

Gyógyszer rezisztenciát okozó fehérjék vizsgálata

Bereczki Kristóf

SzTE Gyakorló Gimnázium, Szeged

Dobolyi Zsófia

ELTE Apáczai Csere János Gyakorló Gimnázium, Budapest

Horváth Ákos

Bonyhádi Petőfi Sándor Evangélikus Gimnázium



émavezetők:

Dr. Telbisz Ágnes, Horváth Tamás

MTA Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet

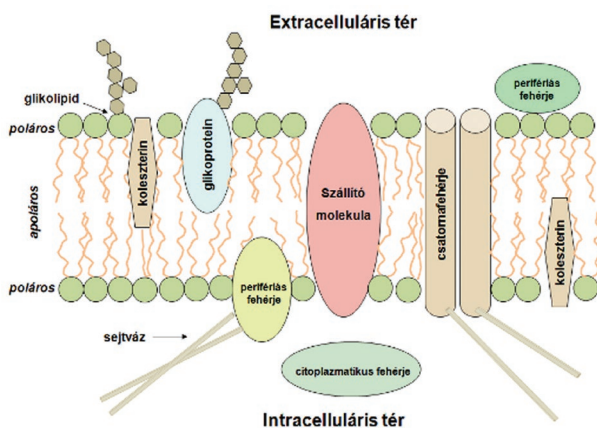
Bevezetés

Az előző tanévben nagyon sokat foglalkoztunk kémiával, illetve biológiával főként a közelgő érettségi, és versenyek kapcsán. Így elhatároztuk, hogy megírjuk pályázatainkat a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont „AKI Kíváncsi Kémikus” egy hetes nyári kutatótáborára, amelyet idén már a kilencedik alkalommal rendeztek meg. A jelentkezéshez három témát kellett megjelölnünk, és végül mind abban a témában kutathattunk, ami a legjobban érdekelt minket, azaz a gyógyszer rezisztenciát okozó fehérjék vizsgálatával.

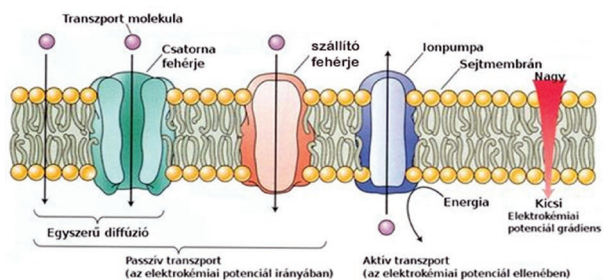
Témánk

De mi is az a gyógyszer rezisztencia? A szervezetünkbe nagyon sokféle kórokozó juthat be, ilyenek pl. a vírusok, baktériumok, gombák, illetve a szervezet saját sejtjeinek kóros szaporodásával ráksejtek keletkezhetnek, melyek túlélnek és szaporodnak a szervezetünkben. A gyógyszereknek az a célja, hogy a kórokozókat, ráksejteket elpusztítsák, vagy megakadályozzák szaporodásukat. Ha a kórokozó, illetve ráksejtek a kezelés ideje alatt szaporodni képesek, vagy akárcsak nem pusztulnak el, akkor mutációk alakulhatnak ki, így már nem tud hatni rájuk a gyógyszer, úgynevezett rezisztencia alakul ki, így idővel a terápia hatástalanná válik.

A fehérjék az élőlények alapvető molekulái, számos feladatot látnak el bennünk: lehetnek pl. enzimek, hormonok, alvadásképzők, felelnek izmaink mozgásáért. A kettős lipidmembránba (1. ábra) beékelődve különböző funkciójú membránfehérjék találhatóak. A membránon az anyagok több úton képesek átjutni. Van aktív, valamint passzív transzport (2. ábra). Az általunk vizsgált aktív transzport makromolekulák vagy töltéssel rendelkező molekulák esetén működik, amelyek nem képesek maguktól áthatolni a sejthártyán, így a membránfehérjéknek kell őket „átpumpálnia”. Mi a fehérjék egy különleges csoportjával, a multidrog transzporterek közé tartozó ATP Binding Cassette (ABC) transzporter



1. ábra: A kettős lipidmembrán

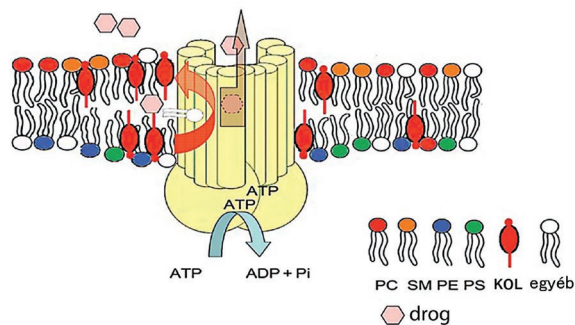


2. ábra: Aktív-, illetve passzív transzport sematikus ábrája

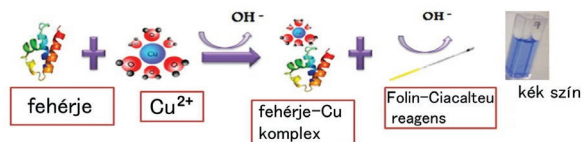
fehérjékkel dolgoztunk (3. ábra). A multidrog rezisztencia fehérjék olyan membrán transzporterek, amelyeket ATP hasítás energiája révén számos gyógyszert, citosztatikus vegyületet képesek kipumpálni a sejt belsejétől. Ezen transzportereknek három fő fajtája létezik, ezek az ABCB1, ABCG2 (mi ezzel a kettővel foglalkoztunk), valamint az ABCC1.

Kutatásunk célja

A táborban töltött idő alatt célunk egy ABC multidrogtranszporter fehérjét kifejező emlős sejt drogtanszportjának mérése volt, továbbá egy eddig – általunk vizsgált fehérjékre – ismeretlen hatásokkal bíró kísérleti drogot teszteltünk. Ezen vizsgálatainkat a már említett ABC multidrog transzporterekre hajtottuk végre. A drogtesztelésnek nagyon fontos lépése ez a vizsgálat, ugyanis a fehérje és a gyógyszer molekula interakciója döntő fontosságú lehet a gyógyszer sejten belüli hatására és további sorsára. Amennyiben a vizsgált anyag (például egy antibiotikum) szubsztrátja valamely ABC transzporternek, az könnyedén kipumpálja az előbbi a sejtéből, ezzel megakadályozva, hogy kifejtsen hatásait a célsejtekben. Munkánk során modellsejteket vizsgálunk *in vitro* technikával, melynek lényege, hogy az adott mérés nem az élő szervezetben, hanem azon kívül zajlik le. A kutatásunk céljának megfelelő sejtvoalakra – ezek esetünkben Sf9 rovarsejtek voltak – témavezetőink bevitték az ABC fehérje génjét bakulovírus segítségével, majd az ABCG2-bakulo-

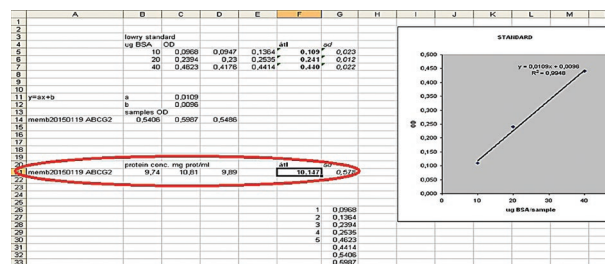


3. ábra: ABC transzporter fehérjék működése



4. ábra: A két reakció, mely együttesen okozza a kialakuló komplex kék színét

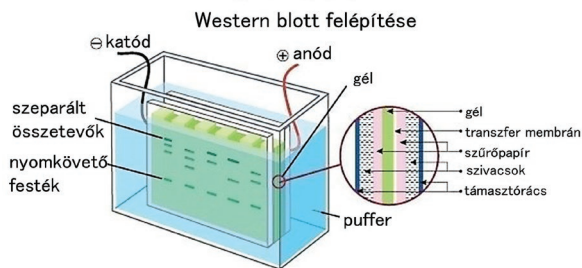
vírussal fertőzött sejtek expresszálták a kívánt fehérjéket. Ez a néhány, nem általunk végzett lépés készítette elő számunkra azt a membránpreparátumot, amelyen elvégezhetjük a méréseket. A lentebb felsorolt kísérletek végeztével az adatok összegyűjtése és kielemezése következett. Ez komoly feladatnak ígérkezett, különösen a rengeteg információt tekintve, ami a több kontrollt és különböző koncentrációkat használó mérésekben keletkezett. Azonban mindez kulcsfontosságú volt az eredmények megbízhatóságához, és a végkövetkeztetés helyes levonásához.



5. ábra: A Lowry-féle protein meghatározás eredménye

A Lowry-féle protein meghatározás

Végcélunk szempontjából nagy szükség volt a korábban említett membránpreparátum összfehérje tömegének meghatározására, amit viszonyítási alapként használtunk. A Lowry-féle protein meghatározás egy kromogén, más néven színeképző eljárás, amikor a fehérje és egy szerves vegyület által létrehozott színes komplex elnyelését mérjük spektrofotométer segítségével. A fehérjemennyiségtől függően létrejövő erős kék színt két reakció hozza létre; a peptid kötés nitrogénjének koordinációja Cu^{2+} ionnal, és a fenollal reagáló Folin-Ciocalteu-reagens tirozin általi redukciója (4. ábra). Egy meghatározott hullámhosszon (660 nm) az elnyelés mértéke egyenesen arányos a minta összfehérje-koncentrációjával. A meghatározáshoz



6. ábra: A gélelektroforézis során használt szerkezet felépítése

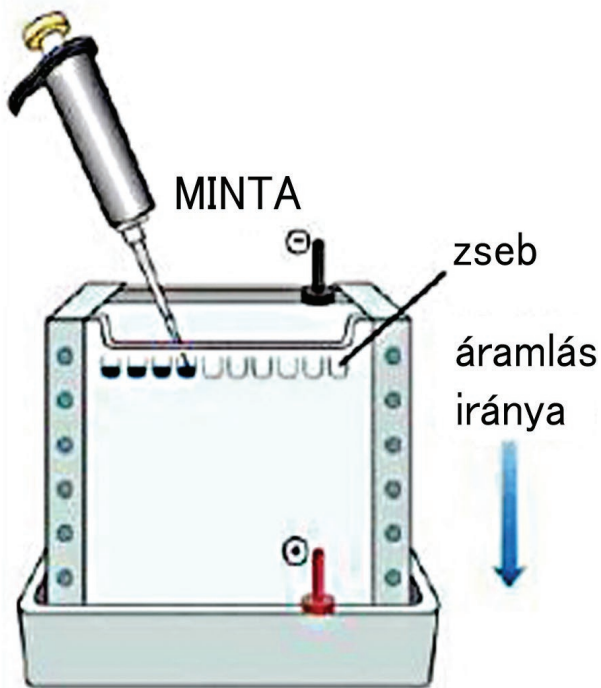
és az ellenőrizhetőség érdekében kalibrációs egyenest is készítettünk ismert koncentrációjú szarvasmarha szérum albumin (BSA) oldattal, és az ismeretlen fehérjekoncentrációt a grafikonról olvastuk le. Az eljárás előnyei közé sorolandó, hogy rendkívül érzékeny, akár 1 µg fehérjét is képes kimutatni, ugyanakkor kivitelezése lassú és számos anyag (pl. glicin) zavarja. A Lowry-féle proteinmeghatározás eredményét az 5. ábra szemlélteti, a grafikon alapján kiszámoltuk a membránpreparátum fehérje koncentrációját mg/ml egységben.

SDS-Page gélelektroforézis és western blott (6. ábra)

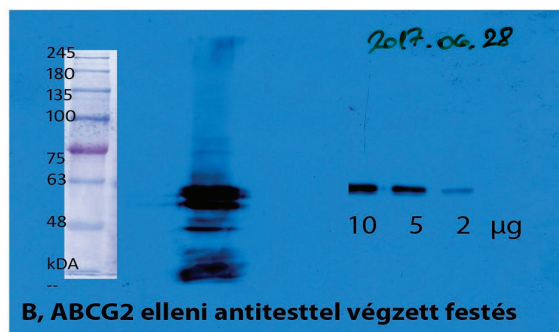
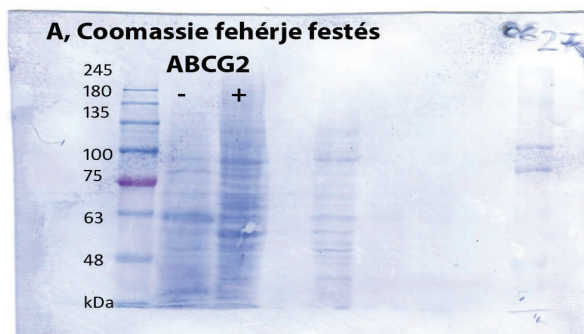
A gélelektroforézis módszerrel a fehérjék méret szerinti elválasztása volt a célunk. A gél maga poliakrilamid alapú, melynek monomerje egy rákkeltő

hatású vegyület, az akrilamid, így fokozott elővigyázatosságot igényelt a gél előállítás. A polimer forma azonban már nem káros az egészségre nézve. A fehérjeminta előkészítésének első lépéseként denaturáltuk a fehérjéket. Ez történhet fizikai úton hőkezeléssel, vagy kémiai úton erős savak vagy bázisok, továbbá egyes sók és szerves anyagok (pl. jelen esetben detergens) adagolásával. A denaturálás során a fehérjék elsődleges szerkezete sértetlen marad. A másodlagos, különösen pedig a harmadlagos és negyedleges szerkezetben azonban alapvető változások történnek, kitekerednek és negatív össztöltést kapnak.

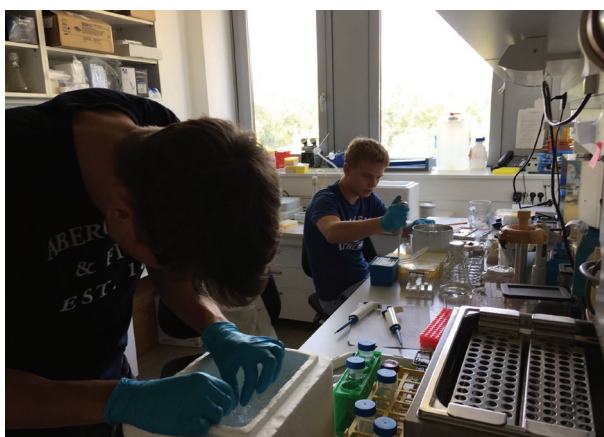
A denaturálás után következett a szétválasztás méret szerint. A fehérjéket az elkészített gél lapon lefuttattuk a felső zsebkéből, ennek során a negatívan töltött fehérjék a + pólus felé áramlottak méretük szerinti sebességgel (7. ábra). A vizsgálat tárgyát képező fehérjét specifikus antitest kötés alapján lehet azonosítani. Ehhez a gél lapról átfuttattuk a fehérjéket azonos elhelyezkedéssel egy poli-vinilidén-difluorid (PVDF) membránra, majd ezt a membránt megjelöltük a megfelelő antitesttel. Ezeket a folyamatokat nevezzük western blotolásnak. A minta felvitelhez színes puffert alkalmaztunk, amely mutatta a fehérjefront haladását, valamint hogy meddig kell folytatni az elektroforézist. Az elektroforézis befejezése után a gélen a fehérjéket Coomassie festéssel megfestettük. A



7. ábra: A fehérjék gél lapon való lefuttatása



8. ábra: A Coomassie festés és az antitesttel való festés eredménye

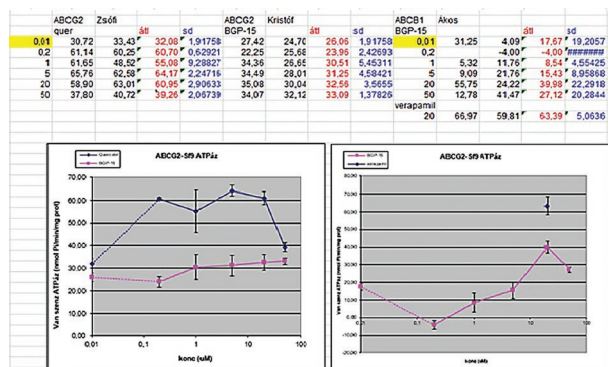


9. ábra: Munka közben

legvégén a PVDF membránt is megfestettük Coomassie fehérje festéssel. A célzott fehérje festéshez specifikus antitestre (elsődleges antitest) és egy ehhez specifikusan kapcsolódó jelölt másodlagos antitestre van szükség, ami a fehérje megjelenítését szolgálja. A jelen esetben a másodlagos antitesthez kötött enzim révén egy lumineszkáló szubsztrátum sötét foltja jelezte a pontos helyet röntgen filmen előhívva. A 8. ábrán jól látható, hogy a minden fehérjét megjelenítő Coomassie festés során erőteljesen megfestődtek az Sf9-sejtekben lévő különböző fehérjék. Az antitesttel végzett specifikus festés láthatóvá teszi azt a csíkot, amely az ABCG2-t tartalmazza. A markersorral / létrával összevetve pedig a kimutatott fehérjék (ABCG2) méretét is meg tudtuk állapítani. Az ábrán látható, hogy kb. 63 kDa volt a keresett fehérjék tömege.

Az ATPáz aktivitás mérése (9. ábra)

Az ABC multidrog transzporterek által végzett drogtanszport ATP függő. Az ATPáz aktivitás szorosan kapcsol a drogtanszporthoz, ezért a drogkölcsonhatás vizsgálata lehetséges az ATPáz aktivitás mérésén keresztül. Először a multidrog fehérjét termelő sejtekből membránt preparáltunk, majd 37°-on

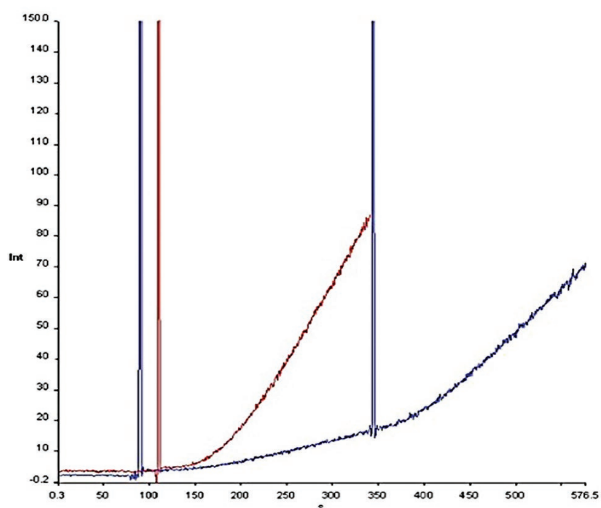


10. ábra: Az ATP aktivitás mérésének eredménye

inkubáltuk a membránt ATP és a vizsgálandó drog jelenlétében. A reakciót 30 perc után leállítottuk, és komplexképzés révén megmértük a felszabadult szervetlen foszfát mennyiségét fotometriával. A különböző körülményekkel kapott adatokat össze kellett vetni, hogy pontos képet kaphassunk a transzport aktivitásáról. Először, miután az általunk használt membránpreparátumban nem csak ABC transzporterek voltak, le kellett vonni a háttéraktivitást, amely minden más ATP-bontó tevékenységgel rendelkező enzimtől jöhetett. Ezt úgy értük el, hogy egy ismert ABC transzporter-inhibitorral blokkoltuk a mi fehérjénk aktivitását, ekkor a kapott eredmény csakis a többi enzim aktivitását mutatta. Ezt a végső eredményből levonva ki lehetett szűrni a legtöbb háttérzajt. Továbbá a transzporterünknek volt egy alapaktivitása, azaz a vizsgálandó drog hozzáadása nélkül is volt valamekkora ATP-bontó képessége. Amennyiben azonban drog hozzáadása nélkül mérjük meg az aktivitást, majd levonjuk az előbb már megkapott háttérzajt, megkaphatjuk az ABC transzporterek alapaktivitását. Ezen adatok ismeretében és a különböző droghígításokkal kapott eredményekkel már egy viszonylag tiszta képet kaphattunk arról, hogy mekkora volt az ABC transzporterek specifikus aktivitása (10. ábra). Ha egy diagramra felvázoljuk az alapaktivitást a drog hozzáadása előtt és a transzporter aktivitását a különböző hígítású drogdátok hozzáadása után, kirajzolódik előttünk, hogy mennyivel növelte meg a gyógyszer a transzmembránprotein aktivitását. Ebből következtethetünk arra, hogy előbbi milyen mértékben aktiválta utóbbit, vagyis, hogy a drog szubsztrátja-e a transzporternek. Az ABCG2-es transzporter esetében különösebb emelkedés nem volt megfigyelhető az általunk vizsgált vegyület esetében, míg az ABCB1-esnél egy ponton nagyobb mértékű aktiválódást tapasztalunk. Ez azt jelenti hogy az ABCG2-esnek nem szubsztrátja az általunk vizsgált drog, míg az ABCB1 szelektíven transzportálja a vizsgált anyagot. Tehát az ABCB1-est nagy mértékben expresszáló sejtek kilökhetik a kísérleti gyógyszert magukból, így semlegesítve annak hatását.

ABC multidrogtranszporterek transzport mérése fluoreszcens szubsztráttal

A tábor utolsó napján az ABCB1 multidrog transzporter transzportját calceinnel mértük. Az elvégzett kísérletünkben egy látványos diagramot (11. ábra) kaptunk, amely szépen mutatja a calcein szintjének a növekedését a sejtekben, miután beadtuk nekik az ABC transzporter inhibitor verapamilt. Az



11. ábra: Az ABCB1 fehérjét tartalmazó sejt és a parentális sejt diagramja calcein hatására

első két hirtelen kiszögellés a calcein vegyület beadásának pillanata. A piros görbe azokat a kontroll sejteket mutatja, melyek alpból nem fejeznek ki ABCB1-et. Ezekben a sejtekben a calcein vegyület kipumpálása nem túl intenzív, így az könnyedén felszaporodhat. A kék görbe azokat a sejteket mutatja, melyekben azonban a mesterségesen bevitt transzporter génről sok ABCB1 keletkezik, így azok a sejtek gyorsabban pumpálták ki magukból a festékanyagot. Azonban a harmadik kiszögellés, azaz a verapamil beadásának pillanata után a gör-

be emelkedni kezd, jelezvén, hogy az inhibitor sikeresen gátolta a transzportereket, így itt is megindult a calcein vegyület gyors felvétele.

Összefoglalás

A fentebbi kísérletek elvégzése, és a kapott adatok kiértékelése után megállapíthattuk, hogy a vizsgált gyógyszerhatóanyag alkalmas gyógyászati célokra, azonban egy ABC transzporternek szubsztrátuma, így azokban a szervezetben, amelyek nagy számban tartalmazzák, azokban előfordulhat, hogy nem fejti ki olyan mértékben a pozitív hatását.

Köszönetnyilvánítás (12. ábra)

Köszönjük az MTA TTK vezetésének a lehetőséget, hogy a táborban részt vehettünk. Hatalmas köszönettel tartozunk a témavezetőinknek, Telbisz Ágnesnek és Horváth Tamásnak, akik egész héten foglalkoztak velünk és segítettek a munkánkat. A tábor elképzelhetetlen lett volna Lendvayné Győrik Gabriella (Gabi néni) nélkül, aki mindvégig velünk tartott és kalauzolt bennünket.

Munkánk során korszerű eszközökkel dolgozhattunk, és témavezetőinknek köszönhetően bepillantást nyerhettünk a kutatók világába, és mindennapjaikba, így közelebb kerülhettünk hosszú távú céljaink eléréséhez, hogy egy napon mi is közülük egynek vallhassuk majd magunkat.



12. ábra: Témavezetőinkkel: Telbisz Ágnessel és Horváth Tamással