

A NAD(P)H-citokróom b5 oxidoreduktáz fehérje-interakciói az endoplazmás retikulumban: szerepe a lipotoxicitás által kiváltott gyulladási folyamatok kivédésében

Monostory Katalin

MTA Természettudományi Kutatóközpont

Kutatási terület:

- a gyógyszer-metabolizmusban résztvevő citokróom P450 (CYP) enzimek működése
- CYP gén expresszió szabályozása
- CYP enzimek működésének gátlása
- CYP mutációk kimutatása
- metabolikus gyógyszer-interakciók vizsgálata
- egyéni gyógyszer-metabolizáló képesség megállapítása



Csala Miklós

Semmelweis Egyetem

Kutatási terület:

- az endoplazmás retikulum (ER) redox metabolizmusa
- az ER-stressz befolyásolása
- a mikroszomális elektrontranszfer útvonalai
- inzulinrezisztencia és β -sejtdiszfunkció
- szabad zsírsavak patológiás szerepe és ennek mechanizmusai (lipotoxicitás)
- a zsíracil-KoA-deszturáció citoprotektív hatása



MedInProt Fehérjetudományi Kiválósági Együttműködési Program

Bevezetés

Az ER-membránban zajló deszturációt végző enzimek, valamint a gyógyszer-metabolizmusban meghatározó citokróom P450 (CYP) enzimek között szoros kapcsolat valószínűsíthető. A sztearil-KoA-deszturáz (SCD1) – a CYP monooxigenázokhoz hasonlóan – a citokróom b5 (b5) és b5-reduktáz (b5R) közvetítésével NAD(P)H-tól kapja az elektronokat. A tisztázatlan funkciójú, citoszolban oldott formában található NAD(P)H-citokróom b5 oxidoreduktáz (Ncb5OR) fehérje b5-szerű és b5R-szerű doméneket tartalmaz. Ez alapján feltételezhető, hogy az Ncb5OR részt vesz az ER-ben zajló elektrontranszferben.

Célkitűzés

Annak kiderítése, hogy az Ncb5OR kölcsönhat-e az SCD1-el, valamely CYP-el, esetleg mindkét típusú enzimmel; azaz közreműködik-e a zsírsav-deszturációban, illetve a gyógyszer-metabolizmusban.

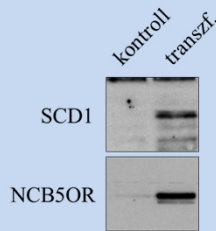
Alkalmazott modell-rendszerek

- 1) SCD1-et és/vagy CYP izoenzimet (pl. CYP2C19, CYP3A4) termelő HEK293 (humán embrionális vese sejtvonal) sejtek, amelyekben vizsgálhatók az egyes enzimaktivitások b5- és/vagy Ncb5OR-kotranszfektálás, illetve géncsendesítés hatására;
- 2) Humán májszövetből preparált mikroszóma, amelyben lévő enzimek működése kofaktorok (NADH, NADPH), citoszol-komponensek vagy tisztított Ncb5OR fehérje adagolásával befolyásolható;
- 3) Szuperszómak, amelyek egyféle CYP izoenzimet tartalmaznak az egyes elektronközvetítő fehérjékkel kombinálva, így alkalmasak a kívülről hozzáadott Ncb5OR szerepének tisztázására.

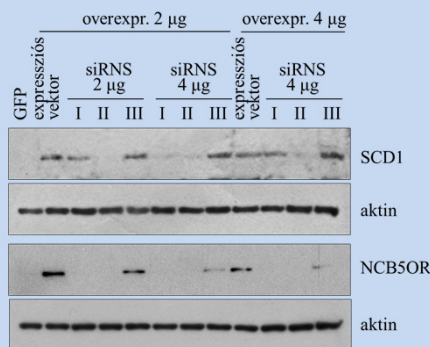
Eddigi eredmények

SCD1 és Ncb5OR túlermelletése HEK293T sejtekben.

A HEK293T sejtek endogén SCD1 és Ncb5OR fehérjetartalma Western blottal alig detektálható (kontroll). A megfelelő inszertet tartalmazó expressziós vektorral transzfektált sejtek lizátumaiban (transzf.) a vártan megfelelő méretű fehérjék specifikus antitestekkel jól kimutathatók.

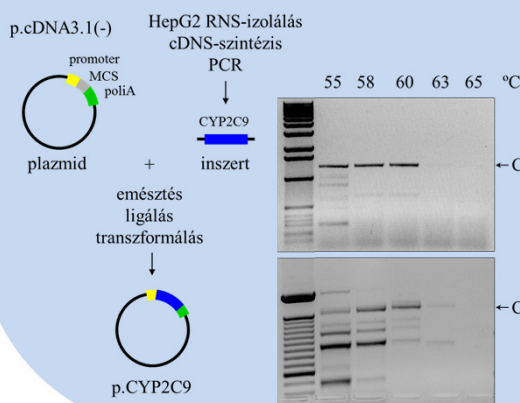


SCD1 és Ncb5OR expressziójának csendesítése transzfektált HEK293T sejtekben.
Az SCD1, illetve Ncb5OR fehérjét termelő, expressziós vektorral transzfektált HEK293T sejtek lizátumaiban (expressziós vektor) a megfelelő fehérjék Western blotl jól detektálhatók. A különböző típusú (I, II, III) és mennyiségű (2 vagy 4 μ g) siRNS-sel transzfektált sejtekben a fehérjeexpresszió csökkenése észlelhető. Az analízis fehérjék egyenlő mennyiségének ellenőrzésére kontrollként β -aktin elleni elsődleges antitesttel is elvégeztük az immunoblot vizsgálatot.



CYP izoenzimek termeltetésére alkalmas, expressziós konstruktok előállítás.

A CYP kódoló szekvenciákat tartalmazó cDNS-eket HepG2 sejtek mRNS-éből állítjuk elő reverz transzkripcióval, majd klónozásra alkalmas inszerteket amplifikálunk, amelyeket p.cDNA3.1(-) vektorba ligálunk. A jobb oldali ábra egy cDNS mintából készült gradiens PCR agaróz gélelektroforézissel elválasztott termékeit mutatja.



A kiválasztott CYP-ek és az SCD1 aktivitásának mérése.

A CYP izoenzimek aktivitása szelektív szubsztátok (tolbutamid, midazolam) metabolizmusa alapján mikroszóma frakcióban (ER) jól mérhető, azonban HEK293 sejtekben nem volt detektálható. A CYP izoenzimek endogén expressziója rendkívül alacsony, és induktorokra sem fokozódik. Beállítottuk és teszteltük az analitikai módszert, amellyel a sejtek komplex lipidjeinek zsírsavprofilját meg tudjuk határozni.

További feladatok

- Koexpressziós konstruktok létrehozása, HEK293T sejtek transzfektációja;
- CYP és SCD1 aktivitás mérések kotranszfektált sejtekben és szubcelluláris rendszerekben;
- Tisztított Ncb5OR előállítás E. coli felhasználásával