

Membrán-lipid terápiais lehetőségek a sejtszintű stresszválasz helyreállításában

Lipidomikai eszközök a Xenohormesis kutatásban

*Török Zsolt, MTA, Szegedi Biológiai Központ,
Biokémiai Intézet, Szeged*

Az élő szervezetek stresszkörülményekhez való sikeres alkalmazkodását egymást szabályszerűen követő adaptív reakciók sorozata biztosítja, amelyet együttesen stresszválasznak nevezünk. A stresszadaptáció és a stressztűrés az élet alapvető feltételei. A stressz okozta károsodást megelőzendő, a stressz pontos monitorozása döntő jelentőségű a különböző molekuláris védelmi mechanizmusok időbeli aktiválásában. A stresszválasz egyik talán legfontosabb eleme a prominens citoprotektív ágensek, a hősokk fehérje molekuláris chaperonok (Hsp-k) szintézisének indukciója mely lehetővé teszi a sejtek és szervezetek számára, hogy ellenálljanak a stressznek ill. hogy felépüljenek a stresszből [Kültz, 2005]. Az elmúlt években a Hsp-k további, ún. „moonlighting”, másodlagos, a “folding” aktivitásuktól független funkcióira is fény derült. Kiderült, hogy Hsp-k megvédik a sejtservecskéket, stabilizálják a membránokat, késleltetik, vagy megakadályozzák az apoptózist, csökkentik az oxidatív és a szabad gyökök által okozott károkat, korlátozzák a gyulladásos választ, fokozzák az immunrendszer aktivitását, eltávolítják a visszafordíthatatlanul sérült celluláris fehérjéket [Török et al., 2014; Vigh et al., 1997]. A sejtszintű stresszválasz vizsgálatának ezért kiemelkedő jelentősége van annak megértésében, hogy a sejtek miképpen válaszolnak és alkalmazkodnak a megváltozott környezeti feltételekhez, és különösképpen a patofiziológiás körülményekhez. Amíg bizonyos betegségek esetén - mint például a daganatos folyamatok - a stresszfehérjék emelkedett szintje figyelhető meg, addig más betegségeknél éppen az ellenkezője a Hsp szint csökkenése és így a fehérjehomeosztázis károsodása tapasztalható [Westerheide és Morimoto, 2005]. A sejtszintű stressz elleni védelem ilyen mértékű gyengülése tapasztalható például

a különböző neurodegeneratív és kardiovaszkuláris betegségek esetén, de ez jellemző a kettes típusú diabétesz és az öregedés során is.

A klasszikus elképzelés szerint a hősök (stressz) válasz a fehérjedenaturáció következménye. A hőökkfehérje molekuláris chaperonok azonban olyan körülmények között is indukálódnak, amikor fehérje denaturáció nem figyelhető meg. Mára számottevő bizonyíték gyűlt össze az ún. „membrán szenzor” hipotézis alátámasztására is, mely szerint a plazmamembrán specifikus módosulásai is képesek megváltoztatni a Hsp-k expresszióját [Vigh et al, 2007; Török et al, 2014; Escriba et al, 2015]. Csoportunk kutatásainak fókuszában e membránokhoz köthető stressz érzékelés kutatása áll molekuláris stresszbiológiai és ultraszenzitív, akár az egyedi molekulák követését is lehetővé tévő biofizikai és a legmodernebb lipidomikai eszköztár felhasználásával. Az előző előadások során bevezetett Xenohormézis jelenség ismeretében különösen érdekesek lehetnek olyan terápiás megközelítések, melyek a különféle stresszfehérje családok eltérő indukcióját vagy éppen csendesítését képesek előidézni káros mellékhatások nélkül [Hooper et al., 2010]. Egy ilyen gyógyszer ideális esetben csak stressz jelenlétében aktív, azaz a stressz hatását csökkenti vagy éppen erősíti (koindukciós v. csendesítő hatás), de normál körülmények között semmilyen látható hatása nincs. Ilyen molekulák eredményes kereséséhez érdemes azonosítani azon membránokhoz köthető folyamatokat, melyek a stresszválasz modulációjához vezethetnek. Különböző patofiziológiás állapotok ill. az öregedés során a membránok egyik alapanyagát, a lipideket előállító anyagcsere folyamatok olyan sérülésekhez/elváltozásokhoz vezetnek, mely megváltoztatja a fontos biológiai funkcióval rendelkező jelképző fehérjék vagy membrán asszociált enzimek funkcionális környezetét biztosító membránok szerkezetét, nanoszerveződését. E membrán “hibák” egyrészt lehetnek a membrán teljes egészét érintő “globális elváltozások (pl. membrán fluiditás, permeabilitás), de lehetnek nagyon specifikus, akár csak a membrán apró jelképző szigetei, az ún. membrán tutajok (raftok) átrendeződését eredményező elváltozások is. E szerkezeti változások miatt bizonyos folyamatok lassulhatnak vagy éppen le is állhatnak, míg mások – mint a stresszválasz - éppen aktivizálódhatnak.

A sejtek védelmi apparátusának bekapcsolása és működése megfelelő eszközök ill. körülmények (pl. megfelelő lipidösszetétel) hiányában gyengülhet, vagy éppen erősödhet. A membránhoz kötött stresszérzékelés és a hozzá kapcsolódó jelátviteli utak megértéséhez nélkülözhetetlen a membránok tranziens domén szerveződését érintő nanoszerkezeti változások és a jelátvitel összefüggéseinek feltárása. Ultraszenzitív fluoreszcencia mikroszkópia segítségével rendkívül nagy tér- és időbontásban követhetjük a stressz hatására lezajló folyamatokat az egyedi sejtek szintjén. A részletes lipidomikai és proteomikai analízissel párhuzamosan egyedi molekulák követésén alapuló mikroszkópiát (TOCCSL) és képkövetésen alapuló fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiát (FCS) alkalmazunk [Brameshuber et al, 2010; Shankaran et al, 2009]. A stresszérzékelés korai eseményeinek azonosítása céljából a módszereket a stresszválasz sejtszintű individualitásának követésére és a plazmamembrán összetételében bekövetkező változások feltérképezésére is felhasználhatjuk. Hipotézisünk szerint a hőmérséklet hatására bekövetkező membrán átrendeződések individualitása szorosan összefügg a sejtek válaszadó képességével ill. az adott válasz erősségével. Bár legfőbb célunk a hőmérséklet-szenzor(ok) azonosítása a plazmamembránban, azt is vizsgáljuk hogy egyéb körülmények, mint pl. a sejtciklus milyen mértékben határozza meg a sejtek hőérzékelő képességét. Mivel egyre több bizonyíték utal a klasszikus membrán transzport útvonalak (endocitotikus, szekréciós) ill. az exoszómák, mikrovezikulák felszabadulásának szerepére a stressz jelátvitelben és a különböző védelmi mechanizmusok elindításában, ezért a különböző stressz körülmények által indukált membrán transzport által előidézett átrendeződéseket is tanulmányozzuk.

A membránok finom szerveződése változásának követésére az egyik legalkalmasabb modern technika az egyedi molekulák követésére is alkalmas ultraszenzitív mikroszkópia, mely fluoreszcens, a membrán bizonyos régiójából tudósító riporter molekulák követésével lehetővé teszi a már említett jelképző membrán tutajok topológiájának és dinamikájának követését. E módszer segítségével a membránok nagyfelbontású térképezését az egyedi sejtek szintjén is megvalósíthatjuk. Ez azért lehet fontos, mert sok esetben – mint például egy rákos daganat – bizonyos sejtek, melyek lehet, hogy csak a teljes sokaság néhány

ezrelékét teszik ki, határozzák meg a betegség (pl. áttétképződés) kimenetelét. A laboratóriumunkban alkalmazott nagy számú sejt pásztázását lehetővé tevő ultraszenzitív TIRF mikroszkóp által előállított képek automatikus analízisével korrelációt kereshetünk bizonyos sejtfunkciók és a stresszválasz erőssége között [Nagy et al., 2007; Brameshuber et al., 2010; Gombos et al., 2011]. A válasz mértékéről tudósító fluoreszcens fehérje riporterkonstrukció segítségével kimutattuk, hogy a sejtek reakcióképessége nagymértékben eltérhet a populáció "kémcsőben" mérhető átlagos mértékétől. A Linz-i egyetem biofizikai intézetének munkatársaival együttműködve bizonyítottuk, hogy egy a lázas állapotnak megfelelő enyhe stressz is képes beindítani a sejtek válaszreakcióját, mi több, e válasz küszöbhőmérséklete nagy egyezést mutatott azzal a hőmérséklettel, ahol a koleszterin gazdag plazmamembrán tutajok olvadni kezdenek [Brameshuber et al., 2010]. Ezzel elsőként mutattunk rá, hogy a stresszválaszban kitüntetett szerep jut a membrán koleszterin gazdag membrán szigeteire. E 20-50 nm-es átmérőjű dinamikusan keletkező és eltűnő miniatűr tutajok valószínűleg olyan receptorokat és jelképző lipid-fehérje klasztereket hordoznak, melyek a lipid környezet alloszterikus szabályzásán keresztül változtatják aktivitásukat.

A plazmamembrán nanostruktúrájában hő hatására létrejövő specifikus változások hátterét korszerű lipidomikai és proteomikai eszközök kombinációjával is tanulmányozzuk [Balogh et al., 2010; Péter et al., 2012]. A korszerű lipid analitika lehetővé teszi, hogy a gyógyszer fejlesztés során összekapcsolhatóvá váljon a membrán szenzor elvbe illeszkedő hőstressz válasz valamint a membránfunkciók centrális fiziológiai paramétereinek meghatározása, a lipid összetétel és oxidáció molekula speciesz szintű finomszemcsés elemzésével. Laboratóriumunkban a membránszerkezet mélyebb megértése céljából a meglévő lipid analitikai eszköztárat modern, gázkromatográfiához ill. folyadékkromatográfiához kapcsolt tömespektrometriai módszerekkel bővítettük ki így létrehozva egy Magyarországon egyedülálló korszerű lipidomika laboratóriumot, ahol lehetőség van a lipid és zsírsav analízisre HPLC-vel, TLC-vel és gázkromatográfhhoz kapcsolt tömegspektrométerrel (GC-MS), lipid molekulaszpeciesz analízisre LC-ESI-MS-el, vagy ESI MS/MS-el. Nagyérzékenységű, finomszemcsés lipidomikai mintázat felismerési eljárást fejlesztettünk ki, amely az alapkutatói célokon túl kivá-

lón alkalmas lehet diagnosztikai ill. gyógyszerjelölt-szűrő eljárásként is. A lipidom és stressz szignálok kapcsolatának feltérképezésével a gyógyszerjelöltek eddig nem ismert, a lipid háztartásra, illetve a sejtmembránok összetételére gyakorolt hatásainak felderítése is lehetővé vált. Kísérleteinkben kapcsolatot találtunk a hőérzékelés sejt szintű heterogenitása és a membrán nanoszkopikus szerkezete és dinamikája között. Összefüggést mutattunk ki a membrán összetétele és szerkezeti érzékenysége között, feltártuk a hőérzékelés korai eseményeinek sorrendjét. A szenzor azonosítása még hátra van, de eredményeink lehetővé teszik olyan aktív molekulák szűrését, melyek a megfigyelt membránváltozásokat érdemben és specifikusan befolyásolhatják. Figyelembe véve, hogy a legtöbb betegségben hibás (serkentett vagy csökkent) a Hsp válasz, a plazmamembrán megfelelő módosítása mindezideig fel nem ismert, új fontos eszköze lehet a hő sokkválasz normalizálásának. A plazmamembrán módosítására fókuszáló Hsp modulációs stratégiák („membrán-lipid-terápia”) potenciálisan magas terápiás értékkel rendelkeznek [Vigh et al., 1997; Crul et al., 2013; Hooper et al., 2014; Török et al., 2014; Escribá et al., 2015]. Kutatásaink bizonyították, hogy a stresszválasz indukcióját előidézni képes gyógyszerjelöltek hatásmechanizmusában kulcsszerepet játszhatnak a sejtmembránok e vegyületekkel kölcsönható lipiddoménjei, pl. azok fázisállapota, doménszerveződése. Számos vizsgálatot végeztünk a farmakonok, ill. a membrán fizikai állapotát módosító stresszfehérjék biofizikai vizsgálatának körében. Specifikus lipid kölcsönhatásokra hívtuk fel a figyelmet, ill. bizonyítottuk a membrán fázisátmenetének megváltozását a kötődés hatására [Tsvetkova et al., 2002; Török et al., 1997; Török et al., 2001; Török et al., 2003]. Alapvető kérdés, hogy egy sejt kultúrában/szövetben a sejtek azonos mértékben szenvedik-e el a stresszt és arra milyen individualitással válaszolnak. Kísérleteink jelenlegi fázisában arra keressük a választ, hogy mi okozza a sejt kultúrákban megfigyelhető heterogén stresszválaszt. Azonos genetikai háttérrel rendelkező sejtek azonos körülmények esetén miért válaszolnak nagyon különbözően. Reményeink szerint e megközelítés közelebb vezethet bennünket annak megértéséhez, hogy egy heterogén sejt populáció néhány tagja miért képes meghatározni egy adott kóros állapot kimenetelét.

References

- Balogh, G., Péter, M, Liebisch, G, Horváth, I, Török, Z, Nagy, E, Maslyanko, A, Benkő, S, Schmitz, G, Harwood, J.L Vigh, L (2010) Lipidomics reveals membrane lipid remodelling and release of potential lipid mediators during early stress responses in a murine melanoma cell line. *Biochim Biophys Acta* 1801:1036-1047.
- Brameshuber, M., Weghuber, J., Ruprecht, V., Gombos, I., Horvath, I., Vigh, L., Eckerstorfer, P., Kiss, E., Stockinger, H. and Schütz, G.J. (2010) Imaging of mobile long-lived nanoplateforms in the live cell plasma membrane, *J. Biol. Chem.* 285, 41765-41771.
- Escribá, P.V., Busquets, X., Inokuchi, J., Balogh, G., Török, Z., Horváth, I., Harwood, J.L., Vigh, L. (2015) Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Prog. Lipid. Res.* 59, 38-53.
- Gombos, I., Crul, T., Piotto, S., Güngör, B., Török, Z., Balogh, G., Péter, M., Slotte, J.P., Campana, F., Pilbat, A-M., Hunya, Á., Tóth, N., Literáti-Nagy, Z., Vigh Jr, L., Glatz, A., Brameshuber, M., Schütz, G.J., Hevener, A., Febbraio, M.A., Horváth, I., Vigh, L. (2011) Membrane-lipid therapy in operation: the HSP co-inducer BGP-15 activates stress signal transduction pathways by remodeling plasma membrane rafts. *PLoS ONE* 6, e28818. doi:10.1371/journal.pone.0028818
- Hooper, P.L., Hooper, P.L., Tytell, M., Vigh, L. (2010) Xenohormesis: health benefits from an eon of plant stress response evolution. *Cell Stress Chaperones.* 15, 761-770.
- Hooper, P.L., Balogh, G, Rivas, E, Kavanagh, K Vigh, L (2014) The importance of the cellular stress response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell Stress Chaperones* 19:447-464.
- Nagy E, Balogi Z, Gombos I, Akerfelt M, Bjorkbom A, Balogh G, Torok Z, Maslyanko A, Fiszer-Kierzkowska A, Lisowska K, Slotte PJ, Sistonen L, Horvath I, Vigh L. (2007) Hyperfluidization-coupled membrane microdomain reorganization is linked to activation of the heat shock response in a murine melanoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 7945-7950

- Kültz, D. (2005) Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 225–257.
- Péter, M., Balogh, G, Gombos, I, Liebisch, G, Horváth, I, Török, Z, Nagy, E, Maslyanko, A, Benkő, S, Schmitz, G, Harwood, J.L Vigh, L (2012) Nutritional lipid supply can control the heat shock response of B16 melanoma cells in culture. *Mol Membr Biol* 29:274-289.
- Sankaran, J., Manna, M., Guo, L., Kraut, R., Wohland, T. (2009) Diffusion, transport, and cell membrane organization investigated by imaging fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biophys J.* 97, 2630-2639.
- Tsvetkova, N.M., Horváth, I, Török, Z, Wolkers, W.F, Balogi, Z, Shigapova, N, Crowe, L.M, Tablin, F, Vierling, E, Crowe, J.H Vigh, L (2002) Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13504-13509.
- Török, Z., Horváth, I, Goloubinoff, P, Kovács, E, Glatz, A, Balogh, G Vigh, L (1997) Evidence for a lipochaperonin: association of active protein-folding GroESL oligomers with lipids can stabilize membranes under heat shock conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2192-2197.
- Török, Z., Goloubinoff, P, Horváth, I, Tsvetkova, N.M, Glatz, A, Balogh, G, Varvasovszki, V, Los, D.A, Vierling, E, Crowe, J.H Vigh, L (2001) *Synechocystis* HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3098-3103.
- Török, Z., Tsvetkova, N.M, Balogh, G, Horváth, I, Nagy, E, Péntzes, Z, Hargitai, J, Bensaude, O, Csermely, P, Crowe, J.H, Maresca, B Vigh, L (2003) Heat shock protein coinducers with no effect on protein denaturation specifically modulate the membrane lipid phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3131-3136.
- Török, Z., Crul, T, Maresca, B, Schütz, G.J, Viana, F, Dindia, L, Piotto, S, Brameshuber, M, Balogh, G, Péter, M, Porta, A, Trapani, A, Gombos, I, Glatz, A, Gungor, B, Peksél, B, Vigh, L.J, Csoboz, B, Horváth, I, Vijayan, M.M, Hooper, P.L, Harwood, J.L Vigh, L (2014) Plasma membranes as heat stress sensors: from lipid-controlled molecular switches to therapeutic applications. *Biochim Biophys Acta* 1838,1594-1618.

- Vigh, L., Literáti, P.N, Horváth, I, Török, Z, Balogh, G, Glatz, A, Kovács, E, Boros, I, Ferdinándy, P, Farkas, B, Jaszlits, L, Jednákovits, A, Korányi, L Maresca, B (1997) Bimoclomol: a nontoxic, hydroxylamine derivative with stress protein-inducing activity and cytoprotective effects. *Nat Med* 3, 1150-1154.
- Vigh, L., Horváth, I, Maresca, B Harwood, J.L (2007) Can the stress protein response be controlled by ,membrane-lipid therapy'?. *Trends Biochem Sci* 32, 357-363.
- Westerheide SD, Morimoto RI. (2005) Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J. Biol. Chem.* .280, 33097–33100.