

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Három jelátviteli út mechanizmusának egy-egy új komponense

Sipos Katalin

Programvezető: Dr. Sümegi Balázs
Témavezető: Dr. Kispál Gyula

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2002.

Tartalomjegyzék

Rövidítések	4
Bevezetés	5
RNáz L inhibitor szerepe az „unfolded protein response” folyamatában	5
„Unfolded protein response” (UPR)	5
Az UPR receptora	6
Az UPR jelátviteli útja	6
RNáz L Inhibitor (Rli)	7
Az Rli1p aktiválása – vas-kén komplex bioszintézis	8
Kalcium homeosztázis élesztőben	10
Glukóz adására bekövetkező kalciumszint változások élesztőben	11
A „shear stress”, egy speciális extracelluláris inger	12
G-protein függő jelátviteli utak	12
Jelátviteli utak aktiválódása „shear stress” hatására	13
Célkitűzések	14
Anyag és módszer	15
<i>In vitro</i> kötési kísérlet	15
RT-PCR	15
⁵⁵ Fe-beépülés mérése	15
Citoszol kalcium koncentráció mérés élesztőben	16
„Shear stress” mérések	16
Mintafeldolgozás	16
Eredmények	17
Rli1p aktiválása és szerepe az UPR-ben	17
Az Rli1p és Ire1p közti kapcsolat <i>in vitro</i> vizsgálata	17
Az UPR aktivitásának változása az Rli1p expressziójának függvényében	18
Glutation szerepe a vas-kén fehérjék aktiválásában	19
Funkcionális kapcsolat igazolható a citoszolikus vas-kén komplex szintézis és a glutation között	20
Kalcium felvétel és hexóz anyagcsere összefüggése	22
A citoszolikus kalcium koncentráció emelkedése vad típusú élesztőben glukóz vagy galaktóz adás hatására	22
A kalcium szint emelkedését a glukóz-1-foszfát és a glukóz-6- foszfát szint emelkedése előzi meg	22

A kalcium szint emelkedés nem váltható ki hexóz transzporter vagy glukóz-foszforiláció hiányában	22
Foszfoglukomutáz aktivitás szükséges a kalcium-válasz kiváltásához	23
Az intracelluláris kalciumszint átmeneti emelkedéséhez külső kalciumra van szükség	23
Shear stress indukálta jelátviteli utak	25
ERK és JNK aktiválódása különbözik áramlási súrlódási erő hatására	25
A súrlódási erő hatására aktiválódó G-protein függő jelátviteli utak endotel sejtekben	25
Megbeszélés	27
Hivatkozások	30
Saját közlemények, előadások, posztterek	33
Köszönetnyilvánítás	37
A tézisek alapját képező közlemények	38

Rövidítések

ABC	ATP binding cassette (ATP-kötő motívum)
ADH	alkohol dehidrogenáz
BAEC	borjú aorta endotel sejtek
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTT	dithiotreitol
EDTA	etilén-diamin tetraecetsav
EGTA	etilén glikol bisz(β -aminoetil éter)
ER	endoplazmatikus retikulum
ERK	extracelluláris jel által szabályozott kináz
GSH	redukált glutation
GST	glutation-S transzferáz
HA	haemagglutinin
IPTG	isopropil β -D-tiogalaktopiranozid
ISC	iron-sulfur cluster
JNK	c-Jun NH ₂ -terminál kináz
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MBP	mielin bázikus protein
Rli	RNáz L inhibitor
TRli	tetrán-szabályozta Rli
UPR	unfolded protein response

Bevezetés

Az eukarióta sejtekben a legfontosabb jelátviteli utak a transzmembrán kináz aktivitású receptorokhoz, a GTPáz aktivitással rendelkező fehérjékhez és a kalciumionhoz, mint intracelluláris üzenetközvetítő molekulához kapcsolódnak. E három típusú jelátviteli útról számos ismerettel rendelkezünk már, de még mindig vannak felderítetlen komponensek. A közönséges pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) megfelelő modell a jelátviteli utak tanulmányozására, mert könnyen tenyészthető, genomja ismert, és számos vonatkozásban azonosan vagy nagyon hasonlóan viselkedik az emlős sejtekhez. Ezért élesztőben vizsgáltuk a hibás szerkezetű fehérjék felhalmozódását jelző jelátviteli út (unfolded protein response: UPR) eddig ismeretlen elemeit, és a citoszolikus kalciumszint változást előidéző egyes folyamatokat.

Az áramlási nyírás erő (shear stress) okozta jelátviteli út aktiválódásra azonban megfelelőbb modell az érendotel (bovine aorta endothel cell: BAEC) sejt kultúra.

RNáz L inhibitor szerepe az „unfolded protein response” folyamatában

„Unfolded protein response” (UPR)

Eukarióta sejtekben a szekretoros és membránfehérjék a transzláció során az endoplazmatikus retikulumba (ER) transzlokálódnak, ahol felveszik a megfelelő térszerkezetet és számos módosításon esnek át, többek között glikozilálódnak, diszulfid hidak alakulnak ki. Ez a folyamat károsodhat a glikolizáció gátlása, redukáló ágensek, vagy az ER fehérjével való „túltöltése” esetén. Az ilyen módon felhalmozódott, hibás térszerkezetű fehérjék jelenlétét az Ire1 nevű fehérje érzékeli, és indítja el azt a folyamatot, amelynek célja a fehérjék foldingját elősegítő, ER-beli enzimek szintézisének fokozása (1). Az UPR-nek nevezett jelátviteli út eddig ismert komponensei élesztőben az Ire1p mellett a Hac1p transzkripciósfaktor, egy tRNS-ligáz és egy szerin-treonin foszfatáz (2).

A folyamat megismerésének jelentősége abban rejlik, hogy élesztőben és emberben, legalábbis részben, azonos a jelátviteli út szabályozása. Számos ismert humán betegséget okoznak a hibás szerkezetű, felhalmozódott fehérjék, így pl. Alzheimer-kórban a presenillin nevű fehérje, cisztikus

fibrózisban a CFTR, von Willebrand betegségben az azonos nevű faktor, osteogenesis imperfecta esetén az I. típusú prokollagén stb (3).

Az UPR receptora

Az Ire1 fehérje az endoplazmatikus retikulum membránjában helyezkedik el, N-terminális végével a lumen felé. C-terminális részén, amely a citoplazmában ill. a nukleuszban van, található egy kináz és egy endonukleáz aktivitással rendelkező domén, amely utóbbiak homológiát mutatnak az RNáz L kináz és ribonukleáz doménjeivel (4). Ez az elhelyezkedés és felépítés igen hasonló az emlős sejtekben ismert transzmembrán receptor kinázokéhoz. Valóban, az Ire1p is aktiválódása során oligomerizálódik és transz-foszforilálódik. Aktiválódását az ER lumenben felhalmozódott hibás szerkezetű fehérjék idézik elő, valószínűleg azáltal, hogy az Ire1 monomér N-terminális részéhez asszociálódott chaperon fehérjét elvonják, ezzel lehetővé téve az Ire1 oligomerizálódását és következményes foszforilálódását. A transz-autofoszforilációt a citoplazmikus részen lévő kináz aktivitású domén végzi. A C-terminálison lévő ribonukleáz aktivitású domén feladata a Hac1p transzkripció faktor mRNS-ének specifikus hasítása (5).

Az UPR jelátviteli útja

A *HAC1* mRNS különleges, nem spliceosome által katalizált érésen esik át az UPR aktiválódása során (6). Az Ire1p endonukleáz doménje távolít el a *HAC1* mRNS 3' nem-transzlálódó végéről egy 252 nukleotid hosszú darabot, ezzel megváltoztatva a Hac1p C-terminális végét is. A két hasítási helyet tRNS-ligáz köti össze. Az intron kimetszésének két következménye is van. Egyik, hogy ilyen módon egy olyan szakasz távolítódik el a mRNS-ből, amely saját translációjának attenuációjáért felelős. Ez az RNS-szakasz szerkezeténél fogva a transláció során a riboszómák továbbhaladását gátolja. Másrészt az érést követően keletkezett módosult Hac1p hatékonyabb transzkripció aktivátor, mint az eredeti fehérje. A Hac1p egy 22 bázispárt tartalmazó szekvenciához kötődik, amely megtalálható minden UPR által regulált gén promóterében. Ez a szekvencia szükséges és elegendő feltétele a megfelelő gének aktiválhatóságának. Az így indukált gének termékei kivétel nélkül a hibás szerkezetű fehérjék megfelelő átalakítását tudják elvégezni (chaperonok, pl. BiP, amely a hsp70 család tagja, élesztő megfelelője Kar2p, ER-ban lokalizált enzimek, pl. protein-diszulfid izomeráz).

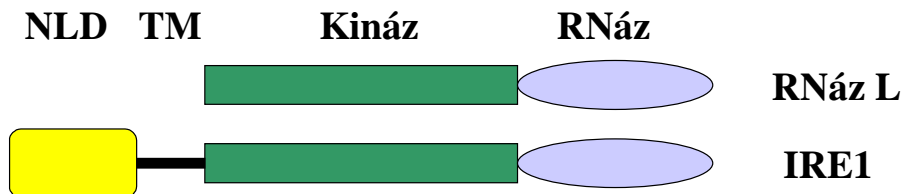
Emlős sejtekben a folyamat összetettebb, több út összekapcsolódása szükséges az UPR aktiválásához (7). Kimutatható emlős sejtekben egy ATF6 nevű bZIP transzkripció faktor, amelynek bázikus része hasonló az élesztőben található Hac1p megfelelő szakaszához. Az UPR aktiválódására az ATF6 elhasad, a membránban található fehérje N-terminális része leválik és transzlokálódik a sejtmagba, aminek következménye az UPR effektor fehérjéinek génaktiválódása. A fehérjét hasító enzimek is ismertek, és hiányukban nem aktiválódik az UPR. A közelmúltban fedezték fel az emlős Ire1p szubsztrátját is, az XBP1 mRNS-t. Az XBP1 (X-box binding protein) transzkripció faktor szerkezete csak annyiban hasonlít a Hac1p-hez, hogy ez is egy bZIP fehérje. Az Ire1p által végbevitt mRNS hasítás azonban igen hasonló az élesztőben leírthoz mind szekvenciájában, mind következményében. A hasítást követően a transzkripció faktorok C-terminális szakasza mindkét esetben megváltozik, és ennek következménye a fokozott transzkripció aktivitás lesz. Különbség a két faktor között, hogy míg a Hac1 mRNS hasítás nélkül gyakorlatilag nem transzlálódik, az XBP1 mRNS processzálódás nélkül is átíródik. Az ATF6 út és az XBP1 út összekapcsolódik, mivel a proteolízisen átesett ATF6 az XBP1 mRNS mennyiségét megnöveli. Ez szükséges előfeltétele az XBP1 mRNS Ire általi hasításának. Úgy tűnik, hogy emlős sejtekben az UPR aktiválásának több fokozata van, az ATF6 út aktiválódik először, és csak „nagyobb igény” esetén aktiválódik következményesen az XBP1 út. Ezt igazolja az is, hogy az utóbbi rendszert igénylik pl. a plazmasejtek és a máj sejtjei normális fejlődésükhöz, mivel ezekben a sejtekben a fehérjeszintézis mértéke igen nagyfokú. Ez arra is bizonyíték, hogy az UPR jelátviteli rendszernek emlős sejtekben nem csak stressz helyzetekben, hanem az ER normális működése során is szerepe van.

RNáz L inhibitor (Rli)

Az Rli egy konzervált, a prokariótákat kivéve valamennyi élőlényben megtalálható fehérje. A humán Rli szerkezete régebb óta ismert, az élesztő fehérje ezzel 68%-os homológiát mutat. Két nukleotid kötő és hasító ABC domént tartalmaz, valamint egy 4 ciszteint tartalmazó ferredoxin-szerű szekvenciát, amely 4Fe-4S komplex kötésére alkalmas(8).

Emlős sejtekben az Rli első leírása az interferon indukálta RNáz L aktivitásának szabályozása kapcsán történt (9). Az RNáz L 2'-5' oligoadenilát (2-5A) kötése révén aktiválódik, amely szokatlan molekula virális fertőzés során létrejövő kettős szálú RNS molekula ill. interferon hatására keletkezik a sejtekben ATP-ből a 2-5A szintetáz enzim segítségével

(10). Az RNáz L molekula N-terminális része tartalmazza a 2-5A kötő helyet, amely önmagában gátolja a C-terminális ribonukleáz domént. A 2-5A molekula kötését követően az RNáz L dimerizálódik és válik katalitikusan aktívvá. Az RNáz L kináz doménje szükséges az endonukleáz aktivitáshoz, nélküle nem dimerizálódik a molekula, de foszforiláció nem történik ezalatt.



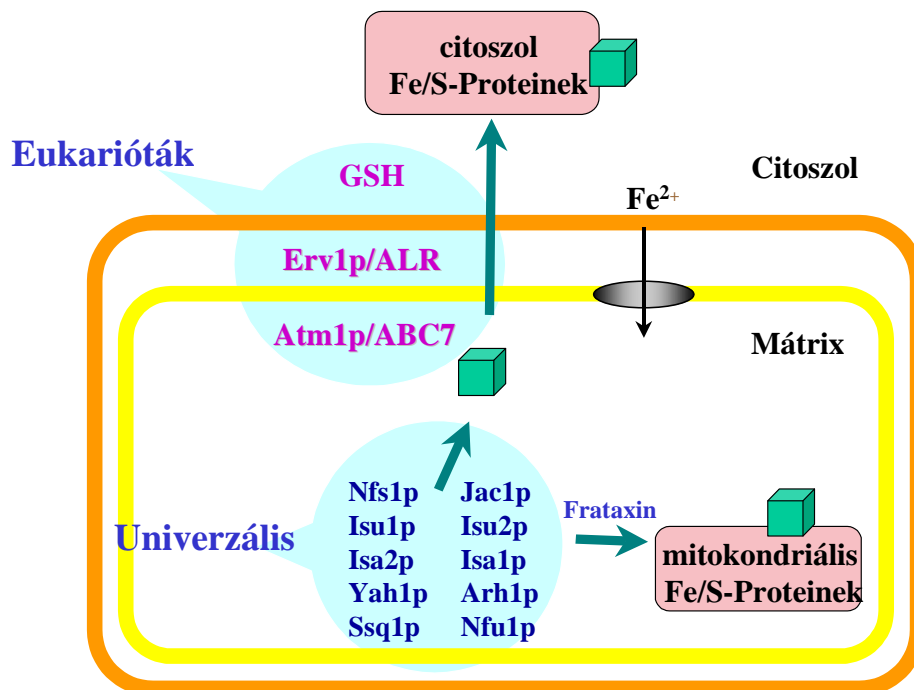
1. Ábra. Az RNáz és az Ire1p szerkezete. A homológ doméneket azonos színnel jelöltük. NLD: N-terminális luminális domén, TM: transzmembrán szegment

Az RNáz L szerepe feltételezhetően vírusinfekciók elleni védelem, ill. antiproliferatív hatás. Élesztőben nem található meg ez a molekula, de mint láttuk, az Ire1p tartalmaz egy hozzá hasonló szekvenciát (kináz és ribonukleáz domének) a citoplazmikus szakaszán. Emlős sejtekben az RNáz L inhibitora, az Rli gátolja a ribonukleáz hatását, azáltal, hogy a 2-5A molekula kötődését csökkenti, amely nélkül az RNáz L nem aktív. Érdekes módon az Rli megtalálható élesztő sejtekben is, funkciója élesztőben még nem ismert. Az Ire1p és az RNáz L nagyfokú homológiája, valamint az Ire és Rli fehérjék közötti *in vitro* kötődés megléte alapján felvetődött, hogy az Rli az UPR folyamatának szabályozásában játszik szerepet (11).

Az Rli1p aktiválása – vas-kén komplex bioszintézis

Vas-kén komplexet tartalmazó fehérjék elektron transzfer folyamatokban és számos enzimikus folyamatban vesznek részt (12). Eukarióta sejtekben a vas-kén komplexet tartalmazó fehérjék zöme a mitokondriumban lokalizálódik, de egyre több válik ismertté a citoszolban is. Kísérletes adatok azt bizonyítják, hogy a vas-kén komplex az apoprotein résztől függetlenül szintetizálódik, és „kész” állapotban épül össze a fehérje komponenssel. A komplex szintézisében részt vevő géncsoportot először baktériumban írták le (ISC, azaz Iron-Sulfur Cluster assembly gének), de hamarosan ismertté vált, hogy az ISC operonon kódolt fehérjék homológjai minden élő sejtben megtalálhatóak (13). Ez arra enged következtetni, hogy a komplex bioszintézise minden élő sejtben azonos módon kezdődik az univerzálisan

megtalálható enzimek hatására. Az eddig megismert enzimek ill. fehérjék közül legfontosabbak a teljesség igénye nélkül a következők: Nfs1p, cisztein deszulfuráz aktivitással, amely ciszteinből elemi ként szabadít fel. A komplex felépüléséhez redukáló ekvivalensekre is szükség van, valószínű donornak a Yah1p, mitokondriális ferredoxin látszik. Az Isu1 és Isu2 fehérjék valószínű szerepe a vas komplexbe juttatása (14). Mitokondriális chaperonok tartják a szintetizálódó komplexet megfelelő konformációban.



2. Ábra. A mitokondrium szerepe a vas-kén fehérjék aktiválásában. Az ISC operonon kódolt fehérjék homológjai univerzálisan megtalálhatóak és eukariótában részt vesznek mind a mitokondriális, mind a citoszol vas-kén fehérjék aktiválásában. Az ábrán ezek élesztő homológjait tüntettük fel.

Az élesztő Atm1p (humán homológja: ABC7), az élesztő Erv1 (humán homológja: ALR) és a glutation (GSH) kizárólag a citoszol vas-kén fehérjék aktiválásához szükséges.

A citoszolikus vas-kén fehérjék aktiválása az univerzálisan megtalálható enzimeken kívül további fehérjéket igényel, amelyek közül csak néhány ismert. Közülük a legjobban jellemzett a mitokondriumban található Atm1p (15).

Élesztőben és valamennyi eukarióta sejtben transzport rendszernek kell a mitokondriumban elkészült komplexet a citoszolba juttatnia, hogy ott a megfelelő apoproteinnel összeépülve létrejöhessen az aktív, vas-kén komplexet tartalmazó fehérje. Az Atm1p, egy ABC transzporter valószínűsíthető a szállító szereppel, és feltételezések szerint citoszolikus

chaperon molekulákra is szükség van a komplex beépüléséhez. Munkánk egyik részében a citoszolikus vas-kén komplex fehérjék aktiválásának új komponensét kerestük (16).

A glutation (γ -glutamil-ciszteinil-glicin) élesztőben esszenciális faktor (17). Szintéziséért két enzim felelős: γ -glutamil cisztein szintáz és glutation szintáz. Glutation hiányában az élesztő sejtek fokozottan érzékenyek oxidáló ágensekre, valamint az apoptózis jeleit mutatják. A glutation fő szerepének a redukáló kapacitását, a nehézfémeket keláló és a xenobiotikumokat konjugáló aktivitását tartják (18). Vizsgálataink alapján bebizonyosodott, hogy a glutationnak mindemellett a citoszolikus vas-kén fehérjék aktiválásában is szerepe van.

Kalcium homeosztázis élesztőben

A kalcium-ionok az emlős sejtekhez hasonlóan élesztőben is szerepet játszanak a jelátviteli utak aktiválásában, ehhez azonban fenn kell tartani részben egy állandó alacsony citoszolikus Ca^{2+} -szintet, részben a membránok Ca^{2+} -grádiensét (19). Mindezt a külső közeg esetleges kalcium-szint változása mellett is teljesítenie kell az élesztő sejtnek. A szabad citoszolikus kalcium-ionok alacsony szintje azért is kívánatos, hogy a foszforilált metabolitokkal ne képződhessenek alacsony oldékonyságú komplexek. A kalcium-ionok egy része fehérjékhez kötött a citoszolban, a zöme intracelluláris organellumokban tárolódik. A vakuolumok a legnagyobb kalcium-raktárak az élesztőben, amelyekben főként polifoszfát-komplexekként található a kalcium-ion. Az endoplazmatikus retikulum és a Golgi-rendszer kalcium-ion raktára könnyebben mobilizálható. A szekretoros sejtalkotók éppen magas Ca^{2+} -koncentrációt igényelnek azoknak az enzimeknek az aktivitásához, amelyek a fehérjék foldingját, transzportját, szekrécióját katalizálják.

A citoszolból a kalcium-ionok két pumpa, a Golgiban található Pmr1p és a vakuoláris Pmc1p segítségével jutnak a megfelelő sejt-kompartimentbe (20). A kettő közül az előbbi szerepe jelentősebb normál növekedési viszonyok között. A kalcium-pumpa mellett a vakuolumok rendelkeznek egy Vcx1p elnevezésű, V-ATPáz által működtetett $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporterrel is, amely főleg rövid idejű citoszolikus kalcium-szint növekedés esetén aktiválódik. A hosszú távú kalcium-tolerancia kialakulásáért főleg a Pmc1p aktiválódása felelős (21). Mindegyik kalcium-ion transzportért felelős rendszert a kalcineurin, egy Ca^{2+} - és kalmodulin-dependens protein foszfatáz regulálja, méghozzá olyan módon, hogy a Vcx1p gátlódik, míg a két Ca^{2+} -ATP-áz

indukálódik a calcineurin hatására (22). Ugyanakkor az intracelluláris transzporterek, elsősorban a Vcx1p visszacsatolás révén a calcineurin funkcióját is modulálják. Általánosságban elmondható, hogy a transzport rendszerek egymást pótolni tudják, ahogy ezt deléciós mutáns törzseken igazolták. Mindezek révén lehetővé válik, hogy a citoszolikus szabad Ca^{2+} -szint olyan módon legyen szabályozva, hogy a kalcium-szignált a transzport mechanizmusok ne gátolják, de a kalcium-szint tartósan ne térjen el a normálistól.

A külső környezet Ca^{2+} koncentrációja az élesztő sejtek működését jelentősen befolyásolja (23). Ennek a rendszernek egyik komponense a Mid1p, egy Ca^{2+} -permeabilis kation csatorna, amely az élesztő sejt feszülésére aktiválódik, jelenléte és működése szükséges a feromonhatásnak kitett élesztő életben maradásához. A szexuális szaporodás korai szakaszában a feromon G-proteinnel asszociálódott receptorhoz kötődik a sejt felszínén, MAP kináz utat aktivál, amelynek eredményeként a sejt a sejtciklus G_1 fázisában megáll. Az ezt követő differenciálódás Ca^{2+} beáramlást igényel, amely Mid1 fehérjétől függő. A Mid1p szerkezete szokatlan más ioncsatornákéval összehasonlítva. Jellemzői 4 hidrofób régió, egy N-glikozilációs hely, és a reguláció szempontjából fontos C-terminális domén, amely 7, a funkció szempontjából fontos ciszteint tartalmaz. Újabb kutatások igazolták, hogy a Mid1p a Cch1p-vel (emlős sejtek nagy affinitású, feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornához homológ fehérje) asszociálódva szükséges a sejtnövekedéshez alacsony kalciumkoncentrációjú közegben, valamint aktiválható a szekretoros Ca^{2+} -raktárak depléciójával. Vizsgálataink szerint a Mid1p ioncsatornának a szénhidrát-megvonást követő hexóz adás előidézte átmeneti citoszolikus kalciumszint emelkedés előidézésében is szerepe van.

Glukóz adására bekövetkező kalciumszint változások élesztőben

Glukóz-adásra az élesztő sejtekben átmeneti Ca^{2+} -szint emelkedés figyelhető meg. A jelenség első leírásakor azt találták, hogy glukózmegvonásra a sejtek a G_0 - G_1 fázisban megállnak, glukóz visszadást követően kb. 1 órával sejtosztódás következik be (24). A glukóz adminisztrációt követő kb. 2. perc végén az intracelluláris kalciumkoncentráció átmeneti megemelkedése látható, amelyet deoxi-glukóz adása nem idézett elő. A jelenség nem függött össze az intracelluláris cAMP-szint változásával, és nem igényelt *de novo* fehérjeszintézist. Vizsgálataink igazolták, hogy extracelluláris kalcium nélkül a jelenség nem látható, és előidézéséhez a glukóznak valamilyen metabolitjára van szükség.

A „shear stress”, egy speciális extracelluláris inger

Az erekben áramló vér az érfal endotél borítására és részben az alatta lévő simaizomzatra jól definiálható erőhatást fejt ki, amelynek fő összetevői az érfalat érő nyomás és súrlódási, nyírási erő (25). Ezeket összefoglalóan az angol nyelvű irodalom „shear stress”-nek nevezi. Laminárisan áramló rendszerben a falat érő nyíró erő az áramló folyadék (vér) viszkozitásával és az áramlás sebességével egyenes, míg a rendszer átmérőjével fordított arányban áll (26). A jelenség és főként a hatására az érfal sejtjeiben bekövetkező változások kutatása akkor vált jelentőssé, amikor nyilvánvalóvá vált, hogy az érlemezéssel szemben védettek azok a területek a keringésben, amelyek viszonylag nagyobb és/vagy állandó shear stress-nek vannak kitéve. Kísérleteink során mi is a shear stress hatására intracellulárisan bekövetkező változásokat, jelátviteli utak aktiválódását, következményes génexpressziós változásokat vizsgáltuk az ateroszklerózis mechanizmusának jobb megértése céljából.

G-protein függő jelátviteli utak

Az extracelluláris jelek egy része GTP-kötő fehérjével (G-proteinnel) asszociálódott membránreceptorok révén fejt ki hatását az eukarióta sejtekre (27). Ez a jelátviteli út már élesztőben is jól ismert, például a feromonok egy része is G-fehérjével kapcsolódó membránreceptorokhoz kötődik. A G-fehérjék a nagyobb GTP-áz fehérjék egyik családja, három különböző, α , β és γ alegységből állnak. Ezeknek az alegységeknek a különböző típusai preferenciált kombinációkat alkotnak egymással. Az alegységek ultrastruktúrája ismert napjainkban, amelyből számos funkcionális következtetés is levonható. Az α -alegységnek van nukleotid kötő helye, de az alegység térszerkezete merőben különböző a GDP és GTP kötés esetében. A β és γ alegység igen szoros kapcsolatban dimér komplexet képez, és szerepe van önállóan is, például serkenti az α -alegység membránreceptorhoz kötődését.

Az extracelluláris jeleket érzékelő membránreceptorokra és működésükre általánosságban jellemző, hogy a ligand kötése után olyan konformációváltozást szenvednek, amelynek következménye a citoszolikus oldalukhoz kötődött G-proteinek struktúraváltozása. Ennek legjelentősebb lépése az addig inaktív, GDP-t kötő fehérje α -alegységéről a GDP ledisszociálása. Mivel a sejten belül a GTP koncentrációja meghaladja a GDP-ét, a ledisszociálódó GDP helyét rögtön GTP foglalja el. Ennek hatására az α -

alegység aktiválódik, leválik a receptorról és a másik két, dimert alkotó alegységről (β és γ). Az aktív α -alegység hatására intracelluláris enzim(ek) aktiválódnak, és általában másodlagos közvetítőkön keresztül a kiváltó ingerre az adott sejtre jellemző specifikus válaszadás következik be. Mindemellett a $\beta\gamma$ -dimér is képes az α -alegységtől függetlenül enzimek, másodlagos közvetítő molekulák aktiválására. A jelátviteli út lecsengésében legnagyobb jelentősége az α -alegység GTP-áz aktivitásának van. A kötődött GTP elhasítását követően ugyanis az α -alegység aktivitása megszűnik, és újra alkalmassá válik a $\beta\gamma$ -dimérrel és a membránreceptorral való asszociációra.

Jelátviteli utak aktiválódása „shear stress” hatására

Számos külső ingerre az eukarióta sejtekben a mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK) ill. azok egy csoportja aktiválódik (28). Ezen szerin/treonin kináz családban fontos jelátviteli molekulák szerepelnek, amelyek különböző külső ingerre a sejtre jellemzően transzkripciósfaktorokat, enzimeket vagy más kinázokat foszforilálnak. Shear stress hatására a MAP kinázok két nagy csoportja aktiválódott, az extracelluláris jellel kapcsolatos kinázok (ERK) és a *c-jun* N-terminális kinázok (JNK). Abban az időben amikor vizsgálatainkat végeztük, még csak az ERK komponensek részvétele volt ismert. Azóta felismerték egy újabb alcsalád, a p38 kinázok szerepét is (29). Az azóta végzett kutatások azonosítottak egy konzervatív szekvenciát is (SSRE: shear stress response element) azon gének egy részének promóterében, amelyek expressziója shear stress hatására változik. A két jelátviteli út szerepét az is alátámasztja, hogy a legújabb adatok szerint a két út aktivitásának egyensúlya szabja meg az ateroszklerózissal szembeni védelem és a gyulladás kialakulása közül melyik zajlik az érintimában. Az még nem tisztázott, hogy a mechanikus hatás milyen módon kerül érzékelésre. Az valószínűnek látszik, hogy citoskeletonális elemek (F-aktin, integrinek) vesznek részt benne.

Célkitűzések

Eukarióta sejtekben kerestük jelátviteli utak új elemeit.

1. Az Rli szerepe az „unfolded protein response” folyamatában.
A mitokondrium szerepe az Rli aktiválásában
A glutation jelentősége az Rli és más citoszolikus vas-kén fehérje aktiválásában.
Az Rli1 és Ire1 fehérjék közötti funkcionális kapcsolat.
2. A glukózadás előidézte átmeneti intracelluláris kalciumszint emelkedés jelátviteli útja, a glukóz hatását közvetítő molekula azonosítása.
3. Az endotel sejtek áramlási nyíró erő okozta mechanikus ingerre (shear stress) adott válasza eddig ismeretlen komponenseinek feltérképezése.

Anyag és módszer

In vitro kötési kísérlet

PCR segítségével kapott Ire1p doméneket (kináz és RNáz, csak kináz, csak RNáz) pGex4T-1 plazmidba klónoztuk és BL21 sejtekbe transzformáltuk. A sejteket ampicillint és klorocidot tartalmazó LB médiumban növesztve 0.1 mM IPTG-vel indukáltuk 2 órán át, 30°C-on. A sejteket összegyűjtve kis volumenű TBST (20 mM Tris-HCl, 7.4, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20) oldatban felvettük, lefagyasztottuk, felengedés után röviden szonikáltuk. A centrifugálás után nyert sejtlizátumot GSH-agaróz (Pharmacia) gyöngyökkel inkubáltuk. A mosott agaróz gyöngyök a GST-vel fúzionáltatott Ire fehérjedarabokat specifikusan megkötötték.

Az Rli fehérjét haemagglutininnel fúzionáltatva fejeztük ki élesztőben. Az ebből a törzsből üveggyöngyös feltárás révén kapott tiszta sejtextraktumot inkubáltuk a fenti GSH-agaróz gyöngyökkel 50 mM Tris-HCl (8), 5 % glicerin, 0.1 % Triton X-100, 50 mM NaCl pufferben. Laemmler mintapufferben felvéve a gyöngyöket tartalmazó üledéket Western-blott analízist végeztünk HA ellenes monoklonális ellenanyaggal, kontrollként élesztő sejtlizátumot használva.

RT-PCR

W303 és TRli sejteket 0, 0.1, 0.5 vagy 2.5 µg/ml doxiciklint tartalmazó YPD médiumban növesztettünk éjszakán át. 300 mg sejtéből teljes RNS-t izoláltunk. 1.8 µg teljes RNS templáttal reverz transzkriptáz reakciót végeztünk (Omniscript RT Kit, Qiagen) 37°C-on, 1 órán át. A reakció volumen felét (10 µl) használtuk templátnak a PCR reakcióhoz (Sigma Taq Pol). A reakció 10 %-át futtattuk 1 %-os agaróz gélen.

⁵⁵Fe-beépülés mérése

A vizsgált fehérje HA fúziós formáját kifejező élesztőtörzset éjszakán át vasmentes minimál médiumban növesztettük. 300 mg sejtet 10 ml vasmentes médiumban növesztettünk 10µCi ⁵⁵Fe mellett, aszkorbát jelenlétében 1 órán át. Az összegyűjtött, lemerített sejteket citrát tartalmú (50 mM citrát, pH:7.4, 1 mM EDTA) oldattal mostuk, majd 20 mM Tris-HCl (7.4), 2.5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 10% glicerin összetételű pufferben üveggyöngyökkel feltártuk. A tiszta felülúszóból azonos mennyiségeket használtunk agarózhoz kötött monoklonális HA-ellenes ellenanyaggal végzett immuprecipitációra. A beépült radioaktív vasat szcintillációs számlálóval kvantifikáltuk.

Citoszol kalcium koncentráció mérése élesztőben

A használt élesztő törzseket *ADHI* promóter kontrollja alatt álló apoaequorin gént expresszáló plazmival transzformáltuk (24). A citoszol szabad Ca^{2+} koncentrációjának meghatározásához a kifejeződő aequorin összfehérje koncentrációra vonatkoztatott mérésére volt szükség. A szabad Ca^{2+} koncentrációja és az aequorin okozta fénykibocsátás viszonyának meghatározásához pedig standard görbét vettünk fel. A mérés luminométerben történt 2 mM EGTA-t és 40 mM MES-Tris-t (6.5) tartalmazó minimum médiumban. Az apoaequorint aequorinná történő konvertálás után a sejteket a fenti teszt médiumban inkubáltuk 3 órán át szobahőn, sötétben. Ezt az alap fénykibocsátás mérése követte (40 sec), majd glukóz vagy galaktóz adással kezdődött a mérés.

A sejtek teljes kalcium tartalmának meghatározása szárított, mért mintákon lángfotometriás úton történt.

„Shear stress” mérések

BAEC (borjú aorta endotel) sejteket 20% borjúsérumot tartalmazó DMEM tápoldatban növesztettünk üveglemezen (kb. 1 millió sejt/lemez). A kísérlet előtti napon a médiumot 0.5% sérumot és 25 mM HEPES-t tartalmazó DMEM-re cseréltük. A mérés speciális kamrában történt, 37°C-on, pumpával szabályozható standard áramlás mellett (30).

Mintafeldolgozás

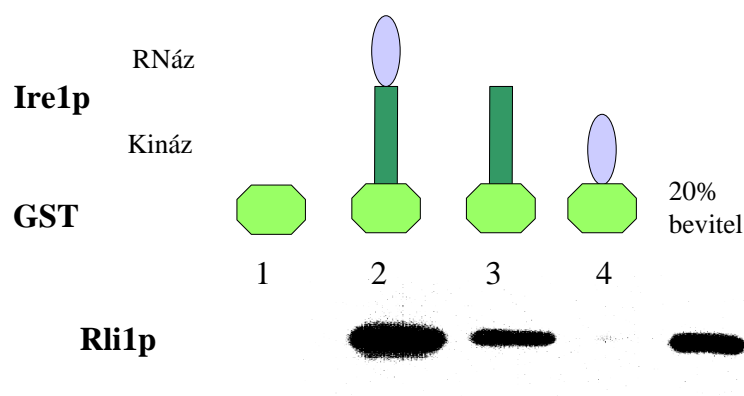
Az áramlási behatásnak kitett sejtekből proteinázgátlók jelenlétében, 4°C-on citoszol-kivonatot, vagy 1% Triton X-100 jelenlétében lizátumot készítettünk. A kivonatokot SDS-gélen futtatva Western-blott analízisnek vetettük alá, foszfortirozin specifikus ellenanyagot használva. MAPK aktivitást MBP (mielin bázikus protein) vagy GST-c-Jun, mint specifikus szubsztrátok foszforilálódásának mértékével mértük, a kináz reakciót követő gélelektroforézis és autoradiográfia révén. Immunprecipitációt ERK ill. JNK ellenes specifikus ellenanyaggal, valamint Protein A-agaróz ill. Protein G-agaróz segítségével végeztünk. Az így kapott immunkomplexekkel végeztünk kináz reakciót MBP ill. GST-c-Jun szubsztrátokat és $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP-t használva.

Eredmények

Rli1p aktiválása és szerepe az UPR-ben

Az Rli1p és Ire1p közti kapcsolat *in vitro* vizsgálata

Az RNáz L és az Ire1p közötti homógia vetette fel a gondolatot, hogy élesztőben (és emlős sejtekben is) az Rli fehérje szerepe esetleg az UPR jelátviteli rendszerében van. Vizsgálatainkat így az Rli1p és az Ire1p közötti kapcsolat feltérképezésével kezdtük. Az Ire fehérje kináz és/vagy ribonukleáz doménjét glutation S-transzferázhoz fúzionáltatva IPTG-vel indukálhatóan nagy mennyiségű fehérjét tudunk előállítani, amelyek glutation tartalmú agaróz gyöngyökhöz köthetők. A fehérjét hordozó gyöngyöket élesztő sejtextraktummal inkubáltuk, amely sejtekben az Rli1p a haemagglutinin (HA) egy szakaszával fúzionáltatva fejeződik ki. Az Ire1p adott doménjéhez való specifikus Rli1p kötődést HA-ellenes ellenanyag segítségével mutattuk ki.



3. Ábra. Az Ire1p kötődése az Rli1p-hez. Glutation-S transzferáz (GST) (1), GST-Ire1p kináz és RNáz domén (2), GST-Ire1p kináz domén és GST-Ire1p RNáz domén fúziós fehérjéket glutation-Sepharose-hoz kötve Rli1p-t tartalmazó sejtlizátummal kevertünk össze. A GST-fúziós fehérjéket izoláltuk, majd a megkötött Rli1p-t immunoblot módszerrel mutattuk ki.

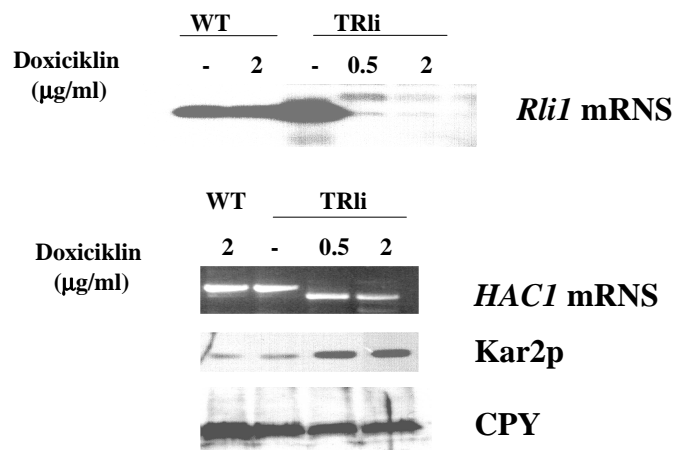
Az *in vitro* kötési kísérletek eredményeként a reakcióelegyben található Rli1p kb. 50%-a kötődik az Ire kináz és RNáz doménjéhez együtt. Ennél kevesebbet, kb. 20%-nyit kötött a kináz domén külön, míg az RNáz domén önmagában nem kötött Rli1 fehérjét. Ennek alapján elmondható, hogy *in*

in vitro a két fehérje között létrejön specifikus kötődés, amely legerősebb, ha az Ire1 fehérje kináz és RNáz doménje is jelen van.

Az UPR aktivitásának változása az Rli1p expressziójának függvényében

Az Ire1p és Rli1p közötti kötődés, valamint az Ire1p és az RNáz L molekula közötti hasonlóság alapján feltételeztük, hogy az Rli1p szerepet játszik az UPR folyamatában. Az Ire1 fehérje az UPR receptoraként működik az ER lumenében. Aktiválódása elindítja az UPR folyamatát, amelynek fő jellemzői a *Hac1* mRNS processzálódása, és következményesen az UPRE-t hordozó gének aktiválódása élesztőben, pl. a *Kar2*. A folyamat vizsgálatához létrehoztunk egy törzset, amelyben az Rli promóterét egy doxiciklinnel szabályozható promóterre cseréltük ki (TRli). Az *Rli1* mRNS szintjének meghatározásával bizonyítottuk, hogy a TRli sejtekben doxiciklin jelenlétében az Rli expressziója jelentősen csökken.

Ilyen körülmények között vizsgáltuk a *Hac1* mRNS-ének érését RT-PCR technikával. A vad típusú sejtekben csakúgy, mint a kezeletlen TRli sejtekben csak a teljes hosszúságú mRNS volt kimutatható, míg az antibiotikummal kezelt, azaz kevesebb Rli1 fehérjét expresszáló TRli sejtekből a kisebb, intront már nem tartalmazó, processzált *Hac1* mRNS mutatható ki.



4. Ábra. Az UPR aktiválódik Rli1p depléció következtében. Az *Rli1* mRNS deplécióját éjszakán át doxiciklin jelenlétében növesztett sejtekben Northern blot technikával mutattuk ki. A *HAC1* mRNS érését reverz transzkriptáz-PCR módszerrel bizonyítottuk, a Kar2p-t és a kontrollként használt karboxipeptidáz Y-t (CPY) immunoblottal detektáltuk.

Ugyanezekben a sejtekben vizsgáltuk a Kar2p szintjét Western-blot technikával. A TRli sejtekben a doxiciklin kezelés hatására, azaz az Rli1p

mennyiségének csökkenésével párhuzamosan a Kar2p szintje megemelkedett összevetve a vad típusú sejtekben ill. a kezeletlen TRli sejtekben található Kar2p szinttel. Mindez a változás úgy következett be a kezelt TRli sejtekben, hogy közben a fehérjék érése nem károsodott (lásd kontrolként a CPY (karboxipeptidáz Y) immunoblott kimutatását). Az Rli1p szerepe az URP folyamatában ezek alapján az Ire1p és *Hac1* mRNS processzió kapcsolatában közvetlenül vagy közvetve valószínűsíthető.

Glutation szerepe a vas-kén fehérjék aktiválásában

A fenti eredményeket összegezve: az Rli1p szerepet játszik az élesztő UPR folyamatában, az Ire1p és a Hac1p transzkripciós faktor közötti kapcsolatban. Ehhez a szerepéhez szüksége van a Fe-S komplexre. A Fe-S komplex bioszintézis számos lépése ismert már, tudjuk, hogy a mitokondriumban zajlik a komplex összeépítése, ismert a komplexet a citoszolikus apoproteinekhez eljuttató transzporter (Atm1p). A citoszolikus Fe-S komplexet tartalmazó fehérjék éréséhez azonban még bizonyosan más faktorok is szükségesek. Mivel az Atm1p-depletált élesztő törzsből a sejtek glutation-tartalma jelentősen, kb. kétszeresére megnövekedett a vad törzshöz viszonyítva (31), a glutation a Fe-S komplex érés egyik komponense lehet. A feltevést igazolandó a YPH500 törzsből deletáltuk a γ -glutamil-cisztein szintáz enzimet (a glutation szintézis első enzime), létrehozva a Δ gsh1 törzset. Ezt a törzset glutation hiányában növesztve nyolc generáció után a sejtek glutation tartalma századrészt csökkent a vad típusúnak, de a sejtek még életképesek voltak.

Glutation hiányában növesztett Δ gsh1 és YDH500 sejtekből mitokondriumot izoláltunk. Valamennyi vizsgált mitokondriális fehérje mennyisége megegyezett a két törzsből. Két vas-kén komplexet tartalmazó és két másik enzim aktivitása is azonos volt a két sejtípustban, igazolva a mitokondriumok intaktságát és a mitokondriális Fe-S komplex fehérjék megfelelő működését.

Egy mitokondriális Fe-S enzimbe, a biotin szintázba (Bio2p) történő vasbeépülést vizsgáltuk a következőkben, ^{55}Fe és Bio2p ellenes specifikus ellenanyag segítségével. Az immunoprecipitátumban található radioaktivitás alapján elmondhatjuk, hogy glutation hiányában a Δ gsh1 sejtekben a Bio2 fehérjébe a vasbeépülés nem csökkent, sőt növekedett, glutation hozzáadás után a vad típusban látható szintre csökkent le. Ugyanígy a sejtek teljes ^{55}Fe -felvétele Δ gsh1 sejtekben glutation depláció mellett valamivel több volt, mint a vad típusban, és glutation adásra a kétféle azonos szintet mutatott.

Glutationra tehát nincs szükség ahhoz, hogy az élesztő sejtek a vasat felvegyék és a mitokondriumba jutassák a mitokondriális Fe-S fehérjék éréséhez.

A citoszolikus Fe-S fehérjék közül az izopropil-malát izomeráz (Leu1p, a leucin bioszintézis egyik enzime (32)) és az Rli1p ⁵⁵Fe-felvételét vizsgáltuk. A fehérjébe történő vasbeépülés mindkét esetben jelentősen sérült a Δ gsh1 sejtekben a glutation-megvonás hatására. A Leu1p enzimaktivitása is csökkent glutation-hiányban, míg egy másik citoszolikus enzim (ADH: alkohol dehidrogenáz) aktivitása azonos volt a két törzsből.

Glutation-hiányban oxidatív károsodás érheti a sejteket, amellyel szemben a ditioneitol (DTT), mint membránon átjutó redukáló ágens védelmet nyújt. Δ gsh1 sejtek növekedése glutation csökkenés mellett lelassul, ez a hatás DTT adással kivédhető. Az Rli1p érési károsodását a glutation-hiányos Δ gsh1 sejtekben azonban sem a DTT-adás, sem a sejtek anaerob körülmények közötti növelése nem akadályozta meg, ezzel igazolva, hogy a glutationnak a citoszolikus Fe-S fehérjék érésében specifikus szerepe van, amely más, mint az oxidatív károsodástól való védelem.

Funkcionális kapcsolat igazolható a citoszolikus vas-kén komplex szintézis és a glutation között

Korábbi megfigyelés, hogy a mitokondriumban képződött vas-kén komplex citoszolba juttatásáért felelős ABC transzporter, Atm1p csökkent képződésének következményei részben a glutation-szint megemelkedése a sejtben, részben a mitokondriumban történő vasfelhalmozódás. Glutation depléción a Δ gsh1 sejtekben szintén előidézett mitokondriális szabad vas felhalmozódást, amely a vad típusú sejt mitokondriumában található vasmennyiség húszszorosát érte el.

Az *ATM1* és *GSH1* közötti genetikus interakció vizsgálatára kettős mutáns törzset hoztunk létre, a Δ gsh1 sejtben az *ATM1* gént galaktózzal indukálható, glukózzal represszálható promóter (*GAL10*) irányítása alá helyeztük (Δ gsh1/Gal-ATM1). Glutation hiányában, glukóz jelenlétében csak a Gal-ATM1 sejtek növekedtek. A minimál médium glutationnal való kiegészítése után a Δ gsh1 sejtek és a kettős mutánsok is növekedtek. DTT hozzáadásával csak a Δ gsh1 sejtek növekedése segíthető, a kettős mutánsé nem.

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy az Atm1p és a glutation funkciója közötti kapcsolatot genetikai módszerekkel is bizonyítottuk, azaz mindkettő részt vesz a citoszolikus vas-kén fehérjék érési folyamatában.

Kalcium felvétel és hexóz anyagcsere összefüggése

A citoszolikus kalcium koncentráció emelkedése vad típusú élesztőben glukóz vagy galaktóz adás hatására

Az apoaequorin gént expresszáló vad típusú élesztő törzset szénforrásmentes médiumban tartottuk három órán át kalcium hiányában vagy jelenlétében, majd megmértük a citoszol szabad kalcium szintjét. A szabad kalcium szint változását 100 mM glukóz vagy galaktóz sejtekhez adása után folyamatosan mértük. Legmagasabb intracelluláris kalciumszint növekedést az eredetileg glukózon növelt sejtek esetében kaptunk, ha az éheztetés kalciumot tartalmazó tesztoldatban történt és utána glukózt adtunk a sejteknek. Nem kaptunk választ, ha a glukózon növelt sejteknek éheztetés után galaktózt adtunk. A galaktózon előnövelt sejtek hasonlóan reagáltak az éheztetés után, akár glukózt, akár galaktózt kaptak. A válasz kisebb mértékű volt, mint az előző esetben, de a médium kalcium tartalma ebben az esetben is pozitívan befolyásolta.

Az a tény, hogy a galaktóz nem váltotta ki a kalcium szint átmeneti emelkedését a glukózon növelt sejtekben, arra utal, hogy a galaktóznak be kell jutnia a sejtekbe és foszforilálnia kell a válasz előidézéséhez. A galaktóz transzportért és foszforilációért felelős gének glukóz jelenlétében ugyanis represszió alatt állnak.

A kalcium szint emelkedését a glukóz-1-foszfát és a glukóz-6-foszfát szint emelkedése előzi meg

A glukóz-1-foszfát és a glukóz-6-foszfát szint a sejtekben ugyanazokban az esetekben emelkedett, amikor a kalcium szint átmeneti emelkedését is megfigyeltük, azaz glukózon növelt sejtekben glukóz adást követően, és galaktózon növelt sejtekben mind glukóz, mind galaktóz hatására. A legmagasabb értéket mindkét esetben a szénforrás adását követő első percben mértük, míg a kalcium szint a harmadik perc végére érte el a maximumát. A legjelentősebb emelkedést glukózon növelt sejtekben láttuk glukóz adást követően a glukóz-6-foszfát szintben.

A kalciumszint emelkedés nem váltható ki hexóz transzporter vagy glukóz-foszforiláció hiányában

Az apoaequorint expresszáló vad típusú és hexóz transzporter deficiens törzseket laktózon növeltük, majd a szénforrás megvonását követően glukózt

adtunk a sejt kultúrájának és követtük az intracelluláris kalciumszint változását. A vad törzsben a korábbihoz hasonló, bár kisebb mértékű választ detektáltunk. A transzport-deficiens törzsben a válasz hiányzott.

Hasonlóan nem tudtuk a kalciumszint emelkedését glukózzal előidézni a glukózfoszforilációra képtelen (hexokinázok: *HXK1* és *HXK2*, valamint glukokináz: *GLK1* hiánya) mutáns törzsben. Ezek a sejtek glukóz jelenlétében nem is nőnek. Az előinkubálás galaktózzal történt. Éheztetést követő galaktózzadás a szokott kalciumválaszt idézte elő.

Foszfoglukomutáz aktivitás szükséges a kalcium-válasz kiváltásához

Korábbi megfigyelés, hogy a fő foszfoglukomutáz (*PGM2* gén által kódolt) hiánya esetén a galaktózon növelt mutáns sejtekben megnő a glukóz-1-foszfát és a citoszolikus kalcium szint, ugyanakkor a kalciumválasz nem váltható ki sem glukóz, sem galaktóz adással. A Δ pgm2 sejteket glukózon előnövelve, a szénforrás elvonását követő glukózzadás hatására a sejtekben létrejött kalciumválasz a vad típuséhoz képest jóval kisebb volt, a sejtek glukóz-1-foszfát szintje is csak negyede volt a vad típusénak, és a növekedés üteme is lassúbb volt. A glukóz-6-foszfát szintekben nem volt értékelhető különbség.

Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az intracelluláris kalciumszint átmeneti emelkedését előidéző folyamathoz glukóz-1-foszfátra (vagy annak valamely származékára) van szükség a sejtben.

Az intracelluláris kalciumszint átmeneti emelkedéséhez külső kalciumra van szükség

Valamennyi mérésünkben azt találtuk, hogy glukóz vagy galaktóz indukálta intracelluláris kalciumszint emelkedés jóval magasabb volt, ha a teszt médium kalciumot tartalmazott. Figyelembe véve a sejtben és a közegben uralkodó kalciumkoncentráció viszonyokat, úgy tűnik, a külső kalcium hatását egy nagy affinitású csatornán keresztül valósítja meg.

A hipotézist igazolandó, a korábbihoz hasonlóan éheztetést követő glukózzadás hatását néztük az intracelluláris kalciumszintre apoequorint kifejező vad típusú és Mid1p-hiányos élesztőben. A *MIDI* gén terméke egy feszülés hatására aktiválódó kalcium-áteresztő nem-szelektív kationcsatorna. Glukózon történő előtenyésztés után a cukormegvonást követő ismételt glukózzadás hatására a vad típusban a szokásos átmeneti kalciumszint emelkedést detektáltuk, míg a Mid1p-hiányos törzsben nem volt válasz. Ugyanakkor a glukóz-1-foszfát és glukóz-6-foszfát szint a két törzsben

azonos volt, a mutáns törzs glukóz felvétele és foszforilációja tehát nem sérült. A közeg kalciumion koncentrációja azonban egyértelműen befolyásolta a sejtek kalciumválaszát.

Shear stress indukálta jelátviteli utak

ERK és JNK aktiválódása különbözik áramlási súrlódási erő hatására

Már régebb óta ismert jelenség az ERK aktiválódása endotel sejtekben áramlási súrlódás hatására. A jelenséget mi is igazoltuk áramlásnak kitett endotel sejtekben. Különböző (0-20 dyn/cm²) erősségű áramlást alkalmazva 5 percig a sejteket lizáltuk, és részben foszfortirozin ellenanyaggal, részben *in vitro* foszforilációs esszében (a szubsztrát MBP) az ERK1-nek és ERK2-nek megfelelő 44 ill. 42 kD molekulásúlyú fehérjék foszforilálódtak, ill. ezen fehérjék mutattak MBP kináz aktivitást. Az ERK aktivitás mértéke erőbehatástól függött, 1 dyn/cm² értéknél jelent meg, és maximumát 10 dyn/cm²-nél érte el.

Az ERK aktiválódása áramlás hatására nemcsak az erőből függ, hanem időben sem állandó. Azonos erő (5 dyn/cm²) mellett az ERK aktiválódása (MBP, mint specifikus szubsztrát foszforilálásával mérve) 5 perc után érte el maximumát, és 30 perc múlva visszatért a kiindulási értékre. Ezzel szemben a JNK aktiválódása (GST-c-Jun fúziós fehérje volt a szubsztrát) csak 30 perc után kezdődött, 4 óra múlva érte el maximumát és 17 óra múlva tért vissza az alapértékre. Az ERK aktiválással ellenkezőleg a JNK aktivitását nem befolyásolta az alkalmazott erő, már a legkisebb súrlódási erő hatására is maximális válasz keletkezett.

A súrlódási erő hatására aktiválódó G-protein függő jelátviteli utak endotel sejtekben

Ismert, hogy pertussis toxin a G_i-proteinek α alegységének ADP-ribozilációját idézi elő, a kolera toxin viszont aktiválja az α_s alegységet. Ezen toxinok alkalmazásával feltérképezhető, hogy melyik G-proteinnek van szerepe az ERK ill. JNK aktiválásában. Pertussis toxinnal való előkezelést követő áramlási stressz hatására az endotel sejtekben nagymértékben lecsökkent az ERK foszforilálódása, amely foszfo-ERK ellenanyag segítségével specifikusan igazolható, míg az ERK mennyisége a sejtekben azonos volt. Ugyanakkor a toxinnal való előkezelés a sejtekben lévő G_i proteineket teljes mértékben ADP-ribozilálta, ahogy ez a G_i fehérjék *in vitro* ADP-riboziláció hiányából látható az előkezelést követően. A JNK aktiválására a pertussis toxin nem volt hatással, és a kolera toxin is csak a rövid idejű (5 perc) áramlási kezelés esetében mutatott kismértékű JNK-aktivitás növekedést.

α_i mutánsokkal végzett kísérletekben az ERK aktiválódása sérült, specifikusan az α_{i2} -nek bizonyult ebben szerepe. Genistein kezeléssel mindkét út gátolható volt, igazolva tirozin kinázok szerepét mind az ERK, mind a JNK aktiválásában. Mutáns Ras fehérje expressziójával pedig igazoltuk a Ras protein szerepét a JNK aktiválásában.

Megbeszélés

A nem megfelelő térszerkezettel rendelkező fehérjék az endoplazmatikus retikulumban felhalmozódva jelátviteli utat (UPR) aktiválnak, amelynek eredményeképpen egyes dajkafehérjék és enzimek expressziója fokozódik (1). Élesztőben jól ismert az UPR-t aktiváló „receptor” molekula (Ire1p). Az Ire1p szerkezeti felépítéséből (az Ire1p és az RNáz L közötti homológia) következtettünk arra, hogy élesztőben az Rli fehérje (egyik) funkciója az UPR-ben betöltött szerepe lenne. Vizsgálataink igazolták, hogy az Rli1p és az Ire1p *in vitro* kötődik. Az Rli1p depléciója a *Hac1* (transzkripciósfaktor) mRNS-e processzállódását idézte elő, amely az UPR aktiválódása során megfigyelhető jelenség. Mindezek alapján elmondható, hogy az Rli1p élesztőben szabályozó szerepet tölt be az ER és a sejtmag közötti jelátvitelben, közvetve vagy közvetlenül kötődve az Ire1 fehérjéhez gátolja annak endonukleáz (és kináz) aktivitását.

Az Rli1p citoszolikus vas-kén fehérje. Az UPR-ben betöltött funkciójához, azaz teljes aktivitásához a mitokondrium közreműködésére van szükség, amely organellumban többek között a vas-kén komplex érése is zajlik. A vas-kén komplexet tartalmazó fehérjék zöme a mitokondriumban található, elektrontranszportban, enzimátikus folyamatokban (izomerizáció, dehidratáció) vesznek részt. A citoszolikus vas-kén fehérjék (köztük az Rli1p) érésében eddig csak az Atm1p és az Erv1p szerepe volt ismert. Mostani munkánkkal bebizonyítottuk, hogy a glutationnak az oxidatív károsodástól való védelem mellett eddig nem ismert funkciója a citoszolikus vas-kén fehérjék érésének elősegítése. Glutacion depléció mellett a mitokondriális vas-kén fehérjék vashelyvétele és működése nem károsodott, szemben a citoszolikus vas-kén fehérjékkel, amelyeknek mind vasbeépítése, mind aktivitása glutacion hiányban jelentősen csökkent. A glutacionhiány okozta növekedésbeli károsodást redukáló hatású molekulával (pl. DTT) ki lehetett védeni, a vas-kén komplex működésbeli zavara azonban csak glutacionadásra rendeződött, igazolva, hogy nem a redukáló hatása hiányzik a glutationnak, hanem specifikus szerepe van a citoszolikus vas-kén fehérjék érésében. Hogy a citoszolikus vas-kén fehérjék érésének melyik lépésében (vas-kén komplex transzportja, a komplex apoproteinbe építése) van a glutationnak szerepe, még nem ismert.

Mint valamennyi eukarióta sejtben, az élesztőben is a nyugalmi citoszolikus kalcium koncentráció szűk határok között mozog (50-200 nM) (33). Erre a Ca^{2+} mediálta jelátviteli utak szabályozhatósága szempontjából is szükség

van. Ugyanakkor az endoplazmatikus retikulumban lokalizálódó enzimek magas kalcium koncentrációt igényelnek. Az élesztő sejteknek a környezet változó feltételeihez is alkalmazkodniuk kell. A kalcium homeosztázis szempontjából a vakuolumok tároló funkciója emelhető ki, amelyek a Golgi rendszer kalcium transzportereivel összhangban működnek.

Számos sejtet érő külső inger az intracelluláris kalciumszint átmeneti emelkedését okozza, így többek között a glukóz is éhező sejtekben. A hatást közvetítő intracelluláris molekula azonban még nem ismert. Korábbi megfigyelés, hogy foszoglukomutáz deficiens élesztő törzsben galaktózon növelve megnőtt az intracelluláris kalcium teljes mennyisége, de a mobilizálható kalcium raktárak (ER, Golgi) koncentrációja nem változott. A felvett kalciummal párhuzamosan a sejtek glukóz-1-foszfát szintje is megemelkedett. Ezért felvetődött, hogy a glukózádra bekövetkező átmeneti kalciumszint emelkedésért is a glukóz molekulának valamely származéka felelős. Ezt igazolja, hogy a kalciumválasz kiváltásához hexóz transzporterre és foszforiláz aktivitásra van szükség. A fenti foszoglukomutáz deficiens törzset glukózon növelve, majd éheztetve, a glukóz visszaadást követően a kalciumszint emelkedés elmaradt a kontrollétól. Ugyanakkor a glukóz-1-foszfát szint is alacsonyabb volt ebben a törzsben, míg a glukóz-6-foszfát szintek között nem volt jelentős eltérés. Mindezek alapján elmondható, hogy a glukóz adminisztrációt követő átmeneti intracelluláris kalciumszint emelkedésért a glukóz egy metabolitja, nagy valószínűséggel a glukóz-1-foszfát molekula, vagy annak valamely származéka felelős. Az is új megfigyelés, hogy a jelenség kialakulásához extracelluláris kalcium jelenléte szükséges, amelynek élesztőbe való felvételét a Mid1p plazmamembrán fehérje szabályozza.

Ismert tény, hogy arterioszklerotikus károsodások a csökkent vagy változó áramlási erőnek kitett érszakaszokon keletkeznek (34). Ezért fontos, hogy a véráramlás okozta mechanikai erő endotel sejtekre gyakorolt intracelluláris hatásait jobban megértsük. Az áramló vér fizikai hatását az endotel sejtek mechanoreceptorokkal és/vagy a citoszkeleton elemeivel képesek érzékelni. A változások jelátviteli utak közvetítésével transzkripciós faktorok aktiválásához vezetnek, amelyek egy hat bázispárt tartalmazó transzkripciós regulátor szekvenciához kötődnek számos adhézióért, növekedésért stb. felelős gén promóterében (29).

Korábbi vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy egy állandó, magasabb áramlási stressz védi az eret a szklerotikus károsodástól (35). Valószínű, hogy az áramlás ingadozása a legveszélyesebb faktor. Vizsgálataink is azt igazolják, hogy a különböző erőbehatásokra, és az áramlás különböző időtartamára

más-más MAPK utak aktiválódnak az endotel sejtben, igazolva az erőbehatásra adott válasz finom regulációját. Azóta az is bebizonyosodott, hogy az eret védő és a gyulladást indukáló faktorok közötti egyensúlyi helyzetet az ERK és JNK aktiválódási utak közötti kapcsolatrendszer is befolyásolja. Például ERK befolyásolja a MAPK foszfatáz 2 expresszióját, amely a JNK-t deaktiválja. Ez a felismerés összhangban van azon eredményeinkkel, amely szerint két különböző G-fehérje vesz részt az ERK és JNK aktiválásában. Az még nem tisztázott, hogy egy érzékelő rendszeren keresztül aktiválódik-e a két út, vagy két külön „receptor” található. Az *in vivo* történések jobb megértése érdekében a jövőben célszerűbb úgy vizsgálni az endotel sejtek áramlási stresszre adott válaszát, hogy az élő szervezetben található helyzethez hasonlóan egy alapszintű áramlással tartósan „prekondicionáljuk” a sejteket, és ezt követően a változásra adott választ vizsgáljuk.

Hivatkozások

1. Welihinda, A. A. and Kaufman, R. J. (1996) *J.Biol.Chem.* **271**, 18181-18187
2. Shamu, C. E. (1998) *Curr.Biol.* **8**, R121-R123
3. Kaufman, R. J. (1999) *Genes Dev.* **13**, 1211-1233
4. Sidrauski, C., Cox, J. S., and Walter, P. (1996) *Cell* **87**, 405-413
5. Ma, Y. and Hendershot, L. M. (2001) *Cell* **107**, 827-830
6. Gonzalez, T. N., Sidrauski, C., Dorfler, S., and Walter, P. (1999) *EMBO J.* **18**, 3119-3132
7. Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G., and Ron, D. (2002) *Nature* **415**, 92-96
8. Bisbal, C., Martinand, C., Silhol, M., Lebleu, B., and Salehzada, T. (1995) *J.Biol.Chem.* **270**, 13308-13317
9. Dong, B. and Silverman, R. H. (1997) *J.Biol.Chem.* **272**, 22236-22242
10. Bork, P. and Sander, C. (1993) *FEBS Lett.* **334**, 149-152
11. Sidrauski, C. and Walter, P. (1997) *Cell* **90**, 1031-1039
12. Beinert, H. and Kiley, P. J. (1999) *Curr.Opin.Chem.Biol.* **3**, 152-157
13. Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H., and Dean, D. R. (1998) *J.Biol.Chem.* **273**, 13264-13272
14. Lill, R. and Kispal, G. (2000) *Trends Biochem.Sci.* **25**, 352-356
15. Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., and Lill, R. (1999) *EMBO J.* **18**, 3981-3989
16. Lill, R. and Kispal, G. (2001) *Res.Microbiol.* **152**, 331-340
17. Meister, A. (1988) *J.Biol.Chem.* **263**, 17205-17208
18. Penninckx, M. (2000) *Enzyme Microb.Technol.* **26**, 737-742

19. Clapham, D. E. (1995) *Cell* **80**, 259-268
20. Cunningham, K. W. and Fink, G. R. (1994) *J.Exp.Biol.* **196**, 157-166
21. Cunningham, K. W. and Fink, G. R. (1994) *J.Cell Biol.* **124**, 351-363
22. Cunningham, K. W. and Fink, G. R. (1996) *Mol.Cell Biol.* **16**, 2226-2237
23. Maruoka, T., Nagasoe, Y., Inoue, S., Mori, Y., Goto, J., Ikeda, M., and Iida, H. (2002) *J.Biol.Chem.* **277**, 11645-11652
24. Nakajima-Shimada, J., Iida, H., Tsuji, F. I., and Anraku, Y. (1991) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 6878-6882
25. Davies, P. F. (1997) *J.Vasc.Res.* **34**, 208-211
26. Zarins, C. K., Giddens, D. P., Bharadvaj, B. K., Sottiurai, V. S., Mabon, R. F., and Glagov, S. (1983) *Circ Res* **53**, 502-514
27. Cobb, M. H. and Goldsmith, E. J. (1995) *J.Biol.Chem.* **270**, 14843-14846
28. Tseng, H., Peterson, T. E., and Berk, B. C. (1995) *Circ Res* **77**, 869-878
29. Resnick, N., Collins, T., Atkinson, W., Bonthron, D. T., Dewey, C. F., Jr., and Gimbrone, M. A., Jr. (1993) *PNAS* **90**, 4591-4595
30. Kuchan, M. J., Jo, H., and Frangos, J. A. (1994) *Am.J.Physiol* **267**, C753-C758
31. Kispal, G., Csere, P., Guiard, B., and Lill, R. (1997) *FEBS Lett.* **418**, 346-350
32. Kohlhaw, G. B. (1988) *Methods Enzymol.* **166**, 423-429
33. Miseta, A., Fu, L., Kellermayer, R., Buckley, J., and Bedwell, D. M. (1999) *J.Biol.Chem.* **274**, 5939-5947
34. Zarins, C. K., Giddens, D. P., Bharadvaj, B. K., Sottiurai, V. S., Mabon, R. F., and Glagov, S. (1983) *Circ Res* **53**, 502-514

35. Nagel, T., Resnick, N., Dewey, C. F., Jr., and Gimbrone, M. A., Jr.
(1999) *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **19**, 1825-1834

A tézisekhez kapcsolódó közlemények

1. Jo,H., **Sipos,K.**, Go,Y.M., Law,R., Rong,J., and McDonald,J.M. (1997). Differential effect of shear stress on extracellular signal-regulated kinase and N-terminal Jun kinase in endothelial cells. Gi2- and Gbeta/gamma-dependent signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 272, 1395-1401.
2. Tokes-Fuzesi,M., Bedwell,D.M., Repa,I., **Sipos,K.**, Sumegi,B., Rab,A., and Miseta,A. (2002). Hexose phosphorylation and the putative calcium channel component Mid1p are required for the hexose-induced transient elevation of cytosolic calcium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 44, 1299-1308.
3. **Sipos,K.**, Lange,H., Fekete,Z., Ullmann,P., Lill,R., and Kispal,G. (2002). Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione. *J. Biol. Chem.*

Egyéb közlemények

4. **Sipos,K.** and Olson,M.O. (1991). Nucleolin promotes secondary structure in ribosomal RNA. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 177, 673-678.
5. Miseta,A., Csutora,P., **Sipos,K.**, and Wheatley,D.N. (1995). Acid-extractable amino acid pool in *Escherichia coli*: possible role in energy-independent amino acid accumulation and protein synthesis. *Microbios* 84, 207-219.
6. Xie,J., Briggs,J.A., Olson,M.O., **Sipos,K.**, and Briggs,R.C. (1995). Human myeloid cell nuclear differentiation antigen binds specifically to nucleolin. *J. Cell Biochem.* 59, 529-536.
7. Miseta,A., Csutora,P., **Sipos,K.**, and Wheatley,D.N. (1996). Phenylalanine utilization for protein synthesis in beta-phenylpyruvic acid treated *Escherichia coli* cells. *Microbios* 87, 123-133.

8. Miseta,A., Kellermayer,M., Liszt,F., Ludany,A., Magyarlaki,T., **Sipos,K.**, Berko,G., and Tokes-Fuzesi,M. (2001). [Plasma electrolytes in multiple myeloma]. *Orv. Hetil.* *142*, 1449-1453.
9. Bogner,P., **Sipos,K.**, Ludany,A., Somogyi,B., and Miseta,A. (2002). Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes. *Eur. Biophys. J.* *31*, 145-152.
10. Jakus,P.B., **Sipos,K.**, Kispal,G., and Sandor,A. (2002). Opposite regulation of uncoupling protein 1 and uncoupling protein 3 in vivo in brown adipose tissue of cold-exposed rats. *FEBS Lett.* *519*, 210-214.

Előadások, poszterek

K. Sipos, M.O.J. Olson. Interaction of nucleolin with synthetic polynucleotides and ribosomal RNA. 1989 ASCB Meeting, Houston, TX, USA

K. Sipos, R. Szigeti, X. Dong, C.L. Turnbough Jr. Systematic mutagenesis of the thymidine tract of the pyrBI attenuator: effects on transcriptional termination in vivo. ASM 99th General Meeting, 1999, Chicago, IL, USA

Kispál Gyula, Csere Péter, **Sipos Katalin**, Roland Lill. A vas-kén komplex bioszintézis eukarióta útja. VIII. Sejt- és fejlődésbiológiai napok. Pécs, 2000. jan. 17-19.

Karsai Árpád, Csutora Péter, **Sipos Katalin**, Tőkés-Füzesi Margit, Miseta Attila. A glükózt foszforiláló enzimek kompartmentalizációja *Saccharomyces cerevisiae*-ben. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 6. Munkaértekezlete. Sárospatak, 2001. máj. 14-17.

Kispál Gyula, **Sipos Katalin**, Fekete Zsuzsanna, Roland Lill. Az RNáz L inhibitor, egy citoszolikus vas-kén fehérje aktiválása és funkciója. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 6. Munkaértekezlete. Sárospatak, 2001. máj. 14-17.

Jakus Péter, Sándor Attila, **Sipos Katalin**, Kispál Gyula. Opposite regulation of uncoupling protein 1 (UCP1) and UCP3 in brown adipose

tissue (BAT) of rats. XXXI. Membrán transzport konferencia. Sümeg, 2001. máj. 22-25.

Kispál Gyula, **Sipos Katalin**, Fekete Zsuzsanna, Roland Lill. A vas-kén komplex bioszintézis zavara ataxiával térsult szideroblasztos anémiában. XXXI. Membrán transzport konferencia. Sümeg, 2001. máj. 22-25.

G. Kispál, **K. Sipos**, R. Lill. Iron-sulfur protein activation – an essential mitochondrial function. 27th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, 2001, Lisbon, Portugal

A. Sándor, P. Jakus, **K. Sipos**, V. Farkas, G. Kispál. Opposite regulation of uncoupling protein 1 (UCP1) and UCP3 in brown adipose tissue (BAT) of rats. 27th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, 2001, Lisbon, Portugal

Sipos Katalin, Szigeti Réka, C.L. Turnbough. Systematic mutagenesis of the thymidine tract within the pyrBI attenuator of E. coli. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001. okt. 10-12.

Fekete Zsuzsanna, **Sipos Katalin**, Kispál Gyula. A glutation szerepe az extramitokondriális vas-kén fehérjék aktiválásában. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 7. munkaértekezlete, Keszthely, 2002. máj. 14-17.

Sipos Katalin, Fekete Zsuzsanna, Szigeti Réka. A pyrBI operon attenuátorának vizsgálata szisztematikus mutagenézis révén E. coliban. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 7. munkaértekezlete, Keszthely, 2002. máj. 14-17.

Gy. Kispál, **K. Sipos**, Zs. Fekete. Iron-sulfur protein activation – an essential mitochondrial function. XXXII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2002. máj. 21-24.

Fekete Zs., **Sipos K.**, Kispál Gy. A glutation szerepe az extramitokondriális vas-kén fehérjék aktiválásában. XXXII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2002. máj. 21-24.

Sipos K., Fekete Zs., Szigeti R. A pyrBI operon attenuátorának vizsgálata szisztematikus mutagenézis révén E. coliban. XXXII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2002. máj. 21-24.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Kispál Gyulának munkám során nyújtott szakmai támogatását, segítségét.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Sümegi Balázsnak és Dr. Sándor Attilának szakmai segítségükért, Fekete Zsuzsannának és Hajnikné Gábor Ilonának segítőkész közreműködésükért.

Köszönettel tartozom a PTE ÁOK Biokémiai Intézet valamennyi dolgozójának.

Végül szeretném kifejezni hálámat férjemnek, Miseta Attilának szeretetteljes támogatásáért.