

**Identification of novel tumor associated proteins
affecting cell death**

András Szigeti, MD

PhD thesis

**Medical University of Pécs
Department of Biochemistry
and Medical Chemistry**

**Pécs
2007.**

**Identification of novel tumor associated proteins
affecting cell death**

András Szigeti, MD

PhD thesis

Program leader: Professor Balázs Sümegi, DSc

**Medical University of Pécs
Department of Biochemistry
and Medical Chemistry**

**Pécs
2007.**

Introduction

Tumor associated proteins are investigated worldwide to obtain a better understanding of the behavior of tumor growth and development or even of tumor therapy. Several proteins have been studied by our team in the last few years such as Heme Binding Protein 2 / SOUL or Heat Shock Protein 16.2 (HSP16.2). In this study the effect of these proteins on cell death is described.

Heme and porphyrines have high chemical reactivity and are poorly soluble in aqueous solutions. They are known to be good catalysts of the formation of activated oxygen species actively promoting free radical reactions leading to damages to biological molecules. Heme and the intermediates of heme synthesis have to be bound by cytosolic heme-binding proteins to avoid the formation of large aggregates in aqueous solutions such as the cytosol. Recently a number of heme-binding and heme-transport proteins have been described that bind heme and porphyrines in sub micromolar concentrations. Heme-binding protein 1 (HBP22) is a ubiquitously expressed protein having high affinity for heme and protoporphyrine. More recently, heme-binding protein 2 (SOUL) was identified. SOUL is expressed just in some specific tissues, has more than 40% sequence homology with HBP22, and has much higher binding affinity for porphyrines than HBP22 does having K_d in the nM range. Although its chemical and heme-binding properties were described, almost no information is available on its physiological function.

Role of heme-containing proteins in the regulation of cell death and survival are well characterized. They can affect formation of reactive oxygen species hence induction of direct oxidative damages as well as induction of mitochondrial permeability transition (mPT). mPT was strongly implicated in both apoptotic and necrotic cell death. Various stimuli,

including elevated intracellular Ca^{2+} concentration, induce the opening of a megachannel in the inner mitochondrial membrane leading to equilibration of the ions within the intermembrane space (and thus the cytosol) and the mitochondrial matrix, dissipation of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) and uncoupling of the respiratory chain. Numerous agents, including CsA can prevent the opening of the PTP. Dissipation of $\Delta\psi$ induces the release of mitochondrial proteins like cytochrome c resulting in activation of the caspase-cascade, and ultimately in apoptotic cell death. The volume dysregulation following the opening of the PTP causes swelling of the matrix, leading to membrane disruption and finally necrotic cell death.

Searching NCBI database, we noticed homology between the amino acid sequences of LOC51668 and alphaB-crystallin. Since small heat shock proteins, which interact with various components of the programmed cell death machinery upstream and downstream of the mitochondrial apoptotic events^{4,5} are homologous to alphaB-crystallin^{1,2}, it raised the possibility that LOC51668 may have a physiological role similar to that of small heat shock proteins. To indicate this putative physiological role, we used the name small heat shock protein 16.2 (Hsp16.2) for LOC51668 further on.

Unlike heme-containing proteins, effects of heme-binding proteins on the processes involved in cell survival and death are poorly characterized. For this reason, we studied the effect of SOUL on etoposide-induced, hydrogen-peroxide- or Taxol-induced cell death and compared it to HSP16.2. The effect of SOUL was also evaluated on several phenomena such as ROS formation or the mitochondrial permeability transition both in living cells and *in vitro* in isolated mitochondria.

Study objectives

1. Characterization of SOUL protein to detect it in different tissues, measure its expression, to detect homologies and to find its subcellular localization
2. Describe the effect of SOUL on cell death by measuring cell viability of SOUL or HSP16.2 overexpressing and control cells treated by different types of cell death inducing agents
3. Describe the effect of SOUL or HSP16.2 suppression by siRNA technique on cell death in overexpressing and control cells
4. Elucidate the effect of SOUL on ROS-production in SOUL overexpressing and control cells
5. Describe the effect of SOUL on the mitochondrial permeability transition and on the Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\psi$)
6. Prevention of SOUL-induced sensitization toward oxidative stress by cyclosporine A (CsA)
7. Analysis of both apoptotic and necrotic cell death induced by SOUL

General Conclusions

1. Multiple alignment of SOUL was done with its homologues and forms found in different species. The expression of SOUL was detected in a number of human tissues, and cell lines. It was found, that SOUL is not expressed ubiquitously in all tissue, but rather had differential expression. It was interesting to see, that e.g. normal pancreas tissues had little SOUL expression but in pancreas adenocarcinoma it was greatly elevated. According to this finding SOUL might have an importance in the development of pancreatic cancer. SOUL's subcellular localization was also detected with fluorescent microscope and with Western blot after fractionating cells endogenously producing high amount of SOUL. According to our results SOUL was found mostly in the cytoplasm, but it was also present in the mitochondrial fraction in a smaller quantity, which later proved to be very interesting.
2. Overexpressing a protein in a system can supply us information on the possible function of a protein. Effects of SOUL and HSP16.2 were examined in different conditions by treating cells with cell death inducing agents and detecting the living using MTT assay. Several types of drugs were selected to examine the effect of the two proteins. Hydrogen peroxide causes oxidative stress, Taxol affects the microtubule system, A23187 causes mainly necrosis, and Etoposide causes mostly apoptosis. In the presence of excess SOUL cells seemed to have decreased resistance against the above mentioned drugs in our experiment. This effect of SOUL was moderate, although statistically significant and was detected with all kinds of drugs used. On the contrary, when examining HSP16.2

we found opposite results. HSP16.2 protected cells against cell death in our system. Thus, we found two previously uncharacterized proteins that affect cell death in different ways. In this manner we can state that both proteins have an effect on cell death.

3. Gene silencing became a widely used method for knocking out a specific protein to identify its function from indirect effects caused by the lack of this specific protein. When SOUL was silenced using specific dsRNAs in cells endogenously expressing it significant resistance was observed against the cell death inducing agents as expected. In the case of HSP16.2 we also obtained the result we expected. Silenced with the method mentioned above the cells suffered a greater damage when they were exposed to those agents. The result of this and the previous thesis unequivocally confirms that, we found two previously uncharacterized proteins that affect cell death in different ways.

4. We hypothesized, that increased ROS formation caused by the presence of excess iron ions possibly bound by SOUL would be responsible for the excess cell death. To test this, the endogenous and induced production of reactive oxygen species was measured in both the aqueous and in lipid phase of cells overexpressing SOUL. We found no evidence that SOUL would influence the production of ROS *in vivo*, therefore we rejected our hypothesis. Now we had to look for a new mode of action.

5. The role of mitochondrial permeability transition in cell death is a well studied phenomenon. To find a possible mode of action for SOUL protein we investigated its effect on mitochondria *in vivo* and also *in vitro*. First we tracked the change of the mitochondrial membrane potential in SOUL-overexpressing NIH3T3 cells using fluorescent microscopy. We detected, that in cells overexpressing SOUL the mitochondrial membrane potential collapsed faster than in control cells. This result raised our interest and mitochondria were isolated from rat liver to detect direct effect of SOUL *in vitro*. Recombinant SOUL, when added alone, had no effect on mitochondria, but when added with sub-threshold concentrations of calcium, SOUL provoked mitochondrial permeability transition. This effect of SOUL was concentration dependent. At the same time intermembrane proapoptotic mitochondrial proteins such as cytochrome c, apoptosis inducing factor or endonuclease G were released to our reaction mixture in concentrations that were proportional to the concentration of SOUL. These data supports our view that SOUL mediates cell death primarily through the induction of mitochondrial permeability transition.

6. Cyclosporine A is a well known and widely used inhibitor of mitochondrial permeability transition. It binds to cyclophilin D in the mitochondrial permeability transition pore hindering its opening. Permeability transition provoked by SOUL could be inhibited by low concentrations of cyclosporine A *in vitro* and also *in vivo*. This points to the fact, that SOUL has specific effect on the mitochondrial permeability transition.

7. We proved that SOUL induces cell death by acting on mitochondria, and provokes mitochondrial permeability transition. Since mPT is involved in both the necrotic and in apoptotic cell death depending on the nature and severity of the stimulus, we were interested whether SOUL overexpression facilitates either of them. Cells were treated with different agent and were stained with propidium iodide and FITC-conjugated Annexin V to distinguish between the two types of cell death. Using flow cytometry it was shown that irrespective of the stimuli SOUL increases the ratio of necrotic cell death even to the detriment of apoptotic one.

Summary

The examined SOUL and HSP16.2 proteins are present in tumor cells, and in some they are overexpressed. Our investigation proved that both of these proteins have function in the process of cell death. We studied the effects caused by these proteins when they were overexpressed or silenced. Our experiments unequivocally confirmed that while the presence of excess SOUL increases cell death, HSP16.2 protects cells against it in our systems. The following part of the research was designed to further investigate the functions of SOUL protein. Since it was found that the presence of excess SOUL is a disadvantage for the cells, I tried to unravel how this protein affects cell death. Using multiple experimental procedures, it was demonstrated that SOUL, although able to bind the highly reactive heme, it doesn't raise the production of endogenous reactive oxygen species. The additional experiments were aimed at the mitochondrion, since this tiny component of the cell has great role in the process of cell death. By means of in vivo and in vitro experiments it was proved that in the presence of SOUL protein the mitochondrial permeability transition is more easily provoked and that this effect can be inhibited with cyclosporine A, hence this effect of SOUL is specific. Keeping in mind, that the mitochondrion can have a role in both the apoptotic and necrotic cell death, the last experiment in this study was planned to decide which type is involved in the death of SOUL-overexpressing cells. Using flow cytometry it was shown that irrespective of the stimuli SOUL increased the ratio of necrotic cell death even to the detriment of apoptotic one. In conclusion SOUL and HSP16.2 exerts their effect on cell death in a different way, and SOUL, although unable to induce cell death by itself, sensitizes cells to necrotic cell death by promoting mitochondrial permeability transition under stress conditions.

Publications in the topic / Témába tartozó közlemények

Than NG, Sumegi B, Bellyei S, Berki T, Szekeres G, Janaky T, **Szigeti A**, Bohn H, Than GN. Lipid droplet and milk lipid globule membrane associated placental protein 17b (PP17b) is involved in apoptotic and differentiation processes of human epithelial cervical carcinoma cells. *Eur J Biochem.* 2003 Mar;270(6):1176-88.

IF: 3,260

Szigeti A, Bellyei S, Gasz B, Boronkai A, Hocsak E, Minik O, Bogнар Z, Varbiro G, Sumegi B, Gallyas F Jr. Induction of necrotic cell death and mitochondrial permeabilization by heme binding protein 2/SOUL. *FEBS Lett.* 2006 Nov 27;580(27):6447-54. Epub 2006 Nov 7.

IF: 3,415

Bellyei S, **Szigeti A**, Boronkai A, Pozsgai E, Gomori E, Melegh B, Janaky T, Bogнар Z, Hocsak E, Sumegi B, Gallyas F Jr. Inhibition of cell death by a novel 16.2 kD heat shock protein predominantly via Hsp90 mediated lipid rafts stabilization and Akt activation pathway. *Apoptosis.* 2007 Jan;12(1):97-112.

IF: 4,497

Other Publications / Egyéb közlemények

Gallyas F, Gasz B, **Szigeti A**, Mazlo M. Pathological circumstances impair the ability of "dark" neurons to undergo spontaneous recovery. *Brain Res.* 2006 Sep 19;1110(1):211-20. Epub 2006 Jul 26.

IF: 2,296

Mazlo M, Gasz B, **Szigeti A**, Zsombok A, Gallyas F. Debris of "dark" (compacted) neurones are removed from an otherwise undamaged environment mainly by astrocytes via blood vessels. *J Neurocytol.* 2004 Sep;33(5):557-67.

IF: 1,669

Boronkai A, Than NG, Magenheimer R, Bellyei S, **Szigeti A**, Deres P, Hargitai B, Sumegi B, Papp Z, Rigo J Jr.: Extremely high maternal alkaline phosphatase serum concentration with syncytiotrophoblastic origin. *J Clin Pathol*, 58(1):72-6., 2005

IF: 2,619

Than N.G, Pick E, Bellyei S, **Szigeti A**, Burger O, Berente Z, Janaky T, Boronkai A, Kliman H, Meiri H, Bohn H, Than GN, Sumegi B.: Functional analyses of placental protein 13/galectin-13. *European Journal of Biochemistry*, 271(6):1065-78., 2004

IF: 3,260

Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Boronkai A., Szabo Z., Bene J., Janaky T., Barna L., Sipos K., Minik O., Kravjak A., Ohmacht R., Melegh B., Zavodszky P., Than G. N., Sumegi B., Bohn H., Than N. G.: Cloning, sequencing, structural and molecular biological characterization of placental protein 20 (PP20)/human thiamin pyrophosphokinase (hTPK) *Placenta*, 26 (1), 34-46., 2005

IF: 2,680

Than NG, Boronkai A, Magenheimer R, Hargitai B, Deres P, Bellyei Sz, **Szigeti A**, Rigó J, Sümegi B, Papp Z.: Placental origin of the extreme elevation of maternal serum ALP levels In: Papp Z, Rodeck C (ed.) Recent Advances in Prenatal Genetic Diagnosis, Bologna: Medimond Monduzzi Editore, 2004. pp. 209-213

Barna L., Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Boronkai Á., Szabó Z., Ohmacht R., Janaky T., Than N.G., Szilágyi A., Zavodszky P., Sümegi B.: Humán placenta protein20 (PP20)/tiamin pirofoszfokináz (hTPK): szerkezettől a funkcióig *Biokémia*, 27, 88-95, 2003

Than G.N., Sümegi B., Szekeres Gy., Bellyei Sz., Than N.G., **Szigeti A.**, Bohn H.: Placental protein 17b overexpression in human uterine cervical cancer.

The Journal of Obstetrics and Gynecology Research, 28 (1), 8-12., 2002.

Than G., Sümegi B., Than N., Bellyei Sz., Bohn H., Turóczy T., **Szigeti A.**, Szekeres Gy.: A placenta protein 17b (PP17b) / mannóz-6- foszfát receptor transzporter humán méhnyakrák képződésében megfigyelt szerepe. *Biokapocs*, 3/4, 1-4., 2001.

Abstracts / Absztraktok

Szigeti A., Bellyei Sz., Boronkai Á., Bognár Z., Gasz B., Szabó Z., Bognár E., Hocsák E., Komlói K., Varbiro G., Melegh B., Janaky T., Sumegi B., ifj. Gallyas F. Egy BH3 domént tartalmazó mitokondriális permeabilitástranzíciót indukáló fehérje azonosítása. *Biokémia* XXX. Évf. 3. szám 2006. szeptember (Absztrakt száma: E4-05)

Boronkai Á., Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Hocsák E., Németh V., Sümegi B., A galectin-13 indukálta apoptózis molekuláris mechanizmusai. *Biokémia* XXX. Évf. 3. szám 2006. szeptember (Absztrakt száma: E4-01)

Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Boronkai Á., Bognar Z., Hocsák E., Solti Izabella, Pozsgai É., Gallyas F. Jr., Sumegi B. Egy új 16.2 kDa hő-sokk fehérje citoprotektív hatásának jellemzése. *Biokémia* XXX. Évf. 3. szám 2006. szeptember (Absztrakt száma: E2-02)

Szigeti A., Bellyei S., Boronkai Á., Minik O., Szabó Z., Bognár Z., Komlói K., Ohmacht R., Melegh B., Janaky T., Bohn H., Sumegi B., Than N.: Sequence, structure and function of human placenta protein 23 (PP23) / SOUL protein, *FEBS Journal*, 2005 (Abstract number: A1-029P)

Boronkai A., Bellyei S., Pick E., **Szigeti A.**, Burger O., Minik O., Janaky T., Kliman H., Bohn H., Meiri H., Sumegi B., Than N.: Molecular biological characterization and functional analysis of PP13/galectin-13, *FEBS Journal*, 2005 (Abstract number: D2-007P)

Bellyei S., Szigeti A., Boronkai A., Minik O., Pozsgai E., Gomori E., Janaky T., Melegh B., Than G. N., Bohn H., Sumegi B., Than N.G.: Genomic and proteomic characterization of placental protein 25 (PP25), *FEBS Journal*, 2005 (Abstract number: A2-014P)

Than N., Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Janaky T., Berente Z., Boronkai Á., Than G., Szabó D., Bohn H., Sümegi B.: Genomical, proteomical and functional studies of human placental protein 13 (PP13) / galectin-13. *Placenta*, (Suppl. A), Trophoblast Research, 2003.

Bellyei Sz., Than N.G., **Szigeti A.**, Boronkai Á., Berki T., Janáky T., Debreceni B., Sümegi B., Bohn H., Than G.N.: Genomical and proteomical analysis of PP17b / sandrin B. *Placenta*, (Suppl. A), Trophoblast Research, 2003.

Than N., Bohn H., Sümegi B., Bellyei Sz., Berki T., Visegrády B., Szekeres Gy., **Szigeti A.**, Than G.: Structural and functional research on newly cloned fetoplacental proteins. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 17 (S1), 35-36, 2002.

Than N.G., Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Szekeres Gy., Berki T., Sümegi B., Bohn H., Than G.N.: PP17b is involved in differentiation and apoptosis of cervical epithelial cells. *Czech Gynaecology*, 67 (S2), 48, 2002.

Than G.N., Sümegi B., Szekeres Gy., Than N.G., Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Bohn H.: Significance of PP17b overexpression in cervical intraepithelial neoplasias and carcinomas. *Czech Gynaecology*, 67 (S2), 47-48, 2002.

Bellyei Sz., Than N.G., **Szigeti A.**, Sümegi B., Bohn H., Than G.N.: Cloning and sequence analysis of Placental Protein 25 (PP25). *Czech Gynaecology*, 67 (S2), 15, 2002.

Than N., Bellyei Sz., Sümegi B., Szekeres Gy., Berki T., **Szigeti A.**, Bohn H., Than G.: A human placenta protein 17b (PP17b) génexpressziós és functionális vizsgálatai. *Nőgyógyászati és Szülészeti Továbbképző Szemle*, 4 (S1), 132, 2002.

Bellyei Sz., Than N., **Szigeti A.**, Sümegi B., Szekeres Gy., Bohn H., Than G.: A human placenta protein 25 (PP25) klónozása, molekuláris biológiai és genetikai vizsgálatai. *Nőgyógyászati és Szülészeti Továbbképző Szemle*, 4 (S1), 128, 2002.

Than N.G., Bohn H., Sümegi B., Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Than G.N.: Pregnancy-related protein research: History and own results. *Placenta*, 24 (Suppl. A), Trophoblast Research, 17, S60-61., 2003.

Presentations / Előadások

Szigeti A., Bellyei Sz., Boronkai Á., Bognár Z., Gasz B., Szabó Z., Bognár E., Hocsák E., Komlói K., Varbiro G., Melegh B., Janáky T., Sümegi B., ifj. Gallyas F. Egy BH3 domént tartalmazó mitokondriális permeabilitástranziót indukáló fehérje azonosítása. Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, 2006. augusztus 30.

Boronkai Á., Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Hocsák E., Németh V., Sümegi B., A galectin-13 indukálta apoptózis molekuláris mechanizmusai. Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, 2006. augusztus 30.

Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Boronkai Á., Bognár Z., Hocsák E., Solti Izabella, Pozsgai É., Gallyas F. Jr., Sümegi B. Egy új 16.2 kDa hő-sokk fehérje citoprotektív hatásának jellemzése. Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, 2006. augusztus 30.

Boronkai Á., Magenheimer R., Deres P., Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Than N., Rigó J. Jr., Papp Z., Sümegi B.: „Fehérje expressziós vizsgálatok normál és kóros humán méhlepényben.” XXXIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2003. V. 19-23. (poszter)

Than N., Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Berki T., Janáky T., Boronkai Á., Than G., Bohn H., Sümegi B.: „A sandrin b (PP17b) strukturális és funkcionális vizsgálatai.” A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 8. Munkaértekezlete, Tihany, 2003. V. 12-15. (poszter)

Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Janáky T., Berente Z., Boronkai Á., Than G., Bohn H., Sümegi B., Than N.: „Egy új human lepényi galectin (galectin-13) genomikai és proteomikai vizsgálatai.” A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 8. Munkaértekezlete, Tihany, 2003. V. 12-15.

Szigeti A., Bellyei Sz., Boronkai Á., Janáky T., Szabó Z., Than G.N., Sümegi B., Bohn H., Than N.G.: „A placenta protein 20 (PP20) / tiamin pirofoszfokináz molekuláris biológiai karakterizálása.” A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 8. Munkaértekezlete, Tihany, 2003. V. 12-15. (poszter)

Than N., Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Berki T., Janáky T., Boronkai Á., Than G., Bohn H., Sümegi B.: „A sandrin b (PP17b) strukturális és funkcionális vizsgálatai.” XI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, Hungary, 2003. IV. 15-17.

Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Janáky T., Berente Z., Boronkai Á., Than G., Bohn H., Sümegi B., Than N.: „Egy új humán lepényi galectin (galectin-13) molekuláris biológiai vizsgálatai.” XI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, Hungary, 2003. IV. 15-17.

Than N., Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Berki T., Janáky T., Boronkai Á., Than G., Bohn H., Sümegi B.: „*SANDRIN*”, Biotechnológia 2003 Magyarország, az Oktatási Minisztérium Bio- és Agrártechnológiai Osztálya Konferenciája, Budapest, Hungary, 2003. IV. 30. (poszter)

Sümegi B., Than N.G., Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Boronkai Á., Than G.N., Bohn H.: „Possible role of placental proteins in cell differentiation and cell death.” Spezialforschungsbereich – Kolloquium, University of Innsbruck, Innsbruck, Austria, 2003. VI. 2.

Than N., Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Janáky T., Berente Z., Boronkai Á., Than G., Szabó D., Bohn H., Sümegi B.: „Genomical, proteomical and functional studies of human placental protein 13 (PP13) / galectin-13.”, 9th Conference of the International Federation of Placenta Associations, Mainz, Germany, 2003. IX. 24-27.

Bellyei Sz., Than N.G., **Szigeti A.**, Boronkai Á., Berki T., Janáky T., Debreceni B., Sümegi B., Bohn H., Than G.N.: „Genomical and proteomical analysis of PP17b / sandrin B.”, 9th Conference of the International Federation of Placenta Associations, Mainz, Germany, 2003. IX. 24-27. (poszter) *IFPA YW Loke Award*

Boronkai Árpád, Deres Péter, Magenheimer Rita, Bellyei Szabolcs, **Szigeti András**, Than Nándor Gábor, Rigó János Jr., Papp Zoltán, Sümegei Balázs: Jelátviteli mechanizmusok vizsgálata izoláltan magas ALP szinttel társult terhességéből származó placentában. Sejt-és Fejlésbiológiai Napok, Pécs, április 16-18. 2004 (poszter)

Boronkai Árpád, Bellyei Szabolcs, **Szigeti András**, Hocsák Enikő, Tucsek Zsuzsanna, Sümegei Balázs: A galectin-13 jellemzése, sejtthál indukáló hatása. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, V. 23-26, 2006 (poszter)

Hocsák Enikő, Bellyei Szabolcs, **Szigeti András**, Boronkai Árpád, Tucsek Zsuzsanna, Szabó Alíz, Vető Sára, Berki Tímea, Sümegei Balázs: A PP17B fehérje strukturális és funkcionális vizsgálatai. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, V. 23-26, 2006 (poszter)

Szigeti András, Bellyei Szabolcs, Boronkai Árpád, Bognár Zita, Gasz Balázs, Szabó Zoltán, Tucsek Zsuzsanna, Hocsák Enikő, Komlosi Katalin, Varbiro Gábor, Meleghe Béla, Janaky Tamás, Sümegei Balázs, ifj. Gallyas Ferenc: MPTIP1, az első csak BH3 domén-t tartalmazó permeability transition-t indukáló fehérje. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, V. 23-26, 2006 (poszter)

Bellyei Sz., **Szigeti A.**, Boronkai Á., Bognár Z., Hocsák E., Tucsek Zs., Pozsgai É., Gallyas F. Jr., Sümegei B. Egy új 16,2 kDa nagyságú kis molekulású hó-sokk szerű fehérje bemutatása. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, V. 23-26, 2006

**Új, sejthalált befolyásoló tumor-asszociált fehérjék
azonosítása**

Dr. Szigeti András

PhD tézis

**Pécsi Tudományegyetem,
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet**

**Pécs
2007.**

**Új, sejthalált befolyásoló tumor-asszociált fehérjék
azonosítása**

Dr. Szigeti András

PhD tézis

Programvezető: Dr. Balázs Sümegi, egyetemi tanár

**Pécsi Tudományegyetem,
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet**

Pécs

2007.

Bevezetés

Tumor asszociált fehérjéket világszerte kutatnak, hogy mind jobban megérthessük a daganatok kifejlődését és növekedését, ezáltal lehetőséget nyitva specifikusabb és hatékonyabb kezelések kifejlesztésére. A mi munkacsoportunk is számos ilyen fehérjét vett górcső alá, így például a hem-kötő fehérje 2 / SOUL-t vagy a 16.2-es hő sokk fehérjét (HSP16.2). Ebben a tanulmányban e két fehérje sejthalálra kifejtett hatását jellemzem.

A hem és a porfirinek vízben nehezen oldódó nagy kémiai reaktivitással rendelkező fehérjék. Részt vesznek az aktivált szabadgyökök képzésében is károsítva a biológiai folyamatokban szerepet játszó molekulákat. Mivel vízben nehezen oldódnak, citoszólban elhelyezkedő fehérjékhez kötődnek, így elkerülik azt, hogy kicsapódjanak, és aggregátumokat alkossanak. Számos hem-kötő fehérjét karakterizáltak, melyek mikromoláris koncentrációban képesek kötni a hemet. A hem-kötő fehérje 1 (HBP22) minden szövetben jelen van, és nagy affinitással bír a hem és a porfirinek felé. A hem-kötő fehérje 2-t (SOUL) 2002-ben írták le először. Ez a fehérje csak bizonyos szövetekben fejeződik ki, kb. 40%-ban homológja a fent említett HBP22-nek és erősebben képes kötni a hemet és a porfirineket. Bár a SOUL kémiai és fizikai tulajdonságai mára nagyrészt ismertek, biológiai funkciójáról keveset tudhattunk.

A hemet tartalmazó fehérjék szerepe a sejthalál szabályozásában jól ismert. E fehérjék is részt vesznek a szabadgyökök képzésében, oxidációs sérüléseket okozva indukálják a mitokondriális permeabilitás tranzíciót (mPT). A mPT szerepe mind az apoptózisban mind a nekrozisban bizonyított. A belső mitokondriális membránban elhelyezkedő megacsatorna megnyílása különféle ingerhatásokra - mint pl. a megemelkedett kalcium szint - megtörténhet, mely a membrán két oldalán jelenlévő ionkülönbség

kiegyenlítődéséhez, a membrán közötti fehérjék és a mitokondriális mátrix kiáramlásához vezet, amely végsősorban a mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\psi$) eltűnését és a légzési lánc szétkapcsolódását okozza. Számos anyag, így a ciklosporin A is, képes megakadályozni a mPT pórus megnyílását. A membránpotenciál eltűnése maga után vonja a mitokondriális fehérjék – mint pl. a citokróm c – kiszabadulását ezáltal a kaspáz-kaszád aktivációját, mely apoptotikus sejthalálhoz vezet. A mPT pórus megnyílását követő szabályozhatatlan térfogatváltozás a mitokondrium megduzzadásával jár, mely végül a membránok szétszakadásához és nekrotikus sejthalálhoz vezet.

Az NCBI adatbázisban keresve hasonlóságot vettünk észre a LOC51668 és az alfaB-krisztallin között. Ez azért volt érdekes, mert számos kis hősokk fehérje, mely homológ az alfaB-krisztallinhez, kapcsolódik apoptózisban szerepet játszó más fehérjékhez. Felmerült bennünk, hogy az eddig még nem jellemzett LOC51668 fehérjének hasonló szerepe lehet, mint a kis hősokk fehérjéknek. A fehérjét, mint lehetséges hősokk fehérjét, HSP16.2-nek neveztük el.

A hem-tartalmú fehérjékkel ellentétben a hem-kötő fehérjék biológiai funkciójáról ezidáig kevés információ áll rendelkezésre. Éppen ezért részletesen tanulmányoztuk a SOUL fehérje hatását etopozid, hidrogén-peroxid, vagy Taxol által indukált sejthalálban és összehasonlítottuk azt a HSP16.2 által kifejtett hatással. A SOUL fehérjét részletesebben is megvizsgáltuk, így felfedtük szerepét a szabadgyök-képződésben és a mitokondriális permeabilitás tranzícióban élő sejtekben és izolált mitokondriumokon.

Célkitűzések

1. A SOUL fehérje jellemzése, kifejeződésének különböző szövetekben történő meghatározása, homológok keresése, és a sejten belüli eloszlásának feltérképezése.
2. A SOUL fehérje sejthalálra vonatkozó hatásának jellemzése SOUL-t és HSP16.2-t túltermelő sejtekben a sejtek túlélésének vizsgálatával különböző sejthalált okozó szerekkel történt kezelések után.
3. A SOUL és a HSP16.2 fehérje siRNA technikával történt kiütése okozta hatások vizsgálata túltermelő és kontroll sejtekben.
4. A SOUL fehérje hatása a szabadgyök termelésre
5. A SOUL fehérje szerepének ismertetése mitokondriális permeabilitás tranzícióban és a mitokondriális membránpotenciál elvesztésében
6. A ciklosporin A gátolja a SOUL által indukált sejthalált?
7. A SOUL indukálta apoptotikus és nekrotikus sejthalál vizsgálata

Általános következtetések

1. Számítógépes módszerekkel összehasonlítottuk egymással a SOUL fehérje homológjainak és különböző szövetekben talált formáinak elsődleges szerkezetét. A SOUL expresszióját számos humán szövetben és sejtvonalban kimutattuk és igazoltuk, hogy az nem egyformán expresszálódik minden szövetben. Érdekes megfigyelés volt, hogy pl. normál pancreas szövetben kismértékű, míg hasnyálmirigy adenocarcinómában jelentősen emelkedett a SOUL termelődése. Ebből arra lehetett következtetni, hogy a SOUL-nak szerepe lehet a pancreas tumorok kialakulásában. A SOUL intracelluláris lokalizációját fluoreszcens mikroszkóppal és Western blottal mutattuk ki, az endogéne nagy mennyiségben SOUL-t termelő sejtek frakcionálása után. Eredményeink az mutatták, hogy a SOUL döntően a citoplazmában, de kis mennyiségben a mitokondriális frakcióban is megtalálható. Ez utóbbiról később kiderült, hogy nagy jelentősége van.
2. Egy fehérje overexpresszálásával információkat nyerhetünk annak lehetséges funkciójáról. A SOUL és a HSP16.2 hatását úgy vizsgáltuk, hogy különböző sejthalált indukáló szerrel kezeltük a sejteket, majd az élők számát MTT assay segítségével vizsgáltuk. Kiválasztottunk néhány szert, melyek segítségével megvizsgálhattuk a két fehérje hatását. A hidrogénperoxid oxidatív stresszt okoz, a Taxol a microtubuláris rendszert támadja, az A23187 főleg necrosist, míg az Etoposide inkább apoptózist indukál. Kísérleteinkben azok a sejtek, melyek a SOUL fehérjét túlermelték, csökkent ellenállást mutattak a fent említett szerek iránt. Ez a hatás nem volt feltűnő, de statisztikailag

szignifikánsnak bizonyult és minden általunk használt szer esetében megfigyelhető volt. Ezzel szemben, a HSP16.2 vizsgálatok ellentétes eredményeket kaptunk. Rendszerünkben a HSP16.2 megvédte a sejteket a sejthaláltól. Ennek megfelelően találtunk két, korábban nem jellemzett fehérjét, melyek eltérő módon hatnak a sejthalálra folyamatára.

3. A gén-elyomás széles elterjedt módszerré vált különféle fehérjék specifikus kiütésében. Az adott fehérje hiányából indirekten következtetni lehet annak funkciójára. Amikor az endogén expresszálo sejtekben a SOUL-t speciális dsRNA technikával elnémítottuk, a vártaknak megfelelően a vizsgált sejtek ellenállóbbá váltak az általunk használt sejthalált indukáló szerekkel szemben. A gén-elyomásos és a túltermeltetési kísérletek eredménye egyértelműen azt bizonyítja, hogy az általunk találtunk két, korábban nem jellemzett fehérje, különbözőképpen hat a sejthalálra.

4. Azt feltételeztük, hogy a megnövekedett reaktív oxigénradikálok (ROS) képzés –melyet a SOUL által megkötött vasionfelesleg okoz- felelős lehet a megnövekedett sejthalálért. Hogy ezt ellenőrizhessük, a SOUL-t overexpresszálo sejtek vizes és lipid fázisában is megmértük az endogén és az indukált ROS termelést. Nem találtunk arra nézve bizonyítékot, hogy a SOUL-nak in vivo, hatása lenne a ROS termelésre, ezért elvettük a hipotézist. Ezután új hatásmechanizmus után kellett néznünk.

5. A mitokondriális permeabilitás tranzíció szerepe a sejthalálban egy alaposan tanulmányozott jelenség. Hogy a SOUL fehérje lehetséges hatásmechanizmusát megtaláljuk, in vivo és in vitro is vizsgáltuk hatását a mitokondriumra. Először a SOUL-t túltermelő NIH3T3 sejtekben követtük végig a mitokondriális permeabilitás tranzíció változását fluoreszcens mikroszkóppal. Azt találtuk, hogy a SOUL-overexpresszáló sejtekben a membránpotenciál gyorsabban összeomlott, mint a kontroll sejtekben. Ez a felismerés felkeltette érdeklődésünket. Patkány májból izoláltunk mitokondriumot, hogy in vitro vizsgálhassuk a SOUL direkt hatását. Amikor önmagában adtunk rekombináns SOUL-t, akkor a nem fejtett ki hatást a mitokondriumra, de amikor küszöb alatti koncentrációban adtunk hozzá kalciumot, a SOUL mitokondriális permeabilitás tranzíciót provokált. A SOUL ezen hatása koncentrációfüggő volt. A reagens-elegyünkéből pedig mitokondriális proapoptotikus fehérjéket (citokróm c, apoptosist indukáló faktor, endonukleáz b) tudtunk azonosítani, melyek mennyisége a SOUL koncentrációjától függött. Az eredmények bizonyították azon nézetünket, miszerint a SOUL által kiváltott sejthalál elsődlegesen a mitokondriális permeabilitás tranzíció indukciója révén jön létre.

6. A ciklosporin A egy jól ismert és széles körben alkalmazott mitokondriális permeabilitás tranzíció inhibitor. Hozzákötődik a mitokondriális permeabilitás tranzíció pórusban található ciklophyllin D-hez, gátolva ezzel a pórus megnyílását. A SOUL által kiváltott permeabilitás tranzíciót kis koncentrációjú ciklosporin A-val in vivo és in vitro is le tudtuk gátolni. Ez

megegerősíti azt a tényt, hogy a SOUL-nak specifikus hatása van a mitokondriális permeabilitás tranzícióra.

7. Bebizonyítottuk, hogy a SOUL fehérje mitokondriális permeabilitás tranzíciót vált ki és a mitokondriumon keresztül sejthalált okoz. Ismeretes, hogy a mitokondriális permeabilitás tranzíció szerepet játszik mind az apoptózis, mind a nekrozis kialakulásában a stimulus természetétől és súlyosságától függően. A továbbiakban az foglalkoztatott bennünket, hogy a SOUL túltermelése hogyan befolyásolja egyik vagy másik típusú sejthalált. A sejteket különböző szerekkel kezeltük, megfestettük őket propidium joddal és FITC- konjugált Annexin 2-vel, hogy elkülöníthessük a kétféle típust. Áramlási citometriával azt láttuk, hogy függetlenül stimulustól, a SOUL túltermelő sejtekben az apoptózis kárára növekedett a nekrozis aránya.

Összefoglalás

Az általunk vizsgált SOUL és HSP16.2 fehérjék bizonyos daganatos sejtekben megjelennek, túltermelőnek. Kísérleteinkkel megpróbáltunk fényt deríteni e fehérjék sejten belüli szerepére. Igazoltuk, hogy mindkét fehérje befolyásolja a sejthalál folyamatát. Különböző rendszerekben vizsgáltuk e két fehérje túltermelésének és elcsendesítésének hatásait. Kísérleteinkkel sikerült egyértelműen kimutatni a SOUL fehérjének a túlélést gátló, míg a HSP16.2 fehérjének a túlélést elősegítő szerepét. További kísérleteimmel a SOUL fehérje részletesebb vizsgálatát tűztem ki célul. Mivel a fehérje túltermelése hátrányos a sejtek számára megpróbáltam kideríteni, milyen módon hat e fehérje a sejthalálra. Többféle méréssel sikerült igazolni azt, hogy a fehérje, bár képes az igen reaktív hem megkötésére, nem emeli különösebben a sejtek endogén reaktív szabadgyök-termelését, tehát nem ily módon befolyásolja a sejthalált. További kísérleteimmel a mitokondriumot vettem célba, hiszen a sejthalál mechanizmusában e parányi sejtalkotónak nagy szerepe lehet. *In vivo* és *in vitro* kísérletekkel is sikerült igazolni, hogy a SOUL fehérje jelenlétében könnyebben indukálható a mitokondriális permeabilitás tranzíció, és azt is, hogy a fehérje hatása ciklosporin A-val gátolható, tehát specifikus. Tekintettel arra, hogy a mitokondriumnak szerepe lehet mind az apoptotikus, mind a nekrotikus sejthalálban, a dolgozatban szereplő utolsó kísérleteket arra terveztem, hogy kiderítsem vajon melyik típusú sejthalál okozza a túltermelő sejtek fokozott pusztulását. Az áramlási citometriás vizsgálatok egyértelműen a nekrotikus sejthalál fokozott jelenlétét igazolták. Összegzésként tehát elmondható, hogy a SOUL és a HSP16.2 fehérjék más-más módon hatnak a sejthalál folyamatára, továbbá az, hogy a SOUL fehérje, bár önmagában nem képes a sejthalál folyamatának elindítására, a mitokondriális permeabilitás tranzíción keresztül érzékenyíti a sejteket a nekrotikus sejthalálra.