

**Új, sejthalált befolyásoló tumor-asszociált fehérjék
azonosítása**

Dr. Szigeti András

PhD tézis

Programvezető: Dr. Balázs Sümegi, egyetemi tanár

**Pécsi Tudományegyetem,
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet**

Pécs

2007.

Bevezetés

Tumor asszociált fehérjéket világszerte kutatnak, hogy mind jobban megérthessük a daganatok kifejlődését és növekedését, ezáltal lehetőséget nyitva specifikusabb és hatékonyabb kezelések kifejlesztésére. A mi munkacsoportunk is számos ilyen fehérjét vett górcső alá, így például a hem-kötő fehérje 2 / SOUL-t vagy a 16.2-es hő sokk fehérjét (HSP16.2). Ebben a tanulmányban e két fehérje sejthalálra kifejtett hatását jellemzem.

A hem és a porfirinek vízben nehezen oldódó nagy kémiai reaktivitással rendelkező fehérjék. Részt vesznek az aktivált szabadgyökök képzésében is károsítva a biológiai folyamatokban szerepet játszó molekulákat. Mivel vízben nehezen oldódnak, citoszólban elhelyezkedő fehérjékhez kötődnek, így elkerülik azt, hogy kicsapódjanak, és aggregátumokat alkossanak. Számos hem-kötő fehérjét karakterizáltak, melyek mikromoláris koncentrációban képesek kötni a hemet. A hem-kötő fehérje 1 (HBP22) minden szövetben jelen van, és nagy affinitással bír a hem és a porfirinek felé. A hem-kötő fehérje 2-t (SOUL) 2002-ben írták le először. Ez a fehérje csak bizonyos szövetekben fejeződik ki, kb. 40%-ban homológja a fent említett HBP22-nek és erősebben képes kötni a hemet és a porfirineket. Bár a SOUL kémiai és fizikai tulajdonságai mára nagyrészt ismertek, biológiai funkciójáról keveset tudhattunk.

A hemet tartalmazó fehérjék szerepe a sejthalál szabályozásában jól ismert. E fehérjék is részt vesznek a szabadgyökök képzésében, oxidációs sérüléseket okozva indukálják a mitokondriális permeabilitás tranzíciót (mPT). A mPT szerepe mind az apoptózisban mind a nekrozisban bizonyított. A belső mitokondriális membránban elhelyezkedő megacsatorna megnyílása különféle ingerhatásokra - mint pl. a megemelkedett kalcium szint - megtörténhet, mely a membrán két oldalán jelenlévő ionkülönbség

kiegyenlítődéséhez, a membrán közötti fehérjék és a mitokondriális mátrix kiáramlásához vezet, amely végsősorban a mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\psi$) eltűnését és a légzési lánc szétkapcsolódását okozza. Számos anyag, így a ciklosporin A is, képes megakadályozni a mPT pórus megnyílását. A membránpotenciál eltűnése maga után vonja a mitokondriális fehérjék – mint pl. a citokróm c – kiszabadulását ezáltal a kaspáz-kaszád aktivációját, mely apoptotikus sejthalálhoz vezet. A mPT pórus megnyílását követő szabályozhatatlan térfogatváltozás a mitokondrium megduzzadásával jár, mely végül a membránok szétszakadásához és nekrotikus sejthalálhoz vezet.

Az NCBI adatbázisban keresve hasonlóságot vettünk észre a LOC51668 és az alfaB-krisztallin között. Ez azért volt érdekes, mert számos kis hőszokk fehérje, mely homológ az alfaB-krisztallinhez, kapcsolódik apoptózisban szerepet játszó más fehérjékhez. Felmerült bennünk, hogy az eddig még nem jellemzett LOC51668 fehérjének hasonló szerepe lehet, mint a kis hőszokk fehérjéknek. A fehérjét, mint lehetséges hőszokk fehérjét, HSP16.2-nek neveztük el.

A hem-tartalmú fehérjékkel ellentétben a hem-kötő fehérjék biológiai funkciójáról ezidáig kevés információ áll rendelkezésre. Éppen ezért részletesen tanulmányoztuk a SOUL fehérje hatását etopozid, hidrogén-peroxid, vagy Taxol által indukált sejthalálban és összehasonlítottuk azt a HSP16.2 által kifejtett hatással. A SOUL fehérjét részletesebben is megvizsgáltuk, így felfedtük szerepét a szabadgyök-képződésben és a mitokondriális permeabilitás tranzícióban élő sejtekben és izolált mitokondriumokon.

Célkitűzések

1. A SOUL fehérje jellemzése, kifejeződésének különböző szövetekben történő meghatározása, homológok keresése, és a sejten belüli eloszlásának feltérképezése.
2. A SOUL fehérje sejthalálra vonatkozó hatásának jellemzése SOUL-t és HSP16.2-t túltermelő sejtekben a sejtek túlélésének vizsgálatával különböző sejthalált okozó szerekkel történt kezelések után.
3. A SOUL és a HSP16.2 fehérje siRNA technikával történt kiütése okozta hatások vizsgálata túltermelő és kontroll sejtekben.
4. A SOUL fehérje hatása a szabadgyök termelésre
5. A SOUL fehérje szerepének ismertetése mitokondriális permeabilitás tranzícióban és a mitokondriális membránpotenciál elvesztésében
6. A ciklosporin A gátolja a SOUL által indukált sejthalált?
7. A SOUL indukálta apoptotikus és nekrotikus sejthalál vizsgálata

Általános következtetések

1. Számítógépes módszerekkel összehasonlítottuk egymással a SOUL fehérje homológjainak és különböző szövetekben talált formáinak elsődleges szerkezetét. A SOUL expresszióját számos humán szövetben és sejtvonalban kimutattuk és igazoltuk, hogy az nem egyformán expresszálódik minden szövetben. Érdekes megfigyelés volt, hogy pl. normál pancreas szövetben kismértékű, míg hasnyálmirigy adenocarcinómában jelentősen emelkedett a SOUL termelődése. Ebből arra lehetett következtetni, hogy a SOUL-nak szerepe lehet a pancreas tumorok kialakulásában. A SOUL intracelluláris lokalizációját fluoreszcens mikroszkóppal és Western blottal mutattuk ki, az endogéne nagy mennyiségben SOUL-t termelő sejtek frakcionálása után. Eredményeink az mutatták, hogy a SOUL döntően a citoplazmában, de kis mennyiségben a mitokondriális frakcióban is megtalálható. Ez utóbbiról később kiderült, hogy nagy jelentősége van.
2. Egy fehérje overexpresszálásával információkat nyerhetünk annak lehetséges funkciójáról. A SOUL és a HSP16.2 hatását úgy vizsgáltuk, hogy különböző sejthalált indukáló szerrel kezeltük a sejteket, majd az élők számát MTT assay segítségével vizsgáltuk. Kiválasztottunk néhány szert, melyek segítségével megvizsgálhattuk a két fehérje hatását. A hidrogénperoxid oxidatív stresszt okoz, a Taxol a microtubuláris rendszert támadja, az A23187 főleg necrosist, míg az Etoposide inkább apoptózist indukál. Kísérleteinkben azok a sejtek, melyek a SOUL fehérjét túltermelték, csökkent ellenállást mutattak a fent említett szerek iránt. Ez a hatás nem volt feltűnő, de statisztikailag

szignifikánsnak bizonyult és minden általunk használt szer esetében megfigyelhető volt. Ezzel szemben, a HSP16.2 vizsgálatok ellentétes eredményeket kaptunk. Rendszerünkben a HSP16.2 megvédte a sejteket a sejthaláltól. Ennek megfelelően találtunk két, korábban nem jellemzett fehérjét, melyek eltérő módon hatnak a sejthalálra folyamatára.

3. A gén-elnomás szélesen elterjedt módszerré vált különféle fehérjék specifikus kiütésében. Az adott fehérje hiányából indirekten következtetni lehet annak funkciójára. Amikor az endogénen expresszálo sejtekben a SOUL-t speciális dsRNA technikával elnémítottuk, a vártaknak megfelelően a vizsgált sejtek ellenállóbbá váltak az általunk használt sejthalált indukáló szerekkel szemben. A gén-elnomásos és a túltermeltetési kísérletek eredménye egyértelműen azt bizonyítja, hogy az általunk találtunk két, korábban nem jellemzett fehérje, különbözőképpen hat a sejthalálra.
4. Azt feltételeztük, hogy a megnövekedett reaktív oxigénradikálok (ROS) képzés –melyet a SOUL által megkötött vasionfelesleg okoz- felelős lehet a megnövekedett sejthalálért. Hogy ezt ellenőrizhessük, a SOUL-t overexpresszálo sejtek vizes és lipid fázisában is megmértük az endogén és az indukált ROS termelést. Nem találtunk arra nézve bizonyítékot, hogy a SOUL-nak in vivo, hatása lenne a ROS termelésre, ezért elvettük a hipotézist. Ezután új hatásmechanizmus után kellett néznünk.

5. A mitokondriális permeabilitás tranzíció szerepe a sejthalálban egy alaposan tanulmányozott jelenség. Hogy a SOUL fehérje lehetséges hatásmechanizmusát megtaláljuk, in vivo és in vitro is vizsgáltuk hatását a mitokondriumra. Először a SOUL-t túltermelő NIH3T3 sejtekben követtük végig a mitokondriális permeabilitás tranzíció változását fluoreszcens mikroszkóppal. Azt találtuk, hogy a SOUL-overexpresszáló sejtekben a membránpotenciál gyorsabban összeomlott, mint a kontroll sejtekben. Ez a felismerés felkeltette érdeklődésünket. Patkány májból izoláltunk mitokondriumot, hogy in vitro vizsgálhassuk a SOUL direkt hatását. Amikor önmagában adtunk rekombináns SOUL-t, akkor a nem fejtett ki hatást a mitokondriumra, de amikor küszöb alatti koncentrációban adtunk hozzá kalciumot, a SOUL mitokondriális permeabilitás tranzíciót provokált. A SOUL ezen hatása koncentrációfüggő volt. A reagens-elegyünkéből pedig mitokondriális proapoptotikus fehérjéket (citokróm c, apoptosist indukáló faktor, endonukleáz b) tudtunk azonosítani, melyek mennyisége a SOUL koncentrációjától függött. Az eredmények bizonyították azon nézetünket, miszerint a SOUL által kiváltott sejthalál elsődlegesen a mitokondriális permeabilitás tranzíció indukciója révén jön létre.

6. A ciklosporin A egy jól ismert és széles körben alkalmazott mitokondriális permeabilitás tranzíció inhibitor. Hozzákötődik a mitokondriális permeabilitás tranzíció pórusban található ciklophyllin D-hez, gátolva ezzel a pórus megnyílását. A SOUL által kiváltott permeabilitás tranzíciót kis koncentrációjú ciklosporin A-val in vivo és in vitro is le tudtuk gátolni. Ez

megegerősíti azt a tényt, hogy a SOUL-nak specifikus hatása van a mitokondriális permeabilitás tranzícióra.

7. Bebizonyítottuk, hogy a SOUL fehérje mitokondriális permeabilitás tranzíciót vált ki és a mitokondriumon keresztül sejthalált okoz. Ismeretes, hogy a mitokondriális permeabilitás tranzíció szerepet játszik mind az apoptózis, mind a nekrozis kialakulásában a stimulus természetétől és súlyosságától függően. A továbbiakban az foglalkoztatott bennünket, hogy a SOUL túltermelése hogyan befolyásolja egyik vagy másik típusú sejthalált. A sejteket különböző szerekkel kezeltük, megfestettük őket propidium jodiddal és FITC- konjugált Annexin 2-vel, hogy elkülöníthessük a kétféle típust. Áramlási citometriával azt láttuk, hogy függetlenül stimulustól, a SOUL túltermelő sejtekben az apoptózis kárára növekedett a nekrozis aránya.

Összefoglalás

Az általunk vizsgált SOUL és HSP16.2 fehérjék bizonyos daganatos sejtekben megjelennek, túltermelőnek. Kísérleteinkkel megpróbáltunk fényt deríteni e fehérjék sejten belüli szerepére. Igazoltuk, hogy mindkét fehérje befolyásolja a sejthalál folyamatát. Különböző rendszerekben vizsgáltuk e két fehérje túltermelésének és elcsendesítésének hatásait. Kísérleteinkkel sikerült egyértelműen kimutatni a SOUL fehérjének a túlélést gátló, míg a HSP16.2 fehérjének a túlélést elősegítő szerepét. További kísérleteimmel a SOUL fehérje részletesebb vizsgálatát tűztem ki célul. Mivel a fehérje túltermelése hátrányos a sejtek számára megpróbáltam kideríteni, milyen módon hat e fehérje a sejthalálra. Többféle méréssel sikerült igazolni azt, hogy a fehérje, bár képes az igen reaktív hem megkötésére, nem emeli különösebben a sejtek endogén reaktív szabadgyök-termelését, tehát nem ily módon befolyásolja a sejthalált. További kísérleteimmel a mitokondriumot vettem célba, hiszen a sejthalál mechanizmusában e parányi sejtalkotónak nagy szerepe lehet. *In vivo* és *in vitro* kísérletekkel is sikerült igazolni, hogy a SOUL fehérje jelenlétében könnyebben indukálható a mitokondriális permeabilitás tranzíció, és azt is, hogy a fehérje hatása ciklosporin A-val gátolható, tehát specifikus. Tekintettel arra, hogy a mitokondriumnak szerepe lehet mind az apoptotikus, mind a nekrotikus sejthalálban, a dolgozatban szereplő utolsó kísérleteket arra terveztem, hogy kiderítsem vajon melyik típusú sejthalál okozza a túltermelő sejtek fokozott pusztulását. Az áramlási citometriás vizsgálatok egyértelműen a nekrotikus sejthalál fokozott jelenlétét igazolták. Összegzésként tehát elmondható, hogy a SOUL és a HSP16.2 fehérjék más-más módon hatnak a sejthalál folyamatára, továbbá az, hogy a SOUL fehérje, bár önmagában nem képes a sejthalál folyamatának elindítására, a mitokondriális permeabilitás tranzíción keresztül érzékenyíti a sejteket a nekrotikus sejthalálra.