

A „rosszul feltekeredett fehérje válasz” (UPR) és az mTOR útvonal kapcsolatának vizsgálata endoplazmás retikulum stressz esetén

Holczer Marianna, BME VBK VI.
holczermaris@gmail.com

Az eukarióta sejtek legfontosabb feladata a genetikai integritásuk megőrzése. A hibásan feltekeredett fehérjék felhalmozódása az endoplazmás retikulumban (ER) aktiválja a „rosszul feltekeredett fehérje választ” (UPR = unfolded protein response). Az UPR elsődleges célja a sejt állapotának a korábbi vagy egy új homeosztatisz állapotba történő visszaállítása egy autofágia-függő önmegsejtés által, míg a túlzott stressz apoptotikus sejthalált indukál. A sejtnövekedés fő szabályozójának, az mTOR útvonalnak (mammalian target of rapamycin) az UPR-rel kölcsönhatásban pro-apoptotikus szerepe van. Az UPR és az mTOR közötti kapcsolat már bizonyított, de hogy ezek az utak hogyan befolyásolják az élet-halál közti döntés dinamikáját ER stressz esetén, még ismeretlen. A szabályozási hálózatok között levő lehetséges találkozási pontok ugyanis alapvetően határozzák meg a sejt egészének hibátlan működését, ezért kiterjedt orvosi biológiai és gyógyszeres kutatások irányulnak rájuk, például az új rák terápiák keresésében is fontosak lehetnek.

A kísérleteink során célul tűztük ki az UPR-indukált Gadd34 szerepének a megértését az UPR-mTOR útvonalak keresztkezelésében ER stressz során. Ezt a kérdést különböző molekuláris biológiai eszköz segítségével vizsgáltuk.

Kísérleteinkhez humán sejtvonalat (HEK293) kezeltünk ER stresszrel (thapsigargin), mTOR gátlóval (rapamycin) vagy autofágia inaktívátorral (3-metiladenin).

Vizsgálataink megerősítették, hogy az mTOR gátlása (autofágia aktiválása) ER stressz esetén növelte a sejtek életképességét az autofágia indukciója által. Azt vettük észre, hogy a Gadd34, amely az egyik kulcseleme az UPR útvonalnak, képes rá, hogy pozitívan hasson a sejtek túlélésére ER stressz esetén. Elképzelésünk szerint az mTOR és az UPR szinergizmusa, a túlélést segítő autofágia és a sejthalált indukáló apoptózis közötti döntésben keresztkezelési szabályozó elemekkel és visszacsatolási hurkokkal valósul meg ER stressz hatására. Új autofágia indukort is alkalmaztunk a kísérletek során (rezveratrol), és annak hatását is vizsgáltuk az mTOR-UPR keresztkezelésre.

Ebben a témában még nem született publikáció a munkacsoportunk által.

Témavezető(k): Dr. Kapuy Orsolya, egyetemi adjunktus, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet

Assessment of efficacy and quality of exosome isolation by size exclusion chromatography

Gabrielsen Andrea, SE EM IV.

Onódi Zsófia, SE AOK V.

andregabrielsen@hotmail.com, zsofia.onodi@gmail.com

Background: Exosomes may play a key role in intercellular communication and they may hold therapeutic importance. To study exosomes we need an efficient method to isolate pure samples of exosomes from blood plasma, a subject under constant debate. We have previously found exosome isolation by ultracentrifugation (UC) to be inefficient and isolates to be substantially contaminated with albumin. Size exclusion chromatography (SEC) is a novel method that could potentially replace UC, however, its efficiency and the purity of the isolates have yet to be established and optimized.

Aim: To evaluate the efficiency and quality of exosome isolation from rat plasma using different SEC media.

Methods: Blood plasma from male Wistar rats was loaded onto each of the following gravity-eluted columns: Sepharose 2B, Sepharose CL-4B and Sephacryl S-400, each with 10 ml bed volume. In a separate experiment, blood plasma was loaded onto a Sephacryl S-400 column with a bed volume of 120 ml. Western blot (WB) was used to assess the amount of exosome markers TSG101 and CD63 in the collected fractions. The degree of purity was examined by loading equal amount of protein and the subsequent detection of exosome markers and albumin. Equal volume loading was performed to estimate the efficiency of isolation. Size distribution was measured by dynamic light scattering (DLS) or Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Transmission electron microscopy (TEM) was used to demonstrate the presence of exosomes.

Results: Equal protein loading of the WB showed detection of exosomal markers without significant impurities in the Sepharose CL-4B and Sephacryl S-400 columns, however, with the Sepharose 2B column, exosomes co-eluted with albumin. Low separation efficiency and high degree of albumin was detected in exosome-containing fractions. DLS assay detected particles corresponding to exosomes confirming the WB findings. The large-scale experiment also showed low efficiency of isolation.

Conclusion: SEC yields pure exosomal samples with low separation efficiency in the Sepharose CL-4B and Sephacryl S-400 columns. Increasing the bed volume did not increase the isolation efficiency, which could indicate a possible albumin-exosome interaction. SEC provides pure exosome isolates that can facilitate the further study of exosomes in experiments where high purity, but not high efficiency, is required.

Témavezető(k): Tamás Baranyai, PhD student, Department of Pharmacology and Pharmacotherapy; Zoltán Giricz, senior research fellow, Department of Pharmacology and Pharmacotherapy