

Ph.D. dolgozat tézises összefoglalója

**A membrán fizikai állapotának módosulása szabályozza az
Escherichia coli hősokk választát**

Natalia V. Shigapova

Témavezetők:

Vígh László, D.Sc., Horváth Ibolya, Ph.D.

Szegedi Biológiai Központ

Biokémiai Intézet

Szeged

2004

BEVEZETÉS

Általánosan elfogadott , hogy a stressz következtében denaturálódó vagy nem megfelelően feltekeredett fehérjék halmozódása a stresszválasz egyik fő kiváltó tényezője. Egyes elképzelések szerint egy hőszokk fehérje, a DnaK is képes a celluláris termométer szerepének betöltésére, míg a riboszóma szenzor hipotézis alapján a translációs mechanizmus bizonyos elemei működhetnek termoszenzorként . Megint más feltevések alapján miután a sejtek membránjai bizonyítottan rendkívül termoszenzitív makrostruktúrák, ezért a stresszhatások a membránok szerveződése szintjén is generálhatnak olyan szignálokat, amelyek végsősoron elvezetnek a stresszfehérjék szintéziséhez. Ezen “membrán szenzor” hipotézis egyik korai bizonyítéka volt, amikor kékalga sejtek membrán fluidizáló ágenssel (benzil alkohol, BA) való kezelését követően a sejtek minden vizsgált hőszokk génjének aktivációs küszöbhőmérséklete számottevően csökkent. A hőstressz a BA-val analóg módon növelte a membránok fluiditását.

CÉLKITŰZÉSEK

A fenti adatok birtokában a jelenlegi munka során azt a célt tűztük ki, hogy összehasonlító vizsgálatot végzünk *E.coli* sejteken. Követjük a hőstressz és a membránt fluidizálni képes de nem toxikus BA által kiváltott adaptív válaszreakciókat a hőszokk gének aktiválódása, a hőszokk fehérjék képződése ill. a membránok lipidösszetételének, dinamikai tulajdonságainak, permeabilitásának, ill. fázisállapotának a szintjén.

A KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

A két stresszor által előidézett membránváltozásokat az alábbi biofizikai ill analitikai módszerekkel követtük:

- A membrán fluiditását egy hidrofób membránjelölő, az 1,6 difenil-1,3,5-hexatrien (DPH) membránban való mozgásának követésével mértük a fluoreszcencia anizotrópia módszerével.
- A membrán permeabilitását a lipofil fluoreszcens jelölő, az 1-N-fenilnaftilamin fluoreszcenciájának követésével határoztuk meg.
- A sejtek K^+ permeabilitásának vizsgálatára az atomabszorpciós spektrometriát alkalmaztuk.
- A sejtek általános membrán integritását flow cytometerrel (FACS) határoztuk meg.
- Cukorgradiensben való elválasztás után differenciál szkennig kalorimetrián mértük a sejtek külső és belső membránjainak termotróp fázisátalakulási hőmérsékletét.
- A membrán lipideket vékonyréteg kromatográfián választottuk el. A lipidek zsírsavösszetételét gázkromatográfián határoztuk meg.

Számos molekuláris biológiai módszert is alkalmaztunk.

- Northern blot technikával elemeztük a hősokk gének transzkripcióját.
- Egy "reporter" rendszert terveztünk és alkalmaztunk a cianobaktérium hősokk promotereinek membrán fluiditás általi szabályozásának tanulmányozására *E. coliban*.

- A hősokk fehérjék akkumulációját Western blottal követtük.
- A sejtek fehérjeszintézisét radioaktív aminosav jelöléssel majd azt követő fluorográfiával határoztuk meg.

EREDMÉNYEK

A kétféle stresszor (hő, BA) membránra gyakorolt hatását több módszerrel követtük. Az 1,6 difenil-hexatrient (DPH) használva fluoreszcens próbaként megállapítottuk, hogy a BA kezelés a hőstresszel analóg módon okozott membrán hiperfluidizációt, amit a membránok hoemovizskózus adaptációs elvének megfelelően egy fluiditás relaxációs periódus követett. A membrán fluiditás általunk megfigyelt normalizációja jó összhangban volt a hő és a benzilalkohol kezelt sejtek izolált külső és belső (citoplamás) membránjaiban mért gél-fluid lipid fázisátalakulási hőmérsékletek eltolódásaira kapott DSC adatokkal. A külső membránok hő és benzilalkohol által okozott permeabilizációját a külső membránra specifikus NPN fluoreszcens próba segítségével igazoltuk. A membrán permeabilitás hőstresszel kiváltott dezintegrációjára a 40-45 °C-os tartományban került sor, ami egybeesett a sejtek hőstressz válaszával, a stresszfehérjék indukciójával. A BA kezelés a termostresszel kombinálva az adaptív válaszadó képesség jelentős amplifikációját idézte elő, aminek következtében a *E.coli* sejtek válaszreakciója már kb. 35 °C-on indult. Fontos megjegyezni, hogy a belső membrán mindeközben megőrizte teljes integritását, amint azt az etidium homodimer jelölő segítségével igazoltunk.

Ezután mind a hő, mind pedig a BA hatását vizsgáltuk a membránok lipid- és zsírsav összetételének szintjén. Jó összhangban az adaptív válaszreakcióknak a

membránok stabilitását és funkcionalitását szolgáló elsődleges szerepével megállapíthattuk, hogy a hő és az alkalmazott kémiai stresszor egyaránt csökkentette a fordított nemkettősréteg lipidfázis (H_{II}) képzését kiváltani képes foszfatidil etanolamin (PE) szintjét. Érdekes módon, ezzel párhuzamosan míg a hőstressz elsősorban a PG szint emelésével járt, a két másik savas foszfolipid osztály (PG, CL) relatív szintnövekedését igazolhattuk BA kezelésre. Míg általános stresszválaszként a zsírsavak telítettség növekedését tapasztaltuk, az egyes zsírsavak szintjén szintén detektáltunk stresszor (hő, BA) specifikus eltéréseket. Így a 16:1c9 számottevően jobban csökkent a BA-adaptált sejtek összes foszfolipidjeiben (21.1 % vs. 34.6%), mint ahogy az csökkent termoadaptáció hatására (29.2 % vs 34.6 %). Ugyancsak markánsan eltért a sztearinsav (18:0) módosulása: szintje alig változott termoadaptáció közben (1.2% vs. 1.7%), ám jelentősen emelkedett BA stressz hatására (1.2 % vs. 6.3%). Megállapíthattuk, hogy a zsírsavak általános telítettség növekedése a membrán hiperfluidizáció kompenzációjaként, ill. a termotróp és polimorf lipid fázisátalakulások homeosztatiszikus kontrol mechanizmusának részeként jól értelmezhetőek. Adataink megerősítették azt is, hogy a membránok fizikai állapotára gyakorolt hatásukban analóg stresszorok nagyban átfedő, ám még sem azonos adaptív membrán változásokat indukálnak.

A továbbiakban a korábbi, cianobaktériumokon történt vizsgálatokhoz hasonlóan követtük a BA hőshock választ kiváltó hatását, vagyis az egyes stresszfehérje gének expresszióját. Northern hibridizációs vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a két legfontosabb hőshockfehérje a DnaK és a GroEL génjei már a sejtek növekedési hőmérsékletén indukálhatóak BA stressz jelenlétében, mégpedig a membrán fluidizáló ágens koncentrációjával arányosan. Míg a dnaK gén transzkripció szintű aktiválhatósága BA és

hőstressz hatására kb. azonos mértékű volt, a groEL mRNS szintje kevésbé nőtt BA adásakor, mint hőstressz közben. Mivel a *E.coli* hsp gének kifejeződésének közismert a σ^{32} transzkripció faktorától való függése, σ^{32} mutáns sejtekben is elvégeztük a fentiekben leírtakat. Érdekes módon a két stresszfehérje génjeiből átíródó mRNS a mutánsban már a sejtek növekedési hőmérsékletén (30 °C) mérhető mennyiségben volt jelen, ám míg szintjük hőstresszre (46 °C) valamelyest növekedett, BA kezelésre inkább csökkent. Összeségében megfigyeléseink nem csak a “membrán szenzor” hipotézis létjogosultságát igazolták, de azt a lehetőséget is felvetették, hogy az egyes hősokk gének kontrolljában különböző lipid összetételű (fiziko-kémiai állapotú) ill. lokalizációjú membrán domének vehetnek részt.

A továbbiakban a DnaK és GroEL fehérjék szintjeit követtük Western hibridizációval. Igen meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy szemben a hőstresszhez követően kapottakkal, a termostresszel analóg és membrán hiperfluidizációt, a permeabilitási barrier részleges destrukcióját és legfőképpen a hősokk gének egyidejű transzkripció aktiválását egyaránt előidéző BA kezelés (30 °C-on 20 percig) nem járt együtt a két legfontosabb chaperon rendszert reprezentáló hősokk fehérje megnövekedett képződésével. A sejtek fehérjéinek *de novo* szintézisét radioaktív aminosav prekuzorral követve ugyanakkor bizonyítottuk, hogy a BA bevitel a globális fehérjeszintézisre nem volt mérhető hatással. További fontos megfigyelésünk volt, hogy ellentétben a hőstressz során kapottakkal, kísérleti körülményeink között a BA stressz alkalmazása nem járt mérhető szintű protein denaturációval. Mivel mind a hőedzett, mind pedig a BA előkezelt sejtekben kialakult egy. kb. megegyező szintű szerzett termotolerancia, bizonyítékot szolgáltatunk ahhoz a mások által korábban szintén

megfigyelt tényhez, hogy a legfontosabb chaperon fehérjék növekedése feltehetően elégséges, ám nem szükséges előfeltétele az un. szerzett celluláris termotolerancia kialakulásának *E.coli* sejtekben.

Végezetül arra voltunk kíváncsai, hogy a korábban bionyítottan membrán fluiditás által (is) szabályozott cianobakteriális chaperonin gének promoterei, bár nyilvánvalóan nem rendelkezvén σ^{32} felismerő szekvenciákkal, képesek-e ezen membrán fluiditás függő szabályozottságukat megtartani a heterológ, *E.coli* sejtes háttérben. Ehhez a két cianobakteriális chaperonin (*Synechocystis* PCC 6803 groEL ill. cpn60) promotereit az extrém termostabilitású enzimet, az 1,3-1,4 beta-glukanaze-t (vagy lichenaze-t) kódoló riporter szekvencia elé klónoztuk. Az így készített konstrukcióval transzformált *E.coli* sejteket ezután növekvő hőmérsékleteken kezeltük BA-val. Meglepetésünkre a cianobakteriális promoterek (elsősorban a groESL esetében) a BA és hőstressz kezelésre egyaránt aktiválhatónak bizonyultak, az idegen sejt-környezet ellenére.

ÖSSZEFOGLALÁS

1. BA kezelés a hőstresszel analóg módon membrán hiperfluidizációt eredményezett, amit a membránok hoemoviszkózus adaptációs elvének megfelelően egy fluiditás relaxációs periódus követett.
2. A membrán fluiditás általunk megfigyelt normalizációja jó összhangban volt a hő és a benzilalkohol kezelt sejtek izolált külső és belső (citoplamás) membránjaiban mért gél-fluid lipid fázisátalakulási hőmérsékletek eltolódásaira kapott DSC adatokkal.

3. A hő és az alkalmazott kémiai stresszor egyaránt csökkentette a fordított nemkettősréteg lipidfázis (H_{II}) képzését kiváltani képes foszfatidil etanolamin (PE) szintjét.
4. Míg általános stresszválaszként a zsírsavak telítettség növekedését tapasztaltuk, az egyes zsírsavak szintjén szintén detektáltunk stresszor (hő, BA) specifikus eltéréseket.
5. Megállapíthattuk, hogy a zsírsavak általános telítettség növekedése a membrán hiperfluidizáció kompenzációjaként, ill. a termotróp és polimorf lipid fázisátalakulások homeosztatisz kontrol mechanizmusának részeként jól értelmezhetőek
6. Northern hibridizációs vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a két legfontosabb hőszokkfehérje a DnaK és a GroEL génjei már a sejtek növekedési hőmérsékletén indukálhatóak BA stressz jelenlétében, mégpedig a membrán fluidizáló ágens koncentrációjával arányosan
7. Western blot technikát alkalmazva megállapítottuk, hogy szemben a hőstresszre követően kapottakkal, a DnaK és GroEL hőszokkfehérjék szintje nem emelkedett a BA kezelést követően.- Ugyanakkor bizonyítottuk, hogy a BA bevitel a globális fehérjeszintézisre nem volt mérhető hatással.
8. További fontos megfigyelésünk volt, hogy ellentétben a hőstressz során kapottakkal, kísérleti körülményeink között a BA stressz alkalmazása nem járt mérhető szintű protein denaturációval

9. A cianobakteriális promoterek (elsősorban a groESL esetében) a BA és hőstressz kezelésre egyaránt aktiválhatónak bizonyultak *E. coliban* az idegen sejtkörnyezet ellenére.
10. Végül, eredményeink bizonyítékokat szolgáltatottak ahhoz, hogy a hősokk érzékelése még prokariótákban is egy bonyolult, sokkomponensű mechanizmus révén történhet meg, és amelyben a membránok képviselhetik egyikét azoknak a lehetséges “sejthőmérőknek”, amelyek részt vesznek a hősokk gének aktiválásában ill.a szerzett termotolerancia kialakításában.

List of publications:

1. N. M. Tsvetkova, I. Horvath, Z. Torok, W. F. Walkers., Z. Balogi, **N. Shigapova**, L. M. Crowe, F. Tablin, E. Vierling, J. H. Crowe and L. Vigh. (2002). Small Heat Shock Proteins Regulate Membrane Lipid Polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (21), 13504-13509
2. V. Varvasovszki, A. Glatz, **N. Shigapova**, K. Josvay, L. Vigh and I. Horvath (2003). Only one *dnaK* Homolog, *dnak2*, is Active Transcriptionally and is Essential in *Synnechocystis*. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 305, 641-648
3. Zs. Balogi, Zs. Török, G. Balogh, K.Jósvay, **N. Shigapova**, E. Vierling, L.Vigh and I. Horváth (2004) Thylakoid Membrane Reorganization during Heat Acclimation is

Paralleled with The Appearance of a “Heat Shock Lipid”, The Highly Saturated Monoglucosyldiacyl-glycerol, in *Synechocystis*. *submitted to Biochem. Biophys. Res. Com.*

4. N. Shigapova, Zs. Török, G. Balogh, P. Goloubinoff, L. Vigh and I. Horváth (2004). Membrane fluidization triggers membrane remodeling which affects the thermotolerance in *Escherichia coli*. *submitted to Biochem. Biophys. Res. Com.*

Posters:

1. “Heterologously expressed cyanobacterial heat shock genes retain their membrane fluidity control in *E.coli*”, Natalia Shigapova, Attila Glatz, Ibolya Horvath and Laszlo Vigh presented at EuroConference and EMBO workshop on *Mechanisms and Cellular Functions of Molecular Chaperones*, held in Sant Feliu de Guixols, Spain, (2001)

2. “Alterations of membrane physical state regulate the *E.coli* heat shock response”, Natalia Shigapova, Ibolya Horvath, Attila Glatz, Elfrida Fodor, Katalin Jوسفai, Gabor Balogh, Zolt Torok and Laszlo Vigh, presented at the *EMBO workshop on Heat Shock Response* held in Warsaw, Poland, (2002).

Oral presentation:

“Alterations of membrane physical state regulate the *E.coli* heat shock response”, Natalia Shigapova, Ibolya Horvath, Attila Glatz, Elfrida Fodor, Katalin Jوسفai, Gabor Balogh, Zolt Torok and Laszlo Vigh, presented at *Biokemia meeting*, held in Keszthely, Hungary, (2002)