

A stresszválasz és a membránok kapcsolata emlős sejtekben

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Szegedi Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola

Készítette: Nagy Enikő

Témavezető: Prof. Dr. Vígh László

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézet

Szeged

2009

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. A STRESSZVÁLASZ ÁLTALÁNOS JELLEMZŐI	8
2.1.1. Celluláris stresszválasz	8
2.1.2. A stresszelhárító rendszer fehérjéinek funkcionális osztályozása	8
2.1.3. Stressztolerancia	9
2.2. A HŐSOKK FEHÉRJÉK (Hsp-k) SZEREPE ÉS MŰKÖDÉSE	10
2.2.1. A Hsp70 fehérje család	11
2.2.1.1. <i>A Hsp70 fehérje család tagjai</i>	12
2.2.2. A Hsp90 fehérje család	13
2.2.2.1. <i>A Hsp90 fehérje család tagjai</i>	15
2.2.3. A Hsp110 család	15
2.2.3.1. <i>A Hsp110 család tagjai</i>	16
2.2.4. Kis molekulású hősokk fehérjék	16
2.2.4.1. <i>A Hsp27 és az αB-krisztallin</i>	18
2.3. A HSP INDUKCIÓ SZABÁLYZÁSA STRESSZHATÁSOK SORÁN	19
2.3.1. A hősokk faktorok	19
2.3.2. A HSF 1 szerkezete	20
2.3.3. A HSF1 aktiváció mechanizmusa	21
2.3.3.1. <i>A DNS-kötő képesség megszerzése</i>	22
2.3.3.2. <i>A foszforilációs mintázat szabályozza a HSF1 aktivitását</i>	22
2.3.4. A <i>hsp70</i> gén promóter régiója	23
2.3.4.1. <i>Hősokk elemek</i>	24
2.3.4.2. <i>További promóter elemek</i>	24
2.4. A STRESSZVÁLASZ AKTIVÁCIÓJÁNAK FOLYAMATA	25
2.4.1. A stresszérzékelő mechanizmusok	26
2.4.2.1. <i>A denaturált fehérjék, mint stressz-szenzorok</i>	26
2.4.2.2. <i>Az alternatív stresszérzékelő mechanizmusok kérdése</i>	27
2.5. A MEMBRÁNOK SZERVEZŐDÉSE	29

2.5.1. A membrán kettősréteg aszimmetriája	29
2.5.2. A membrán mikrodomének szerveződésének alapja: a fázisszeparáció	30
2.5.3. A rendezett mikrodomének (raftok) biokémiája	31
2.5.4. A membrán mikrodomének és raftok mikroszkópiája	33
2.5.5. Mit nevezünk ma raftnak?	34
2.6. MEMBRÁN-SZENZOR HIPOTÉZIS	35
2.6.1. A hőmérséklet változás membránokra gyakorolt hatása	36
2.6.2. Adaptációs folyamatok a membránban	36
2.6.3. A membránok, mint stresszérzékelők prokarióta sejtekben	37
2.6.4. A membránok potenciális stresszérzékelők eukarióta sejtekben is	39
3. CÉLKITŰZÉSEK	41
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	42
4.1. Sejtek tenyésztése	42
4.2. Fehérjék <i>in vivo</i> radioaktív jelölése	42
4.3. Kvantitatív polimeráz láncreakció	43
4.4. Western blot	43
4.5. DNS-fehérje komplex kimutatása gélretardációs technikával	44
4.6. Kromatin immunoprecipitáció	45
4.7. Riporter plazmidok tranziens transzfekciója	46
4.8. Klóramfenikol-acetiltranszferáz aktivitás mérés	47
4.9. β -galaktozidáz aktivitás mérés	48
4.10. Luciferáz aktivitás mérés	48
4.11. Membránfluiditás mérés	49
4.12. Fluoreszcencia kioltás mérése egyrétegű lipidvezikulákban	49
4.13. Koleszterin gazdag plazmamembrán domének <i>in vivo</i> vizsgálata	50
4.14. Intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentráció mérése	51
4.15. Termotolerancia meghatározása (kolónia képző képesség alapján)	51
5. EREDMÉNYEK	53
5.1. A MEMBRÁNPERTURBÁCIÓ STRESSZVÁLASZT INDUKÁL EMLŐS SEJTEKBEN	53
5.1.1. A <i>hsp</i> gének expressziójának vizsgálata membránstresszt követően	53
5.1.1.1. A membránfluidizáló benzil-alkohol fokozza a <i>Hsp70</i> fehérje szintézisét	53

5.1.1.2. A benzil-alkohol a hsp70 mellett további hsp gének expresszióját is indukálja	54
5.1.2. A benzil-alkohol kezelés nem a fehérjék denaturációján keresztül indukál stresszválaszt	58
5.2. A STRESSZVÁLASZ INDUKCIÓJÁHOZ KÖTHETŐ MEMBRÁN ÁLLAPOT-VÁLTOZÁSOK	59
5.2.1. A benzil-alkohol és a hősök egyaránt növelik a membránok fluiditását	59
5.2.2. A membránfluiditás növekedése nem mindig jár együtt a hősök válasz indukciójával	60
5.2.2.1. Az „izofluid állapotot” előidéző benzil-alkohol és fenetil-alkohol koncentrációk meghatározása	61
5.2.2.2. Az „izofluid membrán állapotot” előidéző fenetil-alkohol hatása a hsp gének expressziójára	62
5.2.3. A hősök választ indukáló kezelések módosítják a membrán mikrodomén szerveződését	63
5.2.3.1. Lipid domének stabilitásának in vitro vizsgálata	63
5.2.3.2. Membrán mikrodomének in vivo vizsgálata	65
5.3. EGY MEMBRÁN ÁLTAL ÉRINTETT JELÁTVITELI ESEMÉNY AZONOSÍTÁSA	67
5.3.1. A Ca^{2+} szerepének tanulmányozása	67
5.3.1.1. Benzil-alkohol hatására megemelkedik az intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentráció	67
5.3.1.2. A Ca^{2+} szint emelkedés szükséges a hsp70 indukciójához	69
5.4. A JELÁTVITELI ÚTVONALAK INTEGRÁCIÓJA: A HSF1 AKTIVÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA	70
5.4.1. A HSF1 DNS-kötő képességének vizsgálata	70
5.4.2. A HSF1 foszforilációs állapotának változása	73
5.4.3. A HSF1 szabályozza a hsp gének indukcióját benzil-alkohol kezelés során	73
5.4.4. A hsp70 transzkripció fokozásához a HSE-k szükségesek benzil-alkohol kezelés során	74
5.5. A TERMOTOLERANCIA KIALAKULÁSÁNAK TESZTELÉSE	77
6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	79
6.1. A membránperturbáció hősök választ indukál	79

6.2. A stresszválasz indukciója a membránok perturbációjával nem a fokozott fehérje denaturáció következménye	80
6.3. Membránszerkezeti változások a stresszválasz indukciója során	80
6.3.1. <i>A membránfluiditás növekedése nem elegendő a hősokk válasz elindításához</i>	81
6.3.2. <i>Hsp választ indukáló kezelések alatt a membrán mikrodomének átrendeződnek</i>	81
6.4. A membránoktól a hsp génekig vezető feltételezett jelátviteli útvonal	83
6.4.1. <i>A Ca^{2+} szerepe, mint másodlagos hírvivő</i>	83
6.4.2. <i>Másodlagos lipid hírvivő molekulák szerepe</i>	84
6.4.3. <i>A membránstressz a HSF1-en keresztül indukálja a hsp géneket</i>	85
6.5. Termotoleráns állapot kialakulása membránstressz hatására	85
HIVATKOZÁSOK	90
ÖSSZEFOGLALÁS	106
SUMMARY	111
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	115

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

7SLPC:	1-palmitoil-2-sztearoil-(7-doxil)- <i>sn</i> -glicero-3-foszfokolin
BA:	benzil-alkohol
CAT:	klóramfenikol-acetiltranszferáz
ChIP:	kromatin immunoprecipitáció
CTL:	kolesztatrién-3-béta-ol
DPH:	difenil-hexatrién
DRM:	detergens rezisztens, kis sűrűségű membránfrakció
FCS:	magzati borjú szérum
fPEG-chol:	polietilén-glikol-koleszterin-éter fluoreszcein észtere
Gsk3:	glikogén szintáz kináz 3
HR-A, HR-B:	minden hetedik aminosav hidrofób tulajdonságú, „heptad repeat”-A, -B
HSBP1:	HSF1-et kötő fehérje
HSE:	hősokk elem
HSF:	hősokk faktor
Hsp:	hősokk fehérje
HSR1:	hősokk-RNS1
l_d :	rendezetlen-folyadékkristályos állapot, „liquid-disordered”
l_o :	rendezett-folyadékkristályos állapot, „liquid-ordered”
MEF:	egérből származó embrionális fibroblaszt sejt, „mouse embryonic fibroblast”
mPKC:	egér foszfoenolpiruvát karboxikináz
NEF:	nukleotid kicserélő faktor
PhA:	fenetil-alkohol
PLC:	foszfolipáz C
POPC:	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfokolin
PSM:	<i>d-eritro-N</i> -palmitoil-szfingomielin
sHsp:	kis molekulásúlyú hősokk fehérje
β -gal:	β -galaktozidáz

1. BEVEZETÉS

Az élet fennmaradásának alapvető feltétele, hogy az élőlények alkalmazkodni tudjanak környezetükhöz. A környezeti feltételek időleges, hirtelen megváltozása egy gyors válaszreakciót idéz elő, ezt a folyamatot nevezzük stresszválasznak, vagy *akklimatizációnak*. Ha a változások hosszú ideig fennállnak, tartós, átörökíthető átalakulások történnek az élőlényekben, és *adaptálódnak* az új viszonyokhoz.

A sejtszintű stresszválasz óriási élettani, ill. kórélettani jelentőséggel bíró univerzális sejtvédő mechanizmus. Alapvető szerepe, hogy védelmet biztosít a makromolekulákat, makromolekuláris rendszereket károsító környezeti behatásokkal szemben. Mivel a sejtek a makromolekulák károsodását érzékelik és nem specifikusan a stresszort, így a stresszre adott válaszreakcióra jellemző, hogy nem stresszor specifikus.

A hősokk válasz sejt és molekuláris szintjeinek ma még számos eleme tisztázatlan. A kérdéskör egyik legvitatottabb aspektusa a stresszor érzékelése, a primer molekuláris szenzor(ok) azonosítása.

Dolgozatomban bizonyítékokkal próbálom alátámasztani azon hipotézisünket, miszerint a sejtmembrán nem csupán a celluláris stresszkárosodás egyik célpontja, de aktuális lipidösszetétele, finomszerkezete és fizikai állapota, annak modulációja egyben központi szereppel bírhat a stressz szignál primer érzékelésében, a stresszelhárító (adaptív) mechanizmusok működtetésében és koordinációjában.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A STRESSZVÁLASZ ÁLTALÁNOS JELLEMZŐI

A stressz szót napjainkban gyakran és igen sokféle értelemben használjuk. Selye János a szervezet egészét tekintve értelmezte a stressz folyamatát. A stressz az a nem specifikus válasz, amellyel a szervezetünk reagál a kihívásokra, ingerekre (Selye, 1976). A válaszreakció nem specifikus tulajdonsága annak köszönhető, hogy az ingerek - függetlenül az eredetüktől - alkalmazkodásra készítik a szervezetet. A stresszor (stresszválaszt kiváltó inger) hatására bekövetkező testi reakciók összességét Selye általános adaptációs szindrómának nevezte el, amely három fő szakaszra különíthető. A riasztási fázisban a szervezet felkészül a fokozott igénybevételre. Az aktív ellenállás fázisában mozgósítja a tartalékait és így hosszabb-rövidebb ideig képes ellenállni a stresszor hatásának. A stresszor tartós fennállásakor azonban a szervezet tartalékai kimerülnek (kimerülés fázisa) és rohamos hanyatlás következik be.

2.1.1. Celluláris stresszválasz

A sejtek szintjén is értelmezhető a stressz fogalma. A celluláris stresszválaszt olyan behatások váltják ki, amelyek károsítják a sejtek makromolekuláit, makromolekuláris rendszereit. A válaszreakció tranziens és nem stresszor specifikus, tehát a stresszorok széles körére aktiválódik (Kültz, 2005). Emellett a sejtekben kialakul egy más jellegű válaszreakció is, az ún. homeosztatikus válasz. A homeosztatikus választ a stresszválással ellentétben stresszor specifikus érzékelők indítják el, és az a megváltozott környezeti hatás jellegétől függő módon biztosítja az egyensúly helyreállítását és fenntartását. A változások egészen addig fennmaradnak, amíg a környezeti feltételek ismét nem módosulnak.

2.1.2. A stresszelhárító rendszer fehérjéinek funkcionális osztályozása

A celluláris stresszválasz bizonyos elemei evolúciósan nagy mértékben konzerválódtak. A fehérjék egy csoportja a baktériumoktól kezdve az élesztőkön át egészen az emberig részt vesz a stresszválasz folyamatában. Ezek a minden sejtben előforduló, konzervált fehérjék alkotják az ún. minimális stressz fehérje készletet (Kültz, 2005). A fehérjék funkciója alapján

a minimális stressz fehérje készlet csoportosítható, a csoportosítás a stresszválasz által érintett különböző folyamatokat is tükrözi:

- DNS károsodás érzékelése / javítása
- Fehérje károsodás érzékelése / javítása
- Károsodott fehérjék lebontása
- Sejtciklus szabályozása
- Anyagcsere utak szabályozása
 - Redox állapot szabályozása
 - Energia termelés/felhasználás
 - Lipid/zsírsav metabolizmus

Természetesen a stresszfehérjék nagy része nem konzervált az élőlények összes csoportjában. Ide tartoznak például a transzkripció, a sejtciklus, a jelátviteli útvonalak szabályozásában szerepet játszó fehérjék, amelyek nagy mértékben különböznek a prokarióta és eukarióta szervezetekben.

2.1.3. Stressztolerancia

A stresszhatások pozitív következménye, hogy a sejtek egy ideig képesek megbirkózni erőteljesebb behatásokkal is. Stressz-edzésnek nevezzük a jelenséget, ha ugyanazzal a stresszorral szemben alakul ki a tolerancia, míg kereszttoleranciának, ha más stresszhatásokkal szemben is ellenállóbbá válik a sejt. A stressz-edzés és kereszttolerancia kialakulásának alapja a stresszválasz nem specifikus tulajdonsága. A különböző stresszhatások ugyanis egy közös stresszfehérje készletet indukálnak/aktiválnak. Az indukálódott stresszfehérjék általános sejtvédő tulajdonságuk miatt (fehérje-, DNS védelem, szabad gyök fogás) ellenállóbbá teszik a sejteket a stresszorok széles körére (Kültz, 2005).

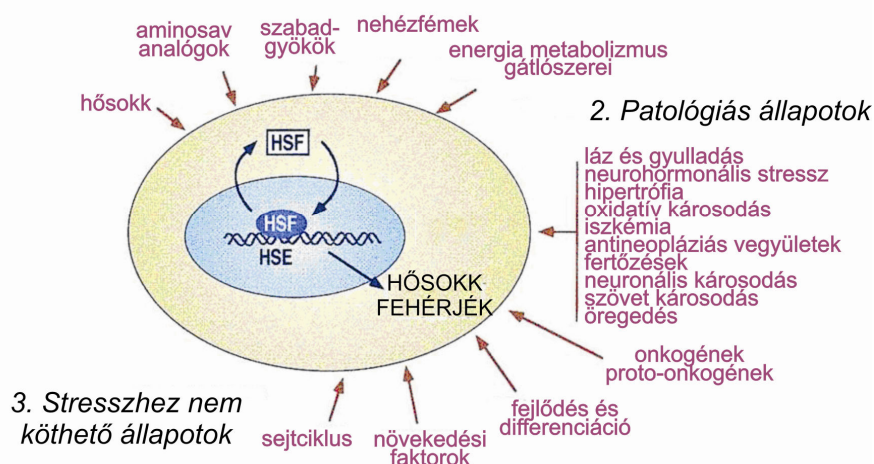
A molekuláris stresszválasz során tehát olyan folyamatok aktiválódnak, amelyek segítenek helyreállítani/eltávolítani a károsodott molekulákat, időlegesen ellenállóvá teszik a sejteket a stresszorral szemben, vagy apoptózisra ítélik a helyrehozhatatlanul megrongálódott sejteket. A stresszválasz része a sejtek génexpressziós mintázatának átalakulása, ami biztosítja, hogy a túléléséhez szükséges védő fehérjék mennyisége megnövekedjen a sejtekben.

A továbbiakban a fentiekben ismertetett stresszelhárító fehérjék egyik jól jellemzett csoportját, a dolgozatomban is kulcsszerepet játszó hősokk fehérjéket kívánom bemutatni.

2.2. A HŐSOKK FEHÉRJÉK (Hsp-k) SZEREPE ÉS MŰKÖDÉSE

A hősokk fehérjék az egész élővilágban, prokarióta és eukarióta sejtekben egyaránt előforduló konzervált fehérjék. Felfedezésük Ritossa nevéhez fűződik, aki 1962-ben számolt be arról a megfigyeléséről, hogy hőstressz hatására a *Drosophila* lárvák politén kromoszómáin megváltozik a puffok mintázata (Ritossa, 1962). A jellegzetes új puffok megjelenése azt jelezte, hogy hősokk hatására átalakul a génexpressziós mintázat, és új RNS molekulák jelennek meg a sejtekben. A hőstressz során indukálódó géneket hősokk géneknek, illetve a róluk szintetizálódó fehérjéket hősokk fehérjéknek (Hsp) nevezték el. Azóta nyilvánvalóvá vált, hogy a hősokk gének kifejeződését a hőstressz mellett egyéb környezeti stresszhatások, és patológiás állapotok is befolyásolják (1. ábra). A stresszhatások mellett a hősokk gének expressziója normál sejt folyamatok során is - sejtciklus, hormonok, növekedési faktorok, az egyedfejlődés / differenciáció - szabályozottan változik (Morimoto, 1998).

1. Környezeti stresszhatások



1. ábra A Hsp-k szintézisét fokozó környezeti, patológiás és fiziológias állapotok. (Morimoto, 1998 alapján)

A hősokk fehérjék funkciójukat tekintve molekuláris chaperonok, azaz olyan fehérjék, amelyek stabilizálják az instabil konformációjú fehérjéket, valamint elősegítik, hogy a nem megfelelően feltekeredett fehérjék felvegyék az *in vivo* aktív szerkezetüket (Hartl, 1996). A Hsp-k az alább felsorolt folyamatokon keresztül nélkülözhetetlen szerepet játszanak a fehérje homeosztázis fenntartásában:

- Naszcens fehérjék feltekerése
- Fehérjék transzlokációja a sejtorganellumokba

- Fehérjék aktivitásának módosítása
 - Inaktív, instabil szerkezetű fehérjék stabilizálása
- Fehérje komplexek összeszerelése
- Nem megfelelő konformációjú fehérjék újraterelése
- Fehérje aggregáció elleni védelem
- Fehérjék kijelölése degradációra
- Károsodott fehérjék elkülönítése

A hősokk fehérjék tehát hozzájárulnak ahhoz, hogy a stressz során károsodott fehérjék visszanyerjék működőképes állapotukat, vagy lebontásra kerüljenek, ha a károsodás már nem helyrehozható.

A hősokk fehérjéket molekulatömegük alapján szokták csoportosítani (Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, kis molekulású Hsp családok). A következőkben azoknak a hősokk fehérje családoknak a jellegzetességeit foglalom össze, amelyek expressziós szint változásait munkám során nyomon követtem.

2.2.1. A Hsp70 fehérje család

Hsp70 fehérjék az evolúció során az egyik legnagyobb mértékben konzerválódott proteinek (Hunt és mtsai, 1985). A Hsp70 ko-chaperonokkal együttműködve egy energiaigényes folyamat során segíti a szubsztrát fehérjét a natív konformáció elérésében. Szubsztrátjai azok a fehérjék, amelyek a felszínükön hidrofób felületeket hordoznak (Mayer és Bukau, 2005).

A fehérje két különböző formában, ATP-t, ill. ADP-t kötő formában lehet jelen. Az ATP kötésekor a Hsp70 csak kis affinitással kötődik a szubsztrát fehérjéhez, így a szubsztrát molekulák gyorsan cserélődnek. ATP hidrolízis során a szubsztrátkötő hely bezáródik, és a "bennrekedt" szubsztrát már nagy affinitással kapcsolódik az ADP-t kötő Hsp70-hez (Mayer és Bukau, 2005). A chaperon ciklus hatékony lezajlásához nélkülözhetetlenek a J domént tartalmazó ko-chaperonok, amelyek stimulálják a Hsp70 ATPáz aktivitását (Laufen és mtsai, 1999). Emellett a szubsztrát fehérjével is kölcsönhatásba lépnek, sőt szerepet játszanak a szubsztrát Hsp70-hez szállításában, és a szubsztrát bekötődésében. Az ATP hidrolízist követően az ADP-ATP cserét a Hsp70-hez kapcsolódó nukleotid kicserélő faktorok (NEF) segítik elő. A Hsp70 chaperon rendszer és a proteaszómális fehérjebontás közötti szoros

együttműködésre utal, hogy a Hsp70 egyik ko-chaperonja, a CHIP, egy ubiquitin ligáz, ami a Hsc70 szubsztrátjait ubiquitinálva degradációra jelölheti ki a nem natív szerkezetű fehérjéket (Höhfeld és mtsai, 2001).

Egyre növekvő számban azonosítanak olyan regulátor fehérjéket, amelyek aktivitásának szabályozásában a Hsp70 fehérjék is részt vesznek. Ilyenek például a nukleáris receptorok (szteroid hormon receptorok), különböző kinázok (Raf, eIF2 α , CiklinB/Cdk1) és transzkripciós faktorok (HSF1, Myc, pRb). Ezeknél a fehérjéknél a Hsp70-szubsztrát komplex már a szubsztrát fehérje szintézisekor kialakul, és a szubsztrát fehérje aktiválódása, például a specifikus ligandum megjelenése vagy a fehérje foszforilációja, eredményezi a komplexek felbomlását. Ezáltal a Hsp70 fehérjék szignál transzdukciós folyamatok, a sejtciklus, az apoptózis, a differenciáció szabályozásában is szerepet játszanak, és központi jelentőségűek számos patológiás állapot (rákos folyamatok, neurodegeneratív, autoimmun betegségek) kialakulásában.

Érdemes megemlíteni, hogy olyan esetekben, amikor a chaperonok iránti igény meghaladja az aktuális sejten belüli mennyiségüket, például stresszhatások során, a Hsp70 fehérje „távozik” a fenti regulátor komplexekből. Ez értelemszerűen befolyásolja a szubsztrát fehérje aktivitását. Így a stressz közvetett úton, a regulátor komplexek szétesése révén is módosíthat jelátviteli útvonalakat, az apoptózis vagy a sejtciklus folyamatát.

Hasonló elven magyarázható az a jelenség, hogy stressz során, vagy például az öregedés alatt, addig látens mutációk hatása fenotipikusan is megjelenik. A mutációt hordozó fehérjék ugyanis chaperonokkal kölcsönhatásban bizonyos esetekben ki tudják alakítani a működéshez szükséges térszerkezetet. Azaz a Hsp70-nel, Hsp90-nel való együttműködés elfedi a mutáció hatását. Azonban olyan körülmények között, amikor a chaperonok nem állnak rendelkezésre a megfelelő mennyiségben, felszínre kerülhet a mutáció hatása, ami patológiás állapotok kialakulásához vezethet (Mayer és Bukau, 2005).

2.2.1.1. A Hsp70 fehérje család tagjai

Minden eukarióta sejten legalább két Hsp70 fehérjét kódoló gén található. Emberben a Hsp70 családba 8 különböző Hsp70 homológot sorolnak (Daugaard és mtsai, 2007). A homológok mellett, hogy eltérő szekvenciával rendelkeznek, expressziós mintázatukban és a sejten belüli lokalizációjukban is különböznek egymástól. A Hsp70.5 (Grp78) az endoplazmatikus retikulum lumenében, a Hsp70.9 (Grp75) pedig a mitokondriumban fordul elő, míg a további hat Hsp70 homológ a citoplazmában és a sejtmagban található. A nem

kompartment specifikus Hsp70 családtagok közül három konstitutívan expresszálódik, míg a további három Hsp70 homológ termelődése stressz hatására indukálódik.

A Hsp70-1A és Hsp70-1B fehérjék a klasszikus, indukálódó Hsp70 családtagok. A két fehérje csak 2 aminosav oldalláncban különbözik egymástól. A fehérjéket kódoló intron nélküli gének a 6. kromoszóma MHC III géncsoportjában helyezkednek el egymás mellett. Alapszintű expressziójuk a sejttípustól és a sejtciklus fázisaitól függő módon változik. A gének stressz indukálta kifejeződését a promóter régiójukban található hősokk elemek (HSE) biztosítják. A *hsp70-1A* és *1B* gének nem nélkülözhetetlenek, mivel a „knock-out” egerek életképesek és termékenyek, de csökken az ellenálló képességük különböző stressz hatásokkal (például UV sugárzás, hősokk, iszkémia, szepszis, ozmotikus stressz, tumor nekrosisz faktor) szemben, valamint a genom instabilitás mértéke is megnő. Az indukálható Hsp70 fehérjék overexpressziója a stresszorok széles körével szemben ellenállóbbá teszi a sejteket (Chong és mtsai, 1998; Bellmann és mtsai, 1996; Wissing és Jäättelä, 1996; Marber és mtsai, 1995).

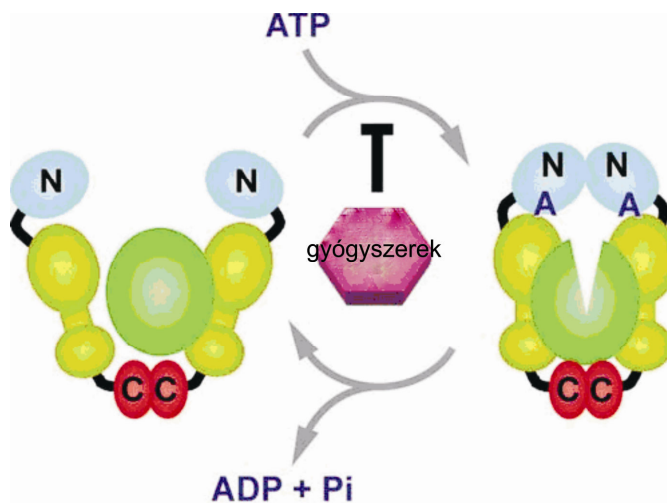
A Hsp70-8, más néven a Hsc70 fehérje génje a 11. kromoszómán található. A gén a legtöbb szövetben konstitutívan fejeződik ki (Dworniczak és Mirault, 1987). A fehérje 86 % - os homológiát mutat az indukálható Hsp70-1-gyel. A Hsc70 olyan alapvető funkciókat lát el, mint az újonnan szintetizálódott fehérjék feltekerése, fehérjék membránon keresztül történő transzlokációja, fehérje komplexek össze- és szétszerelése, fehérjék aggregálódásának megakadályozása. Ennek megfelelően nem tudtak olyan egértörzset előállítani, amelyben a *hsc70* gént kiütötték volna (Dworniczak és Mirault, 1987).

2.2.2. A Hsp90 fehérje család

A Hsp90 is egy nagy mértékben konzervált fehérje, prokarióta és eukarióta sejtekben egyaránt megtalálható. Ez a molekuláris chaperon igen nagy mennyiségben termelődik, amit jól jellemez, hogy a Hsp90 alkotja a citoplazmatikus fehérjéknek közel 1 % - át. A Hsp90 számos fehérje térszerkezetének kialakításában és konformációjának szabályozásában részt vesz. A Hsp70-nel ellentétben azonban egy körülhatárolt, jól meghatározott szubsztrát körrel rendelkezik, amelyeket a Hsp90 “kliens fehérjéinek” neveznek. A Hsp90 nagy mértékű specificitást mutat a kliens fehérjéi irányában.

A Hsp70-hez hasonlóan a Hsp90 is ATPáz aktivitással rendelkező ATP-függő chaperon. A chaperon funkció ellátásához a Hsp90 fehérjéknek homodimereket kell képezniük. A chaperon ciklus alatt ATP hidrolízishez kötött módon váltakozik a molekuláris fogószerű homodimer nyitott és szubsztrátot kötő zárt állapota (2. ábra). A Hsp70-hez hasonlóan a

Hsp90 is számos ko-chaperon közreműködését igényli a hatékony működéshez (Terasawa és mtsai, 2005).



2. ábra A Hsp90 konformációs változásának sematikus ábrázolása. A szubsztrát fehérje (zöld) a nyitott állapotú, ATP-t nem kötő Hsp90 dimerhez kapcsolódik. ATP kötődésekor kialakul a Hsp90 zárt állapota, ami az ATP hidrolíziséhez vezet. A nukleotid és a szubsztrát disszociációjával a Hsp90 újabb kliens kötésére válik alkalmassá. (Pearl és Prodromou, 2006 alapján)

Annak ellenére, hogy egyre nagyobb számban azonosítják a Hsp90 klienseit, még nem ismert, hogy melyek azok a szerkezeti, konformációs sajátosságai a szubsztrát fehérjéknek, amelyek meghatározzák a Hsp90-hez történő kötődésüket. A Hsp90 kliensei olyan fehérjék, amelyek a sejtekben inaktív formában vannak jelen (Young és mtsai, 2001). Azonban ebben az állapotukban a szerkezetük nem stabil és hajlamosak a denaturációra. Így ezek a kliens fehérjék chaperonok segítségét igénylik ahhoz, hogy megtartsák az aktivációra képes, de instabil konformációjukat. A Hsp90 kliens fehérjéi közé tartoznak protein kinázok (Akt, Raf1, Cdk4, CKII, Src family), szteroid hormon receptorok, transzkripciós faktorok (HSF1, p53, HIF1), eNOS, aktin, kalmodulin, az apoptózis folyamatában szerepet játszó Apaf-1, stb. Így elmondható, hogy a Hsp90 alapvető sejtfunciók működéséhez szükséges nélkülözhetetlen fehérje.

A Hsp90 kliensei között számos olyan fehérje van, amelyek szerepet játszanak a rákos állapot kialakulásában. Rákellenes szerekről (geldanamycin, radicicol) kimutatták, hogy nem specifikusan gátolnak bizonyos protein kinázokat, hanem megakadályozzák a Hsp90 chaperon rendszer működését. Az ATP helyett a Hsp90 ATP-kötő doménjéhez kapcsolódnak, így a Hsp90 nem tudja ellátni chaperon funkcióját. A rákos sejtekben, ellentétben a normál sejtekkel a Hsp90 aktivált multichaperon komplexekben található, amelyek jóval

érzékenyebbek az inhibitorokra, mint a szabad Hsp90 fehérjék. Ezzel magyarázható, hogy a drogok szelektíven a rákos sejteket pusztítják el (Kamal és mtsai, 2003).

2.2.2.1. A Hsp90 fehérje család tagjai

A Hsp90 családot eukariótákban négy fehérje alkotja, amelyek jellemzően a sejt különböző kompartmentjeiben fordulnak elő. A citoplazmában két Hsp90 családtag, a Hsp90 α és a Hsp90 β található, a Grp94 az endoplazmatikus retikulumba, a Hsp75/Trap1 pedig a mitokondriumba lokalizálódik. A citoplazmatikus Hsp90 izoformák egymással 76 %-os homológiát mutatnak. Stressz hatására a rövidebb α izoforma expressziója indukálódik, míg a hosszabb β izoforma kifejeződése csak kis mértékben változik meg. A *hsp90 α* gén promóter régiójában egy tökéletes HSE, és több "HSE-szerű" szekvenciárész azonosítható. Érdekes módon a *hsp90 β* gén első intronjában két HSE is található (Csermely és mtsai, 1998).

2.2.3. A Hsp110 család

A Hsp110 fehérje család tagjai a korábban említett chaperonokkal ellentétben csak eukarióta sejtekben fordulnak elő. A Hsp110 fehérjék a chaperonok egy kevésbé jellemzett csoportját alkotják, a sejtekben betöltött szerepük is csak a közelmúltban kezdett ismertté válni. A szekvencia és szerkezeti vizsgálatok alapján a Hsp110 fehérjék hasonlítanak a Hsp70 chaperonokhoz, így a Hsp110 fehérjékre, mint a Hsp70 távoli rokonaira tekintenek (Easton és mtsai, 2000).

A Hsp110 szerepéről sokáig csak töredék információk álltak rendelkezésre. Kimutatták, hogy a *hsp110* gén expressziója stressz, mint például a hőshock, ozmotikus stressz, oxidatív stressz, nehézfémek, dehidratáció, iszkémia, hatására indukálódik. A Hsp110 sejtvédő szerepét támasztotta alá, hogy túltermelésével elő tudták idézni a termotoleráns állapot kialakulását (Easton és mtsai, 2000). A Hsp110 overexpressziója a hőshock mellett egyéb stresszhatásokkal szemben is védelmet biztosított, mivel gátolta a stresszorok apoptotikus hatását (Hatayama és mtsai, 2001; Yamagishi és mtsai, 2006).

A Hsp110 szerepéről megállapították, hogy *in vitro* gátolja a denaturálódó fehérjék aggregációját, de önmagában nem tudja elősegíteni a denaturálódott fehérjék újraterakadását.

A Hsp110 szerepének megértését megalapozták azok a megfigyelések, hogy a Hsp110 együttműködik a Hsp70 chaperon rendszerrel élesztő és emlős sejtekben (Yam és mtsai, 2005). 2006-ban két kutatócsoport egymással párhuzamosan közölte, hogy a Hsp110 a Hsp70

nukleotid kicserélő faktora (NEF) (Raviol és mtsai, 2006; Dragovic és mtsai, 2006). Mivel a Hsp70 ADP-t kötő formája nagy affinitással kapcsolódik a szubsztrát fehérjéhez, a Hsp110 azáltal, hogy szabályozza az ADP-ATP kicserélődését, elősegíti a szubsztrát elengedését, és egy új chaperon ciklus elindulását. Tehát a Hsp110 fehérjék amellet, hogy gátolják a fehérjék aggregációját, NEF aktivitásuk révén aktívan hozzájárulnak a fehérjék natív szerkezetének kialakításához.

2.2.3.1. *A Hsp110 család tagjai*

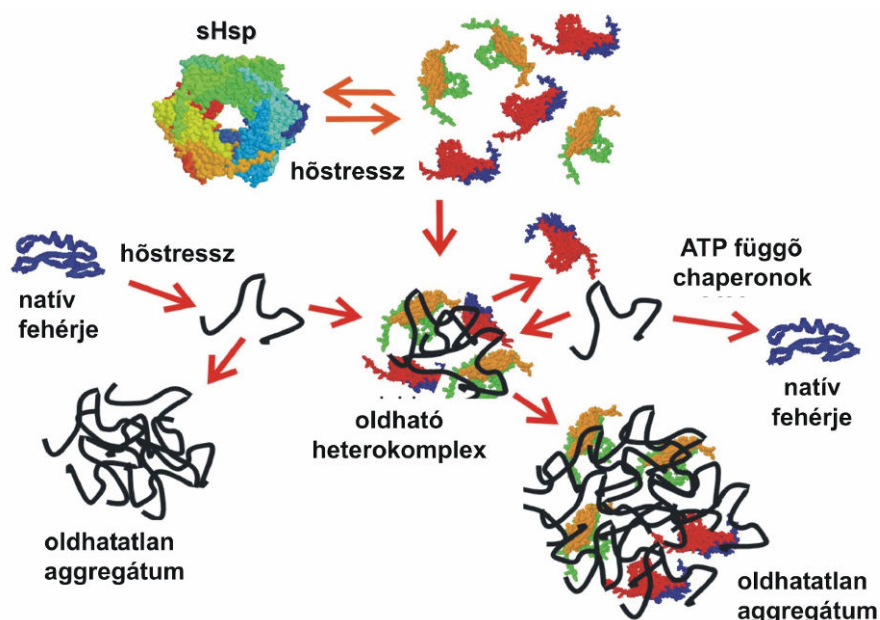
A emlős sejtekben a Hsp110 családba a Hsp110 két (α és β) izoformája, az Apg-1, Apg-2 fehérjék, és a Grp170 tartozik. A Grp170 a család kompartment specifikus tagja, az endoplazmatikus retikulumban fordul elő. A Hsp110 nem stresszelt állapotban is termelődik minden szövetben és a sejt vonalak jelentős részében, nagy mennyiségben mutatható ki az agyban és a májban (Lee-Yoon és mtsai, 1995). A *hsp110* génje intronokat tartalmaz, a két izoforma feltehetően alternatív kivágódás eredményeképp jön létre. A gén kifejeződése stresszhatásokra indukálódik (Santos és mtsai, 1998), ennek megfelelően az egér *hsp110* promóter régiójában két hősokk elem található.

2.2.4. Kis molekulásúlyú hősokk fehérjék

A kis molekulásúlyú hősokk fehérjék (sHsp) családjába igen változatos, 12-43 kDa molekulatömegű fehérjék tartoznak. Emberben tíz fehérjét sorolnak ebbe a családba (Kappé és mtsai, 2003). A családtagok közül azonban csak néhány (Hsp27, Hsp22 és az α B-krisztallin) a klasszikus értelemben vett hősokk fehérje, amelyek expressziója stresszhatások során indukálódik. A sHsp-k közös jellemzője, hogy egy közel száz aminosavból álló konzervált domént – ún. α -krisztallin domén - tartalmaznak. A fehérjék N-terminális karja és C-terminális farok része azonban változatos szerkezetű. További jellegzetességük, hogy a sHsp-k változatos méretű (50–700 kDa) és dinamikus felépítésű homo- ill. heterooligomereket hoznak létre. Az oligomerek építőkövei a sHsp dimerek (Sun és MacRae, 2005).

A sHsp-k működésükhöz ATP-t nem igénylő molekuláris chaperonok. Hidrofób felszínükön keresztül kölcsönhatásba lépnek a részlegesen denaturálódott fehérjékkel, és megakadályozzák a fehérjék nem kívánatos irreverzibilis aggregációját (Jakob és mtsai, 1993). Az instabil, olvadt állapotú fehérjékkel nagy méretű sHsp-szubsztrát fehérje komplexet

képeznek, és elősegítik, hogy ezek a fehérjék oldott állapotban maradjanak. Ezáltal az energiaigényes chaperon rendszerek számára hozzáférhető formában tartják a szubsztrát fehérjéket (Sun Y és MacRae, 2005), (3. ábra).



3. ábra A kis molekulású Hsp-k chaperon funkciója. A sHsp oligomerek stressz hatására kisebb egységekre esnek szét és kölcsönhatásba lépnek a részlegesen denaturálódott fehérjékkel. A sHsp-k ezáltal elősegítik, hogy a fehérjék az energiafüggő chaperon rendszerek számára hozzáférhető, oldott formában maradjanak. (van Montfort és mtsai, 2001 alapján)

A sHsp-k oligomerizációs képessége szükséges a chaperon funkció ellátásához és a szubsztrát megkötéséhez. Az oligomerizáció és chaperon szerep közti összefüggés vizsgálatok azt tapasztalták, hogy a szubsztrát fehérjével a hidrofób felszínnel rendelkező dimerek lépnek kölcsönhatásba, azaz a chaperon aktivitás ellátásához a oligomereknek dimerekké kell disszociálniuk. Azonban további kísérletek rámutattak arra, hogy az oligomereknek nem szükséges szétesniük, hanem az oligomeren belül történő szerkezeti változások is előidézik a szubsztrát kötődését a sHsp-khez. A fentiek alapján a folyamat lényeges eleme, hogy az oligomerek destabilizációjával hidrofób régiók kerülnek a felszínre, és így azok elérhetővé válnak a szubsztrát számára. (Sun Y és MacRae, 2005; Nakamoto és Vigh, 2007).

2.2.4.1. A Hsp27 és az α B-krisztallin

Az emlős sHsp-k között a Hsp27 és az α B-krisztallin a legjobban jellemzett családtagok. A *hsp27* és az *α B-krisztallin* gének normál állapotú sejtekben is kifejeződnek. Elsősorban olyan szövetekben termelődnek nagy mennyiségben, ahol intenzív oxidatív metabolizmus zajlik, például a szívizomban, vázizomban, agyban, vesében. A α B-krisztallin még a szemlencsében expresszáldódik nagy mértékben, ahol az α A-krisztallin fehérjével nagy méretű heterooligomereket hoz létre (Arrigo és mtsai, 2007). Emellett mindkét gén kifejeződése megemelkedik stresszhatások során, ennek megfelelően mindkét gén promóter régiójában a stressz indukálhatóságot biztosító HSE-ek találhatók. A *hsp27* esetében az első intronikus régióban is azonosítottak egy transzkripciót szabályzó HSE-et (Cooper és mtsai, 2000).

A Hsp27 és az α B-krisztallin aktivitását az N-terminális karon található 3-3 szerin oldallánc foszforilálódása is befolyásolja. A Hsp27-et a p38 MAP kináz által aktivált MAPKAP kináz 2 és 3 foszforilálja, így a Hsp27 foszforilációját pl. növekedési faktorok, differenciációt előidéző faktorok, a tumor nekrozis faktor, a hősök és az oxidatív stressz is szabályozzák. Az α B-krisztallin esetében a MAPKAP kináz 2, az ERK MAP kináz, és egy még nem azonosított kináz végzik a szerin oldalláncok foszforilációját. A foszforiláció mindkét fehérjénél megváltoztatja az oligomerizációs állapotot. A foszforiláció hatására a nagy méretű oligomerek kisebb egységekre esnek szét, ami módosítja a fehérje működését, chaperon aktivitását (Arrigo és mtsai, 2007; Nakamoto és Vigh, 2007).

A Hsp27 és az α B-krisztallin az oxidatív károsodásokkal szemben is védelmet nyújtanak. Egyrészt hozzájárulnak ahhoz, hogy az oxidatív védelemben központi szerepet játszó redukált glutation kellő mennyiségben rendelkezésre álljon, másrészt a sejtek vas felvételét is csökkentik. A sHsp-k magas szintje csökkenti a reaktív oxigén és nitrogénoxid gyökök mennyiségét, és ezáltal a lipid peroxidáció és a fehérje oxidáció mértékét is (Arrigo és mtsai, 2007).

A sHsp-k részt vesznek a citoskeletális rendszer szerveződésének, stabilitásának és dinamikájának szabályzásában. A Hsp27 nem foszforilált monomer formája az aktin filamentumok pozitív végéhez kapcsolódva gátolja az aktin polimerizációját. A foszforilált Hsp27 viszont stresszhatások során az aktin filamentumok stabilizálásában, és a filamentumhálózat újrendeződésében játszik fontos szerepet. A sHsp-k az aktin filamentumok mellett az mikrotubulusok és az intermedier filamentumok szerveződését és stabilitását is befolyásolják (Arrigo és mtsai, 2007).

A Hsp27 és az α B-krisztallin azáltal is elősegítik a sejtek túlélését, hogy több ponton is gátolják az apoptózis folyamatát. A Hsp27 kölcsönhatásba lép a mitokondriumból felszabaduló citokróm C-vel, gátolja az apoptoszóma kialakulását, a kaszpáz-3 aktivációját (Garrido és mtsai, 2006). Az α B-krisztallin pedig megakadályozza a proapoptotikus Bax, Bcl- χ s transzlokációját a mitokondriumhoz, így gátolja a citokróm C kiáramlását, és a kaszpáz-3 aktivációját (Mao és mtsai, 2004). A felsorolt sejtvédő funkciók összessége hozzájárulhat ahhoz, hogy az Hsp27 és az α B-krisztallin túltermelésekor ellenállóbbá válnak a sejtek az apoptózist kiváltó stresszhatásokkal szemben.

2. 3. A HSP INDUKCIÓ SZABÁLYOZÁSA STRESSZHATÁSOK SORÁN

Eukarióta sejtekben a génexpresszió egy soklépcsős folyamatsor összehangolt működésének az eredménye, így szabályozása több ponton is megvalósulhat. A Hsp-k mennyiségének stresszhatások során megfigyelhető növekedése elsősorban a transzkripció fokozásának köszönhető (Anckar és Sistonen, 2007).

A transzkripció szabályozásában központi szerepet játszanak a szekvencia specifikus transzkripciós faktorok, amelyek elősegítik a RNS polimeráz II-t tartalmazó preiniciációs komplex összeszerelődését és a kromatin szerkezetet fellazító hiszton módosító- és kromatin „remodelling” komplexek kapcsolódását.

2.3.1. A hősokk faktorok

A hősokk gének transzkripcióját szabályozó faktorok az ún. hősokk faktorok (HSF). Míg gerinctelen állatokban csak egyféle HSF van, addig a gerincesekben négy hősokk faktort (HSF1-4) különböztetünk meg. A HSF3 csak madarakban, a HSF4 csak emlősökben fordul elő. A HSF-ok a stresszválasz mellett a normál sejtműködés - például sejtciklus, embrionális fejlődés, differenciáció - során is szerepet játszanak a *hsp* gének expressziójának szabályozásában, de ennek részletes bemutatása kívül esik a dolgozat témakörén.

Az emlős sejtekben megtalálható 3 HSF közül a HSF1 szabályozza a *hsp* gének stressz hatására bekövetkező transzkripciós aktivációját (McMillan és mtsai, 1998). A HSF1

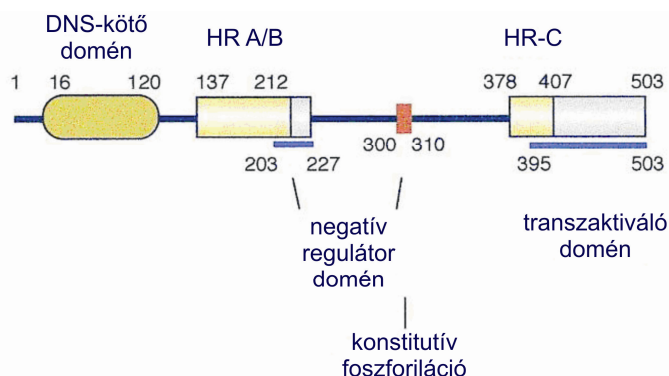
stresszválaszban betöltött központi szerepét bizonyítja, hogy hiányában nem figyelhető meg a *hsp* gének indukciója. Tehát a többi HSF sem tudja helyettesíteni a HSF1 funkcióját.

A HSF1 folyamatosan jelen van a sejtekben represszált állapotú monomer formában. Aktivációja stressz hatására történik meg, egy többlépéses folyamat eredményeként. Az aktiváció során a monomerek trimerizálódnak, és kiterjedt poszttranszlációs módosításokon esnek keresztül. Az aktívvá vált HSF1 szekvencia specifikusan a szabályzott gének promóter régiójában lévő hősokk elemekhez kapcsolódik és fokozza a transzkripció gyakoriságát.

Mivel dolgozatomban egyik kérdésfeltevése éppen ezen transzkripciós faktor stresszor-függő regulációjára vonatkozik, az alábbiakban rövid áttekintést kívánok adni a HSF1 szerkezetéről és működéséről.

2.3.2. A HSF1 szerkezete

A HSF1 domén szerkezete is tükrözi, hogy aktivációja egy több ponton is meghatározott folyamat. A fehérje négy jellegzetes doménből épül fel (4. ábra).



4. ábra A HSF1 szerkezeti elemei. A sematikus ábrán sorrendben a DNS-kötő domén, HR-A/B régió, a regulátor domén, a HR-C régió és a transzaktivációs domén van feltüntetve. A HSF1-en belül a domének elhelyezkedését az aminosav oldalláncok száma is mutatja. (Morimoto, 1998 alapján)

DNS-kötő domén:

Az N-terminálison található a "hélix-turn-hélix" szerkezetű DNS-kötő domén. Ez a legnagyobb mértékben konzervált domén a HSF családon belül.

Oligomerizációs domén:

A DNS-kötő domént követi az oligomerizációs domén. A *HSF trimerek* kialakulását biztosítja. A trimerekben az oligomerizációs domének egymás köré tekeredve egy hármas

szálú spirált hoznak létre. A doménen belül két olyan régió található, ahol minden hetedik aminosav hidrofób tulajdonságú (heptad repeats, **HR-A és HR-B régiók**). Ezek a hidrofób aminosav oldalláncok a tripla hélixben térközbe kerülnek és *stabilizálják a trimer szerkezetét*. A két HR régió mellett egy harmadik, ún. **HR-C régió** is található. A HR-C régió intramolekuláris kölcsönhatásba lép a HR-A és HR-B régiókkal, és *a HSF monomer állapotát stabilizálja*. Ennek megfelelően a HR-C régió deléciójakor a HSF1 konstitutívan aktív trimer formában fordul elő, még a HR-A és HR-B régiók eltávolítása gátolja a trimerek kialakulását.

Transzaktiváló domén:

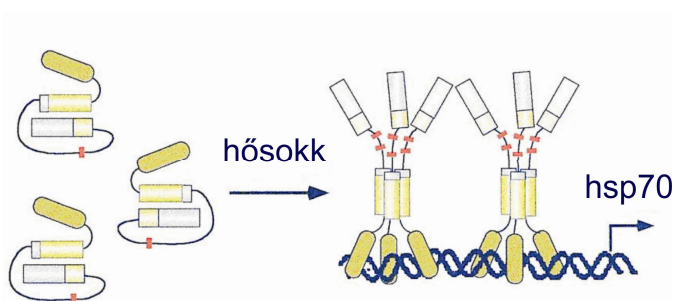
A fehérje C-terminálisán helyezkedik el a transzaktiváló képességért felelős domén. Ez a domén hidrofób és savas aminosav oldalláncokban gazdag, és a preiniciációs komplex alegységeivel, valamint különböző szabályzó fehérjékkel létesít kapcsolatot. Fontos megemlíteni, hogy a transzaktivációs domén önmagában *konstitutívan fokozza* a transzkripció gyakoriságát.

Regulátor domén:

A transzaktiváló képesség *szabályozott működését* biztosítja a HR-A/B és HR-C régiók között található regulátor domén. A regulátor domén inaktív állapotban tartja a transzaktiváló domént, ami csak stressz hatására tud felszabadulni gátló hatás alól (Anckar és Sistonen, 2007).

2.3.3. A HSF1 aktiváció mechanizmusa

A HSF1 aktivációjának tehát két kulcsfontosságú lépése van. Egyrészt a DNS-kötő képesség megszerzéséhez a monomereknek trimerizálódniuk kell, másrészt a transzkripció fokozásához a transzaktivációs doménnek fel kell szabadulnia a regulátor domén gátló hatása alól (5. ábra).



5. ábra A HSF1 aktivációja. A HSF1 monomereket a HR-A/B és HR-C régiók (sárga elemek) közti kölcsönhatás stabilizálja. Stressz hatására a HSF1 trimerizálódik, hiperfoszforilálódik (piros elemek) és szekvencia specifikusan a HSE-khez kapcsolódik. (Morimoto, 1998 alapján)

2.3.3.1. A DNS-kötő képesség megszerzése

A konstitutívan expresszáldó HSF1 normál állapotban DNS kötésre képtelen monomer formában található meg a sejtben (Sarge és mtsai, 1993). Megfigyelték azonban, hogy a HSF1 baktériumokban kifejeztetve, vagy emlős sejtekben túltermeltetve spontán, stresszhatás nélkül is trimerizálódik (Rabindran és mtsai, 1991; Sarge és mtsai, 1993). Ez arra utal, hogy a HSF1 oligomer képzésére hajlamos, és egy kititrálható faktor szükséges ahhoz, hogy represszált, monomer formában maradjon a sejtekben (Zuo és mtsai, 1995). Számos kísérleti adat utal arra, hogy a Hsp90, ill. a Hsp90-nel együttműködő multichaperon komplex vesz részt a monomerek stabilizálásában. A HSF1 tehát a Hsp90 egyik kliens fehérjéje, amelyet a Hsp90 chaperon komplex tart aktivációra képes, de inaktív állapotban (Voellmy és Boellmann, 2007).

2.3.3.2. A foszforilációs mintázat szabályozza a HSF1 aktivitását

A trimerizáció, és a DNS-kötő képesség megszerzése azonban még nem elegendő a transzkripció aktivitás fokozásához. Ezt bizonyítja, hogy az emlős sejtekben overexpresszált HSF1 bár spontán trimerizálódik, de a transzaktiváló képessége csak elhanyagolható mértékű (Zuo és mtsai, 1995). Továbbá, a nem szteroid típusú gyulladáscsökkentők, mint a szalicilát, menadion, vagy a hidrogén-peroxid kezelés hatására a HSF1 DNS kötésre képes trimerré alakul, de a *hsp* gének expressziója nem indukálódik (Jurivich és mtsai, 1992; Bruce és mtsai, 1993).

Ahhoz tehát, hogy a DNS kötésre képes HSF1 fokozza a transzkripció gyakoriságát egy kulcsfontosságú lépésnek is meg kell történnie: a transzaktiváló doménnek fel kell szabadulnia a regulátor domén gátló hatása alól. Ez a folyamat együtt jár a HSF1 foszforilációs állapotának változásával (Sarge és mtsai, 1993). A HSF1 számos aminosav oldallánca nem stresszelt sejtekben is foszforilált, de stressz hatására átrendeződik a foszforilációs mintázat, és a HSF1 ún. hiperfoszforilált állapotba kerül. A hiperfoszforilált állapot kialakulása korrelál a transzaktiváló képesség megszerzésével (Cotto és mtsai, 1996; Xia és Voellmy, 1997).

A mai napig nem ismert, hogy mely aminosavakat érinthetik a poszttranszlációs módosítások, és az egyes módosítások hatása sem pontosan tisztázott. A folyamat komplexitását jól szemlélteti, hogy a humán HSF1-ben 12 aminosav oldalláncról már bizonyították, hogy a hőstresszelt sejtekben foszforilált állapotban fordulnak elő (Guettouche és mtsai, 2005).

Azonban annak ellenére, hogy a hiperfoszforilációval együtt jár a transzaktivációs képesség megszerzése, eddig még csak két szerin oldalláncot sikerült azonosítani (Ser230, Ser326) (Holmberg és mtsai, 2001; Guettouche és mtsai, 2005), amelyek foszforilációja összefüggésbe hozható a HSF1 aktivációjával. A Ser230 aminosav foszforilációját feltehetően a kalcium/kalmodulin-függő protein kináz II végzi. A Ser326 foszforilációját katalizáló enzim nem ismert.

Érdekes módon több vizsgált szerin oldallánc (Ser303, Ser307, Ser363) foszforilációja, bár stressz hatására fokozódik, mégis az inaktív, represszált állapot kialakításában/fenntartásában játszik szerepet (Chu és mtsai, 1998; Wang és mtsai, 2003). A Ser303 oldalláncot a glikogén szintáz kináz 3 (GSK3), a Ser307 oldalláncot az ERK MAPK, még a Ser363-ot egy protein kináz C izoforma, vagy a JNK MAPK foszforilálja. A felsorolt kinázoknak tehát a HSF1 inaktiválásában tulajdonítanak jelentőséget.

Bizonyos Ser oldalláncok foszforilációja a sejtmagi transzlokációt (Ser419) (Kim és mtsai, 2005), vagy a Hsp90 chaperon komplex-szel való kölcsönhatást (Ser121) szabályozzák (Wang és mtsai, 2006).

A poszttranszlációs módosítások körét tovább szélesíti, hogy a foszforilációs mintázatban bekövetkező változások mellett a HSF1 stressz hatására szumoilálódik is. A módosítások egymásra hatását mutatja, hogy a Ser303 oldallánc foszforilációja előfeltétele a Lys298 oldallánc szumoilációjának (Hietakangas és mtsai, 2003). Ez a módosítás is a transzaktiváló képesség gátlásához járul hozzá (Hietakangas és mtsai, 2006).

Érdekes megfigyelés, hogy a HSF1 represszált formáját stabilizáló Hsp90 tartalmú chaperon komplex nem csak a HSF1 monomerekkel, hanem a trimerekkel is kapcsolatban van (Voellmy és Boellmann, 2007). Mivel a stresszhatások, ill. a HSF1 regulátor doménjét érintő mutációk a HSF1 trimer/Hsp90 komplex szétesését eredményezik, így feltételezik, hogy a regulátor doménben történő poszttranszlációs módosítások abban is szerepet játszanak, hogy a trimerizálódott HSF1 le tudjon válni a Hsp90 chaperon komplexről.

2.3.4. A *hsp70* gén promóter régiója

A stressz hatására aktiválódó HSF1 célgénjei közül a *hsp70* az egyik legismertebb. A *hsp70* expressziójának szabályozása régóta intenzíven kutatott terület. Ez a *hsp70* általános jelentősége mellett annak is köszönhető, hogy a transzkripció szabályozás törvényszerűségei tanulmányozásának jó modellje, mivel a gén kifejeződése egyrészt indukálható, másrészt még szövetspecifitást is mutat (Huang és mtsai, 2001).

Emlős sejtekben két indukálható, közel azonos szekvenciájú *hsp70* gén (*hsp α 1a* és *hsp α 1b*) található, melyek az MHCIII kromoszómális régióban helyezkednek el egymás szomszédságában. Mindkét génre jellemző, hogy expressziójuk stressz hatására indukálódik, és sejtciklus függő módon szabályzott (Wu és mtsai, 1986). E mellett bizonyos onkogének (c-myc, c-myb, p53, adenovirális E1a) is aktiválják a transzkripciójukat (Taira és mtsai, 1999). Ennek megfelelően a gének szabályzó régiója is nagy mértékű hasonlóságot mutat.

2.3.4.1. Hősokk elemek

A stresszindukált kifejeződést a promóter régióban található ún. hősokk elemek (HSE) biztosítják, melyek a HSF1 szekvencia specifikus kötőhelyei. A HSF1 DNS-kötő doménje egy öt nukleotidból álló, jellemzően nGAAn szekvenciájú DNS részletet ismer fel. Ahhoz, hogy a HSF1 trimer minden tagja kapcsolódjon a DNS-hez, a fenti nGAAn szekvenciának háromszor kell ismétlődnie (Abravaya és mtsai, 1991).

A humán *hsp70.1* gén (*hsp α 1a*) promóterének egyik HSE-ében például ötször ismétlődik a pentamer szekvencia úgy, hogy az 1., 3. és 4. pentamerben tökéletes az egyezés a konszenzus nGAAn szekvenciával, de a 2. és 5. pentamerben nem. Ehhez a HSE szekvenciához két HSF1 trimer is tud kapcsolódni. A HSF-k együttműködnek egymással, azaz az első trimer kapcsolódása megkönnyíti a következő HSF trimer bekötődését a szomszédos felismerőhelyhez (Kroeger és mtsai, 1993).

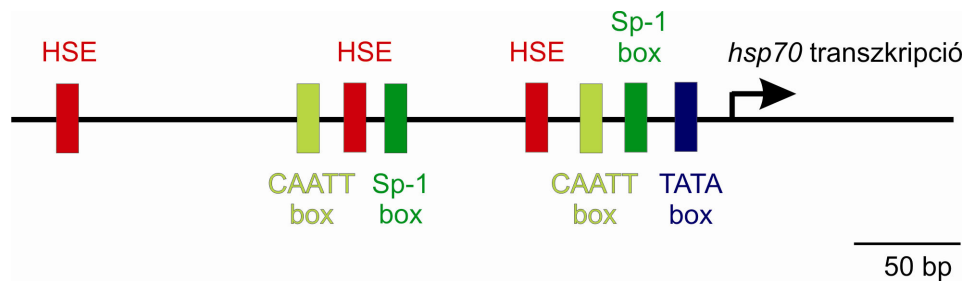
Különbség a két *hsp70* gén között, hogy a *hsp α 1a* esetében kettő, a *hsp α 1b*-nél viszont három HSE-t azonosítottak a promóter régióban (Friedrich és mtsai, 1998). Elteréseket figyeltek meg a két gén indukálhatóságban is; a *hsp α 1b* (egérben *hsp70.1*) érzékenyebb, és a stresszhatások szélesebb körére reagál (Lee és Seo, 2002). A *hsp α 1a* pedig az erőteljesebb károsodások esetében felelős a Hsp70 szint növekedés jelentős részéért (Akçetin és mtsai, 1999). A két gén nem teljesen azonos szabályozását mutatja, hogy hiperozmotikus stresszre csak a *hsp α 1b* reagál, ami nem a HSE-ken, hanem három távolabbi TonE elemen keresztül történik (Woo és mtsai, 2002).

2.3.4.2. További promóter elemek

A stresszindukálhatóságot biztosító HSE-k mellett további transzkripciós faktor kötőhelyek is találhatóak a promóter régióban. Ilyenek például az Sp1-kötő helyek és a CAAT-boxok, amelyek gének alapszintű expresszióját és a fellazult kromatinszerkezet kialakulását biztosítják (Williams és Morimoto, 1990). Az onkogének hatása és a sejtciklus függő

szabályozás a bazális promóterelemekhez kapcsolódó faktorokon keresztüli fehérje-fehérje kölcsönhatások révén valósul meg (Taira és mtsai, 1999).

Munkám során stresszor specifikus szabályzó elemek után kutatva a patkány *hsp70.1* (*hspa1b*) szabályzó régióját vizsgáltuk, ezért a 6. ábrán ezen gén szabályzó régiójának jellemző elemeit mutatom be.



6. ábra A patkány *hsp70.1* gén szabályzó régiója. Az ábrán a közeli, -350 bp-ig terjedő promóter szakasz transzkripciós faktor kötőhelyeit tüntettük fel. A régióban 3 HSE, valamint a bazális expressziót biztosító TATA-box, CAATT-boxok és Sp-1-kötő helyek találhatók.

2. 4. A STRESSZVÁLASZ AKTIVÁCIÓJÁNAK FOLYAMATA

A stressz hatására bekövetkező válaszreakció is egy szignál transzdukciós folyamat eredménye, melynek az alábbiak az általános lépései:

- szignál érzékelése
- jel továbbítása, felerősítése, integrációja
- effektor molekulák megjelenése/aktivációja

Ahogy haladunk az egyre “korábbi” események felé a stresszválasz folyamatában, azt tapasztaljuk, hogy egyre hiányosabbak az ismereteink, az összefüggések egyre kevésbé feltártak.

A korábban bemutatott Hsp-k a stresszválasz **effektor molekuláinak** egyik csoportját alkotják, felépítésük és működésük jól jellemzett.

A *hsp*-k expresszióját szabályzó HSF1 az egyik **végző szabályzó fehérjének** tekinthető, amely közvetlenül befolyásolja az effektor molekulák képződését. A HSF1 szerkezetéről, aktivációjáról, a transzkripcióra gyakorolt hatásáról számos adat áll már rendelkezésre. Azonban a mai napig nem ismert aktivációjának pontos mechanizmusa. A széles körű

poszttranszlációs módosítások arra utalnak, hogy a HSF1 központi, integráló szerepet tölt be, ugyanis számos stressz által érintett jelátviteli útvonal aktivációja vagy éppen gátlódása nyomot hagy a fehérjén. A módosítások mintázata meghatározhatja az aktivált gének körét és az indukció mértékét.

Több **jelátviteli útvonal** esetében bizonyították, hogy részt vesznek a stresszválasz folyamatában. Ide tartoznak többek között az ERK, JNK, p38 MAP kináz útvonalak, az intracelluláris Ca^{2+} szint növekedés, valamint a PKB/AKT jelátviteli út (Nadeau és Landry, 2007; Price és Calderwood, 1991). A megemlített útvonalak összefüggésbe hozhatók a HSF1 meghatározott Ser oldalláncainak foszforilációjával, ezen keresztül a *hsp* gének indukciójával, valamint az apoptózisban résztvevő fehérjék szabályozásával is. Ily módon aktivációjuk és szövevényes egymásra hatásuk végső soron meghatározza a sejtek sorsát, elősegíti a sejtek túlélését, vagy apoptózisra ítéli őket. Az útvonalak közti összefüggések, de kiváltképp az aktivációjuk mechanizmusa még részleteiben nem tisztázott.

A stresszválasz talán legkevésbé jellemzett pontja a folyamat első lépése, a **stressz érzékelése**. Máig is központi kérdés, hogy melyek a sejtek elsődleges stressz-szenzorai, amelyek a környezeti változásokra reagálva elindítják a jelátviteli utakat, és elvezetnek többek között a HSF1 aktivációhoz és a *hsp*-k indukciójához.

2.4.1. A stresszérzékelő mechanizmusok

2.4.2.1. A denaturált fehérjék, mint stressz-szenzorok

A stresszválasz során indukálódó Hsp-k funkciójukat tekintve molekuláris chaperonok, és a fehérjék működőképes, natív szerkezetének kialakításában és fenntartásában játszanak szerepet. A Hsp-k funkciójából kiindulva számos szerző joggal feltételezte, hogy elsősorban a fehérjék károsodása, denaturációja szolgálhat jelként a HSF1 aktivációjához és ezen keresztül a *hsp*-k indukciójához. A protein denaturáció központi jelentőségét támasztja alá az a korai megfigyelés, hogy a *hsp* gének indukcióját elő lehetett idézni denaturált fehérjék mikroinjekciójával, míg natív fehérjék hatására nem indult el a stresszválasz folyamata (Ananthan és mtsai, 1986).

A széles körben elfogadott „denaturációs modell” alapján a HSF1 aktivációja következőképp történik. Normál körülmények között a HSF1-et Hsp90/Hsp70 tartalmú chaperon komplexek tartják monomer, inaktív állapotban. A HSF1 ingázik a sejtmag és a citoplazma között. Stressz hatására megnő a károsodott fehérjék mennyisége, és a

denaturálódott fehérjék “elszívják” a HSF1-től a chaperonokat. Ennek következtében a HSF1 felszabadul a chaperon gátlás alól, felhalmozódik a sejtmagban, és megtörténnek a HSF1 aktiváció egyes lépései. Később az egyre nagyobb mennyiségben termelődő Hsp-k (Hsp70, Hdj-1) és egy HSF1-kötő fehérje (HSBP1) a HSF1-hez kapcsolódik, ami a trimerek disszociációjához, és az inaktív monomerek megjelenéséhez vezet. Ez végül a stresszválasz lecsengését eredményezi (Morimoto, 1998).

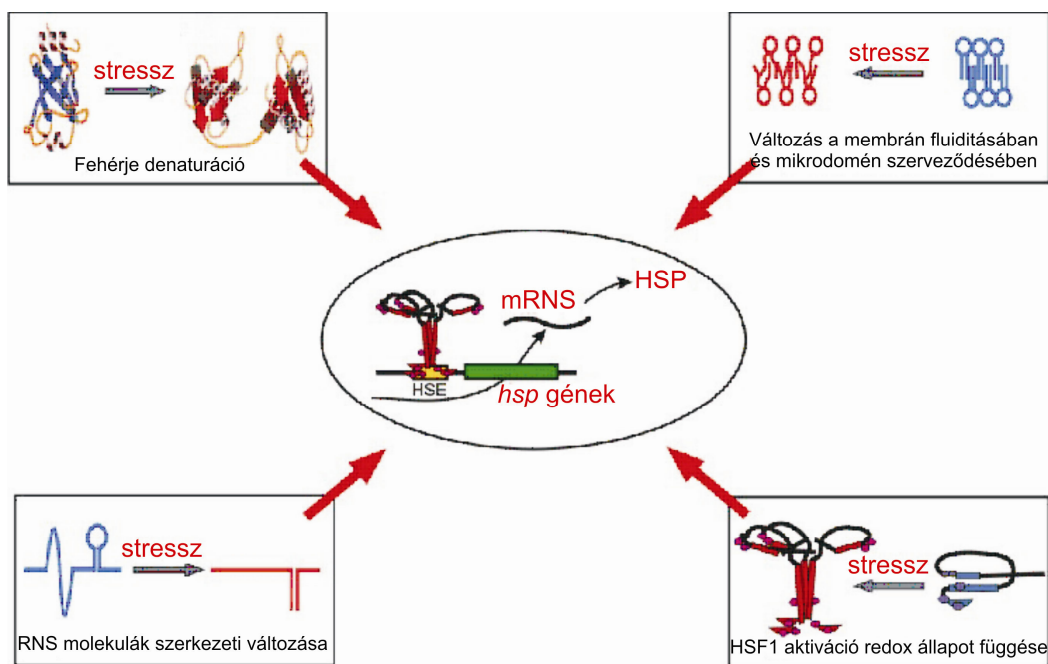
További munkák is megerősítették, hogy a fehérje denaturáció fokozódása határozza meg a HSF1 aktiváció és a *hsp70* indukció mértékét (Gossiau és mtsai, 2001).

2.4.2.2. Az alternatív stresszérzékelő mechanizmusok kérdése

A *hsp* gének indukcióját egymástól igen eltérő tulajdonságú környezeti stresszhatások, patológiás állapotok és fiziológias folyamatok is előidézik. Így felmerül a kérdés, hogy mennyire tekinthető általános érvényűnek a fent vázolt denaturációs modell? Vajon a különböző stresszorok mennyire közös vagy mennyire eltérő útvonalakon keresztül idézik elő a HSF1 aktivációját.

Több adat is alátámasztja azt az elképzelést, hogy a stresszhatások különböző útvonalakon keresztül indítják el a hősokk választ. Az enyhe hősokk esetében például a *hsp* expresszió redukáló szerekekkel gátolható, még az erőteljes hősokk során ez nem figyelhető meg (Huang és mtsai, 1994). Az enyhe hősokk által kiváltott stresszválaszban a Rac1 monomer G fehérje nélkülözhetetlen, míg az erőteljes hősokk Rac1 független útvonalon aktiválja a HSF1-et (Han és mtsai, 2001; Park és mtsai, 2005). A kadmium kezelés viszont koncentrációfüggő módon, vagy a p38, vagy az ERK MAP kinázokat aktiválva indukálja a Hsp70 termelődését (Hung és mtsai, 1998). Az ozmotikus stressz és a hipoxia pedig - szemben a hőstresszel - a p38 MAPK útvonalon keresztül fokozzák a *hsp70* gén kifejeződését (Sheikh-Hamad és mtsai, 1998; Uehara és mtsai, 1999).

Mivel a hősokk válasz stresszor specifikus módon, különböző útvonalakon keresztül is megvalósulhat, feltételezhető, hogy a fehérje denaturáció mellett más, alternatív stresszérzékelő mechanizmusok is működnek a sejtekben (7. ábra).



7. ábra A sejtek potenciális stresszérzékelői: fehérjék, RNS molekulák, membránok, redox állapot. (Vigh és mtsai, 2007 alapján)

Redox-érzékelő

Egy lehetséges stressz-szenzor a redox állapot változása. A HSF1 képes érzékelni a redox állapot változását, mivel DNS-kötő doménjében két kitüntetett szerepű cisztein aminosavoldallánc található, amelyek között stressz hatására intra- vagy intermolekuláris diszulfid hidak alakulnak ki. A cisztein oldalláncok és a kialakuló diszulfid hidak szükségesek a HSF1 trimerizációjához és a *hsp* gének indukciójához (Ahn és Thiele, 2003).

RNS-érzékelő

Az RNS molekulák konformációjában bekövetkező változás is potenciális stressz-szenzornak tekinthető (Shamovsky és Nudler, 2008). Meglepő felfedezés volt, hogy a HSF1 aktivációjához szükséges egy konzervált, nem kódoló RNS molekula (hősokk-RNS1, HSR1) jelenléte is. Kimutatták, hogy a HSR1 csendesítésekor nagy mértékben visszaesik a *hsp* gének indukciója. A HSR1-nek - az eEF1a-val együtt - az aktív HSF1 trimerek kialakulásában, stabilizálásában tulajdonítanak nélkülözhetetlen szerepet. Számítógépes modellezés alapján a HSR1 igen összetett másodlagos szerkezettel rendelkezik, ami hősokk hatására ráadásul át is alakul. Ez alkalmassá teszi a termoszenzor funkció betöltésére (Shamovsky és mtsai, 2006).

Membrán-érzékelő

A fentiek mellett a membránok is részt vehetnek a stressz érzékelés folyamatában. Csoportunk korábbi, azóta bizonyított feltételezése alapján a sejtmembrán nem csupán a celluláris károsodás és az adaptációs mechanizmusok egyik célpontja, de aktuális

lipidösszetétele és fizikai állapota, ill. annak modulációja egyben központi szereppel bírhat a stressz szignál elsődleges érzékelésében, a stressz indukálta jelátviteli útvonalak aktivációjának szabályozásában (Vigh és mtsai, 1998)

A membrán-szenzor hipotézis részletesebb áttekintése előtt azonban még fontosnak tartom az eukarióta membránok szerkezetének, azon belül is a membránok mikrodomén szerveződésének bemutatását.

2.5. A MEMBRÁNOK SZERVEZŐDÉSE

A sejteket és az organelumokat határoló biológiai membránok lipidekből, fehérjékből és szénhidrátokból épülnek fel. A fehérjék az amfipatikus lipidek által létrehozott kettős rétegbe ágyazódnak be különböző mélységben és erősséggel. Az 1972-ben közölt Singer-Nicolson fluid-mozaik membrán modell a membránokat egy két dimenziós oldatnak tekinti, amelyben a viszkózus foszfolipid kettősréteg oldószerként szolgál az integráns membránfehérjék számára (Singer és Nicolson, 1972). A modell értelmében a molekulák véletlenszerűen oszlanak el a membránban, foroghatnak, valamint a membrán síkjában oldalirányban szabadon elmozdulhatnak.

A Singer-Nicolson elképzeléshez képest napjainkban sokat finomodott és átalakulóban van a membránokról alkotott kép (Vereb és mtsai, 2003). A kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a molekulák nem véletlenszerűen és homogénen oszlanak el, hanem jelentős mértékű kettősréteg aszimmetria, laterális heterogenitás, valamint (funkcionális) kompartmentalizáció figyelhető meg a membránon belül (Vigh és mtsai, 2005).

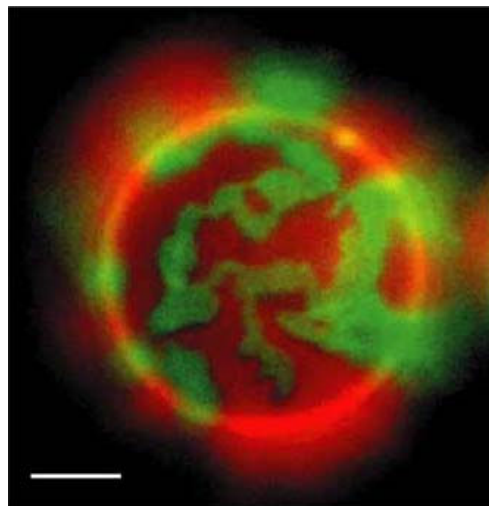
2.5.1. A membrán kettősréteg aszimmetriája

Az állati sejtek plazmamembránjában a különböző lipidosztályok eltérő mennyiségben találhatók meg a kettősréteg két oldalán: a foszfatidil-kolin, a szfingomielin, ill. a glikoszfingolipidek szinte kizárólag a külső oldalon, míg az aminofoszfolipidek (foszfatidil-szerin, foszfatidil-etanolamin), valamint a foszfatidil-inozitol és foszfatidsav elsősorban a sejt felőli oldalon helyezkednek el. A membrán külső és belső rétege közötti aszimmetria fenntartásáról külön enzimrendszerek gondoskodnak (Devaux és Morris, 2004).

A membrán aszimmetriája alapvető biológiai jelentőséggel bíró tulajdonság. Az aszimmetrikus elrendeződés biztosítja például a foszfatidil-inozitol hozzáférhetőségét a belső rétegben specifikus foszfolipázok számára. A citoplazmatikus oldalon található foszfatidil-szerin pedig stresszhatásokra, pl. erősebb hőhatás vagy trombocita aktiváció, “összekeverő enzimek” (scramblase-ok) a külső rétegbe transzportálják. A külső rétegben megjelenő foszfatidil-szerin felismerő szignálként szolgál fagociták számára (Verhoven és mtsai, 1995). A sejtek öregedése és apoptózisa során részben ez a folyamat adja meg a jelet a falósejtek számára a bekebelezéshez (Martin és mtsai, 1995).

2.5.2. A membrán mikrodomének szerveződésének alapja: a fázisszeperáció

A membránok laterális heterogenitásának, a membránkomponensek kompartmentalizációjának lehetőségét (többek között) biofizikai mérések adatai vetették fel. Megfigyelték ugyanis, hogy több komponensű liposzómákban egymás mellett létezhetnek különböző fázisállapotú lipiddomének. Az összetételtől, valamint a hőmérséklettől függően gél, rendezett-folyadékkristályos („liquid-ordered”, l_o), valamint rendezetlen-folyadékkristályos („liquid-disordered”, l_d) fázisok szeparálódhatnak (Brown és London, 1997) (8. ábra).



8. ábra A gél és folyadékkristályos fázisok szeparálódása lipid vezikulákban. A vezikulákat dilauril-foszfatidilkolin (rövid rendezetlen zsírsavdallánc) és dipalmitoil-foszfatidilkolin (hosszú rendezett zsírsavdallánc) lipidekből hozták létre. A pirosan fluoreszkáló lipid analóg (DiIC18) a rendezett, a zölden fluoreszkáló lipid analóg (BOIPY-PC) pedig a rendezetlen doménekben halmozódik fel. (Edidin, 2003 alapján)

A lipidek az l_d és az l_o fázisokban - a „fagyott”, rendezett gélfázissal ellentétben - mozgékonyak, oldalirányban elmozdulhatnak. Az l_o fázist a magas olvadási hőmérsékletű, hosszú, telített zsírsavdallancú lipidek hozzák létre koleszterin jelenlétében, mivel ezek a molekulák szorosan egymás mellé tudnak rendeződni. Az l_d fázisban kevésbé szoros a „pakolódás” mértéke. Ebben a fázisban a telítetlen zsírsavdallancú, alacsony olvadási hőmérsékletű lipidek találhatók (Brown és London, 1997).

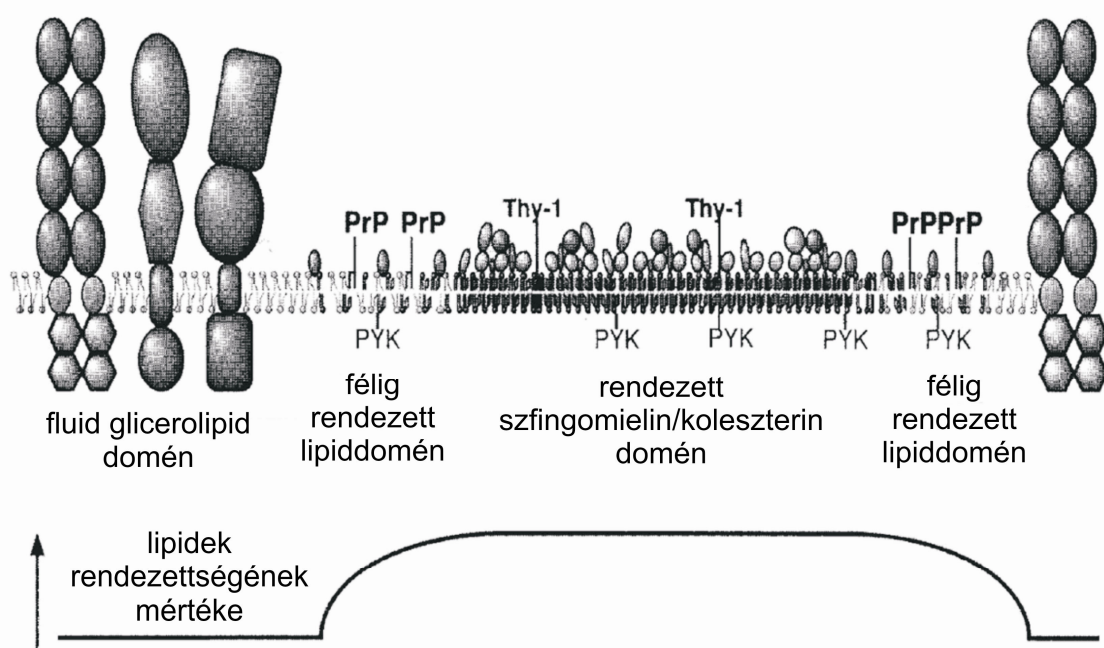
Tehát mesterséges membránokban a lipidek nem véletlenszerűen keverednek egymással, hanem a fázisszeparáció következtében eltérő tulajdonságú és összetételű lipiddomének alakulnak ki. Mivel a biológiai membránokat igen sokféle lipidmolekula építi fel, amelyek egyrészt a poláris fejcsoport minőségében, másrészt a hidrofób zsírsavdallancok hosszában és telítettségében különböznek egymástól, joggal feltételezhető, hogy a membránokban fiziológiai körülmények között koleszterin jelenlétében elkülönülhetnek és együtt létezhetnek l_o és l_d fázisállapotú membrándomének (Vigh és mtsai, 2005).

2.5.3. A rendezett mikrodomének (raftok) biokémiája

Az élő sejtek membránjának laterális heterogenitását biokémiai adatok is alátámasztják. Nem ionos detergensok alkalmazásakor detergens kezeléssel nem szolubilizálható, ún. detergens rezisztens, kis sűrűségű membránfrakció (DRM) izolálható. Ez már önmagában is azt jelzi, hogy a membránokban különböző szerveződésű, így a detergens kezelésre eltérően reagáló domének találhatók. Mivel az l_o fázisállapotú lipiddomének sem szolubilizálhatók nem ionos detergensekkel, így feltételezhető, hogy a DRM frakció az l_o fázisállapotú membránrégiókból alakul ki (Brown és London, 1997).

A DRM frakció összetételének vizsgálatakor azt tapasztalták, hogy nagy mennyiségben tartalmaznak koleszterint, szfingolipideket és telített zsírsavdallancú lipideket (Brown és Rose, 1992). A DRM-okban a lipidek mellett fehérjék is találhatók, jellemző proteinek pl. a glikozil-foszfatidilinozitol horgonnyal rendelkező fehérjék, valamint a lipid/kettős zsírsav horgonyt viselő fehérjék (pl. Src-kinázok, G protein α alegysége, Hedgehog). Ezek a fehérjék olyan telített lipid/zsírsav horgonnyal rendelkeznek, amelyek a rendezett l_o lipidfázis felé mutatnak nagy affinitást. Transzmembrán fehérjék is detektálhatók a DRM-ekben, azonban még nem tisztázott, hogy az asszociációért a fehérjék mely tulajdonságai felelősek (Scheiffele és mtsai, 1997).

A fenti ismeretek birtokában a kilencvenes évek végén egy új membrán-modellt vázoltak fel (9. ábra).



9. ábra A raft modell. A membránban különböző összetételű és eltérő fázisállapotú régiók különülnek el. (Madore és mtsai, 1999 alapján)

A modell alapján a membránban koleszterin-szfingomielin gazdag, az l_o fázishoz hasonló állapotú régiók különülnek el, amelyeket raftoknak (membrántutajoknak) nevezték el. A raftokat egy kevésbé rendezett, fluidabb, elsősorban telítetlen zsírsavdallancú glicerolipideket tartalmazó membránmátrix veszi körül (Simons és Ikonen, 1997). A raftokban a membránfehérjéknek csak egy része mutatható ki, tehát míg bizonyos fehérjék koncentrálnak, addig más fehérjék kirekesztődnek azokból. Azaz a raftok a mikrokörnyezetüktől eltérő, jellegzetes lipid- és fehérje összetétellel rendelkező szigeteket jelentenek a membránban. A membránfunkciók közül a raftoknak alapvető jelentőséget tulajdonítanak például a szignál transzdukciós folyamatok szabályozásában, szervezésében (Simons és Toomre, 2000).

A raftok összetételének vizsgálatában széles körben elterjedt módszer a fent említett DRM-ok analízise. Megfigyelték azonban, hogy a detergens minősége, ill. az extrakció körülményeinek változtatása nagy mértékben befolyásolja a kapott eredményeket (Pike és mtsai, 2005). Ezen kívül az izolálás során elveszíthetjük a raftokhoz csak gyengén asszociálódó, ill. a citoskeletonhoz is kötődő fehérjéket. Így az adatok értelmezése és a következtetések levonása körültekintést igényel. A raftok szerepének vizsgálatára, feltételezett raft komponensek azonosítására azt a megközelítést is használják, hogy a raftok natív szerkezetének - pl. koleszterin részleges kivonással történő - megbontása után

tanulmányozzák a membránfunkciók módosulását, a fehérjék lokalizációjának, DRM-okhoz való asszociációjuknak a változását.

A fentebb ismertetett biokémiai módszerek jelentősen hozzájárulnak a raftok szerveződéséről és funkciójáról alkotott képhez, azonban korlátokkal is rendelkeznek. A módszerek nem nyújtanak kellő információt a DRM-ok eredetéről, nyitva hagyják a kérdést, hogy az élő sejtekben hogyan valósul meg a laterális heterogenitás, milyen formában léteznek a tárgyalt raftok (Munro, 2003).

2.5.4. A membrán mikrodomének és raftok mikroszkópiája

A „raft korszakot” megelőzően is történtek erőfeszítések a membránok mikrodomén szerveződésének közvetlen kimutatására. Fluoreszcens mikroszkópos technikával („fluorencence recovery after fotobleaching”, FRAP módszer) már 1987-ben bizonyították mikrométer skálájú domének létezését fibroblaszt sejtekben (Yechiel és Edidin, 1987). Ezen kezdeti sikerek ellenére a raftok detektálása számos nehézségbe ütközött. Jellemzően csak a raftok összekapcsolásával, a raft komponensek keresztkötésével tudták láthatóvá tenni a mikrodoméneket (Harder és mtsai, 1998). Ennek egyik magyarázata az volt, hogy a raftok mérete általában túl kicsi ahhoz, hogy fénymikroszkóppal detektálható legyen (ld. **2.5.5. Mit nevezünk ma raftnak?**).

Így a membrándomének tanulmányozása új technikák, összetettebb, specializáltabb módszerek alkalmazását tette szükségessé. Egyrészt a raft komponensek lokalizációjának, együttállásának, másrészt a molekulák mozgásának követésével próbáltak információt nyerni ezen domének összetételéről, dinamikájáról, méretéről, fizikai állapotáról.

Fontos előrelépés volt az egy molekula mikroszkópia („single dye tracing microscopy”) bevezetése, mellyel a módszer úttörői, Schindler és Schütz, izomsejtek plazmamembránjának egyedi membrándoménjeit tették láthatóvá. A rendezett („liquid-ordered”) fázisállapot jellemzőit mutató domének mérete 0,2-2 mikrométer közé esett, és mintegy 13 %-át fedték le a plazmamembrán felületének (Schütz és mtsai, 2000).

Némileg eltérő, de elveiben hasonló az egy részecske mozgását követő mikroszkópia („single particle tracking”), amely segítségével Kusumi és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a plazmamembrán 50-200 nm-es kompartmentekre tagolódik. A kompartmentek határait a membránok alatt húzódó aktin citoszkéletális rendszer és a transzmembrán fehérjék hozzák létre. A membránalkotó molekulák a kompartmenten belül

szabadon diffundálnak, de a kompartmentek közötti mozgás („hop diffúzió”) csak bizonyos időközönként (átlagosan 11 ms) történik meg (Kusumi és mtsai, 2005).

Az ún. Laurdan mikroszkópiával a membrán fizikai állapotáról nyerhetünk információkat, ugyanis a Laurdan egy olyan membránba ékelődő fluoreszcens festék, amelynek emissziós spektrumát a membrán aktuális fluiditási szintje befolyásolja. Ezzel a technikával láthatóvá tették, hogy a plazmamembránban valóban eltérő fluiditású régiók találhatók, és ezzel bizonyították a fázisszeparáció létét *in vivo* élő sejtekben (Gaus és mtsai, 2003). A rendezett domének koleszterin kivonásra érzékenyek voltak, és a hőmérséklet emelése növelte a rendezett és a kevésbé rendezett régiók fluiditását is. Rigidebb régiókat találtak specifikus struktúráknál, mint a filopódium, lammelipódium, immunológiai szinapszis, adhézión pontok, sejt-sejt kontaktusok. A detektált doménekről fontos tudni, hogy nem egyedi kompartmenteket jelentenek, hanem egy membránrégió egészének állapotát jellemzik. A megfigyelések megerősítették azt az elképzelést is, hogy a nagy méretű, stabil, rendezett lipidfázisú membrandomének kialakulásában a fehérje-fehérje kölcsönhatásoknak és az aktin citoszkeletonnak döntő szerepe van (Gaus és mtsai, 2006).

2.5.5. Mit nevezünk ma raftnak?

A biokémiai, ill. mikroszkópos módszerek használatából származó, sokszor egymásnak ellentmondó következtetések fogalmi kezelhetősége érdekében egy közelmúltban rendezett konferencián („Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function”) a területen dolgozó vezető kutatók felállítottak és elfogadtak egy általános definíciót arról, hogy mit is tekintünk ma raftnak (Pike, 2006). Ez alapján a membrán raftok kis méretű (20-100 nm átmérőjű), heterogén, dinamikus, koleszterinben és szfingomielinben gazdag membrán mikrodomének, amelyek a sejt folyamatok kompartmentalizációjában játszanak központi szerepet. A definíció megalkotásakor elvetették a „lipid raft” kifejezést, mert a domének kialakításában a lipid-lipid kölcsönhatások mellett a lipid-fehérje és fehérje-fehérje kölcsönhatások egyaránt részt vesznek. A definíció arra is felhívja a figyelmet, hogy raftok nem csak a plazmamembránban, hanem a belső membránrendszerben is létezhetnek. Mivel nem bizonyított, hogy a koleszterin-szfingomielin gazdag raftok az ún. l_o fázisállapotban vannak az élő sejtekben, így ezt a tulajdonságot sem foglalták bele a definícióba. Hasonlóképp a detergens rezisztencia is kimaradt a definícióból, jelezve, hogy önmagában a DRM-ek vizsgálata nem bizonyítja a fehérjék és lipidek raft asszociációját.

Az új raft definíció kapcsán Edidin azt is hangsúlyozta, hogy a membránok laterális szerveződésének vizsgálatakor nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy az ún. raftokon kívül kialakulhatnak egyéb - igen változatos összetételű és eredetű - mikro- és makrodomének is a membránokban (Shaikh és Edidin, 2006).

Összefoglalva, egy olyan kép rajzolódik ki a raftok, ill. tágabb értelemben a membrán mikrodomének világáról, ahol a raftok igen változatos, nanométer skálájú, dinamikus szerveződések, amelyek néhány lipid és fehérjemolekulából állnak (Mishra és Joshi, 2007). Különböző lipid komponenseket bár eltérő arányban tartalmaznak, de a koleszterin és a szfingolipidek feldúsulása mindig megfigyelhető bennük. A raftok elkülönülő kis egységek, de mivel rövid életidejűek, dinamikus egyensúlyban vannak a környező nem-raft doménekkel. Bizonyos körülmények között a raftok össze is olvadhatnak, és mikrométer skálájú, hosszabb életidejű doméneket hozhatnak létre, amelyeket a fehérje-lipid, ill. fehérje-fehérje kölcsönhatások mellett az aktin citoszkeletonnal kialakított kapcsolatok is stabilizálnak.

A fentiek alapján a korábbi fluid-mozaik membrán modellben a hangsúly a fluiditás felől egyre inkább a mozaikosság felé tolódik. A membránalkotó molekulák közti (lipid-lipid, lipid-fehérje, fehérje-fehérje) kölcsönhatások, ill. az extracelluláris térrel, a citoszkeletális rendszerrel kialakított kapcsolatok meghatározzák és folyamatosan, dinamikusan újrendezik a membránban kialakuló komplexek szerveződését, szerkezetét.

2.6. MEMBRÁN-SZENZOR HIPOTÉZIS

Élő sejtekben a membránok jellemzően a folyadékkristályos állapotot igyekeznek felvenni és megtartani, ami biztosítja a komponensek mozgékonyágát, a fehérjék működését, a membrán szemipermeabilitását, flexibilitását, azaz a membránfüggő folyamatok optimális végbemenetelét. Azonban a membránok igen érzékenyen reagálnak a környezeti hatásokra. A hőmérséklet ingadozásával átalakul a membránok fázisállapota és/vagy szerkezete, és a membrán összetételének függvényében gél, „hiperfluid” vagy nem kettősréteget alkotó, fordított hexagonális fázisok (H_{II}) is létrejöhetnek (Gennis, 1989). Ez alapvetően megváltoztatja a membrán dinamikai tulajdonságait és ezzel összefüggésben működőképességét is (Vigh és mtsai, 1998).

2.6.1. A hőmérséklet-változás membránokra gyakorolt hatása

Alacsony hőmérsékleten a membrán egyre rendezettebbé válik, és fagyott, gélszerű fázisállapot alakul ki. A fluid-gél fázisátalakulás a lipidek olvadási hőmérséklete alatt következik be. Mivel a membránalkotó lipidek olvadási hőmérséklete a zsírsavdalláncok hosszától, telítettségétől, a fejcsoportok minőségétől függően eltérő, a hőmérséklet csökkenésekor fázisszeparáció figyelhető meg, és elkülönülnek egymástól a gél, valamint a folyadékkristályos állapotú membránrégiók. A fázishatárokon könnyebben jutnak át a molekulák, így jelentősen megnő a membrán permeabilitása (Quinn, 1985; Clerc és Thompson, 1995). Nem meglepő, hogy szoros összefüggést találtak hidegsokk során a membrán károsodása és az élőlények elhalálása között (Vigh és mtsai, 1998).

A magas hőmérsékleti stressz növeli a membránkomponensek mozgékonyágát, a membrán egyre rendezetlenebbé válik, és az ún. hiperfluid fázisállapotba kerül. A hiperfluidizáció megváltoztatja a fehérjék konformációját, aktivitását, laterális eloszlásukat, sőt a lipid környezet a fehérjék denaturációjának mértékét is befolyásolja (Yatvin és Cramp, 1993). Extrém környezeti körülmények között még a membrán kettősréteg szerveződése is felborulhat, és fordított hexagonális fázis (H_{II}) is létrejöhet (Gounaris és mtsai, 1983), (Gounaris és mtsai, 1984).

2.6.2. Adaptációs folyamatok a membránban

Mivel a membrán fázisállapotának megváltozása súlyosan érinti a membránfunkciók működését, a sejtek igyekeznek ellensúlyozni a hőmérséklet membránfluiditásra gyakorolt hatását. A folyamatot homeoviszkozus adaptációnak nevezzük (Sinensky, 1974). Mivel a membrán lipidösszetétele, a membránalkotó lipidek zsírsavdalláncainak hossza és telítettsége alapvetően meghatározza a membrán fizikai tulajdonságait, így a zsírsavösszetétel módosítása az adaptáció egyik lehetőségét jelenti. A hosszú szénláncú telített zsírsavak növelik a membránok rendezettségét, ennek megfelelően a magas hőmérséklet membránfluidizáló hatása ellen úgy védekezhetnek a sejtek, hogy megemelik a telített zsírsavdalláncú lipidek mennyiségét. Alacsony hőmérsékleten viszont a telítetlen zsírsavdalláncú lipidek arányának növelésével biztosítják a membrán folyadékkristályos állapotának fennmaradását. A zsírsavösszetétel mellett a különböző lipidosztályok mennyiségének, a koleszterol tartalomnak és a fehérje/lipid arálynak az átalakítása is hozzájárul a membrán kompenzációs folyamataihoz (Cress és mtsai, 1982; Shmeeda és mtsai, 2002; Robichon és Dugail, 2007). Tehát a membránok összetételének módosítása központi

eleme a sejtek adaptációs folyamatainak, de vajon a membránok részt vesznek-e a környezeti feltételek változásának érzékelésében is.

2.6.3. A membránok, mint stresszérzékelők prokarióta sejtekben

A “membrán, mint stressz-szenzor” hipotézis megalkotását prokarióta modellszervezeteken végzett kísérletek alapozták meg.

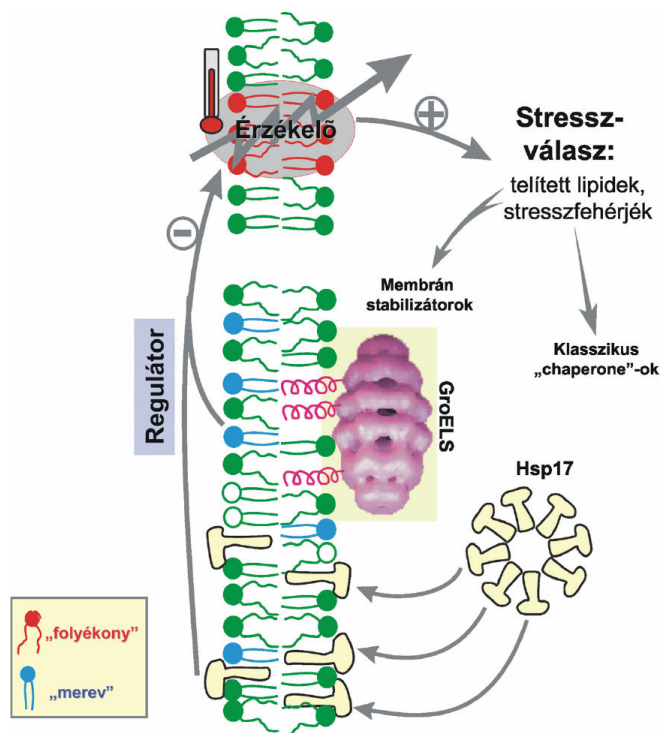
A deszaturázok (pl. DesA) olyan enzimek, amelyek a lipidek zsírsavdallancában kettős kötést hoznak létre. A DesA enzim termelődése alacsony hőmérsékleten indukálódik, ezáltal megnő a telítetlen zsírsavdallancú lipidek aránya a membránban. Ez hozzájárul az alacsony hőmérséklet rigidizáló hatásának ellensúlyozásához. *Synechocystis* kékalgákban csoportunk kimutatta, hogy a membránfluiditás változás szolgál jelként a *desA* expresszió növekedéséhez. A hőmérséklet-csökkenés membránokra gyakorolt hatását alga sejtekben katalitikus hidrogénezéssel modellezték. A katalitikus hidrogénezés során a sejtek citoplazma membránjában a zsírsavdallancok telítődnek, és a membrán – a hőmérséklet csökkentéshez hasonlóan – rigidebbé válik, de izoterm körülmények között. A *desA* gén izoterm körülmények között is indukálódott a katalitikus hidrogénezés hatására (Vigh és mtsai, 1993), ami arra utalt, hogy a sejtek a hőmérséklet csökkenését a membránok rigidizációján keresztül érzékelték.

Tanulmányozták a membránok magas hőmérsékleti stressz érzékelésében betöltött szerepét is. Ehhez a membránok fizikai állapotát többféle úton is módosították: a növesztési hőmérséklet változtatásával, katalitikus hidrogénezéssel vagy egy membránba ékelődő, membránfluiditást növelő molekulával, a benzil-alkohollal (BA). Azt tapasztalták, hogy a membránok fluiditása alapvetően meghatározza a *hsp* gének expressziójának mértékét és hőmérséklet-függését. A tilakoid membránok fluiditásának növelésével ugyanis a *hsp* gének maximális indukciója az alacsonyabb hőmérsékletek irányába tolódott el *Synechocystis* kékalgákban (Horváth és mtsai, 1998).

A membránfluidizáló BA kezelés hatására *Escherichia coli* baktériumban is megemelkedett a *hsp* gének expressziója (Shigapova és mtsai, 2005). Érdekes módon BA kezelés után nem lehetett kimutatni a Hsp fehérjék szintjében növekedést, csak a *hsp* mRNS-ek mennyisége emelkedett meg. Azonban ennek ellenére termotoleráns állapot fejlődött ki a baktérium sejtekben, ami együtt járt a membránok lipid összetételének jelentős átrendeződésével.

A fentiek alapján a membránok összetételének, fizikai állapotának változása befolyásolja a Hsp-k termelődését. A Hsp-k képződése viszont vissza is hat a membránok állapotára, ugyanis a Hsp-k kölcsönhatásba lépnek a membránokkal. (Horváth és mtsai, 2008). Hősokk alatt megnövekszik a membánkötött sHsp-k mennyisége cianobaktériumokban, és ez két ponton is hozzájárul a membránszerkezet stabilizálásához. A sHsp-k membránasszociációja egyrészt növeli a membrán mikroviszkozitását, így képes ellensúlyozni a magas hőmérséklet fluidizáló hatását, másrészt gátolja a lipid kettősréteg felbomlását is, ami a membrán integritásának megőrzését segíti elő (Tsvetkova és mtsai, 2002). Pro- és eukarióta sejtekben is számos Hsp családtag (sHsp-k, Hsp60, Hsp70) membránasszocióját mutatták ki (Török és mtsai, 2001; Török és mtsai, 1997; Nakamoto és Vígh, 2007; Horvath és mtsai, 2008). Néhány esetben az is tisztázott, hogy a Hsp-membrán kölcsönhatás lipideken keresztül valósul meg. Csoportunk nemrégiben bizonyította, hogy *Synechocystis* kéalgákban a kizárólag magas hőmérsékleten halmozódó, telített „hősokk lipid” - a monoglükozil diglicerid - egyben arra is szolgál, hogy hőstressz során a sHsp-k egy szubpopulációját a membránokhoz horgonyozza (Balogi és mtsai, 2005).

A fenti eredmények alapján felvázolható egy modell, amelyben a membránok egy visszacsatoláson alapuló körben szabályozzák a hősokk fehérjék termelődését (10. ábra).



10. ábra A membrán-szenzor modell. Stressz (hősokk) hatására a membránok fluidizálódnak, ami egy még ismeretlen útvonalon keresztül jelet küld a sejteknek a stresszválasz és a Hsp szintézis indukciójához. A termelődő Hsp-k egyrészt

védik/helyreállítják a károsodott fehérjét, másrészt a membránokhoz kapcsolódva stabilizálják a membrán szerkezetét. A stabilizációval megszűnik a membrán-szenzor jelképzése, ami a hősök válasz lecsengését eredményezi. (Vigh és mtsai, 2007 alapján)

2.6.4. A membránok potenciális stresszérzékelők eukarióta sejtekben is

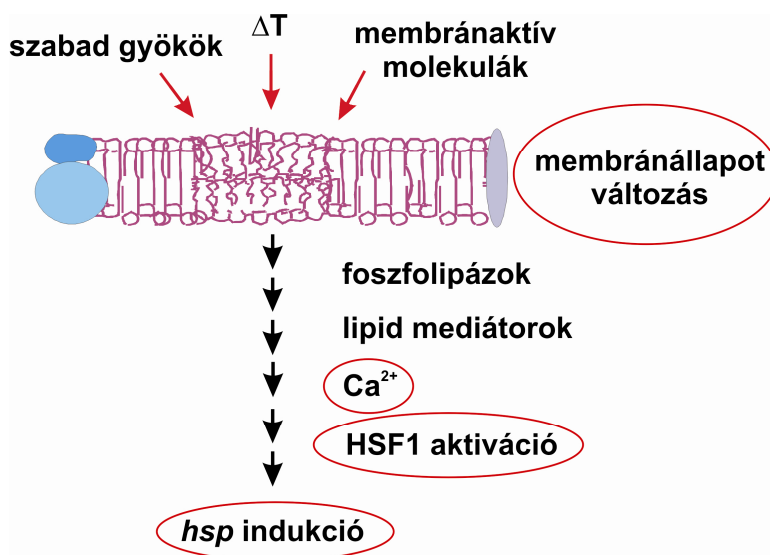
Több adat utal arra, hogy a membránok eukarióta sejtekben is részt vesznek a stresszérzékelés folyamatában. Élesztő sejtekben a membránlipidek zsírsav összetételének módosulása, a telített és telítetlen zsírsavdallancok arányának megváltoztatása befolyásolja a *hsp* gének kifejeződését és a hősök válasz küszöbhőmérsékletét (Carratù és mtsai, 1996). Halaknál is megfigyelték, hogy a hősök válasz küszöbhőmérsékletét az előzetes adaptációs hőmérséklet határozza meg. 5, ill. 19 °C-on tartott pisztrángoknál eltérő hőmérsékleteken, de mindkét esetben 5 °C-kal az adaptációs hőmérséklet felett következett be a *hsp70* indukciója. Azaz az 5 °C-on tartott állatokban már 10 °C-on megnövekedett a *hsp70* expressziója. Mivel az adaptációs hőmérséklet, ill. a kívülről adott politelítetlen zsírsavak nagy mértékben befolyásolták a membránok összetételét, ez is arra utal, hogy a fehérje denaturáció mellett egyéb faktorok, mint a membránok fizikai állapotának változása is hozzájárul a stressz érzékeléséhez (Samples és mtsai, 1999).

Korai vizsgálatok kimutatták, hogy emlős sejtekben is zajlanak membránfüggő folyamatok stresszhatások során. A stresszválaszt kiváltó kezelések foszfolipáz (foszfolipáz C, foszfolipáz A₂) enzimeket aktiválnak, ami másodlagos lipid hírvívő molekulák felszabadulásához vezet (Calderwood és Stevenson, 1993). A foszfolipáz A₂ által felszabadított arachidonsavról régóta ismert (Calderwood és mtsai, 1989), hogy indukálja a HSF1-en keresztül a *hsp* gének kifejeződését (Jurivich és mtsai, 1994). Hősök alatt egy koleszterin származék, a koleszteril-glükozid képződését is kimutatták, ami már önmagában képes kiváltani a *hsp70* expressziójának növekedését (Kunimoto és mtsai, 2002).

Csoportunk bizonyította, hogy léteznek olyan gyógyszerjelölt molekulák (a hidroximsav bimoclomol és származékai), amelyek Hsp „koinducerek”, azaz önmagukban nem indukálják a Hsp-k termelődését, de jelenlétükben stresszhatások során nagyobb mértékű Hsp szintézis figyelhető meg. Ezek a molekulák széles körű terápiás alkalmazási lehetőséggel bírnak általános sejtvédő hatásuk miatt. A bimoclomol Hsp koindukáló hatását a HSF1 aktiváció fokozásán keresztül fejti ki (Hargitai és mtsai, 2003), de érdekes módon adagolása nem fokozza a fehérjék denaturációjának mértékét. Viszont a negatívan töltött lipidekkel specifikus kölcsönhatásba lép, és megnöveli azok fluiditását (Török és mtsai, 2003). Ezek alapján feltételezhető, hogy a bimoclomol és származékai a membránok szerkezetének

módosításán keresztül is képesek befolyásolni a *hsp* gének indukcióját és a stresszválasz folyamatát.

A fenti ismeretek alapján nagyvonalakban felvázolható egy kép arról, hogy emlős sejtekben a membránok hogyan befolyásolhatják a *hsp* indukció folyamatát (11. ábra).



11. ábra A membránoktól a *hsp* génekig vezető jelátviteli útvonal feltételezett elemei. Munkám során a pirossal kiemelt lépések szerepét tanulmányoztam a membrán-eredetű stresszválasz folyamatában.

Felállított munkahipotézisünk alapján a környezeti behatások meghatározzák a membránok finomszerkezetét, módosítják a membránok fizikai állapotát. A változások hatására membránfüggő folyamatok aktiválódhatnak, és így például a foszfolipáz enzimek másodlagos lipid hírvivő molekulákat szabadíthatnak fel. A hírvivő molekulák jelátviteli útvonalakat indítanak el (az inozitol-trifoszfát hatására Ca^{2+} áramolhat a citoplazmatikus térbe), ami elvezethet a HSF1 aktivációjához és ezen keresztül a *hsp* gének indukciójához.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során az emlős sejtek membránjainak stresszválaszban betöltött szerepét kívántam vizsgálni. Az előbbieken felvázolt munkahipotézis alapján a **következő kérdésekre kerestünk választ:**

1) Igazolható-e emlős sejteken a “membrán, mint stressz-szenzor” hipotézis?

Ennek érdekében vizsgáltuk, hogy

- membránperturbáló kezelés hatására indukálódnak-e a *hsp* gének
- fokozódik-e a fehérje denaturáció az alkalmazott membránstressz alatt

2) Milyen membrán állapotváltozások hozhatók összefüggésbe a stresszválasz indukciójával?

A kérdés megválaszolásához tanulmányoztuk, hogy

- a membránfluiditás növekedés elegendő-e a *hsp* gének indukciójához, ill.
- a membránok mikrodomén szerveződésében kimutathatók-e változások stressz hatására

3) A stresszválasz kezdeti szakaszában milyen, a membrán által közvetlenül érintett jelátviteli események zajlanak?

Ehhez meghatároztuk

- a másodlagos hírvivő Ca^{2+} koncentrációjának alakulását a membránperturbáló kezelés során, ill.
- az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció módosításának *hsp* indukcióra gyakorolt hatását

4) A HSF1 szabályozza-e a *hsp* gének indukcióját a membrán-eredetű stresszválasz során?

Vizsgáltuk, hogy membránstressz hatására

- aktiválódik-e HSF1
- növekszik-e a *hsp* gének expressziója HSF1 hiányában
- a *hsp70* indukciójához szükségesek-e a HSE-k

5) Végül alapvető kérdésként merült fel, hogy a szubletális hőelőkezelés („heat priming”) analógiájára a membrán-eredetű stressz hatására védetté válik-e a sejt egy következő, egyébként letális stresszel szemben?

Ezért teszteltük, hogy a membránperturbáció elvezet-e a termotoleráns állapot kialakulásához.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Sejtek tenyésztése

A B16(F10) egér melanóma és a K562 humán eritroleukémia sejteket 10 % magzati borjú szérummal (FCS) és 4 mM L-glutaminnal kiegészített RPMI 1640 médiumban növesztettük. A B16(F10) p950/CAT6 stabil sejtvonalat 400 µg/ml G418 jelenlétében szelektáltuk, és a későbbiekben is 400 µg/ml G418-at tartalmazó médiumban növesztettük. A *Hsfl*^{+/+}, ill. *Hsfl*^{-/-} egerekből származó embrionális fibroblaszt (MEF – mouse embryonic fibroblast) (McMillan és mtsai, 1998) sejtvonalak tenyésztéséhez DMEM médiumot használtunk, az alábbi komponensekkel kiegészítve: 10 % FCS, 2 mM L-glutamin, 10 mM nem esszenciális aminosavak (minimal essential medium nonessential amino acids), 137 µM β-merkaptotanol, antibiotikumok (streptomycin, penicillin) (Hietakangas és mtsai, 2003). A luciferáz enzimet citoplazmatikusan, konstitutívan expresszáló HeLa humán cervikális karcinóma sejtvonalat 10 % FCS-sel, 4 mM glutaminnal kiegészített DMEM médiumban tartottuk fenn (Nguyen és mtsai, 1989). A sejtvonalakat 37 °C-on, párás környezetben, 5 % CO₂ –ot tartalmazó termosztátban tartottuk fenn.

A hősokk kezelésekhez a Petri csészéket parafilmmel lezártuk, és a megfelelő hőmérsékletre (± 0.1 °C) beállított vízfürdőbe helyeztük őket. A BA és a fenetil-alkohol (PhA) kezeléshez a sejteken lévő médiumot friss, BA-t, ill. PhA-t tartalmazó médiumra cseréltük le. Az alkoholokat erőteljes keveréssel oldottuk fel a növesztési médiumban.

4.2. Fehérjék *in vivo* radioaktív jelölése

K562 sejteket (10⁶ sejt) növekvő koncentrációban BA-lal kezeltünk különböző hőmérsékleteken 1 órán keresztül. A stresszt követően 3 órán át hagytuk a sejteket regenerálódni növesztési médiumban 37 °C-on. Ezt követően ¹⁴C izotóppal jelöltük az újonnan szintetizálódó fehérjéket 1 órán keresztül 37 °C-on. Ehhez a médiumot 1 ml puffer A-ra (1,2 mM CaCl₂, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,5 mM MgCl₂, 136 mM NaCl, 6,5 mM Na₂HPO₄, 5 mM D-glükóz) cseréltük, ami 10 µl ¹⁴C protein hidrolizátumot (Amersham CFB25, radioaktivitás 50 µCi · ml⁻¹) is tartalmazott. Az 1 órás jelölés után a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, PBS-sel (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, pH = 7,4) mostuk, és 2 * Laemli SDS mintapufferben (130 mM Tris-

HCl pH 6,8; 10 % β -merkaptoetanol, 4 % SDS, 20 % glicerin, 0,01 % brómfenolkék) intenzív keveréssel és 5 perces forralással feltártuk. A sejtlizátumokban a fehérjéket 8 % SDS poliakrilamid gélen elválasztottuk, és a radioaktívan jelölt fehérjéket Röntgen filmen fluorográfiával tettük láthatóvá a következőképp. A géleket Coomassie brilliant blue-val (20 % Coomassie brilliant blue R250, 45 % etanol, 10 % ecetsav) festettük, majd szintelenítettük (30 % etanol, 10 % ecetsav). Ezután 10 percig ecetsavban áztattuk, majd 20 % 2,5-difeniloxazolt tartalmazó ecetsav oldatban inkubáltuk a géleket 2 órán keresztül. 5 % glicerines áztatás után a géleket szárítottuk és Röntgen filmen detektáltuk a jeleket.

4.3. Kvantitatív reverz transzkripció kapcsolt polimeráz láncreakció

A sejtekből NucleoSpin RNA II kittel (Macherey-Nagel) totál RNS-t izoláltunk, majd 2 μ g RNS-t oligodT primerekkel cDNS-sé írtunk át. A reverz transzkripcióhoz a Fermentas RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit-jét használtuk. A megfelelő géntermékek mennyiségi elemzéséhez az Applied Biosystems-től vásároltuk a cég által tervezett és szintetizált specifikus primereket és TaqMan próbákat: *hsp70* (Mm01159846s1), *hsp25* (Mm00834384_g1), *hsp90* (Mm00658568_gH), *hsp105* (Mm00442865_m1), α B-krisztallin (Mm00515567_m1), β -aktin (Mm00607939s1). A reakcióelegyek elkészítéséhez TaqMan Universal PCR Master Mix-et (Applied Biosystems) használtunk. A kvantitatív PCR reakciókat Rotor-Gene 3000 (Corbett Research) műszerben futtattuk le: 95 °C 12 perc elődenaturáció után 55 ciklus (95 °C 15 s, 60 °C 60 s) következett. A mintákban a cDNS-ek mennyiségének meghatározása a műszerhez tartozó RotorGene software „relative quantification” programjával történt, és a hősokk gének expressziójának mértékét a β -aktin-hoz viszonyítva határoztuk meg. A β -aktin mRNS mennyiségét 1000-nek tekintettük, és ehhez viszonyítva állapítottuk meg a különböző *hsp* gének mRNS szintjét (a.u.).

4.4. Western blot

A HSF1 kimutatásához az összegyűjtött sejteket puffer C-ben (20 mM HEPES, 0,42 M NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EDTA, 25 % glicerin, 0,5 mM ditiotreitol, 0,5 mM fenilmetilszulfonil-fluorid) jégen lizáltuk. A lizátumokból az oldhatatlan törmelékeket centrifugálással (15 perc 15 000 $\times$ g) eltávolítottuk, majd Bradford módszerrel (Bradford, 1976) meghatároztuk a lizátumok fehérjetartalmát. 20 μ g összfehérje tartalmú mintákat

futtatunk meg 8 %-os SDS poliakrilamid gélen, és transzferáltunk nitrocellulóz membránra (Protran nitrocellulose; Schleicher & Schuell). A HSF1 detektálásához anti-HSF1 elsődleges antitestet (köszönettel tartozunk Lea Sistonennek az anti-HSF1 ellenanyagért; Sarge és mtsai, 1993) és torna-peroxidáz konjugált anti-nyúl másodlagos ellenanyagokat használtunk. Az immunkomplexet a kemilumineszcens detekciós módszerrel (Amersham) röntgen filmen tettük láthatóvá. A kísérletet Lea Sistonen (Åbo Akademi University, Turku, Finnország) laboratóriumában hajtottuk végre.

A Hsp70 fehérje mennyiségének összehasonlításához az összegyűjtött sejteket 2 * Laemli SDS mintapufferben tártuk fel intenzív keveréssel és 5 perces forralással. A lizátumokban meghatároztuk az összfehérje koncentrációt (RC DC Protein Assay, BioRad). A mintákból azonos összfehérje mennyiségeket futtatunk meg SDS poliakrilamid gélen, majd a fehérjéket PVDF membránra (0,45 µm, Pierce) vittük át. Anti-Hsp70 (Stressgen SPA-810, 1:2000) elsődleges, és torna-peroxidáz konjugált anti-egér (Sigma) másodlagos antitesttel jelöltük a Hsp70-et, és a létrejött immunkomplexet a kemilumineszcens detekciós módszerrel (Pierce) röntgen filmen tettük láthatóvá.

4.5. DNS-fehérje komplex kimutatása gélretardációs technikával

A kísérletet a (Mosser és mtsai, 1988) közleményben leírt módszer alapján hajtottuk végre Lea Sistonen laboratóriumában (Åbo Akademi University, Turku, Finnország). Az összegyűjtött sejteket puffer C-ben (20 mM HEPES, 0,42 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 25 % glicerín, 0,5 mM ditiotritol, 0,5 mM fenilmetilszulfonil fluorid) jégen lizáltuk, majd a lizátumokból az oldhatatlan törmelékeket centrifugálással (15 perc 15 000×g) eltávolítottuk, és a Bradford módszerrel meghatároztuk a felülúszó fehérjetartalmát. A kötési reakcióban, melynek során kialakulhat a HSE-HSF1 komplex, 12 µg összfehérje tartalmú sejt-lizátumot inkubáltunk 0,1 ng ³²P-jelölt dupla szálú HSE-t tartalmazó specifikus oligonukleotiddal (5' GAT CTC GGC TGG AAT ATT CCC GAC CTG GCA GCC GA 3', 5' GAT CTC GGC TGC CAG GTC GGG AAT ATT CCA GCC GA 3') 0,5 mg poli(dI-dC)-nal 20 percig 25 °C-on az alábbi reakcióelegyben: 10 mM Tris (pH 7,8), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM ditiotritol, 5 % glicerín. A kötési reakció után az elegyeket 4 %-os natív poliakrilamid gélen megfuttattuk, hogy elválasszuk egymástól a fehérjét kötő és a szabad oligonukleotid próbákat. A gél szárítását követően a radioaktív jeleket Röntgen filmmel detektáltuk.

A kötési reakció alatt kialakult HSE-fehérje komplex specifikitásának tanulmányozásakor a reakcióelegybe 100-szoros feleslegben radioaktívan nem jelölt specifikus, ill. nem specifikus (5' AGC TTC AGA GGG GAC TTT CCG AGA GG 3' NF-kB-kötő hely) oligonukleotidot is mértünk.

Annak eldöntésére, hogy a kialakuló HSE-fehérje komplex tartalmaz-e HSF1-et, a sejtlizátumokat a kötési reakció előtt 15 percig 25 °C-on előinkubáltuk 1:100 hígításban anti-HSF1, ill. negatív kontrollként 1:10 hígításban nyúl preimmun szérummal. A kötési reakciót és a gélelektroforézist követően meghatároztuk, hogy tovább csökkent-e a radioaktív próba mobilitása az antitest hozzáadásának hatására.

A ³²P-jelölt dupla szálú oligonukleotidot úgy állítottuk elő, hogy az egyik szál 5' végére T4 polinukleotid kinázzal ³²P foszfát csoportot építettünk, majd a jelölt szálhoz hibridizáltattuk a komplementer nem jelölt szálát.

4.6. Kromatin immunoprecipitáció

A kromatin immunoprecipitációt az (Ostling és mtsai, 2007) publikációban leírtak alapján hajtottuk végre kisebb módosításokkal Lea Sistonen laboratóriumában. Az 1 órás BA- vagy hőkezelés után 1 % végkoncentrációjú formaldehiddel keresztkötöttük a sejtek tartalmát. A keresztkötési reakciót 125 mM végkoncentrációjú glicinnel állítottuk le. Ezt követően a sejteket PBS-sel mostuk, összekapartuk és centrifugálással összegyűjtöttük. A sejtek líziséhez a következő puffert használtuk: 1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, proteáz inhibitor koktél (Roche Applied Science). A sejtlizátumokban a keresztkötött kromatint kb. 500 bp hosszúságú darabokra tördeltük Bioruptor szonikátorral (Diagenode). 100 µl szonikált lizátumhoz 900 µl immunoprecipitációs puffert (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 % Triton-X 100, proteáz inhibitor koktél) mértünk. Az immunoprecipitáció előtt a mintákat előtisztítottuk 100 µg/ml BSA-t tartalmazó 50 % protein G Sepharose gyöngy szuszpenzióval (Amersham Biosciences) egy éjszakán keresztül 4 °C-on. Az immunoprecipitációt 1:200 hígításban anti-HSF1 (Stressgen, SPA-901), anti-acetilált-hisztón 4 (Upstate Biotechnologies, 06-866) ellenanyagokkal és normál nyúl szérummal (Jackson Immuno Research Laboratory) végeztük egy éjszakán át 4 °C-on. Ezt követően az antitesteket Protein G Sepharose gyöngyökhöz kötöttük ki. A kicsapott immunkomplexekeket mostuk háromszor puffer 1-gyel (0,1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA pH 8,0, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0), kétszer puffer 2-vel (0,1 % SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA pH 8,0, 500 mM NaCl,

20 mM Tris-HCl pH 8,0) és háromszor puffer 3-mal (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0, 10 % glicerín). A mosási lépéseket követően a fehérjét 0,5 % SDS jelenlétében 20 µg proteináz K-val hidrolizáltuk, és 65 °C-on egy éjszakán át inkubálva a mintákat, felbontottuk a DNS és fehérje fragmentumok közti keresztkötéseket. A DNS-t fenol-kloroformos extrakcióval nyertük ki az immunoprecipitátumokból, és az extrahált DNS 1/10 részét mértük templátként PCR reakciókba. Az egér *hsp70.1* és az egér *foszfoenolpiruvát karboxikináz* (mPKC) promóterek mennyiségét a következő primerekkel vizsgáltuk: *mHsp70.1* FP: 5'-CAC CAG CAC GTT CCC CA-3', RP: 5'-CGC CCT GCG CCT TTA AG-3', *mPCK* FP: 5'-GAG TGA CAC CTC ACA GCT GTG G-3', RP: 5'-GGC AGG CCT TTG GAT CAT AGC C-3'. A PCR reakciókhoz az Amersham Biosciences puRe Taq Ready-to-go PCR gyöngyeit használtuk. A PCR programban a 94 °C 5 perces denaturáció után 30 ciklus következett az alábbi lépésekkel 94 °C 45 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s. A PCR termékek mennyiségének meghatározásához a termékeket agaróz gélelektroforézissel elválasztottuk és etidium-bromid fluoreszkáló festékkel láthatóvá tettük. Bemérési kontroll mintával teszteltük, hogy az immunoprecipitációkhoz azonos mennyiségű kromatin mintákat használtuk-e fel. A bemérési kontrollnál az immunoprecipitációkhoz használt kromatin mennyiség 10 % -át használtuk, felbontottuk a DNS-fehérje keresztkötést, extraháltuk a DNS-t és végrehajtottuk a PCR reakciókat a fentiek szerint.

4.7. Riporter plazmidok tranziens transzfekciója

A tranziens transzfekcióhoz használt riporter plazmidok a patkány *hsp70.1* promóterének különböző hosszúságú darabjait, és azok HSE-eket érintő deléciós származékait tartalmazzák a klóramfenikol-acetiltranszferáz (CAT) riporter gén előtt. A plazmidok név szerint a következők: p150/CAT6, p250/CAT6, p350/CAT6, p350(ΔHSE1)/CAT6, p550/CAT6, p550(ΔHSE1)/CAT6, p550(ΔHSE2)/CAT6 p950/CAT6, p950(ΔHSE1+2)/CAT6. A riporter plazmidok pontos szerkezetét és az összeépítésük menetét a (Fiszer-Kierzkowska és mtsai, 2003) publikációban írták le. Köszönettel tartozunk Katarzyna Lisowska-nak, hogy rendelkezésünkre bocsátotta, és így kísérleteinkben használhattuk a riporter plazmid sorozatukat.

A CAT riporter plazmidokat és a transzfekció hatékonyságának méréséhez használt pRSVβ-gal belső kontroll plazmidot a DEAE-dextrán módszerrel transzfektáltuk tranziensen B16(F10) sejtekbe a (Fiszer-Kierzkowska és mtsai, 2003) közleményben leírtak alapján

kisebbségi módosításokkal. A transzfekció előtti napon 150 mm-es Petri-csészékbe $4,8 \times 10^6$ sejtet osztottunk ki. A transzfekció során 6,6 ml 0,5 mg/ml DEAE-dextránt és 60 µg DNS-t (30 µg CAT riporter plazmid és 30 µg RSVβ-gal) tartalmazó TBS(P) puffert (25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂ and 0,3 mM Na₂HPO₄) mértünk a sejtekre, és 30 percig szobahőn inkubáltuk őket a transzfekciós eleggyel. Majd mosást TBS(P) követően 10 % DMSO-t tartalmazó RPMI 1640 médiumot rétegeztünk a sejtekre 2 percig, amit végül növesztési médiumra cseréltünk le. Négy órával később a 150 mm-es Perti csészében transzfektált sejteket 9 darab 60 mm Perti csészébe osztottuk szét és egy napig növesztettük őket. Másnap a transzfektált sejteket BA-lal kezeltük, 42 °C-on hősokkoltuk, vagy kezeletlenül hagytuk 1 órán keresztül. Minden esetben 3 ismétlésben végeztük el a kezeléseket. 16 órás regenerálódás után mértük a CAT riporter enzim aktivitását, valamint a kezeletlen sejtekben meghatároztuk a β-galaktozidáz enzim aktivitását is. Minden plazmiddal legalább kétszer végeztük el a transzfekciót.

4.8. Klóramfenikol-acetiltranszferáz aktivitás mérés

Az összegyűjtött sejteket 0,25 M Tris-HCl (pH 7,8) pufferben felfuszpendáltuk. Ezután a sejteket lizáltuk olyan módon, hogy többször ismételve lefagyasztottuk majd felolvasztottuk a szuszpenziót. A sejtörmelégeket centrifugálással eltávolítottuk (15 000×g 5 perc) és mértük a felülúszó fehérje tartalmát a Bradford módszerrel. A deacetiláz enzimeket 60 °C 10 perces inkubációval inaktívtuk a sejt-lizátumban. Az enzimaktivitás méréshez 30 µg összfehérje tartalmú lizátumot használtunk, amihez szubsztrátként 0,1 µCi aktivitású [¹⁴C]klóramfenikolt (100 µCi/ml; ICN) és 1 mM acetil-CoA-t adtunk. A CAT aktivitás meghatározása 0,25 M Tris-HCl (pH 7,8) 0,5 mM EDTA pufferben történt. A reakció 4 órán keresztül 37 °C-on zajlott. A reakció végtermékeit (nem acetilált klóramfenikol, egy hidroxil csoporton, ill. két hidroxil csoporton acetilált klóramfenikol) szilikagél vékonyrétegen kloroform:metanol 95:5 arányú eleggyel választottuk el egymástól. A radioaktív foltokat Molecular Dynamics PhosphorImager 445 SI berendezéssel detektáltuk és az ImageQuaNT software segítségével határoztuk meg a foltokhoz tartozó radioaktivitás értékeit.

4.9. β -galaktozidáz aktivitás mérés

A *hsp70* promóter fragmentumok aktivitásának teszteléséhez a CAT riporter plazmidok mellett egy β -galaktozidázt (β -gal) konstitutívan expresszáló plazmidot is (pRSV β -gal) transzfektáltunk a sejtekbe, hogy a CAT aktivitás értékeket korrigálni tudjuk a transzfekciós hatékonyság mértékével. Ehhez meghatároztuk a β -gal enzim aktivitását is a CAT aktivitás méréshez felhasznált kontroll (kezeletlen) sejt-lizátumokban. A β -gal aktivitás méréséhez 30 μ g összfehérje tartalmú lizátumot használtunk, azonban ebben az esetben a lizátumokat nem hőinaktiváltuk 60 °C-on. A reakcióelegybe a sejt-lizátum mellett 66 μ l 4 mg/ml orto-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (0,1 M nátrium-foszfát pufferben (pH 7,5) oldva) szubsztrátot, 3 μ l 100 $\times$ Mg-oldatot (0,1 M $MgCl_2$, 4,5 M 2-merkaptóetanol) mértünk, és kiegészítettük 300 μ l-re 0,1 M nátrium-foszfát pufferrel (pH 7,5). A reakció 16 órán keresztül 37 °C-on zajlott, amit 500 μ l 1 M Na_2CO_3 -tal állítottunk le. A termék mennyiségét 420 nm-en mértük spektrofotométerrel.

A CAT aktivitást a következő képlettel számítottuk ki:

$$\text{CAT aktivitás} = [\text{acetyl-klóramfenikol} \times 100 \times (\text{klóramfenikol} + \text{acetyl-klóramfenikol})^{-1}] / [\text{OD}_{420} \times 10]$$

4.10. Luciferáz aktivitás mérés

A szentjánosbogár luciferáz enzimet a citoplazmában konstitutívan expresszáló HeLa sejteket a mérés előtti napon 10^5 sejtszámmal tenyésztésre alkalmas csövekbe osztottuk. A 42 °C-on hősokkolt, ill. 30 mM BA-lal kezelt sejteket 1 % Triton X-100-zal kiegészített hideg puffer A-ban (25 mM Tris-HCl (pH 8,8), 8 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml BSA, 10 % glicerin, 0,1 % 2-merkaptóetanol) lizáltuk. A luciferáz aktivitás meghatározásakor 0,15 ml sejt-lizátumhoz 0,1 ml 1,2 mM ATP-t és 0,33 mM luciferint tartalmazó puffer A-t kevertünk, és 10 s-on keresztül mértük a kibocsátott fény intenzitását Interbio luminométerrel (Nguyen és mtsai, 1989). A kísérletet Olivier Bensaude (Ecole Normale Supérieure, Párizs, Franciaország) laboratóriumában hajtottuk végre.

4.11. Membránfluiditás mérés

Az *in vitro* membránfluiditás méréseket B16(F10) sejtekből izolált plazmamembrán frakción hajtottuk végre. A plazmamembrán frakció izolálását a (Maeda és mtsai, 1983) hivatkozásban leírt módszer alapján végeztük. A sejteket PBS-sel mostuk, összegyűjtöttük, TNM pufferben (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, proteáz inhibitorok: 1 mM PMSF, 2 μ M leupetin) felszuszpendáltuk, és duzzasztás nélkül Potter homogenizátorral jégen széttroncsoltuk. Az épen maradt sejteket és a sejtmagokat centrifugálással (1000 g 5 perc) leüleptítettük. A felülúszót centrifugáltuk 8 000×g-n 15 percig 4 °C-on, és a csapadékkal dolgoztunk tovább, ami a plazmamembrán frakciót és a mitokondriumokat tartalmazta. A két frakció elkülönítéséhez a csapadékot TNM pufferben felszuszpendáltuk, 36 %-os cukor oldatra rétegeztük és 90 000×g-n 2,5 órát centrifugáltuk 4 °C-on. A plazmamembrán frakció a fázishatáron halmozódik fel. Az összegyűjtött és TNM pufferben felszuszpendált interfázist 100 000×g-n 40 percig 4 °C-on centrifugálva leüleptítettük, és a csapadékot használtuk plazmamembrán frakcióként a további mérésekhez.

A plazmamembrán frakciót PBS-ben felszuszpendáltuk. A fluoriméter küvettába mért plazmamembrán frakció optikai denzitását PBS-sel OD₃₆₀=0,1 értékre állítottuk, amit aztán 0,2 μ M difenil-hexatrién (DPH) fluoreszcens festékkel 10 percig jelöltünk. Az alkoholok membránfluidizáló hatásának méréséhez a DPH-jelölt plazmamembrán frakciót növekvő koncentrációban BA-lal vagy PhA-lal inkubáltuk 5 percig 37 °C-on, majd PTI spektrofluoriméteren (T-format, Quanta Master QM-1, Photon Technology International, Princeton, NJ, USA) meghatároztuk a fluoreszcencia anizotrópia értékeket (Schlame és mtsai, 1990). A membránfluiditás hőmérséklet-függésének vizsgálatakor a hőmérsékletet fokozatosan emeltük és közvetlenül a küvettában mértük. A DPH anizotrópia mérésakor a gerjesztő fény hullámhossza 360 nm volt, az emittált fény intenzitását 430 nm-en detektáltuk a gerjesztő fény polarizációs síkjára merőlegesen és azzal párhuzamosan 5 nm-es résszélességek mellett.

4.12. Fluoreszcencia kioltás mérése egyrétegű lipidvezikulákban

A mérésekhez kétféle, eltérő összetételű lipid vezikulát készítettünk: POPC/7SLPC/PSM/koleszterin/CTL összetevőket 30:30:30:9:1 arányban tartalmazó vezikulákat, valamint 7SLPC-t helyett POPC-t tartalmazó POPC/PSM/koleszterin/CTL 60:30:9:1 vezikulákat. A CTL (kolesztatrién-3-béta-ol) egy fluoreszcens koleszterin származék, a 7SLPC (1-palmitoil-2-sztearoil-(7-doxil)-*sn*-glicero-3-foszfokolin) pedig képes

kioltani a CTL fluoreszcenciáját. A fenti lipid vezikulák tehát vagy csak a fluoreszcens CTL-t, vagy a CTL mellett még a kioltó 7SLPC is tartalmazták. Az egyrétegű lipid vezikulák preparálásához a megfelelő arányban összemért lipid keveréket nitrogén alatt pároltuk, majd vákuum alatt beszárítottuk. A beszárított lipid keveréket - amit legfeljebb 24 óráig tároltunk -20 °C-on - vízben diszpergáltuk, és felmelegítettük az olvadási hőmérséklet fölé, hogy elősegítsük a lipidek hidratációját. 10 másodperces szonikálás (Branson Sonifier S-450, Branson Ultrasonics corp., Danbury, UK) után a lipidvezikula keveréket két egymásra helyezett, 100 nm pórusátmérőjű polikarbonát filteren préseltük át tízszer Lipextruder (Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada) segítségével, hogy így egyrétegű, jól meghatározott méreteloszlású lipid vezikulákat kapjunk (Björkqvist és mtsai, 2005).

A CTL fluoreszcencia intenzitás változását PTI QuantaMaster 1 spektrofluoriméteren (Quanta Master QM-1, Photon Technology International, Princeton, NJ, USA) a hőmérséklet függvényében követtük nyomon. A CTL-t 324 nm-es fénnel gerjesztettük, és 374 nm-en detektáltuk a kibocsátott fény intenzitását 5 nm-es résszélesség mellett. A küvettában a vezikula szuszpenziót folyamatosan 260 rpm sebességgel kevertettük. A mintákat 8 °C-ról 70 °C-ra melegítettük fel 5 °C/perc sebességgel. A hőmérsékletet közvetlenül a küvettában mértük (Björkqvist és mtsai, 2005). A BA-t (40mM) és a fenetil-alkoholt (PhA) (12 mM) közvetlenül, néhány másodperccel a mérés kezdete előtt adagoltuk a mintákhoz. A BA és a PhA esetében is vízzel tízszeresére hígított oldatot használtunk. A kísérletet Peter Slotte (Åbo Akademi University, Turku, Finnország) laboratóriumában hajtottuk végre.

4.13. Koleszterin gazdag plazmamembrán domének *in vivo* vizsgálata

B16(F10) sejteken vizsgáltuk a plazmamembrán koleszterin gazdag mikrodoménjeinek méreteloszlását egy fluoreszcens koleszterin származék (a polietilén-glikol-koleszterin-éter fluoreszcein észtere, fPEG-chol; Sato és mtsai, 2004) alkalmazásával (köszönettel tartozunk Toshihide Kobayashinak, hogy rendelkezésünkre bocsátotta az fPEG-chol próbát). A kísérletet megelőző napon B16(F10) sejteket osztottunk ki olyan speciális 6 cm Petri csészékbe, amelyek aljára üveg fedőlemez volt ragasztva. Másnap 40 mM BA-lal, 12 mM PhA-lal kezeltük a sejteket, vagy hősokkoltuk őket 41 °C-on és 43 °C-on 1 órán keresztül. A stresszhatásokat követően 0,2 µM fPEG-chol festéket tartalmazó növesztési médiumot mértünk a sejtekre, és szobahőmérsékleten 20 percig jelöltünk, majd a sejtek által fel nem vett, felesleges festéket mosással eltávolítottuk. Olympus Fluoview 1000 (Melville, NY) konfokális mikroszkóppal 300 ×-os végső nagyítást és 1600 × 1600 pixeles felbontást

használva képeket készítettünk az fPEG-chol-lal jelölt plazmamembrán régiókról. A fluoreszcein festéket argon ion lézersugárral (488 nm) gerjesztettük. Az fPEG-chol-jelölt membránrégiókat az internetről letölthető ImageJ szoftverrel (<http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/imagej/>) elemeztük. Meghatároztuk a detektált domének átmérőjét az alábbi képlet alapján: $2X \times (N_{\text{pix}}/\pi)^{-2}$, ahol X a pixel mérete (nm), N_{pix} pedig a domént alkotó pixelek száma. A doméneket a méretük alapján osztályoztuk, és megszámoztuk, hogy az általunk felállított hat mérettartományba hány domén tartozik. Ez alapján felrajzoltuk a detektált fPEG-chol-jelölt mikrodomének méreteloszlását.

4.14. Intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentráció mérése

A BA kezelés és a hő sokk hatására bekövetkező intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentráció változást Fura-2/AM észter segítségével határoztuk meg K562 sejtekben. A sejteket mosás után puffer A-ba (1,2 mM CaCl_2 , 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM MgCl_2 , 136 mM NaCl, 6,5 mM Na_2HPO_4 , 5 mM D-glükóz) szuszpendáltuk fel, és 5 mM végkoncentrációjú Fura-2/AM észterrel 45 percig 37 °C-on inkubáltuk őket. A Fura-2/AM-mel feltöltött sejteket mostuk, hogy eltávolítsuk a pufferből a fel nem vett festék molekulákat, majd fluoriméter küvettába pipettáztuk őket úgy, hogy a sejtuszuspenzió optikai denzitása 510 nm-en $\text{OD}_{510} = 0,25$ legyen. Ezt követően 37 °C-on BA-lal kezeltük, vagy 42 °C-on hő sokkoltuk a sejteket, és PTI spektrofluoriméteren (T-format, Quanta Master QM-1, Photon Technology International, Princeton, NJ, USA) 5 nm-es résszélesség mellett nyomon követtük 510 nm-en a fluoreszcencia intenzitás változását 340 nm-es és 380 nm-es gerjesztő fény hatására. Meghatároztuk a sejtek autofluoreszcenciáját is olyan módon, hogy a festékkel fel nem töltött sejtek fluoreszcencia intenzitását mértük a fenti hullámhossz tartományokban. Az adatok kiértékelésénél az autofluoreszcencia értékét kivontuk a festékkel feltöltött sejteken mért fluoreszcencia intenzitás értékekből. Azokban a kísérletekben, amikor az intracelluláris Ca^{2+} raktárak szerepét vizsgáltuk a Ca^{2+} koncentráció növekedésében, a puffer A összetételét úgy módosítottuk, hogy az Ca^{2+} helyett 10 mM EGTA-t tartalmazott.

4.15. Termotolerancia meghatározása (kolónia képző képesség alapján)

A termotoleráns állapot kialakulásának tesztelésekor vizsgáltuk, hogy a prekondicionáló, szubletális kezelés hatására a sejtek hány százaléka képes túlélni egy egyébként letális stresszhatást. A kísérlet során B16(F10) sejteken hasonlítottuk össze a BA és a 42 °C hő sokk

termotoleráns állapotot indukáló képességét. 6 cm Petri csészékbe 5×10^5 sejtet osztottuk ki, és másnap az alábbi 1 órás prekondicionáló kezeléseket hajtottuk végre: 40 mM BA, 42 °C hősök, ill. kezeletlen kontroll. A 16 órás regenerálódási időt követően a sejteket letális hőkezeléseknek (45 °C 30 és 60 perc, valamint kontrollként 37 °C 1 óra) vetettük alá. A minták egy részénél azért nem alkalmaztunk prekondicionáló kezelést, mert így meg tudtuk határozni, hogy prekondicionálás nélkül a sejtek hány százaléka éli túl a letális stresszhatást. A letális hőkezelés nélküli mintákkal pedig azt vizsgáltuk, hogy az alkalmazott prekondicionáló kezelések befolyásolták-e a sejtek életképességét. A letális kezeléseket követően a sejteket tripszinezttük, Bürker-kamrában meghatároztuk a sejtek számát, és hígítási sort készítettünk a mintákból. Minden mintát 4 hígításban 6 cm-es Petri-csészékbe osztottunk ki (10^5 , 10^4 , 10^3 és 10^2 sejt/csésze). A sejteket 37 °C-os termosztátban hagytuk szaporodni, miközben 3-4 naponta médiumot cseréltünk rajtuk. 10 nap múlva már szabad szemmel is látható kolóniák fejlődtek ki a csészékben. A kolóniákat 10 % formaldehiddel 5 percig fixáltuk, majd 2 % ecetsavban oldott 1 %-os kristályibolya oldattal festettük. Végül meghatároztuk a kolóniák számát, azaz az életképes sejtek számát a különböző mintákban.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A MEMBRÁNPERTURBÁCIÓ STRESSZVÁLASZT INDUKÁL EMLŐS SEJTEKBEN

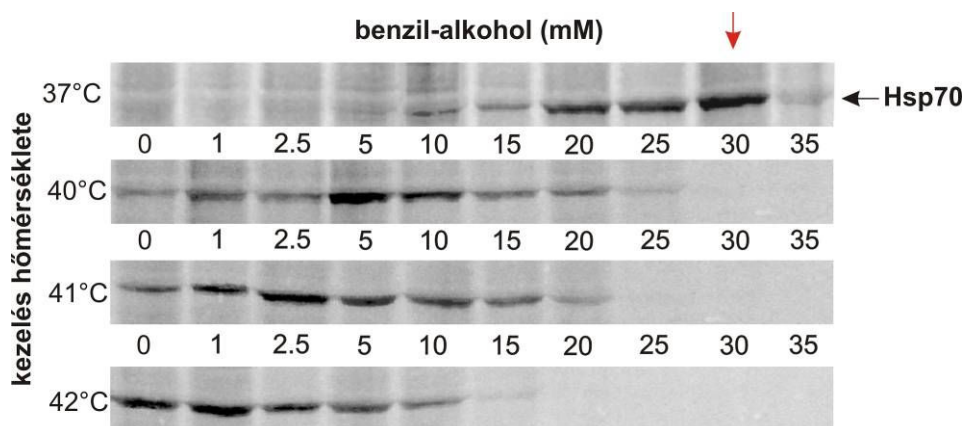
A felvázolt „membrán-eredetű stresszválasz” hipotézis érvényességének vizsgálatához elsőként arra kerestünk választ, hogy emlős sejtekben is befolyásolja-e a hősokk válasz folyamatát a membránok fizikai állapotának módosítása. A sejtmembránok fizikai állapotát a hőmérséklet-emelésével, valamint egy membránba interkalálódó vegyülettel, a korábban már említett benzil-alkohollal (BA) változtattuk meg. A BA egy neutrális, amfifil molekula, amely a membránba ékelődve növeli a membránok fluiditását (Konopásek és mtsai, 2004). Jól jellemzett a membránok fizikai állapotára gyakorolt hatása, mivel széles körben használták a membránfluiditás és a membránfunkciók közötti kapcsolat tanulmányozására (Gordon és mtsai, 1980; Carrière és mtsai, 1986; Friedlander és mtsai, 1990; Bookstein és mtsai, 1997; Kitagawa és mtsai, 1995; Ghosh és mtsai, 2002).

5.1.1. A *hsp* gének expressziójának vizsgálata membránstresszt követően

5.1.1.1. *A membránfluidizáló benzil-alkohol fokozza a Hsp70 fehérje szintézisét*

A stresszválasz egyik kulcsfontosságú eseménye a Hsp-k mennyiségének növekedése. Nyomon követtük, hogy a membránfluidizáló BA kezelés hatására változik-e a Hsp-k szintézisének mértéke. A kísérlet során tenyésztett humán sejteket (K562 humán eritroleukémia sejtek) növekvő koncentrációban BA-lal kezeltünk különböző hőmérsékleteken. A fehérjeszintézisben bekövetkező változásokról úgy nyertünk információt, hogy ¹⁴C izotóppal jelöltük az újonnan keletkező proteineket. A radioaktív fehérjét SDS poliakrilamid gélelektroforézist követően fluorográfiával tettük láthatóvá (12. ábra).

Hősokk hatására a 70 kDa körüli tartományban jelentősen megemelkedett egy fehérje expressziója, melyet irodalmi adatok alapján (Baler és mtsai, 1992) indukálható Hsp70-nek azonosítottunk. A Hsp70 szintézisét a hősokk mellett a BA is koncentrációfüggő módon befolyásolta. A BA egy adott koncentráció tartományban (20-30 mM) önmagában, hősokk nélkül is megnövelte a Hsp70 mennyiségét. Maximális indukciót 30 mM-os BA kezelésnél tapasztaltunk.



12. ábra A BA kezelés indukálja a Hsp70 *de novo* szintézisét. K562 sejteket növekvő koncentrációban BA-lal kezeltünk az ábrán jelzett hőmérsékleteken egy órán keresztül. Három órás nyugalmi időszak után ^{14}C izotópot tartalmazó fehérje hidrolizátummal jelöltük az újonnan szintetizálódó fehérjéket. A radioaktív fehérjéket SDS poliakrilamid gélelektroforézist követően fluorográfiával tettük láthatóvá. Az ábrán a fluorográfok 70 kDa-os fehérjéket tartalmazó sávjai láthatók.

Ha a BA kezelés mellett hősokknak is kitettük a sejteket, akkor a hőmérséklet emelésével egyre kevesebb BA-ra volt szükség ugyanakkora Hsp70 szint eléréséhez. Tehát a hősokk és a BA Hsp70 szintézisre gyakorolt hatása összeadódott. Fontos még megemlíteni, hogy a BA kezelés magasabb koncentrációknál, különösen hőmérséklet-emeléssel párosítva, gátolta a fehérjék szintézisét, ami a stresszt követő negyedik órában képződő Hsp70 mennyiségéből is jól látható, és ezzel összefüggésben a sejtek életképessége is csökkent.

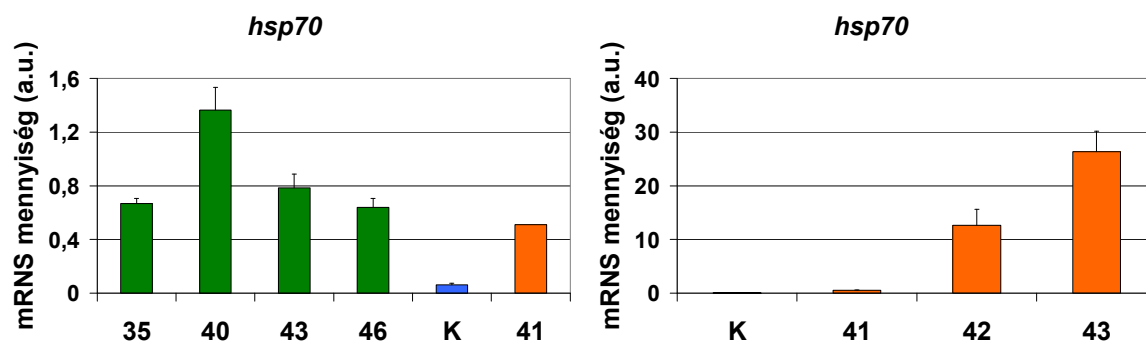
5.1.1.2. A benzil-alkohol a hsp70 mellett további hsp gének expresszióját is indukálja

A Hsp70 csak az egyik képviselője a hősokk fehérjék hatalmas családjának. Kíváncsiak voltunk, hogy a BA a *hsp70* mellett fokozza-e más *hsp* gének expresszióját is. Ezért kiválasztottuk még további három Hsp család 1-2 olyan tagját – Hsp110, Hsp90, Hsp25 és αB -krisztallin –, amelyekről ismert, hogy hősokk során indukálódnak, és meghatároztuk, hogy hogyan változik ezen gének kifejeződése BA hatására.

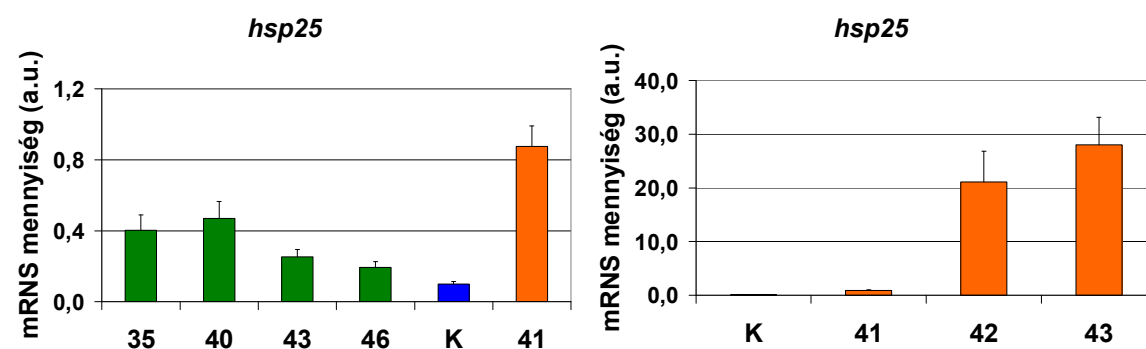
Mivel végső célunk a membrán-eredetű stresszválasz szabályzó elemeinek feltérképezése volt, kísérleteinket az egér melanóma B16(F10) sejtvonalon folytattuk, ahol a megfelelő molekuláris eszköztár már a rendelkezésünkre állt. A B16(F10) sejtek a K562 sejtekkel ellentétben nem szuszpenzióban növekszenek, hanem kitapadnak a növesztési felszínre. A B16(F10) sejtek jóval ellenállóbbnak bizonyultak a BA kezeléssel szemben, mint a K562 sejtek. Míg K562 sejteknél a 30 mM-nál magasabb koncentrációjú egy órás BA kezelés letálisnak bizonyult, addig a B16(F10) sejtek még a 46 mM-os kezelést is túléltek.

A *hsp* gének indukálhatóságának teszteléséhez szubletális koncentrációkban (35-46 mM) BA-lal kezeltünk, vagy magas hőmérsékleti stressznek (41-43 °C) tettünk ki B16(F10) sejteket, és közvetlenül a kezelések után kvantitatív RT-PCR-al mértük a *hsp* mRNS-k mennyiségét (13. ábra).

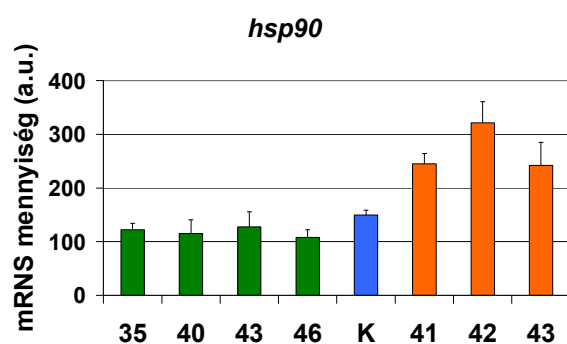
A)



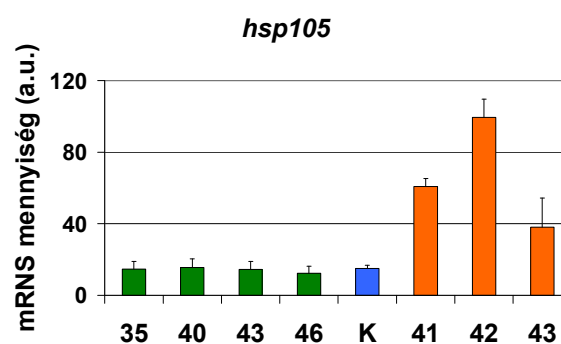
B)

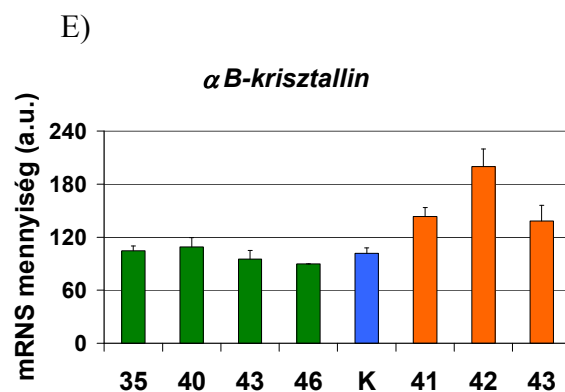


C)



D)





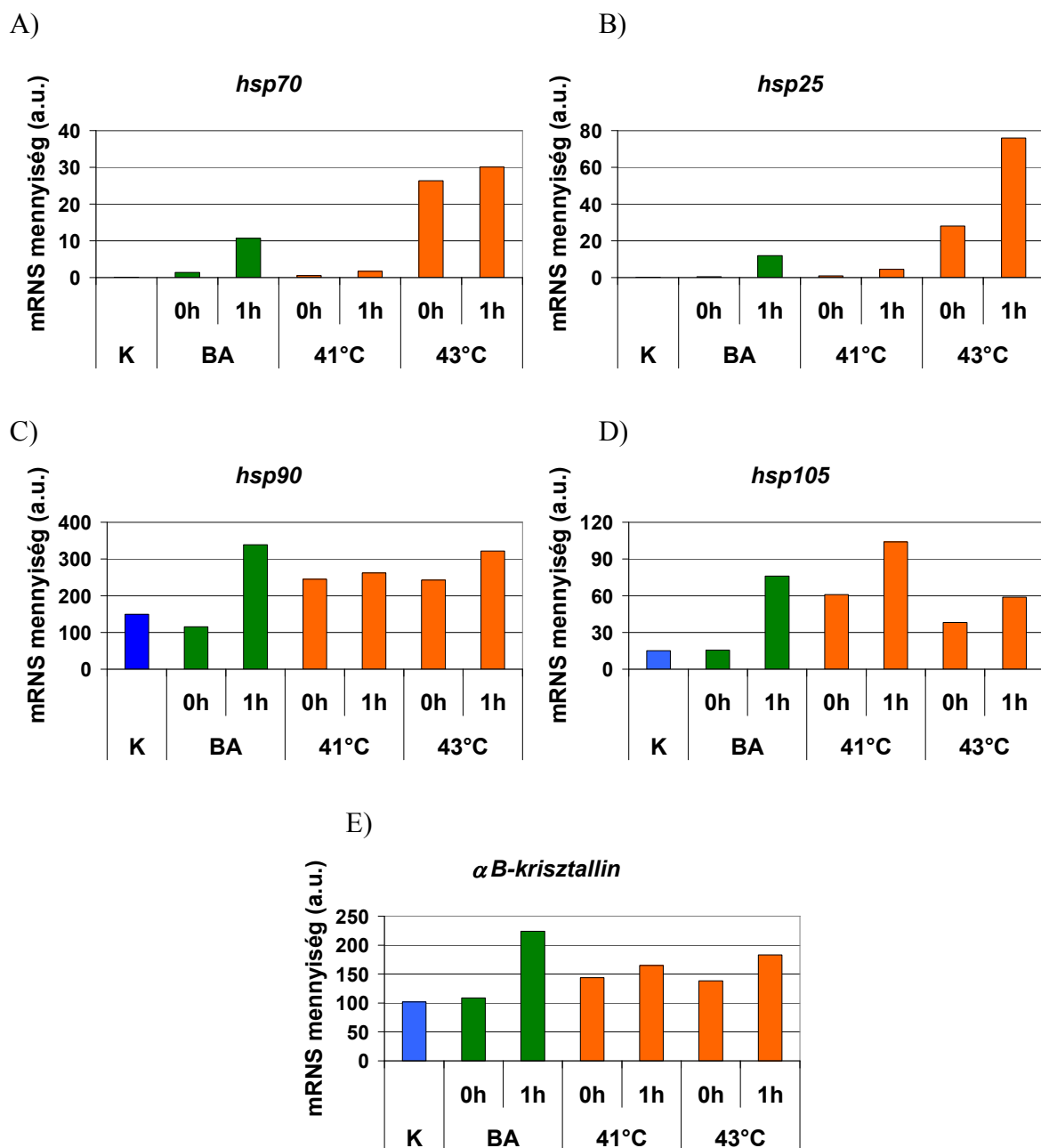
13. ábra A BA és a hőszokk hatása a *hsp* gének expressziójára. BA-lal kezeltünk (35 mM, 40 mM, 43 mM és 46 mM koncentrációkban, zöld oszlopok) vagy magas hőmérsékleti stressznek tettünk ki (41 °C, 42 °C és 43 °C, piros oszlopok), ill. növesztési körülmények között hagytunk (K, kontroll, kék oszlop) B16(F10) sejteket egy órán keresztül. A kezeléseket után kvantitatív RT-PCR-rel meghatároztuk a *hsp70* (A), *hsp25* (B), *hsp90* (C), *hsp105* (D) és αB -krisztallin (E) mRNS-ek mennyiségét β -aktin belső kontrollhoz képest. A *hsp70* és *hsp25* esetében külön diagramokon ábrázoltuk a BA-ra és a hőszokkra vonatkozó adatokat a nagy expressziós különbségek miatt.

Szembevetendő különbséget tapasztaltunk a BA és a hő hatása között. Hőstressz alatt – 41, 42 és 43 °C-on is – az összes vizsgált *hsp* (*hsp70*, *hsp25*, *hsp90*, *hsp105* és az αB -krisztallin) mRNS mennyisége megnövekedett. A BA kezeléseket azonban csak a *hsp70* és a *hsp25* mRNS-ek szintjét emelték meg szignifikáns mértékben. Maximális *hsp70* és *hsp25* indukciót a 40 mM-os koncentrációnál mértünk.

A hőmérséklet változására a BA-ra is indukálódó *hsp70* és *hsp25* reagált a legérzékenyebben. Az enyhébb 41 °C-hoz képest a 42 °C-os hőszokk egy nagyságrenddel nagyobb mértékű indukciót okozott. A BA kezelés a *hsp* indukáló képessége alapján a 41 °C-os enyhébb hőstresszhez állt közelebb, bár a BA a *hsp70* mRNS szintjét nagyobb, még a *hsp25*-ét kisebb mértékben emelte meg, mint a 41 °C.

Közvetlenül a BA kezeléseket után tehát nem tapasztaltunk növekedést a *hsp90*, *hsp110* és αB -krisztallin expressziójában. Ez két lehetőséget is felvet: a BA vagy nem befolyásolja ezen gének kifejeződését, vagy az indukciójuk csak későbbi időpontban figyelhető meg. Ennek eldöntéséhez vizsgáltuk a *hsp* gének expressziós szintjét egy órával a kezeléseket után is.

A kísérlet során egy órás kezeléseket (40 mM BA, 41 és 43 °C) alkalmaztunk, és az egy órás regeneráció után kvantitatív RT-PCR-rel mértük a *hsp* mRNS-ek szintjét (14. ábra).



14. ábra A *hsp* gének expressziójának időbeli változása BA kezelés és hő sokk után. B16 (F10) sejteket egy órán keresztül 40 mM BA-lal (zöld oszlop) kezeltünk, 41 °C-on és 43 °C-on hő sokkoltunk (piros oszlop), vagy növesztési körülmények között hagytunk (K, kontroll, kék oszlop). Egy órás nyugalmi fázist követően (1h) kvantitatív RT-PCR-al meghatároztuk a *hsp70* (A), *hsp25* (B), *hsp90* (C), *hsp105* (D) és α B-krisztallin (E) mRNS-ek mennyiségét β -aktin belső kontrollhoz képest. A könnyebb összevethetőség miatt az ábrán feltüntettük az 13. ábrán már bemutatott 0 h-nál mért mRNS szinteket.

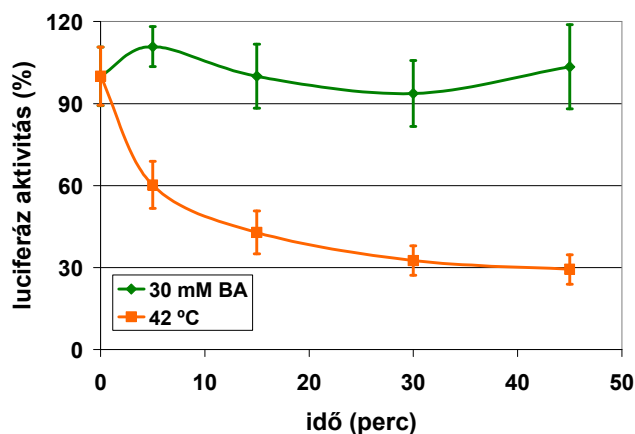
Ebben az időablakban már láthatóvá vált, hogy a *hsp90*, a *hsp105* és az α B-krisztallin is indukálódik BA hatására, csak megkésve, más kinetikával, mint a hő sokkolt sejtekben. Az egy órás nyugalmi időszak alatt az összes vizsgált *hsp* mRNS mennyisége tovább emelkedett. A *hsp25* és *hsp70* expressziós szintje olyan nagymértékben nőtt BA kezelést követően az egy

órás regenerációs fázis alatt, hogy ebben az időpontban már meghaladta a 41 °C-on hűsokkolt sejtekben mért értékeket. Érdekes megfigyelés, hogy a *hsp105* mindkét vizsgált időpontban az enyhe, 41 °C-os hőstresszre reagált a legnagyobb mértékben.

5.1.2. A benzil-alkohol kezelés nem a fehérjék denaturációján keresztül indukál stresszválaszt

A Hsp-k funkciója alapján az abnormális, vagy denaturált fehérjék felhalmozódását tekintik az elsődleges szignálnak, amely a stresszválaszt kiváltja. Így a membrán-szenzor hipotézis igazolása szempontjából központi jelentőségű, hogy a BA kezelés alatt vajon károsodnak-e, azaz denaturálódnak-e a fehérjék.

A protein denaturáció mértékének becsléséhez a szentjánosbogár luciferázt használtuk, mint riporter fehérjét. A luciferáz azért alkalmas erre a feladatra, mert hőérzékeny, és szolubilitásának elvesztése korrelál az enzim aktivitásának csökkenésével (Nguyen és mtsai, 1989). A kísérlethez a luciferázt citoplazmatikusan, konstitutívan expresszáló HeLa sejteket használtunk, és nyomon követtük az enzim aktivitásának változását BA kezelés és magas hőmérsékleti stressz alatt (15. ábra). Megjegyzendő, hogy a BA a K562 sejtekhez hasonló módon ebben a sejtben is indukálta a Hsp70 szintézisét.



15. ábra A BA a hűsokkkal ellentétben nem denaturálja a fehérjéket. A szentjánosbogár luciferáz enzimet citoplazmatikusan expresszáló HeLa sejteket kezeltünk 30 mM BA-lal vagy 42 °C-on hűsokkoltuk őket. 5; 15; 30 és 45 perces inkubációkat követően mértük a luciferáz enzim aktivitását.

A 42 °C-os hűsokk hatására gyorsan csökkent a luciferáz aktivitása: 5 perces inkubációt követően 60 %-ra esett vissza az enzim aktivitása, míg egy óra múlva már csak a kiindulási

érték 20 %-át mértük. Ezzel szemben a BA kezelés során a luciferáz nem veszítette el az aktivitását: még 45 perc után is 100 % körüli értéket mértünk. Ezek alapján megállapíthattuk, hogy a BA, ellentétében a hőstresszel, nem okoz jelentős mértékű protein denaturációt. Fentebb ismertetett kísérleteink megerősítették azon feltételezésünket, hogy a *hsp* expresszió növekedését nemcsak a fehérjék károsodása, de a membránperturbáció hatására bekövetkező szignálképző események is el tudják indítani.

5.2. A STRESSZVÁLASZ INDUKCIÓJÁHOZ KÖTHETŐ MEMBRÁN ÁLLAPOT-VÁLTOZÁSOK

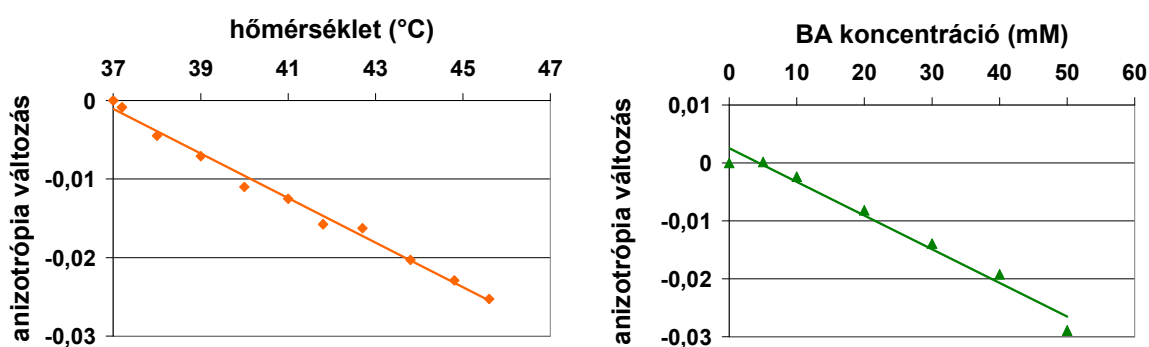
Munkám következő szakaszában arra kerestünk választ, hogy milyen membrán állapotváltozások válthatják ki a hősokk választ. Azonosítani kívántuk a stresszválasz kezdeti szakaszában a membrán által közvetlenül érintett jelképzési-, jelátviteli eseményeket, a membránok fizikai állapotában, finomszerkezetében és összetételében bekövetkező változásokat.

5.2.1. A benzil-alkohol és a hősokk egyaránt növelik a membránok fluiditását

Irodalmi adatok alapján a BA egy jól jellemzett membránfluidizáló szer (Rege és mtsai, 2002; Konopásek és mtsai, 2004). Emellett a hősokk is értelemszerűen növeli a membránok fluiditását (Revathi és mtsai, 1994; Dynlacht és Fox, 1992; Dynlacht és Fox, 1992; Van Blitterswijk és mtsai, 1981). A membránok fluiditása, a molekulák dinamikus mozgása, laterális diffúziója és rotációja meghatározza a membránok állapotát, és ezen keresztül a membránfüggő folyamatok végbemenetelét (Vigh és mtsai, 2005). Ezek alapján a membránfluiditás növekedés jelként szolgálhat a stresszválasz elindításához.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a hőmérséklet emelése és a BA milyen mértékben változtatják meg a membránok fluiditását abban a tartományban, amelyben a *hsp* gének indukcióját előidézik. Ehhez a membránfluiditás változását egy membránba ékelődő fluoreszcens molekula anizotrópia mérésével határoztuk meg. A fluoreszcencia anizotrópia értékek fordítottan arányosak a fluiditás jellemzővel, így az anizotrópia csökkenése a membránfluiditás növekedését jelzi.

A hőmérséklet-emelés és a BA kezelés membránfluiditásra gyakorolt hatását B16(F10) sejtekből izolált plazmamembrán frakción mértük 1,6-difenil-1,3,5-hexatrién (DPH) fluoreszcens próba segítségével. A DPH jelölővel a membránok hidrofób, zsírsavdallancokat tartalmazó régiójában bekövetkező változásokról nyerhetünk információkat.



16. ábra A hőmérséklet-emelés és a BA kezelés dóziszfüggő módon növelik a membránok fluiditását. (A) A DPH fluoreszcencia anizotrópia változása hőmérséklet-emelés hatására B16(F10) sejtekből izolált plazmamembrán frakción. Az ábrán a 37 °C-on mért anizotrópia értéktől való eltérést tüntettük fel. (B) DPH jelölt plazmamembrán frakciót növekvő koncentrációban BA-lal inkubáltunk 37 °C-on 5 percig, majd meghatároztuk a DPH fluoreszcencia anizotrópia értékeket. A BA-lal nem kezelt mintához viszonyítva ábrázoltuk az anizotrópia változását.

Várakozásainknak megfelelően a hőmérséklet emelésével fokozatosan csökkent az izolált membránfrakció rendezettsége (16/A ábra). A BA kezelés is koncentrációfüggő módon növelte a membránok fluiditását (16/B ábra). A BA kezelés a *hsp* indukciót kiváltó 30-40 mM koncentráció tartományban olyan mértékben növelte a membránfluiditást, mint a 42-44 °C-os hőmérsékletemelés. Tehát mindkét stresszhatás a hősokk választ előidéző tartományban hasonló mértékben fokozta meg a lipidmolekulák mozgékonyágát, a membránok rendezetlenségét.

5.2.2. A membránfluiditás növekedése nem mindig jár együtt a hősokk válasz indukciójával

A fenti, valamint K562 sejteken nyert, jelen dolgozatban részletesen nem ismertetett eredmények (Balogh és mtsai, 2005) összevetése alapján felmerült a lehetőség, hogy a membránok rendezettségének kritikus szintű csökkenése már elégséges feltétele a hősokk

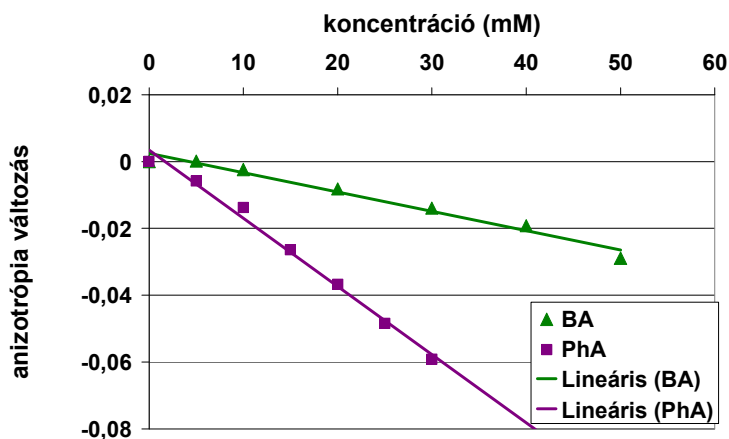
válasz kiváltásának. A feltételezés teszteléséhez egy BA-lal szerkezetileg rokon membránfluidizáló vegyület, a fenetil-alkohol (PhA) hatását is tanulmányoztuk (17. ábra).



17. ábra A BA és a PhA szerkezeti képlete

5.2.2.1. Az „izofluid membrán állapotot” előidéző benzil-alkohol és fenetil-alkohol koncentrációk meghatározása

Kérdésként tettük fel, hogy ha PhA-lal idézünk elő ugyanolyan mértékű membránfluiditás növekedést, mint a hő sokk választ kiváltó BA (40 mM) kezeléssel, akkor indukálódnak-e a *hsp* gének PhA hatására. A kérdés megválaszolásához először meg kellett határoznunk azt a PhA koncentrációt, amely ugyanakkora mértékben fluidizálja a membránokat, mint a 40 mM BA kezelés. Ehhez B16(F10) sejtekből izolált DPH-jelölt plazmamembrán frakciót növekvő koncentrációban PhA-lal inkubáltunk, és a DPH fluoreszcencia anizotrópia mérésével vizsgáltuk a PhA membránfluiditásra gyakorolt hatását (18. ábra).



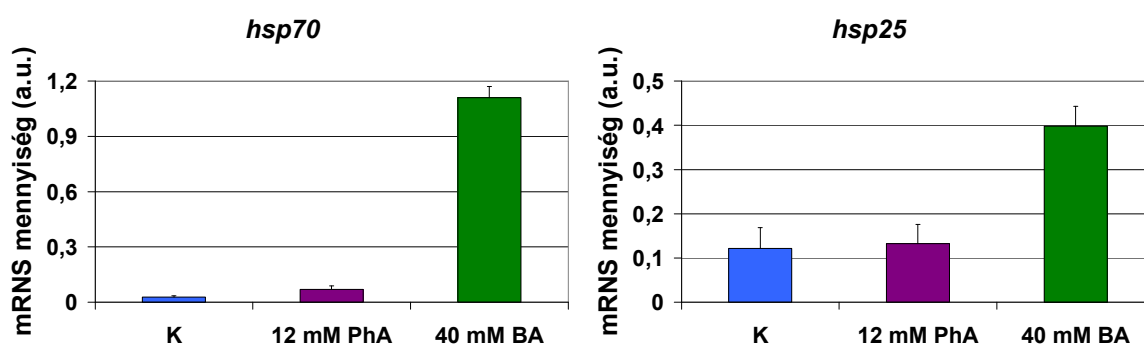
18. ábra A PhA koncentrációfüggő módon növeli a membránok fluiditást. DPH-jelölt plazmamembrán frakciót növekvő koncentrációban PhA-lal inkubáltunk 37 °C-on 5 percig, majd meghatároztuk a DPH fluoreszcencia anizotrópia értékeit. A kezeltetlen mintához viszonyítva ábrázoltuk az anizotrópia változását. A könnyebb összevethetőség érdekében az ábrán feltüntettük a BA-ra vonatkozó, 16. ábrán már bemutatott adatokat is.

A PhA is koncentrációfüggő módon növelte az izolált membránfrakció fluiditását. A PhA hatékonyabb fluidizáló szernek bizonyult, mint a BA, ugyanis 12 mM koncentrációban idézett

elő olyan mértékű fluiditás növekedést, mint a 40 mM BA kezelés. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a PhA-nál a fenil-csoport mélyebben tud beékelődni a membránba, így a hidrofób, zsírsavdallancokat tartalmazó membránrégió rendezettségét erőteljesebben képes megbontani.

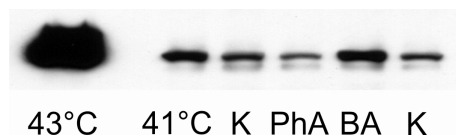
5.2.2.2. Az „izofluid membrán állapotot” előidéző fenetil-alkohol hatása a *hsp* expresszióra

Az „izofluid membrán állapotot” előidéző BA és PhA koncentrációk (40, ill. 12 mM) meghatározását követően már tanulmányozhattuk, hogy az azonos mértékű membránfluiditás növekedés hogyan befolyásolja a *hsp* gének kifejeződését. A *hsp70* és *hsp25* mRNS-ek mennyiségét kvantitatív RT-PCR-rel mértük 12 mM PhA-lal és 40 mM BA-lal kezelt B16(F10) sejteken (19. ábra).



19. ábra A BA és a PhA, az izofluid állapotot előidéző koncentrációkban, eltérő módon hatnak a *hsp* gének expressziójára. 40 mM BA-lal (zöld oszlop) vagy 12 mM PhA-lal (lila oszlop) kezeltünk B16(F10) sejteket, ill. növesztési körülmények között hagytuk őket (K, kontroll, kék oszlop) egy órán keresztül. Közvetlenül a kezeléseket után kvantitatív RT-PCR-rel meghatároztuk a *hsp70* (A) és a *hsp25* (B) mRNS-ek β -aktin-hoz viszonyított mennyiségét.

Várakozásainknak megfelelően a BA indukálta a *hsp70* és a *hsp25* gének kifejeződését. Azonban meglepve tapasztaltuk, hogy a PhA nem befolyásolta a *hsp25* expresszióját, és a *hsp70* mRNS szintjét is csak olyan kis mértékben emelte meg, hogy az messze elmaradt a BA *hsp70* indukáló hatásától. A Hsp70 fehérje szintjének vizsgálata is megerősítette a fenti eredményt. Western blot technikával igazoltuk, hogy a 12 mM PhA kezelés nem növeli meg a Hsp70 fehérje mennyiségét sem szemben az izofluid membrán állapotot létrehozó BA kezeléssel (40mM) (20. ábra).



20. ábra A PhA a BA-lal ellentétben nem fokozza a Hsp70 termelődését az izofluid membrán állapotot előidéző koncentrációban. 40 mM BA-lal (BA), 12 mM PhA-lal (PhA) kezeltünk, 41 és 43 °C-on hősokkoltunk B16(F10) sejteket, vagy növesztési körülmények között hagytuk őket (K, kontroll) egy órán keresztül. Hat órás nyugalmi fázist követően Western blot technikával vizsgáltuk a Hsp70 fehérje mennyiségét.

Eredményeink alapján BA kezelés és hőstressz során a membránok rendezettségének csökkenésével párhuzamosan a *hsp* gének is indukálódtak. De a membránok belső hidrofób régiójának hiperfluidizációját nem minden esetben követi automatikusan a hősokk fehérjék indukciója. Kísérleteink arra utalnak, hogy a membránfluiditás növekedése nem elégséges a hősokk válasz kiváltásához.

Fontos azonban megjegyezni, hogy a biológiai membránok a membránkomponensek között kialakuló specifikus kölcsönhatások révén heterogénnek tekinthetők. A lipidek és a fehérjék laterálisan szerveződő doméneket hozhatnak létre a membrán síkjában, így a membránban egymástól eltérő mikroviszkozitású szegmensek jöhetnek létre. Tehát amikor a membrán átlagos fluiditás jellemzőjéről beszélünk, akkor nem biztos, hogy az kellőképpen leírja a membrán funkcionalitása szempontjából kitüntetett mikrodomének fizikai-kémiai állapotát (Vereb és mtsai, 2003; Vigh és mtsai, 2005).

5.2.3. A hősokk választ indukáló kezelések módosítják a membrán mikrodomén szerveződését

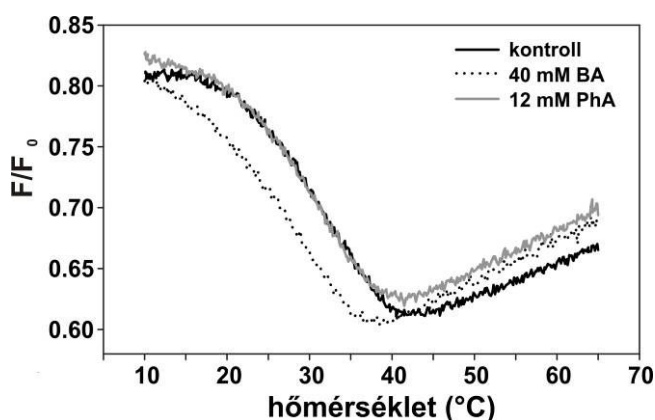
Annak érdekében, hogy megértsük, hogy az átlagos membránfluiditás növekedés mellett milyen további szerkezeti változások történnek a membránokban, tanulmányoztuk a membránok laterális mikrodomén szerveződésében bekövetkező változásokat is.

5.2.3.1. Lipiddomének stabilitásának in vitro vizsgálata

Peter Slotte turkui csoportjával együttműködve először egy *in vitro* kísérleti rendszerben (Björkqvist és mtsai, 2005) vizsgáltuk a BA és a PhA koleszterin gazdag, rendezett lipiddoménre gyakorolt hatását. Lipid kettősrétegben, amelyben alacsony és magas olvadáspontú lipidek is találhatóak, a koleszterin fázisszeparációt idéz elő. Kialakulnak koleszterinben gazdag, rendezett („liquid ordered”, l_o) és koleszterinben szegény, rendezetlen

(„liquid disordered”, l_d) lipiddomének. A kísérletben használt POPC/7SLPC/PSM/koleszterin/CTL, 30:30:30:9:1 összetételű lipidkettős rétegben létrejönnek PSM/koleszterin gazdag l_o , valamint POPC/7SLPC gazdag l_d fázisú domének. A lipidvezikula CTL összetevője egy fluoreszcens koleszterin származék, amelynek fluoreszcenciáját a 7SLPC komponens képes kioltani. De mivel a CTL-nek a rendezett l_o fázishoz nagy az affinitása, a 7SLPC pedig az l_d fázisban halmozódik fel, így a fázisszeparáció miatt a CTL fluoreszcenciája nem veszik el. Azonban a lipiddomének felbomlásakor a CTL és a 7SLPC térközelbe kerül, és a fluoreszcencia kioltódik. A CTL fluoreszcencia intenzitás csökkenése tehát arra utal, hogy a CTL az l_o fázisból a kioltót tartalmazó l_d fázisba került.

A mérés során a CTL fluoreszcencia intenzitás változását követtük nyomon. A hőmérséklet emelésekor azt tapasztaltuk, hogy a CTL fluoreszcencia intenzitása fokozatosan csökken, ami az l_o koleszterin gazdag lipiddomének hő hatására bekövetkező destabilizálódását, felbomlását jelzi (21. ábra).



21. ábra A BA és a PhA, az izofluid membrán állapotot előidéző koncentrációkban, eltérő módon hatnak a koleszterin gazdag l_o domének stabilitására. CTL fluoreszcencia intenzitás hőmérséklet függése 40 mM BA, 12 mM PhA jelenlétében, és a fluidizáló szerek nélkül. Az F mintákban a vezikulák összetétele: POPC/7SLPC/PSM/koleszterin/CTL 30:30:30:9:1. Az F_0 mintákban a 7SLPC-t POPC helyettesítette. Az F mintában mért fluoreszcencia intenzitás értékeket az F_0 mintához viszonyítottuk, amiből a 7SLPC által kioltott CTL arányára következtethetünk.

40 mM BA fokozta a hőmérsékletemelés hatására bekövetkező CTL fluoreszcencia intenzitás csökkenést; a görbe az alacsonyabb hőmérsékletek irányába tolódott el. Ezzel szemben az izofluid állapotot létrehozó 12 mM PhA nem befolyásolta az l_o domének olvadását (21. ábra). Ezek alapján bizonyítottuk, hogy a BA a lipid kettősrétegbe ékelődve képes a rendezett, koleszterin gazdag lipiddomének szerkezetét is megbontani. A PhA viszont

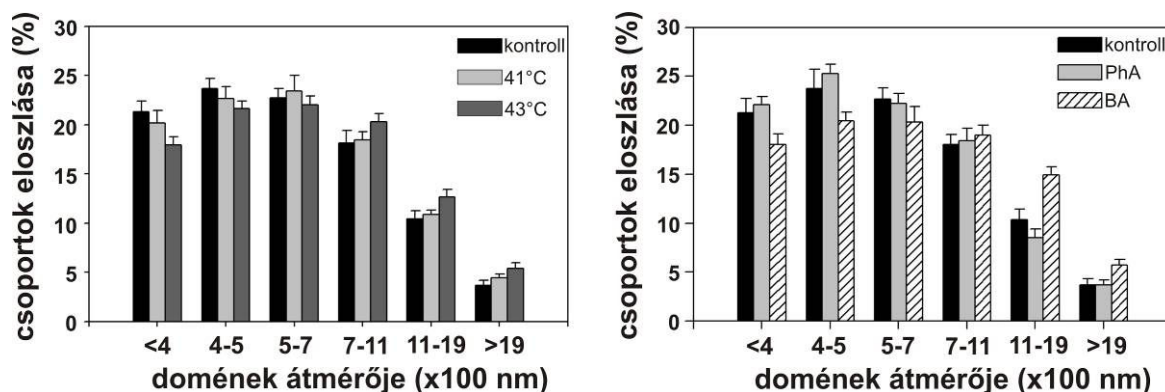
annak ellenére, hogy ugyanolyan mértékben megnöveli a membránok átlagos fluiditását, nem destabilizálja a rendezett lipiddoméneket.

5.2.3.2. Membrán mikrodomének *in vivo* vizsgálata

Az *in vitro* kísérleti adatok alapján felmerült a lehetősége annak, hogy élő sejtekben is módosulhat a hősokk választ indukáló kezelések során a membránok laterális mikrodomén szerveződése. A koleszterin gazdag plazmamembrán mikrodoméneknek központi szerepet tulajdonítanak többek között jelátviteli útvonalak, membrántranszport folyamatok szabályozásában, sejt-sejt közti kapcsolatok kialakításában, így mint szignalizációs platformok a stresszindukálta jelképzési-jelátviteli események helyszínéül is szolgálhatnak.

A koleszterin gazdag mikrodomének szerveződésének vizsgálatához egy fluoreszcens koleszterin származékot (polietilén-glikol-koleszterin-éter fluoreszcein észtere, fPEG-chol) használtunk. Az fPEG-chol egy nem toxikus, vízdékony, membrán impermeábilis molekula, amely a vizes fázisból a koleszterin gazdag membránokba épül be sejtek és modell membránok esetében is. Élő sejtek jelölésekor kizárólag a plazmamembrán külső rétegének koleszterin gazdag régióiban halmozódik fel, ahonnan a sejtek lassan endoszómákba internalizálják a jelöltöt raft markerekkel együtt (Sato és mtsai, 2004). Abból indultunk ki, hogy ha a stresszhatások módosítják a koleszterin gazdag mikrodomének szerkezetét, akkor stressz során megváltozik a mikrodomének mérete, eloszlása a plazmamembránban. Ezért próbáltunk betekintést nyerni, hogy átrendeződik-e a plazmamembrán koleszterin tartalmú mikrodoménjeinek méreteloszlása hőstressz (41 °C és 43 °C), ill. az izofluid membrán állapotot létrehozó BA és PhA kezelések hatására.

A kísérlet során a fenti egy órás stresszhatásokat követően B16(F10) sejteket jelöltünk fPEG-chol próbával, és konfokális mikroszkóppal felvételeket készítettünk a sejtek növesztési felszínhez kitapadó plazmamembrán régiójáról. A képeken Image J szoftver segítségével meghatároztuk az fPEG-chol-jelölt plazmamembrán régiók (mikrodomének) számát és méretét. Az fPEG-chol-jelölt mikrodoméneket a méretük alapján hat csoportba osztottuk, és meghatároztuk, hogy a vizsgált mintákban hogyan oszlanak meg a detektált mikrodomének a hat mérettartomány között (22. ábra).



22. ábra A hősokk és membránfluidizáló szerek hatása a koleszterin gazdag mikrodomének szerveződésére. (A) 41 és 43 °C-on egy órán át hősokkoltunk, (B) 40 mM BA-lal, 12 mM PhA-lal kezeltünk B16(F10) sejteket, vagy növesztési körülmények között hagytuk őket (kontroll). A koleszterin gazdag mikrodoméneket fPEG-chol jelölővel tettük láthatóvá. A detektált doméneket méretük alapján 6 csoportba osztottuk, és meghatároztuk a domének eloszlását a csoportok között.

Hőstressz alatt jellegzetes változást tapasztaltunk az fPEG-chol-jelölt mikrodomének méreteloszlásában. A kisebb méretű (500 nm alatti) domének aránya csökkent, míg a nagyobb átmérőjű (700 nm feletti) domének aránya megnőtt. A kontroll mintához képest csak a 43 °C kezelés módosította szignifikáns mértékben a mikrodomének méreteloszlását, azonban 41 °C-on is ugyanolyan tendenciájú, csak kisebb mértékű változásokat detektáltunk.

A BA (40 mM) kezelés hatására is átrendeződött az fPEG-chol-jelölt mikrodomének méretbeli eloszlása. Ráadásul a BA ugyanolyan irányú változásokat idézett elő, mint a hőmérsékleti stressz: csökkent a kisebb, és nőtt a nagyobb méretű fPEG-chol-jelölt mikrodomének hányada. Ezzel szemben a PhA kezelés (az „izofluid” membrán állapotot előidéző koncentrációban, 12 mM) nem befolyásolta szignifikáns mértékben a mikrodomének méreteloszlását. Ezen felül a PhA még tendenciáját tekintve sem okozott hasonló irányú változásokat, mint a hősokk és a BA kezelés.

A plazmamembrán koleszterin gazdag mikrodoménjeinek *in vivo* vizsgálata megerősítette az *in vitro* kísérleti eredményeket. A membránfluidizáló BA kezelés és a magas hőmérsékleti stressz az *in vitro* kísérleti rendszerben egyaránt destabilizálta a koleszterin gazdag rendezett lipiddoméneket. Ezzel összhangban a fenti stresszhatások élő sejtekben is megváltoztatták a koleszterin gazdag mikrodomének méreteloszlását, ami a mikrodomének szerveződésében, szerkezetében bekövetkező változásokra utal. A PhA kezelés azonban annak ellenére, hogy növelte a membránok átlagos fluiditását, sem *in vitro*, sem *in vivo* nem módosította a koleszterin gazdag mikrodomének szerveződését.

Eredményeinket összegezve megállapítottuk, hogy a Hsp szintézist indukáló kezelések, mint a BA és a hőstressz, nemcsak a membránok rendezetlenségét növelik meg, de emellett módosítják, átrendezik a plazmamembrán koleszterin gazdag mikrodoménjeinek szerveződését is. Ez arra utalhat, hogy ezek a mikrodoménjek részt vehetnek, mint szignalizációs platformok a membrán-eredetű stresszválasz jelképzési - jelátviteli folyamatában (Nagy és mtsai, 2007).

5.3. EGY MEMBRÁN ÁLTAL ÉRINTETT JELÁTVITELI ESEMÉNY AZONOSÍTÁSA

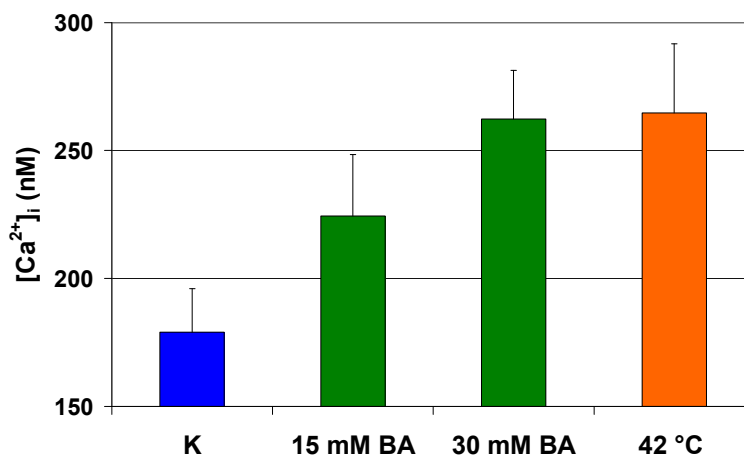
5.3.1. A Ca^{2+} szerepének tanulmányozása

Milyen jelátviteli események kapcsolhatják össze a membránokban zajló eseményeket a *hsp* gének indukciójával? Régóta ismert a Ca^{2+} , mint másodlagos hírvívő, központi szerepe a hősokk válasz folyamatában (Price és Calderwood, 1991). A Ca^{2+} csatornák működését meghatározhatja a membrán állapota, ráadásul az intracelluláris Ca^{2+} szint növekedését az inozitol lipidek metabolizmusa is befolyásolja (Stevenson és mtsai, 1986; Calderwood és mtsai, 1988). Ezek alapján feltételeztük, hogy a Ca^{2+} a BA hatására aktiválódó, membránból induló jelátviteli útvonal egyik elemeként részt vehet a *hsp* gének expressziójának szabályozásában.

5.3.1.1. Benzil-alkohol hatására megemelkedik az intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentráció

A Ca^{2+} szerepének vizsgálatokor először azt határoztuk meg, hogy változik-e a sejtekben a Ca^{2+} koncentráció BA kezelés hatására. Az intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) méréséhez Fura-2 fluoreszcens festéket használtunk. A Fura-2 spektrális tulajdonságai Ca^{2+} kötésekor megváltoznak, a festék gerjesztési maximuma 338 nm-ről 366 nm-re tolódik. Így ha 340 nm-en, ill. 380 nm-en gerjesztjük a fluorofórt és 510 nm-en detektáljuk a kibocsátott fény intenzitását, a fluoreszcencia intenzitás arányának mérésével a Fura-2 mennyiségétől függetlenül a közeg Ca^{2+} koncentrációja meghatározható. Az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció méréséhez a festéket a sejtekbe kell juttatni. Ennek széles körben elterjedt módja a Fura-2-acetoxi-metil (AM) észter alkalmazása. A Fura-2/AM észter apoláris tulajdonságú, így képes áthatolni a sejtmembránon. A sejten belül az AM észtert intracelluláris észterázok membrán

impermeabilis Fura-2-vé hidrolizálják, így a festék a sejteken belül felhalmozódik. A kísérlet során 5 percig BA-lal kezeltünk (15 mM és 30 mM) vagy 42 °C-on hősokkoltunk Fura-2-vel feltöltött K562 sejteket, majd mértük az $[Ca^{2+}]_i$ -t (23. ábra).

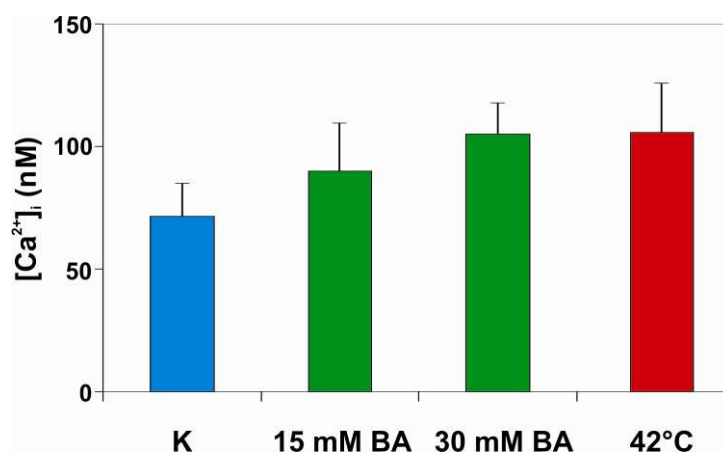


23. ábra A BA kezelés és a hőszokk során intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentráció növekedés figyelhető meg. Az intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentrációt fluorimetriáson, Fura-2/AM fluoreszcens Ca^{2+} kelátor alkalmazásával határoztuk meg K562 sejtekben. A BA és a hőszokk hatásának vizsgálatokor a mérés előtt a Fura2/AM festékkel feltöltött sejteket 5 percig inkubáltuk BA-lal (15mM, 30 mM, zöld oszlopok), vagy hőszokkoltuk őket 42 °C-on (piros oszlop) 1,2 mM Ca^{2+} tartalmú pufferben.

A BA kezelés koncentrációfüggő módon megemelte a sejtekben az $[Ca^{2+}]_i$ -t. Az irodalmi adatokkal összhangban 42 °C hőstressz alatt is $[Ca^{2+}]_i$ növekedést tapasztaltunk. Érdeemes megjegyezni, hogy a 30 mM BA és a 42 °C-os hőszokk K562 sejtekben hasonló mértékben indukálta a Hsp70 fehérje szintézisét, és emellett az $[Ca^{2+}]_i$ -ban is azonos szintű növekedést idéztek elő.

A következőkben azt próbáltuk megállapítani, hogy a Ca^{2+} az extracelluláris térből áramlik a sejtekbe vagy intracelluláris raktárokból szabadul fel. Ehhez a fenti kísérletet végrehajtottuk Ca^{2+} mentes és EGTA-t is tartalmazó pufferben. Így megvontuk a sejtektől az extracelluláris Ca^{2+} forrást (24. ábra).

Extracelluláris Ca^{2+} hiányában a nem stresszelt sejtekben jelentősen lecsökkent az $[Ca^{2+}]_i$. De a BA kezelés és a hőstressz továbbra is fokozta az $[Ca^{2+}]_i$ -t. Ez arra utal, hogy az intracelluláris térből felszabaduló Ca^{2+} hozzájárul az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedéshez BA kezelés és hőszokk során is.

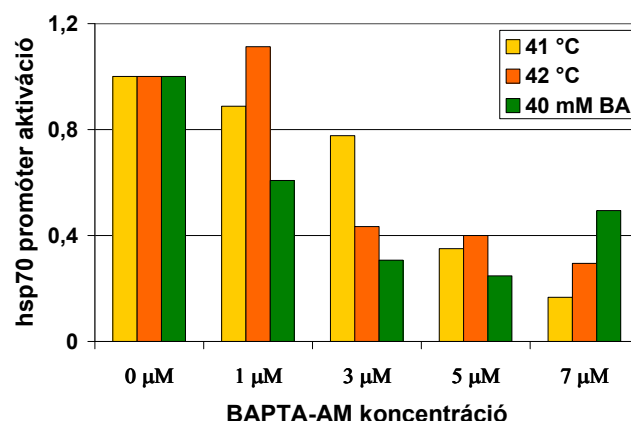


24. ábra A BA kezelés és a hő sokk során Ca^{2+} szabadul fel az intracelluláris raktárakból. Az intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentrációt az előzőekhez hasonló módon határoztuk meg K562 sejtekben. A mérés előtt a Fura2/AM festékkel feltöltött sejteket 5 percig inkubáltuk BA-lal (15mM, 30 mM, zöld oszlopok), vagy hő sokkoltuk őket 42 °C-on (piros oszlop) Ca^{2+} mentes és 10 mM EGTA-t is tartalmazó pufferben.

5.3.1.2. A Ca^{2+} szint emelkedés szükséges a *hsp70* indukciójához

Annak eldöntésére, hogy a BA által kiváltott Ca^{2+} szint növekedés szükséges-e a *hsp* gének indukciójához, a következő kísérletet végeztük el. Meggátoltuk a stressz hatására bekövetkező Ca^{2+} szint emelkedést egy intracelluláris Ca^{2+} kelátor, a BAPTA-AM alkalmazásával, és teszteltük a *hsp70* promóter aktivitását. A *hsp70* promóter aktivitását egy riporter plazmid segítségével követtük, amelyben a patkány *hsp70.1* promóterének 950 bp-os fragmentuma szabályozza a CAT riporter fehérje kifejeződését (p950/CAT6). A kísérlethez olyan B16(F10) sejt vonalat használtunk, amely a kromoszómába integrálva tartalmazta a fenti riporter plazmidot (25. ábra).

A BAPTA-AM kezelés koncentrációfüggő módon gátolta a BA hatására bekövetkező *hsp70* promóter aktivációt. A várakozásoknak megfelelően a BAPTA-AM csökkentette a hőstressz *hsp70* promóter aktiváló hatását is. Ezek alapján megállapíthattuk, hogy a membránból induló stresszaktivált jelátviteli útvonalak az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelésén keresztül szabályozzák a *hsp70* gén indukcióját.



25. ábra Intracelluláris Ca^{2+} kelátor alkalmazása gátolja a *hsp70* promóter aktivációját. A *hsp70* promóter aktivitását p950/CAT6 plazmidot tartalmazó stabil B16(F10) sejtvonalban határoztuk meg a CAT enzim aktivitásának mérésével. A kísérlet során BAPTA-AM intracelluláris Ca^{2+} kelátorral 30 percig előkezeltük a sejteket, majd BAPTA-AM jelenlétében stressz hatásoknak tettük ki őket: 40 mM BA, 41 °C, 42 °C egy órán keresztül. Majd 16 órás regenerációs fázis következett, továbbra is BAPTA-AM jelenlétében, végül mértük a CAT riporter aktivitását. Mindhárom stresszor esetében a BAPTA-AM-et nem tartalmazó mintákban 1-nek tekintettük a promóter aktiváció mértékét, és ehhez viszonyítottuk a BAPTA-AM jelenlétében mért CAT aktivitás értékeket.

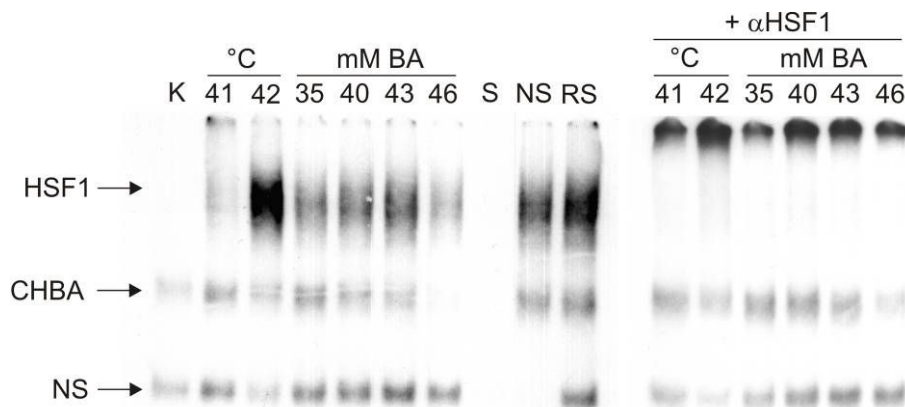
5.4. A JELÁTVITELI ÚTVONALAK INTEGRÁCIÓJA: A HSF1 AKTIVÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

A HSF1 a stresszválasz központi jelentőségű transzkripciós faktora. A HSF1 intenzív poszttranszlációs módosításain keresztül számos szignalizációs útvonal hatását integrálja. Kíváncsiak voltunk, hogy a membránstressz által aktivált jelátviteli útvonalak is a HSF1-en keresztül szabályozzák-e a *hsp* gének indukcióját.

5.4.1. A HSF1 DNS-kötő képességének vizsgálata

Normál körülmények között a HSF1 monomer formában van jelen a sejtekben. Stressz hatására a DNS-kötésre képtelen HSF1 monomerek DNS-kötésre képes trimerekké alakulnak, és szekvencia specifikusan a hősokk elemekhez (HSE) kapcsolódnak (Sarge és mtsai, 1993). Ez a folyamat, azaz a DNS-kötő képesség megszerzése, gélretardációs technikával nyomon követhető. A kísérlet során B16(F10) sejteket növekvő koncentrációban BA-lal kezeltünk, vagy összehasonlításuképp 41 és 42 °C-on hősokkoltunk. A sejtmagi lizátumokat radioaktív

HSE-t tartalmazó oligonukleotiddal inkubáltuk, majd nem denaturáló poliakrilamid gélelektroforézist követően autoradiográfiásan detektáltuk a radioaktív oligonukleotidok migrációját (26. ábra).



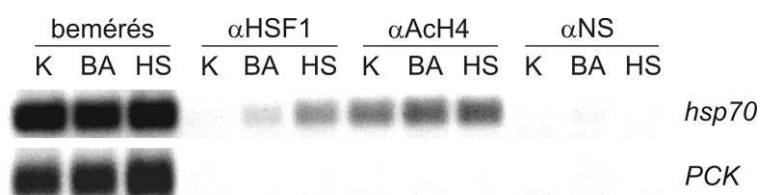
26. ábra BA hatására kialakul a HSF1 DNS-kötésre képes aktív formája. BA-lal (35, 40, 43, 46 mM) kezeltünk, 41 és 42 °C-on hősokkoltunk, vagy növesztési körülmények között hagytunk (K, kontroll) B16(F10) sejteket egy órán keresztül. Gélretardációs technikával, HSE-t tartalmazó radioaktív oligonukleotidokkal vizsgáltuk a HSE-HSF1 komplex kialakulását. A kötés specifikitásának teszteléséhez a kötési reakciókba feleslegben radioaktívan nem jelölt specifikus (S) vagy nem specifikus (NS) oligonukleotidokat mértünk. A HSE-hez kötődő HSF1 azonosításához anti-HSF1 antitest, vagy negatív kontrollként nyúlserum (RS) jelenlétében is végrehajtottuk a kötési reakciókat. Az ábrán az autoradiogram képe látható. HSF1: HSE-HSF1 komplex, CHBA: konstitutív HSE-kötő aktivitás, NS: nem HSE specifikus komplex.

BA kezelés hatására, a hősokkolt mintákhoz hasonlóan, kialakult egy HSE kötésére képes DNS-fehérje komplex. A feleslegben adott nem jelölt specifikus oligonukleotid kiszorította a komplexből a radioaktív specifikus oligonukleotidot, míg a nem specifikus oligonukleotiddal történő inkubáció nem befolyásolta a DNS-fehérje komplex kialakulását jelezve, hogy HSE specifikus DNS-fehérje komplex alakult ki a BA kezelt mintákban.

A HSE-fehérje komplexben a HSF1 jelenlétének igazolásához anti-HSF1 antitest jelenlétében is inkubáltuk a lizátumokat a jelölt specifikus oligonukleotiddal. Ennek hatására tovább lassult a HSE-fehérje komplex migrációja, ami arra utal, hogy HSF1 tartalmú DNS-fehérje komplex jött létre a BA és a hőkezelt mintákban.

A gélretardációs analízis alapján megállapítottuk, hogy BA kezelés során is DNS-kötésre alkalmas trimerré alakul a HSF1. Arra a kérdésre azonban, hogy a HSF1 a sejten belül valóban kötődik-e a DNS-hez, ill. milyen gének mely szabályzó elemeivel létesít kapcsolatot, egy másik módszerrel, kromatin immunoprecipitációval tudunk választ kapni. Korábbi kísérleteinkből ismert volt, hogy a *hsp70* expressziója nagymértékben megemelkedik BA

hatására. Ezért kromatin immunoprecipitációval azt határoztuk meg, hogy a *hsp70* gén promóteréhez kapcsolódik-e *in vivo* a HSF1. BA (43 mM) kezelést és 42 °C hőshockot követően anti-HSF1 antitesttel immunoprecipitáltuk a formaldehiddel keresztkötött és szonikált kromatin preparátumokat. Pozitív kontrollként anti-acetil-hisztón 4 (anti-AcH4) antitesttel, és negatív kontrollként nyúlszérummal is elvégeztük a kicsapást. Szemikvantitatív PCR-rel becsültük meg a *hsp70.1* promóter mennyiségét az immunoprecipitált DNS-ben (27. ábra).

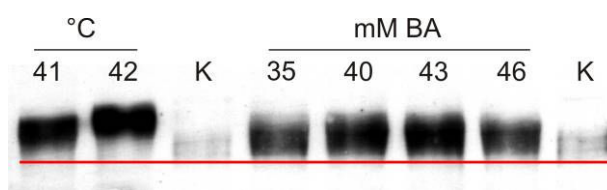


27. ábra A HSF1 a *hsp70.1* promóterhez kapcsolódik BA kezelés hatására. Kromatin immunoprecipitációval vizsgáltuk a HSF1 *hsp70.1* promóterhez kötődését B16(F10) sejteken növesztési körülmények (K) között, valamint egy órás 43 mM BA (BA), és 42 °C-os hőshock (HS) kezeléseket követően. Anti-HSF1, pozitív kontrollként anti-AcH4 ellenanyagokkal, és negatív kontrollként nyúlszérummal (NS) is immunoprecipitáltuk a szonikált kromatin mintákat. Szemikvantitatív PCR-rel határoztuk meg a *hsp70.1* és a *foszfoenolpiruvát-karboxikináz* (PCK) promóter fragmentumok mennyiségét a precipitátumokban. A bemérési kontrollnál az immunoprecipitációhoz használt kromatin mennyiség 10 % -át használtuk.

A kontrollhoz képest mind a BA, mind a hőkezelt minták HSF1 precipitátumaiban feldúsult a *hsp70.1* promóter. 42 °C hőshock után a sejtek nagyobb hányadában kötődött HSF1 a *hsp70.1* promóterhez, mint 43 mM BA kezelést követően. Ez az eredmény összhangban van a korábbi *hsp70* génexpressziós adatokkal, ahol azt tapasztaltuk, hogy a 42 °C hőshock hatására egy nagyságrenddel magasabb a *hsp70* mRNS szintje, mint a 43 mM BA kezelés után. A negatív kontroll nyúlszérummal kicsapott mintákban nem detektáltunk *hsp70.1* promótert, még a pozitív kontroll acetilált hisztón 4 ellenanyaggal mindegyik kromatinpreparátumból kicsapható volt a *hsp70.1* promóter. A *foszfoenolpiruvát-karboxikináz* promóterhez egyik fehérje sem tud kötődni, és ennek megfelelően nem is tudtuk kimutatni egyik immunoprecipitátumban sem. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy BA kezelés hatására a HSF1 DNS-kötő képességre tesz szert, és a sejtekben kapcsolódik a *hsp70.1* promóterhez.

5.4.2. A HSF1 foszforilációs állapotának változása

Ahhoz, hogy a HSF1 fokozza a célgének transzkripcióját, a DNS-kötő képesség megszerzése mellett kovalens poszttranszlációs módosításokra is szükség van. Irodalmi adat, hogy stressz hatására átrendeződik a HSF1 foszforiláltsági mintázata, és a transzkripció faktor hiperfoszforilálttá válik (Sarge és mtsai, 1993). A foszforiláltsági állapotban bekövetkező változást Western blot technikával nyomon követhetjük, mivel a hiperfoszforiláció hatására a HSF1 mobilitása lelassul SDS poliakrilamid gélben. A következőkben azt vizsgáltuk, hogy BA kezelés alatt is megtörténik-e a HSF1 hiperfoszforilációja (28. ábra).



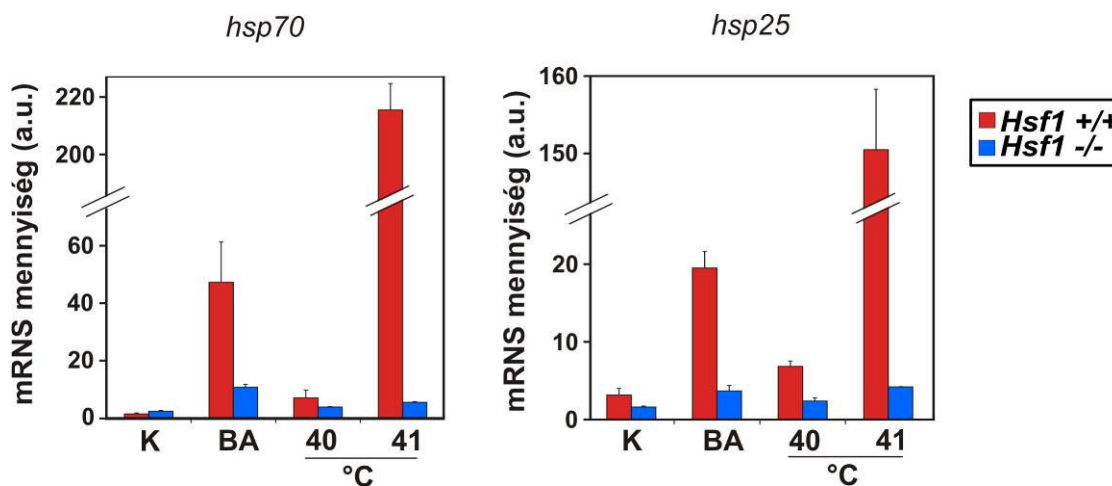
28. ábra A HSF1 foszforiláltsági állapota BA kezelés során is megváltozik. BA-lal (35, 40, 43, 46 mM) kezeltünk, 41 és 42 °C-on hősokkoltunk, vagy növesztési körülmények között hagytunk (K, kontroll) B16(F10) sejteket egy órán keresztül. Anti-HSF1 Western blot-tal vizsgáltuk a HSF1 mobilitásának változását a fenti kezelések hatására.

A kontroll mintákhoz képest a BA-kezelt mintákban lassult a HSF1 migrációja, és a hősokkolt mintákban is a várakozásoknak megfelelően csökkent a HSF1 mobilitása. Ez arra utal, hogy BA kezelés hatására éppúgy, mint hőstressz során, megváltozik a HSF1 foszforiláltsági állapota. Meglepő módon a kezelt mintákban számottevően nagyobb mennyiségű HSF1-et detektáltunk, mint a kontroll sejtlizátumokban. Irodalmi adatok alapján a HSF1 konstitutívan expresszálódik a sejtekben, és a mennyisége stresszhatások során sem változik. A kérdés, hogy az általunk használt B16(F10) sejtvonalban valóban megnő-e a HSF1 szintje, vagy a komplex poszttranszlációs módosulások befolyásolják a HSF1 detektálhatóságát (pl. az antitest affinitását), még nem tisztázott.

5.4.3. A HSF1 szabályozza a *hsp* gének indukcióját benzil-alkohol kezelés során

A fentiekben megmutattuk, hogy BA hatására is lejártszódik a HSF1 aktiváció többlépéses folyamata. Ahhoz azonban, hogy a HSF1 nélkülözhetetlen szerepét igazoljuk, HSF1 hiányában is tanulmányoznunk kellett a membránstressz hatását a *hsp* gének indukciójára. Ehhez HSF1 „knock-out” egérből származó *Hsf1*^{-/-} embrionális fibroblaszt sejteket (MEF)

(McMillan és mtsai, 1998) használtunk. Vad típusú *Hsf1*^{+/+} és *Hsf1*^{-/-} MEF sejteket kezeltünk BA-lal, és kvantitatív RT-PCR-al mértük a *hsp70* és *hsp25* mRNS-ek mennyiségét (29. ábra).



29. ábra HSF1 hiányában a BA sem indukálja a *hsp* gének expresszióját. *Hsf1*^{+/+} és *Hsf1*^{-/-} MEF sejteket kezeltünk 30 mM BA-lal (BA), ill. hőszokoltunk 40 és 41 °C-on egy órán keresztül, vagy növesztési körülmények között hagytuk azokat (K, kontroll). A kezeléseket követően kvantitatív RT-PCR-al meghatároztuk a *hsp70* (A), *hsp25* (B) mRNS-ek mennyiségét β -aktin belső kontrollhoz képest.

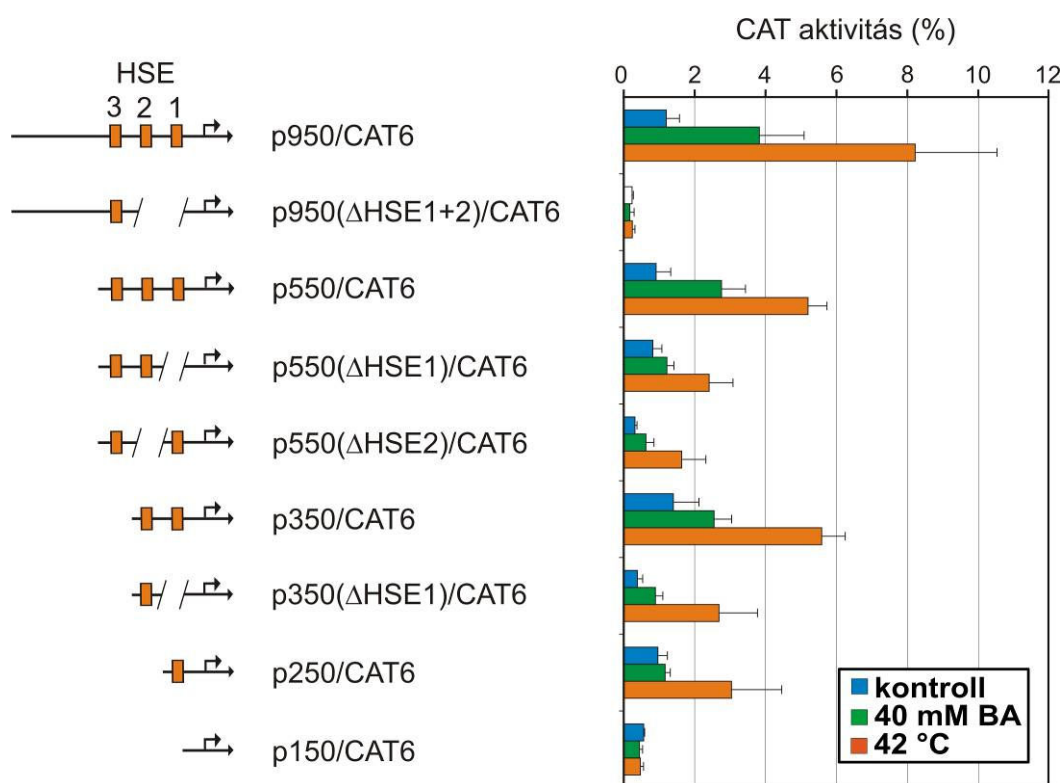
A MEF sejtek, a K562 sejtekhez hasonlóan, érzékenyebbek voltak a BA-ra, mint a B16(F10) sejtvonal. Emiatt a kísérlet során alacsonyabb BA koncentrációt használtunk. *HSF1*^{+/+} MEF sejtekben a 30 mM BA kezelés megnövelte a *hsp70* és a *hsp25* mRNS-ek szintjét. A vad típusú sejtekhez képest a *HSF1*^{-/-} MEF sejtekben nagymértékben visszaesett a *hsp70* és a *hsp25* indukciója mind BA, mind hőszokk hatására. Érdekes módon a *HSF1*^{-/-} sejtekben bár nagyon kis mértékben, de mRNS szint növekedést tapasztaltunk hő és BA hatására is. Ez arra utal, hogy a HSF1 mellett egyéb faktorok is befolyásolják a *hsp*-k expresszióját. Mindemellett adataink alátámasztják, hogy az izoterm membránperturbáció által kiváltott stresszválaszban elsődlegesen a HSF1 szabályozza a *hsp* gének indukcióját.

5.4.4. A *hsp70* transzkripció fokozásához a HSE-k szükségesek benzil-alkohol kezelés során

A stressz hatására aktivált HSF1 a célgén promóter régiójában található HSE-khez kapcsolódik. De vajon a jól jellemzett HSF1-HSE kölcsönhatáson kívül részt vesznek-e stresszor specifikus szabályzó elemek a *hsp* gének indukciójának szabályozásában?

Azonosítható-e például olyan promóter régió, amely szükséges a *hsp70* hőindukálhatóságához, de a BA hatásához nem?

A kérdés vizsgálatához Katarzyna Lisowska csoportjával együttműködve egy 9 tagú riporter plazmid sorozatot használtunk. A plazmidokban a patkány *hsp70.1* promóter különböző hosszúságú fragmentumai, és ezek HSE-ket érintő deléciós származékai szabályozzák a klóramfenikol-acetiltranszferáz (CAT) riporter gén kifejeződését (Fischer-Kierzkowska és mtsai, 2003). A plazmid sorozatot B16(F10) sejtekbe transzfektálva összehasonlítottuk, hogy miképpen befolyásolja a különböző promóter régiók eltávolítása a BA és a hőszokk indukáló hatását (30. ábra).



30. ábra A BA és a hőszokk hasonló promóter elemeken keresztül indukálja a *hsp70.1* gén kifejeződését. A CAT riporter plazmidok a patkány *hsp70.1* promóter különböző hosszúságú fragmentumait, és deléciós származékaikat tartalmazzák. A sematikus ábrán feltüntettük a 3 HSE (piros téglalap) helyzetét, és nyíllal jelöltük a transzkripció start pontját. A plazmidokkal tranziensen transzfektált B16(F10) sejteket 40 mM BA-lal kezeltük, 42 °C-on hőszokkoltuk, vagy növesztési körülmények között hagytuk (kontroll) egy órán keresztül. 16 órás nyugalmi fázist követően meghatároztuk a CAT riporter enzim aktivitását.

A patkány *hsp70.1* promóter régiójában három HSE található.

Leghosszabb vizsgált fragmentum:

A riporter plazmid sorozatban a leghosszabb promóter fragmentum 950 bp hosszúságú (p950/CAT6) és mind a három HSE-t tartalmazza. Mint az várható volt, a 950 bp hosszúságú promóter régió jelenlétében a riporter fehérje expressziója indukálódott BA kezelésre és hősokra. A BA kisebb mértékben emelte meg a riporter expresszióját, mint a 42 °C hősokk, alátámasztva a korábbi kvantitatív RT-PCR adatokat.

HSE-ket nem érintő deléció:

A p550/CAT6 plazmidban szintén mindhárom HSE jelen van, viszont távoli, HSE-eket nem tartalmazó szabályzó régió hiányzik belőle. A deléció csak kis mértékben érintette a BA és a hőstressz indukáló képességét.

HSE3 hiánya:

A rövidítés folytatása, amely a HSE3-t távolította el (p350/CAT6), nem okozott további csökkenést a promóter aktiváló képességében.

HSE1 vagy HSE2 hiánya:

A p550(Δ HSE1)/CAT6; p550(Δ HSE2)/CAT6 plazmidokban a HSE2 vagy a HSE1 hiányzik, de jelen van a HSE3. Ezek a deléciók nagymértékben csökkentették az indukció szintjét mindkét stresszor esetében.

Ha emellett még a HSE3 is el volt távolítva (p350(Δ HSE1)/CAT6; p250/CAT6) nem tapasztaltunk további jelentős csökkenést sem a BA, sem a hősokk aktiváló képességében.

HSE1 és HSE2 együttes hiánya:

A p950(Δ HSE1+2)/CAT6; p150/CAT6 plazmidokban található promóter fragmentum nem okozott indukciót BA- és hőkezelésre sem.

A különböző deléciók hasonló módon érintették a BA és a hőstressz indukáló képességét. A plazmid sorozatot használva tehát nem találtunk olyan deléciót, amely eltérő módon befolyásolta volna a BA és a hő *hsp70* indukáló képességét, ami arra utal, hogy hasonló promóter elemeken (elsődlegesen a HSE1 és HSE2-n) keresztül történik a *hsp70* indukciója mindkét stresszor hatására. A fentiek alapján azonban még nem zárhatjuk ki potenciális stresszor specifikus promóter elemek jelenlétét a *hsp* gének szabályzó régiójában, mivel ehhez szükséges lenne egy szisztematikus, nemcsak a HSE-ket érintő deléció sorozat hatásának összehasonlító vizsgálata.

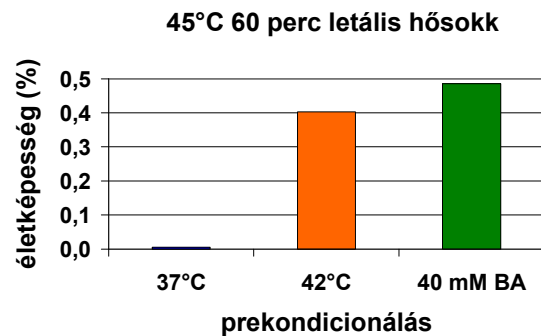
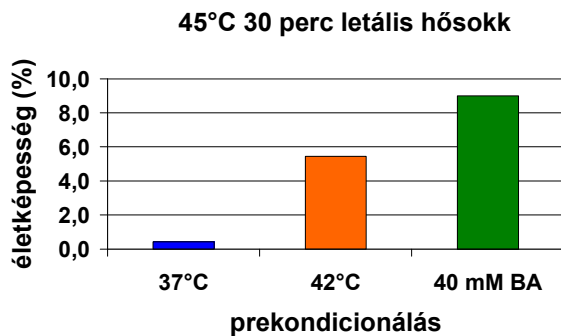
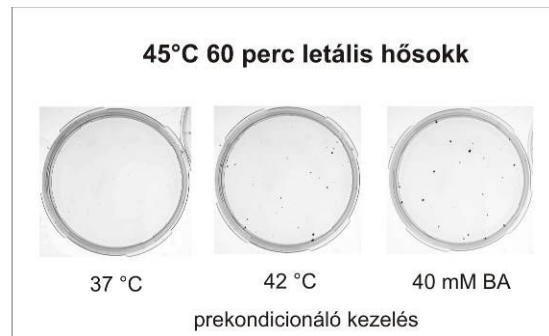
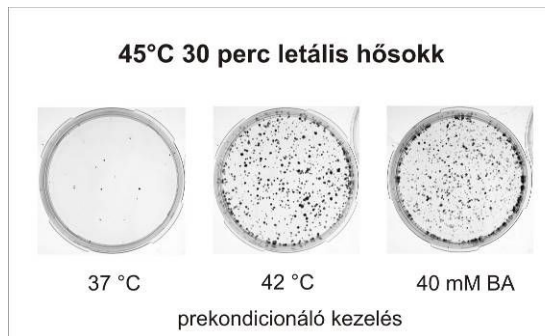
5.5. A TERMOTOLERANCIA KIALAKULÁSÁNAK TESZTELÉSE

Régi megfigyelés, hogy a stresszhatások pozitív következményekkel is járnak. Szubletális stresszt követően a sejtek időlegesen ellenállóbbakká válnak, és az erőteljesebb stresszhatásokkal is megbirkóznak. A stressztolerancia kifejlődése, és a Hsp-k megnövekedett mennyisége között szoros kapcsolatot mutattak ki (Li és Werb, 1982). A membrán-eredetű stresszválasz tanulmányozása során is alapvető kérdésként fogalmazódott meg, hogy a membránokat érintő stressz képes-e felkészíteni a sejteket egy ezt követő stresszhatás túlélésére. Vajon a BA kezelés által elindított folyamatok elvezetnek-e az ún. keresztolerancia, jelen esetben a letális hőstresszel szemben védő termotoleráns állapot kialakulásához?

A termotolerancia tesztelésére használt egyszerű módszer azon alapul, hogy az életképes sejtek kitapadnak a növesztési felszínre, majd kolóniát képeznek. A kísérlet során a sejteket előkezelik a szubletális, ún. prekondicionáló hatással, majd letális hősokkot alkalmaznak. A mi esetünkben a prekondicionálás BA-lal (40 mM), valamint összehasonlításképp 42 °C hősokkal történt. Az előkezelést egy 16 órás nyugalmi periódus követte. Ezután letális hőstressznek tettük ki a sejteket 45 °C-on 30, vagy 60 percig. Végül különböző hígításokban Petri-csészékbe osztottuk őket, és meghatároztuk, hogy a sejtek hány százaléka képes a kolóniaképzésre (31. ábra).

Prekondicionálás nélkül csak néhány sejt élte túl a 45 °C-os kezelést, így megbizonyosodtunk róla, hogy a 30 és 60 perces 45 °C-os hősokk valóban letális hatású. A BA és a 42 °C-os előkezelések legalább egy nagyságrenddel növelték az életképes sejtek számát. BA hatására a 30 perc letális hősokkot a sejtek megközelítőleg 9 %-a élte túl, a 60 perces hőstressz viszont már annyira erőteljesnek bizonyult, hogy csak kevesebb, mint 0,5 %-uk. Bár az előkezelések ez utóbbi esetben is jelentősen növelték a sejtek túlélőképességét.

Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a BA kezelést követő komplex válaszreakció hősokk nélkül, izoterm körülmények között is elvezetett a termotoleráns állapot kifejlődéséhez. Érdekes módon a 40 mM BA valamivel hatékonyabb prekondicionáló kezelésnek bizonyult, mint a 42 °C hősokk, annak ellenére, hogy a hőstressz nagyobb mértékben indukálja a Hsp fehérjék szintézisét, mint a BA. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a Hsp-k mellett egyéb adaptációs folyamatok is fontos szerepet játszhatnak a termotoleráns állapot kialakulásában.



31. ábra A termotolerancia kiváltható BA kezeléssel is. Egy óras 40 mM BA, ill. 42 °C hőszokk kezelésekkal prekondicionáltunk B16(F10) sejteket, vagy növesztési körülmények között hagytuk őket (37 °C). 16 órás nyugalmi periódust követően 45 °C-on 30, valamint 60 percig letális hőstressznek tettük ki őket, és összehasonlítottuk a prekondicionáló kezelések hatását a sejtek kolónia képző képességére. (A) Az életképes sejtek által létrehozott kolóniák. (B) A kolónia képző képesség grafikus ábrázolása. A letális hőszokkon át nem esett, nem prekondicionált (37 °C-on tartott) mintában 100 %-nak tekintettük az életképes sejtek számát, és ehhez viszonyítva határoztuk meg az életképes sejtek arányát a letális hőkezelést kapott mintákban.

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Munkám során a sejtmembránok stresszválaszban betöltött szerepét tanulmányoztam emlős sejttenyészeteken. Csoportunk korábbi eredményeiből kiindulva feltételeztük, hogy az emlős sejtmembrán, hasonlóan a prokarióta sejtek membránjához, nemcsak károsodik a stresszhatások során, hanem aktuális lipidösszetétele és fizikai állapota, annak modulációja egyben központi szereppel bír a stresszorok érzékelésében, és a stresszelhárító (adaptív) mechanizmusok működtetésében.

6.1. A membránperturbáció hősokk választ indukál

A fent vázolt „*membrán, mint stressz-szenzor*” hipotézis érvényességének vizsgálatához azt a prokarióták esetében már alkalmazott megközelítést használtuk, hogy a membránok fizikai állapotát egy membránba interkalálódó vegyülettel módosítottuk, majd követtük, hogy a membránperturbáció képes-e aktiválni a sejtek általános védekező rendszerét. A membrán rendezettségének módosítását benzil-alkohol (BA) kezeléssel értük el. A BA egy neutrális, amfifil tulajdonságú molekula, amelynek membránfluiditásra gyakorolt hatása jól jellemzett (Rege és mtsai, 2002; Konopásek és mtsai, 2004). Számos tanulmányban alkalmazták már a membránfluiditás és a membránfunkciók közötti kapcsolat vizsgálatára (Gordon és mtsai, 1980; Carrière és mtsai, 1986; Friedlander és mtsai, 1990; Bookstein és mtsai, 1997; Kitagawa és mtsai, 1995; Ghosh és mtsai, 2002). Ismert tény a hőmérséklet-emelés membránok rendezettségét csökkentő hatása (Revathi és mtsai, 1994; Dynlacht és Fox, 1992; Dynlacht és Fox, 1992; Van Blitterswijk és mtsai, 1981; Mejía és mtsai, 1995), így BA kezeléssel a hősokk membránfluidizáló hatása hőstressz nélkül, a növesztési hőmérsékleten is modellezhető. A BA kezelés és a hőmérséklet-emelés membránfluiditásra gyakorolt hatását DPH anizotropia méréssel kísérleteink során mi is megerősítettük.

A stresszválasz aktivációjának egyik következménye, hogy indukálódik a Hsp-k szintézise. Több emlős sejtvonal esetében (K562, B16(F10), MEF) is azt tapasztaltuk, hogy BA hatására megemelkedik a *hsp* gének expressziója. B16(F10) egér melanóma sejtvonalon részletesebben is jellemeztük a *hsp* expresszió változást öt *hsp* (*hsp70*, *hsp25*, *hsp90*, *hsp110*, *α B-krisztallin*) családtag esetében. Megállapítottuk, hogy a hősokkhoz hasonlóan, BA kezeléskor is megemelkedik az összes vizsgált *hsp* mRNS mennyisége, de az indukció kinetikáját, és a *hsp* családtagok expressziójának mértékét a stresszor jellege és „erőssége”

határozza meg. Eredményeink alapján egyértelműen bizonyítottuk, hogy a membránperturbáció egy még ismeretlen útvonalon keresztül, de elvezet a *hsp* gének fokozott kifejeződéséhez.

A BA hősokk választ indukáló képességét más organizmusokban — cianobaktériumban (Horváth és mtsai, 1998) *Escherichia coli*-ban (Shigapova és mtsai, 2005), élesztőben (Carratù és mtsai, 1996), és mohákban (Saidi és mtsai, 2005) – csoportunk és mások is bizonyították. Sőt, a BA kezelés chaperon indukáló hatása a gyakorlatban is felhasználható pl. *Escherichia coli*-ban fehérjék túltermeltetésekor. A BA kezelés ugyanis csökkentette a túltermelt fehérjék inszolubilis aggregátumokba történő felhalmozódását (de Marco és mtsai, 2005).

6.2. A stresszválasz indukciója a membránok perturbációjával nem a fokozott fehérje denaturáció következménye

A klasszikus stressz-szenzor modell értelmében a hősokk fehérjék indukcióját a denaturálódott, abnormális fehérjék felhalmozódása indítja el a sejtekben. A modell tehát a károsodott fehérjék megjelenését tekinti az elsődleges stresszérzékelőnek (Morimoto, 1998). Ezért a membrán-szenzor hipotézis igazolása szempontjából központi jelentőségű, hogy a BA kezelés fokozza-e a celluláris fehérjék denaturációját. A szentjánosbogár luciferáz, mint riporter enzim (Nguyen és mtsai, 1989) aktivitásának mérésekor azonban azt tapasztaltuk, hogy a hősokkal ellentétben BA hatására nem csökkent az enzim aktivitása. Ez arra utal, hogy a BA nem okoz jelentős mértékű fehérje denaturációt. Hasonló következtetéshez vezetett az extrém termoszenzitívusú homoszerin *transz*-szukciniláz szolubilitásának/aggregációjának vizsgálata *Escherichia coli*-ban BA kezelés alatt (Shigapova és mtsai, 2005). Tehát a membránba interkalálódó, membránfluidizáló BA kezelés olyan útvonalon keresztül váltja ki a Hsp-k szintézisének fokozását, ami nem jár együtt a celluláris fehérjék denaturációjával.

6.3. Membránszerkezeti változások a stresszválasz indukciója során

A BA mellett számos lipofil tulajdonságú membránaktív vegyületről leírták, hogy fokozzák a Hsp-k szintézisét emlős sejtekben. Ilyenek például az alifás alkoholok (metanoltól oktanolig), fenol, lidokain, paracetamol, rotenon. Azt tapasztalták, hogy a felsorolt molekulák hősokk válasz indukáló képességét a lipidoldékonyságuk mértéke határozza meg. Akkor idéznek elő Hsp választ, ha a vegyületek membránbeli koncentrációja elér egy adott, szűk

intervallumba eső értéket (Hahn és mtsai, 1985; Neuhaus-Steinmetz és mtsai, 1994; Neuhaus-Steinmetz és Rensing, 1997). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a membránok fizikai állapotában, szerkezetében bekövetkező változásokat egy bizonyos szintig tolerálják a sejtek. Azonban egy ponton túl a membránperturbáció és membránfunkciók esetleges károsodása már jelképzési folyamatokat indít el, amelyek szerepet játszhatnak a stresszválasz, és ezen belül a *hsp* génexpresszió beindításában.

6.3.1. A membránfluiditás növekedése nem elegendő a hősokk válasz elindításához

Vajon hogyan jellemezhetőek azok a membrán állapotváltozások, amelyek a stresszválasz indukciójának kezdeti szakaszában zajlanak? A stresszválaszt kiváltó membránaktív vegyületek, mint az általunk használt BA, valamint az alifás alkoholok, a lidokain, a szalicilát, amellet, hogy fokozzák a *hsp* gének kifejeződését (Ishihara és mtsai, 2003), a membránok fluiditását is növelik (Firestone és mtsai, 1994; Chung és mtsai, 2000; Fox és mtsai, 2006; Balasubramanian és mtsai, 1997). Kísérleteink során K562 sejteken azt tapasztaltuk, hogy a hősokk, a BA és a disszertációban nem tárgyalt heptanol, ha azonos mértékű Hsp70 fehérje szintézist idéznek elő, azonos mértékben növelik meg a membránok fluiditását is (Balogh és mtsai, 2005). A fenti megfigyelések arra utaltak, hogy legalábbis K562 sejteken a membránok rendezettségének kritikus csökkenése már elégséges jelként szolgál a Hsp fehérjék indukciójához.

A jelenség érvényességét más sejtvonalon, B16(F10) sejteken is megvizsgáltuk a következőképpen. Egy BA-lal szerkezetileg rokon vegyülettel (fenetil-alkohollal, PhA) (Jordi és mtsai, 1990) idéztünk elő ugyanakkora membránfluiditás növekedést, mint a *hsp* gének expresszióját indukáló BA-lal (40 mM), majd teszteltük, hogy a PhA is fokozza-e a *hsp* mRNS-ek szintézisét. Várakozásainkkal ellentétben a BA is csak a 42 °C hősokknál nagyobb fluidizációt okozó koncentrációban hozott létre *hsp* választ. A BA-lal izofluid dózisú PhA pedig egyáltalán nem indukálta a *hsp* gének kifejeződését. Eredményünk alapján arra következtettünk, hogy a membránperturbáció egyik eleme, a membránfluiditás növekedés, nem szükségszerűen jár együtt a Hsp válasz kialakulásával.

6.3.2. Hsp választ indukáló kezelések alatt a membrán mikrodomének átrendeződnek

A membránok jellegzetes sajátossága, hogy a membránalkotó komponensek nem homogénen, random módon oszlanak el, hanem a lipidek és a fehérjék között kialakuló specifikus kölcsönhatások révén dinamikus, folyamatosan újraszerveződő mikrodomének jönnek létre a membrán síkjában. A plazmamembrán mikrodoménjeinek fontos szerepet

tulajdonítanak a jelátviteli folyamatok szabályozásában, így felmerült a lehetőség, hogy a stresszválasz során is részt vehetnek a jelképzési/jelátviteli események elindításában (Vigh és mtsai, 2005).

Annak érdekében, hogy megértsük, hogy a fluiditás növekedés mellett milyen további állapot változások történnek, a membránok laterális mikrodomén szerveződésében bekövetkező átrendeződéseket is tanulmányoztuk. Egy *in vitro* kísérleti rendszerben (Björkqvist és mtsai, 2005) nyomon követtük, hogy a fluidizáló szerek jelenlétében hogyan változik a koleszterin gazdag, rendezett lipiddomének stabilitása. Azt tapasztaltuk, hogy a *hsp* gén indukcióját okozó BA képes a rendezett, koleszterin gazdag lipiddomének szerkezetét megbontani, de a PhA annak ellenére, hogy ugyanolyan mértékben megnöveli a membránok átlagos fluiditását, nem destabilizálja a rendezett lipiddoméneket. *In vivo* élő sejtekben is különbséget találtunk a két membránfluidizáló szer hatásában. A BA kezelés alatt jellegzetesen módosult a koleszterin gazdag, fPEG-chol jelölt (Sato és mtsai, 2004) mikrodomének méreteloszlása. A kis méretű domének száma lecsökkent, a nagyobb méretű domének aránya pedig megnőtt. Hasonló irányú változásokat tapasztaltunk hőstresszt követően is. A PhA kezelés viszont nem módosította ilyen irányba az fPEG-chol jelölt mikrodomének méreteloszlását. Eredményeink arra utalnak, hogy a hősokk fehérje expressziót indukáló kezelések (magas hőmérséklet, BA) hatására a plazmamembrán koleszterin gazdag mikrodoménjeinek szerveződése átalakul. Elképzelhető, hogy a kisebb méretű koleszterin gazdag mikrodomének fuzionálásával nagyobb mikrodomén platformok jönnek létre. Legújabb lipidomikai vizsgálatainkban a szfingomielin-ceramid átalakulást, a ceramid szint növekedést, ill. a ceramid raft-koaleszcenciát kiváltó hatását valószínűsítjük a jelenség hátterében (Balogh és mtsai 2009, kézirat). Még nem ismert, hogy a koleszterin gazdag mikrodomének szerveződése, a koleszterin homeosztázis átalakulása milyen szerepet játszik a stresszválasz folyamatában. De említést érdemel az a megfigyelés, hogy emlős sejtekben hősokk hatására egy koleszterin származék, koleszteril-glükózid, szintetizálódik. A koleszteril-glükózid pedig képes a HSF1 aktivációján keresztül fokozni a *hsp70* expresszióját (Kunimoto és mtsai, 2002). Így elképzelhető például, hogy a koleszterin gazdag mikrodomének szerkezetének megbomlása megváltoztatja a koleszterin hozzáférhetőségét, és elősegítheti a *hsp* gén expressziót befolyásoló koleszterin-származékok keletkezését. A további lehetséges mikrodomén-függő jelátviteli utakat alább, a 33. ábrán foglaljuk össze.

6.4. A membránoktól a *hsp* génekig vezető feltételezett jelátviteli útvonal

6.4.1. A Ca^{2+} szerepe, mint másodlagos hírvivő

A membránoktól a *hsp* génekig ívelő jelképzési és jelátviteli folyamat még nincs felderítve. A Ca^{2+} -ról viszont régóta ismert, hogy központi szerepet játszik a hősokk válasz folyamatában (Stevenson és mtsai, 1986). Számos irodalmi adat utal arra, hogy a Ca^{2+} koncentráció növekedése jelként szolgál a HSF1 aktivációjához (Mosser és mtsai, 1990; Price és Calderwood, 1991) és a hősokk fehérjék expressziójához (Kiang és mtsai, 1994; Kiang és mtsai, 1998; Kiang és mtsai, 1999). A hősokk mellett további stresszhatások, mint pl. a glutation depléció, a megnövekedett extracelluláris K^+ koncentráció, a prosztaglandin A_2 , a Hsp90 inhibitor geldanamycin alkalmazása, Ca^{2+} -függő módon fokozzák a *hsp70* kifejeződését (Chang és mtsai, 2006; Silomon és mtsai, 2007; Eickelberg és mtsai, 2001; Choi és mtsai, 1994). Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a BA kezelés is a Ca^{2+} szint növelésén keresztül indukálja a *hsp70* expresszióját.

A Ca^{2+} szint növekedés akár közvetlen következménye is lehet a membránok fizikai állapotában bekövetkező változásoknak. A membránok fizikai állapota ugyanis közismerten befolyásolja a membránfehérjék, ioncsatornák működését. A BA okozta membránfluidizációról kimutatták, hogy bizonyos ioncsatornák aktivitását gátolja (Elliott és Elliott, 1997; Haeseler és mtsai, 2000; Carrière és Le Grimellec, 1986; Bookstein és mtsai, 1997; Kitagawa és mtsai, 1995), még másokét pedig fokozza (Friedlander és mtsai, 1990; Daniell és Harris, 1989; Zhang és mtsai, 2000). A membránperturbáció membránfehérjékre gyakorolt hatásának egyik értelmezése szerint a membránba ékelődő amfilifil molekulák, mint a BA, átrendezik a membránban uralkodó laterális nyomásviszonyokat. A membránok felszínén, a lipidmolekulák fejcsoport régiójában érvényesülő laterális nyomóerő megnő, míg a belső, zsírsavdallánccokat tartalmazó régióban csökken a molekulák egymásra ható laterális nyomása. A nyomásviszonyok átalakulása a különböző ioncsatornák aktivitását eltérő módon befolyásolja attól függően, hogy milyen az adott csatorna szerkezete, és milyen konformációváltozást eredményező mozgások szükségesek a fehérje működéséhez (Cantor, 1997). A membrántenzió növekedése a mechanoszenzitív ioncsatornákat is aktiválja. Ezek az ioncsatornák hőre és illékony anesztetikumokra is reagálnak (Martinac, 2004). Az ioncsatornák körüli lipid-mikrokörnyezet meghatározó jelentőségét igazolták egy hőmérséklet érzékeny kation csatorna, a hidegérzékelő neuronokban előforduló TRPM8 esetében. Kimutatták, hogy a fehérje membrán mikrodoménekbe ágyazott, és hőmérséklet-függő

működését a membránon belüli lokalizációja, raft-asszociációja alapvetően meghatározza (Morenilla-Palao és mtsai, 2009).

6.4.2. Másodlagos lipid hírvivő molekulák szerepe

A Ca^{2+} szintet közvetett módon is befolyásolják membránfüggő folyamatok. A foszfolipáz C (PLC) enzim aktivációjának egyik következménye az intracelluláris Ca^{2+} szint növekedés, mivel az enzim által felszabadított inozitol-trifoszfát hatására az intracelluláris raktárakból Ca^{2+} áramlik a citoplazmába. Hősokk választ indukáló kezelésekről már leírták, hogy aktiválják a PLC-t (Calderwood és Stevenson, 1993; Calderwood SK és mtsai, 1988). Csoportunkban végzett lipidomikai vizsgálatok kimutatták, hogy BA kezelés és hőstressz során jelentős mértékben csökken az inozitol lipidek mennyisége. Az inozitol lipidek, különösen az arachidonsavat tartalmazó foszfatidil-inozitol fogyása a fokozott PLC aktivitásnak tulajdonítható. BA, ill.hő hatására tehát aktiválódik a PLC, ami hozzájárulhat a Ca^{2+} szint növekedéshez (Balogh és mtsai, 2009, kézirat). Meg kívánjuk jegyezni, hogy a PLC aktivitás hatására az inozitol-trifoszfát mellett keletkező diacilglicerol pedig protein kináz C aktiváción keresztül képes modulálni a hősokk választ (Holmberg és mtsai, 1998). Ezen felül a diacilglicerol lipáz, ill. monoacilglicerol lipáz útvonalon arachidonsav szabadul fel. Az arachidonsav hősokk válaszban betöltött szerepét, és képződésének másik útvonalát az alábbiakban ismertetem.

A PLC mellett a hősokk választ indukáló kezelések alatt egy másik foszfolipáz, a foszfolipáz A_2 is aktiválódik (Calderwood és Stevenson, 1993). A PLA_2 enzim szabad zsírsavvá és lizofoszfolipiddé hidrolizálja a foszfolipideket, aktivitásának eredményeképp (többek között) arachidonsav szabadul fel a sejtekben. Az irodalomból ismert, hogy a hősokk hatására felszabaduló arachidonsav (Calderwood és mtsai, 1989) a HSF1-en keresztül a *hsp* gének transzkripcióját indukálja (Jurivich és mtsai, 1994). A PLA_2 aktivitását a membránok lipidösszetétele, koleszterin, szfingomielin, ceramid tartalma, a lipidszubsztrát hozzáférhetősége is befolyásolja (Klapisz és mtsai, 2000), így a membránperturbáció okozta szerkezeti változások is módosíthatják az enzim aktivitását. A csoportunkban jelenleg is folyó kísérletek azt mutatják, hogy BA kezelés alatt megemelkedik a szabad arachidonsav szint a sejtekben, ami szerepet játszhat a BA hatására megfigyelhető *hsp* indukcióban (Balogh és mtsai, 2009, kézirat).

6.4.3. A membránstressz a HSF1-en keresztül indukálja a *hsp* géneket

A *hsp* gének kifejeződését közvetlenül a HSF1 transzkripció faktor szabályozza. Eredményeink alapján a membránperturbáló BA stressz hatására elinduló jelképzési folyamatok végül elvezetnek a HSF1 aktivációjáig: BA hatására a HSF1 DNS-kötésre alkalmas trimerré alakul, *in vivo* a *hsp70* promóterhez kapcsolódik, és a transzaktiváló képesség megszerzéséhez szükséges poszttranszlációs módosítások, a hiperfoszforiláció is megtörténik. HSF1-et nem tartalmazó, HSF1^{-/-} sejtek vizsgálatával azt is bizonyítottuk, hogy a HSF1 aktivációja szükséges a *hsp* gének transzkripciójának fokozásához membránstressz alatt is. HSF1 hiányában a hősokk (McMillan és mtsai, 1998) és a BA kezelés mellett pl. a proteaszóma és Hsp90 inhibitorok sem váltanak ki Hsp választ (Zaarur és mtsai, 2006). A *hsp70* promóter különböző szakaszainak vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy ugyanazokra a promóterelemekre (a HSE1-t és a HSE2-t tartalmazó régiókra) van szükség a *hsp70* BA és hősokk hatására bekövetkező indukciójához.

Mivel környezeti stresszhatások, patológiás és fiziológias állapotok széles köréről leírták, hogy a *hsp* gének expresszió növekedését a HSF1 szabályozza, így eredményünk, hogy a membrán-eredetű stressz is a HSF1 aktivációján keresztül indukálja a *hsp* gének kifejeződését jól illeszkedik a korábbi megfigyelésekhez. Adataink alátámasztják azt az elképzelést (Morimoto, 1998), hogy a stresszorok bár eltérő módon, különböző mechanizmusokon keresztül károsítják a sejteket, más szóval eltérő célponton keresztül fejtik ki hatásukat, de a stresszorok által elindított jelátviteli útvonalak közös pontokba futnak össze. Az egyik ilyen központi csomópontot a HSF1 jelentheti, amely a *hsp* gének transzkripciójának fokozásával elősegíti a sejtek túlélését.

6.5. Termotoleráns állapot kialakulása membránstressz hatására

A stresszhatások a sejtekben egy komplex válaszreakciót indítanak el. Ezek egyrészt biztosítják a károsodott makromolekuláris rendszerek helyreállítását, másrészt olyan kompenzációs és adaptáció folyamatok zajlanak le, amelyek hozzájárulnak a sejtek túléléséhez a stresszor tartós vagy ismételt fennállása esetén is. Erre példa a termotoleráns állapot kialakulása (Gerner és mtsai, 1976). Sőt, úgynevezett kereszttolerancia is kialakulhat, amikor a prekondicionáló stressz hatására egy más jellegű stresszel szemben is rezisztenssé válnak a sejtek (Lee és Hahn, 1988). Eredményeink alapján a BA kezelés ellenállóbbá teszi a sejteket egy egyébként letális hősokkal szemben, tehát a BA hatására olyan változások indultak el a sejtekben, amelyek elvezettek a termotoleráns állapot kialakulásához. Régóta

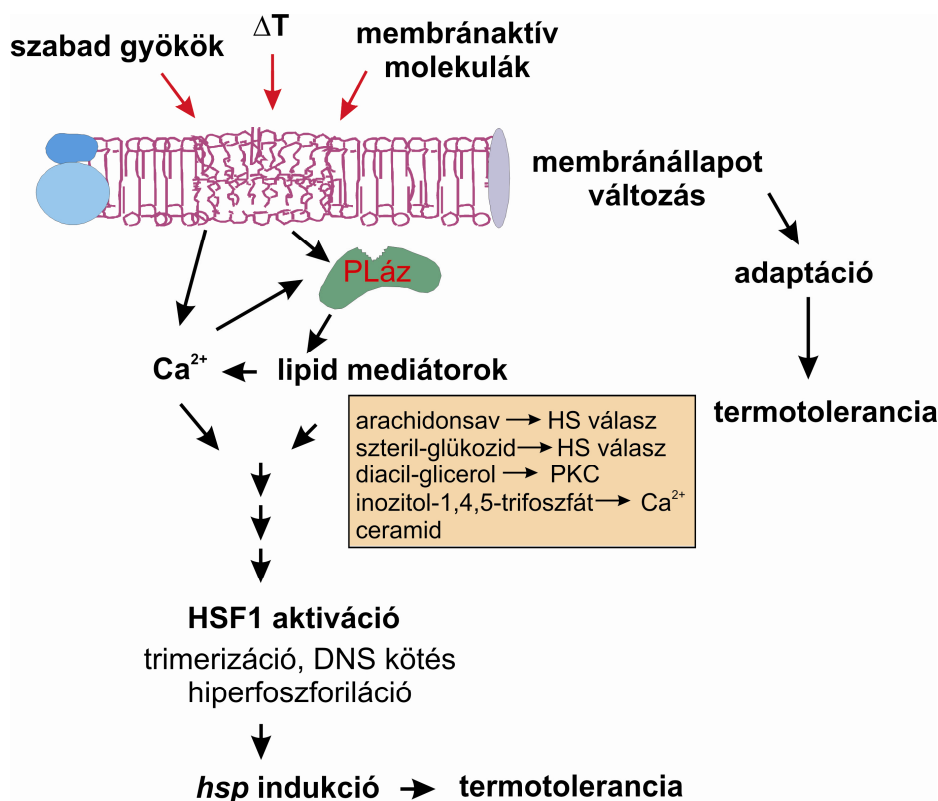
ismert az összefüggés a termotoleráns állapot kialakulása és a hősokk fehérjék megnövekedett mennyisége között (Li és Werb, 1982). A Hsp-k szintézisét indukáló stresszorok (pl. arzenit, etanol, diamin, prostaglandin A₁) hatására kialakul az erőteljes hőstressz elleni védelem a sejtekben (Lee és Hahn, 1988; Amici és mtsai, 1993). Már önmagában a Hsp-k túltermelésével (pl. Hsp70, Hsp27, Hsp110, α B-krisztallin) is megnövelhető a sejtek hővel szembeni ellenállóképessége (Wissing és Jäätelä, 1996; Blackburn és mtsai, 1996; Oh és mtsai, 1997). A Hsp fehérjék több szempontból is hozzájárulnak a sejtek stressztűrő képességének növeléséhez. Mint molekuláris chaperonok gátolják a fehérjék aggregációját, segítik a denaturálódott, rosszul feltekeredett fehérjék újratekeredését. Ezen felül az ubiquitinfüggő fehérjebontó útvonallal együttműködve részt vesznek a károsodott, már nem javítható fehérjék lebontásának szabályozásában. Ráadásul a Hsp-k számos ponton képesek gátolni az apoptózis folyamatát, így a sejtek sorsát a sejthalál helyett a túlélés irányába mozdítják el (Kim és mtsai, 2006). Mivel a BA kezelés hatására megemelkedik több Hsp fehérje mennyisége, a BA által előidézett termotolerancia jól értelmezhető a Hsp indukcióval.

Azonban kísérletünk során azt is tapasztaltuk, hogy BA előkezelés hatására a sejteknek valamivel nagyobb hányada vált védetté, mint a 42 °C-os kezelést követően, annak ellenére, hogy a BA kisebb mértékű Hsp szintézist indukál, mint a 42 °C-os hősokk. Ez viszont arra utal, hogy a Hsp-k szintje mellett egyéb adaptációs folyamatok is közreműködnek a ellenállóképesség kialakulásában. E mellett szól az a publikáció is, amelyben jellemezték négy különböző stresszor (hősokk, arzenit, etanol, diamin) hatására kialakuló termotoleráns állapotokat (Kampinga és mtsai, 1995). Miközben a prekondicionáló kezelésekkel közel azonos mértékű termotoleranciát indukáltak, a Hsp-k mennyisége eltérő volt a túlélésre képes sejtekben. Különbséget tapasztaltak a membrán- és sejtmagi fehérjék denaturációjának, aggregációjának mértékében is. Több olyan példa is található az irodalomban, amikor a Hsp fehérjék felhalmozódása nélkül is kialakul a hővel szembeni ellenállóképesség (Fisher és mtsai, 1992; Bader és mtsai, 1992; Borrelli és mtsai, 1996; Hershko és mtsai, 2003; Shigapova és mtsai, 2005). Csirke sejtekben azt is kimutatták, hogy a csirke HSF1, annak ellenére, hogy nem képes a *hsp* gének transzkripciójának robusztus fokozására, mégis védelmet biztosít a közepes erősségű hősokk-kal szemben. Valószínűsíthető, hogy ez a *hsp*-ken kívüli célgének aktiválásával valósul meg (Inouye és mtsai, 2003). Genom szintű génexpressziós vizsgálatok rávilágítottak a stresszválasz komplex természetére (Trinklein és mtsai, 2004). Bár a hőindukálható gének nagy részénél HSF1 kötődést, ill. HSE promóter elemeket találtak, de a HSF1 nem minden HSE-szerű szekvenciához kapcsolódik, sőt a HSF1

kötődése nem jelentett minden esetben transzkripció aktiválást. Ezen felül azonosítottak a HSF1-től függetlenül indukálódó géneket is.

A stressztolerancia, ill. termotolerancia kifejlődésének mechanizmusa máig nem pontosan tisztázott, de a fenti adatok megerősítik azt a korai feltételezést, hogy kialakulása különböző útvonalakon keresztül is megvalósulhat (Laszlo, 1988). A Hsp-k termelődésének indukciója mellett, amely önmagában citoprotektív hatású, egyéb alternatív útvonalak is hozzájárulnak a megvalósulásához. Számos korai munka foglalkozott a membránok és a hőérzékenység kapcsolatának tanulmányozásával, és ezzel összefüggésben a magas hőmérséklet hatására a membránban bekövetkező változások meghatározásával. Az eredmények ellentmondásosak voltak, de arra utalnak, hogy a membránok összetételének (koleszterol tartalom, lipid osztályok aránya, zsírsavak minősége) és fizikai állapotának kompenzációs változásai, bár önmagukban nem feltétlenül elegendők, de hozzájárulnak a sejtek hőérzékenységének kialakításához (Yatvin és Cramp, 1993). Ezen felül az irodalmi áttekintésben ismertetett minimális stresszfehérje készlet további tagjai (DNS javítás, fehérje lebontás, anyagcsere utak szabályozása) is részt vesznek a Hsp-k mellett a stressz elleni védekezésben az élőlények minden csoportjában (Kültz, 2005).

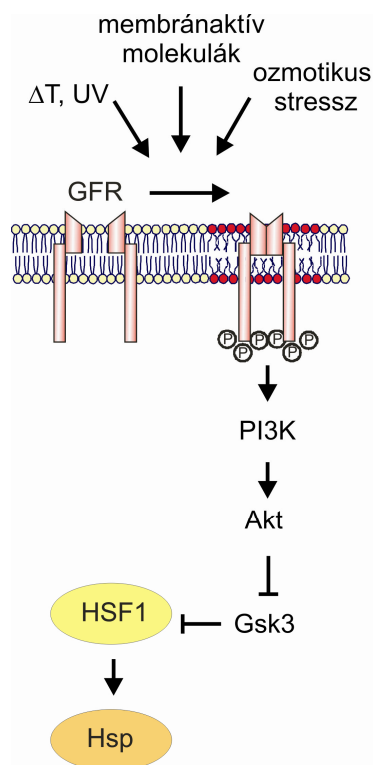
Eredményeinket összegezve felvázolható egy szignalizációs útvonal, amelyen keresztül a membránok állapotában bekövetkező változások elvezetnek a *hsp* gének indukciójáig, és a termotoleráns állapot kialakulásáig (32. ábra).



32. ábra A membránoktól a *hsp* génekig vezető jelátviteli útvonal. A membránok fizikai állapotában bekövetkező változások hatására megemelkedik a sejtekben a Ca²⁺ koncentráció, valamint foszfolipáz enzimek aktiválódnak, ami lipid hírvivő molekulák felszabadulásához vezet. Ezek a változások még nem felderített módon a HSF1 aktivációját, és *hsp*-k indukcióját eredményezik. A Hsp fehérjék megnövekedett mennyisége, valamint a membránokban zajló adaptációs folyamatok termotolerancia kifejlődéséhez vezetnek.

A fent vázolt útvonal mellett, amely elsősorban lipid hírvivő molekulák képződésével kapcsolja össze a hőshock válasz indukcióját, érvényesülhet egy másik mechanizmus is. A BA ugyanis módosítja a membránok mikrodomén szerveződését, ami összefüggésbe hozható a *hsp* gének expresszió növekedésével a növekedési faktor receptoroktól induló szignalizáción keresztül (Vigh és mtsai, 2007). Egy membránperturbáló molekuláról, a dezoxi-kólsavról kimutatták, hogy a membránba ékelődve megváltoztatja a koleszterin tartalmú mikrodomének szerveződését, miközben növekedési faktor receptor (GFR) ligandfüggetlen aktivációját is kiváltja (Jean-Louis és mtsai, 2006). GFR-ek ligandfüggetlen aktivációját stresszhatások (hőshock, UV-, ozmotikus stressz) során is leírták (Lin és mtsai, 1997; Rosette és Karin, 1996). A GFR jelátviteli útvonalról pedig a heregulin β 1 ligand – ErbB receptor esetében igazolták, hogy a PI3K (foszfatidil-inozitol-3-kináz), Akt, Gsk3 (glikogén-szintáz-kináz-3), HSF1 részvevőkön keresztül növeli a Hsp70, a Hsp90 és a Hsp60 fehérjék szintjét (Khaleque és mtsai, 2005; Vigh és mtsai, 2007). Így a GFR szignalizáció képviselhet egy mikrodomén-

függő mechanizmust, amelyen keresztül a membránperturbáló BA indukálja a *hsp* gének expresszióját (33. ábra).



33. ábra A membránoktól a *hsp* génekig vezető mikrodomén-függő jelátviteli útvonal. A GFR dimerizáció és autofoszforyláció hatására PI3K-függő módon aktiválódik az Akt kináz. Az Akt a Gsk3-at foszforylálva gátolja annak működését. Mivel a Gsk3 a Ser303 foszforylációján keresztül hozzájárul a HSF1 represszált állapotának fenntartásáért, így a HSF1 fel tud szabadulni a gátló hatás alól, és indukálja a *hsp* gének kifejeződését (Vigh és mtsai, 2007, Trends Biochem Sci.).

Eredményeink alapján a fehérjék, a DNS és a redox egyensúly mellett a membránok is részt vesznek emlős sejtekben a stresszválasz folyamatában. A BA által okozott membránstressz érzékelésének pontos mechanizmusa még nem tisztázott, de a membránok fluidizációja mellett a koleszterin gazdag mikrodomének átrendeződése is szükséges a stressz-szignál kialakulásához. A jelet lipid mediátorok és receptor aktivált kináz kaszkádok továbbíthatják a sejtmag felé. Az intracelluláris Ca^{2+} szint növekedés és a HSF1 aktiváció a membránoktól a *hsp* génekig ívelő jelátviteli útvonalnak már azonosított elemei. A membránperturbáció hatására bekövetkező komplex válaszreakció, melynek eleme a Hsp-k fokozott szintézise, növeli a sejtek ellenállóképességét a magas hőmérséklettel szemben, tehát a membránok szerkezetét érintő hatások is bekapcsolják a sejtek általános védekező rendszerét.

HIVATKOZÁSOK

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(1):586-592.

Ahn SG, Thiele DJ. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev.* (2003) 17(4):516-28.

Akçetin Z, Pregla R, Darmer D, Heynemann H, Haerting J, Brömme HJ, Holtz J. Differential expression of heat shock proteins 70-1 and 70-2 mRNA after ischemia-reperfusion injury of rat kidney. *Urol Res.* (1999) 27(5):306-11.

Amici C, Palamara AT, Santoro MG. Induction of thermotolerance by prostaglandin A in human cells. *Exp Cell Res.* (1993) 207(2):230-4.

Ananthan J, Goldberg AL, Voellmy R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science.* (1986) 232(4749):522-4.

Anckar J, Sistonen L. Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways. *Adv Exp Med Biol.* (2007) 594:78-88.

Arrigo AP, Simon S, Gibert B, Kretz-Remy C, Nivon M, Czekalla A, Guillet D, Moulin M, Diaz-Latoud C, Vicart P. Hsp27 (HspB1) and alphaB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Lett.* (2007) 581(19):3665-74.

Bader SB, Price BD, Mannheim-Rodman LA, Calderwood SK. Inhibition of heat shock gene expression does not block the development of thermotolerance. *J Cell Physiol.* (1992) 151(1):56-62.

Balasubramanian SV, Straubinger RM, Morris ME. Salicylic acid induces changes in the physical properties of model and native kidney membranes. *J Pharm Sci.* (1997) 86(2):199-204.

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(6):1151-9.

Balogh G, Horváth I, Nagy E, Hoyk Z, Benkő S, Bensaude O, Vigh L. The hyperfluidization of mammalian cell membranes acts as a signal to initiate the heat shock protein response. *FEBS J.* (2005) 272:6077-86.

Balogi Z, Török Z, Balogh G, Jósvay K, Shigapova N, Vierling E, Vigh L, Horváth I. "Heat shock lipid" in cyanobacteria during heat/light-acclimation. *Arch Biochem Biophys.* (2005) 436(2):346-54.

Bellmann K, Jäättelä M, Wissing D, Burkart V., Kolb H. Heat shock protein Hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett.* (1996) 391:185–188.

Björkqvist YJ, Nyholm TK, Slotte JP, Ramstedt B. Domain formation and stability in complex lipid bilayers as reported by cholestatrienol. *Biophys J.* (2005) 88(6):4054-63.

Blackburn R, Galoforo S, Berns CM, Ireland M, Cho JM, Corry PM, Lee YJ. Thermal response in murine L929 cells lacking alpha B-crystallin expression and alpha B-crystallin expressing L929 transfectants. *Mol Cell Biochem.* (1996) 155(1):51-60.

Bookstein C, Musch MW, Dudeja PK, McSwine RL, Xie Y, Brasitus TA, Rao MC, Chang EB. Inverse relationship between membrane lipid fluidity and activity of Na⁺/H⁺ exchangers, NHE1 and NHE3, in transfected fibroblasts. *J Membr Biol.* (1997) 160(3):183-92.

Borrelli MJ, Stafford DM, Karczewski LA, Rausch CM, Lee YJ, Corry PM. Thermotolerance expression in mitotic CHO cells without increased translation of heat shock proteins. *J Cell Physiol.* (1996) 169(3):420-8.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* (1976) 72:248-54.

Brown DA, London E. Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem Biophys Res Commun.* (1997) 240(1):1-7.

Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* (1992) 68(3):533-44.

Bruce JL, Price BD, Coleman CN, Calderwood SK. Oxidative injury rapidly activates the heat shock transcription factor but fails to increase levels of heat shock proteins. *Cancer Res.* (1993) 53(1):12-15.

Calderwood SK, Bornstein B, Farnum EK, Stevenson MA. Heat shock stimulates the release of arachidonic acid and the synthesis of prostaglandins and leukotriene B₄ in mammalian cells. *J Cell Physiol.* (1989) 141(2):325-33.

Calderwood SK, Stevenson MA, Hahn GM. Effects of heat on cell calcium and inositol lipid metabolism. *Radiat Res.* (1988) 113(3):414-25.

Calderwood SK, Stevenson MA. Inducers of the heat shock response stimulate phospholipase C and phospholipase A₂ activity in mammalian cells. *J Cell Physiol.* (1993) 155(2):248-56.

Cantor RS. The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia. *Biochemistry.* (1997) 36(9):2339-44.

Carratù L, Franceschelli S, Pardini CL, Kobayashi GS, Horvath I, Vigh L, Maresca B. Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1996) 93(9):3870-5.

Carrière B, Le Grimellec C. Effects of benzyl alcohol on enzyme activities and D-glucose transport in kidney brush-border membranes. *Biochim Biophys Acta*. **(1986)** 857(2):131-8.

Chang YS, Lee LC, Sun FC, Chao CC, Fu HW, Lai YK. Involvement of calcium in the differential induction of heat shock protein 70 by heat shock protein 90 inhibitors, geldanamycin and radicicol, in human non-small cell lung cancer H460 cells. *J Cell Biochem*. **(2006)** 97(1):156-65.

Choi AM, Tucker RW, Carlson SG, Weigand G, Holbrook NJ. Calcium mediates expression of stress-response genes in prostaglandin A2-induced growth arrest. *FASEB J*. **(1994)** 8(13):1048-54

Chong KY, Lai CC, Lille S, Chang C, Su CY. Stable overexpression of the constitutive form of heat shock protein 70 confers oxidative protection. *J Mol Cell Cardiol*. **(1998)** 30:599–608.

Chu B, Zhong R, Soncin F, Stevenson MA, Calderwood SK. Transcriptional activity of heat shock factor 1 at 37 degrees C is repressed through phosphorylation on two distinct serine residues by glycogen synthase kinase 3 and protein kinases Calpha and Czeta. *J Biol Chem*. **(1998)** 273(29):18640-6.

Chung IK, Kim DG, Chung YZ, Kim BS, Choi CH, Cho GJ, Jang HO, Yun I. Effects of Local Anesthetics on the Rate of Rotational Mobility of Phospholipid Liposomes. *J Biochem Mol Biol*. **(2000)** 33(3):279-84.

Clerc SG, Thompson TE. Permeability of dimyristoyl phosphatidylcholine/dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer membranes with coexisting gel and liquid-crystalline phases. *Biophys J*. **(1995)** 68(6):2333-41.

Cooper LF, Uoshima K, Guo Z. Transcriptional regulation involving the intronic heat shock element of the rat hsp27 gene. *Biochim Biophys Acta*. **(2000)** 1490(3):348-54.

Cotto JJ, Kline M, Morimoto RI. Activation of heat shock factor 1 DNA binding precedes stress-induced serine phosphorylation. Evidence for a multistep pathway of regulation. *J Biol Chem*. **(1996)** 271(7):3355-8.

Cress AE, Culver PS, Moon TE, Gerner EW. Correlation between amounts of cellular membrane components and sensitivity to hyperthermia in a variety of mammalian cell lines in culture. *Cancer Res*. **(1982)** 42(5):1716-21.

Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther*. **(1998)** 79(2):129-68.

Daniell LC, Harris RA. Effect of anesthetics on calcium stores and membrane order of brain microsomes. *Mol Pharmacol*. **(1989)** 36(3):471-7.

Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* **(2007)** 581(19):3702-10.

de Marco A, Vigh L, Diamant S, Goloubinoff P. Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in *Escherichia coli* by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones. *Cell Stress Chaperones.* **(2005)** 10(4):329-3.

Devaux PF, Morris R. Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic.* **(2004)** 5(4):241-6.

Dragovic Z, Broadley SA, Shomura Y, Bracher A, Hartl FU. Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *EMBO J.* **(2006)** 25(11):2519-28.

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

Dynlacht JR, Fox MH. Effects of hyperthermia and membrane-active compounds or low pH on the membrane fluidity of Chinese hamster ovary cells. *Int J Hyperthermia.* **(1992)** 8(3):351-62.

Dynlacht JR, Fox MH. The effect of 45 degrees C hyperthermia on the membrane fluidity of cells of several lines. *Radiat Res.* **(1992)** 130(1):55-60.

Easton DP, Kaneko Y, Subjeck JR. The hsp110 and Grp1 70 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress Chaperones.* **(2000)** 5(4):276-90.

Eddidin M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **(2003)** 4(5):414-8.

Eickelberg O, Geibel J, Seebach F, Giebisch G, Kashgarian M. K(+)-induced HSP-72 expression is mediated via rapid Ca(2+) influx in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* **(2001)** 281(2):F280-7.

Elliott AA, Elliott JR. Voltage-dependent inhibition of RCK1 K⁺ channels by phenol, p-cresol, and benzyl alcohol. *Mol Pharmacol.* **(1997)** 51(3):475-83.

Firestone LL, Alifimoff JK, Miller KW. Does general anesthetic-induced desensitization of the Torpedo acetylcholine receptor correlate with lipid disordering? *Mol Pharmacol.* **(1994)** 46(3):508-15.

Fisher B, Kraft P, Hahn GM, Anderson RL. Thermotolerance in the absence of induced heat shock proteins in a murine lymphoma. *Cancer Res.* **(1992)** 52(10):2854-61.

Fiszer-Kierzkowska A, Wysocka A, Jarzab M, Lisowska K, Krawczyk Z. Structure of gene flanking regions and functional analysis of sequences upstream of the rat hsp70.1 stress gene. *Biochim Biophys Acta.* **(2003)** 1625(1):77-87.

Fox CB, Horton RA, Harris JM. Detection of drug-membrane interactions in individual phospholipid vesicles by confocal Raman microscopy. *Anal Chem.* **(2006)** 78(14):4918-24.

Friedlander G, Le Grimellec C, Amiel C. Increase in membrane fluidity modulates sodium-coupled uptakes and cyclic AMP synthesis by renal proximal tubular cells in primary culture. *Biochim Biophys Acta.* **(1990)** 1022(1):1-7.

Friedrich H, Walter L, Günther E. Analysis of the 5'-flanking regions of the MHC-linked Hsp70-2 and Hsp70-3 genes of the rat. *Biochim Biophys Acta.* **(1998)** 1395(1):57-61.

Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle.* **(2006)** 5(22):2592-601.

Gaus K, Gratton E, Kable EP, Jones AS, Gelissen I, Kritharides L, Jessup W. Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA.* **(2003)** 100(26):15554-9.

Gaus K, Zech T, Harder T. Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy. *Mol Membr Biol.* **(2006)** 23(1):41-8.

Gennis RB. Biomembranes: Molecular structure and function. in: Cantor, C.R. (Ed.), *Springer Advanced Text in Chemistry.* **(1989)** Springer-Verlag N.Y.

Gerner EW, Boone R, Connor WG, Hicks JA, Boone ML. A transient thermotolerant survival response produced by single thermal doses in HeLa cells. *Cancer Res.* **(1976)** 36(3):1035-40.

Ghosh PK, Vasanji A, Murugesan G, Eppell SJ, Graham LM, Fox PL. Membrane microviscosity regulates endothelial cell motility. *Nat Cell Biol.* **(2002)** 4(11):894-900.

Gordon LM, Sauerheber RD, Esgate JA, Dipple I, Marchmont RJ, and Houslay MD. The Increase in Bilayer Fluidity of Rat Liver Plasma Membranes Achieved by the Local Anesthetic Benzyl Alcohol Affects the Activity of Intrinsic Membrane Enzymes *J. Biol. Chem.* **(1980)** 255(10): 4519-27.

Gossiau A, Ruoff P, Mohsenzadeh S, Hobohm U, Rensing L. Heat shock and oxidative stress-induced exposure of hydrophobic protein domains as common signal in the induction of hsp68. *J Biol Chem.* **(2001)** 276(3):1814-21.

Gounaris K, Brain AR, Quinn PJ, Williams WP. Structural and functional changes associated with heat-induced phase-separations of non-bilayer lipids in chloroplast thylakoid membranes. *FEBS Letters.* **(1983)** 153(1):47-52.

Gounaris K, Brain AR, Quinn PJ, Williams WP. Structural reorganisation of chloroplast thylakoid membranes in response to heat-stress, *Biochim Biophys Acta.* **(1984)** 766:198-208.

Guettouche T, Boellmann F, Lane WS, Voellmy R. Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem.* **(2005)** 6:4.

Haeseler G, Mamarvar M, Bufler J, Dengler R, Hecker H, Aronson JK, Piepenbrock S, Leuwer M. Voltage-dependent blockade of normal and mutant muscle sodium channels by benzylalcohol. *Br J Pharmacol.* **(2000)** 130(6):1321-30.

Hahn GM, Shiu EC, West B, Goldstein L, Li GC. Mechanistic implications of the induction of thermotolerance in Chinese hamster cells by organic solvents. *Cancer Res.* **(1985)** 45(9):4138-43.

Han SI, Oh SY, Woo SH, Kim KH, Kim JH, Kim HD, Kang HS. Implication of a small GTPase Rac1 in the activation of c-Jun N-terminal kinase and heat shock factor in response to heat shock. *J Biol Chem.* **(2001)** 276(3):1889-95.

Harder T, Scheiffele P, Verkade P, Simons K. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol.* **(1998)** 141(4):929-42.

Hargitai J, Lewis H, Boros I, Rácz T, Fiser A, Kurucz I, Benjamin I, Vigh L, Péntes Z, Csermely P, Latchman DS. Bimocmolol, a heat shock protein co-inducer, acts by the prolonged activation of heat shock factor-1. *Biochem Biophys Res Commun.* **(2003)** 307(3):689-95.

Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* **(1996)** 381(6583):571-9.

Hatayama T, Yamagishi N, Minobe E, Sakai K. Role of hsp105 in protection against stress-induced apoptosis in neuronal PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **(2001)** 288(3):528-34.

Hershko DD, Robb BW, Luo GJ, Paxton JH, Hasselgren PO. Interleukin-6 induces thermotolerance in cultured Caco-2 cells independent of the heat shock response. *Cytokine.* **(2003)** 21(1):1-9.

Hietakangas V, Ahlskog JK, Jakobsson AM, Hellesuo M, Sahlberg NM, Holmberg CI, Mikhailov A, Palvimo JJ, Pirkkala L, Sistonen L. Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol.* **(2003)** 23(8):2953-68.

Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, Sistonen L. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci USA.* **(2006)** 103(1):45-50.

Holmberg CI, Roos PM, Lord JM, Eriksson JE, Sistonen L. Conventional and novel PKC isoenzymes modify the heat-induced stress response but are not activated by heat shock. *J Cell Sci.* **(1998)** 111 (Pt 22):3357-65.

Holmberg CI, Hietakangas V, Mikhailov A, Rantanen JO, Kallio M, Meinander A, Hellman J, Morrice N, MacKintosh C, Morimoto RI, Eriksson JE, Sistonen L.

Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J.* **(2001)** 20(14):3800-10.

Horváth I, Glatz A, Varvasovszki V, Török Z, Páli T, Balogh G, Kovács E, Nádasdi L, Benkő S, Joó F, Vígh L. Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17 as a "fluidity gene". *Proc Natl Acad Sci USA.* **(1998)** 95(7):3513-8.

Horváth I, Multhoff G, Sonnleitner A, Vígh L. Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochim Biophys Acta.* **(2008)** 1778(7-8):1653-64.

Höhfeld J, Cyr DM, Patterson C. From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep.* **(2001)** 2:885–890.

Huang L, Mivechi NF, Moskophidis D. Insights into regulation and function of the major stress-induced hsp70 molecular chaperone in vivo: analysis of mice with targeted gene disruption of the hsp70.1 or hsp70.3 gene. *Mol Cell Biol.* **(2001)** 21(24):8575-91.

Huang LE, Zhang H, Bae SW, Liu AY. Thiol reducing reagents inhibit the heat shock response. Involvement of a redox mechanism in the heat shock signal transduction pathway. *J Biol Chem.* **(1994)** 269(48):30718-25.

Hung JJ, Cheng TJ, Lai YK, Chang MD. Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinases confers cadmium-induced HSP70 expression in 9L rat brain tumor cells. *J Biol Chem.* **(1998)** 273(48):31924-31.

Hunt C, Morimoto RI. Conserved features of eucaryotic hsp70 genes releaved by comparision with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **(1985)** 82:6455–6459.

Inouye S, Katsuki K, Izu H, Fujimoto M, Sugahara K, Yamada S, Shinkai Y, Oka Y, Katoh Y, Nakai A. Activation of heat shock genes is not necessary for protection by heat shock transcription factor 1 against cell death due to a single exposure to high temperatures. *Mol Cell Biol.* **(2003)** 23(16):5882-95.

Ishihara K, Horiguchi K, Yamagishi N, Hatayama T. Identification of sodium salicylate as an hsp inducer using a simple screening system for stress response modulators in mammalian cells. *Eur J Biochem.* **(2003)** 270(16):3461-8.

Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem.* **(1993)** 268(3):1517-20.

Jean-Louis S, Akare S, Ali MA, Mash EA Jr, Meuillet E, Martinez JD. Deoxycholic acid induces intracellular signaling through membrane perturbations. *J Biol Chem.* **(2006)** 281(21):14948-60.

Jordi W, Nibbeling R, de Kruijff B Phenethyl alcohol disorders phospholipid acyl chains and promotes translocation of the mitochondrial precursor protein apocytochrome c across a lipid bilayer. *FEBS Lett.* **(1990)** 261(1):55-8.

Jurivich DA, Sistonen L, Kroes RA, Morimoto RI. Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. *Science*. **(1992)** 255(5049):1243-1245.

Jurivich DA, Sistonen L, Sarge KD, Morimoto RI. Arachidonate is a potent modulator of human heat shock gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*. **(1994)** 91(6):2280-4.

Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature*. **(2003)** 425(6956):407-10.

Kampinga HH, Brunsting JF, Stege GJ, Burgman PW, Konings AW. Thermal protein denaturation and protein aggregation in cells made thermotolerant by various chemicals: role of heat shock proteins. *Exp Cell Res*. **(1995)** 219(2):536-46.

Kappé G, Franck E, Verschuure P, Boelens WC, Leunissen JA, de Jong WW. The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10. *Cell Stress Chaperones*. **(2003)** 8(1):53-61.

Khaleque MA, Bharti A, Sawyer D, Gong J, Benjamin IJ, Stevenson MA, Calderwood SK. Induction of heat shock proteins by heregulin beta1 leads to protection from apoptosis and anchorage-independent growth. *Oncogene*. **(2005)** 24(43):6564-73.

Kiang JG, Carr FE, Burns MR, McClain DE. HSP-72 synthesis is promoted by increase in $[Ca^{2+}]_i$ or activation of G proteins but not pHi or cAMP. *Am J Physiol*. **(1994)** 267(1):104-14.

Kiang JG, Gist ID, Tsokos GC. Cytoprotection and regulation of heat shock proteins induced by heat shock in human breast cancer T47-D cells: role of $[Ca^{2+}]_i$ and protein kinases. *FASEB J*. **(1998)** 12(14):1571-9.

Kiang JG, Gist ID, Tsokos GC. Biochemical requirements for the expression of heat shock protein 72 kda in human breast cancer MCF-7 cells. *Mol Cell Biochem*. **(1999)** 199(1-2):179-88.

Kim SA, Yoon JH, Lee SH, Ahn SG. Polo-like kinase 1 phosphorylates heat shock transcription factor 1 and mediates its nuclear translocation during heat stress. *J Biol Chem*. **(2005)** 280(13):12653-7.

Kim HP, Morse D, Choi AM. Heat-shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert Opin Ther Targets*. **(2006)** 10(5):759-69.

Kitagawa S, Sugaya Y, Nishizawa M, Hirata H. Relationship of alcohol-induced changes in $Mg(2+)$ -ATPase activity of rabbit intestinal brush border membrane with changes in fluidity of its lipid bilayer. *J Membr Biol*. **(1995)** 146(2):193-9.

Klapisz E, Masliah J, Béréziat G, Wolf C, Koumanov KS. Sphingolipids and cholesterol modulate membrane susceptibility to cytosolic phospholipase A(2). *J Lipid Res*. **(2000)** 41(10):1680-8.

Konopásek I, Vecer J, Strzalka K, Amler E. Short-lived fluorescence component of DPH reports on lipid--water interface of biological membranes. *Chem Phys Lipids*. **(2004)** 130(2):135-44.

Kroeger PE, Sarge KD, Morimoto RI. Mouse heat shock transcription factors 1 and 2 prefer a trimeric binding site but interact differently with the HSP70 heat shock element. *Mol Cell Biol*. **(1993)** 13(6):3370-83.

Kunimoto S, Murofushi W, Kai H, Ishida Y, Uchiyama A, Kobayashi T, Kobayashi S, Murofushi H, Murakami-Murofushi K. Steryl glucoside is a lipid mediator in stress-responsive signal transduction. *Cell Struct Funct*. **(2002)** 27(3):157-62.

Kusumi A, Nakada C, Ritchie K, Murase K, Suzuki K, Murakoshi H, Kasai RS, Kondo J, Fujiwara T. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. **(2005)** 34:351-78.

Kültz D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol*. **(2005)** 67:225-57.

Laszlo A. Evidence for two states of thermotolerance in mammalian cells. *Int J Hyperthermia*. **(1988)** 4(5):513-26.

Laufen T, Mayer MP, Beisel C, Klostermeier D, Reinstein J, Bukau B. Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ co-chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **(1999)** 96:5452–5457.

Lee KJ, Hahn GM. Abnormal proteins as the trigger for the induction of stress responses: heat, diamide, and sodium arsenite. *J Cell Physiol*. **(1988)** 136(3):411-20.

Lee JS, Seo JS. Differential expression of two stress-inducible hsp70 genes by various stressors. *Exp Mol Med*. **(2002)** 34(2):131-6.

Lee-Yoon D, Easton D, Murawski M, Burd R, Subjeck JR. Identification of a major subfamily of large hsp70-like proteins through the cloning of the mammalian 110-kDa heat shock protein. *J Biol Chem*. **(1995)** 270(26):15725-33.

Li GC, Werb Z. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. **(1982)** 79(10):3218-22.

Lin RZ, Hu ZW, Chin JH, Hoffman BB. Heat shock activates c-Src tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in NIH3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*. **(1997)** 272(49):31196-202.

Madore N, Smith KL, Graham CH, Jen A, Brady K, Hall S, Morris R. Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *EMBO J*. **(1999)** 18(24):6917-26.

Maeda T, Balakrishnan K, Mehdi SQ. A simple and rapid method for the preparation of plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*. **(1983)** 731(1):115-20.

Mao YW, Liu JP, Xiang H, Li DW. Human alphaA- and alphaB-crystallins bind to Bax and Bcl-X(S) to sequester their translocation during staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. **(2004)** 11(5):512-26.

Marber MS, Mestril R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J. Clin. Invest*. **(1995)** 95:1446–1456.

Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Shie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*. **(1995)** 182:1545-1556.

Martinac B. Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction. *J Cell Sci*. **(2004)** 117(12):2449-60.

Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*. **(2005)** 62(6):670-84.

McMillan DR, Xiao X, Shao L, Graves K, Benjamin IJ. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem*. **(1998)** 273(13):7523-8.

Mejía R, Gómez-Eichelmann MC, Fernández MS. Membrane fluidity of Escherichia coli during heat-shock. *Biochim Biophys Acta*. **(1995)** 1239(2):195-200.

Mercier PA, Winegarden NA, Westwood JT. Human heat shock factor 1 is predominantly a nuclear protein before and after heat stress. *J Cell Sci*. **(1999)** 112 (16):2765-74.

Mishra S, Joshi PG. Lipid raft heterogeneity: an enigma. *J Neurochem*. **(2007)** 103 Suppl 1:135-42.

van Montfort R, Slingsby C, Vierling E. Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem*. **(2001)** 59:105-56.

Morenilla-Palao C, Pertusa M, Meseguer V, Cabedo H, Viana F. Lipid Raft Segregation Modulates TRPM8 Channel Activity. *J Biol Chem*. **(2009)** 284(14):9215-24.

Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev*. **(1998)** 12(24):3788-96.

Mosser DD, Kotzbauer PT, Sarge KD, Morimoto RI. In vitro activation of heat shock transcription factor DNA-binding by calcium and biochemical conditions that affect protein conformation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **(1990)** 87(10):3748-52.

Mosser DD, Theodorakis NG, Morimoto RI.: Coordinate changes in heat shock element-binding activity and HSP70 gene transcription rates in human cells. *Mol Cell Biol.* **(1988)** 8(11):4736-44.

Munro S. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell.* **(2003)** 115(4):377-88.

Nadeau SI, Landry J. Mechanisms of activation and regulation of the heat shock-sensitive signaling pathways. *Adv Exp Med Biol.* **(2007)** 594:100-13.

Nagy E, Balogi Z, Gombos I, Akerfelt M, Björkbom A, Balogh G, Török Z, Maslyanko A, Fiszer-Kierzkowska A, Lisowska K, Slotte PJ, Sistonen L, Horváth I, Vigh L. Hyperfluidization-coupled membrane microdomain reorganization is linked to activation of the heat shock response in a murine melanoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **(2007)** 104(19):7945-50.

Nakamoto H, Vigh L. The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol Life Sci.* **(2007)** 64(3):294-306.

Neuhaus-Steinmetz U, Xu C, Fracella F, Oberheitmann B, Richter-Landsberg C, Rensing L. Heat shock response and cytotoxicity in C6 rat glioma cells: structure-activity relationship of different alcohols. *Mol Pharmacol.* **(1994)** 45(1):36-41.

Neuhaus-Steinmetz U, Rensing L. Heat shock protein induction by certain chemical stressors is correlated with their cytotoxicity, lipophilicity and protein-denaturing capacity. *Toxicology.* **(1997)** 123(3):185-95.

Nguyen VT, Morange M, Bensaude O. Protein denaturation during heat shock and related stress. Escherichia coli beta-galactosidase and Photinus pyralis luciferase inactivation in mouse cells. *J Biol Chem.* **(1989)** 264(18):10487-92.

Oh HJ, Chen X, Subjeck JR. Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance. *J Biol Chem.* **(1997)** 272(50):31636-40.

Ostling P, Björk JK, Roos-Mattjus P, Mezger V, Sistonen L. Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1. *J Biol Chem.* **(2007)** 282(10):7077-86.

Park HG, Han SI, Oh SY, Kang HS. Cellular responses to mild heat stress. *Cell Mol Life Sci.* **(2005)** 62(1):10-23.

Pearl LH, Prodromou C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem.* **(2006)** 75:271-94.

Pike LJ, Han X, Gross RW. Epidermal growth factor receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids: a shotgun lipidomics study. *J Biol Chem.* **(2005)** 280(29):26796-804.

Pike LJ. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res.* **(2006)** 47(7):1597-8.

Price BD, Calderwood SK. Ca is essential for the multistep activation of the heat shock factor in premeabilized cells. *Mol Cell Biol.* **(1991)** 11(6) 3365-3368.

Quinn PJ. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology.* **(1985)** 22(2):128-46.

Rabindran SK, Giorgi G, Clos J, Wu C. Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **(1991)** 88:6906–6910.

Raviol H, Sadlish H, Rodriguez F, Mayer MP, Bukau B. Chaperone network in the yeast cytosol: Hsp110 is revealed as an Hsp70 nucleotide exchange factor. *EMBO J.* **(2006)** 25(11):2510-8.

Rege BD, Kao JP, Polli JE. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci.* **(2002)** 16:237–246.

Revathi CJ, Chattopadhyay A, Srinivas UK. Change in membrane organization induced by heat shock. *Biochem Mol Biol Int.* **(1994)** 32(5):941-50.

Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experimentia* **(1962)** 18:571-573.

Robichon C, Dugail I. De novo cholesterol synthesis at the crossroads of adaptive response to extracellular stress through SREBP. *Biochimie.* **(2007)** 89(2):260-4.

Rosette C, Karin M. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science.* **(1996)** 274(5290):1194-7.

Saidi Y, Finka A, Chakhporanian M, Zrýd JP, Schaefer DG, Goloubinoff P. Controlled expression of recombinant proteins in *Physcomitrella patens* by a conditional heat-shock promoter: a tool for plant research and biotechnology. *Plant Mol Biol.* **(2005)** 59(5):697-711.

Samples BL, Pool GL, Lumb RH. Polyunsaturated fatty acids enhance the heat induced stress response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **(1999)** 123(4):389-97.

Santos BC, Chevaile A, Kojima R, Gullans SR. Characterization of the Hsp110/SSE gene family response to hyperosmolality and other stresses. *Am J Physiol.* **(1998)** 274(6Pt2):1054-61.

Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI. Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol.* **(1993)** 13(3):1392-407.

Sato SB, Ishii K, Makino A, Iwabuchi K, Yamaji-Hasegawa A, Senoh Y, Nagaoka I, Sakuraba H, Kobayashi T. Distribution and transport of cholesterol-rich membrane domains

monitored by a membrane-impermeant fluorescent polyethylene glycol-derivatized cholesterol. *J Biol Chem.* **(2004)** 279(22):23790-6.

Scheiffele P, Roth MG, Simons K. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J.* **(1997)** 16(18):5501-8.

Schlame M, Horvath I, Török Z, Horvath LI, Vigh L. Intramembraneous hydrogenation of mitochondrial lipids reduces the substrate availability, but not the enzyme activity of endogenous phospholipase A. The role of polyunsaturated phospholipid species. *Biochim Biophys Acta.* **(1990)** 1045(1):1-8.

Schütz GJ, Kada G, Pastushenko VP, Schindler H. Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J.* **(2000)** 19(5):892-901.

Selye H. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can Med Assoc J.* **(1976)** 115(1):53-6.

Shaikh SR, Edidin MA. Membranes are not just rafts. *Chem Phys Lipids.* **(2006)** 144(1):1-3.

Shamovsky I, Ivannikov M, Kandel ES, Gershon D, Nudler E. RNA-mediated response to heat shock in mammalian cells. *Nature.* **(2006)** 440(7083):556-60.

Shamovsky I, Nudler E. New insights into the mechanism of heat shock response activation. *Cell Mol Life Sci.* **(2008)** 65(6):855-61.

Sheikh-Hamad D, Di Mari J, Suki WN, Safirstein R, Watts BA 3rd, Rouse D. p38 kinase activity is essential for osmotic induction of mRNAs for HSP70 and transporter for organic solute betaine in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem.* **(1998)** 273(3):1832-7.

Shigapova N, Török Z, Balogh G, Goloubinoff P, Vigh L, Horváth I. Membrane fluidization triggers membrane remodeling which affects the thermotolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* **(2005)** 328(4):1216-23.

Shmeeda H, Kaspler P, Shleyer J, Honen R, Horowitz M, Barenholz Y. Heat acclimation in rats: modulation via lipid polyunsaturation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **(2002)** 283(2):R389-99.

Silomon M, Bauer I, Bauer M, Nolting J, Paxian M, Rensing H. Induction of heme oxygenase-1 and heat shock protein 70 in rat hepatocytes: The role of calcium signaling. *Cell Mol Biol Lett.* **(2007)** 12(1):25-38.

Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* **(1997)** 387(6633):569-72.

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **(2000)** 1(1):31-9.

Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. (1972) 175(23):720-31.

Stevenson MA, Calderwood SK, Hahn GM. Rapid increases in inositol trisphosphate and intracellular Ca^{++} after heat shock. *Biochem Biophys Res Commun*. (1986) 137(2):826-33.

Sun Y, MacRae TH. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci*. (2005) 62(21):2460-76.

Taira T, Sawai M, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. Cell cycle-dependent switch of up-and down-regulation of human hsp70 gene expression by interaction between c-Myc and CBF/NF-Y. *J Biol Chem*. (1999) 274(34):24270-9.

Terasawa K, Minami M, Minami Y. Constantly updated knowledge of Hsp90. *J Biochem*. (2005) 137(4):443-7.

Török Z, Horváth I, Goloubinoff P, Kovács 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(6):2192-7.

Török Z, Goloubinoff P, Horváth I, Tsvetkova NM, Glatz A, Balogh G, Varvasovszki V, Los DA, Vierling E, Crowe JH, Vigh L. Synechocystis HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2001) 98(6):3098-103.

Török Z, Tsvetkova NM, Balogh G, Horváth I, Nagy E, Péntes Z, Hargitai J, Bensaude O, Csermely P, Crowe JH, Maresca B, Vigh L. Heat shock protein coinducers with no effect on protein denaturation specifically modulate the membrane lipid phase. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2003) 100(6):3131-6.

Trinklein ND, Murray JI, Hartman SJ, Botstein D, Myers RM. The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. *Mol Biol Cell*. (2004) 15(3):1254-61.

Tsvetkova NM, Horváth I, Török Z, Wolters WF, Balogi Z, Shigapova N, Crowe LM, Tablin F, Vierling E, Crowe JH, Vigh L. Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2002) 99(21):13504-9.

Uehara T, Kaneko M, Tanaka S, Okuma Y, Nomura Y. Possible involvement of p38 MAP kinase in HSP70 expression induced by hypoxia in rat primary astrocytes. *Brain Res*. (1999) 823(1-2):226-30.

Van Blitterswijk WJ, Van Hoeven RP, Van der Meer BW. Lipid structural order parameters (reciprocal of fluidity) in biomembranes derived from steady-state fluorescence polarization measurements. *Biochim Biophys Acta*. (1981) 644(2):323-32.

Vereb G, Szöllosi J, Matkó J, Nagy P, Farkas T, Vigh L, Mátyus L, Waldmann TA, Damjanovich S. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci USA*. **(2003)** 100(14):8053-8.

Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P. Mechanism of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med*. **(1995)** 182:1597-1601.

Vigh L, Los DA, Horváth I, Murata N. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene in *Synechocystis* PCC6803. *Proc Natl Acad Sci USA*. **(1993)** 90(19):9090-4.

Vigh L, Maresca B, Harwood JL. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem Sci*. **(1998)** 23(10):369-74.

Vigh L, Escribá PV, Sonnleitner A, Sonnleitner M, Piotto S, Maresca B, Horváth I, Harwood JL. The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing function. *Prog Lipid Res*. **(2005)** 44(5):303-44.

Vigh L, Horváth I, Maresca B, Harwood JL. Can the stress protein response be controlled by 'membrane-lipid therapy'? *Trends Biochem Sci*. **(2007)** 32(8):357-63.

Voellmy R, Boellmann F. Chaperone regulation of the heat shock protein response. *Adv Exp Med Biol*. **(2007)** 594:89-99.

Wang X, Grammatikakis N, Siganou A, Calderwood SK. Regulation of molecular chaperone gene transcription involves the serine phosphorylation, 14-3-3 epsilon binding, and cytoplasmic sequestration of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol*. **(2003)** 23(17):6013-26.

Wang X, Khaleque MA, Zhao MJ, Zhong R, Gaestel M, Calderwood SK. Phosphorylation of HSF1 by MAPK-activated protein kinase 2 on serine 121, inhibits transcriptional activity and promotes HSP90 binding. *J Biol Chem*. **(2006)** 281(2):782-91.

Williams GT, Morimoto RI. Maximal stress-induced transcription from the human HSP70 promoter requires interactions with the basal promoter elements independent of rotational alignment. *Mol Cell Biol*. **(1990)** 10(6):3125-36.

Wissing D, Jäättelä M. HSP27 and HSP70 increase the survival of WEHI-S cells exposed to hyperthermia. *Int J Hyperthermia*. **(1996)** 12(1):125-38.

Woo SK, Lee SD, Na KY, Park WK, Kwon HM. TonEBP/NFAT5 stimulates transcription of HSP70 in response to hypertonicity. *Mol Cell Biol*. **(2002)** 22(16):5753-60.

Wu BJ, Kingston RE, Morimoto RI. Human HSP70 promoter contains at least two distinct regulatory domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **(1986)** 83:629-633.

Xia W, Voellmy R. Hyperphosphorylation of heat shock transcription factor 1 is correlated with transcriptional competence and slow dissociation of active factor trimers. *J Biol Chem*. **(1997)** 272(7):4094-102.

Yam AY, Albanèse V, Lin HT, Frydman J. Hsp110 cooperates with different cytosolic HSP70 systems in a pathway for de novo folding. *J Biol Chem.* **(2005)** 280(50):41252-61.

Yamagishi N, Ishihara K, Saito Y, Hatayama T. Hsp105 family proteins suppress staurosporine-induced apoptosis by inhibiting the translocation of Bax to mitochondria in HeLa cells. *Exp Cell Res.* **(2006)** 312(17):3215-23.

Yatvin MB, Cramp WA. Role of cellular membranes in hyperthermia: some observations and theories reviewed. *Int J Hyperthermia.* **(1993)** 9(2):165-85.

Yechiel E, Edidin M. Micrometer-scale domains in fibroblast plasma membranes. *J Cell Biol.* **(1987)** 105(2):755-60.

Young JC, Moarefi I, Hartl FU. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol.* **(2001)** 154(2):267-73.

Zaarur N, Gabai VL, Porco JA Jr, Calderwood S, Sherman MY. Targeting heat shock response to sensitize cancer cells to proteasome and Hsp90 inhibitors. *Cancer Res.* **(2006)** 66(3):1783-91.

Zhang GJ, Liu HW, Yang L, Zhong YG, Zheng YZ. Influence of membrane physical state on the lysosomal proton permeability. *J Membr Biol.* **(2000)** 175(1):53-62.

Zuo J, Rungger D, Voellmy R. Multiple layers of regulation of human heat shock transcription factor 1. *Mol Cell Biol.* **(1995)** 15:4319-4330.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az élet fennmaradásának alapvető feltétele, hogy az élőlények alkalmazkodni tudnak környezetükhöz. A környezeti feltételek időleges, hirtelen megváltozása egy gyors válaszreakciót idéz elő, ezt a folyamatot nevezzük stresszválasznak. Ha a változások hosszú ideig fennállnak, tartós, átörökíthető átalakulások történnek az élőlényekben, és azok adaptálódnak az új viszonyokhoz.

A sejtszintű stresszválasz óriási élettani, ill. kórélettani jelentőséggel bíró univerzális sejtvédő mechanizmus. Alapvető szerepe, hogy védelmet biztosít a makromolekulákat, makromolekuláris rendszereket károsító környezeti behatásokkal szemben. Mivel a sejtek a makromolekulák károsodását érzékelik és nem specifikusan a stresszort, így a stresszre adott válaszreakcióra jellemző, hogy nem stresszor specifikus.

A molekuláris stresszválasz során olyan folyamatok aktiválódnak, amelyek segítenek helyreállítani/eltávolítani a károsodott molekulákat. Ez részben a génexpressziós mintázat megváltozásán keresztül valósul meg, ami biztosítja, hogy a túléléshez szükséges védő fehérjék nagy mennyiségben jelenjenek meg a sejtekben. Az indukálódott stresszfehérjék általános sejtvédő tulajdonságuk miatt (fehérje-, DNS-védelem, szabadgyök fogás) ellenállóbbá teszik a sejteket, így azok egy ideig képesek megbirkózni erőteljesebb behatásokkal is. A stresszválasz bizonyos elemei evolúciósan konzerváltak; a fehérjék egy csoportja a baktériumoktól kezdve az élesztőkön át egészen az emberig részt vesz a folyamatban. Ide sorolhatók többek között a hősokk fehérjék (Hsp-k), amelyek expressziója jelentős mértékben megemelkedik stressz hatására. A hősokk fehérjéket molekulatömegük alapján szokták csoportosítani a következőképp: Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60 és kis molekulású Hsp-k.

A Hsp-k alapvető feladatokat látnak el a fehérje homeosztázis fenntartásában. Funkciójukat tekintve molekuláris chaperonok, azaz olyan fehérjék, amelyek stabilizálják az instabil konformációjú fehérjéket, és elősegítik a nem megfelelően feltekeredett fehérjék aktív szerkezetének kialakulását. Stressz során hozzájárulnak ahhoz, hogy a károsodott fehérjék visszanyerjék működőképes állapotukat, vagy ha a károsodás már nem helyrehozható, lebontásra kerüljenek. Csoportunk kimutatta, hogy a Hsp-k egy csoportja a membránokhoz is képes kötődni, és specifikus lipid-fehérje kölcsönhatásaikon keresztül részt vesznek a membránfluiditás, permeabilitás szabályozásában, a membrán integritásának megőrzésében.

A Hsp-k alapvető szerepet játszanak számos betegség kialakulásában, ill. fennmaradásában. Rákos daganatokban például magas Hsp szintet figyeltek meg, míg a kettes típusú diabéteszben és különböző neurodegeneratív betegségekben ennek ellenkezőjét írták le. Így a stresszválasz mechanizmusának feltárása, a kulcsfontosságú szabályozási lehetőségek megértése alapvető jelentőséggel bír. Annak ellenére, hogy a Hsp-k szerepéről, a *hsp* gének expressziójának szabályozásáról számos adat áll rendelkezésre, a hősokk válasz sejt- és molekuláris szintjeinek ma még számos eleme tisztázatlan. A kérdéskör egyik legvitatottabb aspektusa a stresszor érzékelése, a primer molekuláris szenzor(ok) azonosítása.

A Hsp-k funkciójából kiindulva számos szerző joggal feltételezte, hogy elsősorban a fehérjék károsodása, denaturációja szolgál jelként a stresszválasz elindításához, a Hsp-k fokozott termeléséhez. Valóban, a *hsp* gének indukciója kiváltható denaturált fehérjék mikroinjekciójával, ami alátámasztja a protein denaturáció központi jelentőségét a folyamatban. Azonban a *hsp* gének expresszióját egymástól igen eltérő tulajdonságú környezeti hatások, patológiás állapotok és fiziológiás folyamatok is előidézik. Így felmerült a kérdés, hogy mennyire tekinthető általános érvényűnek a denaturációs modell. A fehérjéken kívül milyen további stresszérzékelők működnek a sejtekben?

Csoportunkban - elsősorban prokarióta modellszervezeteken - végzett kísérletek eredményei megalapozták az ún. membrán-szenzor hipotézist, amely szerint a sejtmembrán nem csupán a celluláris stresszkárosodás egyik célpontja, de aktuális lipidösszetétele és fizikai állapota központi szereppel bírhat a stressz szignál érzékelésében, a stresszelhárító (adaptív) mechanizmusok működtetésében. A felvázolt modellben a membránok a következő visszacsatoláson alapuló körben szabályozzák a hősokk fehérjék termelődését. A stressz hatására bekövetkező membrán állapotváltozások (mint például a membrán fluiditásának növekedése, és mikrodoménjeinek átrendeződése) indukálják a *hsp* gének expresszióját. A termelődő Hsp-k egyrészt védik/helyreállítják a károsodott fehérjéket, másrészt a membránokhoz kapcsolódva stabilizálják a membrán szerkezetét. A stabilizációval megszűnik a membrán-szenzor jelképzése, ami a hősokk válasz lecsengését eredményezi.

Munkám során a membránok stresszválaszban betöltött szerepét emlős sejteken vizsgáltuk. **A felvázolt kérdéseket és kísérleteink eredményeit az alábbiakban foglalnám össze.**

1. Első lépésként tisztázni kívántuk, hogy emlős sejtekben is érvényes-e a „membrán, mint stressz-szenzor” hipotézis. Befolyásolja-e a hősokk válasz folyamatát a membránok fizikai állapotának módosítása? A kérdés megválaszolásához azt a prokarióták esetében már alkalmazott megközelítést használtuk, hogy a membránok állapotát egy jól jellemzett

membránfluidizáló szerrel, benzil-alkohollal (BA) módosítottuk, majd követtük, hogy a membránperturbáció képes-e kiváltani a Hsp-k termelődését. Több emlős sejtvonalban kimutattuk, hogy **a BA kezelés már a növesztési hőmérsékleten is képes indukálni a hsp gének kifejeződését.**

2. A membrán-szenzor hipotézis igazolása szempontjából központi jelentőségű kérdés, hogy a BA fokozza-e a celluláris fehérjék denaturációját. A szentjánosbogár luciferáz riporter enzim aktivitásának követésével megállapítottuk, hogy **a BA nem okoz jelentős mértékű fehérje denaturációt.**

Ezek alapján feltesszük, hogy a membránfluidizáló BA kezelés olyan útvonalon keresztül váltja ki a Hsp-k fokozott szintézisét, ami nem jár együtt a celluláris fehérjék denaturációjával.

A következőkben információkat szerettünk volna kapni azokról a stressz hatására bekövetkező membrán állapotváltozásokról, amelyek összefüggésbe hozhatók a Hsp válasz indukciójával.

3. Elsőként teszteltük, hogy vajon a membránok rendezettségének kritikus érték alá csökkenése elégséges jelként szolgál-e a Hsp-k termeléséhez. Ehhez egy BA-lal szerkezetileg rokon vegyülettel (fenetil-alkohollal) ugyanakkora membránfluiditás növekedést idéztünk elő, mint a *hsp* gének expresszióját fokozó BA-lal. Azonban várakozásainkkal ellentétben az „izofluid” membrán állapotot létrehozó PhA kezelés hatására nem tapasztaltuk Hsp szint növekedést. Ebből arra következtettünk, hogy **a membránfluiditás növekedés nem szükségszerűen jár együtt a Hsp válasz kialakulásával.**

4. A fentiek alapján kérdésként merült fel, hogy a stresszválaszt kiváltó membránaktív kezelések a fluidizáció mellett milyen további változásokat idéznek elő a membránban. Mivel a membrán heterogén szerveződésű, és a plazmamembrán mikrodoménjeinek bizonyítottan fontos szerepe van a jelátviteli folyamatok szabályozásában, így a membránok laterális mikrodomén szerveződésében bekövetkező változásokat is megvizsgáltuk. Kimutattuk, hogy **a Hsp szintézist indukáló kezelések (BA, hőstressz) a membránfluidizáló hatásuk mellett destabilizálják a koleszterin gazdag rendezett lipiddoméneket *in vitro*, és átrendezik a plazmamembrán koleszterin gazdag mikrodoménjeinek szerveződését *in vivo*.** A fenetil-alkohol viszont ezeket a jelenséget nem idézi elő.

Ez arra utal, hogy a plazmamembrán koleszterin gazdag mikrodoménjei mint szignalizációs platformok vesznek részt a membrán-eredetű stresszválasz jelképzési - jelátviteli folyamatában.

A továbbiakban a membrán állapotváltozástól a *hsp* gének indukciójáig vezető jelátviteli útvonal elemeit kívántuk azonosítani.

5. Tanulmányoztuk a Ca^{2+} , mint másodlagos hírvivő részvételének lehetőségét, mivel a Ca^{2+} -ról régóta ismert, hogy központi szerepet játszik a hősokk válasz folyamatában. Kísérleteinkben igazoltuk, hogy a **BA okozta membránperturbáció hatására megemelkedik az intracelluláris Ca^{2+} szint**. Megállapítottuk, hogy **az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedés szükséges lépés a *hsp70* indukciójához**. A Ca^{2+} citoplazmába áramlása lehet közvetlen következménye a membrán állapotváltozásnak, de azt membránfüggő folyamatok közvetett módon is befolyásolhatják, például foszfolipázok aktivációján keresztül.

6. A hősokk faktor 1 (HSF1) egy transzkripciós faktor, amely a stresszhatások széles körére elindítja a *hsp* gének fokozott kifejeződését. Intenzív poszttranszlációs módosításain keresztül nagy számú szignalizációs útvonal hatását integrálja. Következő kérdésünk arra vonatkozott, hogy a membránperturbáció által elindított jelátviteli útvonalak elvezetnek-e a HSF1 aktivációjához. Eredményeink alapján **BA hatására megtörténik a HSF1 többlépes aktivációja**: a HSF1 DNS-kötésre képes trimerré alakul, hiperfoszforilálódik, a sejtekben a *hsp70* promóteréhez kapcsolódik. Igazoltuk továbbá, hogy **BA kezelés során a HSF1 nélkülözhetetlen a *hsp* gének indukciójához**.

A stresszhatások a sejtekben egy komplex válaszreakciót indítanak el. Ezek mellett, hogy biztosítják a károsodott makromolekuláris rendszerek helyreállítását, ahhoz is hozzájárulnak, hogy a stresszor tartós vagy ismételt fennállása esetén is túléljenek a sejtek, azaz stressztoleranciát alakítsanak ki.

7. Ennek megfelelően alapvető kérdésként fogalmazódott meg, hogy vajon a membránokat érintő stressz is ellenállóbbá teszi-e a sejteket egy következő stresszhatással szemben? A termotoleráns állapot kialakulásának tesztelésével megállapítottuk, hogy **a BA prekondicionálást követően a sejtek egy része képes megbirkózni egy egyébként letális hatású hőkezeléssel**.

Eredményeink alapján a fehérjék, a DNS és a redox egyensúly mellett a membránok is részt vesznek emlős sejtekben a stresszválasz folyamatában. A BA által okozott membránstressz érzékelésének pontos mechanizmusa még nem tisztázott, de bizonyítottuk, hogy a membránok fluidizációja mellett a koleszterin gazdag mikrodomének átrendeződése is szükséges a stressz-szignál kialakulásához. A jelet lipid mediátorok és receptor aktivált kináz kaszkádok továbbíthatják a sejtmag felé. Az intracelluláris Ca^{2+} szint növekedés és a HSF1 aktiváció a membránoktól a *hsp* génekig ívelő jelátviteli útvonalnak már azonosított elemei. A

membránperturbáció hatására bekövetkező komplex válaszreakció, melynek eleme a Hsp-k fokozott termelődése, növeli a sejtek ellenállóképességét a magas hőmérséklettel szemben, tehát a membránok szerkezetét érintő hatások is bekapcsolják a sejtek általános védekező rendszerét.

SUMMARY

The ability of living organisms to cope with the constantly changing environmental conditions is essential for permanently maintaining life on Earth. Abrupt, temporal environmental changes induce a prompt and transient reaction called the stress response, while permanent environmental changes provoke the long term adaptation of the organism to the new environmental condition.

Cellular stress response is a universal mechanism of extraordinary physiological and pathological importance. It represents a defence reaction of cells to damage that environmental forces inflict on macromolecules. Many aspects of the cellular stress response are not stressor specific because cells monitor macromolecular damage without the regard of stress that causes such damage.

The main roles of the stress response to assess and counteract with damage and to activate pathways repairing or degrading damaged molecules. The stress response is accompanied with characteristic changes in the gene expression pattern inducing the accumulation of proteins with protective function. Because of their involvement in general aspects of cellular protection such as protein stabilization, DNA repair, and free radical scavenging, activated/elevated stress proteins confer resistance to many different types of stress enabling cells to survive severe insults. Some aspects of the cellular stress response are well conserved. A set of proteins involved in this process present in all organisms from bacteria till humans. One group of these highly conserved proteins are the heat shock proteins (Hsps) which are activated or induced during many types of stress. The Hsps are named according to their molecular weights: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 and the “small heat shock proteins”.

Hsps contribute to the maintenance of protein homeostasis in various ways. They are molecular chaperons that bind and stabilize proteins with instable conformation and assist in proper folding of misfolded proteins to achieve their native forms. During stress they contribute to refold unfolded proteins or target ultimately damaged proteins to degradation. Our research group has shown that a subpopulation of Hsps is present either on the surface or within the cellular membranes. Via their specific protein and lipid interactions Hsps can control major attributes of the membrane like fluidity, permeability or non-bilayer propensity.

Hsps play a fundamental role in the pathology of several human diseases. Aberrantly high level of certain Hsp classes is characteristic in cancer cells and the converse situation applies for type 2 diabetes or neurodegeneration. In accordance, understanding the mechanism

whereby cells can elicit a stress protein response is of key importance. In spite of the knowledge on the function and expressional regulation of *hsps*, basic questions on the molecular mechanism of stress perception, the identity of primary stress sensors are still remained open.

Considering the function of Hsps as molecular chaperones it was proposed that protein denaturation could serve as a primary signal initiating the stress response pathway. Indeed, the injection of denatured proteins into living cells is sufficient to induce *hsp* gene expression clearly supporting the role of denatured proteins in stress protein response. But *hsp* genes are known to be induced by diverse environmental insults, pathological and physiological conditions. It raises the question that the denaturation model of stress perception reflects a universal mechanism or additional stress sensors are present in the cells.

Our concept that membranes are potential stress sensors arise from studies performed mainly in prokaryotic organisms. The membrane sensor hypothesis postulates that membranes are not only the targets of cellular damage during stress but alterations of membrane physical state and/or composition may function in initial stress sensing events and in adaptation processes. In the proposed model the crosstalk between membranes and *hsp* gene expression forms a feedback regulatory loop in the following way. During stress conditions modification of membrane physical state, membrane hyperfluidization activates the transcription of *hsp* genes. The Hsps synthesized besides protecting/refolding (mis)folded proteins interact with membranes thus re-establish the proper membrane lipid order and physical state. This in turn switches off stress signal generation in membranes leading to diminution of stress response.

During my work our goal was to explore the possible involvement of membranes in stress sensing mechanisms in cultured mammalian cells. The questions we have been focusing on and the results of our experiments are summarised below.

1. To unravel the validity of membrane sensor hypothesis in mammalian cells we asked that modification of membrane physical state could influence the stress response. The approach applied was previously used in prokaryotic studies. The physical state of membranes was modified by the administration of a well characterised membrane intercalating agent namely benzyl-alcohol (BA) then its effect on the activation of the stress response was followed. We demonstrated that **the expression of *hsp* genes was induced by BA treatment even at growth temperature in several mammalian cell lines.**

2. In the widely accepted model the protein denaturation is considered as the primary stress-sensor initiating the stress protein response. Accordingly, the question whether BA treatment increases protein denaturation has great significance. Following the activity of

heterologously expressed firefly luciferase reporter enzyme we found that **BA exerts no measurable effect on protein denaturation**. These data indicate that alterations in the lipid phase of cell membranes provoked by BA treatment induces the synthesis of Hsps in a way which is not accompanied with protein denaturation.

Next we focused on membrane organization changes induced by stress and tended to reveal alterations which can be causally related to the initiation of Hsp response.

3. First it was proposed that a critical drop in the membrane physical order can generate sufficient signal for *hsp* gene induction. To test this assumption the effects of another, structurally similar membrane fluidizer molecule (phenethyl-alcohol) were studied. We provided evidence, that phenethyl-alcohol at a concentration equipotent with BA in membrane fluidization, does not generate a stress protein signal. Thus we concluded that if **an equal increase of membrane fluidity is achieved with different membrane perturbors, this is not necessarily coupled with the induction of heat shock genes**.

4. To unravel some possible mechanisms underlying stress response initiation besides membrane hyperfluidization we examined the lateral organization of membranes since it is well known, that cholesterol-sensitive plasma membrane compartments play an essential role in signalling events. We demonstrated that **treatments inducing Hsp response (like BA and heat) apart from membrane hyperfluidization also have the potential to destabilize cholesterol-rich ordered lipid domains *in vitro* and to reorganize specific cholesterol-rich plasma membrane microdomains *in vivo***.

It implies that reorganization of cholesterol-rich microdomains may also be required for the generation and transmission of sufficient stress signals to activate *hsp* genes.

5. We were also interested in the signal transduction events affected by membrane alterations taking place in the initial phase of the stress response activation. The role of Ca^{2+} was suggested, since it has been known that Ca^{2+} is a key signalling element in the heat stress response pathway. In our experiments **an increase in the intracellular free Ca^{2+} concentration was detected upon BA treatment. This rise in Ca^{2+} level proved to be necessary for efficient induction of *hsp70* gene**. The observed elevation in Ca^{2+} level can be a direct consequence of membrane perturbation by the modulation of ion channels, in addition, alterations in membrane physical state can indirectly affect Ca^{2+} concentration through the action of phospholipase enzymes.

6. Next we examined whether the signal transduction pathways provoked by membrane perturbation activate HSF1, the main transcriptional regulator of *hsp* induction. HSF1 has a central role in the regulation of gene expression changes under stress conditions. Through its

intensive posttranslational modifications it integrates the marks of many signal transduction pathways. We provided evidence that similar to heat treatment, **HSF1 undergoes its multistep activation process upon BA administration**: it acquires DNA binding ability, becomes hyperphosphorylated and binds to the *hsp70* promoter in the cells. It was also verified that this activation is a necessary step for the induction of *hsp* genes.

Stress triggers a complex response which, besides promoting the restoration of damaged macromolecular functions, supports also cells to survive under persisting stressful conditions. This phenomenon is called acquired stress tolerance.

7. Accordingly, finally we addressed the important question whether stress signals originated from membranes can also induce processes rendering cells resistant to subsequent lethal stress. Testing the thermal sensitivity of cells by their colony forming ability we confirmed that similar to sublethal temperature pretreatment, **preconditioning by the administration of BA is fully sufficient for the development of cellular thermotolerance**.

In conclusion, our results strongly indicate that in addition to proteins, DNA and redox state, the membranes of mammalian cells play a critical role in thermal sensing as well as signalling. The exact mechanism of membrane mediated stress perception imposed by BA awaits further studies but membrane hyperfluidization and the distinct re-organization of cholesterol-rich microdomains are also required for the generation of stress signal. The membrane generated stress signal can be transmitted by secondary lipid mediators and protein kinase cascades towards the nucleus. The rise of intracellular Ca^{2+} and the activation of HSF1 are already identified elements of the signal transduction pathway leading to the synthesis of Hsps. Similar to heat priming, isothermal membrane perturbation can also trigger the general stress response processes protecting cells from subsequent heat damage.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Víg Lászlónak, hogy bekapcsolódhattam kutatócsoportja munkájába. Köszönöm áldozatkész munkáját, amellyel mindig biztosította a csoport működéséhez szükséges szellemi és anyagi feltételeket. Külön köszönöm a támogatását, hogy bízott bennem, és számtalan lehetőséget biztosított a tanuláshoz, fejlődéshez. Nagyon hálás vagyok Balogh Gábornak a szemléletformáló és elgondolkodtató szakmai és baráti beszélgetésért, hogy problémáimmal mindig fordulhattam hozzá, és mindig számíthattam a segítségére. Köszönettel tartozom Dr. Horváth Ibolyának, Dr. Török Zsoltnak, Dr. Glatz Attilának, Dr. Balogi Zsoltnak, Dr. Gombos Imrének, Dr. Debreczeny Mónikának, Andriy Maslyankonak, Juhász Katának munkám során nyújtott segítségükért, szakmai és emberi támogatásukért, a mindig megfontolandó tanácsaikért. Köszönöm segítőkész asszisztensnőinknek, Dobóné Barta Évának, Bogdán Istvánné Gabinak, Zukic Erikának és Egri Izabellának a kísérletek megvalósításában nyújtott segítségüket, hogy biztosították a laboratóriumok gördülékeny működéséhez nélkülözhetetlen alapokat. Köszönöm a VI. emelet izotópszárny valamennyi dolgozójának azt a családias, baráti légkört, amittől nemcsak munkahely, hanem második otthon lehetett a folyosó.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Lea Sistonennek és Dr. Katarzyna Lisowskanak, hogy laboratóriumukban fogadtak, és minden segítséget megadtak az új módszerek elsajátításához. Köszönöm Malin Akerfelt és Natalia Vydra nélkülözhetetlen segítségét a kísérletek sikeres megvalósításában.

Külön köszönöm Prof. Dr. Boros Imrének és jelenlegi munkatársaimnak a türelmet és biztatást, ami segítségemre volt a dolgozat megírásában.

Köszönöm szüleimnek, hogy erejükön felül megteremtették a lehetőséget, hogy idáig eljuthattam. Köszönöm családomnak és barátaimnak a hitet és a bátorítást. Köszönöm Attilának, hogy mindenkor mellettem állt, és bízhattam támogatásában.