

EGYETEMI DOKTORI DISSZERTÁCIÓ

Chaperonin fehérje és tilakoid membrán
hőmérsékletfüggő kölcsönhatása a
Synechocystis PCC 6803 cianobaktériumban

Lehel Csaba

MTA Szegedi Biológiai Központ

Biokémiai Intézet

Szeged

1991

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések

1.	BEVEZETÉS	1
2.	CÉLKITÜZÉS	2
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
3.1.	A növények termotoleranciája	3
3.2.	Adaptáció a tilakoid membrán szintjén	4
3.3.	A hősokk fehérjék általános jellemzése	6
3.4.	Chaperonin fehérjék	10
3.5.	Cianobaktériumok	14
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	18
4.1.	Tenyésztési körülmények	18
4.2.	Adaptációs kísérletek	18
4.2.1.	Túlélési kísérlet	18
4.2.2.	Fotoszintetikus aktivitás mérés	19
4.2.3.	Totál fehérje szintézis mérés	19
4.3.	Hsp szintézis vizsgálata teljes sejt szinten	20
4.4.	Hősokk fehérjék intracelluláris lokalizációjának vizsgálata	21
4.4.1.	Sejtfractionálási kísérletek	21
4.4.2.	A 64 kD hsp tilakoid kötődésének vizsgálata	22
4.5.	Chaperonin fehérje tisztítás	24
4.5.1.	Tisztítás cukor grádiens centrifugálással	24
4.5.2.	Chaperonin fehérje további tisztítása Sephacryl S-200 oszlopon	24
4.6.	Fehérje elektroforézis és ehhez kapcsolódó módszerek	25
4.6.1.	SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)	25



4.6.2.	Fluorográfia	26
4.6.3.	Denzitometria	26
4.6.4.	Immunoblotting	26
4.6.5.	Fehérje szekvenálás	27
5.	EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	28
5.1.	Magas hőmérséklet adaptációs kísérletek	28
5.2.	Hősokk fehérje szintézis vizsgálata teljes sejt szinten	34
5.3.	Hősokk fehérjék intracelluláris lokalizáció- jának vizsgálata	44
5.4.	64 kD hősokk fehérje tisztítása és azonosítása	50
5.5.	Immunológiai kísérletek más hősokk fehérjék azonosítására	58
5.6.	Hipotézis a tilakoid membrán és a chaperonin fehérje kölcsönhatásáról	61
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	69
7.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	72
8.	IRODALOMJEGYZÉK	73

RÖVIDÍTÉSEK

BSA	-marha szérum albumin
cpn	-chaperonin
cpn10	-10 kD molekulatömegű chaperonin
cpn60	-60 kD molekulatömegű chaperonin
DNS	-dezoxiribonukleinsav
hsp	-hősokk fehérje
hsp60	-60 kD molekulatömegű hősokk fehérje
hsp70	-70 kD molekulatömegű hősokk fehérje
kD	-kilodalton
LHCP	-fénybegyűjtő komplex fehérjéje
lmw hsp	-kis molekulatömegű hősokk fehérje
MES	-2(N-morfolin)etán-szulfonsav
MGDG	-monogalaktozil-diacilglicerol
mRNS	-hírvivő ribonukleinsav
PAGE	-poliakrilamid gélelektroforézis
pLHCP	-preszekvenciát tartalmazó LHCP
PMSF	-fenil-metil-szulfonilfluorid
POPOP	-1,4-di/2-(5-fenil)-oxazoil/-benzol
PPO	-difeniloxazol
Rubisco	-ribulóz-1,5,-bifoszfát-karboxiláz
SDS	-Na-dodecilszulfát
TCA	-triklórecetsav
Tris	-tris(hidroximetil)aminometán

1. BEVEZETÉS

A környezeti hőmérséklet optimális érték fölé emelkedése minden élő szervezet számára súlyos kihívás, amelyre -esetleges egyéb védekező mechanizmusok mellett- minden eddig vizsgált élőlény a hősokk fehérjék (hsp-k) szintézisével válaszol (Lindquist, 1986). Speciális helyzetben vannak ebből a szempontból a növények: a kedvezőtlen hatásokat nem képesek aktív helyváltoztató mozgással kivédeni, ezért ezekkel szembeni adaptációs képességük fokozott jelentőségű. A magas hőmérséklet által okozott károsodás és ezzel szembeni alkalmazkodási képességük nagy gazdasági és elméleti jelentőséggel bíró probléma.

A hőstressz a növényi sejt számos életfolyamatára kedvezőtlenül hat, abban azonban általános az egyetértés, hogy ezek közül a kloroplasztisz tilakoid membránjához kötött fotoszintézis az egyik legsérülékenyebb (Berry és Björkman, 1980). A fentiekkel összhangban ezért célul tűztük ki a tilakoid membrán szintjén működő védekezési stratégiák minél alaposabb megismerését. A csoportunkat érdeklő molekuláris szintű ok-okozati összefüggések jelenleg alig ismertek, és ezek beható vizsgálatához még egy egysejtű eukarióta alga is túl bonyolult rendszer. Így esett választásunk a kloroplasztisz endoszimbióta őseinek tekintett, fotoszintetizáló tilakoid membránnal rendelkező, prokarióta, genetikailag könnyen manipulálható cianobaktériumokra.

2. CÉLKITÜZÉS

A *Synechocystis* PCC 6803 cianobaktérium tilakoid membránjának magas hőmérséklet adaptációs folyamatait kívántuk vizsgálni. Ezen belül főbb céljaink a következők voltak:

1. A tudományos irodalomban alig található adat a cianobaktériumok magas hőmérséklettel szembeni alkalmazkodási képességéről. Ezért első lépésként ezt a képességet kívántuk kimutatni, és ezzel bizonyítani, hogy modellválasztásunk helyes.

2. A csoport korábbi eredményei alapján tudjuk, hogy a tilakoid membrán szintjén zajló adaptáció összetett folyamat: változás történik a membránt alkotó lipidek összetételében, de egyedül ezzel az alkalmazkodás nem magyarázható (Török és mtsai, előkészületben). Feltételeztük, hogy ebben a folyamatban a fehérjéknek, elsősorban a hősokk fehérjéknek (hsp) is nélkülözhetetlen szerepe van. Céljaink közé tartozott ezen hősokk fehérjék alapszintű jellemzése.

3. Igazolni szeretnénk volna azt az elképzelésünket, hogy egy vagy több frissen szintetizálódott hsp a hősokk közben kötődik a tilakoid membránhoz. Vizsgálni kívántuk a feltételezett kötődés természetét.

4. Miután kimutattuk egy abundáns hősokk fehérje tilakoid asszociációját, célként lebegett a szemünk előtt ennek a fehérjének az azonosítása, és lehetőleg minél pontosabb jellemzése.

5. Munkánk során igyekeztünk feltárni a párhuzamos vonásokat a cianobaktériumok, más prokarióták, és a növényi kloroplasztisz hősokk közbeni viselkedését illetően.

3. IRODALMI ATTEKINTÉS

3.1. A növények termotoleranciája

Az élőlényeknek az optimálisnál magasabb hőmérséklettel szemben kialakult védekező képessége a termotolerancia. Bár élesen nem választható szét, valójában kétféle termotolerancia létezik. A fogalmat általában az élőlények azon képességére értik, hogy egy nem letális hőstressz után bizonyos idővel (általában néhány órától egy-két napig) képesek túlélni egy egyébként letális hőmérséklet kezelést. Ez a szerzett termotolerancia (Nagao és mtsai, 1990). Létezik azonban olyan, genetikai különbségeken alapuló termotolerancia is, amely nem igényel előkezelést (Kunst és mtsai, 1989). Arra is van adat, hogy ugyanazon fajhoz tartozó, genetikailag eltérő fajták előkezelés nélkül nem, de azt követően különböznek hőtülrő képességükben (Khrisnan és mtsai, 1989). Jelen dolgozatban termotolerancián a fogalom általánosan elfogadott jelentését, tehát a szerzett termotoleranciát értjük.

A növények termotoleranciája (hőtülrő képessége) nagy gazdasági jelentőséggel bíró, és egyben tudományos szempontból is izgalmas probléma, ezért már régóta áll az érdeklődés középpontjában. A kutatások korai szakasza két alapvető felismerést hozott:

1. A hőstressz által leginkább a kloroplasztisz tilakoid membránjához kötött fotoszintézis károsodik (Berry és

Björkman, 1980).

2. A termotolerancia kialakulása szinte mindig együtt jár speciális, magas hőmérsékleten indukálódó fehérjék, az úgynevezett hősokk fehérjék (hsp) szintézisével (Lin és mtsai, 1984, Moisyadi és Harrington, 1989). Ezekből logikusan következett az a feltételezés, hogy a termotolerancia alapja ezeknek a fehérjéknek a szintézise. Bár vannak ezzel ellentétes adatok is (László, 1988), az eredmények zöme ezt támasztja alá. A hsp-k szintézisét hőmérséklet emelés nélkül, más faktorokkal (például kadmium, arzenit, vagy etanol adagolásával) is ki lehet váltani, és ez általában szintén termotolerancia kialakulásával jár (Lindquist, 1986). Ugyancsak meggyőző, hogy egy hőtürelőbb búza fajta többféle és nagyobb mennyiségű hsp szintézisére képes, mint hőre érzékenyebb társa (Khrisnan és mtsai, 1989).

Vizsgáljuk meg e két alapvető felismerés háttérében álló jelenségeket!

3.2. Adaptáció a tilakoid membrán szintjén.

A tilakoid membrán egy lipid kettősrétegből és abba ágyazódott, illetve felszínéhez kötődött fehérjékből álló, bonyolult képződmény, amely a fotoszintézis révén minden élőlény számára megteremti az élet egyik fontos alapfeltételét. Egy ma általánosan elfogadott elmélet szerint a magas hőmérséklet hatására a tilakoid membránban a lipidek kettősréteg szerveződése megbomlik, úgynevezett fordított hexa-

gonális lipid fázis alakul ki, ami a membrán félig áteresztő képességének és egyéb funkcióinak elvesztésével, végső soron a sejt pusztulásával jár (Quinn, 1989). Ennek a sérülékenységnak az a magyarázata, hogy a tilakoid membránt alkotó lipidek felét kitevő, többször telítetlen zsírsavakkal észterezett monogalaktozil-diacilglicerol (MGDG) nagyon nagy hajlandóságot mutat hexagonális fázis képzésére. Normális körülmények között a membránt alkotó többi lipid és a fehérjék az MGDG-t is a kettősrétegbe kényszerítik (Williams és Quinn, 1987), a hőmérséklet emelkedése azonban a hexagonális fázis kialakulásának irányába hat.

Hogyan védekezhet ez ellen a sejt? Az egyik eszköze lehet erre a lipidekben található zsírsavak telítetlenségének csökkentése, ami által a membrán fluiditása és a hexagonális fázis kialakulásának veszélye is csökken. Számos adat mutat arra, hogy ez valóban hatékony eszköz (Thomas és mtsai, 1986, Vígh és mtsai, 1989, Kunst és mtsai, 1989, Hugly és mtsai, 1989). Ez a folyamat azonban hosszabb időt vesz igénybe, és nem ad magyarázatot a rövid időtartam (egy-két óra) alatt kialakuló termotoleranciára.

Tehát a tilakoid membrán adaptációjakor feltételezhetjük, hogy ebben specifikusan a hősokk közben szintetizálódott fehérjék is részt vesznek. Több adat arra mutat, hogy ez valóban így van. Escherichia coliban hőkezelés hatására a külső membránban új, integráns fehérjék jelennek meg, ezek feltételezett funkciója a lipid kettősréteg stabilizálása (Yatvin, 1987). Kimutatták a növényi sejt citoplazmá-

jában szintetizálódó kis molekulatömegű hsp-k kloroplasztiszba történő transzlokációját (Vierling és mtsai, 1989), ilyen hsp-nek a tilakoid membránhoz kötődését (Glaczinski és Kloppstech, 1988), sőt e hsp hőstressz közbeni, fotoszintézist védő hatásáról is van adat (Schuster és mtsai, 1988). Kimutattak a kloroplasztiszban szintetizált, tilakoid membránhoz kötött hsp-eket is (Krishnasamy és mtsai, 1988). Mindezzel együtt maguk a fehérjék, illetve azok pontos funkciói és lokalizációi még alig ismertek, nagy teret engedve a kutatói képzelet szárnyalásának.

3.3. A hősokk fehérjék általános jellemzése

Sok szó esett eddig a hősokk fehérjéről általában. Itt az ideje kicsit részletesebben megismerkedni velük.

A magas hőmérsékletre adott hsp szintézis, mint válasz minden eddig vizsgált élőlénynél előfordul, és megfelelő körülmények között termotolerancia kialakulásához vezethet (Lindquist, 1986). Érdekes módon ezeknek a fehérjéknek a szintézise nemcsak hővel, hanem más stresszfaktorokkal is kiváltható, például etanollal (Zeuthen és mtsai, 1988), kadmiummal és arzenittel (Edelman és mtsai, 1988). Hogy milyen módon képesek egymástól látszólag teljesen különböző hatások hasonló választ indukálni, ma még nem ismert.

A hősokk fehérjéket tömegük, aminosav sorrendjük és funkciójuk alapján csoportosítani lehet. A dolgozatnak nem

célja minden egyes hsp osztály ismertetése, ezért csak utalunk néhány friss, összefoglaló cikke (Lindquist és Craig, 1988, Nagao és mtsai, 1990). Mindenképpen említést érdemel azonban az a három hsp csoport, amelyhez munkánk során közünk volt: a hsp70, a hsp60, és a kis molekulatömegű hsp (lmw hsp) csoport.

A hsp70 család tagjait minden eddig vizsgált szervezetben megtalálták. Eukariótákban általában több gén kódolja őket, egyes gének konstitutívan, mások hővel indukálhatóan fejeződnek ki (Nagao és mtsai, 1990). Egyebek mellett nélkülözhetetlen szerepük van az endoplazmatikus retikulum és a mitokondrium membránjain keresztül zajló fehérje transzportban (Chirico és mtsai, 1988, Hartl és Neupert, 1990). A csoport egy tagját a kloroplasztiszban is kimutatták (Marshall és mtsai, 1990). A prokariótákban jelenlévő dnaK fehérjének a DNS szintézisben és a hősokk válasz szabályozásában van fontos szerepe (Skelly és mtsai, 1988).

Csak prokariótákban, illetve az endoszimbióta elmélet értelmében prokarióta eredetű eukarióta sejtorganellekben (kloroplasztisz és mitokondrium) mutatták ki a hsp60 családba tartozó fehérjéket. Munkánk főleg ezekre koncentráldott, ezért részletesebb ismertetésükkel külön fejezet foglalkozik (lásd "Chaperonin fehérjék").

A kis molekulatömegű hsp-k (lmw hsp) több szervezetben előfordulnak, de jelenlétük a növényekben a legmarkánsabb. Itt általában 10-20 féle ilyen fehérje is létezik, 15-28 kD közötti molekulatömeggel (Nagao és mtsai, 1990). A sejt

szinte minden organelumban megtalálhatók. Funkciójuk alig ismert, bár többször is kimutatták őket mRNS tartalmú aggregátumokban (Nover és mtsai, 1989). Külön alcsoportot alkotnak a számunkra legérdekesebb kloroplasztiszba traszlokálódó 1mw hsp-k. Kloroplasztiszon belüli lokalizációjukra és lehetséges funkciójukra nézve az adatok ellentmondásosak. Elképzelhető sztrómában lokalizált aggregátumok formájában az mRNS-ek védelme (Chen és mtsai, 1990), vagy tilakoid kötött állapotban a fotoszintézis protekciója (Schuster és mtsai, 1988).

Szólnunk kell az utóbbi évek hsp kutatásának talán legnagyobb eredményéről, az úgynevezett "molekuláris chaperone" elméletről. A molekuláris chaperone-ok olyan fehérjék, amelyek más polipeptideket segítenek a korrekt, natív szerkezet elérésében, ők maguk azonban nem komponensei a keletkező végső, natív struktúrának (Ellis, 1990b). Az egyre bővülő csoportba olyan fehérje családok tartoznak, amelyek csak funkciójuk révén hozhatók egymással kapcsolatba (1. táblázat). Közöttük igen sok a hsp. Feltételezik, hogy minden hsp egyben molekuláris chaperone is, bár nem minden molekuláris chaperone hsp (Ellis, 1990b).

Hogyan működnek ezek a molekuláris chaperone-ok? A sejtben számos olyan folyamat zajlik (például fehérje szintézis, fehérje transzport, oligomer struktúrák felépülése), amelynek során a fehérje szerkezetét meghatározó, és normális állapotban rejtetten elhelyezkedő aminosav sorrend részletek átmenetileg felszínre kerülnek, és fennáll a veszély,

NÉV	FELTÉTELEZETT FUNKCIÓK
Nukleoplazminok	Nukleoszóma felépülés Transzkripció? Riboszóma felépülés és transzport?
Chaperoninok	Fehérje folding Oligomer struktúrák felépülése Protein transzport DNS replikáció mRNS turnover Stressz védelem
Hősokk fehérje 70 osztály	Protein folding Oligomer struktúrák felépülése Protein transzport Oligomer struktúrák lebontása?
Hősokk fehérje 90 osztály	Hormon receptor lefedése
Szignál felismerő részecske (SRP)	Protein transzport
Szubtilizin proszekvenciája	Szubtilizin folding
α -lítikus proteáz proszekvenciája	α -lítikus proteáz folding
Ubiquitinált riboszóma fehérjék	Riboszóma felépülés eukariótákban
Trigger faktor	Protein transzport
Sec B protein	Protein transzport
Pap D fehérje	Pilus felépülés E. coliban

1. táblázat. A molekuláris chaperone-ok (Ellis, 1990b alapján)

hogy egymással nem megfelelő reakcióba lépve biológiailag inaktív szerkezetben rögzülnek. Ma még nem ismert módon a molekuláris chaperone ezeket a szekvencia részleteket ismeri fel, és átmenetileg ahhoz hozzákötődve, valamilyen módon segíti az aktív struktúra kialakulását (Rothman, 1989).

Hőstressz közben ez a veszély fokozott, hiszen a hő az aktív fehérje szerkezetet megbontva, egyszerre hozhatja felszínre ezeket a szekvencia részleteket a sejt összes fehérjéjében. Ilyenkor megnő a molekuláris chaperone-ok iránti igény, így bizonyára ezzel magyarázható, hogy számos molekuláris chaperone egyben hsp is. Már in vitro kísérletek is bizonyítják, hogy ezek a fehérjék valóban így működhetnek a sejten belül: a hsp70 családba tartozó dnaK protein ATP függő reakcióban képes újra aktiválni a hő által inaktivált RNS polimeráz enzimet (Skowrya és mtsai, 1990).

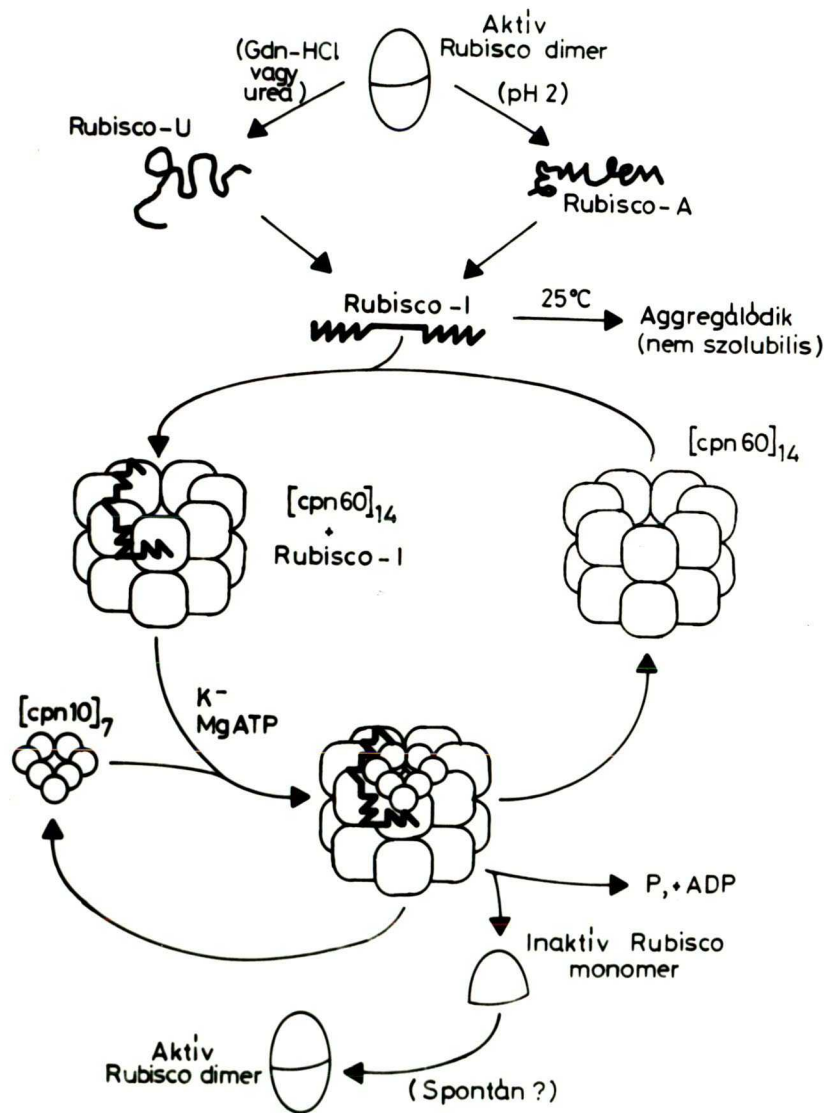
3.4. Chaperonin fehérjék.

A hsp60 család, vagy más néven a chaperoninok (cpn), szintén a molekuláris chaperone-okhoz tartozó fehérjék (1. táblázat). Prokariótákban és prokarióta eredetű eukarióta organeliumokban (mitokondrium és kloroplasztisz) mutatták ki jelenlétüket. Kétféle fehérje tartozik a családba: az egyik 60-65 kD (cpn60), a másik 10-15 kD (cpn10) körüli molekulatömegű, és prokariótákban egyazon operon kódolja őket. Sokáig úgy gondolták, hogy a cpn10 nincs meg az eukarióta organeliumokban, de a mitokondriális cpn10 azonosítá-

sa után (Lubben és mtsai, 1990) jelenléte a kloroplasztiszban is valószínűsíthető. Minden eddig vizsgált szervezetben nagy mennyiségben, konstitutívan termelődnek, de hővel a szintézisük tovább indukálható (Ellis, 1990a). Mindkét chaperonin oligomer struktúrájú: a cpn60 kettő héttagú, a cpn10 pedig egy héttagú gyűrűből áll (Georgopoulos és Ang, 1990).

Funkcióik igen szerteágazóak, valószínűleg ma még nem mindegyikük ismert. Mitokondriumban a protein transzportban (Hartl és Neupert, 1990) és az oligomer struktúrák felépülésében mutatták ki szerepüket (Cheng és mtsai, 1989). A legújabb elképzelések szerint a cpn60 a mikrotubulusok felépüléséhez is nélkülözhetetlen (Gupta, 1990), csakúgy, mint saját oligomer szerkezetének a kialakításához (Cheng és mtsai, 1990). A kloroplasztisz megfelelő proteinje, a Rubisco kötő fehérje komplexet képez a citoplazmából a kloroplasztiszba transzportálódott fehérjék többségével (Lubben és mtsai, 1989), és alapvető szerepe van a Rubisco oligomer szerkezetének kialakulásában (1. ábra, Roy, 1989). Kimutatták, hogy egy 65 kD molekulatömegű szolubilis fehérje jelenléte szükséges a tilakoid membrán fénybegyűjtő fehérjéjének, az LHCPnek a membránba integrálódásához (Fulson és Cline, 1988). Több, mint valószínű, hogy a cpn60-ról van szó.

A prokarióta Escherichia coliban mindkét fehérje nélkülözhetetlennek bizonyult a sejt életképességének fennmaradásához (Fayet és mtsai, 1989), és szintjük meghatározhatja a



legmagasabb növekedési hőmérsékletet (Kusukawa és Yura, 1988). Kimutatták részvételüket a DNS és RNS szintézisben csakúgy, mint a fehérje szekrécióban és fág részecskék felépítésében (Georgopoulos és Ang, 1990, Kusukawa és mtsai, 1989, VanDyk és mtsai, 1989). Végül, de nem utolsósorban: jelenlétük, részben csoportunk munkájának köszönhetően, a cianobaktériumokban is bizonyított (Vigh és mtsai, 1990, Webb és mtsai, 1990, Jager és Bergman, 1990).

Viszonylag sokat tudunk a chaperoninok működési mechanizmusáról, amelyhez nagyban hozzájárultak egy amerikai kutatócsoport által kidolgozott in vitro kísérleti rendszer eredményei (Goloubinoff és mtsai, 1989, Viitanen és mtsai,

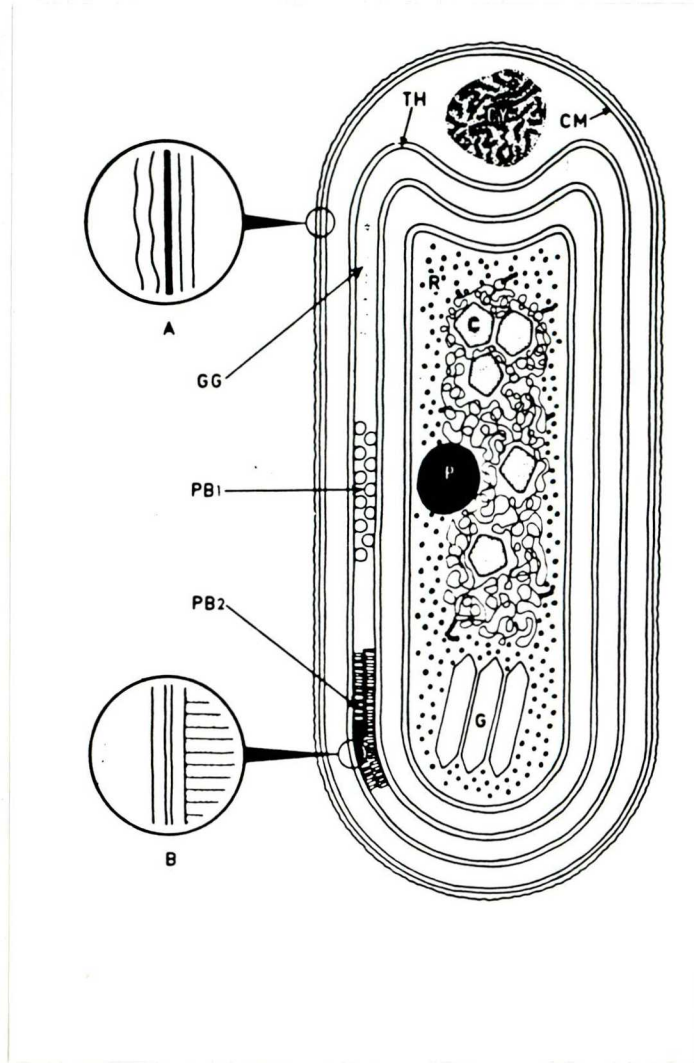
1. ábra. Modell a chaperonin-függő, aktív Rubisco dimer in vitro rekonstitúciójára, kitekeredett fehérjéből (Gatenby és mtsai, 1990). Az aktív Rubisco dimert (fent) 8 M ureával vagy 6 M guanidin hidrokloriddal (Gdn-HCl) denaturálni lehet, kitekeredett, másodlagos szerkezettel alig rendelkező fehérjét kapva (Rubisco-U). A dimert savval denaturálva a másodlagos struktúra még részben megmarad (Rubisco-A). Feltehetően ugyanaz a köztitermék képződik mindkét formából a denaturáló szer eltávolításának hatására (Rubisco-I). 25 °C-on, chaperoninok hiányában a denaturáló szer kihígítása a fehérje aggregálódásával jár. Ha a cpn60 a kihígításkor jelen van, közte és a Rubisco-I között stabil komplex képződik. Ehhez a komplexhez K^+ ion jelenlétében cpn10-t és MgATP-t adva, aktív Rubisco dimer keletkezik.

1990). Ezek szerint az oligomer állapotú cpn60 megköti a "felépítendő" fehérjét, ma még pontosan nem ismert módon katalizálja a felépülési folyamatot, majd amikor ez befejeződött, cpn10 és K^+ jelenlétében, MgATP hasítása közben elengedi a korrekt szerkezetű proteint (1. ábra). Ma még nem világos azonban, hogy az oligomer cpn60 a reakció végén szétesik-e kisebb egységekre (Roy, 1989, Goloubinoff, 1989), vagy végig oligomer állapotban marad (Georgopoulos és Ang, 1990).

3.5. Cianobaktériumok

Kitűzött célunk a tilakoid membrán szintjén történő magas hőmérsékleti adaptáció összefüggéseinek megismerése. Ezt azonban még egysejtű eukarióta alga rendszeren is igen nehéz vizsgálni, az ok-okozati összefüggéseket megtalálni, nem beszélve a korlátozott genetikai manipulációs lehetőségekről. Ezért esett választásunk a prokarióta, fotoszintetizáló tilakoid membránnal rendelkező cianobaktériumokra, amelyek az endoszimbióta elmélet értelmében ősei és ma élő rokonai a növényi kloroplasztisznak (Giovannoni és mtai, 1988).

A cianobakteriális sejt viszonylag egyszerű felépítésű, membránjainak körülbelül 90 %-át a tilakoid membrán teszi ki, amelyben a kloroplasztisz tilakoidjával megegyező elektrontranszport lánc funkcionál (2. ábra). Azonban két jelentős különbséget is megfigyelhetünk: egyrészt a tilakoid



2. ábra. Cianobakteriális sejt vázlatos rajza (Stanier, 1988 alapján). CM: sejt membrán; TH: tilakoid membrán; PB1 és PB2: fikobiliszóma szemből és oldalnézetben; GG: keményítő granulum; CY: cyanophycin granulum; P: polifoszfát granulum; C: a nukleoplazma által körülvevett karboxiszóma; R: riboszóma; G: gáz vezikulum. A: a sejt membrán kinagyított részlete, a külső membránnal, a peptidoglikán sejtfallal, és a belső vagy citoplazmás membránnal. B: a tilakoid membrán kinagyított részlete, a két tilakoid közti lumennel és a tilakoid felszínén elhelyezkedő fikobiliszómákkal.

membrán nem különül el gránum és sztróma tilakoidra (Stanier, 1988), másrészt a fény begyűjtése nem egy membránba integrálódott fehérje komplexum, hanem a membrán felszínén elhelyezkedő, fikobiliszómának nevezett, bonyolult fehérje struktúra funkciója (Glazer, 1988). További érdekes eltérés, hogy a szén-dioxid fixáció kulcsenzime, a Rubisco a kloroplasztisz sztrómájával ellentétben itt a karboxiszóma nevű testecskékben található (Shively, 1988, Price és Badger, 1988).

Endoszimbióta rokonságuknak, egyszerű genomjuknak és könnyű transzformálhatóságuknak köszönhetően a cianobaktériumok az utóbbi években a fotoszintézis kutatás kedvelt objektumaivá váltak (Porter, 1988). Az általunk választott Synechocystis PCC 6803 törzs az eddig felsorolt előnyökön kívül képes fotoheterotróf életmódra is, lehetőséget adva ezzel érdekes, egyébként nem életképes mutánsok előállítására (Pakrasi és mtsai, 1989, Yu és Vermaas, 1990).

A cianobaktériumok alacsony hőmérséklet adaptációjában szerepet játszó tényezők viszonylag jól ismertek (Vigh és mtsai, 1985, Murata, 1989, Wada és mtsai, 1990). Ezzel ellentétben a termotolerancia háttérében álló folyamatok közel sem tisztázottak. Bár a magas hőmérséklet hatására indukálódó hsp szintézist több tudományos publikációban is leírták (Borbély és mtsai, 1985, Mannan és mtsai, 1986, Bhagwat és Apte, 1989), ezekben nem is tettek kísérletet az egyes hsp-k sejten belüli funkciójának és lokalizációjának tisztázására. Csak a legutóbbi időben jelentek meg az első

ilyen adatok, részben csoportunk munkájának köszönhetően (Vigh és mtsai, 1990, Webb és mtsai, 1990, Jager és Bergman, 1990).

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Tenyésztési körülmények.

A Synechocystis PCC 6803 (Rippka és mtsai, 1979) sejteket BG-11 folyékony táptalajon (Allen, 1968), $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű fehér fény megvilágítás mellett neveltük. A tenyészeteket 1% CO_2 -t tartalmazó levegővel buborékoltattuk. A tenyésztés hőmérséklete az adaptációs kísérleteknél 22, illetve 36 °C volt (3-6. ábra). A chaperonin fehérje tisztításhoz 36 °C-on nőtt sejt kultúrát a tisztítás megkezdése előtt egy éjszakán át 42 °C-on kezeltünk (13-14. ábra). A többi kísérlethez 30 °C-on nőtt tenyészeteket használtunk.

A sejtek növekedését a 800 nm-en mért abszorpció változásával követtük, Shimadzu spektrofotométerrel. Exponenciális növekedési szakaszukban ($\text{OD}_{800}=0,5-1,0$) használtuk fel őket az adott kísérlet céljaira.

4.2. Adaptációs kísérletek.

Az adaptációs kísérletekhez alacsony (22 °C) és magas (36 °C) hőmérsékleten nevelt sejteket használtunk.

4.2.1. Túlélési kísérlet.

A kétféle sejtuszuspenzióból 1-1 ml térfogatú mintákat



szétosztottunk steril Eppendorf csövekbe, és 1 órán keresztül inkubáltuk őket $37-47^{\circ}\text{C}$ között. Ezután a tenyészetekből BG-11 táptalajjal hígítási sorozatot készítettünk, és hígításonként $100-100\text{ }\mu\text{l}$ -t szélesztettünk 1% agarral kiegészített, szilárd BG-11 tartalmú Petri csészéken. A Petri csészéket fényen, 30°C -on addig inkubáltuk, amíg a látható kolóniák megjelentek (körülbelül 10 nap). Ekkor megszámoltuk őket, majd a kapott túlélési adatokat a hőmérséklet függvényében ábrázoltuk.

4.2.2. Fotoszintetikus aktivitás mérés.

A kétféle tenyészetből származó, 1-1 ml térfogatú sejtszuspenziókat a jelzett hőmérsékleteken 1 óráig hősokk kezelésnek tettük ki, majd a mérést megelőzően 1 órán keresztül, 25°C -on inkubáltuk őket. Oxigén termelő képességüket ezen a hőmérsékleten, Clark típusú O_2 elektróddal, adalékok (elektron donor vagy akceptor) hozzáadása nélkül határoztuk meg. Ilyen körülmények között az oxigén termelés sebessége a teljes fotoszintetikus elektron transzport sebességével arányos. A kapott adatokat a kezelési hőmérséklet függvényében ábrázoltuk, 100 %-nak tekintve a nem hősokk körülmények között (36°C) mért értéket.

4.2.3. Totál fehérje szintézis mérés.

A 22°C -on és 36°C -on adaptált sejtszuspenzióból is

1-1 ml-es alikvotokat Eppendorf csövekbe osztottunk szét, és 1 órán keresztül inkubáltuk őket $2 \mu\text{Ci}$ [$\text{U-}^{14}\text{C}$] protein hidrolizátum (Chemapol, Prága, Csehszlovákia) jelenlétében $35-47^\circ\text{C}$ között. A sejteket 3 perc, 15 ezer g centrifugálással kiülepítettük, az üledéket felszuszpendáltuk $50 \mu\text{l}$ SDS tartalmú gél elektroforézis mintapufferben (Laemmli, 1970), és 5 percig forraltuk. A forralt mintából 2 párhuzamosban $5-5 \mu\text{l}$ -t Whatman 31 ET Chroma szűrőpapír korongokra csepegtettünk, majd 10% TCA-ban 5 percig forraltuk őket, ezzel kicsapva a fehérjéket. A TCA eltávolítása után a korongokat 5 percig etanolban mostuk, aztán megszáritottuk. Ezután 5 ml toluol szcintillációs koktélt (5 g PPO és 0,3 g POPOP 1 liter toluolhoz) tartalmazó fiolába tettük őket, és radioaktivitásukat Beckman LS 5000 TD folyadék szcintillációs számológéppel határoztuk meg.

4.3. Hsp szintézis vizsgálata teljes sejt szinten.

30°C -on nevelt tenyészetből 1-1 ml-nyi adagokat Eppendorf csövekbe osztottunk szét, és $2 \mu\text{Ci}$ [$\text{U-}^{14}\text{C}$] protein hidrolizátum jelenlétében inkubáltuk őket a következő módokon:

a/ Hőmérséklet függés vizsgálatakor $30-47,5^\circ\text{C}$ között 1 óráig.

b/ A hsp szintézis kinetikájának vizsgálatakor a sejteket $42,5^\circ\text{C}$ -on 3 óráig inkubáltuk, az izotópot fél-fél órára, a hősokk kezelés különböző szakaszaiban adva a tenyészethez, majd a jelölést követően a sejteket azonnal

ülepítettük, és SDS-PAGE mintapufferben viasszaszuspendáltuk.

c/ Más stresszfaktorok hsp szintézist indukáló hatását vizsgálva általában 3 óráig, 30 °C-on inkubálva, az adott kezeléssel egy időben adtuk a jelzett szénforrást a sejt-szuspenzióhoz (további részletek a 10. ábramagyarázatban).

A kezelést követően a sejteket 3 perc, 15 ezer g centrifugálással ülepítettük, majd felszuspendáltuk azokat SDS-PAGE mintapufferben, és a 4.6. pontban leírtak szerint, a kezelés időtartama alatt szintetizálódott fehérjéket SDS-PAGE-t követően, fluorográfiás módszerrel detektáltuk. A hsp szintézis kinetikáját ábrázoló fluorogramokat (8. ábra) denzitometriás módszerrel értékeltük (lásd a 4.6.3. pontot).

4.4. Hő sokk fehérjék intracelluláris lokalizációjának vizsgálata.

4.4.1. Sejtfrakcionálási kísérletek.

30 °C-on nevelt sejteket 30, illetve 42 °C-on inkubáltunk 3 óráig, 2 μ Ci/ml [U-¹⁴C] protein hidrolizátum jelenlétében, majd 5 perc, 1 ezer g centrifugálással kiülepítettük őket. Minimális térfogatú feltáró pufferben (10 mM Tris-MES pH:7,0 1-1 mM PMSF, benzamidin és ϵ -amino kapronsav) viasszaszuspendáltuk őket, ezután 1/3 térfogatban 0,1 mm átmérőjű üveggyöngyöt adtunk hozzájuk (Braun AG, Melsungen, Németor-

szág), majd 3x3 perces vortexeléssel (két vortexelés között 3 percig jégen hűtve) elvégeztük a sejtek feltárását (Pakra-si és mtsai, 1989). Az üveggyöngyök eltávolítása után a sejttörmelékét és a feltáratlan sejteket 1 ezer g 5 perc centrifugálással üleptítettük.

A felülúszót óvatosan leszívtuk, majd 27 ezer g 15 perc centrifugálással tilakoid membrán gazdag üledékre, valamint citoszol és citoplazmás membrán gazdag felülúszóra választottuk szét. Egyes esetekben a 27 ezer g-s felülúszót 150 ezer g, 1 órás centrifugálással tovább frakcionáltuk citoplazmás membrán gazdag üledékre és nagy tisztaságú citoszol-ra. Az üledékeket kis térfogatú feltáró pufferben visszaszuszpendáltuk, majd minden kapott frakciót SDS-PAGE-t követő fluorográfiával analizáltunk.

4.4.2. A 64 kD hsp tilakoid kötődésének vizsgálata.

A 4.4.1. pont szerint előállított tilakoid membrán gazdag frakciót (27 ezer g üledék) további kezeléseknak vetettük alá a 64 kD hsp kötődési sajátságainak megállapítására. Háromféle kezelést alkalmaztunk: 1. 2 M NaCl mosást, 2. 0,1 M NaOH mosást, 3. Triton X-114 fázis szeparálást. A kezelésesek eredményeként kapott minden frakciót SDS-PAGE-t követő fluorográfia módszerével tovább vizsgáltunk.

1. 2 M NaCl mosás: A feltáró pufferben levő mintához NaCl-t adtunk 2 M végkoncentrációig, majd enyhe ultrahang kezelést követően 30 percig jégen inkubáltuk. 15 ezer g 10

perc centrifugálással a membránt ülepitettük, majd kis térfogatú feltáró pufferben újra viaszszuszpendáltuk. A felülúszóból a fehérjéket 10% TCA-val, jégen kicsaptuk, majd SDS-PAGE pufferben visszaoldottuk őket.

2. 0,1 M NaOH mosás: A membrán szuszpenzióhoz NaOH-t adtunk 0,1 M végkoncentrációban, majd jégen 30 percig inkubáltuk. A membrán kiülepitése után (15 ezer g 15 perc) a felülúszóhoz a NaOH-dal egyenlő koncentrációban HCl-t adtunk, és a fehérjéket 10 % TCA-ban, jégen kicsaptuk.

3. Triton X-114 fázis szeparálás (Bricker és Sherman, 1984 alapján): A membránt 1 % Triton X-114, 150 mM NaCl, 10 mM Tricine-NaOH pH: 7,5 oldatban 4 °C-on 30 percig szolubilizáltuk, majd a nem szolubilizálódott üledéket 4 °C, 15 ezer g, 5 perc centrifugálással eltávolítottuk. A felülúszót 37 °C-on 5 percig inkubáltuk, ezután a zavarossá vált oldatot szobahőn, 5 perc, 15 ezer g-vel centrifugáltuk. A két fázist (alsó detergens és felső vizes) szétválasztottuk, majd az alsó fázishoz a fenti puffert (Triton X-114 kivételével), a felső fázishoz pedig 1 % végkoncentrációig Triton X-114-et adva a hőmérséklet-függő fázis szeparálást mindkét fázissal megismételtük. Mivel a Triton X-114 a TCA-val csapadékot ad, ezért a másodszori elválasztás után kaptunk tisztított fázisokból a fehérjét acetonnal csaptuk ki (80 % végkoncentráció, -20 °C, 1 óra, a detergens fázist előzőleg kihígítva), majd SDS-PAGE pufferben visszaoldottuk.

4.5. Chaperonin fehérje tisztítás.

4.5.1. Tisztítás cukor grádiens centrifugálással.

5 l 36 °C-on nőtt sejt szuszpenzióját a tisztítás megkezdése előtt egy éjszakán keresztül 42 °C-on inkubáltunk a chaperonin mennyiségének további növelése céljából. Minden ezt követő lépést 4 °C-on végeztünk. A sejteket 1 ezer g 5 perces centrifugálással összegyűjtöttük, felszuszpendáltuk kis térfogatú "A" pufferben (750 mM K-foszfát, pH=7,0, és 1-1 mM PMSF, benzamidin és $\mathcal{E}$ -amino kapronsav), majd a 4.4. pontban leírt módszerrel, üveggyönggyel feltártuk őket. Az üveggyöngyök eltávolítása után 15 ezer g, 15 perces centrifugálással kiülepítettük a sejttörmeléket és a membránok nagy többségét. A felülúszót óvatosan leszívtuk, és "A" puffer tartalmú, 10-30 %-os szaharóz grádiens tetejére rétegeztük. A grádiens egy éjszakán keresztül, 100 000 g-vel centrifugáltuk. Másnap 2 ml térfogatú frakciókat szedtünk belőle, és azok kis részletét TCA kicsapást követően SDS-PAGE-val analizáltuk. A frakciók szaharóz koncentrációját refraktométerrel határoztuk meg.

4.5.2. Chaperonin fehérje további tisztítása Sephacryl S-200 oszlopon.

A chaperonint tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük, és "B" pufferrel (100 mM K-foszfát, pH=7,0, és 1-1 mM PMSF,

benzamidin, és ϵ -amino kapronsav) ekvibrált Sephadex G-25 oszlopon átfolyatva az "A" puffert "B" pufferre cseréltük. A fehérjéket szilárd $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hozzáadásával (60% telítettségig) kicsaptuk, és 15 ezer g, 10 perces centrifugálással kiülepítettük. A pelletet 2 ml "B" pufferben viaszszuszpendáltuk, és óvatosan ugyanebben a pufferben ekvibrált Sephacryl S-200 oszlop (1 cmx 90 cm) tetejére rétegeztük. 0,2 ml/perc átfolyási sebesség mellett 4,5 ml térfogatú frakciókat gyűjtöttünk, ezeket SDS-PAGE-val analizáltuk. A Sephacryl S-200 oszlopon a molekulatömegeket Pharmacia gyártmányú marker fehérjékkel végzett kalibrációval határoztuk meg, a gyártó által leírtak szerint.

A tisztított fehérjét YM-10 membránt tartalmazó Amicon koncentráló cellával tízszeresére töményítettük, majd egyenlő térfogatú glicerinn hozzáadása után -20°C -on tároltuk.

4.6. Fehérje elektroforézis és ehhez kapcsolódó módszerek.

4.6.1. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A gélre a mintákat vagy azonos fehérje koncentrációban, vagy radioaktív minták esetén azonos aktivitásban vittük fel. A fehérje koncentrációt Bradford (1976) módszerével mértük, BSA-t használva standardként. A radioaktivitás meghatározására a 4.2.3. pontban leírt módszert használtuk.

A mintákat SDS mintapufferrel kevertük össze, majd 3 percig forraltuk. Ezután Laemmli (1970) módszerrel készült

8-15%-os gradiens gélekre vittük fel őket. Az elektroforézis után Coomassie Brilliant Blue festést alkalmaztunk a fehérjék megjelenítésére. Molekulatömeg markerként Pharmacia standardot használtunk.

4.6.2. Fluorográfia.

Radioaktív minták esetén a Coomassie festés után a gél tőmény ecetsavban oldott PPO-val impregnáltuk Skinner és Griswold (1983) módszere alapján, majd Pharmacia KA 15-ös gélszárítóval Whatman MM3 szűrőpapírra rászárítottuk. A géltre sötétszobában röntgenfilmet helyeztünk (Medifort RP Medical X-ray film, Forte, Hungary). A filmet pár napig sötétben, -70°C -on exponáltuk, majd előhívtuk.

4.6.3. Denzitometria.

A fluorogramok, illetve a Coomassie festett gélek kvantitatív analízisére a Bio-Rad Model 1650 Scanning Densitometert használtuk, amelyet HP 3394 A típusú integrátorral kötöttünk össze.

4.6.4. Immunoblotting.

Az elektroforézis után a festetlen gélről a fehérjéket BioRad Transblot készülék segítségével, újabb elektroforézissel (15 mV, 3 óra, Towbin és mtsai, 1979) nitrocellulóz

membránra (Schleicher and Schuell) blottoltuk át. A további lépésekben a Harlow és Lane (1988) által leírt módszert követtük. A membrán szabad fehérjekötő kapacitását 1% BSA-val telítettük. Első ellenanyagként a) *E. coli* groEL fehérje ellen készült antiszérumot (Dr. A. A. Gatenby ajándéka), b) *E. coli* dnaK protein ellen készült antiszérumot (Dr. H. Weissbach ajándéka), c) borsó kloroplasztisz lmw hsp C-terminálisa ellen készült ellenanyagot (Dr. E. Vierling ajándéka) használtunk. A második ellenanyag alkalikus foszfatázal jelölt kecske anti-nyúl IgG volt (Promega).

4.6.5. Fehérje szekvenálás.

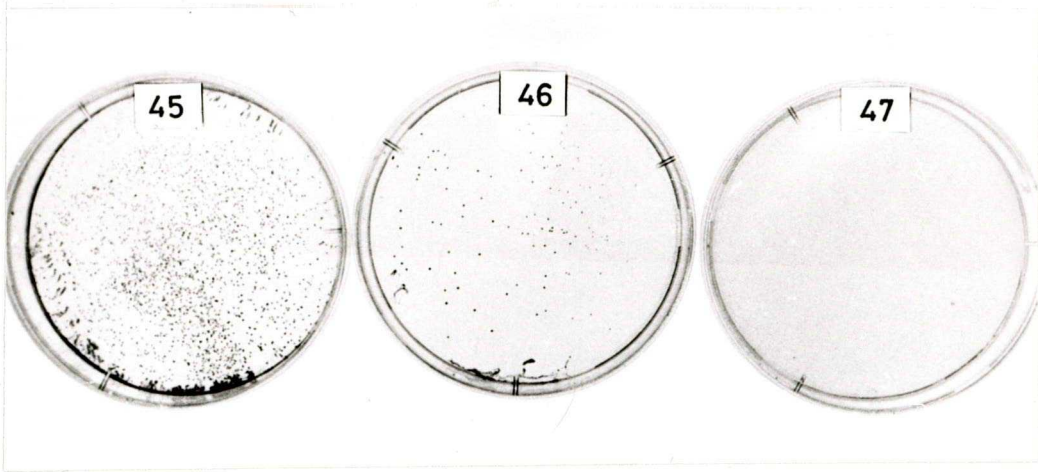
A fehérje szekvenálásban Moos és mtsai (1988) módszerét követtük. A 4.5.2. pont szerint tisztított chaperonin fehérjét 8-15% SDS-PAGE-val tovább tisztítottuk, majd a gélről a fehérjét elektroforetikus úton Immobilon P membránra (Millipore) blottoltuk át. A membránt Coomassie Brilliant Blue-val megfestettük, majd levegőn megszárítottuk. A chaperonin fehérjének megfelelő, szennyező fehérjéket nem tartalmazó csíkot kivágtuk és Applied Biosystems 470A típusú, gáz fázisú szekvenátoron szekvenáltattuk.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.

5.1. Magas hőmérséklet adaptációs kísérletek.

Céljainkkal összhangban, első feladatunk annak tisztázása volt, hogy a Synechocystis PCC 6803 cianobaktériumban vajon lezajlanak-e azok a magas hőmérséklet adaptációs folyamatok, amivel rendszerválasztásunk helyességét igazolhatjuk. Ebből a célból alacsony (22°C) és magas hőmérsékleten (36°C) neveltünk sejteket, és e sejtek tulajdonságait vizsgáltuk abban a legalacsonyabb hőmérséklet tartományban, ahol pusztulásuk már lezajlik. Előkísérleteink szerint ez egy órás kezelés során $40\text{--}47^{\circ}\text{C}$ között történik meg, ezért a későbbiekben erre a régióra koncentráltunk. Megfelelő kontrollnak pedig a sejtek $35\text{--}40^{\circ}\text{C}$ között mutatott túlélési viselkedését tekintettük, ahol az előkísérletek tanúsága szerint irreverzibilis károsodás még nem történik.

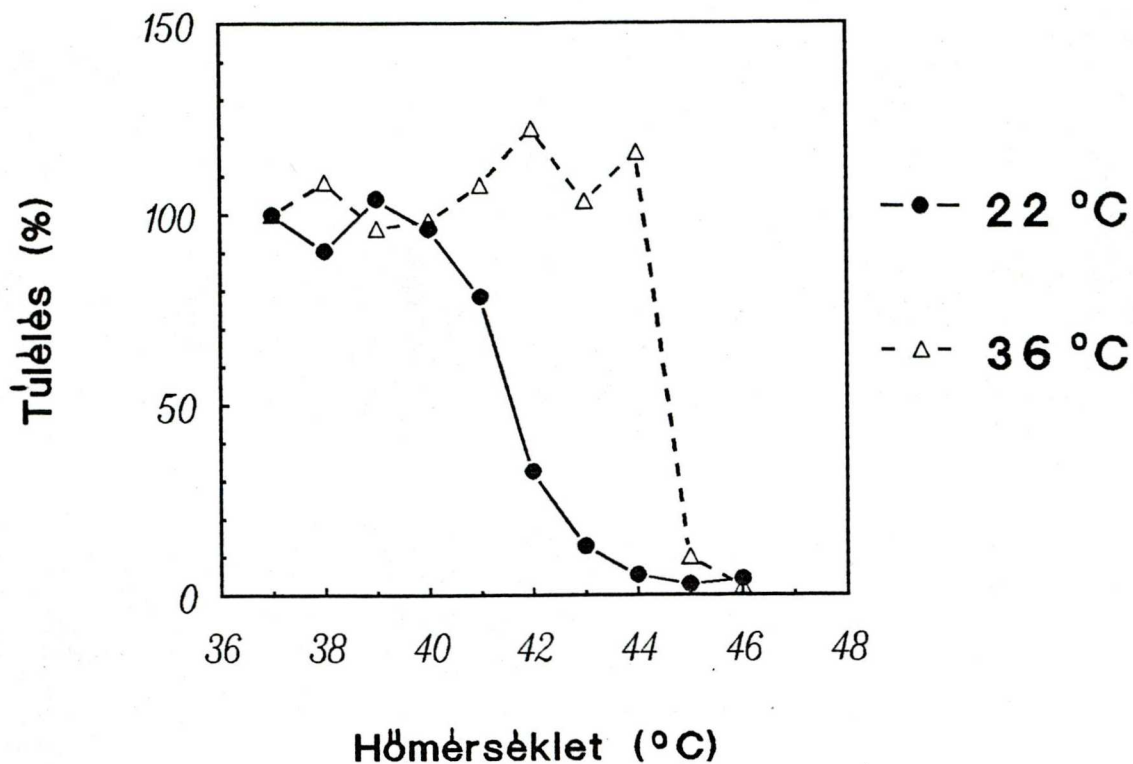
A sejtek túlélését a kolónia képző képességükkel követtük. Ebből a célból a sejteket a hőkezelést követően hígítottuk, majd Petri csészén, szilárd táptalajon szélesztettük (3. ábra), és általában két hét elteltével a keletkezett kolóniákat megszámoltuk. A 4. ábra három, egymástól független kísérlet adatainak átlagát mutatja be, 100 %-nak véve a 37°C -on kapott értékeket. Jól látható, hogy a sejtek előélete nagymértékben befolyásolta hőtűrő képességüket. A 22°C -on nevelt sejtek túlélő képessége a hőmérséklet emelésével folyamatosan csökkent és 44°C -on már csak a



3. ábra. *Synechocystis* PCC 6803 sejtek túlélő képességének vizsgálata. 36 °C-on nevelt sejteket 1-1 óráig a jelzett hőmérsékleten inkubáltunk, majd különböző hígításokban (az ábra 10^{-6} hígítást mutat be) 1 % agarral kiegészített BG-11 táptalajon, Petri csészén szélesztettük őket. A fényen, 30 °C-on két hét alatt kinőtt kolóniákat megszámloltuk.

kiindulási érték 10 %-a körül volt. Ezzel szemben a magas hőmérsékleten nőtt sejtek esetében 45 °C-ig jelentős változást nem tapasztaltunk, ezt viszont hirtelen, éles csökkenés követte. Összességében megállapíthatjuk, hogy a magas hőmérsékleten nőtt sejtek hőtűrő képessége 3-4 °C-kal magasabb volt, mint alacsony hőmérsékleten nőtt társaiké.

A sejtek túlélésével párhuzamosan vizsgáltuk fotoszintetizáló képességüket. Ebből a célból a kétféle sejtpopulációt 1 órás hőkezelésnek vetettük alá, majd ezt követően 1 óra múlva, 25 °C-on Clark típusú oxigén elektróddal megmértük az oxigén termelésüket. Fork és mtsai (1987) munkássága alapján ismert, hogy a tilakoid membrán károsodását két

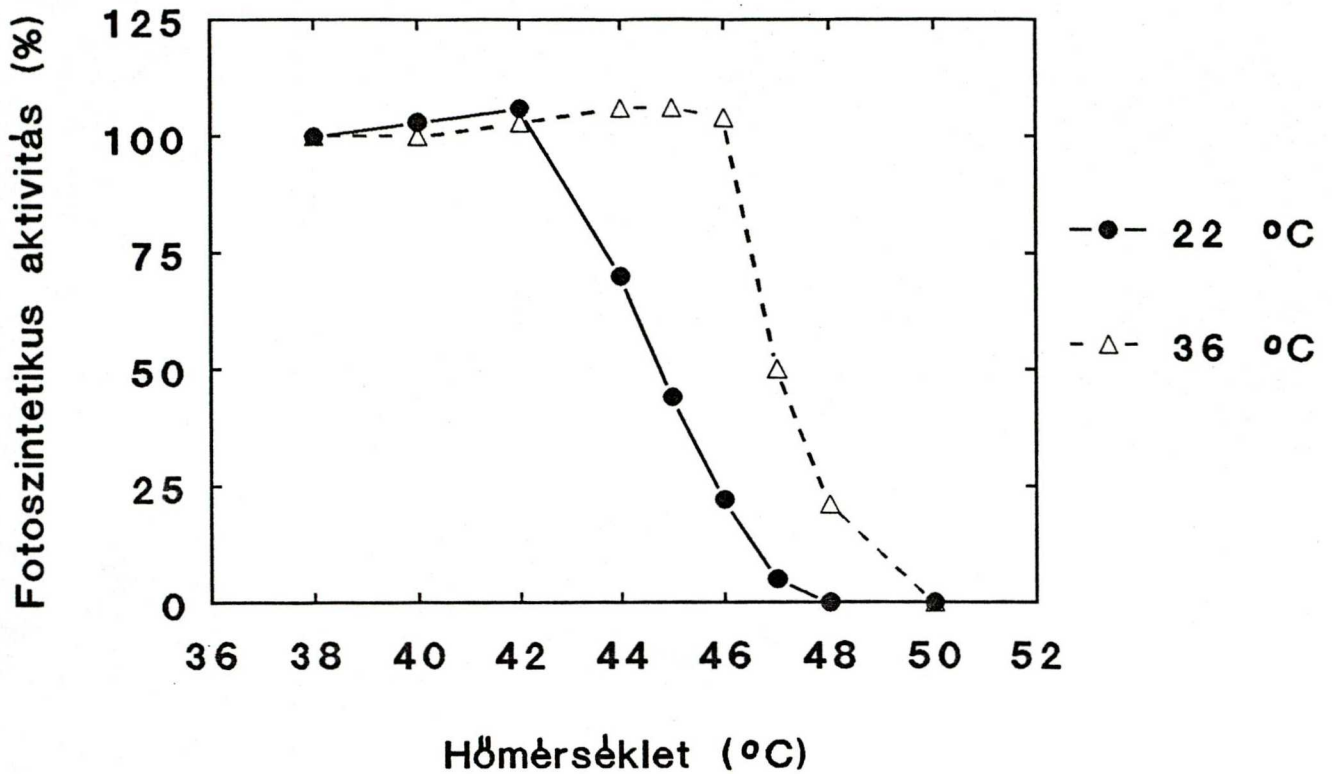


4. ábra. *Synechocystis* PCC 6803 sejtek hőkezelést követő túlélő képességének vizsgálata. 22, illetve 36 °C-on nevelt sejtek szuszpenziójának 1-1 ml-ét 37-47 °C között fokozatosan, 1 óráig inkubáltunk, majd relatív túlélő képességüket a 4.2.1. pont szerint, Petri csészén szélesztve határoztuk meg, 100 %-nak tekintve a 37 °C-on kapott értékeket. A bemutatott adatok három, egymástól független kísérlet eredményeinek átlagát jelentik.

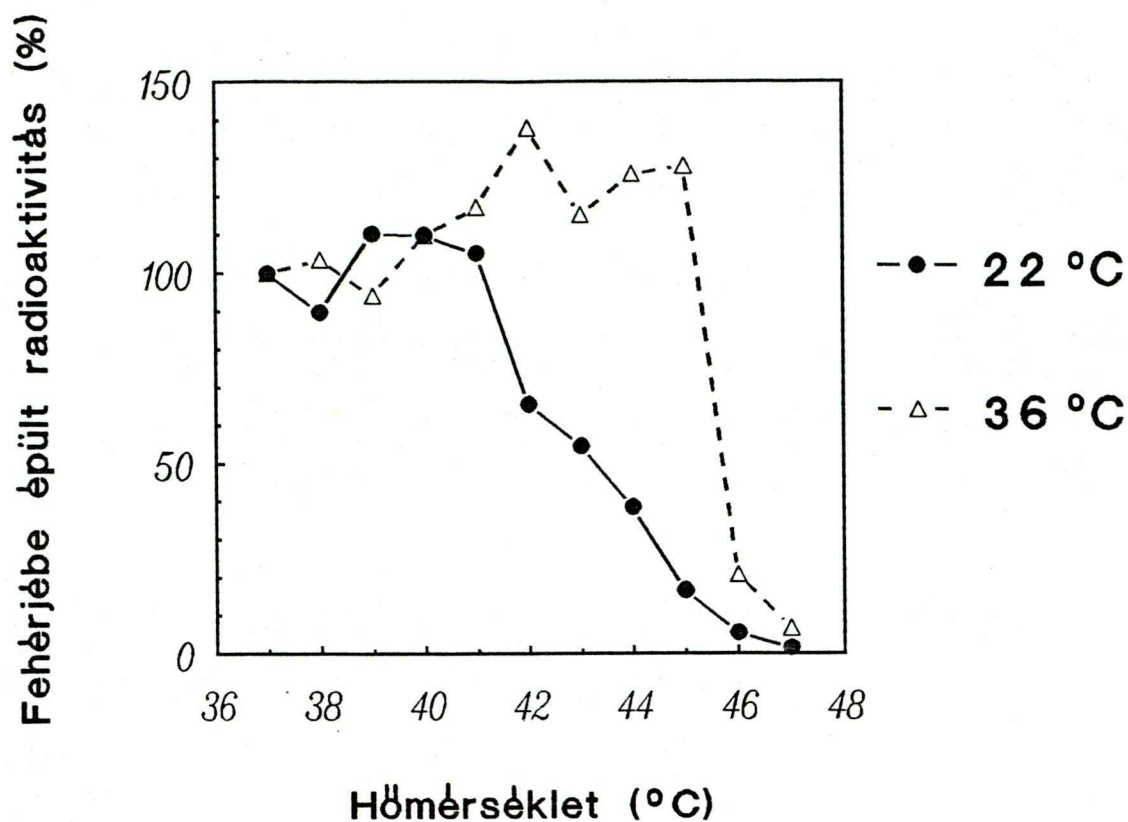
értékkel jellemezhetjük: a T_1 és a T_2 hőmérséklettel. Az oxigénfejlődést mérve, a hőmérséklet emelésével T_1 -nél figyelhetjük meg az addig sértetlen fotoszintetikus elektrontranszport lánc működésében az első zavarokat, ami a T_2 értéken a funkció teljes megszűnéséhez vezet. Gombos és mtsai (1991) az általunk is vizsgált Synechocystis PCC 6803 cianobaktériumon kimutatták, hogy a T_1 érték a hőkezelés időtartamától függetlenül állandó, a hőkezelés időtartama csak a T_1 és T_2 közti görbe meredekségét, és magának a T_2 -nek az értékét befolyásolja, tehát tényleges, a tilakoid adaptáltságával összefüggő információt a T_1 hordoz. A mi esetünkben a 22, illetve a 36 °C-on nevelt sejtek 42, illetve 46 °C-os T_1 értéke a túlélő képességgel jól korrelál (5. ábra).

Ügyszintén vizsgáltuk a sejtek fehérje szintetizáló képességét a 37-47 °C közötti hőmérséklet tartományban. 1-1 ml térfogatú sejtszuszpenziókhoz [$U-^{14}C$] protein hidrolizátumot adtunk, majd az 1 órás kezelés alatt a frissen szintetizálódott fehérjékbe beépült radioaktivitást mértük (a módszer leírása részletesen: 4.2.3. pont). A 6. ábrán bemutatott adatok három, egymástól független kísérlet eredményeit ábrázolják, 100 %-nak tekintve a 37 °C-on mért értékeket.

Mint látható, a sejtek túlélése, fotoszintetizáló és protein szintetizáló képessége nagyon hasonló módon változott, mindhárom esetben kimutatható volt egy adaptív változás. A három vizsgált paraméter mind az alacsony, mind a magas hőmérsékleten nevelt sejtek esetében nagyon hasonló hőmérsék-



5. ábra. Hőkezelt *Synechocystis* PCC 6803 sejtek fotoszintetizáló képességének vizsgálata. A 22, illetve 36 °C-on nevelt sejtek szuszpenziójából 5-5 ml-t az ábrán jelölt hőmérsékleteken, 1 óráig inkubáltunk, majd 25 °C-on, Clark típusú oxigén elektróddal megmértük oxigén fejlesztő képességüket. Az ábra három, egymástól független kísérlet adatainak átlagát mutatja be, 100 %-nak tekintve a 38 °C-on mért értékeket.

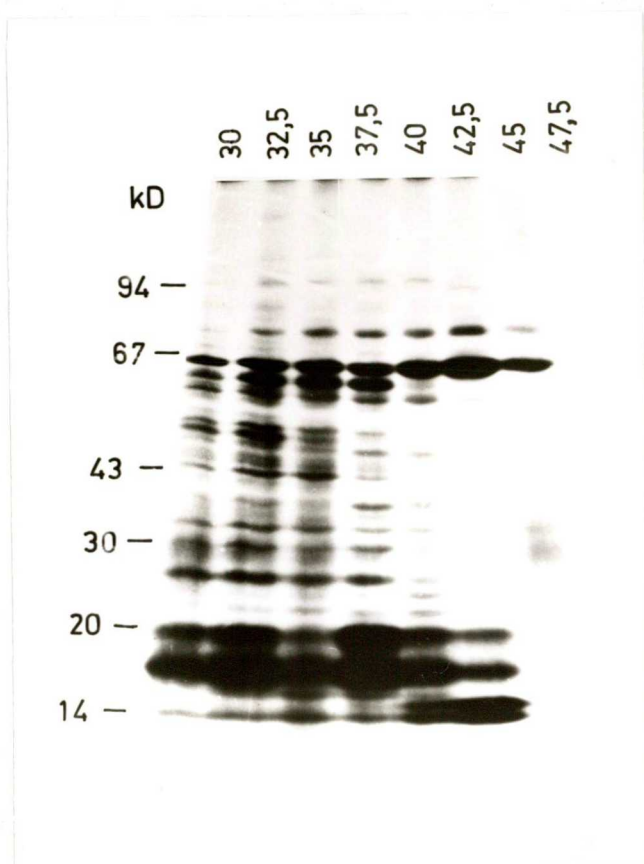


6. ábra. Hőkezelt *Synechocystis* PCC 6803 sejtek fehérje szintetizáló képességének vizsgálata. A 22, illetve 36 °C-on tenyésztett sejtek 1-1 ml térfogatú alikvotját 1 óráig, az ábrán jelzett hőmérsékleteken inkubáltuk, 1 $\mu\text{Ci/ml}$ $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ protein hidrolizátum jelenlétében. A frissen szintetizálódott fehérjékbe beépült radioaktivitás mértékét a 4.2.3. pont alapján határoztuk meg. Az ábra három, egymástól független kísérlet eredményeinek átlagát mutatja be, 100 %-nak véve a 37 °C-on mért radioaktivitást.

let függést mutatott. A kapott adatok alapján tehát elmondhatjuk, hogy a sejtek fotoszintetizáló és fehérje termelő képessége is jó korrelációt mutatott a sejtek hősokkot követő túlélésével. A túlélő képességet egyértelműen meghatározó ok-okozati összefüggések felderítéséhez azonban a fent bemutatott eredmények önmagukban nem elégségesek.

5.2. Hősokk fehérje szintézis vizsgálata teljes sejt szinten.

Előző vizsgálatainkban sikerült kimutatnunk a sejtek életétől függő különbséget a fehérje szintetizáló képességben. A tudományos irodalomból jól ismert, hogy az optimális érték feletti hőmérsékleten a sejtek elsősorban hősokk fehérjéket szintetizálnak (Lindquist, 1986). Ezért következő lépésként mi is megvizsgáltuk, hogy a hőmérséklet emelése -és egyéb stresszfaktorok- milyen fehérjék szintézisét indukálják. Ebből a célból a 30 °C-on (ez tekinthető a sejtek optimális növekedési hőmérsékletének) nevelt sejteket [$U-^{14}C$] protein hidrolizátum jelenlétében, különböző hőmérsékleteken inkubáltuk, majd a kezelés közben szintetizálódott fehérjéket SDS-PAGE-t követő fluorográfiával analizáltuk (7. ábra). Mint látható, a hőmérséklet emelése a képződött fehérjék mintázatának jelentős változását idézte elő. Míg az optimális növekedési hőmérsékleten szintetizálódó fehérjék többségének szintje a hőmérséklet emelésével visszaesett, néhány fehérje esetében nagyfokú növekedést

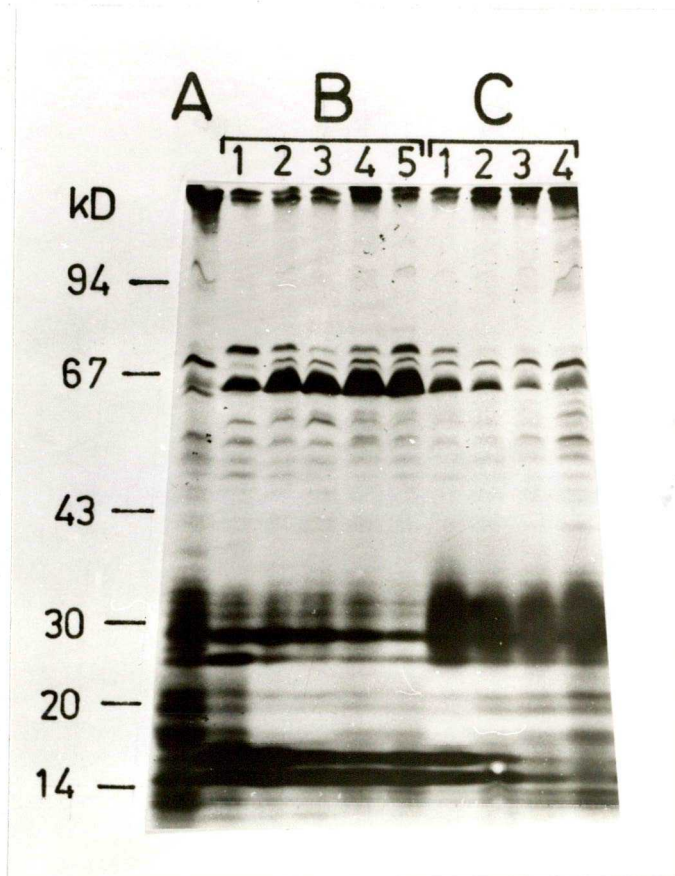


7. ábra. A fehérjeszintézis hőmérséklet függésének vizsgálata. A 30 °C-on tenyésztett sejtszuszpenzió 1-1 ml térfogatú alikvotját 30-47,5 °C között, az ábrán jelzett hőmérsékleteken 1 óráig inkubáltuk 1 $\mu\text{Ci/ml}$ [U- ^{14}C] protein hidrolizátum jelenlétében. Az egyes mintákat azonos fehérje koncentrációban vittük fel a gélre, majd a 8-15 % SDS-PAGE-t követően a frissen szintetizálódott proteineket fluorográfiával detektáltuk. Bal oldalt a molekulatömeg standard látható.

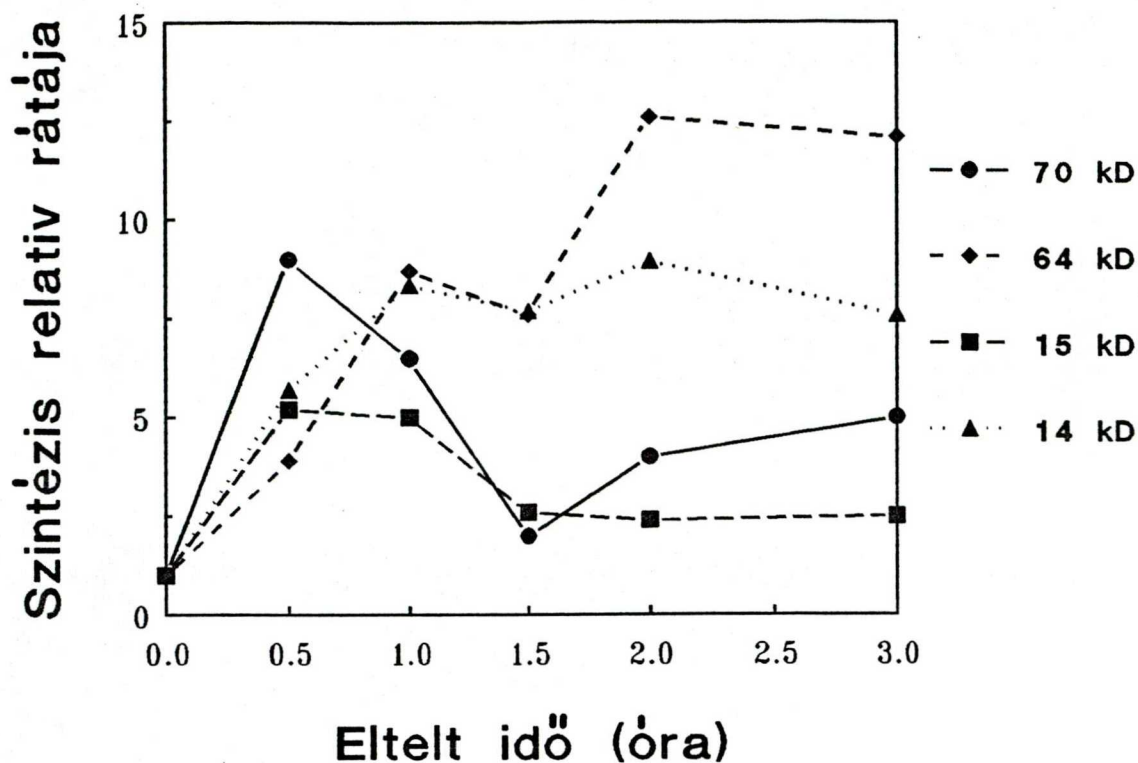
detektálhattunk. Ez utóbbiakat tekintettük a későbbiekben hősokk fehérjéknek (hsp-k). A sejtek túlélése szempontjából döntő 40-45 °C közötti tartományban már elsősorban e proteinek termelődtek, míg a letálisnak talált, 47 °C feletti hőmérsékleten már ezek szintézisét sem figyelhettük meg. Ezért feltételezhetjük, hogy a sejtek hőtűrő képessége szempontjából ezek a fehérjék döntő szerepet játszanak. Közülük a legabundánsabbak molekula tömege 70, 64, 15 és 14 kD-nak adódott. A továbbiakban figyelmünket elsősorban ezekre a fehérjékre irányítottuk.

Következő lépésként a hsp-k szintézisének kinetikáját vizsgáltuk (8-9. ábra). Mivel előző eredményeink alapján (7. ábra) a legnagyobb méretű hsp szintézis 42,5°C-on figyelhető meg, ezért a 30 °C-on nevelt sejteket ezen a hőmérsékleten inkubáltuk 3 óráig. A kezelés különböző szakaszaiban 30-30 percre [U-¹⁴C] protein hidrolizátumot adtunk a sejtszuszpenzióhoz, majd az ez idő alatt szintetizálódott fehérjéket detektáltuk (8/B ábra). Mint látható, az összes hsp szintézise jelentősen megugrott a kezelés első 30 percében, azonban a hősokk későbbi szakaszában már nagy különbségek voltak kimutathatók az egyes proteinek között.

Hogy ezeket a különbségeket kvantitálni lehessen, a 8/B ábrán bemutatott fluorogramot denzitometráltuk, majd a kapott csúcs alatti területeket integráltuk. Az így kapott adatok közül a 4 legabundánsabb hsp-re vonatkozó értékeket ábrázoltuk a 9. ábrán, egy egységnek véve az egyes hsp-k normál hőmérsékleten (30 °C-on) mért képződésének szintjét.



8. ábra. A hősokk fehérje szintézis kinetikájának vizsgálata. 30 °C-on nevelt sejtek szuszpenziójából 1-1 ml-t inkubáltunk 1 $\mu\text{Ci/ml}$ [$\text{U-}^{14}\text{C}$] protein hidrolizátum jelenlétében, a következő módokon: A: 30 percig, 30 °C-on (kontroll); B: 42,5 °C-on, a hőkezelés 1./ első 30 percében, 2./ 30.-60. perce között, 3./ 60.-90. perce között, 4./ 90.-120. perce között, 5./ 150.-180. perce között; C: 30 perces, 42,5 °C-os előkezelést követő 30 °C-os inkubáció 1./ első 30 percében, 2./ 30.-60. perce között, 3./ 60.-90. perce között, 4./ 120.-150. perce között. Baloldalt a molekulatömeg standard látható.



9. ábra. A 4 legabundánsabb hősokk fehérje szintézisének időfüggése. A hsp szintézis kinetikáját ábrázoló, 8/B ábrán bemutatott fluorogramot integrátorral összekötött denzitométerrel kiértékeltek, majd a 4 legnagyobb mennyiségben termelő hsp adatait a hőkezelés közben eltelt idő függvényében ábrázoltuk. Egységnyiinek vettük e fehérjék kontroll sejtekben detektált képződésének szintjét (8/A ábra).

Jól megfigyelhetően kétféle kinetikát különböztethetünk meg: a 70 és 15 kD hsp-k termelődésében hirtelen, nagyfokú felfutás után már az első órában csökkenés lépett fel, ami azonban még mindig a kontrollnál magasabb szintet jelentett. Több minor, itt nem ábrázolt hsp esetén hasonló kinetikát figyelhattunk meg. Ezzel szemben a 64 és 14 kD hsp-k képződése hosszabb időn át növekvő tendenciát mutatott, és szintézisük a kontrollhoz képest jóval magasabb szinten stabilizálódott.

Cianobaktériumok esetében Borbély és mtsai (1985) már vizsgálták a hsp-k szintézisének kinetikáját Synechococcus-ban, és kimutatták az általunk is demonstrált kétféle típust. Szembeötlő a hasonlóság az ő általuk talált 65, 64 és 14 kD, valamint az általunk itt bemutatott 64 és 14 kD hsp-k szintézisének időfüggésében. Valószínűleg e fehérjéknek megfelelő, konstitutívan is szintetizálódó hősokk proteinek párt mutattak ki Anacystis nidulans-ban is, 59 és 16 kD molekula tömeggel (Mannan és mtsai, 1986). Escherichia coli-ban már régóta ismert két, közös operon által kódolt hsp, a groE fehérjék, amelyek molekula tömegükben (groEL: 65 kD, groES: 15 kD), abundanciájukban és kinetikájukban is a mi 64 és 14 kD hsp-nkre emlékeztetnek (Neidhardt és mtsai, 1984). Ezért megalapozottnak tűnt az a feltevésünk, hogy az általunk vizsgált proteinek e hősokk fehérjékkel rokonok, és a chaperoninok közé tartoznak (Lehel és mtsai, 1991a). Későbbi munkánk során, két másik csoporttal gyakorlatilag egy időben, sikerült is bizonyítanunk a chaperoninok jelen-

létét cianobaktériumokban (lásd az 5.4. pontot).

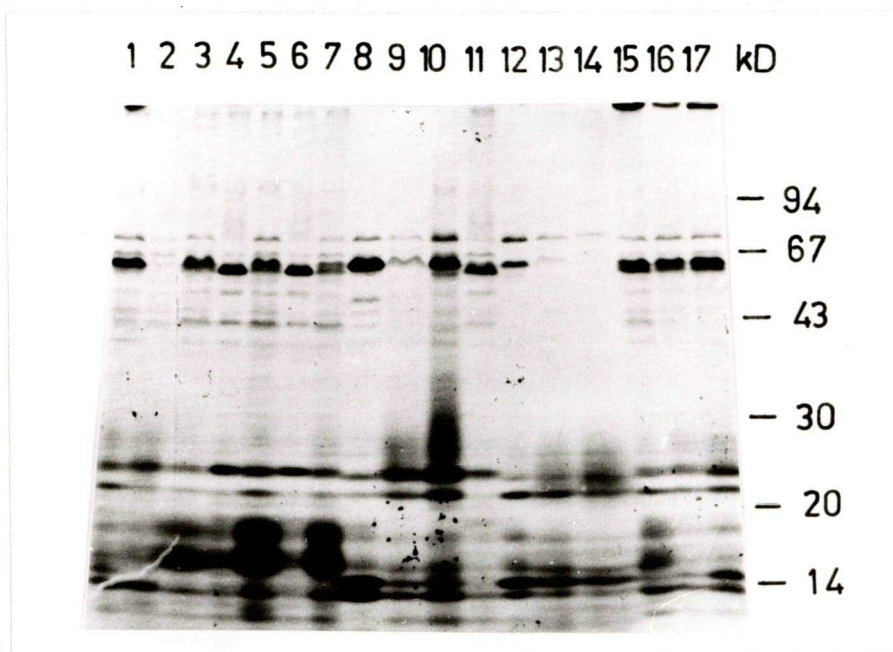
Kíváncsiak voltunk arra, hogy a hőkezelés elmúltával hogyan változik a hsp-k szintézise. Ennek érdekében a sejteket fél óráig 42,5 °C-on előkezeltük, majd 30 °C-on összesen két órán keresztül inkubáltuk őket, a kezelés különböző szakaszaiban 30-30 percig $[U-^{14}C]$ protein hidrolizátum jelenlétében. Az SDS-PAGE-t követő fluorográfia eredménye a 8/C ábrán látható. Az összes hsp szintézise csökkenő tendenciát mutatott a hőkezelést követő visszatérés első másfél órájában, két óra elteltével pedig már csak kisebb kvantitatív különbségek voltak detektálhatók a kontroll (nem hőkezelt) és a hő előkezelést kapott sejteket összehasonlítva. Újra beindult a fikobiliproteinek (16-20 kD közötti, abundáns proteinek) képződése is.

Az optimális hőmérsékletre történő visszatérés közben a hsp szintézis csökkenése jól ismert jelenség, azonban ez nem jelenti a hsp-k eltűnését a sejtből: turnover-ük alacsony, így a sejtben továbbra is sokáig jelen vannak, és egy általánosan elterjedt elképzelés szerint esetleg ez határozhatja meg a sejtek szerzett termotoleranciáját, ma még pontosan alig ismert módon (Lindquist, 1986, Nagao és mtsai, 1990). A mi terveink között is szerepel az egyes hsp-k (különösen a tilakoiddal kapcsolatba hozhatók) szintje és a termotolerancia közötti összefüggés vizsgálata.

A hsp-k képződését nemcsak hővel, hanem egyéb stresszfactorokkal is ki lehet váltani (Lindquist, 1986). Cianobaktériumok esetében ezek átfogó jellemzésére még nem történt

kísérlet, ezért következő kísérleteink erre irányultak. A 30 °C-on nevelt sejtek 1-1 ml-ét a 10. ábra aláírásában leírt módon kezeltük [U-¹⁴C] protein hidrolizátum jelenlétében, majd a kezelés közben szintetizálódott fehérjéket SDS-PAGE-t követően fluorográfiával mutattuk ki (10. ábra). Mint látható, a sejtek sokféle kezelésre nagyon hasonló módon reagáltak: hősokk (8. minta), hideg sokkot követő visszatérés (1. minta), etanol, kadmium és arzenit kezelés (10., 12., és 17. minta) nagyon hasonló fehérje szintézis választ indukált. De itt is találhatók különbségek: etanol és kadmium kezelés volt a leghatékonyabb a 70 kD hsp szintjének emelésében, míg a 64, 15, és 14 kD hsp képződése legjobban hővel volt kiváltható. Jelentős növekedést lehetett kimutatni egy 23 kD protein szintjében, akár hideg sokkot követő visszatérés idején (1. ábra), akár etanol, kadmium vagy arzenit hozzáadására (10., 12., és 17. minta). Ez a fehérje hővel is indukálható, de csak átmenetileg, a hőkezelés első fél órájában (lásd 8. ábrát). Egy 62 kD protein szintje megemelkedett arzenit hozzáadást követően csakúgy, mint só és etanol eltávolítás hatására (4., 6., 11., és 17. minta).

Az itt bemutatott adatok a tudományos irodalom eddigi eredményeivel jól összeegyeztethetők. Ismert az etanol (Zeuthen és mtsai, 1988, Neidhardt és mtsai, 1984), az arzenit és a kadmium stressz protein indukáló hatása (Edelman és mtsai, 1988). Escherichia coli-ban pedig kimutatták, hogy hidegkezelést követően a visszatérés az optimális hőmérsék-



10. ábra. Különböző stresszfaktorok fehérjeszintézisre gyakorolt hatásának vizsgálata. 30 °C-on nevelt sejtszuszpenzió 1-1 ml térfogatú alikvotjait 1 $\mu\text{Ci/ml}$ [$\text{U-}^{14}\text{C}$] protein hidrolizátum jelenlétében inkubáltuk, a következő módokon: 1./ 5 óra, 4 °C előkezelést követően, 1 óráig 30 °C-on, 2./ 15 °C-on 3 óráig, 3./ 1 % NaCl jelenlétében 3 óráig, 4./ 1 % NaCl, 3 óra előkezelést követően, a só eltávolítása után 3 óráig, 5./ 2 % NaCl jelenlétében 3 óráig, 6./ 2 % NaCl, 3 óra előkezelést követően, a só eltávolítása után 3 óráig, 7./ 30 °C-on 1 óráig (kontroll), 8./ 42,5 °C-on 1 óráig, 9./ 5 % etanol jelenlétében 1 óráig, 10./ 5 % etanol jelenlétében 3 óráig, 11./ 5 % etanol, 1 óra előkezelést követően, az etanol eltávolítása után 3 óráig, 12./ 50 $\mu\text{M/ml}$ CdCl_2 jelenlétében 3 óráig, 13./ 250 $\mu\text{M/ml}$ CdCl_2 jelenlétében 3 óráig, 14./ 500 $\mu\text{M/ml}$ CdCl_2 jelenlétében 3 óráig, 15./ 25 $\mu\text{M/ml}$ Na-arzenit jelenlétében 3 óráig, 16./ 100 $\mu\text{M/ml}$ Na-arzenit jelenlétében 3 óráig, 17./ 250 $\mu\text{M/ml}$ Na-

arzenit jelenlétében 3 óráig. A gélre azonos radioaktivitású mintákat vittünk fel. Jobb oldalt a molekulatömeg standard látható.

letre szintén stressz protein képződést vált ki (Neidhardt és mtsai, 1984).

Kissé meglepő a sejtek reakciója só hozzáadására, illetve a só és az etanol eltávolítására. 1 és 2 % NaCl hozzáadására a totál fehérje szintézis kismértékű csökkenésétől eltekintve a sejtek semmilyen markáns, a fehérjék termelődésében megmutatkozó választ nem adtak (3. és 5. minta). Ezzel szemben a só és az etanol eltávolítása is hasonló stresszproteinek szintézisét váltotta ki (4. és 6. minta), miközben a fikobiliproteinek képződése szinte teljesen leállt (ez minden stresszválaszra jellemző volt, legalább átmenetileg).

A só által kiváltott választ illetően az eredmények ellentmondásosak: míg Apte és Bhagwat (1989) só hozzáadást követően egy dimenziós SDS-PAGE-t követő fluorográfiával is jelentős fehérje szintézisbeli különbséget mutatott ki a kontrollhoz képest Anabaena cianobaktériumban, Harrington és Alm (1988) dohány sejtkultúráján semmi markáns különbséget nem talált. Sőt, a mi eredményeinkkel teljes összhangban, a só megvonása idézett elő stresszprotein szintézist. A jelenség magyarázatával azonban ők is adósak maradtak, csakúgy, mint mi.

Szinte a mi kísérleteinkkel párhuzamosan, az általunk

vizsgált Synechocystis PCC 6803 törzs sóadaptációját vizsgálták Hagemann és mtsai (1990). Ők 4 % NaCl-t adtak a sejt-szuszpenzióhoz, ami a fehérje szintézist rövid időre teljesen leállította. A sejtek fehérje szintetizáló képességük 50 %-át egy glükózilglicerinnel nevezett ozmotikum szintjének növekedésével párhuzamosan, körülbelül 2 óra alatt nyerték vissza. Az általunk alkalmazott 1, illetve 2 % NaCl kisebb mérvű (körülbelül 25 %-os) szintézis gátlást okozott, ami összeegyeztethető a fenti adatokkal. Ezen túlmenően, Hagemann és mtsai (1990) sem találtak 1 dimenziós SDS-PAGE-t követő fluorográfiával kimutatható különbséget a kontroll és a sókezelt tenyészetek által termelt fehérjék között.

A különféle stresszfaktorok által kiváltott fehérje szintézis választ a 2. táblázat összegzi. Az indukált stresszproteinek alapján a vizsgált kezelések két csoportra bonthatók: hidegsokkból történő visszatérés, hősokk, etanol, kadmium és arzenit hozzáadása a tenyészethez hasonló fehérjék megjelenését váltotta ki, míg a só és az etanol eltávolítása a médiumból a stresszfehérjék egy másik, kis csoportjának szintézisét indukálta.

5.3. Hősokk fehérjék intracelluláris lokalizációjának vizsgálata.

Eredeti célkitűzésünknek megfelelően kísérletet tettünk tilakoid membránhoz kötött hsp kimutatására. Ebből a célból 100-100 ml, 30 °C-on nevelt sejt szuszpenzióját 3 órán ke-

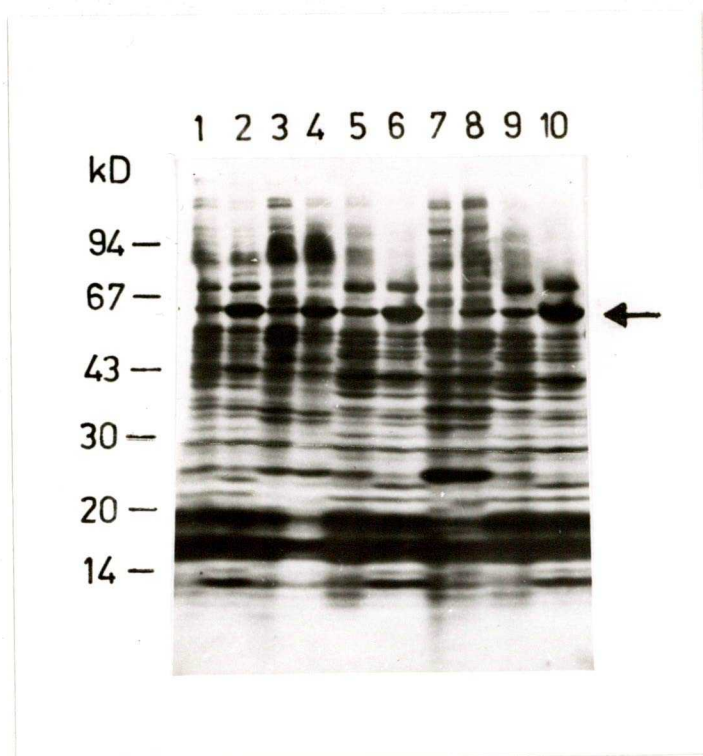
SP	Stresszfaktor						
(kD)	H8	HSV	Kadmium	Arzenit	Etanol	ESV	SSV
70	+	+	+	+	+		
64	+	+	+	+	+		
62				+		+	+
55						+	+
53	+						
26					+	+	+
25	+		+	+	+		
23	+	+	+	+	+		
15	+	+	+	+	+		
14	+	+	+	+	+		

2. táblázat. Különböző stresszfaktorok stressz protein szintézist indukáló hatásának összefoglalása. Készült főleg a 10. ábra adatainak felhasználásával. +: a fehérje szintézise indukálható az adott stresszfaktorral. SP: stressz protein, HSV: hidegstresszt követő visszatérés, ESV: etanol stresszt követő visszatérés, SSV: sóstresszt követő visszatérés.

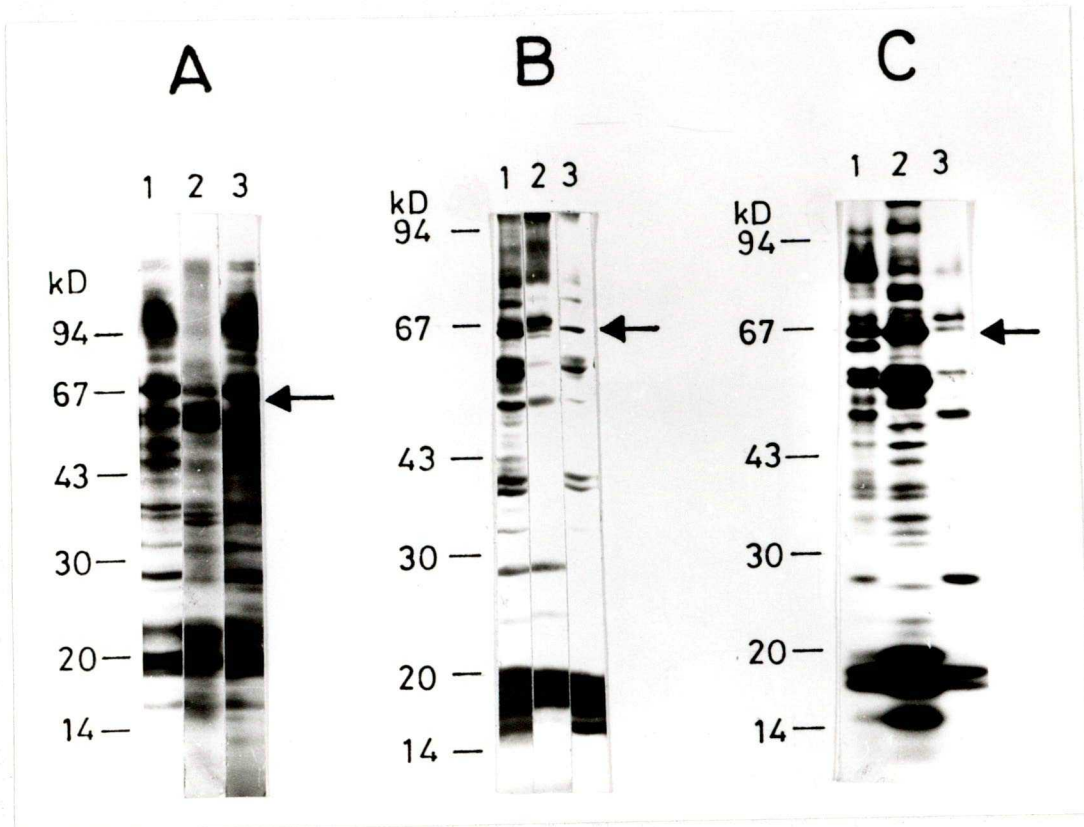
resztül $[U-^{14}C]$ protein hidrolizátummal jelöltük 30, illetve 42,5 °C-on. Ezt követően a sejteket üveggyöngyös módszerrel feltártuk, majd centrifugálással frakcionáltuk. Előállítottunk tilakoid membrán gazdag frakciót (27 ezer g üledék), citoplazmás membránban dúsított frakciót (150 ezer g üledék), és nagy tisztaságú citoszolt (150 ezer g felülúszó), majd minden egyes frakcióból a kontroll és a hőkezelt mintát is analizáltuk SDS-PAGE-t követő fluorográfiával (11. ábra).

Bár eredetileg a kloroplasztisszal analóg viselkedést, és kis molekulatömegű hsp membrán kötődését vártuk, meglepetésünkre egy másik, már eddig is tanulmányozott hsp, a 64 kD hsp jelenlétét tudtuk többször is, jól reprodukálhatóan kimutatni a tilakoid gazdag frakcióban (11. ábra, 4. minta). Ugyanakkor a fehérje még ennél is nagyobb mennyiségben volt megtalálható a citoszolban (11. ábra, 10. minta), tovább erősítve feltevésünket, hogy chaperonin fehérjével állunk szemben.

Szerettük volna tisztázni a 64 kD hsp tilakoid asszociációjának természetét, ezért a 42,5 °C-on jelölt sejtekből származó, tilakoid membrán gazdag frakciót további kezeléseknak vetettük alá (12. ábra). A 2 M NaCl mosás, ami az ionosan kötött felszíni fehérjéket távolítja el, a mi esetünkben nem volt hatékony (12/A ábra). Ezzel szemben a felszíni fehérjéket válogatás nélkül eltávolítani képes 0,1 M NaOH kezelés alapján a 64 kD hsp felszíni fehérjének adódott (12/B ábra). Ugyanilyen feltevésre jutottunk a Triton



11. ábra. A hősokk fehérjék sejten belüli lokalizációjának vizsgálata. 100-100 ml 30 °C-on nevelt sejt szuszpenzióját 3 órán keresztül, 30, illetve 42,5 °C-on inkubáltunk 1 μ Ci/ml [U- 14 C] protein hidrolizátum jelenlétében. A sejteket feltártuk, majd tartalmukat centrifugálással, több lépésben frakciókra bontottuk. Minden frakcióból azonos radioaktivitású mintát vittünk fel gélre és a frissen szintetizálódott fehérjéket fluorográfiával detektáltuk. A páratlan számú minták 30, a páros számúak 42,5 °C-on inkubált sejtekből származnak. 1.-2. minta: feltáratlan sejt, 3.-4. minta: 13 ezer g, 15 perces centrifugálásból származó pellet (tilakoid gazdag frakció), 5.-6. minta: 13 ezer g, 15 perces centrifugálás felülúszója (citoszol gazdag frakció), 7.-8. minta: 13 ezer g felülúszót 150 ezer g, 1 óráig tovább centrifugálva elállított pellet (citoplazmás membrán gazdagfrakció), 9.-10. minta: 150 ezer g, 1 óra centrifugálás felülúszója (nagy tisztaságú citoszol).



12. ábra. A 64 kD hsp és a tilakoid membrán kölcsönhatásának vizsgálata. Hőkezelt sejtekből tilakoid membránt izoláltunk a 4.4.1. pontban leírtak szerint. A membránt különböző kezeléseknek vetettük alá (részletesen lásd a 4.4.2. pontban) és az ezek során előállított összes frakció fehérje összetételét SDS-PAGE-t követő fluorográfia módszerével vizsgáltuk. A gélen a minták a következők: A: 2 M NaCl mosás; 1: kezeletlen tilakoid membrán, 2: 2 M NaCl által a membránról eltávolított proteinek, 3: a membrán fehérjéi a 2 M NaCl mosás után. B: 0,1 M NaOH mosás; 1: kezeletlen membrán, 2: a membránon maradt fehérjék a 0,1 M NaOH kezelést követően, 3: a kezelés által a membránról eltávolított proteinek. C: Triton X-114 fázisszeparálás; 1: kezeletlen membrán, 2: a vizes fázis fehérjéi, 3: a detergens fázis proteinjei. A nyíl a 64 kD hsp pozícióját mutatja.

X-114 fázisszeparálás eredményéből is: a 64 kD hsp-t a felületi fehérjéket tartalmazó vizes fázisból tudtuk kimutatni (12/C ábra). Ez a módszer igen megbízható, a membránfehérjéket két csoportra bontja: az integráns fehérjéket a detergens fázisból, a felületi fehérjéket pedig a vizes fázisból lehet visszanyerni.

Mindezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a 64 kD hsp felületi fehérjeként kötődik a tilakoid membránhoz, mégpedig - mivel a 2 M NaCl nem volt képes a membrán felszínéről eltávolítani - valószínűleg hidrofób erők révén. Mivel a membránba eközben nem integrálódik, ezért nem valószínű, hogy a lipidekkel lép ilyen kölcsönhatásba. A fentiek alapján megállapíthattuk tehát, hogy a 64 kD hsp valahogyan a membrán fehérjeivel kerülhet hidrofób kapcsolatba. Nyilvánvaló, hogy hősokk közben a fehérjék viszonylag kis erők által fenntartott natív szerkezete könnyen meg bomolhat és ekkor felszínre kerülhetnek addig rejtett, hidrofób szekvencia részletek. Ez alól minden bizonnyal a membránfehérjék sem jelentenek kivételt, és a 64 kD hsp esetleg ezt az állapotot ismerheti fel, és kötődhet ezekhez a polipeptidekhez. Ha feltételezzük, hogy a fehérjénk egy chaperonin, akkor ez a fajta kötődés nagyon is beleillik a proteinről eddig kialakított képbe (Rothman, 1989). Ezek szerint a chaperonin más fehérjék normális körülmények között rejtett, reaktív felszíneit -feltehetően nagyrészt hidrofób felszíneit- ismeri fel, és azokat képes megkötni. A hipotézis igazolásához már csak azt kellett bebizonyítanunk, hogy a 64 kD hsp valóban chaperonin fehérje.

5.4. 64 kD hősokk fehérje tisztítása és azonosítása.

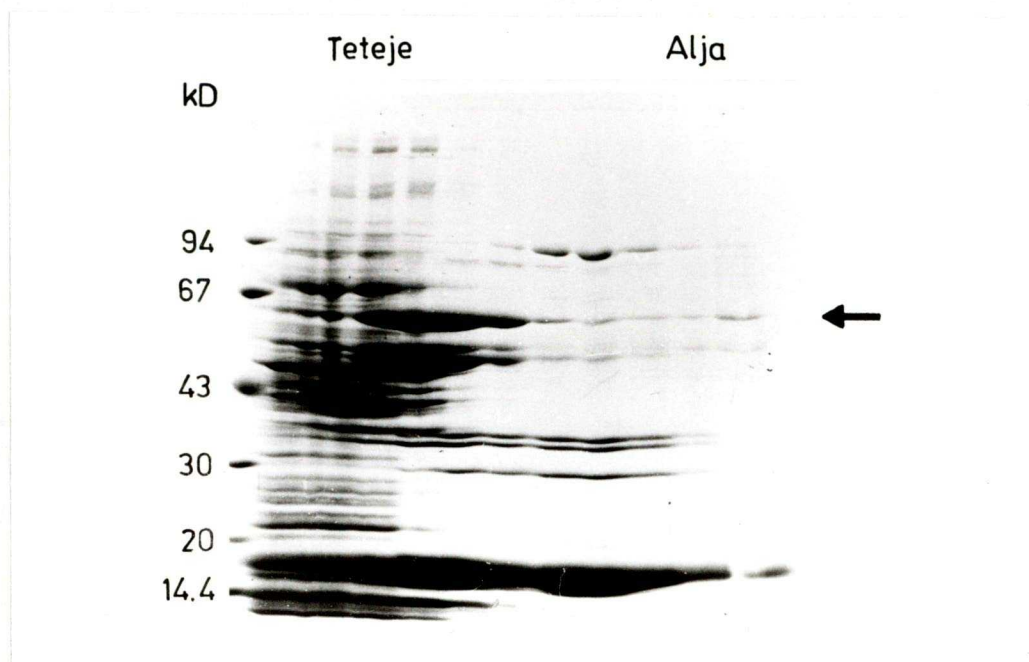
A 64 kD hsp molekulatömege, abundanciája, szintézisének hővel való indukálhatósága és alapvetően citoszolikus lokalizációja alapján arra a feltevésre jutottunk, hogy minden valószínűség szerint a chaperonin fehérjék cianobakteriális képviselőjével állunk szemben. Hipotézisünk igazolása céljából kísérletet tettünk a fehérje tisztítására és a tisztított fehérje azonosítására. A hsp szintézis kinetikáját vizsgálva már korábban megállapítottuk (9. ábra), hogy a 64 kD hsp szintje hosszú ideig tartó hőkezeléssel nagymértékben megemelkedik, ezért a tisztítás megkezdése előtt egy éjszakán át tartó, 42 °C-os előkezelést alkalmaztunk. Ez a kontrollhoz viszonyítva a fehérje mennyiségét valóban jelentősen megnövelte (nem bemutatott adat).

A chaperonin fehérjék két, egyenként hét monomerből álló gyűrűt alkotva fordulnak elő Escherichia coli-ban (Georgopoulos és Ang, 1990) és a kloroplasztiszban is (Roy, 1989), azonban kísérleteink idején jelenlétüket cianobaktériumokban még nem bizonyították. Ezt az oligomer formát szaharóz grádiens centrifugálással minden eddig vizsgált esetben viszonylag nagy tisztaságban lehetett kinyerni a körülbelül 20% szaharózt tartalmazó frakciókból. Érdekes módon azonban hasonló kísérleteink több, kis ionerősségű puffer kipróbálásával (10 mM Tris-HCl, pH:7,5, vagy 100mM K-foszfát, pH: 7,0) sem vezettek sikerre, a 64 kD hsp-t a grádiens tetején, kis szaharóz koncentrációjú frakciókban tudtuk kimu-

tatni (nem bemutatott adat). Ismert volt előttünk a cianobaktériumokra jellemző, szintén oligomer felépítésű fikobiliszómák nagy érzékenysége az izoláló médium ionerősségére (Katoh, 1988). Ezért következő kísérletünkben az intakt fikobiliszóma izolálásban rutinszerűen használt, általunk "A"-val jelölt, 750 mM K-foszfátot tartalmazó pufferfert próbáltuk ki, ami a várt eredményt adta (13. ábra). A sejteket üveggyöngyös módszerrel, "A" pufferben feltártuk, majd centrifugálással (15 ezer g, 15 perc, felülúszó) előállítottunk egy citoszol gazdag frakciót. Ezt a szintén A pufferfert tartalmazó, 10-30 % szaharóz grádiens tetejére rétegeztük, és egy éjszakán át 100 ezer g-vel centrifugáltuk. Másnap a grádiensről frakciókat szedtünk és azokat SDS-PAGE-val analizáltuk. Refraktometriás mérések alapján a 64 kD hsp-t tartalmazó frakciók szaharóz koncentrációja 18-20% között volt, ami jól megfelel a várt értéknek.

A 64 kD hsp tartalmú frakciókban nagy mennyiségben megtalálhatók egyéb oligomer fehérjék, főleg fikobiliszómák. A fikobiliszómák zömét a 16-20 kD közötti molekulatömegű, úgynevezett fikobiliproteinek alkotják (Glazer, 1988). Hatékony elválasztásuk a 64 kD hsp-től sem ioncserélő (Servacel DEAE 52 oszlop) sem fordított fázisú kromatográfiával (Phenyl Sepharose) nem volt eredményes (nem bemutatott adat). Ennek oka valószínűleg a 64 kD hsp és a fikobiliproteinek hasonló izoelektromos pontjában ($pI=5,5-6,0$), és hasonló hidrofób sajátságaikban keresendő.

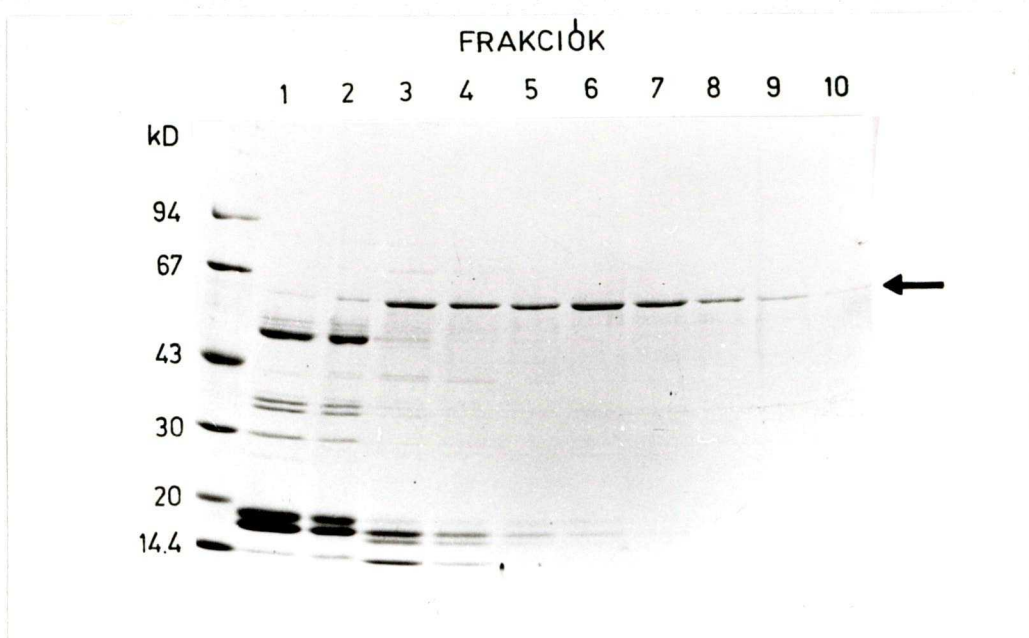
Már korábbi eredményeink is a 64 kD hsp oligomer szerke-



13. ábra. A 64 kD hsp tisztítása szacharóz grádiens centrifugálással. A 36 °C-on nevelt, majd egy éjszakán át 42 °C-on hőkezelt sejteket 750 mM K-foszfát tartalmú "A" pufferben tártuk fel. A sejttörmelékét és a membránok nagy részét 15 ezer g, 15 perces centrifugálással eltávolítottuk, a felülúszót pedig "A" puffer tartalmú, 10-30 %-os szacharóz grádiensre rétegeztük. A grádienszt egy éjszakán keresztül, 100 ezer g-vel centrifugáltuk, majd frakciókat szedtünk belőle. A frakciók fehérje összetételét SDS-PAGE-val analizáltuk.

zetének ionerősségtől függő, nagyfokú labilitását mutatták, ezért fehérjénket megpróbáltuk ezt a jelenséget kihasználva tovább tisztítani. Ez a megközelítési mód eredményes volt: a szaharóz grádiens csúcsfrakcióit összegyűjtöttük, és az így kapott mintát kis térfogatú, 100 mM K-foszfátot tartalmazó "B" pufferben egy Sephacryl S-200 géliszűrő oszlopra vittük fel. A géliszűrés eredményeként kapott frakciók analízise azt mutatta, hogy a szennyező, oligomer struktúrájú fehérjék nem estek szét monomerjeikre (bár a fikobiliszómák itt már nem tekinthetők teljesen intaktnak, oligomer szerkezetük még jelentős mértékben megmaradt), és így az oszlop kizárási térfogatában maradtak. A 64 kD hsp ezzel szemben monomerekre disszociálódott, és belépett az oszlop elválasztási tartományába (14. ábra). A 6.-8. frakciókban a 64 kD hsp tisztasága legalább 90%-osnak becsülhető.

Itt érdemes részletesen áttekinteni a később valóban chaperonin fehérjének bizonyuló 64 kD hsp disszociációs viselkedését. Más cianobakteriális oligomer struktúrákkal összehasonlítva is a 64 kD hsp oligomerje igen nagy érzékenységet mutatott a puffer ionerősségével szemben. Mivel egy nyilvánvalóan nem fiziológiás, magas sókoncentráció volt szükséges az oligomer szerkezet in vitro fenntartásához, ezért felmerül a kérdés, hogy vajon a sejten belül a fehérje monomer, vagy oligomer állapotban fordul-e elő. Meg kell jegyezni azonban, hogy az in vivo bizonyítottan oligomer fikobiliszómát teljesen intakt állapotban szintén csak 750 mM foszfát pufferben lehet izolálni (Kato, 1988). E jelen-



14. ábra. A 64 kD hsp tisztításának 2. lépése Sephacryl S-200 gélszűrő oszlopon. A szacharóz grádiens 64 kD hsp tartalmú frakcióit összegyűjtöttük, majd a fehérjék $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -os kicsapását követően visszaoldottuk őket kis térfogatú, 100 mM K-foszfát tartalmú "B" pufferben. Ezt "B" pufferben ekvilibrált Sephacryl S-200 oszlop tetejére rétegeztük. 0,2 ml/perc átfolyási sebesség mellett frakciókat szedtünk, ezek protein összetételét SDS-PAGE-val vizsgáltuk.

ség háttérében egy, a sejtben nagy koncentrációban jelenlevő ozmotikum állhat, aminek ellentételezés nélküli eltávolítása disszociációhoz vezethet (Reed és Stewart, 1985). Ezért elképzelésünk szerint a chaperonin in vivo szintén oligomerként fordul elő. A fikobiliszómánál is nagyobb labilitása inkább sejten belül is elképzelhető nagyobb disszociációs hajlandóságát reflektálhatja.

Érdemes összehasonlítani a cianobakteriális chaperonin disszociációs tulajdonságairól alkotott elképzelésünket a jól ismert Escherichia coli groEL, és kloroplasztisz Rubisco kötő fehérje viselkedésével. Az E. coli fehérje esetében némileg ellentmondásos kép alakult ki. Általánosan elfogadott, hogy az oligomer nem disszociál kisebb egységekre még a szubsztrát fehérje elengedésekor sem (Georgopoulos és mtsai, 1990). Azonban ezzel ellentétes eredmény szintén előfordul, kimutatva a groEL (cpn60) oligomer MgATP, K^+ és groES (cpn10) függő disszociációját a szubsztrát fehérje leválásakor (Goloubinoff és mtsai, 1989). A groEL oligomer önmagában, kis ionerősségű, vizes pufferben stabil, csak metrizamidban esik szét (Georgopoulos és Ang, 1990). Ez a mi eredményeinkkel egyezően az alegységek közti hidrofób kötő erőkre utal, bár az E. coli fehérje esetében ezek az erők jóval erősebbnek tűnnek.

Némileg eltérő elképzelés alakult ki a kloroplasztisz chaperonin fehérje esetében (Roy, 1989). Itt cpn10-nek megfelelő fehérje jelenlétét eddig nem mutatták ki, bár létezése a mitokondriális cpn10 felfedezése után (Lubben és

mtsai, 1990) erősen valószínűsíthető. A cpn60-nak megfelelő Rubisco kötő fehérje könnyen és reverzibilisen disszociál ATP jelenlétében. Feltételezik, hogy a cpn60 a kloroplasztiszon belül ciklusokat tesz a két állapot között, minden ciklus során megkötve, majd ATP hidrolízise mellett elengedve egy-egy szubsztrát fehérjét (Roy, 1989).

Az általunk elképzelt mechanizmus a kloroplasztisz chaperonin működésére emlékeztet inkább, azzal a különbséggel, hogy cianobaktériumokban a cpn10 fehérjét kódoló gént a legutóbbi időben már megtalálták (Webb és mtsai, 1990).

A tisztított 64 kD hsp-t fehérje szekvenálással sikerült chaperoninként azonosítanunk. Az N-terminális első 25 aminosavat határoztuk meg, majd ezt összehasonlítottuk több ismert chaperonin szekvenciával (15. ábra). Nem túl meglepő módon a Synechocystis PCC 6803-ban általunk azonosított chaperonin a legnagyobb hasonlóságot az egyetlen ezen kívül ismert cianobakteriális chaperonin szekvenciával mutatta (Webb és mtsai, 1990).

Bár egy 60-65 kD közötti molekula tömegű hsp jelenlétét már több cianobaktérium törzsben kimutatták (Bhagwat és Apte, 1989, Borbély és mtsai, 1985, Mannan és mtsai, 1986, Lehel és mtsai, 1991a), a génjét szekvenálták (Webb és mtsai, 1990), nekünk sikerült először a fehérjét kitisztítani, és szekvenálással azonosítani (Lehel és mtsai, 1991b).

A cianobakteriális chaperonin számos folyamatban játszhat fontos szerepet. Részt vehet a már más szervezetekben is leírt folyamatokban, mint DNS replikáció, protein

S. 6803	A K S I I Y N D E A T R A L E * G M D I L A E A V
S. 7942	+ + R + + + + E N + R + + + + K + I E + + + + + +
E. coli	+ + D V K F G N D + R V K M L R + V N V + + D + +
Búza	+ + E + A F D Q K S R A + + Q A + V E K + + N + +

Homológia:

S. 6803- S. 7942: 75%

S. 6803- E. coli: 33%

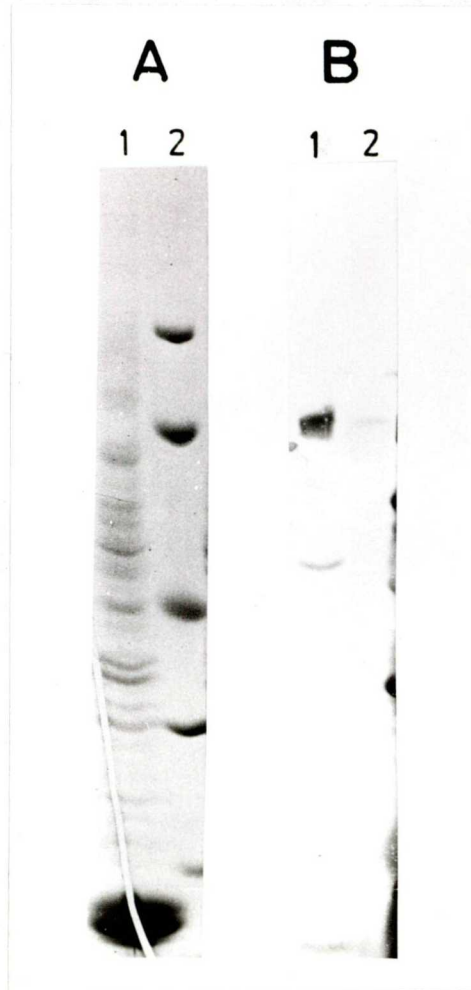
S. 6803- Búza : 42%

15. ábra. A *Synechocystis* PCC 6803 64 kD hsp N-terminális aminosav sorrendjének összehasonlítása ismert chaperonin fehérjék aminosav sorrendjével. +: azonos aminosav; *: azonosítatlan aminosav. A *Synechococcus* PCC 7942 groEL szekvencia Webb és mtsai (1990), a búza Rubisco kötő fehérje és az *Escherichia coli* groEL szekvencia Gupta és mtsai (1989) munkájából származik.

transzport (1. táblázat), de valószínűleg vannak speciális, csak cianobaktériumokra jellemző funkciói is. Jelenlétét a legutóbbi időben kimutatták a karboxiszómában (Jager és Bergman, 1990), ahol valószínű a Rubisco oligomer felépítésében "segédkezik". A fikobiliszómák oligomer szerkezetének kialakulását is katalizálhatja, kötődését a tilakoid membránhoz pedig sikerült is kimutatnunk. Ez utóbbival kapcsolatos elképzeléseinket az 5.6. pontban fejtem ki részletesen.

5.5. Immunológiai kísérletek más hősokk fehérjék azonosítására.

A hsp szintézist teljes sejt szinten vizsgáló kísérleteinkben sikerült kimutatnunk egy 70 kD körüli, abundáns, hőre indukálódó protein megjelenését (7.-10. ábra). Feltételeztük, hogy a fehérje a hsp70 molekuláris chaperone család tagja. Ezt a feltevésünket immunológiai eszközökkel kívántuk bizonyítani. Ebből a célból 42,5 °C-on, 1 óráig hőkezelt cianobakteriális sejtek fehérjéit SDS-PAGE-val elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. Elképzelésünket igazolva, a membránon az immunoblot módszer alkalmazásával sikerült is kimutatnunk egy, a hsp70 családba tartozó fehérjét (16. ábra, a módszer leírását lásd részletesen a 4.6.4. pontban). Első ellenanyagként az Escherichia coli e családba tartozó, dnaK fehérjéje ellen készült antiszérumot használtuk.



16. ábra. Immunoblotting hsp70 családba tartozó molekuláris chaperone kimutatására *Synechocystis* PCC 6803-ban. 30 °C-on nevelt, 42,5 °C-on hőkezelt sejtek fehérjéit SDS-PAGE-val elválasztottuk és nitrocellulóz membránra blottoltuk. A membránt első ellenanyagként a hsp70 családba tartozó *Escherichia coli* dnaK fehérje ellen készült antiszérummal, második ellenanyagként alkalikus foszfatázhoz kötött kecske anti-nyúl IgG-vel kezeltük. A: Coomassie festett gél; B: nitrocellulóz membrán a foszfatáz színreakció után; 1: hőkezelt *Synechocystis* PCC 6803 sejtek fehérjéi; 2. molekulatömeg standard.

Hasonló próbálkozásaink egy kloroplasztisz 1mw hsp rokon fehérje kimutatására azonban nem jártak sikerrel. Erre a célra a borsó kloroplasztisz 21 kD 1mw hsp C-terminálisa ellen készült poliklonális ellenanyagot használtuk fel (Vierling és mtsai, 1989), azonban pozitív eredményt semmilyen koncentrációban nem kaptunk (nem bemutatott adat). Ilyen fehérje jelenléte a cianobaktériumokban ezek után sem zárható ki, bár valószínűsége nem nagy; különösen, ha figyelembe vesszük, hogy sem nekünk (7.-10 ábra), sem másoknak (Borbély és mtsai, 1985, Bhagwat és Apte, 1989) ebben a molekulatömeg tartományban abundáns hsp-t nem sikerült kimutatni.

Érdemes itt egy pillanatra összehasonlítani a hsp szintézis regulációjában fellelhető hasonlóságokat az Escherichia coli, a cianobaktériumok és a növényi kloroplasztisz esetében. Az endoszimbióta elmélet értelmében a kloroplasztisz cianobaktérium ősöktől származik (Giovannoni és mtsai, 1988, Gupta és mtsai, 1989). A hsp szintézis tekintetében azonban úgy tűnik, hogy a kloroplasztisz és a cianobaktérium között a hasonlóság kisebb, mint a cianobaktérium és a szintén Gram-negatív prokarióta Escherichia coli között. A hsp60 és hsp70 család tagjai mindhárom esetben jelen vannak, de míg prokariótákban szintézisük a hőmérséklettől erősen függ, a kloroplasztisz esetében a megfelelő gének a magban találhatóak, és hővel nem, vagy alig regulálhatóak (Ellis, 1990a, Lindquist és Craig, 1988, Marshall és mtsai, 1990). Ugyanakkor a kloroplasztiszra jellemző 1mw hsp pro-

karióta megfelelőit mindeddig nem mutatták ki.

Csak egyetlen cikkben jelentek meg eddig adatok kloroplasztisz által szintetizált hsp-kről (Krishnasamy és mtsai, 1988). Azonban a mai napig nem ismert, hogy milyen fokú autonómiát őrzött meg a hsp szintézis regulációjában a kloroplasztisz. Escherichia coliban ennek a regulációnak a kulcsszereplője az RNS polimeráz sigma 32 alegysége (Straus és mtsai, 1987). Ez a fehérje minden valószínűség szerint cianobaktériumokban is megtalálható, míg jelenléte a kloroplasztiszban izgalmas, eldöntendő kérdés.

5.6. Hipotézis a tilakoid membrán és a chaperonin fehérje kölcsönhatásáról.

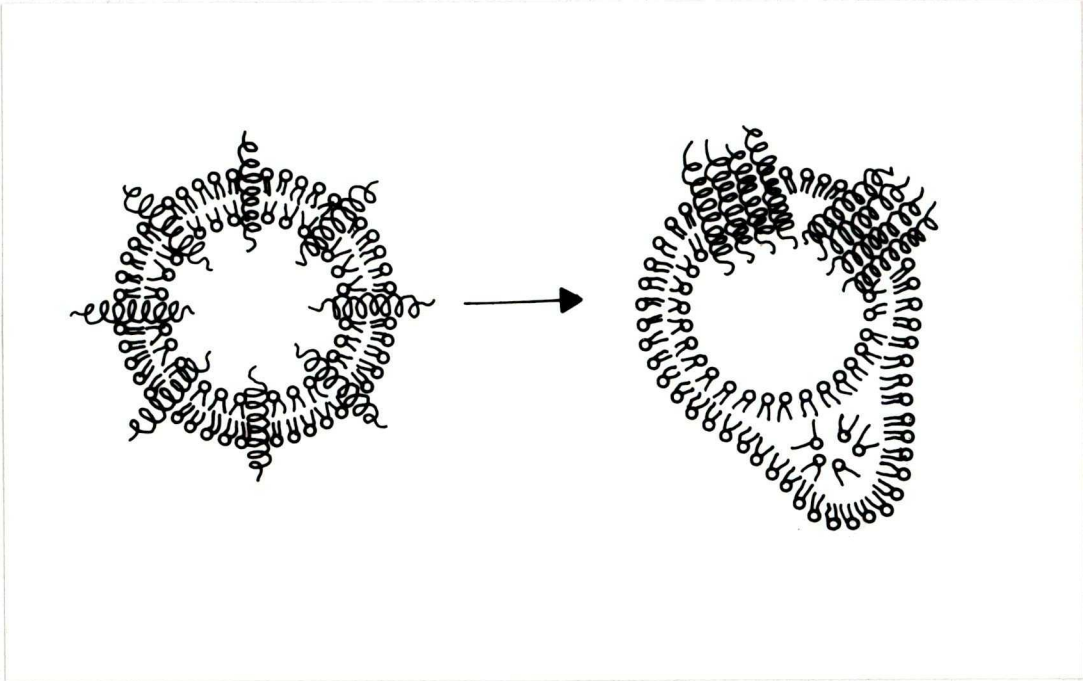
Munkánk során sikerült kimutatnunk a cianobakteriális chaperonin fehérje közvetlen kapcsolatát a tilakoid membránal. Ezt a kapcsolatot az összefüggések tágabb rendszerébe helyezve, az alábbiakban részletezett hipotézist állítottuk fel.

Feltételezhető, hogy a chaperonin és a tilakoid membrán közvetlen és közvetett kapcsolatban is áll egymással, mind normál, mind hősokk körülmények között. Közvetlen kapcsolaton a chaperonin fehérje nem kovalens kötődését értjük a membrán integráns és/vagy felületi fehérjéihez (valószínű nem csak egy membrán fehérjét ismer fel szubsztrátként). Közvetett a kapcsolat, ha a chaperonin frissen szintetizálódott fehérjét köt meg, és annak a tilakoid membránon

keresztüli transzlokációjában, vagy membránba integrálódásában játszik szerepet. Tehát ebben az esetben a protein transzporthoz vezető folyamat egyik aktív résztvevője.

A közvetlen kapcsolatra sikerült is bizonyítékot szerez-nünk, a közvetettét pedig több tény is valószínűsíti. A pro-tein transzportnak a molekuláris chaperone-ok nélkülözhetet-len alkotóelemei (Ellis, 1990a, Hartl és Neupert, 1990), és magáról a chaperoninról is kimutatták, hogy részt vesz ilyen folyamatokban (Kusukawa és mtsai, 1989, Cheng és mtsai, 1989). A tilakoid membrán esetében a fehérje inszer-cióban és transzlokációban aktív szerepet játszó proteinek ma még nem ismertek, de az inszertálandó pLHCP (a kloro-plasztisz tilakoid fénybegyűjtő komplexének preszekvenciát tartalmazó polipeptidje) és a chaperonin fehérje, illetve egy azonosítatlan 65 kd-os protein asszociációját már két esetben is kimutatták (Lubben és mtsai, 1989, Fulson és Cline, 1988).

Nézzük meg ezek után kicsit részletesebben, hogy magas hőmérséklet hatására milyen kedvezőtlen folyamatok indulhat-nak el a tilakoid membránban, ezek ellen a sejt hogyan véde-kezhethet, és hogyan használhatja e folyamatok közben a chape-ronin fehérjét (17. ábra). A magas hőmérséklet mind a memb-ránt alkotó fehérjékre, mind a lipidekre a kettősréteg struktúra felbomlását és a fordított hexagonális fázis kia-lakulását elősegítő módon hat, ez pedig a membrán dezorgani-zálódásával és funkcióvesztésével járhat. A lipidekre gya-



17. ábra. A hőmérséklet emelkedésének hatása a tilakoid membránra (hipotézis). Normális körülmények között (bal oldalt) a membrán lipidek alkotta kettősrétegében a fehérjék viszonylag egyenletes eloszlást mutatnak, a membránfunkciók elvesztéséhez vezető hexagonális fázis nem fordul elő. A hőmérséklet emelkedésével (jobb oldalt) a kettősréteg struktúra rendje megbomolhat, hexagonális fázis alakulhat ki. Ezt a folyamatot kiválthatja vagy esetleg tovább erősítheti a membránfehérjék hő hatására bekövetkező aggregációja és ezzel párhuzamosan fehérjementes területek kialakulása. Elképzelésünk szerint a chaperonin fehérje ez utóbbi folyamatokkal (fehérje aggregáció és fehérjementes szigetek keletkezése) szemben jelenthet védelmet. Részletes magyarázatot lásd a szövegben.

korolt hatást már viszonylag régóta vizsgálják: a hőmérséklet emelkedése kiváltja a hexagonális fázist kedvelő lipidek (különösen az MGDG) szegregálódását a többi lipidtől, ami bizonyos határt túllépve a hexagonális fázis kialakulásához vezet (Thomas és mtsai, 1986, Williams és Quinn, 1987).

Feltételezésünk szerint ezt a folyamatot tovább erősíti a hőnek a fehérjékre kifejtett hatása. Magas hőmérsékleten a proteinek kis erőik által fenntartott harmadlagos szerkezete megbomlik, és felszínre kerülhetnek eddig rejtett struktúrák: hidrofób szekvenciariészletek, reaktív -SH csoportok (Rothman, 1989). Ha a fehérjének "szerencséje" van, akkor a folyamat még visszafordulhat, az aktív konformációt eredményezve. Ellenkező esetben viszont a felszínre került reaktív csoportok inter- és intramolekulárisan egyaránt reakcióba léphetnek egymással: a kovalens S-S hidak kialakulása (Caldwell, 1989) és a fehérjék hidrofób felszíneinek összetapadása a fehérjék aggregációját idézheti elő. Ez az adott proteinekre nézve már minden bizonnyal irreverzibilis folyamat, és az enzimatis aktivitás elvesztésén túl -ami önmagában is nagyon súlyos károkkal járhat, de új fehérje szintézisével valószínűl kivédhető- még egy hatása van. A membrán lipid kettősrétegében eddig többé-kevésbé egyenletes eloszlást mutató fehérjék az aggregáció miatt a membrán bizonyos régióiban összetapadnak, a membrán más területei pedig fehérjementesekké válnak. Mint tudjuk, a lipid kettősréteg stabilizálásában a fehérjéknek nagyon fontos szerepük

van (Quinn, 1989), ezért a fehérjementes területek kialakulása nagymértékben fokozza a hexagonális fázis kialakulásának valószínűségét.

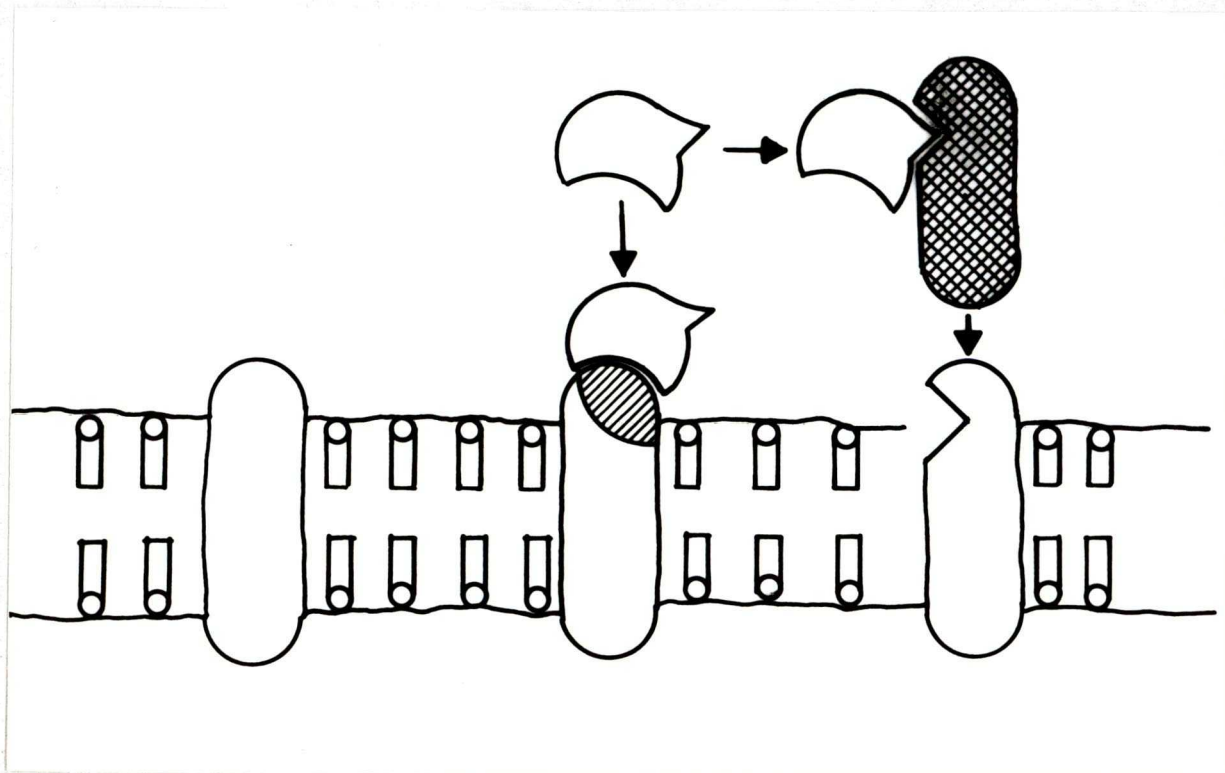
Hogyan védekezhet mindezek ellen a sejt? A védekezés egyik módja bizonyára a lipidek fordított hexagonális fázis képző hajlandóságának csökkentése, ezt pedig a rendszer a lipidek zsírsavainak telítésével érheti el. Több adat is van arra, hogy ez valóban a membrán stabilizálódásával járhat (Thomas és mtsai, 1986, Hugly és mtsai, 1989, Vígh és mtsai, 1989, Quinn és mtsai, 1989). A magasabb hőmérséklet-hez adaptált Synechocystis sejtek tilakoidjainak zsírsav összetétele bizonyítottan telítettebb (Török és mtsai, előkészületben). Az izolált cianobakteriális tilakoid membrán hőstabilitása a lipidek in situ homogén katalitikus telítésével fokozható (Vígh és mtsai, előkészületben).

E hosszú távú védelmi stratégián túl számolnunk kell azonban egyéb, rövidebb időtartam alatt "mozgósítható" védelmi mechanizmusokkal is. A fehérje S-S hidak kialakulása ellen védelmet adhat a sejten belüli redukáló erő növelése a redukált glutation koncentrációjának emelésével (Caldwell, 1989). Ugyancsak elképzelhető, hogy a sejt rendelkezik a hexagonális lipid fázist specifikusan felismerő, és annak "eltüntetése" irányában ható enzimekkel (Quinn, 1989). Azonban e két "eszközt" csak a károsodási folyamat későbbi fázisaiban lehet bevetni, és minden valószínűség szerint nem nyújthatnak teljes védelmet.

Nagy szerephez juthat viszont a gyors védekezés során a

chaperonin fehérje (18. ábra). Egyrészt felismerheti a hő hatására kitekeredő proteinek "reaktív" felszíneit, és ezekre a fehérjékre kötődve, azonnal megakadályozhatja mind az S-S hidak kialakulását, mind a hidrofób erők hajtotta aggregációt (Rothman, 1989). Ugyancsak lehetőséget adhat a kötött fehérjének a katalizált visszatekeredésre, elkerülve így az inaktiválódást. Valószínű van azonban a chaperonin-nak egy közvetett hatása is, amit a membránt alkotó fehérje/lipid arány növekedésében detektálhatunk. Ennek igen fontos szerepe lehet egyrészt a fehérjementes szigetek eltüntetésében, másrészt az irreverzibilisen inaktiválódott fehérjék pótlásában. A hőmérséklet adaptációval kapcsolatban ilyen arányváltozást valóban ki is tudtunk mutatni (Török és mtsai, előkészületben). Ebben az esetben valószínűleg nem csak a chaperonin, hanem a protein transzportban részt vevő többi, ma még ismeretlen fehérje is aktiválódik, és nagy mennyiségű (esetleg speciálisan csak ilyen körülmények között termelődő) membránfehérje inszercióját katalizálják. Jelenleg folyamatban lévő kutatásaink középpontjában pontosan ezek, a megváltozott fehérje/ lipid arány háttérében lezajló folyamatok állnak.

Nem kerülhetjük el a válaszadást arra a kérdésre, hogy vajon ezek a kutatások milyen mértékben járulnak hozzá a kloroplasztisz tilakoid membrán adaptációs folyamatainak megértéséhez. A kloroplasztisz chaperonin szintézisének hőregulációját csak a legutóbbi időben sikerült kimutatni (Ellis, 1990a), génje a magban helyezkedik el, és bár Ru-



18. ábra. A chaperonin fehérje és a tilakoid membrán kölcsönhatása (hipotézis). Elképzeléseink szerint a chaperonin (középen fent) a membránnal mind közvetlen (az ábra bal oldalán), mind közvetett (az ábra jobb oldalán) kapcsolatba léphet. Az első esetben a membrán sérült proteinjeihez kötődik, és azok "kijavítódását" katalizálja, a második esetben a membránfehérjék inszerciójában "segédkezik". Részletes magyarázatot lásd a szövegben.

bisco kötő fehérje néven a chaperonin már tíz éve ismert, tilakoid membránhoz kötődését mindeddig nem írták le. Sikert viszont kimutatni egy, a cianobaktériumokban valószínűleg nem is létező lmw hsp-nek a tilakoid kötött formáját (Glaczinski és Kloppstech, 1988). Elképzelésünk szerint a cianobakteriális őssejt bekebelezése után a chaperonin, - a génjével és hőmérséklet regulációjával kapcsolatos változásokkal együtt - elveszthette tilakoid membránvédő funkcióját is, amit esetleg az lmw hsp vehetett át. Ily módon, bár a cianobakteriális chaperonin-tilakoid rendszer vizsgálatának eredményei közvetlenül nem adaptálhatók a kloroplasztiszra, e munkának mégis kettős értelme van. Egyrészt ebben a genetikailag jól kézben tartható rendszerben sok mindent megtudhatunk a kloroplasztiszban is abundáns és multifunkcionális chaperoninról, másrészt a chaperonin-tilakoid kapcsolat megismerése esetleg közelebb vihet a plasztisz lmw hsp-tilakoid kölcsönhatás megértéséhez, annak általánosításához.

6. ÖSSZEFOGLALÁS.

Jelen dolgozatban a Synechocystis PCC 6803 cianobaktérium, és mindenekelőtt tilakoid membránjának magas hőmérséklet adaptációs folyamatait tanulmányoztuk.

1. Megállapítottuk, hogy az általunk választott rendszer az adaptáció folyamatának vizsgálatára jól használható, hiszen a magas hőmérséklethez adaptált sejtek minden vizsgált paraméterükben (túlélő képesség, protein szintetizáló és fotoszintetizáló aktivitás) az ezt követő hősokkal szemben ellenállóbbak voltak.
2. Kimutattuk, hogy a túlélési és egyéb paraméterek alapján is kritikusnak talált magas hőmérsékleti tartományban a sejtek a rendelkezésükre álló fehérje szintetizáló kapacitást elsősorban hősök fehérjék képzésére fordítják. Elvégeztük a legabundánsabb hsp-k (70, 64, 15 és 14 kD) szintézisének kinetikai jellemzését. Vizsgáltuk e fehérjék megjelenését egyéb stresszfaktorok hatására.
3. Eredeti célkitűzésünknek megfelelően kísérletet tettünk tilakoid membrán kötött hsp detektálására. Bebizonyítottuk, hogy az egyik legnagyobb mennyiségben termelődő hsp - a 64 kD hsp - kettős lokalizációval bír. Míg a fehérje nagy része a citoszolban található, jól reprodukálhatóan ki tudtuk mutatni kötődését a tilakoid membránhoz is. Megállapítottuk, hogy a kötés felszíni, hidrofób természetű. Elképzelésünk szerint a 64 kD hsp a membrán fehérjeivel lép ilyen kapcsolatba.

4. Eredményeink alapján feltételeztük, hogy a 64 kD hsp az utóbbi időben az érdeklődés középpontjába került chaperonin fehérje család tagja. Ezen az alapon megpróbáltuk tisztítani, ami sikerrel járt. Oligomer szerkezetének disszociációjára vonatkozó elképzeléseinket összehasonlítottuk a chaperonin család többi tagjáról nyert ilyen jellegű információkkal, és azokkal összeegyeztethetőnek találtuk. Sikerült meghatároznunk a protein N-terminális aminosav sorrendjét, és azt más chaperonin szekvenciákkal összehasonlítva, fehérjénk azonosságát minden kétséget kizáróan bizonyítottuk.
5. Immunológiai módszerekkel sikerült kimutatnunk egy, a hsp 70 családba tartozó fehérje jelenlétét is. Érdekes módon a kloroplasztiszra jellemző kis molekulatömegű hsp jelenléte rendszerünkben nem volt igazolható. Ezért az irodalom eddigi eredményeivel is összhangban arra a következtetésre jutottunk, hogy a cianobaktériumok hsp szintézise és annak regulációja több rokon vonást mutat a Gram negatív prokarióta Escherichia colival, mint a növényi kloroplasztisszal.
6. Felállítottunk egy hipotézist a chaperonin fehérje és a tilakoid membrán kapcsolatáról. Elképzelésünk szerint, bár a chaperonin és a tilakoid közti kölcsönhatás hősök között a legintenzívebb, köztük normális hőmérsékleti körülmények között is van mind közvetett, mind közvetlen kapcsolat. Áttekintettük azokat a folyamatokat, amelyek a magas hőmérséklet hatására a tilakoid

membrán károsodásához vezethetnek, és felvázoltuk a lehetséges védekezési stratégiákat. Részletesen kifejtettem álláspontunkat, miszerint a chaperonin fehérje a hőstressz káros hatásainak elhárításába több ponton is, hatékonyan bekapcsolódhat.

7. KÖSZÖNETNYILVANÍTÁS.

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani mindazon kollégáimnak, akik értékes tanácsaikkal, a kísérleti munkában nyújtott segítségükkel, valamint az anyagi és egyéb feltételek biztosításával nagymértékben hozzájárultak a munka sikeréhez. Személy szerint is szeretném köszönetemet kifejezni:

Dr. Venetianer Pálnak, a Biokémiai Intézet igazgatójának,

Dr. Vigh Lászlónak, a Biokémiai Intézet főmunkatársának,
csoportvezetőnek,

Dr. Horváth Ibolyának, a Biokémiai Intézet munkatársának,

Dr. Gombos Zoltánnak, a Növényélettani Intézet
munkatársának,

Török Zsoltnak, a Biokémiai Intézet segédmunkatársának,

Nikovics Krisztina, Petrényi Lászlóné és Gazsó Józsefné
asszisztenseknek,

Borka András fotósnak.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- Allen MM: Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.* 4:1-4 (1968)
- Apte SK, Bhagwat AA: Salinity-stress-induced proteins in two nitrogen-fixing *Anabaena* strains differentially tolerant to salt. *J. Bacteriol.* 171:909-915 (1989)
- Berry J, Björkman O: Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:491-543 (1980)
- Bhagwat AA, Apte SK: Comparative analysis of proteins induced by heat shock, salinity, and osmotic stress in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain L-31. *J. Bacteriol.* 171:5187-518 (1989)
- Borbély G, Surányi G, Korcz A, Pálfi Z: Effect of heat shock on protein synthesis in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 6301. *J. Bacteriol.* 161:1125-1130 (1985)
- Bradford M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254 (1976)
- Bricker TM, Sherman LA: Triton X-114 phase fractionation of membrane proteins of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Arch. Biochem. Biophys.* 235:204-211 (1984)
- Caldwell CR: Temperature-induced protein conformational changes in barley root plasma membrane-enriched micro-

- somes. III. Effect of temperature and cations on protein sulfhydryl reactivity. *Plant Physiol.* 91:1339-1344 (1989)
- Chen Q, Lauzon LM, DeRocher AE, Vierling E: Accumulation, stability, and localization of a major chloroplast heat shock protein. *J. Cell Biol.* 110:1873-1883 (1990)
- Cheng MY, Hartl FU, Martin J, Pollock RA, Kalousek F, Neupert W, Hallberg EM, Hallberg RL, Horwich AL: Mitochondrial heat shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* 337:620-625 (1989)
- Cheng MY, Hartl FU, Horwich AL: The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly. *Nature* 348:455-458 (1990)
- Chirico WM, Waters MG, Blobel G: 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332:805-810 (1988)
- Edelman L, Czarnecka E, Key JL: Induction and accumulation of heat shock-specific poly(A+) RNAs and proteins in soybean seedlings during arsenite and cadmium treatments. *Plant Physiol.* 86:1048-1056 (1988)
- Ellis RJ: The molecular chaperone concept. *Seminars in Cell Biology* 1:1-9 (1990a)
- Ellis RJ: Molecular chaperones: the plant connection. *Science* 250:954-959 (1990b)
- Fayet O, Ziegelhoffer T, Georgopoulos C: The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are

- essential for bacterial growth at all temperatures. *J. Bacteriol.* 171:1379-1385 (1989)
- Fork DC, Sen A, Williams WP: The relationship between heat-stress and photobleaching in green and blue-green algae. *Photosynthesis Res* 11:71-87 (1987)
- Fulson DR, Cline K: A soluble protein factor is required in vitro for membrane insertion of the thylakoid precursor protein, pLMCP. *Plant Physiol.* 88:1146-1153 (1988)
- Gatenby AA, Viitanen PV, Lorimer GH: Chaperonin assisted polypeptide folding and assembly: implications for the production of functional proteins in bacteria. *Trends in Biotech. Sci.* 8:354-358 (1990)
- Georgopoulos C, Ang D: The *Escherichia coli* groE chaperonins. *Seminars in Cell Biology* 1:19-25 (1990)
- Giovannoni SJ, Turner S, Olsen GJ, Barns S, Lane DJ, Pace NR: Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* 170:3584-3592 (1988)
- Glaczinski H, Kloppstech K: Temperature-dependent binding to the thylakoid membranes of nuclear-coded chloroplast heat-shock proteins. *Eur. J. Biochem.* 173:579-583 (1988)
- Glazer AN: Phycobilisomes. In: Packer L, Glazer AN (eds) *Met. Enzym. vol. 167: Cyanobacteria*: 304-312 (1988)
- Goloubinoff P, Christeller JT, Gatenby AA, Lorimer GH: Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on 2 chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature* 342:884-889 (1989)

- Gombos Z, Wada H, Murata N: Direct evaluation of effects of fatty-acid unsaturation on the thermal properties of photosynthetic activities, as studied by mutation and transformation of *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* in press (1991)
- Gupta RS, Picketts DJ, Ahmad S: A novel ubiquitous protein 'chaperonin' supports the endosymbiotic origin of mitochondrion and plant chloroplast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163:780-787 (1989)
- Gupta RS: Mitochondria, molecular chaperone proteins and the in vivo assembly of microtubules. *Trends in Biochem. Sci.* 15:415-418 (1990)
- Hagemann M, Wölfel L, Krüger B: Alterations of protein synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 after a salt shock. *J. Gen. Microbiol.* 136:1393-1399 (1990)
- Harlow E, Lane D (eds): *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. pp:471-510 (1988)
- Harrington HM, Alm DM: Interaction of heat and salt shock in cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 88:618-625 (1988)
- Hartl FU, Neupert W: Protein sorting to mitochondria: Evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* 247:930-938 (1990)
- Hugly S, Kunst L, Browse J, Somerville C: Enhanced thermal tolerance of photosynthesis and altered chloroplast ultrastructure in a mutant of *Arabidopsis* deficient in

- lipid desaturation. *Plant Physiol.* 90:1134-1142 (1989)
- Jager KM, Bergman B: Localization of a multifunctional chaperonin (GroEL protein) in nitrogen-fixing *Anabaena* PCC 7120. *Planta* 183:120-125 (1990)
- Katoh T: Phycobilisome stability. In: Packer L, Glazer AN (eds) *Met. Enzym.* vol. 167: *Cyanobacteria*: 313-318 (1988)
- Krishnan M, Nguyen HT, Burke JJ: Heat shock protein synthesis and thermal tolerance in wheat. *Plant Physiol.* 90:140-145 (1989)
- Krishnasamy S, Mannan RM, Krishnan M, Gnanam A: Heat-shock response of the chloroplast genome in *Vigna sinensis*. *J. Biol. Chem.* 263:5104-5109 (1988)
- Kunst L, Browse J, Somerville C: Enhanced thermal tolerance in a mutant of *Arabidopsis* deficient in palmitic acid unsaturation. *Plant Physiol.* 91:401-408 (1989)
- Kusukawa N, Yura T: Heat shock protein groE of *Escherichia coli*: key protective roles against thermal stress. *Genes&Dev.* 2:874-882 (1988)
- Kusukawa N, Yura T, Ueguchi C, Akiyama Y, Ito K: Effect of mutations in heat-shock genes groES and groEL on protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 8:3517-3521 (1989)
- Laemmli, UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)
- László A: The relationship of heat-shock proteins ,

- thermotolerance, and protein synthesis. *Exp. Cell Res.* 178:401-404 (1988)
- Lehel C, Gombos Z, Vigh L: Thermal adaptation induced changes in the heat shock response in cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Physiol.* in press (1991a)
- Lehel C, Wada H, Kovács E, Török Z, Gombos Z, Horváth I, Murata N, Vigh L: Identification of molecular chaperones in a cyanobacterium: Purification of a groEL-related heat shock protein. *Plant Mol. Biol.* in press (1991b)
- Lin C-H, Roberts JK, Key JL: Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings. Synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization. *Plant Physiol.* 74:152-160 (1984)
- Lindquist S: The heat shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55:1151-1191 (1986)
- Lindquist S, Craig EA: The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22:631-677 (1988)
- Lubben TH, Donaldson GK, Viitanen PV, Gatenby AA: Several proteins imported into chloroplasts form stable complexes with the groEL-related chloroplast molecular chaperone. *The Plant Cell* 1:1223-1230 (1989)
- Lubben TH, Gatenby AA, Donaldson GK, Lorimer GH, Viitanen PV: Identification of a groES-like chaperonin in mitochondria that facilitates protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7683-7687 (1990)
- Mannan RM, Krishnan M, Gnaniham A: Heat shock proteins of

- cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Plant Cell Physiol.* 27:377-381 (1986)
- Marshall JS, DeRocher AE, Keegstra K, Vierling E: Identification of heat shock protein hsp70 homologues in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:374-378 (1990)
- Moisyadi S, Harrington HM: Characterization of the heat shock response in cultured sugarcane cells. I. Physiology of the heat shock response and heat shock protein synthesis. *Plant Physiol.* 90:1156-1162 (1989)
- Moos M Jr, Nguyen NY, Liu T-Y: Reproducible high yield sequencing of proteins electrophoretically separated and transferred to an inert support. *J. Biol. Chem.* 263:6005-6008 (1988)
- Murata N: Low-temperature effects on cyanobacterial membranes. *J. Bioenerg. Biomem.* 21:61-75 (1989)
- Nagao RT, Kimpel JA, Key JL: Molecular and cellular biology of the heat-shock response. In: Scandalios JG, Wright TRF (eds) *Advances in Genetics* vol. 28: Genomic response to environmental stress. 235-274 (1990)
- Neidhardt FC, VanBogelen RA, Vaughn V: The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 18:295-329 (1984)
- Nover L, Scharf K-D, Neumann D: Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 9:1298-1308 (1989)

- Pakrasi HB, Diner BA, Williams JGK, Arntzen CJ: Deletion mutagenesis of the cytochrome b_{559} protein inactivates the reaction center of Photosystem II. *The Plant Cell* 1:591-597 (1989)
- Porter RD: DNA transformation. In: Packer L, Glazer AN (eds) *Met. Enzym.* vol. 167 *Cyanobacteria*:703-714 (1988)
- Price GD, Badger MR: Expression of human carbonic anhydrase in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942 creates a high CO_2 -requiring phenotype. Evidence for a central role for carboxysomes in the CO_2 concentrating mechanism. *Plant Physiol.* 91:505-513 (1989)
- Quinn PJ: Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. *J. Bioenerg. Biomem.* 21:3-19 (1989)
- Quinn PJ, Joó F, Vigh L: The role of unsaturated lipids in membrane structure and stability. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 53:71-103 (1989)
- Reed RH, Stewart WDP: Osmotic adjustment and organic solute accumulation in unicellular cyanobacteria from freshwater and marine habitats. *Marine Biol.* 88:1-9 (1985)
- Rippka RJ, Deruelles J, Herdman M, Waterbury JB, Stanier RY: Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111:1-61 (1979)
- Rothman JE: Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. *Cell* 59:591-601 (1989)

- Roy, H: Rubisco assembly: A model system for studying the mechanism of chaperonin action. *The Plant Cell*. 1:1035-1042 (1989)
- Schuster G, Evan D, Kloppstech K, Ohad I: Evidence for protection by heat-shock proteins against photoinhibition during heat shock. *EMBO J*. 7:1-6 (1988)
- Shively JM: Carboxysomes. In: Packer L, Glazer AN (eds) *Met. Enzym. vol. 167 Cyanobacteria*: 204-206 (1988)
- Skelly S, Fu C-F, Dalie B, Redfield B, Coleman T, Brot N, Weissbach H: Antibody to σ^{32} cross-reacts with DnaK: association of DnaK protein with *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5497-5501 (1988)
- Skinner MK, Griswold MD: Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with 2,5-diphenyloxazole in acetic acid and its comparison with existing procedures. *Biochem. J*. 209:281-284 (1983)
- Skowrya D, Georgopoulos C, Zylicz M: The *E. coli* dnaK gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell* 62:939-944 (1990)
- Stanier G: Fine structure of cyanobacteria. In: Packer L, Glazer AN (eds) *Met. Enzym. vol. 167 Cyanobacteria*: 157-172 (1988)
- Straus DB, Walter WA, Gross CA: The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ^{32} . *Nature* 329:348-351 (1987)

- Thomas PG, Dominy PJ, Vigh L, Mansourian AR, Quinn PJH, Williams WP: Increased thermal stability of pigment-protein complexes of pea thylakoids following catalytic hydrogenation of membrane lipids. *Biochim Biophys Acta* 849:131-140 (1986)
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354 (1979)
- VanDyk TK, Gatenby AA, LaRossa RA: Demonstration by genetic suppression of interaction of GroE products with many proteins. *Nature* 342:451-453 (1989)
- Vierling E, Harris LM, Chen Q: The major low-molecular-weight heat shock protein in chloroplasts shows antigenic conservation among diverse higher plant species. *Mol. Cell. Biol.* 9:461-468 (1989)
- Vigh L, Gombos Z, Joó F: Selective modification of cytoplasmic membrane fluidity by catalytic hydrogenation provides evidence on its primary role in chilling susceptibility of the blue-green alga, *Anacystis nidulans*. *FEBS Lett.* 191:200-204 (1985)
- Vigh L, Gombos Z, Horváth I, Joó F: Saturation of membrane lipids by hydrogenation induces thermal stability in chloroplast inhibiting the heat-dependent stimulation of Photosystem I-mediated electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* 979:361-364 (1989)
- Vigh L, Lehel C, Török Z, Gombos Z, Balogh N, Horváth I:

- Factors affecting thylakoid thermal stability in cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803. In: Quinn PJ, Harwood J (eds) Plant lipid biochemistry, structure and utilization. Portland Press Limited, London, pp: 373-381 (1990)
- Viitanen PV, Lubben TH, Reed J, Goloubinoff P, O'Keefe DP, Lorimer GH: Chaperonin-facilitated refolding of ribulosebisphosphate carboxylase and ATP hydrolysis by chaperonin 60 (groEL) are K^+ dependent. *Biochem.* 29:5665-5671 (1990)
- Wada H, Gombos Z, Murata N: Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation. *Nature* 347:200-203 (1990)
- Webb R, Reddy KJ, Sherman LA: Regulation and sequence of the *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 groESL operon, encoding a cyanobacterial chaperonin. *J. Bact.* 172: 5079-5088 (1990)
- Williams WP, Quinn PJ: The phase behavior of lipids in photosynthetic membranes. *J. Bioenerg. Biomem.* 19:605-624 (1987)
- Yatvin MB: Influence of membrane-lipid composition on translocation of nascent proteins in heated *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 901:147-156 (1987)
- Yu J, Vermaas WFJ: Transcript levels and synthesis of photosystem II components in cyanobacterial mutants with inactivated photosystem II genes. *The Plant Cell*: 2:315-322 (1990)

Zeuthen ML, Dabrowa N, Aniebo CM, Howard DH: Ethanol tolerance and the induction of stress proteins by ethanol in *Candida albicans*. J. Gen. Microbiol. 134: 1375-1384 (1988)