

Kismolsúlyú hősokkfehérjék membrán kölcsönhatásai

Ph.D. értekezés

Balogi Zsolt

Témavezetők:

Horváth Ibolya, Ph.D.

Török Zsolt, Ph.D.

Magyar Tudományos Akadémia,

Szegedi Biológiai Központ,

Biokémia Intézet

2006.

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések	4-5
Bevezetés	6
Célkitűzések	7-8
Irodalmi áttekintés	9-41
1. Biológiai membránok	9-26
1.1. Biológiai membránok fölépítése és szerkezete	9-10
1.2. Biológiai membránok fizikai állapotát és funkcióját befolyásoló tényezők ..	11-13
1.2.1. <i>Lipidek és fehérjék</i>	14
1.3. Hőmérséklet-akklimatizáció és termostabilitás	15-16
1.4. Prokarióta membránok	16-26
1.4.1. <i>Synechocystis</i> PCC 6803	16-22
1.4.2. <i>Escherichia coli</i>	23-26
2. Hősokkfehérjék	26-28
3. Kismolsúlyú hősokkfehérjék	29-41
3.1. A kismolsúlyú hősokkfehérjék szerkezete, oligomerizációja	29-32
3.2. A kismolsúlyú hősokkfehérjék chaperon aktivitása	33-34
3.3. Prokarióta és növényi kismolsúlyú hősokkfehérjék funkciói	35-39
3.4. Emlős kismolsúlyú hősokkfehérjék funkciói	39-40
3.5. A kismolsúlyú hősokkfehérje kutatás jelentősége és távlatai	40-41
Anyagok és módszerek	42-55
1. <i>Synechocystis</i> PCC 6803	42-51
1.1. <i>Synechocystis</i> sejtek és növesztési körülményeik	42
1.2. <i>In vivo</i> tilakoid stabilitás és szerkezet vizsgálatok	42-44
1.2.1. <i>Oxigén fejlődés mérés</i>	42-43
1.2.2. <i>Klorofill a fluoreszcencia mérés</i>	43
1.2.3. <i>Fluoreszcencia anizotrópia mérés</i>	43-44
1.2.4. <i>Membrán mikroheterogenitás vizsgálat</i>	44
1.3. Tilakoid membrán és lipidek izolálása, elválasztása, analízise és előkészítése	44-46

1.3.1. Tilakoid membrán izolálása, sejtfractionálás	44
1.3.2. Lipidek izolálása, elválasztása és analízise	45
1.3.3. Lipid mintaelőkészítés	45-46
1.4. Gél elektroforézis, immunoblotting és autoradiográfia	46-47
1.5. <i>Synechocystis</i> Hsp17 túltermelése, izolálása és tisztítása	47-48
1.6. <i>In vitro</i> membrán stabilitás és lipid-fehérje kölcsönhatás vizsgálatok	49-51
1.6.1. „Monolayer” kísérletek	49-50
1.6.2. Lipid membrán fluiditás mérések	50
1.6.3. FTIR és DSC mérések	50
1.6.4. Lipid-fehérje kötés vizsgálat biokémiai módszerrel	51
2. <i>Escherichia coli</i>	51-55
2.1. <i>Escherichia coli</i> sejtek és növesztési körülményeik	51-52
2.2. Membrán fracionálás (külső és belső membrán)	52
2.3. Gél elektroforézis és immunoblotting	52-53
2.4. <i>In vivo</i> membrán fenotípus vizsgálatok	53-54
2.4.1. NPN fluoreszcencia követésen alapuló permeabilitás mérések	53-54
2.4.2. Membrán fluiditás mérések	54
2.5. Lipid extrakció, elválasztás, analízis és mintaelőkészítés	54
2.6. <i>In vitro</i> lipid-fehérje kölcsönhatás vizsgálatok	55
2.6.1. Lipid membrán fluiditás mérések	55
2.6.2. „Monolayer” kísérletek	55
Eredmények és megvitatásuk	56-107
1. <i>Synechocystis</i> PCC 6803	56-75
1.1. A tilakoid membrán hő- és fényakklimatizációja	56-59
1.2. Lipidváltozások a rövidtávú alkalmazkodás szolgálatában?	60-64
1.3. A Hsp17 hatékony eszköz a membrán stabilizációban	64-68
1.4. Hsp17 és MGlcDG: a membrán lipid fázis regulátorai	68-75
2. <i>Synechocystis</i> Hsp17 pontmutációk specifikusan módosítják a kismolsúlyú hősokkfehérje membrán aktivitását	76-94
2.1. A sHsp oligomerizáció szerepe a lipid kölcsönhatásban	76-81
2.2. N-terminális Hsp17 pontmutánsok	82-94
2.2.1. Hsp17 N-terminális vég mint lipid kölcsönható régió	82-90
2.2.2. A Q16R N-terminális Hsp17 mutáció extra stabilizációt kölcsönöz a	

<i>fotoszintetikus funkciónak</i>	91-94
3. <i>Escherichia coli</i>	95-107
3.1. Az IbpA és/vagy IbpB hiánya membrán fenotípus változást eredményez	95-103
3.2. A Δ IbpAB sejtben IbpA/B expresszióval részlegesen helyreállítható a vad típusú membrán fenotípus	103-107
Eredmények összefoglalása	108-110
Köszönetnyilvánítás	111
Publikációs lista	112
Referenciák	113-125
Összefoglalás	126-130
Summary	131-134

RÖVIDÍTÉSEK

14:0 mirisztinsav

15:0 pentadekánsav

16:0 palmitinsav

16:1 palmitoleilsav

16:2 hexadekadiénsav

18:0 sztearinsav

18:1 olajsav

18:1v vakcénsav

18:2 linolsav

20:1 (Δ 11) 11-eikozénsav

c17:0 ciklo-heptadekánsav

c19:0 ciklo-nonadekánsav

α -18:3 18:3(9, 12, 15), α -linolénsav

γ -18:3 18:3(6, 9, 12), γ -linolénsav

ω -18:4 18:4(3, 6, 9, 12), ω -oktadekatetraénsav

ANS 8-anilino-1-naftalin szulfonsav

BA benzil-alkohol

Chl *a* klorofill *a*

CL kardiolipin

DCBQ 2,6-diklór-benzokinon

DGDG digalaktozil-diacilglicerol

DMPG dimirisztoil-foszfátidil-glicerol

DOPG dioleil-foszfátidil-glicerol

DPH 1,6-difenil-1,3,5-hexatrién

DSC különbségi kalorimetria

ECL „enhanced chemiluminescence”

FTIR Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia

GC-MS gázkromatográfiához csatolt tömegspektrometriás analízis

GSH redukált glutation

H_{II} fordított hexagonális fázis

HPLC nagynyomású folyadékkromatográfia
Hsp hősokkfehérje
sHsp kismolsúlyú hősokkfehérje
IPTG izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
L α lipid folyadékkristályos fázis
L β lipid gél fázis
LC-MS folyadékkromatográfiához csatolt tömegspektrometriás analízis
LPE lyso-foszfátidil-etanolamin
LUV nagyméretű, egyrétegű vezikula
MGDG monogalaktozil-diacilglicerol
MGlcDG monoglükozil-diacilglicerol
MLV többrétegű vezikula
NPN 1-N-fenilnaftilamin
OPPG 1-oleil-2-palmitoil-foszfátidil-glicerol
PE foszfátidil-etanolamin
PG foszfátidil-glicerol
POPG 1-palmitoil-2-oleil-foszfátidil-glicerol
PS foszfátidil-szerin
PSI I-es fotokémiai rendszer
PSII II-es fotokémiai rendszer
ROS reaktív oxidációs specieszek
SDS-PAGE SDS poliakrilamid gélelektroforézis
sn-1 a lipid glicerinváz 1-es pozíciója
sn-2 a lipid glicerinváz 2-es pozíciója
SQDG szulfokvinozil-diacilglicerol
SUV kisméretű, egyrétegű vezikula
T_{hex} fluid → fordított hexagonális lipid fázisátmenet (hőmérséklete)
T_m gél → fluid lipid fázisátmenet (hőmérséklete)
TLC vékonyréteg kromatográfia
TMA-DPH 1-(4-trimetilammónium)-6-fenil-1,3,5-hexatrién
TNL összes neutrális lipid
TPL összes poláros lipid
WT vad típusú

BEVEZETÉS

Minden élőlény szoros kölcsönhatásban van a környezetével. A környezeti tényezők komoly kihívást jelenthetnek az egyed számára, amely speciális válaszreakciókkal -stresszválaszokkal- igyekszik a káros hatásokat kompenzálni. Károsodások érhetik a sejt minden alkotóelemét, mint pl. a fehérjéket (aggregáció, oxidáció), vagy morfológiai megközelítéssel, pl. a membránokat. Ez utóbbiak őrzik a sejt integritását, jelentősen hozzájárulnak a sejt fölépítés- és működésbeli szerveződéséhez, ill. aktív szerephez jutnak a jelátviteli folyamatokban. Ugyanakkor mind lokalizációjuk, szerkezetük, mind kémiai összetételük alapján a különféle stresszhatások potenciális célpontjául szolgálhatnak.

A Membrán- és Stresszbiológiai Csoport munkássága a membrán, ill. a membrán és stresszfolyamatok kapcsolatának tanulmányozására összpontosul, különös tekintettel a membrán lipid fázis szerepére. Hipotézisünk szerint a membránok képesek egyfajta stressz érzékelőként szolgálni (pl. hőmérőként a membrán fluiditás révén, ill. oxidatív stressz érzékelésére oxidációs termékeken keresztül). Ez valamilyen jelátviteli úton át elindít(hat)ja a stresszválasz folyamatát: hősokkfehérjék (Hsp-k) termelődését, lipidváltozásokat, stb., amelyek segíthetnek az organizmusnak a megváltozott körülményekkel megbirkózni. Az eddigi ismereteink alapján a Hsp-k több módon is védhetik a potenciálisan veszélyeztetett célpontokat, úgy mint (i) szubsztrát-Hsp komplexek képződésével megóvhatják, ill. helyreállíthatják a fehérjéket, (ii) membránokhoz (lipidekhez) kötődve megőrizhetik azok integritását és funkcionalitását. Mindkét esetben a maximális vagy elégséges védelem egy visszacsatolós szabályzási mechanizmuson keresztül a hősokkválasz lecsengéséhez vezethet (Vígh és Maresca, 2002; Vígh és mtsai, 2005).

Dolgozatom témája a kismolsúlyú hősokkfehérjék (sHsp-k) membrán (lipid) kölcsönhatásainak tanulmányozása, membránkötésük jelentőségének és mechanizmusának megértése prokarióta modellrendszerek, *Escherichia coli* és *Synechocystis PCC 6803* (növényi modellként szolgáló fotoszintetizáló cianobaktérium) segítségével.

CÉLKITŰZÉSEK

I. A *Synechocystis PCC 6803* egyetlen sHsp-je a Hsp17, melyről a közelmúltban számos publikáció jelent meg. Többek között ismeretes, hogy hőstressz során kölcsönhat és ún. „refolding-ra alkalmas állapotban”-ban konzervál bizonyos fehérjéket (Giese és Vierling, 2002 és 2004). Ugyanakkor tilakoid membránokhoz (is) kötődve, ezáltal növelve azok stabilitását, közvetlen vagy közvetett módon jelentős mértékben óvja a fotoszintetikus funkciót a hő és fény okozta károsodásoktól (Török és mtsai, 2001; Asadulghani és mtsai, 2003; Nitta és mtsai, 2005). Egy, a membrán lipid fázisát szelektíven módosító kísérlet arra utal, hogy a Hsp17 expressziója és membrán asszociációja direkt és kölcsönös kapcsolatban áll a tilakoid membrán lipidjeinek fizikai állapotával, annak fluiditás jellemzőjével (Horváth és mtsai, 1998).

1/a. Annak érdekében, hogy a Hsp17-membrán kölcsönhatás hőaklimatizációban betöltött szerepét alapjaiban megérthessük, kísérleteket terveztünk annak földerítésére, hogy **milyen tényezők játszanak szerepet a tilakoid membrán megnövekedett stabilitásának, és ezzel összefüggésben, a fotoszintetikus funkció termorezisztenciájának kialakulásában.**

Célul tűztük ki, hogy

- megvizsgáljuk a fény- és hőedzés szerepét a termotolerancia kialakulásában (sötétben és fényben hőaklimatizált sejtek fotoszintetikus aktivitásának mérésével *in vivo*),
- föltérképezzük az akklimatizált membránok összetételében, fizikai jellemzőiben, szerkezetében és fölépítésében történt változásokat,
- jellemezzük a membránok lipid fázisában történt változásokat, és
- analizáljuk a potenciális stabilizáló tényezők lehetséges hatásmechanizmusát, és az esetleges specifikus/ szelektív sHsp-lipid kölcsönhatások lehetőségét.

1/b. A Hsp17-lipid kölcsönhatás természetének alaposabb jellemzésére részletes *in vitro* kísérletekbe kezdünk.

A kölcsönható lipid komponens változtatásával kívántuk vizsgálni a sHsp lipid kölcsönhatásának mechanizmusát a lipid fejcsoport és a hidrofób zsírsav régiókban.

2. A sHsp oligomerizációs szerkezetének és/vagy potenciális kölcsönható részeinek módosításával a Hsp17 és tilakoid membrán (lipid) kölcsönhatás

további analizését céloztuk meg mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között. Egyidejűleg arra is választ kerestünk, hogy **a sHsp-lipid kölcsönhatás mechanizmusának ismeretében lehet-e azt irányítottan befolyásolni.** Kooperációs partnerünk (E. Vierling, Tucson, AZ, USA) munkacsoportja a Hsp17 olyan pontmutánsait állította elő, és tesztelte *in vitro/in vivo* körülmények között, amelyek oligomerizációs hajlamukban, fehérjevédő képességükben különböznek a vad típustól, ill. a különféle pontmutánsokat expresszáló sejtek különböző mértékben tolerálják a stresszhatást (Giese és Vierling, 2002 és 2004; Giese és mtsai, 2005). A vad típusú (WT) mellett hat fehérjét tisztítottunk ki (S2Y, L9P, Q16R, L66A, F102S, V143A), amelyek mind a fentebb felsorolt tulajdonságok tekintetében, mind a mutáció helyét illetően széles határok közötti vizsgálódáshoz nyújtanak lehetőséget.

II. Az *Escherichia coli* két sHsp-je az IbpA és IbpB. Ezek a „kis chaperon-ok” extrém magas hőmérsékleten gátolják a protein denaturációt *in vivo*. Szignifikáns mértékű fehérjevédelmet azonban csak huzamosabb idejű hőstressznek kitett sejtekben mutattak (Kuczynska-Wisnik és mtsai, 2002). Egy másik tanulmány - IbpA/B túltermelő sejt vonalakat használva- ugyanakkor rámutatott, hogy az IbpA/B jóval gyorsabban is képes lehet a sejt túlélését befolyásoló védelmet nyújtani (Kitagawa és mtsai, 2000). Mindez azt sugallta, hogy a sHsp-k a fehérjevédelmen kívül más védelmi funkciót is elláthatnak stressz körülmények között. Ez a fölismerés és az a tény, hogy az IbpA/B membránokhoz asszociált (Miyake és mtsai, 1993; Laskowska és mtsai, 1996; Kuczynska-Wisnik és mtsai, 2002), továbbá, hogy az *E. coli* hő sokkválasz beindítása, sőt a termorezisztencia kialakulása pusztán a membrán lipid fázis szelektív módosításával elérhető (Shigapova és mtsai, 2005) vezetett a kérdésfelvetéshez, hogy **vajon az IbpA/B szerepet játsz(hat)nak-e az *E. coli* membrán(ok) védelmében.**

Ennek megválaszolására Δ IbpAB és WT sejteket teszteltünk *in vivo*, membrán fenotípusukban található különbségek után kutatva, ill. tisztított fehérjék lipid kölcsönhatásait kívántuk vizsgálni *in vitro*.

Ugyanakkor a Δ IbpAB kontsrukcióban az IbpA-t, IbpB-t, IbpAB-t túltermeltetve vizsgáltuk a sHsp-k közvetlen membránvédő szerepét, valamint a két sHsp esetleges funkcióbeli különbségét vagy együttműködését.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

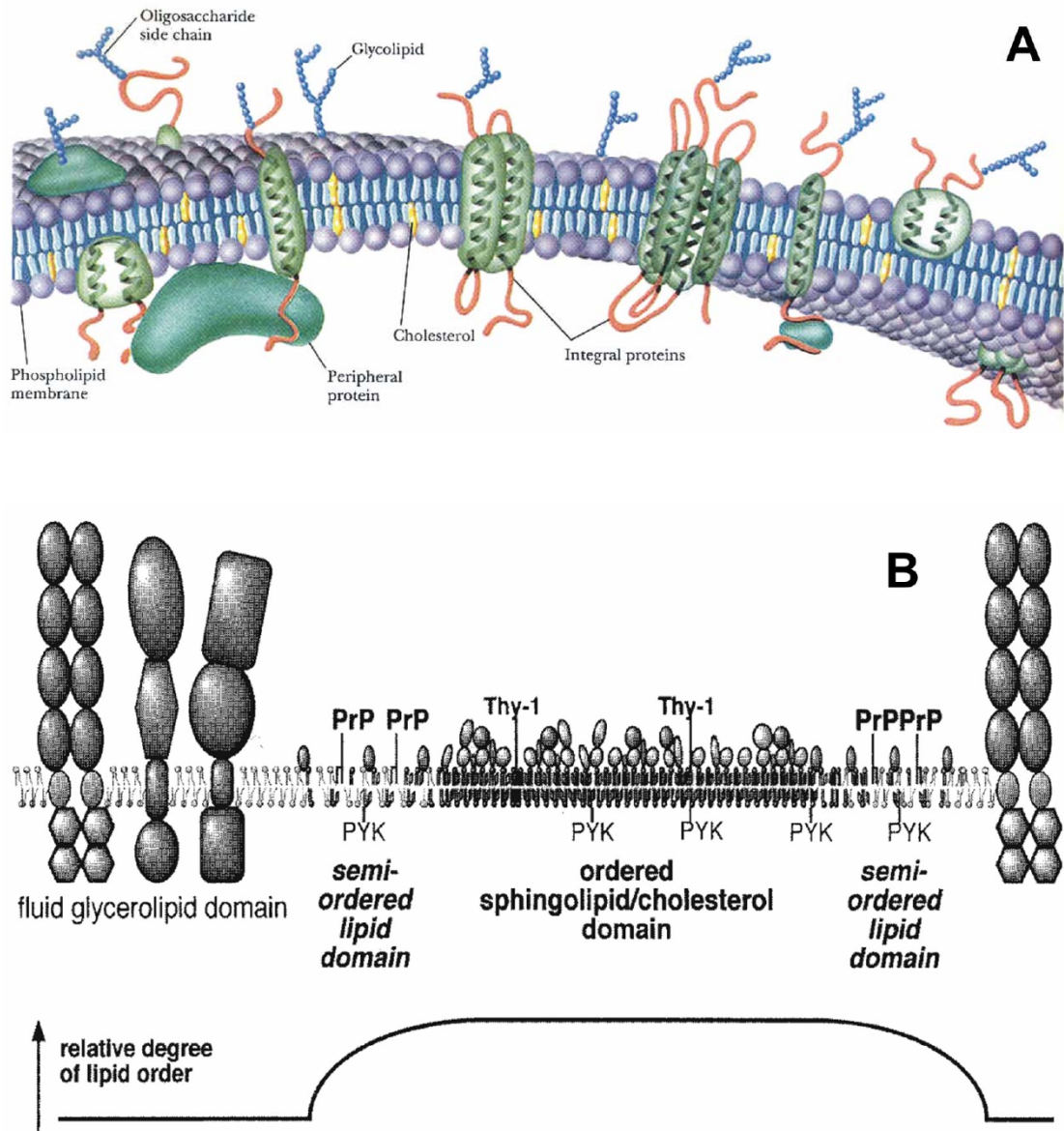
1. Biológiai membránok

A biológiai membránok minden sejt életében fontos szerephez jutnak. Jelenlétük biztosítja a *szerkezeti integritást*, elhatárolja a sejtet a környezetétől, illetve magasabbrendű élőlények esetében a különböző organelumok határvonalait képezik. Ennél azonban jóval többre hivatottak a membránok, *aktív közvetítő*ként működnek az azokat körülvevő külső és belső tér között: szabályozott módon előmozdítják vagy épp gátolják ionok, molekulák, ill. az információ áramlását. De nem csak *jelátviteli folyamatok* elemei avagy kiindulópontjai lehetnek, hanem számos kulcsfontosságú életfolyamat szinterei, úgy mint *fotoszintézis, mitokondriális elektrontranszport és oxidatív foszforiláció, DNS replikáció prokariótákban* (Gennis, 1989).

1.1. Biológiai membránok fölépítése és szerkezete

A biológiai membránok lényegében lipidek kettősrétegébe ágyazott fehérjék halmaza. A két fő alkotóelemhez kötődhetnek még szénhidrátok, glikolipidek vagy glikoproteinek formájában. A *membránalkotók* azonban olyan nagymértékű sokszínűséget mutat(hat)nak, hogy a membrán csupán az *összetétel* szempontjából is meglehetősen bonyolult rendszernek tekinthető, mivel a sok komponens -aligha teljesen ismert- kölcsönhatásaival kell számolnunk, amikor a *membrán szerkezetét* próbáljuk megjósolni. Tovább bonyolítja a „modellezés” nehézségeit, hogy a membránok tulajdonságait nagymértékben befolyásol(hat)ják, hogy azt valós, fiziológias környezetben, vagy *in vitro* körülmények között vizsgáljuk. A még mindig érvényben lévő *Singer-Nicolson féle fluid-mozaik elképzelés* szerint a membrán lipidek és proteinek kétdimenziós oldata, amelyben a lipid kettősréteg fluid mátrix, amely oldószerül szolgál a fehérjék számára. A modell szerint mind a lipidek, mind pedig a proteinek szabadon foroghatnak és oldalirányban elmozdulhatnak (Singer és Nicolson, 1972) (1/a. ábra). Egy újabb elképzelés szerint elkülönült lipid és lipid-fehérje mezők létezhetnek a membránban, melyek kialakulását a membránkomponensek közötti specifikus kölcsönhatások okozhatják. Az ún. „*Raft*

modell” szerint a membrán fölépítése mind laterális, mind transzverzális irányban heterogénnek tekinthető (Simons és Toomre, 2000) (1/b. ábra).

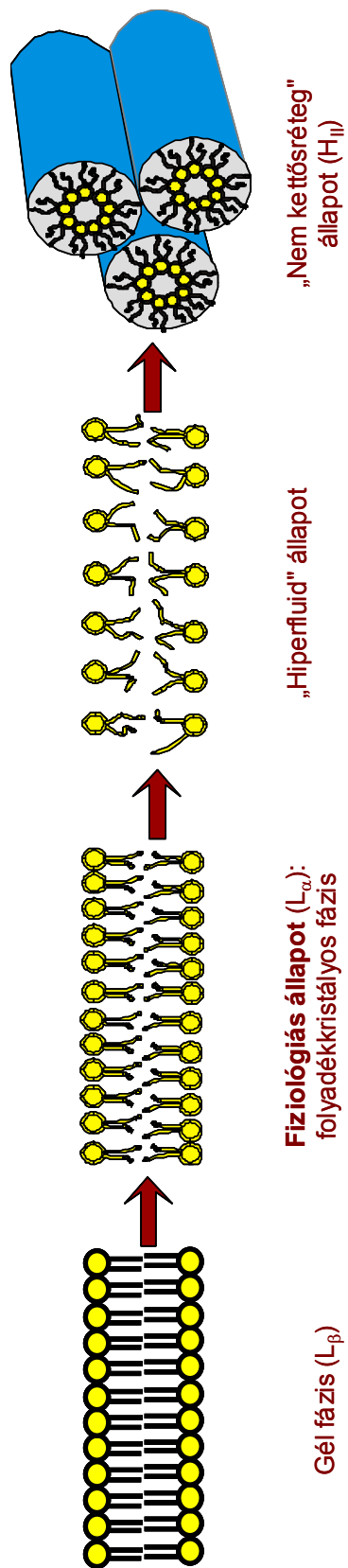


1. ábra A Singer-Nicolson féle fluid-mozaik (A) (Garrett és Grisham, 1999) és a „Raft” (B) (Madore és mtsai, 1999) membrán modell.

1.2. Biológiai membránok fizikai állapotát és funkcióját befolyásoló tényezők

A *membrán fluiditás* lényegében a membrán, mint kolloid halmaz viszkozitásának reciprokaként értelmezhető. Ha azonban ezt a kolloid struktúrát nem a fluid-mozaik elmélet által javasolt „oldatnak” tekintjük, akkor fontos megjegyezni, hogy a membrán különböző szegmensei az átlagértétől eltérő mikroviszkozitással bírhatnak (Lakowicz, 1984). Ennek jelentősége az, hogy egyes funkcionálisan fontos fehérjéket nagyban befolyásolhatja az azt körülvevő közvetlen (lipid) környezet, mely környezet jellemzői akár jelentősen különbözhetnek a membrán többi részének fizikai állapotától. A raft modell arra (is) föl hívja a figyelmet, hogy amikor a membrán *átlagos fluiditás jellemzőjéről* beszélünk, akkor nem biztos, hogy az kellőképpen leírja a membrán funkcionalitása szempontjából kitüntetett *mikrodomén fizikai állapotát* (Vereb és mtsai, 2003).

Bár a fluiditás jellemzés nem nyújt teljeskörű képet a membrán fizikai-szerkezeti változásairól, mégis meglehetősen jól visszatükrözi a membránt befolyásoló külső környezeti ill. belső szerkezeti tényezők hatását. Ez utóbbiak közé sorolandók a membrán alkotóelemeinek, azaz a *lipideknek* (pl. *zsírsavtelítetlenség*) és *fehérjéknek* a minősége és mennyisége. Ezen belső modulátorok aránya vagy akár minősége megváltozhat stresszhatások, vagyis külső környezeti tényezők (pl. *hőmérséklet*) hatására. Ugyanakkor a külső környezeti tényezők közvetlenül is befolyásolják a membrán fizikai állapotát. A hőmérséklet a membrán komponenseinek függvényében módosítja a lipid kettősréteg rendezettségét. A membránalkotó lipidek az összes tényező eredőjének függvényében főként *gél*, *folyadékkristályos (fluid)* vagy nem kettősréteget alkotó, *fordított hexagonális fázisokat* (H_{II}) vehetnek föl (Gennis, 1989) (2. ábra). Ezek alapvetően meghatározzák a membránok dinamikai tulajdonságait, úgy mint rigiditását (a fluiditás reciproka), flexibilitását, permeabilitását és ezzel összefüggésben működőképességének minőségét és mértékét is. A biológiai membránok jellemzően a folyadékkristályos állapotot igyekeznek fölvenni, de pl. fotoszintetikus szervezetekben ill. membránokban a fordított hexagonális fázis is előfordul. Ez utóbbiak megjelenése pl. szélsőséges hőmérsékleti körülményekhez kapcsolódik, szerepük azonban



2. ábra A membránalkotó lipidek által fölvehető fontosabb állapotok a növekvő hőmérséklet függvényében (Gennis, 1989).

meglehetősen vitatott (Uemura és mtsai, 1995; Williams, 1998). Gounaris és mtsai (1983 és 1984) azt az érdekes megfigyelést tették, hogy magashőmérsékleti stressz során a fotoszintetikus reakciócentrumok (PSI és PSII) károsodásának küszöbhőmérséklete egybeesik a nem kettősréteg fázisok membránban történő megjelenésével. Mindezt úgy értelmezték, hogy a hőstressz destabilizálja a lipidek, főként a *nem kettősréteg-képző lipidek és a fehérjék közötti kölcsönhatásokat*, majd a H_{II} megjelenéséhez ill. a fehérjék károsodásához vezet. Bár ezt a feltevésüket -olyan ozmolitok alkalmazásával, amelyek H_{II} -t indukálnak- nem sikerült igazolniuk, továbbra sem zárták ki a nem kettősréteg-képző lipidek lehetséges szerepét a PSII fehérje komplexek szerkezeti és funkcionális épségében (Páli és mtsai, 2003). Megjegyzendő, hogy az alkalmazott ozmolitok egymástól független hatást fejtettek ki az izolált membránok fehérje ill. lipid komponenseire, így az ezek közötti kapcsolat vizsgálatára az ozmolitok nem bizonyultak hathatós eszköznek (Williams és Gounaris, 1992; Williams és mtsai, 1992). A nem kettősréteg-képző lipidek és ezzel összefüggésben a H_{II} megjelenésének membrán funkcionalitását érintő hatásai annál is inkább megfontolandóak, mivel számos közlemény utal arra, hogy a membrán lipidek, ill azok fizikai állapotának módosításával jelentősen befolyásolható a fotoszintetikus funkció hőstabilitása (Horváth és mtsai, 1986; Thomas és mtsai, 1986; Sharkey, 2000; Murakami és mtsai; 2000; Morgan-Kiss és mtsai, 2002; ld. továbbá 20. oldal). *A H_{II} membránon belüli jelenléte*, akár közvetlen kapcsolatban áll a fotoszintetikus komplexekkel, akár nem, mindenképpen *kedvezőtlen* a membrán integritásának megőrzése szempontjából (Quinn, 1988), így *annak elkerülése akár megelőzés, akár eltávolítás formájában* alapvető érdekként jelenhet meg a sejt számára. Ennek megfelelően a H_{II} membránon belüli megjelenése többnyire átmeneti jelenség (Epanand, 1998). Az elképzelés, miszerint -adott körülmények között- *H_{II} -ok* membránból történő *lefűződésével* stabilizálódhat a membrán szerkezet, több mint valószínű. Ez ugyanis alternatív védelmi eszköz lehet a fehérje/lipid ill. nem kettősréteg-képző/kettősréteg-képző lipid arányok szabályzásán keresztül (Gounaris és mtsai, 1984; Uemura és Steponkus, 1997; Garab, 2000).

1.2.1. Lipidek és fehérjék

A *lipidek* poláros fejcsoport és hidrofób alkilánc részekből fölépülő biomolekulák. Mindkét régió igen nagyfokú változatosságot és specifikusságot mutathat. Egy általános -a membrán fluiditását szabályozni képes- lipid jellemző a *zsírsav alkiláncok telítettségének* mértéke, azaz kettős kötéseinek száma ill. elhelyezkedése (Vigh és mtsai, 1994). Természetesen nem csak a zsírsav láncok telítettsége, hossza, konformációja, pozíciója, hanem a fejcsoport minősége (pl. ionos, poláros; foszfo- vagy galakto-), mérete is alapvető fontossággal bírnak a lipidek intramolekuláris mozgásaiban (laterális diffúzió, rotáció, „flip-flop”) és azok intermolekuláris kölcsönhatásaiban is (Garrett és Grisham, 1999).

A membrán *fehérje/lipid* aránya széles határok között változhat, hozzávetőlegesen 20-80 % fehérje mennyiséggel jellemezhető, függően attól, hogy milyen és milyen állapotú membránról van szó. A fehérjék jó része közvetlen kapcsolatban, kölcsönhatásban van lipidekkel, ám előfordulhatnak protein- ill. lipidszegény régiók, ahol egyik vagy másik komponens gyakorlatilag döntően meghatározó (Mayor és mtsai, 1992). A membrán fehérjék egy része mélyen, *integránsan* a kettősrétegben ül, míg más proteinek csak *perifériálisan* kötődnek, elsősorban a lipid fejcsoport részekhez, vagy akár egyéb membrán fehérjékhez. A kölcsönhatás erőssége függ annak minőségétől, amely lehet kovalens vagy másodlagos kémiai erők által összetartott. Az utóbbi azonban meglepően erős lehet (pl. több hidrogénhid-kötés) és kétségkívül dinamikusabb, reverzibilisebb kapcsolódási forma, amely rendkívüli előnyökkel bírhat egy biológiai rendszerben (Lodish és mtsai, 1995). Ezekon túlmenően talán az egyik legfontosabb jellemző egy (lipid-fehérje) kölcsönhatásra, hogy az mennyire *specifikus*. Ebben döntő szereppel bírnak a sztérikus tényezők, azaz, hogy egyik ill. másik biomolekula kölcsönható része mennyire illik a másik kölcsönható fél „aktív” részéhez, akár enzimszerű kulcs-zár csatlakozással (Lee, 2003).

1.3. Hőmérséklet-aklimatizáció és termostabilitás

Minden élőlényre hat a környezete, amelynek változásait egy bizonyos tűréshatáron belül képes *tolerálni*, elviselni. Ha az életkörülmények nem ideálisak az organizmus számára, akkor az -bizonyos határokon belül- *alkalmazkodik* a megváltozott feltételekhez. Amennyiben a stressz mértéke túllépi az élőlény alkalmazkodó képességének határát, akkor az a stressz nagyságával arányos mértékben *károsodik*. Ha a károsodás mértéke meghaladja az élőlény által elviselhető szintet, akkor az élőlény elpusztul. Ha azonban egyfajta „*kondicionáló stresszel*” *hozzászoktatjuk* az organizmust a nagyobb megpróbáltatásokhoz, akkor jelentősen megnövelhetjük *ellenálló képességét*. Rövid távú *aklimatizációról* beszélünk, ha az élőlény rövid ideig van kitéve hirtelen megváltozott körülményeknek, ill. hosszú távú aklimatizációról abban az esetben, ha az adott genotípus toleranciájában megnövekedett fenotípust hoz létre. Amennyiben az alkalmazkodás mértéke genotípus változással jár együtt, akkor *adaptációs* jelenség lép fel (<http://ecology.botany.ufl.edu/ecologyf02/homeostasis.html>).

Egy fontos környezeti tényező, különösen pl. a helyváltoztatásra nem képes növények esetében, a hőmérséklet. A gyakorlatból is ismeretes, hogy mekkora károkat és nehézségeket tud okozni a *magashőmérsékleti stressz*, egészen az egyszerűbb prokarióta élőlényektől a növényeken át az emlősökig. Ennek ellensúlyozására egy meglehetősen általános védekezési mechanizmus a *hősokkválasz*. Ez a folyamat többek között magában foglalja a *Hsp*-k kifejeződését, indukálódását ill. azok stresszelhárító ténykedését, vagy *lipidváltozásokat*, melyek a membrán integritását igyekeznek megőrizni (Glatz és mtsai, 1999 és 2003). A *Hsp*-k klasszikus védelmi funkciója a citoszolikus vagy egyéb fehérjék megóvása a denaturációtól, aggregációtól (Bukau, 1993). Egyre több irodalmi adat azonban arra nyújt példát, hogy a *Hsp*-k membránokhoz hozzákötve képesek azok integritását, (termo)stabilitását védeni ill. növelni, avagy a membránhoz csatolt funkció -pl. fotoszintézis- működőképességét megővni (Vígh és Maresca, 2002). A növényi életfolyamatok közül a *fotoszintézis*, egy tilakoid membránhoz kötött létfontosságú funkció, a legérzékenyebb a magashőmérsékleti stresszre (Berry és Björkman, 1980). Ennélfogva a fotoszintetizáló élőlények hőstabilitásában elsődleges szerep jut a tilakoid membrán stabilitásának. Rövid távú aklimatizáció során a membrán átlagos

lipidösszetételében nem mehet végbe nagymértékű változás, így a membrán védelmében jelentősebb szerephez juthatnak a membránhoz kötődő és azt védeni képes Hsp-k. Hosszabb edzés során azonban lehetőség van a lipid metabolizmus és ezzel párhuzamosan a lipid összetétel számottevő változásaira is. Ezek érinthetik az egyes lipidek közötti arányokat vagy szabályozhatják a zsírsavak telítettségi szintjét, sőt akár változhat a zsírsavak pozícionális megoszlásának aránya is (Murata és Nishida, 1987; Lindblom és mtsai, 2002; Shigapova és mtsai, 2005).

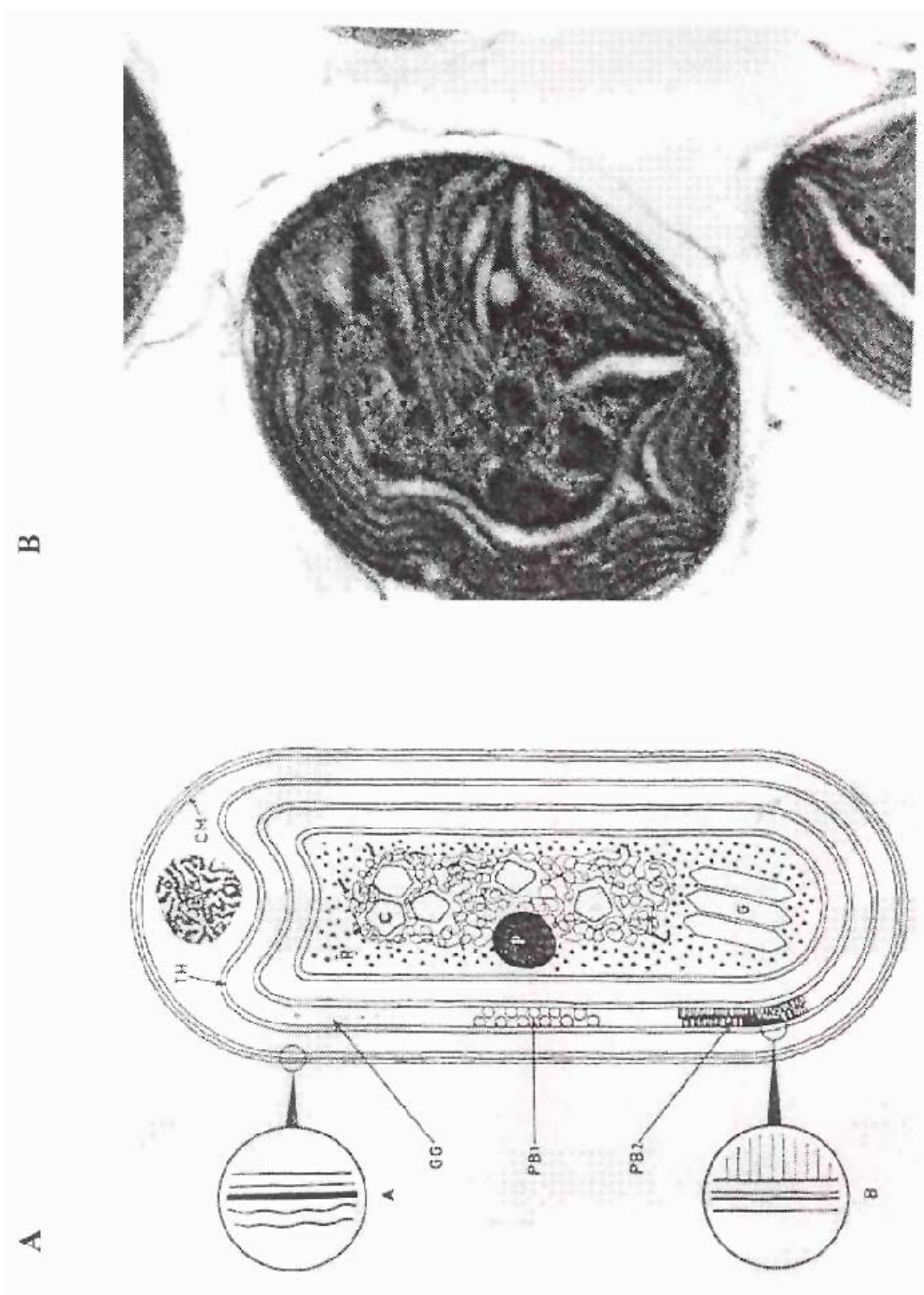
1.4. Prokarióta membránok

A prokarióta sejtek sejtmag, organelumok és citoszkeleton nélküli életformák, vagyis membránrendszerük, fölépítésük és működésük is lényegesen egyszerűbb az eukarióta sejtekhez képest (Garrett és Grisham, 1999).

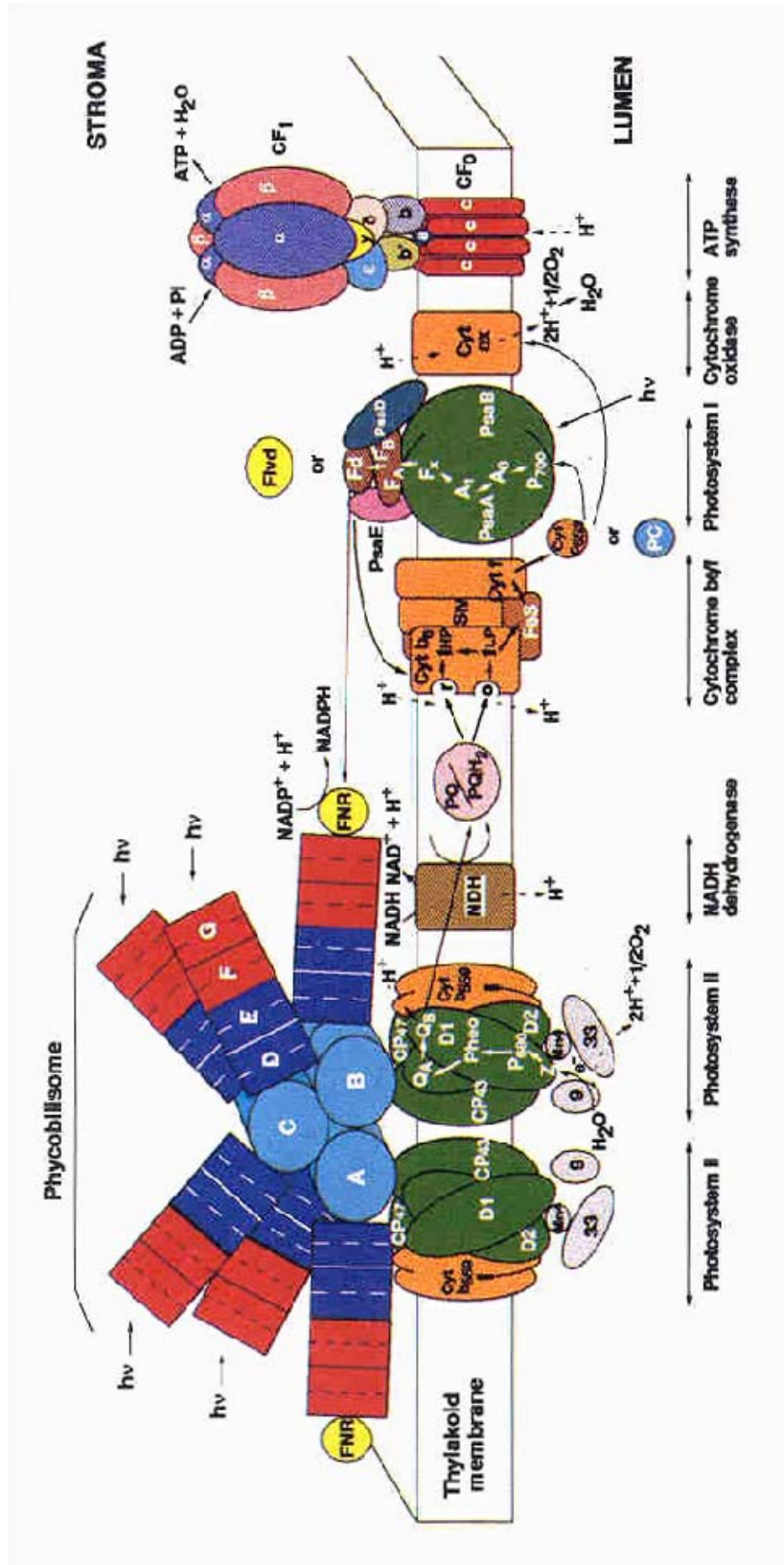
1.4.1. *Synechocystis* PCC 6803

A fotoszintetikus folyamatok tanulmányozására modell szervezetként régóta használják a kloroplasztisz endoszimbióta ősnének tekintett *cianobaktériumokat*. A növényekhez képest könnyebben, gyorsabban kezelhetők, membránjaik 90-95 %-át a tilakoid teszi ki, és lipidösszetétel szempontjából is nagyban hasonlítanak a növényi megfelelőjükre. Sejtjeiket egy kettős membrán határolja, a külső és a plazma (belső) membrán. A belső membrán által határolt intracelluláris térben található a körkörös futó tilakoid membránok (Stanier, 1988) (3. ábra). A cianobakteriális tilakoid membránban a kloroplasztiszéhoz hasonló elektrontranszport lánc működik. A magasabb rendű növényektől eltérően azonban a fénybegyűjtést nem integráns membránfehérje komplexek, hanem a membrán felszínén elhelyezkedő fikobiliszómák végzik. Ugyancsak eltérés, hogy a tilakoid membránban nem csak a fotoszintézis, de a légzési elektrontranszport is funkcionál, amely magasabb rendűeknél elsősorban a mitokondriumban működik (Bryant, 1994) (4. ábra).

Murata és mtsai (1987) összefoglaló munkájában részletes információ található a cianobakteriális membrán lipidekről. A fő membránalkotó lipidek a monogalaktozil-diacilglicerol (*MGDG*) (50-60 %), digalaktozil-diacilglicerol

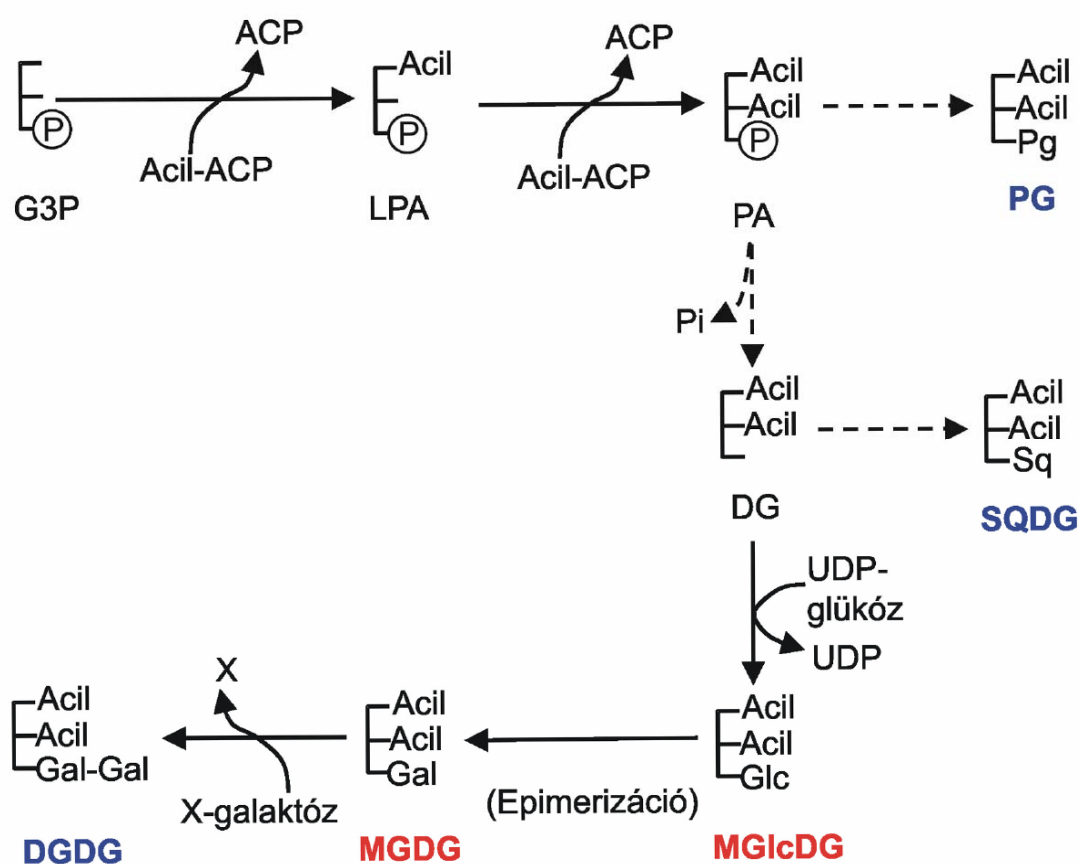


3. ábra (A) Egy cianobakteriális sejt sematikus rajza (Stanier, 1988): CM (sejt membrán), TH (tilakoid membrán), PB1 és PB2 (a tilakoid membránhoz asszociált fikobiliszómák felül- és oldalnézete), GG (glikogén granulomok), P (polifoszfát granulomok), C (karboxiszmák), R (riboszómák), G (gáz vezikulumok). (A): A sejtfal kinagyított képe a külső és a citoplazmás membránnal és a közöttük elhelyezkedő peptidoglikán réteggel. (B): A tilakoid membrán kinagyított képe (B) A *Synechocystis* PCC 6803 elektronmikroszkópos felvétele.



4. ábra A cianobakteriális tilakoid membrán: a fotoszintetikus és a légzési elektrontranszport főbb komponensei (Bryant, 1994).

(*DGDG*) (10-20 %), szulfokvinozil-diacilglicerol (*SQDG*) (10-20 %) és foszfatidilglicerol (*PG*) (10-20 %). Ezenkívül egy minor lipid is megtalálható a cianobaktériumban, a monoglükozil-diacilglicerol (*MGLcDG*), amely prekursor molekulaként szolgál a legfőbb membránalkotó lipid, az *MGDG* számára (5. ábra). A lipidek zsírsavösszetételének komponensei a palmitinsav (16:0), palmitoleilsav (16:1), hexadekadiénsav (16:2), sztearinsav (18:0), olajsav (18:1), linolsav (18:2), α -linolénsav (18:3(9, 12, 15)), γ -linolénsav (18:3(6, 9, 12)) és ω -oktadekatetraénsav (18:4(3, 6, 9, 12)).



5. ábra A cianobakteriális glicerolipidek bioszintézisének vázlatja (Murata és mtsai, 1987). **Nem kettősréteg-képző lipidek:** MGDG (monogalaktozil-diacilglicerol, neutrális), MGLcDG (monoglükozil-diacilglicerol, neutrális); **Kettősréteg-képző lipidek:** DGDG (digalaktozil-diacilglicerol, neutrális), SQDG (szulfokvinozil-diacilglicerol, negatív töltésű fejcsoport), PG (foszfatidil-glicerol, negatív töltésű fejcsoport); G3P: glicerol-3-foszfát, ACP: „acyl carrier protein”, (L)PA: (lyso-)foszfatidsav, Pi: inorganikus foszfát, DG: (1,2-)diacylglicerol, UDP: diacylglicerol-glükoziltranszferáz, Glc: glükóz, Gal: galaktóz, X: nem azonosított galaktóz hordozó

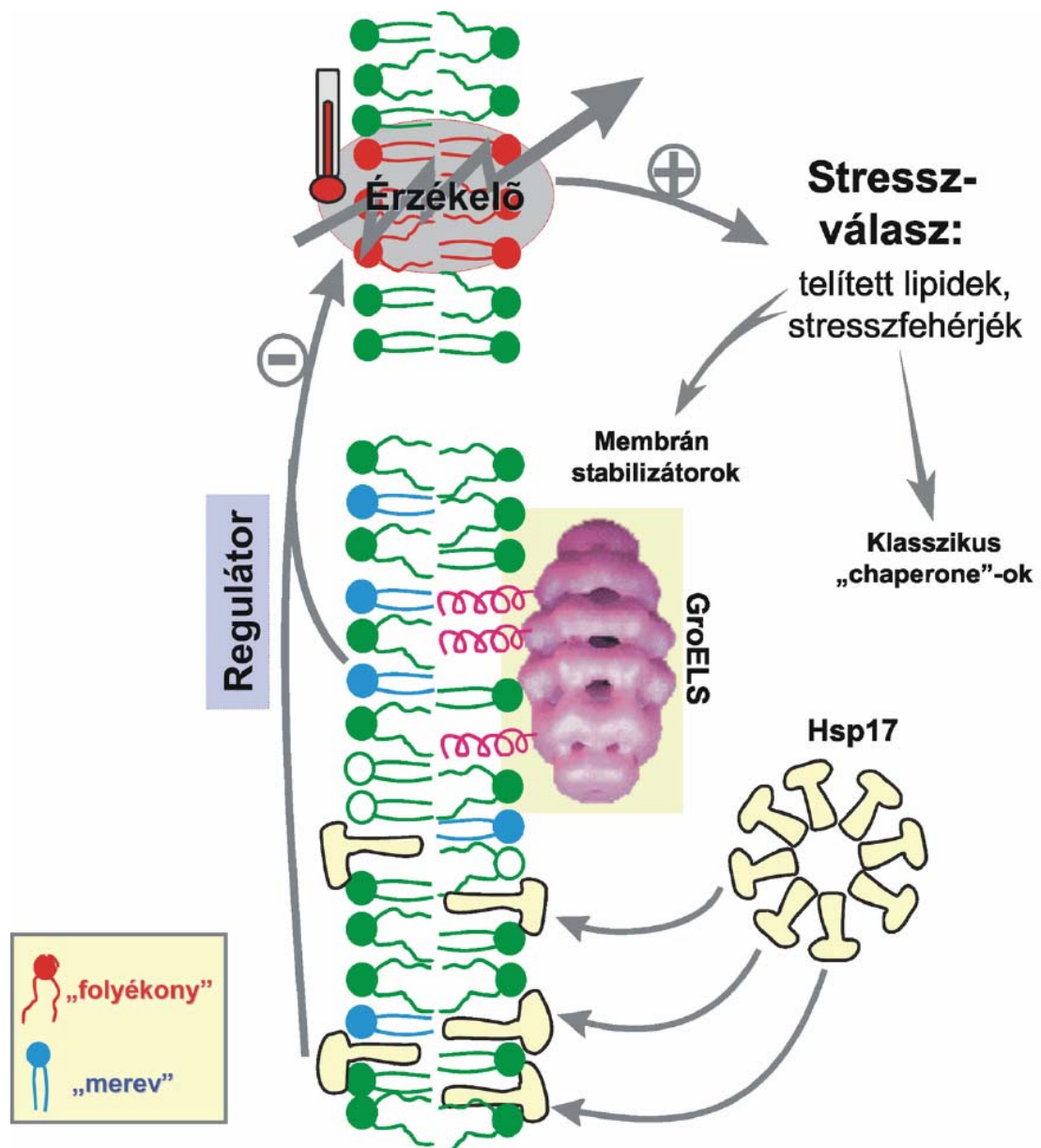
A zsírsavak pozícionális megoszlása általánosan a 18:x/16:y vagy 16:x/16:y (*sn-1/sn-2*) molekula specieszekkel írható le. Ez a jellemzően prokarióta lipidfelépítés merőben különbözik az eukariótáknál megfigyelhető 16:x/18:y vagy 18:x/18:y formáktól (Roughan és mtsai, 1987).

A cianobakteriális alacsony- és magashőmérsékleti akklimatizáció jelenségéről és az abban szerepet játszó tényezőkről számos információ áll rendelkezésre. Általában elmondható, hogy a sejtek a túréhatáron belül alkalmazkodnak a megváltozott környezeti tényezőkhöz, amely megnyilvánul a túlélő képességben, abban, hogy a fotoszintetikus funkció működését és ezzel szoros összefüggésben *tilakoid membránjának stabilitását* igyekeznek minél inkább megőrizni. A *homeoviszkozus adaptáció* elmélete szerint, ha megváltoztatjuk az élőlény növekedési hőmérsékletét, az a megváltozott membrán fluiditást olyan irányba igyekeznek szabályozni, hogy az az eredeti értékre álljon vissza, vagyis az optimális működéséhez szükséges membrán fluiditás állandósítására törekszik függetlenül a környezet változásától (Sinensky, 1974). Erre több eszköze is van, mint pl. a lipidmetabolizmus szabályozása vagy membránkötésre képes Hsp-k aktiválása (Vígh és mtsai, 2005). Amíg az utóbbi azonban csak magashőmérsékleti stressz esetén működhet, az előbbi egy általánosabb akklimatizációs lehetőség. Az alacsony hőmérséklet által csökkentett fluiditás kompenzálására deszaturáz enzimek aktiválódnak, amelyek a zsírsav telítetlenség növelésére hivatottak. Vígh és mtsai (1993) a plazma membrán *katalitikus hidrogénezésével*, szimulálva az alacsony hőmérsékleti stressz hatását a membrán fluiditásra, aktiválták a *desA* gént, ezzel igazolva, hogy a membrán fizikai állapotának megváltozása kompenzációs, lipidmódosító folyamatokat indít el. Magashőmérsékleti stressz esetén a zsírsavak telítése lenne kedvező, ám nincs olyan gyors enzimatikus út erre a célra, mint pl. a deszaturáz enzim funkció. Erre a *lipid bioszintézisen* keresztül nyílik mód (5. ábra), mivel így telített zsírsavak épülhetnek be az újonnan szintetizálódott lipidekbe. Jónéhány tanulmány igazolja, hogy a membrán lipidek mesterséges telítése nagyobb hőstabilitást, ellenállóképességet kölcsönöz a tilakoid membránnak és funkciónak (Thomas és mtsai, 1986; Horváth és mtsai, 1986; Vígh és mtsai, 1989). Murakami és mtsai (2000) egy deszaturáz transzgen „elhallgattatásával” egy akklimatizációs képességében hasonlóképp megerősödött növényt hoztak létre (Sharkey, 2000; Morgan-Kiss és mtsai, 2002). A *nem kettősréteg-képző lipidek* (MGDG) szükségesek a fotoszintetikus fehérjék megfelelő szerkezeti egységéhez, működéséhez (van

Walraven és mtsai, 1984; Garab és mtsai, 2000; Páli, T, 2003; Loll és mtsai, 2005). Azonban kónikus alakjuk (kis fej- és nagy láb régió), amely előnyös szerkezetileg elengedhetetlen fehérje-lipid kölcsönhatások kialakításához, rendkívül érzékenyvé teszi azokat a magashőmérsékleti stresszel szemben, hiszen akkor a láb rész, növekvő mozgékonyágánál fogva, méginkább szétnyílik, így ezen lipidek kettősrétegben tartása, azaz a *fázisszeparáció és fordított hexagonális fázis képződésének* meggátlása kritikussá válik (Gounaris és mtsai, 1983 és 1984) (2. ábra). A lipid telítettség szabályozása ily módon nem csupán a (*hiper*)*fluidizációval* összefüggő folyamatokban lényeges, mint pl. a mobilis e⁻-hordozó (plasztokinon) működése (Hirano és mtsai, 1981), hanem a *membrán dezintegráció* ill. *funkcióvesztés* ellen is védhet a nem kettősréteg-képző lipidek H_{II}-képző hajlamának csökkentésén keresztül (ld. 13. oldal). Bár a lipid metabolizmus szabályozása hatékony védelmi eszköz lehet a magashőmérsékleti stressz kivédésében, mégsem nyújt elég gyors és hathatós módot erre hirtelen stressz, vagyis rövid akklimatizáció során. A *Hsp-k* különösen ez esetben életmentőként munkálkodhatnak azáltal, hogy a tilakoidhoz kötve *növelik a membrán stabilitását, rigiditását* (Kovács és mtsai, 1994a és 1994b; Török és mtsai, 1997). Egy, a membrán lipid fázisát szelektíven módosító kísérlet arra utal, hogy a *Hsp17* expressziója és membrán asszociációja direkt és kölcsönös kapcsolatban áll a *tilakoid membrán lipidjeinek fizikai állapotával*, annak fluiditás jellemzőjével (Horváth és mtsai, 1998). A membrán fizikai állapotát a növekedési körülményekkel, azaz (*elő*)*akklimatizációval*, egyfajta „kondicionáló hőstresszel” módosítva a *hősokkválasz küszöbhőmérséklete* is változik, jelezve, hogy a hősokkválasz nem az aktuális hőmérséklettel van közvetlen kapcsolatban, hanem a sejt „belső érzékelői”, mint pl. a membrán fizikai állapota határozzák meg a segítség szükségességét (Lehel és mtsai, 1993; Glatz és mtsai, 1999; Inoue és mtsai, 2001).

Vígh és mtsai szerint a *membránok* (leginkább annak egyes hiperfluid részei) képesek egyfajta *stressz érzékelőként*, hőmérőként szolgálni a membrán fluiditás révén (Vígh és mtsai, 1998 és 2005; Los és Murata, 2000). Ez valamilyen jelátviteli úton át elindít(hat)ja a stresszválasz folyamatát, Hsp-k termelődését, lipidváltozásokat. A Hsp-k membránokhoz (lipidekhez) kötődve megőrizhetik azok integritását és funkcionalitását. A maximális vagy elégséges védelem egy visszacsatolós szabályzási mechanizmuson keresztül a hősokkválasz lecsengéséhez vezethet (Vígh és Maresca, 2002) (6. ábra). Minthogy a különböző védelmi eszközök, Hsp-k közös szabályzó elemmel bírnak a membrán fizikai állapotán keresztül, az

egyres Hsp-k szabályzása között lehet összefüggés. A dnaK2 gén részleges eltávolítása a hsp17 hőindukálódásának küszöbhőmérsékletét 2°C-kal csökkenti, jelezvén, hogy a DnaK2 hiányzik a védelemben, ám az *a Hsp-k közötti együttműködés* révén (részben legalábbis) helyettesíthető (Varvasovszki és mtsai, 2003; Vígh és mtsai, nem közölt adat).

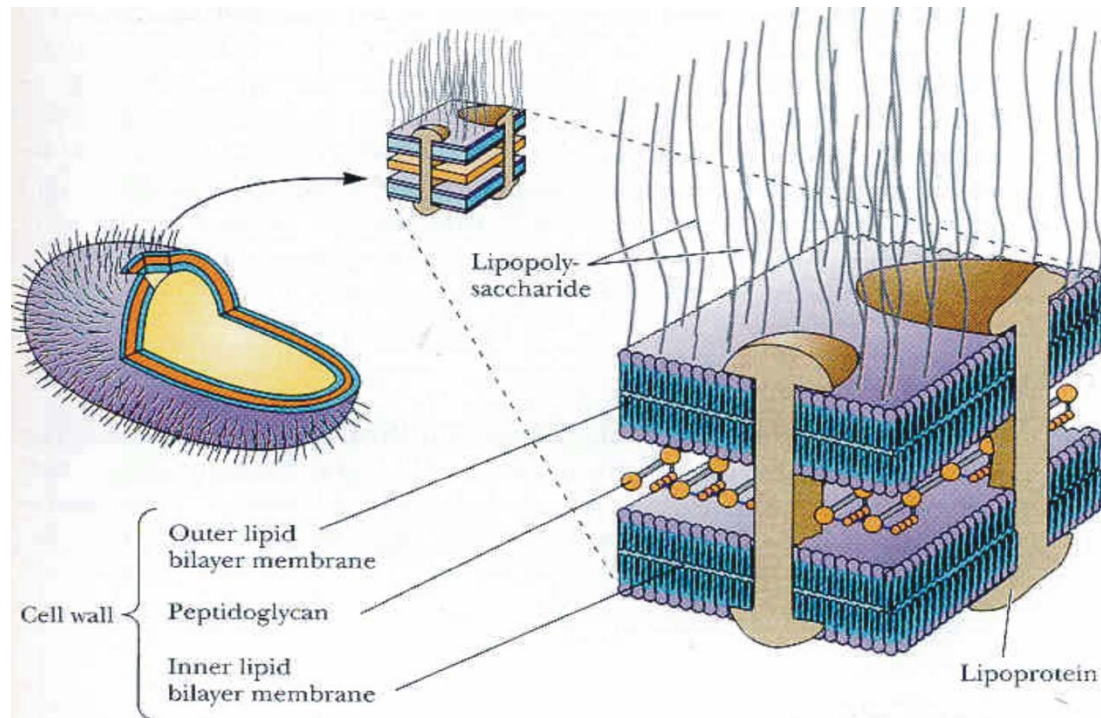


6. ábra A membrán fizikai állapota és a stresszválasz közötti kapcsolat modellje (Vígh és Maresca, 2002).

1.4.2. *Escherichia coli*

Az *E. coli* az egyik legegyszerűbb, ám mégsem igazán megismert élőlény, egy evolúciós siker, amely rendkívüli módon képes volt alkalmazkodni a szélsőséges életkörülményekhez. Ezek alapján ideális modell organizmus a stressz akklimatizációs/ adaptációs folyamatok tanulmányozására. Annál is inkább, mert az *E. coli* membrán adaptációs lépéseit meglehetősen kevésbé vagy inkább egyoldalúan tanulmányozták. Az ezzel kapcsolatos irodalmi adatok helyenként ellentmondásosak, elhanyagolásuktól szenvednek avagy éppen hiányosak.

Az *E. coli* sejtet egy sejtfal, *kettős membrán (külső és belső)* határolja, melyeket egy ún. peptidoglikán réteg választ el (7. ábra). A két membrán összetétele, szerkezete és funkciója jelentősen különbözik. A belső, plazma membrán jókora foszfolipid tartalommal bír, és ez alkotja a sejt tényleges határvonalát. A külső membrán külső rétegét ún. lipopoliszacharid réteg alkotja, a belsőt foszfolipidek, és az egész membrán lényegesen nagyobb fehérje/lipid aránnyal és permeabilitással jellemezhető a plazma membránhoz képest (Vance és Vance, 1991).



7. ábra Az *Escherichia coli* sejt membrán fölépítése (Garrett és Grisham, 1999).

Az *E. coli* membrán különösen jó példa arra, hogy az *in vivo* vagy izolált membránokon végzett kísérleti eredmények különbözhetnek, akár még egymásnak ellentmondóak is lehetnek (Proulx, 1988). Ennek egyik oka az lehet, hogy a külső membrán aszimmetrikus fölépítésének fönntartásához elengedhetetlenül szükséges a peptidoglikán réteg, vagyis a külső membrán izolálásakor ha az összetétele nem is, de natív szerkezete módosulhat (Mühlradt és Golecki, 1975). A membránok fő foszfolipid komponensei a foszfatidil-etanolamin (*PE*) (60-85 %), foszfatidil-glicerol (*PG*) (10-25 %) és kardiolipin (*CL*) (0-10 %). Ezen kívül előfordul még foszfatidil-szerin (*PS*) és lyso-foszfatidil-etanolamin (*LPE*). A fő zsírsav komponensek a 16:0, 16:1 és vakcénsav (18:1 ν), de lehet még mirisztinsav (14:0) is. A külső membrán jóval nagyobb arányban tartalmaz *PE*-t (akár 20 % különbség!) és lipidjei szignifikánsan rigidebbek a plazma membrán lipidjeivel összevetve (Lugtenberg és Peters, 1976; Bayer és Bayer, 1985).

Amint növeljük az *E. coli* növekedési hőmérsékletét, az a *homeoviszkózus adaptáció* elmélete szerint igyekszik membránjai fluiditását az eredeti értékre állítani (Sinensky, 1974). Mivel a membrán fázisstranzíciós hőmérséklete hatást gyakorol a sejt hőérzékenységre, a membrán károsodás lényegesen befolyásolhatja a baktérium túlélését (Katsui és mtsai, 1981). Magashőmérsékleti adaptáció esetén a legjellemzőbb lipidváltozás egy 18:1 \rightarrow 16:0 vagy 16:1 \rightarrow 16:0 irányú szaturációs folyamat, amellyel az *E. coli* növelni képes a membrán rigiditást (Lugtenberg és Peters, 1976). Ez a lipidadaptációs lépés azonban lényegesen csak a külső membránt érinti (Janoff és mtsai, 1979 és 1980). Hasonlóképp, egy hirtelen hőstressznek kitett sejt kultúra gyors lipid-fehérje vezikula lefűződéssel válaszolt, ám -a vezikulák összetétele alapján- ezek alapvetően a külső membránból, ill. a periplazma régióból származtak (Katsui és mtsai, 1982). Egyes munkák rámutatnak, hogy a külső membrán hőadaptációjában nem csak lipidváltozások játszhatnak szerepet, sőt bizonyos esetben szükségszerűnek mutatkozik más védelmi mechanizmusok megléte is (Janoff és mtsai, 1980). Yatvin és mtsai (1986) bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy hősokk közben képződő naszcens, membrán szignál szekvencia nélküli fehérjék képesek a membrán lipid fázisának változásait érzékelve a külső membránhoz kijutni és azt valamilyen formában stabilizálni (Umakoshi és mtsai, 1998). Ezt az állításukat tovább erősíti az a tény, hogy -16:1 vagy 20:1 (eikozénsav) zsírsavakkal kiegészített médiumot használva- a membrán lipidösszetételt módosítva, a hősokkot követő külső membrán fehérje összetétele jelentősen változott, jelezvén a membrán lipid fázisa és

az asszociált fehérjék közötti kapcsolatot (Yatvin, 1987). Hipotézisük szerint a fehérje transzlokálizációra a hő által a külső és belső membrán között előidézett összefüzdések teremtenek lehetőséget (Hui és Stewart, 1981; Hui és mtsai 1981). Érdekes, hogy ugyanez a csoport úgy találta, hogy a fő Hsp-k nem vesznek részt a membrán védelemnek ebben a formájában. Elképzelésük szerint a Hsp-k a védelemnek talán egy későbbi fázisában szintetizálódnak, amikor már elegendő naszcens, egyéb fehérje támogatta meg a membrán integritását (Yatvin és mtsai, 1987). Következtetésüket némileg cáfolni látszanak az azóta napvilágot látott kutatási eredmények. Mejía és mtsai (1995) az *E. coli* adaptációs képességét -amelyet a membrán fluiditás mérésével vizsgáltak- két tényezőre bontották föl, nevezetesen a lipid- és fehérjevédelemre. Ez utóbbit szoros összefüggésbe hozták a Hsp-k szintézisével, sőt feltételezésük szerint *a membrán fizikai állapota és a hősokkválasz között is kapcsolat van*. Egy immunogold elektronmikroszkópiás analízis membránhoz lokalizált GroEL chaperont mutatott ki (Newman és Crooke, 2000), míg egy másik munka ennek cochaperonját, a GroES-t találta a két membrán közti periplazma régióban (Lee és Ahn, 2000). Miyake és mtsai (1993) két akkor még nem azonosított, később *IbpA* és *IbpB* néven elnevezett, 15 kDa körüli Hsp-t talált a rövid ideig, extrém magas hőmérsékletnek kitett *E. coli* membrán frakciójában. A membrán minta további analízisével kizárták annak lehetőségét, hogy a sHsp-k esetleg nem oldható aggregátumokkal való együttülepedés folytán kerültek volna a membrán frakcióba. Laskowska és mtsai (1996) -poliklonális anti-IbpAB ellenanyagot használva- IbpAB-t detektáltak a kontroll és hősokkolt külső membránban, amely a hősokk eredményezte fehérje aggregátum frakcióban is megjelent. Érdekes módon semmilyen körülmények között nem találtak sHsp-t a belső membrán és citoszolikus frakciókban.

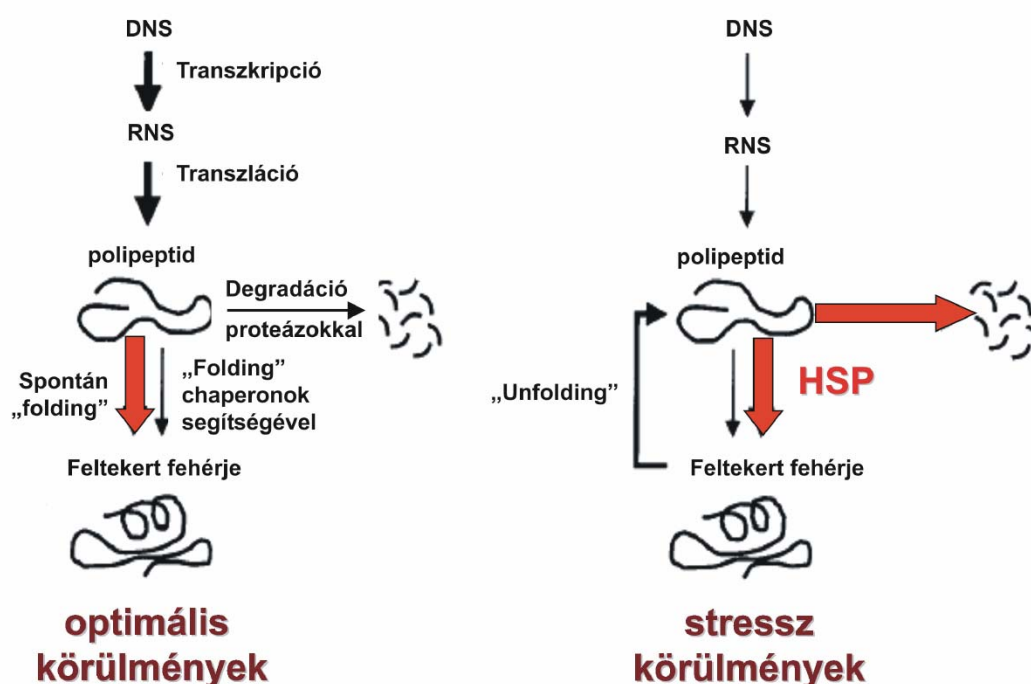
Egy nemrégiben publikált közlemény egyrészt megerősítést adott a lipidváltozások szerepére az *E. coli* hőadaptációs folyamataiban, ill. rávilágított a membrán fizikai állapota és a hősokkválasz közötti kapcsolatra, másrészt viszont *megkérdőjelezte a fehérjék, leginkább a fő Hsp-k abszolút szükségességét a termotolerancia megszerzésében* (Shigapova és mtsai, 2005). Hőanalóg membrán fluidizációval -amelyet egy, a membrán lipid fázisát szelektíven módosító fluidizáló szer, a benzil-alkohol (BA) használatával értek el a növekedési hőmérsékletet megtartva- nagymértékű, gyakorlatilag a hőkezelés okozta változással azonos nagyságú lipid- és zsírsavösszetételbeli módosulást idéztek elő. Bár a főbb hősokk

gének (groEL, dnaK) indukálódtak, fehérje szinten viszont nem jelent meg védelmet nyújtani képes *de novo* termék, ami önmagában is érdekes tény. Ugyan nem zárható ki, hogy már a kezelést megelőzően létező vagy más fehérjék (pl. IbpAB, ClpB) szerepet játszhatnak a kialakult, a hőedzés által előidézetthez képest közel azonos mértékű termotolerancia kialakulásában, mégis figyelemre méltó az a megállapítás, hogy *csupán a membrán lipid- és zsírsavszintű módosítása jelentősen növeli a membrán stabilitását és ezzel összefüggésben a sejt tűrőképességét is.*

2. Hősokkfehérjék

A főbb stresszfehérje családok nagymértékben konzerváltak, jelenlétüket a legegyszerűbb baktériumoktól a magasabb rendű eukarióta szervezeteken át az emberig kimutatták. A hőstresszfehérjéket molekulatömegük alapján szokás csoportosítani, így megkülönböztetjük a *Hsp110*, *Hsp90*, *Hsp70*, *Hsp60*, *Hsp10* és a kis molekulatömegű, *sHsp* (LMW Hsp, α -Hsp vagy smHsp) *családokat* (Fink és Goto, 1998). Ellis (1987) szerint ezek *molekuláris chaperonok*, olyan funkcionális rokonságot mutató, bár alapvetően igen különböző „dajkafehérjék”, melyek más fehérje struktúrák fölépülésében segédkeznek azok kovalens módosítása nélkül, miközben nem válnak részévé a végső, funkcionális formának. Ez a definíció ma is helytállóan nevezhető, ám némi kiegészítésre szorul. Chaperonok közreműködését igénylő esemény lehet a sejtek életében a (1) *polipeptid láncok „folding”-ja*, funkcionális fehérjévé válása, (2) a fehérjék *transzportja* és *transzlokálizációja a membránokba ill. azokon keresztül*, valamint (3) a *különböző stresszhatások megjelenése* (Lodish és mtsai, 1995). Ez utóbbi esetben a Hsp-k több módon is védhetik a potenciálisan veszélyeztetett célpontokat, úgy mint (i) *szubsztrát-Hsp komplexek képződésével megóvhatják (aggregációtól, oxidációtól), ill. helyreállíthatják a fehérjéket (deaggregáció, „refolding”)*, (ii) *membránokhoz (lipidekhez) kötődve megőrizhetik azok integritását és funkcionalitását* (Vigh és mtsai, 1994; Kovács és mtsai, 1994a; Mejia és mtsai, 1995; Glatz és mtsai, 1997; Török és mtsai, 1997; Horváth és mtsai, 1998; Goloubinoff és mtsai, 1999). A *proteáz rendszerek*, mint hősokkfehérjék az irreverzibilisen károsodott, már a chaperonok számára sem kijavítható fehérjék gyors eltávolításában vesznek részt (Narberhaus,

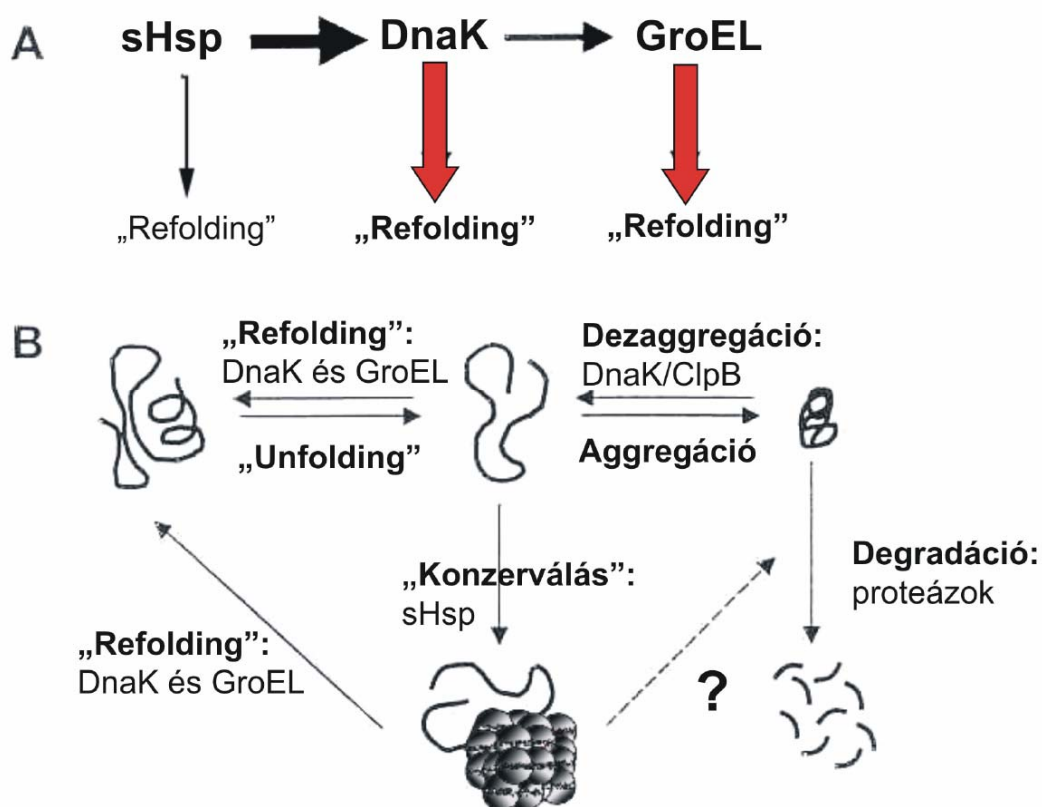
2002). Ezekre a funkciókra bár jól ráillik egy molekuláris chaperon elnevezés, mégis az eredeti definíció tágabb értelmezését kívánják meg.



8. ábra **Chaperonok a fehérjék minőségi kontrolljában** (Narberhaus, 2002). Normális (optimális) körülmények között a transzkripció és transzláció sebessége nagy, a *de novo* fehérje láncok többnyire spontán módon elnyerik végső konformációjukat, az aggregáció és degradáció aránya csekély. Stressz körülmények között a fehérjeszintézis korlátozottabb; a kitekeredett és funkcionalitásukat veszített fehérjék -a Hsp-k „döntésétől” függően- visszanyerhetik rendeltetészerű állapotukat vagy a proteáz rendszerek közreműködésével lebontásra kerülnek.

A különböző chaperonok egymással és a proteolitikus rendszerekkel hatékonyan együttműködve látják el funkcióikat a sejtekben mind normál, mind pedig stressz körülmények között (8. ábra). A stresszfehérjék egyfajta „minőségellenőrzés” megvalósítói, a fehérjék sorsának fontos útkereszteződéseiben helyezkednek el, és döntenek arról, hogy az adott fehérje működőképes konformációjának helyreállítása lehetséges-e, ill. kifizetődő-e a sejtnél, avagy a protein teljes eltávolítása szolgálja-e inkább a sejt érdekeit. A 9. ábra jól áttekinthető módon foglalja össze, hogy hogyan működnek együtt a prokarióta Hsp-k a stresszhatásnak kitett sejt fehérje körforgásában. A funkcionalitásukat (részlegesen) elveszített, félig kitekeredett („mis/unfolded”) fehérjék ki vannak téve az aggregáció veszélyének, amelyet azonban több irányból is ellensúlyoznak a chaperon rendszerek. Az aggregáció (1) részben legalábbis visszafordítható a *DnaK* (Hsp70) és *ClpB* (Hsp110) Hsp családok által, a

(2) *sHsp*-k (α -Hsp-k) képesek konzerválni a félig kitekeredett fehérjéket egy „szivacszerű” állapotban, amelyek aztán visszanyerhetik aktív formájukat a (3) *DnaK* és *GroELS* (Hsp60 és Hsp10, chaperonin és cochaperonin) helyreállító gépezetek segítségével (Török és mtsai, 1996; Glatz és mtsai, 1999; Narberhaus, 2002).



9. ábra **A multichaperon rendszer együttműködése** (Narberhaus, 2002). (A) A *sHsp*(-k) által megmentett, félig kitekeredett fehérjék eredeti funkcióját a *DnaK*/*GroEL* rendszer állít(hat)ja helyre. (B) A *DnaK*/*GroEL* rendszer a „refolding”-ban, míg a *DnaK*/*ClpB* rendszer a fehérje aggregátumok reverzibilis helyreállításában játszik szerepet.

A klasszikus, „*homeosztatiszikus reguláció vagy titrációs modell*” szerint a hő sokkválasz átmeneti, amely azon alapszik, hogy a félig kitekeredett fehérjék chaperonok által segített refolding-ja vagy degradációja csökkenti az indukciós szignált, minthogy az elégséges fehérje védelem szabaddá teszi a Hsp-eket, amelyek így ismét kölcsönhatásba léphetnek, lekötve a hő sokkválasz pozitív regulációs elemeit (Bukau, 1993). Egy *alternatív elképzelés* szerint nem csupán a denaturálódó fehérjék, de a *membrán*, annak fizikai állapota is lehet a hő sokkválasz szabályzásának érzékelője (ld. 1.4.1. fejezet és 6. ábra) (Vigh és Maresca, 2002).

3. Kismolsúlyú hősokkfehérjék

A sHsp-k a hősokkfehérjék egyik, gyakorlatilag mindenféle élőlényben megtalálható családját alkotják (átfogó tanulmányok ld. Arrigo és Müller, 2002; Narberhaus, 2002; van Montfort és mtsai, 2002).

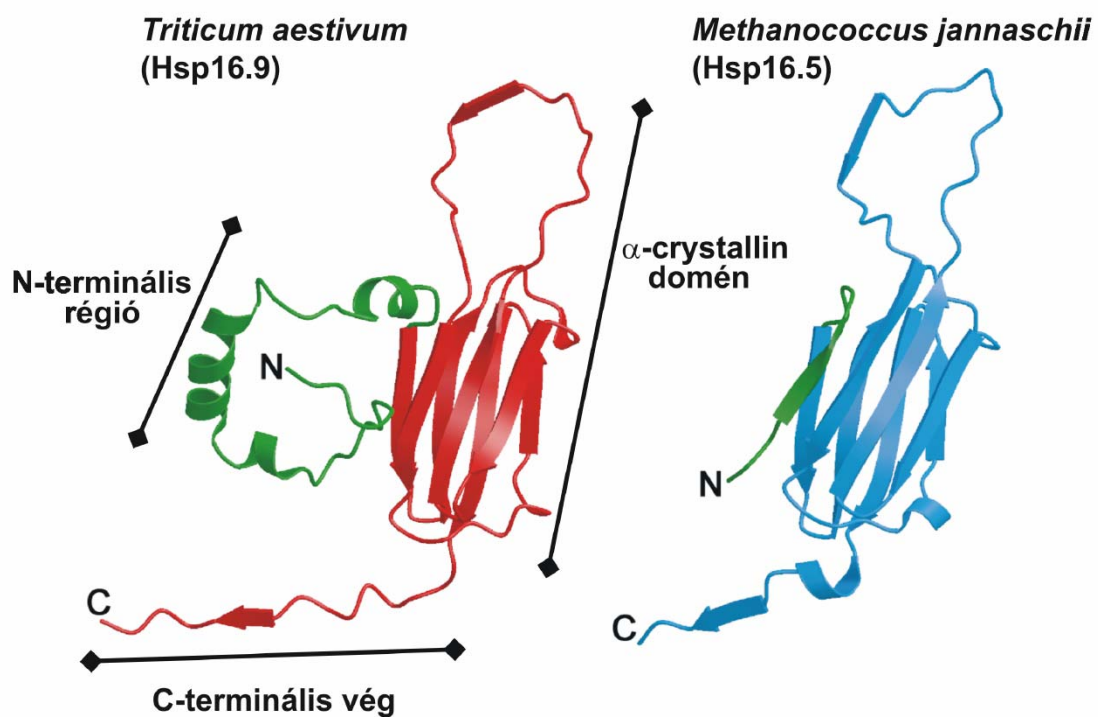
3.1. A kismolsúlyú hősokkfehérjék szerkezete, oligomerizációja

A sHsp-k (LMW Hsp, α -„*crystallin*”-ok (α -Hsp)) egy széles körben fellelhető Hsp család, ám a többi Hsp-hez képest kevésbé mutatnak hasonlóságot, konzerváltságot szekvenciájukban, inkább csak rövid szekvencia motívumok tekintetében. Monomer molekulatömegük 12-43 kDa között változik, de túlnyomó többségük a 14-27 kDa mérettel jellemezhető. A legnagyobb konzerváltságot a középső, névadó rész, az ún. α -„*crystallin*” domén hordozza, ennél lényegesen változatosabb a C-terminális és különösen az N-terminális rész (10. ábra).

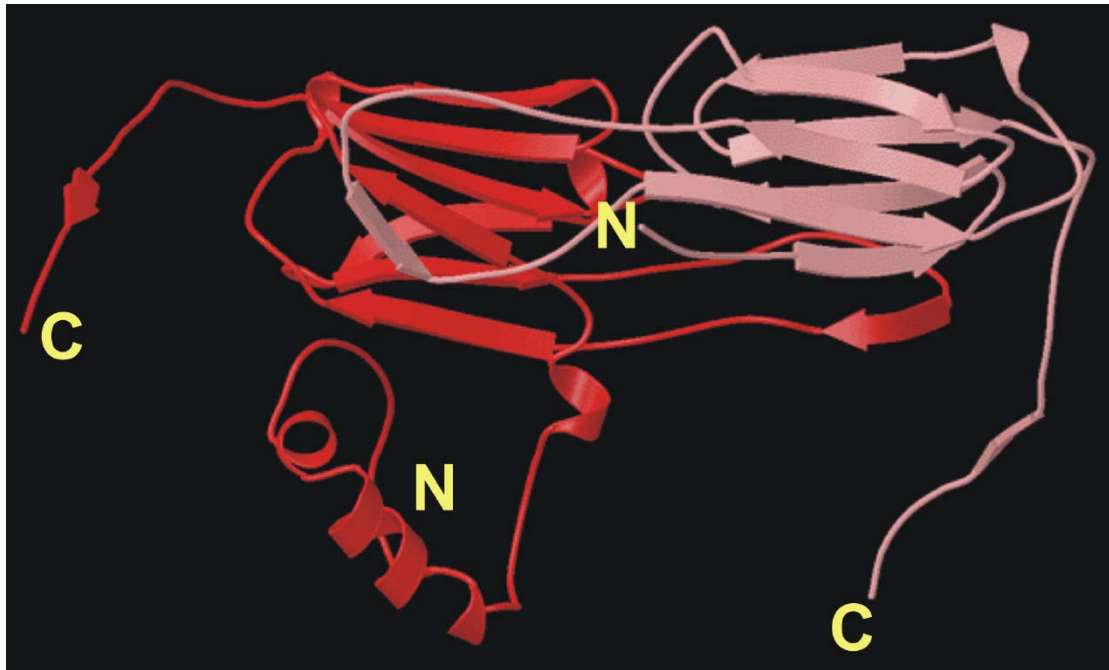
A sHsp monomert az antiparallel β -sheet-ekből összerendeződött α -„*crystallin*” domén, a *flexibilis*, „csuklóval ellátot” C-terminális rész és a hosszúságában, szekvenciájában nagy változatosságot mutató, rugalmas N-terminális régió alkotják (11. ábra). A sHsp-k közös szerkezeti sajátossága, hogy nem kovalens kötéssel, reverzibilis módon dimerekké, trimerekké, tetramerekké, nonamerekké ill. *dinamikus oligomer struktúrákká* szerveződnek. Valójában a dimerek (trimerek) tekinthetők az *alapvető építőelemek*nek az oligomer szerveződésben. A monomerek összekapcsolásában meghatározó szereppel bír az egyik N-terminális régió bekötése a másik monomerhez (12. ábra). A dimerek a másik még szabadon maradt N-terminális kar és a mozgékony C-terminális részek segítségével kapcsolódnak össze tetramerekké, oligomerekké (13. ábra). A végső, üreges és gömbszerű forma állhat akár 9-32 alegységből (14. ábra) (Chang mtsai, 1996; Haley és mtsai, 1998; Kim és mtsai, 1998; van Montfort és mtsai, 2001).



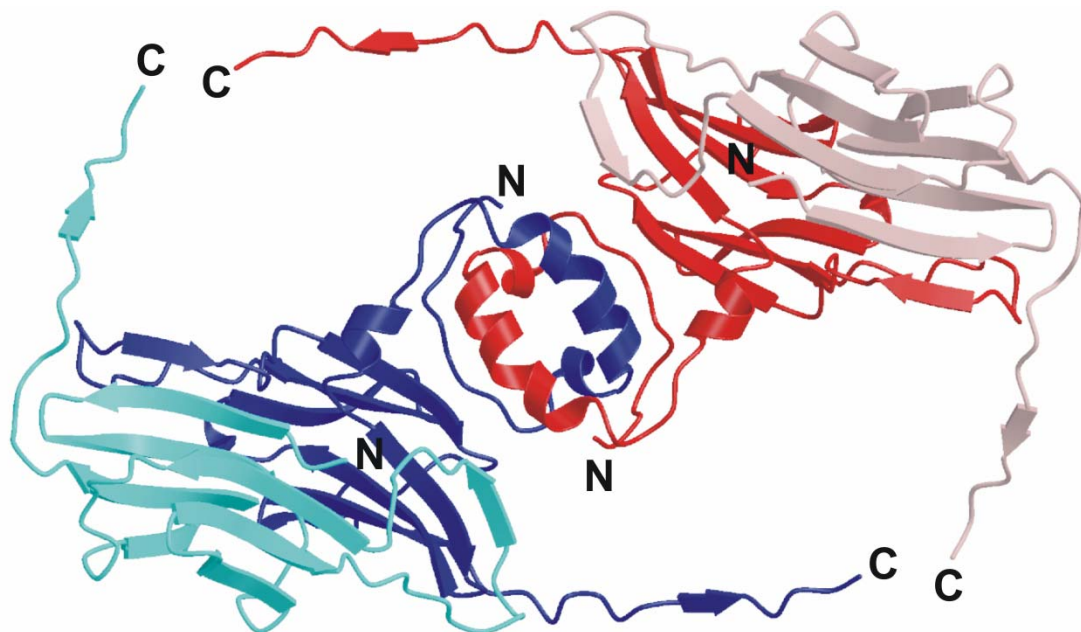
10. ábra A sHsp-k primer szerkezete, a sHsp monomer alapvető egységei (E. Vierling).



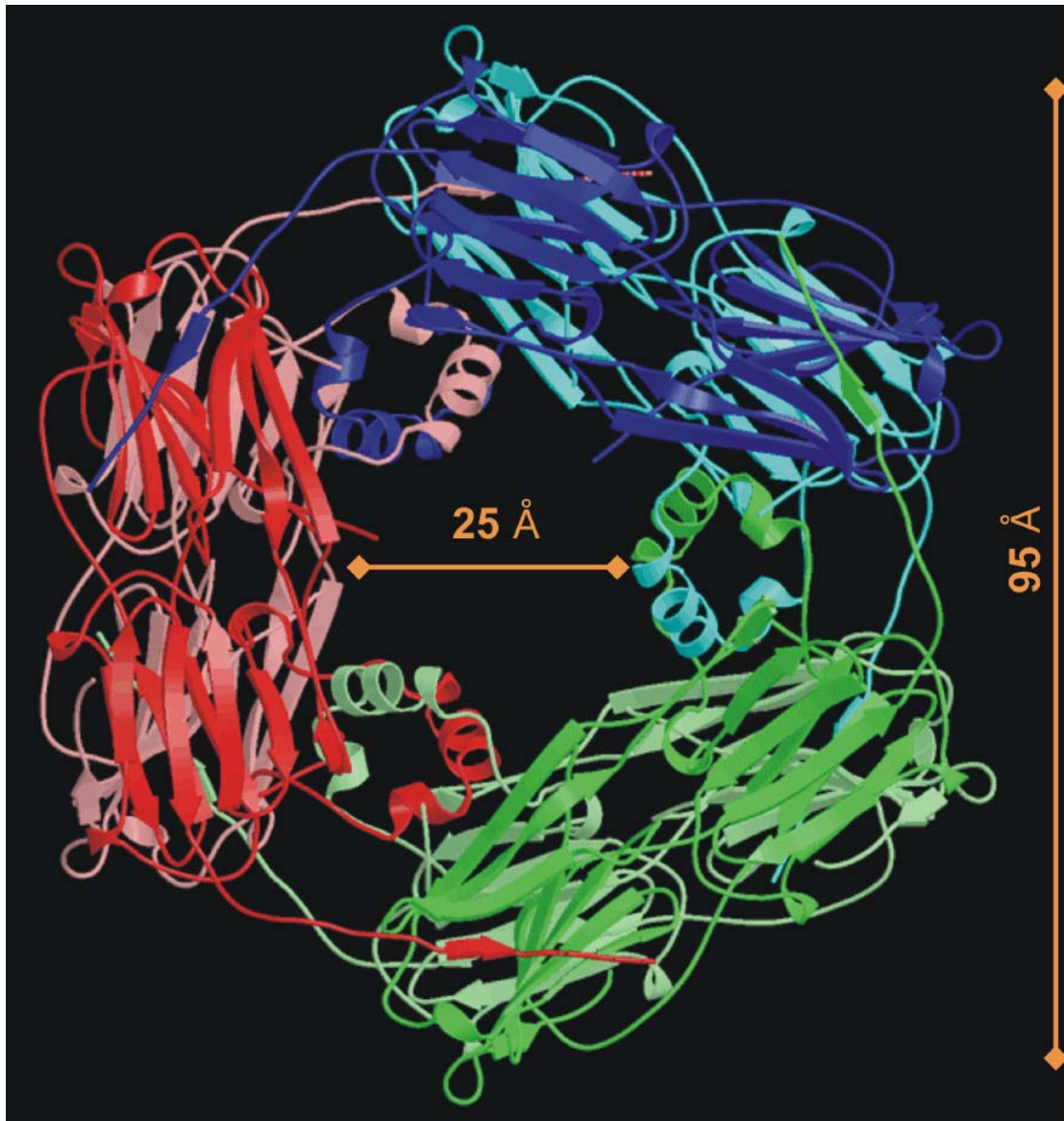
11. ábra Az eukarióta *Triticum aestivum* (búza) Hsp16.9 és a prokarióta *Methanococcus jannaschii* Hsp16.5 monomer térbeli szerkezete (van Montfort és mtsai, 2001; Kim és mtsai, 1998).



12. ábra **A búza Hsp16.9 monomerek dimerizációja** (van Montfort és mtsai, 2001). Az egyik monomer N-terminális régiója a másik monomer α -crystallin doménjével reverzibilis kölcsönhatás révén létesít kapcsolatot.



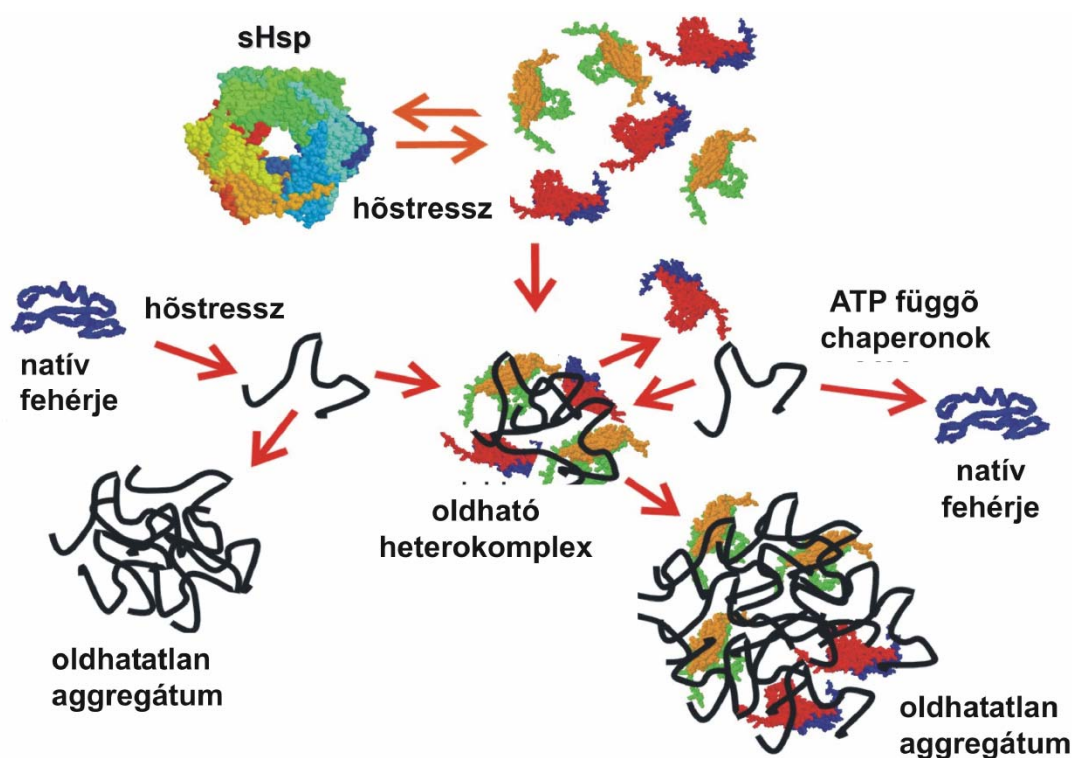
13. ábra **Egy sHsp tetramer képződése a búza Hsp16.9 példáján bemutatva** (van Montfort és mtsai, 2001). Az N-terminális régió alapvető fontosságú mind a dimerek, mind a tetramerek létrejöttében. Tetramer állapotban az összes N-terminális vég kötött formában található meg.



14. ábra A búza Hsp16.9 dodekamer térbeli szerkezete (van Montfort és mtsai, 2001). A sok alegységből reverzibilisen fölépülő oligomer formát a C- és N-terminális régiók által létesített intermolekuláris kölcsönhatások stabilizálják.

3.2. A kismolsúlyú hőszokkfehérjék chaperon aktivitása

A dinamikusan szerveződő sHsp oligomer szerkezet -bár még nem teljesen tisztázott, pontosan hogyan is- szerepet játszik ezen Hsp-k funkcionális működésében. Van Montfort és mtsai (2002) szerint a sHsp oligomerek hőstressz hatására kisebb egységekké, tetramerekké, *dimerekké esnek szét*, így az addig az oligomerben elrejtett hidrofób, „ragadós” részek felszínre kerülnek (Haslbeck és mtsai, 1999). Az ily módon *aktivizált sHsp-k* képesek megkötni a félig kitekeredett, „misfolded” proteineket, és *megóvni az aggregációtól, megtartani* egy „szivacszerű” rendezett vagy rendezetlen struktúrában, *„refolding-ra alkalmas állapotban”* a fehérjéket (Laskowska és mtsai, 1996; Lee és mtsai, 1997; Roy és mtsai, 1999; Friedrich és mtsai, 2004). A sHsp-k aggregáció elleni védelme, amely *ATP-*, azaz *energiafüggetlen* jelenség, nagyfokú *fehérje specifitást* is mutathat.



15. ábra A sHsp-k fehérjevédő képessége (chaperon aktivitása) (van Montfort és mtsai, 2002). A modell szerint a hőstressz során disszociáció révén aktiválódó sHsp-k képesek a félig kitekeredett („unfolded”) proteineket megkötni és abban az állapotukban konzerválni. Az irreverzibilis aggregációtól megmentett fehérjék más chaperonok közreműködésével visszanyerhetik eredeti állapotukat és funkcionalitásukat vagy lebontásra kerülnek.

Bár a sHsp-k nagy hatékonysággal befagyasztják, megállítják az irreverzibilis aggregációs folyamatot, helyreállítani nem képesek az inaktívált fehérje struktúrákat, viszont *együttműködnek a „refolding”-ban résztvevő Hsp70 (DnaK) és Hsp60-Hsp10 (GroEL) rendszerekkel*, azoknak átadják a megmentett fehérjét (Lee és Vierling, 2000; Török és mtsai, 2001; Kuczynska-Wisnik és mtsai, 2002). A másik lehetőség, hogy a nem működőképes fehérjehalmaz *lebomlik*, kikerül a forgalomból. Ez utóbbi esetben is lényeges a lebontásra váró fehérjét *hozzáférhető formában* tartani, különben nem oldható, nem eltávolítható formaként károsíthatják a sejtet (15. ábra). Az eddigi ismereteink alapján az α -crystallin domén és az N-terminális rész bizonyos motívumai lehetnek felelősek a szubsztrát kötésért, az N- és C-terminális végek az oligomerizáción keresztül közvetetten befolyásolhatják a chaperon aktivitást, ill. a C-terminális rész szerepet játszik még a komplex oldhatóságának megőrzésében is (Lee és mtsai, 1997; van Montfort és mtsai, 2001 és 2002; Giese és Vierling, 2002 és 2004; Giese és mtsai, 2005). A sHsp/ szubsztrát komplex képződésekor elengedhetetlenül szükségesnek tűnik *a sHsp oligomer dinamikus szerveződése, disszociációja és reasszociációja*, bár ez utóbbi nem föltétlenül szabályos szerkezetű komplexet eredményez (Ehrnsperger és mtsai, 1999; Rogalla és mtsai, 1999; Giese és Vierling, 2002). Vajon miért lehet fontos az újraasszociáció? Nem elégséges ugyanis a „segítségért kiáltó” fehérjék megragadása, hanem szükséges az újonnan kialakult *komplex stabilizálódása* is, hiszen maga a sHsp is -aktivizált állapotában- bizonyos értelemben egy veszélynek kitett fehérje forma. Ezt mi sem bizonyítja jobban, mint hogy maguk a sHsp-k is válhatnak a saját maguk aktivitásának áldozatául, ami tovább növeli a sejt károsodásának mértékét (Stege és mtsai, 1999). Ennek ellensúlyozására olyan *hetero sHsp komplexek* léteznek, amelyben az egyik sHsp inkább a sHsp komplex stabilitásáért, a másik pedig annak minél nagyobb aktivitásáért felelős. Ilyen példák az *E. coli* IbpAB és az emlős α AB-crystallin, ill. α B-crystallin/Hsp27 komplexek (van Boekel és mtsai, 1999; Fu és Liang, 2003).

Nem csak a hő befolyásolhatja a sHsp oligomerizációt és funkciót, hanem számos *poszttranszlációs fehérje módosítás* is, mint pl. deamidáció, aciláció, diszulfid hidak képződése, *(szulf)oxidáció*, glikoziláció és *foszforiláció*. Ez utóbbi emlősökben fontos szereppel bír a *sHsp-k szignál folyamatokban* betöltött szerepével kapcsolatban (Ehrnsperger és mtsai, 1999; Rogalla és mtsai, 1999; Gaestel, 2002; Diaz-Latoud és mtsai, 2005).

3.3. Prokarióta és növényi kismolsúlyú hősokkfehérjék funkciói

A *Synechocystis* PCC 6803 egyetlen sHsp-je a *Hsp17* vagy *Hsp16.6* (továbbiakban *Hsp17*), ill. általánosabb megközelítéssel a cianobakteriális sHsp-t *HspA* névvel illetik (Horváth és mtsai, 1998; Giese és Vierling, 2002; Asadulghani és mtsai, 2003). Ez a Hsp megköti és megóvjá a denaturálódott fehérjéket az aggregációtól, mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között. Affinitás kromatográfia, immunprecipitáció és tömegspekrometria használatával számszerint 42 fehérjét találtak, amelyek *in vivo*, hőstressz közben, specifikus módon kölcsönhatnak a Hsp17-tel. A lehetséges szubsztrát fehérjék rámutatnak arra, hogy a Hsp17 meglehetősen széles körben védheti a sejt funkcionalitását, mint pl. a *transzkripció*, *transzláció*, *szignál folyamatok* vagy *metabolizmus* terén (Török és mtsai, 2001; Basha és mtsai, 2004). Giese és Vierling (2002 és 2004) valamint Giese és mtsai (2005) véletlenszerű mutagenezissel a Hsp17 pontmutánsait állították elő, majd a megfelelő génnel a vad típust helyettesítve, ill. a fehérjét *E. coli*-ban túltermeltetve és kitisztítva, vizsgálták a mutáció hatását a sHsp szerkezetére és chaperon aktivitására *in vivo* és *in vitro* egyaránt. Első lépésben -a munka nagyságrendjét csökkentendő- a mutáns sejtek termotoleranciáját tesztelték, és ez alapján választottak ki jónéhány esetet további tanulmányozás céljára. Megállapították, hogy *a Hsp17 dinamikus oligomerizációs képessége, chaperon aktivitása és a sejt túlélőképessége között szoros összefüggés van*, minthogy olyan mutációk, amelyek az oligomer állandósult széteséséhez vezetnek, a protektív hatás jelentős csökkenését eredményezték. Habár megjegyzendő, hogy a dimer formájú Hsp17 mutánsok -az aktivizálódás elméletével összhangban- a denaturálódott fehérjék gyorsabb kinetikájú reaktiválódását tették lehetővé, mégis a sHsp/szubsztrát komplex valamilyen formájú reasszociációja, stabilizálódása elengedhetetlennek tűnik a hatékony chaperon funkcióhoz. Érdekes módon olyan N-terminális mutánsok, melyek sem a sHsp oligomerizációját, sem *in vitro* chaperon aktivitását nem befolyásolták számottevő mértékben, nem voltak képesek védelmet nyújtani a sejtnek. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy vagy az általuk használt *in vitro* chaperon teszt nem elégséges az *in vivo* fehérjevédelem modellezésére, vagy *a Hsp17 N-terminális része valamilyen más, a sejt életbenmaradása szempontjából lényeges funkció védelmében játszik szerepet.*

Fotoszintetizáló létformák esetén nem kétséges, hogy a *fotoszintézis* egy létfontosságú funkció, sőt a *tilakoid membrán* a sejt legérzékenyebb része hőstressz során, következésképp ennek *védelme* elemi érdekként jelenik meg (Berry és Björkman, 1980). Számos közlemény állítja, hogy a *sHsp*-k tilakoid membránhoz asszociálva *védik a fotoszintetikus funkciót a fény- és hő okozta károsodásoktól*. Deléciós mutánst használva független laborok mutatták ki, hogy a Hsp17 jelentősen hozzájárul a sejt termotoleranciájának, fokozott membrán stabilitásának kialakulásához, ill. a fotoszintetikus aktivitás védelméhez (Schuster és mtsai, 1988; Lee és mtsai, 1998; Nakamoto és mtsai, 2000; Török és mtsai, 2001; Heckathorn és mtsai, 2002; Fang és Barnum, 2003). *A sHsp hiánya a tilakoid struktúra drasztikus károsodásához vezet hőstressz körülmények között* (Lee és mtsai, 2000). Egy másik morfológiai munka is megerősítést adott arra nézve, hogy a *Synechococcus* HspA mind normál, de különösképpen stressz körülmények között meghatározó szereppel bír a tilakoid membrán szerkezeti integritásának és funkcionalitásának megőrzésében (Nitta és mtsai, 2005). Habár a *sHsp*-k egyaránt védenek hő- és fénystressz ellen, szerepük erélyesebben mégis a *fotoinhibíció elleni küzdelemben* mutatkozik meg, különösképpen, ha mindez még párosul a hőstressz kedvezőtlen hatásával is (Schuster és mtsai, 1988; Nakamoto és mtsai, 2000; Pike és mtsai, 2001). A védelem tekintetében igencsak egységes tanulmányok már korántsem annyira azonos véleményen vannak a protekció konkrét helyét illetően (Adamska és Kloppstech, 1991). Érdekes *-in vitro* transzport kísérletből és *in vivo* megfigyelésből származó megfigyelés, hogy a *sHsp* membrán asszociációját ill. transzportját befolyásolja a kloroplasztisz előélete, hogy az hősokkolt avagy sem. Értelmezésük szerint hősokk hatására nem csupán a *membrán* fluiditása változik meg, hanem annak szerkezete, organizációja is (Kloppstech és mtsai, 1985). Nem csak ez az *átrendeződés*, de akár egyéb változások a lipid- és protein összetételben is befolyásolhatják a (s)Hsp-k membrán asszociációját, amely minden bizonnyal egy jól koordinált folyamat (Glaczinski és Kloppstech, 1988). Egyes elgondolások szerint, mivel a fény legközvetlenebb módon a PSII reakciócentrumában elhelyezkedő *D1 proteint* károsítja, a védelem célpontjának ennek kell lennie (Schuster, 1988). Mások szerint a funkció közvetettebb megóvásáról lehet szó, mint pl. a *fotoszintetikus komplex perifériális* és igen hőérzékeny *fehérjéinek* vagy akár a fénybegyűjtő *fikobiliszómák* aggregáció elleni védelme (Nakamoto, 2000; Heckathorn, 2002). Heckathorn és mtsai (1998) úgy találták, hogy a *sHsp* a PSII elektron transzportot, nem a PSI funkciót

védi, és az *in vitro* mért protekció kinetikája túlságosan gyors egy fehérje reaktiváló mechanizmus lehetőségéhez. Egy a membrán lipid fázisát szelektíven módosító kísérlet arra utal, hogy a *Hsp17* expressziója és membrán asszociációja közvetlen és kölcsönös kapcsolatban áll a *tilakoid membrán lipidjeinek fizikai állapotával*, annak fluiditás jellemzőjével (Horváth és mtsai, 1998). Valójában a *Hsp17* egyaránt képes fehérjéket és lipideket védeni, azaz *amfitróp Hsp*-nek tekinthető, amely hordozza a *közvetlen vagy közvetett membrán védelem lehetőségét* is, sőt mindeközben akár citoszolikus fehérjéket is megóvhat (Török és mtsai, 2001; Nitta és mtsai, 2005). Ám hagyományosnak tekintett citoszolikus chaperon funkciója mellett, kétségkívül lényeges szerepet játszik a membrán funkció támogatásában is. Ennek igen szembetűnő bizonyítéka, hogy a *Synechocystis* Hsp-k expressziójának szabályzása - különösképpen a *Hsp17* esetében- erősen fényfüggő folyamat, amely nehezen köthető a citoszolikus fehérjék védelméhez, ill. nehezen függetleníthető a fotoszintézistől (Asadulghani és mtsai, 2003).

A túlzott mértékű vagy nagy energiájú (UV) fény nem csak a fehérjék direkt károsodását, de *reaktív oxidációs specieszek (ROS)* képződését is előidézheti a fotoszintetizáló membránban (Asadulghani és mtsai, 2003). Egy általánosabb elmélet szerint minden olyan tényező (pl. hőstressz), amely valamilyen elektrontranszport láncot kiszolgáló membrán integritását megbontja, az adott elektronlánc „kisiklásához”, egy *autooxidációs* jelenséghez vezet (Garbe és Yukawa, 2001). Az *oxidatív stressz* célpontjai a fehérjék és különösképpen a többszörösen telítetlen *lipidek*, amelyek további szabad gyököket generáló ROS hatására egy végeláthatatlan *peroxidációnak* vannak kitéve, amely drasztikus membrán szerkezeti károsodáshoz, csökkent membrán fluiditáshoz és megnövekedett permeabilitáshoz vezet (Farber, 1995). A sHsp-k képesek megvédeni a PSII és mitokondriális elektrontranszport folyamatokat (Downs és mtsai, 1998; Heckathorn és mtsai, 1998 és 2002). A fentebb tárgyalt mechanizmusok mellett a sHsp-k egyéb módon is mérsékelhetik a hő- és oxidatív stressz hatását. A sHsp *triptofán, cisztein és metionin* aminosavai megköthetik, deaktiválhatják a ROS-et (Jakob és mtsai, 1999). Az *oxidációt elszennvedett sHsp-k* konformációs változáson esnek át, amely *chaperon aktivitásuk elvesztésével* jár(hat) (Harndahl és mtsai, 1999 és 2001). Ez az öngyilkos *semlegesítő módszer* ésszerűtlennek tűnik, de a sHsp-k reaktiválásáról, *reverzibilis* működéséről más enzimszisztemek, pl. *metionin szulfoxid reduktáz* gondoskodnak (Gustavsson és mtsai, 2002). Miért akkor hát egy köztes szereplő ebben az oxidációs láncban? A

kloroplasztisz Hsp21 és *M. tuberculosis* Hsp16.3 két membrán lokalizált sHsp, amelyeknek lehetőségük van közvetlenül érintkezni és reagálni a membrán lokalizált ROS-kel, lipidekkel, amelyet egy citoszolikus enzim nem tud megvalósítani (Harndahl és mtsai, 1999). Érdekes észrevétel, hogy mivel a *M. tuberculosis* elsődleges célja kiállni a gazdaszervezet immunválaszának támadásait, pl. az oxidatív stresszt, *plazma membránjának védelme elsődleges* feladattá válik, amely mellett gyakorlatilag fontosságát veszíti a sHsp chaperon funkciójának megtartása (Abulimiti és mtsai, 2003). Ezt az elgondolást megerősítendő *in vitro* vizsgálták a lipid asszociált *Hsp16.3* szerveződését, amely *dimerek formájában kapcsolódott a lipid membránhoz*. Mivel a Hsp16.3 chaperon aktivitása annak oligomer állapotához kötődik, az előbbi megállapítás -legalábbis a *M. tuberculosis* sHsp esetén- megkérdőjelezi a sHsp-kre javasolt amfitróp működési mechanizmust, pontosabban azt, hogy az egyidejűleg ugyanarra a sHsp komplexre/oligomerre teljesüljön (Chang és mtsai, 1996; Török és mtsai, 2001; Chen és mtsai, 2003; Nitta és mtsai, 2005). Ez utóbbi értelmezés azonban nem zárja ki annak lehetőségét, hogy két különböző sHsp komplex egyidejűleg elláthassa a fehérjék és a membrán védelmét is.

Az *E. coli* sHsp-eket, IbpA-t és IbpB-t független csoportok mutatták ki a (hősokkolt) membrán frakcióban (Miyake és mtsai, 1993; Laskowska és mtsai, 1996). Később ezek egyike -feltételezésre alapozva állítását- műterméknek könyvelte el korábbi kijelentését, annak ellenére, hogy továbbra is megtalálták az *IbpAB*-t a *membrán frakciókban* (Kuczynska-Wisnik és mtsai, 2002; Laskowska és mtsai, 2004). Bár a fő Hsp-k más szerzők szerint nem vesznek részt a membrán termotoleranciájának kialakításában, fontos megjegyezni, hogy ezek mind figyelmen kívül hagyták a sHsp-k esetleges szerepét (Yatvin és mtsai, 1987; Shigapova és mtsai, 2005). Valójában az *E. coli* nem rendelkezik egy olyan *Synechocystis*-éhez hasonló membrán kötött funkcióval, amelynek tesztelésével meggyőző bizonyítékot lehetne adni az IbpAB membrán protektív szerepére. *Az IbpAB csak huzamosabb ideig, extrém magas hőmérsékletnek kitett sejtekben képes szignifikáns mértékű fehérjevédelmet nyújtani* (Kuczynska-Wisnik és mtsai, 2002). Egy másik tanulmány - IbpA/B túltermelő sejtvonalakokat használva- ugyanakkor rámutatott, hogy *az IbpA/B jóval gyorsabban is képes lehet a sejt túlélését befolyásoló védelmet nyújtani* (Kitagawa és mtsai, 2000). Mindez azt sugallja, hogy a sHsp-k a fehérjevédelmen kívül más védelmi funkciót is elláthatnak hő- vagy oxidatív stressz körülmények között. Ez a fölismerés és az a tény, hogy *az E. coli hősokkválasz beindítása, sőt a*

termorezisztencia kialakulása *pusztán a membrán lipid fázis szelektív módosításával elérhető* azt mutatja, hogy nem zárható ki az IbpAB esetleges membránvédő szerepe (Shigapova és mtsai, 2005). Ez nem szolgál példa nélküli esetként, a *M. tuberculosis* Hsp16.3-n kívül az *Oenococcus oeni* (tejsavbaktérium) Hsp18 (Lo18) is membrán asszociált, mely utóbbi expressziója és membrán asszociációja mind a kondicionáló hőstresszel, mind a hőanalóg membrán fluidizálószer, BA-lal elérhető (Jobin és mtsai, 1997; Delmas és mtsai, 2001).

3.4. Emlős kismolsúlyú hőszokkfehérjék funkciói

A humán genom 10 α Hsp-t, azaz sHsp-t kódol, amelyeket a HspB1-10 kategóriába sorolva is jelölünk, bár alternatív nevezéktan is használatos (Kappe és mtsai, 2003). Ezek szövetek közti, sejten belüli eloszlása, mennyisége, indukálhatósága és funkciója meglehetősen nagy változatosságot és specifikusságot mutat. A *Hsp27* hőstressz hatására a citoszolból *a sejtmagba* jut, és óvja a fehérjéket az aggregációtól (Kampinga és mtsai, 1994). A sHsp-k kölcsönhatnak a *citoszkeletáris elemekkel*, és foszforiláció-függő módon befolyásolják azok szerveződését (Liang és MacRae, 1997). A *Hsp27* az ubikvitinhez kapcsolódva aktív részese a *fehérjék degradációs* folyamatának (Parcellier és mtsai, 2003). Arrigo és Müller (2002) figyelemre méltó elképzelése szerint a *sHsp-k* nem passzív módon befagyasztják a félig károsodott fehérjék állapotát, várva a chaperon rendszerek „megmentésére”, hanem *egy aktív, deaggregáció-újraoligomerizációs folyamatban „kivonják a forgalomból” az oxidálódott fehérjéket*, ezzel elkerülve a rendkívül káros, proteolízisnek ellenálló „lipofuscin” aggregátumok képződését (Sitte és mtsai, 2000). Az újraaktivizálódó/ oligomer sHsp forma ugyanakkor -a *GSH-GSSG* (glutation) redox *detoxifikáló rendszeren keresztül*- képes a (pl. TNF α -okozta) oxidatív stressz ellen védeni, ill. a sejtet már előzetesen „redukált” állapotban tartani. Mindez megmutatkozik pl. az NF- κ B aktivizáció, *lipid peroxidáció és protein oxidáció gátlásában* vagy a sejt morfológiájának, mitokondriális membránpotenciáljának megőrzésében. Kutatásaik azonban arra is rámutatnak, hogy a sHsp-k közvetlen(ebb) módon is részesei a védelemnek (Mehlen és mtsai, 1996; Preville és mtsai, 1999; Ray és mtsai, 2001). Megannyi cikk hoz példát arra, hogy *emlős sHsp-k membrán lokalizáltak, védenek* pl. mitokondriális elektrontranszportot, membrán kötött enzim

funkciót, *befolyásolják* mikrofilamentumok membránhoz kapcsolódását, vagy szerepet játszanak a szürkehályog kialakulásában (Mulders és mtsai, 1985; Piotrowicz és Levin, 1997; Downs és mtsai, 1999; Cobb és Petrash, 2000 és 2002; Nakagawa és mtsai, 2001; Negre-Aminou és mtsai, 2002; van den Ijssel és mtsai, 2003; Derham és mtsai, 2003). A *membrán*, elsősorban lipidjei oxidációs érzékenysége folytán, az *oxidatív stressz érzékelőjeként* szolgálhat (Benderitter és mtsai, 2003). ROS, pl. *lipid szabad gyökök és peroxidációs termékek*, szerepet játsz(hat)nak az oxidatív stressz *szignál* folyamataiban (Starkopf és mtsai, 1998; Uchida, 2003; Poli és mtsai, 2004). A foszfatidil-szerin (PS) szelektív oxidációja és externalizációja megjelöli a sejtet a halálra az apoptózis során. A membrán aszimmetria megszűnését -egy lehetséges mechanizmus szerint- az apoptotikus redox effektor, citokróm c és a PS kölcsönhatása, reakciója eredményezi. Ismeretes, hogy a sHsp-k gátolják az oxidatív stressz indukálta apoptózist, a Hsp27 kölcsönhat a citokróm c-vel, így aktív résztvevő, mediátor lehet a fentebb vázolt apoptotikus folyamatban (Fabisiak és mtsai, 1998; Kagan és mtsai, 2000; Arrigo és mtsai, 2002). A *foszforiláció* és más poszttranszlációs módosítások által szabályozható aktivitású, oligomerizációjú és funkcionalitású *sHsp-k* -részeseivé válva a sejt szignál útvonalainak- nem csak a fehérjék, de *az egész sejt életének minőségellenőrei lehetnek*, az életfolyamatok meghatározó kereszteződéseiben döntést hozhatnak az életben maradásról vagy halálról (Ehnsperger és mtsai, 1999; Rogalla és mtsai, 1999; Narberhaus, 2002; Gaestel, 2002).

3.5. A kismolsúlyú hősokkfehérje kutatás jelentősége és távlatai

Nem kérdéses, hogy *fotoszintetizáló élőlények* termostabilitásában szerepet játszó tényezők megértése, esetleges módosítása óriási *gazdasági, környezet(védelm)i haszonnal* bírhat. Egyes patogén baktériumok gazdaszervezettel szembeni ellenállóképességében (is) meghatározó lehet a sHsp (membrán)védő képessége, mint az a *M. tuberculosis* esetében valószerűsíthető (Chen és mtsai, 2003). Ennek a védekezési mechanizmusnak a megértése közvetlen, specifikusabb ellentámadási felületet kínál a *fertőzéssel* szemben. Ha *alkalmazás* szintjén igyekszünk hasznosítani ismereteinket, akkor nem elegendő a megfigyelés, szükséges a mélyebb szintű megismerés, *hatásmechanizmusok* fölrajzolása is. A sHsp-k mindenféle élőlényben

jelenlevő chaperon család, és bár szekvenciájukban, méretükben, környezetükben jelentősen különbözhetnek, mégis nagyfokú *funkcionális hasonlóságot* mutatnak. Általában elmondható, hogy *hő- és oxidatív stresszhez* köthető jelenlétük, védenek fehérjéket, membrán integritást és funkciót.

A *sHsp-k* számos betegség során megjelennek, fölhalmozódnak, ill. valamilyen -nem feltétlenül előnyös- módon összefüggésbe hozhatók azokkal. Ilyenek többek között a *rák, a szürkehályog, kardiovaszkuláris, neurodegeneratív vagy autoimmun betegségek*. Amellett, hogy potenciálisan *diagnosztikai markerként* szolgálhatnak, szerepük megértésével talán közelebb kerülhetünk a gyógyítás módjához, olyan *gyógyszerfejlesztésbe* lehet kezdeni, amely központi elemként kezeli a *sHsp-k működését*. A fentebb említett betegségek nem csak a sHsp-khez köthetők, de mindegyikük szorosan kapcsolódik a membránokhoz, akár közvetlenül (pl. szürkehályog, Alzheimer kór, prion betegség; általában stressz rezisztencia), ill. intra- vagy extracelluláris szignál (citokinek, metasztázis), lipid peroxidáció (ischemia-reperfusio) révén (Clark és Muchowski, 2000; Crabbe és Hepburne-Scott, 2001; Snoeckx és mtsai, 2001; Arrigo és mtsai, 2002). Ezek alapján a sHsp-membrán kutatásnak egyértelműen rendkívüli létjogosultsága van. Egy *drogjelölt* molekula, névszerint a *Bimoclomol*, anélkül, hogy protein denaturációt idézne elő, pusztán a membrán egyes lipidjeivel szelektíven kölcsönhatva, szinergikus módon serkenti a hsp-k indukcióját, ezzel elősegítve a sejtek edződését, azaz nagyobb hő- és oxidatív (ischemia) stressz elleni rezisztenciájának kialakulását (Vígh és mtsai, 1997; Török és mtsai, 2003). Meg kell még jegyezni, hogy *shsp-k* specifikusan, a fő hsp-ktől függetlenül is indukálódnak/indukálhatók, ami nem csak azt jelzi, hogy „*életútjuk*” jórészt függetlenül zajlik a többi Hsp-től, de egyben *kivételes lehetőségeket is kínál specifikus gyógymechanizmusok kidolgozására* (Eskenazi és mtsai, 1998; Kato és mtsai, 1999; Trautinger, 2001; Sőti és mtsai, 2005).

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. *Synechocystis* PCC 6803

1.1. *Synechocystis* sejtek és növesztési körülményeik

A *Synechocystis* sejteket állandó megvilágítás mellett ($35 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$), fotoautotróf körülmények között, BG-11 tápoldatban (pH 7,5) neveltük 30°C -on. A tenyészetek növekedéséhez szükséges szénforrást 1 % CO_2 -t tartalmazó steril levegő buborékolatása vagy NaHCO_3 (3,4 mM) biztosította. A növekedés mértékét abszorpció mérésével követtük ($\lambda = 800 \text{ nm}$) egy HP 8452A típusú spektrofotométerrel, a sejteket azok exponenciális növekedési szakaszában ($\text{OD} = 1,5 \pm 0,3$) használtuk fel. A sejt kultúrát fényben ($35 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) és sötétben, 30°C -on tartottuk kontrollként és 42°C -on, 3 órán át inkubáltuk, a fény és a hő akklimatizációs szerepének vizsgálata céljából (Lehel és mtsai, 1993).

A Hsp17 pontmutáns sHsp-eket expresszáló sejt vonalakat E. Vierling (Tucson, AZ, USA) laboratóriuma hozta létre. A konstrukciók a megfelelő, *hsp17* pontmutánst hordozó pNaive plazmid (spectinomycin rezisztencia) dupla *deléciós* mutánsba ($\Delta hsp17$, kanamycin rezisztencia és $\Delta clpB$, eritromycin rezisztencia) történő integratív transzformációjával készültek. Ezeket a sejteket a fentebb leírtaknak megfelelően kezeltük, a megfelelő antibiotikumok és a mutánsok növekedését elősegítendő 5 mM glükóz hozzáadásával kiegészítve a tápoldatot (Giese és Vierling, 2002 és 2004).

1.2. *In vivo* tilakoid stabilitás és szerkezet vizsgálatok

1.2.1. Oxigén fejlődés mérés

A fotoszintézis hőinaktiválódási folyamatát egy Clark típusú oxigén elektróddal követtük. Az oxigén fejlődést intakt sejtekben, külsőleg hozzáadott elektron donor vagy akceptor nélkül mértük (ld. 16. ábra). A sejteket a meghatározott hőmérsékleten 30 percig tartottuk sötétben, majd a szuszpenzió Chl *a* koncentrációját

15 µg/ml-re állítva 30 °C-on mértünk normál megvilágítás mellett (Lehel és mtsai, 1993). A sejteket előzetesen a 1.1. fejezetben leírtak szerint kezeltük a fény- és hőaklimatizáció szerepének vizsgálata céljából.

A Hsp17 pontmutáns sHsp-ket expresszáló sejteket (ld. Eredmények és megvitatásuk 2.2.2. fejezet) fényben, 42 °C-on, 3 órán át kezeltük mielőtt az UV-B stressz fotoszintetikus funkció működésére gyakorolt hatását vizsgáltuk. A hőedzést követően 15 percig inkubáltuk a mintákat 30 °C-on, normál megvilágítás mellett, hogy azok hőmérsékletét visszaállítsuk a normál értékre, mely egyben a mérés hőmérséklete is volt. Ezután a sejteket 2 órán át egy 10-12 µE/m²/s megvilágítást biztosító Vilbert-Lourmat UV-B lámpa fényének, majd 1 óráig normál megvilágításnak tettük ki. A sejtek PSII aktivitására jellemző „steady-state” oxigén fejlődés értékeket (0,5 mM DCBQ elektron akceptor jelenlétében) különböző időpontokban detektáltuk (Cadoret, 2005).

1.2.2. Klorofill *a* fluoreszcencia mérés

A tilakoid membrán hőstabilitását a hőindukálta „steady-state” klorofill *a* fluoreszcencia változással követtük egy Quanta Master QM-1 luminospektrométerrel (PTI, Princeton) intakt sejtekben. A Chl *a* a PSII fehérje komplexek hőstabilitásának jellemzésére általánosan elfogadott belső, azaz nem kívülről hozzáadott fluoreszcens molekula. A 10mM TES (NaOH) pH 7,0, 10 mM MgCl₂ pufferben fölvelt minták Chl *a* koncentrációját 1 µg/ml-re, a fűtési sebességet 0,5 °C/min-re állítottuk. A gerjesztési 435 nm, az emissziós hullámhossz 680 nm volt, 5 nm-es résszélességek mellett (Schreiber és Armond, 1978; Horváth és mtsai, 1998). A sejteket előzetesen a 1.1. fejezetben leírtak szerint kezeltük a fény- és hőaklimatizáció szerepének vizsgálata céljából.

1.2.3. Fluoreszcencia anizotrópia mérés

Az izolált tilakoid membrán „átlagos” fluiditás jellemzőjét DPH anizotrópia méréssel követtük a hőmérséklet függvényében, egy Quanta Master QM-1 luminospektrométerrel (PTI, Princeton). A 10 mM TES (NaOH) pH 7,0, 10 mM MgCl₂ pufferben fölvelt, 3 µg/ml Chl *a* koncentrációjú szuszpenzióhoz 0,2 µM jelölőt adtunk, majd 30 percig inkubáltuk 4 °C-on. A fűtési sebességet 0,5 °C/min-re

állítottuk, a gerjesztő fény hullámhossza 360 nm volt, az emittált fény intenzitását 460 nm-en detektáltuk 5 nm-es résszélességek mellett (Horváth és mtsai, 1998). A fluoreszcencia anizotrópia értékeket, melyek fordítottan arányosak a fluiditás jellemzővel, a mért, a gerjesztő fény polarizációs síkjára merőleges és azzal párhuzamos emittált fényintenzitások és a műszerparaméter segítségével határoztuk meg (Lakowitz, 1984). A sejteket előzetesen a 1.1. fejezetben leírtak szerint kezeltük a fény- és hőakklimatizáció szerepének vizsgálata céljából.

1.2.4. Membrán mikroheterogenitás vizsgálat

Az izolált tilakoid membrán mikroheterogenitásának jellemzésére a mintákat a 1.2.3. fejezetben leírtak szerint jelöltük DPH-val, és a próba életidő eloszlását elemeztük. A kísérleteket egy Quanta Master QM-1 lüminospektrométerrel (PTI, Princeton) végeztük el 30 °C-on. A gerjesztési fényt 358 nm-nél egy impulzus üzemi N₂ lézer (PL2300)-festéklézer (PL202) (PTI) szolgáltatta, a fluoreszcencia lecsengést 460 nm-nél követtük (Mayor és mtsai, 1992). A sejteket előzetesen a 1.1. fejezetben leírtak szerint kezeltük a fény- és hőakklimatizáció szerepének vizsgálata céljából.

1.3. Tilakoid membrán és lipidek izolálása, elválasztása, analízise és előkészítése

1.3.1. Tilakoid membrán izolálása, sejtfractionálás

A tilakoidban gazdag frakció izolálása 0-4 °C között történt. 100 ml összegyűjtött tenyészetet (5000 g, 10 min) 3 ml pufferben (10 mM TES (NaOH) pH 7.0, 10 mM MgCl₂), 1-1 mM proteáz gátló (PMSF, benzamidin, ε-amino-kapronsav) jelenlétében főluszpendáltuk, majd a továbbiakban sötétben és jégen tartottuk. A sejteket 0,1 mm átmérőjű üvegyöngy és 3x3 min vortexelés segítségével tártuk föl. A sejttörmelékét és a fel nem tárt sejteket 5000 g, 10 min centrifugálással távolítottuk el. A felülúszót (27000 g, 30 min) elválasztottuk a tilakoid gazdag pellet és „citoszolikus” felülúszó frakciókra. Ez utóbbit, amely többnyire citoszolikus fehérjéket és a tilakoidról leszakadt proteineket tartalmazza, szolubilis fehérje

frakcióként kezeltük. A tilakoid frakciót egyszer mostuk, hogy a lazán kötődő fehérjéket (főként fikobiliproteinek) eltávolítsuk (Kovács és mtsai, 1994a).

1.3.2. Lipidek izolálása, elválasztása és analízise

A lipideket kloroform:metanol (1:2) extrakciós eljárással nyertük ki a sejtekből, izolált membránokból és liposzóma rendszerekből (Bligh és Dyer, 1959). A neutrális (TNL) és poláros lipideket (TPL) -és szükség esetén- a TPL lipidosztályokat vékonyréteg kromatográfia (TLC) (szilikagél vékonyréteg, Merck 5721) segítségével választottuk el, kloroform:metanol:28 % NH₄OH (65:35:5) eluens elegyet használva (Sato és Murata, 1988). Az egyes lipidek megjelöléséhez ill. azonosításához a vékonyréteg lapok széleit ANS-sel fújtuk le. A lipid foltokra 17:0 belső standardot csepegtettünk, lekapartuk azokat, majd átészterítéssel alkalmassá tettük a mintákat zsírsavjaik gázkromatográfiás analízisére (Vigh és mtsai, 1993). A zsírsavelemzést egy Shimadzu GC-MS-QP2010 típusú GC-MS-sel végeztük el. Az elválasztáshoz egy 30 m x 0,25 mm (0,2 µm film borítású) szilika kapilláris SP-2330 típusú kolonnát (Supelco) használtunk. A deszolvatáció 240 °C-on történt, a minta komponenseit He vivőgázzal, 160-200 °C gradiens elúcióval választottuk el. A komplex lipidek mennyiségét, a zsírsavmennyiségből visszaszámolva, átlagos moltömegük alapján határoztuk meg (Kates, 1972).

A lipid molekula specieszek fejcsoport és zsírsav ill. zsírsav pozíció azonosítása LC-MS technikával történt. A molekula specieszeket egy LC-10vp típusú folyadékkromatográfia, Supelcosil LC-18 oszlopon választottuk el, acetonitril:izopropanol (3:2) eluenssel, amely 0,5 mM ammónium-acetátot is tartalmazott. Az eluátum ESI-MS azonosítása egy QP8000 kvadrupólus tömegspektrométerrel történt. A deszolvatációs vonalat 230 °C-ra fűtöttük, a kapilláris és deflektor feszültséget 4,5 kV-ra ill. 90 V-ra állítottuk (Guella és mtsai, 2003).

1.3.3. Lipid mintaelőkészítés

A dimirisztoil-foszfatidil-glicerol (DMPG), dioleil-foszfatidil-glicerol (DOPG), 1-palmitoil-2-oleil-foszfatidil-glicerol (POPG) lipideket (Sigma) és a borsó ill. spenót monogalaktoszil-diacilglicerol lipideket (Avanti Polar Lipids) vásároltuk.

A metabolikusan ^{14}C -izotópjelölt totál polár lipid keverék (0,4 mCi/mg) előállításához 100 ml sejtet növesztettünk rázatás mellett, az $\text{OD}_{800} = 0,15\text{-}0,20$ tartományban inaktív NaHCO_3 -on (2 mM), majd $^{14}\text{C}\text{-NaHCO}_3$ (+1,4 mM, 0,9 mCi) hozzáadásával $\text{OD}_{800} = 1.5$ sejt koncentrációig. Ezután a sejt kultúrát $42\text{ }^\circ\text{C}$ -on, 3 órán át inkubáltuk továbbra is normál megvilágítás mellett, majd a fentebb leírtak szerint izoláltuk és analizáltuk a lipideket, amelyek fajlagos aktivitását folyadékszintillációs módszerrel határoztuk meg.

Az 1-oleil-2-palmitoil-foszfatidil-glicerolt (OPPG) a megfelelő PC-ből (OPPC) foszfolipáz D katalizálta heterogén (éter/vizes fázisú) reakcióban állítottunk elő, majd a kívánt terméket a reakcióelegyből kloroform:metanol:ecetsav (65:25:10) eluens elegy és referenciaként szolgáló standardok (PC, PG) használatával, TLC-val tisztítottuk (Hirche és Ulbrich-Hofmann, 1999). Ellenőrzésképp analizáltuk a minta zsírsavösszetételét is.

Az izolált lipidek teljes mértékű heterogén katalitikus hidrogénezését PdRh-PVPP katalizátor segítségével, H_2 atmoszféra ($p = 1$ bar) alatt valósítottuk meg. A zsírsavtelítés mértékét a katalizátortól mosással és szűréssel elválasztott termék zsírsavösszetételének meghatározásával ellenőriztük (Horváth és mtsai, 1998).

Liposzóma modell rendszerek előállításához a kloroform:metanol (2:1) oldószerben tárolt tisztított lipideket bepárooltuk inert gáz alatt, majd a maradék szolvens eltávolítása érdekében a mintát legalább 1 órán át vákum alatt szárítottuk. Ezt követően a tiszta lipidet a kívánt vizes pufferben, a lipid T_m fölött hidratáltuk, majd 10x ismételt, sorozatos fagyasztás-felolvasztással ($\text{N}_{2(lq)}$) többrétegű vezikulákat (MLV) kaptunk. Az MLV szuszpenziót átláthatóságig szonikálva kisméretű, egyrétegű vezikulákat (SUV, $d \sim 20\text{-}40\text{ nm}$) nyertünk. A MLV rendszert extrúziós eljárással (LiposoFast, Avestin, Inc.) polikarbonát filteren ($d_{\text{pórus}} = 100$ és 200 nm) többször „átszűrve” nagyméretű, egyrétegű, jól meghatározott méreteloszlású vezikulákhoz (LUV) jutottunk.

1.4. Gél elektroforézis, immunoblotting és autoradiográfia

A különböző minták fehérjeösszetételét egydimenziós SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) elemeztük (BioRad MiniPROTEAN II). Híg oldatok esetén a mintát 5x-ös térfogatú acetonnal kicsaptuk, majd a leülepitett

fehérjéket a kívánt térfogatú mintapufferben vettük föl. Az SDS mintapuffer hozzáadását követően a mintákat 1-2 órán keresztül vortexeltük, majd 60-95 °C-on 5 percig tovább szolubilizáltuk. Általában 15 %-os, ritkán 10 %-os géleket használtunk az elválasztani kívánt fehérje molekulatömeg tartomány függvényében. A fehérjéket Coomassie BBR-250 festéssel tettük láthatóvá. Szükség esetén vagy immunoblot céljából a géltre vitt fehérje mennyiségeket protein koncentráció mérésével (Lowry módszer) vagy próbagél segítségével állapítottuk meg.

A tilakoid membrán és citoszolikus frakciókat anti-Hsp17 (E. Vierling, Tucson, AZ, USA), anti-GroEL/Cpn60 (Kovács és mtsai, 1994a) és anti-DnaK (Shigapova és mtsai, 2005) ellenanyagokkal vizsgáltuk. Elektroforézis után a fehérjéket a festetlen gélről ImmobilonTM-P (PVDF, 0,45 µm, Millipore) membránra blottoltuk 10 mM CAPS-NaOH, pH 11, 10 % metanol tartalmú puffert használva, az alábbi körülmények mellett:

Hsp17-hez, 200 mA, 45 min;

GroEL/Cpn60- és DnaK-hoz, 500 mA, 1 h.

A membrán szabad helyeit 5 %-os sovány tejjel blokkoltuk 1 órán át, szobahőmérsékleten rázatva vagy egész éjszakán át 10 °C alatt. Első ellenanyagként anti-Hsp17-tel 1:750 hígításban 1-2 óráig,

anti-GroEL/Cpn60-nal 1:3000 hígításban 1 óráig,

anti-DnaK-val 1:1000 hígításban 1 óráig inkubáltuk a membránokat.

Második ellenanyagként a „kecske anti-nyúl” torma-peroxidáz jelölt IgG-oldatot (Sigma) használtuk 1:10000 hígítás és 1 h inkubációs idő mellett. Az előhíváshoz az Amersham ECL reagenseit és az általuk leírt módszert használtuk.

Radioaktív minta esetén a Coomassie festés után a gélt tömény ecetsavban oldott PPO-val átitattuk Skinner és Griswold (1983) módszere alapján, Whatman MM3 szűrőpapírra szárítottuk, filmet (Medifort RP, Medical X-ray film, Forte) helyeztünk rá és -80 °C-on exponáltuk (2-4 hét), majd a filmet előhívtuk.

1.5. *Synechocystis* Hsp17 túltermelése, izolálása és tisztítása

A vad típusú (WT), és pontmutáns S2Y, L9P, Q16R, L66A, F102S, V143A Hsp17 fehérjéket *E. coli*-ban túltermeltük, majd tisztítottuk (Giese és Vierling, 2002). A tisztítási módszer röviden ismertetve a következő. A megfelelő pJC20 Hsp17

plazmida (E. Vierling) frissen transzformált BL21 *E. coli*-val inokuláltunk 2-4 l LB tápoldatot és éjszakán át növesztettük 37 °C-on. Másnap 0,24 g/l IPTG hozzáadásával 4 órán keresztül indukáltuk a sHsp termelődését. A további műveleteket jégen, hűtve ill. hűtött pufferek használatával végeztük. A sejteket 5000 g, 15 min centrifugálással leüleptítettük, majd mostuk TE oldattal (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA). A pelletet kb. 70 ml TE-ben, 1 mM DTT, 1 mM benzamidin és 5 mM amino-kapronsav jelenlétében főluszpendáltuk. A szuszpenziót 4x0,5 percig szonikáltuk, miközben az első és harmadik szonikálás után 700 µl 100 mM PMSF-t adtunk a preparátumhoz. A főtárt sejtek szolubilis és nem oldható frakcióját 13 krpm, 30 min centrifugálással választottuk el (Sorvall, SS-34 rotor). SDS-PAGE-sel megállapítottuk, hogy a tisztítani kívánt fehérje túlnyomó részt melyik frakcióban található. Ha a fehérje leginkább szolubilis forma volt, akkor a felülúszóból 0-20, 20-40, 40-60, 60-95 % ammónium-szulfát precipitálással tovább tisztítottuk a preparátumot. Az egyes frakciókat 14 krpm, 20 min (Sorvall, SS-34 rotor) centrifugálással üleptítettük, és azok fehérjeösszetételét gélelektorforézissel (is) ellenőriztük. A kívánt frakció(ka)t 6 ml DTT-t és proteáz inhibitorokat tartalmazó TE pufferben főluszpendáltuk, majd dializáltuk. A fehérje oldatot 0,2-0,8 M (TE, DTT) cukorgradiensre rétegeztük és 50 krpm, 4 órát ultrafugáltuk (Beckman, VC53 rotor). A gradiensből gyűjtött frakciókat gélelektorforézissel elemeztük, majd kiválasztottuk a legtisztább mintákat. Ha a Hsp17 mutáns fehérje a sejt főtárását követően a nem oldható frakcióban volt, 6 M urea kezeléssel szolubilizáltuk a pelletet, amelyből a sejtörmelékot leválasztottuk és a felülúszót dializáltuk. A dialízis után a Hsp17 oldható formában maradt. Ebben az esetben az ammónium-szulfát „kisózás” értelemszerűen kimaradt. A cukorgradiens vagy -nem szolubilis Hsp17 esetén- a dialízist követően a 3 M ureával előzetesen kezelt preparátumot 3 M ureával (DTT) ekvibrált DEAE ioncserélő oszlopra vittük föl, majd 0-300 mM NaCl gradienssel eluáltuk a gyantára kötött fehérjéket. A frakciókat ismét analizáltuk, majd dializáltuk. Ha a fehérje tisztasága nem volt megfelelő, a preparátumot „HiTrap Butyl” hidrofób oszlopon tovább tisztítottuk. A mintát és az oszlopot 50 mM nátrium-foszfát (pH 7,3), 4 M NaCl, 1,5 M urea pufferrel ekvibráltuk, majd az oszlopra kötött anyagot 4-0 M NaCl gradienssel eluáltuk. A frakciók elemzésével a legtisztább mintákat választottuk ki, melyeket TE oldattal szemben dializáltunk. A fehérje koncentrációkat microBCA módszerrel (Pierce) határoztuk meg, a mintákat -(20-80) °C-on tároltuk.

1.6. *In vitro* membrán stabilitás és lipid-fehérje kölcsönhatás vizsgálatok

1.6.1. „Monolayer” kísérletek

A “monolayer” kísérletekhez egy KSV3000 Langmuir Blodgett készüléket használtunk (KSV Instruments, Helsinki). A lipid-puffer határfelület felületi feszültségét a felületre merőlegesen belemerülő Pt-lemezzel mértük. A lipideket (ld. 1.3.2. és 1.3.3. fejezetek) közvetlenül a szerves oldószerből adagolva rétegeztük a pufferre olyan mennyiségben, hogy a kívánt felületi nyomást elérjük. A tiszta lipidek fizikai sajátságait vizsgálandó, a pufferre (20 mM nátrium-foszfát, pH 7,5) rétegzett monomolekulás lipid réteg izobár ($\Pi = 20$ mN/m) hőmérséklet görbéjét vettük föl a felület nagyságát követve (ld. 29-31. ábra). A görbék inflexiós pontját (T_m) numerikus polinomillesztést (Mathematica 3.0) követően határoztuk meg.

A fehérje-lipid kölcsönhatás kísérletekhez állandó felület mellett a lipid réteg kétdimenziós nyomását, azaz a kezdeti felületi feszültséget állítottuk be ($\Pi_{\text{kezdeti}} = 21-41$ mN/m), izoterm (23 ± 1 °C) körülmények között, ahol a legkisebb felületi nyomás értéket nagyobbak választottuk, mint amit a felületaktív fehérje önmagában elérhetne. A lipid felszín alá injektáltuk a fehérjét, és állandó kevertetés mellett követtük a felületi feszültség változását. Amennyiben a fehérje képes behatolni az adott felületi nyomású lipid réteg közé, az a kezdeti felületi feszültség növekedését eredményezi (ld. pl. 36. ábra). A változás mértéke arányos a fehérje inszerciós, lipid kölcsönható képességével, de a változás várható értéke ugyanakkor a kezdeti lipid nyomás növekedtével párhuzamosan csökken. A kölcsönhatás jellemzésére elfogadott az a kezdeti lipid nyomás érték (tengelymetszet), ahol a fehérje már nem képes inszertálódni (ld. pl. 22. ábra). Ezen túlmenően a felületi feszültség változásának sebessége kinetikai információval szolgál (ld. pl. 36. ábra). Természetesen a fehérje koncentráció függvényében is változik a kölcsönhatás nagysága (ld. pl. 39. ábra), ezért -a koncentráció profil mérésének kivételével ($\Pi_{\text{kezdeti}} = 22$ mN/m)- olyan protein koncentrációt használtunk, ahol további fehérje hozzáadás már nem eredményezett újabb változást. A kizárólag vad típusú Hsp17-tel (+8,0 $\mu\text{g/ml}$) végzett kísérletekben 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM KCl, 20 mM Mg-acetát, a vad típusú és mutáns Hsp17 fehérjék (+4,2 $\mu\text{g/ml}$) összehasonlító vizsgálatához 20 mM nátrium-foszfát

(pH 7,0), 20 mM NaCl, az IbpA és IbpB (+6,8 µg/ml, $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) tanulmányozására 20 mM nátrium-foszfát (pH 7,0) puffereket használtunk (Blume, 1979; Török és mtsai, 1994 és 2001).

1.6.2. Lipid membrán fluditás mérések

A *Synechocystis* lipidekből előállított lipid membrán stabilitásának vizsgálatához 10 mM TES (NaOH) pH 7,0, 10 mM MgCl_2 pufferben fölvetett SUV, a Hsp17 mutáns fehérjék lipid kölcsönhatásának tanulmányozása céljából TPL LUV ($d = 100\text{ nm}$) liposzóma modell rendszereket használtunk. A vezikulákat az 1.2.3. fejezetben leírtak szerint jelöltük és vizsgáltuk DPH-val, azzal a különbséggel, hogy a méréshez az emissziós hullámhosszat 420 nm-nek, a fűtési sebességet pedig 0,5-1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -nek választottuk. Átlagosan 17 µg/ml lipidet használtunk, amely megfelelő intenzitású jelet biztosított. A Hsp17:lipid arány 3:4 (m/m) volt, a fehérjéket 30 percig inkubáltuk a LUV-okkal 20 mM nátrium-foszfát (pH 7,0), 20 mM NaCl pufferben (Török és mtsai, 1997).

1.6.3. FTIR és DSC mérések

Infravörös spektroszkópia és kalorimetriás mérésekhez (MGDG, PG) MLV modell membránokat használtunk 60 mg/ml ill. 100 mg/ml koncentrációban, melyeket 10 mM TES-NaOH (pH 7,1) pufferben vettünk föl. A lipideket 30 $^{\circ}\text{C}$ -on növesztett *Synechocystis* sejtekből izoláltuk. A Hsp17-t 30 mg/ml (FTIR) ill. 50 mg/ml (DSC) koncentrációban, 30 percig inkubáltuk a lipidekkel. A FTIR spektrumokat 4 cm^{-1} felbontás mellett, a 3600-900 cm^{-1} hullámszám tartományban, 4 µl mintát használva gyűjtöttük egy Perkin-Elmer 2000 IR spektrométerrel. Spektrumonként 8 interferogram analízisét a SPECTRUM 2000 (Perkin-Elmer) szoftverrel végeztük. A DSC méréseket egy Perkin-Elmer DSC7 DSC-vel (Calorimetry Sciences, Provo, UT) végeztük el. A fűtési sebességet 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -re állítottuk, a mérésekhez 20 µl mintát használtuk.

1.6.4. Lipid-fehérje kötés vizsgálat biokémiai módszerrel

TPL-ből extrúziós eljárással készített liposzómákat (1 mg/ml) (LUV, d= 200 nm) 1 órán keresztül inkubáltunk Hsp17 fehérjékkel (0,5 mg/ml) 25 °C-on. A liposzómákat 60 krpm, 1 h, 25 °C (Beckman, TLA-100.3 rotor) centrifugálással üleptítettük, majd a pellet és felülúszó frakciókat óvatosan elválasztottuk. Az egyes mintákból annyit vittünk föl géltre elektroforézissel (SDS-PAGE) történő elemzés céljából, hogy 1:1 arányú megoszlás esetén 13,5-13,5 µg fehérje legyen a gél pellet és felülúszó frakciójában egyaránt, ezzel kisebb mennyiségű protein kimutatására is lehetőséget adva. Az izotóp jelölt (¹⁴C-TPL) liposzómákkal végzett kísérleteket hasonlóképp vittük véghez, azzal a különbséggel, hogy a Coomassie festés után a gél izotóp tartalmát kimutatandó, azt autoradiográfiával vagy folyadékszintillációs módszerrel elemeztük. Ez utóbbi esetben kivágtuk a vizsgálni kívánt valamint a hasonló méretű (inaktív) kontroll csíkokat a gélből, majd pottereléssel vízben elhomogenizáltuk és Ultima-Gold LSC koktélaban mértük a radioaktivitásukat.

2. Escherichia coli

2.1. *Escherichia coli* sejtek és növesztési körülményeik

MC4100 vad típusú és Δ IbpAB (kanamycin rezisztencia) *E. coli* sejteket ill. az IbpA, IbpB, IbpAB túltermelő plazmidokat B. Bukau (Heidelberg, Németország) bocsátotta rendelkezésünkre (Mogk és mtsai, 2003). A pUHE21-ibpA, -ibpB, -ibpAB plazmidokat (ampicillin rezisztencia) és a sHsp termelést represszáló lacI gént hordozó pBB529 plazmidot (spectinomycin rezisztencia) a Δ IbpAB sejtekbe transzformáltuk, majd a konstrukciókat szekvenálással és fehérje indukciót követően immunoblotting-gal ellenőriztük (Buchberger és mtsai, 1994; Tomoyasu és mtsai, 2001). A sejt kultúrákat 30 °C-on, a megfelelő antibiotikummal kiegészített LB tápoldatban növesztettük, a növekedés mértékét abszorpció mérésével ($\lambda = 600$ nm) egy HP 8452A típusú spektrofotométerrel követtük. A kísérletekhez szánt sejteket OD= 0,1-ről előkultúrából indítottuk és az OD= 0,8-1,0 tartományban használtuk fel azokat. A sHsp túltermelést az OD= 0,2-0,5 tartományban 1 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk. Az indukciós időt a termelni kívánt fehérje mennyiség függvényében

választottuk meg. Hősokkolt minták előállításához 15 percen át, 50 °C-on kezeltük a sejteket, kivéve az NPN permeabilitás méréseknél alkalmazott hőmérséklet sorozatot.

2.2. Membrán frakcionálás

Az *E. coli* külső és belső membránokat alapvetően Sato és mtsai (1977) munkája alapján izoláltuk, a következők szerint. 1l sejttenyészetet OD= 1,0-ra növesztettünk, majd 4 °C-on 6 krpm, 10 min (Sorvall, GS-3 rotor) centrifugálással ülepitettük. Hősokkolt mintákhoz a sejteket előmelegített tápoldatban vettük föl, majd az inkubációs idő leteltével újra leülepitettük. A továbbiakban jégen, hűtve ill. hűtött pufferek használatával dolgoztunk. A pelleteket M pufferben (10 mM HEPES, 10 % glicerol, pH 7,4), 2 mM EDTA és 0,8 µl/ml merkapto-etanol hozzáadása mellett kétszer mostuk (6 krpm, 10 min, Sorvall, GSA rotor). A sejteket összesen 10 ml pufferben szuszpendáltuk fel, majd 2x10.000 PSI nyomással „French press” segítségével föltártuk azokat. 9 krpm, 15 min (Sorvall, SS-34 rotor) centrifugálással elválasztottuk a szuszpenziót, majd a felülúszót tovább szeparáltuk egy 30 krpm, 1 h (Beckman, SW-41 rotor) ultrafugálással. Az 1 ml-ben fölsuszpendált pelletet M pufferben készített háromrétegű cukorgradiensre (0,77 M/ 4,5 ml, 1,44 M/ 5,0 ml, 2,12 M/ 1,5 ml) rétegeztük. A mintákat 30 krpm fordulaton, egész éjszakán át ultrafugáltuk (Beckman, SW-41 rotor). Fölről haladva összegyűjtöttük a belső és külső membránokat, melyek jól elkülönültek az esetleges fehérje aggregátum frakciótól. A mintákat TES-NaOH (pH 7,1) pufferrel mostuk (30 krpm, 1 h, Beckman, SW-41 rotor), majd a pelleteket 500 µl pufferben vettük föl, és fölhasználásukig -80°-on táruktuk.

2.3. Gél elektroforézis és immunoblotting

A különböző minták fehérjeösszetételét egydimenziós SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) elemeztük (BioRad MiniPROTEAN II). Az SDS mintapuffer hozzáadását követően a mintákat 1-2 órán keresztül vortexeltük, majd 60-95 °C-on 5 percig tovább szolubilizáltuk. Általában 10-15 %-os géleket használtunk a fehérjék elválasztására, amelyeket Coomassie BBR-250 festéssel tettünk láthatóvá. A géltre vitt fehérje mennyiségeket próbagél segítségével vetettük össze.

A teljes sejt és izolált membrán frakciókat anti-IbpAB ellenanyagokkal vizsgáltuk, melyeket K. Liberek (Gdansk, Lengyelország) és B. Bukau (Heidelberg, Németország) ajándékoztak nekünk. Elektroforézis után a fehérjéket a festetlen gélről ImmobilonTM-P (PVDF, 0,45 µm, Millipore) membránra blottoltuk 10 mM CAPS-NaOH, pH 11, 10 % metanol tartalmú puffert használva, 200 mA áramerősség mellett, 45 percen át. A membrán szabad helyeit 5 %-os sovány tejporral blokkoltuk 20 percen keresztül szobahőmérsékleten rázatva. Anti-IbpAB ellenanyaggal 1:2000 ill. 1:5000 hígításban 2 óráig inkubáltuk a membránt. Második ellenanyagként a „kecske anti-nyúl” torma-peroxidáz jelölt IgG-oldatot (Sigma) használtuk 1:10000 hígítás és 1 h inkubációs idő mellett. Az előhíváshoz az Amersham ECL reagenseit és az általuk leírt módszert használtuk.

2.4. *In vivo* membrán fenotípus vizsgálatok

2.4.1. NPN fluoreszcencia követésen alapuló permabilitás mérések

A membrán, mégpedig leginkább a külső membrán károsodásával arányos NPN fluoreszcencia követésen alapuló permeabilitás méréseket Tsuchido és mtsai (1989) munkája alapján a következőképp végeztük el. Az összehasonlítani kívánt két fajta sejtet (OD= 0,8-1,0) PBS-ben mostuk (szobahő, 4 krpm, 5 min, Sorvall, GSA rotor), majd OD mérés alapján meghatároztuk a mérésre szánt azonos sejtkoncentrációjú (OD₆₀₀~ 0,15) mintákhoz (V= 3 ml) szükséges sejt szuszpenziók térfogatát. Ennek alapján aliquotokat mértünk Eppendorf csövekbe, melyeket egy növekedési hőmérsékletnek megfelelő, 30 °C-os termosztátba helyeztünk. A megmérni kívánt mintát a 30 °C-on inkubált kivetta puffer tartalmához adtuk, 5 µM NPN-nel jelöltük pontosan 2:30 percig, majd 350 nm gerjesztési, 422 nm emissziós hullámhossz, 10 nm gerjesztési, 4 nm emissziós résszélesség mellett 15 sec-ig mértük, majd átlagoltuk az NPN fluoreszcencia intenzitást egy Quanta Master QM-1 lminospektrométerrel (PTI, Princeton). A két fajta sejt aliquotjait egymást követően (5 perc eltéréssel) inkubáltuk az adott hőmérsékleten 15 percig, a 30-70 °C hőmérséklet tartományban. Az intenzitás vs. hőmérséklet függvényt szigmoiddal illesztettük (SigmaPlot 5.0). A minden egyes mérési párban viszonyítási alapként

használatos Δ IbpAB sejtek illesztett görbáját közös normalizációs alapnak véve vetettük össze a más-más mérésekből származó eredményeket.

2.4.2. Membrán fluiditás mérések

A sejteket kétszer mostuk PBS-ben (szobahő, 4 krpm, 5 min, Sorvall, GSA rotor), majd 1/10-nyi térfogatban fölveltük azokat. A különböző minták mennyiségét egy HP 8452A típusú spektrofotométerrel ($\lambda = 360$ nm) állítottuk azonosra (OD~0,25). Szükség esetén előmelegített puffer és állandó hőmérsékleten temperálható küvettatartó segítségével 50 °C-on inkubáltuk a küvetták (V= 3 ml) puffer tartalmát, majd ehhez adtuk hozzá az előzetesen meghatározott (kb. 30 μ l) sejt mennyiségeket. Ez a pillanat volt a hősokk kezdeti időpontja. A nem hősokkolt mintákat 30 °C-on mértük. A levonásra kerülő háttér fényszórás megmérése után a mintákat 0,2 μ M DPH-val ill. 0,4 μ M TMA-DPH-val 10 percig jelöltük állandó kevertetés mellett. Mivel az élő sejtek membrán fluiditása a hőaklimatizáció folytán folyamatosan változhat, a hősokk 13-17 min közötti szakaszának anizotrópia jellemzőjét mértük, majd ezt átlagoltuk, és a kapott értéket a 15 min hősokk eredményezte membrán fluiditás állapotnak feleltettük meg. A méréseket egy Quanta Master QM-1 lüminospektrométerrel (PTI, Princeton) végeztük 10 nm-es résszélességek mellett, ahol a gerjesztési fény hullámhossza 360 nm volt, az emittált fényt pedig 420 nm-en detektáltuk. A különböző típusú minták fluiditás értékeit külön-külön átlagoltuk, majd az átlagértékeket összevetve hasonlítottuk össze az eltérő sejtípusok membránjainak fizikai állapotát.

2.5. Lipid extrakció, elválasztás, analízis és mintaelőkészítés

A lipidek extrakciója, elválasztása és analízise az 1.3.2. fejezetben leírtak szerint történt, azzal az eltéréssel, hogy a lipidek vékonyréteg kromatográfiás (TLC) elválasztásához kloroform:metanol:ecetsav (65:25:10) eluens elegyet használtunk. Nagyméretű egyrétegű liposzómákat (LUV, $d = 100$ nm) a 1.3.3. fejezet alapján készítettünk.

2.6. *In vitro* lipid-fehérje kölcsönhatás vizsgálatok

Az IbpA és IbpB tisztított fehérjét K. Liberek (Gdansk, Lengyelország) és P. Goloubinoff (Lausanne, Svájc) laboratóriumai bocsátották rendelkezésünkre, melyek koncentrációját microBCA módszerrel (Pierce) határoztuk meg, majd a mintákat $-(20-80) ^\circ\text{C}$ -on tároltuk.

2.6.1. Lipid membrán fluiditás mérések

Az IbpA, IbpB és IbpAB külső membránból extrahált TPL-lel való kölcsönhatásának tanulmányozása céljából LUV ($d= 100 \text{ nm}$) liposzóma modell rendszereket használtunk, amelyeket $0,2 \mu\text{M}$ DPH-val ill. $0,4 \mu\text{M}$ TMA-DPH-val jelöltünk állandó kevertetés mellett 20 percen keresztül. Ezt követően adtuk a fehérjét a küveták tartalmához, amiket további 30 percig ekvibráltunk a lipidekkel. Átlagosan $23 \mu\text{g/ml}$ lipidet használtunk, amely elegendő intenzitású jelet biztosított. A sHsp:lipid arány 2:3 (m/m) volt, a kísérletekhez 20 mM nátrium-foszfát ($\text{pH } 7,0$) puffert használtunk. A méréseket 10 nm -es résszélességek, 360 nm gerjesztési és 420 nm emissziós hullámhossz mellett végeztük egy Quanta Master QM-1 luminospektrométerrel (PTI, Princeton). A pontosabb mérés végett folyamatos fölfűtés helyett állandó hőmérsékleten, kb. $5 ^\circ\text{C}$ -onként mértünk a $25-65 ^\circ\text{C}$ tartományban (Török és mtsai, 1997).

2.6.2. „Monolayer” kísérletek

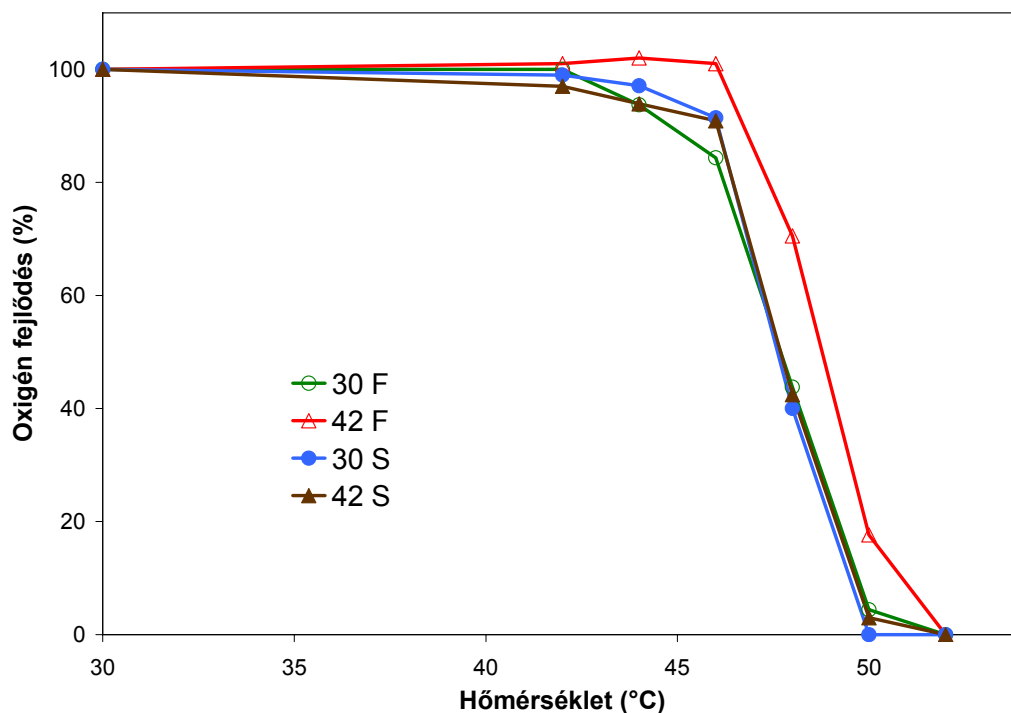
Az IbpA és IbpB (külső és belső membrán) TPL kölcsönhatásának tanulmányozására irányuló „monolayer” kísérleteket a 1.6.1. fejezetben leírtak alapján végeztük el. A mérésekhez, melyeket $30 ^\circ\text{C}$ -on temperáltunk, 20 mM nátrium-foszfát ($\text{pH } 7,0$) puffert és $6,8 \mu\text{g/ml}$ fehérjét használtunk (Török és mtsai, 2001).

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

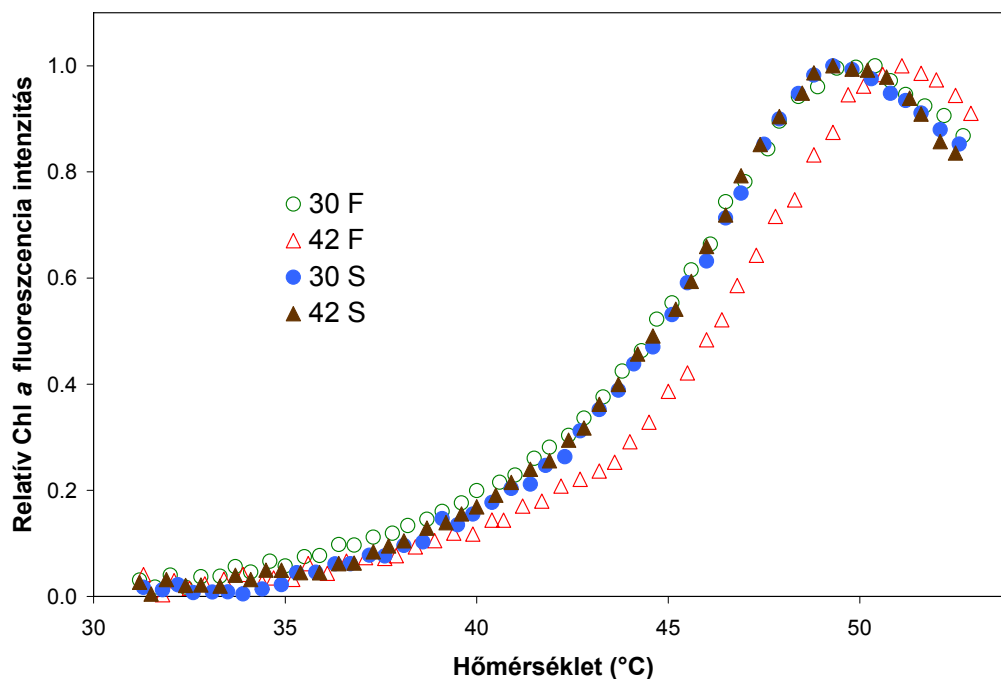
1. *Synechocystis* PCC 6803

1.1. A tilakoid membrán hő- és fényaklimatizációja

A tilakoid membrán stabilitása és azzal összefüggésben a fotoszintetikus funkció akklimatizációjának tanulmányozása céljából egy szubletális (3 h, 42 °C) kondicionáló hőstressz hatását vizsgáltuk fény és sötét körülmények között. Akár a fotoszintetikus oxigén fejlődés hőinaktivációját (16. ábra), akár a hőstressz indukálta Chl *a* fluoreszcencia kifejlődést (17. ábra) követjük, arra a megállapításra juthatunk, hogy *kizárólag a fényben történt hőedzés vezetett a tilakoid funkció (PSII) megnövekedett hőstabilitásához.*



16. ábra **Fényfüggő hőaklimatizáció a *Synechocystis* PCC 6803-ban.** A fotoszintetikus funkció károsodása a hőmérséklet függvényében (reprezentatív mérési eredmény, n= 3). A 30 °C-on növesztett sejteket a kísérletet megelőzően 30 (30) vagy 42 °C-on (42) tartottunk fényben (F) ill. sötétben (S) 3 órán keresztül. Az oxigén fejlődés abszolút értékei (t= 30 °C): 30 F (91,0 %), 42 F (48,7 %), 30 S (100,0 %), 42 S (93,6 %).



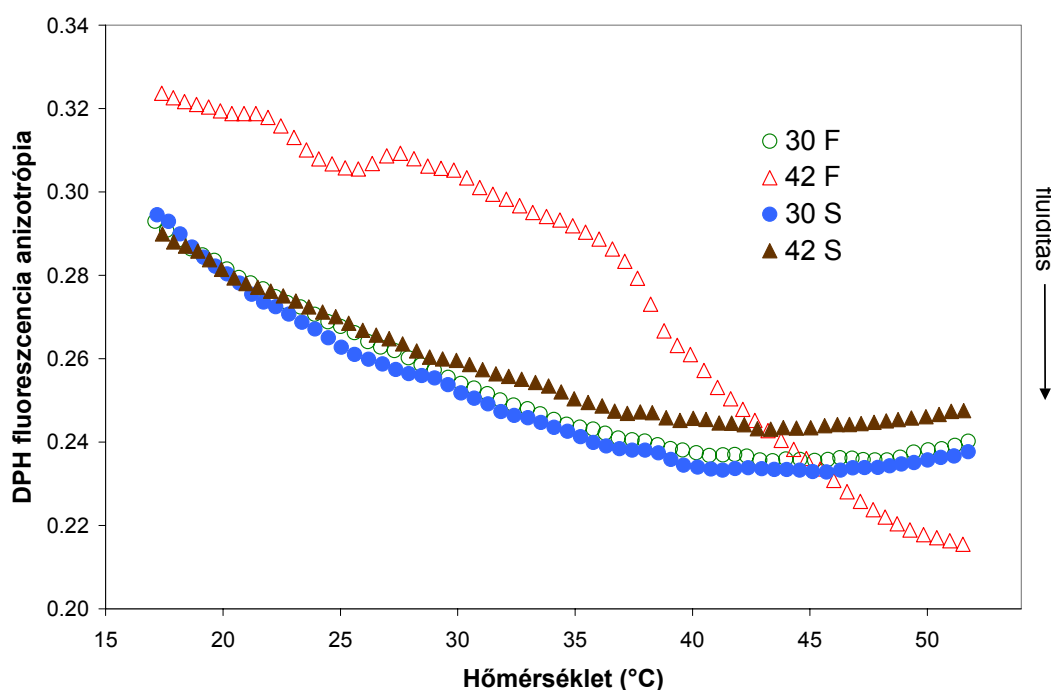
17. ábra **Fényfüggő hőakklimatizáció a *Synechocystis* PCC 6803-ban.** A hőindukálta Chl *a* fluoreszcencia növekedés olyan 30 °C-on növekedett sejtekben, amelyeket a kísérletet megelőzően 30 (30) vagy 42 °C-on (42) tartottunk fényben (F) ill. sötétben (S) 3 órán keresztül (reprezentatív mérési eredmény, n= 3).

A nem ill. sötétben hőkezelt sejtek mintegy 2 °C-kal hamarabb szenvedtek károsodást hőstressz során (ld. Anyagok és módszerek 1.2. fejezet).

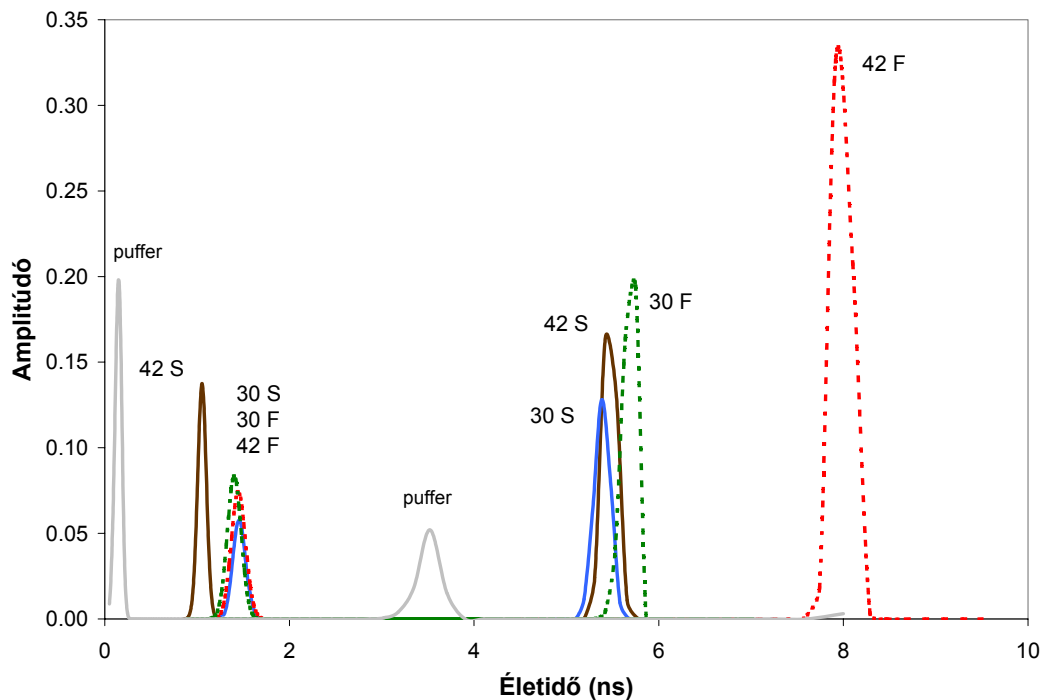
Minthogy azok a változások, melyek a megnövekedett termorezisztenciához vezettek, az izolált membránokban is föllelhetők (Kloppstech és mtsai, 1985; Horváth és mtsai, 1998) a különböző előéletű sejtek tilakoid membránjait vizsgáltuk tovább olyan különbségek után kutatva, amelyek magyarázatot szolgáltathatnak a fenti kísérleti eredményekre. A membrán fluiditás egy, a membrán stabilitásra jellemző tulajdonság. Mivel a magashőmérsékleti stressz a membrán fluidizálódásához vezet, az azt ellensúlyozni képes tényezők előnyösen hatnak a struktúra integritásának megőrzésében. Membrán lipidek -katalitikus hidrogénezéssel történő- rigidizálása képes növelni mind a PSII, mind a PSI komplexek hőstabilitását, azaz a rigidizálás nem csak szerkezeti, de funkcionális hatással is van a tilakoid rendszerre (Thomas és mtsai, 1986; Vígh és mtsai, 1989). Ugyanakkor membránhoz asszociált Hsp-k is képesek lehetnek annak ilyen módon történő stabilizálására (Kovács és mtsai, 1994a; Horváth és mtsai, 1998; Török és mtsai, 1997 és 2001). Ezek ismeretében vizsgáltuk az izolált membránok átlagos fluiditás jellemzőjét (18. ábra). Bár a sötétben hőedzett

minták kis mértékű rigidizáció jelét mutatták, ez a változás csak töredéke volt annak, amit a fény- és hőkezelés együttesen idézett elő a membránban. A fényben történt hőkezelés során a meglehetősen nagy fluiditás csökkenés mellett az anizotrópia-hőmérséklet görbe profilja is teljesen megváltozott, jelezvén, hogy minden bizonnyal a membrán szerveződése is alapjaiban különbözik az edzetlen ill. sötétben edzett membránokétól, azaz egy teljesen más membrán állt elő.

Föltételezésünket megvizsgáló -a DPH fluoreszcens próba életidő eloszlását követve- az egyes membránok mikrodomén fölépítését tanulmányoztuk (19. ábra). Az összes minta jellemezhető egy rövidebb (1-2 ns) és egy hosszabb (5-8 ns) életidejű próba populációval. Amíg a rövidebb életidejű komponens esetében - amely a membrán felszín poláros környezetéhez rendelhető hozzá- lényegi különbséget nem tehetünk, a fény- és hőedzett minta hosszabb életidejű komponense (8 ns) alapvetően eltér a többi minta ugyanezen komponensétől (5-6 ns).



18. ábra **Fényfüggő hőaklimatizáció a *Synechocystis* PCC 6803-ban.** Tilakoid membránok fluiditás vs. hőmérséklet profilja (reprezentatív mérési eredmény, n= 4). A membránokat 30 °C-on növesztett, majd 30 (30) vagy 42 °C-on (42) fényben (F) ill. sötétben (S) 3 óráig keresztül kezelt sejtekből izoláltuk.

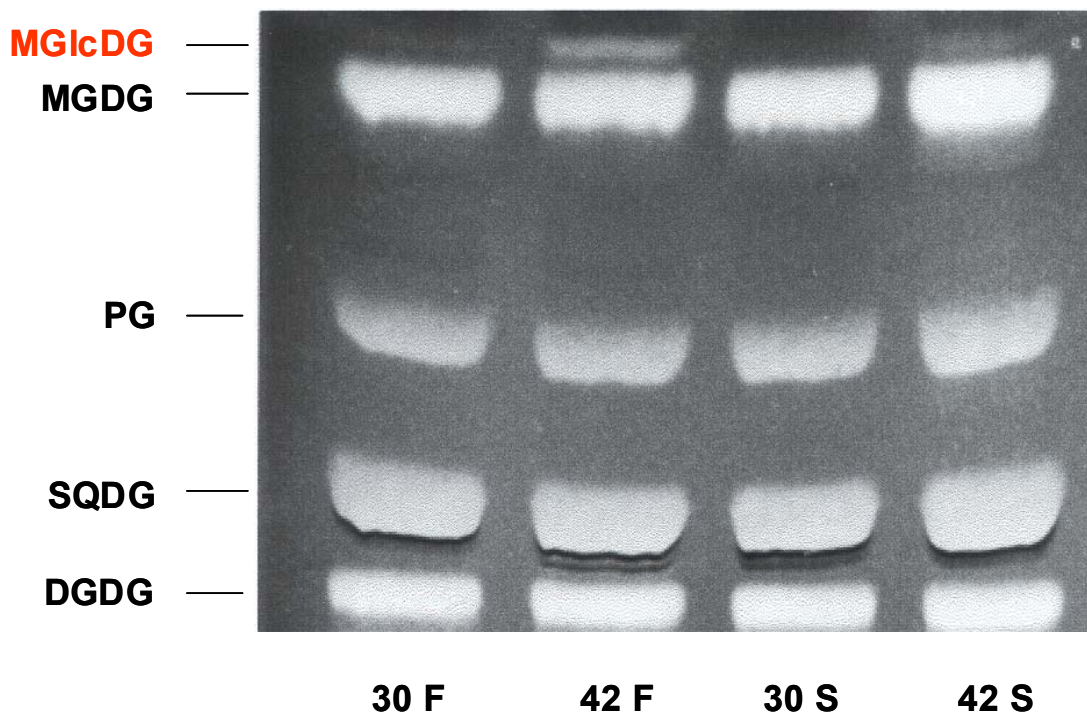


19. ábra A fényben végzett hőaklimatizáció a tilakoid membrán mikrodomén szerkezetének átalakulását eredményezi. A DPH fluoreszcens próba életidő eloszlása izolált tilakoid membránokban (reprezentatív mérési eredmény, $n=2$), melyeket 30 °C-on növesztett, majd 30 (30) vagy 42 °C-on (42) fényben (F) ill. sötétben (S) 3 órán keresztül kezelt sejtekből izoláltunk.

A nagy életidővel, intenzitással és keskeny eloszlással jellemezhető csúcs valószínűleg fehérje szegény lipid hidrofób környezet által határolt próba molekuláktól származik, amely környezet megjelenése *membrán átrendeződés* eredménye (Williams és mtsai, 1990; Mayor és mtsai, 1992). Bizonyos lipidekkel kölcsönható proteinek elsődleges szereppel bírhatnak ebben a folyamatban azáltal, hogy specifikus kölcsönhatások révén stabilizálnak, immobilizálnak egy adott membrán (lipid) organizációt (Pinnaduwege és Bruce, 1996; Xing You és mtsai, 2001). Következésképpen *lipid és fehérje tényezők ill. ezekben bekövetkező minőségi és mennyiségi változások* egyaránt szerepet játszhatnak a membrán átalakításában.

1.2. Lipidváltozások a rövidtávú alkalmazkodás szolgálatában?

Bár egy 3 h időtartamú magashőmérsékleti akklimatizáció túlságosan rövid ahhoz, hogy jelentős változások történhessenek a tilakoid lipid- és zsírsavösszetételében, mégsem kizárható, hogy egy limitált mértékű változás esetleg jelentőséggel bírjon a fentebb vázolt membrán reorganizációs folyamatban ill. az azzal együttjáró megnövekedett tilakoid stabilitás és termorezisztencia kialakulásában. Az elvárásoknak megfelelően nem mutatható ki szignifikáns változás a nem vagy sötétben hőkezelt minták lipid- és zsírsavösszetételében. *A fényben hőkezelt mintában* viszont *szembetűnően megnövekedett az MGDG* prekursor lipid, az *MGlcDG mennyisége* a kontroll mintához képest (nem kimutatható → 4 %), amely az MGDG rovására gyarapodott (52 % → 48 %), amíg a PG, SQDG és DGDG mennyisége közel állandó maradt (20. ábra).



20. ábra A „hősokklipid” (MGlcDG) megjelenése a fényben hőkezelt cianobaktériumban. 30 °C-on növesztett, majd 30 (30) vagy 42 °C-on (42) fényben (F) ill. sötétben (S) 3 órán keresztül kezelt sejtek tilakoid polár lipidjeinek vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) analízise (reprezentatív, n= >3). MGlcDG (monoglükozil-diacilglicerol), MGDG (monogalaktozil-diacilglicerol); PG (foszfatidil-glicerol), SQDG (szulfokvinozil-diacilglicerol), DGDG (digalaktozil-diacilglicerol)

Föltételezhetően az MGlcDG → MGDG epimerizációs lépés gátlódik fény és hő együttes jelenlétében, amely a prekursor földúsulásához vezet. A DGDG kivételével az összes lipid kettős kötés tartalma csökkent a fényben történt hőkezelés hatására, amely összhangban van a várakozásokkal, hiszen ez a változás a megnövekedett fluiditás kompenzálására hivatott. A sötétben történő hőedzés során ez a kompenzációs mechanizmus (is) gátoltnak tűnik. A telítetlen zsírsav tartalom (γ 18:3, 18:2) csökkenés ill. *a telített zsírsav* mennyiség (18:0) jelentős az SQDG és PG ill. leginkább szembeötlő az *MGlcDG* esetében (1. tábl.). Ez utóbbi zsírsavjainak pozicionális analízisét LC-MS segítségével elvégezve arra az eredményre jutottunk, hogy ezt a lipidet 56,0 %-ban 18:0/16:0 és 5,3 %-ban 16:0/16:0 teljesen telített specieszek teszik ki (2. tábl.). A fény és hő hatására földúsuló MGlcDG tehát egy olyan rendkívül telített, ennél fogva csökkent H_{II} képzési hajlammal megáldott „*hősokklipid*”, amely bár viszonylag kis mennyiségben van jelen, *lokálisan „húsíthati” a környező telítetlen lipid mátrixot.*

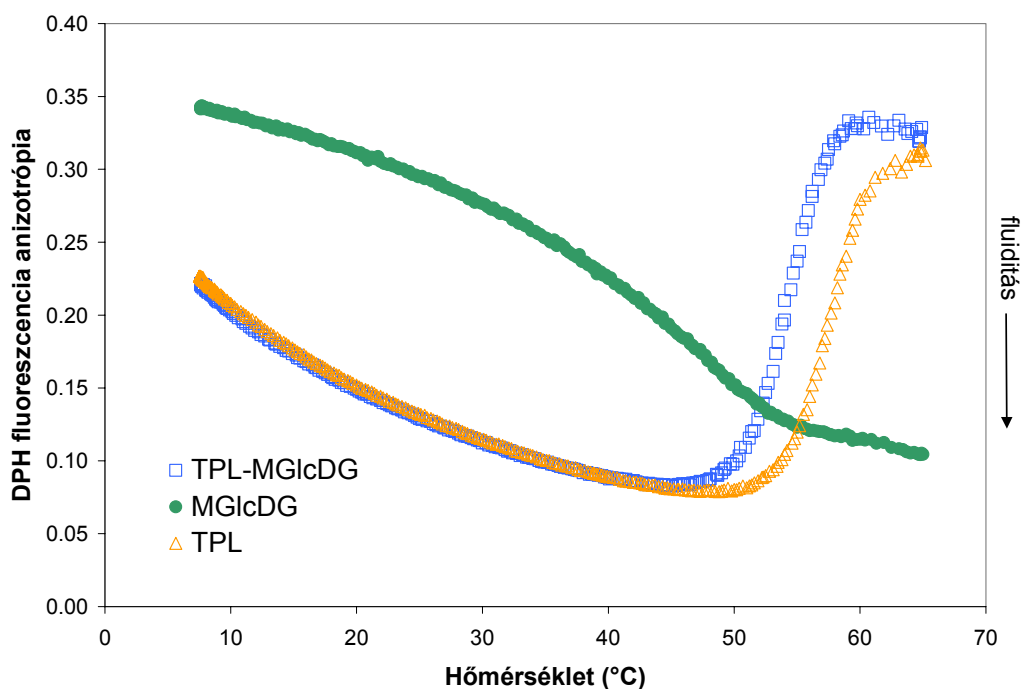
Lipid	Minta	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	γ 18:3	α 18:3	DBI
MGlcDG	42 F	50.3	1.4	28.6	8.4	5.8	5.5	0.0	38.0
	42 S	51.4	3.2	4.4	7.7	15.0	18.2	0.0	95.7
MGDG	30 F	48.4	2.7	0.3	4.6	12.1	31.7	0.2	127.2
	42 F	49.2	2.6	2.3	4.2	12.3	29.2	0.2	119.5
	30 S	48.0	3.1	3.0	3.6	13.0	32.0	0.2	129.0
	42 S	47.8	2.9	0.2	3.5	13.7	31.7	0.2	129.6
PG	30 F	48.3	1.9	1.0	9.6	32.9	1.5	4.7	96.0
	42 F	49.6	1.9	3.7	8.2	30.5	1.7	4.4	89.4
	30 S	49.0	2.3	1.0	8.3	32.7	1.9	4.8	96.1
	42 S	48.3	2.0	1.3	8.5	33.2	1.8	4.9	96.9
SQDG	30 F	60.1	5.0	1.3	12.8	18.1	2.1	0.6	62.2
	42 F	59.5	4.7	6.5	10.7	16.0	2.1	0.6	55.3
	30 S	60.2	5.5	1.0	12.2	18.1	2.4	0.7	63.2
	42 S	60.3	5.2	1.2	12.0	18.3	2.4	0.6	62.8
DGDG	30 F	47.4	4.3	1.1	4.5	13.4	28.9	0.3	123.3
	42 F	47.1	4.2	1.7	4.1	13.4	29.1	0.3	123.4
	30 S	47.2	4.7	1.7	4.1	13.4	29.1	0.3	123.4
	42 S	47.3	4.5	1.0	4.2	13.9	28.7	0.4	123.6

1. táblázat **Izolált tilakoid polár lipidek zsírsavösszetétele (m/m %)** (reprezentatív analízis, n= 2). A membránokat 30 °C-on növesztett, majd 30 (30) vagy 42 °C-on (42) fényben (F) ill. sötétben (S) 3 órán keresztül kezelt sejtekből izoláltuk. MGlcDG (monoglükozil-diacilglicerol), MGDG (monogalaktozil-diacilglicerol); PG (foszfatidil-glicerol), SQDG (szulfokvinozil-diacilglicerol), DGDG (digalaktozil-diacilglicerol) DBI („double bond index”: 100 zsírsavra számított átlagos kettős kötés tartalom)

Speciesz (sn-1/sn-2)	Relatív mennyiség (%)
18:3/16:1	3.2
18:3/16:0	7.8
18:2/16:0	11.4
18:1/16:0	16.4
16:0/16:0	5.3
18:0/16:0	56.0

2. táblázat A „hősokklipid” (MGlcDG) molekula speciesz összetétele. A hősokklipidet 30 °C-on növesztett, majd 42 °C-on fényben 3 óráig tartó hőstressznek kitett sejtekből izoláltuk. Az összetétel meghatározás (m/m %) a minta teljes ion kromatogramjának kiértékelésén alapult (reprezentatív analízis, n= 2).

Az MGlcDG fizikai tulajdonságait és lehetséges stabilizáló hatását rekonstruált liposzóma rendszerben teszteltük (21. ábra). Azok a liposzómák, amelyek kizárólag MGlcDG-ből készültek, lényegesen nagyobb anizotrópia értéket jeleztek, mint a TPL vezikulák, amely összhangban van a hősokklipid rendkívüli telítettségével. Érdekes módon azok a liposzómák, amelyekből kivontuk az MGlcDG- t nem mutatkoztak



21. ábra A „hősokklipid” (MGlcDG) rigiditása és hatása a rekonstruált lipid membrán stabilitására. SUV liposzóma rendszerek fluiditása és stabilitása a hőmérséklet függvényében (reprezentatív mérési eredmény, n= 4). A liposzómákat 30 °C-on növesztett, majd 42 °C-on fényben 3 óráig tartó hőstressznek kitett sejtekből izolált lipidekből készítettük. TPL: összes poláros lipid, MGlcDG: monogalaktoszil-diacilglicerol („hősokklipid”), TPL-MGlcDG: TPL, amelyből eltávolítottuk az MGlcDG-t

mérhető mértékben fluidabbnak a minor lipidet is tartalmazó TPL membránoknál. Másfelől viszont az MGlcDG hiányos liposzómák mintegy 3 °C-kal alacsonyabb hőmérsékleten jeleztek egy, az anizotrópia görbében megfigyelhető hirtelen ugrást. Ez a változás nem valószínű, hogy valós fluiditás változásra utal, sokkal inkább származhat egy hirtelen fényszórás növekedésből, amely a SUV-k hőindukálta aggregációjának köszönhető (Webb és Green, 1990). Ezt az elképzelésünket TPL liposzómák aggregációs hajlamát és hőstabilitását abszorbancia méréssel követve is megerősítettük (nem bemutatott adat). Mindez arra enged következtetni, hogy az MGlcDG képes a membrán lipid fázis termostabilitását fokozni azáltal, hogy *késlelteti* azokat a folyamatokat, melyek *a (lipid) membránok aggregációjához* vezethetnek. Minthogy az MGlcDG nem kettősréteg-képző lipid, *nem csak a hiperfluidizációt, de a magas hőmérséklet indukálta fázisszeparációt ill. a fordított hexagonális fázis képződését is közvetlenül gátolhatja.*

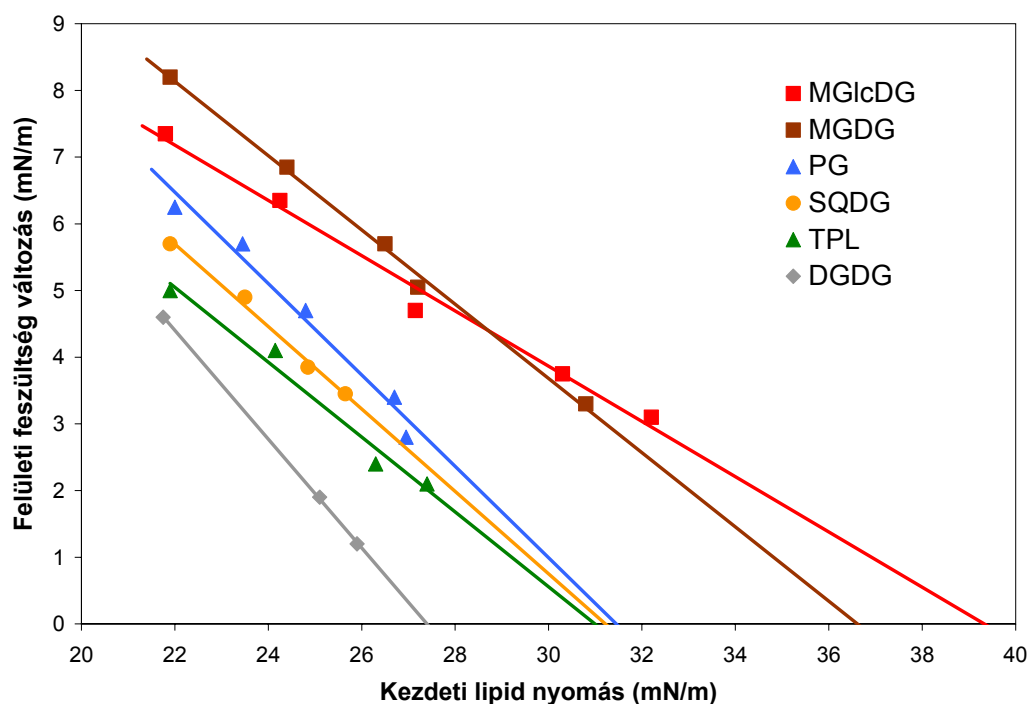
Egy minor lipid szerepét ugyanakkor egészen más megvilágításba helyezhetik a tilakoid membrán heterogén felépítését alátámasztó tények (Mayor és mtsai, 1992). Ismeretes, hogy különösképpen a nem kettősréteg-képző lipidek (MGDG, MGlcDG) és a PG meghatározó szereppel bírnak a cianobakteriális fotoszisztéma fehérje komplexek megfelelő konformációjának kialakításában (van Walraven és mtsai, 1984; Lee, 2003; Loll és mtsai, 2005). Általánosabban elmondható, hogy *egy membrán fehérje rendeltetésszerű topológiájának és funkciójának kialakulásához meghatározott lokális lipidösszetétel szükséges*, és a fehérje ill. lipid komponensek kölcsönösen befolyásolhatják egymás szerkezetét, funkcionalitását avagy eloszlását (Batenburg és mtsai, 1988; Schleiff és mtsai, 2001; Bogdanov és mtsai, 2002). Ilyen megvilágításban könnyen belátható, hogy akár egy minor lipid jelenléte is igen fontos lehet, amennyiben az -az MGDG-hez hasonlóan vagy azt helyettesítendő- *specifikus lipid-fehérje kölcsönhatásokban* vesz részt, miközben fizikai tulajdonságai révén lényegesen nagyobb termostabilitást kölcsönözhet (mikro)környezetének. Bár közvetlen bizonyítékot nem adhatunk arra, hogy *az MGlcDG részt vállal a membrán átférmálódásában*, megjelenésének ill. földúsulásának egybeesése a megváltozott membrán tulajdonságokkal mindenképp figyelemre méltó. Érdemes összevetni a tiszta MGlcDG és az izolált membrán anizotrópia profilját (18. és 21. ábra), vagy szem előtt tartani, hogy a fényben hőedzett tilakoid membrán többi mintától eltérő szegmenseit lipidekben gazdagabb összetétel jellemzi (19. ábra), tehát a membrán „átszabása” valószínűleg köthető a hőszoklipid megjelenéséhez, minthogy más

lényegi lipidváltozás nem történt. Egy NMR tanulmány szerint prokarióta membránok hőaklimatizációjában olyan lipid összetételbeli, elsősorban szerkezeti és nem dinamikai változások játszhatnak szerepet, melyek magát a lipid fázis viselkedését befolyásolják. Ezek főként a fejcsoport régiót érintik, amelyek alapján megjósolható egy „új” lipid megjelenése az aklimatizáció során (Lindblom és mtsai, 2002). Ha azonban a hőszokk lipid meghatározó szereppel is bír a membrán átformálásában, valószínűleg, hogy csupán ekkora változás dönthetne a teljes membrán sorsáról. Minden bizonnyal *fehérje tényezők vagy azok lipid kölcsönhatásai* is feladatot kaphatnak a folyamatban.

1.3. A Hsp17 hatékony eszköz a membrán stabilizációban

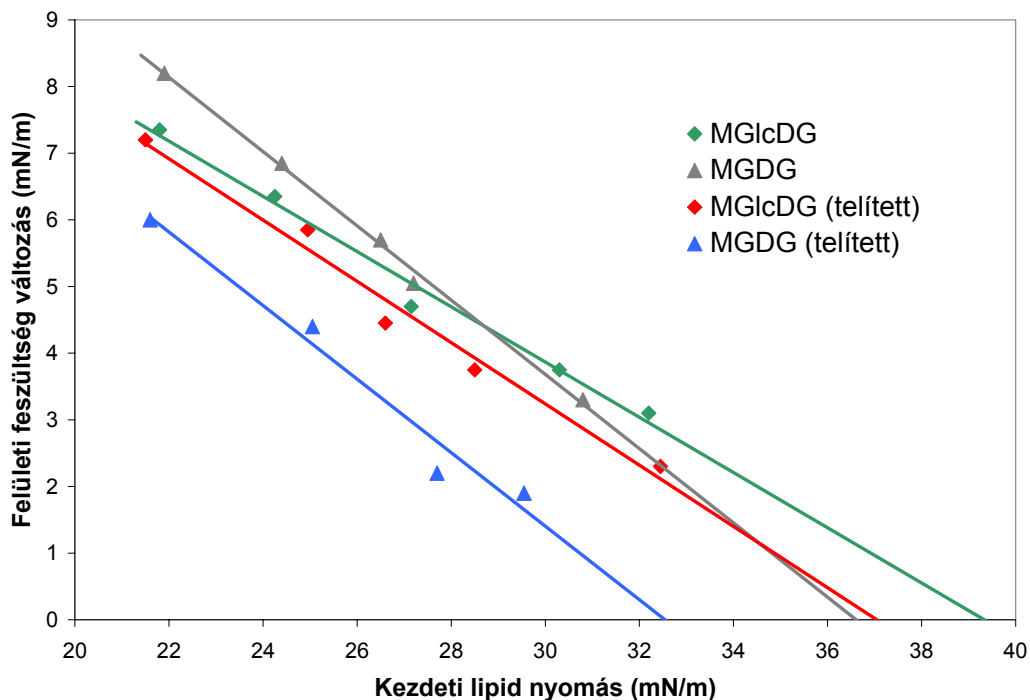
Synechocystis chaperonok, *GroEL*, *Cpn60* (GroEL2) és a sHsp, *Hsp17* egy hányada a *tilakoid membránhoz kötött* formában található sötét és fény körülmények között egyaránt. *A membránhoz asszociált Hsp-k mennyisége jelentősen növekszik hőstressz hatására.* Korábbi tanulmányok igazolják, hogy a GroEL és a Hsp17 képesek a membrán (lipid fázis) stabilizálására (Kovács és mtsai, 1994a; Horváth és mtsai, 1998; Török és mtsai, 1997 és 2001; nem bemutatott adatok). *A hsp-k szabályzása* és ezzel összefüggésben a membránhoz kötött Hsp mennyiségek azonban jelentősen *fényfüggők*. A *groEL* és *cpn60* gének expressziója jócskán módosul fény hiányában, ami leginkább abban ölt testet, hogy a chaperonin gén- és (a membrán asszociált) fehérjetermékek mennyisége szignifikáns mértékben csökken (nem bemutatott adatok). *A fényfüggő szabályzás azonban a hsp17 esetében a legkülönösebb.* Míg fény és hő (42 °C) együttes jelenlétében a gén expressziója tranziens jelleget ölt, és 60 perc után lecseng, sötétben még 3 órát követően is maximális az mRNS mennyiség. A tilakoidhoz kötött Hsp17 mennyisége fényviszonyoktól függetlenül hozzávetőlegesen azonos 3 h, 42 °C hőedzést követően (Glatz és mtsai, 1997; Asadulghani és mtsai, 2003; nem bemutatott adat). Minthogy a Hsp17 ill. a sHsp-k számos publikáció szerint *kitüntetett szereppel bírnak a hőstressz és különösképpen a fotoinhibíció elleni küzdelemben*, a Hsp17 esetleges jelentőségét vizsgáltuk a membrán átrendeződésében, ennek megfelelően tanulmányoztuk, hogy membrán asszociációja kapcsolható-e *specifikus lipid komponensekhez* (Lee és mtsai, 1998 és 2000; Nitta és mtsai, 2005; ld. még irodalmi áttekintés 3.3. fejezet).

Fényben hőaklimatizált tilakoid lipideket (TPL és egyes lipidosztályok) és tisztított Hsp17 fehérjét használtunk a fehérje-lipid kölcsönhatás kísérletekben, ahol a kezdeti lipid nyomás függvényében követtük a fehérje kölcsönható képességét. A Hsp17 a két nem kettősréteg-képző lipiddel (*MGlCDG*, *MGDG*) mutatta a legerősebb kölcsönhatást, míg a kettősréteg-képző lipideket (PG, SQDG, DGDG) ill. a TPL-t használva jelentősen kisebb inszerciós képességet detektáltunk (22. ábra) (a „monolayer” technikáról ld. Anyagok és módszerek 1.6.1. fejezet). Nem meglepő, hogy egy fluiditás változásra érzékeny membrán fehérje preferáltan hat kölcsön az MGDG-vel, hiszen az kis fejcsoportja és nagy térkitöltésű, telítetlen zsírsav régiója folytán sztérikusan ideális „beékelődési lehetőséget” kínál a membrán felszínéhez asszociálódó sHsp számára (Horváth és mtsai, 1998; Török és mtsai, 2001; van der Brink-van der Laan és mtsai, 2001).



22. ábra *Synechocystis* Hsp17-lipid kölcsönhatások. A Hsp17 és 30 °C-on növesztett, majd 42 °C-on fényben 3 óráig tartó hőstressznek kitett sejtekből izolált lipidek alkotta monomolekulás rétegek kölcsönhatásai. A Hsp17-t egy meghatározott kezdeti felületi nyomású lipid réteg alá injektáltuk, majd mértük a fehérje inszerció eredményezte felületi feszültség változás nagyságát (ld. 36. ábra). Az egyes változások értékét a hozzátartozó kezdeti lipid nyomás függvényében ábrázolva a jelen ábrát kaptuk (ld. még Anyagok és módszerek 1.6.1. fejezet). MGlCDG (monoglükozil-diacilglicerol), MGDG (monogalaktozil-diacilglicerol); PG (foszfatidil-glicerol), SQDG (szulfokvinozil-diacilglicerol), DGDG (digalaktozil-diacilglicerol), TPL (összes poláros lipid)

Azonban az MGlcDG annak ellenére jelzett még inkább erős asszociációt a Hsp17-tel (ld. tengelymetszetek), hogy a hőszokklipid láb régiója nyilvánvalóan korántsem annyira előnyös kapcsolódási felület, hiszen az lényegesen telítettebb, mint az MGDG azonos része. Ez és a többi lipiddel kapott eredmény egyértelművé tette, hogy *a Hsp17-lipid kölcsönhatás -ugyan erősen fluiditás függő- alapvetően a lipid fejcsoport által meghatározott*. Azért, hogy a két nem kettősréteg-képző lipid fejcsoportjának fehérje asszociációra gyakorolt hatását közvetlenül össze tudjuk hasonlítani, katalitikus hidrogénezéssel mindkét lipid zsírsavjait teljesen telítettük, így azok gyakorlatilag azonos (főként 18:0/16:0) „láb” régióval rendelkeztek (Murata és mtsai, 1987; 1. és 2. tábl.). Ez a lipidmódosítás rávilágított, hogy a Hsp17 még az MGDG-hez képest is kiemelkedő affinitást mutat az MGlcDG lipid fejcsoportja felé (23. ábra). *A hőszokklipid tehát nem csupán extrém telítettsége, de fejcsoportja révén is lehetőséget nyújt a membrán stabilizálódásához, azáltal, hogy „specifikus” lipid-fehérje kölcsönhatáshoz ad lehetőséget egy potenciális, membránt stabilizálni képes*



23. ábra **A *Synechocystis* Hsp17 nem kettősréteg-képző lipidek fejcsoportjával mutatott kölcsönhatása.** Az MGlcDG-t (monoglükozil-diacilglicerol) és MGDG-t (monogalaktozil-diacilglicerol), melyek 30 °C-on növesztett, majd 42 °C-on fényben 3 óráig tartó hőstressznek kitett sejtekből származtak (ld. 22. ábra), katalitikus hidrogénezéssel teljes mértékben telítettük, így azok zsírsavjaik tekintetében azonosává váltak (18:0/16:0), azaz a telített lipidek csak fejcsoportjaik minőségében különböztek egymástól.

fehérjével. Mivel az MGlcDG csak egyetlen, a cukor fejcsoport 4-es pozíciójában lévő -OH csoport térállásában különbözik az MGDG-től, igen valószínű, hogy a Hsp17 *H-híd kötést* létesít a lipidek fejcsoport régiójában, amely elképzelés megmagyarázná a Hsp17 MGlcDG-vel szemben tanúsított kivételes kölcsönható képességét (Bishop és mtsai, 2001; Fernandez és Berry, 2001; Wikstrom és mtsai, 2004).

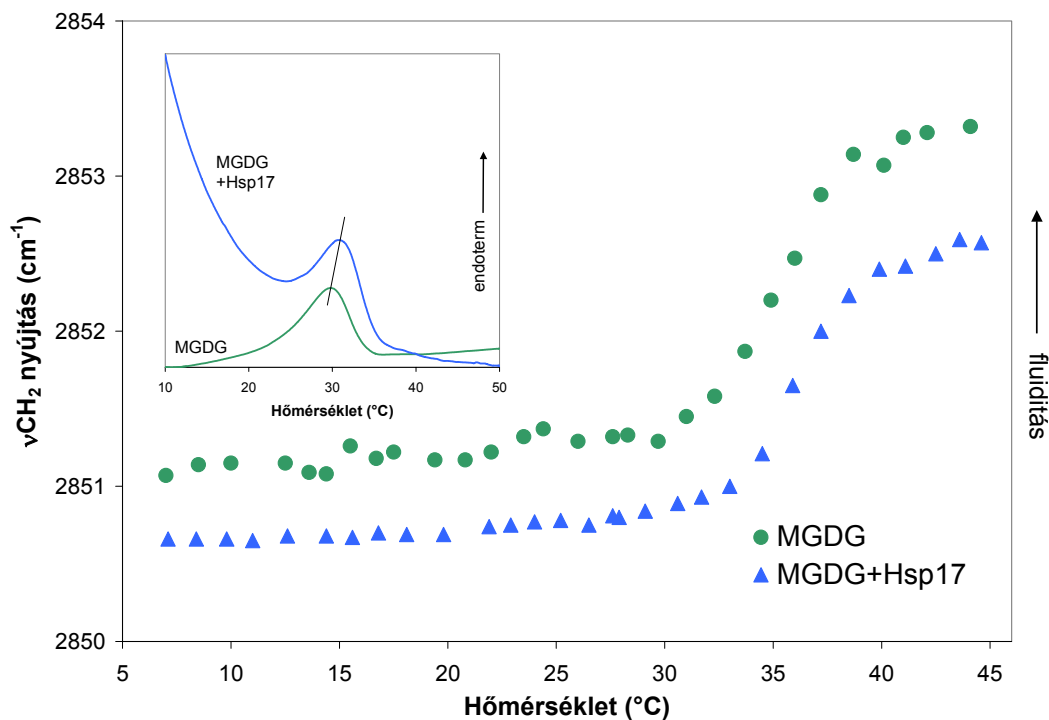
Érdekes, hogy a TPL, mely kb. 50 %-ban MGDG-ből és MGlcDG-ből tevődik össze, nem mutat nagyobb kölcsönhatás értéket a kettősréteg-képző lipidekhez képest. Ismeretes, hogy a Hsp17 a TPL liposzómák rigiditását is képes növelni, mégis úgy tűnik, hogy igazán akkor válik erőteljesebbé a lipid stabilizáló hatása, ha -legalábbis mikrokörnyezetében- nem kettősréteg-képző lipidekkel létesíthet kapcsolatot (Török és mtsai, 2001). Ez a helyzet gyakorlatilag a *fázisszeparáció* vagy ahhoz közeli állapot során valósulhat meg, amely kétségkívül megalapozottan *hívna életre egy magasabb szintű sHsp védelmet*. Ezek alapján lehetséges, hogy a Hsp17 és a nem kettősréteg-képző lipidek közötti kölcsönhatás szerepet játszik a membrán átrendeződésében. Kérdéses azonban, hogy vajon a külső tényezőkben bekövetkezett változások szükségesszerűen a membrán „passzív” átrendeződését idézik elő, és a különféle védelmi mechanizmusok „csak” ezt igyekeznek ellensúlyozni, avagy a külső tényezőkben bekövetkező változások életre hívják olyan *védelmi eszközöket*, amelyek -feltételezhetően- *összehangolt együttműködése folytán a membrán* egy olyan új állapotba *rendeződik*, amellyel hatékonyabban képes megbirkózni a megváltozott körülményekkel. A klasszikus, hsp-k regulációjára érvényes „titrációs modell” (ld. Irodalmi áttekintés 2. fejezet) alapján nehezen értelmezhető, hogy a hsp17 expressziója sötétben miért nem átmeneti jellegű, hiszen citoszolikus fehérjék aggregációja fénytől független vagy legfőljebb a membrán funkcion keresztül, közvetetten fénytől függő folyamat. Következésképp a tapasztalt jelenség -és nem csupán a sHsp esetében- mindenképp a membránhoz köthető. *A hsp17 gén regulációja korrelál a membrán átalakulás folyamatával*, amennyiben az végbe megy -szükségesszerűen a membránból- egy olyan jel indul, amely a génexpresszió lecsengéséhez vezet. Ha azonban -ld. sötétben akklimatizálódó sejtek- ez a jelzés elmarad a gén továbbra is aktív marad. Márpedig ha ez így van, akkor *a Hsp17 föltétlen egy aktív membrán átalakítás részese kell legyen*, hiszen ellenkező esetben a reguláló jelet nem a membrán átszabáshoz köthetnénk, hanem valamely más, korábbi „végállapot” jelölné azt, és így sötétben is bekövetkezne. Ezt a hipotézist az is

alátámaszja, hogy bár *a membránt stabilizálni képes Hsp-k* sötétben is *aktivizálhatók a membrán fluiditás hirtelen növekedésével*, a tilakoid membrán stabilitása nem képes olyan mértékben változni, hogy az szignifikáns mértékben megmutatkozzon a fotoszintetikus funkció védelmében (6. és 16-18. ábra) (Kovács és mtsai, 1994a; Horváth és mtsai, 1998; Török és mtsai, 1997 és 2001; nem bemutatott adatok). Vagyis úgy tűnik, hogy a tilakoid funkció termorezisztenciájának kialakulásához a membrán átformálásán keresztül vezet az út, amelyhez *láthatólag szükségesek a Hsp-k, a lipidváltozások (MGlcDG és MGDG) és a külső tényezők*. Meg kell azonban jegyezni, hogy más, nem vizsgált tényezők is szerepet játszhatnak a védelem különböző szintjén, pl. a Hsp-k amfitróp tulajdonságuk folytán „egyidejűleg” védhetik a membrán lipid és fehérje elemeit, ezzel akár közvetett és közvetlen protekciót nyújtva a tilakoid funkciónak (ld. Irodalmi áttekintés 2. és 3. fejezet).

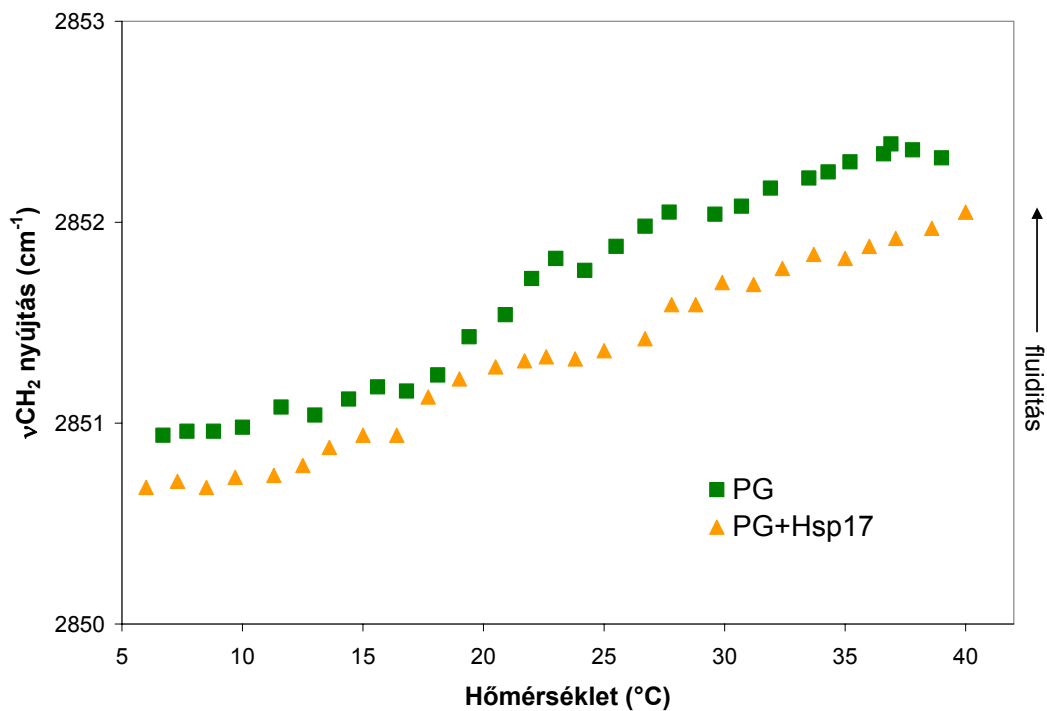
1.4. Hsp17 és MGlcDG: a membrán lipid fázis regulátorai

A Hsp17 vagy általában a sHsp-lipid kölcsönhatás mechanizmusának alaposabb megértése végett vizsgáltuk ezen fehérjé(k) tulajdonságait *in vitro* kísérletekben, nevezetesen azt, hogy a sHsp-k milyen hatással vannak a lipid termotróp fázis állapotára ill. a lipidek fázistranzíciós hőmérsékletére (csak a Hsp17-tel kapcsolatos adatok kerülnek bemutatásra). Kalorimetriás mérések (DSC) kiválóan alkalmasak a lipid fázisátmenetekkel járó entalpiaváltozások detektálására, míg a membrán lipidek zsírsavjainak fizikai állapotáról (fluiditás) a zsírsav láncok szimmetrikus -CH₂- rezgéseinek infravörös (FTIR) képe árulkodik. A 24. és 25. ábra tanúsága szerint *az emlős sHsp, α -crystallin homológ Hsp17 képes csökkenteni a telítetlen (MGDG, PG) lipidek fluiditását, és gátolni a nem kettősréteg-képző lipid (MGDG) fiziológias struktúrából való kilépését, azaz képes a magasabb hőmérsékletek irányába tolni az MGDG polimorf fázisátalakulási hőmérsékletét (T_{hex})* (ld. 1. tábl.).

Annak érdekében, hogy a sHsp-lipid kötés természetéről további részleteket tudjunk meg, a következő néhány kísérletsorozatban különféle MGDG és PG molekula specieszeket teszteltünk „monolayer” kísérletekben. A fölhasznált természetes eredetű lipidek zsírsavösszetételét és ennek megfelelően azok legjellemzőbb molekula specieszeit a 3. táblázatban foglaltuk össze (Murata és mtsai,



24. ábra A Hsp17 hatása a *Synechocystis* MGDG liposzómák fiziológiás állapotára (FTIR spektrum) és folyadék \rightarrow nem kettősréteg állapot tranzíciós hőmérsékletre (T_{hex}) (DSC termogram, inzert) (representatív mérési eredmény, $n=3$).



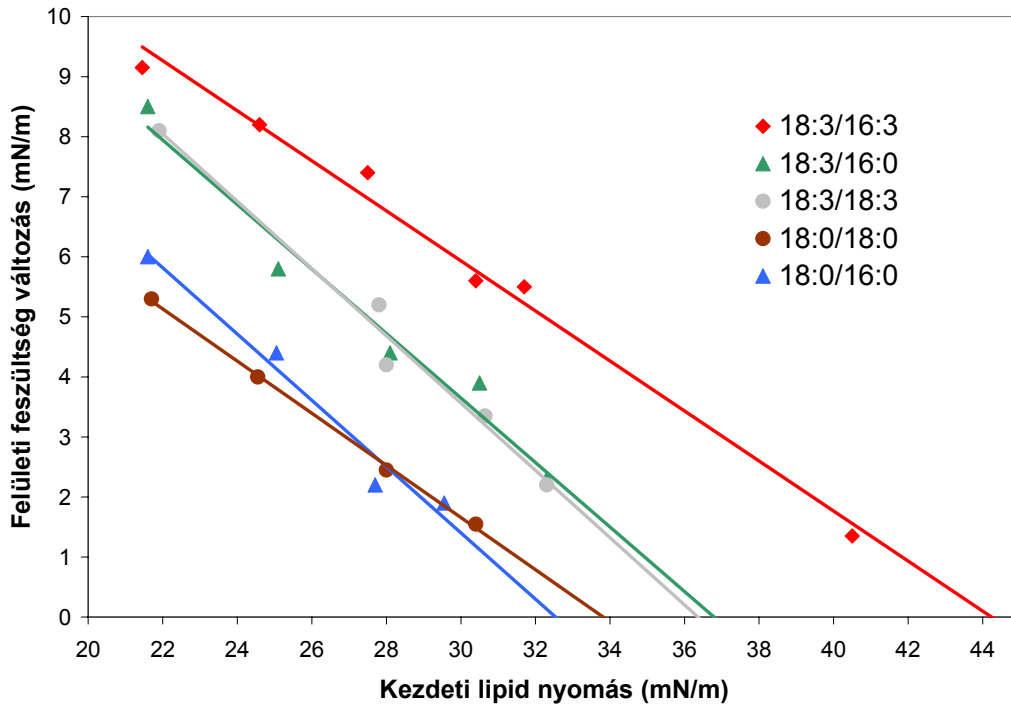
25. ábra A Hsp17 hatása a *Synechocystis* PG liposzómák fluiditására (FTIR spektrum) (representatív mérési eredmény, $n=3$).

1987; Roughan és mtsai, 1987). Az egyéb szintetikus PG lipideket (DOPG, POPG) vásároltuk (Sigma), ill. a megfelelő PC-ből állítottuk elő (OPPG) (Anyagok és módszerek 1.3.3. fejezet). A Hsp17 -fluiditást érzékelő funkciójának megfelelően szignifikánsan kisebb affinitást jelez mind a *Synechocystis*-ből, mind pedig a borsóból származó hidrogénezett MGDG felé. Bár a zsírsavtelítés jóval nagyobb kettős kötés tartalom csökkenéssel járt a borsó lipid esetében (ld. DBI-ek), a kölcsönhatásban mutatkozó változás mégis nagyobbak mondható a *Synechocystis 18:x/16:y prokarióta típusú lipidjei* esetén. A borsó MGDG-hez képest alig valamivel telítetlenebb, ám a borsó 18:3/18:3 speciesz mellett jelentős mennyiségű 18:3/16:3 megoszlású lipidet tartalmazó spenót MGDG-t használva óriási Hsp17-lipid kölcsönhatás értékeket detektálhattunk (26. ábra). Mindez arra enged következtetni, hogy *egy általános lipid fluiditás érzékelésen lényegesen túlmutatató lipid speciesz szintű fölismerés működik*. Hasonló megállapításokra juthatunk a különféle PG specieszek eredményei alapján is. A természetes -főként 18:2/16:0 és 18:1/16:0 lipideket tartalmazó- PG határozottan nagyobb kölcsönhatást mutat a Hsp17-tel, mint a 18:1/16:0 összetétellel jellemezhető OPPG. Ennek pozicionális izomere, a POPG (16:0/18:1) és a *Synechocystis*-ben nem előforduló, telítetlen DOPG (18:1/18:1) viszont csak jóval kisebb asszociációs képességet tudott fölmutatni a sHsp-vel (27. ábra).

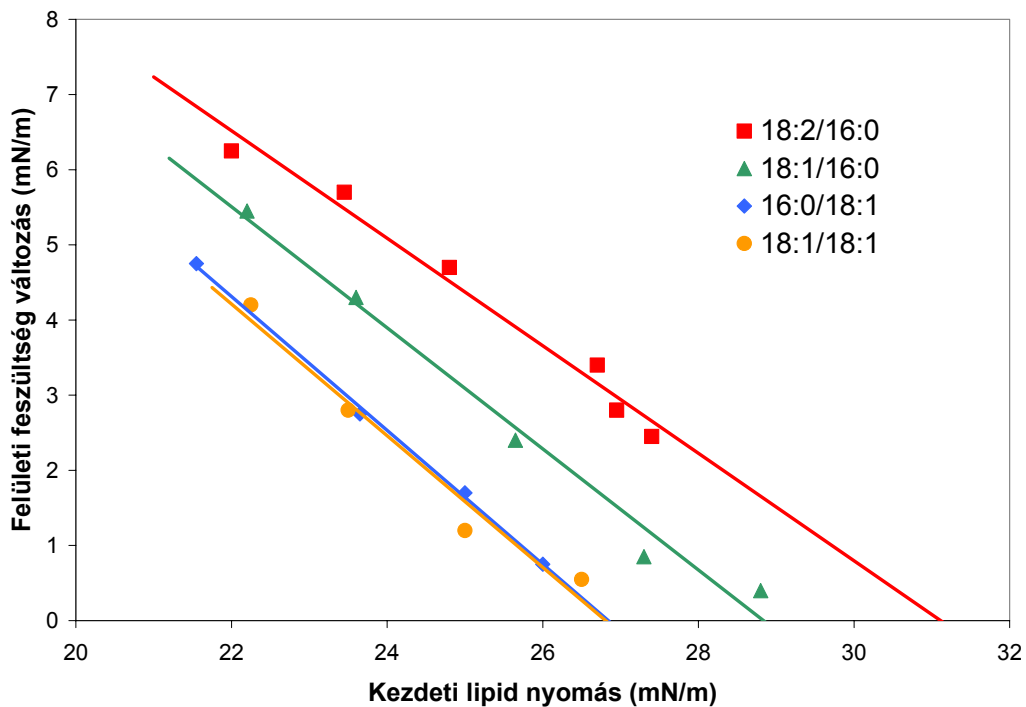
Zsírsavak (%)											Molekula specieszek
MGDG	16:0	16:1	16:3	18:0	18:1	18:2	γ 18:3	α 18:3	18:4	DBI	
spenót	2.8	1.1	23.2	2.3	0.0	1.1	0.8	69.6	0.0	281.7	α 18:3/16:3; α 18:3/ α 18:3
Syn22	46.4	2.7	0.0	1.8	3.2	6.4	37.7	0.3	1.5	138.7	γ 18:3/16:0; 18:2/16:0
borsó	3.8	0.4	0.0	1.1	1.2	8.8	0.0	84.7	0.0	273.4	α 18:3/ α 18:3
borsó/ H ₂	6.1	0.0	0.0	93.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	18:0/18:0
Syn22/ H ₂	48.7	0.0	0.0	51.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	18:0/16:0

PG	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	γ 18:3	α 18:3	DBI	
Syn30	57.2	1.1	1.1	8.6	30.2	0.9	0.9	75.5	18:2/16:0; 18:1/16:0
OPPG	50.0			50.0				50.0	18:1/16:0
POPG	50.0			50.0				50.0	16:0/18:1
DOPG				100.0				100.0	18:1/18:1

3. táblázat A 26. és 27. ábrák kísérleteiben vizsgált természetes és szintetikus eredetű lipidek (MGDG, PG) zsírsavösszetétele (m/m %) és fontosabb molekula specieszei. MGDG: Syn22 (22 °C-on növesztett *Synechocystis*-ből izolált lipidek), H₂: a zsírsavak teljes mértékű katalitikus hidrogénezését jelöli; PG: Syn30 (30 °C-on növesztett *Synechocystis*-ből izolált lipidek), OPPG (1-oleil-2-palmitoil-foszfatidil-glicerol), POPG (1-palmitoil-2-oleil-foszfatidil-glicerol), DOPG (dioleil-foszfatidil-glicerol); DBI („double bond index”: 100 zsírsavra számított átlagos kettős kötés tartalom)



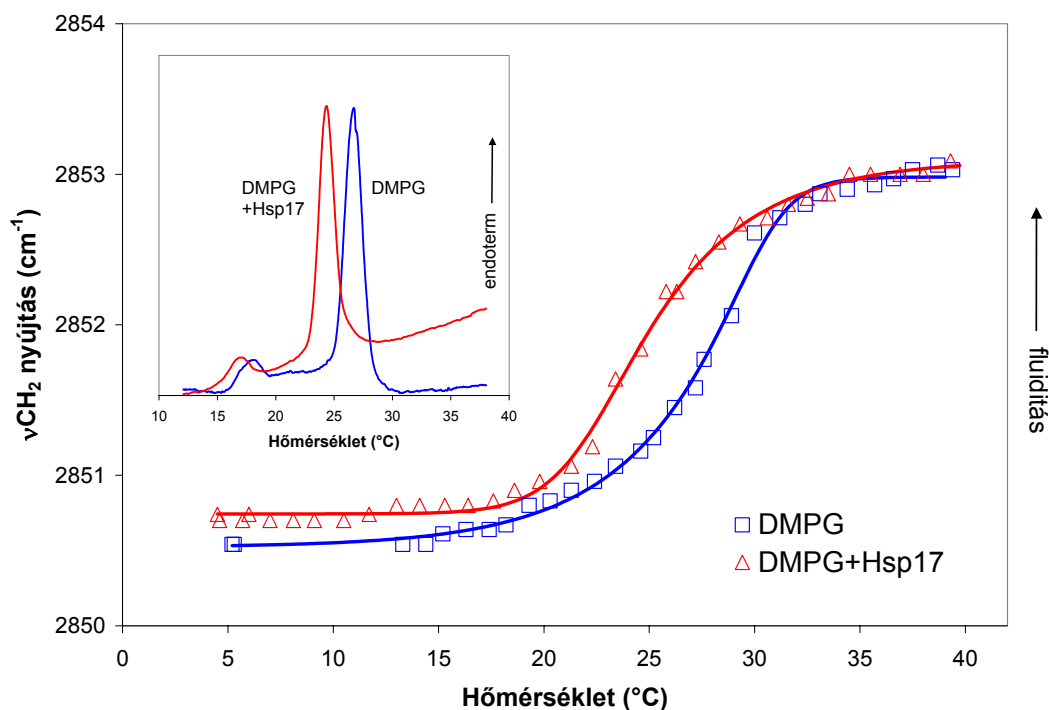
26. ábra A *Synechocystis* Hsp17 különböző MGDG molekula specieszekkel mutatott kölcsönhatása („monolayer” kísérlet, ld. 22. ábra). A különböző MGDG-eket az azokra leginkább jellemző molekula speciesz (ld. 3. tábl.) jelével tüntettük fel.



27. ábra A *Synechocystis* Hsp17 különböző PG molekula specieszekkel mutatott kölcsönhatása („monolayer” kísérlet, ld. 22. ábra). A különböző PG-eket az azokra leginkább ill. kizárólagosan jellemző molekula speciesz (ld. 3. tábl.) jelével tüntettük fel.

Összességében elmondható, hogy a *Hsp17* lipid molekula speciesz fölismerésen alapuló membrán kölcsönhatását elsősorban a lipid fejcsoport minősége határozza meg, de ez nagymértékben módosul a zsírsavak hosszúsága, pozíciója és azok telítetlensége függvényében (ld. 22-27. ábra).

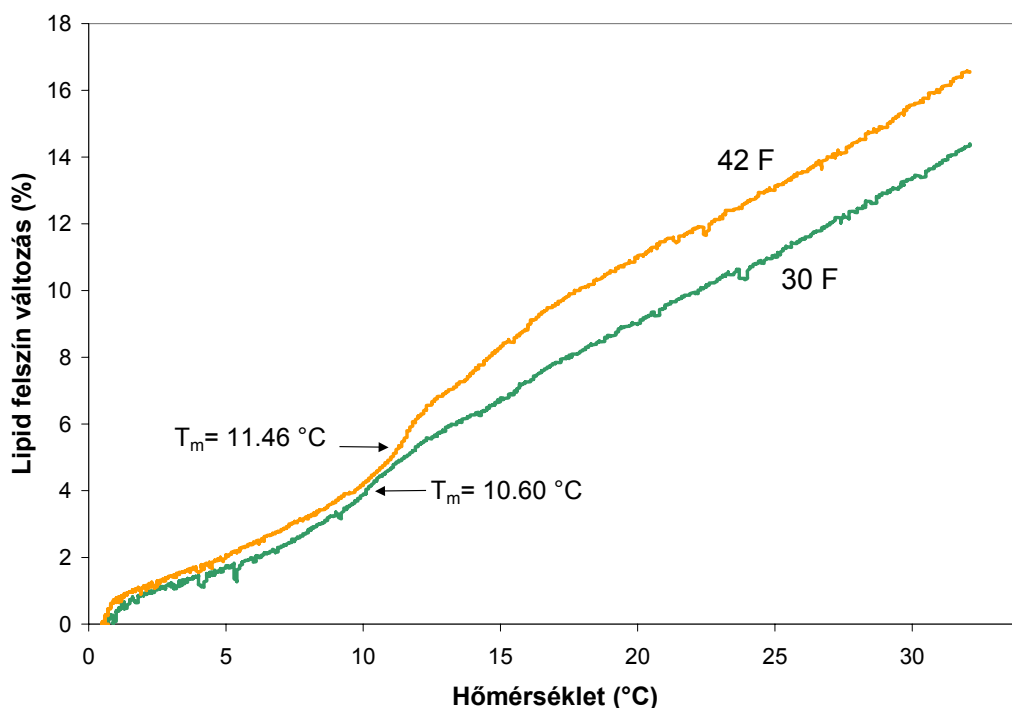
A *Hsp17* és az MGLcDG egyaránt képes mérsékelni ill. gátolni a magas hőmérséklet okozta hiperfluidizációt és a nem kettősréteg-képző lipidek általi fordított hexagonális fázis képződést (2. ábra; 1-2. tábl., 21. ábra; 24-27. ábra, további nem bemutatott adatok) (az ábrákon túl ld. az MGLcDG rendkívüli telítettségét és csökkent H_{II} -képző hajlamát, a *Hsp17* fluiditás érzékelő lipid kölcsönhatását). Soto és mtsai (1999) egy *Castanea sativa* sHsp-t *E. coli*-ban expresszáltak, és azt a megfigyelést tették, hogy a sHsp jelenléte növeli az *E. coli* sejtek alacsony hőmérsékleti stresszel szemben mutatott túlélőképességét. A *Hsp17* némileg meglepő módon csökkenteni képes a teljesen telített (14:0/14:0) DMPG T_m értékét, és csekély mértékben fluidizálja a rigid lipidet a gél fázisban (28. ábra).



28. ábra A *Hsp17* hatása a DMPG liposzómák gél fázis állapotára (FTIR spektrum) és gél → fluid (fiziológus) állapot tranzíciós hőmérsékletére (T_m) (DSC termogram, inzert) (reprezentatív mérési eredmény, $n=3$). DMPG (dimirisztoil-foszfatidil-glicerol, 14:0/14:0-PG)

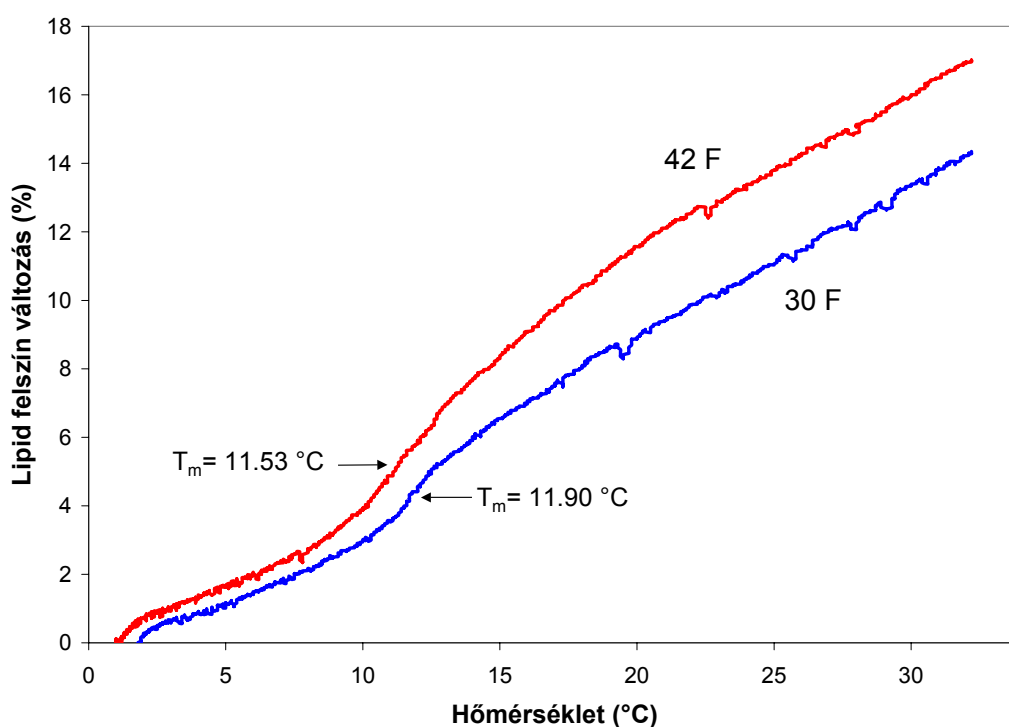
A *sHsp*(-k) ezen aktivitása éppen ellentétes azzal, amit a magas hőmérsékleti stressz során végez(nek), másfelől viszont *-egyfajta intelligens működésről tanúskodva-membrán asszociációju(k)kal mindkét hőmérsékleti szélsőséggel szemben a fiziológiás lipid fázis megőrzését segíti(k) elő* (további nem bemutatott adatok).

A fényben végzett magashőmérsékleti akklimatizáció hatását vizsgálva a TPL ill. az egyes lipidosztályok fizikai tulajdonságai tekintetében ismét némileg meglepő eredményre jutottunk (29-31. ábra). A „monolayer” technika nem csak lipid-fehérje kölcsönhatás vizsgálatára alkalmas, de a lipidek gél → fluid fázisátmenetének (T_m) tanulmányozására is kiváló eszköznek bizonyult (Blume, 1979; ld. még Anyagok és módszerek 1.6.1. fejezet). A telítettebb, hőedzett MGDG T_m értéke a kismértékű kettős kötés tartalom csökkenéssel arányos mértékben a magasabb hőmérsékletek irányába tolódott (1. tábl., 29. ábra), és egyetlen másik fő lipidosztály kontroll és hőedzett párral sem kaptunk ellenkező tendenciát (nem bemutatott adatok). A fényben hőkezelt sejtekből izolált TPL T_m értéke ugyanakkor mégsem nőtt a kontroll mintához viszonyítva (30. ábra).

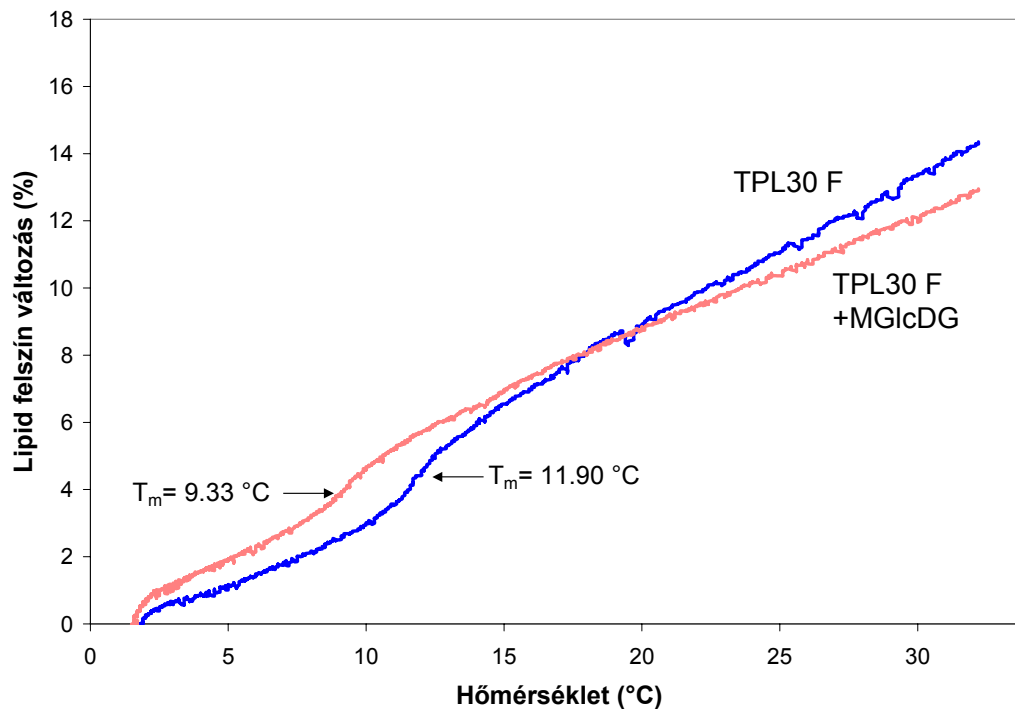


29. ábra A fényben végzett hőakklimatizáció hatása a *Synechocystis* MGDG fizikai tulajdonságaira. Lipid monolayer-ek izobár hőmérséklet görbéi (representatív mérési eredmény, n= 2). A lipideket 30 °C-on növesztett, majd 30 (30) vagy 42 °C-on (42) fényben (F) 3 órán keresztül kezelt sejtekből izoláltuk.

Ezt a várakozásoknak ellentmondó eredményt minden bizonnyal a fényben végzett hőaklimatizáció során földúsult, ám továbbra is minor lipidnek számító MGlcDG okozta, hiszen a fő lipidosztályoktól eltekintve ez az egyetlen eltérés a fényben hőedzett és kontroll TPL keverékek összetétele között. Ennek megfelelően a kontroll TPL-be kevert (10 %) rendkívül telített MGlcDG ahelyett, hogy -nagy telítettsége folytán- növelte volna a TPL „olvadási hőmérsékletét”, drasztikusan csökkentette azt, csaknem a tiszta MGlcDG tranzíciós hőmérsékletére ($T_m = 9,01 \text{ °C}$) (31. ábra). Mindez rávilágított arra, hogy *a hőszokklipid MGlcDG szerepe -a Hsp17-hez nagyon hasonlatosan- elsősorban a lipid fázis tranzíciós hőmérsékletének olyan irányú módosítása (a T_{hex} növelése és a T_m csökkentése), hogy az a membrán fiziológiás körülményeit igyekezzen fenntartani.* Ehhez szorosan kapcsolódva, a Hsp17 és az MGlcDG egyaránt képes a lipid fluiditás módosítására is, ugyancsak a fiziológiás lipid fázis megőrzésének érdekében (ld. 72. oldal).



30. ábra **A fényben végzett hőaklimatizáció hatása a *Synechocystis* TPL fizikai tulajdonságaira.** Lipid monolayer-ek izobár hőmérséklet görbéi (reprezentatív mérési eredmény, $n = 3$). A lipideket 30 °C-on növesztett, majd 30 (30) vagy 42 °C-on (42) fényben (F) 3 órán keresztül kezelt sejtekből izoláltuk.



31. ábra A „hősokklipid” (MGlcDG) hatása a kontroll TPL fizikai állapotára. Lipid monolayer-ek izobár hőmérséklet görbéi (reprezentatív mérési eredmény, n= 2). TPL30 F: fényben 30 °C-on növesztett *Synechocystis* sejtekből izolált TPL, TPL30 F+ MGlcDG: TPL30-hoz kevert 10 m/m % MGlcDG, amelyet 30 °C-on növesztett, majd 42 °C-on fényben 3 órán keresztül kezelt sejtekből izoláltuk.

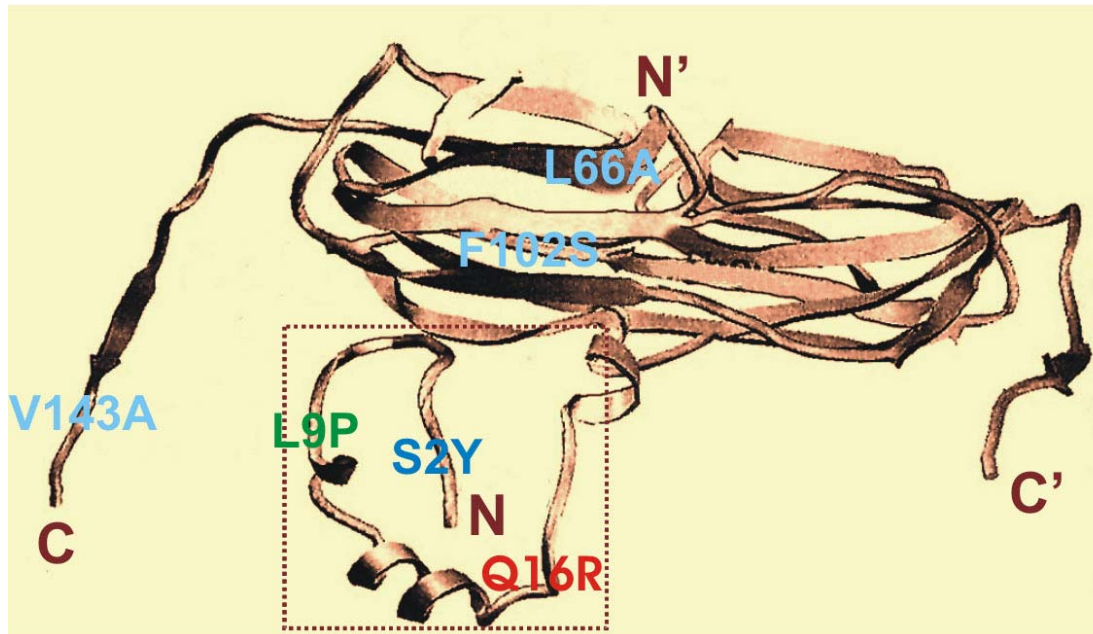
Érdekes egybeesés, hogy Lindblom és mtsai (2002) szerint prokarióta membránok hőakklimatizációjában olyan lipid összetételbeli változások játszhatnak szerepet, melyek magát a lipid fázis viselkedését befolyásolják. Ezek a lipid változások főként a fejcsoport régiót érintik, amelyek alapján megjósolható egy „új” lipid megjelenése az akklimatizáció során. A hősokklipid mind a lipid fázist módosítani képes, mind pedig az „új” jellemzőknek eleget tesz. *A Hsp17 és a hősokklipid tehát olyan lehetséges membrán lipid fázist szabályozó faktorok*, melyek egymáshoz egyedi asszociációs képességet mutatnak, de akár függetlenül is aktív részeseivé lehetnek a membrán hőakklimatizációs folyamatainak.

2. *Synechocystis* Hsp17 pontmutációk specifikusan módosítják a kismolsúlyú hősokkfehérje membrán aktivitását

A Hsp17-membrán (lipid) kölcsönhatás ill. mechanizmusának további tanulmányozását céloztuk meg olyan sHsp pontmutáns konstrukciók létrehozásával ill. a megfelelő tisztított fehérjék vizsgálatával, amely sejtek stressz toleranciájuk tekintetében ill. a megfelelő fehérjék oligomerizációs tulajdonságukban és *in vitro* fehérjevédő képességükben különböznek a WT sejttől ill. fehérjétől (Giese és Vierling, 2002 és 2004; Giese és mtsai, 2005). A vad típusú mellett hat pontmutánst expresszáló sejtet ill. *E. coli*-ből tisztított fehérjét vizsgáltunk (S2Y, L9P, Q16R, L66A, F102S, V143A), amelyek mind a fentebb felsorolt tulajdonságok tekintetében, mind a sHsp mutáció helyét illetően széles határok közötti vizsgálódáshoz nyújtanak lehetőséget. A 32. és 33. ábra a mutációk helyeit tünteti föl a WT Hsp17 primer és hozzávetőleges térbeli (dimer) szerkezetét véve alapul (Bishop és mtsai, 2001). A továbbiakban a fentebb vázolt pontmutánsokat két csoportban tárgyalom a 2.1. és 2.2. fejezetekben.

2.1. A sHsp oligomerizáció szerepe a lipid kölcsönhatásban

Giese és Vierling (2002 és 2004) a *Hsp17 dinamikus oligomerizációs képessége, chaperon aktivitása és a sejt túlélőképessége között szoros összefüggést mutattak ki*. Olyan mutációk, amelyek az oligomer állandósult széteséséhez vezetnek a fehérjevédelmi hatás jelentős csökkenését eredményezték. Habár a dimer formájú Hsp17 mutánsok -a sHsp aktivizálódás elmélettel összhangban- a denaturálódott fehérjék gyorsabb kinetikájú reaktiválódását tették lehetővé, a szerzők mégis arra a megállapításra jutottak, hogy a sHsp/szubsztrát komplex valamilyen formájú reasszociációja, stabilizálódása elengedhetetlen a hatékony chaperon funkcióhoz (ld. Irodalmi áttekintés 3.2. és 3.3. fejezet). Ezzel párhuzamosan a sHsp oligomerizációs állapotának lipid kölcsönhatásban betöltött szerepe is kérdéses. Ezért olyan mutánsokat vizsgáltunk, amelyek ebben a tekintetben hasznosak lehetnek. Az S2Y egy olyan mutáció, amely *az oligomer struktúrát stabilizálja, annak disszociációját*

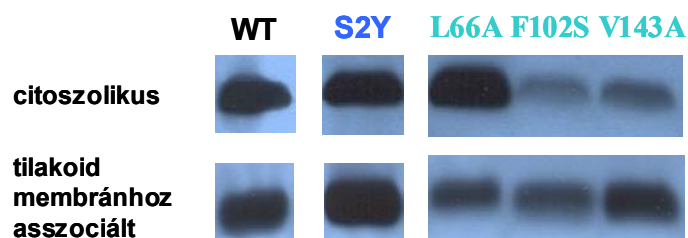


33. ábra A Hsp17 pontmutációk hozzávetőleges helyzete a sHsp dimer térbeli modell szerkezetében (Giese és Vierling, 2004). Az L9P és a Q16R az oligomer állapotot nem érintő N-terminális mutációk. Az S2Y mutáció az oligomer állapot rögzítését eredményezi. Az α -crystallin domén két mutációja (L66A, F102S) és a C-terminális V143A mutáció az oligomer állandósult disszociációjához vezet (ld. 4. és 5. tábl., 32. ábra).

	WT	S2Y	L66A	F102S	V143A
Oligomerizáció	oligomer	rögzített oligomer	főként dimer	dimer	dimer
„Refolding” aktivitás	+++	nincs	+	nincs	+
Sejt termotolerancia	+++	+++	nincs	nincs	nincs

4. táblázat A sHsp oligomerizációt befolyásoló Hsp17 pontmutánsok jellemzői (Giese és Vierling, 2002, 2004; Giese és mtsai, 2005) (ld. 32. és 33. ábra). Oligomerizáció: a tisztított fehérje *in vitro* vizsgált tulajdonsága; „Refolding” aktivitás: a sHsp *in vitro* fehérjevédő képessége a teljes „unfolding-refolding” ciklus részeként (ld. 9. és 15. ábra); Sejt termotolerancia: az adott Hsp17-t expresszáló *Synechocystis* sejtek termotoleranciája; „WT” sejt: +WT Hsp17 revertáns; A fehérjék „refolding” aktivitás értékeit és a sejtek termotolerancia jellemzőit a WT sHsp és az azt expresszáló sejt ill. a sHsp nélküli *in vitro* rendszer és a Δ Hsp17 sejt tulajdonságaihoz viszonyítottuk („+++” ill. „nincs”).

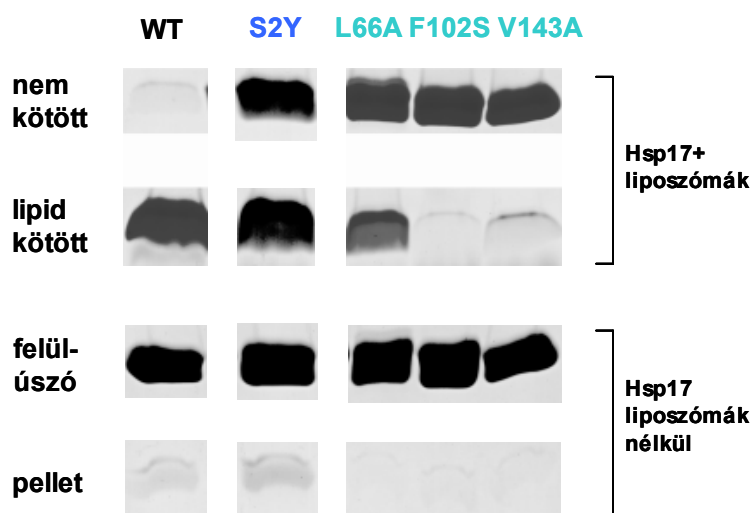
Annak érdekében, hogy a fentebb említett Hsp17 mutációk és az azokhoz kapcsolódó szerkezeti-funkcionális módosulások hatását nyomon kövessük, a dimer és oligomer állapotú fehérjék sejten belüli eloszlását elemeztük. A vad típusú Hsp17 nagyjából egyenlő arányban található meg a fényben hőedzett sejt membrán ill. citoszolikus frakciójában. Az S2Y sHsp megoszlása hasonló képet mutat, és a dimer fehérjékkel ellentétben a hőindukált összes fehérje mennyiség nagyobb a kontroll mintához képest. A dimer fehérjék nem csupán az összes fehérje mennyiség, de a frakcionális megoszlásuk tekintetében is változatos képet mutatnak. Az L66A, F102S, V143A irányban a tilakoid asszociált sHsp aránya és mennyisége egyaránt növekvő tendenciát jelez (34. ábra).



34. ábra **A sHsp oligomerizációt befolyásoló Hsp17 pontmutánsok megoszlása a citoszolikus és tilakoid membrán frakciók között a fényben végzett hőaklimatizációt követően.** A 30 °C-on növesztett *Synechocystis* sejteket fényben 3 óráig tartó 42 °C-os hőstressznek tettük ki, majd tilakoid membrán és citoszolikus (felülészó) frakciókat izoláltunk. A két fajta frakcióból azonos fehérje mennyiségeket elemeztünk Hsp17 immunoblotting segítségével (reprezentatív, n= 3). A kontroll (30 °C-os) sejtekből származó frakciókban a Hsp17 nem kimutatható (nem bemutatott eredmény). A pontmutációk befolyásolják a Hsp17 totál mennyiségét.

A sHsp membrán kötésének egyik lehetséges eszközeként/ célpontjaként vizsgáltuk a kérdéses tisztított fehérjék *in vitro* lipid kötését. A biokémiai módszer arról árulkodik, hogy a *teljesen liposzóma kötött WT* fehérjéhez képest az oligomer S2Y jelentősen kisebb mértékben, míg a dimerek gyakorlatilag egyáltalán nem maradtak a liposzómát tartalmazó pellet frakcióban. A liposzómamentes rendszerekben a fehérjék egyike sem ülepedett ki (35. ábra). Ez némileg meglepő a “monolayer” kísérletek eredményével összevetve, hiszen azok gyakorlatilag éppen ellenkezőleg azt mutatják, hogy a dimer fehérjék jelentős mértékben megőrizték affinitásukat a lipidekhez, míg az S2Y fehérje valamilyen módon elveszítette ezt (36. ábra). Ha azonban figyelembe vesszük, hogy a biokémiai módszernél nagy, míg a “monolayer” technikánál kis lipid és fehérje koncentrációkat alkalmaztunk, értelmezhetjük az eredményeket. A

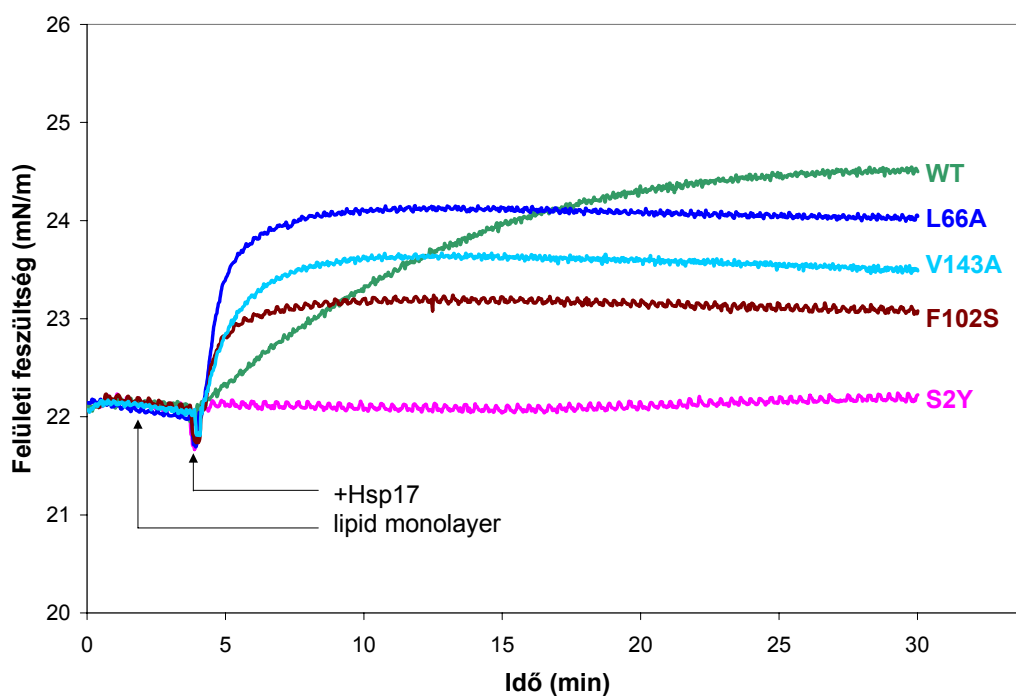
“monolayer” technika szerint *a dimerek a WT fehérjénél (is) gyorsabb kinetikával penetrálnak a lipid felszínbe, ami arra utal, hogy a vad típusú Hsp17-hez képest a kölcsönható rész jobban/ gyorsabban hozzáférhető.* Ez azt sejteti, hogy *a kölcsönhatáshoz szükséges az oligomer disszociációja, amely a WT fehérjénél némi időt vesz igénybe, míg az S2Y mutáns esetében mindez jelentősen gátolt.*



35. ábra A sHsp oligomerizációt befolyásoló Hsp17 pontmutánsok TPL asszociációja. A tisztított fehérjét 30 °C-on növesztett, majd fényben 3 órán keresztül 42 °C-on hűdött *Synechocystis* sejtekből izolált lipidek alkotta liposzómákkal (LUV) inkubáltuk. A lipideket az azokhoz kötődő fehérjékkel együtt centrifugálással üleptítettük. A felülúszó és pellet frakciók ugyanakkora hányadát SDS-PAGE segítségével analizáltuk. A lipidmentes rendszerekben a fehérjék (számottevően) nem ülepedtek. (reprezentatív eredmény, n= 3)

Ezek alapján a lipid kölcsönható résznek valamely, a sHsp oligomer szétesése során szabaddá váló felületnek kell lennie, amely így leginkább a C- vagy N-terminális rész lehet. Ez azonban még mindig nem oldja föl az ellentmondást a biokémiai módszerrel kapott eredményekhez képest. Egy lehetséges magyarázat szerint a dimer fehérjék hiába őrzik meg az affinitásukat a lipid membránhoz, *a kapcsolatot stabilizálódásához szükséges a sHsp (re)oligomerizációs készsége.* Ezt támasztja alá az a tény, hogy a részben oligomer L66A kis hányada föllelhető a liposzómákhoz kötötten, a pellet frakcióban (ld. 35. ábra). Bár az S2Y fehérje kölcsönható része -az oligomerben elrejtve- *nagy mértékben gátolt a hozzáférés tekintetében,* ha növeljük a kölcsönható partnerek koncentrációját, akkor értelmezhető egy *kevésbé preferált/ akadályozott asszociáció létrejötte.* Ezt az elképzelést támasztja alá, hogy MGlcDG-vel -amely preferáltabb (perifériális) lipid kölcsönhatásra ad lehetőséget, mint a TPL-

koncentrációfüggő módon kölcsönhat az S2Y, bár kevésbé, mint az egyéb fehérjék (nem bemutatott “monolayer” adat, ld. továbbá 22. és 23. ábra). Egy ilyen kölcsönhatást működtető mechanizmus földerítése azonban alaposabb vizsgáldást igényel, amely háttérben minden bizonnyal az S2Y -fehérjevédelemben is fölmutatott- *dinamikus oligomerizációs képességbeli hiányossága* áll.



36. ábra A sHsp oligomerizációt befolyásoló Hsp17 pontmutánsok kölcsönhatása TPL monolayer-ekkel. A tisztított fehérjét 30 °C-on növesztett, majd fényben 3 órán keresztül 42 °C-on hődzett *Synechocystis* sejtekből izolált lipidek alkotta felszín alá injektáltuk.

Összeségében elmondhatjuk, hogy a Hsp17 oligomerizációs állapota befolyásolja a sHsp chaperon és membrán aktivitását egyaránt. Ahhoz azonban, hogy az *in vivo* membrán eredmények és az *in vitro* lipid vizsgálatok között összefüggést találjunk, további munkák szükségesek, amelyben a Hsp17 lipid és (membrán) fehérje kölcsönhatásait is figyelembe kell venni.

2.2. N-terminális Hsp17 pontmutások

2.2.1. Hsp17 N-terminális vég mint lipid kölcsönható régió

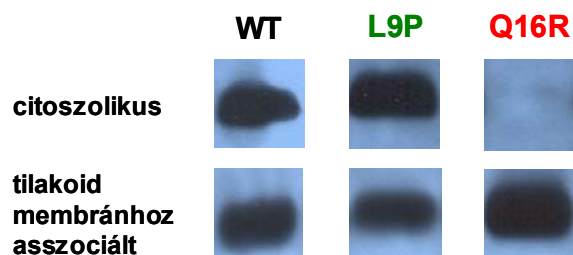
Fölöttébb érdekes módon Giese és mtsai (2005) úgy találták, hogy egyes N-terminális mutások, melyek sem a sHsp oligomerizációját, sem *in vitro* chaperon aktivitását nem befolyásolták számottevő mértékben, hőstressz során nem voltak képesek védelmet nyújtani a sejtnek (5. tábl.). A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy vagy az általuk használt *in vitro* chaperon teszt nem megfelelő az *in vivo* fehérjévédelem modellezésére, vagy a Hsp17 N-terminális része valamilyen más, a sejt életbenmaradása szempontjából lényeges funkció védelmében játszik szerepet.

	WT	L9P	Q16R
Oligomerizáció	oligomer	oligomer	oligomer
„Refolding” aktivitás	+++	+++	+++
Sejt termotolerancia	+++	nincs	nincs

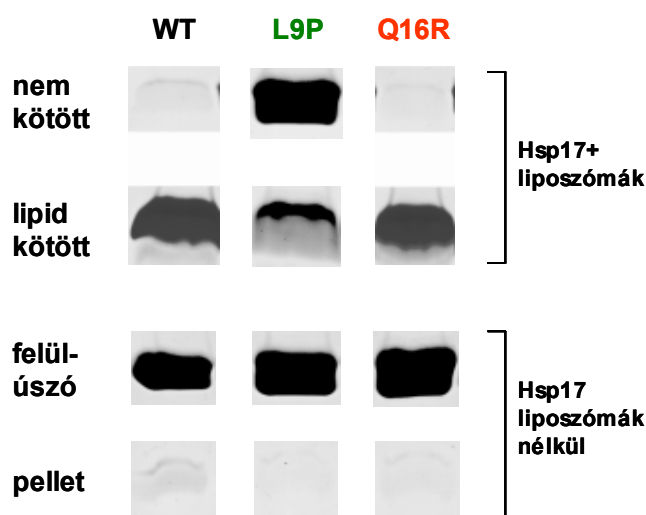
5. táblázat A Hsp17 oligomerizációt nem befolyásoló N-terminális pontmutások jellemzői (Giese és mtsai, 2005) (ld. 32. és 33. ábra). Oligomerizáció: a tisztított fehérje *in vitro* vizsgált tulajdonsága; „Refolding” aktivitás: a sHsp *in vitro* fehérjévédelem képessége a teljes „unfolding-refolding” ciklus részeként (ld. 9. és 15. ábra); Sejt termotolerancia: az adott Hsp17-t expresszáló *Synechocystis* sejtek termotoleranciája; „WT” sejt: +WT Hsp17 revertáns; A fehérjék „refolding” aktivitás értékeit és a sejtek termotolerancia jellemzőit a WT sHsp és az azt expresszáló sejt ill. a sHsp nélküli *in vitro* rendszer és a Δ Hsp17 sejt tulajdonságaihoz viszonyítottuk („+++” ill. „nincs”).

Ez kézenfekvő alapot teremtett az L9P és Q16R mutások sejtben belüli lokalizációjának ill. (membrán) lipid kötésének *in vitro* tanulmányozására. Bámulatos módon 3 h, 42 °C fényben végzett hőaklimatizációt követően az L9P mutáció hatására a Hsp17 megoszlása szignifikánsan a citoszolikus frakció felé tolódott el, a Q16R sHsp pedig kizárólag a tilakoid frakcióban volt megtalálható (37. ábra). Ezzel összhangban a lipid (TPL) kötés vizsgálatára használt biokémiai módszer -a kísérleti körülmények között- maximális kölcsönhatást jelzett a WT és Q16R fehérjékre, míg

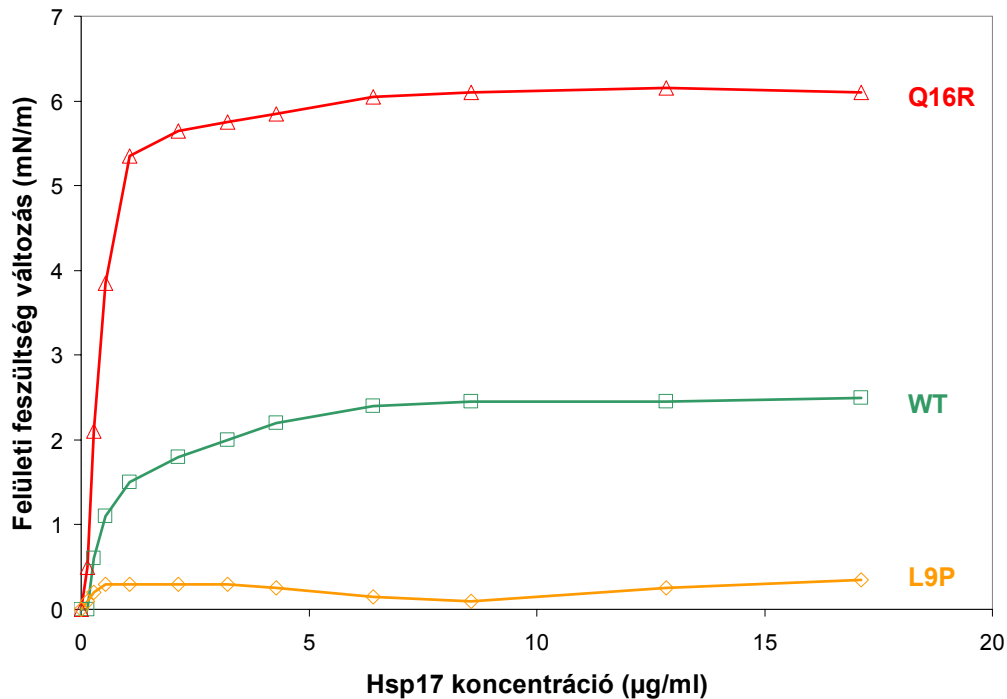
az L9P sHsp csupán részlegesen volt föllelhető a liposzómákhoz kötötten. A vizsgált fehérjék egyike sem ülepedett ki a lipid vezikulák hiányában (38. ábra). A “monolayer” technika segítségével további különbség vált felismerhetővé ezen sHsp-k kölcsönható képessége között, ezúttal azonban egy mutáns fehérje, a Q16R javára (39. ábra).



37. ábra A Hsp17 oligomerizációt nem befolyásoló N-terminális pontmutások megoszlása a citoszolikus és tilakoid membrán frakciók között a fényben végzett hőakklimatizációt követően. A 30 °C-on növesztett *Synechocystis* sejteket fényben 3 óráig tartó 42 °C-os hőstressznek tettük ki, majd tilakoid membrán és citoszolikus (felülúszó) frakciókat izoláltunk. A két fajta frakcióból azonos fehérje mennyiségeket elemeztünk Hsp17 immunoblotting segítségével (reprezentatív, n= 3). A kontroll (30 °C-os) sejtekből származó frakciókban a Hsp17 nem kimutatható (nem bemutatott eredmény). A pontmutációk befolyásolják a Hsp17 totál mennyiségét.



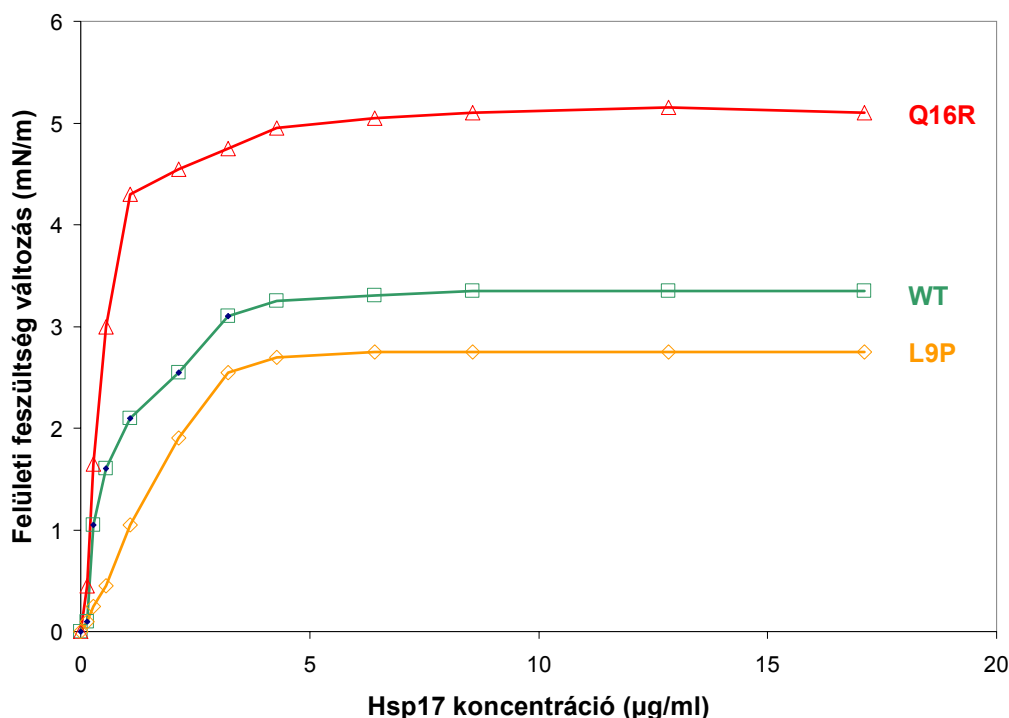
38. ábra A Hsp17 oligomerizációt nem befolyásoló N-terminális pontmutások TPL asszociációja. A tisztított fehérjéket 30 °C-on növesztett, majd fényben 3 órán keresztül 42 °C-on hőedezett *Synechocystis* sejtekből izolált lipidek alkotta liposzómákkal (LUV) inkubáltuk. A lipideket az azokhoz kötődő fehérjékkel együtt centrifugálással üleptítettük. A felülúszó és pellet frakciók ugyanakkora hányadát SDS-PAGE segítségével analizáltuk. A lipidmentes rendszerekben a fehérjék (számottevően) nem ülepedtek. (reprezentatív eredmény, n= 3)



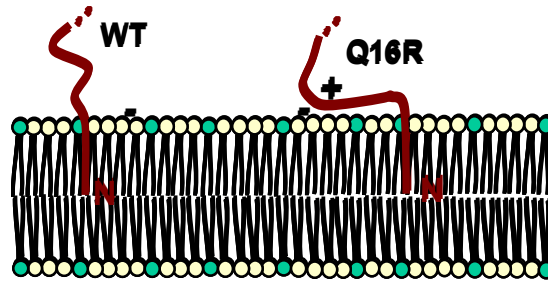
39. ábra A Hsp17 oligomerizációt nem befolyásoló N-terminális pontmutások kölcsönhatása TPL monolayer-ekkel. A tisztított fehérjéket 30 °C-on növesztett, majd fényben 3 órán keresztül 42 °C-on hűdített *Synechocystis* sejtekből izolált lipidek alkotta felszín alá injektáltuk.

Anélkül tehát, hogy módosítottuk volna a fehérjék oligomerizációs állapotát, azaz lipid kölcsönható részük hozzáférhetőségét, negatív (L9P) és pozitív (Q16R) irányban befolyásoltuk azok kölcsönható képességét. Erre kézenfekvő magyarázatként szolgálhat az, hogy az *N-terminális pontmutációk (L9P és Q16R) közvetlen (és/ vagy esetleg közvetett) módon érintették a kölcsönható fehérje motívumot.* Ha MGDG lipidet használtunk, a Q16R és WT sHsp közötti különbség korántsem volt akkora, és a TPL-lel gyakorlatilag nem kölcsönható L9P Hsp17 inszerció is majdnem akkora felületi feszültség változást eredményezett, mint a WT fehérje esetében (40. ábra). Úgy tűnik tehát, hogy a lipid fejcsoport minősége az, ami elsősorban különbséget tesz a különböző mutások között. Másfelől, a kölcsönhatás mechanizmusát a fehérje oldalról megvizsgálva, az eredmények -az előző fejezet bizonyítékai alapján is- arra engednek következtetni, hogy a sHsp *N-terminális része (a) lipid kölcsönható rész.* Nem zárható ki más fehérje részek szerepe sem a lipid kölcsönhatásban, bár több tanulmány egyetért abban, hogy az oligomerizációban részt vevő, a vízdoldhatóságért felelős C-terminális vég nem rendelkezik ilyen funkcióval (Mulders és mtsai, 1985; van Montfort és mtsai, 2001). További potenciális érveként szól az N-terminális vég

lipid kölcsönható szerepe mellett az, hogy a *Hsp17* első húsz aminosava közül három Met az *oxidatív stressz elhárításában is közreműködhet*, így ezen rész lipid membrán közelsége további előnyökkel is járhat a sejt számára (Farber, 1995; Asadulghani és mtsai, 2003; ld. még Irodalmi áttekintés 3.3. fejezet). Feltételezhetően a kölcsönható motívum nem éri át a teljes membránt, ugyanis nemigen található a *Hsp17* szekvenciájában ehhez elegendő hosszúságú hidrofób szakasz, de ez nem is szükséges egy átmeneti stabilizációs feladatot ellátó fehérje számára (32. ábra). Egy lehetséges elképzelés szerint az N-terminális vég kb. egy lipid réteg mélységben behatolni képes, alapvetően hidrofób régiója (1-10. aminosav) felelős a lipid (zsírsav) kölcsönhatásért, és a 16. aminosav (*Gln*) + töltéstöbblettel járó cseréje *Arg-re extra stabilizációt kölcsönözhet a negatív töltésű fejcsoporttal bíró lipidekkel (SQDG) létesített kölcsönhatás által* (32. és 41. ábra). Ezt az elképzelést támaszja alá, hogy a neutrális fejcsoportú MGDG-vel végzett kísérletekben lényegesen kisebb extra stabilizációt tapasztaltunk a Q16R *Hsp17* javára, mint a negatív töltésű lipideket is tartalmazó TPL lipidek vizsgálatakor (ld. 39. és 40. ábra) (Horváth és mtsai, 1995; Schleiff és mtsai, 2001).

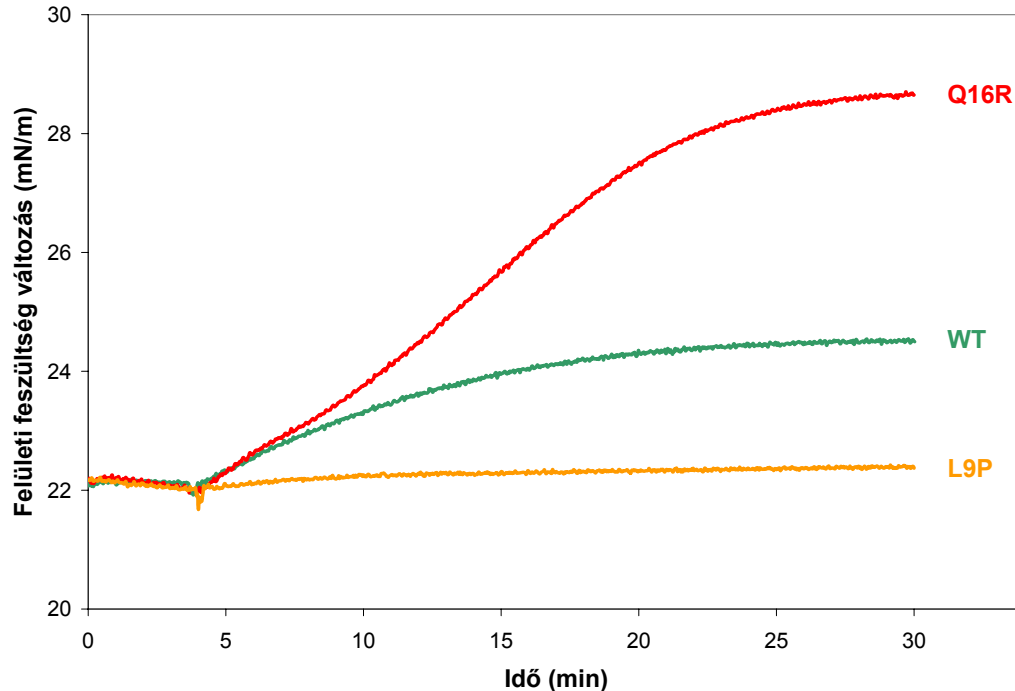


40. ábra A *Hsp17* oligomerizációt nem befolyásoló N-terminális pontmutások kölcsönhatása MGDG lipid monolayer-ekkel. A tisztított fehérjéket 30 °C-on növesztett, majd fényben 3 órán keresztül 42 °C-on hőedzett *Synechocystis* sejtekből izolált lipidek alkotta felszín alá injektáltuk.

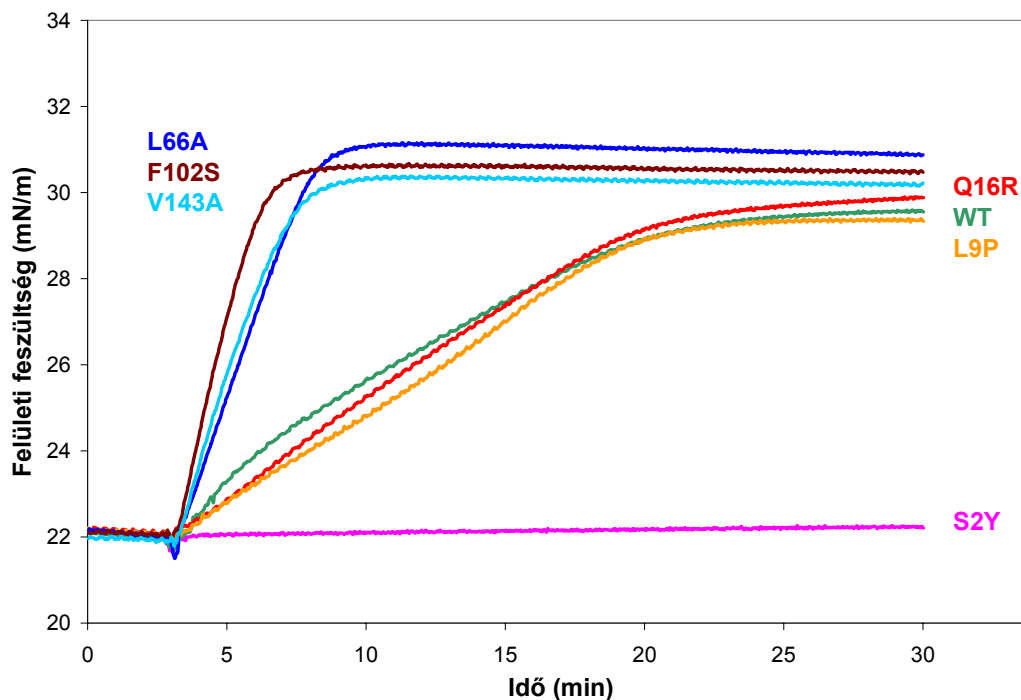


41. ábra A Hsp17 N-terminális részének vélt (lipid) membrán inszerciója és a Q16R mutáció eredményezte extra stabilizáció feltételezett mechanizmusa. Az elképzelés szerint a Q16R, + töltéstöbblettel járó aminosav csere, a negatív töltésű fejcsoporttal rendelkező lipidekkel létesített kölcsönhatás révén biztosít extra stabilizációt a sHsp-lipid kölcsönhatásnak.

Az oligomer struktúra disszociációjának szükségessége tekintetében további bizonyítékként szolgálnak a kölcsönhatások kinetikáját bemutató ábrák (36., 42. és 43. ábra). Az oligomerizációjukban a WT fehérjéhez hasonló mutánsok a kontroll fehérjével párhuzamosan viszonylag lassú kinetikával érik el a maximális kölcsönhatás értéket, TPL és MGlCDG lipidekkel egyaránt (42. és 43. ábra).



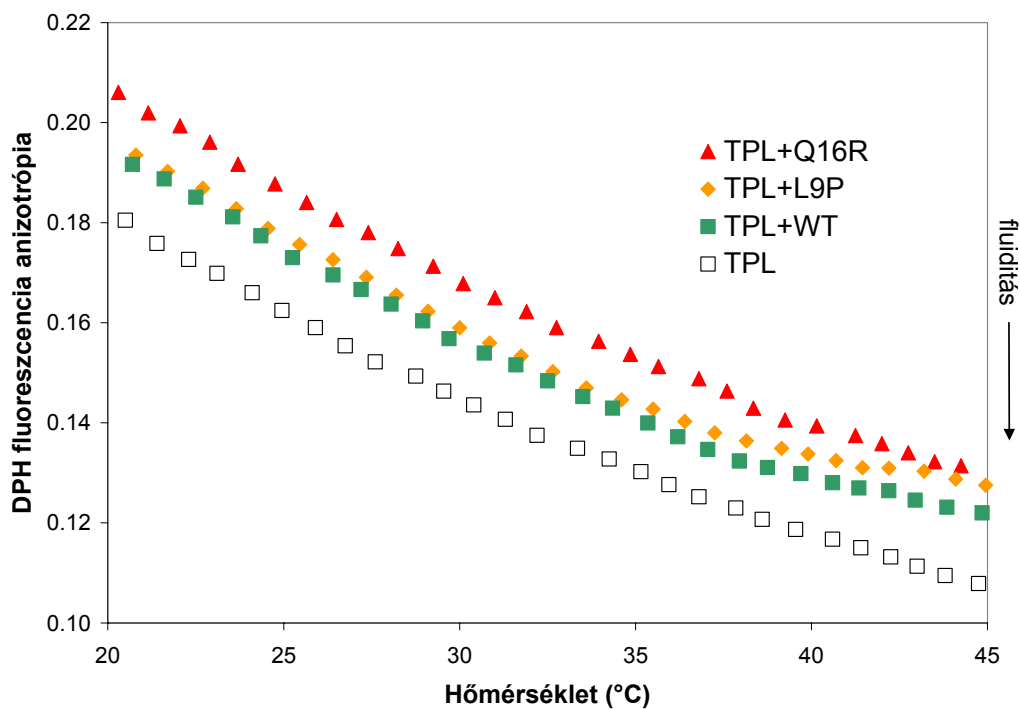
42. ábra A Hsp17 oligomerizációt nem befolyásoló N-terminális pontmutások kölcsönhatása TPL monolayer-ekkel. A tisztított fehérjéket 30 °C-on növesztett, majd fényben 3 órán keresztül 42 °C-on hődzett *Synechocystis* sejtekből izolált lipidek alkotta felszín alá injektáltuk.



43. ábra A sHsp oligomerizációt befolyásoló (L66A, F102S, V143A, S2Y) és a Hsp17 oligomerizációt nem befolyásoló N-terminális (L9P, Q16R) pontmutációk kölcsönhatása MGlCDG lipid monolayer-ekkel. A tisztított fehérjéket 30 °C-on növesztett, majd fényben 3 órán keresztül 42 °C-on hűdített *Synechocystis* sejtekből izolált lipidek („hősokklipid”) alkotta felszín alá injektáltuk.

Szembevetve a különbség, mennyivel gyorsabban aktivizálódnak a dimerek ill. kevésbé (látszólag egyáltalán nem) a disszociációs képességében gátolt S2Y Hsp17 (36. és 43. ábra). Ez összhangban van a jelenleg érvényben lévő, a sHsp-k chaperon aktivitására kidolgozott modellel, miszerint a kölcsönható sHsp oligomer kisebb egységekké disszociál mielőtt a fehérjékkal kölcsönhat. Bár korántsem bizonyos, hogy ugyanazon sHsp motívumok lennének felelősek a fehérjékkal és lipidekkel való kölcsönhatásért, meglehetősen nagy a hasonlatosság ezen különböző kölcsönhatások által megkívánt oligomerizációs változások tekintetében. Az oligomer szerveződéséről alkotott jelenlegi elképzelések alapján ugyanis *a lipid kölcsönható N-terminális vég csak az oligomer legalább dimer szintű disszociációjával válik hozzáférhetővé* (ld. Irodalmi áttekintés 3.1. fejezet). Ez egyszersmind azt is feltételezi, hogy az oligomer állapotú sHsp-k legalább egy kis hányada dimer formában van jelen, vagy a lipid jelenléte katalizálja ill. elősegíti a disszociáció irányába ható oligomerizációs változásokat. Minthogy a sHsp-k dinamikus, folyton mozgásban lévő struktúrák a fenti hipotézis nem elképzelhetetlen, ám ez az elmélet még bizonyításra

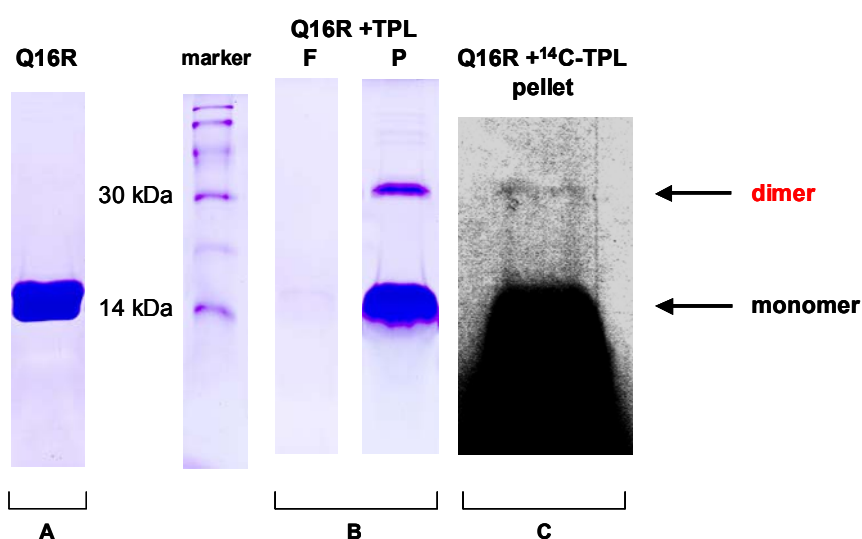
vár (Chen és mtsai, 2003). További érdekesség, hogy a gyakorlatilag csak fejcsoport kölcsönhatáson keresztül ható, telített hősokklipid MGlcDG nem tesz különbséget a *Q16R*, *WT* és *L9P* fehérjék között. Ebből az következik, hogy *a negatív fejcsoport és a telítetlen, ezáltal kölcsönható zsírsav régió játszanak szerepet ezen fehérjék által fölmutatott eltérő lipid affinitásban* (ld. még 39. és 40. ábra). A zsírsav régió szerepének tesztelése végett vizsgáltuk, mennyire képesek az egyes fehérjék a TPL liposzóma fluiditását csökkenteni a hidrofób régióban (44. ábra).



44. ábra **A Hsp17 oligomerizációt nem befolyásoló N-terminális pontmutások hatása a TPL membránok zsírsav (hidrofób) régiójának fluiditására.** LUV liposzóma rendszerek fluiditása a hőmérséklet függvényében (reprezentatív mérési eredmény, n= 3). A liposzómákat 30 °C-on növesztett, majd 42 °C-on fényben 3 óráig tartó hőstressznek kitett sejtekből izolált lipidekből készítettük.

Ez a kísérlet -a 40. ábrával összhangban- azt az eredményt hozta, hogy *a Q16R mutáció nem csak a fejcsoport, de a láb régió stabilizációját is elősegíti*, ill. *az L9P mutáció nem érinti a fehérje zsírsav kölcsönható képességét, annak hiányossága a negatív töltésű lipidekkel való kölcsönhatásban keresendő* (ld. még 39. és 43. ábra). A *Q16R* sHsp esetében a mutáció vagy közvetett módon (pl. fehérje konformáció módosítás) vagy egyszerűen nagyobb arányú Hsp17 lipid felszínhez kihorgonyzásával növeli a hatást (ld. 37. ábra).

A biokémiai lipid kötés vizsgálat során (ld. 35. és 38. ábra), a lipid kötött fehérjé(k) SDS-PAGE elválasztásakor egy -a dimer Hsp17 molekulatömegének magasságában futó- fehérje csík jelent meg a gélen, amely ellenállt mind a mintapuffer feleslegének, mind a forralásnak. Ez a kisebb mobilitású fehérje csík minden lipid kötött sHsp elemzésekor megjelent, de annak erőssége csak a Q16R mutáns esetében volt igazán szembeötlő. Ez nem származhatott a tisztított fehérjében esetlegesen föllelhető szennyeződéstől, hiszen a lipidmentes sHsp minták analízisekor a kérdéses csíkot nem detektáltuk, kizárólag a monomer magasságában találtunk fehérjét (45. ábra és nem bemutatott adatok).



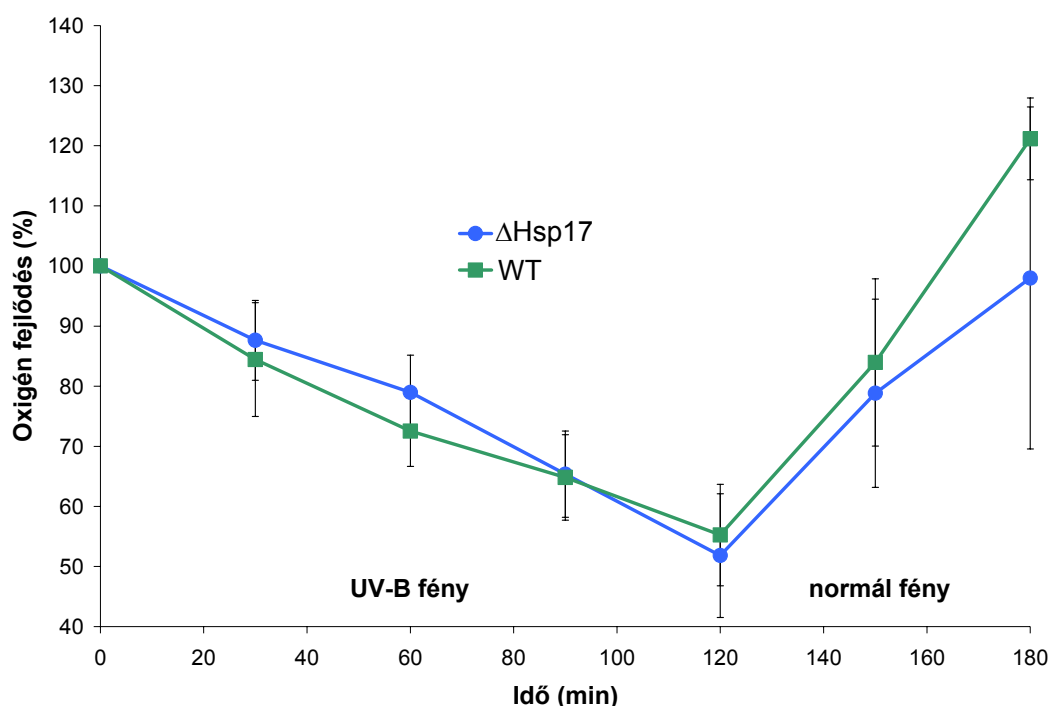
45. ábra **Q16R Hsp17-lipid kölcsönhatások lipideket immobilizálnak a fehérje szerkezetben ill. sHsp egységeket kapcsolnak dimerekké.** (A) A tisztított fehérje nem tartalmaz SDS-PAGE-val kimutatható szennyeződéseket. (B) A Q16R Hsp17 (TPL) lipid kötésének vizsgálatakor (ld. 38. ábra) egy -a dimer Hsp17 molekulatömegének magasságában futó- fehérje csík jelent meg a lipid kötött fehérje frakciót SDS-PAGE-val elemezve. (C) A kísérletet radioaktívan jelölt TPL-ből készített liposzómákkal megismételve, a lipidek jelenléte kimutatható volt a dimer régióban autoradiográfia segítségével (reprezentatív, n= 2). F: felülúszó, P: pellet

Arra a következtetésre jutottunk, hogy az *extra fehérje csík szükségszerűen a lipid jelenléte miatt kellett előtűnjön*. Feltételezésünk szerint a kölcsönható lipidek olyan erősen „ragasztották” össze a sHsp egységeket, hogy a fehérje minták képesek voltak ellenállni a redukzív feltárási körülményeknek, legalábbis a minta egy kis hányada csak a dimer állapotig esett szét. Azért hogy ezt az elképzelésünket megvizsgáljuk, metabolikusan előállított ¹⁴C-TPL liposzómákkal megismételtük a kísérletet, majd

autoradiográfiával fedték föl a *lipidek* jelenlétét a *dimer régióban*, ill. azt folyadékszintillációs módszerrel is megerősítettük ($189,0 \pm 25,7$ dpm vs. kontroll csík: $63,6 \pm 5,1$ dpm). Detergens kezelt, izolált membrán fehérjék összetételbeli és szerkezeti elemzése során nem példa nélküli, hogy a *fehérjéhez szervesen kapcsolódó lipid molekulákat* is kimutatnak (Lee, 2003; Li és mtsai, 2004). NMR és tömegspektrometriás munkák ilyen esetekben a lipid szolvatációs hatáson túlmenően *specifikus lipid-fehérje kölcsönhatásokról* tanúskodnak. Lee (2003) szerint a fehérjék röntgenkristallográfiás elemzésekor föoldható lipidek túlnyomó többsége mélyedésekbe, meghatározott fehérje kötő helyekre ágyazott lipidekre utal. Egyes esetekben a lipid fejcsoport is jól azonosítható a fehérje szerkezetben, ami a *lipid immobilizációját* jelzi a fehérje szerkezetben. Minthogy a lipid kötött fehérjének csak egy kis hányada volt -láthatólag irreverzibilisen- a dimer állapotában rögzítve, talán ehhez speciális lipidekre (pl. MGlcDG, PG, SQDG) van szükség (Schlame és mtsai, 1990; Horváth és mtsai, 1995; Loll és mtsai, 2005). Annak megválaszolása, hogy a lipidek vajon a monomerek között létesítenek erős ill. extra kapcsolatot, avagy a dimerhez kötődve gátolják, hogy a detergens kifejtsse hatását még további vizsgálatot kíván. Az a tény, hogy a kölcsönható rész hozzáférhetőségéhez szükséges a sHsp oligomer disszociációja ill. az, hogy nem találtunk dimernél nagyobb lipidek által összeragasztott oligomer formát arra utal, hogy valóban a *dimer vagy esetleg a monomer lehet a lipid kölcsönható forma*. Ezt támasztja alá, hogy Chen és mtsai (2003) röntgendiffrakciós vizsgálatai alapján a lipid felszínen kristályosított sHsp dimer formában található meg. Továbbra is kérdéses azonban, hogy *miért tűnik szükségesnek a sHsp specieszek reasszociációs képessége a lipid kötés stabilizációjához* (ld. 35. ábra). Összességében megállapítható, hogy jelentős *párhuzam fedezhető fel a sHsp-k fehérje és lipid kölcsönhatás mechanizmusa között*. Úgy fest, hogy a sHsp-k valóban *amfitróp fehérjék*, amelyek képesek lehetnek fehérjékkel és lipidekkel kölcsönhatásba lépni és megóvni azokat különféle stresszhatásoktól (Török és mtsai, 2001).

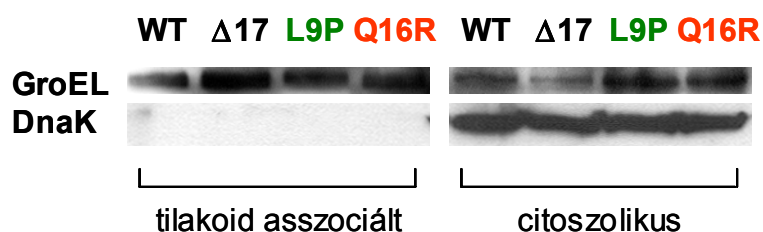
2.2.2. A Q16R N-terminális Hsp17 mutáció extra stabilizációt kölcsönöz a fotoszintetikus funkciónak

Az N-terminális mutánsokról nyert információk fényében azt a kérdést tettük fel, hogy vajon ezen mutáns fehérjék megváltozott membrán (lipid) aktivitása milyen formában mutatkozik meg a fotoszintetikus funkció védelmében. Ismeretes, hogy a sHsp-k ill. a Hsp17 mérséklék a tilakoid funkció hő és (főként) fény okozta károsodásait (Nakamoto és mtsai, 2000; Asadulghani és mtsai, 2003; ld. továbbá Irodalmi áttekintés 3.3. fejezet). Minthogy a *sHsp-k fotoinhibíció elleni szerepe kiemeltnek tűnik* az eddigi tanulmányok alapján, az *UV stressznek* kitett kérdéses sejtvonalak fotoszintetikus aktivitását kívántuk tesztelni (Schuster és mtsai, 1988). Bár Lee és mtsai (1998 és 2000) úgy találták, hogy a Hsp17 hiánya a cianobaktériumban annak meglehetősen gyorsan kimérhető hőérzékenységéhez vezet, mi nem tudunk hasonló megerősítést adni erre az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között.



46. ábra A fotoszintetikus (PSII) funkció UV stressz okozta károsodása és fölépülése fényben hőaklimatizált sejtekben (n= 4, ±SD) (ld. Anyagok és módszerek 1.2.1. fejezet). A 30 °C-on növesztett *Synechocystis* sejteket a kísérletet megelőzően fényben 42 °C-on tartottuk 3 órán keresztül. Az oxigén fejlődés (átlagolt) abszolút értékei (t= 0 min): ΔHsp17 (89,2 %), WT (100,0 %).

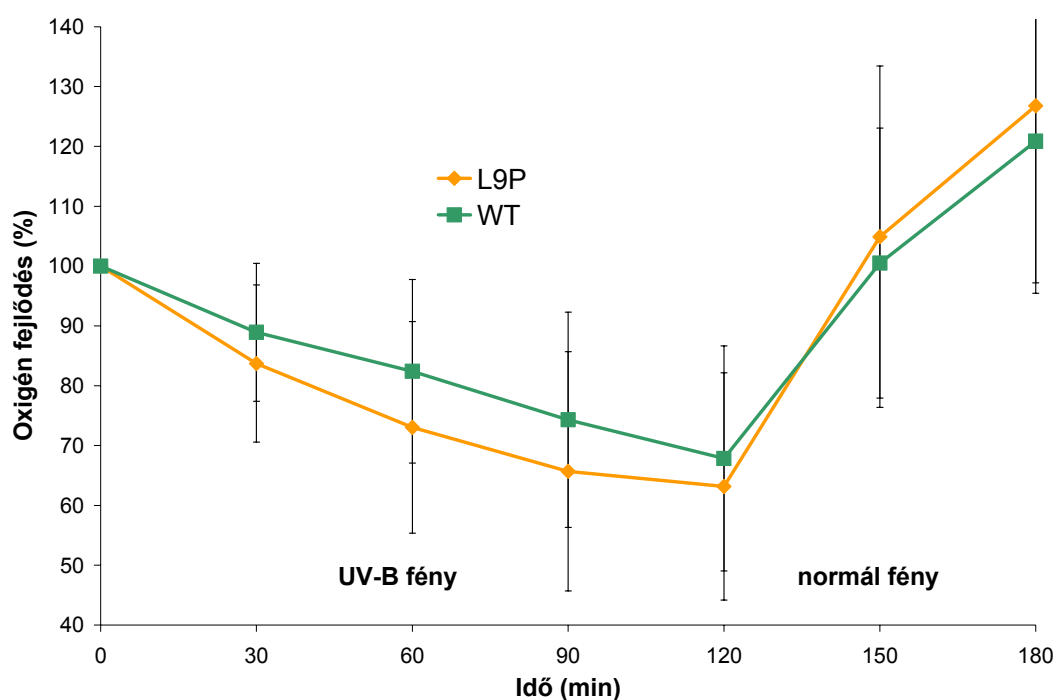
A normál fényben 3 órán át, 42 °C-on hőedzett vad típusú (+WT Hsp17 revertáns) ill. Δ Hsp17 sejtek UV stressz toleranciájában nem találtunk különbséget (46. ábra). A *hsp17* hőre és különösképpen fotoinhibíciós hatásra indukálódik, mégis a jelen teszt körülmények között úgy tűnik, hogy hiánya nem jár hátránnyal a cianobaktérium számára (Horváth és mtsai, 1998; Huang és mtsai, 2002; Fang és mtsai, 2004, nem bemutatott adat). Erre lehetséges magyarázatként az szolgálhat, hogy *más akklimatizációs tényezők* (pl. egyéb *Hsp-k*) teljes mértékben elégséges védelmet nyújtanak ahhoz, hogy a sejt megfelelően válaszoljon az azt ért kihívásokra, azaz mindehhez a Hsp17 nem föltétlenül szükséges, hiánya nem eredményez szignifikáns változást. Valójában több munka is bizonyította, hogy akár a *GroEL* (Cpn60), akár a *DnaK* képes a tilakoid membrán (funkció) védelmére (Kovács és mtsai, 1994a; Török és mtsai, 1997; Asadulghani és mtsai, 2003; Varvasovski és mtsai, 2003). Bár a jelen teszt körülmények között a Hsp17 hiánya nem jelentett hátrányt a fotoszintetikus funkció működése szempontjából, a Δ Hsp17 sejtben szükség volt a Hsp17 hiányának kompenzálására nagyobb mennyiségű alternatív védelmi eszköz, nevezetesen GroEL formájában (ld. 47. ábra).



47. ábra A **GroEL és a DnaK megoszlása a citoszolikus és tilakoid membrán frakciók között a fényben végzett hőakklimatizációt követően.** A 30 °C-on növesztett *Synechocystis* sejteket fényben 3 óráig tartó 42 °C-os hőstressznek tettük ki, majd tilakoid membrán és citoszolikus (felülűszó) frakciókat izoláltunk, amelyeket anti-GroEL és anti-DnaK ellenanyagokkal vizsgáltunk (ld. még anti-Hsp17 immunoblotting, 37. ábra). „WT”: +WT Hsp17 revertáns, Δ 17: Δ Hsp17, L9P ill. Q16R: L9P ill. Q16R Hsp17-t expresszáló *Synechocystis* sejtek

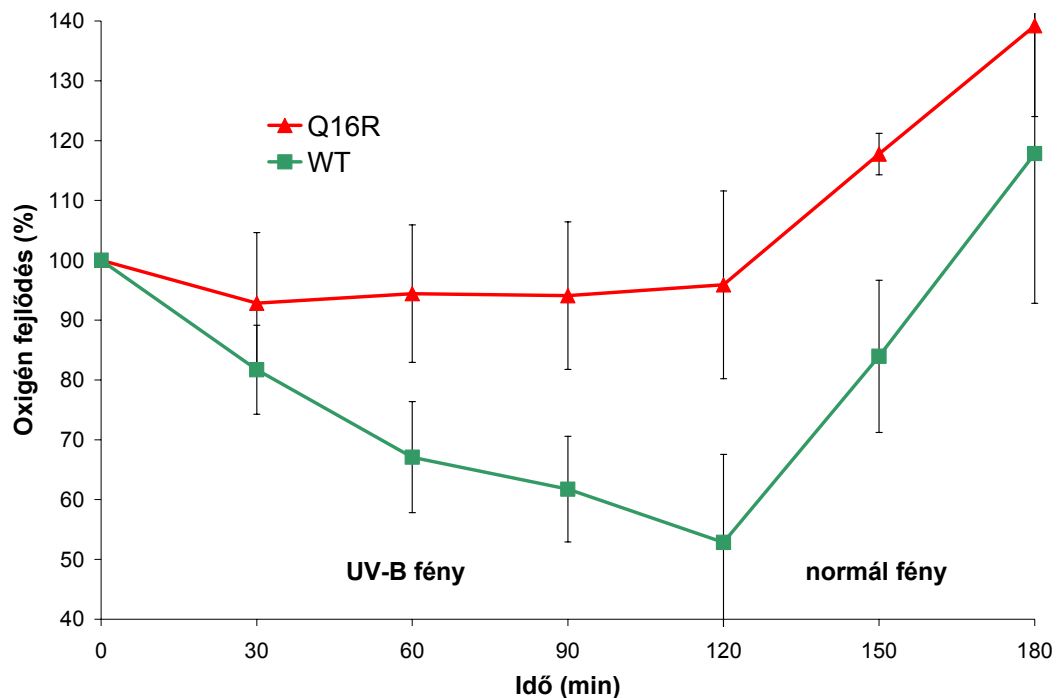
Az *L9P* mutáns sejt vonalat vizsgálva az nem tért el szignifikáns mértékben a WT fehérjét expresszáló sejtektől UV stressz toleranciájuk tekintetében (48. ábra). A *Q16R* mutáns ellenben jelentősen növelte a cianobaktérium UV stressz ellenálló képességét (49. ábra). Mi több, egyedülálló módon olyannyira megnövelte a tilakoid

funkció stabilitását, hogy annak aktivitása állandónak mutatkozott a fényben végzett hőaklimatizációt követő UV stressz során.



48. ábra **A fotoszintetikus (PSII) funkció UV stressz okozta károsodása és fölépülése fényben hőaklimatizált sejtekben** (n= 4, \pm SD). A 30 °C-on növesztett *Synechocystis* sejteket a kísérletet megelőzően fényben 42 °C-on tartottuk 3 órán keresztül. Az oxigén fejlődés (átlagolt) abszolút értékei (t= 0 min): L9P (88,0 %), WT (100,0 %). L9P: L9P Hsp17-t expresszáló *Synechocystis* sejtek

Bár a korábbi eredmények alapján úgy tűnik, hogy a WT Hsp17 szerepköre kiváltható ill. nem föltétlenül szükséges, hogy a sejt az aktuális teszt körülményeknek kellőképpen ellenálljon, ettől függetlenül mégsem zárható ki annak a lehetősége, hogy *egy extra tényező többlet stabilitást kölcsönöz a fotoszintetikus funkciónak*, olyat, amellyel az addigi védelmi apparátus nem rendelkezett. Ezúttal a *Q16R* fehérje jelenti ezt az extra tényezőt, amely -a 2.2.1. fejezettel összhangban- *in vivo körülmények között is fölülmúlja a WT megfelelőjét*. Ahogyan azt a 47. ábra mutatja a tilakoid asszociált GroEL mennyisége a pontmutánsokat expresszáló sejtekben nem különbözik számottevően a WT sejtben detektálható fehérje szinttől. Ez arra utal, hogy *a Q16R mutáns megnövekedett stabilitása nem származhat nagyobb mennyiségű GroEL közreműködéséből*. A citoszolikus GroEL mennyisége kis mértékben mindkét pontmutánsban nagyobb a kontrollhoz viszonyítva, ami talán az *in vivo* chaperon funkció segítésére ill. hiányosságainak kompenzálására hivatott. Érdekes módon



49. ábra **A fotoszintetikus (PSII) funkció UV stressz okozta károsodása és fölépülése fényben hőaklimatizált sejtekben** (n= 3, \pm SD). A 30 °C-on növesztett *Synechocystis* sejteket a kísérletet megelőzően fényben 42 °C-on tartottuk 3 órán keresztül. Q16R: Q16R Hsp17-t expresszáló *Synechocystis* sejtek Az oxigén fejlődés (átlagolt) abszolút értékei (t= 0 min): Q16R (100,0 %), WT (99,8 %).

egyetlen sejt típusban sem találtunk tilakoid asszociált DnaK-t, és a chaperon citoszolikus mennyisége sem különbözött a négy sejtben (47. ábra). Minden jel arra utal, hogy a *Q16R* fehérje a tilakoid funkció működésének előnyére válik, *rendkívüli membrán aktivitása folytán* azonban *teljes mértékben hiányzik a citoszolból*, így ott fehérjevédelmi funkcióit nem képes ellátni, amely talán a sejt termotoleranciájának drasztikus csökkenéséhez vezet (ld. 5. tábl.). Az *L9P sHsp* vélhetően -bizonyos körülmények között- a membrán védelmében mutat elégtelen működőképességet, amely szintén csökkenti a cianobaktérium túlélési esélyeit. Ez a példa a Hsp17 kettős tulajdonságának és a fehérje két alapvető funkciója között fennálló egyensúly megtartásának fontosságára hívja föl a figyelmet.

A 2.2. fejezet összegzéseként elmondhatjuk, hogy az *in vitro* fehérje-lipid kölcsönhatásban tapasztalt változások összhangban vannak a Hsp17 *in vivo* membrán asszociációjával és a sHsp fotoszintetikus membránra gyakorolt hatásával. Ezek alapján *valószínűsíthető, hogy a Hsp17 in vivo membrán aktivitását legalább részben a sHsp-lipid kölcsönhatás irányítja.*

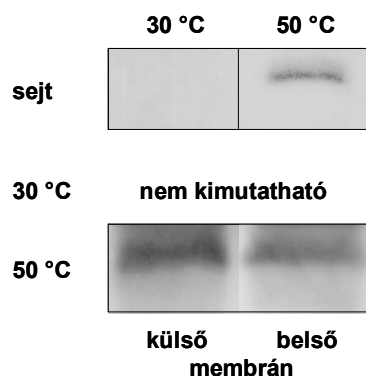
3. *Escherichia coli*

Az *E. coli* két sHsp-je az IbpA és IbpB, melyek extrém magas hőmérsékleten gátolják a protein denaturációt *in vivo*. Szignifikáns mértékű fehérjevédelmet azonban csak huzamosabb idejű hőstressznek kitett sejtekben mutattak (Kuczynska-Wisnik és mtsai, 2002). Egy másik tanulmány ugyanakkor rámutatott, hogy exogén IbpA/B fehérjéket expresszáló sejt vonalak már jóval rövidebb ideig tartó (hő- és oxidatív) stresszhatás során is lényegesen nagyobb ellenállóképességet tanúsítanak a vad típusú megfelelőhöz képest (Kitagawa és mtsai, 2000). Mindez azt sugallja, hogy a sHsp-k a fehérjevédelmen kívül más védelmi funkciót is elláthatnak stressz körülmények között. Ez a fölismerés és az a tény, hogy az IbpA/B membránokhoz asszociált (Miyake és mtsai, 1993; Laskowska és mtsai, 1996; Kuczynska-Wisnik és mtsai, 2002), továbbá, hogy az *E. coli* hő sokkválasz beindítása, sőt a termorezisztencia kialakulása pusztán a membrán lipid fázis szelektív módosításával elérhető (Shigapova és mtsai, 2005) vezetett a kérdésfölvetéshez, hogy vajon az IbpA/B szerepet játszanak-e az *E. coli* membrán(ok) védelmében (ld. Irodalmi áttekintés 1.4.2. és 3.3. fejezetek).

3.1. Az IbpA és/vagy IbpB hiánya membrán fenotípus változást eredményez

Az IbpA/B membrán védelemben betöltött szerepének földerítéséhez vad típusú és Δ IbpAB sejteket teszteltünk membrán fenotípusukban föllelhető különbség után kutatva. Az 50. ábra tanúsága szerint normál körülmények között (30 °C) *sem a sejt lízáatumban, sem a sejtek membránjaiban nem detektálható IbpA/B fehérje*. A shsp-k magashőmérsékletű (kb. 46-48 °C) inkukálhatóságával összhangban csupán az 50 °C-on hő sokkolt sejtekben tudtuk a sHsp fehérjetermékek jelenlétét kimutatni (Kuczynska-Wisnik és mtsai, 2002 és nem bemutatott adat). Ezzel egyidejűleg a meglehetősen magas hőmérsékletnek (50 °C) *kitett sejtek membránjaiban, főként a külső membránban megjelent az IbpA/B fehérje*. Egy lehetséges transzlokációs mechanizmusként szolgálhat a Yatvin és Cramp (1993) által javasolt elképzelés, miszerint a membránok között létrejövő összefűződések, adhézión pontok lehetőséget

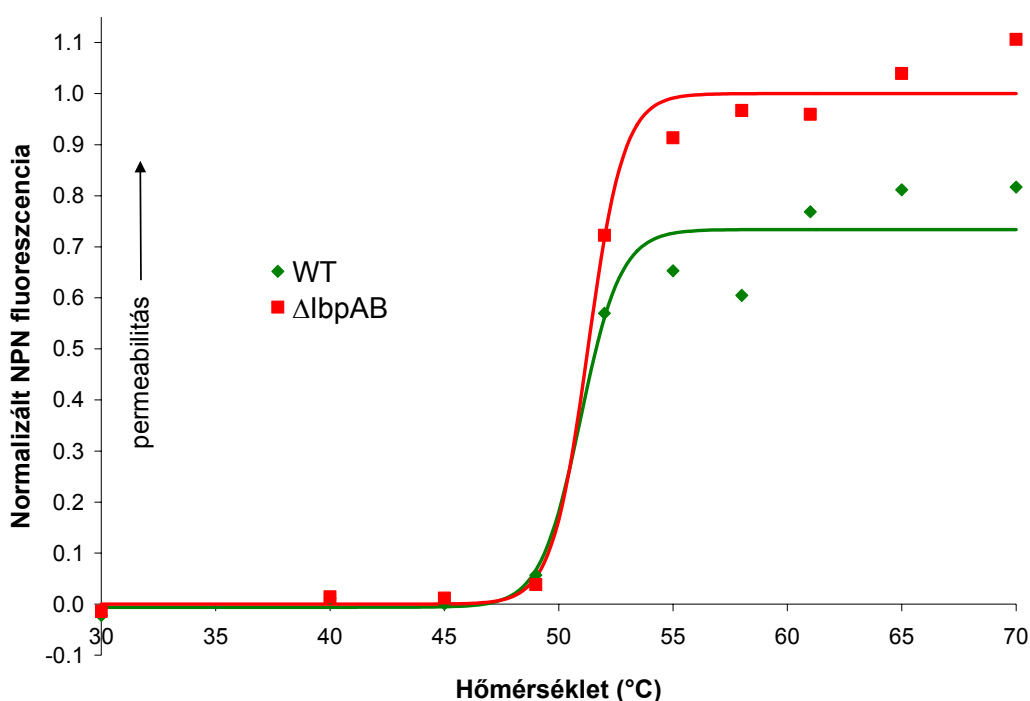
nyújtanak a membrán szignál szekvencia nélküli fehérjék külső membránba történő transzportjára (Smit és Nikaido, 1978; Fishov és Woldringh, 1999). A megfelelő Δ IbpAB sejtől származó minták egyikében sem mutattunk ki sHsp jelenlétet (nem bemutatott adat).



50. ábra Az IbpAB fehérjék jelenléte a kontroll és hőszokkolt *E. coli* sejtekben ill. azok izolált membránjaiban. A normál körülmények között növesztett (30 °C) vagy 15 percig hőszokkolt (50 °C) sejtek ill. az azokból izolált membránok fehérjetartalmát anti-IbpAB ellenanyaggal vizsgáltuk (reprezentatív, n= 3).

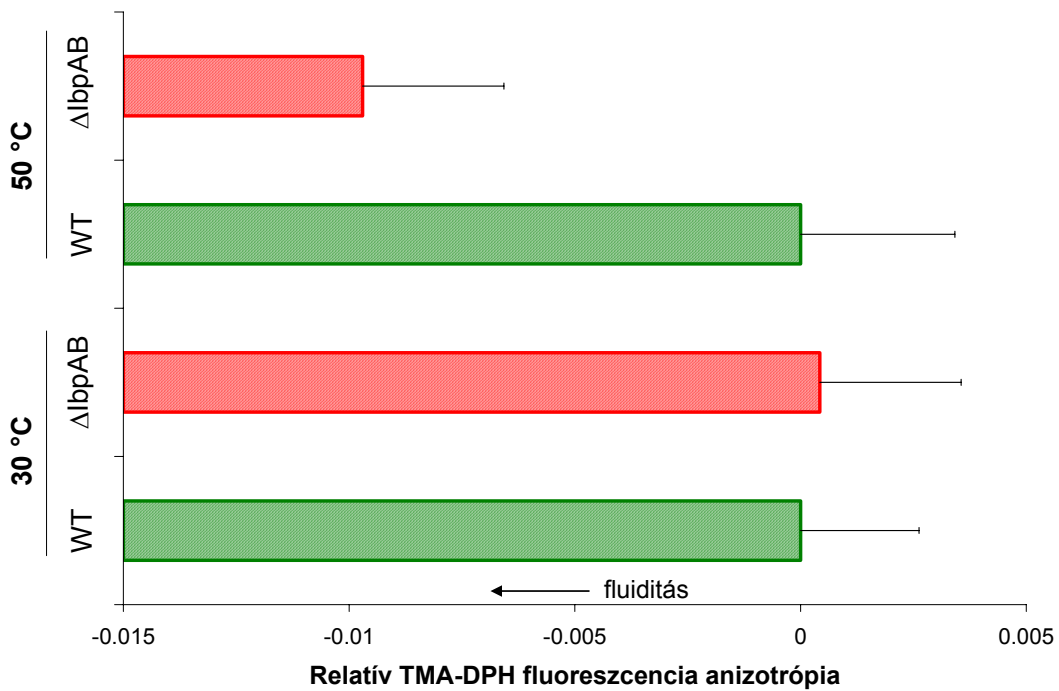
Míthogy az IbpA/B extrém magas hőmérsékleti stressz során a sejt integritását őrző külső és belső membránokhoz asszociál, feltételezhetően valamilyen, annak védelmét célzó funkcióval bír ilyen körülmények között. Feltevésünket megvizsgálandó, a vad típusú és a Δ IbpAB sejtek membránjainak fizikai jellemzőit követtük különböző hőmérsékleteken. Az NPN fluoreszcencia az élő sejt membránjainak „áteresztőképességéről”, azaz permeabilitásáról nyújt információt. Minél inkább károsodnak a sejtet határoló membránok, a próba annál inkább behatol azokba és ezzel arányos jelet ad. A fluoreszcens molekula valószínűleg elsősorban a külső membrán állapotának változását követi, így még a maximális fluoreszcencia érték sem föltétlenül jelzi a sejt halálát vagy a sejt integritásának teljes mértékű, irreverzibilis megszűnését (Tsuchido és mtsai, 1989; Ganzle és Vogel, 2001). A vad típusú és Δ IbpAB sejtek membránjainak állapota -legalábbis ebben a tekintetben- azonosnak tűnik egészen kb. 48 °C-ig, ahol a membránok láthatólag veszíteni kezdenek integritásukból (51. ábra). A vad típusú és *IbpAB* sejt membránjai egyszerre kezdenek károsodni, ám az utóbbiak nagyobb mértékben sérülnek, amire a nagyobb max. fluoreszcencia értékek utalnak. Valójában „csak” annyit állíthatunk, hogy az IbpAB hiányában egy olyan membrán jön létre, amely magasabb hőmérsékleten permeabilisabb a vad típusú megfelelőhöz képest. Az, hogy az *E. coli*

sHsp-k éppen abban a hőmérséklet tartományban jelennek meg, amikor a membránok (is) károsodnak, és membrán asszociációjukkal párhuzamosan a sejt integritása is kevésbé sérül, azt jelzi, hogy az IbpA/B valóban védheti a membránokat a magas hőmérséklet okozta sérülésektől. Figyelemre méltó az a tény, hogy amíg az *IbpA/B* szignifikáns mértékű fehérjevédelmet csak huzamosabb idejű (4 h!) hőstressznek kitett sejtekben mutatott (Kuczynska-Wisnik és mtsai, 2002), *membrán jelenlétük már 15 perc hő sokkot követően egyértelmű előnyökkel járt a sejt számára* (ld. 51. ábra). Kétségtelen, hogy az IbpAB hiányával együtt járó „lépeshátrány” adott esetben kedvezőtlenül befolyásolhatja a sejt túlélési esélyeit.

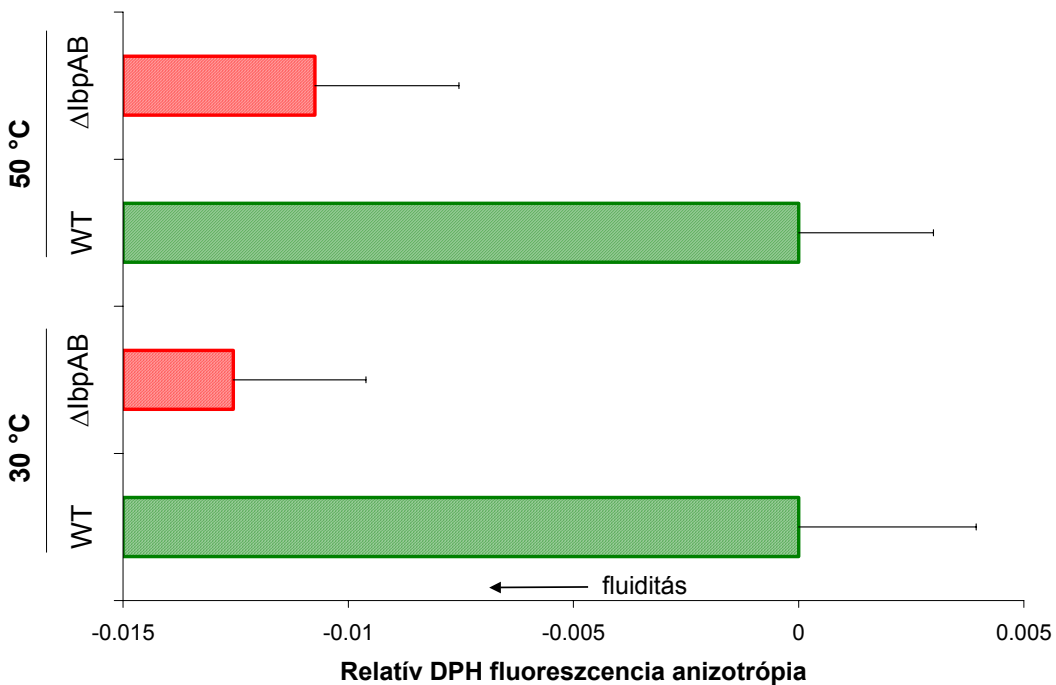


51. ábra **Az IbpAB fehérjék szerepe az *E. coli* membránok integritásának megőrzésében.** A külső membrán permeabilitásának nyomon követése különböző hőmérsékleteken 15 percig inkubált vad típusú és Δ IbpAB sejtekben (reprezentatív mérési eredmény, n= 5).

A membránok fizikai állapotának jellemzésére vizsgáltuk azok fluiditását is. *A membránok perifériális régiójában* elhelyezkedő TMA-DPH próba nem jelzett különbséget a 30 °C-on növekedett sejtek fluiditás értékeiben, de *a hő sokkolt vad típusú sejtek membránjai lényegesen rigidebbnek* mutatkoztak a Δ IbpAB megfelelőkhöz képest (52. ábra). Ez összhangban van a sHsp-k lokalizációjának ill. a membránok permeabilitás tulajdonságának változásával. Érdekes módon a



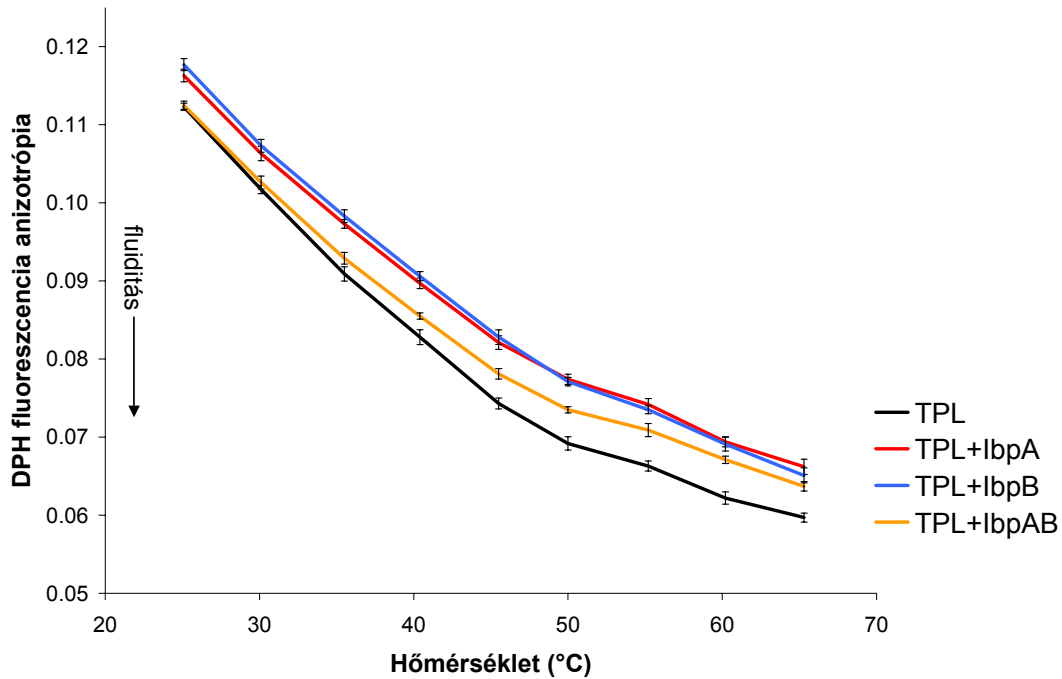
52. ábra Az *E. coli* sejt membrán fluiditása normál és hőstressz körülmények között a membrán lipidek fejcsoport régiójában (n= 6, ±SD). A vad típusú és ΔlbpAB sejtek membránjainak TMA-DPH fluoreszcencia anizotrópia jellemzői 30 °C-on ill. 15 perc 50 °C-os hő sokkot követően.



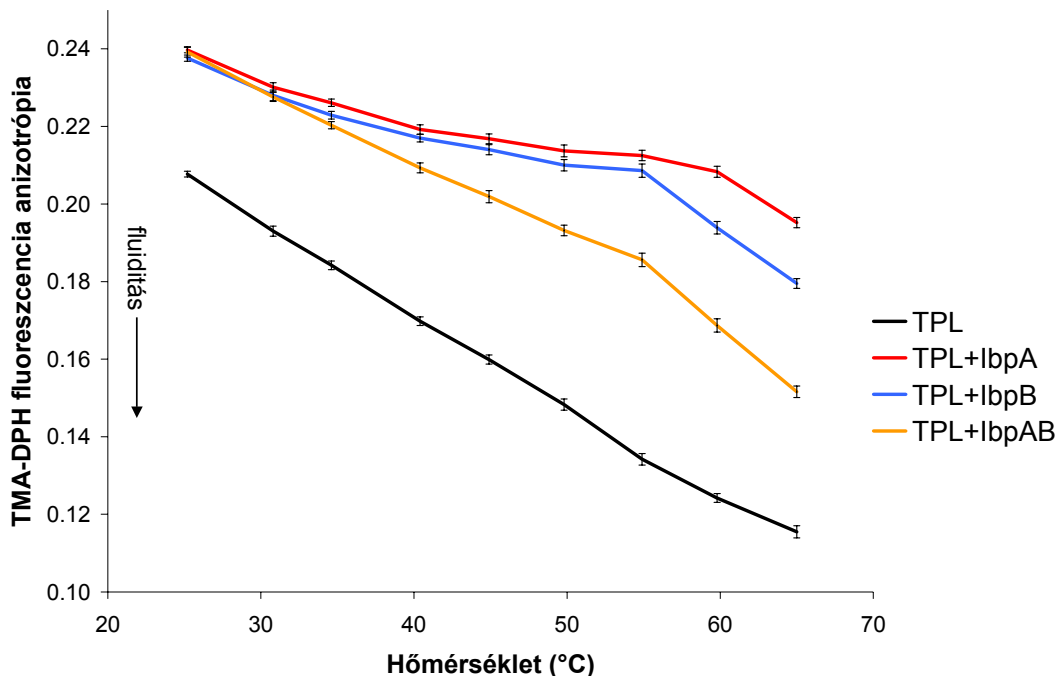
53. ábra Az *E. coli* sejt membrán fluiditása normál és hőstressz körülmények között a membrán lipidek zsírsav (hidrofób) régiójában (n= 6, ±SD). A vad típusú és ΔlbpAB sejtek membránjainak DPH fluoreszcencia anizotrópia jellemzői 30 °C-on ill. 15 perc 50 °C-os hő sokkot követően.

membránok hidrofób, zsírsav régiójában elhelyezkedő DPH próba szerint nem csak 50 °C-on, hanem már normál körülmények között is fluidabbak a Δ IbpAB sejtek membránjai a vad típusú megfelelőkhöz viszonyítva (53. ábra).

A fluiditás mérésekből nyert eredmények összefüggésbe hozhatók a permeabilitás mérések során kapott adatokkal. Ugyanis *a membránok lipid fejcsoport közeli* -elsősorban fehérje asszociációnak köszönhető- *rigidizációja* és a hidrofób régió -főként zsírsavváltozásokból származó- fluidizációja *csökkent(het)i azok permeabilitását* (Da Silveira és mtsai, 2003; Wang és Zhang, 2005). Természetesen egy olyan élőlénynek, amely membrán lipidjeinek meg kell felelniük a változó külső hőmérsékletnek, a zsírsavszabályzás ilyen célú alkalmazása akár veszélyeket is hordozhat, hiszen növeli a hiperfluidizáció esélyét. Ettől függetlenül egy lehetséges, a megfelelő időben a membrán perifériális régióját rigidizálni képes fehérje komponens elvétele (IbpAB?) járhat a membrán permeabilitásának növekedtével, és erre lehetséges válaszreakcióként ill. kompenzációként szolgálhat a hidrofób régió fluidizálása, amely enyhítheti az előállt hiányosságot. Minthogy azonban a membrán fluiditását több tényező is módosíthatja, azt vizsgáltuk, hogy az IbpA/B hiánya és az annak következményeként előálló lipid zsírsavváltozások mennyiben állhatnak a tapasztalt fenotípus változások mögött. Mivel a sHsp-k elsősorban a külső membránhoz kötődnek, és az NPN mérések is főleg erről a membránról árulkodnak, a külső membránból izolált foszfolipidek alkotta liposzómák és a tisztított IbpA/B fehérjék kölcsönhatását vizsgáltuk az élő sejtek membrán fluiditásának jellemzésére is alkalmazott TMA-DPH és DPH fluoreszcens próbákkal. *Bár a fehérjék a lipid membránok hidrofób régiójának rigiditását is szignifikáns mértékben növelték, hatásuk sokkal szembeötlőbb volt a vezikulák lipid fejcsoport környezetéből tudósító TMA-DPH jelölőt alkalmazva* (54. és 55. ábra). Ezek alapján *az IbpA/B valószínűleg perifériálisan kötődik a membrán (lipid) felszínéhez* és hatékonyan képes rigidizálni azt a régiót, ezáltal csökkenteni a membrán permeabilitását. Mint láttuk, az *E. coli* sHsp-k hatása a membrán hidrofób régiójában is érvényesül (54. ábra), az IbpA/B hiányában vagy rendkívül kis mennyiségek jelenlétében (30 °C-on) is meglévő fluiditás különbség a két sejtípus membránjai között (53. ábra) azonban azt sejteti, hogy emögött valamilyen más tényezők, pl. zsírsavváltozások (is) állnak. Ezért a 30 °C-on növesztett ill. 50 °C-on, 15 percen keresztül hősokkolt sejtekből extrahált lipidek zsírsavösszetételét vizsgáltuk. Meglepő módon *az E. coli az ibpAB ill. IbpA/B elvételére normál és hősokk körülmények között egyaránt a 18:1v (vakcénsav)*



54. ábra Az IbpA, IbpB ill. IbpAB fehérjék hatása a TPL membránok zsírsav (hidrofób) régiójának fluiditására. LUV liposzóma rendszerek fluiditása a hőmérséklet függvényében (reprezentatív mérési eredmény, $n=4$, az adott mérésre $\pm SD$). A liposzómákat 30 °C-on növesztett sejtek külső membránjaiból izolált lipidekből készítettük. A sHsps:lipid arány (m/m) 2:3 volt.



55. ábra Az IbpA, IbpB ill. IbpAB fehérjék hatása a TPL membránok lipid fejcsoport régiójának fluiditására. LUV liposzóma rendszerek fluiditása a hőmérséklet függvényében (reprezentatív mérési eredmény, $n=2$, az adott mérésre $\pm SD$). A liposzómákat 30 °C-on növesztett sejtek külső membránjaiból izolált lipidekből készítettük. A sHsps:lipid arány (m/m) 2:3 volt.

	WT	Δ IbpAB	Δ IbpAB +IbpA	Δ IbpAB +IbpB	Δ IbpAB +IbpAB	
14:0	3.0 \pm 0.4	2.2 \pm 0.2	2.3 \pm 0.2	3.1 \pm 0.5	2.4 \pm 0.3	30 °C
15:0	0.9 \pm 0.2	0.6 \pm 0.3	0.7 \pm 0.3	0.8 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2	
16:0	28.0 \pm2.4	26.0 \pm1.6	27.2 \pm1.5	29.0 \pm1.5	25.6 \pm0.3	
16:1	31.3 \pm1.3	31.2 \pm0.3	32.4 \pm1.1	33.5 \pm1.5	30.0 \pm0.7	
c17:0	2.5 \pm 0.5	2.0 \pm 0.2	2.1 \pm 0.1	2.3 \pm 0.3	1.7 \pm 0.2	
18:0	1.7 \pm 1.2	1.3 \pm 0.2	1.7 \pm 0.6	1.2 \pm 0.2	1.6 \pm 0.4	
18:1	0.5 \pm 0.3	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	
18:1v	31.7 \pm1.5	36.3 \pm1.4	32.2 \pm1.4	28.7 \pm1.7	37.2 \pm1.3	
c19:0	0.8 \pm 0.4	0.3 \pm 0.2	1.2 \pm 0.4	1.1 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1	
14:0	6.3 \pm 0.4	4.0 \pm 0.2	2.9 \pm 0.2	4.1 \pm 0.2	2.6 \pm 0.1	50 °C
15:0	0.7 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0	0.6 \pm 0.1	
16:0	32.4 \pm0.6	31.3 \pm1.2	33.2 \pm0.4	35.5 \pm0.3	32.5 \pm0.4	
16:1	31.8 \pm1.3	28.1 \pm1.1	27.0 \pm0.9	28.9 \pm0.4	25.9 \pm0.3	
c17:0	1.8 \pm 0.2	2.0 \pm 1.4	1.8 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1	
18:0	1.0 \pm 0.2	1.3 \pm 0.3	1.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	
18:1	0.4 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2	0.2 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	
18:1v	24.6 \pm1.0	31.4 \pm0.8	32.1 \pm1.0	27.3 \pm0.6	34.7 \pm0.7	
c19:0	0.9 \pm 0.1	0.8 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.0	0.9 \pm 0.0	

A

B

6. táblázat **Kontroll és hősokkolt *E. coli* sejtek membrán lipidjeinek zsírsavösszetétele (m/m %) (n= 6, \pm SD).** A lipideket normál körülmények között (30 °C) növekedett vagy azt követően 50 °C-on 15 percig hősokkolt sejtekből izoláltuk. **(A)** A vad típusú és Δ IbpAB sejtek membránjainak zsírsavösszetétele. **(B)** A Δ IbpAB konstrukcióban exogén IbpA-t, IbpB-t ill. IbpAB-t termelő sejtek membránjainak zsírsavösszetétele (ld. 56. ábra). **18:1v: vakcénssav**

szintjének megnövelésével válaszol, ami magyarázatot szolgáltat arra, hogy miért is lehet fluidabb a Δ IbpAB sejtek membránja a hidrofób régióban, ám fölöttébb érdekes kérdés, hogy miért reagál ilyen módon a sejt az IbpAB fehérjék elvételére (6/A tábl.). A lipidosztályok aránya nem különbözik a kétféle sejtben, és a különböző lipidosztályokban minőségileg és mértékében a TPL eredményekhez hasonló eltérések mutatkoznak az egyes kontroll és Δ IbpAB párok zsírsavösszetétele tekintetében is (nem bemutatott adatok). A sejtek membránjainak hidrofób régióját (is) rigidizálni képes sHsp komponensek elvétele eredményezheti a membrán megnövekedett fluiditását, erre azonban -egyszerű gondolatmenettel- az lenne hathatós ellenlépés, ha pl. a zsírsavak telítődése folytán ellensúlyozódna mindez. Mégsem ez, hanem inkább egy alacsony hőmérséklet eredményezte stresszválaszhoz hasonlatos 18:1v fölszaporodás megy végbe, ami azonban nem igazán a 16:0 rovására zajlik, tehát akár a hideg, akár a magashőmérsékleti stressz hatásától különböző *egyedi lipidváltozás*. A hőaklimatizációs lépés mindkét sejttypusban egy -az irodalmi

adatokkal is egybevágó- 18:1v → 16:0 irányú változást eredményez. Fölmerül a kérdés, akkor vajon milyen célt szolgálhat egy ilyen egyedi, szokatlan válaszreakció a shsp-k elvételére? Az IbpA/B -mutatott tulajdonságaik alapján- egy olyan védelmi eszköz, amely a megfelelő időben, azaz különösen magashőmérsékleti stressz során képes lehet -a zsírsavláncok nagyobb térkitöltése folytán- a lipid fejcsoportok (PE) közötti tér kiékelésére, ezáltal megóvni a membránt a „kilyukadástól”. Ennek egy lehetséges megvalósulási formája, hogy a sHsp-k mintegy beborítják a membrán felszínét, és a lipidek fejcsoportjaival kölcsönhatva képesek befolyásolni a membrán szegregációs folyamatokat ill. az abból történő lipid vezikula lefűződéseket. (Katsui és mtsai, 1982; Garab és mtsai, 2000). Ha az *IbpA/B*-t a membrán impermeabilitását őrző eszköznek fogjuk föl, akkor a hiányukban előálló nagyobb membrán permeabilitás kompenzálására életbe lépő zsírsav telítetlenítés jól értelmezhető, hiszen az ellensúlyozni képes a primer kedvezőtlen változást (ld. 99. old.). Egy másik elképzelés szerint a hosszabb szénláncú 18:1v gyarapodása más, a membránt védeni képes fehérjék membránba hatolását segíti elő. Yatvin (1987) elgondolása alapján ugyanis hosszabb szénláncú zsírsavak beépülése a membrán lipidekbe jelentősen fokozni képes hőssokk során a külső membránba „zuhanó” szignál szekvencia nélküli, integrális fehérjék mennyiségét ill. megváltoztathatja azok minőségi profilját. Ez ugyan növelheti a membrán integritását, ám nem oldja meg egy speciális, a perifériális régióban ható védelmi eszköz hiányát, amely érezhetően megmutatkozik a membrán permeabilitás jellemzőiben (51. ábra).

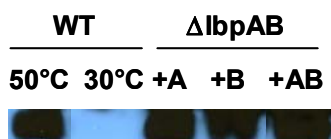
Érdekes módon az *IbpA/B* (ill. az *ibpAB* gén hiánya) jónéhány más gén expresszióját is megváltoztatja (nem bemutatott DNS „chip” eredmény), vagyis *a sejt valamilyen módon érzékeli a sHsp-k (ill. shsp-k hiányát)*, és helyettesítésükre már normál körülmények között változtatásokat eszközöl. Ezt támasztja alá a már ismertett membrán fenotípus változások mellett az a tény is, hogy a $\Delta IbpAB$ *E. coli* hőssokkválasza néhány °C-kal alacsonyabb hőmérsékleten indul (nem bemutatott adat). Nem a $\Delta IbpAB$ sejt az egyetlen, amelyben a primer beavatkozás rejtélyes mechanizmus szerint a membránok zsírsavösszetételének megváltozását eredményezi. A σ^{32} transzkripciós faktor *E. coli*-ban a hőssokkgének szabályzásában vesz részt kizárólag stressz körülmények során (Kuczynska-Wisnik és mtsai, 2001). A $\Delta\sigma^{32}$ sejt a $\Delta IbpAB$ *E. coli*-hoz hasonló, ám még jelentősebb zsírsavmódosításokat visz véghez, holott hasonlóképp -jelenlegi tudásunk alapján- erre sem szolgálhatunk magyarázattal (Shigapova, 2004). Érdekes módon a normál körülmények között nem létfontosságú

groEL1 gén eltávolítása ugyancsak a zsírsavösszetétel megváltozását eredményezi *Mycobacterium smegmatis*-ban. A GroEL1 chaperon közvetlen fizikai kapcsolatban áll egy zsírsav szintáz fő komponensével, a KasA-val (Ojha és mtsai, 2005). Minthogy az IbpA/B nem található meg kimutatható mennyiségben a nem hősokkolt sejtek membránjaiban, és a sHsp-k membrán asszociációja főként a lipid kettősréteg felszínére korlátozódik, nem valószínű, hogy a tapasztalt IbpAB-zsírsavsintézis „párbeszéd” a fehérjék és a zsírsav régió közvetlen, fizikális kapcsolatának eredménye, inkább valamilyen áttételes úton juthat el a jel a zsírsavsintézist szabályozó rendszerhez. Mansilla és mtsai (2004) összefoglalója alapján az említett feladatot egy citoszolikus hőmérő végzi el, és a membrán fluiditásának szabályozása kizárólag a hőmérsékletnek a FabF enzim aktivitására gyakorolt hatása révén megy végbe. Ettől merőben eltérő következtetésre juthatunk Shigapova és mtsai (2005) munkája alapján, miszerint a membrán lipid fázisának szelektív módosításával -a növekedési hőmérsékletet megtartva- nagymértékű, gyakorlatilag a hőkezelés okozta változással azonos nagyságú lipid- és zsírsavösszetételbeli módosulás érhető el. Ez nyilvánvalóan megkérdőjelezi egy citoszolikus hőmérő és egy hőre érzékeny enzim kizárólagos szerepét a lipid és zsírsav metabolizmus szabályzásában, és valószínűsíti egy membrán vagy a membrán fizikai állapotához kapcsolt stresszérzékelő jelenlétét (DiGiuseppe és Silhavy, 2003). Ezt megerősíteni látszik az a tény is, hogy a fentebb említett szelektív membrán módosítás a növekedési hőmérsékleten indukálta a hősokkgének kifejeződését, amely a membrán, mint általános(abb) stresszérzékelő szerepére utal (Shigapova és mtsai, 2005).

3.2. A Δ IbpAB sejtben IbpA/B expresszióval részlegesen helyreállítható a vad típusú membrán fenotípus

Nem kérdéses, hogy az IbpA/B hiánya jelentős változásokat eredményez a sejt életében, csökkenteni látszik annak túlélési esélyeit magashőmérsékleti stressz során. Mivel azonban már normál körülmények között is az ibpAB gének hiánya meglehetősen komplex változásokat eszközöl, így pusztán a vad típusú és Δ IbpAB sejt tanulmányozásával nehezen megállapítható, hogy közvetlenül mennyiben részese az IbpA/B fehérje a tapasztalt fenotípusbeli eltéréseknek (53. ábra, 6/A tábl. és nem bemutatott DNS „chip” adatok). Ezért a Δ IbpAB kontstrukcióban az IbpA-t, IbpB-t,

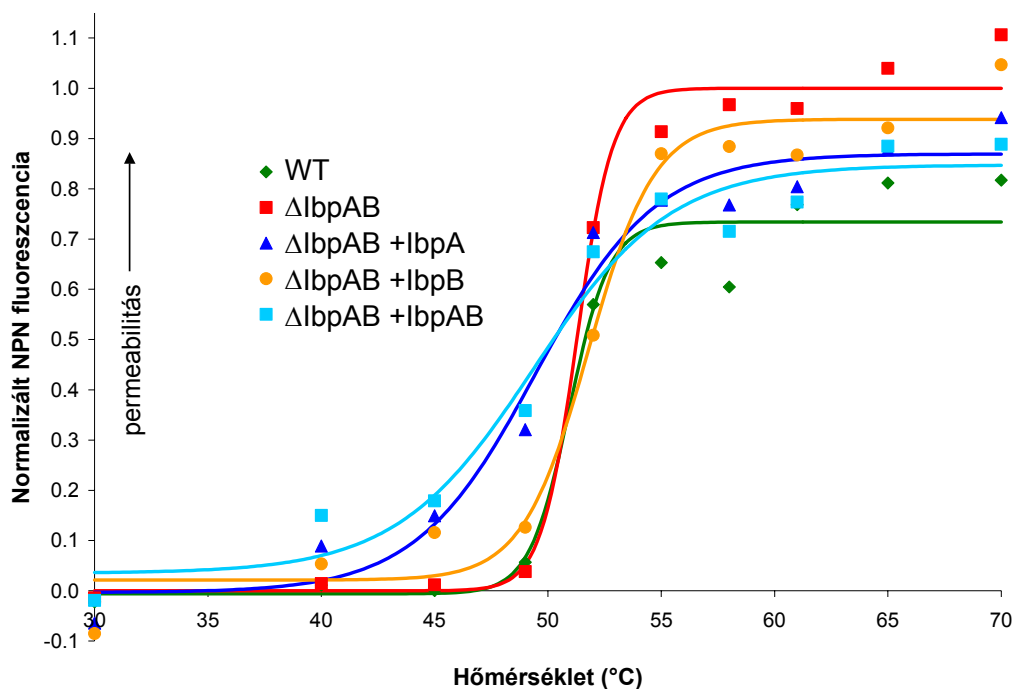
IbpAB-t túltermeltetve vizsgáltuk a sHsp-k közvetlen membránvédő szerepét, valamint a két sHsp esetleges funkcióbeli különbségét vagy együttműködését. Az egyes konstrukciókban túltermelt IbpA/B fehérje mennyiségeket a hősokkolt vad típusú sejt által termelt mennyiséghez viszonyítottuk, és aszerint módosítottuk az indukciós tartományt, hogy hozzávetőlegesen azonos mennyiségű fehérjetermék legyen a különböző sejtekben (56. ábra).



56. ábra **Az IbpAB fehérjék mennyisége különféle *E. coli* sejtekben** (reprezentatív immunoblotting, n= 2). Jelölések: normál körülmények között (30 °C) növekedett vagy azt követően 50 °C-on 15 percig hősokkolt vad típusú (WT) sejtek; a ΔIbpAB konstrukcióban exogén IbpA-t, IbpB-t ill. IbpAB-t (+A, +B ill. +AB) termelő sejtek

A sHsp-ket termelő „revertánsok” permeabilitását vizsgálva arra a megállapításra jutottunk, hogy *az IbpA mintegy 50 %-ban, míg az IbpAB együtt legalább ilyen mértékben állítja helyre ezt a membrán funkciót.* Az IbpB ezeknél lényegesen kisebb mértékben képes segíteni a membránon (57. ábra). A ΔIbpAB sejtben az üres és represszor vektorok, az IPTG, valamint az antibiotikumok együttes jelenléte nem okozott szignifikáns mértékű eltérést a membrán permeabilitás és zsírsavösszetétel jellemzőkben a ΔIbpAB értékekhez viszonyítva (nem bemutatott adatok) (ld. *Anyagok és módszerek* 2.1. fejezet). Teljes helyreállítást tehát egyetlen konstrukcióval sem figyeltünk meg, amely arra utal, hogy más tényezők is szükségesek a membrán integritás teljes visszaállításához, olyanok, amelyek igényel(het)ik nem csak a fehérjetermék, de a teljes integráns gén jelenlétét is. Valójában már a fehérjék jelenléte is -ezidáig- megmagyarázhatatlan módon befolyásolja a zsírsavösszetételt, arról téve tanúbizonyságot, hogy *valószínűleg az ibpA/B gén és fehérjetermékei finom szabályzására van szükség az optimális membrán funkcionalitáshoz* (6/B tábl.). Ezt látszik alátámasztani az a megfigyelés, hogy az IbpA ill. IbpAB termelő sejtekben, melyekben a vad típusú megfelelővel ellentétben már a növekedési hőmérsékleten is jelen van(nak) a sHsp(-k), már 40 °C fölött is módosul a membrán fizikai állapota (57. ábra). Értelmezésünk szerint *a sHsp-k alacsonyabb hőmérsékleten, ahol jelenlétük még nem indokolt a membránban, a lipid fejcsoportok „közé ékelődve” megbonthatják, szegregálhatják az azon a*

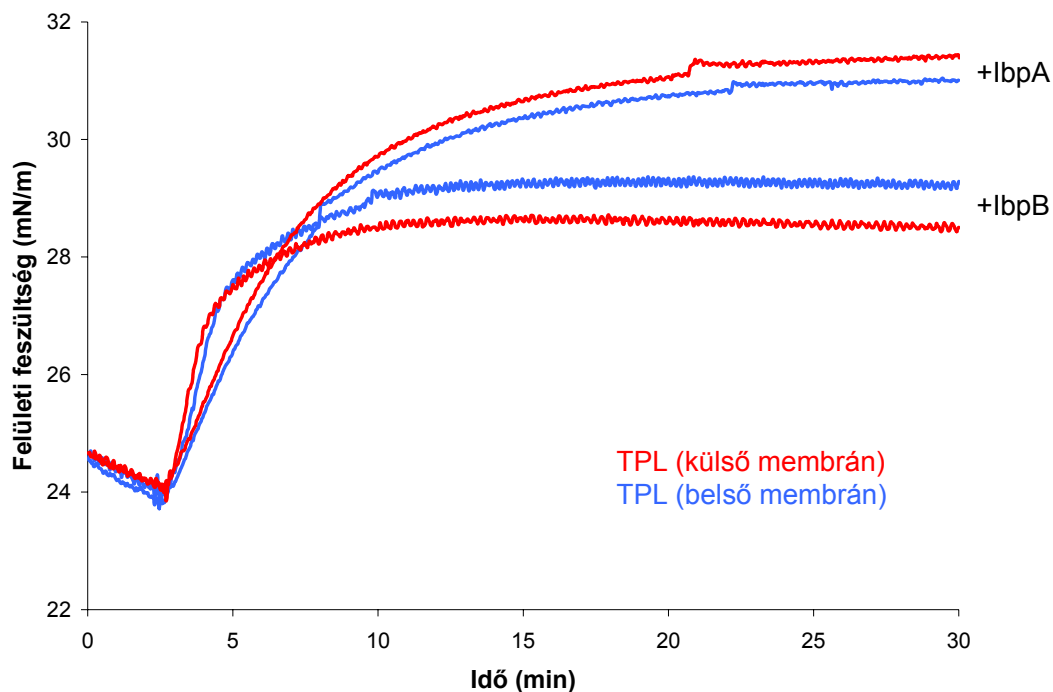
hőmérsékleten (még) ép *membrán szerkezetet*. A fehérje „külső” termelésével tehát érzékenyít(het)jük a membránt alacsonyabb hőmérsékleten, és „rendeltetésszerűen” véd(het)jük azt az extrém magas hőmérséklet okozta károsodások ellen. Az *IbpA/B* tehát olyan *specifikus*, a membrán integritását őrizni képes finom *védelmi eszköz*, amelyet szükségessége esetén -a membránok permeabilitásának növekedtével párhuzamosan- (csak) meghatározott hőmérsékleten hív életre a sejt.



57. ábra **Az IbpAB fehérjék szerepe az *E. coli* membránok integritásának megőrzésében.** A külső membrán permeabilitásának nyomon követése különböző hőmérsékleteken 15 percre inkubált sejtekben (reprezentatív mérési eredmény, mérési páronként n= 3-5, ld. Anyagok és módszerek 2.4.1. fejezet). A $\Delta IbpAB +IbpA$, $+IbpB$ ill. $IbpAB$ rövidítések a $\Delta IbpAB$ konstrukcióban exogén *IbpA*-t, *IbpB*-t ill. *IbpAB*-t termelő sejteket jelölnék. Az egyes sejt típusok által termelt fehérje mennyiségeket az 56. ábrán tüntettük föl.

Technikai okoknál fogva ezidáig nem tudtuk megállapítani, hogy vajon mindkét vagy csak az egyik sHsp játszik-e szerepet a (vad típusú) membrán védelmében. Az ismertett komplex kép ellenére azonban kirajzolódni látszik, hogy a két sHsp valószínűleg nem egyforma súllyal bír a membrán tulajdonságainak alakításában. Érdekes módon LeThanh és mtsai (2005) úgy találták, hogy stressz körülmények között az *IbpA* mintegy 3x-os feleslegben van az *IbpB*-hez képest, míg egy másik csoport vizsgálata alapján az *IbpA* és *IbpB* 1:4 arányú *komplex* formában

együttműködve képes leghatékonyabban ellátni chaperon funkcióját. Önmagában az *IbpB* jelentősen hatástalanabbnak, az *IbpA* pedig gyakorlatilag elégtelennek bizonyult a fehérjevédelmi funkció ellátására a két fehérje együttes működőképességéhez viszonyítva (Kuczynska-Wisnik és mtsai, 2004; Matuszewska és mtsai, 2005). Ez arra enged következtetni, hogy az *IbpB* az *E. coli* sHsp-k azon képviselője, amely a fehérjevédelmi feladatot ellátja, bár eredményes működéséhez szükség van az *IbpA*-ra is. Ez utóbbi fölöslege viszont azt sejteti, hogy az *E. coli* sejtben van olyan más, fehérjevédelemtől különböző funkció, amelyben az *IbpA* játszik fontosabb szerepet. Az 55. és 57. ábrákon bemutatott eredmények alapján az *IbpA* várományosa lehet egy, a membrán védelmében meghatározó(bb) feladatkör betöltésének. Nem csupán az előbb említett eredmények alapján lehet nagyobb szereppel bíró, membrán integritást őrző eszköz az *IbpA* az *IbpB*-vel szemben, ezt megerősíteni látszik az 58. ábra is, miszerint az *IbpA* erősebb kölcsönhatást képes létesíteni akár a külső, akár a belső membrán lipidjeivel.



58. ábra Az *IbpA* és *IbpB* fehérjék kölcsönhatása TPL monolayer-ekkel. A tisztított fehérjéket 30 °C-on növesztett sejtek izolált külső és belső membránjaiból extrahált poláros lipidek alkotta felszín alá injektáltuk.

Érdekes, hogy az IbpA és IbpB bármelyike önmagában nagyobb hatást tud kifejteni a lipid membránok fizikai állapotára, mint az 1:1 arányú, ugyanakkora mennyiségű fehérje keverék (54. és 55. ábra). Ez azonban nem zárja ki egy optimális összetételű, funkcionális szinergizmust eredményező, az egyedi alkotóknál hatékonyabb komplex működését az élő sejtben, és jelzés értékű arra nézve, hogy *talán a membrán védelmében (is) egy jól meghatározott heterooligomer lehet a legeredményesebb*. Ez annál is inkább megfontolandó, mivel a membrán egyben védelemre szoruló fehérjék színtere is, így az IbpB jelenléte, hacsak ilyen szempontból is, indokolt lehet. Annak földerítésére, hogy vajon az IbpA (ibpA) ill. IbpB (ibpB) önmagában képes lehet-e megfelelő, a vad típusú sejtrel összevethető mértékű védelmet nyújtani a sejt membránjainak, olyan konstrukciók tesztelését tervezzük, amelyekben az ibpA ill. ibpB a saját promóter régiójának szabályzása alatt, természetes módon működhet.

EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. *Synechocystis* PCC 6803

A cianobakteriális tilakoid membrán és fotoszintetikus funkció hőaklimatizációs folyamatait és az abban szerepet játszó tényezőket tanulmányoztuk *in vivo* és *in vitro* végzett kísérletekben. Megállapítottuk, hogy egy szubletális (3 h, 42 °C) hőedzés kizárólag a fény jelenlétében vezet a tilakoid funkció megnövekedett hőstabilitásához. Ezzel párhuzamosan kizárólag a fényben történő hőedzés eredményezte a tilakoid membrán stabilitásának jelentős növekedését ill. a membrán mikrodomén organizációjának átalakulását. A tilakoid membrán és (PSII) funkció stabilitását növelni képes tényezők után kutatva megállapítottuk, hogy lipid és fehérje eredetű változások egyaránt szerepet játszhatnak a rövidtávú aklimatizációs folyamatokban. Az általános lipid kettős kötés tartalom csökkenés mellett egy rendkívül telített MGlCDG, a „hősokklipid” jelent meg a fényben végzett hőedzés során, amely fizikai tulajdonságai alapján a membrán (lipid fázis) stabilizálására hivatott. A tilakoid membránt ugyancsak stabilizálni képes tényező a sHsp Hsp17, amely kitüntetett módon hat kölcsön a nem kettősréteg-képző lipidekkel (MGlCDG, MGDG). A hősokklipid és a Hsp17 olyan, a membrán lipid fázisának szabályozására képes hatékony védelmi eszközöknek bizonyultak, amelyek egymástól függetlenül vagy együttműködve aktív részesei lehetnek a fényben történő hőedzést kísérő membrán átrendeződésnek, és hozzájárulhatnak a tilakoid membrán ill. funkció termorezisztenciájának kialakulásához.

2. *Synechocystis* Hsp17 pontmutációk specifikusan módosítják a kismolsúlyú hősokkfehérje membrán aktivitását

A Hsp17-membrán (lipid) kölcsönhatás mechanizmusának tanulmányozását céloztuk meg olyan sHsp pontmutáns konstrukciók létrehozásával ill. a megfelelő tisztított fehérjék vizsgálatával, amely sejtek stressz toleranciájuk tekintetében ill. a megfelelő fehérjék oligomerizációs tulajdonságukban és *in vitro* fehérjevédő képességükben különböznek a vad típusú sejttől ill. fehérjétől (Giese és Vierling,

2002 és 2004; Giese és mtsai, 2005). Olyan mutációk (L66A, F102S, V143A ill. S2Y), amelyek a Hsp17 oligomer állandósult dimer formára való szétesését ill. az oligomer állapot rögzítését eredményezték, a membrán (lipid) kölcsönható sHsp oligomer disszociációjának és reasszociációs képességének szükségességére mutattak rá. Az aktív, lipid asszociációra képes fehérje formának a dimer, ill. (esetleg) monomer bizonyult. N-terminális mutáns fehérjék (L9P, Q16R) segítségével megállapítottuk, hogy a Hsp17 N-terminális vége hordozza a lipidekkel kölcsönható képes fehérje motívumot. Az L9P ill. Q16R Hsp17 membrán (lipid) asszociációs képessége és tilakoid funkciót védeni képes hatása ugyanis anélkül változott negatív ill. pozitív irányban a vad típusú megfelelőhöz képest, hogy oligomerizációs képességükben eltérnének a kontroll fehérjétől. A hőkezelésnek kitett sejtekben a Q16R fehérje kizárólag a tilakoid frakcióban található meg. E fehérje kivételes membrán aktivitása folytán a vad típusú sHsp-t is felülmúlóan képes védeni a tilakoid funkciót a fotoinhibíciós (UV-B) károsodásoktól. Az L9P és Q16R mutánsokkal végzett kísérletek alapján az *in vitro* fehérje-lipid kölcsönhatásban tapasztalt változások összhangban vannak a Hsp17 *in vivo* membrán asszociációjával és a sHsp fotoszintetikus membránra gyakorolt hatásával. Eszerint valószínűsíthető, hogy a Hsp17 *in vivo* membrán aktivitását legalább részben a sHsp-lipid kölcsönhatás irányítja.

3. *Escherichia coli*

Az *E. coli* sHsp-k (IbpA és IbpB) membrán (hő)stabilitásban betöltött szerepének feltárása céljából Δ IbpAB és WT sejteket teszteltünk *in vivo*, membrán fenotípusukban található különbségek után kutatva, ill. tisztított fehérjék lipid kölcsönhatásait vizsgáltuk *in vitro*. Ugyanakkor a Δ IbpAB kontsrukcióban az IbpA-t, az IbpB-t ill. az IbpAB-t (túl)termeltetve vizsgáltuk a sHsp-k közvetlen membránvédő szerepét, valamint a két sHsp esetleges funkcióbeli különbségét vagy együttműködését. A sejt membránjainak permeabilitás és fluiditás jellemzőit követve megállapítottuk, hogy a hősokk során membránokhoz kötődő IbpA/B a sejt olyan, gyorsan reagálni képes védelmi eszközt képviseli, amelynek feladata a magashőmérsékleti stressz okozta károsodások kivédése ill. megfékezése. Az elsősorban külső membránhoz perifériálisan kapcsolódó IbpA/B képes a lipidek

fejcsoport régiójában hatékonyan rigidizálni a membránt, ezáltal gátolni a membrán „kilyukadását”, megőrizni annak integritását. Az IbpAB hiánya a sejtben egyidejűleg jónéhány más gén expresszióját megváltoztatja, mellyel vélhetően kompenzatorikus alternatív védelmi eszközök kerülnek előtérbe. A sHsp-k nélkül a sejt egy szokatlan, egyedi lipidváltoztatást eszközöl, ami a 18:1v gyarapodásával és a membránok hidrofób (zsírsav) régiójának fluidizációjával jár együtt. Ennek pontos mechanizmusa továbbra is kérdéses, de további bizonyítékkal szolgál arra nézve, hogy az IbpA és/vagy IbpB hiánya membrán fenotípus változást eredményez. A Δ IbpAB sejtben exogén módon termelt IbpAB mintegy 50 %-ban állítja helyre a vad típusú membrán fenotípusát, a sHsp-k membrán védelemben betöltött közvetlen szerepéről tanúskodva. Minthogy az IbpA -az IbpB-vel szemben- önmagában is hasonló helyreállításra képes, és *in vitro* kísérleti ill. irodalmi adatok is az IbpA nagyobb membrán aktivitásáról árulkodnak, az IbpA minden bizonnyal meghatározóbb szereppel bír a membrán hőstabilitásának kialakításában. Annak érdekében, hogy az IbpA ill. IbpB membrán védelemben vállalt szerepéről még inkább helytálló képet kaphassunk, olyan konstrukciók tesztelése van folyamatban, melyekben az egyes shsp-k a saját promóter régiójuk szabályozása alatt, természetes módon működhetnek.

Az elért eredmények gyakorlati jelentősége

A cianobakteriális sejt hőaklimatizációs folyamatainak és az abban szerepet játszó tényezőknek a tanulmányozásával példát mutattunk arra, hogy a sHsp-membrán (lipid) kölcsönhatás funkciójának és mechanizmusának megértésével olyan fehérje szerkezeti (ld. pontmutációk) vagy lipid összetételbeli (ld. pl. MGlcDG) módosítások tervezhetők, amelyekkel megjósolható módon befolyásoljuk a tilakoid membrán funkciót ill. tágabb értelemben véve a cianobakteriális sejt stressz aklimatizációs képességét. Ilyen eredményekre (ld. pl. Q16R mutáns) épülő alkalmazott kutatások elvezethetnek pl. olyan transzgenikus haszonnövények kifejlesztéséhez, amelyek nagyobb aszálytűrő képességgel rendelkeznek.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőimnek, Horváth Ibolyának és Török Zsoltnak, hogy számíthattam rájuk; Vígh Lászlónak, hogy sok erőfeszítéssel lehetővé tette a munkámat a csoportban, hogy az értékes szakmai beszélgetésekből sokat fejlődhettem és köszönettel tartozom támogatásáért a megpróbáltató időkben. Hálás vagyok áldozatkész aszisztenseinknek, Dobóné Barta Évának, Bogdán Istvánné Gabinak és Zukič Erikának, akik segítsége nélkül sokkal több „hosszú napom” lett volna. Köszönöm Nagy Enikőnek, Jósvay Katinak és Glatz Attilának a molekuláris biológiai munkák elvégzését; Debreczeny Móninak és Balogh Gábornak az együtt végzett munkát és szakmai beszélgetéseket; Farkas Tibornak és egykori csoportjának a megtisztelő társaságot. Nagyra becsülöm Kim Giese és Elizabeth Vierling segítségét és kedvességét a külföldi kiküldetésem alatt. Köszönöm kooperációs partnereink, különösen Otilia Cheregi és Vass Imre áldozatkész együttműködését. Külön köszönettel tartozom Solymosy Ferenc baráti és szakmai támogatásáért, valamint Tóth Sándorné Marikának a prezentációs anyagok elkészítésében nyújtott segítségéért. Végezetül köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy mellettem álltak, és egyben elnézését kérem mindazoknak, akikkel szemben hálátlannak tűnök, pedig csak megfeledkeztem róluk. ☺

PUBLIKÁCIÓS LISTA

(*Az értekezés alapjául szolgáló cikkek és kéziratok)

Kukovecz, A., **Balogi, Z.**, Kónya, Z., Toba, M., Lentz, P., Niwa, S.-I., Mizukami, F., Molnár, A., Nagy, J.B., Kiricsi, I. Synthesis, characterisation and catalytic applications of sol-gel derived silica-phosphotungstic acid composites, *Applied Catalysis A, General* 228 (1-2) (2002) 83-94.

*Tsvetkova, N.M., Horváth, I., Török, Z., Wolkers, W.F., **Balogi, Z.**, Shigapova, N., Crowe, L.M., Tablin, F., Vierling, E., Crowe, J.H., Vígh, L. Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (21) (2002) 13504-13509.

***Balogi, Z.**, Török, Z., Balogh, G., Jósvay, K., Shigapova, N., Vierling, E., Vígh, L., Horváth, I. "Heat shock lipid" in cyanobacteria during heat/light-acclimation, *Arch. Biochem. Biophys.* 436 (2005) 346-354.

Horváth I., Glatz A., **Balogi Z.**, Balogh G., Puskás L.G., Jósvay K., Liberek K., Debreczeny M., Hunyadi-Gulyás M., Medzihradzsky E., Goloubinoff K.F., Vígh L. The emerging role for small heat shock proteins in the regulation of composition and dynamics of cell membranes, *Chem. Phys. Lipids* 130 (1) (2004) pp. 29.

Balogi, Z., Glatz, A., Balogh, G., Nagy, E., Liberek, K., Debreczeny, M., Goloubinoff, P., Horváth, I., Vígh, L. The emerging role for small heat-shock proteins in the regulation of lipid composition and dynamics of cell membranes, *FEBS J.* 272 (2005) pp. 358.

***Balogi, Z.**, Cheregi, O., Debreczeny, M., Giese, K., Vierling, E., Vass, I., Vígh, L., Horváth, I. Mutations in *Synechocystis* Hsp17 specifically modify the membrane activity of this small heat shock protein, (manuscript in preparation)

***Balogi, Z.**, Glatz, A., Jósvay, K., Nagy, E., Balogh, G., Debreczeny, M., Juhász, K., Liberek, K., Goloubinoff, P., Mogk, A., Bukau, B., Vígh, L., Horváth, I. Deletion of small heat shock proteins IbpA and IbpB alters the membrane phenotype of *E. coli* cells, (manuscript in preparation)

REFERENCIÁK

1. **Abulimiti, A.**, Qiu, X., Chen, J., Liu, Y., Chang, Z. Reversible methionine sulfoxidation of *Mycobacterium tuberculosis* small heat shock protein Hsp16.3 and its possible role in scavenging oxidants, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 305 (2003) 87-93.
2. **Adamska, I.**, Klopstech, K. Evidence for the localization of the nuclear-coded 22-kDa heat-shock protein in a subfraction of thylakoid membranes, *Eur. J. Biochem.* 198 (1991) 375-381.
3. **Arrigo, A.P.**, Müller, W.E.G. (Eds.) Small stress proteins, *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 2002
4. **Arrigo, A.-P.**, Paul, C., Ducasse, C., Sauvageot, O., Kretz-Remy, C. Small stress proteins: modulation of intracellular redox state and protection against oxidative stress, in: Arrigo, A.P., Müller, W.E.G. (Eds.) Small stress proteins, *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 2002, pp. 171-184.
5. **Asadulghani**, Suzuki, Y., Nakamoto, H. Light plays a key role in the modulation of heat shock response in the cyanobacterium *Synechocystis sp* PCC 6803, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 306 (2003) 872-879.
6. **Basha, E.**, Lee, G.J., Breci, L.A., Hausrath, A.C., Buan, N.R., Giese, K.C., Vierling, E. The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress *in vivo* indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions, *J. Biol. Chem.* 279 (9) (2004) 7566-7575.
7. **Batenburg, A.M.**, Demel, R.A., Verkleij, A.J., de Kruijff, B. Penetration of the signal sequence of *Escherichia coli* PhoE protein into phospholipid model membranes leads to lipid-specific changes in signal peptide structure and alterations of lipid organization, *Biochem.* 27 (15) (1988) 5678-5685.
8. **Bayer, M.H.**, Bayer, M.E. Phosphoglycerides and phospholipase C in membrane fractions of *Escherichia coli* B, *J. Bacteriol.* 162 (1) (1985) 50-54.
9. **Benderitter, M.**, Vincent-Genod, L., Pouget, J.P., Voisin, P. The cell membrane as a biosensor of oxidative stress induced by radiation exposure: a multiparameter investigation, *Radiat. Res.* 159 (2003) 471-483.
10. **Berry, J.**, Björkman, O. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants, *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 31 (1980) 491-543.
11. **Bishop, C.M.**, Walkenhorst, W.F., Wimley, W.C. Folding of β -sheets in membranes: specificity and promiscuity in peptide model systems, *J. Mol. Biol.* 309 (2001) 975-988.
12. **Bligh, E.G.**, Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911-917.
13. **Blume, A.** A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers, *Biochim. Biophys. Acta* 557 (1979) 32-44.
14. **van Boekel, M.A.M.**, de Lange, F., de Grip, W.J., de Jong, W.W. Eye lens α A- and α B-crystallin: complex stability versus chaperone-like activity, *Biochim. Biophys. Acta* 1434 (1999) 114-123.
15. **Bogdanov, M.**, Heacock, P.N., Dowhan, W. A polytopic membrane protein displays a reversible topology dependent on membrane lipid composition, *EMBO J.* 21 (9) (2002) 2107-2116.
16. **van der Brink-van der Laan, E.**, Dalbey, R.E., Demel, R.A., Killian, J.A., de Kruijff, B. Effect of nonbilayer lipids on membrane binding and insertion of the catalytic domain of leader peptidase, *Biochem.* 40 (2001) 9677-9684.

17. **Bryant, D.A.** (Ed.) The molecular biology of cyanobacteria, *Advances in Photosynthesis*, Kluwer Academic Publishers Dordrecht, **1994**
18. **Buchberger, A.**, Valencia, A., McMacken, R., Sander, C., Bukau, B. The chaperone function of DnaK requires the coupling of ATPase activity with substrate binding through residue E171, *EMBO J.* 13 (7) (**1994**) 1687-1695.
19. **Bukau, B.** Regulation of *Escherichia coli* heat-shock response, *Mol. Microbiol.* 9 (4) (**1993**) 671-680.
20. **Cadore, J.C.**, Rousseau, B., Perewoska, I., Sicora, C., Cheregi, O., Vass, I., Houmard, J. Cyclic nucleotides, the photosynthetic apparatus and response to a UV-B stress in the Cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803, *J. Biol. Chem.* 280 (40) (**2005**) 33935-33944.
21. **Chang, Z.**, Primm, T.P., Jakana, J., Lee, I.H., Serysheva, I., Chiu, W., Gilbert, H.F., Quioco, F.A. *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure *in vitro* to suppress thermal aggregation, *J. Biol. Chem.* 271 (12) (**1996**) 7218-7223.
22. **Chen, Y.**, Lu, Y.-J., Wang, H.-W., Quan, S., Chang, Z., Sui, S.-F. Two-dimensional crystallization of a small heat shock protein Hsp16.3 on lipid layer, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 310 (**2003**) 360-366.
23. **Clark, J.I.**, Muchowski, P.J. Small heat-shock proteins and their potential role in human disease, *Cur. Opin. Struct. Biol.* 10 (**2000**) 52-59.
24. **Cobb, B.A.**, Petrash, J.M. Characterization of α -crystallin-plasma membrane binding, *J. Biol. Chem.* 275 (9) (**2000**) 6664-6672.
25. **Cobb, B.A.**, Petrash, J.M. α -Crystallin chaperone-like activity and membrane binding in age-related cataracts, *Biochem.* 41 (**2002**) 483-490.
26. **Crabbe, M.J.C.**, Hepburne-Scott, H.W. Small heat shock proteins (sHsps) as potential drug targets, *Cur. Pharm. Biotech.* 2 (**2001**) 77-111.
27. **Delmas, F.**, Pierre, F., Coucheney, F., Divies, C., Guzzo, J. Biochemical and physiological studies of the small heat shock protein Lo18 from the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3 (4) (**2001**) 601-610.
28. **Derham, B.K.**, Ellory, J.C., Bron, A.J., Harding, J.J. The molecular chaperone α -crystallin incorporated into red cell ghosts protects membrane Na/K-ATPase against glycation and oxidative stress, *Eur. J. Biochem.* 270 (**2003**) 2605-2611.
29. **Diaz-Latoud, C.**, Buache, E., Javouhey, E., Arrigo, A.P. Substitution of the unique cysteine residue of murine Hsp25 interferes with the protective activity of this stress protein through inhibition of dimer formation, *Antiox. and Redox. Signal.* 7 (3-4) (**2005**) 426-445.
30. **DiGiuseppe, P.A.**, Silhavy, T.J. Signal detection and target gene induction by the CpxRA two-component system, *J. Bacteriol.* 185 (8) (**2003**) 2432-2440.
31. **Downs, C.A.**, Heckathorn, S.A. The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH:ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants, *FEBS Letters* 430 (**1998**) 246-250.
32. **Downs, C.A.**, Jones, L.R., Heckathorn, S.A. Evidence for a novel set of small heat-shock proteins that associates with the mitochondria of murine PC12 cells and protects NADH:ubiquinone oxidoreductase from heat and oxidative stress, *Arch. Biochem. Biophys.* 365 (2) (**1999**) 344-350.
33. **Ehrnsperger, M.**, Lilie, H., Gaestel, M., Buchner, J. The dynamics of Hsp25 quaternary structure (Structure and function of different oligomeric species), *J. Biol. Chem.* 274 (21) (**1999**) 14867-14874.
34. **Ellis, R.J.** Proteins as molecular chaperones, *Nature* 328 (**1987**) 378-379.

35. **Epand, R.M.**, Lipid polymorphism and protein-lipid interactions, *Biochim. Biophys. Acta* 1376 (1998) 353-368.
36. **Eskenazi, A.E.**, Powers, J., Pinkas, J., Oesterreich, S., Fuqua, S.A.W., Frantz, C.N. Induction of heat shock protein 27 by hydroxyurea and its relationship to experimental metastasis, *Clin. Exp. Metastasis* 16 (1998) 283-290.
37. **Fabisiak, J.P.**, Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Lazo, J.S., Kagan, V.E. Random versus selective membrane phospholipid oxidation in apoptosis: role of phosphatidylserine, *Biochem.* 37 (1998) 13781-13790.
38. **Fang, F.**, Barnum, S.R. The heat shock gene, *htpG*, and thermotolerance in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Cur. Microbiol.* 47 (2003) 341-346.
39. **Fang, F.**, Barnum, S.R. Expression of the heat shock gene *hsp16.6* and promoter analysis in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Cur. Microbiol.* 49 (3) (2004) 192-198.
40. **Farber, J.L.** Mechanism of cell injury, in: Craighead J.E. (Ed.), Pathology of Environmental and Occupational Disease, Mosby-Year Book Inc. St Louis, 1995, pp. 287-302.
41. **Fernandez, A.**, Berry, R.S. Proteins with H-bond packing defects are highly interactive with lipid bilayers: implications for amyloidogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 2391-2396.
42. **Fink, A.L.**, Goto, Y. (Eds.) Molecular chaperones in the life cycle of proteins: structure, function and mode of action, Marcel Dekker Inc. N.Y., 1998
43. **Fishov, I.**, Woldringh, C.L. Visualization of membrane domains in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 32 (6) (1999) 1166-1172.
44. **Friedrich, K.L.**, Giese, K.C., Buan, N.R., Vierling, E. Interactions between small heat shock protein subunits and substrate in small heat shock protein-substrate complexes, *J. Biol. Chem.* 279 (2) (2004) 1080-1089.
45. **Fu, L.**, Liang, J.J.-N. Enhanced stability of α B-crystallin in the presence of small heat shock protein Hsp27, *Biochim. Biophys. Acta* 302 (2003) 710-714.
46. **Gaestel, M.** sHsp-phosphorylation: enzymes, signaling pathways and functional implications, in: Arrigo, A.P., Müller, W.E.G. (Eds.) Small stress proteins, *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 2002, pp. 151-169.
47. **Ganzle, M.G.**, Vogel, R.F. On-line fluorescence determination of pressure mediated outer membrane damage in *Escherichia coli* cells, *Syst. Appl. Microbiol.* 24 (2001) 477-485.
48. **Garab, G.**, Lohner, K., Laggner, P., Farkas, T. Self-regulation of the lipid content of membranes by non-bilayer lipids: a hypothesis, *Trends in Plant Sci.* 5 (11) (2000) 489-494.
49. **Garbe, T.R.**, Yukawa, H. Common solvent toxicity: autooxidation of respiratory redox-cyclers enforced by membrane derangement, *Z. Naturforsch.* 56c (2001) 483-491.
50. **Garrett, R.H.**, Grisham, C.M. Biochemistry, 2nd Ed., Saunders College Publishing F.W., 1999
51. **Gennis, R.B.** Biomembranes: Molecular structure and function, in: Cantor, C.R. (Ed.), *Springer Advanced Text in Chemistry*, Springer-Verlag N.Y., 1989
52. **Giese, K.**, Vierling, E. Changes in oligomerization are essential for the chaperone activity of a small heat shock protein in vivo and in vitro, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 46310-46318.

53. **Giese, K.**, Vierling, E. Mutants in a small heat shock protein that affect the oligomeric state. Analysis and allele-specific suppression, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 32674-32683.
54. **Giese, K.**, Basha, E., Catague, B.Y., Vierling, E. Evidence for an essential function of the N terminus of a small heat shock protein *in vivo*, independent of *in vitro* chaperone activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (52) (2005) 18896-18901.
55. **Glatz, A.**, Horváth, I., Varvasovszki, V., Kovács, E., Török, Z., Vígh, L. Chaperonin genes of the *Synechocystis* PCC 6803 are differentially regulated under light-dark transition during heat stress, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 239 (1997) 291-297.
56. **Glatz, A.**, Vass, I., Los, D.A., Vígh, L. The *Synechocystis* model of stress: from molecular chaperones to membranes, *Plant Physiol. Biochem.* 37 (1) (1999) 1-12.
57. **Glatz, A.**, Horváth, I., Török, Z., Vígh, L. A membránok és a chaperone-ok szerepe a hőstressz érzékelésében és elhárításában, *Bot. Közlem.* 90 (1-2) (2003) 121-128.
58. **Glaczinski, H.**, Klopstech, K. Temperature-dependent binding to the thylakoid membranes of nuclear-coded chloroplast heat-shock proteins, *Eur. J. Biochem.* 173 (1988) 579-583.
59. **Goloubinoff, P.**, Mogk, A., Zvi, A.P.B., Tomoyasu, T., Bukau, B. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (24) (1999) 13732-13737.
60. **Gounaris, K.**, Brain, A.R.R., Quinn, P.J., Williams, W.P. Structural and functional changes associated with heat-induced phase-separations of non-bilayer lipids in chloroplast thylakoid membranes, *FEBS Letters* 153 (1) (1983) 47-52.
61. **Gounaris, K.**, Brain, A.R.R., Quinn, P.J., Williams, W.P. Structural reorganisation of chloroplast thylakoid membranes in response to heat-stress, *Biochim. Biophys. Acta* 766 (1984) 198-208.
62. **Guella, G.**, Frassanito, R., Mancini, I. A new solution for an old problem: the regiochemical distribution of the acyl chains in galactolipids can be established by electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Com. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1982-1994.
63. **Gustavsson, N.**, Kokke, B.P.A., Harndahl, U., Silow, M., Bechtold, U., Poghosyan, Z., Murphy, D., Boelens, W.C., Sundby, C. A peptide methionine sulfoxide reductase highly expressed in photosynthetic tissue in *Arabidopsis thaliana* can protect the chaperone-like activity of a chloroplast-localized small heat shock protein, *Plant J.* 29 (5) (2002) 545-553.
64. **Haley, D.A.**, Horwitz, J., Stewart, P.L. The small heat-shock protein, α B-crystallin, has a variable quaternary structure, *J. Mol. Biol.* 277 (1998) 27-35.
65. **Harndahl, U.**, Hall, R.B., Osteryoung, K.W., Vierling, E., Bornman, J.F., Sundby, C. The chloroplast small heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants from oxidative stress, *Cell Stress Chap.* 4 (2) (1999) 129-138.
66. **Harndahl, U.**, Kokke, B.P.A., Gustavsson, N., Linse, S., Berggren, K., Tjerneld, F., Boelens, W.C., Sundby, C. The chaperone-like activity of a small heat shock protein is lost after sulfoxidation of conserved methionines in a surface-exposed amphipathic α -helix, *Biochim. Biophys. Acta* 1545 (2001) 227-237.
67. **Haslbeck, M.**, Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H.E., Chen, S., Saibil, H.R., Buchner, J. Hsp26: a temperature-regulated chaperone, *EMBO J.* 18 (23) (1999) 6744-6751.

68. **Heckathorn, S.A.**, Downs, C.A., Sharkey, T.D., Coleman, J.S. The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress, *Plant Physiol.* 116 (1998) 439-444.
69. **Heckathorn, S.A.**, Ryan, S.L., Baylis, J.A., Wang, D., Hamilton, E.W., Cundiff, L., Luthe, D.S. *In vivo* evidence from an *Agrostis stolonifera* selection genotype that chloroplast small heat-shock proteins can protect photosystem II during heat stress, *Funct. Plant Biol.* 29 (2002) 933-944.
70. **Hirano, M.**, Satoh, K., Katoh, S. The effect of photosynthetic electron transport of temperature-dependent changes in the fluidity of the thylakoid membrane in a thermophilic blue-green alga, *Biochim. Biophys. Acta* 635 (1981) 476-484.
71. **Hirche, F.**, Ulbrich-Hofmann, R. The interfacial pressure is an important parameter for the rate of phospholipase D catalyzed reactions in emulsion system, *Biochim. Biophys. Acta* 1436 (1999) 383-389.
72. **Horváth, I.**, Mansourian, A.R., Vigh, L., Thomas, P.G., Joó, F., Quinn, P.J. Homogeneous catalytic hydrogenation of the polar lipids of pea chloroplasts in situ and the effects on lipid polymorphism, *Chem. Phys. Lipids* 39 (1986) 251-264.
73. **Horváth, I.**, Glatz, A., Varvasovszki, V., Török, Z., Páli, T., Balogh, G., Kovács, E., Nádasi, L., Benkő, S., Joó, F., Vigh, L. Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17 as a "fluidity gene", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 3513-3518.
74. **Horváth, L.I.**, Heimburg, T., Kovachev, P., Findlay, J.B.C., Hideg, K., Marsh, D. Integration of a K⁺ channel-associated peptide in a lipid bilayer: conformation, lipid-protein interactions, and rotational diffusion, *Biochem.* 34 (1995) 3893-3898.
75. **Huang, L.**, McCluskey, M.P., Ni, H., LaRossa, R.A. Global gene expression profiles of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 in response to irradiation with UV-B and white light, *J. Bacteriol.* 184 (24) (2002) 6845-6858.
76. **Hui, S.W.**, Stewart, T.P. 'Lipidic particles' are intermembrane attachment sites, *Nature* 290 (1981) 427-428.
77. **Hui, S.W.**, Stewart, T.P., Boni, L.T., Yeagle, P.L. Membrane fusion through point defects in bilayers, *Science* 212 (1981) 921-922.
78. **van den Ijssel, P.**, Wheelock, R., Prescott, A., Russel, P., Quinlan, R.A. Nuclear speckle localisation of the small heat shock protein α B-crystallin and its inhibition by the R120G cardiomyopathy-linked mutation, *Exp. Cell Res.* 287 (2003) 249-261.
79. **Inoue, N.**, Taira, Y., Emi, T., Yamane, Y., Kashino, Y., Koike, H., Satoh, K. Acclimation to the growth temperature and the high-temperature effects on photosystem II and plasma membranes in a mesophilic cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Cell Physiol.* 42 (10) (2001) 1140-1148.
80. **Jakob, U.**, Muse, W., Eser, M., Bardwell, J.C.A. Chaperone activity with a redox switch, *Cell* 96 (1999) 341-352.
81. **Janoff, A.S.**, Haug, A., McGroarty, E.J. Relationship of growth temperature and thermotropic lipid phase changes in cytoplasmic and outer membranes from *Escherichia coli* K12, *Biochim. Biophys. Acta* 555 (1979) 56-66.
82. **Janoff, A.S.**, Gupte, S., McGroarty, E.J. Correlation between temperature range of growth and structural transitions in membranes and lipids of *Escherichia coli* K12, *Biochim. Biophys. Acta* 598 (1980) 641-644.
83. **Jobin, M.-P.**, Delmas, F., Garmyn, D., Divies, C., Guzzo, J. Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein

- associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*, *Appl. Environ. Microbiol.* (1997) 609-614.
84. **Kagan, V.E.**, Fabisiak, J.P., Shvedova, A.A., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Schor, N.F., Kawai, K. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis, *FEBS L.* 477 (2000) 1-7.
 85. **Kampinga, H.H.**, Brunsting, J.F., Stege, G.J.J., Konings, A.W.T., Landry, J. Cells overexpressing Hsp27 show accelerated recovery from heat-induced nuclear protein aggregation, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 204 (3) (1994) 1170-1177.
 86. **Kappe, G.**, Franck, E., Verschuure, P., Boelens, W.C., Leunissen, J.A.M., de Jong, W.W. The human genome encodes 10 α -crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10, *Cell Stress Chap.* 8 (1) (2003) 53-61.
 87. **Kates, M.** Techniques of lipidology: Isolation, analysis and identification of lipids, *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, North-Holland Publishing Co. Amsterdam, 1972
 88. **Kato, K.**, Ito, H., Kamei, K., Iwamoto, I. Selective stimulation of Hsp27 and α B-crystallin but not Hsp70 expression by p38 MAP kinase activation, *Cell Stress Chap.* 4 (2) (1999) 94-101.
 89. **Katsui, N.**, Tsuchido, T., Takano, M., Shibasaki, I. Effect of preincubation temperature on the heat resistance of *Escherichia coli* having different fatty acid compositions, *J. Gen. Microbiol.* 122 (1981) 357-361.
 90. **Katsui, N.**, Tsuchido, T., Hiramatsu, R., Fujikawa, S., Takano, M., Shibasaki, I. Heat-induced blebbing and vesiculation of the outer membrane of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 151 (3) (1982) 1523-1531.
 91. **Kim, K.K.**, Kim, R., Kim S.-H. Crystal structure of a small heat-shock protein, *Nature* 394 (1998) 595-599.
 92. **Kitagawa, M.**, Yoshinobu, M., Tetsuaki, T. Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistance to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*, *FEMS Microbiology Letters* 184 (2000) 165-171.
 93. **Kloppstech, K.**, Meyer, G., Schuster, G., Ohad, I. Synthesis, transport and localization of a nuclear coded 22-kd heat-shock protein in the chloroplast membranes of peas and *Chlamydomonas reinhardtii*, *EMBO J.* 4 (8) (1985) 1901-1909.
 94. **Kovács, E.**, Török, Z., Horváth, I., Vígh, L. Heat stress induces association of the GroEL-analog chaperonin with thylakoid membranes in cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803, *Plant Physiol. Biochem.* 32 (2) (1994a) 285-293.
 95. **Kovács, E.**, Horváth, I., Glatz, A., Török, Z., Bagyinka, C., Vígh, L. Molecular characterization, assembly and membrane association of the GroEL-type chaperonins in *Synechocystis* PCC 6803, in: J.A.F.O. den Kamp (Eds.), *Biological Membranes: Structure, Biogenesis and Dynamics*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1994b NATO ASI Series II 82
 96. **Kuczynska-Wisnik, D.**, Laskowska, E., Taylor, A. Transcription of *ibpB* heat-shock gene is under control of sigma(32)- and sigma(54)-promoters, a third regulon of heat shock response, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 284 (1) (2001) 57-64.
 97. **Kuczynska-Wisnik, D.**, Kedzierska, S., Matuszewska, E., Lund, P., Taylor, A., Lipinska, B., Laskowska, E. The *Escherichia coli* small heat-shock proteins IbpA and IbpB prevent the aggregation of endogenous proteins denatured *in vivo* during extreme heat shock, *Microbiology* 148 (2002) 1757-1765.
 98. **Kuczynska-Wisnik, D.**, Zurawa-Janicka, D., Narkiewicz, J., Kwiatkowska, J., Lipinska, B., Laskowska, E. *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA/B enhance activity of enzymes sequestered in inclusion bodies, *Acta Biochim. Pol.* 51 (4) (2004) 925-931.

99. **Lakowicz, J.R.** Principles of fluorescence spectroscopy, Plenum Press N.Y., **1984**
100. **Laskowska, E.**, Wawrzynow, A., Taylor, A. IbpA and IbpB, the new heat-shock proteins, bind to endogenous *Escherichia coli* proteins aggregated intracellularly by heat shock, *Biochimie* 78 (**1996**) 117-122.
101. **Laskowska, E.**, Bohdanowicz, J., Kuczynska-Wisnik, D., Matuszewska, E., Kedzierska, S., Taylor, A. Aggregation of heat-shock-denatured, endogenous proteins and distribution of the IbpA/B and Fda marker-proteins in *Escherichia coli* WT and *grpE280* cells, *Microbiol.* 150 (**2004**) 247-259.
102. **Lee, A.G.** Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective, *Biochim. Biophys. Acta* 1612 (**2003**) 1-40.
103. **Lee, G.J.**, Roseman, A.M., Saibil, H.R., Vierling, E. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state, *EMBO J.* 16 (3) (**1997**) 659-671.
104. **Lee, G.J.**, Vierling, E. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 system to reactivate a heat-denatured protein, *Plant Physiol.* 122 (**2000**) 189-197.
105. **Lee, J.E.**, Ahn, T.I. Periplasmic localization of a GroES homologue in *Escherichia coli* transformed with *groESx* cloned from *Legionella*-like endosymbionts in *Amoeba proteus*, *Res. Microbiol.* 151 (**2000**) 605-618.
106. **Lee, S.**, Prochaska, D.J., Fang, F., Barnum, S.R. A 16.6-kilodalton protein in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 plays a role in the heat shock response, *Cur. Microbiol.* 37 (**1998**) 403-407.
107. **Lee, S.**, Owen, H.A., Prochaska, D.J., Barnum, S.R. Hsp16.6 is involved in the development of thermotolerance and thylakoid stability in the unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Cur. Microbiol.* 40 (**2000**) 283-287.
108. **Lehel, C.**, Gombos, Z., Török, Z., Vigh, L. Growth temperature modulates thermotolerance and heat shock response of cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803, *Plant Physiol. Biochem.* 31 (1) (**1993**) 81-88.
109. **LeThanh, H.**, Neubauer, P., Hoffmann, F. The small heat-shock proteins IbpA and IbpB reduce the stress load of recombinant *Escherichia coli* and delay degradation of inclusion bodies, *Microb. Cell Fact.* 4 (6) (**2005**)
110. **Li, Y.**, Heitz, F., Le Grimellec, C., Cole, R.B. Hydrophobic component in noncovalent binding of fusion peptides to lipids as observed by electrospray mass spectrometry, *Rapid Com. Mass Spectrom.* 18 (**2004**) 135-137.
111. **Liang, P.**, MacRae, T.H. Molecular chaperones and the cytoskeleton, *J. Cell Sci.* 110 (**1997**) 1431-1440.
112. **Lindblom, G.**, Oradd, G., Rilfors, L., Morein, S. Regulation of lipid composition in *Acholeplasma laidlawii* and *Escherichia coli* membranes: NMR studies of lipid lateral diffusion at different growth temperatures, *Biochemistry* 41 (**2002**) 11512-11515.
113. **Lodish, H.**, Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Darnell, J. Molecular cell biology, 3rd Ed., Scientific American Books Inc. N.Y., **1995**
114. **Loll, B.**, Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., Biesiadka, J. Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II, *Nature* 438 (15) (**2005**) 1040-1044.
115. **Los, D.A.**, Murata, N. Regulation of enzymatic activity and gene expression by membrane fluidity, *Science (Perspective)* (**2000**) 1-4.
116. **Lugtenberg, E.J.J.**, Peters, R. Distribution of lipids in cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* K12, *Biochim. Biophys. Acta* 441 (**1976**) 38-47.

117. **Madore, N.**, Smith, K.L., Graham, C.H., Jen, A., Brady, K., Hall, S., Morris, R. Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface, *EMBO J.* 18 (24) (1999) 6917-6926.
118. **Mansilla, M.C.**, Cybulski, L.E., Albanesi, D., de Mendoza, D. Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors, *J. Bacteriol.* 186 (20) (2004) 6681-6688.
119. **Matuszewska, M.**, Kuczynska-Wisnik, D., Laskowska, E., Liberek, K. The small heat shock protein IbpA of *Escherichia coli* cooperates with IbpB in stabilization of thermally aggregated proteins in a disaggregation competent state, *J. Biol. Chem.* 280 (13) (2005) 12292-12298.
120. **Mayor, J.-P.**, Török, Z., Siegenthaler, P.-A., Vígh, L. Differential accessibility of hydrogenation catalyst to acyl lipids in thylakoid membranes from Atrazine-resistant and -susceptible *Solanum nigrum* biotypes, *Plant Cell Physiol.* 33 (1992) 209-215.
121. **Mehlen, P.**, Kretz-Remy, C., Preville, X., Arrigo, A.-P. Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human α B-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF α -induced cell death, *EMBO J.* 15 (11) (1996) 2695-2706.
122. **Mejia, R.**, Gomez-Eichelman, M., Fernandez, M.S. Membrane fluidity of *Escherichia coli* during heat-shock, *Biochim. Biophys. Acta* 1239 (1995) 195-200.
123. **Miyake, T.**, Araki, S., Tsuchido, T. Synthesis and sedimentation of a subset of 15-kDa heat shock proteins in *Escherichia coli* cells recovering from sublethal heat stress, *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 (4) (1993) 578-583.
124. **Mogk, A.**, Deuerling, E., Vorderwulbecke, S., Vierling, E., Bukau, B. Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation, *Mol. Microbiol.* 50 (2) (2003) 585-595.
125. **van Montfort, R.**, Basha, E., Friedrich, K.L., Slingsby, C., Vierling, E. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein, *Nat. Struct. Biol.* 8 (12) (2001) 1025-1030.
126. **van Montfort, R.**, Slingsby, C., Vierling, E. Structure and function of the small heat shock protein/ α -crystallin family of molecular chaperones, *Advances in Prot. Chem.* 59 (2002) 105-156.
127. **Morgan-Kiss, R.**, Ivanov, A.G., Williams, J., Khan, M., Huner, N.P.A. Differential thermal effects on the energy distribution between photosystem II and photosystem I in thylakoid membranes of a psychrophilic and a mesophilic alga, *Biochim. Biophys. Acta* 1561 (2002) 251-265.
128. **Mulders, J.W.M.**, Stokkermans, J., Leunissen, J.A.M., Benedetti, E.L., Bloemendal, H., de Jong, W.W. Interaction of α -crytsallin with lens plasma membranes, *Eur. J. Biochem.* 152 (1985) 721-728.
129. **Murakami, Y.**, Tsuyama, M., Kobayashi, Y., Kodama, H., Iba, K. Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature, *Science* 287 (2000) 476-479.
130. **Murata, N.**, Nishida, I. Lipids of blue-green algae, *Biochem. Plants* 9 (1987) 315-347.
131. **Mühlradt, P.F.**, Golecki, J.R. Asymmetrical distribution and artifactual reorientation of lipopolysaccharide in the outer membrane bilayer of *Salmonella typhimurium*, *Eur. J. Biochem.* 51 (1975) 343-352.
132. **Nakagawa, M.**, Tsujimoto, N., Nakagawa, H., Iwaki, T., Fukumaki, Y., Iwaki, A. Association of HspB2, a member of the small heat shock protein family, with mitochondria, *Exp. Cell Res.* 271 (2001) 161-168.

133. **Nakamoto, H.**, Suzuki, N., Roy, S.K. Constitutive expression of a small heat-shock protein confers cellular thermotolerance and thermal protection to the photosynthetic apparatus in cyanobacteria, *FEBS Letters* 483 (2000) 169-174.
134. **Narberhaus, F.** Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (1) (2002) 64-93.
135. **Negre-Aminou, P.**, van Leeuwen, R.E.W., van Thiel, G.C.F., van den Ijssel, P., de Jong, W.W., Quinlan, R.A., Cohen, L.H. Differential effect of simvastatin on activation of Rac₁ vs. activation of the heat shock protein 27-mediated pathway upon oxidative stress, in human smooth muscle cells, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 1483-1491.
136. **Newman, G.**, Crooke, E. DnaA, the initiator of *Escherichia coli* chromosomal replication, is located at the cell membrane, *J. Bacteriol.* 182 (9) (2000) 2604-2610.
137. **Nitta, K.**, Suzuki, N., Honma, D., Kaneko, Y., Nakamoto, H. Ultrastructural stability under high temperature or intensive light stress conferred by a small heat shock protein in cyanobacteria, *FEBS Letters* 579 (2005) 1235-1242.
138. **Ojha, A.**, Anand, A., Bhatt, A., Kremer, L., Jacobs, W.R., Hatfull, G.F. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in *Mycobacteria*, *Cell* 123 (2005) 861-873.
139. **Páli, T.**, Garab, G., Horváth, L.I., Kóta, Z. Functional significance of the lipid-protein interface in photosynthetic membranes, *Cell Mol. Life Sci.* 60 (8) (2003) 1591-1606.
140. **Parcellier, A.**, Schmitt, E., Gurbuxani, S., Seigneurin-Berny, D., Pance, A., Chantome, A., Plenchette, S., Khochbin, S., Solary, E., Garrido, C. Hsp27 is a ubiquitin-binding protein involved in I- κ B α proteosomal degradation, *Mol. Cell Biol.* 23 (16) (2003) 5790-5802.
141. **Pike, C.S.**, Grieve, J., Badger, M.R., Price, G.D. Thermoprotective properties of small heat shock proteins from rice, tomato and *Synechocystis* sp. PCC 6803 overexpressed in, and isolated from, *Escherichia coli*, *Aust. J. Plant Physiol.* 28 (2001) 1219-1229.
142. **Pinnaduwege, P.**, Bruce, B.D. In vitro interaction between a chloroplast transit peptide and chloroplast outer envelope lipids is sequence-specific and lipid class-dependent, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 32907-32915.
143. **Piotrowicz, R.S.**, Levin, E.G. Basolateral membrane-associated 27-kDa heat shock protein and microfilament polymerization, *J. Biol. Chem.* 272 (41) (1997) 25920-25927.
144. **Poli, G.**, Leonarduzzi, G., Biasi, F., Chiarotto, E. Oxidative stress and cell signaling, *Cur. Med. Chem.* 11 (2004) 1163-1182.
145. **Preville, X.**, Salvemini, F., Giraud, S., Chaufour, S., Paul, C., Stepien, G., Ursini, M.V., Arrigo, A.-P. Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery, *Exp. Cell Res.* 247 (1999) 61-78.
146. **Proulx, P.** Fluorescence studies on prokaryotic membranes, in: Hilderson, H.J. (Eds.), *Subcellular Biochemistry: Fluorescence Studies on Biological Membranes*, Plenum Press N.Y., 1988, pp. 281-323.
147. **Quinn, P.J.** Effects of temperature on cell membranes, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 42 (1988) 237-258.
148. **Ray, P.S.**, Martin, J.L., Swanson, E.A., Otani, H., Dillmann, W.H., Das, D.K. Trangene overexpression of α B crystallin confers simultaneous protection against

- cardiomyocyte apoptosis and necrosis during myocardial ischemia and reperfusion, *FASEB J.* 15 (2001) 393-402.
149. **Rogalla, T.**, Ehrnsperger, M., Preville, X., Kotlyarov, A., Lutsch, G., Ducasse, C., Paul, C., Wieske, M., Arrigo, A.P., Buchner, J., Gaestel, M. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor α by phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 274 (27) (1999) 18947-18956.
 150. **Roughan, P.G.**, Thompson, G.A., Cho, S.H. Metabolism of exogenous long-chain fatty acids by spinach leaves, *Arch. Biochem. Biophys.* 259 (2) (1987) 481-496.
 151. **Roy, S.K.**, Hiyama, T., Nakamoto, H. Purification and characterization of the 16-kDa heat-shock-responsive protein from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which is an α -crystallin-related, small heat shock protein, *Eur. J. Biochem.* 262 (1999) 406-416.
 152. **Sato, N.**, Murata, N. Membrane lipids, *Meth. Enzymol.* 167 (1988) 251-259.
 153. **Sato, T.**, Ito, K., Yura, T. Membrane proteins of *Escherichia coli* K-12: two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of inner and outer membranes, *Eur. J. Biochem.* 78(2) (1977) 557-567.
 154. **Schlame, M.**, Horváth, L., Vígh, L. Relationship between lipid saturation and lipid-protein interaction in liver mitochondria modified by catalytic hydrogenation with reference to cardiolipin molecular species, *Biochem. J.* 265 (1990) 79-85.
 155. **Schleiff, E.**, Tien, R., Salomon, M., Soll, J. Lipid composition of outer leaflet of chloroplast outer envelope determines topology of OEP7, *Mol. Biol. Cell* 12 (2001) 4090-4102.
 156. **Schreiber, U.** Armond, P.A. Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in solated chloroplasts and related heat-damage at the pigment level, *Biochim. Biophys. Acta* 502 (1978) 138-151.
 157. **Schuster, G.**, Even, D., Kloppstech, K., Ohad, I. Evidence for protection by heat-shock proteins against photoinhibition during heat-shock, *EMBO J.* 7 (1) (1988) 1-6.
 158. **Sharkey, T.D.** Some like it hot, *Science* 287 (2000) 436-437.
 159. **Shigapova, N.** Alteration of membrane physical state regulate the *E. coli* heat shock response, *Ph.D. Thesis* (2004) pp. 54.
 160. **Shigapova, N.**, Török, Z., Balogh, G., Fodor, E., Goloubinoff, P., Vígh, L., Horváth, I. Membrane fluidization triggers membrane remodeling which affects the thermotolerance in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 328 (2005) 1216-1223.
 161. **Da Silveira, M. G.**, Golovina, E.A., Hoekstra, F.A., Rombouts, F.M., Abee, T. Membrane fluidity adjustments in ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (10) (2003) 5826-5832.
 162. **Simons, K.**, Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction, *Nature Reviews, Mol. Cell Biol.* 1 (2000) 31-39.
 163. **Sinensky, M.** Homeoviscous adaptation - a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 522-525.
 164. **Singer, S. J.**, Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* 175 (1972) 720-731.
 165. **Sitte, N.**, Huber, M., Grune, T., Ladhoff, A., Doecke, W.-D., von Zglinicki, T., Davies, K.J.A. Proteasome inhibition by lipofuscin/ ceroid during postmitotic aging of fibroblasts, *FASEB J.* (2000) 1490-1498.

166. **Skinner, M.K.**, Griswold, M.D. Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with 2,5-diphenyloxazole in acetic acid and comparison with existing procedures, *Biochem. J.* 209 (1983) 281-284.
167. **Smit, J.**, Nikaido, H. Outer membrane of Gram-negative bacteria XVIII. Electron microscopic studies on porin insertion sites and growth of cell surface of *Salmonella typhimurium*, *J. Bacteriol.* 135 (2) (1978) 687-702.
168. **Snoeckx, L.H.E.H.**, Cornelussen, R.N., van Nieuwenhoven, F.A., Reneman, R.S., van der Vusse, G.J. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology, *Physiol. Rev.* 81 (4) (2001) 1461-1497.
169. **Soto, A.**, Allona, I., Collada, C., Guevara, M.-A., Casado, R., Rodriguez-Cerezo, E., Aragoncillo, C., Gomez, L. Heterologous expression of a plant small heat-shock protein enhances *Escherichia coli* viability under heat and cold stress, *Plant Physiol.* 120 (1999) 521-528.
170. **Sóti, C.**, Nagy, E., Giricz, Z., Vigh, L., Csermely, P., Ferdinandy, P. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets, *Br. J. Pharmacol.* 146 (6) (2005) 769-780.
171. **Stanier, G.**, Fine structure of cyanobacteria, *Methods in Enzymol.* 167 (1988) 157-172.
172. **Starkopf, J.**, Andreasen, T.V., Bugge, E., Ytrehus, K. Lipid peroxidation, arachidonic acid and products of the lipoxygenase pathway in ischaemic preconditioning of rat heart, *Cardiovasc. Res.* 37 (1998) 66-75.
173. **Stege, G.J.** Renkawek, K., Overkamp, P.S., Verschuure, P., van Rijk, A.F., Reijnen-Aalbers, A., Boelens, W.C., Bosman, G.J., de Jong, W.W. The molecular chaperone alphaB-crystallin enhances amyloid beta neurotoxicity, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 262 (1999) 152-156.
174. **Thomas, P.G.**, Dominy, P.J., Vigh, L., Mansourian, A.R., Quinn, P.J., Williams, W.P. Increased thermal stability of pigment-protein complexes of pea thylakoids following catalytic hydrogenation of membrane lipids, *Biochim. Biophys. Acta* 849 (1986) 131-140.
175. **Tomoyasu, T.**, Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P., Bukau, B. Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol, *Mol. Microbiol.* 40 (2) (2001) 397-413.
176. **Török, Z.**, Demel, R.A., Leenhouts, J.M., de Kruijff, B. Presequence-mediated intermembrane contact formation and lipid flow. A model membrane study, *Biochem.* 33 (1994) 5589-5594.
177. **Török, Z.**, Vigh, L., Goloubinoff, P. Fluorescence detection of symmetric GroEL₁₄(GroES₇)₂ heterooligomers involved in protein release during the chaperonin cycle, *J. Biol. Chem.* 271 (27) (1996) 16180-16186.
178. **Török, Z.**, Horváth, I., Goloubinoff, P., Kovács, E., Glatz, A., Balogh, G., Vigh, L. Evidence for a lipochaperonin: association of active protein-folding GroESL oligomers with lipids can stabilize membranes under heat shock conditions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 2192-2197.
179. **Török, Z.**, Goloubinoff, P., Horváth, I., Tsvetkova, N.M., Glatz, A., Balogh, G., Varvasovszki, V., Los, D.A., Vierling, E., Crowe, J.H., Vigh, L. *Synechocystis* HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 3098-3103.
180. **Török, Z.**, Tsvetkova, N.M., Balogh, G., Horváth, I., Nagy, E., Péntes, Z., Hargitai, J., Bensaude, O., Csermely, P., Crowe, J.H., Maresca, B., Vigh, L. Heat

- shock protein coinducers with no effect on protein denaturation specifically modulate the membrane lipid phase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (6) (2003) 3131-3136.
181. **Trautinger, F.** Heat shock proteins in the photobiology of human skin, *J. Photochem. Photobiol.* 63 (2001) 70-77.
 182. **Tsuchido, T.**, Aoki, I., Takano, M. Interaction of the fluorescent dye 1-N-phenyl-naphthylamine with *Escherichia coli* cells during heat stress and recovery from heat stress, *J. Gen. Microbiol.* 135 (1989) 1941-1947.
 183. **Umakoshi, H.**, Kuboi, R., Komasa, I., Tsuchido, T., Matsumura, Y. Heat-induced translocation of cytoplasmic beta-galactosidase across inner membrane of *Escherichia coli*, *Biotechnol. Prog.* 14 (2) (1998) 210-217.
 184. **Uchida, K.** 4-hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress, *Prog. Lipid Res.* 42 (4) (2003) 213-218.
 185. **Uemura, M.**, Joseph, R.A., Steponkus, P.L. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions), *Plant Physiol.* 109 (1) (1995) 15-30.
 186. **Uemura, M.**, Steponkus, P.L. Effect of cold acclimation on the lipid composition of the inner and outer membrane of the chloroplast envelope isolated from rye leaves, *Plant Physiol.* 114 (4) (1997) 1493-1500.
 187. **Xing You, H.**, Yu, L., Qi, X. Phospholipid membrane restructuring induced by saposin C: a topographic study using atomic force microscopy, *FEBS Letters* 503 (2001) 97-102.
 188. **Yatvin, M.B.**, Smith, K.M., Siegel, F.L. Translocation of nascent non-signal sequence protein in heated *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 261 (17) (1986) 8070-8075.
 189. **Yatvin, M.B.** Influence of membrane-lipid composition on translocation of nascent proteins in heated *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta* 901 (1987) 147-156.
 190. **Yatvin, M.B.**, Clark, A.W., Siegel, F.L. Major *E.coli* heat-stress proteins do not translocate: implications for cell survival, *Int. J. Radiat. Biol.* 52 (4) (1987) 603-613.
 191. **Yatvin, M.B.**, Cramp, W.A. Role of cellular membranes in hyperthermia: some observations and theories reviewed, *Int. J. Hypertherm.* 9 (2) (1993) 165-185.
 192. **Vance, D.E.**, Vance, J.E. (Eds.) Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes, *New Comprehensive Biochemistry*, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 1991
 193. **Varvasovszki, V.**, Glatz, A., Shigapova, N., Jósvay, K., Vigh, L., Horváth, I. Only one *dnaK* homolog, *dnaK2*, is active transcriptionally and is essential in *Synechocystis*, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 305 (2003) 641-648.
 194. **Vereb, G.**, Szöllösi, J., Matko, J., Nagy, J., Farkas, T., Vigh, L., Waldmann, T.A., Damjanovich, S. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 8053-8058.
 195. **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 (1989) 361-364.
 196. **Vigh, L.**, Los, D.A., Horváth, I., Murata, N. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene in *Synechocystis* PCC 6803, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 9090-9094.

197. **Vígh, L.**, Török, Z., Kovács, E., Glatz, A., Balogh, N., Horváth, I. Thermal acclimation and heat stress response of *Synechocystis* PCC 6803: the possible role of thylakoid physical state, lipid saturation and molecular chaperones, in: J.H. Cherry (Eds.), *Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **1994**, NATO ASI Series, H86
198. **Vígh, L.**, Literáti, P.N., Horváth, I., Török, Z., Balogh, G., Glatz, A., Kovács, E., Boros, I., Ferdinándy, P., Farkas, B., Jaszlits, L., Jednákovits, A., Korányi, L., Maresca, B. Bimoclomol: a nontoxic, hydroxylamine derivative with stress protein-inducing activity and cytoprotective effects, *Nat. Med.* 3 (10) (**1997**) 1150-1154.
199. **Vígh, L.**, Maresca, B., Harwood, J.L. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes?, *TIBS* 23 (**1998**) 369-374.
200. **Vígh, L.**, Maresca, B. Dual role of membranes in heat stress: as thermosensors they modulate the expression of stress genes and, by interacting with stress proteins, re-organize their own lipid order and functionality, in: Storey, K.B., Storey J.M. (Eds.), *Sensing, Signaling and Cell Adaptation*, Elsevier Science B.V., **2002**, pp. 173-187.
201. **Vígh, L.**, Escriba, P.V., Sonnleitner, A., Sonnleitner, M., Piotto, S., Maresca, B., Horváth, I., Harwood, J.L. The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing function, *Prog. Lipid Res.* 44 (5) (**2005**) 303-344.
202. **van Walraven, H.S.**, Koppelaar, E., Marvin, H.J., Hagendoorn, M.J., Kraayenhof, R. Lipid specificity for the reconstitution of well-coupled ATPase proteoliposomes and a new method for lipid isolation from photosynthetic membranes, *Eur. J. Biochem.* 144 (3) (**1984**) 563-569.
203. **Wang, J.**, Zhang, G.-J. Influence of membrane physical state on lysosomal potassium ion permeability, *Cell Biol. Internat.* 29 (**2005**) 393-401.
204. **Webb, M.S.**, Green, B.R. Effects of neutral and anionic lipids on digalactosyldiacylglycerol vesicle aggregation, *Biochim. Biophys. Acta* 1030 (**1990**) 231-237.
205. **Wikstrom, M.**, Xie, J., Bogdanov, M., Mileykovskaya, E., Heacock, P., Wieslander, A., Dowhan, W. Monoglucosyldiacylglycerol, a foreign lipid, can substitute for phosphatidylethanolamine in essential membrane-associated functions in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 279 (11) (**2004**) 10484-10493.
206. **Williams, B.W.**, Scotto, A.W., Stubbs, C.D. Effect of proteins on fluorophore lifetime heterogeneity in lipid bilayers, *Biochem.* 29 (**1990**) 3248-3255.
207. **Williams, W.P.**, Brain, A.P.R., Dominy, P.J. Induction of non-bilayer lipid phase separation in chloroplast thylakoid membranes by compatible co-solutes and its relation to the thermal stability of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta* 1099 (**1992**) 137-144.
208. **Williams, W.P.**, Gounaris, K. Stabilisation of PS-II-mediated electron transport in oxygen-evolving PS II core preparations by the addition of compatible co-solutes, *Biochim. Biophys. Acta* 1100 (**1992**) 92-97.
209. **Williams, W.P.** The physical properties of thylakoid membrane lipids and their relation to photosynthesis, in: Siegenthaler, P.-A., Murata, N. (Eds.), *Advances in Photosynthesis: Lipids in Biosynthesis*, Kluwer Academic Publishers, **1998**, pp. 103-118.

ÖSSZEFOGLALÁS

Minden élőlény szoros kölcsönhatásban van a környezetével. A környezeti tényezők komoly kihívást jelenthetnek az egyed számára, amely speciális válaszreakciókkal -stresszválaszokkal- igyekszik a káros hatásokat kompenzálni. Károsodások érhetik a sejt minden alkotóelemét, mint pl. a DNS-t, a fehérjéket vagy a membránalkotó lipideket. A membránok őrzik a sejt integritását, jelentősen hozzájárulnak a sejt fölépítés- és működésbeli szerveződéséhez, ill. aktív szerephez jutnak a jelátviteli folyamatokban. Ugyanakkor mind sejten belüli elhelyezkedésük, szerkezetük, mind kémiai összetételük alapján a különféle stresszhatások potenciális célpontjául szolgálhatnak. A membrán, ill. a membrán és stresszfolyamatok kapcsolatának tanulmányozása arra a fölismerésre vezetett, hogy a hősokkfehérjék membránokhoz (lipidekhez) kötődve megőrizhetik azok integritását és funkcionalitását. Ezen túlmenően kapcsolat áll fent a hősokkgének szabályozása és a membrán fizikai állapota között. A membrán nem csupán passzív résztvevőként szenved el a stressz körülmények károsító hatásait, de aktív jeladóként érzékelve a megváltozott környezeti paramétereket, maga is beindíthatja a stresszválasz folyamatait (hősokkfehérjék expressziója, lipidváltozások), amelyek „enyhülést” hozhatnak nem csak a membrán, de az egész sejt számára. A kismolsúlyú hősokkfehérjék (sHsp-k) egy általánosan jelenlevő családját alkotják a hősokkfehérjék népes táborának, melyek a citoszolikus fehérjék átmenekítése mellett hatékony védelmet nyújthatnak a membránok számára is.

E dolgozat témája a sHsp-k membrán (lipid) kölcsönhatásának tanulmányozása, membránkötésük jelentőségének és mechanizmusának megértése. Ennek érdekében prokarióta modellrendszereket vizsgáltunk:

a/ egy fotoszintetizáló cianobaktériumot, a *Synechocystis* PCC 6803-t, amely (i) kiváló eszközként szolgál a növényi szervezetek modellezésére, (ii) csak egyetlen sHsp-vel bír, (iii) amelynek a fotoszintetikus membránra gyakorolt hatása egyszerűen nyomon követhető a tilakoid membrán funkció tesztelésével;

b/ az *Escherichia coli*-t, hogy fölfedjük, (i) vajon az *E coli* sHsp-k -a *Synechocystis* Hsp17-hez hasonlóan- rendelkeznek-e membránt védeni képes funkcióval, és ha igen, (ii) mi a jelentősége a két sHsp együttes jelenlétének.

Az eredményeket a következőkben összegezzük:

1. A *Synechocystis* PCC 6803 egyetlen sHsp-je a Hsp17, melyről többek között ismeretes, hogy hőstressz során kölcsönhat bizonyos fehérjékkel és ún. „refolding-ra alkalmas állapotban”-ban konzerválja azokat. Ugyanakkor tilakoid membránokhoz (is) kötődve, ezáltal növelve azok stabilitását, közvetlen vagy közvetett módon jelentős mértékben óvja a fotoszintetikus funkciót a hő és fény okozta károsodásoktól. Egy, a membrán lipid fázisát szelektíven módosító kísérlet arra utalt, hogy a Hsp17 expressziója és membrán asszociációja direkt és kölcsönös kapcsolatban áll a tilakoid membrán lipidjeinek fizikai állapotával, annak fluiditás jellemzőjével. Ezek ismeretében kísérleteket terveztünk annak földerítésére, hogy milyen tényezők játszanak szerepet a tilakoid membrán megnövekedett hőstabilitásának, és ezzel összefüggésben, a fotoszintetikus funkció termorezisztenciájának kialakulásában.

Megállapítottuk, hogy egy szubletális (3 h, 42 °C) hőedzés kizárólag a fény jelenlétében vezet a tilakoid funkció megnövekedett hőstabilitásához. Ezzel párhuzamosan kizárólag a fényben történő hőedzés eredményezte a tilakoid membrán stabilitásának jelentős növekedését ill. a membrán mikrodomén organizációjának átalakulását. A tilakoid membrán és (PSII) funkció stabilitását növelni képes tényezők után kutatva megállapítottuk, hogy lipid és fehérje eredetű változások egyaránt szerepet játszhatnak a rövidtávú akklimatizációs folyamatokban. Az általános lipid kettős kötés tartalom csökkenés mellett egy rendkívül telített MGlcDG, a „hősokklipid” jelent meg a fényben végzett hőedzés során, amely fizikai tulajdonságai alapján a membrán (lipid fázis) stabilizálására hivatott. A tilakoid membránt ugyancsak stabilizálni képes tényező a sHsp Hsp17, amely kitüntetett módon hat kölcsön a nem kettősréteg-képző lipidekkel (MGlcDG, MGDG). A hősokklipid és a Hsp17 olyan, a membrán lipid fázisának szabályozására képes hatékony védelmi eszközöknek bizonyultak, amelyek egymástól függetlenül vagy együttműködve aktív részesei lehetnek a fényben történő hőedzést kísérő membrán átrendeződésnek, és hozzájárulhatnak a tilakoid membrán ill. funkció termorezisztenciájának kialakulásához.

2. A *Synechocystis* Hsp17-membrán (lipid) kölcsönhatás mechanizmusának alaposabb tanulmányozását céloztuk meg olyan sHsp pontmutáns konstrukciók tesztelésével ill. a megfelelő tisztított fehérjék vizsgálatával, amely sejtek stressz

toleranciájuk tekintetében ill. a megfelelő fehérjék oligomerizációs tulajdonságukban és *in vitro* fehérjevédő képességükben különböznek a vad típusú sejttől ill. fehérjétől.

Olyan mutációk (L66A, F102S, V143A ill. S2Y), amelyek a Hsp17 oligomer állandósult dimer formára való szétesését ill. az oligomer állapot rögzítését eredményezték, a membrán (lipid) kölcsönható sHsp oligomer disszociációjának és reasszociációs képességének szükségességére mutattak rá. Az aktív, lipid asszociációra képes fehérje formának a dimer, ill. (esetleg) monomer bizonyult. N-terminális mutáns fehérjék (L9P, Q16R) segítségével *megállapítottuk*, hogy a Hsp17 N-terminális vége hordozza a lipidekkel kölcsönható képes fehérje motívumot. Az L9P ill. Q16R Hsp17 membrán (lipid) asszociációs képessége és tilakoid funkciót védeni képes hatása ugyanis anélkül változott negatív ill. pozitív irányban a vad típusú megfelelőhöz képest, hogy oligomerizációs képességükben eltérnének a kontroll fehérjétől. A hőkezelésnek kitett sejtekben a Q16R fehérje kizárólag a tilakoid frakcióban található meg. E fehérje kivételes membrán aktivitása folytán a vad típusú sHsp-t is felülmúlóan képes védeni a tilakoid funkciót a fotoinhibíciós (UV-B) károsodásoktól. Az L9P és Q16R mutánsokkal végzett kísérletek alapján az *in vitro* fehérje-lipid kölcsönhatásban tapasztalt változások összhangban vannak a Hsp17 *in vivo* membrán asszociációjával és a sHsp fotoszintetikus membránra gyakorolt hatásával. Eszerint valószínűsíthető, hogy a Hsp17 *in vivo* membrán aktivitását legalább részben a sHsp-lipid kölcsönhatás irányítja.

3. Az *Escherichia coli* két sHsp-je az IbpA és az IbpB. Ezek a „kis chaperonok” extrém magas hőmérsékleten gátolják a protein denaturációt *in vivo*. Szignifikáns mértékű fehérjevédelmet azonban csak huzamosabb idejű hőstressznek kitett sejtekben mutattak. Egy másik tanulmány -IbpA/B túltermelő sejt vonalakat használva- ugyanakkor rámutatott, hogy az IbpA/B már jóval rövidebb idő alatt is képes lehet a sejt túlélését befolyásoló védelmet nyújtani. Mindez azt sugallta, hogy a sHsp-k a fehérjevédelmén kívül más védelmi funkciót is elláthatnak stressz körülmények között. Ez a fölismerés és az a tény, hogy az IbpA/B membránokhoz kötődik, továbbá, hogy az *E. coli* hősokkválasz beindítása, sőt a termorezisztencia kialakulása pusztán a membrán lipid fázis szelektív módosításával elérhető, vezetett a kérdésfelvetéshez, hogy vajon az IbpA ill. B szerepet játszanak-e az *E. coli* membrán(ok) védelmében. Az *E. coli* sHsp-k (IbpA és IbpB) membrán (hő)stabilitásban betöltött szerepének feltárása céljából Δ IbpAB és WT sejteket teszteltünk *in vivo*, membrán fenotípusukban található különbségek után kutatva, ill.

tisztított fehérjék lipid kölcsönhatásait vizsgáltuk *in vitro*. Ugyanakkor a Δ IbpAB kontstrukcióban az IbpA-t, az IbpB-t ill. az IbpAB-t (túl)termeltetve vizsgáltuk a sHsp-k közvetlen membránvédő szerepét, valamint a két sHsp esetleges funkcióbeli különbségét vagy együttműködését.

A sejt membránjainak permeabilitás és fluiditás jellemzőit követve *megállapítottuk*, hogy a hő sokk során membránokhoz kötődő IbpA/B a sejt olyan, gyorsan reagálni képes védelmi eszközt képviseli, amelynek feladata a magashőmérsékleti stressz okozta károsodások kivédése ill. megfékezése. Az elsősorban külső membránhoz perifériálisan kapcsolódó IbpA/B képes a lipidek fejcsoport régiójában hatékonyan rigidizálni a membránt, ezáltal gátolni a membrán „kilyukadását”, megőrizni annak integritását. Az IbpAB hiánya a sejtben egyidejűleg jónéhány más gén expresszióját megváltoztatja, mellyel vélhetően kompenzatorikus alternatív védelmi eszközök kerülnek előtérbe. A sHsp-k nélkül a sejt egy szokatlan, egyedi lipidváltoztatást eszközöl, ami a 18:1v gyarapodásával és a membránok hidrofób (zsírsav) régiójának fluidizációjával jár együtt. Ennek pontos mechanizmusa továbbra is kérdéses, de további bizonyítékkal szolgál arra nézve, hogy az IbpA és/vagy IbpB hiánya membrán fenotípus változást eredményez. A Δ IbpAB sejtben exogén módon termelt IbpAB mintegy 50 %-ban állítja helyre a vad típusú membrán fenotípusát, a sHsp-k membrán védelemben betöltött közvetlen szerepéről tanúskodva. Minthogy az IbpA -az IbpB-vel szemben- önmagában is hasonló helyreállításra képes, és *in vitro* kísérleti ill. irodalmi adatok is az IbpA nagyobb membrán aktivitásáról árulkodnak, az IbpA minden bizonnyal meghatározóbb szereppel bír a membrán hőstabilitásának kialakításában. Annak érdekében, hogy az IbpA ill. IbpB membrán védelemben vállalt szerepéről még inkább helytálló képet kaphassunk, olyan konstrukciók tesztelése van folyamatban, melyekben az egyes shsp-k a saját promóter régiójuk szabályozása alatt, természetes módon működhetnek.

Az elért eredmények gyakorlati jelentősége

A cianobakteriális sejt hőaklimatizációs folyamatainak és az abban szerepet játszó tényezőknek a tanulmányozásával példát mutattunk arra, hogy a sHsp-membrán (lipid) kölcsönhatás funkciójának és mechanizmusának megértésével olyan fehérje szerkezeti (ld. pontmutációk) vagy lipid összetételbeli (ld. pl. MGlcDG) módosítások tervezhetők, amelyekkel megjósolható módon befolyásoljuk a tilakoid membrán funkciót ill. tágabb értelemben véve a cianobakteriális sejt stressz akklimatizációs képességét. Ilyen eredményekre (ld. pl. Q16R mutáns) épülő alkalmazott kutatások elvezethetnek pl. olyan transzgénikus haszonnövények kifejlesztéséhez, amelyek nagyobb aszálytűrő képességgel rendelkeznek.

Minthogy a sHsp-k ill. membrán asszociációjuk összefüggésbe hozhatók egy sor aktuális, gyakorlati jelentőségű kérdéssel (pl. fertőzések; autoimmun, degeneratív, kardiovaszkuláris betegségek, rák; szignál folyamatok, stb.), távlatibb célként megjelölve, membrán (lipid) kölcsönhatásuk mechanizmusának ismeretében a kölcsönhatás irányított módosítása komoly lehetőséget vagy előrelépést jelenthet a fentebb említett problémák megoldásában.

SUMMARY

All organisms are known to interact with their environment. This may involve a considerable stress to the organism that has to respond to this challenge by means of specific cellular processes. A number of cellular constituents can be damaged, e.g. DNA, proteins, membrane-forming lipids. Membranes are engaged in the preservation of cell integrity, in the structural and functional organization of cell components as well as in signalling processes. On the other hand, as judged from their intracellular location, structure and chemical composition, they are potential targets of various kinds of stress. They are, however, not just targets of stress, but also function as active sensors of changes in the physiological condition of the cell. As such they initiate stress responses such as expression of heat shock proteins and changes in the composition and dynamics of membrane lipids, ensuring thereby cell acclimatization. Heat shock proteins (Hsps) have been proved to bind to and stabilize membranes. Among Hsps small Hsps (sHsps) are particularly efficient in membrane protection.

The aim of this study was to investigate the mechanism and the functional importance of interaction between sHsps and membranes (focused on mainly membrane lipids). For this purpose we used two prokaryotes as experimental objects: a/ a photosynthetic cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803, because (i) it has but one sHsp, (ii) the beneficial effect of which is easily detectable by measuring photosynthetic activity and (iii) it is an excellent model of higher plants; b/ *Escherichia coli* (i) to explore the general nature of sHsp function on cellular membranes and (ii) to reveal the possible importance of having two existing sHsps instead of one as in *Synechocystis* PCC 6803.

Our results are summarized as follows:

1. The sHsp of *Synechocystis* PCC 6803, Hsp17, is known to interact with certain proteins during heat stress, keeping them in a refolding competent state for subsequent recovery. This sHsp also binds to and stabilizes thylakoid membranes protecting them against heat and photoinhibitory effects of light exposure, by which it confers higher stability on photosynthetic function. By means of the selective modulation of the membrane lipid phase it was concluded that the expression and membrane association of Hsp17 are correlated with the physical state (fluidity) of

thylakoid membranes. We aimed to reveal the factors that are involved in the acquisition of higher thermal stability of thylakoid membranes paralleled with the development of acquired thermotolerance of the photosynthetic apparatus.

We have concluded that heat-primed acclimation of *Synechocystis* cells resulted in the thermal stabilization of photosynthesis exclusively in the light. In parallel, a great increase in thermal stability and microdomain reorganization of thylakoid membranes was observed only in cells challenged by heat stress in the light. Analysis of membranes isolated from cells exposed to a sublethal (3 h, 42 °C) heat stress in the light revealed that changes in protein and lipid composition are likely to be involved in a short term acclimation process. In addition to a general lowering of the double bond content of lipids, a highly saturated MGlcDG, “heat shock lipid” appeared in the heat/light-acclimated membranes. This lipid is able to stabilize membranes by hindering the hyperfluidization of the membrane lipid phase and by inhibiting the formation of non-bilayer structures. Hsp17 is also able to regulate the membrane lipid phase as shown by its ability to recognize membrane hydrophobicity and by preferentially interacting with non-bilayer phase forming lipids (MGlcDG, MGDG). All in all, the “heat shock lipid” and Hsp17 are effective members of the stress defensive machinery of cyanobacteria. The highly saturated MGlcDG and Hsp17 are probably involved in the retailoring of membrane ultrastructure in heat/light-hardened cells conferring higher thermal stability on thylakoid membranes and related photosynthetic function.

2. To get a deeper insight into the mechanism of interaction between *Synechocystis* Hsp17 and membrane (lipids), we tested cells expressing point mutants of sHsp and the purified recombinant proteins themselves. These cells and proteins differed from their wild type counterparts in terms of their thermotolerance and their oligomeric state as well as *in vitro* chaperone activity, respectively.

When mutations resulting either in a stable dissociation of sHsp oligomers to dimers (L66A, F102S, V143A) or in a sHsp oligomer with reduced ability to dissociate (S2Y) were tested, it turned out that dissociation and reassociation of the Hsp17 oligomer is necessary to enable sHsp to stably interact with membrane (lipid)s. Dimers (possibly monomers) appear to associate with lipid membranes. N-terminal point mutant proteins (L9P and Q16R) proved to behave differently with respect to their ability to associate with lipids and to protect thylakoid function. L9P had a lesser, Q16R a higher membrane activity than the WT protein. These results led us *to*

conclude that the N-terminal part of the protein is responsible for membrane (lipid) interaction. In heat/light-acclimated cells the Q16R protein was localized exclusively to thylakoid membranes. By its superior membrane activity this mutant protects thylakoid function against damages caused by photoinhibitory UV-B stress. Results obtained from *in vitro* protein-lipid interaction studies are correlated with those describing the *in vivo* behaviour (membrane localization and protection) of Hsp17s (L9P and Q16R). All things considered, the *in vivo* membrane activity of Hsp17 is likely governed (at least partly) by sHsp-lipid interactions.

3. The *Escherichia coli* sHsps IbpA and IbpB are known to protect soluble proteins from aggregation caused by extreme, long term heat effects *in vivo*. Overexpression of these sHsps, however, was shown to confer thermotolerance on cells even upon short term heat exposure. This implies that IbpA/B may protect essential cellular components or compartments other than soluble proteins. *E. coli* sHsps are believed to be localized to membranes. This is supported by the finding that selective modulation of the membrane lipid phase triggers heat shock response and leads to the acquisition of thermotolerance. Based on the above data we decided to check the potential role of IbpA and IbpB in the heat acclimation of *E. coli* cell membranes. To this end we compared the membrane phenotype (permeability, fluidity and fatty acid composition) of wild type cells with that of Δ IbpAB cells *in vivo* and tested the interaction of lipids and purified recombinant proteins (IbpA and IbpB) *in vitro*. Moreover, to define the direct effect of sHsps on heat acclimation of cellular membranes, to differentiate between their function and to see whether or not they cooperate in membrane protection, we investigated the membrane phenotype of Δ IbpAB cells expressing exogenous IbpA, IbpB or IbpAB.

We found that IbpA/B is essential for a rapid, complete heat acclimation of cellular membranes. Both IbpA and IbpB preferentially associate with the outer membrane of *E. coli* cell during heat stress. These loosely attached membrane proteins (IbpA/B) greatly increase the rigidity of the membrane head group region, protecting thereby the permeability barrier and preserving membrane integrity. Intriguingly, deletion of *ibpAB* altered the gene expression profile of several other biomolecules. The absence of IbpAB resulted in a unique change in the fatty acid composition of cell membranes. An increase in the amount of 18:1v was in agreement with the fluidization of the hydrophobic region of membranes. We suggest that all changes in the gene expression pattern caused by the deletion of *ibpAB* are intended

to reduce the deleterious effects of sHsps removal. Exogenously produced IbpAB in Δ IbpAB cells restored by 50% the membrane permeability of WT cells, supporting their immediate role in membrane protection. Since IbpA by itself was able to restore membrane phenotype to a similar extent, in contrast to IbpB, and *in vitro* experimental results as well as literature data also yield evidence for its higher membrane activity, IbpA must play a most decisive role in membrane protection. To get more insight into the protective effect of IbpA and IbpB, constructs are being made in which individual shsps are under the regulation of their own promoters.

Possible practical importance of our results

The present study showed that by revealing the function and the mechanism of sHsp-membrane (lipid) interaction, modifications either in protein structure (see point mutations) or lipid composition (see e.g. MGlcDG) could be engineered. The effect of these modifications could be predicted on thylakoid membrane function or, in general, cell acclimatization. Such basic information (e.g. Q16R mutant) may help in the development of transgenic plants characterized with e.g. higher drought resistance.

Since sHsps and their association with membranes are apparently involved in a number of phenomena of practical importance (drought resistance of plants, infections, autoimmune, degenerative, cardiovascular diseases, cancer, signalling processes, etc.), controlled modification of sHsp-membrane interaction may lead to a breakthrough in the solution of at least some of the above problems.