

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

Doktori (Ph.D.) értekezés

Khaled Said Ali

Témavezetők:

Dr. Hermes Edit

Dr. Ábrahám Magdolna

**Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi kar
Biokémiai Tanszék**

2003

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS.....	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
2.1. A stresszfehérjék.....	8
2.1.1. A stresszfehérjék osztályozása.....	9
2.1.2. A 70 kDa fehérjék jellemzése	10
2.1.3. Hsp70 fehérjék szerkezete	13
2.1.4. A 70 kD-os fehérjéket kódoló gének szerkezete és a génműködés szabályozása.....	15
2.1.4.1. A <i>hsp70</i> és <i>hsc70</i> gének szerkezete.....	15
2.1.4.2. A <i>hsp70</i> gének működésének szabályozása.....	16
2.1.5. A Hsp70 jellemzése halakban.....	18
2.2. A metallothioneinek.....	19
2.2.1. A metallothioneinek általános jellemzése.....	19
2.2.2. A metallothionein I csoport szerkezeti jellemzése.....	20
2.2.3. A metallothionein gének szerkezete és szabályozása.....	21
2.2.4. A metallothioneinek funkciói.....	22
2.2.4.1. Az MT-ek szerepe az esszenciális fémek tárolásában, elosztásában és szállításában	22
2.2.4.2. Az MT-ek detoxifikáló szerepe nehézfém expozíció esetén...23	
2.2.4.2.1. Kadmium detoxifikáció.....	24
2.2.4.2.2. Arzén detoxifikáció.....	24
2.2.4.2.3. Réz detoxifikáció.....	25

2.2.5. MT-ek jellemzése halakban.....	26
2.3. A <i>hsp70</i> , <i>hsc70</i> és a metallothionein gének expressziója szívben	27
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	30
3.1. Kísérleti állatok és kezelési körülmények.....	30
3.2. Genomiális DNS preparálás.....	30
3.3. RNS preparálás.....	31
3.4. Reverz transzkripció (RT).....	32
3.5. Northern blot analízis.....	32
3.6. Primerek.....	33
3.7. PCR amplifikáció.....	34
3.8. Gélelektroforézis, fragment izolálás.....	35
3.9. Géldokumentáció, denzitometrálas.....	35
4. EREDMÉNYEK	37
4.1. Ponty <i>hsp70</i> és <i>hsc70</i> gének izolálása	37
4.1.1. Evolúciósan konzervált DNS szekvenciák azonosítása, PCR primerek tervezése, amplifikálási stratégiák	37
4.1.2. Ponty <i>hsp70</i> gén amplifikálása genomiális DNS templátról.....	38
4.1.3. Ponty <i>hsc70</i> -gének amplifikálása cDN templátról.....	41
4.1.4. A <i>hsp70</i> és <i>hsc70</i> szekvenciák analízise.....	42
4.1.5. A <i>hsc70</i> gének amplifikálása genomiális DNS-ről.....	44
4.2. Ponty <i>hsp70</i> és <i>hsc70</i> gének expressziójának vizsgálata.....	46
4.2.1. A <i>hsp70</i> és <i>hsc70</i> gének szövetspecifikus alapexpressziója.....	46
4.2.2. Hőmérsékletváltozás hatása a <i>hsp70</i> és <i>hsc70</i> gének expressziójára izomban és májban.....	48
4.2.3. Kadmium kezelés hatása a <i>hsp70</i> és <i>hsc70</i> gének expressziójára....	50

4.3. A <i>hsp70</i> , <i>hsc70-1</i> és az MT gének expressziójának vizsgálata ponty szívben.....	52
4.3.1. Hőmérsékletváltozás indukálta <i>hsp70</i> és <i>hsc70-1</i> gén expressziója.....	52
4.3.2. Nehézfémek hatása a <i>hsp70</i> és <i>hsc70-1</i> gének expressziójára	53
4.3.2.1. Kadmium hatása a <i>hsp70</i> és <i>hsc70-1</i> gének expressziójára....	53
4.3.2.2. Az arzén és a réz hatása a <i>hsp70</i> és <i>hsc70-1</i> gének expressziójára.....	54
4.3.3. Nehézfémek hatása az MT gének expressziójára	54
4.3.3.1. Kadmium hatása az MT-1 és MT-2 gének expressziójára	55
4.3.3.2. Az arzén hatása MT-1 és MT-2 gének expressziójára.....	56
4.3.3.3. Réz hatása az MT-1 és MT-2 gének expressziójára.....	56
4.3.4. Hidegsokk hatása az MT-1 és az MT-2 gének expressziójára a szívben.....	56
5. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS MEGBESZÉLÉSE.....	58
5.1. A 70 kDa fehérjét kódoló stressz gének izolálása és jellemzése.....	58
5.2. A szívben indukálódott stressz gének működése.....	63
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	67
PUBLIKÁCIÓJEGYZÉK.....	68
IRODALAMJEGYZÉK.....	70
MAGYARNYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ	
ANGOLNYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ	

1. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS

Az utóbbi évtizedekben végbemenő káros környezeti változások (szennyező kémiai anyagok fokozott kibocsátása, klimatikus viszonyok megváltozása, stb.) egyre nagyobb veszélyt jelentenek az élőlények számára és számos fajt, amelyek nem képesek alkalmazkodni a megváltozott feltételekhez, a kihalás veszélye fenyegeti. A nehézfémek és vegyületeik a talajba, talajvízbe, valamint a felszíni vizekbe kerülve koncentrációjuktól és az expozíció időtartamától függően direkt módon károsíthatják az ökoszisztémák egyedeit, továbbá a tápláléklánc keresztüli közvetett akkumulációjuk miatt váltanak ki toxikus hatást. A vízi környezet nehézfém tartalma részint geológiai adottságok függvénye, amelyhez az adott környezetben élő fajok alkalmazkodtak, s ehhez hozzájárulhat az ipari és mezőgazdasági tevékenységből eredő addicionális terhelés is. A fémek egy része (Cu, Zn) a szervezetben esszenciális kofaktorként számos fehérje/enzim szerkezetének, működésének nélkülözhetetlen feltétele, továbbá fontos szerepet játszanak többek között számos anyagcsere vagy szignál transzdukciós folyamatban is. Fiziológiánál magasabb koncentrációban azonban, hasonlóan a nem-esszenciális fémekhez, toxikussá válnak. A fehérjék szulfhidril-, amino- vagy anionos csoportjaihoz kötődve módosítják azok konformációját, gátolva működésüket. A nehézfémek másodlagos hatásként a sejtekben reaktív oxigén szabadgyökök képződését indukálják, amely erősen oxidáns hatású szerves és szervetlen peroxidok keletkezéséhez vezet. A halak, a vízi táplálkozási lánc csúcsán, fokozott expozíciónak lehetnek kitéve tekintettel arra, hogy egyrészt a kopoltyúikkal és bőrükkel folyamatosan érintkeznek a vízben oldott idegen anyagokkal, másrészt a planktonikus élőlényekben, valamint a növényi és állati eredetű táplálékban felhalmozott anyagok a halak szervezetében is akkumulálódnak, így rövid vagy hosszú távon toxikussá válhatnak.

A stresszhatásokkal szembeni védekezés képessége általános tulajdonsága az élő szervezeteknek, amelynek során fizikai vagy kémiai jellegű környezeti hatásokra számos olyan fehérje szintetizálódik, amelyek fontos védő, szabályzó funkciót látnak el a sejtekben. Ezek részben a stresszhatás következményeit hárítják el (pl. fehérjék renaturációja, oxidatív stressz elleni védekezés, *DNS repair*, stb. útján), részben viszont közvetlenül megkötik a nehézfémeket, csökkentve ezáltal toxikus hatásukat.

A fizikai és kémiai jellegű stresszhatások többsége elsősorban molekuláris szinten jelentkezik, számos más hatáson túl fehérje denaturációt okozva a sejtekben. A stresszfehérjék a denaturálódott fehérjékhez kapcsolódva megakadályozzák azok aggregációját, és segítik a *refolding*-ot. A stresszválaszáadásban bizonyítottan résztvevő géncsalád a Hsp70, amelynek több konstitutív és indukálható izoformája ismert az élőlényekben. Különböző sejtek és szervek Hsp70-hez kapcsolódó stresszválaszai különbözőképpen szabályozottak, tükrözve specifikus biológiai szerepüket. Halakban a *hsp70* gén expressziójának szabályozó mechanizmusa főként transzlációs szinten ismert. Más, elsősorban emlősökön végzett vizsgálatok rámutattak, hogy a transzkripció és poszt-transzkripció változások is kulcsfontosságúak a szabályozás során.

A stresszválaszban szerepet játszó *hsp70* gén molekuláris szintű azonosítását, és potenciális induktorok hatására bekövetkező változások tanulmányozását tűztük ki célul pontyban (*Cyprinus carpio*, L.). Célunk volt minél több gén azonosítása és ennek sikere esetén terveztük az izoformákat kódoló gén expressziójának vizsgálatát a kontroll, valamint a hőmérsékleti és a nehézfém stressz hatásának kitett állat egyes szöveteiben, szerveiben. A fémek közül vizsgáltuk a Cd, mint az egyik legtoxikusabb nehézfém, a Cu, mint esszenciális fém és az As, mint a vizsgált koncentrációban legkevésbé toxikus nehézfém hatását. Az állatok fiziológias szív működése

kulcsszerepet játszik más szövetek oxigén és tápanyag ellátásában, ezért külön fejezetben vizsgáltuk a *hsp70* gén expressziójának szabályzását a szívizomszövetben. A nehézfémek molekuláris fehérje-károsító hatását jelentős mértékben befolyásolja a szabad fém ionok koncentrációja, ill. hozzáférhetősége a sejtekben. A metallothioneinek a sejtekben általánosan előforduló, magas fémtartalmú fehérjék, amelyeknek esszenciális szerepük van a nehézfémek detoxifikációjában. Munkacsoportunk korábban azonosított a pontyban két metallothionein gént, az MT-1 és MT-2 géneket, amelyek expressziója meghatározó lehet a sejtfehérjék védelmében. Ilyen módon a sejtek MT szintje közvetve befolyásolhatja a *hsp70* stresszgén expresszióját is, ezért vizsgáltuk a két MT gén fémek hatására bekövetkező expresszióját is a szívben.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A stresszfehérjék

Régóta ismert az a jelenség, hogy hőmérsékletemelkedés hatására a sejtek jellegzetes fehérjék szintézisével válaszolnak. Ezen fehérjéket hősokk fehérjéknek (Hsp), a jelenséget pedig hősokk válasznak nevezték el (Ritossa, 1962; Tissieres és mtsi, 1974). Később megfigyelték, hogy a hirtelen hőmérséklet változáson kívül más stresszhatások is indukálják ezen fehérjék szintézisét, ezért az irodalomban az általánosabb stresszfehérje elnevezés is használatos. 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 kiválthatják környezeti stresszorok (hőmérsékletváltozás, nehézfémek, a sejtek energia metabolismusának inhibitorai, különböző szerves vegyületek) valamint endogén tényezők, betegségek (pl. vírus infekció, láz, gyulladás, *hypertrophy*, *ischemia*, oxidációs hatások), továbbá bizonyos, a normális sejtműködéssel kapcsolatos hatások (sejtosztódási ciklus, növekedési faktorok, differenciálódás, stb.) (Ashburner és Bonner, 1979; Schlesinger, 1990). Egyes környezeti tényezők előidéznak *specifikus* válaszreakciókat is a sejtekben, amelynek során olyan fehérjék indukálódnak, amelyeknek közvetlen hatása az adott stresszorra irányul, mint pl. a toxikus nehézfémeket elimináló metallothioneinek, vagy a poliaromás vegyületeket metabolizáló citokróm P450-függő biotranszformációs enzimek keletkezése (Iwama és mtsi, 1998).

Stresszfeltételek 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 hősokk

fehérjék keletkezése, amelyek 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.

A 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 stresszmentes állapotban a sejt összes fehérjéjének 5-10%-át teszi ki, stresszt követően azonban többszörösére növekszik a mennyiségük (Morimoto, 1994a).

2.1.1. A stresszfehérjék osztályozása

A stresszfehérjék legáltalánosabb besorolása a molekulatömegük alapján történik, ilyen módon megkülönböztetjük a Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 és a kis molekulatömegű családba tartozó fehérjéket. Az eukarióta sejtekben a Hsp fehérjék a citoszolban, mitokondriumokban, endoplazmatikus retikulumban (ER) és sejtmagban találhatók. A Hsp78, Hsp75, Hsp60 és Hsp10 általában az organellumokban, míg a Hsp110, Hsp90, Hsc70, Hsc71, Hsc73, Hsp70, Hsp71, Hsp72, és Hsp20 a citoplazmában és sejtmagban is előfordulnak. A stresszfehérjéket gyakran csoportosítják még fokozott szintézisüket kiváltó okok szerint (pl. hősokk fehérje, glükóz regulált fehérje), vagy a szekvencia homológiájuk, illetve a funkciójuk alapján (Morimoto és mtsi, 1990; Gething és Sambrook, 1992; Becker és Craig, 1994; Günther és Walter, 1994; Morimoto és mtsi, 1994b; Wynn és mtsi, 1994). A stressz fehérjék egy csoportja az intracelluláris fehérjék térszerkezetének kialakításában való aktív szerepük miatt a molekuláris *chaperone* elnevezést kapta (Ellis, 1987).

2.1.2. A 70 kDa fehérjék jellemzése

A stressz fehérjék egyik legnépesebb családja 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 (Bardwell és Craig, 1984; Craig, 1985; Lindquist, 1986; Caplan és mtsi, 1993; Günther és Walter, 1994; Santacruz és mtsi, 1997).

Az eukarióta sejtekben mind a citoszólban, mind a sejtmagban kimutathatók a konstitutívan jelenlévő Hsc70 és a stressz indukálható Hsp70 formák (Sorger és Pelham, 1987). A mitokondriumokban és kloroplasztokban előforduló fehérje a glükóz regulált Grp75, az endoplazmatikus retikulum lumenében pedig egy negyedik, a Grp78 (Bip) glükóz regulált fehérje található (Munro és Pelham, 1986).

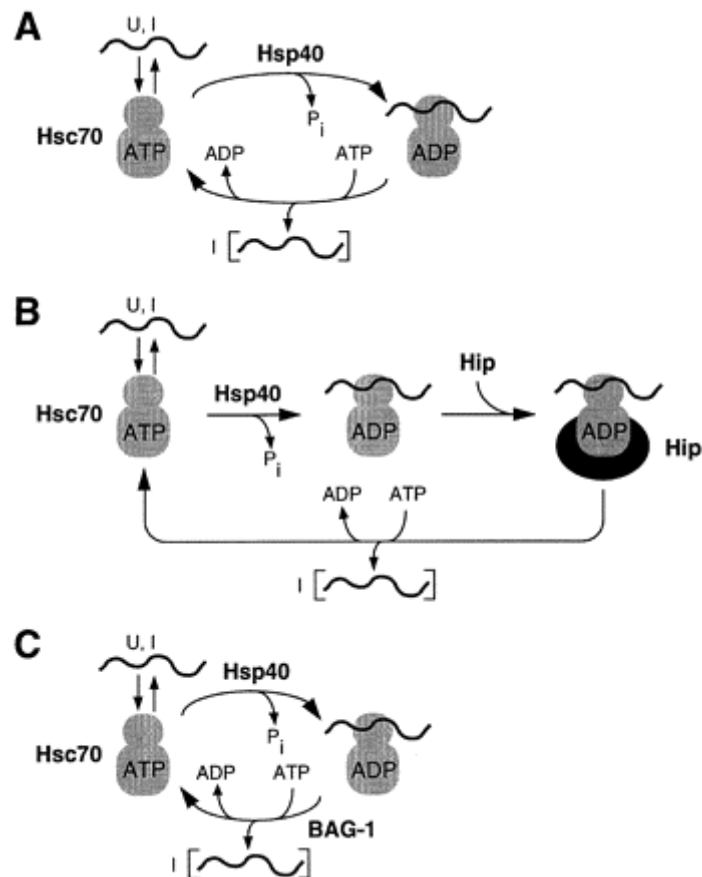
A citoplazmában és a sejtorganellumokban előforduló 70 kDa molekulatömegű fehérje család konstitutív tagjai számos fontos biokémiai funkciót látnak el stresszmentes állapotban. Mint molekuláris *chaperone-ok* közreműködnek a fehérjék funkcionális térszerkezetének kialakításában, gátolják a *de novo* szintetizálódó fehérjék aggregálódását és résztvesznek a fehérjék célbajutásában és transzlokációs folyamataiban. A citoszolikus Hsp70 fehérjék (ct-Hsp70) kölcsönhatásba kerülnek a poliriboszómákon szintetizálódó naszcens prekursor fehérjékkel és az *unfolded* intermediereket az endoplazmatikus retikulumba, mitokondriumokba vagy a kloroplasztiszokba irányítják (Marshall és mtsi, 1990; Phillips és Silhavy, 1990; Nover, 1991; Sanders, 1993; Stuart és mtsi, 1994).

A 70 kDa molekulatömegű fehérjecsalád konstitutív formáinak, azaz a citoplazmában és sejtmagban található Hsc70, valamint a mitokondriális Grp75 (mtHsp70) és az endoplazmatikus retikulumban található Grp78 fehérjéknek, két

különböző *chaperone* funkciója van a sejtek nyugalmi állapotában. Egyrészt az újonnan szintetizált fehérjéket *unfolded* állapotban tartják és átadják a Hsp60 család tagjainak, melyek létrehozzák a *folded* fehérjéket, a natív konformációt. Másrészt szállítják a különböző celluláris kompartmentekbe transzlokálódó fehérjéket. A Hsc70 és Hsp70 fehérjék közvetlenül kölcsönhatásba lépnek a zsírsavakkal, ezáltal kötődni képesek a sejtmembránhoz (Guidon és Hightower, 1986; Torok és mtsi, 1997).

A Hsc70 és a célfehérjék közötti kölcsönhatásokat számos laboratóriumban vizsgálták (Hartl és mtsi, 1994; Leung és Hightower, 1997; Bukau és Horwich, 1998). A Hsc70 hidrofób régiója a célfehérjék hidrofób polipeptid láncrészeinek kötésében is részt vesz. A 70 kDa molekulatömegű *chaperone*-ok az újonnan szintetizálódó polipeptid lánc hét egymást követő aminosav oldallácahoz kötődnek mielőtt az elhagyná a riboszómát, és a kötött fehérje szegmenseket laza *folded* állapotba hozzák. A fehérje szubsztráton a *chaperone*-ok egymást követően átlagosan 20-40 aminosavnyi távolságnyra kötődnek, s a Hsp70 ATP hidrolizáló aktivitása miatt a *chaperone* többször is leválik és újraköt egy-egy kinyújtandó vagy nyújtott peptidszakaszon. A Hsp70 a szintézis során kötött és laza állapotban tartja a naszcens polipeptid láncot. Végül a Hsp60 és Hsp10 *chaperonine* fehérjék befejezik a lánc teljes *folding*-ját, amely a natív konformáció kialakulásához vezet. A Hsp70/Hsc70 *chaperone* ciklus mechanizmusában a Hsp40, a Hip (*Hsp70-interacting protein*), és a BAG-1 (*Bcl2-associated athanogene 1 protein*) fehérjéknek is fontos szerepük van (1. ábra) (Frydman és Höhfeld, 1997; Höhfeld és Jentsch, 1997). A Hsp40 stimulálja az Hsc70 ATP-t hidrolizáló aktivitását és stabilizálja a Hsc70 és szubsztrát fehérje közötti kölcsönhatást. A Hip *cochaperone* kapcsolódása a komplexen stabilizálja ezt az állapotot. A BAG-1 fehérje ellentétesen szabályoz, fokozza az ADP felszabadulását és a Hsc70 ciklust (Höhfeld és mtsi, 1995; Hartl, 1996; Bukau és Horwich, 1998). Élesztőkben más

segédfehérjék fordulnak elő, a Ydj1, Sec63, Sej1, és Sis1 (Hattori és mtsi, 1993; Silver és Way, 1993).



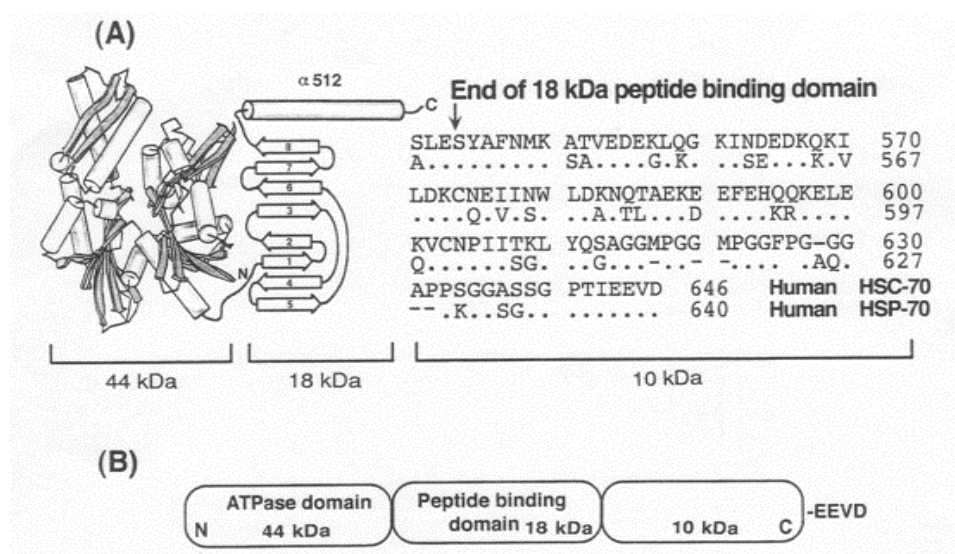
1. ábra: Modell a Hsc70 ciklus mechanizmusáról a Hsp40, Hip és BAG-1 segédfehérjék jelenlétében. U: az *unfolded* polipeptid szubsztrát, I: *folding intermediate* (Höhfeld és Jentsch, 1997).

A Hsp70 együttműködve a Hsp90 fehérjével részt vesz a frissen szintetizált szteroid receptorok feltekerésének első lépésében is. A szteroid receptort a Hsp70 köti meg segédfehérjék (Hsp40, Hip) segítségével, majd az így kialakult komplexhez a Hsp90 is hozzákötődik. A Hsp70 és Hsp90 közötti kapcsolatot a Hop (*Hsp70-Hsp90 organizing protein*) elnevezésű fehérje biztosítja (Pratt és Toft, 1997; Hernández és mtsi, 2002).

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 organellekbe (Terlecky, 1994; Kiang és Tsokos, 1998; Agarraberes és Dice, 2001).

2.1.3. Hsp70 fehérjék szerkezete

A Hsp70 fehérjékben két különböző funkciójú *domain* található, az N-terminális ATPáz *domain*, amely kb. 64% azonosságot mutat eukarióta fehérjékben, valamint a variábilisabb C-terminális peptidkötő *domain*. A két *domain*-t proteáz szenzitív régió kapcsolja össze (Feige és Polla, 1994) (2. ábra).



2. ábra: Az emberi Hsc70/Hsp70 fehérjék molekuláris szerkezete.(A). A *domain* szerkezet sematikus ábrázolása (B) (Kiang és Tsokos, 1998).

Az ATPáz *domain* szerkezetének röntgen krisztallográfiás vizsgálata kimutatta, hogy térszerkezetét tekintve két, globuláris *subdomain*-ból áll, amelyek két strukturális

lebenyt alkotnak, s közöttük mély ATP-kötő árok húzódik (Flaherty és mtsi, 1990). A fehérje ATP-kötőhelyének három-dimenziós szerkezete nagymértékben hasonlít az aktin és a hexokináz ATP-kötőhelyéhez (Flaherty és mtsi, 1990; Kabsch és mtsi, 1990; Bork és mtsi, 1992). Az N-terminális régióban többszörösen ismétlődő VDLGGGDFE és egy GILDG szekvencia található (Gupta és Golding, 1993), továbbá a 170-175 pozícióban glutamát található (Flaherty és mtsi, 1990).

A C-terminális *domain* egy kb. 18 kDa peptidkötő, és az azt követő 10 kDa-os C-terminális *subdomain*-ekre tagolódik (Morimoto és mtsi, 1990; Wang és mtsi, 1993; Chou és mtsi, 2001). A peptidkötő *domain* két, négy szálas antiparallel β -lemezből és egy α -helixből áll (Morshauser és mtsi, 1995). A peptidkötő *domain* szerkezete nagy hasonlóságot mutat az MHC (*major histocompatibility complex*) fehérje I peptidkötő *domain*-jének szerkezetéhez (Flajnik és mtsi, 1991; Rippmann és mtsi, 1991). A 10 kDa tömegű C-terminális *subdomain* főként α -helix szerkezetű. Az EEVD terminális szekvencia konzervált (Hightower és mtsi, 1994). A négy terminális aminosav jelen van minden eukarióta Hsp70 és Hsp90 fehérjében és résztvesz a *tetratricopeptid repeat* (TPR)-*domain*-t tartalmazó *co-chaperone*-okkal (pl. Hip, Hop és Chip fehérjék) történő kölcsönhatásokban (Chen és Smith, 1998; Ramsey és mtsi, 2000; Rusell és mtsi, 1999; Brinker és mtsi, 2002).

A Hsc73 fehérjének a C-terminális *domain*-je olyan aminosav szekvenciát tartalmaz, amely felismeri és köti a KFERQ pentapeptid szekvenciákat tartalmazó polipeptideket (Chiang és mtsi, 1989; Terlecky, 1994; Agarraberes és Dice, 2001). A Hsc70 a célfehérjén kétféle motívumot köt, az egyik a nagy, hidrofób és aromás oldalláncokat tartalmazó FYQLALT szekvencia, amely relatíve jól stimulálja az ATPáz aktivitást, s ugyanakkor marker a natív és az *unfolded* konformáció felismerésére. A másik motívum a hidrofób és bázikus aminosavakat tartalmazó NIVRKKK, amely

kevésbé stimulálja az ATPáz aktivitást, szerepük lehet az organellekbe irányuló fehérje transzportban, illetve *unfolded* fehérjéket köt (Kiang és Tsokos, 1998).

2.1.4. A 70 kD-os fehérjéket kódoló gének szerkezete és a génműködés szabályzása

2.1.4.1. A *hsp70* és *hsc70* gének szerkezete

Eukariótákban a *hsp70* és a *hsc70* gének több kópiás gén családot alkotnak; a *Saccharomyces cerevisiae* sejtekben például 9 gén van (Craig és mtsi, 1990), *Drosophila*-ban úgyszintén (Pauli és Tissieres, 1990), ellentétben a prokarióta *E. coli* egy kópiás génjével (*dnk*) (Günter és Walter, 1994). A *hsp70* gének aktivitását szabályozó mechanizmusok jelentősen eltérnek a *hsc70* génektől. A *hsc70* gének konstitutívan expresszálódnak és stressz hatására nem vagy csak kis mértékben indukálódnak, míg *hsp70* gének különböző stresszhatásokra jelentős mértékben indukálódnak és alap állapotban nem vagy csak kis mértékben expresszálódnak. Az endoplazmatikus retikulumban található *grp78* például konstitutívan expresszálódik és glükóz hiányában, glikolízis gátlók hatására, vagy hipoxiában expressziója növekszik, hő sokk hatására azonban nem reagál (Hass, 1994).

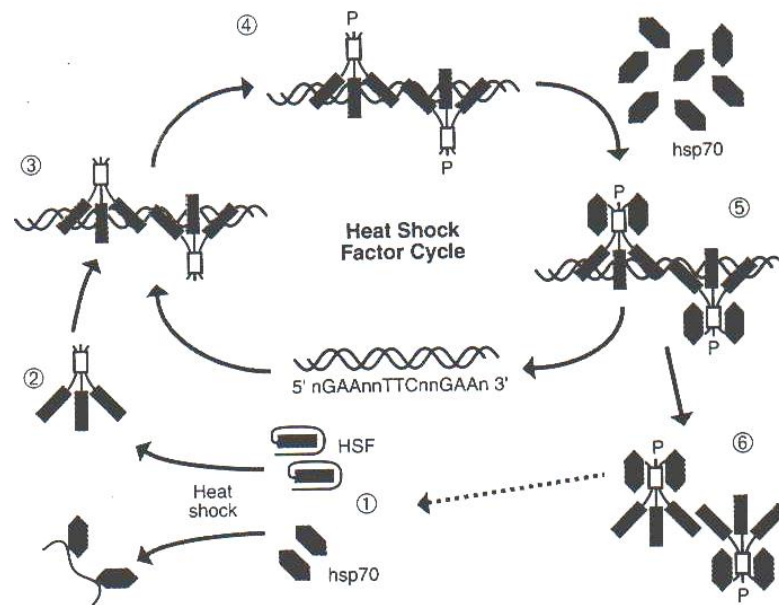
A *hsp70* és *hsc70* struktúrgének jellegzetes különbségeket mutatnak. Az eddig azonosított *hsc70* struktúrgének intronokat hordoznak. Az intronok hosszúsága nem mutat jelentős hasonlóságot a különböző fajok között, azonban számuk és pozíciójuk konzervált. A *Rivulus marmoratus* és pisztráng halfajokban, emberben és egérben például a *hsc70* gén 9 exont és 8 intront hordoz, amelyek közül az első exon nem kódoló (Dworniczak és Mirault, 1987; Zafarullah és mtsi, 1992; Hunt és mtsi, 1999; Park és mtsi, 2001). Az eddig azonosított *hsc70* struktúrgének közös jellemzője, hogy a funkcionális transzlációs start kodonnak megfelelő szekvencia minden esetben a második exonban található. A *hsc70* génekkel szemben a *hsp70* gének néhány kivételtől eltekintve (*Oomycetes fungi*, Judelson and Michelmores, 1989; Le'John és mtsi, 1994)

nem hordoznak intront (Milner és Campbell, 1990; Lele és mtsi, 1997; Lim és Brenner, 1999). A *hsp70* gén promóter régiójában az expresszió szabályozásában résztvevő szekvenciák (HSE: *Heat Shock Element*, CCATT szekvenciák és Sp1 kötőhelyek) a TATA box közelében 400 bp-on belül találhatóak (Lim és Brenner, 1999). A patkány *grp78* génjének promóterében nincsen HSF kötő HSE-régió, más transzkripciós faktorok szerepelnek a gén konstitutív expressziójának szabályozásában (Lin és mtsi, 1986; Ramakrishnan és mtsi, 1995; Zhou és Lee, 1998).

2.1.4.2. A *hsp70* gének működésének szabályozása

A sejtek a stresszhatást követően viszonylag gyorsan, a *hsp70* gének transzkripciós aktiválódásával válaszolnak. A szabályozó mechanizmus fontos elemei a HSF (*Heat Shock Factor*) transzkripciós faktorok, az élesztőben és *Drosophila*-ban csak egyféle HSF azonosítható, más eukarióta fajokban kettő vagy több. A gerincesekben eddig négy különböző HSF-t azonosítottak: a HSF1, HSF2, HSF3 és HSF4. A HSF3 csak a madarakra jellemző (Nakai és mtsi, 1995; Morimoto, 1998, Nakai és Ishikawa, 2001) és a HSF4 az emberi szívben, agyban és izomban expresszálódik preferenciálisan (Nakai és mtsi, 1997; Morimoto, 1998). A gerincesek sejtjeiben expresszálódó hősokk faktorok közül a HSF1 stressz hatására (pl. hősokk, oxidatív stressz, nehézfémek, aminosav analógok), míg a HSF2 fehérje stresszmentes körülmények között, az egyes sejtek működése során (pl. differenciálódás, spermatogenezis, stb.) aktiválódnak. A HSF fehérjék nagyfokú strukturális hasonlóságot mutatnak a különböző fajokban, az emberi, egér és csirke szövetekből izolált HSF1 aminosav szekvenciája 85-95% azonosságot mutat (Morimoto és mtsi, 1994a).

A HSF1 stresszmentes állapotban a citoplazmában monomerként van jelen és Hsp-t köt (3. ábra).



3. ábra: Modell a HSF szabályozó szerepről a *hsp70* expresszióban. A stresszmentes sejtekben a HSF1 monomer állapotban van jelen (1). A hő sokk hatására trimerizálódik (2), kötődik a *hsp70* promóter régiójának HSE elemeihez (3) és foszforilálódik (4). Ez a fokozott *hsp70* expresszióhoz vezet, amely komplexet alakít ki a HSF-vel (5). Végül a HSF ledisszociál és ismét monomer formává alakul (6) (Morimoto, 1993).

Hő sokk, oxidatív stressz, nehézfémek és aminosav analógok hatására a HSF ledisszociál a Hsp-ről, és a monomerek a sejtmagba lépnek, ahol trimerizálódnak, kötődnek a *hsp70* gén promóter régiójának HSE elemeihez és foszforilálódnak. Az egér HSF1 a promóter mind az öt HSE eleméhez kötődik, míg a HSF2 csak a 2-5. pozícióban kapcsolódik. A DNS öt bázispárnyi, nGAAn szekvenciája esszenciális a HSF1 és HSF2 kötődéséhez. A *hsp70* gén átíródását követően a HSF trimer ledisszociál és monomerként elhagyja a sejtmagot. A citoplazmában a HSF monomer ismét Hsp-vel kapcsolódik (Abravaya és mtsi, 1991; Baler és mtsi, 1992; 1993; Wu, 1995; Cotto és mtsi, 1996; Morimoto és mtsi, 1996; Morimoto, 1998; Shi és mtsi, 1998). Tehát a stresszhatás valószínűleg nem változtatja meg a HSF1 mennyiségét a sejtben, hanem a HSF1 inaktív formáját transzkripcionálisan aktív formába hozza, amely fokozott Hsp70 expressziót eredményez.

2.1.5. A Hsp70 jellemezése halakban

A halakban elsőként Kothary és mtsi. (1984) izoláltak két Hsp70-t kódoló részleges cDNS szekvenciát, a pisztráng hepatocytá RTG-2 sejtvonalból. Aminosav szekvenciájuk 88,1%-ban mutat hasonlóságot egymáshoz és nagy mértékben hasonlít a *Drosophila melanogaster* (Ingolia és mtsi, 1980) és *Saccharomyces cerevisiae hsp70* génjének megfelelő szekvenciáihoz (Ingolia és mtsi, 1982). Zafarullah és mtsi. (1992) elsőként írták le a pisztráng *hsc70* struktúrgén szerkezetét. Azóta több halfajból is izolálták mind a *hsp70* mind a *hsc70* géneket (Arai és mtsi, 1995; Lele és mtsi, 1997; Santacruz és mtsi, 1997; Molina és mtsi, 2000; Park és mtsi, 2001). Arai és mtsi. (1995) az *Oryzias latipes* és *Oryzias celebensis* fajokból származó két hepatocytá sejtvonalból (OLHSC70 és CEHSC70) egy-egy *hsc70* cDNS-t izoláltak. Az OLHSC70 cDNS hosszúsága 2262 bp és 686 aminosavból álló fehérjét kódol. A CEHSC70 cDNS hosszúsága 2114 bp. A két gén konstitutívan expresszálódik alap állapotban és a hőmérsékletváltozás hatására kismértékű indukciót mutat.

A halakban a *hsc70* génstruktúra hasonlít az emlős *hsc70* szerkezetéhez (Dworniczak és Mirault, 1987; Hunt és mtsi, 1999), amely kilenc exonból és nyolc intronból áll, az első exon nem kódoló (Zafarullah és mtsi, 1992; Park és mtsi, 2001). Halakból az indukálható *hsp70* géncsaládba tartozó genomiális szekvenciát a *Fugu rubripes*-ben írták le elsőként, amely hasonlóan az emlősök génjeihez nem tartalmaz intront (Lim és Benner, 1999). A szabályozó mechanizmus fontos elemét a HSF fehérjét eddig egyetlen halfajból, a zebra dánióból izolálták (zHSF) (Rabergh és mtsi, 2000), amely az emlős HSF1 típusú transzkripciós faktornak felel meg.

A Hsp70 hősokk fehérje hőstressz hatására szövet-specifikusan expresszálódik. *Fundulus heteroclitus* (Cyprinodontidae) halfajjal végzett *in vivo* kísérletek mutatták, hogy, hősokk hatására a *hsp70* gének közül a kopoltyúban és szívben a *hsp76* és *hsp74*,

a májban, izomban és agyban a *hsp76* expresszálódik (Koban és mtsi, 1991). Hasonló megfigyeléseket tettek Dyer és mtsi. (1991) a *Fathead minnow* (FHM) kopolyú, izom és agyszövetében.

Mint már említettük, a *hsp70* gén indukcióját nemcsak a hőmérsékletváltozás váltja ki, hanem a környezeti szennyező anyagok is. Megfigyelték, hogy kémiai stresszorok (pl. nehézfémek, β -naftoflavon, lindane, diazinon, stb.) hatása szövet-specifikus *hsp70* expressziót indukál (Dyer és mtsi, 1991). A FHM kopolyújában az arzenit a *hsp74*, *hsp72*, *hsp70* géneket indukálja, míg az izomban a *hsp70* és *hsp68* indukálódik (Sanders, 1993).

2.2. A metallothioneinek

2.2.1 A metallothioneinek általános jellemzése

A metallothioneinek (MT) kis molekulatömegű, ciszteinben gazdag, fémkötő fehérjék. Először 1957-ben, a ló vese kéregállományából izolálták őket, azóta már szinte valamennyi vizsgált élőlényben, a prokariótáktól az eukarióta mikroorganizmusokon és magasabb rendű növényeken át az emberig azonosították (Margoshes és Vallee, 1957; Kagi és Kojima, 1987; Kagi, 1993). Az MT-ek mai ismereteink szerint az egyetlen olyan fehérjék, melyek denaturálódás nélkül képesek a Cd ionok megkötésére (Suzuki, 1992). Az MT-ek különböznek a legtöbb fémtartalmú fehérjétől, mivel azoknál sokkal nagyobb mennyiségben tartalmaznak fémeket, és a fémkötéseik kinetikailag labilisak. E tulajdonságuk teszi őket alkalmassá a fémionok raktározására, szállítására és elosztására az élő szervezetekben.

Struktúrális hasonlóságaik alapján három csoportba sorolhatók (Fowler és mtsi, 1987):

- I. azok a polipeptidek, melyek elsődleges szerkezete és a cisztein aminosavak elhelyezkedése közel azonos a ló veséből izolált, alaptípusnak számító MT-el.

- II. azok a polipeptidek, melyek szerkezete nem vagy csak igen távoli evolúciós kapcsolatban van a ló vese MT-el (pl. élesztők MT-ek).
- III. azok a fém-thiolát polipeptidek, melyek nem riboszómális fehérjeszintézis útján keletkeznek (növényekben, mikroorganizmusokban).

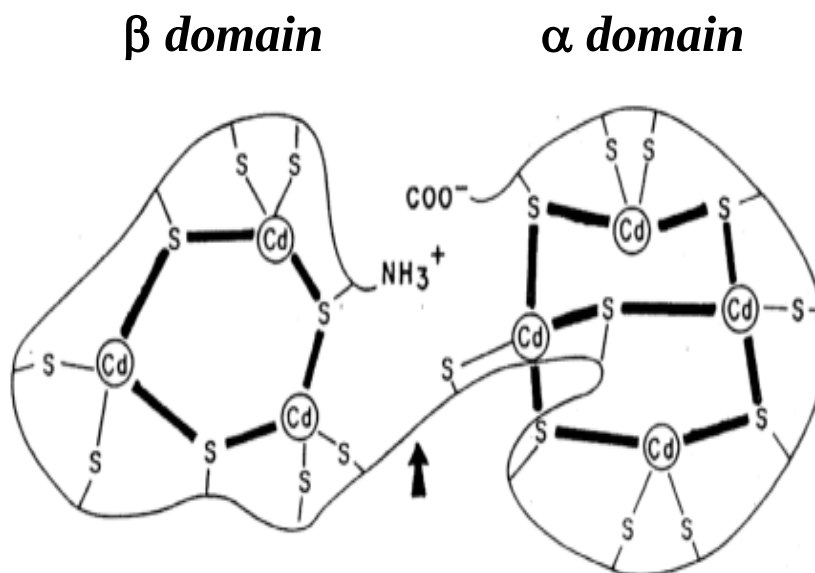
Mivel a halak MT fehérjéi a fenti besorolás I osztályba tartoznak, ezért a továbbiakban részletesen csak ennek az osztálynak a jellemzésével foglalkozunk.

2.2.2. A metallothionein I csoport szerkezeti jellemzése

Az MT-ek kis molekulatömegű (6-7 kDa), 60-64 aminosavból álló, magas fémtartalmú (~ 7 db/molekula) és jellegzetes aminosav összetételű polipeptidek. Nem, vagy csak rendkívül alacsony arányban tartalmaznak aromás aminosavakat és hisztidint, míg az aminosav tartalmuk közel egyharmada cisztein (~ 20/molekula). A polipeptidláncon belül a ciszteinek pozíciója konzervált, a Cys-x-Cys, Cys-x-x-Cys illetve Cys-Cys motívumok a fémionokkal térhálós fém-thiolát komplexekbe rendeződnek. Az MT-ekben valamennyi fém thiolát-ligand formájában kötött. A kötött formában jelenlevő 7 fématom két csoportba (*cluster-be*) különül el, 3 illetve 4 fém megoszlásban (Kagi, 1974). A két fémkötő *domain* egymástól jól elkülöníthető: a fehérje N-terminális része a β *domain*-t foglalja magába, ahol 9 cisztein 3 fématom kötésében vesz részt, míg az α *domain*-nek nevezett C terminális régióban, 11 cisztein 4 fématommal létesít kötést (Nielson és Winge, 1983) (4. ábra).

Az MT-ek szerkezetéről, funkciójukról meglévő ismereteink elsősorban az emlősből származó fehérjéken végzett vizsgálatok eredményei. Az első csoportba tartozó emlős MT fehérjének 4 fő izoformáját különböztetjük meg; az állatvilágban általánosan előforduló MT-I és MT-II mellett azonosították még a központi idegrendszerre specifikus MT-III (Uchida és mtsi, 1991; Imagawa és mtsi, 1995)

valamint a pikkelyes hámsejtekre jellemző MT-IV-et kódoló géneket is (Quaife és mtsi, 1994).

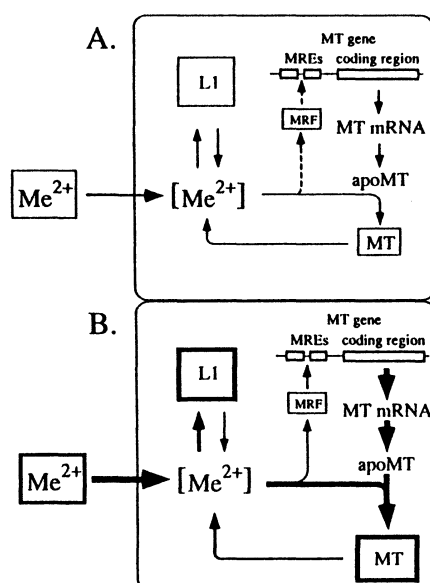


4. ábra: A Cd-Cys elhelyezkedése a Cd-MT fehérjében. Az α domain 4 fém-tiolát cluster-t és a β domain 3 fém-tiolát cluster-t tartalmaz (Klaassen és mtsi, 1999).

2.2.3. A metallothionein gének szerkezete és szabályozása

Valamennyi ismert MT gén 3 exont és két intront tartalmaz. Az exonok nukleotid sorrendje valamint, az exon-intron határok pozíciója rendkívül konzervált. Az emlős MT gének expressziója elsősorban transzkripcionális szinten szabályozódik (Palmiter, 1987). Többek között különböző fémek, hormonok, antioxidáns molekulák megemelkedett szintje indukálja az MT mRNS-ek szintézisét a gének 5' régiójában található regulációs szakaszokon (*cis-acting responsive element*) keresztül (Palmiter, 1987; Andrews, 1990; Dalton és mtsi, 1994; Kelly és mtsi, 1997). Az MT promóter régióban általánosan előforduló szekvencia az MRE (*metal responsive element*); mely egy 13-15 nukleotidból álló, TGCA/GCNC core szekvenciát tartalmazó, mindig több kópiában jelenlévő szabályozó elem (Hamer, 1986; Palmiter, 1987). Fémindukció esetén egy specifikus fehérje, az MRF (*metal responsive factor*) (Westin és Schaffner

1988), a fém kötését követő konformációs változás során aktiválódik. Az aktiválódott szabályozó fehérjék kötődnek az MT gén regulációs szakaszaihoz, mely a gén fokozott átírását eredményezi. Az indukciót követően nő a sejtekben az MT szint, fokozódik az intracelluláris fémionok megkötése, illetve megtörténik a fémionok átvétele a metallothionein ligandokról. MT-kötött formában megszűnik a fémionok toxikus hatása (5. ábra).



5. ábra: Fémek szubcelluláris megoszlása fiziológias állapotban (A) és fémindukciót követően (B). Me^{2+} : a szervezetbe került kétértékű fém, a vastag vonalak a fémionok fluxusának irányát és relatív koncentrációját jelzik (Roesijadi, 1992).

2.2.4. A metallothioneinek funkciói

2.2.4.1. Az MT-ek szerepe az esszenciális fémek tárolásában, elosztásában és

szállításában

Az MT-ek fontos szerepet játszanak az esszenciális fémionok (Zn, Cu, Fe) megfelelő időbeni és szöveti eloszlásának biztosításában, mivel -SH csoportjaik által képesek a fémionok gyors megkötésére, tárolására és szükség esetén leadására. Az apo-MT-ek magas -SH csoport tartalmuk és azok fémionokhoz való nagy affinitása

következtében jelentős fém akzeptorként viselkednek. A kötött fémionok, az -SH csoportok nagy reaktivitása miatt egy folyamatos transzfer reakció részei, mivel Cys-Fém(II)-Cys keresztkötések állandó felbomlása és újraszerveződése lehetővé teszi a fémionok kicserélődését. Ez végbemehet egy MT molekula egyetlen centrumán belül vagy centrumai között, továbbá az MT molekulák, illetve az MT és más metalloproteinek között. Az MT-ek fémkötésének ezen nagyfokú affinitása és dinamikus fluktuációja teszi őket alkalmassá arra, hogy döntő szerepet töltsenek be az esszenciális fémek homeosztázisának fenntartásában.

Az alapállapotban szintetizálódott MT-ek elsősorban cinket és rezet kötnek, melyeket könnyen kiszoríthatnak olyan fémionok, melyek nagyobb affinitással képesek kötődni a fehérjékhez ($Zn < Cd < Cu < Ag < Hg$). Így például Cd expozíció esetén a Cd folyamatosan kiszorítja a Zn-et a Zn-Cu-MT molekulákból, miközben az egyes fehérje molekulák egy adott időpontban mindhárom fémeket is tartalmazhatják. Az MT-hez kötött fémek aránya erősen függ a szervezetbe került nem esszenciális fémek koncentrációjától, a fémfelvétel körülményeitől, továbbá erős faj és szövetspecifitás jellemző rájuk.

2.2.4.2. Az MT-ek detoxifikáló szerepe nehézfém expozíció esetén

Az esszenciális fémek hatása a biológia rendszerekben kettős (Roesijadi, 1992): egyfelől jelenlétük nyomnyi mennyiségben elengedhetetlen a különböző életfolyamatokhoz, míg a fiziológiásnál nagyobb koncentrációban vagy folyamatos expozíció esetén toxikussá válnak a szervezet számára. Ennek egyik oka az, hogy nagy affinitással kötődnek az enzimek szulfhidril- és amino-csoportjaihoz, anionos oldalláncjaihoz és közvetlenül, vagy a fehérje konformáció megváltoztatásával közvetve gátolják az enzimek katalitikus aktivitását.

A biológiai funkcióval nem rendelkező nehézfémek (Cd, Pb, As, Hg) hasonló mechanizmuson keresztül kifejtve hatásukat, már kis koncentrációban is toxikusak lehetnek.

2.2.4.2.1. Kadmium detoxifikáció

A kadmiumnak a környezetünkben való fokozódó felhalmozódása az ipari tevékenység következményeként egyre nagyobb gondot okoz. A Cd expozíció elsősorban a májat és a tüdőt károsítja, de a tartós Cd terhelés esetén a vesében és a csontozatban okozza a legsúlyosabb elváltozásokat. Emberben, a vese tubulusok károsodása talán a legáltalánosabban jelentkező betegség Cd expozíció következtében. Az MT-ek szerepét a Cd semlegesítésében, kiválasztásában számos kísérleti eredmény alátámasztotta. Különböző MT-transzgenikus egér modelleket használva valószínűsíthető, hogy az MT nem befolyásolja a Cd bélcsatornán keresztül történő felvételét, sem pedig annak kezdeti eloszlását a különböző szövetek között. Azonban a Cd, Cd-MT formában történő kiválasztása az epébe jelentősen csökkenti a nehézfém toxikus hatását, megvédve ezzel a szervezetet, különös tekintettel a vesét, a különböző szöveti károsodásoktól (Liu és Klaassen, 1996; Liu és mtsi, 1996).

2.2.4.2.2. Arzén detoxifikáció

Az arzén, hasonlóan más nehézfémekhez, az élő szervezetekbe kerülve annak károsodását idézheti elő (máj megnagyobbodás, tumor képződés, sejt degeneráció, stb.) (Ishinishi és mtsi, 1980; Del Razo és mtsi, 2001). Nagy affinitással kötődik a fehérjék szulfhidril csoportjaihoz, ezzel gátolva a -SH függő enzimek működését (Webb, 1987). Az arzén öt vegyértékű alakja a sejtek redukzív feltételei közt a toxikusabb As^{3+} -á redukálódik, majd az arzenit a májban kevésbé toxikus szerves formává alakul át és kiválasztódik (Eller-Essen és Crivello, 1998).

Patkányban az *in vivo* As^{3+} és As^{5+} kezelések dóziszfüggő MT mRNS és fehérje szintnövekedést eredményeztek. A közvetlen arzenát bevitel mindig hatékonyabb válaszreakciót váltott ki, mint a hasonló dózisban alkalmazott arzenit (Albores és mtsi, 1992).

Az arzén az MT gén expresszióját mind direkt mind indirekt módon növelheti. A közvetett, poszt-transzkripció szintű szabályozás létrejöhet az mRNS-ek fokozott transzlációja, illetve az MT fehérjék stabilizálása révén. Ez utóbbi lehetőséget támasztja alá az a megfigyelés, hogy az arzén gátolja a lizoszómális enzimek aktivitását és az ubiquitin függő fehérje degradációt (Albores és mtsi, 1992).

2.2.4.2.3. Réz detoxifikáció

A Cu, mint esszenciális fém, nélkülözhetetlen számos enzim szerkezetének és katalitikus tulajdonságainak kialakításához. Ez utóbbi feladatot különleges elektronszerkezete miatt, főként redox reakciók enzimeinek kofaktoraként látják el. Emiatt megfelelő mennyiségű Cu jelenléte a szervezetben nélkülözhetetlen többek között a sejtlégzésben és a szabadgyökök elleni védekezésben.

A Cu nagy mennyiségben kerülve a szervezetbe, hasonlóan az élettani funkcióval nem rendelkező fémekhez, toxikussá válhat. Felszívódása a gyomron és a vékonybélben keresztül történik, majd Cu-albumin vagy Cu-hisztidin komplex formában eljut a májba, ahonnan egy része kiválasztódik az epébe (Abelson és Simon, 1991; Harris és Gitlin, 1996). A májsejtekbe kerülve egy részük MT molekulákhoz illetve MRF-okhoz kötődik, indukálva ezáltal az MT génexpressziót.

Cu hatására az MT gének expressziójának szabályozása transzkripció szinten valósul meg, melynek során az MT mRNS dóziszfüggő növekedést mutat (Abelson és Simon, 1991). Más fémekhez viszonyítva (pl. Zn) a Cu gyengébben indukálja a máj MT

szintézisét, ezért a Cu-MT kötés kialakulását befolyásolhatják más induktorok (fémek, hormonok, stb.) hatására elsődlegesen szintetizált MT-ek.

Mindezek alapján mondhatjuk, hogy az MT-ek egyfajta raktárként szolgálnak a Cu ionok számára, de lényeges szerepük van a Cu detoxifikációjában, megvédve ezzel a sejtmembránt, a nukleinsavakat és enzimeket a Cu által indukált oxidatív támadástól.

2.2.5. MT-ek jellemzése halakban

Vízi élőlényekben az MT fehérjét először egy tengeri halból (*Sebastes seboides*) azonosította Olafson és Thompson, 1974-ben. Azóta már több mint 12 halfajból nyert MT elsődleges szerkezetét ismerjük. Ezeknek a fehérjéknek aminosav szekvenciája igen hasonló egymáshoz és nagyfokú hasonlóságot mutat a ló vese MT-hez, így az MT-ek I. osztályába sorolhatók (Roesijadi, 1992).

Halakban az MT-ek főképp a máj, a vese, a kopolyú és a bélrendszerben fordulnak elő, azaz azon szervekben, melyek szerepet játszanak a fémek felvételében, detoxifikálásában és kiválasztásában. A vesébe jutott fémionok az MT-ekhez kötődve felhalmozódnak, majd a vizeletbe szekretálódnak (Bremner, 1987; Webb, 1987), míg a májból az MT-fémion komplexek az epébe választódnak ki.

Halakban, néhány faj kivételével (*Trematomus brenacchii*, *Salmo gairdneri*, *Chinodraco hamatus*, *Carassius cuvieri*, Kille és mtsi, 1991; Scudiero és mtsi, 1997; Carginale és mtsi, 1998; Muto és mtsi, 1999; Ren és mtsi, 2000) csupán egy fajta MT fehérjét azonosítottak eddig.

Pontyban, Kito és munkatársai két, aminosav összetételében rendkívül hasonló, de mégis karakterisztikus különbséget mutató MT fehérjét, az MT-I-et és az MT-II-et azonosították 1986-ban (Kito és mtsi, 1986). Az MT-I gén genomiális és cDNS szekvenciáját 1997-ben Shiu és mtsi. helyezték el a GenBank-ban. Hermes és mtsi. 2001-ben publikálták a ponty MT-II izoformát kodoló cDNS szekvenciát, valamint *in*

vivo kísérletekben vizsgálták a két gén expresszióját fiziológiás körülmények között és különböző stresszorok hatására. A két gén alapexpressziója jellegzetes szövet-specifitást mutat, indukálhatóságukat stressz-, szövet-, és gén-specifitás jellemzi (Hermesz és mtsi, 2001; 2002).

2.3. A *hsp70*, *hsc70* és a metallothionein gének expressziója szívben

A hősokk fehérjék és a metallothioneinek alapvető biokémiai folyamatokban, és legfőképpen a sejtek stresszhatásokkal szembeni védelmében betöltött szerepét megismerve, a kutatások újabb irányt vettek és az érdeklődés középpontjába a két géncsalád expresszióját szabályozó, az organizmuson belüli folyamatok, illetve az élőlényeket kívülről érkező környezeti hatások vizsgálata került előtérbe. A szövet-specifikus hatások kimutatása, illetve klinikai megfigyelések alapján az utóbbi években számos kutatócsoport figyelme fordult a szívben lejátszódó regulációs mechanizmusok irányába. A következőkben röviden összefoglaljuk azokat a legfontosabb tudományos eredményeket, amelyek a *hsp70* és a metallothionein géncsalád kardioprotektív szerepét és annak mechanizmusát mutatják be.

A gerincesek szívében a 70 kDa fehérjét kódoló géncsalád mindenkét, a konstitutív (*hsc73*) és az indukálható (*hsp72*) formáit is kimutatták (Maloyan és mtsi, 1999). Más szövetekhez hasonlóan számos endogén és exogén eredetű stresszhatás okoz fokozott *hsp70* génexpressziót, például a hipertermia (Currie és mtsi, 1988), *ischemia* (Knowlton és mtsi, 1991) hipoxia (Howard és mtsi, 1986) endotoxémia (Meng és 1996a) a hemodinamikus stressz (Meng és mtsi, 1996b), továbbá a nehézfémek (Ribeiro és mtsi, 1994) és az oxidációs hatások (Kukreja és mtsi, 1994). A stressz gének közül a *hsp70* gén az egyik, amely legérzékenyebben reagál a hőmérséklet változásaira. Hőstressz hatására a *hsp70* minden gerinces fajban viszonylag gyorsan, szövet

specifikus módon indukálódik. A hősokk hatására béka szívben nagyobb fokú *hsp70* génexpressziót mértek, mint az izomban vagy a májban (Ali és mtsi, 1997). Currie és mtsi. (2000) a pisztráng szívben kimutatták, hogy az indukció mértéke erősen függ a hőstresszt megelőző akklimatizáció hőmérsékletétől: a 17 °C-on akklimatizált halakban kisebb fokú indukció mérhető hőstressz hatására, mint az alacsony, 5 °C-on tartott állatokban, vagyis a hőmérséklet drasztikus (20 °C-os) emelésekor számottevően nő *hsp70* mRNS szintézise. Enyhe hőstressz indukálja a *hsp70* gént és fokozza a szívizom sejtek stressz toleranciáját myocardialis *ischemia*, infarktus, műtéti beavatkozások nyomán fellépő hipoxia esetén (Yellon és Latchman, 1992; Lepore és mtsi, 2001; Mestril, 2001).

A Hsp70 fehérjét kódoló gének nemcsak hősokk, hanem hidegsokk hatására is indukálódnak. Hoekstra és mtsi (1998) madarak szívében kimutatták a Hsp70 fehérjék szintézisének növekedését hidegsokkot követően. A hidegstressz hatására bekövetkező *hsp72* gén expressziójának szabályzását egér szívében vizsgálva Cullen és Sarge (1997) bizonyították, hogy eltérő szabályozási mechanizmus működik, mint hősokk esetén. A hidegsokk enyhe *hsp72* expressziót vált ki, míg a hideg kezelést követő, *recovery* periodus alatt nő jelentősen a gén expresszió (hasonlóan a hősokk hatáshoz). A jelenség oka az, hogy a *hsp72* mRNS maximális szintéziséhez a HSF1 DNS promóterhez való kötődése és az aktivált trimer transzkripciós faktor hiper-foszforilálódása szükséges, amely hidegsokk esetén nem, viszont az azt követő *recovery* szakaszban történik meg.

A metallothioneinek a sejtek alapműködése szempontjából nélkülözhetetlenek, ezért jelen vannak a gerincesek minden szövetében, így a szívben is. Egér szívében az MT fehérje mennyisége a többi szervhez képest alacsony, ennek következtében ez a szerv a stresszorokkal szemben érzékenyebb. (Nath és mtsi, 2000). A ponty szívében két MT izoformát azonosítottuk, az MT-1-et és MT-2-et. A két izoforma közül az MT-2

mRNS szintje háromszor nagyobb, mint az MT-1, és mennyisége összemérhető nagyságú más szövetek MT-1 szintjével (Hermesz és mtsi, 2001). Hasonlóan más szövetekhez, a nehézfémek, az oxidatív stressz és különböző biológiai és kémiai ágensek, mint például egyes gyógyszerek, a citokinek, stb. indukálják az MT gének expresszióját a szívben (Nath és mtsi, 2000).

A metallothionein magas cisztein tartalmuk miatt kettős funkciót látnak el, egyrészt a nehézfémek megkötését, másrészt hozzájárulnak a sejtek redox státuszának fenntartásához. Mint antioxidáns hatású peptidek (pl. glutation), a metallothioneinek is fontos szerepet töltenek be a szívizom szövet védelmében (Singal és mtsi, 1981). Fliss és Menard (1992) a nyúl szívizom sejtek redox státuszának vizsgálatakor azt találták, hogy annak változása szabályozza a metallothioneinek fémkötő képességét, így az esszenciális Cu és Zn kötését is.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok és kezelési körülmények

A kísérletekhez a halakat (*Cyprinus carpio*) a Tiszai Halgazdaság Fehértói telepéről szereztük be 1998 februárja és 2001 decembere között. A kezelések előtt 400 l-es jól levegőztetett kádakban, 12-13 °C, illetve 15-16 °C akklimatizáltuk őket, 2-3 hét időtartamban. A kádak vizét hetente kétszer cseréltük. A kezelésekhez a halakat 100 l-es akváriumokba helyeztük át (mérettől függően 2-3 hal/akvárium). A hőkezelést 26 °C-on és 28 °C-on végeztük. A mintavétel a 0.5, 1 és 3 órás hőkezelést követően illetve az azt követő 1 óra *recovery periodus* után történt.

A hidegsokkhoz a halakat 5 °C-os vízhőmérsékletű akváriumba helyeztük át 1, 2, és 5 óra időtartamra. A mintavétel közvetlenül a hidegsokk után, illetve az azt követő 1 órás, az akklimatizációs hőmérsékleten való inkubáció elteltével történt. A fémkezelésekhez a halakat 100 l-es, 10 mg/l As-et (Na_2HAsO_4 , Fluka), 10 mg/l Cd-ot (Kadmium acetát, Fluka), illetve 10 mg/l Cu-t (CuSO_4 , Reanal) tartalmazó akváriumokba helyeztük át, a mintavétel 0, 24, 48, 72, és 96 óra elteltével történt. Az intraperitoneális kezelés során a Cd-ot 10 mg/testsúly kg dózisban alkalmaztunk a mintavétel 0, 24 és 48 óra elteltével történt. Minden mintavételi pontban három illetve négy egyedet használtunk fel a mérésekhez. Az izolált szövetmintákat azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük és -80 °C-on tároltuk a felhasználásig.

3.2. Genomiális DNS preparálás

A DNS preparáláshoz máj szövetmintát használtunk fel és a Zhou és mtsi. (1999) által közölt protokollt követtük. Röviden összefoglalva 100 µg szövetet 1 ml pufferben (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl, 100 µg proteinase K) inkubáltunk 55 °C-on egy éjszakán át. Az emésztés befejezése után 150 µl NaCl-t (6 M) adtunk a mintákhoz és erőtejes szuszpendálást követően centrifugáltuk (15 perc, 3000 rpm), a felülúszóból 0.75 térfogatnyi izopropanollal precipitáltuk a DNS-t. A csapadékot 75%-os etilalkohollal mostuk (egy éjszaka, -20 °C) és centrifugáltuk. Az etilalkohol eltávolítása után a csapadékot disztillált vízben oldottuk fel és -80 °C-on tároltuk.

3.3. RNS preparálás

100 mg fagyasztott máj, szív, izom, vese és agy mintákat TRI reagens oldatban (Sigma) homogenizáltuk (2 perc, 1500 fordulat). A homogenizátumokat eppendorff csövekbe gyűjtöttük, majd kétszer, kloroformos (150 µl) extrahálást végeztünk, és centrifugáltuk (15 perc, 15000 rpm, 4 °C) a mintákat. A felső vizes fázishoz 0.75 térfogatnyi izo-propanolt adtunk. A pelyhes csapadékot centrifugáltuk (5 perc, 15000 rpm, 4 °C). A felülúszó eltávolítása után a csapadékot 1 ml 75%-os etilalkohollal mostuk (egy éjszaka, -20 °C). Az etilalkohol eltávolítása után a csapadékot 50 µl DEPC-al kezelt (dietil pirokarbonát, Sigma) vízben oldottuk fel.

Ahhoz hogy az enzimatis reakciókhoz megfelelő tisztaságú mintát kapjunk, az RNS-t újból percipitáltuk. Ez 1/10 térfogatnyi nátrium-acetát és 2.5 térfogatnyi 96%-os etilalkohol jelenlétében történt. A csapadékot egy éjszakán át 75%-os etilalkohollal

mostuk, majd felszuszpendáltuk 50 µl DEPC-al kezelt desztillált vízben. A tisztított RNS mintákat 100 U RNáz mentes DNáz I-el (Boehringer-Mannheim) kezeltük rutinszerűen (2 óra, 37 °C).

Az RNS koncentrációjának meghatározására az $1_{A_{260}} = 40 \text{ µg/ml RNS}$ összefüggést alkalmaztuk. Amennyiben az A_{260}/A_{280} arány nagyobb volt 1.8-nél akkor a minta tisztaságát megfelelőnek tekintettük.

3.4. Reverz transzkripció (RT)

A cDNS szintézist 5 µg totál RNS-ből kiindulva 20 µl végtérfogatban végeztük. A templát RNS-t és az 500 pmol random hexamer primert (Promega) víz jelenlétében 10 percig 90 °C-on denaturáltuk, majd 200 U M-MuLV reverz transzkriptáz (Sigma), 20 pmol dNTP keverék (MBI Fermentas) és RT reakció puffer (Sigma) jelenlétében 10 percig 37 °C-on, majd 45 percig 42 °C-on inkubáltuk. A reakciót 5 perces 65 °C-on történő inkubálással állítottuk le, majd -20 °C-on tároltuk.

3.5. Northern blot analízis

20 µg totál RNS-t 2.2 M formaldehid/1.2%-os denaturáló agaróz gélen választottunk el. Az elektroforetikus szeparálás előtt az RNS mintákat mintafelvívő pufferben (1xMOPS, 6% formaldehid, 50% formamid) 55 °C-on 15 percig denaturáltuk. Az elválasztást követően a gélt 10xSSC oldattal (20xSSC: 3 M NaCl, 0.3 M trinátrium citrát, pH 7) kapilláris transzferrel vittük át nylon membránra (Amersham), egy éjszakán keresztül. A transzfert követően a filtert 2xSSC-vel öblítettük, majd az RNS-t UV besugárzással rögzítettük a membránhoz (GS-Gene crosslinker, Bio-Rad).

Hibridizáláshoz a DNS próbákat (izolált cDNS fragmentek) α -³²P-dCTP-vel radioaktívan jelöltük, *random priming* technikával, High Prime DNA Labeling kit-et (Boehringer-Mannheim) használva.

A hibridizáció 14-16 óra hosszan történt 42 °C-on, 50% formamid, 5xDenhardt's reagens, 5xSSC oldatban. A nem specifikusan kötődött próbákat 68 °C-on 0.1xSSC-t és 0.1% SDS-t tartalmazó oldatban történő mosással távolítottuk el.

3.6. Primerek

A ponty *hsp70*, *hsc70-1* és *hsc70-2* amplifikálásához használt primereket a zebradánió (GI:17061841; GI:1865782), pisztráng (GI:17129570; GI:246719), *Xiphophorus maculatus* (GI:17061837; GI:17061839), béka (GI:64796; GI:1326171), csirke (GI:211941; GI:2996407), egér (GI:193983; GI:309319) és ember (GI:386785; GI:13273304) *hsp70* és *hsc70* konzervált szekvenciák összehasonlítása alapján terveztünk.

hsp70/hsc70 általános primerek:

1F : 5' GCTGTTGGCATTGACCTGGG 3',

2R : 5' TCTGGGTAAATGCTCTTGTT 3',

4R : 5' GGTGATGGTGATCTTGTTCT3',

6R : 5' GTCAACCTCCTCAATGGTTG 3'.

Ponty *hsc70-1* specifikus primerek (AY120893, AY219845):

3-1F : 5'CTGGCCTTGACGTCCTCCGC 3',

5-1F : 5' TCAGGACTTATTTAACGGCC3',

7F : 5' ATCGACCTGGGCACCACTA3',

8R : 5' CTTCCATCTTGGGCTTACT3',

G-1R: 5' TTGGCTCGTTGGTAATGCGG 3',

G-2F : 5' TATATGAGGGAGAGAGAG 3'.

Ponty *hsc70*-2 specifikus primerek (AY219844):

3-2F : 5' CTGGCTTGAATGTTCTGG 3',

5-2F : 5' CCAAGACTACTTCAACGGCAA 3',

9F : 5' AAGAATGGTCTGGAATCCTAT 3',

10R : 5' GCCTCCAGCACTCTGGTACAG 3'.

Ponty *hsp70*-specifikus primerek (AY120894):

hsp70-3F: 5' TTGACAAAGGCAAAGCTTCA 3',

hsp70-5F : 5' CGCTTTGAAGAGATGTGCTC 3',

hsp70-7F : 5' CTAAAGACGCTGGAGTAATC 3',

hsp70-8R : 5' TGCTTCCTCTTGAATCCTCC 3'.

A ponty MT cDNS amplifikálásához használt primerek (AF249875):

CMT5: 5' ATGGATCCTTGCGATTGCGAAC 3',

CMT6: 5' CGAACAGGTTACATAGGTGA 3',

CMT7: 5' ACAAGTTCACCTTGCTGTAG 3'.

A PCR reakciókban a *hsc70*, *hsp70* és MT mRNS szintet a ponty β -aktin mRNS mennyiségére normalizáltuk. A β -aktin primereket az M24113 szekvencia alapján terveztük.

β -aktin-3: 5' GCAAGAGAGGTATCCTGACC 3',

β -aktin-4: 5' CCCTCGTAGATGGGCACAGT 3'.

3.7. PCR amplifikáció

A PCR amplifikálásokhoz templatként a RT reakció termékekből 1 μ l-t, a genomiális DNS-ből 10 ng-ot használtunk fel reakciónként. A reakcióelegy a következő

komponenseket tartalmazta: 250 μ M koncentrációban a négyféle dNTP (MBI Fermentas), 50 pmol a megfelelő primerekből, 1xPCR puffer/MgCl₂ (Zenon) és 5 U Taq polimeráz (Zenon). A PCR amplifikálásokat egy PTC 150-16 MiniCycler-ben (MJ Research) a következő két alap program felhasználásával végeztük el.

I.alap program

Első lépés: 1 perc 95 °C-on, 2. lépés: (denaturálás) 30 másodperc 95 °C-on, 3. lépés: (*annealing*) 30 másodperc 45-50 °C-on, 4. lépés: (szintézis) 30-240 másodperc 72 °C-on, 5. lépés: a 2., 3., és 4. lépés ismétlése 4 alkalommal, 6. lépés: 30 másodperc 95 °C-on, 7. lépés: 30 másodperc 55-60 °C-on, 8. lépés: 30-240 másodperc 72 °C, 9. lépés: a 6., 7., és 8. lépés ismétlése 24-29 alkalommal, 10. lépés: 5 perc 72 °C-on.

II. alap program

Első lépés: 1 perc 95 °C-on, 2. lépés: 30 másodperc 95 °C-on, 3. lépés: 30 másodperc 55-60 °C-on, 4. lépés: 30-240 másodperc 72 °C-on, 5. lépés: a 2., 3., és 4. lépés ismétlése 24-34 alkalommal, 6. lépés: 5 perc 72 °C-on.

3.8. Gélelektroforézis, fragment izolálás

A PCR termékeket a fragment méretétől függően 0.7-2%-os agaróz gélen, 0.1 μ g/ml ethidium bromid jelenlétében, TAE puffert használva (40 mM Tris-acetát, 10 mM EDTA pH 7.5) frakcionáltuk. Klónozáshoz, szekvenáláshoz a DNS fragmenteket egy 0.45 μ m pórusméretű gélszűrővel izoláltuk (Ultrafree-MC Centrifugal Filter Unit, Millipore). Az izolált PCR termékeket pGEM-T Easy vektorba (Promega) inzertáltuk és *E. coli* DH5 α sejtekbe transzformáltuk. A rekombináns klónokban található inzerteket szekvenáltuk.

3.9. Gél dokumentáció, denzitometrálas

A kísérletek minden idő pontjában három vagy négy halat használtunk fel az RNS preparálásához. RT-PCR reakciót mindegyik mintán háromszor ismételve végeztük el, hogy megnöveljük a kiértékelés megbízhatóságát. A *hsc70*, *hsp70* és MT mRNS mennyiségét egy belső kontrollhoz, a β -aktin mRNS szintjéhez viszonyítva állapítottuk meg. Az autoradiogramokat és az ethidium bromiddal festett agaróz géleket a GDS 7500 gél dokumentációs rendszeren analizáltuk a GelBase/GelBlot™ Pro *Gel analysis* szoftvert felhasználásával.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Ponty *hsp70* és *hsc70* gének izolálása

4.1.1. Evolúciósan konzervált DNS szekvenciák azonosítása, PCR primerek

tervezése, amplifikálási stratégiák

Célunk az volt, hogy pontyból minél több 70 kDa-os stresszfehérjét kódoló gént azonosítsunk, ezért a GenBank/EMBL adatbázisban található, evolúciósan távol eső fajokból, így emberből, egérből, csirkéből, békából, és három halfajból (zebradánió, pisztráng, *Xiphophorus maculatus*) közölt Hsc70 és Hsp70 szekvenciákat hasonlítottunk össze. A fajok kiválasztásánál csak azok jöhettek számításba, ahol egy adott fajon belül úgy a konstitutívan expresszáldó mint az indukálható izoformák teljes hosszúságú szekvenciái ismertek voltak. A stressz-fehérjék evolúciós konzerváltsága miatt találtunk olyan szekvencia tartományokat, ahol a hasonlóság foka rendkívül magas volt. Az egymáshoz nagy homológiát mutató régiók közül négyhez oligonukleotidokat terveztünk (1F, 2R, 4R és 6R) (6. ábra) és ezeket, mint *általános* primereket használtuk fel a *hsp70* és *hsc70* szekvenciák amplifikálásához pontyból.

	P1 →	p2 ←	p4 ←	p6 ←	
Egér Hsc70	MS--KGP AVGIDLGTT -/-ELNKSINPDEAV-/-TG KENKITIT NDK-/-SSG PTIEEVD				
Ember Hsc70	MS--KGP AVGIDLGTT -/-ELNKSINPDEAV-/-TG KENKITIT NDK-/-SSG PTIEEVD				
CsirkeHsc70	MS--KGP AVGIDLGTT -/-ELNKSINPDEAV-/-TG KENKITIT NDK-/-SSG PTIEEVD				
Béke Hsc70	MS--KGP AVGIDLGTT -/-ELNKSINPDEAV-/-TG KENKITIT NDK-/-SSG PTIEEVD				
Trout Hsc70	MS--KGP AVGIDLGTT -/-ELNKSINPDEAV-/-TG KENKITIT NDK-/-SSG PTIEEVD				
Zebra Hsc70	MS--KGP AVGIDLGTT -/-ELNKSINPDEAV-/-TG KENKITIT NDK-/-SSG PTIEEVD				
<i>Xipho</i> .Hsc70	MS--KGP AVGIDLGTT -/-ELNKSINPDEAV-/-TG KENKITIT NDK-/-ASG PTIEEVD				
CsirkeHsp70	MSG-KGP AIGIDLGTT -/-ELNKSINPDEAV-/-TG KENKITIT NDK-/-SSG PTIEEVD				
Egér Hsp70	MA--KNT AIGIDLGTT -/-DLNKSINPDEAV-/-TG KANKITIT NDK-/-GSG PTIEEVD				
Ember Hsp70	MA--KAA AVGIDLGTT -/-DLNKSINPDEAV-/-TG KANKITIT NDK-/-GSG PTIEEVD				
Béka Hsp70	MAT-KGV AVGIDLGTT -/-ELNKSINPDEAV-/-SG KQNKITIT NDK-/-NSG PTIEEVD				
Zebra Hsp70	MSSPKG AIGIDLGTT -/-ELNKSINPDEAV-/-TG KQNKITIT NDK-/-AQG PTIEEVD				
Trout Hsp70	MSSAKGP SIGIDLGTT -/-ELNKSINPDEAV-/-TG KENKITIT NDK-/-SQG PTIEEID				
<i>Xipho</i> .Hsp70	MCAAKNV AIGIDLGTT -/-ELNKSINPDEAV-/-TG KENKITIT ANDK-/-SQG PTVEEVD				
	1-----	-/366-----	-/504-----	-/636-----	646

6. ábra: Néhány gerinces állat Hsc70 és Hsp70 szekvenciájának összehasonlításán alapuló konzervált régiók. A ponty *hsc70* és *hsp70* gének amplifikálásához használt közös primereket vastag betűkkel tüntettük fel. Az aminosav pozíciók megadásához az egér szekvenciát vettük alapul.

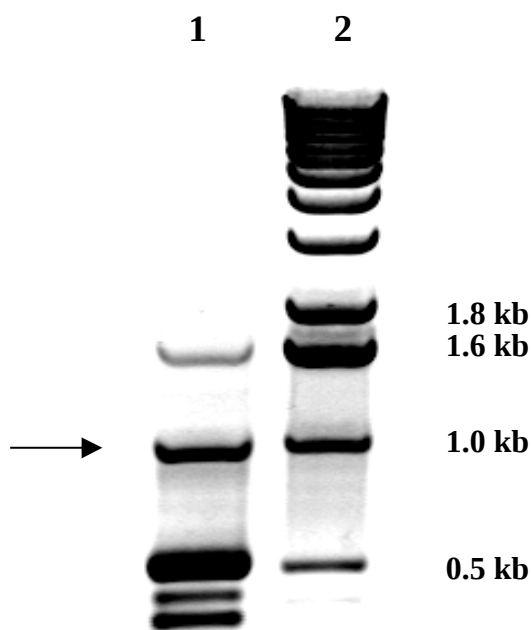
A primerek tervezéséhez felhasznált konzervált régiók kiválasztásánál arra is törekedtünk, hogy a primerek által határolt szekvenciák minél nagyobb eltérést mutassanak az izoformák között. Zebradánió esetén például az 1F/2R primer pár által határolt 360 aminosavból álló szakaszon 41 pozícióban találunk különbséget a Hsc70 és a Hsp70 fehérjék között.

A kétféle izoformát kódoló gén minél hatékonyabb elkülönítésére két, az irodalomból ismert adatot felhasználva dolgoztuk ki a stratégiánkat: **a**, az ismert eukarióta *hsp70* struktúrgének, szemben a *hsc70* génekkel, nem tartalmaznak intronokat; **b**, a *hsp70* mRNS-ek stresszmentes állapotban nem, vagy csak kis mennyiségben mutathatók ki. A *hsp70* gén(ek) amplifikálásához templátként genomiális DNS-t használtunk a PCR reakcióban, a *hsc70* gén(eke)t, pedig különböző szövetekből nyert RNS templátokról amplifikáltuk RT-PCR reakciókban. Az első amplifikálást párhuzamosan végeztük mind a kétféle templáton, az 1F/2R általános primer pár felhasználásával. Számításainknak megfelelően a különböző forrásból származó templát DNS-ekről mind a két géncsaládot reprezentáló génszakaszokat sikerült azonosítani. Ezekre a szekvenciákra alapozva már lehetőségünk volt génspecifikus primerek tervezésére és ezeket párban használva egy-egy általános primerrel a teljes kódoló szekvenciákat azonosítanunk a különböző gének esetén.

4.1.2. Ponty *hsp70* gén amplifikálása genomiális DNS templátról

Ahogy már említettük, genomiális DNS templátot választottunk a *hsp70* gének izolálásához, annak reményében, hogy így elkerülhetjük az mRNS templát használata esetén várható közel azonos méretű, kevert *hsp70/hsc70*-specifikus termék amplifikálását. Az 1F/2R primer pár a *hsp70* gének esetében egy 1 kb nagyságú génszakaszt határol, míg az ismert *hsc70* gének esetében erre a szakaszra 3 intron

jelenléte jellemző. A kísérlet eredménye (7. ábra) az elvárásainknak megfelelően alakult.



7. ábra: *hsp70* génszakasz amplifikálása genomiális DNS-ről az **1F** és **2R** primer használatával (**1**). A nyíl az izolált 1 kb fragmentet jelzi. 1 kb molekulásúly marker (Gibco) (**2**).

Az amplifikált termékek között volt egy, melynek mérete az intron nélküli cDNS-nek felelt meg. A várt méretű PCR terméket izoláltuk az agaróz gélből, és egy PCR klónozó vektorba inzertáltuk, majd meghatároztuk 3 független rekombináns plazmidban található inzert nukleotid sorrendjét. A szekvenálási reakciókban a klónozó vektor primereit, illetve egy, az új rész-szekvencia ismeretében tervezett primert használtunk. A szekvenciák elemzése alapján egyértelmű volt, hogy egyetlen génről történt az amplifikálás (ezt sugallta a teszt szekvenálásunk is, ahol közvetlenül a PCR populációt szekvenáltuk az egyik amplifikáló primerrel és „tisztá”, jól olvasható szekvenciát kaptunk). Az amplifikált fragment hossza 1084 bp és legnagyobb homológiát az adatbankban talált 70 kDa fehérjét kódoló génekkel mutatta: a zebradánio *hsp70*

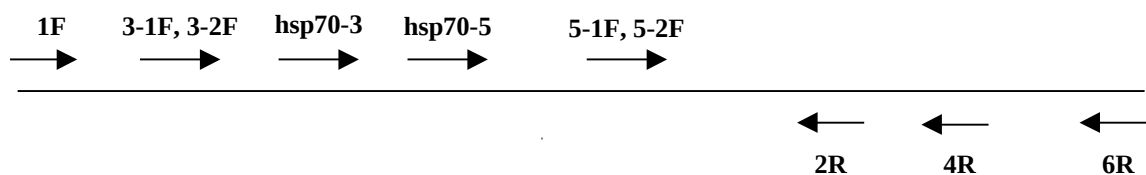
génjével 89% a *hsc70* génjével pedig 76%-ban mutatott azonosságot. A szekvencia teljes hosszúságában végighúzódik egy *open reading frame*. A kikövetkeztetett aminosav szekvencia 90 illetve 86%-os homológiát mutat a zebradánió *hsp70* és *hsc70* génjei által kódolt fehérjékkel.

Most, hogy már ismertük a ponty *hsp70* és *hsc70* gének szekvenciájának tekintélyes részét (*hsc70* fragmentekre vonatkozó információkat lásd a következő fejezetben), célul tűztük ki a teljes kódoló szekvencia azonosítását. Ennek érdekében két további ponty *hsp70* specifikus primert terveztünk (*hsp70-3F* és *hsp70-5F*) (10. ábra). A primerek pozíciójának kiválasztásánál, amellet, hogy minél specifikusabb legyen az amplifikálás, arra is törekedtünk, hogy lehetőleg nagy legyen az átfedés az amplifikált szakaszok között, így erősítve meg, hogy azonos génről történt a termékek amplifikálása. A *hsp70-3F* primert a 4R a *hsp70-5F* primert pedig a 6R általános primerekkel használtuk párban. A két átfedő szakasz mérete 958 és 1019 bp. A PCR-termékek izolálása, klónozása és szekvenálása a fent említéssel azonos módon történt. 3-3 független rekombinánsból származó inzert szekvenciáját határoztuk meg azon a néhány ponton, ahol eltérés mutatkozott a három szekvenciában (feltehetőleg a Taq I polimeráz által generált mutációk) és a két azonos nukleotidot fogadtuk el „valósnak”. Az átfedő régiókban (a *hsp70-3/4R* fragment esetén 544 bp, a *hsp70-5/6R* fragment esetén pedig 611 bp) a szekvenciák 100%-ban azonosak voltak, így nagy valószínűséggel állíthatjuk, hogy azonos génről történt a három termék amplifikálása. A három átfedő szakaszból egy 1905 bp hosszú, teljes hosszán egyetlen *open reading frame*-t tartalmazó, 635 aminosavat kódoló szekvencia rakható össze (8. és 9. ábra), amely a legnagyobb hasonlóságot (88%) a zebradánió *hsp70* nukleotid szekvenciájához mutatja. A két fehérje közt a hasonlóság 90%, míg a zebradánió Hsc70 izoformájával, mindössze 83% a homológia.

4.1.3. Ponty *hsc70* gének amplifikálása cDNS templátról

A *hsc70* géneket RT-PCR reakciókban amplifikáltuk. A cDNS szintézishez izomból preparált RNS mintákat és random hexamer primert használtunk. Az 5' vég amplifikálását az általános 1F/2R oligonukleotid párral végeztük el. A különböző méretű ampliconok között találtunk, olyat melynek hossza a várt mérettartományba esett (~1 kb). Ezt a PCR terméket klónoztuk, majd meghatároztuk kilenc független rekombináns plazmidban található inzert nukleotid sorrendjét. A szekvenciákat egyértelműen két csoportba lehetett osztani, az egyik csoport 7 a másik 2 klón által volt reprezentálva. A két cDNS fragment közt 79%-os volt a hasonlóság. A zebradánio *hsp70* és *hsc70* génjeivel történt összehasonlítás során az egyik csoport 76 és 79%-os, a másik csoport 76 és 92%-os homológiát mutatott. Az első cDNS-t *hsc70-1*, a másodikat pedig *hsc70-2* néven említjük a továbbiakban.

A két *hsc70*, valamint a ponty *hsp70* szekvenciák összehasonlítása alapján *hsc70-1* és *hsc70-2* specifikus oligonukleotidokat terveztünk a teljes hosszúságú cDNS-ek hiányzó szakaszainak amplifikálásához. Hasonlóan a *hsp70* gén izolálásánál leírtakhoz, 2-2 génspecifikus primert terveztünk (3-1F és 5-1F, illetve 3-2F és 5-2F) (10. ábra) melyek elvárásaink szerint, párban a 4R és 6R általános primerekkel lehetővé teszik a teljes kódoló szekvenciák amplifikálását.



10. ábra: A három gén amplifikálásához használt általános és specifikus primerek pozíciójának sematikus ábrája.

A 3-1F/4R primer pár egy 1019 bp-os terméket amplifikált, ez a szakasz 604 bp-on átfed a gén 5' régiójával. Az 5-1F/6R primer pár által amplifikált termék hossza 891 bp, és 462 bp-on fed át a kódoló régió középső szakaszával. A nagy átfedő fragmentek és a független rekombináns plazmidok inzertjeinek a nukleotid sorrendjéből kétséget kizáróan megállapítható, hogy a *hsc70-1* cDNS-ről történt mind a három fragment amplifikálása. A három átfedő szakaszból egy 1926 bp hosszú, a teljes hosszán egyetlen *open reading frame*-t tartalmazó, 642 aminosavat kódoló szekvencia rakható össze (9. és 11. ábra).

A *hsc70-2* specifikus 3-2F/4R és 5-2F/6R primer párokkal történő amplifikálás egy 1019 bp-os és egy 896 bp-os terméket eredményezett, melyek 604 illetve 461 bp-on fednek át a cDNS 5'végi, illetve a középső régiót reprezentáló fragmentekkel. A teljes kódoló szekvencia hossza 1932 bp (9. ábra), mely egy 644 aminosavból álló fehérjét kódol (11. ábra).

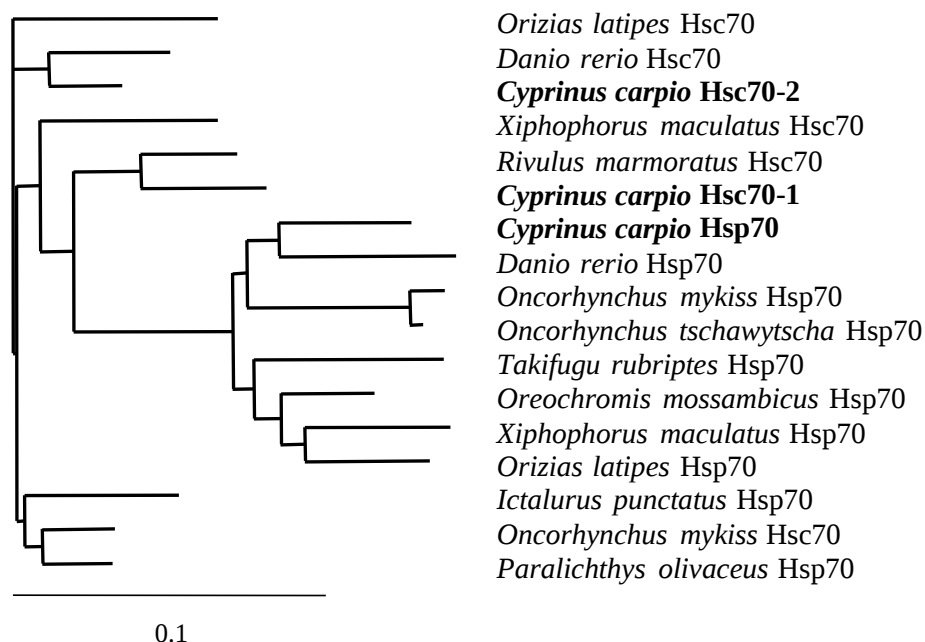
4.1.4. A *hsp70* és *hsc70* szekvenciák analízise

A szekvenciák analízisének az eredményekén a három általunk azonosított gént egyértelműen a 70 kDa fehérjét kódoló gének családjába sorolhatjuk be. A ponty *hsp70* génje a legnagyobb homológiát (88%) a zebradánió *hsp70* génjéhez mutatja. A két fehérje közt a hasonlóság 90%, míg a zebradánió Hsc70 izoformájával mindössze 83% az azonosság (8. ábra).

A két *hsc70* cDNS egymás közti hasonlósága 78% -os az általuk kódolt fehérjék pedig 88%-os homológiát mutatnak. A ponty Hsp70 izoformával 82 illetve 83%-os a hasonlóság. A *hsc70-1* gén az adatbázisban elhelyezett szekvenciák közül leginkább a fogaspontyok családjába tartozó *Rivulus marmoratus*-ból azonosított *hsc70* génhez

mutat hasonlóságot (81% nukleinsav szinten és 93% aminosav szinten). A *hsc70-2* gén szintén egy a pontyfélékhez tartozó hal, a zebradánió *hsc70* génjéhez mutatja a legnagyobb rokonságot, 91% és 96%-os a hasonlóság DNS illetve fehérje szinten (11. ábra).

Az újonnan azonosított három génnek a szekvencia hasonlóságok illetve a *hsp70* génekre jellemző intron nélküli struktúrgén szerkezet alapján történt besorolását tovább erősítette a filogenetikai analízis. A *PHYLP* package program inputjaként (Felsenstein, 1996; Page, 1996) első lépésben a primer tervezéshez kiválasztott ember, egér, csirke, béka, és hal Hsp70 és Hsc70 fehérje szekvenciákat használtuk fel. A Hsp70 és Hsc70 izoformák két, jól elkülöníthető csoportot alkottak, melyekbe a ponty szekvenciák elhelyezkedése megerősítette a korábbi besorolásukat. Hasonló filogenetikai analízist végeztünk a GenBank-ban hozzáférhető hal Hsp70 és Hsc70 szekvenciák felhasználásával (12. ábra).



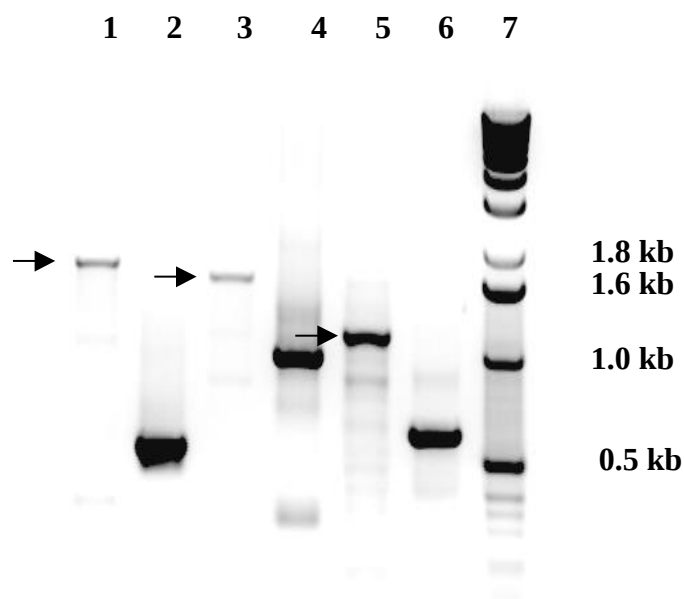
12. ábra: A ponty Hsp70 és Hsc70 fehérjék filogenetikai analízise a különböző halfajok Hsp70 és Hsc70 fehérjeivel szemben.

Az analízisből kihagytuk azokat a fajokat, ahol csak az egyik izoformára rendelkezünk adatokkal, illetve csak részleges szekvencia információ volt elérhető. A ponty Hsc70 szekvenciák egyértelműen a meglehetősen divergens Hsc70 családba sorolódtak be, míg a Hsp70 fehérje a jól elkülönülő, kompaktabb Hsp70 csoportba került.

4.1.5. A *hsc70* génnek amplifikálása genomiális DNS-ről

Az irodalomból ismert, hogy az eddig azonosított eukarióta *hsc70* struktúrgének intronokat tartalmaznak. Kísérleteink kezdetén egyetlen halfajból, a pisztrángból volt ismert genomiális *hsc70* szekvencia. Ezt összehasonlítva a magasabb rendű gerincesekben leírt struktúrgénekkel az exon-intron határok pozíciója konzervált volt. Erre az információra alapozva két új *hsc70-1* génspecifikus primert terveztünk (G1R és G2F) (11. ábra). Ezek a primerek párban a már meglévő génspecifikus és általános oligonukleotidokkal három átfedő fragment amplifikálásával a teljes kódoló szekvenciát hordozó genomiális DNS szakaszt lefedik. Az intronok méretét ugyan előre nem ismertük, de azt tudtuk, hogy 2 illetve 3 intront tartalmazó szakaszt határolnak a megtervezett primer párok, ezért a PCR paraméterek meghatározásánál a szintézis fázis időtartamát jelentősen megnöveltük, a *hsp70* génről történt amplifikáláshoz képest. Genomiális DNS templátról az 1F/G1R primer pár egy 1682 bp, a 3-1/4R egy 1668 bp és a G2F/6R egy 1128 bp-os terméket amplifikált. Mindegyik primer párral cDNS-ről is elvégeztük az amplifikálást, mintegy belső kontrollként, a primerek működésének tesztelésére (13. ábra). A genomiális fragmenteket gélből izoláltuk, klónoztuk és szekvenáltuk. A genomiális és a cDNS szekvenciák az átfedő szakaszokon megegyeztek. A kétféle DNS szekvencia összevetéséből azonosítottuk az exon-intron határokat és meghatároztuk az intronok méretét (1. táblázat). A *hsc70-1* struktúrgén az

általunk vizsgált szakaszon 7 intront tartalmaz (11. és 14. ábra), a *hsc70* géncsaládra karakterisztikus, evolúciósan konzervált pozíciókban.

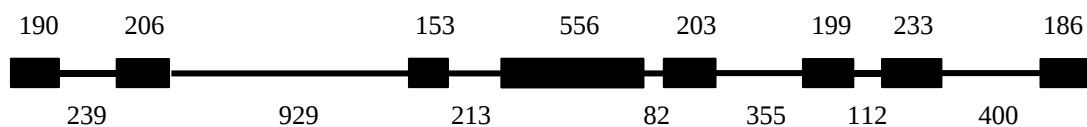


13. ábra: Reprezentatív PCR amplifikálás genomiális DNS (1, 3, 5) és cDNS (2, 4, 6) templátokról, a 1, 2: 1F/G1R; 3, 4: 3-1/4R; 5, 6: G2F/6R primer párokkal. 7: 1 kb molekulaszúly marker (Gibco). A nyílak a gélből izolált fragmenteket jelzik.

1. Táblázat:

Exon	5'-Splice site			Intron	3'-Spilce site			Exon
2	TTG	GTAAGG----	2	(239)	----GGTTCAACAG	A	3	
3	AAG	GTGAAT----	3	(929)	----GTTGTTTCAG	C	4	
4	AAG	GATAGA----	4	(213)	----TTCACACAG	G	5	
5	CAG	GTAAGA----	5	(82)	----ATTTACACCAG	C	6	
6	CAG	TAAATG----	6	(355)	----TTACCCTTAG	G	7	
7	AAG	GTAAAA----	7	(112)	----TTTCTTTTAG	G	8	
8	CAG	GTAGGT----	8	(400)	----TGTGCCACAG	A	9	
(C/A) AG		GT (A/G) AGT		Konszenzus	(T/C) ₆ N (C/T) AG		G	

hsc70-1 struktúrgén splice akceptor és splice donor szekvencia valamint az intronok mérete.



14. ábra: A *hsc70-1* struktúrgén exon-intron tagozódása: a boksok az exonokat a vonalak az intronokat jelzik.

A *hsc70-2* gént nem elemeztük ilyen részletességgel, de egy, a fentiekhez hasonló amplifikálással kimutattuk a 7. intron jelenlétét, és így bizonyítottuk, hogy ez a gén is hordozza szerkezetében a klasszikus *hsc70* jegyeket.

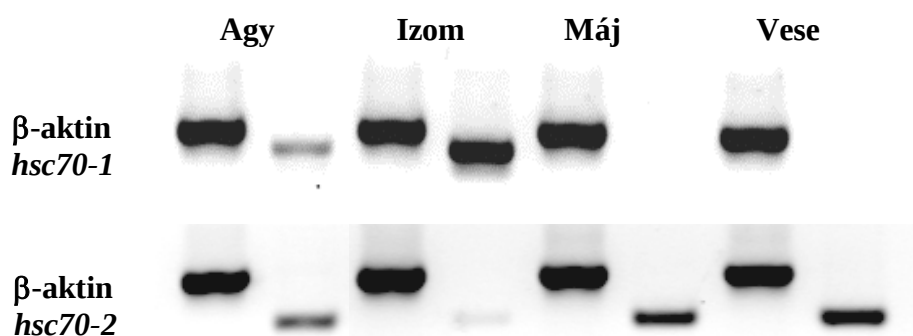
4.2. Ponty *hsp70* és *hsc70* gének expressziójának vizsgálata

4.2.1. A *hsp70* és *hsc70* gének szövetspecifikus alapexpressziója

A 70 kDa-os stresszfehérjét kódoló gének klasszikus besorolása szerint a *hsp70* gének fiziológiás körülmények között nem vagy csak kis mértékben nyilvánulnak meg, míg a *hsc70* génekre a konstitutív expresszió jellemző. Kezeletlen halak különböző szerveiben, májban, vesében, agyban és izomban vizsgáltuk mind a három újonnan azonosított ponty gén expresszióját RT-PCR amplifikálással, illetve Northern hibridizációval. A RT-PCR reakcióhoz olyan génspecifikus primereket választottunk (*hsp70-7/hsp70-8*, 7F/8R és 9F/10R) (11. ábra), melyek biztosítják az amplifikálás specifitását (ezek specifitását a klónozott cDNS templatokon ellenőriztük). Az adott mRNS mennyiségét egy belső kontrollhoz, a β -aktin mRNS szintjéhez viszonyítva állapítottuk meg. Northern hibridizálásnál teszt kísérletekben győződünk meg, hogy a génspecifikus próbákkal nem kapunk kereszt hibridizálást a kiválasztott paraméterek alkalmazása mellett.

A *hsp70* mRNS Northern hibridizációval nem volt kimutatható egyik szövetmintában sem. Az agyban a jóval érzékenyebb RT-PCR módszerrel sem mutattunk ki detektálható mennyiségű mRNS-t, míg a vesében, a májban és az izomban, erős egyedi variációt mutatva, a kimutathatósági határ körüli mennyiségben volt jelen.

A *hsc70-1* expresszió az izomban volt a legmagasabb, a *hsc70-1* mRNS a β -aktinnal összevethető mennyiségben volt jelen. Ennek az értéknek körülbelül 25%-át mértük az agyban. A májban és a vesében vagy nem tudtuk kimutatni ezt a génterméket vagy pedig a kimutathatóság határán mozgott a mennyisége (15. ábra).

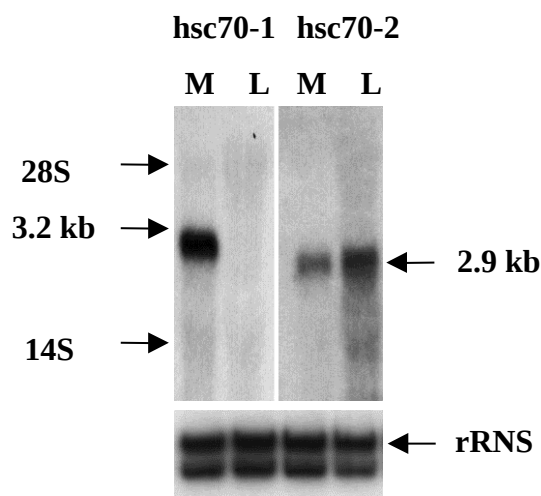


15. ábra: Reprezentatív RT-PCR amplifikálás a kontroll halak agy, izom, máj és vese szöveteiből izolált RNS mintákon.

A *hsc70-2* gén expressziója markáns különbséget mutatott. A legmagasabb expressziót a vesében találtuk, ez 55-60%-a volt a β -aktin szintnek. Valamivel kisebb mennyiségben volt jelen a májban és az agyban (40-45%). Az izomban, ahol a *hsc70-1* mRNS-t a legnagyobb mennyiségben találtuk, maximum egy 15%-os expressziót mértünk (15. ábra).

Northern hibridizálással a kétféle *hsc70* gén expresszióját a májból és az izomból preparált RNS mintákban vizsgáltuk. A hibridizációs kísérletek alátámasztották az RT-PCR reakciókban kapott eredményeket. A *hsc70-1* mRNS az izomban könnyen

detektálható volt míg a májban nem tudtuk kimutatni. A *hsc70-2* gén-specifikus próbával a májban 4.5-szer több mRNS-t detektáltunk, mint az izomban (16. ábra).



16. ábra: Northern hibridizációval detektált *hsc70-1* és *hsc70-2* mRNS a kezeletlen halak izom (M) és máj (L) szövetében. A két génről szintetizált mRNS mennyiségét a rRNS mennyiségére normalizáltuk (alsó panel).

Ez a kísérlet lehetőséget adott a két *hsc70*-specifikus mRNS méretének meghatározására is, ami 3.2 kb-nak adódott a *hsc70-1*-re és 2.9 kb-nak a *hsc70-2*-re nézve. Mivel a két gén kódoló régiója közel azonos hosszúságú, a mRNS-ek jelentős méretbeli különbsége az 5' és/vagy 3' végi, nem transzlálódó régiók eltérő méretéből adódhat.

4.2.2. Hőmérsékletváltozás hatása a *hsp70* és *hsc70* gének expressziójára izomban és májban

Az első kísérlet sorozatban az akváriumok vízhőmérsékletét 14 illetve 18 °C-kal emeltük majd 0.5 és 3 óra elteltével, valamint a hőkezelést követő 1 óra *recovery* időszak után vizsgáltuk a három hősokk gén expresszióját. Mivel a kétféle *hsc70*

génünk a májban és az izomban reciprok expressziós mintázatot mutatott, ezekben a szövetekben követtük a különböző stresszorok indukciós hatását.

A májban a *hsp70* gén tranziensen indukálódott. A félórás hőkezelést követően egy 2-2.5-szeres mRNA növekedést mértünk. A három órás hő sokkot követően viszont már nem volt jelentős különbség a kontroll állatokban mért értékhez képest. A kontroll és a félórás hő kezelt állatok izom szövetében nem volt detektálható mennyiségű *hsp70* mRNA jelen. A három órás inkubáció magas hőmérsékleten viszont indukálta a *hsp70* expressziót, a májban mért maximum értékek 2/3-át detektáltuk (17. ábra). A hőkezelést követő 1 óra *recovery* periódus nem befolyásolta a *hsp70* expressziót egyik vizsgált szövetben sem.

A *hsc70* gének májban nem vagy nagyon mérsékelten reagáltak a hirtelen hőmérsékletnövekedésre. A *hsc70-1* mRNA mennyisége egyik kísérleti időpontban sem érte el a kimutathatósági szintet. A *hsc70-2* gén expressziójában egy maximum 2-szeres növekedést mértünk a 3 órás hő sokkot követő *recovery* periodus után.

Izomban a közvetlen hő sokk nem okozott lényeges változást a *hsc70-1* expresszióban, a *recovery* időszak elteltével azonban egy jól mérhető növekedés volt detektálható (1.5-2.5). Ebben a szövetben a *hsc70-2* gén érzékenyebb volt a hőkezelésre: már a 30 perces inkubációt követően egy 3-szoros, a 3+1 órát követően pedig egy 4-4.5-szeres indukciót mértünk (18. ábra).

Valamennyi vizsgált időpontban és szövetmintában a 14 °C-os hőmérsékletemelési adatait mutattuk be, mivel a 18 °C-os hő sokk hatására se tapasztaltunk magasabb indukciós értékeket.

A második kísérlet sorozatban a hidegsokk hatását vizsgáltuk a három gén expressziójára. A víz hőmérsékletét 7 °C-kal csökkentettük és 1, 2, 5 órás kezelést követő 1 órás *recovery* idő elteltével vettünk mintát a májból és az izomból.

A *hsp70* gén mind a két szövetben indukálódott hidegsokk hatására. Az indukció abszolút mértéke nem meghatározható, hisz egyik szövetben sem volt mérhető a *hsp70* mRNA szint alapállapotban. Májban 1+1 óra elteltével a *hsp70* mRNA mennyisége 1/10-e volt a β -aktin mennyiségének. Ez az érték nem is igen változott hosszabb inkubálási idő elteltével sem. Izomban, hasonlóan a májhoz már 1+1 óra elteltével detektálható mennyiségű mRNA volt jelen, ebben a szövetben a 2+1 illetve az 5+1 óra inkubálást követően további növekedést mértünk, szinte megduplázódott a *hsp70* transzkriptum mennyisége.

A két *hsc70* gén különbözőképpen reagált a hidegkezelésre. A *hsc70-1* expresszió csökkent az izomban; az alapszint közel 55-65%-a volt mérhető 2+1 és 5+1 órát követően. A *hsc70-2* gén ezzel szemben jelentősen indukálódott; 2+1 óra elteltével már 7.5-10-szeres mRNA növekedést detektáltunk, és ehhez hasonló értékeket kaptunk az 5+1 inkubálást követően is (19. ábra). Májban a *hsc70-1* mRNA nem volt kimutatható egyik vizsgált időpontban sem. A *hsc70-2* gén az izomban mért értékekhez képest egy jóval mérsékeltebb, maximum 1.5-szeres indukciót mutatott (20. ábra).

4.2.3. Kadmium kezelés hatása a *hsp70* és *hsc70* gének expressziójára

A hőmérsékletváltozáson kívül más fehérjekárosító tényezők hatását is vizsgálni kívántuk a stressz gének expressziójára. Ebben a kísérletben a kadmium hatását követtük májban, a méregtelenítés szervében és izomban az emberi táplálkozás szempontjából legfontosabb szövetben, két különböző koncentrációban alkalmazva.

A kadmiumot 10 mg/l koncentrációban alkalmaztuk és négy napon keresztül vizsgáltuk a hatását napi mintavételt alkalmazva. Izomban a három gén közül csak a *hsp70* indukálódott, 96 óra elteltével 2-2.5-szeresére nőtt az mRNA mennyisége a kontroll állatokban mért értékekhez viszonyítva (a kontroll értékek nem minden minta esetében voltak mérhetőek). Májban a *hsp70* mRNA mennyisége nem érte el a

kimutathatóság határát a kezelés egyik időpontjában sem. A *hsc70-1* gén jelentős mértékben indukálódott, a kontrollhoz képest egy 11-13-szoros mRNS növekedést mértünk 96 óra elteltével. Ahol a kontroll értékek nem voltak meghatározhatók, ott 24 és 96 óra között egy hatszoros mRNS szintnövekedés volt mérhető. A *hsc70-2* gén expresszióját egy jóval mérsékeltebb emelkedés jellemezte, maximum 2-2.5-szeres növekedést mértünk 96 óra elteltével (21. ábra).

A szervezetben a kadmium felhalmozódás nagymértékben függ a fém bevitel módjától. A következő kísérletsorozatban a kadmiumot intraperitoniálisan juttattuk a szervezetbe 10 mg/kg koncentrációban, a mintavétel a kezelés 10. és 48. órájában történt.

Májban a *hsp70* mRNS mennyisége 15-szörösére emelkedett a 10 órás fémexpozíciót követően és még 48 óra elteltével is egy 10-szeres növekedés volt mérhető a kontrollhoz képest. Izomban eltérő volt a *hsp70* gén indukációs kinetikája, 10 óra elteltével már kimutatható mennyiségben volt jelen a *hsp70* mRNS, 48 óránál pedig egy 3-szoros növekedést mértünk (22. ábra).

A *hsc70* gének kadmiummal való indukálhatósága messze elmaradt a *hsp70* génhez képest. A májban a *hsc70-1* gén egy 2.5-szeres maximum indukációt mutatott a kezelés 10. órájában, míg 48 óra elteltével egy 1.5-szeres változást mértünk. A *hsc70-2* mRNS szintet egy lassú növekedés jellemezte (1.6 és 2-szoros) a két vizsgált időpontban (23. ábra). Izomban fordított volt a két gén expressziójának változása, a *hsc70-1* gén egy 1.5-szeres a *hsc70-2* egy 2.5-szeres mRNS növekedést ért el a kezelés 48. órájában (24. ábra).

4.3. A *hsp70*, *hsc70-1* és az MT gének expressziójának vizsgálata ponty szívben

4.3.1. Hőmérsékletváltozás indukálta *hsp70* és *hsc70-1* gén expresszió

A *hősokk* hatását a halakban a *hsp70* és a *hsc70-1* gének működésére a vízhőmérsékletnek 14 °C-al, 12 °C-ról 26 °C-ra történő emelésével vizsgáltuk. 30 perc valamint 3 óra eltelte után, továbbá a hőkezelést követő 1 órás 12 °C-os *recovery* időszakot követően ellenőriztük a *hsp70* és a *hsc70-1* gének expresszióját (25. ábra). A *hsp70* mRNS mennyisége hőkezelés hatására folyamatos emelkedést mutatott a kontroll értékhez képest, 30 perc elteltével 3.8-szoros, és azt követő egy órás *recovery* időszakban további, összességében 10-szeres növekedést mértünk. 3 órás hőkezeléskor 5.5-szeres növekedést detektáltunk, míg a *recovery* időszak után a kontroll szinthez képest csak 2.3-szeres növekedés figyelhető meg.

A *hsc70-1* mRNS mennyisége 30 perc elteltével a 3-szorosára nőtt a kontrollhoz képest, amely szint 3 órás kezelést követően sem emelkedett tovább. A fél órás hőkezelést követő 1 órás *recovery* időszak közel alapszintre csökkentette a *hsc70-1* mRNS mennyiségét, ezzel szemben a hosszabb, három órás hőstresszt követő 1 órás *recovery* időszakban a mRNS mennyisége a kontroll szinthez képest 3-szoros növekedést mutatott, amely közel azonos mértékű a 3 órás *hősokk* hatásával.

A következőkben megvizsgáltuk a *hidegsokk* hatását a két gén expressziójára. A vízhőmérsékletet 7 °C-al, 12 °C-ról 5 °C-ra csökkentettük, és 1, 2 és 5 órás *hidegsokk* kezelést követő 1 órás *recovery* időszak után mértük a *hsp70* és a *hsc70-1* mRNS szintet (26. ábra).

A *hsp70* mRNS a kontroll állatokban alapszinten, 12 °C-on nem detektálható. Az egy órás *hidegsokk*ot követő egy órás *recovery* időszakban enyhe indukció tapasztalható, amely azonban gyorsan lecseng.

A *hsc70-1* mRNS szintje a kontroll állatokban a 12 °C-on kimutatható alapszinthez képest gyorsan, már 1 órás hidegsokk és az azt követő *recovery* hatására 1.5-szeresére nőtt. További emelkedés tapasztalható 2 órás kezelést követő 1 órás *recovery* után, s a mért mRNS mennyiség az elérhető maximális érték, ugyanis 5 órás hidegsokk hatására nem fokozódott az expresszió.

4.3.2. Nehézfémek hatása a *hsp70* és *hsc70-1* gének expressziójára

A hőmérséklet emelése mindkét hőstressz gén fokozott, de eltérő kinetikájú expresszióját idézte elő a szívben, ezzel szemben a hidegstressz jelentéktelen, rövid ideig tartó *hsp70* mRNS szint emelkedést, és a hőstressz hatásánál kisebb *hsc70-1* gén indukciót okozott. A két gén működésének további jellemzése céljából megvizsgáltuk az ugyancsak fehérje károsodást okozó nehézfémek, a Cd, As és Cu hatását. A fémeket 10 mg/l koncentrációban, illetve Cd esetén 10mg/kg dózisban is alkalmaztuk, és a *hsp70* gének expresszióját 48-96 óráig tartó kezelés során vizsgáltuk

4.3.2.1. Kadmium hatása a *hsp70* és *hsc70-1* gének expressziójára

Szívben az alapszinten nem detektálható *hsp70* gén expressziójában a 10 mg/l koncentrációjú Cd tartós növekedést okozott; a kezelés 24. órájában a *hsp70* mRNS mennyisége a β -aktin szintjének kb. 20%-a, s ez az érték a 96. órára sem változott lényegesen (27/A. ábra.). A kadmium ebben a koncentrációban nem okozott *hsc70-1* indukciót, a mRNS mennyisége a fémkezelés során a kontrollhoz képest mérési hibahatáron belül változott.

Feltételeztük, hogy a vízből felvett fém akkumulációja a szívben lassú folyamat, továbbá a sejtekben az MT fehérjék gyorsan megkötik a nehézfémeket, ezért azok fehérjéket denaturáló hatása nem, vagy kevésbé érvényesül. Ezért megvizsgáltuk a kadmium hatását a magasabb, 10 mg/kg intraperitoneálisan bejuttatott dózisban (27/B. ábra). A *hsp70* indukció hasonló mértékű volt az előbbi, kisebb koncentrációban

alkalmazott fém hatásához, 24 óra elteltével a β -aktin mRNS-hez képest 20% *hsp70* mRNS mérhető, amely érték 48 óra elteltével gyakorlatilag nem változott. A *hsc70-1* indukció lassúbb folyamat, a kezelést követő 48. órában mutatható ki, s a kontrollhoz képest 1.5-szeres mRNS szint emelkedés mérhető.

4.3.2.2. Az arzén és a réz hatása a *hsp70* és a *hsc70-1* gének expressziójára

Az arzén 10 mg/l koncentrációban csak a kezelés 24-ik órájában okozott átmenetileg kimutatható *hsp70* mRNS szintnövekedést, amely a β -aktin mRNS szintjének 13%-a volt. 48 óra múlva a mRNS szint lecsengett. Az arzén tranziens *hsc70-1* gén indukciót okozott, a mRNS mennyisége 24 órás expozíció során a kontrollhoz képest kétszeresére emelkedett. Ez a szint 48 óra elteltével sem változott, majd ezt követően a kezelés 72. órájában csökkenés mérhető, amikor az mRNS mennyisége a kontrollhoz képest már csak 1.5-szer magasabb (28/A. ábra).

A 10 mg/l koncentrációjú Cu az As és Cd hatásával szemben a vizsgált fémek közül a legjobb *hsp70* induktornak bizonyult, 24 órás expozíciót követően mérhető mRNS mennyisége eléri a β -aktin szintjének kb. 10%-át, 48 óra múlva pedig csaknem 30%-ra nő (28/B. ábra). Az esszenciális Cu ion az arzénal azonos koncentrációban alkalmazva jobb *hsc70-1* induktornak bizonyult, mint az As és a Cd. A kezelés 24. órájában a *hsc70-1* mRNS mennyisége a kontrollhoz képest 4.2-szeresére nő és 48 óra múlva sem csökken lényegesen.

4.3.3. Nehézfémek hatása az MT gének expressziójára

A nehézfémek fehérjék szerkezetét károsító hatásának közvetett jellemzésére az előző fejezetben két 70 kDa fehérjét kódoló gén expresszióját tanulmányoztuk. Az eredmények helyes értékelésének azonban feltétele az, hogy ismerjük a nehézfémeket megkötő, s így azok detoxifikációjában résztvevő MT gének expressziójának szabályozását a ponty szívben. Az MT fehérjék ugyanis lényegesen csökkentik a sejten

belüli szabad fémionok koncentrációját, továbbá az általuk kiváltott szabadgyökök keletkezését, s ezáltal csökken a nem-MT típusú fehérjék denaturációja. Ennek következményeként csökkenhet a *hsp* gének expressziója.

4.3.3.1. Kadmium hatása az MT-1 és MT-2 gének expressziójára

A halakat 10 mg/l koncentrációjú kadmium hatásnak kitéve, a két vizsgált MT gén eltérő expressziós kinetikát mutatott (29/A. ábra). Az MT-1 mRNS mennyisége a kezelés kezdetén 24 óra alatt a kontrollhoz képest 2.5-szeresére nőtt, és ez a szint a további kezelés során sem változott. A fém lényegesen jobban indukálta az MT-2 gént, ugyanis 24 óra elteltével maximális, 5.5-szeres indukciót mértünk a kontrollhoz képest. Az emelkedés nem folyamatos, a kezelés 48. órájában ugyanis a mRNS szint átmenetileg lecsökkent a kontroll 1.5-szeresére, majd a 96. órában ismét emelkedni kezdett és a kontrollhoz képest 3.9-szeres indukciót mértünk.

A kadmiumot 10mg/kg dózisban intraperitoneálisan alkalmazva a két MT gén gyors és erőteljes aktiválódását eredményezte (29/B. ábra), lényeges különbség mutatkozott azonban az indukció mértékében: az MT-1 mRNS mennyisége a 24 óra elteltével a kontroll értékénél 8.5-szer magasabb volt, és 48 óra múlva pedig 12-szeres növekedést mértünk. Az MT-2 mRNS szintje kissé gyorsabb emelkedést mutat, mint az MT-1 mRNS, de 48 óra múlva mennyiségük a szívben megegyezik. A kontroll állatokban mért magasabb MT-2 alapexpresszió miatt azonban ez a gén kevésbé indukálódik, mint az MT-1, 48 óra múlva 2.5-szeres MT-2 mRNS szint emelkedés mérhető. A Cd-al kétféle módon kezelt halak szívében a 10 mg/kg egyszeri dózisban alkalmazott nehézfém stressz fokozottabb MT-1 indukciót váltott ki, mint a tartósan 4 napig 10 mg/l fémmel kezelt állatokban, ahol az MT-1 mRNS mennyisége csak enyhén indukálódott.

4.3.3.2. Az arzén hatása az MT-1 és MT-2 gének expressziójára

Az arzén 10 mg/l koncentrációban alkalmazott folyamatos expozíció esetén hatékony MT gén induktornak bizonyult (30/A. ábra). Az MT-1 indukciója jellegzetes, kétlépcsős kinetikát mutat a mérési perióduson belül, ugyanis a 24 órás expozíció eredményeként gyors mRNS szint növekedés, majd a 48 óra elteltével ugyancsak gyors, az alapszintet megközelítő csökkenés következett be, végül 72 óra múlva ismét erőteljes emelkedés mérhető. Az indukció mértéke a 24 órás mintában 7.5-szeres, a 72 órában pedig 10-szeres. Az MT-2 mRNS szint az expozíció során folyamatosan nőtt és a kezelés 24. órájában 5-szörös, a 48. és 72. órájában pedig 6-szoros indukciót okozott.

4.3.3.3. Réz hatása az MT-1 és MT-2 gének expressziójára

A 10 mg/l koncentrációjú réz a két MT gén gyors aktiválódását eredményezte, s a kezelés 48. órájában a két vizsgált gén mRNS szintje azonos értéket ért el (30/B. ábra). A két gén indukciója azonban lényeges különbséget mutat, ugyanis az eltérő alapszintek miatt a Cu jóval hatékonyabb MT-1, mint MT-2 induktornak bizonyult. Az MT-1 mRNS mennyisége 48 óra expozíció után a kontrollhoz képest 14.5-szeres, az MT-2 mRNS pedig csak 2.8-szeres növekedést mutatott.

4.3.4. Hidegsokk hatása az MT-1 és a MT-2 gének expressziójára

Ismert jelenség az, hogy a hőmérséklet hirtelen emelkedése vagy csökkenése a hősokk géneken kívül más gének expresszióját is befolyásolhatja. Ezért megvizsgáltuk azt, hogy a ponty szívében a vízhőmérséklet változása hogyan hat az MT-1 és az MT-2 gének expressziójára. A hőmérséklet emelése az MT gének aktivitását nem befolyásolta, ezért a hidegsokk hatását mutatjuk be.

A hidegsokkot a halak 12°C-os vízhőmérsékletéről 5°C-ra helyezésével idéztük elő és vizsgáltuk szívből az MT gének kifejeződését 1, 2 és 5 órás hidegsokkot követő 1 órában 12°C-on történő *recovery* időszak után (31. ábra). Az MT-1 gén expresszióját a

hidegsokk gátolta, és a mRNS szint a kontrollhoz képest folyamatosan csökkent. Ezzel szemben az MT-2 gén esetében tranziens aktiválódást figyelhetünk meg, a mRNS mennyisége 2 órás kezelést követően eléri a maximum értéket, a kontroll kétszeresét, majd 5 órás hidegsokk hatására csökken, és az alapszinthez képest már csak 1.3-szeres az indukció.

5. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS MEGBESZÉLÉSE

A dolgozatomban összefoglaló címe „stresszválasz vizsgálata halakban” egyben utalás is munkacsoportunk fő céljára: minél több, a stressz-válaszadásban résztvevő géncsalád tagjának azonosítása és azok szerepének vizsgálata különböző halfajokban. A dolgozat első fejezetében összefoglalt munka a stressz-válaszadásban fontos szerepet játszó, a stresszfehérjék egyik legnépesebb családjába tartozó 70 kDa fehérjét kódoló génekkel foglalkozik a pontyban. A második fejezetben talán kissé szokatlan módon egyetlen szerv, a szív, stresszválaszadási képességét vizsgáljuk, követve az újonnan izolált *hsp70* gének illetve egy korábban azonosított géncsalád, a metallothionein tagjainak expresszióváltozását különböző fémkezeléseket és hőmérsékletváltozást követően.

5.1. A 70 kDa fehérjét kódoló stressz gének izolálása és jellemzése

A 70 kDa stresszfehérjét kódoló gének pontyban történő azonosításához RT-PCR amplifikálást használtunk. A géncsaládot jellemző nagy szekvencia homológia ellenére, a reakciókban használt *általános*/génspecifikus primerkombinációk specifikitása elegendőnek bizonyult három izoformát kódoló gén elkülönítéséhez. A gének konstitutív illetve indukálható *hsp70* alcsaládba történő besorolása szekvencia analízis, génszerkezet és expressziós mintázat alapján történt meg. A három gén közül kettő a fent említett szempontok alapján a Hsc70 fehérjéket kódoló gének csoportjába tartozik. A két fehérje közti homológia 88%-os. A legnagyobb hasonlóság, 91%, a két izoforma ATP kötő *domain*-jét jellemzi (az 1-381 aminosavak között). A két C-terminális *domain* ennél alacsonyabb homológiát mutat, 87% a 379-538 pozíciók, illetve 79% a 537-638 pozíciók között. Computeres összehasonlítás alapján a ponty Hsc70-1 fehérje a

legnagyobb homológiát, a *Rivulus marmoratus* (93%), míg a Hsc70-2 izoforma a zebradánió (96%) Hsc70 fehérjéjével mutatja. Érdekes megfigyelni, hogy a ponty Hsc70-1 és a legközelebbi analógja között 95%, 91% és 80%-os a *domain*-ek közti azonosság megoszlása, míg a Hsc70-2 esetében a C-terminális *domain*-eket nem jellemzi ez a nagyobb fokú variabilitás, mindhárom terület 95%-os hasonlóságot mutat.

A harmadik azonosított génünk legjobban a zebradánió *hsp70* génjéhez hasonlít. Az általuk kódolt fehérjék aminosav sorrendje 90%-ban megegyezik, míg a ponty Hsc70 izoformákhoz csak 83 illetve 84%-ban hasonlítanak. A ponty Hsc70 és a Hsp70 izoformák N-terminális, ATP kötő *domain*-je, és a középső, fehérjekötő *domain* 87-89%-ban mutatnak hasonlóságot, míg a 10 kDa C-terminális *domain*-ek mindössze 55%-ban egyeznek meg.

Emlősökben nem ritka több *hsc70* gén jelenléte egy fajon belül, s köztük a homológia igen magas (96-98%) (Günter és Walter, 1994). Alacsonyabb rendű gerincesekből eddig csak békából (Ali és mtsi, 1996a; 1996b) és egyetlen halfajból, a zebradánióból (Graser és mtsi, 1996-97; Santacruz és mtsi, 1997) izoláltak két *hsc70* cDNS-t. Egy fajon belül a két izoforma közti hasonlóság 94-95%. A ponty *hsc70-1* és *hsc70-2* így az első példája alacsonyabb rendű gerincesekben a lényeges szekvencia különbséget mutató *hsc70* gének jelenlétére egy fajon belül.

A *hsc70-1* és *hsc70-2* géneket jellemző exon/intron tagolódás valamint a *hsp70* struktúrgén intron nélküli felépítése tovább erősítette a konstitutív, illetve az indukálható géncsaládba történt besorolásukat. Az izolált *hsc70-1* genomiális fragment 8 exont és 7 intront tartalmaz. Ismert egér és ember *hsc70* struktúrgéneket összevetve feltűnő, hogy a kódoló exonok mérete 100%-ban megegyezik és emellett még az intronok mérete is igen jó egyezést mutat. Sem az ismert pisztráng és *Rivulus*, sem pedig

az általunk azonosított ponty *hsc70* struktúrgéneket nem jellemzi ez a nagyfokú konzerváltság, bár az exon/intron határok pozíciója valamennyi fajban megegyezik.

A ponty *hsc/hsp70* cDNS-ek eltérései alapján tervezett primerek segítségével lehetőségünk nyílt a három gén expressziójának specifikus vizsgálatára stresszmentes és indukált körülmények között. A *hsp70* gének alap-expresszióját nagy egyedi és szezonális variabilitás jellemzi májban, vesében, szívben és az izomban. A *hsc70* mRNS-ek alapállapotban, azokban a szövetekben, ahol ezek a gének expresszálódtak, a β -aktinnal összevethető mennyiségben voltak jelen, és ez a tény tovább erősítette a konstitutív besorolásukat. Ismert *hsc70* gének expressziós mintázata igen széles skálán mozog még egy adott fajon belül is. Egérben például a *hsc70* gén valamennyi vizsgált szövetben (agy, szív, máj, vese, lép, bél, mellékvese, nyelv és hasnyálmirigy) (Giebel és mtsi, 1988) expresszálódik némi szövet-specifitást mutatva, ugyanakkor a *hsc70t* hím ivarsejt-specifikus expressziót mutat (Matsumoto and Fujimoto, 1990). Halakban nehéz összehasonlítást végeznünk, mivel eddig egyedül a zebradánióból azonosítottak két *hsc70* gént. A két gén egyikének expressziója az embrionális fejlődés során térben és időben szabályozott (Santacruz és mtsi, 1997), míg a másik expressziós mintázatára nincs irodalmi adat. A ponty *hsc70* gének jellegzetes szövet-specifikus expressziója újdonság; bizonyos szövetekben mind a kétféle mRNS kimutatható, míg vannak szervek, ahol dominánsan csak az egyik gén expresszálódik, mintegy egymást kiegészítő módon.

Vizsgáltuk a három gén indukálhatóságát különböző hőmérsékletváltozásokat követően. A víz hőmérsékletének hirtelen emelése akár 14, akár 18 °C-kal csak mérsékelt emelkedést eredményezett a három gén expressziójában. Lényeges különbség a *hsp/hsc70* gének között, hogy a konstitutívan expresszálódó gének nem indukálódnak közvetlen hősokk hatására, mérhető mRNS szintváltozás csak a hősokkot követő

recovery idő elteltével tapasztaltunk. A *hsp70* génnek az expressziója viszont nem mutatott lényeges különbséget a közvetlen hőstressz és a *recovery* idő elteltével. Ez a jelenség esetleg betudható a stuktúrgének szerkezetében (exon/intron tagozódás a *hsc70* esetében) meglévő különbségnek. A *hsc70-2* gén 4-4.5-szeres indukciója önmagában nem egy dramatikus változás, de más fajokból leírt *hsc70* gének hőstresszre adott válaszreakcióihoz képest jelentősnek is nevezhető. Békában (Ali és mtsi, 1996a), *Rivulus*-ban (Park és mtsi, 2001), pisztrángban (Zafarullah és mtsi, 1992) például nem volt detektálható változás a *hsc70* expresszióban, míg egérben (Hunt és mtsi, 1999), és medaka sejt kultúrában (Arai és mtsi, 1995) egy max. 2-szeres növekedést mutattak ki hőmérsékletemelkedést követően.

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. Az irodalomból főleg a *hsp70* gének stressz-válaszadó képességére van ismeretünk a hőmérsékletcsökkenést követően (Yamashita és mtsi, 1996; Cullen és Sarge, 1997; Laios és mtsi, 1997) míg a *hsc70* gének expressziójának változásáról kevés adat ismert (Anderson és mtsi, 1994). A ponty *hsc70-2* mRNS szint 7.5-10-szeres növekedése pedig példa nélküli, ilyen mértékű indukció a *hsc70* expresszióban csak a NIH3/T3 és human HeLa sejtvonalak *azetidine* (aminosav analóg) kezelése során volt mérhető (Hunt és

mtsi, 1999). Az a tény, hogy az „izom-specifikus” *hsc70-1* gén expressziója lényeges csökkenést mutat, míg az alap szinten alig detektálható *hsc70-2* ilyen 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, mint ahogy fentebb már említettük is, ilyen az egér és ember *hsc70t* (Matsumoto és Fujimoto, 1990) génje, mely „dominánsan” a hím ivarszervekben expresszálódik, és hasonlóan fontos szerepet tulajdonítanak a zebradánió *hsc70* génjének az idegrendszer fejlődésében (Santacruz és mtsi, 1997). Arra azonban nem találunk példát, hogy ez a „dominancia” 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 (Hermesz et al., 2001). A nagy fémkötő kapacitással rendelkező metallothionein fehérjék szintéziséhez azonban szükség lehet egy fokozottabb „*foldosoma* aktivitásra”, mely megmagyarázná a *hsc70* gének expressziójának növekedését májban (*hsc70-1*: 11-13-szoros), ahol a méregtelenítés a leghatékonyabban történik.

A kadmiumot 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 metallothioneinek már nem nyújtanak védeltséget, a denaturált fehérjék mennyisége növekszik és valószínűleg maga a transzkripció, transzlációs apparátus is jelentősen sérült.

5.2. A szívben indukálódott stresszgének működése

Az azonosított *hsp70* és *hsc70-1* szekvencia különbségek alapján lehetővé vált, hogy a specifikus primerek felhasználásával vizsgálni tudjuk a két gén alapexpresszióját és indukcióját a ponty szívben is. A gének expresszióját stressz körülmények között, hő- és hidegsokk, illetve nehézfém hatásának kitett állatokban tanulmányoztuk, amelynek célja a két gén szerepének jellemzése a stresszhatással szembeni védekezésben.

Az irodalomban eddig viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre a *hsp70* hősokk gének kifejeződéséről a halak szívében stressz körülmények között, noha más szövetek oxigén ellátása és az anyagcsere folyamatok zavartalansága szempontjából fontos szerepe van az intakt szívizomnak. A pisztráng *hsp70* indukálhatósága hiperthermia hatására a szívben jóval magasabbnak bizonyult, mint az izomban és a májban (Currie és mtsi, 2000).

A pontyban a *hsp70* és a *hsc70-1* gének a hősokk hatására egymástól eltérő módon reagáltak. A 14 °C hőmérsékletemelkedés a *hsp70* gén expresszióját kezelési időtől függően ötszörösére növeli. A *recovery* hatása, ugyanis gyors, traziens és erőteljes (10-szeres) indukciót okoz. A *hsc70-1* expresszióját ugyancsak fokozza a hőmérséklet emelkedése, de nem éri el az előbbi gén indukció szintjét. A *recovery* hatása a konstitutív *hsc70-1* gén kifejeződését a *hsp70* génnel ellentétesen befolyásolja, folyamatos emelkedő jellegű. Hasonló hatást figyeltek meg más szerzők is egyes emlős fajok szívizom szövetében, ahol ugyancsak a *hsc70* jelentős indukcióját mutatták ki a hipertermia hatására (Abe és mtsi, 1993; Su és mtsi, 1999). A szívizomban a hősokk

hatására kimutatott magas *hsp70* és kisebb, de szignifikáns *hsc70-1* indukció azt mutatja, hogy mindkét génnek fontos szerepe van a sejtek, illetve sejtfehérjék védelmében, szemben a májjal illetve vázizmokkal, ahol jelentőségük kisebb. Hasonló szövetspecifikus hatást figyeltek meg a béka, patkány *hsp70* és nyúl *hsc70* gének esetén is (Locke és mtsi, 1995; Ali és mtsi, 1997; Maloyan és mtsi, 1999).

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 °C) nem expresszálódott, és csak rövid idejű, intenzív stresszhatáskor, az 1 órás hidegsokkot követő *recovery* esetén figyelhető meg enyhe aktiválódás.

Ismert az a tény, hogy a nehézfémek közvetlenül kötődve a fehérjékhez, konformáció változást idéznek elő, amely folyamathoz másodlagos hatásként hozzájárul a fémek által kiváltott oxidációs hatás is (Halliwell, 1987; Moffatt and Denizeau, 1997). Ennek következtében számos stresszgén indukálódik, többek között a Hsp fehérjék, valamint az MT fehérjék génjei (Nath és mtsi, 2000; Latchman, 2001; Del Razo és mtsi, 2001).

A továbbiakban megvizsgáltuk azt, hogy három nehézfém, az egyik a legtoxikusabbnak ismert Cd, az ugyancsak toxikus As és az esszenciális, de nagy koncentrációban toxikus Cu hogyan befolyásolja a hősokk gének expresszióját. Az azonos, 10 mg/l koncentrációban alkalmazott fémek közül a Cd meglepő módon a *hsp70*-t csak kis mértékben indukálta, miközben a *hsc70-1* expressziója nem változott, hasonlóan a vázizomhoz. Az As és Cu viszont 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 a kísérleti periódus végéig folyamatosan indukáló hatásával. A három fém által kiváltott *hsp70* indukció mértéke növekvő sorrendben As<Cd<Cu. A *hsc70-1* gént a Cd nem indukálja ebben a

koncentrációban, 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 gén közül a konstitutív forma expressziójának van nagyobb jelentősége.

Az a megfigyelés, hogy a Cd enyhe mértékben csak a *hsp70* gént indukálja, továbbá a 10 mg/kg egyszeri dózisban intraperitoneálisan alkalmazott fém sem okoz nagyobb indukciót, felveti a MT gének indukciójának szerepét, illetve jelentőségét a fehérjék szerkezetének védelmében. Ezen megfontolás alapján vizsgáltuk az MT-1 és a MT-2 gének expresszióját a háromféle fémexpozíció esetén. Csoportunk korábban azonosított a pontyból két MT izoformát (MT-1 és MT-2) az agyban, szívben, izomban, májban és vesében. Alapexpressziójukat tekintve a szívben MT-2 mRNS szint közel 3.5-szer magasabb, mint az MT-1, ellentétben a többi szövettel, ahol a MT-1 aránya magasabb (Hermesz és mtsi. 2001).

A szívben mindhárom fém indukálja a két vizsgált MT gént, kadmium esetében a kezelés módjától erősen függő mértékben és módon. A folyamatosan, 10 mg/l koncentrációban alkalmazott fém 1.7-2.5-szeres, míg az egyszeri 10 mg/kg Cd dózis ennél nagyobb, 8-12-szeres MT-1 indukciót okoz. A folyamatos expozíció az MT-1-hez képest nagyobb mértékű MT-2 (5-szörös) indukciót okoz, az egyszeri dózisban adott fém hatására viszont az MT-2 gén indukciója mintegy ötöde az MT-1 indukciónak. Az As- és Cu ionokkal folyamatosan kezelt halak szívében az 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 nyilvánvaló, hogy a szívben a nehézfémek által kiváltott stresszválasz összetett folyamat. A stresszválasz mindkét géncsalád esetében fém-függő, és függ a fémexpozíció módjától is. A két MT gén aktiválódása nehézfém kezeléskor és az MT fehérjék szintézisének fokozódása fontos elemei a sejtalkotó fehérjék

védelmének. Ezt bizonyítja nehézfém kezeléskor a hősokk géneknek viszonylag alacsony szintű indukciója. A fém-specifikus hatásokat összehasonlítva érdekes jelenséget tapasztalunk. A fehérjék denaturált állapotát jelző *hsp70* és *hsc70-1* indukció az esszenciális Cu esetében magasabb, mint az erősen toxikus fémekként kezelt Cd és az As esetében. A jelenség lehetséges magyarázata az 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, továbbá a nehézfémek detoxifikálásában, valamint szabadgyök *scavenger*ként a nehézfémek által indukált antioxidációs folyamatokban (Langmade és mtsi, 2000). Irodalmi adatok szerint az oxidatív stresszhatások a szívben, intracellulárisan az MT fehérjékről Zn ionok felszabadulást váltják ki, amelyek többszörösére növelhetik a sejtek szabad fémion koncentrációját (Singal és mtsi, 1981; Fliss és Menard, 1992; Turan és mtsi, 1997). A Cu ionokat a MT fehérjék a Zn-hez hasonlóan kis affinitással kötik és a szabad fém okozhat fehérje denaturációt, illetve stresszfehérje indukciót.

A hőmérséklet változása sokkal kisebb hatású az MT gének expressziójában, mint a fémeké. A hősokk nem befolyásolja a két gén kifejeződését szívben, ugyanakkor fokozott *hsp70* és kisebb mértékű *hsc70-1* expressziót okoz. A hipotermia kétszeresére növeli MT-2 gén expresszióját, viszont az MT-1-et nem indukálja és alacsony expresszió változás mérhető a hősokk gének esetén is.

KÖSZÖNETNYILVÁNYÍTÁS

Ezután szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Hermes Editnek tanításomat, munkám irányítását és a sok türelmet és biztatást, amit kaptam tőle.

Külön köszönettel tartozom Dr. Ábrahám Magdolnának, aki a másik témavezetőm volt. Köszönöm a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségét, és értékes tanácsaival munkámat és a tanszéken tartózkodásomat mindvégig segítette.

Szeretnék külön köszöntet mondani Vadadi Lászlónénak, aki sokat segített a halkezeléssel kapcsolatos technikában.

Végül köszönöm családomnak, hogy mellettem voltak és mindvégig vártak rám.

Publikációjegyzék

A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények:

Khaled Said Ali, László Dorgai, Magdolna Ábrahám, Edit Hermes. Tissue- and stressor-specific differential expression of two *hsc70* genes in carp. *Biochem Biophys Res Commun*. In press. IF₂₀₀₂ 2.946

Khaled Said Ali, László Dorgai, Anett Gazdag, Magdolna Ábrahám, Edit Hermes. Identification and induction of *hsp70* gene by heat shock and cadmium exposure in carp. *Acta Biol Hung*. In press. IF₂₀₀₂ 0.282

Edit Hermes, Anett Gazdag, **Khaled Said Ali**, János Nemcsók, Magdolna Ábrahám. Differential regulation of the two metallothionein genes in common carp. *Acta Biol Hung*. 2002; 53, 343-350. IF₂₀₀₂ 0.282

A dolgozat témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

Magdolna Szente, Zita Gajda, **Khaled Said Ali**, Edit Hermes. Involvement of electrical coupling in the in vivo ictal epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in the neocortex. *Neuroscience*. 2002, 115, 1067-1078. IF₂₀₀₂ 3.219

Zita Gajda, Erika Gyengési, Edit Hermes, **Khaled Said Ali**, Magdolna Szente. Involvement of gap junctions in the manifestation and control of duration of seizures in vivo. *Epilepsia*. Közlésre elfogadva. IF₂₀₀₂ 3.271

Poszterek, előadások, magyarnyelvű közlemények:

Khaled Said Ali, László Dorgai, Magdolna Ábrahám, Edit Hermes. 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 Hermes. 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 Hermes, **Khaled Said Ali**, Magdolna Szenté, 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 Hermes, **Khaled Said Ali**, Magdolna Szenté. Involvement of electrical synapses in the induction and maintenance of cortical seizure discharges, Int. Liga Against Epilepsy, Hung. Faculty, 6th Conference, Budapest, 2002.

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

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.

IRODALOMJEGYZÉK

Abe K, Lee TH, Aoki M, Nitta Y, Isoyama S. Preferential expression of HSC70 heat shock mRNA in gerbil heart after transient brain ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1993, 25, 1131-1135.

Ableson NJ, Simon IM. *Methods in Enzimology*. Vol, 205, Section I., VII., IX., Academic Press, INC.

Abravaya K, Phillips B, Morimoto RI. Heat shock induced interactions of heat shock transcription factor and the human hsp70 promoter examined by in vivo footprinting. *Mol. Cell. Biol* 1991, 11, 586-592.

Agarraberes FA, Dice JF. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* 2001, 114, 2491-2499

Albores A, Koropatnick J, Cherian GM, Zelazowski JA. Arsenic induces and enhances rat hepatic metallothionein production in vivo. *Chem-Biol Interactions* 1992, 127-140.

Ali A, Fernando P, Smith WL, Ovsenek N, Lepock JR, Heikkila JJ. Preferential activation of HSF-binding activity and hsp70 gene expression in *Xenopus* heart after mild hyperthermia. *Cell Stress Chaperones* 1997, 2, 229-237.

Ali A, Salter-Cid L, Flajnik MF, Heikkila JJ. Isolation and characterization of a cDNA encoding a *Xenopus* 70-kDa heat shock cognate protein, Hsc70.I. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1996a, 113, 681-687.

Ali A, Salter-Cid L, Flajnik MJ, Heikkila JJ. Molecular cloning of a cDNA encoding a *Xenopus laevis* 70-kDa heat shock cognate protein, hsc70.II. *Biochim Biophys Acta* 1996b, 1309, 174-178.

Andrews GK. Regulation of metallothionein gene expression. *Prog Food Nutr Sci* 1990, 14, 193-258.

Anderson JV, Li QB, Haskell DW, Guy CL. Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum-luminal 70-kilodalton heat-shock cognate gene and expression of 70-kilodalton heat-shock genes during cold acclimation. *Plant Physiol* 1994 104, 1359-1370.

Arai A, Mitani H, Naruse K, Shima A. Cloning and characterization of cDNAs for hsp70-kDa heat-shock proteins Hsp70 from two fish species of the genus *Oryzias*. *Jap. J. Gen* 1995, 70, 423-433.

Ashburner M, Bonner JJ. The induction of gene activity in drosophila by heat shock *Cell* 1979, 17, 241-254.

Baler R, Dalh G, Voellmy, R. Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. *Mol. Cell. Biol* 1993, 13, 2486-2496.

Baler R, Welch WJ, Voellmy R. Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor. *J. Cell Biol* 1992, 117, 1151-1159.

Bardwell JCA, Craig EA. Major heat shock gene of drosophila and Escherichia coli heat-inducible DNA gene are homologous. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 848-852.

Becker J, Craig, EA. Heat shock proteins as molecular chaperones, *Eur. J Biochem* 1994, 219, 11-23.

Bork P, Sander C , Valencia A. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 7290-7294.

Bremner I, Nutritional and physiological significance of Metallothionein. In: Metallothionein II, edited by J. H. R. K. Kagi. *Birhauser, Basel* 1987, 81-107.

Brinker A, Scheufler C, Von Der Mulbe F, Fleckenstein B, Herrmann C, Jung G, Moarefi I, Hartl FU. Ligand discrimination by TPR domains. Relevance and selectivity of EEVD-recognition in Hsp70 x Hop x Hsp90 complexes. *J Biol Chem* 2002, 277, 19265-19275.

Bukau B, Horwich ALThe Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 1998, 92, 351-366.

Caplan AJ, Cyr DM , Douglas, M. G. Eukaryotic homologues of *Escherichia coli* dnaJ: a diverse protein family that functions with hsp70 stress proteins. *Mol. Biol. Cell* 1993, 4, 555-563.

Carginale V, Scudiero R, Capasso C, Capasso A, Kille P, di Prisco G, Parisi E. Cadmium-induced differential accumulation of metallothionein isoforms in the Antarctic icefish, which exhibits no basal metallothionein protein but high endogenous mRNA levels. *Biochem. J* 1998, 332, 475-481.

Chen S, Smith DF. Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem* 1998, 273, 35194-35200.

Chiang H-L, Terlecky SR, Plant CP, Dice, JF. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 1989, 246, 382-385.

Chou CC, Wang C, Sun YJ, Shr HL, Hsiao CD. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the 10 kDa C-terminal subdomain of 70 kDa heat-shock cognate protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2001, 57, 1928-1930.

Cotto JJ, Kline M, Morimoto RI. Activation of heat shock factor 1 DNA binding precedes stress-induced serine phosphorylation. *J. Biol. Chem* 1996, 271, 3355-3358.

Craig, EA. The heat shock response. *CRC Crit. Rev. Biochem* 1985, 18, 239-280.

Craig, EA., Role of hsp70 in translocation of proteins across membranes, Stress Proteins in Biology and Medicine, Eds R.I Morimoto, A. Tissieres, and C. Georgopoulos, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Springer Harbor, N.Y. 1990, PP. 301-321.

Cullen KE, Sarge KD, Characterization of hypothermia-induced cellular stress response in mouse tissues. *J. Biol. Chem* 1997, 272, 1742-1746.

Currie RW, Karmazyn M, Kloc M, Mailer K. Heat-shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery. *Circ Res* 1988, 63, 543-549.

Currie S, Moyes CD, Tufts BL. The effects of heat shock and acclimation temperature on hsp70 and hsp30 mRNA expression in rainbow trout: *in vivo* and *in vitro* comparisons. *Journal of Fish Biology* 2000, 56, 398-408.

Dalton T, Palmiter RD, Andrews GK. Transcriptional induction of the mouse metallothionein-I gene in hydrogen peroxide-treated Hepa cells involves a composite major late transcription factor/antioxidant response element and metal response promoter elements. *Nucl. Acids Res* 1994, 22, 5016-5023.

Del Razo LM, Quintanilla-Vega B, Brambila-Colombres E, Calderon-Aranda ES, Manno M, Albores A. Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001, 177, 132-148.

Dworniczak B, Mirault ME. Structure and expression of human gene coding for a 71 kd heat shock 'cognate' protein. *Nucl. Acids Res*. 1987, 15, 5181-5197.

Dyer SD, Dickson KL, Zimmerman EG. Tissue-specific patterns of synthesis of heat-shock proteins and thermal tolerance of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Can. J. Zool*. 1991, 69, 2021-2027.

Eller-Jessen K, Crivello FJ. Subcutaneous NaAs³⁺ exposure increases metallothionein mRNS and protein expression in juvenile winter flounder. *Aquat. Toxicol* 1998, 42, 301-320.

Ellis J. Proteins as molecular chaperones. *Nature* 1987, 328, 378-379.

Feige U, Polla, BS, Heat shock proteins: the hsp70 family. *Experientia* 1994, 50, 979-985.

- Felsenstein J.** Inferring phylogenies from protein sequences by parsimony, distance, and likelihood methods. *Methods Enzymol* 1996, 266, 418-427.
- Flaherty KM,** DeLuca-Flaherty C, McKay DB, Three-dimensional structures of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 1990, 346, 623-628.
- Flajnik MF,** Canel C, Kramer J, Kasahara M. Which came first, MHC class I or II?, *Immunogenetics* 1991, 33, 295-300.
- Fliss H,** Menard M. Oxidant-induced mobilization of zinc from metallothionein. *Arch Biochem Biophys.* 1992, 293, 195-199.
- Fowler BA,** Hildebrand CE, Kojima J, Webb M. Nomenclature of metallothionein. In: Metallothionein II., (Kagi J.H.R, Kojima Y. eds), *Birkhauser-Verlag, Basel* 1987 19-22.
- Frydman J,** Höhfeld J. Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. 1997, *Trends Biochem. Sci* 22, 87-92.
- Gamperl AK,** Vijayan MM, Pereira C, Farrell AP. Beta-receptors and stress protein 70 expression in hypoxic myocardium of rainbow trout and chinook salmon. *Am J Physiol.* 1998, 274, R428-436.
- Gething M.-J,** Sambrook J, Protein folding in the cell. *Nature*, 1992, 355, 33-45.
- Giebel LB,** Dworniczak BP, Bautz EK. Developmental regulation of a constitutively expressed mouse mRNA encoding a 72-kDa heat shock-like protein. *Dev Biol.* 1988, 125, 200-207.
- Graser RT,** Malnar-Dragojevic D, Vincek V. Cloning and characterization of a 70 kd heat shock cognate (hsc70) gene from the zebrafish (*Danio rerio*). *Genetica.* 1996-97, 98, 273-276.
- Guidon PT, Jr,** Hightower LE. Purification and initial characterization of the 71-kilodalton rat heat-shock protein and its cognate as fatty acid binding proteins. *Biochemistry* 1986, 25, 3231-3239.
- Günther E,** Walter L, Genetic aspects of hsp70 multigene family in vertebrates. *Experientia* 1994, 50, 987-1001.
- Gupta R.S.,** Golding G.B., Evolution of HSP70 and its implications regarding relationships between archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes. *J. Mol. Evol* 1993, 37, 573-582.
- Halliwell B.** Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1987, 1, 358-364.
- Hamer DH.** Metallothionein. *Annu Rev Biochem* 1986, 55, 913-951.

Harris ZL, Gitlin JD. Genetic and molecular basis for copper toxicity. *Am J Clin Nutr.* 1996; 63, 836S-41S.

Hartl F.-U. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996, 381, 571-580.

Hartl F.-U, Holdan R, Langer T. Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends biochem. Sci* 1994, 19, 20-25.

Hass IG. BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmatic reticulum. *Experientia* 1994, 50, 1012-1020.

Hattori H, Kaneda T, Lokeshwar B, Laszlo A, Ohtsuka K. A stress-inducible 40-kDa protein (HSP40)-purification by modified 2-dimensional gel electrophoresis and co-localization with hsc70 (p73) in heat-shocked Hela cells. *J. Cell Sci* 1993, 104, 629-638.

Hermesz E, Ábrahám M, Nemcsók J. Tissue-specific expression of two metallothionein genes in common carp during cadmium exposure and temperature shock. *Comp. Biochem. Physiol* 2001, 128, 457-466.

Hermesz E, Gazdag AP, Said Ali K, Nemcsok J, Abraham M. Differential regulation of the two metallothionein genes in common carp. *Acta Biol Hung* 2002, 53, 343-50.

Hernandez MP, Sullivan WP, Toft DO. The assembly and intermolecular properties of the hsp70-Hop-hsp90 molecular chaperone complex. *J Biol Chem*, 2002, 277, 38294-38304.

Hightower LE, Sadis SE, Takenaka IM. Interactions of vertebrate hsc70 and hsp70 with unfolded proteins and peptides. in: *The Biology of heat shock Proteins and molecular Chaperones*, Morimoto, R. I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C. (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview. 1994, pp. 179-207.

Hoekstra KA, Iwama GK, Nichols CR, Godin DV, Cheng KM. Increased heat shock protein expression after stress in Japanese quail. *Stress*, 1998, 2, 265-272.

Howard G, Geoghegan TE, Altered cardiac tissue gene expression during acute hypoxic exposure. *Mol Cell Biochem* 1986, 69, 155-160.

Höhfeld J, Jentsch S. GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J* 1997. 16, 6209-6216.

Höhfeld J, Minami Y, Hartl EU. Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* 1995, 83, 589-598.

Hunt CR, Parsian AJ, Goswami PC, Kozak CA. Characterization and expression of the mouse Hsc70 gene. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1444, 315-25.

Imagawa M, Ishikawa Y, Shimano H, Osada S, Nishihara T. CTG triplet repeat in mouse growth inhibitory factor/metallothionein III gene promoter represses the

transcriptional activity of the heterologous promoters. *J Biol Chem* 1995, 270, 20898-20900.

Ingolia TD, Craig EA, McCarthy BJ. Sequence of three copies of the gene for the major drosophila heat shock induced protein and their flanking regions. *Cell* 1980, 21, 669-679.

Ingolia TD, Slater MR, Craig EA. *Saccharomyces cerevisiae* contains a complex multigene family related to the major heat shock-inducible gene of *Drosophila*. *Mol Cell Biol* 1982; 2, 1388-98.

Ishinishi N, Tomita M, Hisanaga A. Study on chronic toxicity of arsenic trioxide in rats with special reference to the liver damages. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 1980, 27-40.

Iwama GK, Thomas PT, Forsyth R. B., Vijayan M. M. Heat shock protein expression in fish. *Reviews in fish Biology and Fisheries*, 1998, 8, 35-56.

Judelson HS, Micheltore RW. Structure and expression of gene encoding HSP70 from the oomycete fungus *Bremia lectucae*. *Gene* 1989, 79, 207-217.

Kabsch W, Mannherz HG, Suck D. Pai EF, Holmes KC. Atomic structure of the actin: Dnase I complex. *Nature* 1990, 347, 37-44.

Kagi JH, Himmelhoch SR, Whanger PD, Bethune JL, Vallee BL. Equine hepatic and renal metallothioneins. Purification, molecular weight, amino acid composition, and metal content. *J Biol Chem* 1974, 249, 3537-3542.

Kagi JH, Kojima Y. Chemistry and biochemistry of metallothioneins. In: Metallothionein II.; *Experimental Supplementum* 52, (Kagi J.H.R, Kojima Y. eds), *Birkhauser-Verlag, Basel* 1987, 25-61.

Kagi JH. Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: In: Suzuki KT., Imura, N., Kimura M. (Eds.), Metallothionein III. *Birkhauser-Verlag, Basel*, 1993, 29-55.

Kelly EJ, Sandgren EP, Brinster RL, Palmiter RD. A pair of adjacent glucocorticoid response elements regulate expression of two mouse metallothionein genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94, 10045-10050.

Kiang JG, Tsokos GC, Heat shock protein 70 kDa: Molecular biology, Biochemistry, and Physiology, *Pharmacol. Ther* 1998, 80, 2, 183-201.

Kille P, Stephens PE, Kay J. Elucidation of cDNA sequences for metallothioneins from rainbow trout, stone loach and pike liver using the polymerase chain reaction. *Biochim Biophys Acta* 1991, 23, 1089, 407-410.

Kito H, Ose Y, Sato T. Cadmium-binding protein (metallothionein) in carp. *Environ Health Perspect* 1986, 65, 117-124.

- Klaassen CD**, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999, 39, 267-294.
- Knowlton AA**, Brecher P, Apstein CS. Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia. *J Clin Invest* 1991, 87, 139-147.
- Koban M**, Yup AA, Agellon LB, Powers DA. Molecular adaptation to environmental temperature: heat-shock response of the eurythermal teleost *Fundulus heteroclitus*. *Mol. Mar. Biol. Biotech* 1991, 1, 1-17.
- Kothary RK**, Jones D, Candido EP. 70-Kilodalton heat shock polypeptides from rainbow trout: characterization of cDNA sequences. *Mol Cell Biol* 1984, 4, 1785-1791.
- Kukreja RC**, Kontos MC, Loesser KE, Batra SK, Qian YZ, Gbur CJ Jr, Naseem SA, Jesse RL, Hess ML. Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart. *Am J Physiol* 1994, 267, H2213-2219.
- Laios E**, Rebeyka IM, Prody CA. Characterization of cold-induced heat shock protein expression in neonatal rat cardiomyocytes, *Mol. Cell Biochem* 1997, 173 153-159.
- Langmade SJ**, Ravindra R, Daniels PJ, Andrews GK. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem* 2000, 275, 34803-34809.
- Latchman DS**. Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc Res.* 2001, 51, 637-46.
- Le'John HB**, Cameron LE, Yang B, MacBeath G, Barker DS, Williams SA. Cloning and analysis of a constitutive HSP70 gene inducible by L-glutamine. *J. Biol. Chem* 1994, 269, 4513-4522.
- Lele Z**, Engel S, Krone PH. hsp47 and hsp70 gene expression is differentially regulated in a stress- and tissue-specific manner in zebrafish embryos. *Dev Genet* 1997, 21, 123-133.
- Lepore DA**, Knight KR, Anderson RL, Morrison WA. Role of priming stresses and Hsp70 in protection from ischemia-reperfusion injury in cardiac and skeletal muscle. *Cell Stress Chaperones*. 2001, 6, 93-96.
- Leung S.-M**, Hightower LE. Mammalian Hsc70 and Hsp70 proteins. In: Guidebook to Molecular Chaperones and Protein Folding Catalysts, Gething, M. -J. (ed.) Oxford University Press, Sambrook & Tooze Imprint, Oxford 1997, pp. 52-58.
- Lim EH**, Brenner S. Short-range linkage relationships, genomic organisation and sequence comparisons of a cluster of five HSP70 genes in *Fugu rubripes*. *Cell Mol Life Sci* 1999, 55, 668-78.
- Lin AY**, Chang SC, Lee AS. A calcium ionophore-inducible cellular promoter is highly active and has enhancer-like properties. *Mol. Cell. Biol* 1986, 6, 1235-1243.

- Lindquist S.** The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem* 1986, 55, 1151-1191.
- Liu J, Klaassen CD.** Absorption and distribution of cadmium in metallothionein-I transgenic mice. *Fundam Appl Toxicol* 1996a, 29, 294-300.
- Liu J, Liu Y, Michalska AE, Choo KH, Klaassen CD.** Distribution and retention of cadmium in metallothionein I and II null mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996b, 136, 260-268.
- Locke M, Noble EG, Tanguay RM.** Activation of heat-shock transcription factor in rat heart after heat shock and exercise. *Am J Physiol* 1995, 268, C1387-1394.
- Maloyan A, Palmon A, Horowitz M.** Heat acclimation increases the basal HSP72 level and alters its production dynamics during heat stress. *Am J Physiol* 1999, 276, R1506-1515.
- Margoshes M, Vallee BL.** A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc* 1957, 79, 4813-4814.
- Marshall JS, DeRocher AE, Keegstra K, Vierling E.** Identification of heat shock protein hsp70 homologues in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87, 374-378.
- Matsumoto M, Fujimoto H.** Cloning of a hsp70-related gene expressed in mouse spermatids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990, 15, 166, 43-49.
- Meng X, Brown JM, Ao L, Nordeen SK, Franklin W, Harken AH, Banerjee A.** Endotoxin induces cardiac HSP70 and resistance to endotoxemic myocardial depression in rats. *Am J Physiol* 1996a, 271, C1316-1324.
- Meng X, Brown JM, Ao L, Banerjee A, Harken AH.** Norepinephrine induces cardiac heat shock protein 70 and delayed cardioprotection in the rat through alpha 1 adrenoceptors. *Cardiovasc Res* 1996b, 32, 374-383.
- Mestril R.** Stress protein involvement in cardioprotection induced by hypothermia. *J Mol Cell Cardiol.* 2001, 33, 2075-2078.
- Milner CM, Campbell RD.** Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 1990, 32, 242-51.
- Moffatt P, DenizEAU F.** Metallothionein in physiological and physiopathological processes. *Drug Metab Rev* 29, 261-307.
- Molina A, Biemar F, Muller F, Iyengar A, Prunet P, Maclean N, Martial JA, Muller M.** Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish. *FEBS Lett* 2000, 474, 5-10.

Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C. The stress response, function of the proteins, and perspectives. In *Stress proteins in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 1990, p. 1-36.

Morimoto RI. Cell in stress: Transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 1993, 259, 1409-1410.

Morimoto RI, Jurivich DA, Kroeger PE, Mathur SK, Murphy SP, Nakai A, Sarge K, Abravaya K, Sistonen LT. Regulation of Heat Shock Gene Transcription by a Family of Heat shock Factors. 1994, *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1994a.

Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1994b.

Morimoto RI, Kroeger PE, Cotto JJ. The transcriptional regulation of heat shock genes: a plethora of heat shock factors and regulatory conditions. *Experientia*, 1996, 77, 139-163.

Morimoto RI, Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. *Genes & Development* 1998, 12, 3788-3796.

Morshauser RC, Wang H, Flynn GC, Zuiderweg ER. The peptide-binding domain of the chaperone protein Hsc70 has an unusual secondary structure topology. *Biochemistry* 1995, 34, 6261-6266.

Munro S, Pelham HR. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 1986, 46, 291-300.

Muto N, Ren HW, Hwang GS, Tominaga S, Itoh N, Tanaka K. Induction of two major isoforms of metallothionein in crucian carp (*Carassius cuvieri*) by air-pumping stress, dexamethasone, and metals. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1999, 122, 75-82.

Nakai A, Kawazoe Y, Tanabe M, Nagata K, Morimoto RI. The DNA-binding properties of two heat shock factors, HSF1 and HSF3, are induced in the avian erythroblast cell line HD6. *Mol Cell Biol* 1995, 10, 5268-5278.

Nakai A, Ishikawa T. Cell cycle transition under stress conditions controlled by vertebrate heat shock factors. *EMBO J* 2001, 20, 2885-2895.

Nakai A, Tanabe M, Kawazoe Y, Inazawa J, Morimoto RI, Nagata K. HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol Cell Biol* 1997, 1, 469-481.

Nath R, Kumar D, Li T, Singal PK. Metallothioneins, oxidative stress and the cardiovascular system. *Toxicology* 2000, 155, 17-26.

Nielson KB, Winge DR. Order of metal binding in metallothionein. *J Biol Chem* 1983, 258, 13063-13069.

Nover L. The heat shock Response, *CRC Press, Boca Raton, FI* 1991.

Olafson RW, Thompson JAJ. Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates. *Mar Biol*, 28, 83-86.

Page R.D.M., Tree view: An application to display phylogenetic trees on personal computers, *Computer Applications in the Biological Sciences* 1996, 12, 357-358.

Palmiter RD. Molecular biology of metallothionein gene expression *Experientia Suppl* 1987, 52, 63-80.

Park JH, Lee JJ, Yoon S, Lee JS, Choe SY, Choe J, Park EH, Kim CH. Genomic cloning of the Hsc71 gene in the hermaphroditic teleost *Rivulus marmoratus* and analysis of its expression in skeletal muscle: identification of a novel muscle-preferred regulatory element. *Nucl. Acids Res* 2001, 29, 3041-3050.

Pauli D., Tissieres A. Development expression of the heat shock genes in *Drosophila melanogaster*, In :Stress proteins in biology and medicine, Eds R.I Morimoto, A. Tissieres, and C. Georgopoulos, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.1990, p. 361-378.

Phillips GJ, Silhavy TJ. Heat-shock proteins DnaK and GroEL facilitate export of LacZ hybrid proteins in *E. coli*. *Nature* 1990, 344, 882-884.

Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 1997, 18, 306-360.

Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palmiter RD. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 1994, 33, 7250-7259.

Rabergh CM, Airaksinen S, Soitamo A, Bjorklund HV, Johansson T, Nikinmaa M, Sistonen L. Tissue-specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress. *J Exp Biol*, 2000, 203, 1817-1824.

Ramakrishnan M, Tugizov S, Pereira L, Lee AS. Conformation-defective herpes simplex virus 1 glycoprotein B activates the promoter of the grp94 gene that codes for the 94-kD stress protein in the endoplasmic reticulum. *DNA Cell Biol* 1995, 5, 373-384.

Ramsey AJ, Russell LC, Whitt SR, Chinkers M. *J. Biol. Chem* 2000, 275, 17857-17862.

Ren HW, Itoh N, Kanekiyo M, Tominaga S, Kohroki J, Hwang G. S, Nakanishi T, Muto N, Tanaka K. Two metallothioneins in the freshwater fish, Curcian carp

(*Carassius curvieri*): cDNA cloning and assignment of their expression isoforms. *Biol. Pharm. Bull* 2000, 23, 145-148.

Ribeiro SP, Villar J, Downey GP, Edelson JD, Slutsky AS. Sodium arsenite induces heat shock protein-72 kilodalton expression in the lungs and protects rats against sepsis. *Crit Care Med.* 1994, 22, 922-929.

Rippmann F, Taylor WR, Rothbard JB, Green NM. A hypothetical model for the peptide binding domain of hsp70 based on the peptide binding domain of HLA., *EMBO J* 1991, 5, 1053-1059.

Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962, 18, 571-573.

Roesijadi G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 1992, 22, 81-113.

Russell LC, Whitt SR, Chen M.-S, Chinkers M. Identification of conserved residues required for the binding of a tetratricopeptide repeat domain to heat shock protein 90. *J. Biol. Chem* 1999, 274, 20060-20063.

Sanders BM. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol* 1993 23, 49-75.

Santacruz H, Vríz S, Angelier N. Molecular characterization of a heat shock cognate cDNA of zebrafish, hsc70, and developmental expression of the corresponding transcripts. *Dev Genet* 1997, 21, 223-233.

Schlesinger MJ. Heat shock proteins. *J. Biol. Chem* 1990, 265, 12111-12114.

Scudiero R, Carginale V, Riggio M, Capasso C, Capasso A, Kille P, di Prisco G, Parisi E. Difference in hepatic metallothionein content in Antarctic red-blooded and haemoglobinless fish: undetectable metallothionein levels in haemoglobinless fish is accompanied by accumulation of untranslated metallothionein mRNA. *Biochem J.* 1997, 322, 207-211.

Shi Y, Zhao M, Xu X.. Comparative study of expression levels of the major human heat shock proteins in cancer and normal tissues *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 1998, 20, 277-279.

Silver PA, Way JC. Eukaryotic DnaJ homologs and the specificity of hsp70 activity. *Cell* 1993, 74, 5-6.

Singal PK, Dhillon KS, Beamish RE, Dhalla NS. Protective effect of zinc against catecholamine-induced myocardial changes electrocardiographic and ultrastructural studies. *Lab Invest* 1981, 44, 426-433.

Sorger PK, Pelham HR. Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast. *EMBO J* 1987, 6, 3035-3041.

- Stuart RA**, Cyr DM, Neupert W. Hsp70 in mitochondrial biogenesis: From chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation. *Experientia* 1994, 50, 1002-1011.
- Su CY**, Chong KY, Chen J, Ryter S, Khardori R, Lai CC. A physiologically relevant hyperthermia selectively activates constitutive hsp70 in H9c2 cardiac myoblasts and confers oxidative protection. *J Mol Cell Cardiol* 1999, 31, 845-855.
- Suzuki TK**. Metallothionein: analysis in tissues and toxicological significance. Cadmium in the *Human Environment* 1992, 211-216.
- Terlecky SR**. Hsp70s and lysosomal proteolysis. *Experientia* 1994, 50, 1021-1025.
- Tissieres A**, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 1974, 84, 389-398.
- Torok Z**, Horvath I, Goloubinoff P, Kovacs E, Glatz A, Balogh G, Vigh L. Evidence for a lipochaperonin: association of active protein-folding GroESL oligomers with lipids can stabilize membranes under heat shock conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94, 2192-2197.
- Turan B**, Fliss H, Desilets M. Oxidants increase intracellular free Zn²⁺ concentration in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1997, 272, H2095-2106.
- Uchida Y**, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 1991, 7, 337-347.
- Wang TF**, Chang JH, Wang C. Identification of the peptide binding domain of hsc70. 18-Kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding. *J Biol Chem* 1993, 268, 26049-26051.
- Webb M**. Toxicological significance of metallothionein. In: Metallothionein II, Kagi and Kojima (ED.), *Birkhauser, Basel* 1987, 109-134.
- Westin G**, Schaffner W. Heavy metal ions in transcription factors from HeLa cells: Sp1, but not octamer transcription factor requires zinc for DNA binding and for activator function. *Nucl. Acids Res* 1988, 13, 5771-5581.
- Wu C**. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995, 11, 441-469.
- Wynn RM**, Davie JR, Cox RP, Chuang DT. Molecular chaperones: heat-shock proteins, foldases, and matchmakers. *J Lab Clin Med* 1994, 124, 31-36.
- Yamashita M**, Ojima N, Sakamoto T. Induction of proteins in response to cold acclimation of rainbow trout cells. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Letters* 1996, 382, 261-264.

Yellon DM, Latchman DS. Stress proteins and myocardial protection. *J Mol Cell Cardiol*, 1992, 24, 113-124.

Zafarullah M, Wisniewski J, Shworak NW, Schieman S, Misra S, Gedamu L. Molecular cloning and characterization of a constitutively expressed heat-shock-cognate hsc71 gene from rainbow trout. *Eur J Biochem* 1992, 204, 893-900.

Zhou Y, Lee AS. Mechanism for the suppression of the mammalian stress response by genistein, an anticancer phytoestrogen from soy. *J Natl Cancer Inst* 1998, 90, 381-388.

Zhou T, Zhou G, Song W, Eguchi N, Lu W, Lundin E, Jin T, Nordberg G. Cadmium-induced apoptosis and changes in expression of p53, c-jun and MT-I genes in testes and ventral prostate of rats. *Toxicology*, 1999;142, 1-13.

1F →			
C	-----AIGIDLGTTYSWVGGVQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQ		53
Z1	MSSPKGI.....C..VS.....NA.....L		60
Z2	MS--KGP.V.....C..VF.....D.....		58
C	VAMNPNNTVFDAKRLIGRKFDPPVVQSDMKHWSFQVVS	DGGKPKVQVEYKGENKTFYPEE	113
Z1	R...H.....K..R.....A..HS..D...N...		120
Z2	T...L..N..N..Q...G.....P.N.IN.NSR.....S.S.....		118
C	ISSMVLVKMKEIAEAYLGQKV	TNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLN	VLENINEPTA 173
Z1	E.H.....V.....ARI....RP		180
Z2	T.....KT.S.....S.....T.S.....VI.....		178
hsp70-3 →			
C	AAIAYGLDKGKASERNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMV		233
Z1	S.....E.....V.....T.		240
Z2	KVGA.....S.....S.....		238
C	NHFVEEFKRKHKKDISQNKRALRRLRTACERAKRTLSSSSQASIEIDSLYEGIDFYTSIT		293
Z1			300
Z2	...IT.....D...V.....T.....		298
hsp705 →			
C	RARFEEMCSDLFRGTL	EPVEKALRDAKMDKSQINDVVLVGGSTRIPKIQKLLQDFFNRRE	353
Z1	L.....D.....A..H.....G..		360
Z2	LND.....D.....A.....Y..GK.		358
←2R			
C	LNKSINPDEAVAYGA	AVQAAILMGDTSGNVQDLLLLDVAPLSLGIETAGGVMTPLIKRNT	413
Z1	M.....A.....		420
Z2	S..K.E.....T.....V.....		418
C	TIPTKQTQTFTTYSANQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPAPRGVPQIEVTF		473
Z1	A...D.....F...G.....D.....		480
Z2	D.....		478
← 4R			
C	DIDANGILNVS	AVDKSTGKENKITITINDKGRLSKEEIERMVQDADKYKAEDDLQREKIAA	533
Z1	A.....Q.....E.....S.		540
Z2	M.....D.....E.E.....V..D.VS.		538
C	KNSLESYAFNMKNSVEDENLKGKISEDDKKKVIEKCNEAVSWLENNQLADKEEYEHHLKE		593
Z1	D.....E...R.V.....R.....Q...		600
Z2	..G.....ST...K.....DE..Q.ILD...VIG..DK..T.ER..F..QQ..		598
← 6R			
C	LEKVCNPLITKLYQ-----GGMPAGGCG--AQAHGRIRAALR-PTIEEVD		635
Z1	V.S.....-----RAASG.SAQG.....		643
Z2	I.T....SAGGMP....E.MP.GFPG.GAAPGGGSSG.....		649

8. ábra: A ponty Hsp70 (C) és zebradánió Hsp70 (Z1), valamint Hsc70 (Z2) szekvenciák összehasonlítása. A teljes szekvenciát csak a ponty esetében tüntettük fel, a többi esetben csak az eltérő aminosavakat jelöltük. A ponty Hsc70/Hsp70 általános és Hsp70 specifikus primerek pozícióját aláhúzással jelöltük.

hsc1	GCTGTTGGTATCGACCTGGGCACCACCTACTCCTGTGTGGGAGTCTTCCAGCATGGTAAG	60
hsc2	T.....A..T.....A.....A..A	60
hsp	G.....G.GTG.T.....A..A	60
hsc1	GTGGAGATCATCGCCAATGACCAGGGGAACAGAACAACCCCCAGCTATGTCGCCTTTACA	120
hsc2	..T..A.....T..T.....A..A.....G..C..T..A.....A..T..C...	120
hsp	A.....A.....T.....C...	120
hsc1	GACACCGAAAGACTGATCGGAGATGCAGCCAAGAACCAAGTAGCCATGAACCCCCAACAAAC	180
hsc2	..T..T..G..GT....T.....T..A..A.....G..C.T.....C.G..	180
hsp	T..G..G.....T.....T..A.....G..G.....	180
hsc1	ACAGTGTTTGATGCCAAGCGCTTGATTGGTCGACGCTTTGATGACCCTGTGGTTCAGTCT	240
hsc2	C.....A..TC.....C..GAAG.....TGGG..T..G..A...	240
hsp	..C.....C.....AA.GC.....C..CA..AAG.....A..T..G.....	240
hsc1	GACATGAAGCACTGGCCCTTTAAGGTAATCAATGATGGTAGTAAGCCCCAAGATGGAAGTG	300
hsc2	..T.....T.....T..C.....CAA..CCCGT.....G.TC.G..T	300
hsp	T.T..CC.A..CG...G.....AG.G.....G..AG.TC....T	300
hsc1	GAGTACAAAGGAGAGATAAAGTCCTTCTACCCTGAAGAGGTCTCCTCTATGGTCCTCACT	360
hsc2	..A.....G..T....CC.....T.....A.T.....C.....T.....C	360
hsp	..A.....A.AC...A.A..T..T.....A.T.....GGTG	360
hsc1	AAGATGAAGGAGATCTCTGAGGCTTACCTGGGCAAGCCAGTGTCAAATGCAGTCATTACA	420
hsc2	A..TG.....C.....A..A.T..T..C..C..T...G.C...	420
hsp	TG...A.....T.....GC..AAG...A.....T..C...	420
hsc1	GTGCCTGCTTACTTTAATGACTCTCAACGCCAAGCCACCAAGGACGCTGGAACAATTGCT	480
hsc2	C.....C..C..T.....G..A..G.....T.....C..CT..	480
hsp	..T.....C.....C.....C..GA.G.....G..T..A.....GT...C...	480
hsc1	GGCCTTGACGTCCTCCGCATTACCAACGAGCCAACGGCCGCTGCCATCGCGTATGGATTG	540
hsc2	...T.GA.T..T..GG.T..C.T...T..A.....T..T.....T..T..T..C..T...	540
hsp	..AT.GA.T.....TGAG.AC.T.....C..A..T..A.....T..C..C..CC.T	540
hsc1	GACAAAAAGGTTGGTGCTGAGCGCAATGTCCTAATCTTTGATTTGGGTGGCGGCACCTTT	600
hsc2	A.G.....C.....C...C.T.....T.....T..C	600
hsp	GGCAAA.C.T.A.....C.....G.....CC...A..A.....	600
hsc1	GACGTGTCCATTCTGACGATTGAGGATGGCATTTTTGAAGTCAAGGCTACTGCTGGTGAC	660
hsc2	..T.....T..C..C..C.....C.....G..A..AT.....A...	660
hsp	..T.....C.....C.....A.....C.....G..G.....C..A.....A...	660
hsc1	ACCCATCTGGGTGGTGAAGACTTCGACAACCGAATGGTCAACCACTTCATTGCAGAGTTC	720
hsc2	..T..CT.....A.....T..T.....C.....G.....CA.....	720
hsp	..T.....G..G.....T.....C.....TG.G.AG.....	720
hsc1	AAGCGCAAATTCAAGAAAGACATCACTGGGAATAAACGTGCAGTCCGTCGCCTGCGGACA	780
hsc2	GCA.....G.....GC.AC..C..GA.A..C..T..C..T..C..C..C	780
hsp	...A.G..GCA.....G.....G.CA...C..GA.G..CC.GA.GA.G.....T...	780
hsc1	GCATGTGAGCGCGCCAAGCGCACCTTTCTCCAGTACGCAGGCTAGCATTGAGATCGAC	840
hsc2	..C..C...A.G.....T.....G.....C..T.....C..T.....	840
hsp	A.....A.G..A..C..G.....CT.T.....C.....	840
hsc1	TCTCTGTATGAAGGTTCCGACTTCTACACTTCCATCACCAGAGCACGTTTTGAGGAGCTC	900
hsc2	..C..C.....G...AT.....T..C.....G..C.....	900
hsp	..G.....C..G..CAT.....G.....T..C.....A..A.G	900

hsc1 AATGCCGACCTTTTCCGTGGTACACTGGAGCCGGTGGAAAAGTCTCTGCGGGATGCCAAG 960
hsc2 ..C..T.....C.....C..CT....C..A..C..G.....C..T..T..C..... 960
hsp TGCT.A.....C...A.A..A.....T.....T.....AG.C...A.A..C..... 960

hsc1 ATGGACAAGGCACAGATCCATGACATTGTGCTGGTTGGTGGCTCCACTCGCATTCCTAAA 1020
hsc2T.....C.....C..C..... 1020
hspT.T.....A.....G.....T.....A..A..A..AA.A.....A..G 1020

hsc1 ATCCAAAAGTTGCTTCAGGACTTATTTAACGGCCGGGATCTTAACAAAAGCATCAACCCT 1080
hsc2G...C....C...A....AC..C.....AA...G.....T..G.....C.....C 1080
hspG...C.T..G.....T..C..C..TC..A.A..A.....G.....T..A 1080

hsc1 GATGAAGCAGTAGCTTATGGAGCAGCTGTCCAGGCAGCCATTTTAGCAGGTGATAAATCG 1140
hsc2G..T..G..C..C.....T.....T.....CC.CT.T.....C..G..T 1140
hspG.....G.....T..T..A..T..A..C.....CC.CATG..A..C.C...T 1140

hsc1 GAGAACGTCCAAGACCTTTTGCTGCTGGATGTCACTCTTCTCTTTCTGGGCATTGAGACA 1200
hsc2T..T..G...T.GC.....A.....C...G.CC..T..A..... 1200
hsp .GA..T.....T.G.....T.....GG...CA..A.CCT.....G 1200

hsc1 GCTGGTGGTGTGTCATGACTGTGTTAATTAAGAGGAACACCACCATTCCCACCAAGCAAACC 1260
hsc2A.....CC.C..C...C.T..T.....T..C..A.....A..G..T 1260
hsp ..A.....A.....ACCC.G..C..AC.C.....C.....A..G... 1260

hsc1 CAGACTTTCACCACTTATTCGGACAACCAGCCTGGTGTACTGATCCAGGTATATGAGGGA 1320
hsc2C.....T.....A.....G..C..T.....T..... 1320
hspC.....C..C..A.CA.....C.....C.....T.....G..... 1320

hsc1 GAGAGAGCAATGACGAAGGATAACAACCTTCTTGCAAATTTGAGTTGACTGGCATCCCT 1380
hsc2 ..CGTGC..T....C.....T.G..G.....G.....C.T.....A.....C 1380
hspG..C.....A..A..C.....G..G..T.....C....A..A.....A 1380

hsc1 CCTGCTCCTTGTGGTGTGCCACAAATTGAAGTTACATTTGACATTGATGCCAATGGCATT 1440
hsc2A...C.A.....T..C..G..A..G..C..C.....C 1440
hspG..AC....A..C.....G..C.....G..C.....C.....C..A..C 1440

hsc1 CTCAATGTGTCCGCAGTGGACAAAAGCACTGGCAAAGAGAACAAGATCACTATCACCAAT 1500
hsc2 A.G.....T.....T..T..T..G.....G.....A.....C.....C 1500
hsp ..A.....G.....A.....C..... 1500

hsc1 GACAAAGGTCGTTTGAGCAAGGAAGAAATTGAACGTATGGTACAGGAAGCTGACCAATAC 1560
hsc2 ..T..G.....C.T.....G..C.....G..C.....G.....G..A..GA.G... 1560
hspG..CA.AC....T..A..G..G.....GA.G.....G.....C..A..A..... 1560

hsc1 AGAGCAGAGGACGAAGCCCAGAAGGAGAAGGTCACCTGCCAAGAACAACCTTTGGAGTCGCTG 1620
hsc2 .AG.TT....T..T.TG...CGT..C.....GT.....TGG.C....A..CTAT 1620
hsp .A...T..A..T..TCTG..A.GA.....A.TG.....A...T..C.....TTAC 1620

hsc1 GCCTTTAACATGAAGAGCACTGTGGAGGATGACAAGCTGAAGGACAAGATCAGTGCAGAG 1680
hsc2C.....ATC.....T.....G..A..A....G.....AT... 1680
hspC.....A..G.....A.....G..C.....A.G.....AG..C 1680

hsc1 GACAAAAAACTATTATTGACAAATGCAATGAGGTCATAGCCTGGTTGGACAGAAACCAG 1740
hsc2GC.G.AG..CC.....G.....A.....CAGT...C.T....AG..... 1740
hspG..G.AAG.T.....G.....T..C....C.G.CAG....C.A..A.AC..... 1740

hsc1 ACTGCAGAAAAGGATGAGTATGAGCACCAACAGAAGGAGCTGGAAAAAGTGTGCAACCCC 1800
hsc2T..G.....A..A.T.....G.....G..G..A..... 1800
hsp CTG..T..T..A..G.....A..T..T.T.....G.....C.....A 1800

```

hsc1 ATCATCACCAAGCTCTATCAGGGCACTGGTGACATGCCAGGTGGAATGCCGGGTGGAATG 1860
hsc2 .....G..C...A.TG....A.G.....T.A..GT... 1860
hsp  C.....T..A..G.....-----..A.GG.....C....G-----.A..TGGA. 1849

hsc1 CCTGGGGGATTTCCTGGAAGGG-----CGGGAAC TTGTTCTCCTCTGGTCCTACC 1911
hsc2 .....C..C..C..A...GCC.GTTCTGCTC.A...G--..G.A..G..A..C..A... 1917
hsp  .TCA..CACA.----.....A-----T.A..-GC-----GCG...A..C..-... 1893

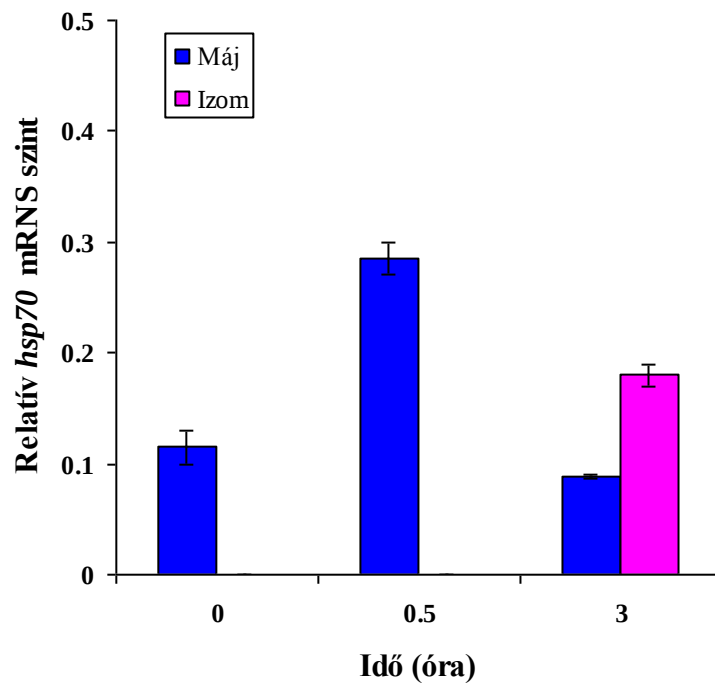
hsc1 ATTGAGGAGGTTGAC 1926
hsc2 ..... 1932
hsp  ..... 1905

```

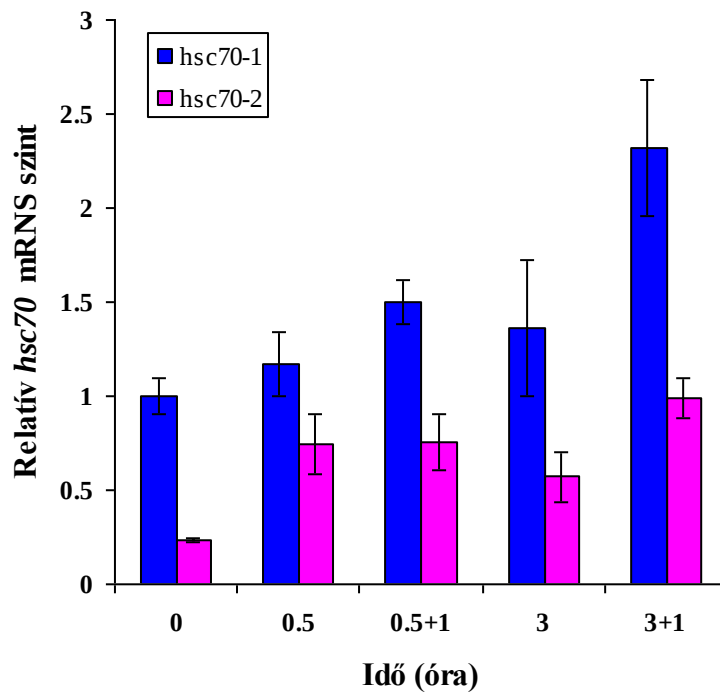
9. ábra: A ponty *hcs70-1* (hsc1), *hsc70-2* (hsc2) és *hsp70* (hsp) cDNS szekvenciák összehasonlítása.

		7F	
Carp	HSC70-1	AVGIDLGT TT YSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVAMNPN	60
Carp	HSC70-2	V...TD	60
Riv	HSC70	I.....S.	65
Zebr	HSC70	T.	65
		↓	
		8R	
Carp	HSC70-1	TVFDAKRLIGRRFDDPVVQSDMKHWPFKVINDGSKPKMEVEYKGEIKSFYPEEVSSMVL	120
Carp	HSC70-2	K...G.....N...NTR..VQ.....T.....	120
Riv	HSC70	KY.....S.....I.....	125
Zebr	HSC70	..L..N..N..Q...G.....N...N.R..VQ.....S.....	125
		↓	
		G-1R	
Carp	HSC70-1	KMKEISEAYLGKPVSNVITVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLDVLRITNEPTAAAIAYGL	180
Carp	HSC70-2	A.....T.....V.....S..N..G.I.....	180
Riv	HSC70	S.T.....S..N..I.....	185
Zebr	HSC70	A.....T.....S.....S..N..V.I.....	185
		↓	
Carp	HSC70-1	DKKVGAEARNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFIAEF	240
Carp	HSC70-2	S.....T.....	240
Riv	HSC70	G.....	245
Zebr	HSC70	S.....S.....T.....	245
		↓	
Carp	HSC70-1	KRKFKKDITGNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQASIEIDSLYEGSDFYTSITRARFEEL	300
Carp	HSC70-2	...H....SD.....I.....	300
Riv	HSC70	VS.....T.....	305
Zebr	HSC70	...H....SD.....I.....	305
		↓	
Carp	HSC70-1	NADLFRGTLFVEKSLRDAKMDKAQIHIDIVLVGGSTRIPKIQKLLQDLFNGRDLNKSINP	360
Carp	HSC70-2	D.....Y...KE.....	360
Riv	HSC70	S.....F.....	365
Zebr	HSC70	D...A.....Y...KE.....	365
		↓	
Carp	HSC70-1	DEAVAYGA AV QAAILAGDKSENVQDLLLLDVTLFLGIETAGGVMTVLIKRNTTIPTKQT	420
Carp	HSC70-2	S.....P.S.....	420
Riv	HSC70	Q...P.S.....	425
Zebr	HSC70	S.....P.S.....	425
		↓ G-2F	
Carp	HSC70-1	QTFTTYS DN QPGVLIQVYEGGERAMTKDNNLLGKFELTGIPPAPCGVPQIEVTFDIDANGI	480
Carp	HSC70-2	DVPL.....R.....	480
Riv	HSC70	I.....R.....	485
Zebr	HSC70	R.....	485
		↓	
		9F	
Carp	HSC70-1	LNVS AV DKSTGKENKITITNDKGRLSKEEIERMVQEADQYRAEDEAQKEKVTAKNTLES	540
Carp	HSC70-2	M.....D.....EK.KV..DV.RD..S...G...Y	540
Riv	HSC70	D.....E.F.T...RD.I.....S...	545
Zebr	HSC70	M.....D.....EK.K...DV.RD..S...G...Y	545
		↓	
Carp	HSC70-1	AFNMKSTVEDDKLKDKISAEDKKTIIDKCNEVIAWLDRNQTAEKDEYEHQQKELEKVCNP	600
Carp	HSC70-2	E...G...D...QK.L.....S...K.....E.F.....	600
Riv	HSC70	E...Q...P.....V.....S.....	605
Zebr	HSC70	E...G...D...QK.L.....G...K.....RE.F.....	605
		10R	
Carp	HSC70-1	IITKLYQ G --TGDMPPGGMPG----GMPGGFPG--RAGTGSSSGPTIEEVD	642
Carp	HSC70-2	S--A.G.....D----AGS.PG.A.....	644
Riv	HSC70	..S.....GMP.G.....GMPG.....L..GAG..P.G.....	655
Zebr	HSC70	S--A.G.....E----AGA.PG.G.....	649

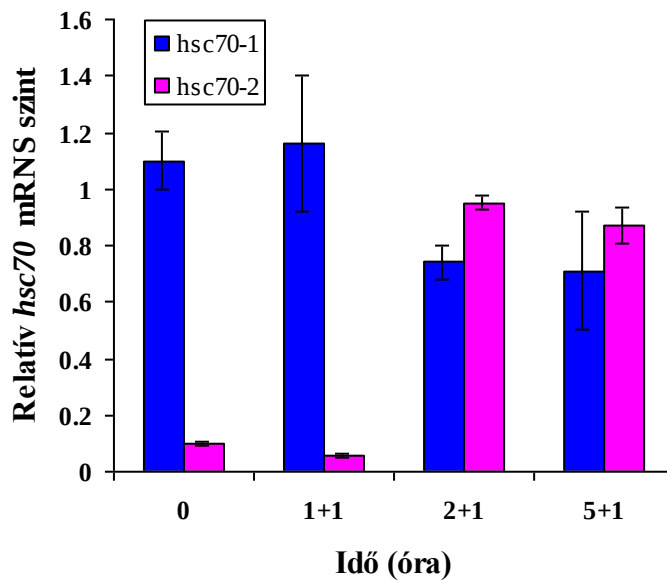
11. ábra: A ponty két Hsc70 (Hsc70-1 és Hsc70-2), zebradánió és Rivulus Hsc70 fehérje szekvenciáinak összehasonlítása. A teljes szekvenciát csak a ponty Hsc70-1 esetében tüntettük fel, a többi esetben csak az eltérő aminosavakat jelöltük. A két *hsc70* gén expressziójának tesztelésére használt primereket és a genomális DNS izolálásához használt primereket aláhúzással jelöltünk. A ponty *hsc70-1* és rivulus *hsc70* szekvenciákban azonosított exon határokat nyíl jelzi.



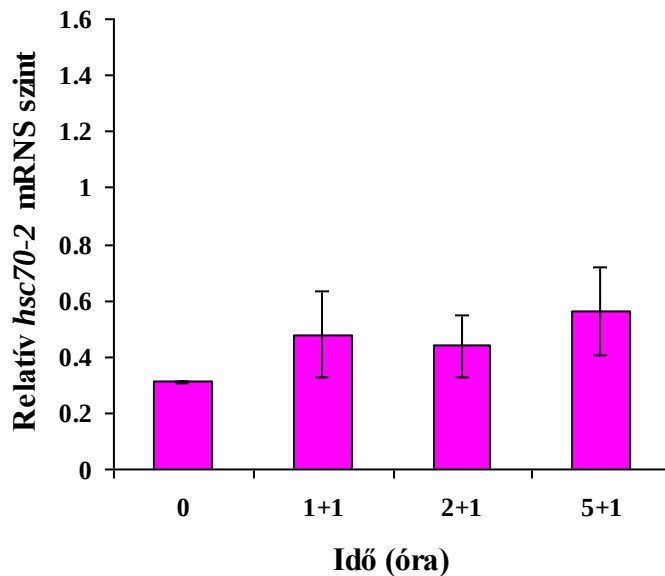
17. ábra: A *hsp70* gén indukciója hő sokk hatásnak kitett halak izom és máj szövetében. Jelölések: **0**: kontroll, **0.5** és **3**: 30 perc és 3 órás hőkezelés. Az adatok 3 egyedből történt mérések átlagai.



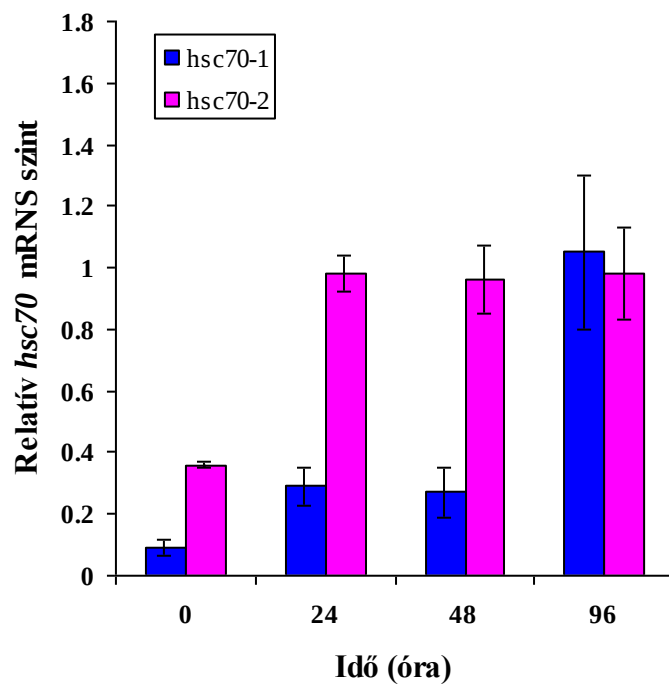
18. ábra: A *hsc70* gének indukciója az izomban hő sokk hatására. Jelölések: **0**: kontroll; **0.5**, **3**, **0.5+1** és **3+1** : 30 perc és 3 órás hőkezelés, illetve azt követő 1 óra *recovery* periódus. Az adatok 3 egyedből történt mérések átlagai.



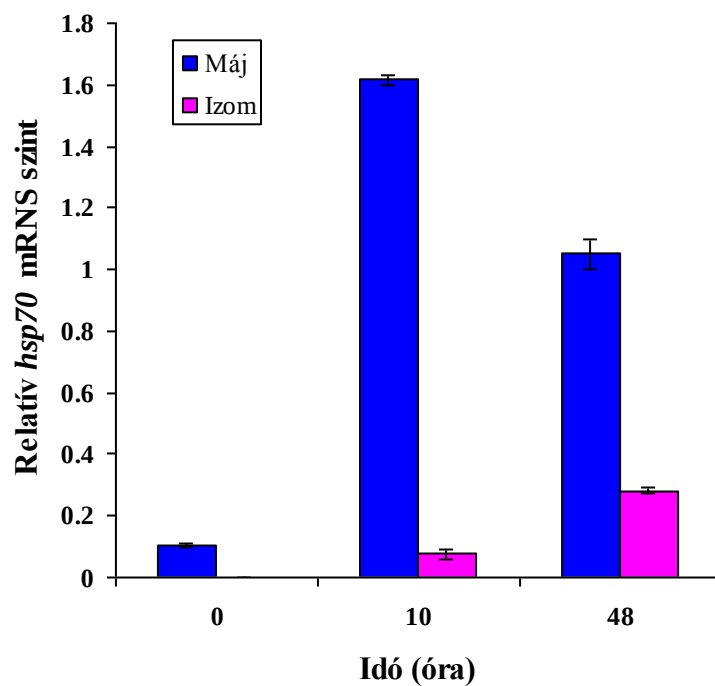
19. ábra: A *hsc70* gén indukciója hidegsokk hatását követően az izomban. Jelölések: **0**: kontroll; **1+1**, **2+1** és **5+1**: 1, 2 és 5 órás hidegsokkot követő 1 órás *recovery* periódus. Az adatok 3 egyedből történt mérések átlagai.



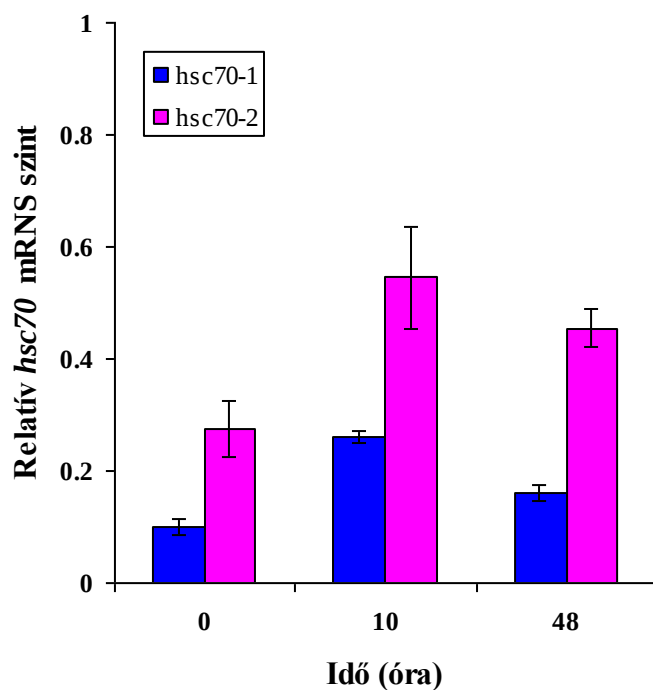
20. ábra: A *hsc70-2* indukciója a hidegsokk hatását követően májban. Jelölések: **0**: kontroll; **1+1**, **2+1** és **5+1**: 1, 2 és 5 órás hidegsokkot követő 1 órás *recovery* periódus. Az adatok 3 egyedből történt mérések átlagai.



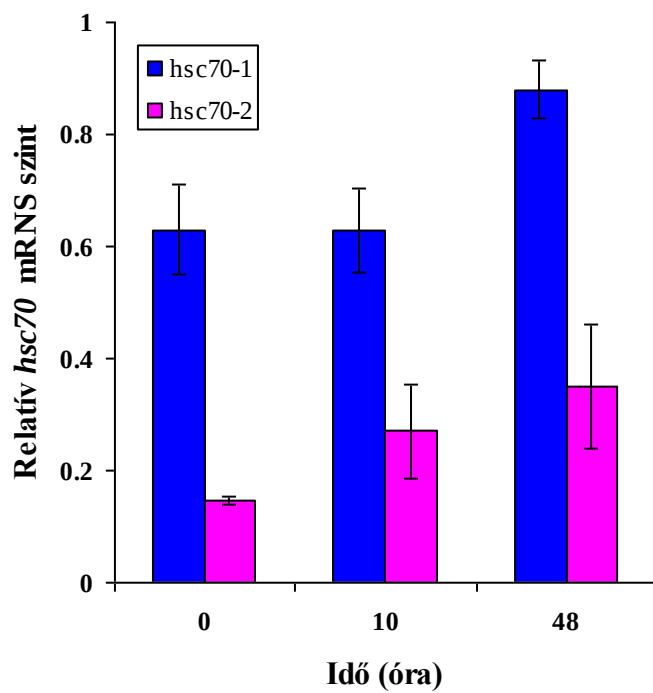
21. ábra: A *hsc70* gén indukciója 10 mg/kg Cd-mal kezelt halak májában. Az adatok 3 egyedből történt mérések átlagai.



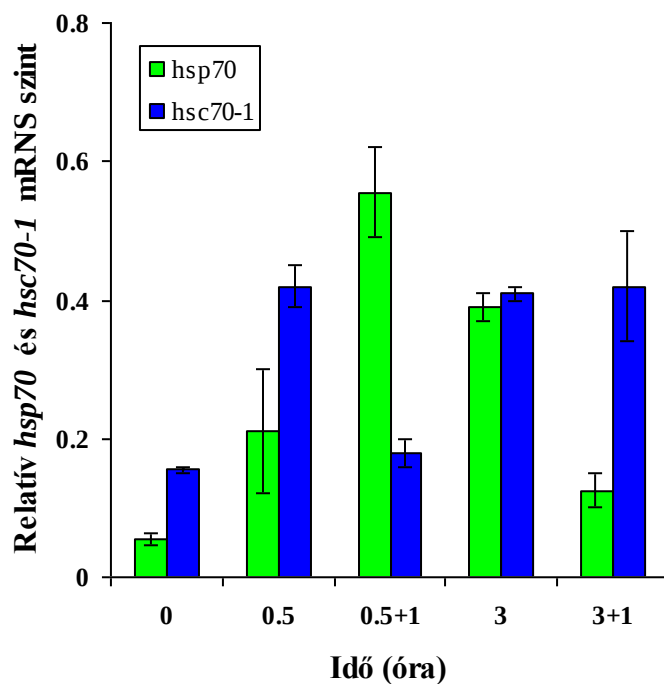
22. ábra: A *hsp70* gén indukciója 10 mg/kg Cd-mal kezelt halak izom és máj szövetében. Az adatok 3 egyedből történt mérések átlagai.



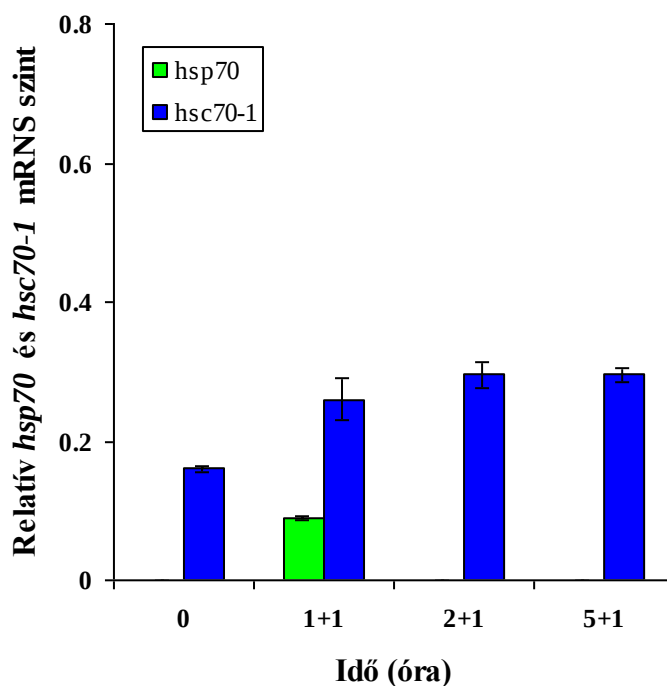
23. ábra: A *hsc70* gén indukciója a 10 mg/kg Cd-mal kezelt halak májában. Az adatok 3 egyedből történt mérések átlagai.



24. ábra: A *hsc70* gén indukciója 10 mg/kg Cd-mal kezelt halak izom szövetében. Az adatok 3 egyedből történt mérések átlagai.

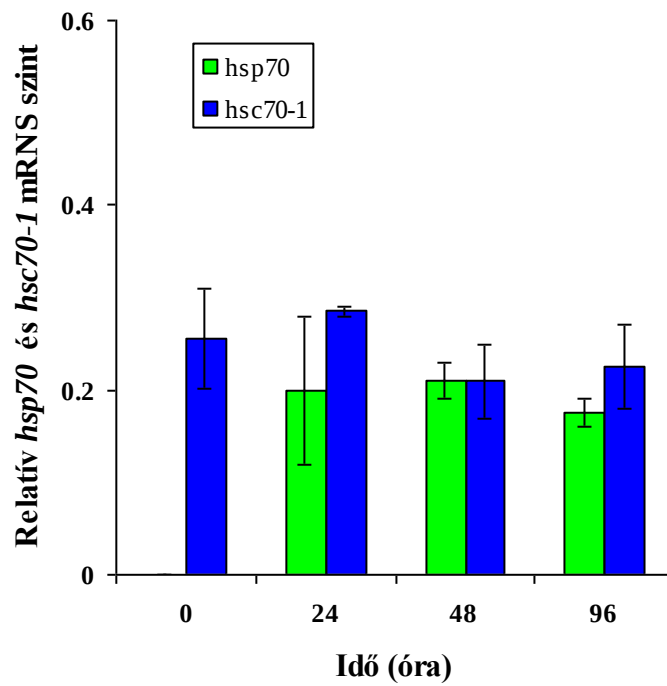


25. ábra: A *hsp70* és *hsc70-1* gének indukciója ponty szívben hő sokk hatására. Jelölések: **0**: kontroll; **0.5**, **0.5+1**, **3** és **3+1**: 30 perc és 3 órás hőkezelés, illetve azt követő 1 órás *recovery* periódus. Az adatok 3 egyedből történt mérések átlagai.

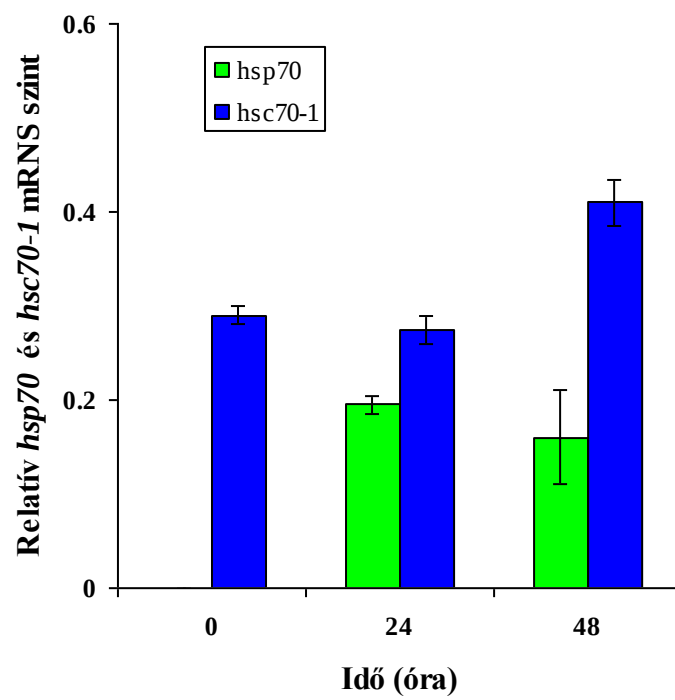


26. ábra: A *hsp70* és *hsc70-1* gének indukciója ponty szívben hidegsokk hatására. Jelölések: **0**: kontroll; **1+1**, **2+1** és **5+1**: 1, 2 és 5 órás hidegsokkot követő 1 órás *recovery* periódus. Az adatok 3 egyedből történt mérések átlagai.

A

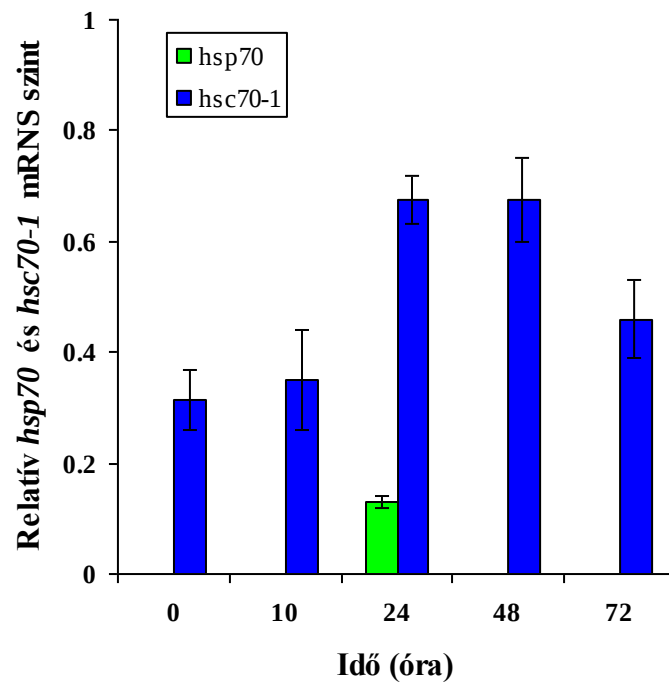


B

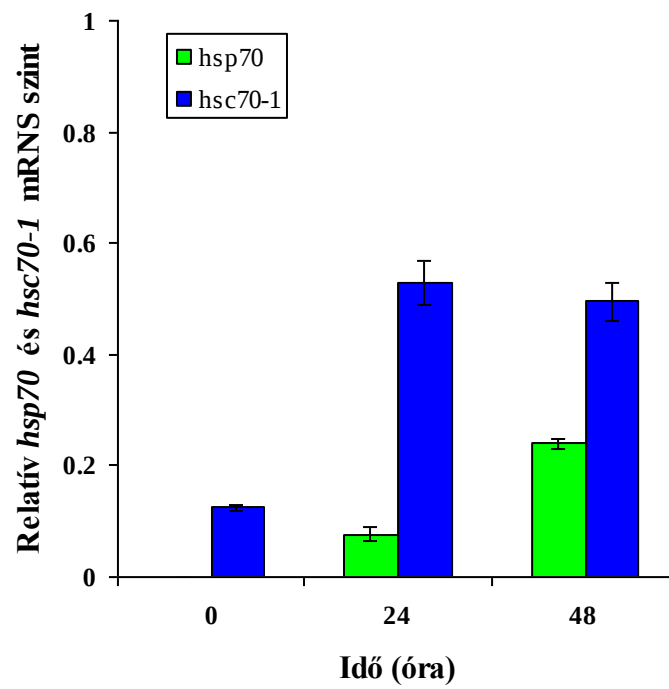


27. ábra: A *hsp70* és *hsc70-1* gének expressziója 10 mg/l (**A**) és 10 mg/kg (**B**) Cd-mal kezelt ponty szívben. Az adatok 3 egyedből történt mérések átlagai.

A

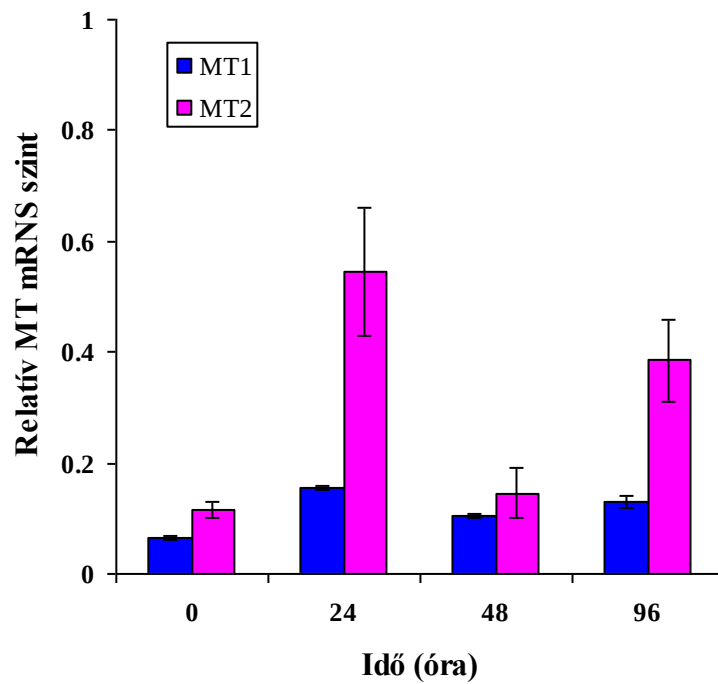


B

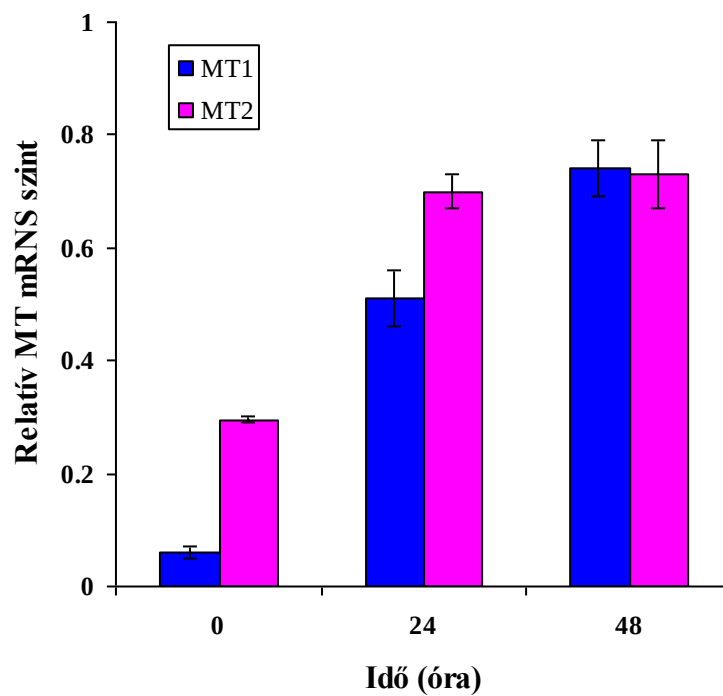


28. ábra: Ponty *hsp70* és *hsc70-1* gének indukciója 10 mg/l As (**A**) és Cu (**B**) kezelést követően szívben. Az adatok 3 egyedből történt mérések átlagai.

A

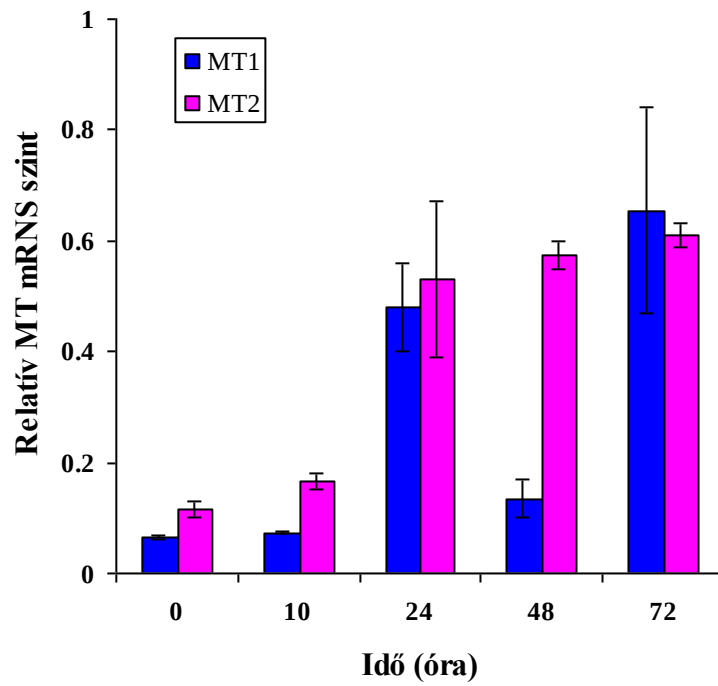


B

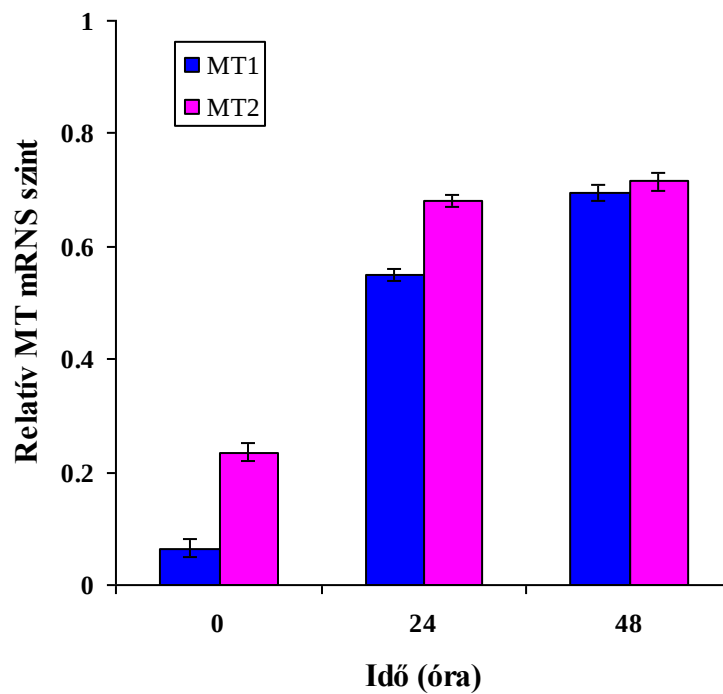


29. ábra: Az MT-1 és MT-2 gének expressziója 10 mg/l (**A**) és 10 mg/kg (**B**) Cd-mal kezelt ponty szívben. Az adatok 3 egyedből történt mérések átlagai.

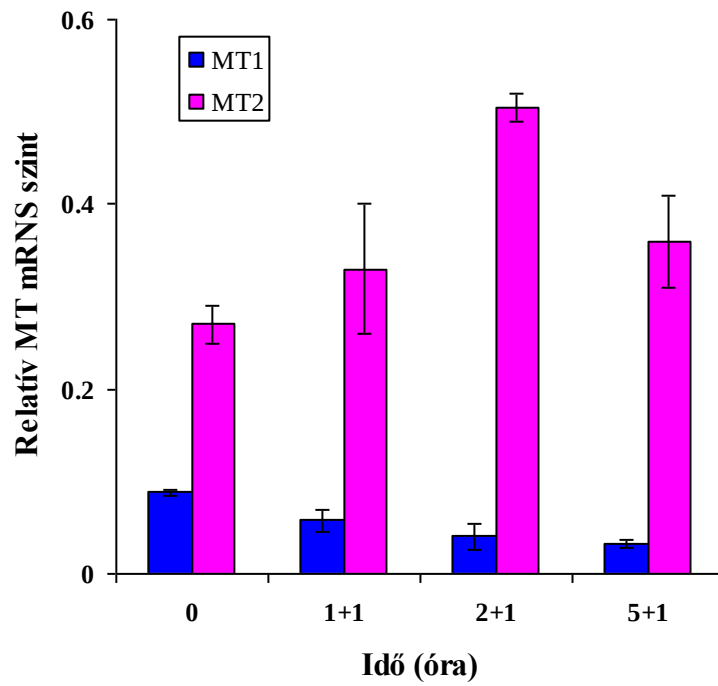
A



B



30. ábra: Az MT-1 és MT-2 gének indukciója 10 mg/l As (**A**) és Cu (**B**) kezelést követően ponty szívben. Az adatok 3 egyedből történt mérések átlagai.



31. ábra: Hidegsokk hatása az MT gének expressziójára a ponty szívizomban. Jelölések: **0**: kontroll; **1+1, 2+1, 5+1**: 1, 2 és 5 órás hidegsokkot követő 1 órás *recovery* periódus. Az adatok 3 egyedből történt mérések átlagai.