

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

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

Biológia Doktori Iskola  
Szegei Tudományegyetem

Magyar Tudományos Akadémia  
Szegei Biológiai Központ Biokémiai Intézete  
Szegei  
2009

## BEVEZETÉS

Az élet fennmaradásának alapvető feltétele, hogy az élőlények alkalmazkodni tudjanak környezetükhöz. A környezeti feltételek időleges, hirtelen megváltozása egy gyors válaszreakciót idéz elő, ezt a folyamatot stresszválasznak, vagy *akklimatizációnak* nevezzük. A sejtszintű stresszválasz óriási élettani, ill. kórélettani jelentőséggel bíró univerzális sejtvédő mechanizmus. Alapvető szerepe, hogy védelmet biztosít a makromolekulákat, makromolekuláris rendszereket károsító környezeti behatásokkal szemben. Ez részben a génexpressziós mintázat megváltozásán keresztül valósul meg, ami biztosítja, hogy a túléléshez szükséges védő fehérjék nagy mennyiségben jelenjenek meg a sejtekben. Ide sorolhatók többek között a hősokk fehérjék (Hsp-k), amelyek expressziója jelentős mértékben megemelkedik stressz hatására.

A Hsp-k alapvető feladatokat látnak el a fehérje homeosztázis fenntartásában. Funkciójukat tekintve molekuláris chaperonok, azaz olyan fehérjék, amelyek stabilizálják az instabil konformációjú fehérjéket, és elősegítik a nem megfelelően feltekeredett fehérjék aktív szerkezetének kialakulását. Csoportunk kimutatta, hogy a Hsp-k egy csoportja a membránokhoz is képes kötődni, és specifikus lipid-fehérje kölcsönhatásaikon keresztül részt vesznek a membránfluiditás és permeabilitás szabályozásában, valamint a membrán integritásának megőrzésében. A Hsp-k alapvető szerepet játszanak számos betegség kialakulásában, illetve fennmaradásában. Rákos daganatokban például

magas Hsp szintet figyeltek meg, míg a kettes típusú diabéteszben és különböző neurodegeneratív betegségekben ennek ellenkezőjét írták le. Így a stresszválasz mechanizmusának feltárása, a kulcsfontosságú szabályozási lehetőségek megértése alapvető jelentőséggel bír.

Annak ellenére, hogy a Hsp-k szerepéről, a *hsp* gének expressziójának szabályozásáról számos adat áll rendelkezésre, a hő sokk válasz sejt- és molekuláris szintjeinek ma még számos eleme tisztázatlan. A kérdéskör egyik legvitatottabb aspektusa a stresszor érzékelése, a primer molekuláris szenzor(ok) azonosítása.

Csoportunkban - elsősorban prokarióta modellszervezeteken - végzett kísérletek eredményei megalapozták az ún. membrán-szenzor hipotézist, amely szerint a sejtmembrán nem csupán a celluláris stresszkárosodás egyik célpontja, de aktuális lipidösszetétele és fizikai állapota központi szereppel bírhat a stressz szignál érzékelésében, a stresszelhárító (adaptív) mechanizmusok működtetésében. A felvázolt modellben a membránok a következő visszacsatoláson alapuló körben szabályozzák a hő sokk fehérjék termelődését. A stressz hatására bekövetkező membrán állapotváltozások (mint például a membrán fluiditásának növekedése, és mikrodoménjeinek átrendeződése) indukálják a *hsp* gének expresszióját. A termelődő Hsp-k egyrészt védik/helyreállítják a károsodott fehérjéket, másrészt a membránokhoz kapcsolódva stabilizálják a membrán szerkezetét. A stabilizációval megszűnik a membrán-szenzor jelképzése, ami a hő sokk válasz lecsengését eredményezi.

## CÉLKITŰZÉSEK

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

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

## MÓDSZEREK

Emlős sejtek tenyésztése, tranziens transzfekciója

Fehérjék *in vivo* radioaktív jelölése, Western blot technika

Kvantitatív polimeráz láncreakció

DNS-fehérje komplex kimutatása gélretardációs technikával

Kromatin immunoprecipitáció

Riporter fehérje aktivitás mérés

Membránfluiditás mérés

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

## **EREDMÉNYEK**

1. Első lépésként tisztázni kívántuk, hogy emlős sejtekben is érvényes-e a „membrán, mint stressz-szenzor” hipotézis. Befolyásolja-e a hősokk válasz folyamatát a membránok fizikai állapotának módosítása? A kérdés megválaszolásához a membránok állapotát egy jól jellemzett membránfluidizáló szerrel, benzil-alkohollal (BA) módosítottuk, majd követtük, hogy a membránperturbáció képes-e kiváltani a Hsp-k termelődését. Több emlős sejtvonalban kimutattuk, hogy a BA kezelés már a növesztési hőmérsékleten is indukálja a *hsp* gének kifejeződését.

2. A membrán-szenzor hipotézis igazolása szempontjából központi jelentőségű kérdés, hogy a BA fokozza-e a celluláris fehérjék denaturációját. A szentjánosbogár luciferáz riporter enzim aktivitásának követésével megállapítottuk, hogy a BA nem okoz jelentős mértékű fehérje denaturációt.

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

3. Először teszteltük, hogy a membránok rendezettségének kritikus érték alá csökkenése elégséges jelként szolgál-e a Hsp-k termeléséhez. Ehhez egy BA-lal szerkezetileg rokon vegyülettel (fenetil-alkohollal) ugyanakkora membránfluiditás növekedést idéztünk elő, mint a *hsp* expressziót fokozó BA-lal. Azonban várakozásainkkal ellentétben az „izofluid membrán állapotot” létrehozó fenetil-alkohol kezelés hatására nem tapasztaltuk Hsp szint növekedést.

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

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

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

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

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

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

7. Ennek megfelelően végül kérdésként fogalmazódott meg, hogy a membránokat érintő stressz is ellenállóbbá teszi-e a sejteket egy következő stresszhatással szemben? A termotoleráns állapot kialakulásának tesztelésével megállapítottuk, hogy BA prekondicionálást követően a sejtek egy része képes volt megbirkózni egy egyébként letális hatású hőkezeléssel.

**Eredményeink alapján** a fehérjék, a DNS és a redox egyensúly mellett a membránok is részt vesznek emlős sejtekben a stresszválasz folyamatában. A BA által okozott membránstressz érzékelésének pontos mechanizmusa még nem tisztázott, de bizonyítottuk, hogy a membránok fluidizációja mellett a koleszterin gazdag mikrodomének átrendeződése is szükséges a stressz-szignál kialakulásához. Igazoltuk, hogy az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint növekedés, és a HSF1 aktiváció a membránoktól a *hsp* génekig ívelő jelátviteli útvonalnak elemei. A membránperturbáció hatására bekövetkező komplex válaszreakció,

melynek része a Hsp-k fokozott termelődése, növeli a sejtek ellenállóképességét a magas hőmérséklettel szemben, tehát a membránok szerkezetét érintő hatások is bekapcsolják a sejtek általános védekező rendszerét.

## TÉZISPONTOK

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



## AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK:

**Nagy E**, Balogi Z, Gombos I, Akerfelt M, Bjorkbom A, Balogh G, Torok Z, Maslyanko A, Fiszer-Kierzkowska A, Lisowska K, Slotte PJ, Sistonen L, Horvath I, Vigh L.: Hyperfluidization-coupled membrane microdomain reorganization is linked to activation of the heat shock response in a murine melanoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2007) 104(19) 7945-50.

Balogh G, Horváth I, **Nagy E**, Hoyk Z, Benkő S, Bensaude O, Vigh L.: The hyperfluidization of mammalian cell membranes acts as a signal to initiate the heat shock response. *FEBS J.* (2005) 272(23) 6077-86.

## TOVÁBBI PUBLIKÁCIÓK:

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

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

Török Z, Tsvetkova NM, Balogh G, Horváth I, **Nagy E**, Péntes Z, Hargitai J, Bensaude O, Csermely P, Crowe JH, Maresca B, Vigh L.: Heat shock protein coinducers with no effect on protein denaturation specifically modulate the membrane lipid phase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2003) 100(6) 3131-36.

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

## Társszerzői nyilatkozat

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

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

Prof. Dr. Víg László

Szeged, 2009. április 14.