

A Ph.D. értekezés tézisei

**Hsp70 chaperone homológ *Synechocystis* PCC6803-ban:  
a DnaK2 szerepe a stresszhelyzetek kivédésében és  
a tilakoid membránok fizikai állapotának szabályozásában**

Írta: Varvasovszki Viktória

Témavezető: Dr. Vígh László

A Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Központja,  
Biokémiai Intézet  
Szeged, 2003.

## Bevezetés és előzmények

Földünk élőlényei szoros kapcsolatban élnek saját élő és élettelen környezetükkel, ahonnan állandó ingerek érik őket, melyek egy része kimeríthetetlen veszélyforrást jelent számukra. A celluláris stresszválasz elemei a legáltalánosabban elterjedt elhárító mechanizmusok közül kerülnek ki. Ilyen rendkívül konzervatív "védőháló" az ún. stresszfehérjék rendszere is, melyek a negatív környezeti hatások (pl. magas hőmérséklet) által provokált károsodásoktól védi az arra érzékeny sejtalkotókat, fehérjéket, sejtmembránokat. További vizsgálatuk során kiderült, hogy nemcsak a különböző stresszek során, de az alapvető életfunkciók ellátása szempontjából is nélkülözhetetlenek a sejtek számára. **A molekuláris chaperone-ok olyan funkciójukban rokon, de szerkezetükben egymástól igen különböző fehérjék, melyek elősegítik a fehérjetartalmú struktúrák nem kovalens össze- és/vagy szétszerelését ATP felhasználásával *in vivo*, oly módon, hogy ők maguk nem részei az így kialakult aktív struktúráknak (Ellis, 1997)** A molekuláris chaperone-ok egyik legintenzívebben tanulmányozott csoportja a Hsp 70 család, melyek tagjai a DnaK (70 kDa) fehérje illetve a DnaJ (40 kDa) és a GrpE (20 kDa) co-chaperone-ok. Jelenlétüket először *Escherichia coli*-ban igazolták (Zylicz, 1984), később azonban más baktériumokban és eukariótákban is megtalálták homológjaikat. A fehérjék mentésében, az aggregációs folyamatok gátlásában kifejtett tevékenységük eszenciális, a *de novo* szintetizálódó proteinek összeszerelésében pedig a többi chaperone-csoporttal együttműködve vesznek részt (Georgopoulos, 1993).

Kísérleti modellszervezetünk, a ***Synechocystis* PCC 6803**, egy Gram-negatív egysejtű fotoszintetizáló cianobaktérium. Jó transzformálhatósága és a nagy homológ rekombinációs gyakoriság miatt inszerciós inaktiválással számos gén funkcióját illetően nyerhetünk *in vivo* adatokat. Vitathatatlan előny, hogy teljes genomját megszekvenálták (Kaneko, 1996) és a Cyanobase nevű adatbázis a számítógépes világhálón keresztül is elérhető.

A *hsp 70* család tagjai közül *Synechocystis*-ben korábban egy *dnaK*-homológ gént izoláltak, melynek transzkripciósi aktivitása szubletális hőstressz hatására fokozódik (Chitnis és Nelson, 1991). A DnaK-homológ fehérjét csoportunk korábban azonosította, sejtbeli szerepéről azonban eddig adatok nem álltak rendelkezésre. A *hsp 70* (*dnaK*) chaperone géneket egyébként más cianobaktériumokban is megtalálták, így például a *Synechocystis* közeli rokonában, a *Synechococcus* PCC7942-ben, ahol e génből több kópiát fedeztek fel (Nimura, 1994). Ezek co-chaperone géneikkel együtt különféle elrendeződésű operonokban lokalizálódnak. Deléciós kísérletek alapján a *dnaK2* és 3, valamint a *dnaJ* is eszenciálisnak bizonyult, a *dnaK1* viszont minden különösebb következmény nélkül eliminálható a

genomból (Oguchi, 1997; Nimura, 2001). A DnaK fehérjéről kimutatták, hogy a DnaK1 és 3 a sejtben konstitutívan fejeződik ki, csupán a DnaK2 mutat magas hőmérsékleten hősokk fehérjétől elvárható megnövekedett (Nimura, 2001). Sejtbeli lokalizációjukról kiderült, hogy a DnaK1 illetve 2 főleg citoszolikus fehérje, a DnaK3 viszont hosszú C-terminális doménjével perifériásan a tilakoid membránhoz kötődik csakúgy, mint a DnaJ protein (Nimura, 1996).

Az irodalomban számos kísérlet igazolja, hogy a növényi életfolyamatok közül a tilakoid membránhoz kötött fotoszintézis, azon belül is a II. fotoszisztéma a legérzékenyebb a szervezetre ható hőstresszre (Berry és Björkman, 1980). Ebből következik, hogy a növények hőstabilitásában elsődleges szerep jut a fotoszintetikus membrán (tilakoid) stabilitásának, melynek fő alkotói - a fehérjéken kívül - a lipidek. A fény begyűjtése és a fotoszintetikus elektrontranszport a tilakoid membránokban zajlik, melyek a fotoszintetizáló szervezetek membránjainak 60-80 %-át teszik ki.

Csoportunk korábban kimutatta, hogy a növekedési hőmérséklet jelentősen befolyásolja a *Synechocystis* PCC6803 sejtek tilakoidjának hőstresszel szembeni ellenállóképességét (Lehel, 1993). Az alacsony illetve magasabb hőmérséklethez adaptált cianobaktérium tenyészetek hőtűrése között 4-5 °C különbség volt az utóbbi javára. Alacsony hőmérsékleten a membrán fluiditása, "folyékony" volta csökken, melyre a sejtek ellentétes irányú adaptív válasza a membrán mikroviszkozitásának csökkentése, hosszú távon döntően a zsírsavláncok telítettségének - a kettős kötések számának - növelésével, míg magas hőmérsékleten a fenti változások ellentétesen zajlanak le. A membránokban hőmérsékletváltozás hatására más folyamatok is lejátszódhatnak, például módosulhat a különböző lipidek mennyiségi aránya (Vígh, 1985), illetve a zsírsavak térbeli eloszlása (Watanabe, 1981), mely lépések mind a membránok alkalmazkodását szolgálják.

A zsírsavak megfelelő mértékű telítettségének szerepét a membránok biológiai funkciójának védelmében a membránlipidek homogén katalitikus hidrogénezésével is bizonyították (Vígh és Joó, 1983). A módszer segítségével *in situ* -a tilakoidok érintetlenül hagyásával - szelektíven telítették a *Synechocystis* külső citoplazmás membránját, minek következtében - az izoterm kísérleti körülmények ellenére - e membrán úgy viselkedett, mintha hideg hőmérsékleti hatás érte volna, mely folyamat a sejtben bizonyos deszaturáz gének aktiválódásához vezetett. A fentieknek teljesen megfelelő történések játszódtak le akkor, amikor a sejtek 36°C-ról 22°C-ra kerültek, vagyis valóban alacsony hőmérsékleti stresszel találkoztak (Vígh, 1993). Ezen ismeretek birtokában bizonyíthatta csoportunk először, hogy a biológiai membránok állapotának akár igen minimális változásai is jelgenerátorként szolgálhatnak és aktiválhatják illetve szabályozhatják a stresszelhárító gének működését. A katalitikus hidrogénezés

alkalmazásával tehát lehetőség nyílt redukálni a telítetlen lipidek mennyiségét, és ezúton a hőmérséklet csökkenése által előidézett membrán rigiditás növekedést utánozni.

Csoportunk további munkája során a fenti gondolatot kiterjesztettük a magas hőmérsékletek irányába is. E feltételezés igazolásához ismét a *Synechocystis* modellszervezetet használtuk. Megfigyeléseink szerint a citoplazmás membrán katalitikus hidrogénezése nem okozott hőshock gén aktiválást, ellenben a sejtek tilakoidjait is elérni képes fluidizálószer (benzilalkohol) -kezelés elindítja a transzkripciós szintű hőshockválaszt (Horváth, 1998). Hipotézisünk meggyőző alátámasztása volt, amikor a bimoclomol elnevezésű molekuláról – melyről korábban kimutattuk, hogy hőshock gének aktiválására képes emlős sejtekben – kiderült, hogy nem okoz fehérjednaturációt, vagyis az a megállapítás, miszerint a denaturálódott fehérjék keletkezése az elsődleges magas hőmérsékleti stressz szignál, nem állja meg a helyét (Vígh, 1997). A legújabb kutatások során a bimoclomol molekuláról az is bebizonyosodott, hogy néhány negatív töltést hordozó lipiddel igen szelektív kölcsönhatást alakít ki és ezeket – akár a hőstressz – fluidizálni képes (Török, 2003).

A fenti összefüggések ismeretében tehát egyre több bizonyíték kerül felszínre munkacsoportunk azon alapvető hipotézisére nézve, miszerint **a sejteket érő hőmérsékleti stressz elsődleges érzékelője – és egyben az adekvát védelmi reakció kiindulópontja is – a biológiai membrán.**

Feltételezéseink szerint a rövid ideig szubletális hőstressznek kitett sejtekben a protein/lipid arány növekedése a hőshock fehérjéknek köszönhető. Kutatásaink során megfigyeltük, hogy *Synechocystis* PCC6803-ban hőkezelés hatására négy mólsúlytartományba eső fehérje (Hsp70, Hsp60, Hsp17, Hsp14) indukálódik (Lehel, 1992). Immunológiai módszerekkel, illetve N-terminális szekvenálással meghatároztuk, hogy a Hsp70 a DnaK, a két Hsp60 és a Hsp14 a chaperoninok családjába tartozik, a Hsp17 pedig a kis mólsúlyú növényi hőshock proteinek cianobakteriális megfelelője. Az utóbbi években azt is bizonyítottuk, hogy a GroEL chaperonin (Kovács, 1994, Török, 1997) és a Hsp17 is tilakoid-kötötté válik a hőstressz kezelés során (Horváth, 1998, Török, 2001, Tsvetkova, 2002). Kísérleteink során kimutattuk, hogy míg az *E. coli* GroEL és GroES fehérjék *in vitro* körülmények között lipid vezikulákhoz kötődve megtartották chaperone-aktivitásukat, a *Synechocystis*-ből izolált Hsp17 (az *E. coli* DnaK/DnaJ/GrpE és GroESL rendszerek társaságában) *Synechocystis*-lipidek jelenlétében gyakorlatilag elveszíti azt. Megfigyeltük ellenben, hogy a mind a GroESL, mind a Hsp17 hőshock fehérje képes különböző membrán lipideket erőteljesen rigidizálni. A tilakoid megnövekedett hőstabilitása, valamint az ezzel szoros korrelációt mutató Hsp-membránkötés alapján arra következtettünk, hogy e fehérjék aktív részt vállalhatnak a membrán védelmében (Vígh, 1998; Vígh és Maresca, 2002).

A hősokk válasz egyik kiváltó oka köztudottan a denaturálódott, részben vagy teljesen működésképtelen fehérjék citoplazmában való felhalmozódása. Néhány évvel ezelőtt közvetlen bizonyítékok kerültek napvilágra azzal kapcsolatban, hogy a hőhatások következtében megváltozott membránszerkezet hősokk gének transzkripcióját idézte elő (Carratù, 1996, Vígh, 1998). Ezek a megfigyelések a korábban tárgyalt eredményekkel együtt mind a biológiai membránok kettős szerepére utalnak, vagyis egyrészt a sejt "hőmérőjeként" működve, meghatározó szerepet töltenek be a celluláris hőmérséklet-érzékelésben, másrészt - saját fizikai állapotuk modulálásán, illetve hősokk gének indukálásán keresztül – a károsító hatások kivédésének megindításában is részt vállalnak.

### Célkitűzések

Modellszervezetünkben korábban azonosítottuk és hőstressz esetén a membrán védelmében betöltött szerepére nézve részletesen tanulmányoztuk a Hsp60 (chaperonin) osztály tagjait (GroEL, Cpn60, GroES). Abból az általánosan elfogadott nézetből kiindulva, miszerint a stresszfehérjék rendkívül szerteágazó és sokszínű világában az egyes chaperone-családok sejtbeli szerepe egymással szorosan összefügg, a **jelen disszertáció témájaként a chaperone-ok másik legelterjedtebb csoportjának, a Hsp70 család tagjainak hasonló irányú vizsgálatát választottuk.**

E dolgozatban bemutatott kísérleteink során a fenti előzmények kézenfekvő folytatásaként a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. A *Synechocystis* PCC6803 genomialis térképén található *hsp70*-, *hsp40*- és *hsp20*-homológ ORF-ek transzkripció szinten kifejeződnek-e, és ha igen, akkor a róluk készülő mRNS-ek szintézise milyen mértékben hőindukálható?
2. A hőmérséklet emelésével növekvő transzkripció aktivitást mutató gének fehérje-termékei a sejt mely részein lokalizálódnak, esetleg kötődnek-e a membránokhoz?
3. Előállíthatóak-e életképes *hsp70*-deficiens mutánsok, és ha igen, ezen gének teljes vagy csupán részleges inaktivációja lehetséges?
4. Hatást gyakorol-e egy *hsp70*-homológ gén (akár részleges) inaktivációja a *Synechocystis*-ben megtalálható más családba tartozó chaperone-ok transzkripció, illetve transzlációs szinten való kifejeződésére?
5. A *hsp70*-mutáns sejt vonal stressztűrő képessége csökken-e a vad típusú *Synechocystis*-sejtékéhez képest: milyen fiziológiás változásokat okoznak a különböző típusú stresszek (magas és alacsony hőmérséklet, nagy intenzitású fény, UV-B sugárzás) és

ezek kombinációi a membránokhoz kötött fotoszintetikus folyamatok tükrében?

6. Befolyásolja-e a *Synechocystis*-sejtben jelenlevő Hsp70 fehérjék mennyisége a membránok fizikai állapotát illetve összetételét?

## **Anyagok és módszerek**

### **A *Synechocystis* PCC6803 tenyésztése**

A *Synechocystis* PCC6803 (Pasteur Culture Collection, Ripka és mtsai, 1979) sejteket 1% agart tartalmazó BG-11 (Currier és mtsai, 1997) lemezeken tartottuk fenn 30°C-on, folyamatos megvilágítás mellett. Az agarról először egy előkultúrát neveltünk (50 ml BG-11 tápoldatban), majd ezt felhasználva indítottunk 700 ml tenyészetet szintén BG-11-ben, amit a kísérletekhez használtunk. A sejteket  $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású folyamatos fényben, 1% CO<sub>2</sub>-tartalmazó steril levegővel buborékolattuk 22, 30 vagy 36 °C-on. A növekedést a 800 nm-en mért abszorpció változásával követtük. A kísérletekhez exponenciális fázisban lévő kultúrákat (OD<sub>800</sub>=1,5-1,8) használtunk.

### **Totál RNS tisztítása *Synechocystis*-ből**

Az RNS tisztításánál Mohamed és Jansson (1989) módszere szerint jártunk el. A különböző kezelések után 30 ml sejtszuszpenziót átöntöttünk ugyanolyan térfogatú, jéghideg 5% fenolt és 95% etanolt tartalmazó centrifugacsövekbe. Alapos elegyítés és ülepités után a csapadékot felszuszpendáltuk a felülúszó néhány ml-nyi maradékában. A mintát Eppendorf csövekbe tettük, lecentrifugáltuk majd a pelletet kétszer cseppfolyós nitrogénben lefagyasztottuk és jégen felengedtük. 250 $\mu\text{l}$  reszuszpenziós pufferben és 37,5 $\mu\text{l}$  500mM dinátrium-EDTA oldatban vettük fel az üledéket, majd jégen inkubáltuk 5 percig. Ezután 375 $\mu\text{l}$  lízis puffert adtunk hozzá, 65°C-on tartottuk 3 percig és 700 $\mu\text{l}$  65°C-os, vízzel telített savas fenollal egészítettük ki, majd újabb 3 percre 65°C-ra helyeztük, végül ülepitettük. A minta fent leírt fenolos extrakcióját megismételtük és az így nyert vizes fázist 700 $\mu\text{l}$  kloroformmal kezeltük, majd a fázisokat a fenti körülmények között végzett centrifugálással választottuk szét. Az RNS-t a vizes frakcióból 0,2 térfogat 10M lítium-klorid és 2,5 térfogat etanol segítségével egy éjszaka alatt csaptuk ki. Másnap centrifugálás és szárítás után a totál RNS-t 40 $\mu\text{l}$ , dietil-pirokarbonáttal kezelt vízben szuszpendáltuk fel. Az RNS koncentrációját és tisztaságát fotométerrel (A<sub>260</sub>, ill. A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>) határoztuk meg (Ausubel és mtsai, 1987).

### **Reverz transzkripció PCR analízis**

A kísérleteket a GIBCO BRL "SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis" kitjének segítségével, a random hexamer módszer szerint végeztük, a gyártó utasításait pontosan követve. Templátként 3 $\mu\text{g}$  totál RNS-t használtunk és a különböző génekről készült cDNS-ek vizsgálatához speciális amplifikációs primereket alkalmaztunk.

A PCR reakció körülményei a következők voltak: 94°C, 3 perc, majd 35 ciklusban: 94°C, 0,5 perc, 69°C, 1 perc, 72°C, 1 perc, végül 72°C, 3 perc. A reakcióból 20 $\mu\text{l}$ -t választottunk el 0,6%-os agaróz gélen.

### **Transzkripció startpont meghatározása**

A fentiek szerint izolált totál RNS-t használva templátként, a reakciót a *dnaK2* mRNS-sel komplementer primerrel végeztük. A szintetikus oligonukleotidot T<sub>4</sub> polinukleotid-kinázzal (USB) radioaktívan jelöltük a gyártó cég javaslatát követve. Ezután 5 pmol jelölt primert adtunk 25 µg RNS-hez, majd 95°C-on két perces denaturálást követően 20 percig szobahőn hibridizáltuk az oligonukleotidokat a templáthoz ("annealing"). Az extenziós reakciót 42°C-on hajtottuk végre 15 µl végtérfogatban 50mM Tris-HCl pH 8,2; 8mM MgCl<sub>2</sub>; 50mM NaCl; 5mM DTT; 1mM dNTP; 20U RNasin (Promega) tartalmú pufferben, 12U AMV reverz transzkriptázzal (USB). A reakciót 30 perc elteltével leállítottuk, majd standard szekvenáló géltre vittük. A startpont helyének megállapítása érdekében a fenti primerrel megszekvenáltuk a gén megfelelő szakaszát, Glatz és mtsai (1996) szerint.

### **Northern hibridizáció, denzitometria**

A DNS próbákat Multiprime DNA labeling kit (Amersham) felhasználásával α-<sup>32</sup>P-dCTP-vel (Izotóp Kft) radioaktívan jelöltük. A Northern-hibridizációt minden esetben Hybridization Incubator készülékben, 65°C-on végeztük. Az autoradiográfia -80 °C-on történt, "intensifying screen" segítségével. A Northern-blot eredményének kiértékelése denzitometriás módszerrel készült.

### **Mutagén vektor előállítása**

A *dnaK2* mutáns konstrukció készítésénél minden esetben a szokásos molekuláris biológiai protokollokat követtük (Ausubel és mtsai, 1987) és az így kapott mutáns plazmidokat restriktív emésztésekkel ellenőriztük. A *Synechocystis*-t a *dnaK2* gén orientációjával megegyező irányban kanamicin kazettát tartalmazó mutagén vektorral transzformáltuk. A mutáns konstrukció genomba való beépülését genomiális Southern analízis segítségével követtük nyomon.

### **Tilakoid membrán izolálása**

Az izolálásokat minden esetben a mintákat jégen tartva végeztük. 100 ml *Synechocystis* tenyészetből 10 percig tartó 5000xg centrifugálással kiülepítettük a sejteket, majd felszuszpendáltuk 3 ml TES-NaOH pufferben, ami 1-1 mM proteáz gátlót (PMSF, benzamidin, ε-amino-kapronsav) tartalmazott. A mintát a továbbiakban sötétben és jégen tartottuk. A sejteket, a szuszpenzióval azonos térfogatú 0.1 mm átmérőjű üvegyönggyel együtt 3x3 percig kémcsőben vortexelve, s közben 3-3 perc hűtési időt biztosítva tártuk fel. Az üvegyöngyöket hagytuk leülepedni, majd 2x3 ml pufferrel mostuk, s az egyesített szuszpenzióból a sejtörmelékét és a fel nem tárt sejteket 5000xg, 10 perces centrifugálással eltávolítottuk. A felülúszóból kiülepítettük a tilakoid membránban gazdag frakciót, amit legalább egyszer mostunk, hogy a lazán kötődő fehérjéket eltávolítsuk. Ezt követően a tilakoid pelletet izoláló pufferben felszuszpendáltuk és Chl a koncentrációját megmértük (Horváth és mtsai, 1998).

### **Western-analízis**

Exponenciális fázisban lévő *Synechocystis*-kultúrákat (OD<sub>800</sub>=1,5-1,8) fehér fényvel (70 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-2</sup>) történő megvilágítás mellett 3 órán át inkubáltunk a megjelölt hőmérsékleteken. A sejteket ezután centrifugálással ülepítettük és SDS mintapufferben szuszpendáltuk fel. Az azonos fehérje-mennyiségeket 8-15%-os SDS-PAGE-gélen választottuk el (Laemmli, 1970), PVDF membránra blottoltuk és a következő fehérjék ellen termeltetett antiszérumokkal reagáltattuk: *E. coli* DnaK (SPA-880, Stressgene), *Synechococcus* DnaK3 (H.

Yoshikawa ajándéka), *Synechocystis* Hsp17 (E. Vierling ajándéka) és a laboratóriumunkban készített *Synechocystis* GroEL. Második ellenanyagként peroxidáz-konjugált anti-mouse (DnaK, DnaK3) illetve anti-rabbit IgG-t (Sigma) használtunk, az immunodetektálás ECL-metódus szerint történt.

### **Kétdimenziós fehérje gél-elektroforézis**

Az izoelektoromos fókuszálást O'Farrell (1975) módszere alapján végeztük. A rúd-géleket ezután vertikális SDS-poliakrilamid gélek tetejére helyeztük, majd megfuttattuk Laemli (1970) szerint.

### **A fotoszintetikus oxigénfejlődés mérése**

A fotoszintetikus oxigénfejlődést Clark-típusú oxigén elektróddal határoztuk meg. A mérést külsőleg adott elektron donor vagy akceptor nélkül, fehér fényel történő megvilágítás mellett végeztük. Mérés előtt a sejteket 1 percig sötétben inkubáltuk, majd a fotoszintetikus aktivitás változását 3 percen át, fényben regisztráltuk (Lehel és mtsai, 1993).

### **Fotoinhibíciós vizsgálatok**

A különböző hőmérsékleteken növesztett *Synechocystis*-sejteket 10 perces 7000 rpm-en történő centrifugálással gyűjtöttük össze, majd az egyes minták klorofil-koncentrációit 6.5 µg klorofil/ml-re állítottuk be és az így elkészített sejtszuszpenziókból 100-100 ml-t 1 cm rétegvastagságban mintatartókba helyeztünk. A fotoinhibíciós kezelések során az állandó 1200 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-2</sup> fényintenzitást 6 db halogén spotlámpa segítségével értük el, majd a kultúrák 1 órát töltöttek normál intenzitású fényen (120 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-2</sup>). Az egyes méréseknél szükséges állandó hőmérsékletet vízfürdők segítségével biztosítottuk. A kísérlet menete során a 30 percenként vett 2 ml térfogatú minták fotoszintetikus oxigén-fejlődését 2,5 (dimetil) p-benzokinon elektronakceptor jelenlétében, oxigén-elektroddal vizsgáltuk. A felvett értékeket a kezelési idő függvényében ábrázoltuk.

### **UV-B tolerancia mérése**

Az UV-B besugárzáshoz 330 ml *Synechocystis* sejt szuszpenziót (30 µg klorofil/ml) 15 mm mélységű, vízszintesen elhelyezett üveg mintatartóban, 30°C-on, állandóan kevertetve tartottunk. Közvetlenül az UV-B kezelés előtt, az azonos kiindulási körülmények biztosítása érdekében, a mintákat a tenyésztési körülményeknek megfelelő intenzitású fehér fényel világítottuk meg 1 órán keresztül. A 30°C-on növesztett kultúrákat 22°C-ra helyezve 312 nm maximális hullámhosszú, 60 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-2</sup> intenzitású UV-B sugárzással 90 percig kezeltük, majd a mintákat ismét a normál tenyésztési körülményeknek megfelelő fehér fényre helyeztük vissza. A sejtek fotoszintetikus aktivitásának alakulását -állandó keverés mellett- Hansatech DW2 oxigén-elektroddal követtük nyomon.

### **Zsírsvanalízis**

A gázkromatográfiás vizsgálatokhoz a zsírsavak metilésztereit használtuk. A bepárolt összes lipidre ill. az előzőleg elválasztott és ampullákba kapart komplex lipid foltokra mintánként 3 ml 5% cc. sósavat tartalmazó metanolt öntöttünk, széndioxiddal lefúvattuk és leforrasztottuk. 2 órás 80°C-on történő inkubáció után az ampullákat feltörtük, tartalmukat kémcsövekbe vittük. 6ml víz és 3 ml petroléter hozzáadása és rázás után megvártuk a fázisok szétválását. A petroléteres fázist nitrogénnel szárazra pároltuk, majd benzolban vettük fel. A metilészter törzsoldatból 1-2 µl-t gázkromatografáltunk. Az oszlop és a láng-ionizációs detektor hőmérséklete 180°C ill. 260°C volt. Az egyes kromatográfiás csúcsok azonosítását sztenderdekkel ill. a retenciós idők alapján végeztük.



Mennyiségi meghatározásukhoz 17:0 belső sztenderdet használtunk, a csúcsok alatti területek mérését elektronikus integrátor segítségével végeztük.

#### **Lipid extrakció és elválasztás**

A lipideket Bligh és Dyer (1959) által leírt módon kloroform és metanol 1:2 arányú elegyével nyertük ki a sejtekből. A lipidek analízisét és lipidosztályokra történő elválasztását a Sato és Murata (1988) által közölt eljárás alapján végeztük. A szilikagél vékonyrétegen való azonosítás során a futtató közeg kloroform, metanol és 28%-os ammónium-hidroxid (65:35:5) elegye volt.

Az egyes lipidek mennyiségi meghatározása két lépésben történt. A vékonyrétegen történő szétválasztás után a foltokat ANS-sel előhívtuk, 17:0 belső sztenderdet cseppentettünk rájuk, majd ampullákba kapartuk, metileztük és a zsírsavakat gázkromatografáltuk. A komplex lipidek mennyiségét átlagos móltömegük alapján számoltuk ki.

#### **Fluiditás mérés fluoreszcencia anizotrópiával**

A tilakoid membrán fluiditását DPH (1,6-difenil 1,3,5-hexatrién) fluoreszcencia anizotrópiájának mérésével határoztuk meg (Barber és mtsai, 1984). A jelölés során 3 ml 3 $\mu$ g klorofill-a-t tartalmazó tilakoid szuszpenzióhoz (tilakoid izoláló médiumban) 3  $\mu$ l DPH törzsoldatot (0.2 mM, tetrahidrofuránban) adtunk. Ezután a szuszpenziót 40 percig sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A fluoreszcencia anizotrópia mérését fluoreszcens spektrométerrel végeztük. A minta hőmérsékletét számítógép vezérelte átfolyós termosztáttal szabályoztuk, és a küvettában platina elektróddal mértük, a fűtési sebességet 0.5°C/percen tartva. A mérések során a gerjesztő fény hullámhossza 360 nm, a résszélesség 10nm volt. Az emittált fény intenzitását 460 nm-en detektáltuk ugyancsak 10 nm résszélesség mellett. A gerjesztő fényt Glan Thompson prizma segítségével polarizáltuk, és a fluoreszcencia gerjesztő fény polarizációjának irányára merőleges ill. párhuzamos összetevőjét polarizációs szűrők alkalmazásával egyidejűleg mértük. A mért fluoreszcencia intenzitást a jelöletlen minta hátterével korrigáltuk. Az anizotrópiát Barber és mtsai (1984) alapján számoltuk. A tilakoidból izolált lipidekből liposzómákat készítettünk. 250  $\mu$ g lipidet 100 $\mu$ l kloroformban vettünk fel, 2  $\mu$ l DPH törzsoldatot (0.2mM, tetrahidrofuránban) adtunk hozzá, majd nitrogén alatt 10 ml-es szonikáló cső aljára pároltuk. A száraz lipid filmre 5 ml tilakoid izoláló médiumot mértünk. Ezt a lipid szuszpenziót jégen 3x20 másodpercig szonikáltuk. A kapott liposzóma szuszpenzió fluoreszcencia anizotrópiáját a hőmérséklet függvényében a fent leírt módon mértük.

## **Eredmények összefoglalása**

Vizsgálataink során az alábbi eredményekről számolhattunk be:

1. Megállapítottuk, hogy a *Synechocystis*-genomban **a három *hsp70*-homológ közül csak egyetlen, a *dnaK2* mutat hőindukálható expressziót**, a másik két gén (*dnaK1* és 3) pedig transzkripcionálisan nem aktív, ún pszeudogén, mivel mRNS-termékeik –jelen körülmények között- Northern-analízissel RT-PCR-technikával és primer-extenziós kísérletekkel sem mutathatók ki. A fentiekkel szemben **a co-chaperone-ok** (4db *dnaJ* és 1 db *grpE*)

**transzkripciója konstitutívnek bizonyult,** s magasabb hőmérsékleten sem tért el a normál körülmények között megfigyelhető szinttől.

2. Western-blot analízis segítségével kimutattuk, hogy normál hőmérsékleten a **DnaK2 fehérje a citoplazmában és a tilakoid membrán frakcióban egyaránt megtalálható,** hősokk hatására pedig jelentős többlet képződik belőle, melynek egy része membránkötötté válik.
3. Helyspecifikus inszerciós mutagenézis segítségével **részlegesen dnaK2-deficiens, ún. merodiploid sejtvonalat állítottunk elő.** A mutáns konstrukció beépülése a drasztikus szelekciós körülmények ellenére sem volt teljes, a **dnaK2 gén** fiziológias körülmények között is **esszenciálisnak bizonyult.**
4. A különböző sejtvonalak fotoszintetikus oxigén-fejlődését nyomonkövetve megállapítottuk, hogy **a részlegesen DnaK2-hiányos Synechocystis sejtek** normál körülmények között a vad típushoz viszonyítva **kevésbé termotoleráns fenotípust mutatnak,** magas hőmérsékleti **előkezelés után viszont jobb hőadaptációs tulajdonságokkal rendelkeznek,** bár túlélési idejük még ezzel együtt sem éri el a genetikailag nem módosított sejtékét.
5. A különböző növekedési hőmérsékletekhez adaptált vad, illetve **dnaK2-mutáns** tenyészetek **fénytürésének** tanulmányozása a következő eredményeket hozta:
  - a **30°C-on nevelt sejteknél** a fénykezelés önmagában nem okozott számottevő változást egyik kultúra fotoszintetikus aktivitásában sem. E paraméter értéke ugyanezen törzseket 22°C-ra helyezve viszont mindkét törzs esetében csökkenést mutat.
  - a **36°C-hoz adaptált kultúrák** vizsgálatakor már a csak fénykezelt kontrol mintáknál is fotoinhibíciós hatást figyelhettünk meg.
  - a **22°C-on tenyésztett sejtek** a saját növekedési hőmérsékletükön sokkal kevésbé viselték el a fénykezelést, mint a számukra tulajdonképpen már hőstresszt jelentő 30°C-on, sőt ismét fiziológias fényviszonyok közé kerülve is csak csökkent szintű oxigén-fejlesztésre voltak képesek.
6. Az **UV-B tolerancia vizsgálatok** alapján kimutattuk, hogy a **dnaK2-mutáns sejtvonala** oxigén-kibocsátó képessége az eredeti érték 40%-ára esett vissza és fotoszintézisének intenzitása még az UV-B sugárzás megszüntetése után is fokozatos csökkenést mutatott, ami végül a sejtek pusztulását eredményezte. A vad típusú törzs ezzel szemben a kísérlet végére csaknem teljes mértékben visszanyerte fotoszintetikus aktivitását.

7. A *Synechocystis* sejt **membránjaiban lezajló fizikai változásokat** a fluoreszcencia-anizotrópia módszerével **tanulmányozva kimutattuk, hogy** a magas hőmérsékleten előkezelt tilakoidok anizotrópia-értéke adott mérési hőfokon a nekik megfelelő kontrol mintakénál mindig magasabban alakul, mely hatás a membránok termoadaptációjából adódik. **A *dnaK2*-mutánsból származó tilakoidok a vad típusnál mindkét esetben egyértelműen rigidebbek.**
8. **A membrán zsírsav-összetételének analízisekor a mutáns sejtek tilakoid lipidjeiben az olajsav (18:1) mennyiségének** –a linolsav és a  $\gamma$ -linolénsav rovására történő- szignifikáns **növekedését regisztráltuk** a vad típushoz képest.

Összefoglalásul elmondhatjuk, hogy a *dnaK2*-mutáns törzsben a fotoszintézis folyamata a vad típusnál jóval érzékenyebb a magas hőmérsékletre, de ugyanakkor ez a sejt vonal is képes szerzett termotolerancia kialakítására. Ebből következik, hogy a stressz elleni hatékony védekezéshez elengedhetetlen a különböző stresszfehérjék bizonyos szintjének és egymáshoz viszonyított jól meghatározott arányának jelenléte a sejtben, ám a hőmérsékleti adaptációs folyamatokat a *dnaK2* gén részleges eltávolítása kevésbé érinti. Egyéb tényezők, mint a membránok fizikai állapotának illetve összetételének finoman szabályozott változásai, magyarázattal szolgálhatnak arra nézve, hogy a parciális *dnaK2*-mutáns hőadaptációt követő termotoleranciát kialakító képessége nagyrészt érintetlen maradt.

A dolgozatban ismertetett eredmények alapján **elsőként bizonyítottuk, hogy egy alapvető hősokk proteinre, a DnaK-re nézve mutáns szervezet egyben membrán-mutáns is**, mely létezéséhez fiziológias folyamatainak minden szintjén tökéletesen modulált összhang fenntartása szükséges.

## Publikációs lista

Glatz, A., Horváth, I., **Varvasovszki, V.**, Kovács, E., Török, Zs., and Vígh, L. (1996) Stress-induced activation of chaperone genes implies the operation of a novel transcriptional regulatory mechanism in the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803.

*In: Genes and their products for tolerance to physical stresses in plants.* (Leone, A., Grillo, S. Eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 21-29.

Glatz, A., Horváth, I., **Varvasovszki, V.**, Kovács, E., Török, Zs. and Vígh, L. (1997) Chaperonin genes of the *Synechocystis* PCC 6803 are differentially regulated under light-dark transition during heat stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**, 291-297.

Horváth, I., Glatz, A., **Varvasovszki, V.**, Török, Zs., Páli, T., Balogh, G., Kovács, E., Nádasy, L., Benkő, S., Joó, F. and Vígh, L. (1998) Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of *hsp17* as a novel "fluidity gene".

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3513-3518.

Török, Zs., Goloubinoff, P., Horváth, I., Tsvetkova, N. M., Glatz, A., Balogh, G., **Varvasovszki, V.**, Los, D.A., Vierling, E., Crowe, J. H. and Vígh, L. (2001) *Synechocystis* HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3098-3103.

Kovács, E., van der Vies, S. M., Glatz, A., Török, Zs., **Varvasovszki, V.**, Horváth, I. and Vigh, L (2001) The chaperonins of *Synechocystis* PCC 6803 differ in heat inducibility and chaperone activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**, 908-915.

**Varvasovszki, V.**, Glatz, A., Shigapova, N., Jósvey, K., Vigh, L., Horváth, I. (2003) Only one *dnaK* homolog, *dnaK2*, is active transcriptionally and is essential in *Synechocystis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 641-648.