

Bacsó Zsolt: ABC transzporterek fiziológiás szerepükben.
OTKA T046945 zárójelentés

Összefoglalás

Az ABC transzporterek az egyik legelterjedtebb ősi fehérjecsalád tagjai. Az élővilág minden fájában feltalálhatóak, így az emlős sejtekben is szerteágazó funkciókkal bírnak. Egyik általunk vizsgált tagjuk az emberi P-glikoprotein (Pgp), melyet a tumorok kemoterápiájának megghiúsításában betöltött szerepe alapján azonosítottak először. Később kiderült, hogy nem csak a tumor sejteknek az előbb említett un. multidrogrezisztenciájáért okolható, hanem fontos szerepe van a sejtekben a káros lipofil anyagok ellen indított stressz válasz kialakításában, illetve a szervezetnek a lipofil xenobiotikumok elleni általános védekezésében is jelentős. Pályázatunkban sikerült azonosítanunk, hogy a Pgp ezen lipofil védekezési mechanizmusa koleszterinfüggő, azaz a különböző lipofil anyagok transzportja koleszterin kapcsolt. Az emlős sejtek membránjának egyik fontos komponense a koleszterin, mely a membrán lipidek egyik tagjával a szfingolipidekkel és különböző fehérjékkel együtt egy funkcionális egységet, úgynevezett raftokat hoz létre a sejtmembránon belül. Munkánkból kiderült, hogy a P-glikoprotein is egy kulcs fehérje a raftoknak, mely erős koleszterin kapcsoltsága alapján várható. Felismertük, hogy a Pgp koleszterin függése nem csak transzport funkciójában jelenik meg, hanem a Pgpnek a sejtmembránhoz kapcsolt szerkezeti vonatkozásában is jelentős. Koleszterinfüggést figyeltünk meg ugyanis a Pgpnek a citoskeletonhoz és a raftokhoz való kapcsoltságában. Projektünkben e jelenségkör általános vizsgálatára alkalmas citometriás vizsgálati módszert fejlesztettünk ki. Felismertük továbbá azt, hogy a Pgpnek a raftokhoz és a citoskeletonhoz való szerkezeti kapcsoltsága a Pgp traffickingjével magyarázható. A sejtmembránban ugyanis kétfajta Pgp molekulát sikerült azonosítanunk, melyeknek endocitózisa különböző sebességű. A koleszterin kapcsolt endocitózis sokkal gyorsabb, mint a koleszterin független. Felismertük továbbá, hogy a Pgpnek ezen két fajtája más-más konformációjú, és ezeknek is koleszterin dependenciájuk van, továbbá a két különböző konformációjú Pgp molekula más fajta citoskeletonális fehérjékkel alakít ki kapcsolatokat a sejtben. Munkánkban tehát megállapítottuk, hogy a Pgp működése hogyan kapcsolódik egy alapvető sejtéletteni funkcióhoz, a fehérjék endocitózisához. Az utóbbi időben egyre több emlős sejt membránfehérjéről sikerült kimutatni funkcionális és szerkezeti koleszterin kapcsoltságot. Munkánk így azon globális képhez vitt közelebb bennünket, hogy miért lehet fontos az emlős sejtek evolúciójában a koleszterin. Szerepe lehet ugyanis a membránfehérjék membránba juttatásában, illetve azok onnan történő elszállításában is. A koleszterin kapcsoltság ráadásul a fehérjék funkcióját is befolyásolja. Ez az elv egy olyan autóregulációt képes biztosítani, ami a fehérjék sejtmembránban tartásában lehet jelentős. Ehhez a megállapításhoz az ABC transzporterek egyik reprezentatív tagjának a sejtek élettanában betöltött szerepének tanulmányozása során jutottunk.

Az alábbiakban a munka évenkénti előrehaladását mutatom be.

Részjelentés 2004:

Vizsgáltuk, hogy mutat-e gátlószert függést a Pgp raft asszociációja. Ezen vizsgálatainkat LS174T colon karcinóma sejtvonalon kezdtük, de a kapott változások nem voltak statisztikailag is megerősíthetőek, a viszonylag nagyszámú ismétlés ellenére sem. Ezen a sejtvonalon egyébként - a fiziológias Pgp kifejeződés jó indikátoraként - alacsony szinten expresszálódik a Pgp, ezért is szeretnénk volna vizsgálatainkat ezzel a sejtvonallal kezdeni. Ezután magas expressziós szintű Pgpvel transzfektált 3T3-MDR1 sejteken vizsgáltuk tovább a Pgp raft asszociációját kioldási kísérletekben. Itt a Pgp raft asszociációjának abszolút értéke egyértelműen megnövekedett a ciklosporin A (CSA, Pgp gátlószert) hatására.

Az UIC2 antitest alkalmazásával ugyanakkor a raft-asszociált Pgp relatív mennyisége mindig nagyobb, mint amit a gátlószert alkalmazáskor tapasztalunk, annak ellenére, hogy ilyenkor a raft-asszociáció abszolút értéke jelentősen megemelkedik.

A Pgp citoszkeletonhoz való rögzítettségét tovább vizsgáltuk 3T3-MDR1 sejteken FRAP technika alkalmazásával. Ezekben a kísérletekben arra voltunk kíváncsiak, hogy az UIC2-vel gátlószert nélkül azonosítható raft-asszociált sejtfelszíni Pgp pool milyen mértékű laterális mobilitást mutat. A citoszkeleton asszociált pool a membrán síkjában ugyanis rögzültséget kell, hogy mutasson. Azt tapasztaltuk, hogy az UIC2 antitesttel azonnal jelölhető Pgp pool (pool I) kisebb hányada mutat laterális mobilitást (immobilis hányad magas), a CSA gátlószert kezelés után az UIC2 antitesttel jelölhető Pgp populációhoz képest (pool I+II). (Pool I-nek nevezzük az UIC2-vel azonnal jelölhető Pgp populációt, míg a pool II a konformáció szenzitív UIC2 antitest-lefedés után megmaradó más, nem konformáció érzékeny antitestekkel (pl. 15D3) azonosítható Pgp populáció.) Ezen vizsgálataink megerősítették a kioldási kísérlettel kapott eredményeinket, miszerint a pool I populáció relatív raft és citoszkeleton asszociáltsága magasabb, mint a pool II-é, vagy a pool I+II-é. Laterális diffúzióbeli dinamikai különbséget, ugyanakkor nem tudtunk kimutatni. Ezt annak tulajdonítottuk, hogy a Zeiss konfokális mikroszkópos rendszerünk jelenleg használt verziója a kinetikai vizsgálatokban kisebb érzékenységet mutat.

Kolokalizációs vizsgálatokban megerősítettük a Pgp és a caveolin-1 caveola marker (raftokkal analóg detergens rezisztenciájú membrán mikrodomén) kolokalizációját 3T3-MDR1 sejteken. Igaz, hogy a mutatott kolokalizáció csak részleges, és a sejtfelszínen igen nagy mennyiségű szeparált caveolin-1 és Pgp fehérjét is találtunk. Ennek a további jelentőségét vizsgáljuk.

A fentebb leírt eredményeink kiértékelése és rendszerezése folyamatban van.

Részjelentés 2005:

A Pgp fehérjék egy része megtalálható a citoplazma membrán specializált raft régiókban és citoszkeletonális elemekhez kapcsolódik, melyet korábbi munkáink során mutattunk ki. Azt is megmutattuk, hogy a Pgp fehérjéknek két populációja létezik a sejtek felszínén, melyek különböző mértékben kötik az UIC2 antitestet. A pool I-nek nevezett csoport azonnal megköti az UIC2-t, míg a pool II. csak kívülről adott Pgp szubsztrátok jelenlétében mutat antitestkötődést. Munkáink során megállapítottuk, hogy ez a két csoport különböző módon viselkedett raft és citoszkeleton asszociáció tekintetében: a pool I zöme raftokban található és citoszkeleton rögzített. Ezen vizsgálatokhoz detergens rezisztencia kinetikai kísérleteket és FRAP méréseket alkalmaztunk. Kérdés volt, hogy a pool I és pool II. csoportokat biokémiaiilag is tudjuk-e azonosítani. Ezeket a vizsgálatokat hagyományos centrifugációs raft azonosítással végeztük. A kísérletek előző kísérleteinkkel összhangban a pool I fokozottabb mértékű raft kompartmentben való feldúsulását eredményezte Pgp expresszáló 3T3-MDR1, KBV-1 és rezisztens AD2780 sejteken.

Az előzőekben morfológiailag részleges kolokalizációt mutató Pgp és kaveolin fehérjék citoplazma-membránbeli részleges együttállását biokémiaileg immun-precipitációval sikerült alátámasztanunk. A fehérjéket Western-blottal azonosítva, mind a kaveolin, mind a foszfo-kaveolin a Pgpvel együtt fokozott mennyiségben volt található a vizsgált sejtek raft frakciójában.

Korábban LS174T colon karcinóma sejteken végzett vizsgálatainkban a Pgp és a CD44 molekuláris közelségét sikerült kimutatnunk fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) mérésekben, mely a Pgp raftokban történő megjelenését valószínűsítette már akkor. Mostani vizsgálatainkban konfokális mikroszkópiával tanulmányoztuk a CD44 fehérjének, mint sejtfelszíni raft markernek a Pgp fehérjéhez képest mutatott eloszlását más sejtekben is. Mind KBV-1 epiteliális mind AD2780 mdr-rezisztens ovárium tumor sejtekben is azt találtuk, mint amit előzőekben az LS174T sejteken, miszerint a Pgp részleges kolokalizációt mutatott a CD44-el. Kimutattuk továbbá azt, hogy migrációra készített sejtek felszínén a Pgp fehérjék sejten belüli eloszlása a sejtek mozgási irányának megfelelő elülső póluson szaporodik fel, hasonlóan a CD44 fehérjéhez. Ezzel kapcsolatban érdekes, hogy a kaveolin fehérjék zöme ugyanakkor a sejtek hátsó pólusára koncentrálódott, és csak kevés kaveolin maradt a Pgpvel együtt a mozgást végző sejtek elülső pólusán.

Mind az UIC2 Pgp funkciót gátló antitest, mind egy nem gátló 15D3 antitest, további az elsődleges antitestek elleni másodlagos antitestek alkalmazása esetén aggregálja a sejt felszíni Pgp fehérjéket. A Pgp fehérjék ilyen módon előidézett sejt felszíni aggregációja jelentős mértékben növeli a Pgp fehérjéknek a raftokban történő megjelenését és a citoskeletális elemekhez való rögzítettségét. Festék akkumulációs Pgp funkcionális vizsgálatokkal megvizsgáltuk, hogy a Pgp fehérjék aggregációja befolyásolja-e működésüket. Kísérleteink negatív eredménnyel zárultak, sem az UIC2 antitest gátlása nem fokozódott tovább, sem a 15D3 antitest nem mutatott Pgp gátlást másodlagos antitesttel való keresztkötés alkalmazásakor, így valószínűsíthető, hogy a Pgp aggregáció nem változtatja meg lényegesen azok funkcióját.

Ehhez hasonló negatív eredményt hozott egy koleszterin ellen kifejlesztett antitest Pgp funkcióra gyakorolt hatásának a vizsgálata is. Igaz, hogy ennek háttérében az antitest nálunk mutatott kis aviditása állt, ugyanis ezekben a kísérletekben az alkalmazott antitestnek sejtjeinkhez való kötődése minimális mértéket mutatkozott.

Az UIC2 antitest konformáció szenzitív Pgp gátló antitestként működik. Az UIC2 gátló hatása bizonyos Pgp gátlószerekkel fokozható (pl. CsA). In vitro kísérleteinkben azt találtuk, hogy bizonyos szubsztrátok BSA (bovine serum albumin) mosással történő eltávolítása után az UIC2 antitest továbbra is a Pgphez kötődve marad, és megtartja Pgp inaktíváló hatását is. Más szubsztrátok ellenben BSA mosás segítségével eltávolíthatóak. Eltávolításuk után az UIC2 antitest kötődése megszűnik, és értelemszerűen ez a gátló működés megszakadását eredményezi a Pgp szubsztrátok ezen csoportja esetében. Az UIC2 antitest gátló hatását in vivo is jelentős mértékben potenciózza a CsA, mely a klinikai immunszupresszióban széles körben alkalmazott gyógyszer. Ezt teljes egér vérben történő UIC2 kötődési és gátlási kísérletekkel sikerült először kimutatnunk. Ezek után egerekbe oltott tumor xenograftokon végzett kísérletekben in vivo is sikerült ezt a gátlást kimutatnunk. Azt találtuk, hogy az UIC2 in vivo Pgp gátló hatásának a kifejtéséhez elegendő egy az önmagában hatásos CsA koncentrációnál jóval kisebb mennyiségű CsA-val potenciózni az UIC2 Pgp-re történő felkötődését. A kötődés, szövettani analízist végezve tartósnak bizonyult, és az antitest kötődés gátló hatását kifejtette, melyet lézer szkennig citométerrel elvégzett kvantitatív szövettani vizsgálatokkal támasztottunk alá. Az UIC2 antitestnek egy gyógyszerként használatos szerrel való együttes alkalmazása (CsA) felveti a Pgp-t hordozó tumorok megfelelő mértékű in vivo antitesttel történő célzott gátlhatóságának lehetőségét emberekben is, mely diagnosztikai és terápiás szempontból is fontos lehet. Ezen utóbbi anyagunkat

poszteren bemutattuk az Amerikai Sejtbiológiai Társaság 45. éves kongresszusán, illetve a kéziratot közlésre elküldtük.

Pályázatunkban kooperáció keretén belül beterveztünk, egyedi letapadó sejteken végzendő statisztikailag releváns kvantitatív citometriás analízisek elvégzését nagymértékben megkönnyíti az ebben az évben GVOP nagyműszer pályázat keretében elnyert tárgylemez alapú citométerünk, mely műszert már az előző pontban elvégzett kvantitatív szövettani analízisek során alkalmaztunk is.

Részjelentés 2006:

Detergens rezisztencia vizsgálataink során azt a kérdést feszegettük, hogy ha egy fehérje kapcsolódik egy másik fehérjéhez, és a kérdéses fehérjéről ismert, hogy detergens rezisztencia vizsgálatokba raft asszociációt mutat, vajon előidézi az első fehérje mesterséges aggregálása a másik fehérje detergens rezisztenciáját is, vagyis a másik fehérje raft és citoskeleton asszociációja is követi-e az első partner aggregációját. Ezt a kérdést az előzőekben már általunk vizsgált CD44-Pgp vonatkozásában vizsgáltuk meg, és azt találtuk, hogy valóban a Pgp keresztkötve a CD44 kioldása csökkent, azaz a CD44 követte a raftokba a Pgp-t.

Megvizsgáltuk azt, hogy a Pgp milyen ütemű recirkulációt mutat a sejtek felszínén a pool I és a pool II vonatkozásában. Azt az eredményt kaptuk, hogy az UIC2 antitesttel jelzett pool I sokkal gyorsabban hagyja el a sejt felszínét, mint a 15D3 monoklonális ellenanyag segítségével jelölhető pool I és pool II együttesen. Érdekes módon a sejt felszínre kijutó Pgp molekuláknak a száma pedig az idő függvényében folyamatosan csökkent.

Megvizsgáltuk többféle sejt vonalon, hogy a Pgp UIC2-vel azonosítható pool I és a pool I és II különböző detergens rezisztenciát mutat-e. Azt találtuk, hogy nem csak a már korábban azonosított LS174T és a 3T3-MDR1 sejteken van meg ez a különbség, hanem a megvizsgált további minden sejt vonalon is ezt tapasztaltuk.

Beállítottunk fluoreszcensen jelzett phalloidin és DNase mérésén alapuló citometriai mérést, mely segítségével az F-aktin és a G-aktin mennyisége, illetve ezek aránya határozható meg a sejtekben mind áramlási citométer segítségével, mind konfokális mikroszkópia felhasználásával. Ennek segítségével meghatároztuk különböző aktin citoskeletonot módosító szerek hatását és ezek jól követték a várt G-aktin/F-aktin arány változási hatásokat. A módszerrel egy blebistatin (myosin 2 inhibitor) nevű anyag hatását is megvizsgáltuk az aktin citoskeleton állapotára. A myosin 2 gátlónak a vizsgálata azért merült fel, mert elképzelhető a Pgp-nek a traffickingben szerepet játszó partnereként. Vizsgálatunkban azonosítani tudtuk a blebistatinnak az aktin citoskeleton depolimerizáló hatását. Meg kell még vizsgálnunk, hogy a blebistatin vajon befolyásolni képes-e a Pgp detergens rezisztenciáját. Ugyanakkor a blebistatin a Pgp pumpa funkciójára nem volt hatással.

Részjelentés 2007:

Pontosítottuk a pool I és pool II recirkulációja vonatkozásában kapott eredményeinket. A raft kapcsoltabb UIC2 jelölt pool I Pgp populáció, sokkal gyorsabban internalizálódik, mint a sejt felszínen inkább perzisztáló pool II populáció, melynek jelentős részét a 15D3 antitesttel tudtuk megjelölni. A 3T3-MDR1 sejtek CSA (ciklosporin A) Pgp gátlószerekkel történő előkezelése az internalizáció sebességét még tovább fokozta, míg a 15D3 antitest jelzett pool II internalizációját érintetlenül hagyta. A két Pgp pool különböző sebességű internalizációjából származó különböző sebességű sejt belüli megjelenését is követtük antitest jelöléssel. Ezzel a módszerrel is azt kaptuk, hogy a pool I Pgp jobban felszaporodik a sejt belül, mint a pool II.

Ez a munkánk felvet egy további lehetőséget, amit még meg kívánunk később majd vizsgálni, miszerint az irodalom által leírt, de igen nehezen reprodukálható UIC2 okozta Pgp gátlás

tulajdonképpen a sejtfelszíni Pgp molekulák internalizációján keresztül érvényesül. Erre utalt néhány korábbi mérési adatunk is, illetve az irodalom tüzetesebb átvizsgálása is.

Ezen a vonalon megvizsgáltuk még azt, hogy milyen a Pgp poolok recirkulációjának koleszterin függése. Itt is az előző internalizációs különbséget megerősítő eltérést kaptunk. Illetve egy másik internalizációt követő módszerrel is megerősítettük eredményünket. A sejtfelszíni antitestek savas leoldásával is követtük az internalizáció mértékét, és azzal a módszerrel is megerősítettük az internalizáció sebességének a különbségét.

Az internalizáció sebességbeli eltérés felvetette annak a lehetőségét, hogy a két sejtfelszíni Pgp pool más-más fehérje környezettel rendelkezik. A poolok aktin kötöttségét már előzőekben többféle módszerrel (mikroszkópia, F-aktin-G-aktin arány mérés, és detergens rezisztencia mérés) igazoltuk, így aktint kötő fehérjéket szeretnénk volna azonosítani, melyeknek esetleg szerepe lehet a recirkulációs különbségek létrehozásában.

Ehhez először a két antitesttel (UIC2 a pool I, míg 15D3 a pool II kimutatására) külön-külön immunprecipitáltuk a pool I és a pool II Pgp poolt. A két mintát külön-külön megfuttattuk 2D elektroforézissel, majd különbséget kerestünk egy speciális program segítségével a két gélen azonosítható fehérjék összetételében. Ezt a munkát a Debreceni Orvostudományi Centrum ÁOK, Humángenetikai Intézetéből Birkó Zsuzsával kolaborációban végeztük. Sikerült különbséget találnunk a két gélen az immunprecipitátumok között, így a gélről több fehérje foltot sikerült azonosítanunk, és kívágnunk további vizsgálatra.

A fehérjék azonosítását Janáky Tamással kooperációban végeztük, a Szegedi Orvostudományi Egyetem, Orvosi Kémiai Intézetéből. A differencia 2D-elektroforézissel megtalált fehérje foltokat tömegspektrométerrel végrehajtott protein fragmens analízis segítségével karakterizáltuk. Így sikerült a két pool között különböző fehérje összetételű protein komplexeket azonosítanunk a sejtmembránhoz kötődve. A vizsgálat eredményeképpen a két Pgp poolhoz kötődve több citoszkeleton asszociált fehérjét is találtunk, több aktint kötő fehérjét, egy intermedier filamentum fehérjét és több további fehérjét, melyek jelentőségét még pontosan nem ismerjük.

UIC2 immunprecipitációval azonosított pool I, raft Pgphez kapcsolva, többek között, a következő fehérjéket azonosítottuk (zárójelben az alternatív fehérje nevek): Kaptin; Vimentin; Protein disulfide-isomerase A6 precursor (Thioredoxin domain-containing protein 7); Protein disulfide-isomerase precursor (Prolyl 4-hydroxylase subunit beta) (Cellular thyroid hormone-binding protein) (p55) (Erp59); Nucleobindin-1 precursor; Beclin-1 (Coiled-coil myosin-like BCL2-interakting protein).

15D3 immunprecipitációval azonosított pool II, nem-raft Pgphez kapcsolva, többek között, a következő fehérjéket azonosítottuk: Annexin A2 (Annexin II) (Lipocortin II) (Calpaktin I heavy chain) (Chromobindin-8) (p36) (Protein I) (Placental anticoagulant protein IV) (PAP-IV); Twinfilin-1 (Protein A6); ES1 protein homolog, mitochondrial precursor; Septin-11; Serpin H1 precursor (Collagen-binding protein) (Colligin) (47 kDa heat shock protein) (Serine protease inhibitor J6); Polymerase delta-interakting protein 2; Protein FAM50A (XAP-5 protein).

A talált aktin kötő fehérjék egy további elképzelést vetettek fel. A kaptin egy aktin polimerizációt elindító aktin kötő fehérje, sőt a vimentin esetében is ismert, hogy képes citoszkeleton polimerizációt elindítani. Ezeket a fehérjéket az UIC2 antitesttel a pool I Pgpvel találtuk asszociálva. A pool II Pgpk esetében viszont az annexin II és a twinfilin aktin kötő fehérjéket találtuk túlsúlyban. Ezen utóbbi fehérjék az aktin polimerizáció gátlói. Így szeretnénk volna megvizsgálni, hogy az UIC2-vel immunprecipitált membrán vezikulák vajon nem indítanak-e el egy fokozott aktin polimerizációt, a 15D3-al immunprecipitált Pgp tartalmazó membrán vezikulákhoz képest. Ha különbséget tapasztalunk, akkor a pool I és a pool II Pgpk más sebességű aktin polimerizációt indukálnak. A kísérleteket a Pécsi Egyetem Biofizikai Intézetével kollaborációban Nyitrai Miklóssal végeztük. Az elképzelésünket sajnós

nem sikerült megerősítenünk, de érdekes mellékletként viszont azt találtuk, hogy a triton-X-100 detergens bimodálisan befolyásolja az aktin polimerizációt (folyóirat cikk körvonalazódik).

A továbbiakban immunfluoreszcenciás jelölés segítségével konfokális mikroszkópiával megerősítettük a kaptin és az annexin II fehérjéknek 3T3-MDR1 sejtekben való expresszióját és a Pgpvel való részleges kolokalizációját. Ezen két fehérje és a Pgp asszociációját még Western-blottinggal is szeretnénk megerősíteni.

Eredményeink közlése folyóiratcikk formájában folyamatban van, az anyagból legalább 2 cikk körvonalazódik, illetve ezen eredményeinket már több tudományos konferencián előadtuk (az amerikai posztert mellékeltem):

Raftok legyünk vagy szabadok (előadás)

Bacsó Zsolt¹, Goda Katalin¹, Fenyvesi Ferenc² és Szabó Gábor¹

Debreceni Orvostudományi Centrum

¹Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

²Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszertechnológiai Tanszék

VII. Magyar Genetikai Kongresszus

XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok

Balatonfüred, 2007. április 15-17.

47th American Society of Cell Biology Annual Meeting

Washington DC, USA, December 1-5, 2007

„Rafting till freedom... ..or freedom until rafting” (poszter)

Zsolt Bacsó¹, Katalin Goda¹, Zsuzsa Gutay², Henrietta Nagy¹, Zoltán Szabó¹, Fenyvesi Fenyvesi², Zsuzsa Birkó³, Tamás Janáky⁴, Sándor Bíró³ and Gábor Szabó¹;

¹Department of Biophysics and Cell Biology, University of Debrecen, ²Department of Pharmaceutical Technology, University of Debrecen, ³Department of Human Genetics, University of Debrecen, ⁴Department of Medical Chemistry, University of Szeged” c. poszterünkkel vettem részt.