

Gyógyszerrezisztenciát okozó fehérjék vizsgálata



AKI kíváncsi kémikus kutatótábor
2017.06.25 - 07.01.

Témavezetők : *Telbisz Ágnes, Horváth Tamás*

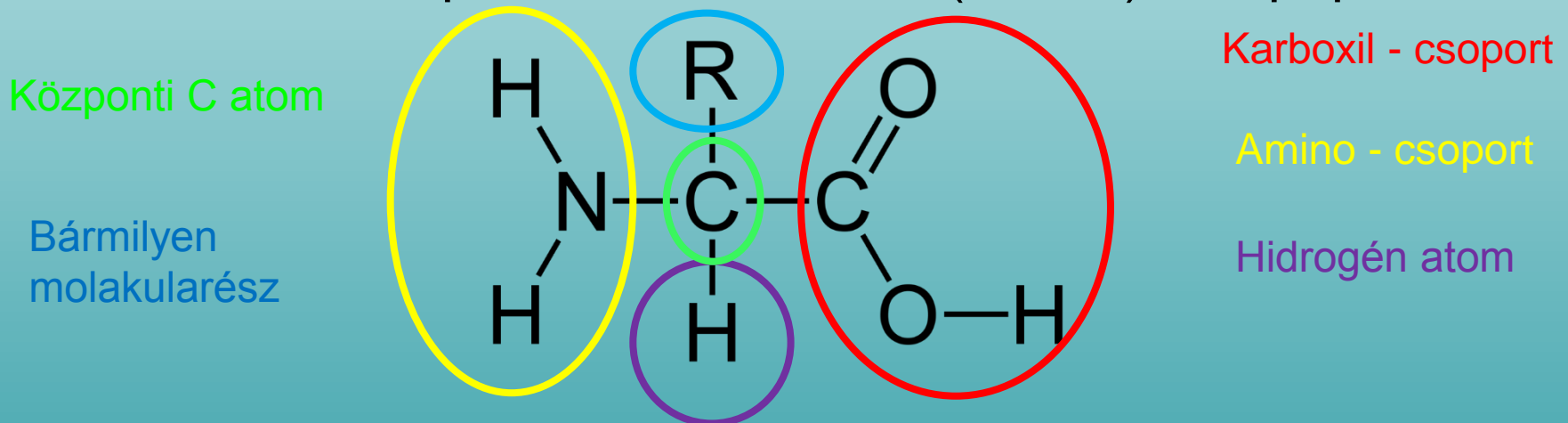
Kutatók : *Dobolyi Zsófia, Bereczki Kristóf,
Horváth Ákos*

Gyógyszerrezisztencia

- Az emberi szervezetbe nagyon sokféle kórokozó (patogén) juthat be. Ide tartoznak a vírusok, a gombák, a baktériumok és az egysejtűek. A szervezetbe jutva ezeknek a kórokozóknak a túlélés és a szaporodás a legfontosabb célja.
- A különböző gyógyszereknek az a feladata, hogy ezeket a kórokozókat vagy elpusztítsák, vagy megakadályozzák szaporodásukat a szervezetben. Ha a kórokozók a kezelés ideje alatt szaporodni képesek, akkor általában úgy változtatnak saját felépítésükön (mutációkat alakítanak ki), hogy ne hasson rájuk a gyógyszer.
- A rezisztencia kialakulásakor az adott gyógyszer (vagy gyógyszer-kombináció) elveszíti azt a képességét, hogy megakadályozza a kórokozó szaporodását. Ennek eredményeként idővel a teljes terápia hatástalanná válik.

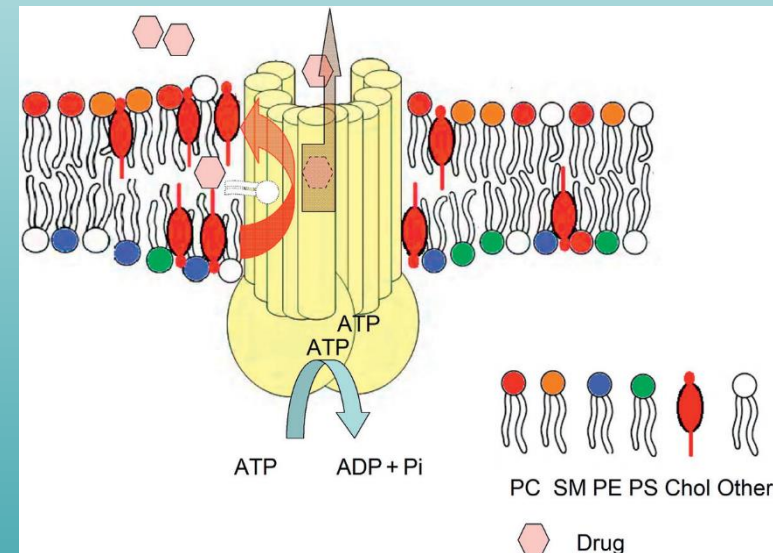
A fehérjék I. (JJJ)

- A fehérjék az élőlények alapvető molekulái, változatosságuk és specifikusságuk az élet számos kis részletében megjelenik.
- Fehérjék építik fel a hajszálakat, a szarut, az izmokat, funkcionálnak enzimként (biokatalizátor), hormonként és különböző szállítóanyagként (hemoglobin).
- α -aminosav-polimerekből állnak (20db) \longrightarrow peptidkötés



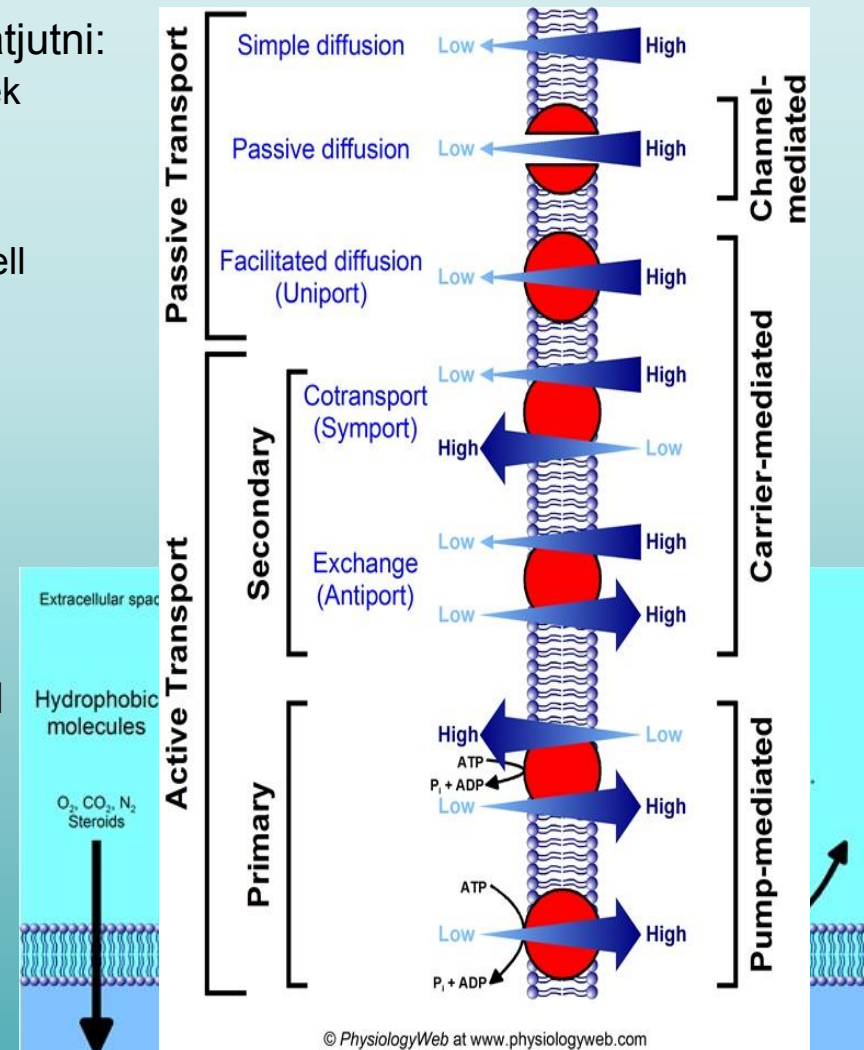
A fehérjék II. (JJJ)

- A fehérjék elsődleges szerkezetét (aminosav sorrendjét) a nukleotid bázispárok által meghatározott kód határozza meg
- Feladataik: enzimek, hormonok, alvadásképzők, izmokban mozgatás (aktin, miozin), stb...
- A kettős lipid membránba beékelődve különböző funkciójú membránfehérjék találhatóak

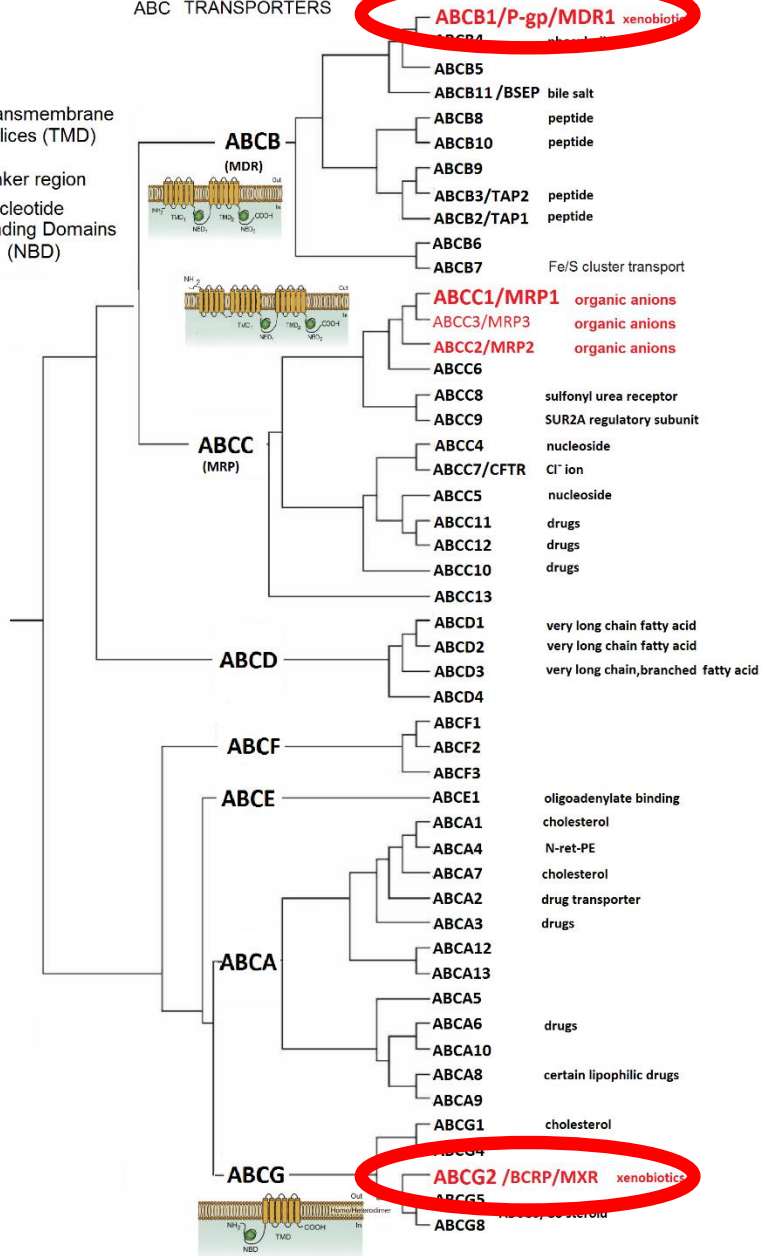
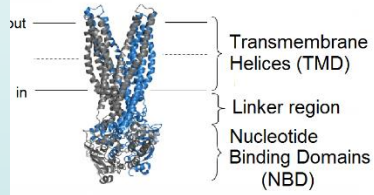


Transzporterek és működésük

- A membránon az anyagok több úton tudnak átjutni:
 - A kisebb molekulák, amelyek nem rendelkeznek töltéssel, azok szabadon át tudnak diffundálni
 - A makro- vagy töltéssel rendelkező molekulák azonban maguktól nem képesek áthaladni a sejthártyán, így ezeket membránfehérjéknek kell „átpumpálnia”
- 3 fő multidrogtranszporter család:
 - ABCB1
 - ABCC1
 - ABCG2
- A multidrog rezisztencia fehérjék membrán transzporterek, amelyeket ATP hasítás energiája révén számos toxikus anyagot képesek távol tartani a sejt belsejétől
- ABC – ATP Binding Cassette



ABC TRANSPORTERS



Kutatásunk bevezetése

- Modell sejteket vizsgálunk *in vitro* technikával
 - A sejtvonalakba bevittük a gént, majd abból expresszáltuk a kívánt fehérjét
1. Vektorhordozó bakulovírussal fertőztük a rovarsejteket (Sf9)
 2. Amint beépült a génünk, over-expresszáltuk a fehérjét
 3. Membránpreparálás

4. Lowry-féle protein meghatározás

- Cél: membránpreparátum összfehérje-tömegének meghatározása
- Kromogén (színképző) eljárás
- A fehérje tirozin része redukálja a szerves vegyületet, így komplex képződik

Lowry-féle (Folin-Ciocolteu) protein meghatározás

1. A membránpreparátum mintákat csak a 4. lépéstől indítjuk. A sejtes mintát szonikálással homogenizáljuk.
2. 5 ul protein mintát bemérünk 900 ul Deszt. vízbe (mikrocentrifuga cső) és hozzáadunk 10 ul 2% Na-deoxykolátot, összekeverjük és 15 percig állni hagyjuk 4°C-on.
3. Hozzáadunk 350 ul 25% TCA (trichloroacetic acid)-t és keverjük (Kicsapjuk a fehérjét).
4. Az asztali **centrifugában** 15 percig 14000 RPM sebességgel centrifugáljuk a mintát 4°C-on. Utána **leöntjük a felülúszót**.
5. Hozzáadunk **1 ml Lowry reagent** és keverjük
6. Hozzáadunk 100 ul of hígított **Folin reagent** és megkeverjük
7. Sötétben szobahőmérsékleten tartjuk 45 min-ig, majd **abszorbanciát mérünk fotométerrel** 660 nm-en.

Kalibrációs sorként BSA fehérjeoldatot használunk 5-70 ug/minta (5-70 ul bemérése 1 mg/ml oldatból)

Lowry reagent: 98% reagent A, 1% reagent B, 1% reagent C. Mix it freshly.

Component A: 4g NaOH+50g (Na₂CO₃ x 10 H₂O) in 1000 ml H₂O, store at 4°C

Component B: 2.g (Na-tartrate x 2H₂O) in 100 ml H₂O, store at 4°C

Component C: 1g (CuSO₄x5H₂O) in 20 ml H₂O, store at 4°C

Folin reagent Sigma F9252

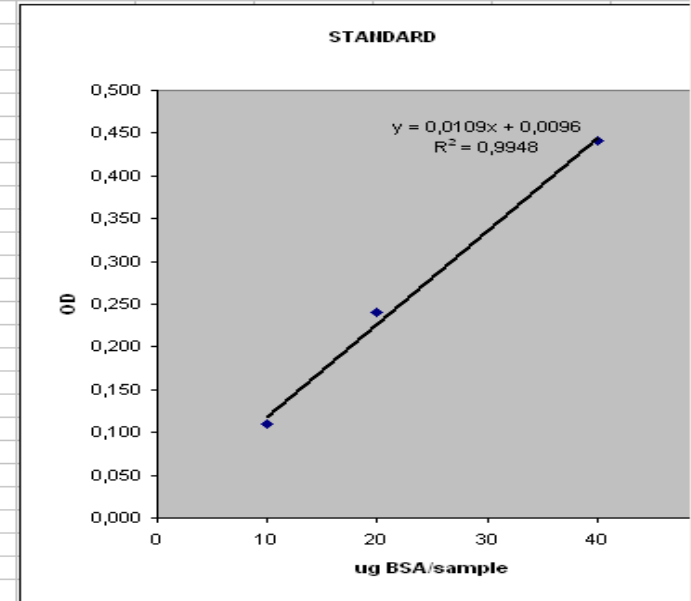
Dilute 1:1 with H₂O

Mindez képekben...



Eredményeink

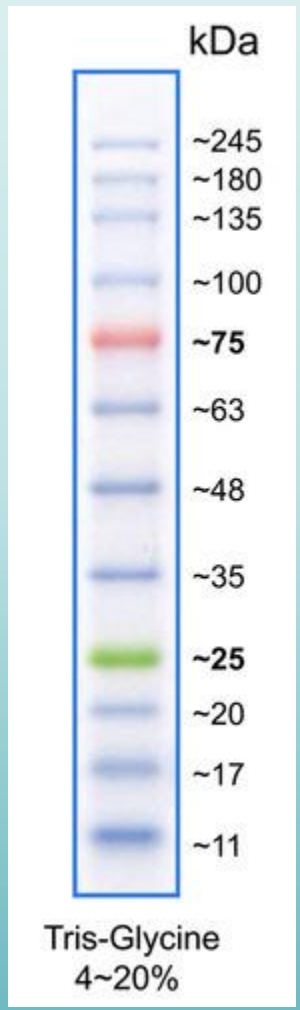
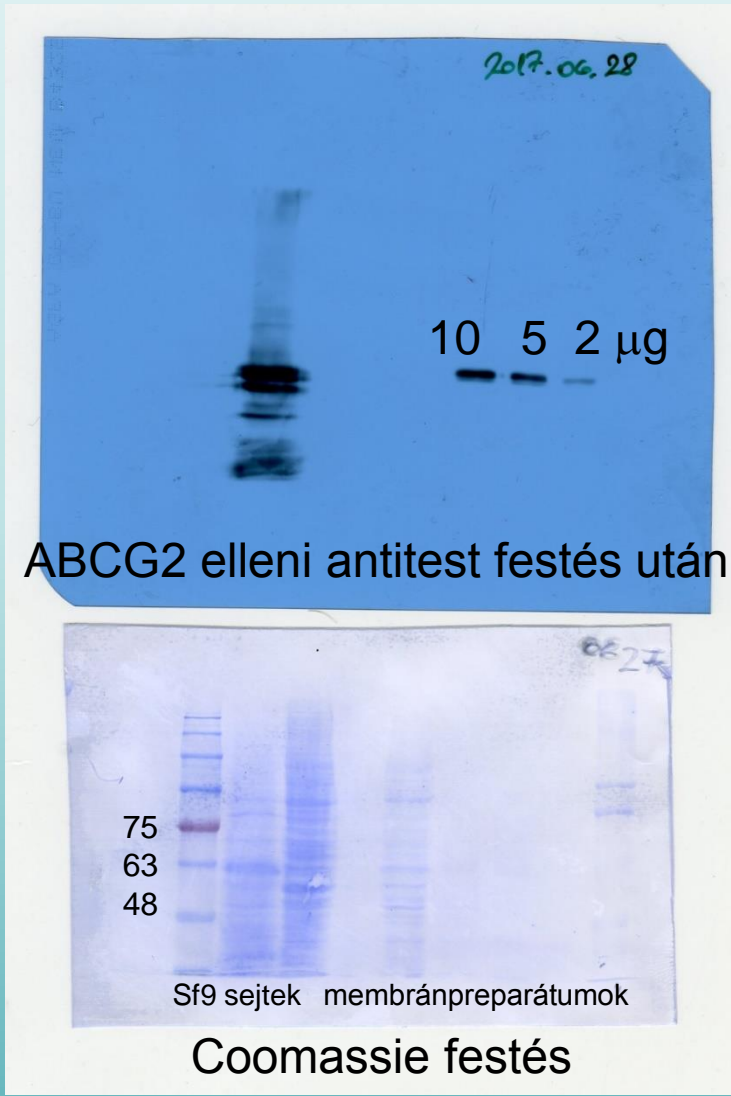
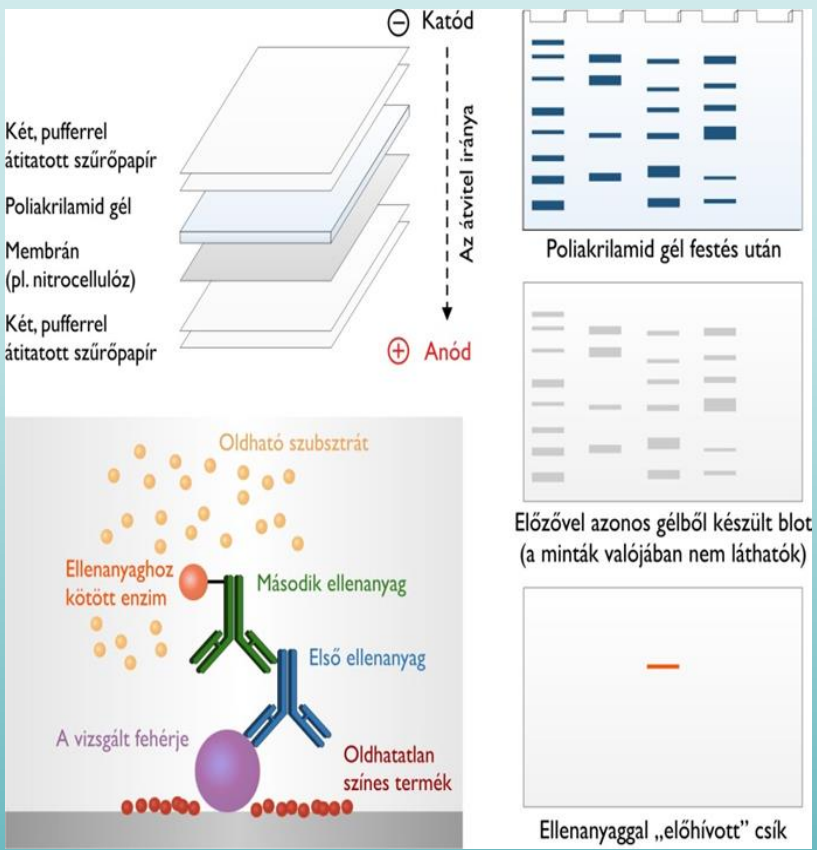
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1														
2														
3														
4			lowry standard											
5			ug BSA	OD		átl	sd							
6			10	0,0968	0,0947	0,1364	0,109	0,023						
7			20	0,2394	0,23	0,2535	0,241	0,012						
8			40	0,4623	0,4176	0,4414	0,440	0,022						
9														
10														
11	y=ax+b		a	0,0109										
12			b	0,0096										
13			samples OD											
14	memb20150119 ABCG2		0,5406	0,5987	0,5486									
15														
16														
17														
18														
19														
20			protein conc. mg prot/ml			átl	sd							
21	memb20150119 ABCG2		9,74	10,81	9,89	10,147	0,578							
22														
23														
24														
25														
26							1	0,0968						
27							2	0,1364						
28							3	0,2394						
29							4	0,2535						
30							5	0,4623						
31								0,4414						
32								0,5406						
33								0,5987						



SDS-page – gélektroforézis

- Cél: nukleinsavak és fehérjék elválasztása a közegtől
- Alapanyag: poliakrilamid
- Lépések:
 1. Fehérjék denaturálása
 2. Méret szerinti szétválasztás a gél lapon
 3. Átmásoljuk egy PVDF membránra (western blottolás)
 4. Elektroforézis után Coomassie fehérje festés
 4. Megjelöljük primer antitesttel (anti-ABCG2) a membránt

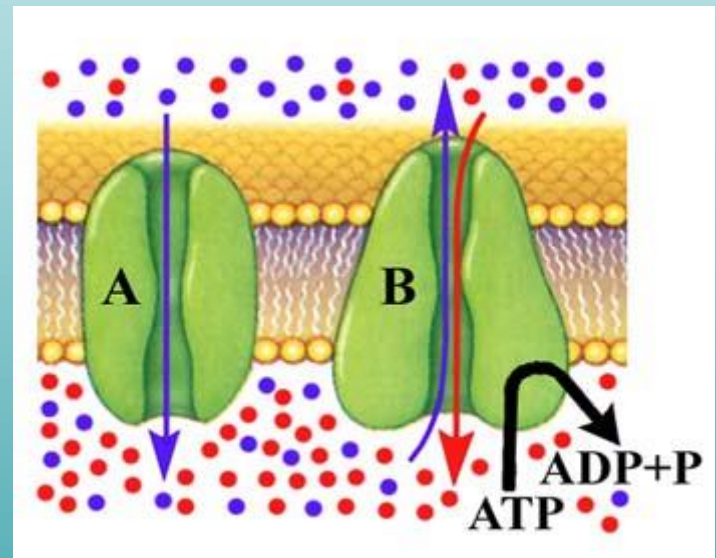
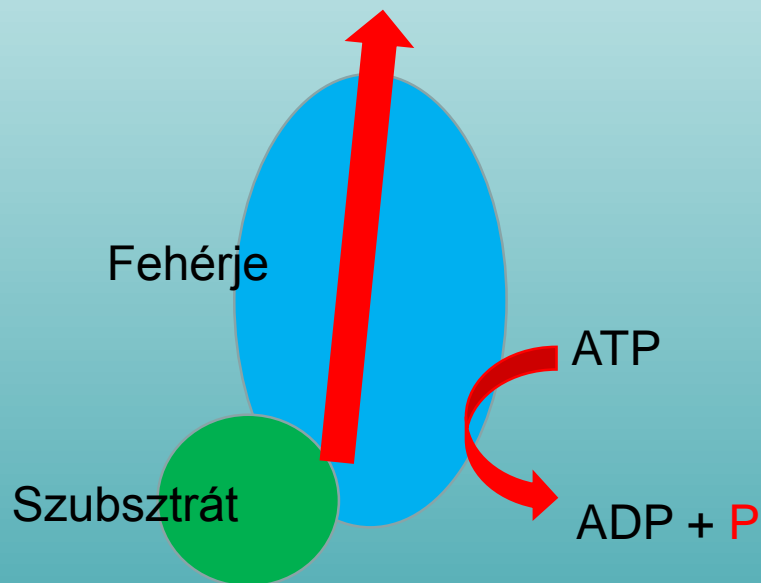
Az ábra, ami mindent megmagyaráz..



A marker skálája

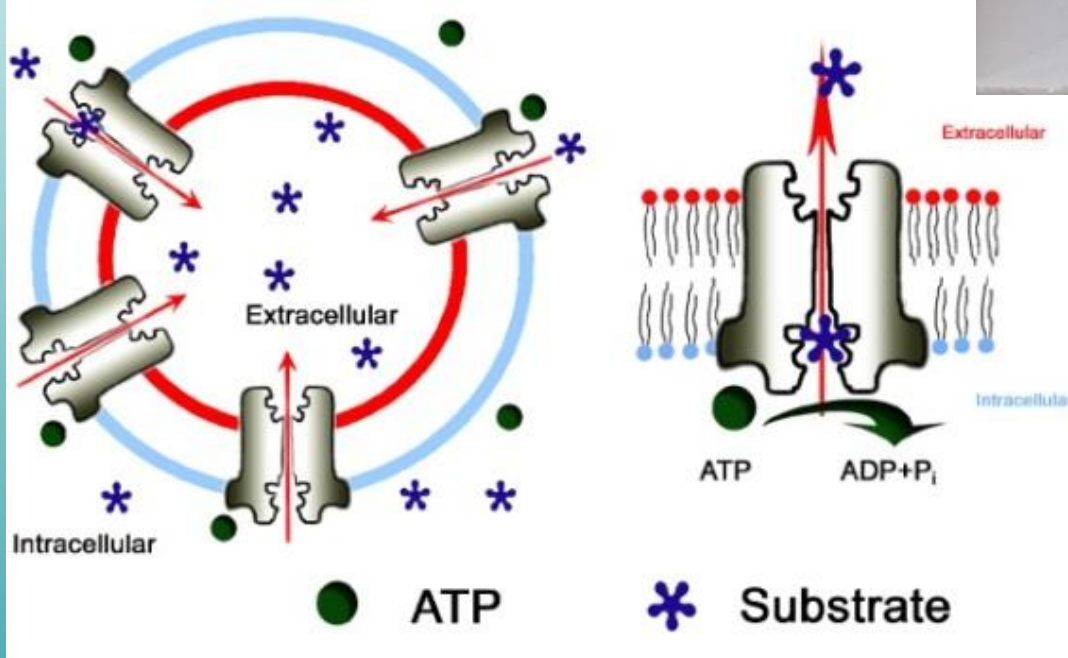
ATPáz aktivitás mérés

- Aktív membrántranszport
- Az energiát ATP hasításával nyeri a konformációváltáshoz
- A transzport mértéke ~ elhasított ATP mennyisége



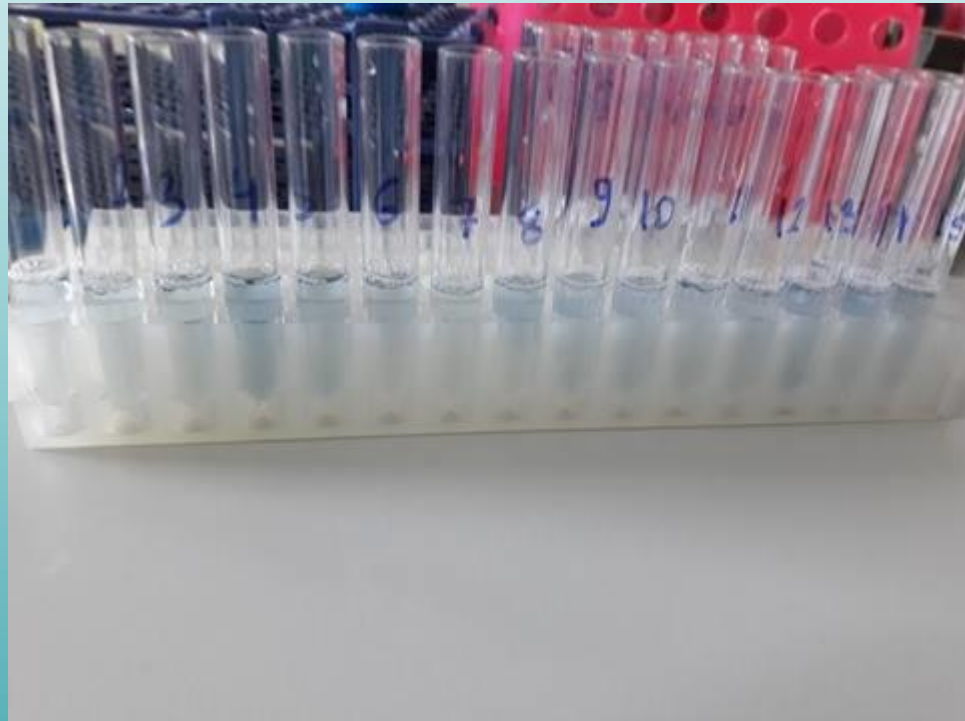
A mérések

- Assay mix – pufferek, ATP-áz gátlók
- Inverz vezikulák
- Szubsztrát: gyógyszer
- ATP önbomlása
- Háttér levonása
- SDS



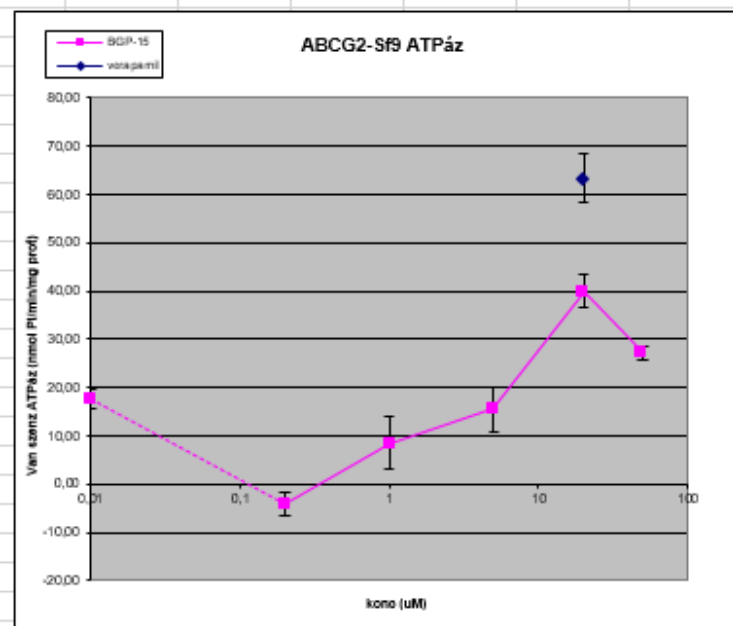
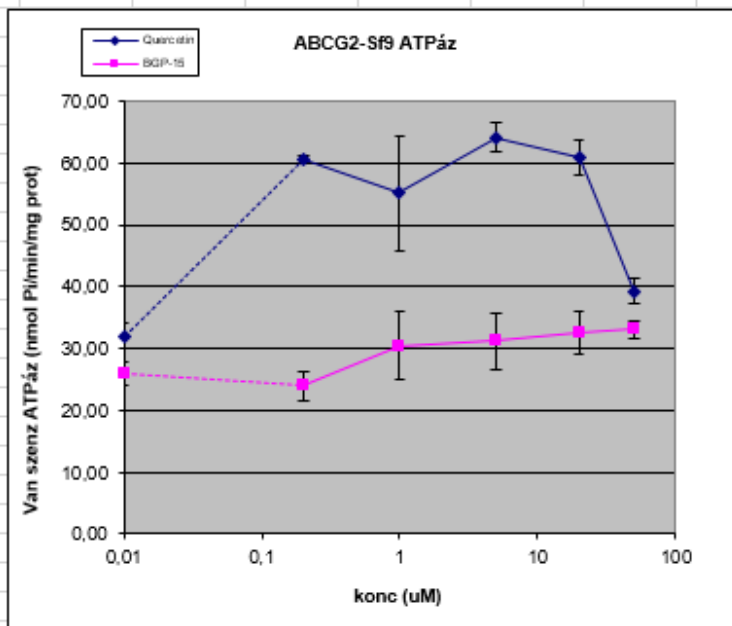
Foszfát mennyiségének meghatározása

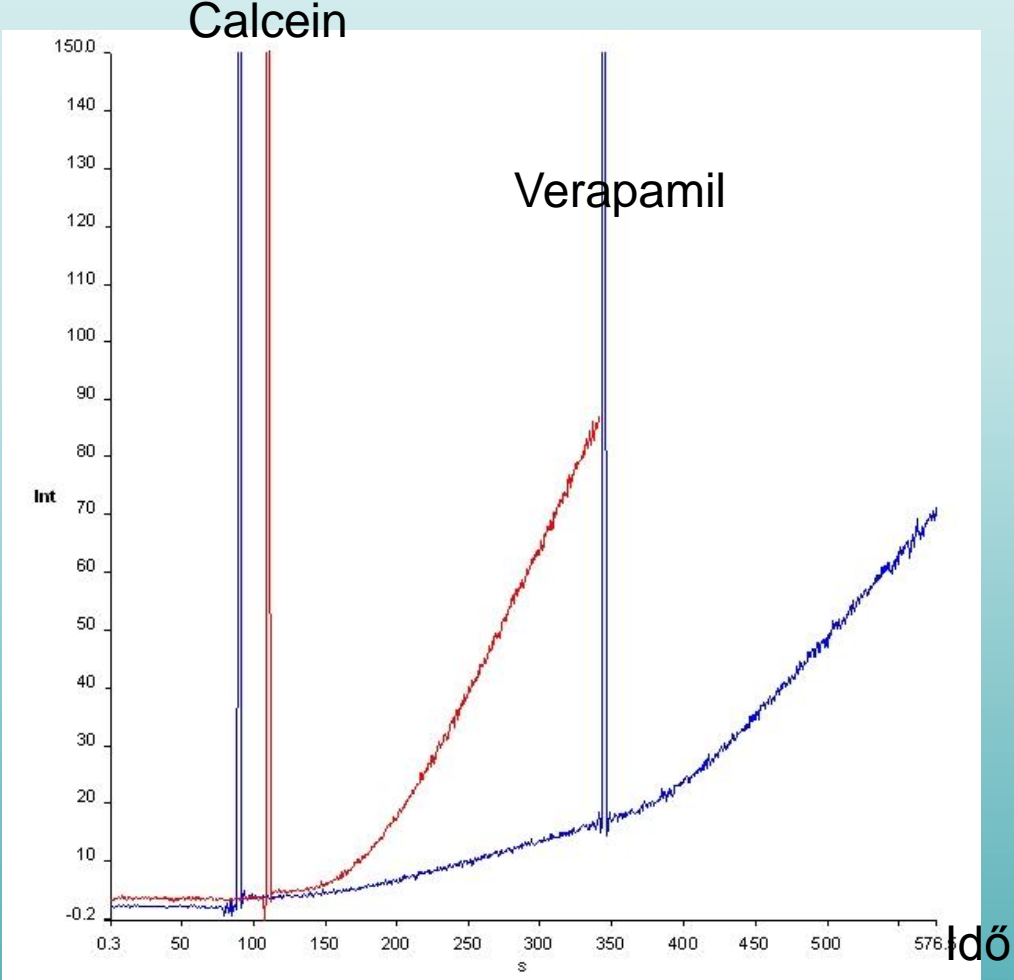
- Komplexképződési reakció
- Standardsor
- Elnyelés lemérése fotométerben



Adatok kiértékelése

	ABCG2	Zsófi			ABCG2	Kristóf			ABCB1	Ákos			
	quer		átl	sd	BGP-15		átl	sd	BGP-15		átl	sd	
0,01	30,72	33,43	32,08	1,91758	27,42	24,70	26,06	1,91758	0,01	31,25	4,09	17,67	19,2057
0,2	61,14	60,25	60,70	0,62921	22,25	25,68	23,96	2,42693	0,2		-4,00	-4,00	#####
1	61,65	48,52	55,08	9,28827	34,36	26,65	30,51	5,45311	1	5,32	11,76	8,54	4,55425
5	65,76	62,58	64,17	2,24716	34,49	28,01	31,25	4,58421	5	9,09	21,76	15,43	8,95868
20	58,90	63,01	60,95	2,90633	35,08	30,04	32,56	3,56655	20	55,75	24,22	39,98	22,2918
50	37,80	40,72	39,26	2,06739	34,07	32,12	33,09	1,37826	50	12,78	41,47	27,12	20,2844
									verapamil				
									20	66,97	59,81	63,39	5,0636





Idő

