

Hipertermia-okozta stresszválasz molekuláris mechanizmusai emlős sejtekben

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Tiszlavicz Ádám István

Témavezető: Dr. Török Zsolt (tudományos főmunkatárs)



Környezettudományi Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet

2022

Szeged

Bevezetés

Az élőlények külső és belső környezete folyamatosan változik. A túlélés szempontjából elengedhetetlen a megváltozott körülményekhez történő alkalmazkodás. Azt az evolúciósan konzervált folyamatot, amely során a szervezet/sejt észleli a stresszt, válaszol rá és megbirkózik vele stresszválasznak nevezzük. Feladata elsősorban a homeosztázis fenntartása, védelem a makromolekuláris károsodásokkal szemben, valamint rezisztencia kialakítása, fenntartása és/vagy fokozása stressz esetén. A stresszre adott válasz magába foglalja az 1) érzékelést, vagyis a megváltozott fizikai-kémiai paraméterek hatására történő különböző szenzormolekulák aktivációját. Emellett a 2) jelátvitelt, amely során az érzékelt stressz jelként többféle biológiai kaskádon keresztül halad végig, hogy 3) kompenzációs folyamatokat aktiváljon. Ezek közé helyreállító és sejtvédő folyamatok tartoznak, mint pl. gének megváltozott expressziója, stresszfehérjék transzlokációja és szintézisüknek fokozódása, valamint a károsodott makromolekulák kezelése (fehérje-, lipid-, RNS-, DNS-védelem). Sikeres megküzdés esetén a sejtek túlélnek, ellenállóbbá válnak, nő a stressztolerancia. Hosszabb időtartamig tartó krónikus stressz esetén pedig a sejt berendezkedik a megváltozott külső és belső állapotokhoz.

Az egyik leginkább tanulmányozott stressz-típus a hő. Emlős sejtekben nagydózisú hőstressz ($> 42\text{ °C}$) kedvezőtlen hatásokat eredményez pl. csökken a plazmamembrán integritása, denaturálódhatnak és aggregálódhatnak a fehérjék. Felborul a homeosztázis, amelyre reagálva a sejtben aktiválódhat a hősokkválasz (HSR). Ugyanakkor nem csak magas hőmérsékletek válthatják ki a HSR-t, hanem az alacsonyabbak is, mint pl. láz, amit patofiziológiai körülmények indukálnak. A „membránszenzor” hipotézis azt feltételezi, hogy a hőmérséklet megváltozása (pl. enyhe hősök, láz hatására) módosítja a sejtmembránok fluiditását és/vagy szerveződését, ami lehetővé teszi a hőmérséklet finom érzékelését, valamint a celluláris stresszválasz aktiválását.

Célkitűzések

A celluláris stresszválasz tanulmányozása kulcsfontosságú annak megértéséhez, hogy a sejtek hogyan válaszolnak a különböző környezeti változásokra és hogyan alkalmazkodnak az új körülményekhez. A tanulmány fő célja a magasabb hőmérséklet hatására fellépő események sorozatának, elsősorban az enyhe, lázszerű hőstressz által előidézett válasz vizsgálata emlős sejtekben. A következő kérdésekre kerestük a választ:

- Hogyan befolyásolják a sejtszintű stresszválaszt a különböző dózisú hőkezelések különösképpen az enyhe, lázszerű hipertermia a sejtnövekedés, fehérjeindukció, szerzett stressztolerancia és energiatermelés tekintetében?
- A szerzett stressztolerancia kialakulásának előfeltétele-e a makromolekuláris károsodás helyreállításában is szerepet játszó hősokkfehérjék indukciója?
- Milyen szerepet játszik a szerzett stressztolerancia kialakulásában a lipidösszetétel/membránszerkezet módosulása különböző dózisú hőkezelések hatására?
- Az enyhe hőstressz hatására milyen dóziszfüggő jelátviteli folyamatok lépnek működésbe?

Alkalmazott módszerek

Sejttenyésztés

Sejtnövekedés mérés (tripánkék festés és sejtszámolás)

Fehérjeszint mérés (*Western Blot*)

Életképesség-vizsgálat (metabolikus aktivitáson alapuló resazurin módszer)

Túlélésvizsgálat (telepképződésen alapuló módszer)

Energiatermelés (Luciferáz alapú ATP koncentrációmérés)

Mitokondriális membrán potenciál mérés (JC-1 jelöléssel)

Lipidperoxidáció mérés (DPPP jelöléssel)

Lipidomika (elektrospray ionizációs tömegspektrometria)

Lipidraftok stabilitásának vizsgálata

Génexpressziós vizsgálatok (RNS szekvenálás és bioinformatika)

Eredmények

- Enyhe lázszerű hipertermia (40 °C) eredményeképpen a sejtnövekedés üteme 12 óra alatt nem változott meg szignifikánsan a 37 °C-os kontrolhoz képest kínai hörcsög petefészek (CHO) sejtekben, azonban 24 órás hőkezelés után gyengült a proliferáció.
- Különböző hőmérsékleten (40, 42,5 és 44 °C-on) végzett akut (20 perces) hőkezelések, melyeket regenerációs fázis követett, eltérő Hsp25 és Hsp70 fehérje indukcióhoz vezetett CHO sejtekben. A 40 °C-os enyhe hőstressz 4 órás inkubációjára volt szükség a Hsp25 szintemelkedés detektálásához regeneráció fázis nélkül CHO sejtekben, míg regenerációt biztosítva rövidebb hőkezelésre (40 °C, 2 óra). A 40 °C-os enyhe hőkezelés 0–12 órás időtartományban nem eredményezett detektálható Hsp70 indukciót. Ugyanilyen dózisu hőstressz a CHO-nál tapasztaltakkal megegyező módon változtatta meg HeLa sejtek Hsp25 szintjét, de a Hsp70 indukció feltűnően eltér. A MEF sejtekben nem detektálható Hsp25 szintváltozás, és a Hsp70 indukció csak 12 órás hőkezelés után figyelhető meg. A további kísérletekhez kiválasztott 1 órás 40 °C-os hőstressz hatása elhanyagolható, míg 6 óra, 40 °C a Hsp25 fehérjeszint szignifikáns növekedését eredményezi a regeneráció meglététől függetlenül CHO sejtekben. A 42,5 °C-os mérsékelt hőstressz eredményezte a legerősebb Hsp25 indukciót, de csak 6 órás 37 °C-os regenerációt követően (Peksel és mtsai., 2017; Tizlavicz és mtsai., 2022).
- Az enyhe lázszerű hőstressz túlélésre és életképességre gyakorolt hatásának tanulmányozása telepképződésen és metabolikus aktivitáson alapuló módszerek felhasználásával történt. Az ezekhez meghatározott többletstresszdózisok a következők voltak: hőstressz (46 °C, 20 perc), membrán stressz (95 mM benzil-alkohol, 20 perc) és oxidatív stressz (250 µM terc-butil-hidroperoxid, 3 óra). A 42,5 és 44 °C-os 20 perces hőkezelések regenerációs fázissal a szerzett termotolerancia kialakulásához vezettek, ami a Hsp-k indukciójával korrelál. Ugyanakkor a 40 °C-os 20 perces hőkezelés (regenerációval) a Hsp indukció hiányában is hozzájárult a védelem kifejlődéséhez. A szerzett termotolerancia kialakulása esetén az edzés hatására megváltozott túlélés és életképesség a Hsp indukcióval korrelál, ami benzil-alkohollal és terc-butil-hidroperoxiddal szembeni kereszttolerancia esetén

nem egyértelmű. Ez arra utal, hogy a membránfluidizáló és oxidatív stressz kivédéséhez nem előfeltétel a Hsp-k indukciója (Peksel és mtsai., 2017; Tizslavicz és mtsai., 2022).

- Az ATP koncentrációjában nincs jelentős változás 40 °C-os és 42,5 °C-os 1 órás HS hatására, azonban 40 °C-on 6 óra után enyhe, de szignifikáns csökkenés figyelhető meg (Tizslavicz és mtsai., 2022).
- A mitokondriális membránpotenciál növekszik enyhe (40 °C, 1 óra) és mérsékelt (42,5 °C, 1 óra) hőstressz hatására, ugyanakkor 95 mM benzil-alkohol jelenlétében minden esetben szignifikánsan csökken. A depolarizációval szembeni védelem csak a mérsékelt hőkezelés esetén volt kimutatható (Tizslavicz és mtsai., 2022).
- A 95 mM benzil-alkohol által előidézett lipidperoxidációt az enyhe (40 °C, 1 és 6 óra) és mérsékelt (42,5 °C, 1 óra) hőkezelések egyaránt képesek voltak csillapítani (Tizslavicz és mtsai., 2022).
- A hőstressz hatására jól elkülöníthető dóziszfüggő változások figyelhetők meg a CHO sejtek lipidomjában. A kontrollhoz viszonyítva több mint 200 lipidmolekula mennyisége változott szignifikánsan. A hosszabb enyhe hipertermia (40 °C, 6 óra) okozta a legjelentősebb változásokat, pl. a diszaturált és egyszeresen telítetlen membránlipid valamint lizoglicerofosfolipid specieszek relatív koncentrációjának növekedését vagy a többszörösen telítetlen komponensek csökkenését. A mérsékelt hőkezelés (42,5 °C, 1 óra) számos hasonló változást eredményezett, mint a hosszan tartó enyhe hőstressz, azonban a többszörösen telítetlen zsírsav tartalmú komponensek összvesztesége csak a dokozahexaénsav tartalmú specieszeknél figyelhető meg. A mérsékelt hőstresszre specifikusan a palmitinsav tartalmú szfingolipid specieszek emelkedése volt jellemző. A rövidebb enyhe hipertermia (40 °C, 1 óra) csak finomabb változásokat idézett elő, melyek többnyire a többi kezelésnél is megfigyelhetők voltak, pl. a hosszú szénláncú, 24:1 zsírsavtartalmú ceramid speciesz, a Cer(42:2:2) minden körülmény hatására felhalmozódott (Tizslavicz és mtsai., 2022).
- Az enyhe 40 °C-os hőkezelések képesek a lipidraftok stabilitását növelni a raft lokalizált fluoreszcens fehérjék detergenssel és membránfluidizálószerrel történő kioldásával szemben GPI-mGFP fehérjét konstitutívan kifejező CHO sejtekben. A

mérsékelt hőstressz (42,5 °C, 1 óra) és a benzil-alkohol mikrodomén destabilizáló tulajdonságokkal bírnak.

- A hőstressz hatására jól elkülöníthető dóziszfüggő változások figyelhetők meg a CHO sejtek transzkriptom profiljában. A kontrollhoz viszonyítva több mint 900 gén expressziója változott szignifikánsan. Az enyhe hőkezelések (40 °C, 1 és 6 óra) hatására leginkább feldúsult utak génjei között számos Hsp és egyéb, a hő sokkválással kapcsolatos fehérje génje található. A mérsékelt hőstressz (42,5 °C, 1 óra) inkább a gyulladással összefüggő jelátviteli útvonalakban eredményezett nagyobb feldúsulást számos olyan útvonal mellett, amelyekben a Hsp-k génexpressziója szignifikánsan megváltozott. Az útvonalak aktivációját prediktáló elemzések alapján az egyik legjelentősebben feldúsult, általános aktivációs tendenciát mutató útvonal a selejtfehérje-válasz volt, különösen az enyhe lázszerű hőstressz (40 °C, 6 óra) hatására (Tizlavicz és mtsai., 2022).

Eredmények összefoglalása

Az enyhe stressz hozzájárulhat ahhoz, hogy a sejtek túléljenek súlyosabb környezeti vagy patofiziológiai körülményeket. A doktori munka során megvizsgáltuk azokat a mechanizmusokat, amelyek elősegítik a szerzett stressztolerancia kialakulását tartós (0–12 óra) lázszerű (40 °C-os) vagy mérsékelt (42,5 °C-os) hipertermia esetén emlős kóci h6rcs6g petef6szek sejtvonalonban. A disszert6ci6ban bemutatott k6s6rleteink alapján:

- A CHO sejtekben a k6l6nb6z66 szint6 hipertermia elt6r6, d6zisz6g6g6 mechanizmusokat induk6l, amelyek eredm6nyek6pp a sejtek ellen6l6bbakk6 v6lnak azonos 6s/vagy elt6r6 t6pus6 stresszel szemben.
 - A h66stressz d6zisz6t6l f6gg66en 6talakul a sejt lipid6sszet6tele, amelyet magasabb h66d6ziszok esetén a h66sokkfeh6rj6k expresszi6ja k6vet.
 - A tel6tett zs6rsavtartalm6 membr6nlipid specieszek 6s egyes lizofoszfatidil-inozitol 6s szfingolipid specieszek relat6v koncentraci6j6nak emelked6se a membr6n mikrodom6nek gyors 6jraszervez6d6s6re 6s egy 6ltal6nos membr6n rigidiz6ci6ra utal.
- A szerzett termotolerancia kifejl6d6se jelent6sen f6gg Hsp v6laszt6l, azonban a v6delem megjelen6s6hez ez a kapcsolat nem el66felt6tel.
 - K6s6rleteinkkel bemutattuk, hogy a r6vid enyhe h66stressz (40 °C, 20 perc) hatás6ra, amelyet regener6l6d6si f6zis k6vet, kifejl6dhet a szerzett termotolerancia a h66sokkfeh6rj6k (Hsp25 6s Hsp70) indukci6j6nak hi6ny6ban is h66t6bbletstresszel (46 °C, 20 perc) szemben. Mindazon6ltal enn6l hosszabb (40 °C, 1 6ra) h66kezel6s regener6ci6 n6lk6l nem fejtett ki v6d66 hat6st, amely kifejl6d6s6hez feltehet66en t6bb id66re van sz6ks6g. M6s esetben a nagyobb d6zisz6 edz6sek (40 °C, 6 6ra vagy 42,5 °C, 1 6ra) hatás6ra megfigyelhet6 Hsp szintemelked6sek a szerzett termotoleranci6val korrel6ltak.

- A szerzett kereszttolerancia kialakulhat enyhe és mérsékelt hőkezelés hatására membrán és oxidatív stresszel szemben.

Kísérleti eredményeink alapján a hősokkfehérjék (Hsp25 és Hsp70) indukciójától függetlenül kialakulhat szerzett kereszttolerancia enyhe lázszerű hipertermia (40 °C) hatására membránperturbáló ágenssel (benzil-alkohol) és oxidálószerrel (TBHP) szemben. A szerzett kereszttolerancia kifejlődése ebből következően más védelmi mechanizmusoknak köszönhető pl. lipid-membrán módosulásoknak (homeoviszkozus adaptáció) vagy selejtféherje válasznak (UPR).

- Az enyhe lázszerű hipertermia endoplazmatikus retikulum stresszel kapcsolatos jelátviteli kaszkádokat hoz működésbe, ami a lipidek újrendeződéséhez és végül a benzil-alkohol által előidézett membránfluidizációval szembeni a tolerancia növekedéséhez vezet.

A hőkezelt minták RNS szekvenálási adatai alapján az egyik leginkább feldúsuló útvonal a UPR volt, amelynek működésbe lépését korábban a felhalmozódott hibás fehérjék mellett a lipid kettősréteg stresszhez kötötték különösen a membránfluiditás csökkenéséhez. Bemutattuk, hogy a membránok fluiditásának növekedése is előidézheti az UPR aktivációját, amelyet predikciós elemzések is megerősítenek főként a hosszú enyhe hőstressz esetében (40 °C, 6 óra). Ezt az eredményt a lipidomikai adatok is tovább erősítik: a hipertermia hatására megnövekvő lizolipidek relatív mennyisége lipid kettősréteg stresszt vált ki. Emellett a lizofoszfátidil-inozitol és a GPR55 receptorfehérje kapcsolatának fontos szerepe van az endoplazmatikus retikulum stresszválaszban.

Summary

Living beings sense and respond to the inner and outer environmental changes in various ways. During the doctoral study, we dissected the distinct cellular mechanisms of mammalian cells in reacting and adapting to stress, especially under mild fever-like hyperthermia. Applying such conditions, more exactly a mild (40 °C) prolonged (0–12 h) heat stress and a moderate one (42.5 °C, 1 h) as well, we investigated cellular growth, Hsp induction, development of stress tolerance, cellular energy, lipidperoxidation, lipidomics, raft stability geneexpression in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. Our results indicate that mild heat triggers a distinct, dose-dependent remodeling of the cellular lipidome followed by the expression of heat shock proteins only at higher heat dosages. A significant elevation in the relative concentration of saturated membrane lipid species and specific lysophosphatidylinositol and sphingolipid species suggests prompt membrane microdomain reorganization and an overall membrane rigidification in response to the fluidizing heat in a time-dependent manner. RNAseq experiments reveal that mild heat initiates endoplasmic reticulum stress-related signaling cascades resulting in lipid rearrangement and ultimately in an elevated resistance against membrane fluidization by benzyl alcohol. To protect cells against lethal, protein-denaturing high temperatures, the classical heat shock protein response was required. The different layers of stress response elicited by different heat dosages highlight the capability of cells to utilize multiple tools to gain resistance against or to survive lethal stress conditions.

A disszertációban felhasznált közlemények:

1. Peksel, B., Gombos, I., Péter, M., Vigh, L., **Tiszlavicz, Á.**, Brameshuber, M., Balogh, G., Schütz, G. J., Horváth, I., Vigh, L., & Török, Z. (2017). Mild heat induces a distinct “eustress” response in Chinese Hamster Ovary cells but does not induce heat shock protein synthesis. *Scientific Reports*, 7(1), 15643. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15821-8>

IF: **4,122** (2017)

2. **Tiszlavicz, Á.**, Gombos, I., Péter, M., Hegedűs, Z., Hunya, Á., Dukic, B., Nagy, I., Peksel, B., Balogh, G., Horváth, I., Vigh, L., & Török, Z. (2022). Distinct Cellular Tools of Mild Hyperthermia-Induced Acquired Stress Tolerance in Chinese Hamster Ovary Cells. *Biomedicines*, 10(5), 24.

<https://doi.org/10.3390/biomedicines10051172>

IF: **4,757** (2021)

További közlemények:

3. Farsang, A., Szatmári, J., Bartus, M., **Tiszlavicz, Á.**, & Barta, K. (2022). Quantification of deflation-induced soil loss on chernozems: Field protocol and sediment trap development based on wind tunnel experiments. *Zeitschrift Für Geomorphologie*, 63(4), 329–341. <https://doi.org/10.1127/zfg/2021/0709>

IF: **1,571** (2021)

Közlő folyóiratok összesített IF-ra: 10,45

Közlő folyóiratok összesített IF-ra (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8,879

Konferencia részvétel:

- Dukic B., **Tiszlavicz Á.**, Gombos I., Péter M., Balogh G., Varga-Zsíros V., Hunya Á., Vígh L., Török Zs.: Investigation of membrane-coupled events induced by fever-like heat treatment, 2022. Május 25-27., Straub-Napok, Szeged, poszter
- Dukic B., **Tiszlavicz Á.**, Gombos I., Peksel B., Péter M., Balogh G., Varga-Zsíros V., Hunya Á., Horváth I., Vígh L., Török Zs.: Lázszerű hőkezeléssel indukált membránkapcsolt események vizsgálata, 2021. november 16-19., 50. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, poszter
- **Tiszlavicz Á.**, Dukic B., Gombos I., Peksel B., Péter M., Balogh G., Horváth I., Vígh L., Török Zs.: Enyhe hipertermia-okozta szerzett stresszrezisztencia molekuláris mechanizmusa emlős sejtekben, 2021. november 16-19., 50. Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, poszter
- Dukic B., **Tiszlavicz Á.**, Gombos I., Peksel B., Péter M., Balogh G., Horváth I., Vígh L., Török Zs.: Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, 2020. november 28., online előadás
- Dukic B., **Tiszlavicz Á.**, Gombos I., Peksel B., Péter M., Balogh G., Horváth I., Vígh L., Török Zs.: Lázszerű hőkezeléssel indukált membránkapcsolt jelátviteli események vizsgálata, XIII. Tavasz Szél Konferencia, 2020. október 16., online előadás
- **Tiszlavicz Á.**, Gombos I., Peksel B., Dukic B., Péter M., Balogh G., Horváth I., Vígh L., Török Zs.: Acquired cellular stress resistance in the absence of heat shock protein induction, XXII. Annual Linz Winter Workshop, 2020. január 31-február 3., Linz (AU), poszter
- Dukic B., **Tiszlavicz Á.**, Gombos I., Peksel B., Péter M., Balogh G., Horváth I., Vígh L., Török Zs.: Mild heat stress-induced early cellular events in mammalian cells, EMBO EMBL - Seeing is believing, 2019. október 9-12., Heidelberg, poszter
- Dukic B., **Tiszlavicz Á.**, Gombos I., Peksel B., Péter M., Balogh G., Horváth I., Vígh L., Török Zs.: Mild heat stress-induced early cellular events in mammalian cells, Straub-Napok, 2019. május 30-31., Szeged, poszter
- **Tiszlavicz Á.**, Gombos I., Peksel B., Dukic B., Péter M., Balogh G., Horváth I., Vígh L., Török Zs.: Acquired cellular stress resistance in the absence of heat shock protein induction, Straub-Napok, 2019. május 30-31., Szeged, poszter
- Dukic B., **Tiszlavicz Á.**, Gombos I., Peksel B., Péter M., Balogh G., Horváth I., Vígh L., Török Zs.: Enyhe hőstressz okozta korai események vizsgálata emlős sejtekben, 49. Membrán Transzport Konferencia, 2019. május 14-17., Sümeg, poszter
- **Tiszlavicz Á.**, Gombos I., Peksel B., Dukic B., Péter M., Balogh G., Horváth I., Vígh L., Török Zs.: Acquired cellular stress resistance in the absence of heat shock protein induction, Hungarian Molecular Life Sciences, 2019. március 29-31., Eger, poszter