

**Gyulladás és oxidatív stressz hatása
jelátviteli folyamatokra és membránrendszerek
stabilitására**

PhD tézis

Kálmán Nikoletta



**Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola
Molekuláris és Celluláris Biokémia Program
Programvezető: Prof. Dr. Sümegi Balázs
Témavezetők: Prof. Dr. Pesti Miklós, Dr. Veres Balázs**

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet**

Pécs, 2018.

Tartalom

I.	Rövidítések listája / Abbreviations	2
II.	Bevezetés	3
1.	A gyulladás: TLR4 jelátvitel. A rezveratrol.....	3
2.	Oxidatív stressz és lipidperoxidáció.....	4
III.	A kutatás célkitűzései	5
IV.	Eredmények	5
1.	A rezveratrol gátolja az LPS-indukált TRAF6 expressziót RAW 264.7 sejteken.....	5
2.	A rezveratrol gátolja az LPS-indukált TRAF6 ubikvitinációt (aktivációt) RAW 264.7 sejteken	6
3.	A rezveratrol gátolja az LPS-indukált p38, JNK és az Akt aktivációját RAW 264.7 sejteken	7
4.	A t-BuOOH-rezisztens S. pombe 2-szeres érzékenységet mutat Amfotericin B-vel szemben. A t-BuOOH-rezisztens mutáns jellemzése.	7
5.	A t-BuOOH-rezisztens S. pombe plazmamembránja emelkedett fázis-tranzíciós hőmérsékletet és csökkent glicerín-felvételi képességet mutat.....	8
6.	A t-BuOOH-rezisztens törzs sejtszintű adaptációja	9
V.	Összefoglalás	10
VI.	Köszönetnyilvánítás	11

I. Rövidítések listája / Abbreviations

ERK – extracellular-signal-regulated kinase; **IKK** – inhibitor- κ B (I κ B) kinase; **JNK** – c-Jun N-terminal kinase; **LPS** – lipopolysaccharide; **MAP** – mitogen-activated protein; **MyD88** – myeloid differentiation primary response gene 88; **NF- κ B**, nuclear factor- κ B; **RIP** – receptor interacting protein; **TAK** – transforming growth factor- β activated kinase; **TBK** – TANK-binding kinase; **TLR4** – Toll-like receptor 4; **TRAF6** – tumor necrosis factor receptor-associated factor 6; **TRIF** – Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor inducing interferon- β ; **AmB** – amphotericin B; **FA** – fatty acid; **FFA** – free fatty acid; **GC** – gas chromatography; **MUFA** – monounsaturated fatty acid; **PLFA** – fatty acids of polar lipid; **PUFA** – polyunsaturated fatty acid; **ROS** – reactive oxygen species; **TAGFA** – fatty acids of triacylglycerol; **TLC** – thin-layer chromatography; **t-BuOOH** – tert-butyl hydroperoxide; **TFA** – total fatty acid

II. Bevezetés

1. A gyulladás: TLR4 jelátvitel. A rezveratrol.

A **Toll-Like Receptor 4** (TLR4) fontos szerepet játszik a veleszületett immunválasz megindításában, és a bakteriális sejtfal komponens (lipopoliszacharid (LPS) endotoxin) általi aktiválása felelős a krónikus és akut gyulladásos rendellenességekért. A kontrollálatlan gyulladásos jelátvitel súlyosabb szepsziszhez vezethet, amely magas mortalitással jár (széptikus sokk).

Az LPS kötődése a TLR4 receptorhoz két jelátviteli utat indít el: a *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88)-függő és a *Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor inducing interferon- β* (TRIF)-függő útvonalakat, melyek végül az NF- κ B, az IRF (*IFN regulatory factor*) aktiválásához, és a MAP kinázok általi citokinek, kemokinek és I-es típusú interferonok expressziójához vezetnek, hogy megvédjék a sejtet a mikrobiális fertőzéstől.

A MyD88 kapcsolódik végül az *interleukin-1 receptor associated kinase* (IRAK) 1-hez és 4-hez, és IRAK2 kinázokhoz. Ezeknek az aktivált proteineknek a hiperfoszforilációját okozza, melyek így képesek a TNF-receptor asszociált faktor 6 (TRAF6) molekulához csatlakozni. Konformációváltozás következtében az IRAK1/2/4/TRAF6 komplex leválik a receptorról, és kölcsönhatásba lép a TGF- β -aktivált kináz 1-el (TAK1) és a TAK1-kötő fehérje 2 és 3-mal (TAB2/3), mely így a TAK1 és TAB2/3 foszforilációját eredményezi. Végül az egész komplex a citoplazmába helyeződik, ahol az aktivált TAK-1 egyrészt aktiválja az IKK-t (I κ B kináz, IKK $\alpha/\beta/\gamma$). Az aktív IKK foszforilálja az I κ B-t (*inhibitor of kappa B*), melynek hatására az degradálódik, így az NF- κ B transzkripciós faktor felszabadul a gátlás alól, és a sejtmagba jutva proinflammatorikus gének transzkripcióját okozza.

A MyD88-független jelátviteli út aktiválódása során a TLR4/MD2 komplex létrejöttét követően a komplex endocitózisa történik, melyben a CD14-nek kulcsszerepe van. Az endoszómához kapcsolódó TRIF egy fontos TIR-domén tartalmú adaptor protein, mely a MyD88-független jelátviteli utat szabályozza. Kulcsfontosságú szerepet tölt be az IRF3 transzkripciós faktor szabályozása mellett az NF- κ B transzkripciós faktornak az ún. "késői fázisú" aktivációjában, és a MAP kinázok aktivációjában. A keletkezett endoszóma a TRIF-en és a TRAM-on, illetve a TRAF3 (*TNF receptor-associated factor 3*) aktiválásán keresztül indukálja az IRF3 (*IFN regulatory factor 3*) transzkripciós faktor dimerizációját, majd nukleáris transzlokációját, a TBK1 (*Tank-binding kinase 1*) és az IKK ϵ -on (*Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon* vagy *Inducible 1 kappa-B kinase* (IKKi)) keresztül. Az IRF3 transzkripciós faktor az I-es típusú interferonok termelését segíti. A TRIF C-terminális régiója tartalmaz egy

RHIM-et (*Rip homotypic interaction motif*), ami szabályozza az interakciót a szerin/treonin kináz RIP1-el (*Receptor interacting protein-1*). A RIP1 szintén fontos eleme a TNF α által közvetített “késői fázisú” NF- κ B jelátvitelnek, azonban nem felelős az LPS indukálta IRF3 aktivációért.

A **rezveratrol** (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) egy természetes polifenol, mely megtalálható főleg piros héjú gyümölcsökben (szőlő) és zöldségekben. Számos kutatás bizonyítja a rezveratrol gyulladáscsökkentő tulajdonságait, beleértve a reaktív oxigén és nitrogénfajták (ROS és RNS) sejtekben történő képződését. A rezveratrol számos molekuláris célpontját azonosították a TLR által közvetített jelátviteli utakban. Kimutatták, hogy a rezveratrol többek között az NF- κ B I κ B kináz gátlásán keresztül éri el, hogy az LPS-indukálta I κ B α -degradáció gátlódjon. A TLR4 receptor és az NF- κ B transzkripció faktor között a TRAF6 az egyik legfontosabb adapterfehérje. Ennek ellenére pontos szerepe és a rezveratrol által kiváltott gyulladáscsökkentő folyamatokban való részvétele még mindig ellentmondásos.

2. Oxidatív stressz és lipidperoxidáció

Oxidatív stresszt okozhatnak a molekuláris oxigén részlegesen redukált formái (ROS), mint pl. a szuperoxid anion, a hidrogén peroxid vagy a hidroxilgyök, melyek belső vagy külső forrásból is származhatnak. A ROS-ok a fehérjék és a nukleinsavak károsítása mellett a biológiai membránok többszörösen telítetlen (PUFA) és, bár kisebb mértékben, az egyszeresen telítetlen (MUFA) zsírsavait is károsítják, melyek láncreakcióvá alakulva a lipidperoxidációt okozzák. A lipidperoxidáció generál számos gyökjellegű terméket, beleértve a lipid hidroperoxidokat. A **tert-butil hidroperoxid** (t-BuOOH) egy szerves lipid hidroperoxid analóg, melyet gyakran használnak prooxidánsként külső eredetű oxidatív stressz vizsgálatához. A t-BuOOH-indukálta toxicitásért Fenton-típusú reakció útján képződő butoxilgyökök a felelősek. Az így termelt szabad gyökök az antioxidáns rendszert kimerítik. Számos tanulmány foglalkozott a t-BuOOH biokémiai hatásának módjával élesztőben és gombákban; a citotoxicitás molekuláris mechanizmusa még mindig nem teljesen ismert, de az adatok azt sugallják, hogy a t-BuOOH első célpontja a plazmamembrán, amelynek összetétele befolyásolhatja a t-BuOOH kezelés következményeit. Az élesztősejtek számos indukálható adaptív válaszreakciót alakítottak ki a ROS-ra és a lipid peroxidációs termékekre, amelyek legalább részben transzkripcionálisan szabályozottak.

III. A kutatás célkitűzései

1. Egyrészt, tanulmányoztuk a rezveratrol hatását az LPS-indukálta TRAF6 képződésre, mind mRNS, mind az expresszáldott protein szintjén. Célkitűzéseink között volt a TRAF6 ubikvitinációjának és a jelátviteli út további elemeinek, a MAP kinázoknak és az Akt aktivációjának RAW 264.7 eger makrofág sejtvonalon történő tanulmányozása. Ezek az adatok hozzájárulhatnak a TRAF6 gyulladásos folyamatokban való részvételének jobb megértéséhez.
2. Másrészt, jelen tanulmány céljaként, meghatároztuk a *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) eukarióta hasadóélesztő szülői (hyd^+) és t-BOOH-rezisztens mutánsának ($hyd1-190$) plazmamembrán-összetételét, valamint annak biofizikai és biológiai jellemzőit. Céljaink közé tartozott a t-BuOOH, mint külső stresszor hatásának vizsgálata a plazmamembrán összetételére, illetve ezen törzsek jellemzése (adaptációs képesség t-BuOOH-dal szemben, pusztítási görbék felvétele, a plazmamembránon keresztül történő glicerín felvételi képességek vizsgálata és a plazmamembránok fluiditásának vizsgálata kontroll és kezelt sejtekben). Az oxidatív stressz toleranciára/rezisztenciára vonatkozó információk hasznosak lehetnek a növényi, állati és emberi patogén mikroorganizmusok és a gazdaszervezet közötti kölcsönhatások megértéséhez.

IV. Eredmények

1. A rezveratrol gátolja az LPS-indukált TRAF6 expressziót RAW 264.7 sejteken

A TRAF6 szerepének tisztázására, a TLR-közvetített NF- κ B aktivációban meghatároztuk a TRAF6 mRNS és fehérje mennyiségét LPS kezelést követően, 10, 30 és 60 (és 120) percet követően, rezveratrol jelenlétében és hiányában. Eredményeink szerint 10 perc LPS kezelés után több mint négyszeresére nőtt a *traf6* mRNS mennyisége, ami 30 perc után majdnem a kiindulási szintre visszaesett. 1 órás LPS kezelés után újabb, kétszeres transzkripcionális növekedés volt megfigyelhető, és még 2 órás LPS kezelés után is enyhe expresszió volt látható. Rezveratrollal történő előkezelés esetén ez az ugráló, bifázisos mintázat megszűnt, gátolta a rezveratrol a *traf6* gén transzkripcióját 10 percnél és 60 percnél is. Önmagában adva a rezveratrol nem befolyásolta a *traf6* génexpressziót. A *traf6* mRNS-nek e kétfázisú expressziós mintázata hasonlít az I κ B α foszforilációs és expressziós kifejeződésére amelyet Loniewski és

munkatársai¹ közölték 2007-ben. A TRAF6-nak jelentős szerepe van az LPS által indukált I κ B α aktiválásban, hiszen az I κ B α foszforilációja és ennek következtében történő lebomlása vezet az NF- κ B nukleáris transzlokációjához. Loniewski-ék és a mi eredményeink alapján is feltételezhető, hogy a TRAF6 részt vesz az LPS által indukált NF- κ B aktiválásban, szintén bifázisú mintázatot követve, és a TRAF6 hatása mutatkozik az I κ B α foszforilációjában és expressziójában. Esetünkben a rezveratrol már transzkripcionális szinten is gátolta az LPS-által kiváltott *traf6* gén kifejeződését LPS adása után mind 10, mind 60 perc elteltével. Továbbá, azt találtuk, hogy a TRAF6 fehérje szintje követi a mRNS expressziós mintázatát. Az LPS ez esetben is két csúcst indukált, 10 ill. 60 percnél, és a rezveratrol mindkettőt gátolta. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a TRAF6-nak szerepe lehet az LPS-indukálta gyulladási folyamatokban és a rezveratrol antiinflammatorikus hatásában RAW 264.7 makrofágokon.

2. A rezveratrol gátolja az LPS-indukált TRAF6 ubikvitinációt (aktivációt) RAW 264.7 sejteken

A TRAF6 egy olyan ubikvitin ligáz enzim, mely a K-63-as aminosavon (lizin oldalláncukon keresztül) saját magát és más fehérjéket is képes ubikvitinálással aktiválni. Ebbe a csoportba tartoznak pl. a TAK1-asszociált kötő fehérje (TAB) 2/3, de TRAF6 K-63-as ubikvitináció szükséges az IKK aktiválásához is. Annak eldöntésére, hogy a fenti mechanizmus szerepet játszik-e a rezveratrol antiinflammatorikus hatásában, megvizsgáltuk a TRAF6 autoubikvitinációját LPS és rezveratrol jelenlétében illetve hiányában. RAW 264.7 sejtek lizátumából TRAF6 ellenes antitesttel immunprecipitácót készítettünk, majd anti-ubikvitin antitesttel immunoblottot végeztünk. A 10 és 30 perces LPS kezelés hatására a sejtekben megnőtt az ubikvitinált TRAF6 mennyisége, míg 1 óra elteltével már alacsonyabb, mint a kontroll csoportokban. Ezt a növekedést 10 és 30 percnél is megakadályozta a rezveratrol előkezelés. A TRAF6 ubikvitinációjának és fehérje-kifejeződés mintázatának nem feltétlenül kell, hogy kövessék egymást. Eredményeink azt mutatják, hogy az LPS kezelés nemcsak növeli a TRAF6 mennyiségét, hanem a funkcionális aktivitását, vagyis autoubikvitinálódását is elősegíti, aktiválva ezzel az IKK és NF- κ B fehérjéket. A rezveratrol képes csillapítani mindkét mechanizmust, funkcionális gátló szerepet töltve be a TRAF6 aktivációban.

¹ Loniewski KJ, Patial S, Parameswaran N. Sensitivity of TLR4- and -7-induced NF-kappa B1 p105-TPL2-ERK pathway to TNF-receptor-associated-factor-6 revealed by RNAi in mouse macrophages. *Mol Immunol* 2007;44:3715–23.

3. A rezveratrol gátolja az LPS-indukált p38, JNK és az Akt aktivációját RAW 264.7 sejteken

A TRAF6 K-63-as poliubikvitinációja és a TAB2/3-mal alkotott komplex indukálja az IKK-t és egy effektor mitogén aktivált fehérje kinázt, a TAK1-et. A TAK1 és TRAF6 kapcsolata LPS hatására a MAP kinázok aktiválásához vezet. A MAPK-ok expressziós mintázata közvetlenül kapcsolódik a TRAF6 aktivációjának változásához. Megvizsgálva az LPS indukálta TRAF6 expresszió és ubikvitináció funkcionális hatását, kíváncsiak voltunk, hogy a rezveratrol hogyan befolyásolja a TRAF6 útvonal MAP kinázainak aktivitását. LPS kezelést követően immunoblottal vizsgáltuk a MAP kinázok foszforilációját, foszforilált kinázokra specifikus elsődleges antitesteket használva, rezveratrol jelentéte mellett és hiányában. Eredményeink szerint az LPS növelte a p38 aktivációját a kezelés időtartamával egyenes arányban, viszont hatását a rezveratrol fokozatosan egyre jobban csökkentette. A JNK aktivációja szintén emelkedést mutatott LPS hatására az első 30 percben, utána viszont lecsökkent. A rezveratrol csökkentette a JNK foszforilációját, kivéve a 30 perces kezelést. A p38 és JNK aktivációtól eltérően, az ERK foszforilációjára a rezveratrol egyik vizsgálati időpontnál sem volt hatással. Munkánk is alátámasztja azt a korábbi feltételezést, hogy a rezveratrol a TRAF6 által indított p38 és JNK fehérjék foszforilációját képes gátolni, de az ERK-ét nem. Ez a tény is azt támasztja alá, hogy a TRAF6-nak funkcionális szerepe van a rezveratrol antiinflammatorikus hatásában. A TRAF6 közvetlen szubsztrátja az Akt is. A TRAF6 deplécióna csökkenti az Akt foszforilációját. Ahhoz, hogy megerősítsük a TRAF6 funkcionális szerepét a mi modellünkben, megvizsgáltuk az Akt foszforilációs mintázatát is. Azt tapasztaltuk, hogy az Akt foszforilációja hasonlóképpen történik, mint a MAP kinázok esetében, amit a rezveratrol gátolni képes.

4. A t-BuOOH-rezisztens *S. pombe* 2-szeres érzékenységet mutat Amfotericin B-vel szemben. A t-BuOOH-rezisztens mutáns jellemzése.

A *tert*-butil hidroxid-rezisztens *S. pombe* törzsek létrehozása a *hyd*⁺ szülői törzsből random mutagenézissel történt, majd a legnagyobb minimális gátló koncentrációval rendelkező törzset választottuk ki további vizsgálatok céljára, mely a *hyd1-190* elnevezést kapta. Ez a törzs tetrádanalízis vizsgálatok alapján egy egy-génes mutációt hordozhat, mert a 25 teljes tetrád spróraklonjait tesztelve a hasadási arány minden esetben 2T:2N volt. A *hyd1-190*-es törzs a szülői (*hyd*⁺) típusal összehasonlítva: (i) négyszeres rezisztenciát mutat *t*-BuOOH oxidatív stresszrel szemben; (ii) hasonló generációs idővel rendelkezik (4 óra); (iii) a *t*-BuOOH-rezisztencia legalább 30 passzálon keresztül öröklődött és stabil maradt a *t*-BuOOH-mentes

szelektív minimál táptalajon; (iv) kétszeres érzékenységet mutat a membránkárosító hatással rendelkező Amfotericin-B antimikotikummal szemben.

5. A *t*-BuOOH-rezisztens *S. pombe* plazmamembránja emelkedett fázis-tranzíciós hőmérsékletet és csökkent glicerín-felvételi képességet mutat

A *hyd*⁺ és *hyd1-190* törzsek késő-log fázisú (23 óra), kezeletlen tenyészetéből készített lipid-extraktumokat vékonyréteg kromatográfiával szeparáltuk, majd gázkromatográfiával meghatároztuk a szterin és zsírsav komponenseket. A szterin összetételben a két törzs egyes komponensei esetében mennyiségi változásokat figyeltünk meg. A *hyd1-190* törzs enyhe (7,8 %) emelkedést mutatott ergoszterin tartalomban, és körülbelül kétszeres növekedést a zimoszterin, fekoszterin, ergoszta-5,7-dienol és episzterin tartalomban, illetve kétszeres csökkenést a szkvalén, lanoszterin és 24-metilén-24,25-dihidrolanoszterin tartalomban.

Hogy megvizsgáljuk a *t*-BuOOH kezelésnek a lipid-összetételben adódó következményeit, középlog fázisú (15 ó) tenyészeteket 8 órán keresztül kezeltünk szubinhibitori koncentrációjú (0,2 mM) *t*-BuOOH-dal a lipid extrakciót megelőzően. Ez a kezelés módosulásokat okozott a legtöbb szterin és zsírsav komponensben mindkét törzsnél. Az azonosított zsírsavak száma a teljes zsírsav tartalomban (*total fatty acids* = TFAs) 24, a poláris lipidekben (*polar lipids' fatty acids* = PLFAs) 17, triacilglicerinekben (*triacylglycerols' fatty acids* = TAGFAs) 10, és a szabad zsírsavakban (*free fatty acids* = FFAs) 5. Az itt bemutatott eredmények prezentálják a *S. pombe* eddigi legrészletesebb zsírsavanalízisét. A fő zsírsavak *S. pombe*-ban a palmitinsav (C16:0; 9,1–12,9 %), a sztearinsav (C18:0; 6,0–15,3 %) és az olajsav (C18:1-9c; 42,0–71,7 %) minden csoportban, kivéve a szabad zsírsavaknál. Szignifikáns különbséget kaptunk a zsírsavak mennyiségében a *hyd1-190* törzsből, összehasonlítva a *hyd*⁺ szülői törzsszel, feltehetően a szterin összetétel módosulásának következményeképpen. A *t*-BuOOH-rezisztens *hyd1-190* törzs poláris lipidjeinek zsírsav tartalma 4,5 %-os növekedést mutatott a telítetlen/telített arányban, és 2,8 %-os csökkenést a többszörösen telítetlen/telített zsírsavak arányában.

A két törzs plazmamembrán fázistranzíciós hőmérsékletét EPR spektroszkópiával határoztuk meg. A fázistranzíciós hőmérséklet töréspontja a kezeletlen, vad típusú kontroll *S. pombe* sejtek esetén 11,68°C míg a *hyd1-190* törzs esetében 19,64°C volt. 1 óra 0,2 mM *t*-BuOOH kezelést követően a fázistranzíciós hőmérsékletek az alábbiak szerint alakultak: a *hyd*⁺ szülői törzs esetén 15,63°C, míg a *hyd1-190* törzs esetén 12,81°C. Ebből következik, hogy alapállapotban a rezisztens törzs membránja rigidebb, hiszen a gél-szol átmenet magasabb hőmérsékleten következik be (11,68°C vs. 19,64°C). Érdekes viszont, hogy bár az alacsony koncentrációjú (0,2 mM), és 1 óra időtartamú *t*-BuOOH kezelést követően a szülői törzs membránja rigidebbé

vált (11,68°C → 15,63°C), ezzel szemben a *t*-BuOOH-rezisztens törzs membránja jóval “korábban” szol állapotba került (19,64 → 12,81°C), vagyis a kezelés hatására fluiditása jelentősen növekedett. Feltehetően eltérő molekuláris mechanizmusok vezettek a két törzs eltérő stressz-válaszaihoz.

Glicerín asszimilációs vizsgálataink azt mutatták, hogy míg a két törzs között glükóz felhasználás tekintetében nem figyeltünk meg különbséget, addig a *t*-BuOOH-rezisztens törzs glicerín felvétele csökkent a szülői törzshöz képest, a szülői törzsnél 25 órával többre volt szüksége, hogy belépjen a logaritmusos fázisba 1 M glicerint tartalmazó médiumban tenyésztve, annak ellenére, hogy a 48 órás tenyésztés végére a biomassza mennyiségek megegyeztek. Ez az eredmény is membrán-összetétel változás jó indikátora.

6. A *t*-BuOOH-rezisztens törzs sejtszintű adaptációja

Hogy megvizsgáljuk az *t*-BuOOH-kezelés következményeit a lipid összetételben, közép-log fázisú sejteket szubinhibitori (0,2 mM) koncentrációjú *t*-BuOOH-val kezeltünk 8 órán át a lipidkivonást megelőzően. Ez a kezelés változásokat indukálhatott a szterin és zsírsav összetételben mindkét törzsnél. A legkifejezettebb változások *t*-BuOOH-kezelés hatására a *hyd*⁺ szülői törzs szterin összetételében történtek, pl. több mint 100 %-kal nőtt a zimoszterin, fekoszterin, ergoszta-5,7-dienol és az episzterin mennyisége. Ezek a szterin kompozícióban bekövetkezett mennyiségi változások megjelennek a zsírsavak mennyiségi változásában is, különösen a poláris lipid-zsírsavakéban (PLFA). A *hyd*⁺ nyolc, míg a *hyd1-190* hat komponensének mennyisége változott szignifikánsan. A többszörösen telítetlen és a telített PL-zsírsavak aránya szintén szignifikánsan növekedett mindkét törzsből. 1 órán át tartó 0,2 mM *t*-BuOOH-kezelés a fázistranzíciós hőmérsékleti pontok esetében okozott már változást, a szülői törzsnél 11,68°C-ról 15,63°C-ra változott, míg a rezisztens törzsnél 19,64°C-ról 12,81°C-ra. *S. pombe* szülői törzsének esetében a növekedésgátlási kísérletekben alkalmazott *t*-BuOOH-koncentrációk adaptációs folyamatra utaltak. A két törzs 60 percig tartó 0,2, 1,0 és 2,0 mM-os *t*-BuOOH kezelést követő túlélési arányát megvizsgálva azt kaptuk, hogy 25, 34 és 50%-kal (*hyd*⁺) illetve 4, 12 és 20%-kal (*hyd1-190*) csökkent sejtpopulációk telep-formáló képessége. A sejtek adaptációra való lehetőségeként alkalmazott, 60 percig tartó szubinhibitori (0,2 mM-os) *t*-BuOOH koncentrációval történő előkezelése, majd az ezt követő, szintén 1 órás 1,0 és 2,0 mM-os *t*-BuOOH kezelése a túlélés szignifikáns növekedését eredményezték a *hyd*⁺ törzsnél, ellentétben a *hyd1-190*-es törzsszel.

V. Összefoglalás

1. Korábbi irodalmi adatok alapján valószínűsítettük, hogy a rezveratrol ismert NF- κ B aktivációt gátló hatását nem az IKK aktivációjának gátlásán keresztül fejt ki, mely aktiváció makrofágokban két egymástól független útvonalon is megtörténhet: egy MyD88-függő és egy TRIF-függő útvonalon. Továbbá feltételeztük, hogy ezen jelátviteli utak között szoros kölcsönhatás állhat fenn, melyek között a kapcsolat a TRAF6 fehérje lehet, mely mindkét útvonalban való részvételével hozzájárulhat az NF- κ B aktiválásához, így a rezveratrol potenciális támadáspontja lehet a gyulladásozó jelátvitelben. Munkánkban, az LPS-jelátvitel során azonosítottuk a TRAF6-ot, mint a rezveratrol funkcionális támadáspontját, eredményeink szerint a rezveratrol gátolta a *traf6* gén és fehérje expresszióját, gátolta a TRAF6 fehérjék auto-poli-ubikvitinációját történő aktiválódását, és a TRAF6 által aktivált MAP kináz (kivéve ERK) és Akt útvonalakat is. Összhangban a korábbi kutatásokkal, alátámasztottuk a TRIF és TRAF6 közötti jelátviteli kapcsolat lehetőségét, ezáltal új megvilágításba helyeztük a rezveratrol lehetséges molekuláris szerepét az antiinflammatorikus folyamatokban.
2. A *S. pombe* eukarióta hasadóélesztő oxidatív stressz okozta membránkárosodásainak vizsgálata során kimutattuk, hogy a *hyd1-190* törzsben *t*-BuOOH rezisztenciát okozó mutáció miatt bekövetkező, a plazmamembrán szterin- és zsírsavösszetételében történt mennyiségi és minőségi változások eredményezhettek egy Amfotericin-B-vel szemben megnövekedett érzékenységet, egy emelkedett fázis-tranzíciós hőmérsékletet a membrán gél-szol állapotát tekintve, illetve okozhatták a glicerinnel való felvétel képességének csökkenését is. Vizsgálattal bizonyítottuk, hogy a két generációs időn keresztül szubinhibítori *t*-BuOOH koncentrációval történő előkezelés adaptációt indukálhat a membránösszetételben, mely visszaköszön a plazmamembrán módosult biofizikai paramétereiben, de a fenotípusos adaptáció *t*-BuOOH-dal szemben nem feltétlenül jár együtt, hisz az csak a szülői, *hyd*⁺ törzsnél volt megfigyelhető. Az adatok azt sugallják, hogy a mutáció, amely a *hyd1-190* mutáns kialakulásához vezetett, lehetséges, hogy az ergoszterin bioszintézis vagy reguláció génjeinek egyikét érinthette, egy adaptív átalakulást eredményezve a plazmamembrán zsírsavösszetételében, tükrözve a megváltozott egyszeresen-többszörösen telítetlen/telített zsírsavak arányának változását, de ennek bizonyítására genetikai vizsgálatokra volna szükség. Emellett munkánk tartalmazza a *Schizosaccharomyces pombe* élesztő eddigi legrészletesebb szterin- és zsírsav analízisét.

VI. Köszönetnyilvánítás

A Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében végzett kutatások tekintetében programvezetőmnek, Prof. Dr. Sümegi Baláznak, társtémavezetőmnek, Veres Baláznak (PhD), és a “*Septic Shock Team*” összes tagjának, különösen Antus Csengének (PhD) és Jakus Péternek (PhD) szeretném megköszönni a munkában nyújtott minden segítséget és támogatást.

A Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, Általános és Környezeti Mikrobiológia Tanszékén végzett kísérletek tekintetében szeretném megköszönni Prof. Dr. Pesti Miklós társtémavezetőnek, és szerzőtársamnak, Gazdag Zoltánnak (PhD) a munkában nyújtott segítséget, támogatást és iránymutatást.

Köszönet illeti még Prof. Dr. Belágyi Józsefet, doc. Ing. Milan Čertík (PhD) professzort, Samy Selimet (PhD), Horváth Esztert (PhD), Virág Esztert (PhD) és dr. med. Fónai Fruzsínát. Szeretném kifejezni hálámat családomnak, és mindazoknak, akik bármilyen módon segítségemre voltak a dolgozat elkészítésében.