

Izabela Michalczyk

Próba określenia mechanizmu agregacji spektryny oraz fizjologicznej roli tego zjawiska

Streszczenie

Podczas badań prowadzonych na komórkach nowotworowych zaobserwowano agregację spektryny związaną z wczesną apoptozą indukowaną za pomocą mieszaniny chemioterapeutyków. Wykryto również obecność kinazy białkowej PKC θ w powstałych apoptotycznych agregatach, a inhibicja PKC θ przy użyciu pseudosubstratu spowodowała przyspieszenie tworzenia się agregatów spektrynowych. Ponieważ agregację spektryny zaobserwowano we wczesnych stadiach apoptozy, wydaje się, że sygnał do ich tworzenia wysyłany jest krótko po jej zainicjowaniu. Mechanizm molekularny leżący u podstaw tego zjawiska pozostaje niepoznany, zatem w niniejszej pracy podjęto próbę jego określenia.

Doświadczenia prowadzono na limfoidalnej linii białaczkowej, Jurkat T, a agregację spektryny obserwowano poprzez ilościową analizę frakcji białek nierozpuszczalnych w zimnym roztworze Tritonu X-100 lub poprzez obserwacje techniką immunofluorescencji. Pierwszym etapem pracy było ustalenie zależności agregacji spektryny od drogi indukcji apoptozy. W tym celu apoptozę aktywowano przy użyciu dwóch induktorów: białka TRAIL (aktywacja szlaku receptorowego) oraz nadtlenu wodoru (aktywacja szlaku mitochondrialnego), a po indukcji obserwowano dynamikę tworzenia się agregatów spektrynowych. Stwierdzono, że agregacja spektryny następuje po indukcji apoptozy zarówno szlakiem receptorowym jak i szlakiem mitochondrialnym, jednakże nieznacznie szybciej w przypadku zastosowania TRAIL. Podobnie jak w przypadku użycia chemioterapeutyków kinaza białkowa PKC θ lokalizuje się w agregatach spektrynowych po indukcji apoptozy przy użyciu TRAIL.

Ponieważ agregaty spektrynowe tworzą się po aktywacji receptora TRAIL-R, ale przed aktywacją kaspazy 8, stąd postanowiono sprawdzić przedział czasowy pomiędzy tymi dwoma stadiami, w którym może mieć miejsce inicjacja agregacji spektryny. W tym celu wprowadzono stabilną linię z obniżoną ekspresją genu kodującego białko FADD (*FADD-KnD*). W komórkach *FADD-KnD* poziom białka FADD został obniżony o ponad 50%. Komórki te okazały się mniej wrażliwe na apoptozę indukowaną przy użyciu TRAIL w porównaniu z komórkami linii wyjściowej, a obniżona ekspresja *FADD* skutkuje opóźnieniem agregacji spektryny w warunkach indukcji apoptozy. Ponadto, w komórkach stabilnej linii Jurkat T *FADD-KnD* kinaza białkowa PKC θ lokalizuje się głównie w obrębie błony

komórkowej w porównaniu z cytosolową lokalizacją w nieapoptotycznych komórkach linii wyjściowej, co może sugerować, że szlak sygnałny TRAIL-FADD może być związany z procesem tworzenia się agregatów spektrynowych.

Na podstawie opublikowanych wcześniej badań oraz wyników przytoczonych powyżej postanowiono dokładniej zbadać relację między kinazą PKC θ , a agregacją spektryny. Wykazano, że sama obecność kinazy PKC θ we frakcji membranowej nie jest czynnikiem indukującym tworzenie agregatów spektrynowych. Dlatego wyprowadzono stabilną linię o obniżonym poziomie ekspresji genu kodującego PKC θ w komórkach (*Prkcq-KnD*). Wykazano, że komórki Jurkat T *Prkcq-KnD* to komórki, w których po upływie 4 godzin od zainicjowania apoptozy uzyskano zwiększony odsetek komórek eksponujących PS w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Zaobserwowano również wyższą aktywność kaspazy 8 już po 2 godzinach od zainicjowaniu apoptozy przy użyciu TRAIL w komórkach Jurkat T *Prkcq-KnD* w porównaniu z komórkami kontrolnymi Jurkat T. Co najważniejsze, stwierdzono, że spektryna agreguje znacznie szybciej po indukcji apoptozy za pomocą TRAIL w komórkach *Prkcq-KnD* niż w komórkach kontrolnych. Wykazano również, że spektryna w agregatach ulega fosforylacji. Jednakże wspomniana fosforylacja nie jest sygnałem do agregacji, choć nadmiar miejsc fosforylacji spektryny opóźnia jej agregację. Mianowicie, po transfekcji komórek Jurkat T konstruktem DNA kodującym C-końcowy fragment spektryny (Spc-GFP), oraz po inicjacji apoptozy zaobserwowano, że spektryna endogenna agreguje szybciej w porównaniu do komórek kontrolnych. Co więcej, w komórkach z nadekspresją C-końcowego fragmentu spektryny zaobserwowano, że PKC θ przechodzi później z cytosolu do błony po aktywacji TRAIL-R.

Z drugiej strony projekt zakładał analizę wpływu samej spektryny na proces apoptozy. Do tego celu wykorzystano otrzymaną, stabilną linię komórek Jurkat T z obniżoną ekspresją genu kodującego spektrynę α (*Sptan1-KnD*). Doświadczenia wykazały, że kaspaza 8 ulega aktywacji wcześniej w komórkach Jurkat T *Sptan1-KnD* w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Ilość aktywnej formy kaspazy 8 jest wyższa w komórkach *Sptan1-KnD* w porównaniu z kontrolą już w komórkach nieapoptotycznych. Taka nieaktywna forma kaspazy 8 w komórkach Jurkat T lokalizuje się w strefie błony komórkowej i w cytozolu, natomiast w komórkach linii *Sptan1-KnD* głównie w obrębie błony. Zaobserwowano, że prekursor kaspazy 8 nie jest związany z agregatami spektrynowymi tworzącymi się w podczas wczesnej apoptozy. Destabilizacja szkieletu aktynowego za pomocą latrunkuliny nie wpływa na rozmieszczenie prekursora kaspazy 8. Zjawisko obniżenia poziomu spektryny w komórce powoduje zwiększenie ilości prekursora kaspazy 8 w obszarze błony w towarzystwie

wimentyny i białka 4.1, co może pośrednio przekładać się na przyspieszenie procesu apoptozy w komórkach *Sptan1*-KnD.

Celem niniejszego projektu była próba określenia mechanizmu agregacji spektryny mającej miejsce podczas apoptozy w komórkach nowotworowych. Podczas serii eksperymentów zaobserwowano, iż spektryna agreguje szybciej w komórkach z obniżonym poziomem PKC θ a później w komórkach z mniejszym poziomem białka FADD. Wydaje się, że obecność kinazy białkowej PKC θ w pobliżu błony komórkowej działa jakoby negatywny regulator agregacji spektryny. Natomiast z drugiej strony, obniżona zawartość spektryny może prowadzić do przyspieszenia apoptozy w komórkach m.in. poprzez zwolnienie miejsca w obszarze błony dla takich białek jak, kaspaza 8 czy białko 4.1. Uzyskane wyniki sugerują, że PKC θ odgrywa ochronną funkcję wobec agregacji spektryny, natomiast FADD może być jej induktorem. Zrozumienie molekularnego mechanizmu(ów) agregacji spektryny może przyczynić się do wyjaśnienia roli spektryny we wczesnym stadium apoptozy.