

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A stresszválasz és a membránok kapcsolata
emlős sejtekben**

Készítette: Nagy Enikő Éva
Témavezető: Prof. Dr. Vígh László

Biológia Doktori Iskola
Szegei Tudományegyetem

Magyar Tudományos Akadémia
Szegei Biológiai Központ Biokémiai Intézete
Szegei
2009

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 stresszválasznak, vagy *akklimatizációnak* nevezzük. 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. Ez részben a génexpressziós mintázat megváltozásán keresztül valósul meg, ami biztosítja, hogy a túléléshez szükséges védő fehérjék nagy mennyiségben jelenjenek meg a sejtekben. Ide sorolhatók többek között a hősokk fehérjék (Hsp-k), amelyek expressziója jelentős mértékben megemelkedik stressz hatására.

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. Csoportunk kimutatta, hogy a Hsp-k egy csoportja a membránokhoz is képes kötődni, és specifikus lipid-fehérje kölcsönhatásaikon keresztül részt vesznek a membránfluiditás és permeabilitás szabályozásában, valamint a membrán integritásának megőrzésében. A Hsp-k alapvető szerepet játszanak számos betegség kialakulásában, illetve 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 hőshock válasz sejt- és molekuláris szintjeinek ma még számos eleme tisztázatlan. A kérdéskör egyik legvitatottabb aspektusa a stresszor érzékelése, a primer molekuláris szenzor(ok) azonosítása.

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 hőshock 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 hőshock válasz lecsengését eredményezi.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során az emlős sejtek membránjainak szerepét vizsgáltam a stresszválasz folyamatában. A **következő kérdésekre kerestünk választ:**

- 1) Igazolható-e emlős sejteken a “membrán, mint stressz-szenzor” hipotézis?
- 2) Milyen membrán állapotváltozások hozhatók összefüggésbe a stresszválasz indukciójával?
- 3) A stresszválasz kezdeti szakaszában milyen, a membrán által közvetlenül érintett jelátviteli események zajlanak?
- 4) A HSF1 szabályozza-e a *hsp* gének indukcióját a membrán-eredetű stresszválasz során?
- 5) A membránstressz hatására védetté válik-e a sejt egy következő, egyébként letális stresszel szemben?

MÓDSZEREK

Emlős sejtek tenyésztése, tranziens transzfekciója

Fehérjék *in vivo* radioaktív jelölése, Western blot technika

Kvantitatív polimeráz láncreakció

DNS-fehérje komplex kimutatása gélretardációs technikával

Kromatin immunoprecipitáció

Riporter fehérje aktivitás mérés

Membránfluiditás mérés

Fluoreszcencia kioltás mérése egyrétegű lipid vezikulákban
Koleszterin gazdag plazmamembrán domének fluoreszcens jelölése
és konfokális mikroszkópia
Intracelluláris szabad Ca^{2+} koncentráció mérése
Termotolerancia meghatározása (kolónia képző képesség alapján)

EREDMÉNYEK

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 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 indukálja 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.

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

3. Először teszteltük, hogy 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* expressziót fokozó BA-lal. Azonban várakozásainkkal ellentétben az „izofluid membrán állapotot” létrehozó fenetil-alkohol kezelés hatására nem tapasztaltuk Hsp szint növekedést.

4. A fentiek alapján kérdésként merült fel, hogy a stresszválaszt kiváltó membránaktív kezelések a fluidizáció mellett milyen további változásokat idéznek elő a membránban. A membránok laterális mikrodomén szerveződését vizsgálva kimutattuk, hogy a Hsp szintézist indukáló kezelések (BA, hőstressz) destabilizálják a koleszterin gazdag rendezett lipiddoméneket *in vitro*, és átrendezik a plazmamembrán koleszterin gazdag mikrodoménjeinek szerveződését *in vivo*. A fenetil-alkohol viszont ezeket a jelenségeket nem idézi elő.

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

5. Tanulmányoztuk a Ca^{2+} , mint másodlagos hírvivő részvételének lehetőségét, és kísérleteinkben igazoltuk, hogy BA hatására megemelkedik az intracelluláris Ca^{2+} szint. Megállapítottuk, hogy az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedés szükséges lépés a *hsp70* indukciójához.

6. A hősokk faktor 1 (HSF1) egy transzkripció faktor, amely a stresszhatások széles körére elindítja a *hsp* gének fokozott kifejeződését. Eredményeink alapján BA hatására is megtörténik a

HSF1 többlépéses aktivációja: a HSF1 DNS-kötésre képes trimerré alakul, hiperfoszforilálódik, a sejtekben a *hsp70* promóterhez kapcsolódik. Igazoltuk továbbá, hogy BA kezelés során a HSF1 nélkülözhetetlen a *hsp* gének indukciójához.

A stresszhatások a sejtekben komplex válaszreakciót indítanak el. Ezek amellet, hogy biztosítják a károsodott makromolekuláris rendszerek helyreállítását, ahhoz is hozzájárulnak, hogy a stresszor tartós vagy ismételt fennállása esetén is túléljenek a sejtek, azaz stressz-toleranciát alakítanak ki.

7. Ennek megfelelően végül kérdésként fogalmazódott meg, hogy a membránokat érintő stressz is ellenállóbbá teszi-e a sejteket egy következő stresszhatással szemben? A termotoleráns állapot kialakulásának tesztelésével megállapítottuk, hogy BA prekondicionálást követően a sejtek egy része képes volt 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. Igazoltuk, hogy az intracelluláris Ca^{2+} szint növekedés, és a HSF1 aktiváció a membránoktól a *hsp* génekig ívelő jelátviteli útvonalnak elemei. A membránperturbáció hatására bekövetkező komplex válaszreakció,

melynek része 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.

TÉZISPONTOK

1. A membránperturbáló benzil-alkohol kezelés már a növesztési hőmérsékleten indukálja a *hsp* gének kifejeződését.
2. A benzil-alkohol kezelés nem okoz jelentős mértékű fehérje denaturációt.
3. A membránfluiditás növekedés nem szükségszerűen jár együtt a Hsp válasz kialakulásával.
4. A Hsp szintézist indukáló benzil-alkohol kezelés és a hőstressz a membránfluidizáló hatásuk mellett átrendezik a plazmamembrán koleszterin gazdag mikrodoménjeinek szerveződését is.
5. Benzil-alkohol hatására megemelkedik az intracelluláris Ca^{2+} szint, ami szükséges lépés a *hsp70* gén indukciójához.
6. A benzil-alkohol okozta membránstressz aktiválja a *hsp* gének központi transzkripció faktorát, a hőshock faktor 1-et.
7. Benzil-alkohol kezelést követően a sejtek ellenállóbbá válnak a magas hőmérséklettel szemben.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK:

Nagy E, Balogi Z, Gombos I, Akerfelt M, Bjorkbom A, Balogh G, Torok Z, Maslyanko A, Fiszer-Kierzkowska A, Lisowska K, Slotte PJ, Sistonen L, Horvath 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.* (2007) 104(19) 7945-50.

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 response. *FEBS J.* (2005) 272(23) 6077-86.

TOVÁBBI PUBLIKÁCIÓK:

Sóti C, **Nagy E**, Giricz Z, Vigh L, Csermely P, Ferdinandy P.: Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *British J. Pharmacol.* (2005) 146(6) 769-80.

Nagy L, Csintalan G, Kalman E, **Nagy E**, Sipos P.: Application of metal ions and their complexes in medicine II. Application of platina complexes in the treatment of tumor. *Acta Pharm. Hung.* (2004) 74(4) 213-22, Hungarian.

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.* (2003) 100(6) 3131-36.

Nagy L, Gubany E, Pellerito C, **Nagy E**, Szorcsik A.: Biological and chemical properties of alkyl lead derivatives. *Acta Pharm. Hung.* (2003) 73(2) 103-14, Hungarian.

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott Prof. Dr. Víg László kijelentem, hogy Nagy Enikő Éva „A stresszválasz és a membránok kapcsolata” című PhD értekezésében/téziseiben felhasznált **Balogh G, Horváth I, Nagy E, Hoyk Z, Benkő S, Bensaude O, Víg L: The hyperfluidization of mammalian cell membranes acts as a signal to initiate the heat shock response. FEBS J. (2005) 272(23) 6077-86.** publikációból származó eredményekhez meghatározó fontossággal hozzájárult.

Kijelentem, hogy az eredményeket az elsőszerző/társszerzők nem használták fel tudományos fokozat megszerzéséhez, és azt a jövőben sem teszik. Más jelöltnek nem adok ki hasonló jellegű nyilatkozatot a fenti publikációt illetően.

Prof. Dr. Víg László

Szeged, 2009. április 14.