STRESSZVÁLASZ HALAKBAN: *hsp70* ÉS METALLOTHIONEIN GÉNEK AZONOSÍTÁSA ÉS EXPRESSZIÓJUK VIZSGÁLATA PONTYBAN (*Cyprinus carpio*)

Ph.D. értekezés tézisei

készítette: Khaled Said Ali

témavezetők:
Dr. Hermesz Edit
egyetemi tanársegéd
Dr. Ábrahám Magdolna
egyetemi docens

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Biokémiai Tanszék

2003

1. Bevezetés

Régóta ismert az a jelenség, hogy hőmérséklet emelkedés hatására a sejtek jellegzetes fehérjék szintézisével válaszolnak. Ezen fehérjéket hősokk fehérjéknek (Hsp), a jelenséget pedig hősokk válasznak nevezték el. A stressz-válaszreakció az élővilágban általános, megfigyelhető a baktériumoktól a növényeken át az emberig. A stresszfehérjék indukciója a sejtek védelmét szolgáló *általános* válaszreakciónak tekinthető, és a hőmérsékletváltozáson felül kiválthatják egyéb környezeti stresszorok (nehézfémek, a sejtek energia metabolizmusának inhibitorai, különböző szerves vegyületek) valamint endogén tényezők, betegségek (pl. vírus fertőzés, láz, gyulladás, hypertrophya, ischemia, oxidációs hatások), továbbá bizonyos, a normális sejtműködéssel kapcsolatos hatások is (sejtosztódási ciklus, növekedési faktorok, differenciálódás, stb.).

Stressz feltételek között megváltozik a sejtekben a fehérjék strukturális integritása, s a konformáció változások eredményeként megemelkedik a denaturált fehérjék mennyisége. Ezt a folyamatot viszonylag rövid időn belül követi a „válaszreakció", miszerint a hősokk proteinek felismerik a denaturált fehérjéket, s elősegítik natív szerkezetük helyreállítását vagy lebontásukat. A Hsp stresszválasz jellege függ a kiváltó stressz típusától és mértékétől, s az egyes szövetekben és fajokban jelentős eltérést mutat. Számos stresszfehérje a sejtekben stresszmentes állapotban is jelen van, azaz konstitutívan expresszálódik, ezek az ún. Hsc (*heat shock cognate*) fehérjék. A hősokk fehérjék teljes mennyisége stressz mentes állapotban a sejt összes fehérjéjének 5-10%-át teszi ki, stresszt követően azonban többszörösére növekszik a mennyiségük. A stresszfehérjék legáltalánosabb besorolása a molekulatömegük alapján történik, ilyen módon megkülönböztetjük a Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 és a kis molekulatömegű családba tartozó fehérjéket.

A stresszfehérjék egyik legnépesebb csoportja a 70 kDa molekulatömegű fehérjecsalád. Tagjai evolúciósan konzerváltak: például az eukarióta Hsp70 fehérjék és az *Escherichia coli* DnaK fehérjéje között 40-60% a homológia, gerincesekben a Hsc70 fehérjék különböző fajok közt 88-98%, a Hsp70 fehérjék pedig 83-96% azonosságot mutatnak.

A konstitutívan expresszálódó Hsc70 és a stressz indukálható Hsp70 formák az eukarióta sejtek citoszóljában és sejtmagjában is kimutathatók. A 70 kDa molekulatömegű fehérjecsalád konstitutív tagjai számos fontos biokémiai funkciót látnak el stresszmentes

állapotban. Mint molekuláris *chaperone-ok* közreműködnek a fehérjék funkcionális térszerkezetének kialakításában, gátolják a *de novo* szintetizálódó fehérjék aggregálódását és részt vesznek a fehérjék transzlokációs folyamataiban. Stressz hatására az indukálható Hsp70 fehérjék szintje jelentősen megemelkedik a citoplazmában és a sejtmagban. A Hsp70 fehérjék a sejt védekező reakcióinak részeként megakadályozzák a denaturált fehérje aggregátumok keletkezését vagy elősegítik azok szolubilizációját, továbbá elősegítik a fehérjék natív konformációjának helyreállítását, és szállítják az irreverzibilisen károsodott fehérjéket a degradatív organullomokba.

Egyes környezeti tényezők előidéznek *specifikus* válaszreakciókat is a sejtekben, amelynek során olyan fehérjék indukálódnak, amelyeknek közvetlen hatása az adott stresszorra irányul, ilyenek például a toxikus nehézfémeket elimináló metallothioneinek.

A metallothioneinek (MT) kis molekulatömegű, ciszteinben gazdag, fémkötő fehérjék. Nagy fémkötő kapacitásuk valamint a kötések jellege azt sugallja, hogy a MT-ek fontos szerepet játszanak az esszenciális fémionok (Zn, Cu, Fe) homeosztázisának fenntartásában és a mérgező nehézfémek detoxifikálásában. Általános jelenlétük a sejtekben, expressziójuk szigorú időbeni- és szövet-specifikus szabályozottsága, valamint az a tény, hogy a gerinces MT-ek elsődleges szerkezetét nagyfokú konzerváltság jellemzi, mind arra utal, hogy jelenlétük létfontosságú a szervezet zavartalan működése szempontjából.

Az MT gének expressziója elsősorban transzkripcionális szinten szabályozódik, többek között különböző fémek, hormonok, antioxidáns molekulák megemelkedett szintje indukálja az MT mRNS szintézisét. Az indukciót követően nő a sejtekben az MT szint, fokozódik az intracelluláris fémionok megkötése, illetve megtörténik a fémionok átvétele a nem-thionein ligandokról. MT-kötött formában megszűnik a fémionok toxikus hatása

2. Célkitűzés

Munkacsoportunk fő célja minél több, a stressz-válaszadásban résztvevő géncsalád azonosítása halakban és azok szerepének vizsgálata a környezeti stresszhatásokkal szembeni védekezésben. Munkánk kezdetén célunk volt az egyik legnépesebb család, a 70 kDa stresszfehérjét kódoló géncsalád több tagjának az azonosítása és expressziójuk vizsgálata pontyban. Terveztük a különböző izoformákat kódoló gének expressziójának vizsgálatát kezeletlen halak, illetve különböző toxicitású nehézfém (Cd, Cu, As) kezelésnek, és hirtelen

hőmérsékletváltozásnak (hősokk és hidegsokk) kitett állatok szerveiben. Az azonosított gének expresszióját májban és vesében, a detoxifikáció központi szervében, izomban, az emberi fogyasztás szempontjából legfontosabb szövetben és a szívben, a szervezet oxigén ellátása és az anyagcserefolyamatok zavartalan lefolyása szempontjából fontos szervben kívántuk követni. A szív esetében, a hőstressz-gének mellett vizsgálni kívántuk a metallothioneinek expresszióját is, egy komplexebb képet alkotva a védekező mechanizmusokban résztvevő gének munkamegosztásáról különböző stresszhatásokat követően.

3. Az alkalmazott módszerek rövid összefoglalása

Kísérleti állatok és kezelési körülmények

Valamennyi, a dolgozatban leírt kísérletet ponttyal (*Cyprinus carpio*) végeztük el. A halakat a Tiszai Halgazdaság Fehértói Telepéről szereztük be. A kezelések előtt 400 l-es jól levegőztetett kádakban akklimatizáltuk az állatokat, 12-15^{0}C-on, 2-3 hét időtartamig. A kezelésekhez a halakat 100 l-es akváriumokba helyeztük át (mérettől függően 2-3 hal/akvárium, 0.5-1 kg egyedi súly), a vízhőmérséklet a hő és hidegsokk kísérletek kivételével szintén 12-15^{0}C volt.

A kísérleti állatokat Cd-al, Cu-el és As-al kezeltük, a fémionra normalizált végkoncentráció minden esetben 10 mg/l volt, kivéve a Cd-al történő intraperitoneális kezelést, ahol 10 mg/testsúly kg dózist is alkalmaztunk.

A hősokk hatásának vizsgálatához a halakat az akklimatizációs hőmérséklettől 14^{0}C-al és 18^{0}C-al magasabb hőmérsékletű közegbe helyeztük, mintát közvetlenül a hőkezelés után, illetve az akklimatizációs hőmérsékletre történő visszahelyezést követően 1 óra múlva (*recovery*) vettünk.

A hidegsokkhoz a halakat 5^{0}C-os vízhőmérsékletű akváriumba helyeztük át. Mintavétel közvetlenül a hidegsokk, illetve változó időtartamú *recovery* periódus után történt.

Minden kísérletet legalább két időpontban (az egymást követő évek közel azonos időszakában) megismételtünk, a kezelések minden mintavételi pontjában három vagy négy egyedet használtunk fel a mérésekhez. Az izolált szövetmintákat azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük, és –80^{0}C-on tároltuk a felhasználásig.

Nukleinsav technikák

A munka során a molekuláris biológia standard módszereit használtuk

- Genomiális és plazmid DNS tisztítás

- Össz-RNS preparálás
- DNS emésztése restrikciós enzimekkel
- Restrikciós fragmentek és PCR termékek szeparálása agaróz gélelektroforézissel
- Klónozás plazmid vektorokba
- DNS szekvencia meghatározása
- PCR, RT-PCR
- DNS próba radioaktív jelölése
- Northern hibridizálás
- Kettős és többszörös szekvencia összehasonlítás, analízis

Géldokumentáció, denzitometrálás

Az ethidium bromiddal festett géleket, és az autoradiogramokat egy GDS 7500 (UVP) rendszert használva dokumentáltuk, és a *GelBase/GelBlot™ Pro Gel analysis* szoftver segítségével analizáltuk.

4. Eredmények összefoglalása és megbeszélése

Három, 70 kDa stresszfehérjét kódoló gént azonosítottunk pontyban. A gének izolálásához a stresszfehérjéket jellemző nagyfokú szekvencia homológia mellett felhasználtuk azokat az irodalmi ismereteket miszerint a gerinces élőlényekből eddig azonosított *hsp70* struktúrgének nem tartalmaznak intron szekvenciákat, és stresszmentes állapotban a *hsp70* mRNS-ek nem, vagy csak kis mennyiségben mutathatók ki.

A gének konstitutív (*hsc70*) illetve indukálható (*hsp70*) alcsaládba történő besorolása szekvencia összehasonlítás, filogenetikai analízis, génszerkezet és expressziós mintázat alapján történt meg. Ezen szempontokat figyelembe véve a három gén közül kettő a Hsc70 egy pedig a Hsp70 fehérjéket kódoló gének csoportjába tartozik:

Emlősökben nem ritka több *hsc70* gén jelenléte egy fajon belül. Halakban azonban a ponyt *hsc70* gének csupán a második példa erre a jelenségre és az első példa alacsonyabb rendű gerincesekben arra, hogy *hsc70* gének lényeges szekvencia különbséget mutatnak (88% szemben más fajban tapasztalható 96-98%-os homológiával).

A *hsc70-1* és *hsc70-2* strukturgének exon/intron tagolódásuak, míg a *hsp70* intron mentes felépítésű. Az azonosított *hsc70-1* genomiális régió 8 exont és 7 intron tartalmaz. Az exon/intron határok pozíciója evolúciósan konzervált.

Vizsgáltuk a három gén expresszióját kezeletlen halak különböző szerveiben (máj, vese, agy, izom). A ponty *hsc70* gének jellegzetes szövetspecifikus expressziója újdonság; bizonyos szövetekben mind a kétféle mRNS kimutatható, míg vannak szervek ahol dominánsan csak az egyik vagy másik gén expresszálódik, mintegy egymást kiegészítő módon.

A *hsc70-1* expresszió az izomban a legmagasabb, mRNS-e a β-aktinnal összevethető mennyiségben van jelen, míg a *hsc70-2* mRNS maximum 15%-a a β-aktin mennyiségének. Májban és vesében a *hsc70-1* géntermékет vagy nem tudtuk kimutatni vagy pedig a kimutathatóság határán mozgott a mennyisége. A *hsc70-2* expresszió itt volt a legmagasabb az mRNS mennyisége 55-60% volt a β-aktin mRNS-ének. Agyban és szívben mind a két géntermék közel azonos mennyiségben volt jelen.

A *hsp70* mRNS agyban nem volt kimutatható. Vesében, májban és izomban erős egyedi variációt mutatva, a kimutathatósági határon mozgott a mennyisége.

Vizsgáltuk a három gén indukálhatóságát hőmérsékletváltozás hatására. A víz hőmérsékletének hirtelen emelése akár 14 akár 18°C-al mérsékel emelkedést eredményezett mind a három gén expressziójában. Lényeges különbség a *hsp/hsc70* gének között, hogy a konstitutívan expresszálódó gének nem indukálódnak közvetlen hősokk hatására, mérhető mRNS szint változás csak a *recovery* idő elteltével tapasztaltunk. A *hsp70* génnek az expressziója viszont nem mutatott lényeges különbséget a közvetlen hő stressz és a *recovery* idő elteltével. A *hsc70-2* gén 4-4.5-szeres indukciója más fajokból leírt konstitutív *hsc70* gének hőstresszre adott válaszreakcióihoz képest jelentősnek nevezhető.

Vizsgáltuk a hidegsokk hatását is a *hsp/hsc70* gének expressziójára. Az, hogy a szervezetnek a hőmérséklet hirtelen csökkenésével szemben is védettségre van szüksége, ami egy fokozottabb *hsp/hsc70* szintézist igényel, logikusnak tűnik. Először is maga a hideg hatás is okozhat fehérje denaturációt, így a Hsp/Hsc70 jelenléte nélkülözhetetlen a „*refolding*”-hoz. Másodszor a hidegsokk alatt lecsökkent metabolikus folyamatok a *recovery* idő alatt felgyorsulnak, új fehérjék szintézise indul be, mely ismét a Hsp/Hsc70 fokozott jelenlétét igényli. A víz hőmérsékletének csökkenése szembetűnő gén- és szövet-specifikus változásokat indukált; jelentős gátlás jellemezte a *hsc70-1* expressziót izomban míg a *hsc70-2* és a *hsp70* gén indukálódott. A *hsc70-2* mRNS szint 7.5-10-szeres növekedése példa nélküli, ilyen mértékű indukció a *hsc70* expresszióban csak a NIH3/T3 és human HeLa sejtvonalak

azetidin (aminosav analóg) kezelése során volt mérhető. Az a tény, hogy az „izom-specifukus” *hsc70-1* gén expressziója lényeges csökkenést mutat, míg az alap szinten alig detektálható *hsc70-2* ily mértékben indukálódik, egyfajta specializálódást sugall a két gén munkamegosztásában kezeletlen állapotban és stresszhatást követően is. Az irodalomban nem példa nélküli a *hsc70* gének közötti „szerep-felosztás” egy fajon belül, arra azonban nem találunk példát, hogy ez stresszfüggő fenotípust mutatna.

A hőmérsékletváltozáson kívül megvizsgáltuk a kadmium, mint általános fehérjekárosodást okozó ágens hatását két különböző fémbeviteli eljárást használva. A kadmium 10 mg/l koncentrációban alkalmazva, nem vagy csak mérsékelten befolyásolta a *hsp70* expresszióját. Az a tény, hogy májban nem és izomban is csak 96 órás expozíciót követően volt változás a *hsp70* mRNS szintben (max. 2.5-szeres) esetleg betudható annak, hogy a kadmium ebben a koncentrációban szinte valamennyi szövetben igen jó hatékonysággal indukálja a metallothionein génexpressziót. A nagy fémkötő kapacitással rendelkező metallothionein fehérjék szintéziséhez azonban szükség lehet egy fokozottabb „*foldosoma* aktivitásra”, mely megmagyarázná a *hsc70* gén expressziójának növekedését májban (hsc70-1: 11-13-szoros), ahol a méregtelenítés a leghatékonyabban történik.

A kadmium 10 mg/kg koncentrációban, intraperitoniálisan juttatva a szervezetbe egy teljesen más reakciót indukál. A *hsp70* gén expressziója hirtelen a sokszorosára nő (15-szörös indukció a kezelést követő 10-ik órában), míg a *hsc70* gének indukciója messze elmarad a 10 mg/l Cd kezelésnél tapasztaltaktól. Az ilyen rendkívül magas dózisban használt Cd-al szemben a metallothineinek már nem nyújtanak védettséget, a denaturált fehérjék mennyisége növekszik és valószínűleg maga a transzkripciós, transzlációs apparátus is jelentősen sérült.

Vizsgáltuk a stresszgének (*hsp70*, *hsc70-1* MT-1, MT-2) expresszióját egy szervre, a szívre koncentrálva, hőmérsékletváltozás és fémkezeléseket követően. A 14 ^{o}C hőmérséklet emelkedés a *hsp70* gén expresszióját 5-szörösére növeli, a *recovery* idő elteltével pedig 10-szeres *hsp70* mRNS növekedés volt mérhető. A *hsc70-1* expresszióját ugyancsak fokozza a hőmérséklet emelkedése, egy maximum 3-szoros növekedést mértünk az mRNS mennyiségében. A szívizomban tehát a hősokk hatására *hsp70* gén lényegesen jobban indukálódott mint azt a májban és vázizomban tapasztaltuk. A metallothionein gének expresszióját a hőmérséklet emelés nem befolyásolta.

A hidegsokk a szívben a hősokk hatásához képest jóval kisebb és átmeneti jellegű *hsp70* és a *hsc70-1* indukciót okoz. A *hsp70* gén alacsony hőmérsékleten (5 ^{o}C) nem

expresszálódott, és csak rövid idejű, intenzív stresszhatáskor, az 1 órás hidegsokkot követő *recovery* esetén figyelhető meg enyhe aktiválódás. Az MT-1 gén expresszióját a hidegsokk gátolta, az MT-2 mRNS szint a kontroll érték duplájára nőtt 2 órás inkubációt követően.

Vizsgáltuk három nehézfém, az egyik legtoxikusabbnak ismert Cd, az ugyancsak toxikus As és az esszenciális, de nagy koncentrációban toxikus Cu hatását a hősokk gének expressziójára. Az azonos, 10 mg/l koncentrációban alkalmazott fémek közül a Cd a *hsp70* expressziójában kismértékű, de hosszan elnyúló növekedést eredményezett. A *hsc70-1* mRNS szint nem változott, hasonlóan a vázizomnál tapasztaltakhoz. Az As és Cu mindkét gént indukálta, a Cd hatásától és egymástól eltérő módon. Az As átmeneti, enyhe *hsp70* indukciót váltott ki, szemben a Cd hasonló nagyságú, de tartós hatásával, és a Cu kísérleti periódus végéig tartó folyamatos indukáló hatásával. A három fém által kiváltott *hsp70* indukció mértéke növekvő sorrendben As<Cd<Cu. A *hsc70-1* gént a Cd nem indukálta, az As kétszeres, a Cu pedig négyszeres indukciót vált ki. A mérési eredmények arra engednek következtetni, hogy az As és Cu hatásával szemben a két fehérje közül a konstitutív formának van nagyobb jelentősége.

A szívben mindhárom fém indukálta a két vizsgált MT gén expresszióját. .A folyamatosan, 10 mg/l koncentrációban jelenlévő Cd 1.7-2.5-szeres, míg az egyszeri 10 mg/kg Cd dózis 8-12-szeres MT-1 indukciót okoz. A folyamatos expozíció az MT-1-hez képest nagyobb mértékű MT-2 (5-szörös) indukciót eredményezett. Az As- és Cu ionokkal folyamatosan kezelt halak szívében a MT-1 indukció magas (maximum 10-15-szörös) és a két fém esetén hasonló mértékű. A Cu által kiváltott MT-2 indukció gyengébb mint az As hatása, annak mindössze fele.

Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a szívben a nehézfémek által kiváltott stresszválasz összetett folyamat. A stresszválasz mindkét géncsalád esetében fém-függő, és függ a fémexpozíció módjától is. Az MT fehérjék szintézisének fokozódása fontos eleme a sejtalkotó fehérjék védelmének. Ezt bizonyítja nehézfém kezeléskor a hősokk géneknek viszonylag alacsony szintű indukciója. A konstitutívan expresszálódó *hsc70-1* mRNS szintjének növekedése itt is egy fokozottabb „*foldosoma* aktivitásra” utalhat. Érdekes jelenség, hogy a fehérjék denaturált állapotát jelző *hsp70* és *hsc70-1* indukció az esszenciális Cu esetében magasabb mint az erősen toxikus fémként ismert Cd és az As esetében. A jelenség lehetséges magyarázata a MT fehérjék funkcióira vezethető vissza, amely szerint azok részt vesznek az esszenciális Zn és Cu ionok megkötésében és elosztásában, azaz a

sejtek fém homeosztázisának fenntartásában. Irodalmi adatok szerint az oxidatív stresszhatások a szívben, intracellulárisan a MT fehérjékről Zn ionok felszabadulást váltják ki, amelyek többszörösére növelhetik a sejtek szabad fémion koncentrációját. A Cu ionokat a MT fehérjék a Zn-hez hasonlóan kis affinitással kötik és a szabad fém okozhat fehérje denaturációt, illetve stresszfehérje indukciót.

Publikációjegyzék

A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények:

Khaled Said Ali, László Dorgai, Magdolna Ábraham, Edit Hermesz: Tissue- and stressor-specific differential expression of two *hsc70* genes in carp. *Biochem Biophys Res Commun*. In press IF_{2002} 2.946

Khaled Said Ali, László Dorgai, Anett Gazdag, Magdolna Ábraham, Edit Hermesz. Identification and induction of *hsp70* gene by heat shock and cadmium exposure in carp. *Acta Biol Hung*., In press IF_{2002} 0.282

Edit Hermesz, Anett Gazdag, **Khaled Said Ali**, János Nemcsók, Magdolna Ábraham. Differential regulation of the two metallothionein genes in common carp. *Acta Biol Hung*. 2002; 53, 343-350 IF_{2002} 0.282

A dolgozot témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények

Magdolna Szente, Zita Gajda**, Khaled Said Ali**, Edit Hermesz. Involvement of electrical coupling in the in vivo ictal epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the neocortex. *Neuroscience*. 2002,115, 1067-1078. IF_{2002} 3.219

Zita Gajda, Erika Gyengési, Edit Hermesz, **Khaled Said Ali**, Magdolna Szente. Involvement of gap junctions in the manifestation and control of duration of seizures in vivo. *Epilepsia.* Közlésre elfogadva. IF_{2002} 3.271

Poszterek, előadások, magyarnyelvű közlemények:

Khaled Said Ali, László Dorgai, Magdolna Ábraham, Edit Hermesz. Differential expression of two *hsc70* genes in the liver and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). Science Conference 2003, Seiyun, Republic of Yemen, 2003.

Khaled Said Ali, Edit Hermesz. Expression of hsp70 and two metallothionein genes during cadmium exposure and heat shock treatment in common carp (*Cyprinus carpio*). MESEAP & SECOTOX 12th International Symposium, Antalya, Turkey, 2003

Erika Gyengési., Zita Gajda., Edit Hermesz**, Khaled Said Ali**, Magdolna Szente. The role of gap junctions in generation of seizure discharges and in the transition from ictal to interictal state. IBRO International Workshop, Debrecen, 2002.

Zita Gajda., Erika Gyengési, Edit Hermesz**., Khaled Said Ali**, Magdolna Szente. Involvement of electrical synapses in the induction and maintrenance of cortical seizure discharges, Int. Liga Against Epilepsy, Hung. Faculty, 6th Conference, Budapest, 2002.

Edit Hermesz, **Khaled Said Ali**, Magdolna Ábraham. Identification of two *hsp90* genes in carp. MESEAP & SECOTOX 11th International Symposium, Limassol, Cyprus, 2001.

10

Magdolna Ábrahám; Aranka Deér, Zsolt Varanka, **Khaled Said Ali**. A Balaton vízminőségének biokémiai módszerekkel való folyamatos ellenőrzése. A Balaton kutatásának 1998-es eredményei (szerk.: Salánki János és Padisák Judit), MTA Veszprémi Területi Bizottsága és Miniszterelnöki Hivatal, Veszprém, 1999, 149-153.

<u>Társszerzői lemondó nyilatkozat</u>

Alulírott nyilatkozom, hogy a jelölt téziseit ismerem, a tézisekben foglalt tudományos eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, s tudomásul veszem, hogy azokat ilyen célból a jövőben sem használhatom fel.

Dátum ……..

……. ……..

…… ……..

…… ……..

…….. ……...

…….. ...……

…….. ……