

***Kalcium szabályozta sejtosztódás és túlélés vizsgálata mielo-eritroid
sejtekben***

című Ph. D. értekezés tézisei

Jánossy Judit

Eötvös Loránd Tudomány Egyetem, Természettudomány Kar
Biológia doktori iskola, Molekuláris sejt- és neurobiológia program

Doktori iskolavezető: Erdei Anna Ph.D., D.Sc.

Program vezető: Dr. Sass Miklós D.Sc.

Témavezetők: Dr. Friedrich Péter és Dr. Tompa Péter

Budapest 2008.

Készült a Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ Enzimológiai
Intézetében, Budapest

BEVEZETÉS

Dolgozatomban a TF-1 sejteken végzett kísérleteink eredményét mutatom be. Ez a humán, hormon-függő, korai, mielo-eritroid sejtvonal modellül szolgálhat a csontvelői eritroid elősejtek jelpályáinak feltérképezéséhez. A vizsgálatok során a $[Ca^{2+}]_i$ -emelő szerek és a kalpain hatását vizsgáltam TF-1 sejteken. Fiziológias körülmények között az eritroid elősejtekben, érési stádiumtól függően, Epo illetve GM-CSF hormonok okozhatnak átmeneti $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést. Az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése hormon-független túléléshez és osztódáshoz vezetett, de eritroid differenciációt nem indukált. Magasabb $[Ca^{2+}]_i$ növekedés apoptózist váltott ki. A kalpain gátlás a TF-1 sejtek érését, és túlélését nem befolyásolta, ugyanakkor a sejtosztódást mérsékelte. Mivel $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés eddig csak elektromosan ingerelhető sejteknél váltott ki túlélési folyamatokat, figyelmünket a jelenség háttérében álló folyamatok feltárására irányítottuk. A dolgozat első felében az ERK1/2 aktiválódását vizsgáltam $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés hatására, mert a növekedési jelek rendszerint az ERK1/2 mitogén aktivált protein kináz (MAPK) aktiválódását okozzák. A dolgozat második felében, arra kerestem választ, hogy a kalcium aktivált neutrális proteáz, a kalpain a sejtciklus melyik fázisában játszik szerepet. Munkámat az Haematológiai és Immunológiai Intézet Molekuláris Sejtbiológiai Osztályának, Szignáltranszdukciós csoportjával szorosán együttműködésve végeztem.

CÉLKITŰZÉSEK

Az intracelluláris Ca^{2+} szint változás számos folyamatot indíthat el, amelyek túléléshez, sejtosztódáshoz, differenciálódáshoz vagy akár sejthalálhoz is vezethetnek. Jelen dolgozatban egy korai mielo-erithroid hormonfüggő sejtvonalon vizsgáltam a különböző Ca^{2+} emelő szerek hatását. Érdeklődésem középpontjában a hormon független túlélés és az osztódáshoz vezető jelátviteli útvonalak, beleértve a kalcium aktiválta neutrális proteáz feltételezett központi szerepe állt. Célom egy olyan rendszer kialakítása volt, amelyben vizsgálható, hogy milyen jelpályák segítségével értelmezi a sejt a különböző Ca^{2+} -jeleket. Munkám során az alábbi kérdésekre kerestem választ:

- Milyen biológiai hatásokat tudunk kiváltani különböző intracelluláris Ca^{2+} emelő szerekkel egy mielo-eritroid sejtvonalon? Milyen mértékű és lefutású jelek szükségesek a biológiai hatás kiváltásához?
- Melyik jelátviteli pálya aktiválódik a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés hatására?
- Miben tér el a különböző kezelésekkel kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés hatására létrejövő ERK/MAPK jelátviteli pálya aktiválódása?
- Milyen szerepet játszik a kalpain a TF-1 sejtek osztódásában és túlélésében?
- A sejtosztódás melyik fázisában feltételezhető m- vagy μ -kalpain aktiválódás?
- Befolyásolja-e a kalpain gátlása az ERK/MAPK $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés által létrehozott aktiválását?

MÓDSZEREK

Sejtvonal jellemzése:

A TF-1 hormon-függő, humán mielo-eritroid leukémia sejtvonalat sejtfelszíni markerek meghatározásával jellemeztük, anti- CD34, CD38, CD33, CD14, CD15, és GPA monoklonális ellenanyagokkal.

A sejtszám változások vizsgálata:

A sejtszám változásokat tripánkéék kizárás módszerrel határoztuk meg. Az élő sejtek arányát MTT teszttel, propidium-jodidos módszerrel is vizsgáltuk néhány esetben.

Az apoptotikus folyamatok vizsgálata:

A kaszpáz-3 aktivitást fluorimetriás módszerrel mértük. A DNS létrát a DNS etidium –bromid tartalmú agaróz gélen való elválasztásával mutattuk ki. A PARP hasítási terméket, illetve az apoptotikus fehérjék (Bcl-2, Bcl-xl és Bax) mennyiségét Western-blot módszerrel vizsgáltuk.

Az intracelluláris szabad $[Ca^{2+}]$ meghatározása:

A fura-2AM festékkel töltött sejtek intracelluláris szabad Ca^{2+} -koncentrációjának változásait spektrofluoriméterrel követtük.

Kinázok és transzkripciós faktorok vizsgálata:

Western-blot analízissel határoztuk meg az ERK1/2 és az Elk-1 aktiválódását foszfo-specifikus ellenanyagok segítségével, míg a c-Fos kifejeződését anti-c-Fos ellenanyaggal követtük.

A sejtciklus változás vizsgálata:

A sejtfázis hányadok időbeli változásait propidium jodidos festéssel követtük, a sejtek egyes fázisokban eltöltött idejét pulzus-követés (pulse-chase) technikával határoztuk meg. PD 150606 specifikus kalpain gátlószert alkalmaztunk a vizsgálatainkhoz.

EREDMÉNYEK

Olyan összetett modell rendszert alakítottunk ki, amivel az eltérő Ca^{2+} jelek által kiváltott biológiai hatásokat lehet jellemezni. A modellünkben használt humán mielo-eritroid sejt vonal szaporodása és túlélése teljes mértékben GM-CSF vagy IL-3 függő. A hormon-megvonás hatására a sejtek megállnak a növekedésben, majd apoptózissal elpusztulnak. A sejteken különböző $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést váltottunk ki: SERCA pumpa gátlás (CPA) átmeneti mérsékelt, alacsony mennyiségű ionofórral (ionomycin) átmeneti fokozott, míg nagyobb ionfór (A23187) koncentráció hosszantartó fokozott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedést eredményezett. A Ca^{2+} -emelkedés nagyságától és időtartalmától függően, hormon-független sejtosztódást, illetve túlélést eredményezett, míg a hosszan tartó magas Ca^{2+} szint apoptózishoz vezetett. A hormon-függő és a hormon-független túlélés egyaránt Bcl-2 anti-apoptotikus fehérje szint emelkedés és Kaszpáz-3 enzim aktivitás csökkenés kísérte. Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változással arányosan aktiválódott a MEK/ERK1/2/Elk-1/c-Fos jelátviteli pálya. Hormon megvonás hatására nem történt aktiváció, a hormon-független túlélés és osztódás azonban két-fázisú, továbbá az apoptózist fokozott, hosszantartó MEK-függő ERK1/2 és Elk-1 foszforiláció kísérte. A Ca^{2+} jelátviteli folyamatokban szerepet játszó kalpain enzim nem befolyásolta a fentiekben ismertetett Ca^{2+} által aktivált jelátviteli pályát. A dolgozatban bemutatásra került, hogy az alkalmazott modell alapján a kalpain szerepet játszik a sejtosztódásban. A kalpain specifikus gátlásával a sejtnövekedés reverzibilisen leállítható, anélkül, hogy apoptózist idézne elő. Részletes elemzés alapján elsőként mutattunk rá arra, hogy a kalpain a sejtciklus összes fázisában szerepet játszik, beleértve az S fázist is. Eredményeink és az irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy a kalpain a fent részletezett jelátviteli kaszkád egy későbbi, vagy leágazó szakaszában működik közre.

LEGFONTOSABB EREDMÉNYEIM ÉS A KÖVETKEZTETÉSEK:

1. Elsőként mutattam be, hogy az átmeneti $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés, a Ca^{2+} -jel nagyságától és időtartalmától függően, sejtosztódási illetve túlélési folyamatokat indított el humán hemopoetikus sejtekben, míg hosszan tartó $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés apoptózishoz vezet.
2. Megmutattam, hogy a Ca^{2+} indukálta hormon-független túlélésben a Bcl-2 anti-apoptotikus fehérje expresszió növekedés játszik fontos szerepet.
3. Kimutattam, hogy a TF-1 sejtek CPA-val és ionomycinnel előidézhető hormon-független túlélésében a MEK/ERK/Elk-1 jelátviteli út kulcsfontosságú. Összefüggést mutattam ki az ERK1/2-MAPK útvonal aktiváció kinetikája és a biológiai válasz között.
4. Megmutattam, hogy TF-1sejtekben az ERK1/2-MAPK útvonal hosszan tartó és nagyfokú aktivációja apoptózishoz vezet függetlenül az aktiváció kiváltásának módjától.
5. Megfigyeltem, hogy a kalpain specifikus gátlásával a TF-1 sejtek osztódása reverzibilisen leállítható anélkül, hogy a sejtek túlélését befolyásolnánk.
6. A kalpain specifikus gátlása a sejtciklus minden szakaszát érinti. Elsőként mutattam meg, hogy a G1/S, és a mitózis egyes szakaszai mellett, a kalpain gátlása az S fázison történő áthaladást is lassítja.
7. Modell rendszeremben a kalpain nem befolyásolta az ERK1/2-MAPK útvonal aktiválódását.

Összefoglalva, a különböző $[Ca^{2+}]_i$ változások teljesen eltérő biológiai hatást váltottak ki. Humán eritroid sejtekben mérsékelt Ca^{2+} szint emelkedés és MAPK aktiváció esetében hormon-független túlélést, és osztódást tapasztaltunk, hosszan tartó Ca^{2+} szint emelkedés és ERK/MAP kináz aktiváció pedig sejtelhaláshoz vezetett. Munkánk eredményeként megállapítható volt a Ca^{2+} -jelátvitel egy másik elemének, a kalpainnak sejtosztódásban játszott kulcs fontosságú szerepe is. Modellünk alkalmas lehet a Ca^{2+} -háztartást modulálására célzó gyógyszerfejlesztések tesztelésére.

A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:

Janossy J, Ubezio P, Apati A, Magocsi M, Tompa P, Friedrich P. „Calpain as a multi-site regulator of cell cycle.” **2004** *Biochem Pharmacol.*;67(8):1513-21.

Apati A, **Janossy J**, Brozik A, Magocsi M. **2003** „Effects of intracellular calcium on cell survival and the MAPK pathway in a human hormone-dependent leukemia cell line (TF-1).” *Ann N Y Acad Sci.* 1010:70-3.

Apati, A.; **Janossy, J.**; Brozik, A.; Bauer, P. I.; Magocsi, M. **2003.** „Calcium induces cell survival and proliferation through the activation of the MAPK pathway in a human hormone-dependent leukemia cell line, TF-1.” *J Biol Chem*, 278(11): p. 9235-43.

Egyéb a doktori értekezéshez kapcsolódó közlemények:

Kolonics, A.; Apati, A.; **Janossy, J.**; Brozik, A.; Gati, R.; Schaefer, A.; Magocsi, M. **2001** „Activation of Raf/ERK1/2 MAP kinase pathway is involved in GM-CSF-induced proliferation and survival but not in erythropoietin-induced differentiation of TF-1 cells.” *Cell Signal.*, 13(10): p. 743-54.