

## STRESSZVÁLASZ: MEMBRÁNTÓL MEMBRÁNIG

### Zárójelentés

#### Bevezetés:

Pályázatunk beadásakor 2001-ben még csak hipotézisként megfogalmazott "membrán szenzor elv", miszerint *a membránok a sejtek egyik lehetséges hőmérséklet érzékelői*, mára a prokariotáktól az emlős sejtekig bizonyítottan tekinthető és nemzetközileg is általánosan elfogadottá vált.

Szintén széleskörű érdeklődést váltottak ki azon munkáink, melyekben bizonyos stresszfehérjék membránasszociációját tanulmányoztuk, és felhívtuk a figyelmet ezen HSP-k membránvédő szerepére. Sikerre vezettek tehát azon erőfeszítéseink, melyekben a stresszválasz "membrántól-membránig" modelljének igazolását tűztük ki célul. Elméletünk gyakorlati jelentőségét az adhatta meg, hogy a stresszfehérjék képződésének mechanizmusa, az indukciójukat módosító faktorok ill. új, eddig feltáratlan membránstabilizáló szerepük megértése mind az alapkutatásban, mind pedig a klinikai gyakorlatban rendkívül gyümölcsözőnek bizonyulhatott. Kísérleteinkkel a szervezet stresszadaptációs modellel leírható betegségmegelőző stratégiáját tanulmányoztuk, igyekeztünk feltárni azokat a pontokat, ahol a lipidanyagcserével összefüggő táplálkozási szokások megváltoztatása vagy az irányított gyógyszeres beavatkozás a hősokk fehérje indukció mozgósításával a stresszel szembeni rezisztencia mértékét és az adaptációs hatékonyságot egyaránt megnövelheti. Külön is ki szeretnénk emelni, hogy az N-Gene Kutatási és Fejlesztési KFT-vel közös fejlesztési projektünk keretében felderítettük bizonyos hősokk fehérje indukciót elősegítő gyógyszerjelöltek szignálképzési útvonalait, melyek valószínűsíthetően szerepet játszanak a nitrogén monoxid (NO) rendszer működésében, valamint a HISS mediálta inzulin szignál érvényrejtésében is. A hatásmechanizmus értelmezésében elért eredményeinken túl messze a legfontosabb gyakorlati eredmény, hogy sikeresen befejeződött a kiválasztott vegyület, a BGP-15 inzulin érzékenyítő hatásának klinikai (Fázis II) vizsgálata inzulin rezisztenciában szenvedő betegeken.

Munkatervünkben a következő változtatás történt: Glatz Attila külföldi ösztöndíja miatt 2004-ben nem tudott részt venni a projektben, így a rá alapozott programrészletet, mely az élesztőt használta modellként, a csoportunkban nagy múlttal bíró prokarióta rendszerekkel egészítettük ki - a kutatási alapkérdések változatlanul hagyása mellett.

#### *In vitro* modellek:

Korábbi megfigyeléseink rámutattak arra, hogy a sHSP-k (kismólsúlyú hősokkfehérjék) általánosan elfogadott citoszólikus lokalizációján túl bizonyos körülmények között membránkötötté is válhatnak. Ezzel párhuzamosan a membrán molekuláris rendezettsége, fázisállapota, permeabilitása egyaránt módosul, miközben a membrán stabilitása fokozódik. További eredményeink rávilágítottak, hogy ezen stresszfehérjék stressz függő, reverzibilis, lipid-specifikus membránközönhatásaik révén képesek igen hatékony membránstabilizáló ágensként működni úgy, hogy eközben önálló, vagy más stressz fehérjékkel kölcsönhatásban megmutatkozó chaperon aktivitásuk jelentősen módosulhat. További kutatásaink során sikerült a sHSP-k ezen új, a membrán interakción keresztül kifejtett membránvédő -lipochaperon- hatásának mechanizmusát feltárni, valamint az emlős sHSP-k egyik legfontosabb képviselőjére az  $\alpha$ -crystallinra kiterjeszteni. Alapvető jelentőségű az a megfigyelésünk, hogy a sHSP-k kiszélesítik a folyadékkristályos fázis hőmérséklettartományát, ily módon képesek védeni mind a hidegstressz okozta gélfázis képződés, mind a magas hőmérsékletek tartományában bekövetkező folyadékkristályos - fordított

hexagonális fázistranzíció membránok épségét veszélyeztető hatásai ellen. (Nelly M. Tsvetkova, Ibolya Horváth, Zsolt Török, Willem F. Wolkers, Zsolt Balogi, Natalia Shigapova, Lois M. Crowe, Fern Tablin, Elizabeth Vierling, John H. Crowe, and László Vígh: *Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 99, 13504-13509, 2002*)

## Prokarióta és élesztő modellek:

### Prokarióta:

A stresszválasz membránfüggő elemeinek tanulmányozására a rendkívül jól karakterizált *E. coli*-t használva megállapítottuk, hogy a membránfluidizáció - melyet okozhat hő, vagy a membrán rendezettségét csökkentő szerek- membrán átrendeződést indukál, és ez szerepet játszik a sejt termotoleranciájának a kialakulásában. A hő ill. a membrán fluidizáló benzil alkohol hatásának elemzésével a stresszválasz indukciójának membránfüggése ezen a vizsgálati objektumon is igazolható volt. A korai membrán hiperfluidizációt egy meglehetősen gyors adaptáció – a membránfluiditás relaxációja (rigidizáció), valamint a lipidosztályok ill. a lipidek alkiláncai szintjén is jól detektálható összetételbeli átrendeződés követte, és ez magában is elégséges a termotolerancia kialakulásához. Eredményeinkről közleményben számoltunk be: **Shigapova N., Török Z., Balogh G., Goloubinoff P., Vigh L., Horváth I. (2005) Membrane fluidization triggers membrane remodeling which affects the thermotolerance in Escherichia coli. Biochem Biophys Res Commun. 328, 1216-1223.**

Az első olyan modellobjektumunk, melyen bizonyítani tudtuk azt az elméleti hipotézisünket, hogy a sejtmembrán nem csupán a celluláris stresszkárosodás egyik célpontja, de aktuális fizikai állapota, annak modulációja egyben központi szereppel bírhat a stressz szignál primer érzékelésében, a stresszelhárító (adaptív) mechanizmusok működtetésében és koordinációjában, a *Synechocystis PCC 6803* fotoszintetizáló kékalga volt. További vizsgálataink során szintén ezen a rendszeren mutattuk ki elsőként, hogy a HSP60 (GroEL), valamint a kismolsúlyú hősokkfehérjék családjába tartozó HSP17 hőstressz hatására membránokhoz kötődik. Modell kísérleteink alapján azt is kimondhattuk, hogy ezen HSP-k lipidekkel történő asszociációja függ a lipid-membrán fizikai állapotától. Jelen munkánkban arra szolgáltattunk bizonyítékokat, hogy az alga tilakoid membránjának fénykontrollálta, hőindukálta adaptív reorganizációja egy erősen telített "hősokk lipid", a monoglükozildiacylglicerol felszaporodásával jár együtt. Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy ennek az egyébként kismennyiségben jelenlevő lipidnek a stressz folyamán kitüntetett szerepe lehet a hőindukálta hiperfluidizáció ill. a nemkettősrétegű lipidstruktúrák kialakulásának meggátlásában. További igen izgalmas megfigyelésünk, hogy a kismolekulasúlyú HSP17 előszeretettel kötődik ehhez a "hősokk lipid"-hez, mely révén a membrán védelme a stressz okozta perturbációkkal ill. károsodásokkal szemben tovább fokozódhat. (Balogh, Z., Török, Z., Balogh, G., Jósvay, K., Shigapova, N., Vierling, E., Vigh, L., Horváth, I. (2005) "Heat shock lipid" in cyanobacteria during heat/light-acclimation. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005;436:346-54.). További vizsgálataink során kimutattuk, hogy a Hsp17 pontmutációk specifikusan módosítják a kismolsúlyú hősokkfehérje membrán aktivitását.

A Hsp17-membrán (lipid) kölcsönhatás mechanizmusának tanulmányozását céloztuk meg olyan sHsp pontmutáns konstrukciók létrehozásával ill. a megfelelő tisztított fehérjék vizsgálatával, amely sejtek stressz toleranciájuk tekintetében ill. a megfelelő fehérjék oligomerizációs tulajdonságukban és *in vitro* fehérjevédő képességükben különböznek a vad típusú sejtől ill. fehérjétől. Egyebek mellett megállapítottuk, hogy a Hsp17 N-terminális vége hordozza a lipidekkel kölcsönhatni képes fehérje motívumot. A hőkezelésnek kitett sejtekben a Q16R fehérje

kizárólag a tilakoid frakcióban található meg. Ezen fehérje kivételes membrán aktivitása folytán a vad típusú sHsp-t is felülmúlóan képes védeni a tilakoid funkciót a fotoinhibíciós (UV-B) károsodásoktól. Ez a felfedezés nem csak a sHsp amfitróp funkcionalitásának fontosságára világít rá, de igen jelentős gyakorlati jelentőséggel is bírhat. A munka részben egy NIH Fogarty pályázat (SzBK - Arizonai Egyetem, Elizabeth Vierling) támogatásával készült.

### **Élesztő:**

Napjainkban egyre inkább elfogadott, hogy a hasadó élesztő (*Schizosaccharomyces pombe*) jobban funkcionál az emlős sejteken végzett kutatások „kiegészítő modelljeként”, mint a pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*). Ezt a tendenciát tükrözi a hasadó élesztő „micromammal” elnevezése is, melynek alapjául szolgál az a tény, hogy mintegy 140 olyan metazoa-homológ gén található a genomjában, ami a pékélesztőből hiányzik. Nem elhanyagolható előnye továbbá, hogy a pékélesztőben használt metodikák túlnyomó többsége alkalmazható a hasadó élesztőben is (Forsburg, 2003; Current Protocols in Molecular Biology: 13.14.1). Az elmúlt évben USA-beli tanulmányútja során (University of California, Davis, Prof. Kazuhiro Shiozaki) Glatz Attilának lehetősége nyílt meggyőződni a hasadó élesztő mint eukarióta stressz-modell használhatóságáról. A *S. pombe* hőstresszválaszának egyik fontos eleme a humán p38/JNK-homológ MAP-kináz (Sp1/Sty1) fémjelezte szignál transzdukciós útvonal. A jelátviteli folyamatban kulcsszerepet játszó kináz hősokk-indukálta foszforilációjának mértékében –azaz aktivitásának szabályozásában-, valószínűleg a specifikus foszfatázok bírnak döntő szereppel. (Shiozaki et al. 1998; Mol. Biol. Cell. 9: 1339-1349). A közelmúltban feltárt, ún. „cell integrity” MAP-kináz (Pmk1p; p42/p44) útvonal is minden bizonnyal fontos a hőstressz- okozta károk érzékelésében, bár foszforilációjának időfüggése eltér a p38/JNK homológéhoz viszonyítva (Madrid et al. 2006; 281: J. Biol. Chem. 2033-2043). Kísérletesen igazolták továbbá, hogy az *S. pombe* hősokk faktor gén (Hsf1) különböző, deléciós mutánsai eltérő módon reagálnak a magas hőmérsékletre és kadmium-stresszre (Saltsman et al. Mol Gen Genet 1999; 261: 161-169).

A fentiekben vázolt eredmények ellenére kevés információval rendelkezünk a hőstressz által okozott, plazmamembrán integritását nagy valószínűséggel védő hsp gének (a HSP70 valamint az sHSP családok) expresszióját és lokalizációjukat illetően. Munkánk során elkezdtük tesztelni a fentiekben megjelölt fehérjék kifejeződését hősokk ill. hősokk+membránperturbens (benzilalkohol) kezelést követően. Külön hangsúlyt fektetünk az ún. „mild heat shock” hőmérsékleti tartományba eső kezelésekre, ahol a sejtek nagymértékű HSP-indukciót mutatnak, de még nem pusztulnak. Előzetes eredményeink alapján ez a tartomány a normál hőmérsékleten nőtt (30 °C) sejtek esetében a 35-37 °C intervallumba esik, függetlenül attól, hogy a sejteket komplett, vagy minimál táptalajon növesztettük. A túlélési kísérleteink alapján elmondható, hogy a vizsgált hőmérsékleti tartományban a 10-50 mM benzilalkohollal történt kezelés sem okozott jelentős sejtpusztulást. A fentiekkel párhuzamosan elkezdtük a két fő MAP-kináz-t érintő mutánsok előállítását is. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a MAPK gének inaktiválása nem letális, valamint a C-terminális végükön HA-6xHis tag-et hordozó kinázok foszforilációs szintje kiválóan tanulmányozható (Shiozaki et al. 1998; Mol. Biol. Cell. 9: 1339-1349, Madrid et al. 2006; 281: J. Biol. Chem. 2033-2043). A tag-gel ellátott MAPK mutánsokban (beszerzésük folyamatban) megvizsgáljuk, hogy a benzilalkohollal történő kezelés befolyásolja-e foszforilációjukat, ill. az általunk előállított, megfelelő genetikai markerrel (G418-rezisztencia) ellátott deléciós mutánsokban változik-e a hőstressz, valamint hőstressz+benzilalkohol kezelésre a két fontos HSP család indukciójának mértéke. Ugyanezen kísérleteket elvégezzük a különböző Hsf1 deléciókat hordozó törzseken is, így fontos adatokat nyerhetünk arra vonatkozóan, hogy az extracelluláris stressz detektálásában kulcsszerepet játszó MAP-kinázok ill. a Hsf1 milyen

mértékben vesznek részt a membránperturbens ágensek okozta stressz érzékelésében valamint elhárításában.

## Emlős modellek

### *Stresszérzékelés: a stresszválasz "lipidreceptorai"*

A program első időszakában végzett kutatásunk három „enigmatikus” - azonosított receptorral (eddig) nem rendelkező – gyógyszer jelölt molekula lipidreceptorait tárta fel, lipid monolayer, nagyfelbontású pásztázó kalorimetria, Fourier transzformált infravörös spektroszkópia valamint a „hagyományos” receptorkutatáshoz hasonló, de specifikus lipidre alkalmazott radioaktív ligand leszorítási módszer bevetésével. Azonosítottuk a támadáspontul szolgáló, kölcsönható lipideket, melyek negatív töltésük alapján sorolhatók közös osztályba. Megmutattuk, hogy a vegyületek a korábban már ismertetett *membrán eredetű hőstressz válasz elvbe* illeszkedően fluidizálják a negatívan töltött lipidek zsírsav oldalláncait, mely esemény a HS válasz szignálképzésének valószínű kiindulópontja. Bizonyítottuk továbbá, hogy a gyógyszerjelöltek hőstressz fehérje koinduktor hatásának erőssége szoros korrelációt mutat a meghatározott lipid targetekhez való kötődési képességükkel. Fehérje denaturációs tesztek segítségével megállapítottuk, hogy a molekulák nem fokozzák a fehérje kicsapódást, ilymódon kizártuk, hogy a HSP koinduktor hatás jelképzésében a klasszikus elmélet alapján prediktált fokozott protein denaturáció bármilyen szerepet játszhatna. Karakterizáltuk továbbá a molekulák közvetlen membránvédő tulajdonságait. (*Zsolt Török, Nelly M. Tsvetkova, Gábor Balogh, Ibolya Horváth, Enikő Nagy, Zoltán Péntes, Judit Hargitai, Olivier Bensaude, Péter Csermely, John H. Crowe, Bruno Maresca and László Vigh: Heat shock protein co-inducers with no effect on protein denaturation specifically modulate the membrane lipid phase Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003; 100(6):3131-6*)

### *Sejtszintű beavatkozások.*

#### *A kismolekulasúlyú hősokek fehérjék (sHSP-k) szerepe a membránvédelemben*

Az sHSP-k - a kismolekulasúlyú stresszfehérjék a molekuláris chaperonok olyan családját alkotják, melyek képesek részlegesen denaturálódott fehérjék irreverzibilis aggregációját gátolni. Ezek a hősokek fehérjék nagy szerephez juthatnak mindazon betegségek esetén, melyek kiváltó oka vagy egyik következménye a sejt bizonyos fehérjéinek abnormális aggregációja (Pl. prion betegség; DRM; hályogképződés; neurodegeneratív betegségek, mint Parkinson, Creutzfeldt-Jakob, Alzheimer, Alexander kór). *In vivo* kutatásaink céljára az SZBK Molekuláris Neurobiológiai Laboratóriumában Sántha Miklóssal kooperációban az sHSP-k overexpressziójának vizsgálatára génkonstrukciókat ill. sejtvonalakat készítettünk el.

	Génkonstrukció	Transzformált sejtvonal	Szelekció	Szelektált klónok száma	Expresszálo klónok száma (Western blot Pozitív)
1.	pEFhsp27	HeLa (V.L.)	Zeocin 200 µg/ml	3	2
2.	pEFhsp27	H9c2	Zeocin 400 µg/ml	3	2
3.	pEFhsp27	B16	Zeocin 100 µg/ml	5	3
4.	pEFhsp27	293 (JC)	Zeocin 300 µg/ml	21	8

5.	Tet indukció (pcDNA4/TO -hsp27 pcDNA6/TR)	B16	Zeocin 30 µg/ml + Blasticidin 5 µg/ml	5	1
6.	phsp27-EGFP fusion	<b>B16</b>	G418 500 µg/ml	14	4 (fluoresz.)
7.	phsp27- EGFP fusion	H9c2	G418 400 µg/ml	Clone #2/2 #8	2 (fluoresz.)
8.	pHSPB2- IRES- HSPB3	HeLa (V.L.)	G418 400 µg/ml	9	2
9.	pHSPB2- IRES- HSPB3	H9c2	G418 400 µg/ml	Clone #2/2 #3, #9	2
10.	phsp27- EGFP fusion pαB crystalline- DsRed-Hyg	B16	G418 500 ug/ml Hyg 100 ug/ml	6	2 (fluoresz)
11.	pαB crystalline- IRES-hsp27- hyg	B16	G418 500 ug/ml Hyg 100 ug/ml	30	1
12.	Tet indukció (pcDNA4/TO -hsp27 pcDNA6/TR)	B16	Zeocin 60 µg/ml + Blasticidin 10 µg/ml	12	2
13.	Tet indukció (pcDNA4/TO -hsp70 pcDNA6/TR)	B16	Zeocin 60 µg/ml + Blasticidin 10 µg/ml	4	1
14.	pCMVαB crystalline- hyg	B16	Hyg 100 ug/ml	12	4

A fenti konstrukciókat használtuk a sHSP-k lokalizációs változásainak mikroszkópiás követésére, ill. teszteltük a kismolsúlyú hősokkfehérjék (sHsp) membrán kölcsönhatásainak (lehetséges) szerepét a membránok hő- és oxidatív stresszel szemben mutatott védelmében.

A kísérletekhez HeLa sejtvonalakat használtunk, amelyekben az  $\alpha$ B-crystallin-t vagy a Hsp27-t indukálható módon túltermel(tet)tük.

Az *in vitro* munkában patkány májból izolált lipideket és tisztított fehérjéket vizsgáltunk.

1. A hő- (42 °C) és oxidatív stressznek (tBuOOH) kitett és kontroll sejtekből izolált membránfrakciók (plazma membrán, mitokondrium) immunoblotting-gal történő elemzésével megállapítottuk, hogy a sHsp-k a stressz folyamán ezen membránokhoz ill. organelumokhoz ködöd(het)nek vagy membrán asszociált mennyiségük megnövekedhet.

2. *In vivo* végzett oxidációs kísérletekben, melyekben egy membrán lokalizált és oxidációra érzékeny fluoreszcens próbát (DPPP) használtunk, a sHsp indukció megnövekedett mértékű védelmet nyújtott oxidatív stresszel szemben.

3. *In vitro* végzett „monolayer” (lipid-protein kölcsönhatás) kísérletek arra utalnak, hogy a sHsp-k képesek lehetnek „scavenger” fehérjékként működni, azaz a reaktív oxidációs termékek (ROS) egy részét semlegesíteni. Az oxidáció eredményeként a sHsp-lipid kölcsönhatás erőssége növekszik, akár a fehérje nagyobb membrán aktivitása, akár a lipid oxidációs termékek megjelenésének következményeként.

### ***Membrán módosítások - a stresszválasz “lipidreceptorai”:***

A membránból induló, hőstressz fehérje indukcióhoz vezető jelátviteli folyamatok mélyebb megértése érdekében a korábbi K562 humán eritroleukémiás sejtvonal mellé a B16 egér melanóma F10 klónját vontuk be kísérleteinkbe.

A membrán és a stresszválasz közötti kapcsolat vizsgálatához célszerű a sejtmembránt módosítani, melynek összetétele, fizikai állapota többféle módon befolyásolható. A benzilalkohol (BA) kezelés során az emlős sejtek membránjainak rendezettsége a prokarióta modelleken tett korábbi megállapításainkkal összhangban csökken, azaz fluiditásuk nő. Kísérleteink során a BA kezelés B16 egér melanóma sejteken egy bizonyos koncentráció tartományban már izotermális körülmények között (37 °C) is kiváltotta a Hsp70 fehérje indukcióját, ami a stresszválasz egyik alapeleme. Összehasonlítottuk kvantitatív valós-idejű PCR-rel (polimeráz láncreakció), hogy hogyan változik a különböző hősokek gének expressziója membráneredetű stressz során, ill. különböző hőmérsékleteken. Az indukciók nagysága alapján a 40 mM BA kezelés a 41 °C-os ún. „enyhébb” hősokekhez áll a legközelebb, bár hatásuk nem teljesen azonos. A hőstressz több vizsgált hsp mRNS mennyiségére volt hatással, mint a BA 1 órás kezelést követően. Eltérést tapasztaltunk a hsp mRNS-ek (hsp70 és hsp25) egymáshoz viszonyított arányában is. Felmerült a kérdés, hogy a membránból induló jelátviteli útvonal milyen mechanizmuson keresztül szabályozza a hsp gének kifejeződését. Az irodalomból ismert, hogy a hsp gének stresszindukált expresszióját a HSF1 (hősokek faktor 1) transzkripció faktor irányítja a hsp promoterekben található hősokek elemeken keresztül. Tanulmányoztuk, hogy a membráneredetű stresszválasz a HSF1 közreműködésével a HSE-eken keresztül szabályozódik-e. A patkány hsp70.1 gén szabályzó régiójának különböző hosszúságú és deléciós származékainak aktiváló képességét mértük reporter fehérje segítségével BA és hőkezelés után Katarzyna Lisowska (Gliwice, Lengyelország) csoportjával együttműködve. Megállapítottuk, hogy azonos DNS szakaszok fontosak az indukciós készséghez, és hogy a HSE-ek jelenléte szükséges a BA okozta transzkripció növekedéshez is. Lea Sistonen (Turku, Finnország) csoportjával kooperációban meghatároztuk, hogy a HSF1 aktiválódik BA kezelés során. Bizonyítottuk, hogy a HSF1, (de nem a HSF2) DNS kötésre (HSE) képessé válik (HSE elektroforetikus mobilitásváltozás alapján), a sejtekben a hsp70 promoterhez hozzákapcsolódik (kromatin immunoprecipitáció HSF1 ellenanyaggal), és hiperfoszforilálódik, de kissé eltérő mértékben, mint a 41 °C hősokek után (Western blot). A HSF1 membráneredetű stresszfehérje indukcióban betöltött központi szerepét alátámasztja, hogy HSF1-et nem tartalmazó HSF1 -/- egér embrionális fibroblaszt sejtekben a hsp indukció nagyon kis mértékű, a HSF1 +/+ sejtekhez képest. A membránperturbáció által kiváltott stresszválasz

univerzális jellegét igazolja, hogy azt rákos (B16 egér melanoma) és nem rákos eredetű (egér embrionális fibroblaszt) sejtekben egyaránt megfigyelhetjük.

Intracelluláris  $Ca^{2+}$  kelátor alkalmazásával megállapítottuk, hogy a  $Ca^{2+}$  szint emelkedése szükséges feltétele mind a hő, mind a benzil alkohol indukálta hsp70 szint emelkedésének.

Tanulmányoztuk a p38 MAPK szerepét (SB203580 p38 inhibitor alkalmazásával) a BA és a hő indukálta stresszválaszban. Megállapítottuk, hogy a p38 MAPK út részt vesz a BA által elindított hsp70 és hsp25 indukcióban. Hőstressz esetében a p38 út szerepének tisztázása további kísérleteket igényel.

Fenti eredményeinket hamarosan publikáljuk, míg az ezeket a kísérleteket megalapozó munkánk 2005-ben jelent meg (**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. 200; 272: 6077-86.***), melyben emlős sejteken elsőként bizonyítottuk a hő és a BA membránfluidizáló ill. stresszválaszt indukáló hatásának szoros összefüggését.

Rámutatunk a kalcium szint gyors, perces időablakban történő membrán perturbáció függő szabályozására, valamint a mitokondriális membránpotenciál hyperpolarizációjára, mint olyan jelenségre, melynek szintén szerepe lehet a stresszválasz szignálképzésében.

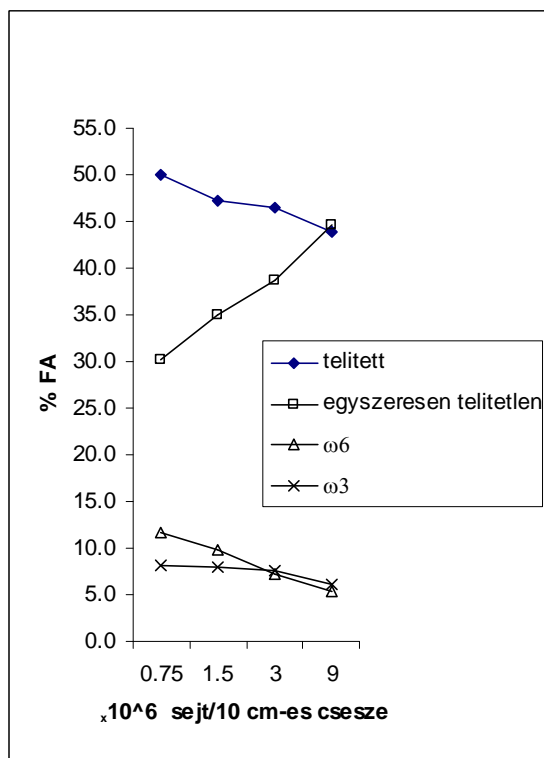
### ***Membránmódosítások sejt kultúrában zsírsav „etetéssel” és egész állaton lipid diétával:***

#### *Sejtmodellek:*

Jelentős előrehaladást értünk el az emlős sejtek célzott membránmódosításának területén. Olyan zsírsav „etetés” módszert dolgoztunk ki és karakterizáltunk, mely révén képesek vagyunk a sejttenyészetekben növekvő sejtek membrán lipidjei zsírsavprofiljának mélyreható megváltoztatására. Eljárásunk alkalmas arra, hogy modellezzük a telített zsírsavak, valamint az n-9, n-6, n-3 telítetlen zsírsavak diétás hatásait, és ilymódon lehetőségünk nyílik a membránok stresszválaszban játszott szerepének új aspektusból történő kutatására. Legújabb - előzetes - eredményeink szerint a linolsav szupplementáció a 18:2 jelentős, több, mint 10%-os beépülését eredményezte a membrán alkotó foszfolipidekbe már 7 órás kezelés hatására. Az így módosított sejtek a hőstresszre fokozott HSP70 expresszióval reagáltak. A többi zsírsav hatásának elemzését valamint a teljesebb HSP profil analízisét követően megfigyeléseinket közleményben tesszük közzé.

#### *Állat modellek:*

Vizsgálataink egész szervezetre való kiterjesztése kooperációs kutatások keretében történt. A koleszterint és halolajat tartalmazó diéta zsírsavösszetételre gyakorolt hatását a szemben és az agyban elemztük. A koleszterinben dús táplálék egyik legkiemelkedőbb hatása a szemben mutatkozott meg, ahol a DHA koncentrációját szignifikáns mértékben csökkentette. Ezt a hatást a halolajat is tartalmazó diéta a normális szintre újra visszahozta. Ez az eredmény hangsúlyozza, hogy a koleszterin akár közvetlen szerepet játszhat a szemben előforduló patológiás elváltozásokban és a többszörösen telítetlen zsírsavak visszafordíthatják a folyamatot. (**Puskás LG, Bereczki E, Sántha M, Vigh L, Csanádi G, Spener F, Ferdinandy P, Onochy A, Kitajka K. *Cholesterol and cholesterol plus DHA diet-induced gene expression and fatty acid changes in mouse eye and brain. Biochimie. 2004;86(11):817-24.***)

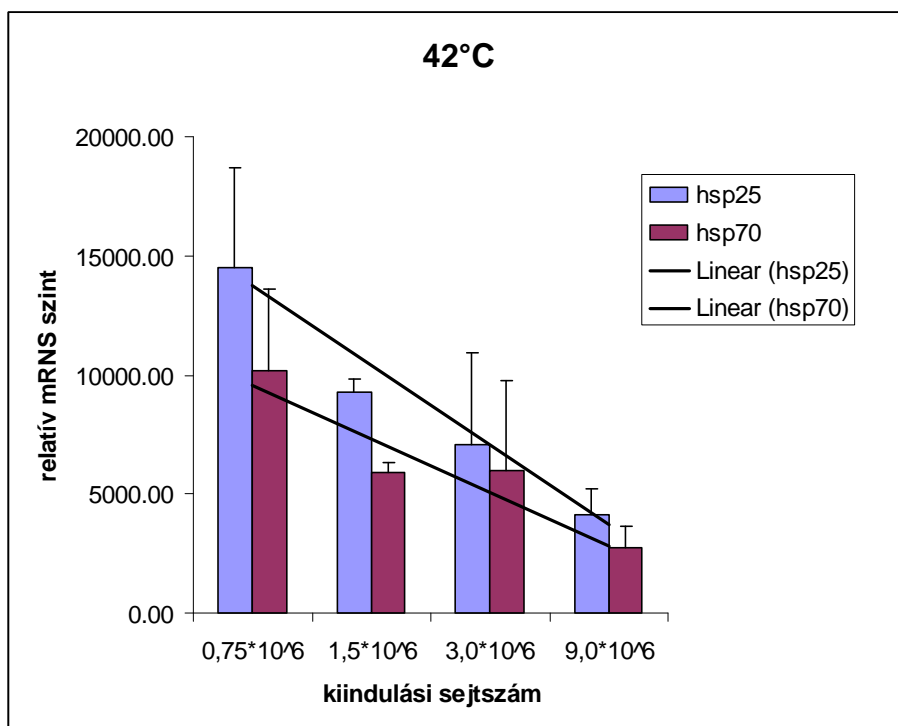


### Membránmódosítások sejt kultúrában - lipidváltozások a sejtszám növelésével:

Rendkívül érdekes kísérleti eredményekről számolhatunk be a következőkben, melyeket a fentebb ismertetett B16 sejt vonalon figyelhetünk meg. A sejteket különböző kezdeti sejtszámmal helyezve el a tenyésztő edényben már egy nap után drasztikus változásokat detektáltunk membránjaik zsírsav összetételében.

### A zsírsavak telítettségének változása a kezdeti sejtszám függvényében

Különösen kiemelnénk az egyszeresen telített zsírsavak (főként az olajsav) mintegy 50%-kal történő emelkedését, ill. az  $\omega 6$  sorozatba tartozóak (főként az arachidonsav) hasonló mértékű csökkenését. A jelenséget lipidomikai tömegspektrometriai módszerekkel is karakterizáltuk (ld. alább).



### A sejtszám változás hatása hsp70 ill. hsp25 indukcióra (Real Time PCR)

Mint azt a real time PCR segítségével nyert hsp70 ill. hsp25 mRNS indukciós adatokból leolvashatjuk, a sejtszám változtatás okozta membrán átrendeződés rendkívül szoros korrelációt mutat a 42°C-n kiváltható stresszválasz amplitúdójával. További izgalmas megfigyelésünk, hogy



alacsonyabb hőmérsékleten a hsp70/hsp25 mRNS arány szabályozódik a sejtszám változás - ill. valószínűleg az ezen keresztül létrejött lipid módosulás következtében.

### **Stressz-szignálok állatmodellekben - izolált szív:**

Az ischemias stressz elleni természetes védelem - a prekondicionálás - molekuláris mechanizmusainak feltárására végeztünk kísérleteket kooperációs partnereinkkel. Több, mint 31 megváltozott expressziójú gént azonosítottunk DNS microarray technikával ill. ellenőriztünk RT-PCR-rel. Az ischemia-és-vagy a prekondicionálás megváltoztatta többek közt a stressz választ, a fehérje lebontást, apoptozist valamint a metabolikus enzimeket szabályozó gének expresszióját. (*Onody A, Zvara A, Hackler L Jr, Vigh L, Ferdinandy P, Puskas LG. Effect of classic preconditioning on the gene expression pattern of rat hearts:a DNA microarray study.FEBS Lett. 2003; 536(1-3):35-40.*)

### **HSP alapú gyógyszerkutatás**

A Hsp-k mennyiségének változtatása számos esetben gyógyászati jelentőségű. A Hsp-k mesterséges indukciója elősegíti a sejtek túlélését diabeteszben és gátolja a neurodegeneratív betegségek (Alzheimer-, Parkinson-, Huntington-kór, prion betegségek) kialakulását. A kórosan magas celluláris Hsp szint farmakológiai gátlása ugyanakkor potenciális antitumor terápia. Az N-Gene Kutatási és Fejlesztési KFT-vel közös fejlesztési projektünk keretében felderítettük bizonyos hősokk fehérje indukciót elősegítő gyógyszerjelöltek szignálképzési útvonalait, melyek valószínűsíthetően szerepet játszanak a nitrogén monoxid (NO) rendszer működésében, valamint a HISS mediálta inzulin szignál érvényrejutásában is. A hatásmechanizmus értelmezésében elért eredményeinken túl messze a legfontosabb gyakorlati eredmény, hogy sikeresen befejeződött a kiválasztott vegyület, a BGP-15 inzulin érzékenyítő hatásának klinikai (Fázis II) vizsgálata inzulin rezisztenciában szenvedő betegeken. A jelen pályázat keretében egy specifikus öregedésmodellt, a spontán diabeteszes Goto-Kakizaki patkányokat vizsgáltuk a karakterizálható lipidom változások szempontjából (ld. alább). Csoportunk az N-Gene K-F Kft-vel együttműködve ill. a Biotchnológia 2003 valamint a DNT (RET) pályázat (SzTE-SzBK) keretében tovább folytatja az új, nem toxikus, neuroprotektív, Hsp indukcióra képes gyógyszerjelölt molekulák vizsgálatát, fejlesztését, vezérmolekulák kiválasztását.

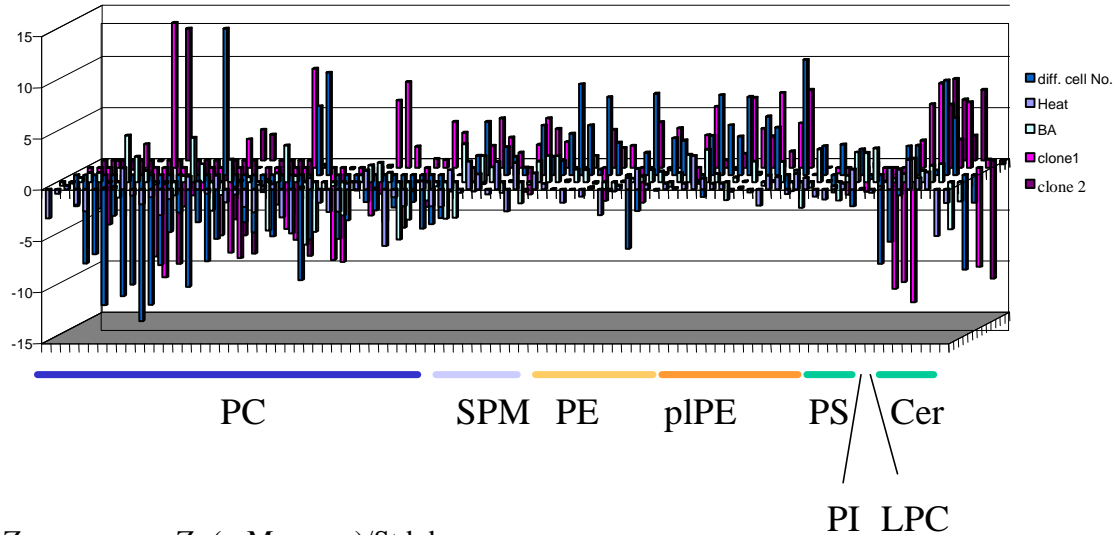
### **Módszer fejlesztés**

#### ***1. Lipidomika: A legkorszerűbb tömegspektrometriára (GC-MS, ESI-MS) épülő első hazai lipidomikai labor megteremtése.***

A Regensburgi Egyetemen közösen elindítottuk egy nagyhatékonyságú és nagy áteresztő képességű lipidomikai módszer közös fejlesztését. Az emlős sejtek stressz ill- egyéb stimulusokra -igy pl. a sejtszám változásra- adott lipidom szintű válaszána elemzése, valamint a lipidanyagcserét érintő transzgénikus egérmodellekből származó minták vizsgálata során megállapítottuk, hogy az új megközelítés rendkívül hatékony. Segítségével rövid idő alatt több száz lipid molekula speciest azonosítottunk, ill. meghatároztuk ezek mennyiségi összetételét. A projekt hazai megvalósítására az SZTE-vel kooperálva, a 2006 elején beállított nagy pontosságú és kiemelkedő érzékenységgű ESI-Q-TOF készülék segítségével kerül sor. A készülék beszerzését az OTKA Iskola pályázat tette lehetővé.

*Lipidomikai vizsgálat a "membránmódosítások sejt kultúrában" témakörben:*

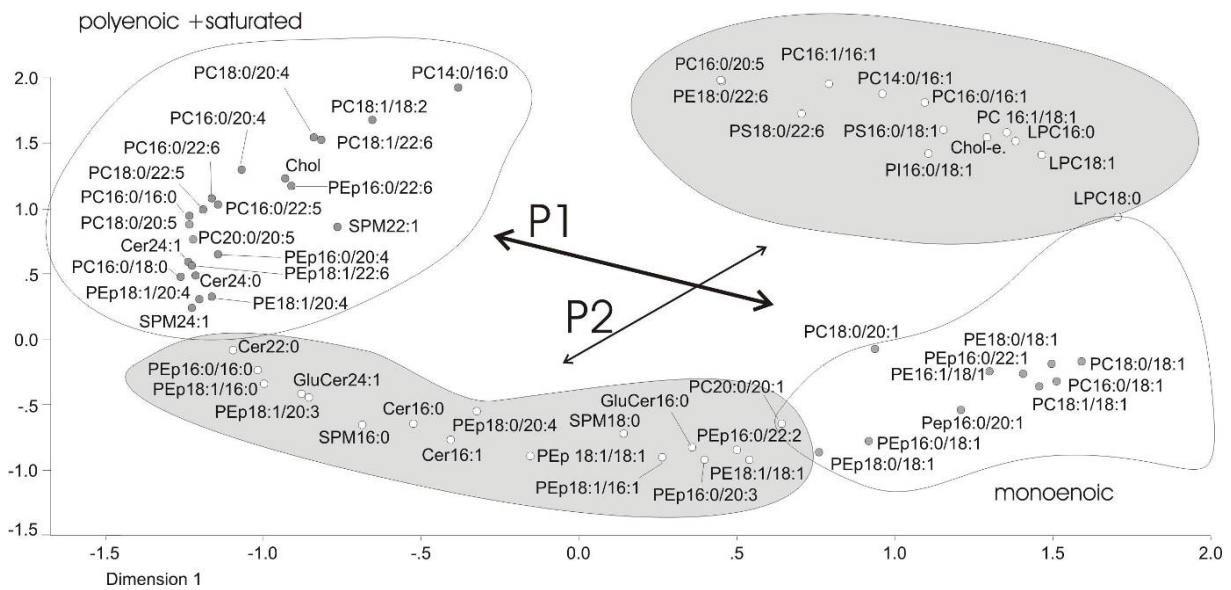
1. A lipidom változása a B16 sejteket ért különféle stimulusok következménye képpen. Vizsgálati csoportjainkat hőstressz, benzil alkohol stressz, klón szelekció, valamint a fentebb már kiemelten tárgyalt sejt szám változás hatásának tettük ki.



A B16 sejtek ESI MS/MS elemzéssel kapott lipidomjának (szelektált specieszek) változása. Az eltérések Z-értékek formájában kerültek ábrázolásra.

A fenti ábrával azt kívántuk szemléltetni, hogy milyen nagy mértékű változásokat, ill. milyen különleges mintázatot kapunk a fiziológias ill. stressz stimulusok hatására. A hatalmas mennyiségű adathból csak megfelelő statisztikai módszerekkel nyerhetők ki az információk, viszont ezen információk teljesen új megvilágításba, értelmezési keretbe helyezhetik a megfigyeléseket.

A következő ábrán a ugyanezen lipid molekula specieszek „együttmozgását” multidimenziós skálázás kétdimenziós terében ábrázoltuk. A főkomponens analízis eredményeit halmazokba rendezéssel és nyilakkal jelöltük. A csoportok kialakításához felhasználtuk még a hierahikus klaszterelemzést is.



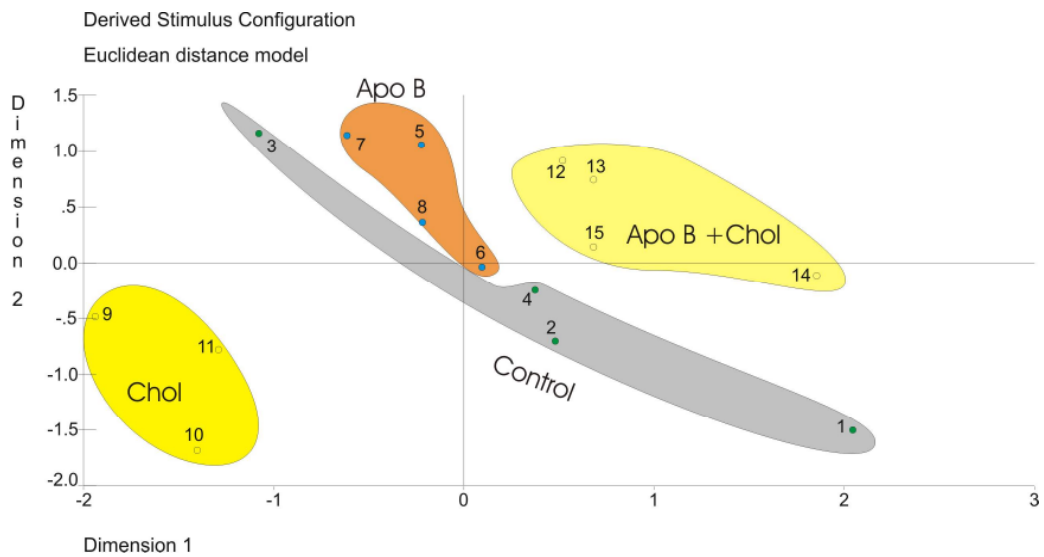
A P1 főkomponens által kijelölt halmazok reprezentálják a sejtszám változás hatására létrejövő molekulaszpecisz átrendeződéseket. A P2 komponens értelmezése további vizsgálatokat kíván. A főkomponensek mentén, de ellentétes irányban elhelyezkedő halmazok a párhuzamosan, de ellentétes előjellel lezajló változásokat jelzik.

Megjegyzésre érdemes, hogy a zsírsav analízis alapján kapott mintázatnál mennyivel árnyaltabb képet mutat a molekulaszpecisz szintű lipidomikai elemzés.

#### *Lipidomikai vizsgálat a "membránmódosítások állatmodelleken" témakörben:*

##### *A humán apolipoprotein B-100 fehérjét túltermelő koleszterin dús diétán tartott transzgenikus egerek lipidomikai elemzése*

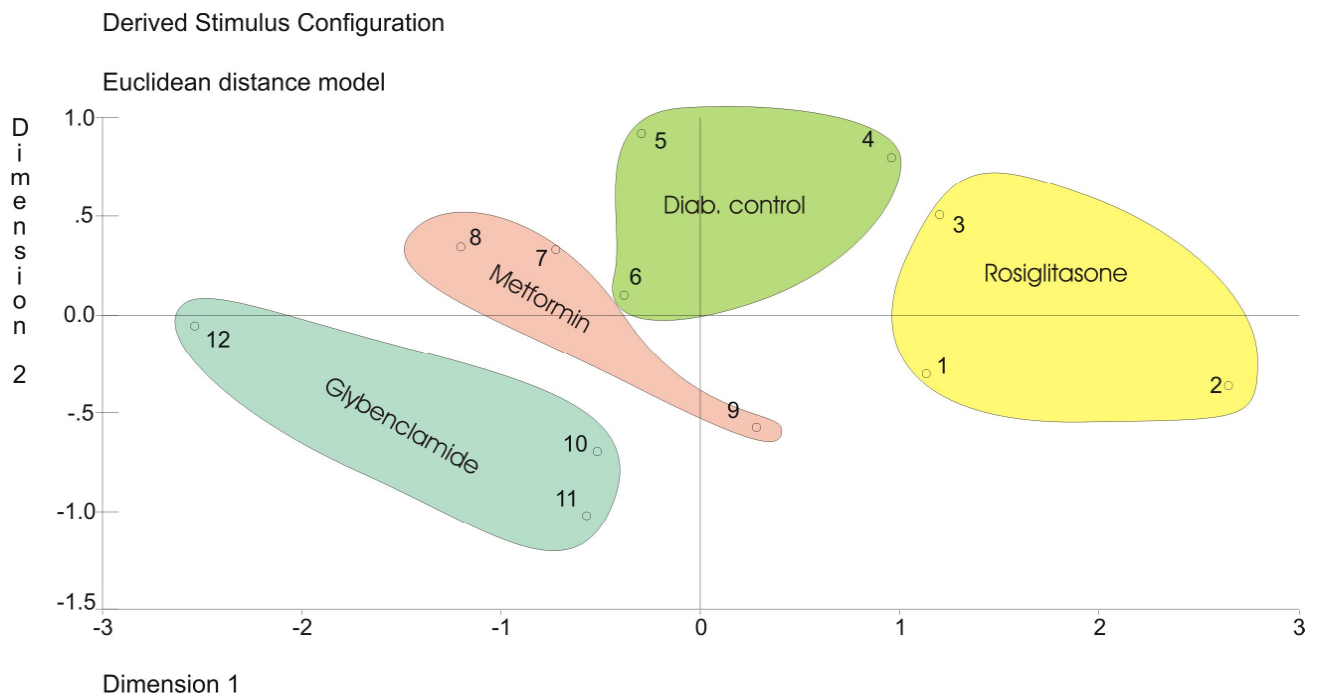
Az elmúlt időszakban Sántha Miklós előállított humán apolipoprotein B-100 fehérjét túltermelő transzgenikus egereket. Jelen vizsgálatunkban előzetesen megállapítottuk, hogy a 17 héten át koleszterol dús diétán tartott apoB-100 transzgenikus egerekben drasztikusan megemelkedett az LDL-hez kötött koleszterol szint és tartós hyperlipidémia alakult ki. A transzgenikus egerek májában, agyában és szívében emelkedett apoB-100 fehérje szint volt kimutatható. Az egerek agyából a membrán alkotó lipideket érintő teljes lipidomikai analízist végeztünk. A kapott eredmények ismertetése rendkívül nagy helyigényű, így itt csak egy adatszerkezet analízist mutatunk be: Az ismertetet statisztikai módszereket jelen esetben arra használtuk, hogy megvizsgáljuk, hogy az egyedi adataink milyen szórással rendelkeznek, mennyire különítik el a csoportokat, vagy éppen az is kiderülhet, hogy a kezelések, ill. a transzgén esetleg nem befolyásolta a lipidomot.



Az ábrán az egyes egerek agyából származó lipidek által kifestített teret látjuk, melyben az egyedi minták csoportokban helyezkednek el. A mintacsoportok kódjai: Control - kezeletlen wt egerek, Chol - koleszterin dús diétán tartott wt egerek, Apo B - transzgenikus egerek, Apo B +Chol - Apo B transzgenikus egerek koleszterin dús diétán tartva

A további elemzések szempontjából fontos információ, hogy a kontrollok jelentős szórása miatt további egereket kell bevonni a vizsgálatba, viszont igen szépen elkülönülő lipid változásokra számíthatunk, mind a transzgén, mind a koleszterin etetés jelentősen megváltoztatta az állatok agyának membránalkotó lipidjeit.

Hasonló elemzést mutatunk be a Goto-Kakizaki spontán diabeteszes patkányok szívéből. Az ábra az antidiabetikus kezeléseknek a lipidomra gyakorolt hatását szemlélteti. Lényegesnek tűnik, hogy a különböző gyógyszerek más és más módon hatnak a diabetes indukálta lipid anomáliákra, tehát a különböző antidiabetikus hatásmechanizmusuk tükröződik a lipidomban.



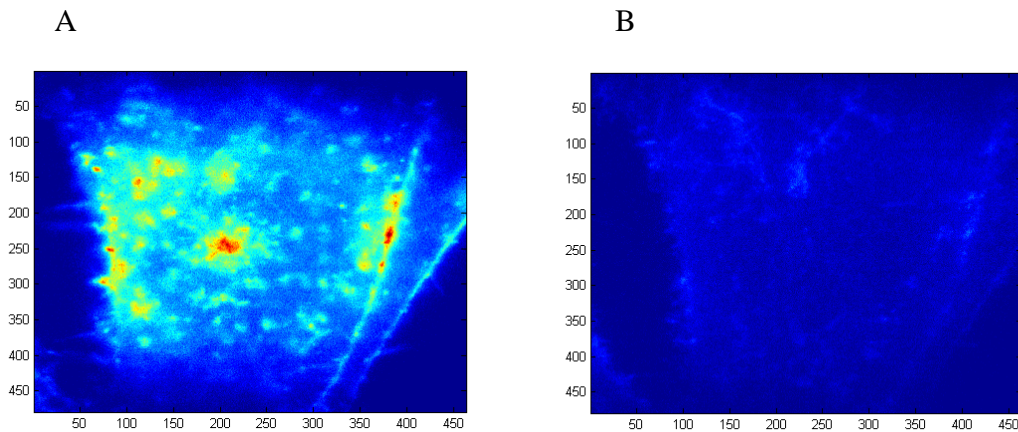
## **2. Ultraszenzitív, egyedi molekulák követésére alkalmas mikroszkópia:**

A Molekuláris stresszbiológiai csoportban az elmúlt években felállított laboratórium egy új technika, a Single Dye Tracing (SDT) révén lehetővé teszi egyedi, fluoreszcensen jelölt molekulák detektálását, illetve a molekulák mozgásának követését. A képalkotó rendszer 40 nm-es pontossággal képes megadni egy molekula térbeli helyzetét. Az időbeli felbontás a miliszekundumos tartományba esik, s ez módot ad egyes fiziológiai folyamatok *in situ*, *in vivo* monitorozására. Első kísérleteink elsősorban annak kiderítését célozták, hogy milyen fluoreszcensen jelölt molekulák alkalmasak arra, hogy stresszhatásra bekövetkező membrán szerkezet változások, mikrodomén átrendeződések riportereként szolgáljanak élő sejtekben. Teszteltünk továbbá fluoreszcens riporter konstrukciókkal transzfektált sejtvonalakat is, az optimális kópiaszámú és expressziós tulajdonságú klón kiválasztásának érdekében. A műszeregyüttes felépítése során nagyon sok technikai probléma merült fel, melyeket a pályázat korábbi éveiben sikeresen megoldottunk. Az elmúlt pályázati időszakban a technikába fektetett munka messzemenőig megtérült.

Stabil sejtvonalak létrehozását követően célul tűztük ki a különböző stresszfehérjék expressziójának (hsp promoter-fluoreszcens riporter fehérje fúzió) és lokalizációjának (HSP-fluoreszcens fehérje) vizsgálatát. A laboratóriumunkban felállított ultraszenzitív mikroszkóp lehetővé teszi tárgylemezre növesztett sejtek rendkívül gyors pásztázását akár több négyzetmilliméteres felületen is. Ennek segítségével az elmúlt időszakban sikeresen beállítottunk egy képanalízisen alapuló sejt citometriai módszert, mely nagyszámú sejt esetén teszi lehetővé egyes sejtek térbeli és időbeli jellemzésének statisztikus analízisét. Ennek segítségével meghatároztuk a hsp70 promoter-YFP indukciójának kinetikáját mely rávilágított, hogy B16 sejtek között több, eltérő intenzitású stresszválaszt produkáló sejt populáció létezik. A bevezetett technika előnye más citometriás módszerekkel szemben (pl. FACS), hogy az eltérő választ adó sejtek kezdeti állapota (morfológia, vizsgált stressz fehérje koncentrációja, membrán fizikai szerkezete stb.) összeköthető az adott sejt bizonyos kezelésre adott válaszával, így az ok-okozati összefüggés kiemelhető a kiátlagolt sejtválaszból.

A stresszfehérjék sejtmembránokkal történő asszociációjának vizsgálatához létrehozott HSP27-EGFP, valamint HSP90-EGFP fúziós riporter konstrukciót stabilan expresszáló sejteken vizsgáltuk ezen fehérjék sejten belüli lokalizációját. A magas citoszolikus koncentráció okozta erős háttérfluoreszcencia akadályozza ezen fehérjék membránhoz kötődésének követését. Ezt a kísérleti nehézséget valamint minden egyéb membránból tudósító fluoreszcens jelölésnek követését teszi lehetővé a teljes fényvisszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópia (TIRF FM), melyet a pályázat elmúlt időszakában sikeresen beállítottunk. Ebben az üzemmódban az üveg/médium határon teljesen visszaverődő fény csak egy nagyon kis távolságra (kb. az alkalmazott hullámhossz feléig) hatol a médiumban lévő mintába (evaneszcens mező). E tulajdonság teszi ezt a módszert felület specifikussá és mivel a letapadt sejtek plazmamembránja pontosan ebbe a régióba esik, membrán specifikussá is. A beállított új technikával elkezdtük a különböző fluoreszcens riporterrel fuzionált stressz fehérje konstrukciók *in vivo* követését valamint fixált sejteken fluoreszcens ellenanyagok felhasználásával a stresszfehérjék stressz hatására történő membránasszociációjának analízisét.

A sejtmembránok mikroheterogenitásának, fizikai szerkezetének valamint a membránokban zajló (stressz)jelképző és jelátviteli folyamatok tér-idő vizsgálatához különlegesen nagy segítséget jelent a zavaró celluláris háttérfluoreszcencia kiszűrését eredményező TIRF üzemmód, mellyel mind sejteken, mind modell membránokon minden eddiginél nagyobb pontossággal válnak követhetővé a stressz közbeni membrán események.



**5. ábra.** A membránfluidizáló benzilalkohol (BA) a membránokban Bodipy-GM1 ganglioziddal festhető protein-lipid raftok átrendeződését eredményezi. A: control; B: 40mM BA

Membrán modellként bevezettük az óriás unilamelláris vezikulákat (GUV), melyek segítségével sikerrel modelleztük a lipid membránokban kialakuló csökkentett fluiditású membrán mezőket „raftokat”. Koleszterol, szfingomielin és foszfatidilkolin lipidek különböző keverékeivel különböző arányú és minőségű raft modelleket állítottunk be. Fluoreszcens szfingomielin ill. GM1 gangliozid lipid próbával jelölt modell membránokon valamint B16 sejteken TIRF mikroszkópiával jellemeztük az egyaránt membránfluiditást és stressz választ módosító kezelések (hő, benzilalkohol) hatását a membránok mikroheterogén szerveződésére (5.ábra).

## Összefoglalás

A 2005-ben befejezett munka során széles kísérleti háttere, különböző sejtes modellekre alapozva szisztematikus munkával igazoltuk az un. “membrán szenzor” hipotézis univerzális érvényességét. A stresszfehérje (molekuláris chaperon) válasz sejt- és molekuláris hátterének egy teljesen új aspektusát tártuk fel, amikor is a stresszválasz primér jelképző funkcióját nem a proteotoxicitás, hanem a membránok lipidfázisa által kontrolált állapotváltozások látják el. A membránok lipid-lipid ill. lipid-fehérje kölcsönhatásaiban (“molekuláris kapcsolók”) stressz (pld. magashőmérséklet) által kiváltott változásokat a membránok fehérje és lipidösszetételének ill. mikrodomén szintű finomszerveződésének szintjén követtük. Igazoltuk a stresszfehérjék lipidmediálta kölcsönhatásait. Kutatásaink újgenerációs gyógyszerek (pld. hidroximsavszármazékok) kifejlesztését alapozták meg. Ezek a stresszfehérje szintézis megfelelő kontrolljával olyan patológiás állapotok gyógyítását teszik lehetővé, mint a 2. típusú diabétesz, vagy a neurodegeneratív betegségek.