

## LIPID-MEMBRÁN ISKOLA A SZEGEDI BIOLÓGIAI KÖZPONTBAN (Zárójelentés)

### Bevezetés:

Farkas Tibor akadémikus 2003 végén bekövetkezett tragikus halála miatt a program vezetését az OTKA Bizottság jóváhagyása alapján Vígh László vette át. A volt témafelelős olyan űrt hagyott maga után, melyet éppen az általa alapított Lipid-Membrán Iskolának kötelessége betölteni. Munkatervünkben illetőleg a személyi összetételben az eredeti tervhez képest a fentiekén túl is történtek szükségszerű változások (hosszú táppénz ill. szülési szabadság, stb.), de mindezek – igyekezetünk szerint - az elvégzett munka érdemi részét nem befolyásolták.

Az elmúlt három évben a Vígh László vezette Molekuláris Streszbizológiai csoport, valamint a pályázat többi résztvevője (Joó Ferenc, Medzihradzky Katalin, Penke Botond, Boros Imre, Puskás László valamint Sántha Miklós csoportjai) rendkívül hatékony együttműködést valósítottak meg, melyet számos közös közlemény bizonyít, és ezt a kooperációs aktivitást és integrációs törekvést jelentésünk szerkezetében is kifejezésre juttattuk.

### **A membránok lipidösszetételének és fizikai állapotának változásai a membránváltozással járó betegségmodellekben és az öregedésben: a stresszválasz membránkapcsolatának molekuláris térképezése - orvosbiológiai perspektívák:**

#### *Lipid terápia állatmodellekben*

A Farkas Tibor által vezetett csoport a Funkcionális Genomika Csoporttal együttműködésben, majd a későbbiekben főként Puskás László által koordinált kutatásokban elsősorban génkifejeződési mintázat meghatározásával foglalkoztunk és arra a kérdésre kerestük a választ, hogy adott összetételű diéta (különböző esszenciális zsírsavfajtákban ill. koleszterinben szegény illetve dúsított) hogyan befolyásolja a géneexpressziót.

A koleszterin, valamint a koleszterin és a többszörösen telítetlen zsírsavakban gazdag halolaj együttes diétás hatását tanulmányoztuk egér modellben. Azokra a génekre koncentráltunk, amelyeknek a kifejeződése a különböző diétás hatásra várhatóan változást mutatnak. A szövetek közül a szemet és az agyat vizsgáltuk.

Transzkripciós szinten elsősorban azokra a génekre koncentráltunk, amelyek transzkripciós faktorokat, zsírsavkötő fehérjéket és a gyulladási folyamatokban résztvevő fontos fehérjéket kódolnak. Több olyan génnek a megváltozott kifejeződését detektáltuk, amelyek a gyulladási folyamatokban vesznek részt. Fontos megjegyezni, hogy a koleszterinnel kombinált halolaj etetés (ami így magas zsírbevitelt jelentett) több gyulladásra specifikus markergén kifejeződését is megemelte (pl. COX-1, COX-2, ICAM-1). Zsírsavkötő fehérjék génei közül kiemelkedő jelentőségű volt, hogy az agyban elsőként találtuk meg a máj sejtre jellemző (L-típusú FABP) gén kifejeződését is. Ennek jelentőségét érdemes lesz tovább kutatni.

A koleszterint és halolajat tartalmazó diéta zsírsavösszetételre gyakorolt hatását szintén a szemben és az agyban vizsgáltuk meg. 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. A koleszterinben és halolajban gazdag diéták szemre és agyra gyakorolt hatásait a "Biochimie" c. folyóiratban közzétük (**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.**).

A továbbiakban apoB transzgenikus egerekben (ld. még alább) fogjuk a génexpressziós és membránösszetételbeli különbségeket megvizsgálni több szervre kiterjedően. A funkcionális tesztek kooperációban (pl. szív iszkémia Ferdinandy Péter laborjában) végezzük el.

Jelen munkaszakaszban csoportunk a többszörösen telítetlen zsírsavakban hiányos táppal etetett patkányok agyi génexpresszióját is követtük, kontroll teljes táppal etetett állatokhoz viszonyítva. Több olyan a normálistól eltérő kifejeződésű gént is sikerült azonosítanunk, amelyek többek között a tanulási folyamatokban, az energiaháztartásban is részt vesznek. Az egyik legérdekesebb változást talán abban a zink transzportert kódoló gén esetében találtuk, amely az agy zink-háztartásában fontos szerepet kap.

Kimutattuk, hogy a ZnT3 gén kifejeződése fokozódik, amit valósidejű kvantitatív PCR segítségével igazoltunk. Ez a fokozott aktivitás csökkent szérumban és CSF cink szintet eredményezett. A cink háztartás központi idegrendszerben történő felborulását a legjobban az demonstrálta, hogy a hippocampusban a szabad cink szignifikáns mértékben megemelkedett. Köztudott, hogy a normálistól eltérő cink koncentrációja a különböző fehérjék aggregációját elősegíti, ami felgyorsíthatja az Alzheimer-kór kialakulását. Ezért azt feltételezzük, hogy az embrionális és korai életkorban a többszörösen telítetlen zsírsavak hiánya keltette cink homeosztázis zavara a későbbiekben neurodegeneratív megbetegedések kockázatát megemeli. (**Kitajka K, Sinclair AJ, Weisinger RS, Weisinger HS, Mathai M, Jayasooriya AP, Halver JE, Puskas LG. Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jul 27;101(30):10931-6.**).

A projekt időtartama alatt adriamicinnel, és adriamicin és melatoninnal kezelt patkányokat vizsgáltunk zsírsavösszetétel és génexpresszió szinten máj szövetben.

A zsírsavanalízis során a különböző típusú zsírsavak relatív mennyiségét határoztuk meg. A kísérletben azt az eredményt kaptuk, hogy a kontroll állatokhoz képest a többszörösen telítetlen zsírsavak mennyisége lecsökkent az adriamicinnel kezelt állatok májában. Ez a csökkenés szignifikánsan kisebb volt, amikor az adriamicin mellett melatonint is kaptak az állatok.

A zsírsav analízis mellett génexpressziós vizsgálatokat patkányspecifikus génpróbákat felhasználva végeztük el valósidejű PCR technika segítségével.

Az RNS tisztítás után oxidatív stresszben szerepet játszó összesen 60 releváns gén kifejeződését vizsgáltuk meg minden egyes állatból (csoportonként 4 állatot felhasználva) egyedi PCR-ekkel. A hipoxantin-foszforiboziltranszferáz és a beta-tubulin gént használtuk normalizációra. Kimutattuk, hogy öt gén esetében a melatonin csökkentette az adriamicin által indukált génkifejeződést (hsp70, hsp90, ccnc, fmo1, dnaja1), míg hét gén fokozottabb overexpressziót mutatott (cxcl10, cdkn1a, gadd45b, por, nos2a, tnfsf6, tnfsf10).

Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy a melatonin nem csak közvetlenül (illetve a lipidperoxidáció következményeként) az oxidációs génekre hatnak, hanem számos olyan gén kifejeződését is befolyásolják, amelyek TNF receptorkötésben, ciklin-szabályozta utakban is szerepet játszanak. A melatonin csökkenti a lipidperoxidációt, ami általában a hősokkválaszban (és fehérje renaturációban) szerepet játszó hősokkfehérjék csökkent aktivációjához vezet. A kapott eredmények alátámasztották a zsírsavanalízis eredményeit. Sok olyan gén kifejeződése normalizálódott a melatonin hatására, amely a kontrollhoz képest az adriamicinnel kezelt állatokban megváltozott.

Több olyan kulcsfontosságú gént sikerült azonosítanunk, amely szerepet játszhat a lipidperoxidáció mellékhatásainak kivédésében és amely közvetett úton a jelátviteli rendszert és a sejtfunkciókat negatívan befolyásolják. Ezen munkáinkból több publikáció született (**Angel Catalá, Ágnes Zvara, László G. Puskás, Klára Kitajka (2006) Melatonin induced gene expression changes and its**

*preventive effects on adryamicin induced lipid peroxidation in rat liver. J. Pineal Res. (under submission), Jayasooriya AP, Ackland ML, Mathai ML, Sinclair AJ, Weisinger HS, Weisinger RS, Halver JE, Kitajka K, Puskas LG. Perinatal omega-3 polyunsaturated fatty acid supply modifies brain zinc homeostasis during adulthood. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 May 17;102(20):7133-8.), Laszlo G. Puskas, Klara Kitajka, Andrew J. Sinclair (2006) Regulation of genetic information by omega 3 fatty acids. British Journal of Nutrition Society (in press).*

A pályázati időszak utolsó részében sikerrel alkalmaztuk a fehérjecsip technológiát több fehérjének a párhuzamos kimutatására. Ezzel a módszerrel sikerült több olyan fehérjét azonosítanunk, amelyek az agyban magas koncentrációban rendelkezésre álló többszörösen telítetlen zsírsav miatt a normálistól eltérő kifejeződési szintet mutat. Ezek közül kiemelkedik néhány gén, amelyek a raftképzésben szerepet játszanak. Így sikerült igazolnunk, hogy a magas koleszterin diéta az agyi raftokra is hatással van. Ennek a munkának az eredményeit a közeljövőben kívánjuk közzé tenni.

## **Öregedés- és betegségmodellek: a membrántól a stresszválaszon át a membránig**

### ***Jelátviteli folyamatok sejtmodelleken - kutatások a Vigh László vezette Molekuláris Stresszbiológiai csoportban:***

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 benzyl alkohol (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 hősokk gének expressziója membráneredetű stressz során, ill. különböző hőmérsékleteken. Az indukciók nagysága alapján a BA kezelés a 41 °C-os ún. „enyhébb” hősokkhoz 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 HSF (hősokk faktor 1) transzkripciós faktor irányítja a hsp promoterekben található HSE-ken (hősokk elemek) 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 riporter 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 növekedéséhez 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 hősokk 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.

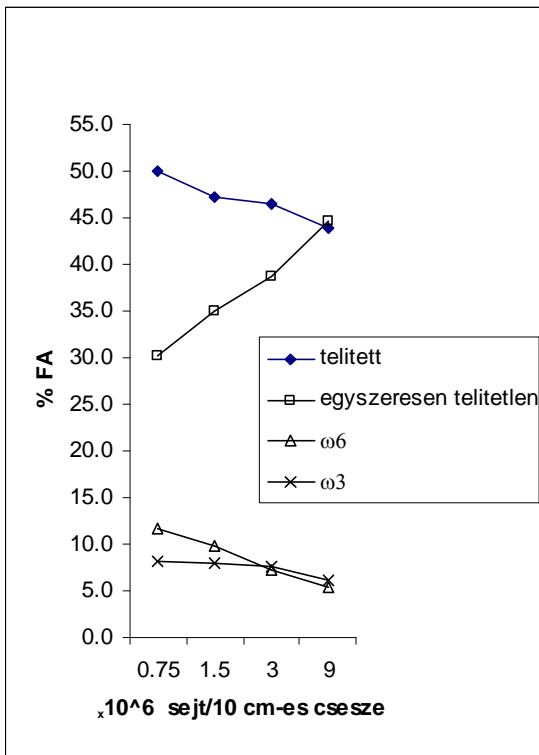
Fenti eredményeinket hamarosan publikáljuk, míg az ezeket a kísérleteket megalapozó munkánk 2005-ben jelent meg (**Balogh G, Horváth I, Nagy E, Hoyk Z, Benkő S, Bensaude O, Vígh L. The hyperfluidization of mammalian cell membranes acts as a signal to initiate the heat shock protein response. FEBS J. 200; 272: 6077-86.**), melyben elsőként bizonyítottuk a hő és a BA membránfluidizáló ill. stresszválaszt indukáló hatásának szoros összefüggését. Rámutattunk 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”:***

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 órással 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.

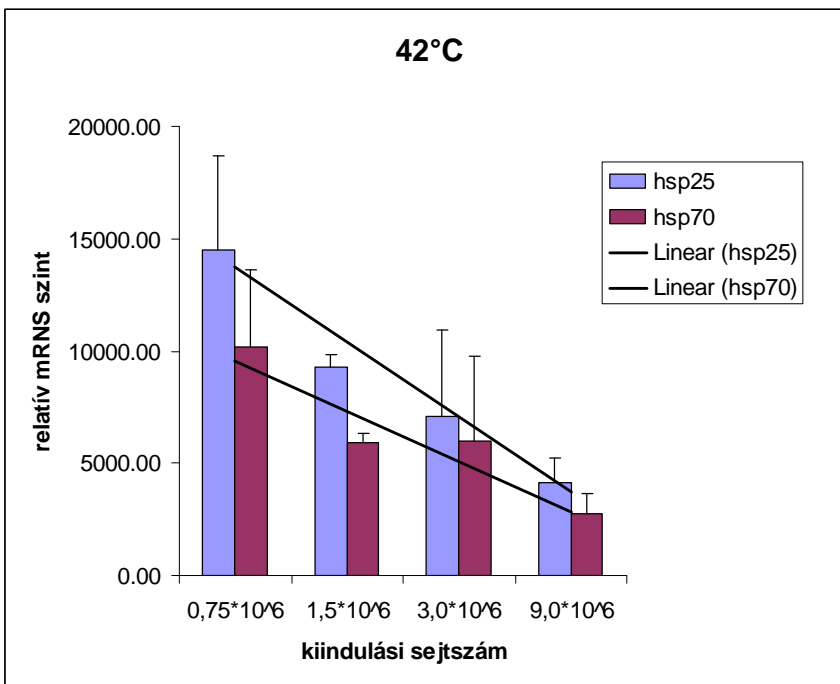
#### ***Membránmódosítások sejt kultúrában - sejtöregítés a sejtszám növelésével:***

Rendkívül érdekes kísérleti eredményekről számolhatunk be a következőkben, melyeket a fentebb ismertetett B16 sejt vonalon figyelhettünk meg. A sejteket különböző kezdeti sejtszámmal helyezve el a tenyésztő edényben már egy nap után dramatikus 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 ω6 sorozatba tartozók (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.

#### ***Stresszválasz membrántól membránig modellszervezeteken:***

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 termotolerancia 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 átrendeződése 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 annak aktuális fizikai állapota, 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 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 monoglükozildiacilglicerol 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 nemkettősretegű 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. (***Balogi, Z., Török, Z., Balogh, G., Jósavay, 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.***)

#### ***Membránmódosítások katalitikus hidrogénezéssel:***

A membránlipid telítetlenség funkcionális tanulmányozásának egyik legcélravezetőbb módja az lehet, ha szelektíven, katalitikus hidrogénezés segítségével megváltoztatjuk a lipid alkilánccok telítetlenségét és vizsgáljuk annak hatását. A emlős sejtek *in vivo* hidrogénezésének érdekében új katalizátor családok kifejlesztése vált szükségessé.

Az alap kutatások a Debreceni Egyetem Fizikai-Kémiai Intézetének Homogén Katalízis Kutatócsoportjában folytak Joó Ferenc vezetésével. Az emlős sejteken végzett kísérletek Vigh László csoportjával szoros kooperációban zajlottak.

Az első évben különböző forrásból származó lipidek, illetve lipid keverékek MALDI-TOF-MS technikával történő vizsgálatára dolgoztunk ki eljárásokat, valamint ezen tömegspektrometriás módszerrel követtük az egyedi lipidek hidrogénezéssel szembeni reaktivitását. A MALDI lehetővé tette

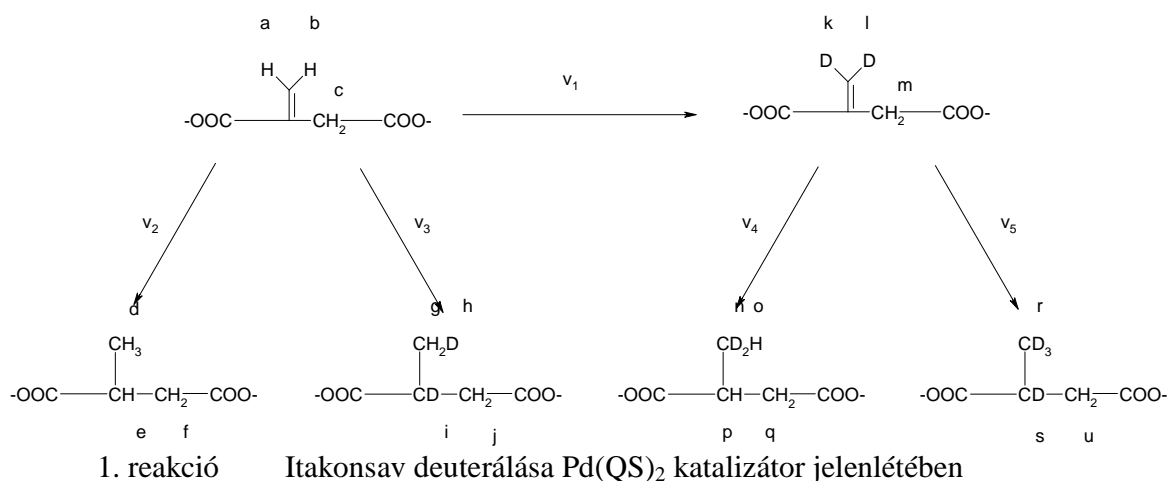
a hidrogénezés hatásának lipid szintű detektálását, ami azt jelenti, hogy lipid keverékekben meg tudtuk adni az *egyres komponensekre* vonatkozó hidrogénezési konverziókat.

A következő időszakban kísérleteink elsődlegesen az N-heterociklusos karbén ligandumot tartalmazó hidrogénező katalizátorok vizsgálatára irányultak. 1-butil-3-metilimidazólium kloridból és az  $[RuCl_2(C_4H_{10})_2]$  összetételű Ru(II)-komplexből kiindulva ( $C_4H_{10} = p$ -izopropil-toluol,  $p$ -cimol) előállítottuk az (1) Ru(II)-komplexet. Az ilyen típusú hidrogénező katalizátorok jelentőségét a pályázat szempontjából az adja, hogy az imidazólium só szubsztituensei igény szerint választhatók meg, így pl. lehetőség van hosszú szénláncú, vagy a lánc végén funkciós csoportot tartalmazó ligandum előállítására, melynek révén a katalizátor membránon belüli elhelyezkedése befolyásolható.

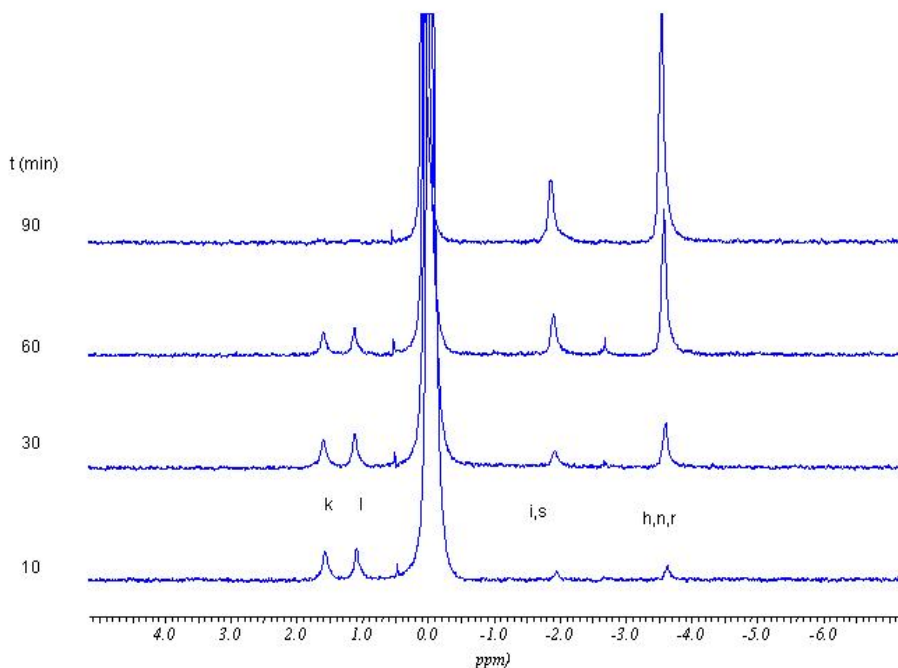
Megvizsgáltuk a katalizátor disszociációs egyensúlyait vizes közegben. Megállapítottuk, hogy a komplex a víz hatására kloridot veszít és a megfelelő akva-komplexszé alakul. Hidrogénező aktivitását ez az egyensúly lényegesen nem befolyásolja, de sajnos az abszolút aktivitása a lipidek (sejtek) hidrogénezéséhez alkalmazható hőmérsékleten csekélynek bizonyult. (*Csabai P; Joó F: Synthesis and Catalytic properties of New Water-Soluble Ruthenium(II) –N-Heterocyclic Carbene Complexes. Organometallics 23: 5640-5643*)

A program utolsó évében vizsgálataink elsődlegesen a lipideknek a kettősrétegben való elhelyezkedésére és mobilitásuk vizsgálatára irányultak. E célból módszert dolgoztunk ki deuteralált lipidek előállítására katalizált deutérium-átvitellel  $H_2/D_2O$  rendszerben (azaz nem deutérium gáz felhasználásával), vízoldható hidrogénező katalizátorok segítségével. A deutérium beépülése a lipidekbe mind tömegspektrometriás, mind mágneses magrezonancia (NMR) módszerekkel jól követhető. A deuteralált lipidek mágneses magrezonancia (NMR) módszerrel való vizsgálata információt nyújthat a lipidmolekula elhelyezkedéséről a membránon belül, valamint mobilitásáról a kettősrétegben. Úgynevezett NMR diffúziós mérésekkel vizsgáltuk továbbá víz, mint passzív transzporttal jellemezhető kismolekula diffúzióját a kettős lipidrétegen keresztül; ezeket a vizsgálatokat más kismolekulákra is ki kívánjuk terjeszteni.

A deuteralált lipidek NMR vizsgálatának előkészítéséhez modellreakcióként az itakonsav deuteralálását végeztük el palládium-alizarinszulfonsavas nátrium komplex ( $[Pd(QS)_2]$ ) jelenlétében,  $D_2O/H_2$  rendszerben (1. reakció).

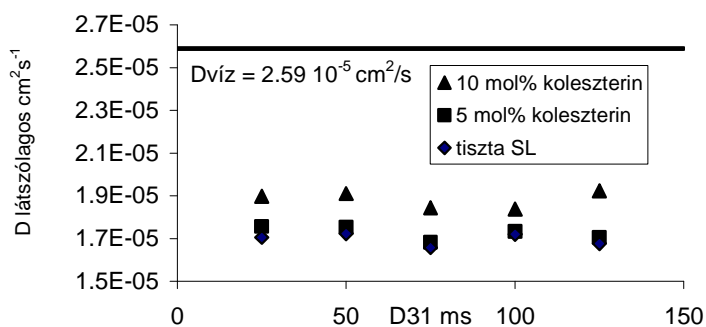


A reakciót a szakaszos mintavételezés módszerével, deutérium-NMR spektrumok felvételével követtük. Az eddig alkalmazott  $^1H$ -NMR és  $^{13}C$ -NMR vizsgálatokhoz képest új információként itt közvetlen bizonyítékot találtunk a többszörös deuteralálást okozó addíciós- $\beta$ -eliminációs lépésre: köztiterméként detektáltuk a telítetlen, ámde deutériumot tartalmazó itakonsav jeleit (1. ábra).



1. ábra Itakonsav deuterálása Pd(QS)<sub>2</sub> katalizátor jelenlétében: deutérium-NMR spektrumok (reakciókörülmények:  $c_{\text{itakonsav}} = 0,15 \text{ M}$ ,  $c_{\text{Pd(QS)}_2} = 2,54 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ , oldószer: D<sub>2</sub>O,  $p_{\text{H}_2} = 1 \text{ bar}$ ,  $t = 24 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Mérési körülmények: Bruker Avance 360 készülék, 55.26 MHz, 20 °C

NMR diffúziós mérések keretében különböző méretű és összetételű liposzómákat készítettünk és vizsgáltuk, hogyan alakul a víz diffúziója a lipidmembránon keresztül. A mérés kalibrálása tiszta víz diffúziójának mérésével történt, több mérési paraméter változtatásával. Ilyen paraméter pl. a D31-gyel jelölt, úgynevezett „bolyongási idő”, melytől való függés a gátolt diffúzió egyik fontos ismérve. Különböző arányban koleszterint is tartalmazó modell-liposzómák vizes diszperziójában azt tapasztaltuk, hogy a diffúziós állandó kisebb, mint a szabad víz esetében mért érték, ezenkívül a koleszterin arányának növekedésével a víz diffúziós állandója is nőtt (2. ábra). Ugyanakkor nem tapasztaltunk jelentős függést D31-től, az úgynevezett „bolyongási időtől”, ami azt jelenti, hogy a membrán a víz számára az NMR időskálán viszonylag gyorsan átjárható.





2. ábra Látszólagos diffúziós együtthatók változása a koleszterintartalommal. A vízszintes vonal a tiszta víz diffúziós együtthatóját jelzi. Mérési körülmények:  $c_{\text{lipid}}=0.05$  M,  $d_{\text{liposzóma}}=200$  nm, Bruker DRX 500 készülék 500 MHz, GCSTE mérési szekvencia, 30 °C

Az ilyen típusú vizsgálatoktól azt várjuk, hogy  $^1\text{H}$ -, de főként  $^2\text{D}$ - és  $^{31}\text{P}$ -NMR mérésekkel elkülönítetten meg tudjuk határozni a kettős rétegben „szabodon” mozgó ill. a raft-ban „kötött” lipid molekulák átlagos diffúzió állandóját.

A vízzeloldható hidrogénező katalizátorok lényeges jellemzője a sztereoszelektivitás. A lipidek vizsgálatában is alkalmazott  $[\{\text{RuCl}_2(\text{mtppps})_2\}_2]$  (mtppps = monoszulfonált trifenilfoszfin) katalizátor sztereoszelektivitását diszubsztituált alkinek hidrogénezésében vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy az nagy mértékben függ a vizes közeg pH-jától.

### **A lipid – chaperone kapcsolatok jellemzése**

Az sHSP-k (kismolekulású stresszfehérjék) a molekuláris chaperonok olyan családját alkotják, melyek képesek részlegesen denaturálódott fehérjék irreverzibilis aggregációját gátolni. Ezek a hőszokk 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). Korábban elért *in vitro* eredményeink szerint az sHSP-k a lipidek fejcsoportjával hatnak kölcsön, sőt e fehérjék kiszélesítik a folyadékkristályos fázis hőmérséklet tartományát. Ily módon a kismolekulású stresszfehérjék képesek védeni mind a hidegstressz okozta gélfázis képződés, mind a magas hőmérsékletek tartományában bekövetkező folyadékkristályos-fordított hexagonális fázistranzíció membránok épségét veszélyeztető hatásai ellen.

#### ***Kismolekulású Hsp fehérjék túltermelése szövetkultúrában:***

Sántha Miklós laboratóriumában kismolekulású hőszokk-fehérjék membrán fizikai állapot-függő regulációjának ill. membránasszociációjuk mechanizmusának és szerepének megértése céljából már az első évben több olyan emlős sejtvonalat (humán HeLa, egér B16 és patkány H9c2) hoztunk létre, amelyekben bizonyos kismolekulású Hsp fehérjék ( $\alpha\text{B}$ -crystalline, hsp27, HSPB2 és HSPB3) konstitutívan túltermelődnek. Ezekben a konstrukciókban a hőszokk fehérjék a human elongációs factor  $-1\alpha$  gén promóteréről működnek, a keletkező fehérjék kimutatását V5 epitope-tag, a fehérjék tisztítását egy 6x His-tag segíti elő. Olyan konstrukciókat is készítettünk, ahol a hsp cDNS-eket az erős, virális (CMV) promóter hajtja meg (pCMV-  $\alpha\text{B}$ -crystalline és pCMV- hsp27) és ezáltal a hsp fehérjék masszív túltermelését biztosítja.

A kismolekulású hőszokk fehérjék sokrétű kölcsönhatásának tanulmányozására olyan sejtvonalakat állítottunk elő, amelyek két hőszokk fehérje egyidejű túltermelését teszi lehetővé ugyanabban a sejtben. Erre a célra olyan klónozó vektort használtunk, amelyben az encephalomyocarditis vírus (ECMV) internal ribosome entry site-ja (IRES) biztosítja a két fehérje bicisztronikus kifejeződését. Ilyen génkonstrukciónk a p $\alpha\text{B}$ -crystalline-IRES- hsp27 és a pHSPB2-IRES-HSPB3.

A hőszokk fehérjék folyamatos túltermelése mellett, különösen érdeklődésünkre tartanak számot azok a sejtvonalak, amelyekben a hőszokk fehérjék indukció hatására termelődnek túl. Erre a célra az Invitrogen cég tetracyclin regulációt biztosító, T-Rex rendszerét alkalmaztuk. A tetracyclin operátor szekvenciát és a hsp27 génjét tartalmazó (pcDNA4/TO-hsp27) vektort a tetracyclin represszor

molekulát termelő (pcDNA6/TR) plazmival együtt kotranszfectáltuk egér eredetű B16 sejtvonalba. Másik indukálható rendszerünk a hsp70 fehérje tetracyclin indukcióját teszi lehetővé.

A kismolsúlyú hősokk-fehérjék egymás közötti és más fehérjékkel történő kölcsönhatása a különböző szövetekben igen sokrétű és összetett. Ezen folyamatok tanulmányozására olyan génkonstrukciókat hoztunk létre, amelyek azt biztosítják, hogy a hsp fehérjék fluoreszcens fehérjékkel fuzionáltan fejeződjenek ki, lehetővé téve ezzel a kismolsúlyú fehérjék kölcsönhatásainak, sejten belüli mozgásának, szignáltranszdukcióban betöltött szerepének részletes és pontos megfigyelését és nyomonkövetését (phsp27-EGFP, p $\alpha$ Bcrystalline-DsRed illetve pEGFP-hsp90, pnNOS-DsRed és phsp70-hrGFP). A fúziós fehérjéket PCR klónozással hoztuk létre és a fehérje molekulák sikeres „in frame” fúzióját DNS szekvenálással ellenőriztük.

Összefoglalva a három év alatt a következő hsp fehérje túltermelő sejtvonalakat hoztuk létre:

	<b>Génkonstrukció</b>	<b>Transzformált sejtvonal</b>	<b>Szelekció</b>	<b>Szelektált klónok száma</b>	<b>Expresszálo klónok száma (Western blot Pozitív)</b>
1.	pEFhsp27	HeLa (V.L.)	Zeocin 200 $\mu$ g/ml	3	2
2.	pEFhsp27	H9c2	Zeocin 400 $\mu$ g/ml	3	2
3.	pEFhsp27	B16	Zeocin 100 $\mu$ g/ml	5	3
4.	pEFhsp27	293 (JC)	Zeocin 300 $\mu$ g/ml	21	8
5.	Tet indukció (pcDNA4/TO-hsp27 pcDNA6/TR)	B16	Zeocin 30 $\mu$ g/ml + Blasticidin 5 $\mu$ g/ml	5	1
6.	phsp27-EGFP fusion	B16	G418 500 $\mu$ g/ml	14	4 (fluoresz.)
7.	phsp27-EGFP fusion	H9c2	G418 400 $\mu$ g/ml	Clone #2/2 #8	2 (fluoresz.)
8.	pHSPB2-IRES-HSPB3	HeLa (V.L.)	G418 400 $\mu$ g/ml	9	2
9.	pHSPB2-IRES-HSPB3	H9c2	G418 400 $\mu$ g/ml	Clone #2/2 #3, #9	2
10.	phsp27-EGFP fusion	B16	G418 500 $\mu$ g/ml	6	2 (fluoresz.)

	<b>pαB crystalline-DsRed-Hyg</b>		<b>Hyg 100 ug/ml</b>		
<b>11.</b>	<b>pαB crystalline-IRES-hsp27-hyg</b>	<b>B16</b>	<b>G418 500 ug/ml Hyg 100 ug/ml</b>	<b>30</b>	<b>1</b>
<b>12.</b>	<b>Tet indukció (pcDNA4/TO -hsp27 pcDNA6/TR)</b>	<b>B16</b>	<b>Zeocin 60 µg/ml + Blasticidin 10 µg/ml</b>	<b>12</b>	<b>2</b>
<b>13.</b>	<b>Tet indukció (pcDNA4/TO -hsp70 pcDNA6/TR)</b>	<b>B16</b>	<b>Zeocin 60 µg/ml + Blasticidin 10 µg/ml</b>	<b>4</b>	<b>1</b>
<b>14.</b>	<b>pCMVαB crystalline-hyg</b>	<b>B16</b>	<b>Hyg 100 ug/ml</b>	<b>12</b>	<b>4</b>

**1. táblázat.** Kismolsúlyú Hsp fehérjéket túltermelő emlős sejtvonalaink.

***Kismolsúlyú hőszokk fehérjék funkciója sejtmodelleken:***

A fenti konstrukciókat a Vigh László vezette Molekuláris Sejtbiológiai Laboratóriumban használtuk a HSP-k lokalizációs változásainak mikroszkópiás követésére (ld. alább), ill. teszteltük a kismolsúlyú hőszokkfehérjék (sHsp) membrán kölcsönhatásainak (lehetséges) szerepét a membránok hő- és oxidatív stresszel szemben mutatott védelmében.

A kísérletekhez HeLa sejtvonalaikat használtunk, amelyekben az αB-crystallin-t vagy a Hsp27-t indukálható módon túltermel(het)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 membrán frakciók (plazma membrán, mitokondrium) immunoblotting-gal történő elemzésével megállapítottuk, hogy a sHsp-k a stressz folyamán ezen membránokhoz ill. organelumokhoz ködőd(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.

## Betegség és öregedés modellek:

### *Transzgenikus egérmodellek*

Egyre több kísérleti adat válik ismertté napjainkban arról, hogy a **hősokkfehérjék** stresszindukálhatósága jelentősen csökken az öregedéssel. Rattan 1998-as kísérletei alapján feltehető, hogy a HSP- k képesek fenntartani a sejtek "fiatalságát". Jelen pályázatunkban célul tűztük ki, hogy:

(i) olyan transzgenikus állatokat állítunk elő, amelyekben kismolsúlyú hősokk fehérjéket ( $\alpha$ B-crystallin, HSP 27, HSPB2, HSPB3) túltermelünk és amelyek ezáltal alkalmasak lesznek a kismolsúlyú hsp fehérjék cito- és kardioprotektív szerepének vizsgálatára.

(ii), vizsgáljuk a hősokkfehérjék aktivációját és a neuronális membránok zsírósszététel változását az atheroszklerózis kialakulása során, az atheroszklerózis egyik klasszikus modellállatában, a hapoB-100 transzgenikus egerekben.

- (i) Kismolsúlyú hsp fehérjék túltermelése transzgenikus egerekben.

#### *Humán hsp27 fehérjét túltermelő transzgenikus egerek előállítása:*

Olyan transzgenikus konstrukciót terveztünk, amely lehetővé teszi a humán hsp27 gén minden szövettípusban történő kifejeződését. Ezért promoterként a human elongációs factor  $-1\alpha$  gén (EF-1) promotérét választottuk és mögé klónoztuk a humán hsp27 cDNS-ét (pEFhsp27). Transzgenikus állatok előállítására a hagyományos pronukleusz mikroinjekciót alkalmaztuk. Összesen 962 petesejtet mikroinjektáltunk és 601 petesejtet ültettünk vissza. 86 megszületett utód közül 9 egér hordozta a transzgént, amit PCR reakcióval és dot blot hibridizációval azonosítottunk. A transzgenikus állatok és ellenkező nemű, vad típusú F1 (C57/B6 X CBA) egerek keresztezése révén heterozygóta transzgenikus vonalakat hoztunk létre. Az utódokat PCR reakcióval és dot blot hibridizációval genotipizáltuk. A 9 vonalból 5 öröközte utódaira a transzgént. A beépült transzgén kópiaszámát dot blot hibridizációval becsültük meg. A transzgén expresszióját a különböző szövetekben (máj, szív, agy) real time RT-PCR reakcióval határoztuk meg. A kísérletekben belső kontrollként a  $\beta$  actin gént használtunk. Az 5 transzgenikus vonal közül 2 vonal (1242 és 1244) közepes (2-3x-os túltermelés) és 3 vonal (1273, 1243 és 1341) alacsony szinten (<2x-es túltermelés) expresszálta a transzgént (2. ábra). A transzgenikus állatok szervei közül a legmagasabb expressziót a szívben detektáltuk (2-6x-os), kevesebb transzkript volt kimutatható a májban és az agyban (1.5-2x-es).

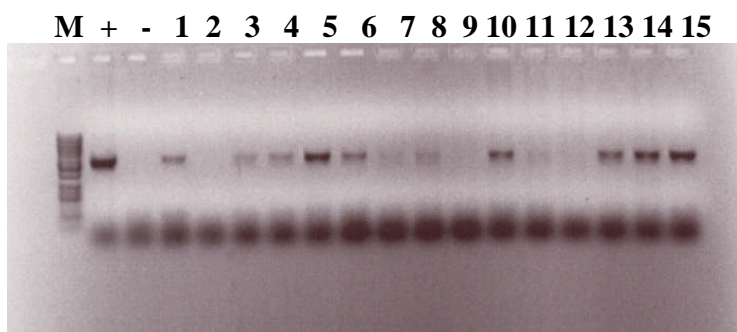
A májban és az agyban kapott viszonylagosan alacsony transzgén-expresszióért valószínűleg az *in vivo* körülmények között gyengén működő humán EF promotér tehető felelőssé. Ezért a következő kísérletekben a már korábban bevált, virális CMV promotert alkalmaztuk.

#### *Human $\alpha$ B-crystalline és hsp27 fehérjét túltermelő kettős transzgenikus egerek előállítása:*

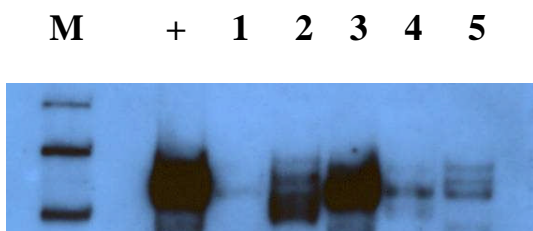
A kettős transzgenikus egerek előállításához az *in vitro* kísérletekben kipróbált CMV-  $\alpha$ B-crystalline és CMV- hsp27 plazmidokat koinjektáltuk a fent leírt pronukleusz injekció módszerrel. Petesejt donorként FVB/N egértörzset alkalmaztunk. 38 megszületett utódból 11 transzgenikus utódot kaptunk. A transzgének kifejeződésének vizsgálata a különböző szövetekben jelenleg folyamatban van.

#### *Humán HSPB2 és HSPB3 fehérjéket együttesen túltermelő transzgenikus egér előállítása:*

A transzgenikus egerek előállításához a korábban létrehozott pHSPB2-IRES-HSPB3 génkonstrukciót használtuk. Az egerek előállítása a **Genoway** francia céggel együttműködésben készült. A linearizált génkonstrukciót elektroporációval juttatuk be embrionális őssejtekbe (ES). A G418 szelekció után 66 neoR ES klónt vizsgáltunk meg a transzgén jelenlétére PCR módszerrel (2. ábra). A beépült transzgén kópiaszámát Southern hibridizációval becsültük meg (3. ábra).



**2. ábra** Transzgén kimutatás ES-sejt klónokból PCR módszerrel. M: molsúly marker, +: pozitív plasmid kontrol , -: negatív kontrol, 1-15: ES klónok



**3. ábra.** Transzgén kópiaszám meghatározás Southern hibridizációval. M: molsúly marker, +: pozitív kontrol, 1-5: ES-sejt klónok.

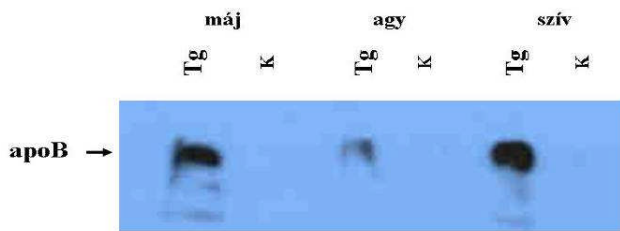
Öt különböző kópiaszámú ES sejtvonalból blasztocysza injekcióval kíméra állatokat állítottunk elő. Az injektálás eredményét a 2. táblázatban foglaltuk össze:

Klón	Transzgén kópiaszáma	Injektált blasztocyszták száma	Megszületett utódok száma	Kíméra utódok száma	Kimériszmus foka
49	Low (1-2)	30	3	1	75%
52	High (>6)	45	18	8	3x90%, 2 x60%, 3x 30
34	Medium (3-5)	30	2	0	0
28	Low (1-2)	30	8	3	20%
53	Medium (3-5)	30	2	0	0
Össz:		<b>165</b>	<b>33</b>	<b>12</b>	

**2.táblázat.** ES-sejtek blasztocysza injektálásának eredménye.

A kíméra egerek transzgént örökíti képességének (germ-line transmission) meghatározását C57B6 törzsszel történt visszakereszteszés révén határoztuk meg. Az 5 kíméra vonalból kettő örökítette a transzgént utódaira. A transzgének mindkét vonal agy és májszöveteiben kifejeződtek.

(ii), Az elmúlt időszakban előállítottunk humán apolipoprotein B-100 fehérjét túltermelő transzgenikus egereket. 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 (4.ábra).



4. ábra. Emelkedett apoB-100 fehérje szint transzgenikus egerek szerveiben. Western analysis.

A transzgenikus egerek vizsgálata részben a Funkcionális Genomika Csoporttal (Puskás László) ill. Ferdinandy Péterrel (SZTE) kooperációban történt (ld. fentebb).

A humán apolipoprotein B-100 fehérjét túltermelő transzgenikus egerek lipidomikai elemzését a lipidomikai fejlesztések ismertetésénél tárgyaljuk.

#### **Transzkripciós szabályozás specifikus betegség modellekben: Az Eukariota transzkripció szabályozás csoport (Boros Imre) eredményei:**

Magasabbrendűek transzkripciójának szabályozásában szerepet játszó faktorokat azonosítottunk, funkciójukat elemeztük. Az aktív kromatin szerkezet kialakulásában fontos szerepet játszó génekben mutáns állatokat állítottunk elő, amelyekkel a kromatin átrendezésben szerepet játszó gének hatása élő rendszerben vizsgálható. Megállapítottuk, hogy acetilációval bekövetkező egyes hiszton módosítások hogyan játszanak szerepet specifikus gének aktiválásában. Az elért eredmények gyógyszerfejlesztésben nyerhetnek felhasználást, mert a hasonló mechanizmussal megvalósuló tartós génműködés módosulást több patológiás állapotban kimutatták és számos hiszton acetilációt módosító vegyületet mint a rák ellenes gyógyszerek új típusait tekintik.

Vizsgáltuk a stressz hatására létrejövő génműködés változásokat és a sejteket érő stressz károsító hatásának kivédésében szerepet játszó fehérjéket. Jellemeztük az akut pankreatitis kialakulását kísérő stressz fehérje termelődést és rámutattunk az egyes stresszet kiváltó ágensek hatásának különbözőségére e tekintetben. Kimutattuk egyes transzkripciós faktorok szerepét kísérletesen indukált pankreatitisben. Vizsgáltuk drogok és gyógyszerjelölt vegyületek stressz fehérje termelődést módosító képességét, ami e vegyületek gyógyászati alkalmazásának lehetőségeit tárja fel. E téren tett

megállapításaik közelebb visznek a sejt-károsító folyamatok elleni természetes védelmet biztosító mechanizmusok megértéséhez és az ebből adódó terápiás lehetőségek kiaknázásához.

A kutatás többoldalú intenzív nemzetközi együttműködésben folyik, amelynek EU FP6 STREP és RTN program, valamint magyar-francia TeT biztosít keretet.

Eredményeiket rangos nemzetközi szaklapokban közzöltük. A periodusban két Ph.D. dolgozat készült.

## **HSP alapú gyógyszerkutatás (Molekuláris Stresszbiológiai Csoport - N-Gene- Debreceni Egyetem)**

A Hsp-k mennyiségének változtatása számos esetben gyógyászati jelentőségű. A Hsp-k mesterséges indukciója elősegíti a sejtek túlélését diabetesben és gátolja a neurodegeneratív betegségek (Alzheimer-, Parkinson-, Huntington-kór, prion betegségek) kialakulását. A kórosan magas celluláris Hsp szint farmakológiai gátlása ugyanakkor potenciális antitumor terápia lehet. 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 öregedésmoделl, 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.

## **Új vizsgálati módszerek kidolgozása: ultraszenzitív mikroszkópia, membrán proteomika és lipidomika**

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

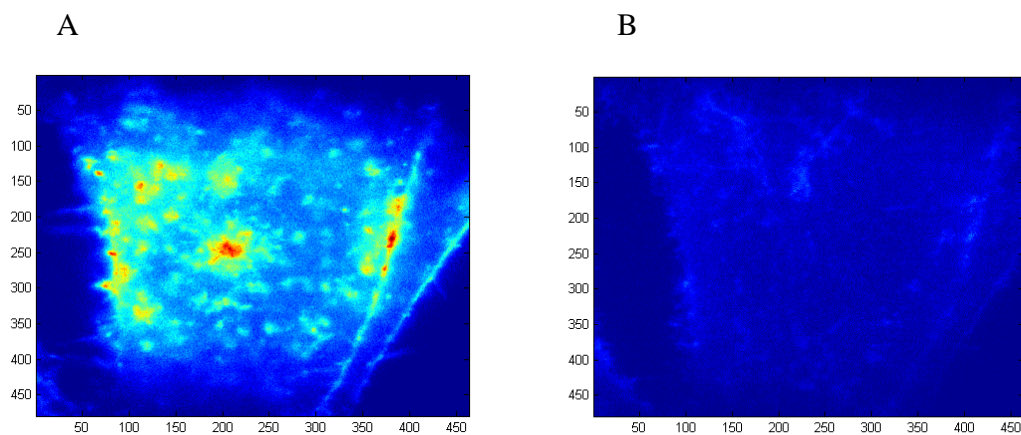
A Molekuláris stresszbiológiai csoportban az elmúlt években felállított laboratórium egy új technika, a Single Dye Tracing (SDT) révén lehetővé teszi egyedi, fluoreszcensen jelölt molekulák detektálását, illetve a molekulák mozgásának követését. A képalkotó rendszer 40 nm-es pontossággal képes megadni 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 megtért.

Stabil sejtvonalak létrehozását követően célul tűztük ki a különböző stresszfehérjék expressziójának (hsp promotor-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 promotor-YFP indukciójának kinetikáját mely rávilágított, hogy B16 sejtek között több, eltérő intenzitású

stresszválaszt produkáló sejtpopuláció 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 citoszólikus 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 analizését.

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).



## **Membrán proteomika - SzBK Proteomikai Kutatócsoport (Medzihradszky Katalin)**

:

A pályázat keretében két feladatunk volt.

- 1) Egy új, lipid- és fehérje-minták analízisére egyaránt alkalmas nagy érzékenységű tömegspektrométer beszerzése/beállítása
- 2) Módszer-beállítás/fejlesztés membrán fehérjék analízisére.

1) Tömegspektrométer beszerzése/beállítása

a) az első lépés a „kívánság-lista”, azaz a specifikációk gondos összeállítása volt.

Ionizációs technikák, detektálási érzékenység, elérhető tömeg-felbontás, a tömegmérés pontossága, MS-MS technikák stb.

b) a szóba jöhető készülékek (Applied Biosystems QSTAR, Waters Micromass Q-TOF, Thermo Finnigan LTQ, Agilent Technologies XCT Plus) helyszíni, több napos tesztelése, megfelelő standard kollekciókkal

c) Közbeszerzési pályázat kiírása, a beérkezett ajánlatok értékelése, döntés

d) A készülék megrendelése, megfelelő helység kialakítása

e) A készülék beállítása, betanulás, módszerek beállítása

A tömegspektrométer beszerzése közös akció: az OTKA iskolában résztvevő ún. proteomikai ikerlaboratóriumok – az Orvos Vegytani Intézet Fehérjekémiai Kutatócsoportja és az SzBK Proteomikai Kutatócsoportja – továbbá az SzBK Biokémiai Intézet Molekuláris Stresszbiológiai csoportja együttesen vettek részt benne. Egy Waters Micromass Q-TOF tömegspektrométert szereztünk be. Rajtunk kívülálló okok miatt a folyamat erősen elhúzódott: a készülék beállítása végülis 2005 novemberében és decemberében történt meg. A felhasználók betanítása, a módszerek beállítása még folyamatban van.

2) Módszer-beállítás/fejlesztés membrán fehérjék analízisére.

a) A membrán-fehérjék analízisét jelentősen megnehezíti hidrofób-jellegük, aggregációs készségük, oldódási problémáik, és az a tény, hogy a legtöbb analitikai technikát gátolják, vagy legalábbis zavarják mindazok az adalék-anyagok, amelyek ezen fehérjék oldatban tartására alkalmasak. Kutatásunk során egy kétdimenziós, mindkét dimenzióban detergenset hasznosító elektroforézis-technikát teszteltünk membrán fehérjék frakcionálására, illetve ennek a módszernek a tömegspektrometriás analízissel való kompatibilitását vizsgáltuk.

*E. coli* külső és belső membrán preparátumok fehérje-tartalmát vetettük össze, és teszteltük a laboratóriumi protokolt a fehérjék azonosítására.

b) Miután a membrán fehérjék a transzmembrán régiókban viszonylag kevés triptikus hasítási helyet tartalmaznak, más enzimekkel, többek között egy rekombináns Tyr-specifikus proteázzal is folytattunk kísérleteket. Prof. Gráf László csoportja (ELTE Biokémia Tanszék) biztosította az enzimet.

c) Tapasztalatainkat hővel vagy benzil-alkohollal kezelt sejtek membrán fehérjéinek összehasonlításában hasznosítottuk.

Eredményeiről több review cikkben adtunk összefoglalást (*Hunyadi-Gulyás, É.; Medzihradszky, K.F. Factors that contribute to the complexity of protein digests. Drug Discovery Today: Targets 3:S3-S10 (2004), Medzihradszky KF. Peptide sequence analysis. Methods Enzymol. 2005;402:209-44.*), továbbá két kézirat van még előkészületben.

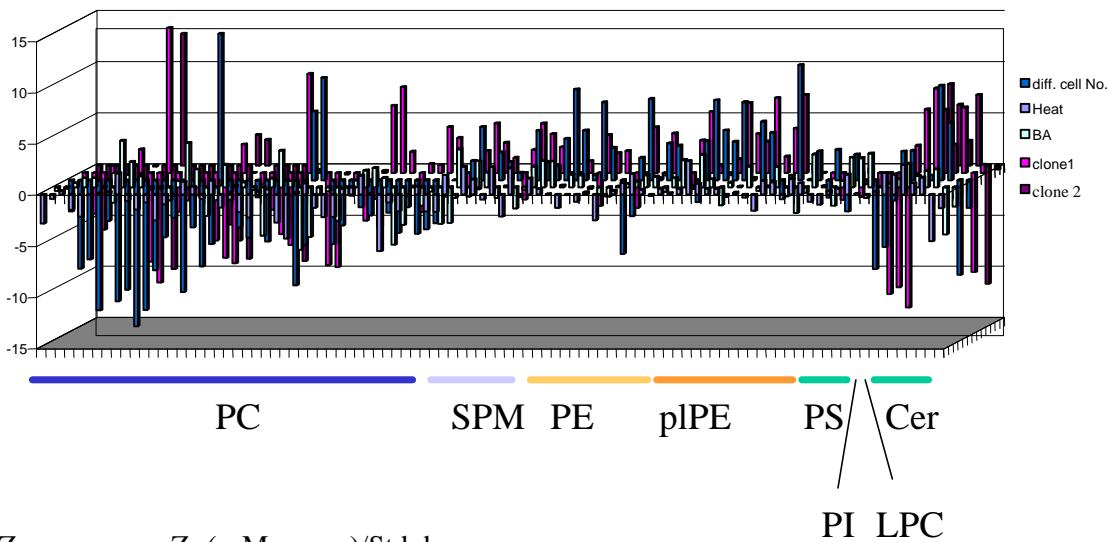
### **Lipidomika:**

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

A Regensburgi Egyetemmel közösen elindítottunk 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 transzgenikus 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 érzékenységű ESI-Q-TOF készülék segítségével kerül sor. A készüléket beszerzését jelen 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 sejtszám változás hatásának tettük ki.

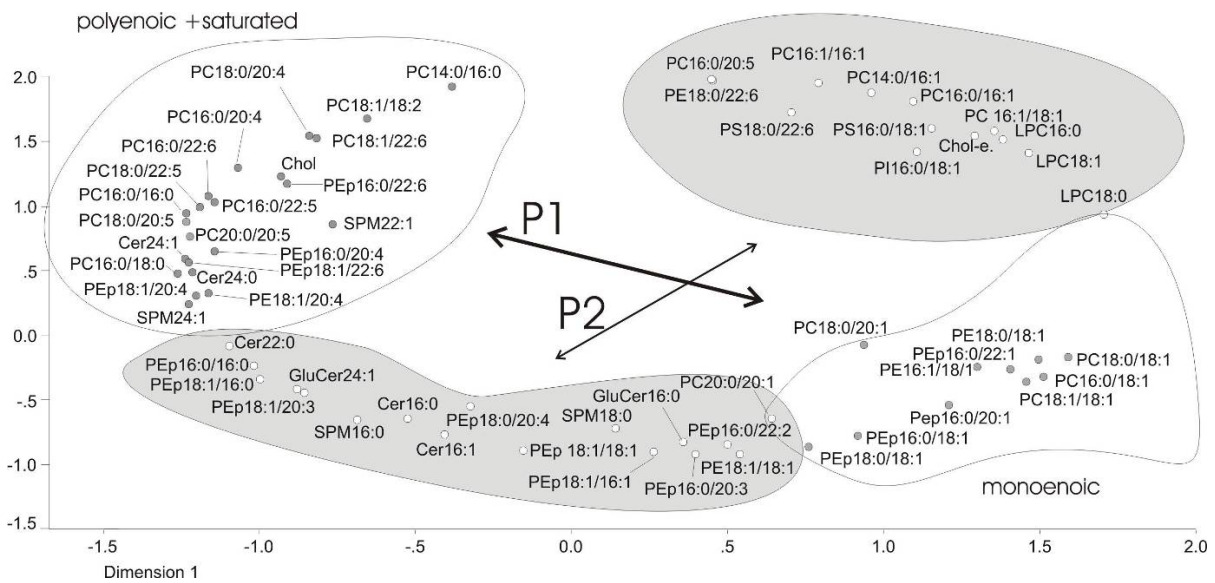


Z-scores:  $Z = (x - \text{Mean}_{\text{contr}}) / \text{Std dev}_{\text{contr}}$

A B16 sejtek ESI MS/MS elemzéssel kapott lipidomjának (szelektált speciestek) 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 fiziológiás ill. stressz stimulusok hatására. A hatalmas mennyiségű adatból 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 speciestek „együttmozgását” multidimenziós skálázás kétdimenziós terében ábrázoltuk. A főkomponens analízis eredményeit halmazokba rendezéssel és nyilakkal jelöltük. A csoportok kialakításához felhasználtuk még a hierahikus klaszterelemzést is.

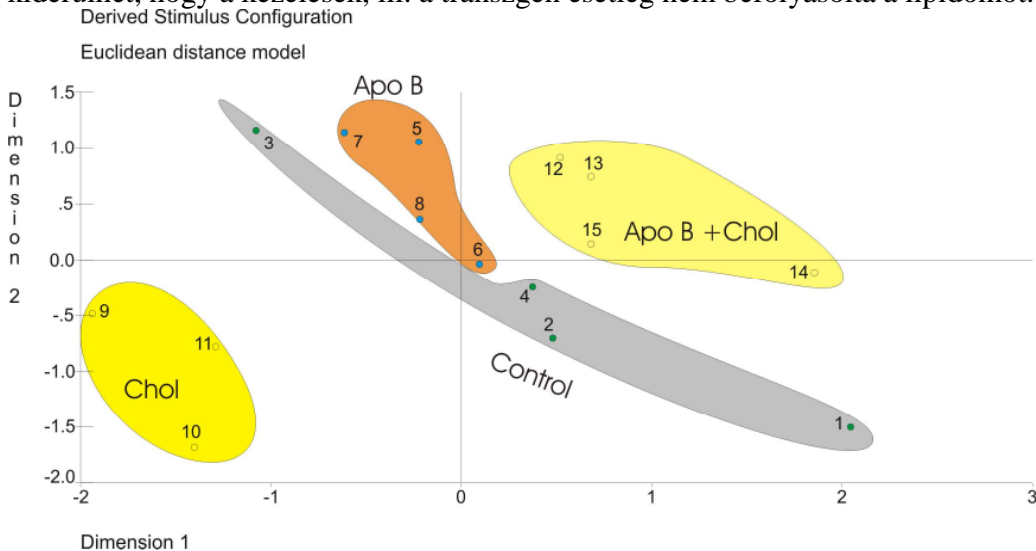


A P1 főkomponens által kijelölt halmazok reprezentálják a sejtszám változás hatására létrejövő molekulaszintű átrendeződéseket. A P2 komponens értelmezése további vizsgálatokat kíván. A főkomponensek mentén, de ellentétes irányban elhelyezkedő halmazok a párhuzamosan, de ellentétes előjellel lezajló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

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

#### A humán apolipoprotein B-100 fehérjét túltermelő transzgenikus egerek lipidomikai elemzése

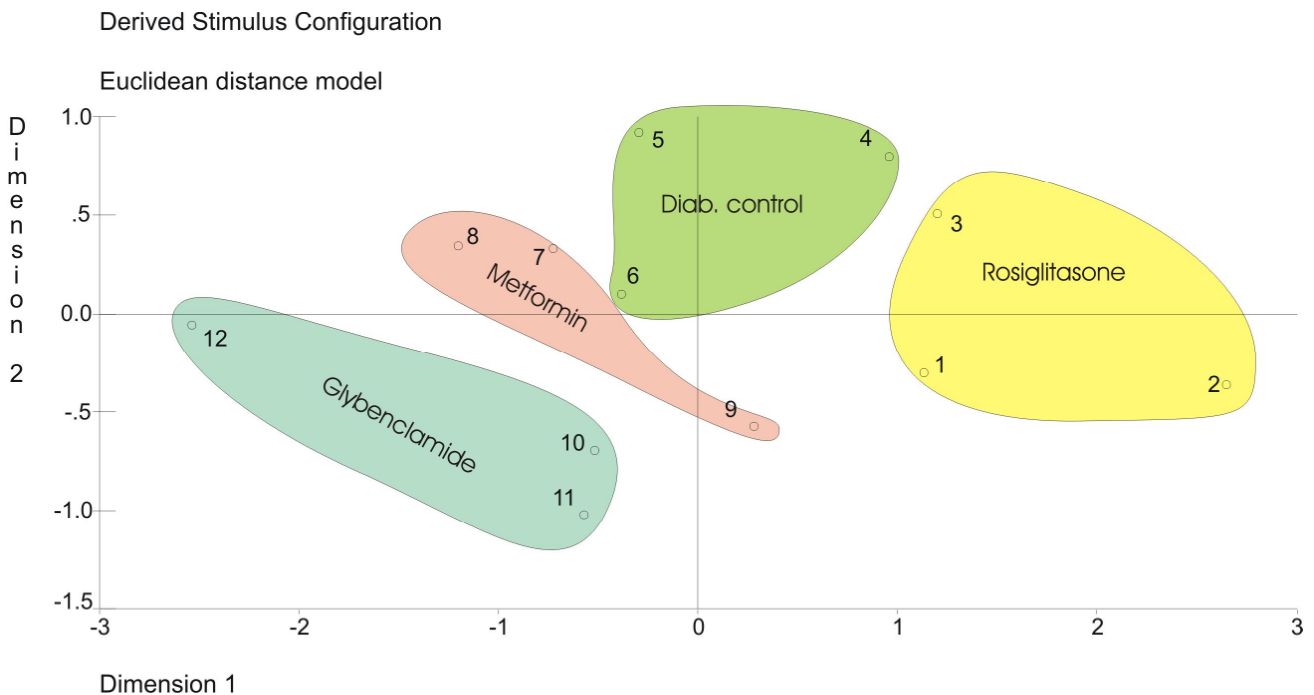
Az ismertetett statisztikai módszereket itt arra használtuk, hogy először megvizsgáltuk, hogy az egyedi adataink milyen szórással rendelkeznek, mennyire különítik el a csoportokat, vagy éppen az is kiderülhet, hogy a kezelések, ill. a transzgenén esetleg nem befolyásolta a lipidomikát.



Az ábrán az egyes egerek agyából származó lipidek által kifeszített 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. (A további vizsgálat folyamatban van.)

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.



## Összefoglalás:

Tisztelegve az elhunyt Farkas Tibor akadémikus emlékének, a Lipid-Membrán Iskola a Szegedi Biológiai Központban minden tekintetben végrehajtotta a pályázatban tervezett feladatait, teljesítette misszióját. Képes volt a meglévő tudás valamint eszközállomány összefogására, koncentrált és hatékony kihasználására. A közös munka eredményeképpen számos, stratégiaileg igen jelentős fejlesztés vált lehetővé. Nagy számú új, eredeti tudományos eredmény (köztük több review, ill. könyv) publikációjára került ill. kerül még sor a program lezárását követően. Törekvéseink fénypontját jelzik az egymolekula követésére alkalmas mikroszkópiás laboratórium (nanotechnológiai alapú membrán kutatóhely, SzBK) ill. az első hazai lipidomikai vertikum (SzTE, SzBK) teljes kiépítése. Kiemelendő, hogy a program célkitűzésének megfelelően a kutatásba számos hallgatót vontunk be. Szakdolgozatok ill. PhD disszertációk születtek a pályázat támogatásával. Aktivitásunk egyértelmű nemzetközi elismeréseképpen 2006-ban Magyarországon kerül megrendezésre a Nemzetközi Lipidtudományi Konferencia (ICBL) kollégáink rendezésében, Vígh László elnökletével.

A Lipid-Membrán Iskola szegedi résztvevői az alap- és alkalmazott lipid és membrán kutatási eredményeik, valamint a kiépült együttműködések alapján sikeresen részévé váltak a Dél-Alföldi Neurobiológiai Tudásközpontnak.