



A PhD értekezés összefoglalása

A hőstressz érzékelésének mechanizmusai és individualitása emlős sejtekben

Begüm PEKSEL ŞAHİN

Témavezető: Dr. TÖRÖK Zsolt

Környezettudományi Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Biokémiai Intézet

Szegedi Biológiai Kutatóközpont - Magyar Tudományos Akadémia

Szeged, 2017

BEVEZETÉS

A stresszválasz létfontosságú biológiai folyamat, amely megvédi az organizmusokat a különféle környezeti és patofiziológiás körülmények között. A sejtek minden stresszt (típustól függetlenül) nyomon követnek, amelyek makromolekuláris károsodást okoznak. Következésképpen a celluláris stresszválasz több szempontból sem stresszorspecifikus. Az egyik leginkább tanulmányozott stressztípus a hő, amely magas hőmérsékleteken komoly károkat okoz (pl. a plazmamembrán integritásának csökkenése vagy súlyos fehérje denaturáció). A hősokkválasz azonban kiváltható enyhe patofiziológiás körülmények között is, pl. láz esetén, amelynél proteotoxicitás nem valószínű. A láz a bakteriális és vírusos fertőzésekre adott evolúciósan konzervált válasz, amely feltételezhetően előnyt jelent a túlélés szempontjából. Az utóbbi időkben számottevő bizonyíték támasztotta alá az ún. „membrán szenzor hipotézis”-t, amely azt feltételezi, hogy a plazmamembránban történt változások módosíthatják a hősokkfehérjék (a HSP-k vagy stresszfehérjék) szintjét. A stressz számos membránhoz kötött szenzoron keresztül indíthat el különböző jelátviteli útvonalakat. Ezek a membrán kémiai és fizikai állapotában bekövetkezett változásokkal hozhatók összefüggésbe. A stresszindukált másodlagos hírvivő molekulák képződésében a koleszterin, a foszfolipidek és szfingolipidek játszhatnak elsődleges szerepet.

A stresszválasz vizsgálata rendkívül fontos ahhoz, hogy megértsük hogyan reagálnak és adaptálódnak a sejtek, ha a környezetükben különféle változások következnek be. Ehhez szisztematikus megközelítésre van szükség, amellyel megvizsgálhatjuk a hőindukálta celluláris események sorozatát az expozíciós idő és hőmérséklet függvényében. Ezzel a megközelítéssel megérthetjük a HSP szintézis, a HSP redisztribúció, a plazmamembrán szerkezet és a celluláris lipidom átrendeződés, valamint a lehetséges jelátviteli utak szerepét.

Jelen értekezésben az enyhe hősokk membránszerveződésre, valamint a HSP szintézisre és lokalizációra gyakorolt akut hatásait ultraszenzitív fluoreszcencia mikroszkópia és lipidomika kombinációjával jellemezzük különös tekintettel a membránok hőérzékelésben és alkalmazkodásban betöltött szerepére.

Alapvető kérdés, hogy a stressz hatása ugyanolyan következményekkel jár-e a sejt kultúra (vagy szövet) minden sejtjében, és azok azonos módon reagálnak-e az adott stresszorra. A génexpresszióval és a celluláris válaszokkal kapcsolatos ismereteinket több millió sejtet tartalmazó populációk vizsgálatával nyerjük. E megközelítés betekintést nyújt az populáció átlagos válaszába, de nem ad információt a sejt kultúrában lévő egyedi sejtekről, ill. az azok által alkotott kisebb

szubpopulációkról. E heterogenitás hatása több szempontól is jelentős. Egyrészt a sejtek individuális variabilitásának ismerete elengedhetetlen a celluláris hálózatok működésének megértéséhez, másrészt a sejtekből együttesen nyert adatokat könnyen félreértelmezhetjük, ha figyelmen kívül hagyjuk a heterogenitást. A jellemző paraméterek (pl. expressziós profil, molekuláris klasztereződés vagy mobilitás) együttesen nyert átlagos értékei nem feltétlenül egyeznek meg az egyedi sejtek értékeivel. Végül az egyedi sejt szintű korrelációanalízis lehetővé teszi, hogy szisztematikus megközelítéssel molekuláris eseményeket azonosítsunk. Ebben a vonatkozásban a sejtek heterogenitását arra használjuk fel, hogy mechanisztikus betekintést nyerjünk a celluláris folyamatokba.

Jelen tézisben bemutattuk, hogy egy genetikailag homogén emlős sejt populáció egyedeinek stresszválasza nagy mértékben különbözik. Az stresszválaszokban megmutatkozó heterogenitás egyik fő oka a sejtek eltérő sejt ciklusa lehet. Az olyan módszerek, mint pl. a szérumeheztetés vagy a kémiai kezelések, amelyek célja a sejt ciklus megállítása, egyúttal hatást gyakorolnak a sejtek lipidösszetételére is. Ebből adódóan az ilyen módszerekkel nyert adatok félrevezetőek lehetnek. A vizsgálataink során alkalmazott mikroszkópia és fluoreszcencia-aktivált sejt válogatás (FACS) kombinációjával kémiai kezelések nélkül elemezhetjük a sejt ciklust és az egyedi stresszválasz kapcsolatát.

CÉLKITŰZÉS

E tanulmány fő célja annak megértése, hogy a sejtek hogyan érzékelik a hőt, és a membránok hogyan járulnak hozzá a hőérzékeléshez és a hőre adott celluláris válaszhoz. Az értekezés a következő kérdésekkel foglalkozik:

- Mi a korai celluláris események sorrendje a hőstressz észlelése során?
- Hogyan befolyásolják az eltérő mértékű hőkezelések (dózisok) a stresszválaszt különös tekintettel a membránfüggő változásokra, fehérje indukcióra és a stressz-jelátviteli utak aktiválására?
- Van-e összefüggés a hőrezisztencia és a módosult membrán (szerkezet és összetétel) között?
- Hogyan befolyásolja a sejt ciklus a stresszválaszt?
- Milyen korai celluláris események játszanak szerepet a hőérzékelésben? Lehetséges-e az egyedi stresszválasz vizsgálatához ezeket az eseményeket paraméterként használni?
- Sejt populációban a hőstresszválasz heterogenitása kapcsolatban áll-e a sejtek membránjainak tulajdonságaival?

MÓDSZEREK

Sejttenyésztés

Western blot

Kolóniaképző képesség vizsgálata

Immunfluoreszcencia mikroszkópia

Nagy információ tartalmú mikroszkópia és képelemzés

Fluoreszcencia mikroszkópia (TIRFM)

Képkotáson alapú fluoreszcencia-korrelációs spektroszkópia (ImFCS)

TOCCSL kísérletek (Thinning Out Clusters while Conserving Stoichiometry of Labeling)

Membrán izolálási technikák

Elektrospray ionizációs tömegspektrometriai (ESI-MS) lipidomikai analízis

Intracelluláris kalcium mérés

Fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás (FACS)

EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Az értekezés legfontosabb eredményei a következők:

- A hőstressz korai eseményei közé tartozik a plazmamembrán és a celluláris lipidom átrendeződése, a Hősokk faktor 1 (HSF1) hiperfoszforilációja, a MAPK jelátviteli utak aktivációja, és a HSP-k redistribúciója, amelyeket a hősokkfehérjék szintjének emelkedése és a szerzett termotolerancia kialakulása követ.
- A CHO sejtek hőkezelésre adott válaszána mechanizmusa hőmérséklet- és időtartamfüggő.
- A különböző hőstressztartományok – enyhe (40°C), mérsékelt (42,5°C) és súlyos (44°C) – eltérő celluláris lipidom, plazmamembrán szerveződés, HSP válasz és jelátviteli utak alapján osztályozhatók.
- Az enyhe stressz indukálja az ERK1/2 szignált, míg a JNK és p38 MAPK jelátviteli utak magasabb hőmérsékleten aktiválódnak.
- Hőstressz esetén a sejtek azonnal átrendezik plazmamembránjukat. A CHO sejtek plazmamembránjában mérsékelt hőkezelés hatására jelentősen megnő a fluoreszcens membránpróba diffúziója, ami enyhe hőmérsékleteken nem tapasztalható. Míg az enyhe

hőstressz hatását a sejt hatékonyan ellensúlyozza aktív mikrodomén átrendeződéssel (megnövekedett mikrodomén kötöttség), addig a mérsékelt hőstressz esetén nő a diffúzió és csökken a GPI-mGFP membrán-mikrodomén kötöttsége.

- A sejtek hőre azonnali lipidprofil átrendeződéssel válaszolnak. A lipidosztályok közül a foszfatidilszerin, foszfatidilglicerol, kardiolipin, lizofoszfatidilkolin és ceramid szint módosulása általánosan jellemző. A foszfatidsav szint változása csak mérsékelt és súlyos stressz esetén figyelhető meg.
- A HSP25 és HSP70 fehérjék akut hő hatására dózistól függően a sejtmagba és a perinukleáris térbe lokalizálódnak.
- A HSP25 és HSP70 fehérje szinteket különböző stressz küszöbértékek és így valószínűleg különböző mechanizmusok szabályozzák, ami nem függ a HSF1 Ser326 foszforilációjától.
- Eredményeink rámutatnak egy eddig nem ismert sejtszintű eustressz tartomány molekuláris részleteire, amelyben az emlős sejtek egy lázszerű enyhe hőmérséklethez membrán homeosztázisuk fenntartásával, lipid és HSP átrendeződéssel adaptálódnak, ami termotolerancia kialakulásához vezet; hangsúlyozandó, hogy mindez a HSP-k indukciója nélkül következik be. Magasabb hőmérsékleteken további védelmi mechanizmusok aktiválódnak (pl. a HSP-k emelkedett szinje), ami tovább növeli a sejtek termorezisztenciáját és stresszmemóriáját.
- Enyhe hőmérsékleten a hőkezelés módosítja a lipidösszetételt és a plazmamembrán szerkezetét, amely a szerzett termotolerancia jelentős megerősödését eredményezi rámutatva a két esemény lehetséges összefüggésére.
- A celluláris hő sokk válasz egyedi eltérései figyelhetők meg a HSP-k sejtmagba történő transzlokációja (korai válasz) és a HSP-k indukciója (késői válasz) során.
- A sejtről sejtre változó hőindukált HSP25 átrendeződés sejtciklustól független, ugyanakkor a G1, S és G2 fázisokat egyedi lipidprofil jellemzi.
- Az egyedi sejtek hőindukált Ca^{2+} -jelének elemzése rámutat, hogy a hőstressz jelátvitelének populáción belüli heterogenitása membránokhoz köthető, de e jelenség megértéséhez további vizsgálatokra van szükség.

PUBLIKÁCIÓK

A PhD értekezés alapjául szolgáló publikációk:

Peksel, Begüm, Imre Gombos, Mária Péter, László Vigh, Jr., Ádám Tizslavicz, Mario Brameshuber, Gábor Balogh, Gerhard Schütz, Ibolya Horváth, László Vigh, Zsolt Török. **“Mild heat induces a distinct**

“eustress” response Chinese Hamster Ovary cells that does not require heat shock protein synthesis”. (2017) Scientific Reports (in press)

I.F.: 4.259

Torok, Zsolt, Tim Crul, Bruno Maresca, Gerhard J Schutz, Felix Viana, Laura Dindia, Stefano Piotto, Mario Brameshuber, Gabor Balogh, Maria Peter, Amalia Porta, Alfonso Trapani, Imre Gombos, Attila Glatz, Burcin Gungor, Begüm Peksel, Laszlo Jr Vigh, Balint Csoboz, Ibolya Horvath, Mathilakath M. Vijayan, Phillip L. Hooper, John L. Harwood, Laszlo Vigh. **“Plasma Membranes as Heat Stress Sensors: From Lipid-Controlled Molecular Switches to Therapeutic Applications.”** Biochimica et Biophysica Acta 1838, no. 6 (June 2014): 1594–1618. doi:10.1016/j.bbamem.2013.12.015.

I.F.: 3.498

Brameshuber, Mario, Eva Sevcsik, Benedikt K. Rossboth, Christina Manner, Hans-Peter Peter Deigner, Begüm Peksel, Mária Péter, Zsolt Török, Albin Hermetter, Gerhard J. Schütz. **“Oxidized Phospholipids Inhibit the Formation of Cholesterol-Dependent Plasma Membrane Nanoplatfoms.”** Biophysical Journal 110, no. 1 (January 5, 2016): 205–13. doi:10.1016/j.bpj.2015.11.018.

I.F.: 3.656

A PhD értekezéssel közvetve kapcsolódó publikációk:

Cadenas, Cristina, Sonja Vosbeck, Eva Maria Hein, Birte Hellwig, Alice Langer, Heiko Hayen, Dennis Franckenstein Bettina Büttner, Seddik Hammad, Rosemarie Marchan, Matthias Hermes, Silvia Selinski, Jörg Rahnenführer, Begüm Peksel, Zsolt Török, László Vigh, Jan G. Hengstler. **“Glycerophospholipid Profile in Oncogene-Induced Senescence.”** Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids 1821, no. 9 (September 2012): 1256–68. doi:10.1016/j.bbalip.2011.11.008.

I.F.: 5.547

Molnár, Eszter, Soujanya Kuntam, Pradeep Kumar Reddy Cingaram, Begüm Peksel, Bhavyashree Suresh, Gabriella Fábián, Liliána Z. Fehér, Attila Bokros, Agnes Medgyesi, Ferhan Ayaydin, Laszlo G. Puskas. **“Combination of Small Molecule Microarray and Confocal Microscopy Techniques for Live Cell Staining Fluorescent Dye Discovery.”** Molecules 18, no. 8 (August 2013): 9999–10013.

I.F.: 2.465

Koos, Krisztian, Begüm Peksel, Lóránd Kelemen. **“Phase Measurement Using DIC Microscopy”** Acta Cybernetica 00 (0000) 1–15.

I.F.: 0.28