

DEBRECENI EGYETEM

University of Debrecen



Universitas Debreceniensis

ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM



TDK KONFERENCIA

2010/11.

Kiss Máté

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet

A POLI-ADP-RIBOZILÁCIÓ SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA SAOS SEJTEK DIFFERENCIÁLÓDÁSÁBAN

Az oszteosarkóma a leggyakoribb primer csontdaganat, amelyre jellemző a tumor sejtek direkt csontszövet-, illetve osteoid termelése. Vizsgálatainkat SAOS-2 sejtvonalon végeztük, mely egy osteosarkóma eredetű osteoblast epitél sejtvonal. A SAOS-2 sejtek részletesen jellemzettek, magas osztódási rátával bírnak, alkalikus foszfatáz aktivitásuk révén megfelelő médium jelenlétében képesek kalcium depozícióra, így módon megfelelő modellrendszernek tekinthetők a csont differenciálódás vizsgálatára. A poli-ADP-riboziláció egy reverzibilis poszttranszlációs módosítás. A poli(ADP-ribóz) polimeráz-1 (PARP-1) aktiválódását követően szubsztrátját, a NAD⁺-ot nikotinamidra és ADP-ribózra hasítja, melyet fehérjék glutamát és aszpartát oldalláncácahoz kapcsolva hosszú, elágazó polimert szintetizál. A poli(ADP-ribóz) polimerek életideje nagyon rövid, lebontásukért a poli(ADP-ribóz) glikohidroláz (PARG) felel. A poli-ADP-ribozilációnak kitüntetett szerepe van a genomi integritás fenntartásában, DNS hibajavításban, a sejthalál és egyes transzkripciók folyamatok szabályozásában. Vizsgálatainkban arra kerestünk választ vajon ez a dinamikus fehérjemódosítási folyamat szerepet játszik-e a csontdifferenciálódás szabályozásában. Korábban, a PARP-1 és PARG fehérjék stabil géncsökkentését lenti vírus részecskéivel valósítottuk meg. A csökkentés hatékonyságát, mRNS szinten, hagyományos és kvantitatív PCR-al is vizsgáltuk. Megfelelő antitest hiányában a fehérjék deplécióját funkció-kiesési vizsgálattal elemeztük immuncitokémiával és Western blott technikával. Hidrogén peroxiddal kezelt sejtekben jelentős poli(ADP-ribóz) polimer képződést tapasztaltunk. A polimerek lebontása jelentős mértékben elhúzódtott a PARG hiányos SAOS sejtekben. A csontdifferenciálódási folyamatot 12 napon keresztül követtük nyomon aszkorbinsav-2-foszfáttal, D-vitaminnal, dexametazonnal és béta-glicerol foszfáttal kiegészített médium jelenlétében. A differenciálódás során vizsgáltuk az alkalikus foszfatáz aktivitásának változását valamint a kalcium depozíciót kvalitatív, AlizarinRed festési eljárással és kvantitatív kalcium kolorimetriás mérő módszer segítségével.

Témavezető: Dr. Erdélyi Katalin

AZ RXR ALFA ÉS RAR ALFA MAGRECEPTOROK LIGANDFÜGGŐ DEGRADÁCIÓJA - EGY ISMERT JELENSÉG ÚJ SZEMSZÖGBŐL

A magreceptorok családjába tartozó retinoid X receptor (RXR) és retinsav receptor (RAR) meghatározó szereppel bír az egyedfejlődésben, differenciációban, és a szervezet homeosztázisában. Mindkét receptornak alfa, béta, és gamma izotípusa létezik, amelyek különböző szöveti expressziós mintázatot mutatnak. Endogén ligandjaik A-vitamin (retinol) származékok: all-transz retinsav (RAR agonista) és 9-cisz retinsav (RAR, RXR agonista).

Az RXR számos magreceptorral heterodimert képez. Az RXR/RAR heterodimer a retinoidok indukálta jelátvitel legfontosabb funkcionális egysége. Fontos annak megértése, hogy a hormonális szignál hogyan szűnik meg, azaz a ligand által aktivált receptor kikapcsolása hogyan történik. Az RXR és RAR ligandkötést követő degradációja a proteaszmákban valószínűleg fontos szabályozója a retinoid szignál nagyságának és időtartamának.

Mindaddig a degradáció tanulmányozásának leginkább használt módja a Western blot technikával végzett fehérjekimutatás volt, amely azonban viszonylag nehezen kvantifikálható, és a sejtek halmazainak átlagáról ad információt. Mi egy olyan módszer beállítását tűztük ki célul, amiben egyes sejtsoportok vagy akár az egyes sejtek szintjén közelíthető meg ez a folyamat. Áramlási citométeren vizsgáltuk különböző idejű ligandkezelésekkel a degradáció időbeli lefolyását. Ehhez RXR alfa, illetve RAR alfa zöld fluoreszcens fehérjével (GFP-vel) fuzionáltatott formáját stabilan expresszáló HeLa sejtvonalakat használtunk. Így a sejtek fluoreszcencia intenzitásának változása megmutatja a degradáció lefolyásának időfüggését. A sejtek mRNS szintjének mérésével azt is megvizsgáltuk, vajon a receptorok degradációjának hatására változik-e szintézisük mértéke.

Eredményeink azt mutatják, hogy az agonista kezelést követő degradáció a két receptor esetében eltérő dinamikájú, körülbelül az első 12 órában a legintenzívebb. A receptor aktiváció 24 órán belül nem okozott lényeges változást az mRNS szintekben.

A beállított módszer lehetőséget biztosít arra, hogy megvizsgáljuk a degradációs folyamat részleteit, és az abban szerepet játszó tényezőket meghatározzuk.

Témavezető: Prof. Dr. Nagy László, Brázda Péter