



Biomedicinsk Forskning

Lene Pedersen

Institut for Molekylærbiologi og Genetik
LP@mbg.au.dk - kontor 208, bygning 1130



Molekylærbiologi: Ja
Molekylær medicin: Ja
Bioteknologi: Ja

Uorganisk fosfat (Pi's) og fosfatimportørers rolle i normal og patologisk osteogen differentiering og i basale cellefunktioner

Baggrund

Indenfor de senere år er der stigende bekymring over den mulige sammenhæng mellem ubalanceret indtag af fosfor og udvikling og/eller forværring af en række livsstils sygdomme. Effekten af et forhøjet uorganisk fosfat (Pi) niveau i blodet er bedst kendt i forbindelse med kronisk nyresygdom, som er en hyppig konsekvens af diabetes type 1 og 2. I disse patientgrupper øger forhøjet blod Pi niveau risikoen for hjerte-kar-sygdom herunder vaskulær forkalkning (aflejring af calcium-fosfat). Hos kronisk nyresyge er der en direkte sammenhæng mellem øget dødelighed - hovedsagelig af kardiovaskulære årsager - og stærkt forhøjet fosfatniveau.

Fosfat øger såvel den for disse sygdomme karakteristiske forkalkning af det glatte muskelcellelag i de store blodkar i benene som forkalkningen af aterosklerotiske læsioner. Begge former er forbundet med øget syge-/dødelighed og involverer bl.a. ændringer i de glatte muskelceller i karrerne, så de får egenskaber som knogledannende celler, herunder evnen til at forkalke omgivelserne.

Primary brain calcification (PBC) er en arvelig sygdom med bl.a. ledsagende neuropsykiatriske sygdomme og bevægelsesforstyrrelser. Der ses vaskulære og pericapilære forkalkninger initielt i hjernens basal ganglier, men andre områder af hjernen er også ofte implicerede.

Højt ekstracellulært Pi niveau kan aktivere cellers indre kommunikationsveje og påvirke udtrykket af vævs-specifikke gener. De to type III natrium-afhængige Pi importører, PiT1 og PiT2, er her i fokus. De er mulige direkte og indirekte mediatorer af det ekstracellulære Pi-inducerede signal: reduceret PiT2 funktion, som i 40% af PBC tilfældene, resulterer i forhøjet Pi niveau i hjernevæsken og forkalkninger i hjernen, og PiT1 er vist kritisk for Pi-induceret fænotypisk ændring af vaskulære glatte muskelceller. Desuden har vi fundet, at PiT1 spiller en tilsvarende rolle i udviklingen af stamceller til knogledannende celler og dermed en kobling til PiT1's normale funktion. Vi og andre har også identificeret nye roller af PiT1 i basale cellefunktioner, og vi undersøger, om PiT2 også har flere roller.

De to type III natrium-afhængige Pi importører, PiT1 og PiT2, er også cellulære receptorer for retrovira, som "leverer" overfladeproteiner til vektorer, der anvendes i kliniske genterapiprotokoller.

Retrovirale infektionsmekanismer

Baggrund

Vira er i høj grad afhængige af værtscellens funktioner. På trods af virus enkelthed er deres indbyrdes forhold med værtscellerne meget komplekse. Vi har således vist, at retrovira er i stand til at udnytte cellens ekstracellulære matrix (ECM) til infektion, idet deres binding til ECM fører til optagelse i cellen.

Retro- og lentivira bruges til genoverførsel i genterapisammenhæng og i forskning. De virale overfladeproteiner, vi arbejder med, kan inficere humane celler og de anvendes til at pseudotype vektorer i kliniske genterapiprotokoller. I genterapisammenhæng ønskes en så kontrolleret genoverførsel som muligt. I denne sammenhæng undersøger vi, hvordan vira interagerer med deres cellulære receptorer og hvordan de krydser cellemembranen og frisætter deres genetiske materiale i cellen.

Desuden bruger vi retrovirale vektorer til følge udtryk af vildtype og mutant PiT1 og PiT2 proteiner.

Teknikker:

Vi anvender forskellige metoder indenfor

- molekylærbiologi (site-directed mutagenese, tagging af receptorer og virusproteiner, kvantitativ PCR etc.),
- cellebiologi (etablering af primære cellekulturer, flow cytometri, fluorescens mikroskopi, RNAi teknologi, membrantransport assays, assays for forskellige intracellulære celledesignaleringsveje etc.),
- proteinkemi (ELISA, small scale proteinoprensning, immunblot etc.),
- knock-out mus
- retrovirologi og retroviral vektorteknologi.

De to hovedfokusområder overlapper metodemæssigt, idet vi udnytter

- at fosfatimportørerne også er receptorer for retrovirus
- at de gammaretrovira vi studerer er dem, der bruger fosfatimportørerne som receptorer.

Mulige projekter vil ligge indenfor følgende områder:

Cellulær differentiering, hvor vi fokuserer på:

- knogledannende celler (osteoblaster) og differentiering af mesenchymale stamceller til osteoblaster
- trans-differentiering af vaskulære glatte muskelceller til celler med osteoblastisk fænotype herunder evnen til at danne knoglemineral, som det sker under den alvorlige medicinske tilstand, der kaldes vaskulær forkalkning.

PBC, hvor vi fokuserer på:

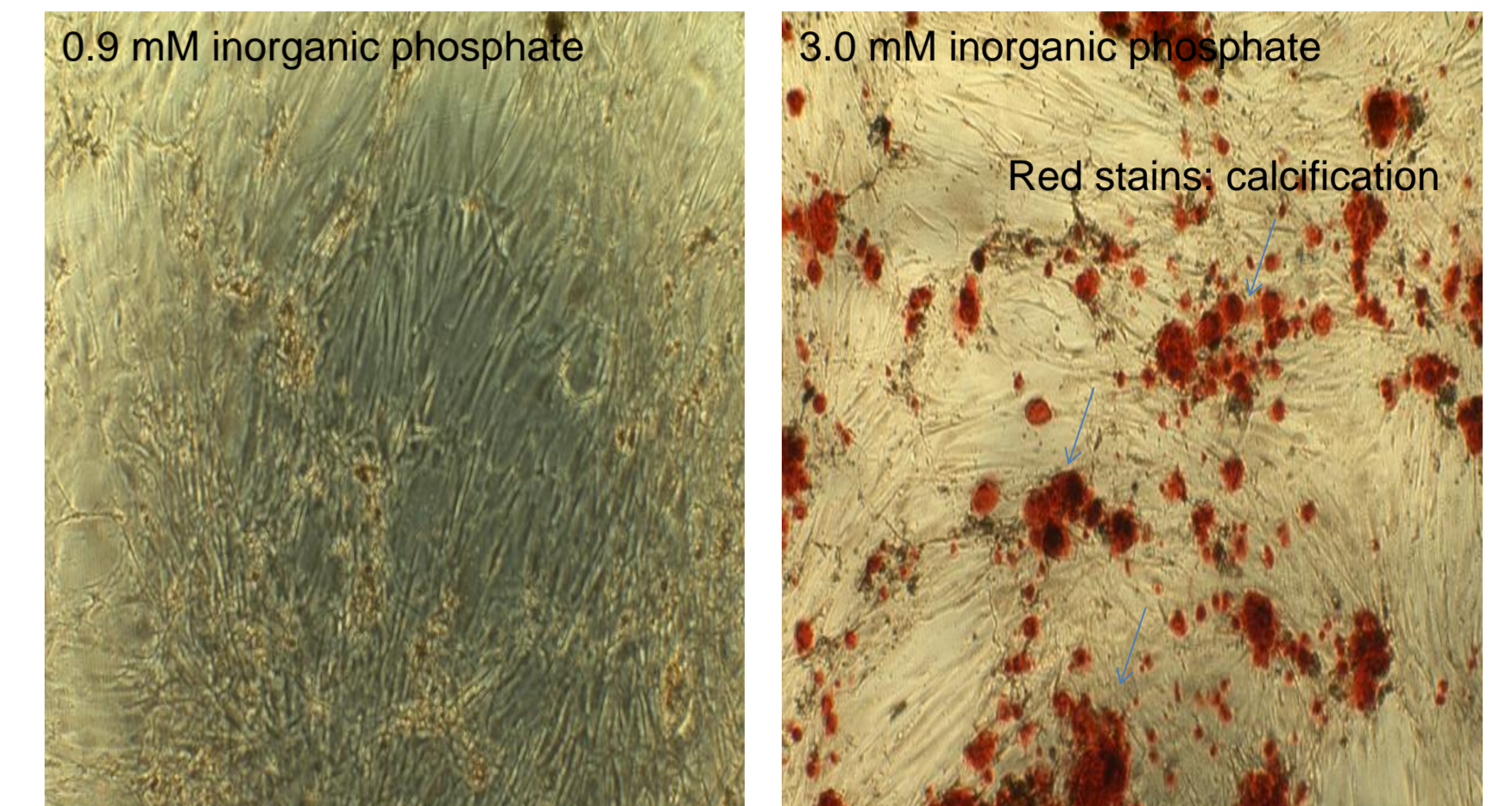
- PiT2's rolle i PBC og selve mekanismen bag udviklingen af hjerneforkalkningerne og symptomerne

PiT1 og PiT2 og interagerende proteiner, hvor vi fokuserer på:

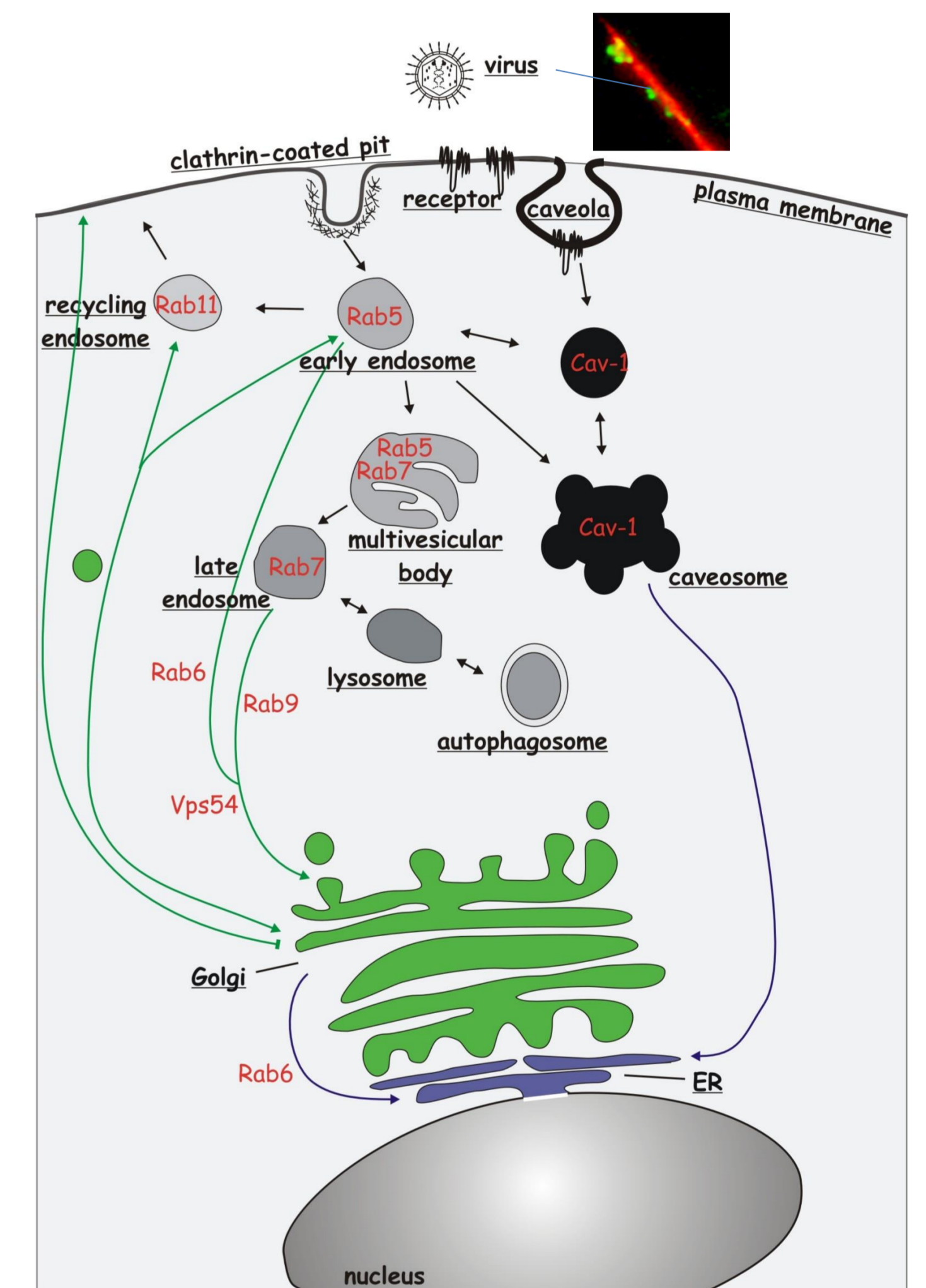
- PiT1's og PiT2's cellulære funktioner
- regulering af PiT1 og PiT2
- fosfat og PiT1's og PiT2's involvering i basale cellulære funktioner
- fosfat og PiT1 og PiT2 i celledesignalering

Retrovirologi, hvor vi fokuserer på:

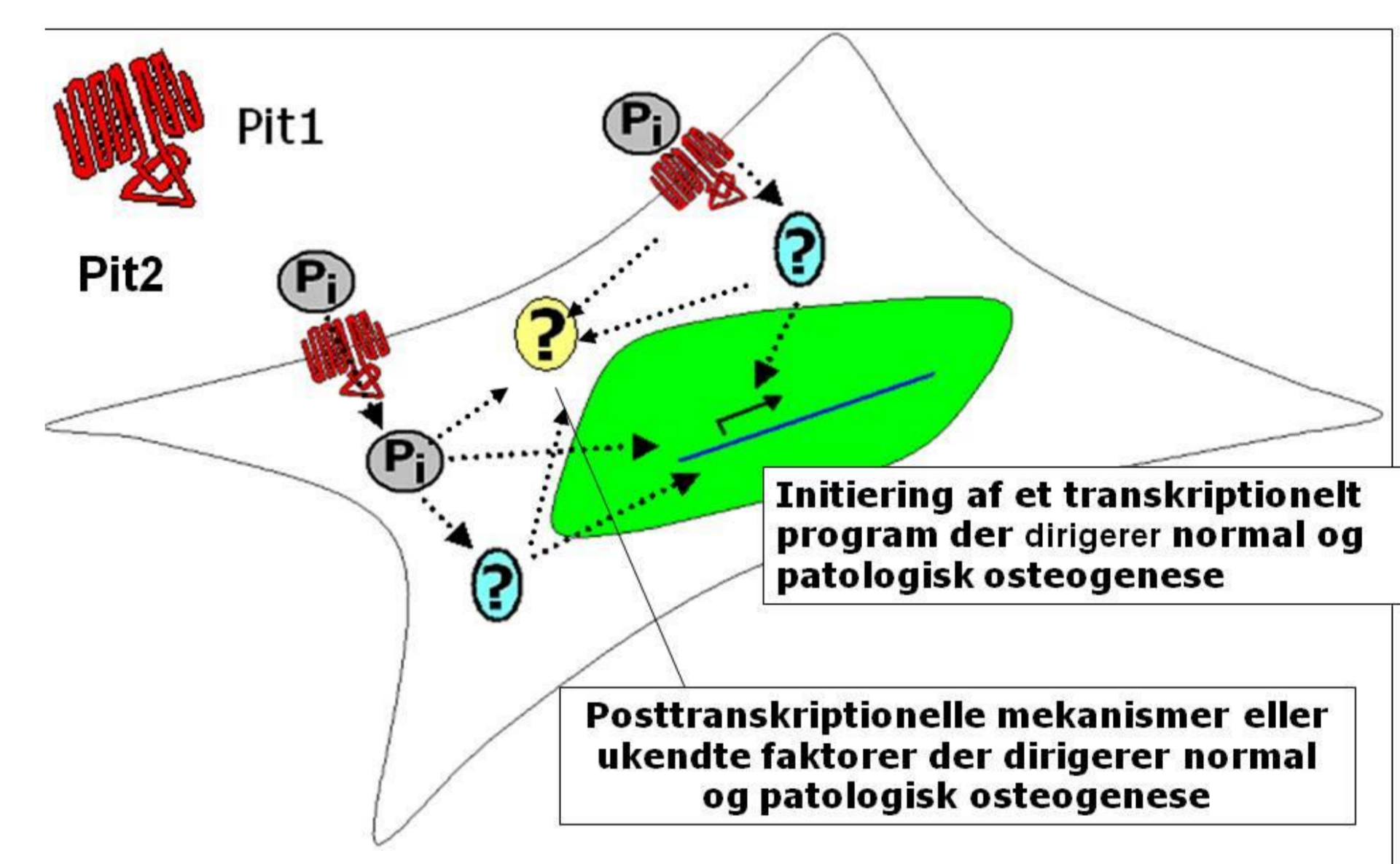
- hvordan retrovirus bruger fosfatimportører til at inficere humane celler
- hvordan de retrovirale partikler kommer ind i celler og hvilke intracellulære transportveje de bruger



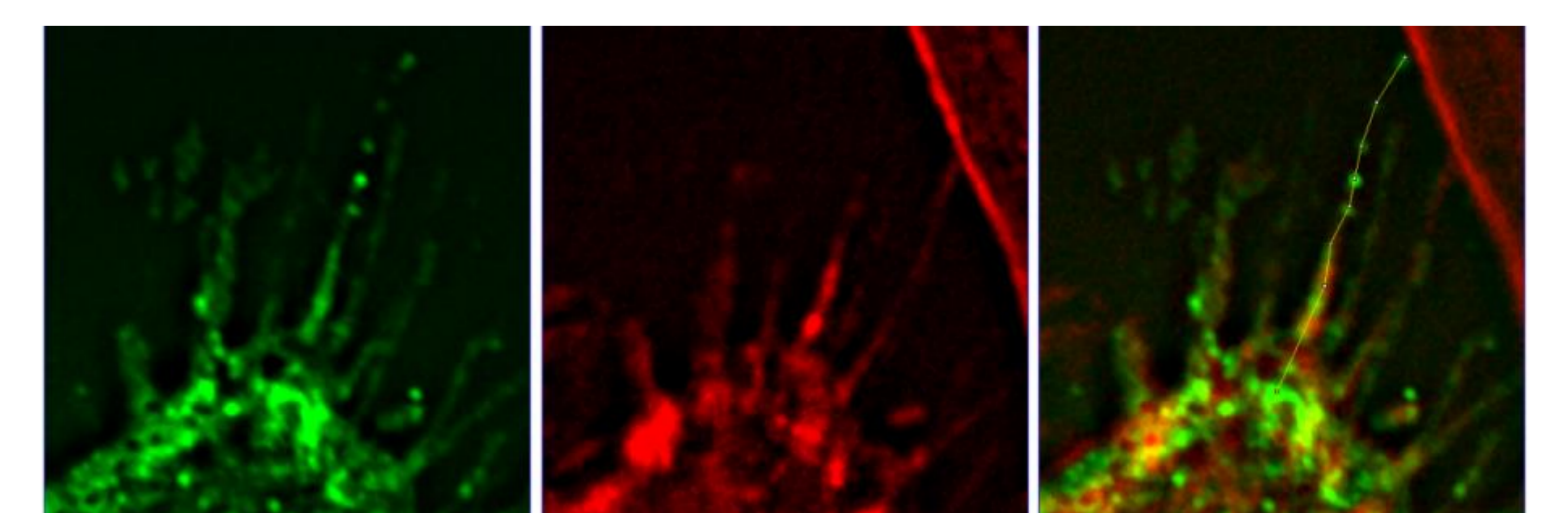
Vaskulære glatte muskelceller differentierer til en osteogen fænotype og danner Ca-Pi mineral, når de dyrkes med koncentrationer af uorganiske fosfat svarende til dem, der forekommer hos nyrepatienter og diabetikere.



Intracellulære transportveje som kan være involveret i retrovirale og lentivirale infektioner



Uorganisk fosfat (Pi) og fosfatimportørerne PiT1 og PiT2 i normal og patologisk osteogenese



PiT2 fosfatimportør /retroviral receptor (grøn) i cellulære udløbere i osteoblast. Udløberne ligner formodede sites for produktion af matrix vesikler, som danner udgangspunkt for egentlig forkalkning af ekstracellulær matrix. Rødt: aktin.