

Jasplakinolid ile F-aktin Stabilizasyonu Uygulanan Endotel Hücrelerinde Difteri Toksini Trafığı

Bilge ÖZERMAN EDİS*[✉], Ebru HACIOSMANOĞLU**[✉], Başak VAROL*[✉], Muhammet BEKTAŞ*[✉]

*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul

**İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

ÖZ

Amaç: Ökaryotik hücrelerde mikrofilament yapısının ana bileşeni olan aktin, sinyal yollarını aktin bağlayan proteinlerle etkileşerek düzenler. Daha önceki çalışmalarımızda difteri toksini ve mutant difteri toksini (CRM-197) ile enfekte olan endotel hücrelerinde toksinin A fragmenti ile etkileşen filamentöz aktinin depolimerleştiği saptanmıştır. Bu çalışmada endotel hücrelerinde F-aktin stabilizasyonu sağlanarak difteri toksininin hücre içi trafiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Hücre kültüründe endotel hücreleri çoğaltıldı ve jasplakinolid (0.1 µmol/ml) ile sırası ile 30 ve 60 dakika uygulandı. Difteri toksini (0.75 nmol/ml) uygulaması için jasplakinolid ile inkübasyon süresi 15 dakika ile sınırlandırıldı. Hücre içi F-aktin stabilizasyonu ve difteri toksini trafiği immüno Floresan mikroskopisi ile görüntülendi.

Bulgular: Bekletme süresine bağlı olarak stres liflerinin jasplakinolid uygulanan endotel hücrelerinin hücre zarında belirginleştiği belirlendi. F-aktin stabilizasyonu sağlanan endotel hücrelerinde difteri toksini trafiğinin engellenmediği ve A fragmenti'nin perinükleer alana yöneldiği görüntülendi.

Sonuç: Hücre içinde F-aktin stabilizasyonu ile G-aktin/F-aktin dönüşümünün engellenmesi difteri toksini trafiğini durdurmamaktadır. Bu sonuç toksin trafiğinde filamentöz aktinin önemini gösteren çalışmaları desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: Difteri toksini, F-aktin, HUVEC

ABSTRACT

F-actin Stabilization by Jasplakinolide in Endothelial Cells and Diphtheria Toxin Traffic

Objective: Actin, the main component of microfilament structure in eukaryotic cells, regulates signaling pathways by interacting with actin binding proteins. Our previous studies have shown that depolymerization of filamentous actin (F-actin) occurs following its interaction with fragment A of the toxin in endothelial cells infected with diphtheria toxin and mutant diphtheria toxin (CRM-197). In this study, it was aimed to determine intracellular trafficking of diphtheria toxin by stabilization of F-actin in endothelial cells.

Material and Methods: Human umbilical vein endothelial cells were cultured and incubated with 0.1 µM jasplakinolide for 30 and 60 minutes respectively. For diphtheria toxin (0.75 nM) treatment, the incubation period with jasplakinolide was limited to 15 minutes. Intracellular stabilization of F-actin and diphtheria toxin traffic were visualized using immunofluorescence microscopy.

Results: Depending on the duration of the incubation period, it was determined that the stress fibers were expressed in the cell membrane of the endothelial cells treated with jasplakinolide. It was shown that diphtheria toxin trafficking was not inhibited in F-actin-stabilized endothelial cells and fragment A was directed to the perinuclear area.

Conclusion: Inhibition of G-actin / F-actin turnover in steady state by intracellular F-actin stabilization does not stop diphtheria toxin trafficking. This result supports studies showing the importance of filamentous actin in toxin trafficking.

Keywords: Diphtheria toxin, F-actin, HUVEC

GİRİŞ

Aktin, ökaryotik hücrelerde, mikrofilament yapısının temel bileşenini oluşturmaktadır ayrıca

yapısal ve düzenleyici proteinler ile etkileşerek sinyal yollarında kavşak görevi gören bir motor proteindir⁽¹⁾. Aktin hücre içinde hem monomer hem polimer yapıda bulunur.

Alındığı tarih: 19.02.2018

Kabul tarihi: 21.06.2018

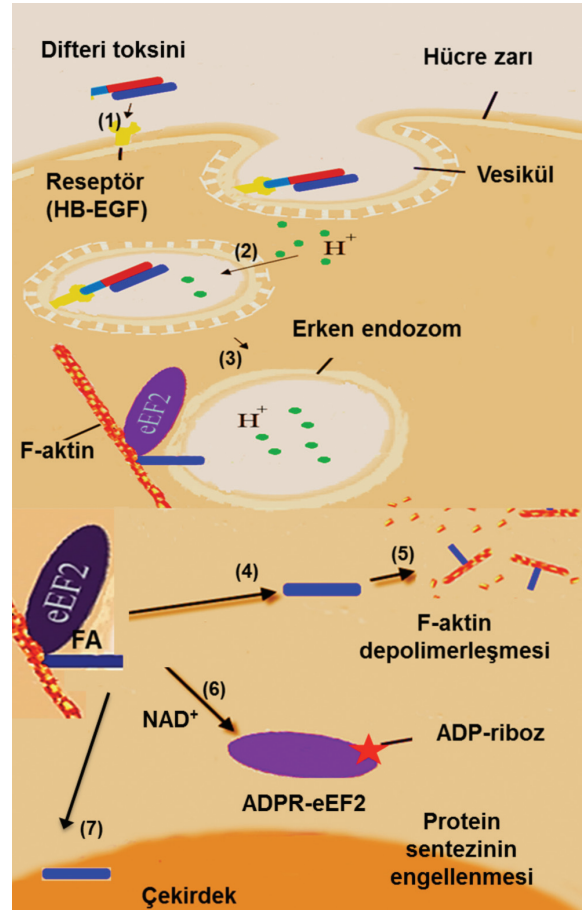
Yazarların ORCID bilgileri:

Bilge Özerman Edis 0000-0002-3499-0474 Ebru Haciosmanoğlu 0000-0001-9559-4515

Başak Varol 0000-0002-0597-4571 Muhammet Bektaş 0000-0002-4438-1664

Monomerik aktin (G-aktin) molekülleri sarmal olarak polimerleşerek filamentöz aktini (F-aktin) oluşturur. Konak hücrenin aktin iskeleti, patojenlerin istilası ve patojenlerin hücre içi hareketi sırasında yeniden düzenlenir⁽²⁾. Bazı protein yapıdaki bakteriyel toksinlerin glikozilleme, adenilleme, Adenozin difosfat (ADP)-ribozilleme ve deamidleme gibi translayon sonrası modifikasyonlar ile aktin iskeletinin yapısının bozulmasına neden olduğu bilinmektedir⁽³⁾.

Bakteriyel peptid olan difteri toksini (DT) ökaryotik elongasyon faktör 2 (eEF2)'yi hedef alır ve ancak nikotin amid dinükleotid (NAD)'in varlığında eEF2'yi ADP-ribozilleyerek eEF2'nin etkinliğini geri dönüşümsüz olarak baskılar. DT, eEF2'nin ADP-ribozillenmesi sonucu protein sentezinin durmasına neden olur⁽⁴⁾. Bununla beraber, DT aktin filamentlerinin depolimerleşmesine neden olurken bir yandan da nükleaz etkinliği gösterir^(5,6). Bu toksininin yapısı, hücre içine alınması ve etkinlik aşamaları ayrıntılı olarak sunulmuştur⁽⁷⁾. DT hücre içine endositik yolla taşınır ve enzimatik etkinliğe sahip olan kısmı fragment A (FA) sitosolik translokasyon faktörleri aracılığı ile sitozole geçer⁽⁸⁾ (Şekil 1). FA ve aktinin etkileşimi deneysel olarak gösterilmiştir⁽⁵⁾. Yaptığımız çalışmalarla FA'nın erken endozomlardan salınmasında, FA'nın hedefi olan eEF2 ve aktinin birlikte etkili olduğunu saptadık⁽⁹⁾. FA-eEF2-aktin etkileşimleri sonucu eEF2'nin ADP-ribozillenmesinin dışında, hücrede aktin filamentlerinin depolimerleşerek yıkıldığını belirledik⁽¹⁰⁾. Ayrıca gerek FA-aktin arasında gerekse mutant difteri toksini-aktin arasında olası etkileşim noktalarını moleküler modelleme yöntemleri ile belirledik^(11,12). Bu bilgiler doğrultusunda endotel hücrelerinde aktin filamentlerinin sabitlendiği bir durumun difteri toksini hareketini nasıl etkilediğini araştırmayı amaçladık. Bunun için zar geçirgen özelliği olan ve F-aktin stabilizasyonunu sağlayan jaspilaklinolidi hücre kültürü ortamında endotel



Şekil 1. Difteri toksininin hücreye girişi ve etkinlik aşamaları.

Difteri toksini R-domain ile hücre yüzeyindeki reseptöre bağlanır (1) ve klatrine bağlı endozitoz ile hücre içine girer (2). Düşük pH ile tetiklenen konformasyonel değişim sonucu T-domain, endozomal zardan toksinin sitozole geçiş basamaklarını başlatır (3). Katalitik olan toksindeki C-domain, fragment A (FA), endozomlardan sitozole, sitosolik translokasyon faktörleri aracılığı ile geçer. Bu süreçte disülfid bağları indirgenir ve şaperonlar aracılığı ile peptid yapı yeniden katlanır (4). F-aktinin depolimerleşme süreci tetiklenirken, FA sitozoldeki NAD⁺ ile eEF2'yi ADP-ribozilleyerek protein sentezinin durmasına neden olur (5,6). Çekirdeğe ulaşan FA nükleaz etkinliği gösterir (7).

hücrelerine uyguladık. Bu koşullar altında difteri toksini verilen hücrelerde toksinin hücre içi hareketini immunfloresan mikroskopi yöntemi ile inceledik.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kimyasallar: Hücre kültür malzemeleri Nunc ve Falcon firmalarından sağlandı. Çalışmalarda jaspilaklinolid (AdipoGen), DT (Calbiochem),

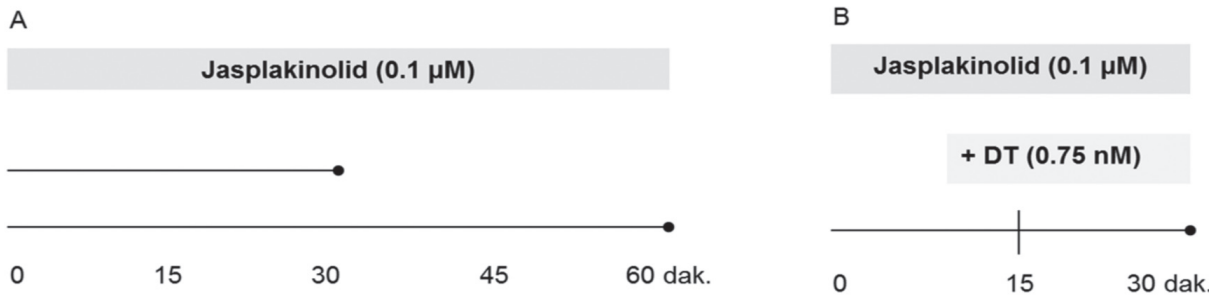
birinci antikor olarak anti-FA (7F2) (Santa Cruz), ikinci antikor olarak anti-fare IgG-Tetrametilrodamin izotiyosiyanat (TRITC) (Santa Cruz), falloidin-Fluoresein izotiyosiyanat (FITC) (Sigma) ve preparatlarda koruyucu olarak ProLong Gold anti-fade (Invitrogen) kullanıldı.

Hücre kültürü ve uygulamalar: Çalışmada hücre soyu olarak insan göbek kordonu damar endotel hücreleri (HUVEC) kullanıldı. Hücreler standart kültür koşullarında, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve antibiyotik (100 µg/ml streptomisin ve 100 U/ml penisilin) içeren Dulbecco modifiye Eagle medium (DMEM) F-12 içinde 37°C'de ve %5 CO₂'li kültür ortamında çoğaltıldı. Hücrelerin canlılık belirlenmesi tripan mavisi ayırma yöntemi ile yapıldı. Hücreler, floresans mikroskopta incelenmek üzere içinde yuvarlak lamel bulunan 6 kuyulu hücre plaklarına (1x10⁶ hücre/ml) ekildi ve hücrelerin yapışması için gece boyu beklendi. İlk aşamada hücrelerde F-aktin stabilizasyonunu sağlamak üzere kuyulara jasplakinolid (0.1 µmol/ml) ilave edilerek 30 ve 60 dakika boyunca inkübe edildi⁽¹⁵⁾. İkinci aşamada jasplakinolidin medium içinde toplamda bulunma süresi 30 dakika olacak şekilde düzenlendi. Bunun için 0.1 µmol/ml jasplakinolid ile 15 dakika inkübe edilen hücreler difteri toksini (0.75 nmol/ml) ile enfekte edildi ve 30 dakika tamamlandığında medium uzaklaştırıldı. Hücreler fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandı ve immünfloresan incelemeye geçildi⁽¹⁰⁾.

İmmünfloresan inceleme: HUVEC'lerde aktin iskeleti F-aktine bağlanan falloidin-FITC (1:1000) ile işaretlendi. DT uygulanan hücrelere FA'nın hücre içi lokalizasyonu, anti-FA monoklonal antikor 7F2 (1:1000) ve anti-fare IgG-TRITC ikinci antikor kullanılarak görünlendi. İmmünfloresan inceleme için öncelikle yuvarlak lameller üzerine yayılmış hücreler PBS ile yıkandı ve %0.01 Triton X-100 /PBS çözeltisinde 10 dk. bekletildi. Belirleme için %2 paraformaldehit/PBS ortamında 1 saat 4°C'de inkübe edildikten sonra %1 PBS-BSA ile seyreltilen birinci antikor ile 2 saat boyunca inkübe edildi. Floresan işaretli ikinci antikorlar %1 PBS-BSA ile 1:2000 oranında seyreltildi ve 1 saat boyunca uygulandı. Floresan işaretli boyanın erken solmasını önlemek ve çekirdeklerin işaretlenmesini sağlamak amacı ile DAPI içeren ProLong Gold anti-fade kapatma sıvısı kullanıldı. Preparatlar floresan mikroskopta (Olympus BX51) immersiyon objektifi ile x100 büyütmede tekli ve üçlü filtreler ile incelendi. Görüntüler Olympus DP-72 kamera sistemi ve DP2-TWAIN yazılım programı ile fotoğraflandı.

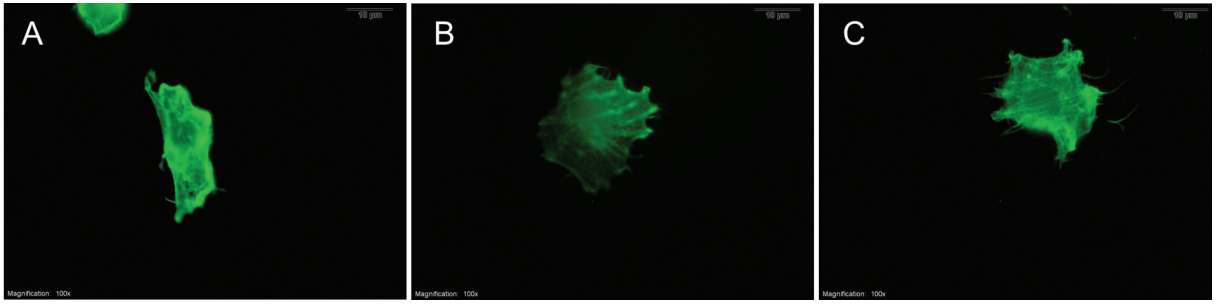
BULGULAR

Endotel hücrelerinde F-aktin stabilizasyonu gereç ve yöntemde belirtildiği gibi jasplakinolid ile oluşturuldu (Şekil 2A). Jasplakinolid (0.1 µmol/ml) uygulanan HUVEC'lerde inkübasyon süresine bağlı olarak filamentöz aktinin



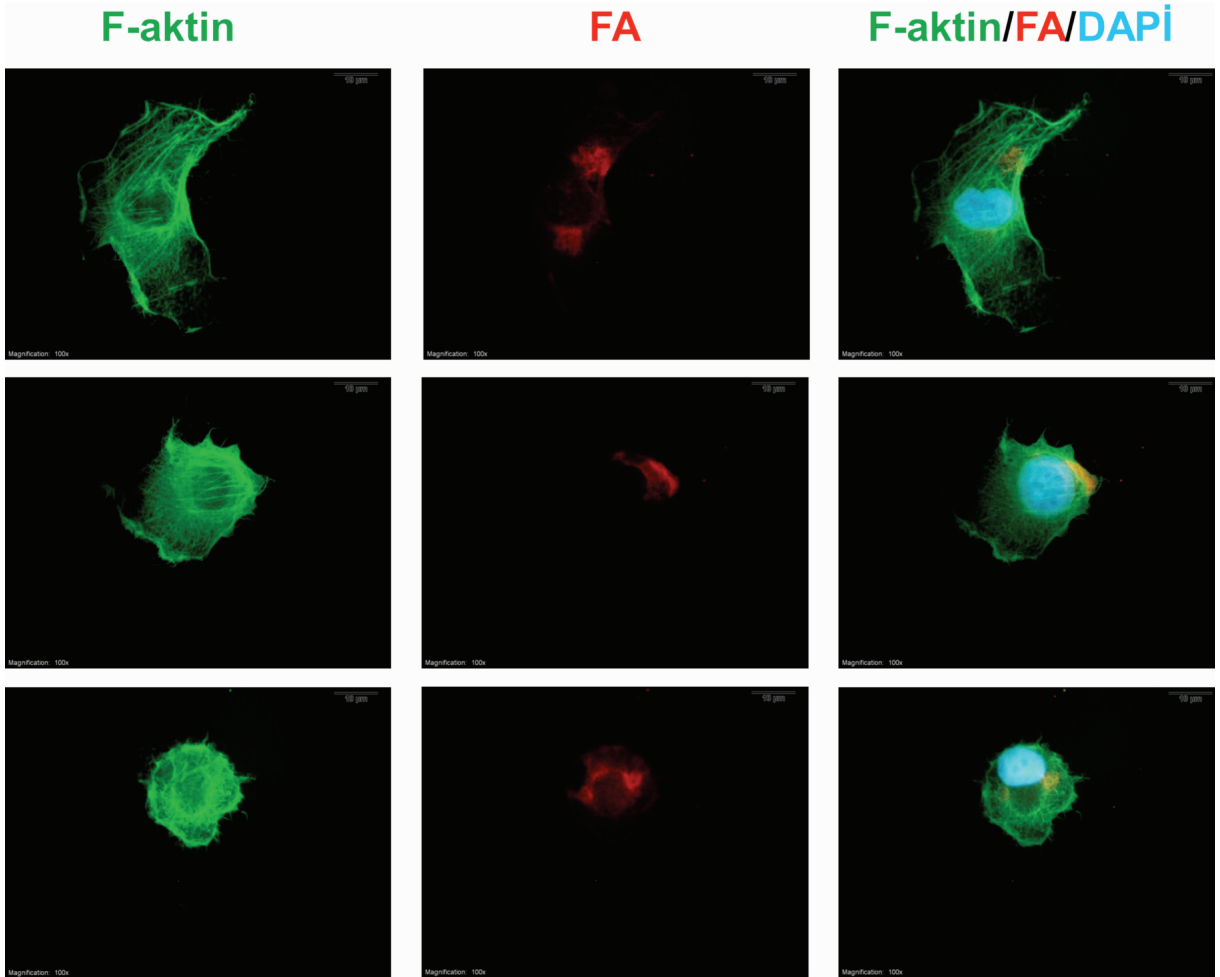
Şekil 2. Hücre kültürü ortamında kimyasalların uygulanma süreleri.

Kuyulara jasplakinolid (0.1 µmol/ml) ilave edilerek 30 ve 60 dakika bekletildi (A). Jasplakinolid ile inkübasyon süresinin 30 dakika olduğu çalışmanın 15. dakikasında hücrelere DT (0.75 nmol/ml) uygulandı (B). İnkübasyon sürelerinin ardından medium uzaklaştırıldı, hücreler PBS ile yıkandı ve immünfloresan işaretleme yapıldı.



Şekil 3. Endotel hücrelerine jasplakinolid uygulaması.

(A) İmmüno floresan görüntüleme için klasik hücre kültürü ortamında çoğaltılan HUVEC'ler yuvarlak lameller üzerine aktarıldı. Kontrol olarak kullanılan (A) ve 30 dakika (B) ile 1 saat (C) jasplakinolid ($0.1 \mu\text{mol/ml}$) ile inkübe edilen HUVEC'lerde aktin iskeleti (yeşil) falloidin-FITC ile işaretlendi. Filamentöz aktinin oluşturduğu stres liflerinin jasplakinolid uygulanan hücrelerde (B, C) belirginleştiği görülmektedir (Büyütme $\times 100$).



Şekil 4. Jasplakinolid uygulanan endotel hücrelerinde FA hareketi.

HUVEC'ler yöntemde belirtildiği gibi jasplakinolid ($0.1 \mu\text{mol/ml}$) ve DT (0.75 nmol/ml) ile inkübe edildikten sonra hücrelerde aktin iskeleti (yeşil) falloidin-FITC ile işaretlendi. FA monoklonal antikor 7F2 ve ikinci antikor olarak IgG-TRITC (kırmızı) ile işaretlendi. Hücre çekirdekleri (mavi) DAPI ile işaretlendi. Jasplakinolid ile aktin filamentleri sabitlenen hücrelerde FA'nın perinükleer alana yerleştiği görülmektedir (Büyütme $\times 100$).

oluşturduğu stres liflerinin hücre zarında belirginleştiği belirlendi (Şekil 3). Bu bulguya dayanarak difteri toksini uygulanmadan önce hücrelerin jasplakinolid ile bekletilme süresi 15 dakika ile sınırlandırıldı. Aktin filamentlerinin stabilizasyonunun ardından toksinin endositik süreçteki hareketini gözlemek amacı ile hücreler difteri toksini ile 15 dakika inkübe edildi. (Şekil 2B). Bu koşullar altında aktin filamentleri, FA ve çekirdek immünfloresan işaretleme ile görüntüledi. Jasplakinolid uygulaması ile aktin filamentlerindeki dinamiğin durdurulduğu halde endotel hücrelerinde difteri toksininin perinükleer bölgede kümelenildiği gösterildi (Şekil 4). Bu bulgu, toksin hareketinin jasplakinolid etkisi ile engellenmediğini göstermektedir.

TARTIŞMA

Aktin iskeleti, hücre göçü, morfogenez, sitokinez, endositoz ve fagositoz gibi çeşitli hücresel süreçlerde temel bir role sahiptir. Bunun sonucu olarak aktin iskeletinin yapısının ve dinamiklerinin hassas olarak düzenlenmesi, ökaryotik organizmalardaki birçok gelişimsel ve fizyolojik süreçler için gereklidir. Hücrelerin kendi aralarındaki ve çevreleriyle arasındaki biyokimyasal ve mekanik etkileşimler aktin iskeletine bağlı oluşan stres fiberlerinin miktarını, yapısını ve organizasyonunu değiştirir⁽¹³⁾.

Jasplakinolid uygulanan endotel hücrelerinde filamentöz aktinin oluşturduğu stres liflerinin inkübasyon süresine bağlı olarak hücre zarında uzantılar oluşturduğunu görüntüledik. Halkasal peptid olan jasplakinolidin yüksek ilginlikle ($K_d = 15$ nM) aktin filamentine 1:1 stokiometri ile bağlandığı bilinmektedir⁽¹⁴⁾. Zamana ve konsantrasyona bağlı olarak jasplakinolid uygulamasının endotel hücrelerine zarar verdiği belirlenmiştir⁽¹⁵⁾. Bu bilgiler doğrultusunda DT'nin hareketini gözlemek üzere F-aktin stabilizasyonu için jasplakinolid uygulama konsantrasyonu 100 nmol/ml seçildi ve süre 15

dakika ile sınırlandırıldı.

Jasplakinolid ile F-aktinin sabitlendiği bu koşullar altında DT hareketinin endotel hücrelerinde engellenmediğini belirledik. DT'nin hücre içi trafiği, kalımlılığı ve F-aktinin FA hareketine etkisini sorguladığımız önceki çalışmalarımızla toksinin çekirdek çevresine ulaşmasında FA-eEF2-aktin etkileşiminin gerekli olduğu belirlenmiştir^(9,10). Sitokalsin D ile F-aktinin uzamasının engellendiği koşullarda ise difteri toksininin endozomdan sitozole geçmediği belirlenmiştir⁽⁹⁾. Mutant difteri toksini, CRM197 ile aktin arasında en yüksek olasılıkla etkileşebilecek amino asitlerden sisteinlerin toksin translokasyonunu sağlayan T-domaini üzerinde yer aldığı belirtilmiştir⁽¹²⁾.

Tarafımızca sitokalsin D ile yapılan çalışmalarda, DT'nin katalitik domeyni olan FA'nın erken endozomlarda tutulduğu ve perinükleer alana kadar ilerleyemediği gözlemlenmiştir⁽⁹⁾. Bu çalışmada, aktin iskeletiyle etkileşen jasplakinolidin varlığında FA'nın hareketinin devam ettiği, aktin filamenti stabilizasyonu ile FA'nın taşınmasına engel olunamadığı gösterilmektedir. Bu da DT'nin reseptör aracılı endositoz ile taşınmasına rağmen, jasplakinolid varlığında kalatrin bağımsız endositoz ile olabileceğini düşündürmektedir. Hücre içinde G-aktin/F-aktin dönüşümünün durmasının difteri toksini hareketini engellememesi filamentöz aktinin endositik süreçteki önemini destekler niteliktedir.

Jasplakinolid uygulamasının transferrinin reseptör aracılı endositozu arttırmadığı ve bu nedenle muhtemelen kalatrin bağımsız endositozu arttırdığı belirtilmiştir. Sitokalsin D ve jasplakinolid arasındaki farklılıkların nedeni, hücrelerin apikal ve bazolateral kutuplarıyla ilişkili aktin birikimlerinin (havuzlarının) farklılıkları ve/veya bu ajanların bu farklı aktin havuzları üzerindeki diferansiyel aktivitesini yansıtabileceği düşünülmektedir⁽¹⁶⁾.

DT'nin G-aktin molekülüne bağlandığı, toksinin endositik süreçte erken endozomlardan salınımına pozitif katkı sağladığı bilinmektedir^(5,9). Ayrıca DT'nin eEF2'yi ADP-ribozilleyerek inhibe ettiği oysa toksinin mutant formu, CRM197'nin protein sentezini durdurmazken aktin filamentleri ile etkileştiği bilinmektedir⁽¹²⁾. Sonuç olarak, bu çalışma, konak hücre iskeleti ve DT etkileşimi bağlamında moleküler mekanizmalara katkıda bulunmanın dışında farmakolojik açıdan da değerlendirilebilir. Kanserle karşı geliştirilmeye çalışılan ilaçlar arasında DT'yi temel alan kimyasal bileşenlerin ya da CRM197'nin kullanıldığı ilaç-taşıyıcı moleküllerin hücre içindeki endositik sürecinin yanı sıra hücre iskeleti ile olan ilişkilerinin takip edilmesi açısından önemlidir.

Teşekkür: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numaraları: 21270, 42511, 24824.

KAYNAKLAR

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th ed. New York: Garland Science, 2002.
2. Lamason RL, Welch MD. Actin-based motility and cell-to-cell spread of bacterial pathogens. Curr Opin Microbiol. 2017;35:48-57. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.11.007>
3. Aktories K, Schwan C, Papatheodorou P, Lang AE. Bidirectional attack on the actin cytoskeleton. Bacterial protein toxins causing polymerization or depolymerization of actin. Toxicon. 2012;60(4):572-81. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.338>
4. Collier RJ. Diphtheria toxin: mode of action and structure. Bacteriol Rev. 1975;39(1):54-85.
5. Bektaş M, Varol B, Nurten R, Bermek E. Interaction of diphtheria toxin (fragment A) with actin. Cell Biochem Funct. 2009;27(7):430-9. <https://doi.org/10.1002/cbf.1590>
6. Lessnick SL, Lyczak JB, Bruce C, et al. Localization of diphtheria toxin nuclease activity to fragment A. J Bacteriol. 1992;174(6):2032-8. <https://doi.org/10.1128/jb.174.6.2032-2038.1992>
7. Varol B, Özerman Edis B, Bektaş M. Toxin structure, delivery and action. In: Burkovski A, ed. *Corynebacterium diphtheriae* and related toxigenic species. Netherlands: Springer, 2013:83-94.
8. Schuster M, Schnell L, Feigl P, et al. The Hsp90 machinery facilitates the transport of diphtheria toxin into human cells. Sci Rep. 2017;7(1):613. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00780-x>
9. Bektaş M, Hacısmanoğlu E, Özerman B, Varol B, Nurten R, Bermek E. On diphtheria toxin fragment A release into the cytosol-cytochalasin D effect and involvement of actin filaments and eukaryotic elongation factor 2. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2011;43(9):1365-72. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.05.017>
10. Varol B, Bektaş M, Nurten R, Bermek E. The cytotoxic effect of diphtheria toxin on the actin cytoskeleton. Cell Mol Biol Lett. 2012;17(1):49-61. <https://doi.org/10.2478/s11658-011-0036-6>
11. Ünlü A, Bektaş M, Şener S, Nurten R. The interaction between actin and FA fragment of diphtheria toxin. Mol Biol Rep. 2013;40(4):3135-45. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2387-0>
12. Özerman Edis B, Varol B, Hacısmanoğlu E, Ünlü A, Bektaş M. Cross-reacting material 197 (CRM197) affects actin cytoskeleton of endothelial cells. Gen Physiol Biophys. 2017;36(4):383-9. https://doi.org/10.4149/gpb_2017006
13. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles. J Cell Sci. 2012;125(Pt 8):1855-64. <https://doi.org/10.1242/jcs.098087>
14. Visegrády B, Lorinczy D, Hild G, Somogyi B, Nyitrai M. A simple model for the cooperative stabilisation of actin filaments by phalloidin and jasplakinolide. FEBS Lett. 2005;579(1):6-10. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.023>
15. Greene W, Gao SJ. Actin dynamics regulate multiple endosomal steps during Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus entry and trafficking in endothelial cells. PLoS Pathog. 2009;5(7):e1000512. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000512>
16. Apodaca G. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. Traffic. 2001;2(3):149-59. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.020301.x>