

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

Doktori (Ph.D) értekezés

Varvasovszki Viktória

Témavezető: Vígh László, Ph.D, D. Sc

A Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központja,
Biokémiai Intézet,
Molekuláris Stresszbiológiai Kutatócsoport

Szeged, 2003.

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK.....	4
BEVEZETÉS.....	5
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
1. A molekuláris chaperone-ok.....	7
2. A 70 kDa-os hősokk fehérje osztály: szerkezet és funkció.....	8
2.1. A Hsp 70 család részvétele a <i>de novo</i> fehérje foldingban.....	10
2.2. Vészhelyzet a sejtben: a DnaK-család fehérjementő szerepe.....	12
3. A <i>hsp 70</i> géncsalád és transzkripció szabályozásuk prokariótákban.....	13
3.1. A <i>dnaK/dnaJ/grpE</i> hősokk gének organizációja.....	13
3.2. σ^{32} faktor: pozitív reguláció <i>Escherichia coli</i> -ban.....	14
3.3. A negatív szabályozás útja: CIRCE és a HrcA fehérje.....	16
4. Nem hőindukálható prokarióta <i>hsp 70</i> -homológ géncsaládok.....	18
4.1. A <i>hscB-hscA-fdx</i> operon.....	18
4.2. Az <i>ybeS-ybeV-ybeW</i> lókuszt.....	20
4.3. Magányos <i>dnaJ</i> -típusú gének: <i>djlA</i> és <i>cbpA</i>	20
5. Kísérleti modellünk, a <i>Synechocystis</i> PCC6803.....	21
6. A <i>hsp 70</i> család cianobakteriális képviselői.....	23
7. A biológiai membránok és a hőmérsékleti stressz kapcsolata.....	24
7.1. A membrán, mint a “sejt hőmérője”.....	24
7.2. A hősokk fehérjék szerepe a biológiai membránok védelmében.....	27
ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	29
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	31
EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	42

1. A <i>hsp 70</i> géncsalád expressziójának tanulmányozása <i>Synechocystis</i> -ben....	42
2. A DnaK2 fehérje celluláris lokalizációja.....	46
3. <i>dnaK2</i> -mutáns <i>Synechocystis</i> törzs előállítása.....	47
4. A <i>dnaK2</i> részleges inaktiválásának hatása a többi chaperone gén kifejeződésére: változások génexpressziós és fehérje szinten.....	49
5. A <i>dnaK2</i> -mutáns sejtvonal fiziológias változásainak vizsgálata: a nagy intenzitású fény és az UV-B sugárzás következményeinek feltárása...	55
6. A DnaK2 kulcsszerepének további bizonyítékai: változások a biológiai membránok fizikai állapotában és összetételében.....	62
AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	67
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	70
PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	71
IRODALOMJEGYZÉK.....	73
MAGYAR NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ	
ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ	

RÖVIDÍTÉSEK

ATP	adenozin-trifoszfát
Chl	klorofill
cpn, Cpn	chaperonin
dNTP	dezoxi-ribonukleotid-trifoszfát
DPH	1,6-difenil 1,3,5,-hexatrién
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
Hsp	hőstressz-fehérje
IR	“inverted repeat”, fordított ismétlődéses szekvencia
kDa	kilodalton
kb	kilobázis
Km	kanamicin
nt	nukleotid
OD	optikai denzitás
ORF	“open reading frame”, nyitott leolvasási keret
PCR	“polymerase chain reaction”, polimeráz láncreakció
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PSII	a fotoszintetikus rendszer kettes számú komplexe
RNáz	ribonukleáz A
Rubisco	ribulóz-1,5-bifoszfát karboxiláz/oxigenáz
SDS	Na-dodecilszulfát
TE	Tris/EDTA : 10/1
Tris	tris(hidroximetil)aminometán

BEVEZETÉS

A stressz az élőlények mindennapi létének szerves része. A különböző károsító hatások elleni védekezés az élő szervezetek energiájának nem elhanyagolható hányadát veszi igénybe, mivel megfelelően gyors és meglepően bonyolult válaszreakciókat kíván. E rendkívül specifikus védekezési mechanizmusok nélkül a szervezetek –legyen szó akár egysejtű baktériumról vagy magáról az emberről - rövid idő alatt elpusztulnának. Nem meglepő tehát, hogy az élőlények sejtszintű stresszelhárító rendszerek egész tárházát fejlesztették ki és használják életük során. Ezek egyike a stresszfehérjék (molekuláris chaperone-ok) világa, mely funkciójukban rokonságot mutató, de szerkezetükben eléggé eltérő fehérjékből épül fel. Működésüket tekintve igen sokféle szinten vesznek részt a sejtek “védelmi vonalának” kialakításában: nemcsak a különböző sejtalkotókat érő káros hatások ellen veszik fel a harcot, de normál körülmények között fiziológiás folyamatokat is szabályoznak.

Munkacsoportunk fő kutatási területe a különböző stresszhatásokra nézve finomszerkezetéből eredően különlegesen érzékeny biológiai membránok védekezési mechanizmusainak tanulmányozása. Modellszervezetünk a cianobaktériumok közé tartozó *Synechocystis* PCC 6803 törzs, mely kísérleteink kiváló alanyául szolgál, mivel tenyésztése egyszerű, genetikailag viszonylag könnyen manipulálható és rajta a stressztényezők élettani hatása is jól mérhető.

Jelen értekezésben a stresszfehérjék egyik legelterjedtebb csoportjának, a Hsp70 chaperone családnak különböző stresszhatások kivédésében való részvételét kívánjuk felderíteni *Synechocystis* sejtekben, különös tekintettel a biológiai membránokhoz kapcsolható folyamatok védelmében betöltött szerepükre.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Földünk élőlényei szoros kapcsolatban élnek saját élő és élettelen környezetükkel, ahonnan állandó ingerek érik őket, melyek egy része kimeríthetetlen veszélyforrást jelent számukra. Ezen környezeti tényezők károsító hatása ellen különböző válaszreakciókkal igyekeznek védekezni, melyek között vannak erősen specializált, pl. egy adott fajra, vagy a hasonló környezeti viszonyok között élőkre jellemző elhárító folyamatok és általánosan kialakult nagy védekezőrendszerek is. Miután a sejteket érő stresszhatások típusai (pl. hő-, oxidatív-, ozmotikus-, sóstressz...stb.) a prokariótáktól a magasabbrendűekig minden élő esetben hasonlóak, nem meglepő, hogy a celluláris stresszválasz elemei a legáltalánosabban elterjedt elhárító mechanizmusok közül kerülnek ki. Ilyen rendkívül konzervatív "védőháló" az ún. stresszfehérjék rendszere is, melyek a negatív környezeti hatások (pl. magas hőmérséklet) által provokált károsodásoktól védi az arra érzékeny sejtalkotókat, fehérjéket, sejtmembránokat. További vizsgálatuk során kiderült, hogy nemcsak a különböző stresszek során, de az alapvető életfunkciók ellátása szempontjából is nélkülözhetetlenek a sejtek számára. A fenti tények tükrében nem meglepő, hogy ezen fehérjék működésének vizsgálata az utóbbi húsz év legintenzívebben kutatott témái közé tartozik (részletes irodalom: Vierling és mtsai, 1991; Jindal, 1996; Vígh és mtsai, 1997.). A stresszfehérjéknek számos, eltérő vagy egymás hatását kiegészítő funkcióval rendelkező csoportja közül a 100, 90, 70, 60, 10 kDa-os és a kis molekulatömegű hősokk proteinek (Hsp) családja a legismertebb.

1. A molekuláris chaperone-ok

Egy, az 1970-es évektől általánosan elfogadott elmélet szerint minden fehérje képes önmagától elérni funkcióképes térszerkezetét, egyéb külső faktor segítségével. Ezt az elméletet felfedezőjéről Anfinsen-teóriának nevezték el. Anfinsen a ribonukleáz-A enzim *in vitro* önrendeződését vizsgálva feltételezte, hogy a fehérjék elsődleges szerkezete (aminosav sorrendje) elegendő információt hordoz működőképes harmadlagos szerkezetének eléréséhez (Anfinsen, 1973).

1978-ban Laskey és munkatársai a nukleoplazmin vizsgálatokor tapasztalták, hogy ez a fehérje elősegíti a nukleoszómák - a kromatin állomány DNS-ből és hisztonfehérjékből álló egységének – felépülését. Azt ezt követő években végzett számos kísérlet is bizonyította, hogy a korábban elfogadott Anfinsen-elmélet *in vivo* nem kizárólagos, mivel számtalan fehérje működőképes térszerkezetének eléréséhez általában segítő molekulákat igényel.

Ebben az időben állították fel a molekuláris chaperone-ok elméletét, melyet később számos felfedezéssel és megfigyeléssel igazoltak. A “molekuláris chaperone” elnevezést Laskey használta először a nukleoplazminnal kapcsolatban (Laskey és mtsai, 1978.). 1980-ban Ellis felfedezte, hogy a fotoszintézis egyik lépésében, a CO₂ megkötésében kulcsszerepet játszó Rubisco enzim alegységeiből történő összeszerelését is chaperone-ok végzik. 1986-ban Pelham megtalálta a 70, ill. 90 kDa-os Hsp-család tagjait állati sejtmagban, citoplazmában és endoplazmatikus retikulumban. Közleményében felvetette, hogy e két fehérjecsalád nem csak stresszkörülmények között védheti a fehérjéket, hanem segíthetik a protein komplexek összeszerakását és szétszerelését normál körülmények között is.

A molekuláris chaperone-ok fogalmának leírása 1987-ből származik és John Ellis nevéhez fűződik. Az első változathoz képest a szerző végrehajtott ugyan kisebb módosításokat (Ellis, 1987; 1990 a,b; 1992; 1993), de ezek a chaperone-ok alapértelmezését számottevően nem befolyásolták. Jelenleg elfogadott definíciójuk a következő:

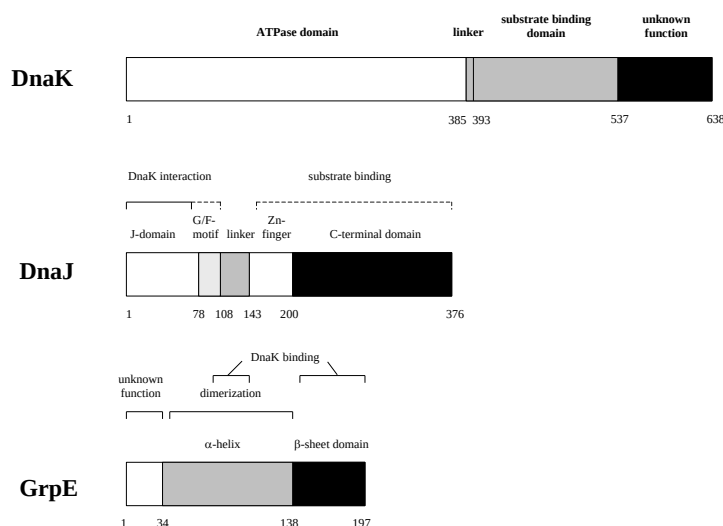
A molekuláris chaperone-ok olyan funkciójukban rokon, de szerkezetükben egymástól igen különböző fehérjék, melyek elősegítik a fehérjetartalmú struktúrák nem kovalens össze- és/vagy szétszerelését ATP felhasználásával *in vivo*, oly módon, hogy ők maguk nem részei az így kialakult aktív struktúráknak (Ellis, 1997).

Számos csoportjuk ismert, melyek tagjai között semmilyen szerkezeti hasonlóság nincs és szerepük is rendkívül változatos lehet. A molekuláris chaperone-ok működéséről ugyanis az elmúlt években kiderült, hogy nem korlátozódik pusztán a *de novo* proteinek helyes térszerkezetének kialakítására, hatáskörük ennél jóval szerteágazóbb. Funkcióik közé tartozik a makromolekulák egymással történő hibás kapcsolódásának megakadályozása, a fehérje-aggregáció gátlása, a már kialakult aggregátumok méretének csökkentése ill. az ezekben található fehérjék renaturálása. Jelentős szerepük van a membránokon át zajló transzportfolyamatokban, ugyanakkor stresszhatások esetén általános sejtvédő tulajdonságokat mutatnak.

2. A 70 kDa-os hőszokk fehérje osztály: szerkezet és funkció

A molekuláris chaperone-ok egyik legintenzívebben tanulmányozott csoportja a Hsp 70 család, melyek tagjai a DnaK (70 kDa) fehérje illetve a DnaJ (40 kDa) és a GrpE (20 kDa) co-chaperone-ok. Jelenlétüket először *Escherichia coli*-ban igazolták

(Zylicz és Georgopoulos, 1984; Zylicz és mtsai, 1985; 1987), később azonban más baktériumokban és eukariótákban is megtalálták homológjaikat; utóbbiakban az elnevezésük Hsp 70, 40 illetve 20. Általában monomer (DnaK, DnaJ) vagy dimer (GrpE) formában fordulnak elő.



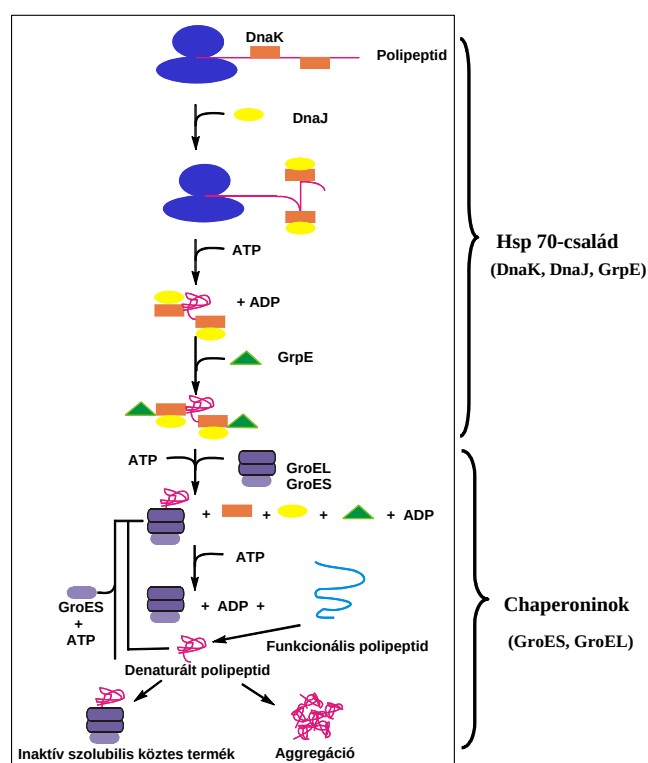
1. ábra. A DnaK, DnaJ és GrpE fehérjék domén-szerkezete (Bukau és Horwich, 1998). A számok a domének illetve a szerkezeti elemek hozzávetőleges határait jelzik.

A DnaK fehérje alapvetően két funkcionális részből áll: az N-terminális végen található 45 kDa tömegű ATP-kötő doménből és a 15 kDa-os C-terminális szubsztrátkötő alegységből, melyet egy kevésbé konzervatív, 10 kDa-os régió követ. A fehérje kötőhely erősen hidrofób, helikális elemekből álló üreg, melynek harmadlagos szerkezete az adott szubsztrát alakjától függően változik (Bukau és Horwich, 1998, 1. ábra). A DnaJ proteinek felépítése jóval heterogénebb. Minden képviselőjükben megtalálható a kb. 80 aminosavból álló, ún. J-domén, mely a DnaK ATP-bontó aktivitását modulálja, ezen kívül általában tartalmaznak glicinben és fenilalaninban gazdag régiót, “Zn-finger” szekvenciát, C-terminálisukon szubsztrát kötő helyet, de gyakran előfordul, hogy az utóbbiak közül egyik-másik, esetleg

mindhárom elem hiányzik A GrpE molekulák szerkezete kevésbé tisztázott. Annyi bizonyos, hogy a DnaK-hoz való kötődésért és saját dimerizációjáért felelős motívumokat hordoz.

2.1 A Hsp 70 család részvétele a *de novo* fehérje foldingban

Fiziológiás körülmények között a Hsp 70 chaperone család szerepet játszik a *de novo* szintetizálódó fehérjék aktív térszerkezetének kialakításában, melyet egy másik chaperone-csoporttal, a Hsp 60-család tagjaival szoros összefüggésben, “chaperone hálózatot” alkotva végeznek (2. ábra).



2. ábra. A Hsp70-család és a chaperoninok együttműködése a *de novo* fehérje folding során. Az ábra részletes magyarázatát lásd a szövegben.

E működésük során a DnaJ és a DnaK chaperone-ok hozzákötődnek a riboszómáról éppen legördülő újonnan képződő fehérjelánchoz, és a DnaK által

végzett, DnaJ katalizálta ATP-hidrolízis kíséretében lezajlik a fehérje feltekerése egy adott konformációs állapotig, majd a nukleotid-cserélő GrpE az így képződő ADP molekulát leválasztja. A DnaK molekula a fent ismertetett folyamatot önmagában is képes elvégezni, de rendkívül kis hatékonysággal. Co-chaperonjai katalitikus segítségével viszont a folding sebessége több ezerszeresére nő. Ezt követően a Hsp 60 család tagjai veszik át a részben feltekeredett szubsztrátot és segítik azt végső térszerkezetének elérésében. Ez a ciklus szükség esetén többször megismétlődhet (részletes irodalom: Bukau és Horwich, 1998; Mayer és mtsai, 2000; Netzer és Hartl 1998; Hartl, 1996).

Normál körülmények között - 30°C-on - a DnaK-család az *E. coli* sejtekben újonnan képződő fehérjék kb. 5-18 %-ának foldingját végzi, 30 kDa-nál nagyobb molekulatömegű szubsztrátjai szabad hidrofób felszíneihez kapcsolódva (Deuerling és mtsai, 1999). Újabb eredmények szerint ebben a funkcióban egy riboszómához kötött peptidil-prolil cisz/transz izomeráz aktivitással is rendelkező másik chaperone, az ún. trigger faktor is részt vesz. Működésük között lényeges különbség azonban az, hogy míg a DnaK mind a naszcens, mind a teljesen elkészült fehérjelánccal kapcsolódhat, a trigger faktor csak az éppen szintetizálódó polipeptidhez képes kötődni (Schaffitzel és mtsai, 2001; Deuerling és mtsai, 1999; Teter és mtsai, 1999).

A Hsp 70 csoport részt vesz bonyolult fehérje komplexek összerakásában ill. szétszerelésében is. Kimutatták például, hogy e chaperone-ok jelenléte feltétlenül szükséges a λ -fág DNS replikációjának indításához, mely folyamat alapvető feltétele a szorosan összetekeredett nukleoprotein struktúrák felbontása (Zylicz és mtsai, 1989.) A fentieken kívül szerepük van a membránokon át zajló transzlokációs folyamatok irányításában, úgy az *E. coli* belső membrán (Wild és mtsai, 1996), mint

az eukarióta sejtorganellek (mitokondrium, endoplazmatikus retikulum) esetében (Stuart és mtsai, 1994; Lyman és Schekman, 1996).

2.2. Vészhelyzet a sejtben: a DnaK-család fehérjementő szerepe

Magas hőmérsékleten - 37 °C felett - a Hsp70 család mindhárom tagjának jelenléte eszenciális az *E. coli* sejtek életben maradása szempontjából. Ez a nélkülözhetetlenség abból a többszörösen bizonyított megfigyelésből is következik, hogy a chaperone-ok alapvető szerepet játszanak az extrém körülmények hatására denaturálódott fehérjék szerkezetének megmentésében (Kusukawa és Yura, 1988; Gragerov és mtsai, 1992; Mogk és mtsai, 1999). A DnaK család azonban nemcsak a hibás szerkezetű fehérjék aggregációját képes gátolni illetve funkcionális formájukba való visszaalakulásukat segíteni. Zylicz és munkatársai már a 90-es évek fordulóján kimutatták, hogy jelentős szerepet vállalnak a már kialakult aggregátumok szétbontásában is (Skowrya és mtsai, 1990). Újabb vizsgálatok alapján kiderült, hogy feleslegben adott DnaK közreműködésével a nagyobb aggregátumok is felbonthatóak és hogy a Hsp70 csoport tagjai ebben a mentési folyamatban egy Hsp100-homológ molekulával, a ClpB-vel kooperációban vesznek részt. Utóbbi feladata a legbonyolultabb aggregátumok fellazításában áll; több hidrofób felszín szabaddá tételével pedig a DnaK fehérje működését is hatékonyabbá teszi (Diamant és mtsai, 2000). Az *E. coli* Hsp 70-homológjáról kiderült, hogy a fehérjék mellett a DNS negatív szuperhélix szerkezetét is képes védeni a magas hőmérséklet okozta konformáció-változástól (Ogata és mtsai, 1996).

A különböző stresszek által a fehérjék szerkezetében okozott hibák elhárításában a Hsp70 családból azonban nemcsak a DnaK molekula nélkülözhetetlen. Huang és munkatársai (2001) nemrégiben kimutatták, hogy a DnaJ co-chaperone elengedhetetlenül szükséges a citoszolban képződő abnormális proteinek degradációjához, mivel hozzájuk kötődve mintegy felkínálja őket a lebontó proteáz enzimeknek. Némelyik proteáz DnaJ jelenléte nélkül teljesen működésképtelen.

A Hsp 70-család szerepére nézve tehát összefoglalásul elmondható, hogy a fehérjék mentésében, az aggregációs folyamatok gátlásában kifejtett tevékenységük eszenciális, a *de novo* szintetizálódó proteinek összeszerelésében pedig a többi chaperone-csoporttal együttműködve vesznek részt.

3. A *hsp 70* géncsalád és transzkripció szabályozásuk prokariótákban

3.1. A *dnaK/dnaJ/grpE* hősokk gének organizációja

Általánosságban elmondható, hogy a prokarióta *dnaK* család génjei egy kópiában vannak jelen a genomban, elrendeződésük a *grpE-dnaK-dnaJ*, a *dnaK-grpE-dnaJ* vagy a *dnaK-dnaJ* és magányos *grpE* szerveződést követi. Operonjaik elején illetve végén gyakran található szabályozásukban résztvevő fehérjét kódoló gén. Promóter régiójuk sok esetben egy igen konzervatív IR (fordított ismétlődéses) szekvenciát tartalmaz, mely szintén fontos operátor elemnek bizonyult (Segal és Ron, 1996).

Escherichia coli-ban a hősokk protein 70 géncsalád hőindukálható tagjai egy kópiában és két külön operonban (*dnaK-dnaJ* és *grpE*) találhatóak meg (Yochem és mtsai, 1978). Mindhárom gén eszenciális a sejt életben maradása szempontjából 43°C

felett. Inszerciós és nullmutánsaik permisszív hőmérsékleten (37°C-ig) nőnek, bár a vad típusnál sokkal lassabban (Zylicz és mtsai, 1987). Egy *grpE* misszensz mutáns (*grpE280*) vizsgálatokor érdekes dologra derült fény. Ez a mutáns törzs 50 °C-on is képes életben maradni – a vad típushoz hasonló mértékben, – ha előzőleg rövid ideig enyhébb hősokk (42°C, 15 percig) éri. Előkezelés nélkül viszont – meglepő módon - a vad típusnál sokkal nagyobb hőtűrést mutat (Delaney, 1990).

Az *E. coli* *dnaK*, *dnaJ* és *grpE* génjei fiziológias körülmények között konstitutívan expresszálódnak, transzkripciójuk a magas hőmérsékleten kívül számos más stresszhatással indukálható, így például ozmotikus sokkal, elektromágneses térrel, extrém pH-val, alkoholokkal, hidrogén-peroxiddal, nehézfémekkel, aminosav-analógokkal, glükóz éhezéssel (Meury és Kohiyama, 1991; Chow, 2000; Chow és Tung, 2000).

3.2. σ^{32} faktor: pozitív reguláció *Escherichia coli*-ban

Az *E. coli* hősokk válasza az RNS polimeráz egy hősokk promóter-specifikus σ alegységének, a σ^{32} -nek pozitív regulációja alatt áll. A σ^{32} -szint és -aktivitás gyors változtatásával a sejt nagyon rövid idő alatt képes reagálni a magas hőmérséklet által előidézett vészhelyzetekre, illetve ezután a stresszmentes életfeltételek visszatérésére. Fiziológias körülmények között pedig a σ^{70} -nel kiegészült RNS polimeráz gondoskodik a konstitutív chaperone expresszióról. Irodalmi adatok szerint legalább öt promóter irányítja a σ^{32} -t kódoló *rpoH* gén átírását; közülük négy (P1, P2, P4, P5,) σ^{70} -dependens, míg az ötödik (P3) σ^{24} -függő, és csak extrém magas hőmérséklet (51°C) esetén felelős a σ^{32} szintéziséért (Erickson és Gross, 1989; Yura és mtsai, 1993). Az *rpoH* transzlációja normál hőmérsékleten erősen represszált, de hősokk

során ugrásszerűen aktiválódik: a fehérje mennyisége 2-4 perc alatt képes elérni az alapállapot tizenkétszeresét. Ezután képződése a hőstressz végéig fokozatosan csillapodik, majd visszatér az eredeti szintre (Connolly és mtsai, 1999). A translációban bekövetkező mennyiségi változás összetett módon szabályozódik. Az *rpoH* mRNS 5' végén található három régiója (A, B, C) segítségével bonyolult másodlagos szerkezetet vesz fel (Nagai és mtsai, 1994). Hősokk hatására ez az összetekeredett struktúra fellazul, ezáltal az mRNS riboszómához való kötődése és így a transláció iniciációja könnyebben végbemegy, a fehérje gyorsabban, illetve nagyobb mennyiségben készül el (Morita és mtsai, 1999). A σ^{32} faktornak a *hsp* gének kifejeződésére gyakorolt hatása azonban nemcsak a fehérje mennyiségétől, hanem stabilitásától illetve aktivitásától is függ (Gross, 1996; Connolly és mtsai, 1999). Fiziológiás helyzetben a σ^{32} féléletideje 1 percnél kevesebb, míg a hőmérséklet 30°C-ról 42°C-ra történő emelésére kb. nyolcszor stabilabbá válik. A σ^{32} fehérje lebontásában valószínűleg egy ATP-függő membránkötött metalloproteáz, az FtsH is részt vesz, ugyanis hiányában a σ^{32} -faktor rendkívüli módon stabilizálódik *in vivo*, féléletideje 2 órára nő (Tatsuta és mtsai, 1998). Kísérletek sorozatával bizonyított tény, hogy maga a DnaK/DnaJ/GrpE rendszer is befolyásolja saját szabályozó faktorának aktivitását *in vivo*, mégpedig negatív módon (Gross 1996; Tatsuta és mtsai 1998; Connolly és mtsai, 1999; Bukau, 1999). E folyamat során először a DnaJ, majd a DnaK molekula kötődik reverzibilisen a σ^{32} -höz, és ATP felhasználása mellett fogva tartja azt. A GrpE ezzel némileg ellentétesen hatva képes a kötést destabilizálni. A σ^{32} tehát a Hsp 70 család természetes szubsztrátjaként viselkedik és megkötése során a *de novo* fehérjék foldingjához hasonló chaperone-kaszád játszódik le. A felszabadult faktor sorsa - a sejt pillanatnyi igényeinek megfelelően – többféle lehet. Egyrészt hőstressz esetén a chaperone-ok a σ^{32} -t az RNS polimeráznak adják át, így

biztosítva a saját és más *hsp* gének aktiválását, míg fiziológias esetben különböző proteázok segítségével degradálódik (összefoglaló irodalom: Arsene és mtsai, 2000).

A fenti adatok tükrében tehát az *E. coli hsp* génjeinek regulációját az alábbi módon képzelhetjük el. Normál körülmények között a Hsp szintet a σ^{70} -RNS polimeráz biztosítja. Ekkor nagyon kevés σ^{32} szintetizálódik, azt is fogva tartják a DnaK család tagjai, így a Hsp indukció gátolt. Hősokk hatására azonban a sejtben fehérjék denaturálódnak, aminek következtében fokozott igény mutatkozik a chaperone-ok "mentő tevékenysége" iránt. Az aktivitásukat veszítő fehérjék így módon a σ^{32} elengedésére, a gátlás feloldására készítetik a DnaK családot, ezzel lehetővé téve a hőszokk gének indukcióját. Amennyiben feladatuk ellátására elegendő chaperone molekula készült el, a Hsp 70 család tagjai ismét foglyul ejtik a σ^{32} fehérjét illetve gátolják szintézisét, minek következményeként a hőindukció megszűnik. Így a chaperone-gének szabályozása egy autoregulációs folyamatnak tekinthető, amelyben az egyik végtermék (a DnaK család) szabályozza önmaga szintézisét (Bukau, 1993; Georgopoulos és Welch, 1993; Yura és mtsai, 1993). A DnaK fehérjét a hőszokk-válasz szabályozásában betöltött szerepe miatt az *E. coli* celluláris hőmérsékletének is szokás tekinteni (Bukau, 1993; Mager és De Kruijff, 1995).

3.3. A negatív szabályozás útja: CIRCE és a HrcA fehérje

1989-ben Baird és munkatársai egy fordított ismétlődéses szekvencia jelenlétéről számoltak be a *Mycobacterium tuberculosis* 10 kDa-os chaperone-ját kódoló gén promóter régiójában (Baird és mtsai, 1989). E nagyon konzervatív szekvenciát később számos eubaktérium hőszokk operonja előtt megtalálták, transzkripciós regulációban játszott szerepére vonatkozó első adatokat pedig -

Bacillus subtilis modellen végzett vizsgálataik eredményeként - Zuber és Schumann (1994) közölte. *Bacillus subtilis*-ben a *hsp 70* operon heptacisztronos; a *hrcA* (orf39), *grpE*, *dnaK*, és *dnaJ* kódoló szekvenciáit három, nem hőindukálható gén (orf 35, 28 illetve 50) követi. Az operon elején található konzervatív IR (TTAGCACTC-N₉-GAGTGCTAA) egy negatív *cis*-regulátor szekvencia, amelyet CIRCE (Controlling IR of Chaperone Expression) néven tart számon a szakirodalom (Zuber és Schumann, 1994). Kimutatták, hogy az első gén terméke, a HrcA fehérje normál körülmények között a CIRCE-hez kötődik, ezzel represszálva a transzkripciót, hősokk során viszont leválik onnan, és lehetővé teszi a *hsp* mRNS-ek képződését (Homuth és mtsai, 1997). *In vitro* kísérletek során megfigyelték, hogy a 60 kDa-os chaperonin GroEL hozzáadása csökkenti a HrcA aggregációját, és növeli a fehérje DNS-kötő aktivitását (Mogk és mtsai, 1997). Ezek alapján feltételezhető, hogy optimális növekedési körülmények között a chaperonin valamilyen módon aktív formában tartja a represszort, gátolva a CIRCE-függő gének expresszióját. Hősokk estén a GroEL a denaturálódó fehérjék helyreállítását végzi, így az inaktívvá váló represszor nem akadályozza az emelt szintű expressziót. Feladata végeztével a chaperonin ismét aktivizálja a HrcA-t, ami gátolja a CIRCE-függő fehérjék transzkripcióját (Narberhaus, 1999).

A fenti ismertetett negatív szabályozási forma az eubaktériumok körében általánosan elterjedt (összefoglaló irodalom: Segal és Ron, 1996; Yura és Nakahigashi, 1999; Narberhaus, 1999) és elmondható, hogy a *dnaK* operonok döntő többségének regulációját a CIRCE szekvencia és a HrcA represszor együttműködő kettőse végzi.

4. Nem hőindukálható prokarióta *hsp 70* - homológ géncsaládok

Jelenlegi ismereteink alapján - a részletesen tanulmányozott *dnaK/dnaJ/grpE* rendszeren kívül – még további két *hsp 70*- és öt *hsp 40*-homológ gén létezik *Escherichia coli*-ban. Két *dnaJ*-típusú gén kivételével fehérje terméküket is sikerült azonosítani. Legmeglepőbb közös tulajdonságuk, hogy hősokk során nem képződnek nagyobb mennyiségben, tehát nem tekinthetők hősokk fehérjének, de általában rendelkeznek chaperone-aktivitással. Az irodalomban sejtbeli funkciójukról kevés adat áll rendelkezésre.

4.1. A *hscB* – *hscA* – *fdx* operon

1994-ben – egymástól függetlenül – két munkacsoport is újabb *hsp 70*- típusú génről számolt be *E. coli*-ban (Seaton és Vickery, 1994; Kawula és Lelivelt, 1994). A *hscA* (heat shock cognate A) gén közös operont alkot a *dnaJ*-homológ *hscB*-vel, illetve a ferredoxint kódoló *fdx*-szel, 5' régiójukban σ^{32} konszenzus szekvencia található. Expressziójuk ennek ellenére mind normál, mind hősokk körülmények között konstitutívnak bizonyult, csupán alacsony hőmérsékleten indukálódnak kismértékben (Lelivelt és Kawula, 1995). Mutáns törzseik 30 és 42°C-on egyaránt életképesek, normális morfológiát mutatnak, növekedésük azonban a vad típushoz mérten lassabb.

A *hscA* gén terméke a 66 kDa molekulatömegű Hsc66 (HscA) fehérje, mely az *E. coli* DnaK-val 62% -os szekvencia-homológiát mutat, főleg az N-terminális ATP-áz domén területén. A *hscB* gén egy 21 kDa-os DnaJ-homológot kódol (Hsc20 vagy HscB), a fehérjék ezen csoportjára jellemző ún. J-domén is megtalálható benne

(Kawula és Lelivelt, 1994). A Hsc66 bizonyítottan ATP-bontó funkcióval rendelkezik, melyet a Hsc20 működése katalizál és – a DnaK/DnaJ rendszerhez hasonlóan - molekuláris chaperone gépet alkotva gátolják egyes fehérjék aggregációját (Vickery és mtsai, 1997; Silberg és mtsai, 1998; Hesterkamp és Bukau, 1998). A két chaperone-rendszer egyes tagjai működésükben *in vitro* helyettesíthetik homológjukat: például a DnaJ is képes katalizálni a Hsc66 ATP-bontó aktivitását. A Hsc20 viszont nem stimulálja a DnaK-t. A GrpE co-chaperone-t kódoló gén egyetlen kópiában található meg az *E. coli* genomban és specifikusan csak a DnaK-val működik együtt (Silberg és mtsai, 1998). Ennek alapján úgy tűnik, hogy a Hsc66-nak – az eukarióta citoszolikus Hsp 70 fehérjékhez hasonlóan (Minami és mtsai, 1996) – feladatai ellátásához egyedül a DnaJ-homológ jelenléte is elegendő.

A Hsc66/Hsc20 rendszer számos más baktériumban is előfordul (Silberg és mtsai, 1998). A *hscB-hscA-fdx* operon előtt általában olyan konzervatív gének csoportja található, amely a redox illetve katalitikus folyamatokban résztvevő vas-kén tartalmú komplexet alkotó fehérjéket kódolja. Ezek egyikéről, az IscU proteintről kimutatták, hogy a Hsc20-hoz hasonlóan részt vesz a Hsc66 chaperone katalizálásában (Hoff és mtsai, 2000).

A fenti irodalmi eredményeket összegezve megállapítható, hogy a Hsc66/Hsc20 rendszer is rendelkezik chaperone aktivitással, konstitutívan kifejeződő volta miatt azonban valószínűleg fiziológiás körülmények között működik és más proteinekkel együttműködve szerepe lehet a vas-kén tartalmú fehérjekomplexek összerendezésében is.

4.2. Az *ybeS-ybeV-ybeW* lókuszt

1998-ban egy harmadik *hsp 70*-homológot is azonosítottak *E. coli*-ban (Yoshimune és mtsai, 1998). Az *ybeW* gén kódolta 62 kDa molekulatömegű Hsc62 33%-os szekvencia-homológiát mutat mind a DnaK, mind pedig a Hsc66 fehérjékkel. Szintén rendelkezik ATP-bontó aktivitással, melynek *in vitro* körülmények között mért optimuma a másik két homológjénál alacsonyabb hőmérsékleten (Hsc62: 40°C, Hsc66: 45°C, DnaK: 60°C) van. Érdekes megfigyelés, hogy a DnaJ co-chaperone a három Hsp 70-homológ közül csak a Hsc62 ATP-bontó működésére nincs hatással. Az *ybeW* előtt található két génről (*ybeS* és *ybeV*) irodalmi adat nem áll rendelkezésre, annyi azonban bizonyos, hogy szekvenciájukban a J-doménhez hasonló elem található (Kelley, 1998). Ezek alapján elmondható, hogy bár a Hsc62 fehérje chaperone-aktivitást mutat, hatását DnaJ-típusú co-chaperone nélkül, illetve valószínűleg nem hősokk körülmények között fejt ki.

4.3 Magányos *dnaJ*-típusú gének: *djlA* és *cbpA*

A Hsc66/Hsc20 rendszer azonosításával egyidőben *Escherichia coli*-ból egy 33kDa-os, hajlított szerkezetű szintetikus oligonukleotidokhoz kapcsolódó proteint is izoláltak (Ueguchi és mtsai, 1994). A CbpA (curve binding protein A) fehérje a DnaJ-vel 39 %-os azonosságot mutat, Zn-finger domént viszont nem tartalmaz. A sejt exponenciális növekedési fázisában csak alacsony szinten expresszálódik, stacioner fázisban, illetve foszfát-éhezés hatására azonban jelentős mennyiség képződik belőle (Yamashino és mtsai, 1994).

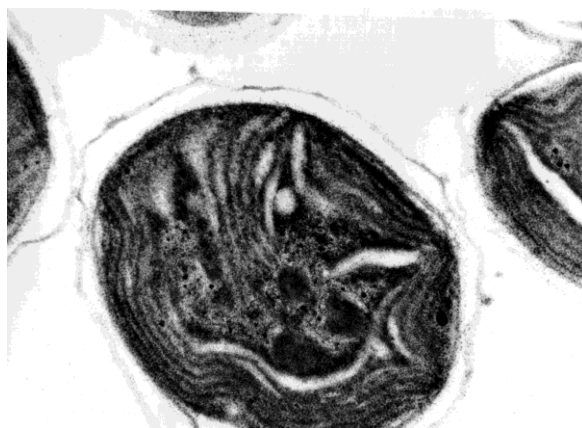
Két évvel a CbpA azonosítása után a DnaJ-homológok köre újabb taggal bővült *E. coli*-ban (Clarke és mtsai, 1996). A DjlA (DnaJ-like A) 30 kDa-os fehérje, mely a belső membránban, J-domént hordozó C-terminális végével a citoplazma felé nézve helyezkedik el. Ezen kívül egy transzmembrán hélixet és periplazmatikus térbe nyúló igen rövid N-terminális szakaszt tartalmaz. A legújabb kutatások szerint képes a DnaK co-chaperone-jaként működni *in vitro* (Genevaux és mtsai, 2001b). Homológjait korábban *Coxiella burnetti*-ben (Zuber és mtsai, 1995) és *Haemophilus influenzae*-ben is leírták (Fleischmann és mtsai, 1995).

Számos *in vivo* kísérletben találhatunk adatokat e két *hsp 40*-típusú gén és a *dnaJ* deléziós analízisével kapcsolatban. Normál körülmények között egyik gén sem eszenciális, a *dnaJ* mutánsok viszont magas hőmérsékletre érzékenyek és ugyanez mondható el a *dnaJ cbpA* (Ueguchi és mtsai, 1995), illetve *dnaJ djlA* kettős, valamint a *dnaJ djlA cbpA* tripla mutánsokról is. A *cbpA* és *djlA* együttes deléciója semmiféle hatással nincs a sejt növekedésére. A három DnaJ-homológ magas hőmérsékleten képes egymás hiányát komplementálni és bizonyos körülmények között a co-chaperone funkcióban is helyettesítheti egymást, bár ez utóbbi hatás lehetséges mechanizmusa a DjlA esetében még nem tisztázott. Valószínű azonban, hogy - szerkezeti eltéréseik és sejtbeli lokalizációjuk különbözősége miatt – egymással átfedő, de nem teljesen azonos feladatokat látnak el (összefoglaló irodalom: Genevaux és mtsai, 2001a; b).

5. Kísérleti modellünk, a *Synechocystis* PCC 6803

Kísérleti modellszervezetünk, a *Synechocystis* PCC 6803, egy Gram-negatív egysejtű fotoszintetizáló cianobaktérium (3.ábra). A *Synechocystis* sejtet egy külső és

egy belső, vagy citoplazmás membrán határolja, közöttük peptidoglükán sejtfa-
helyezkedik el. Összes membránjainak 90 %-át a szorosan egymásba forduló
lamellákból álló tilakoid membrán teszi ki, mely – többek között zsírsav-
összetételében is - nagymértékben hasonlít a növényi kloroplasztisz-tilakoidjához, de
attól eltérően nem tagolódik sztróma és gránum egységekre (Stainer, 1988).
Fotoszintézis során a fény gyűjtését a tilakoid felszínén elhelyezkedő bonyolult
fehérjestruktúra, a fikobiliszóma végzi.



3. ábra. A *Synechocystis* PCC6803 elektronmikroszkópos képe. Az egysejtű
cianobaktérium transzmissziós elektronmikroszkópos felvételén jól látható a
körkörösén futó tilakoid membrán.

A *Synechocystis* laboratóriumi körülmények között egyszerűen tenyészthető,
növekedése viszonylag gyors és képes – megfelelő tápanyagellátás mellett –
fotoheterotróf módon is élni. Jó transzformálhatósága és a nagy homológ
rekombinációs gyakoriság miatt inszerciós inaktiválással számos gén funkcióját
illetően nyerhetünk *in vivo* adatokat (Williams, 1988). A molekuláris biológiai
eszköztárban mára már speciális cianobakteriális vektorok is rendelkezésünkre állnak
(Marraccini és mtsai, 1993), melyek alkalmazásával eszenciális gének mutagenézisére

nyílik lehetőség. Vitathatatlan előny, hogy teljes genomját megszekvenálták (Kaneko és mtsai, 1996) és a Cyanobase nevű adatbázis a számítógépes világhálón keresztül is elérhető (Nakamura és mtsai, 1998).

6. A *hsp 70* család cianobakteriális képviselői

A *hsp 70* család tagjai közül *Synechocystis*-ben korábban egy *dnaK*-homológ gént izoláltak (Chitnis és Nelson, 1991), melynek genetikai környezetében nem található sem *dnaJ*-hez, sem pedig *grpE*-hez hasonló szekvencia. E gén transzkripció aktivitása szubletális hőstressz hatására fokozódik, normál körülmények között mRNS-ének kifejeződése 25 órás periódusokban cirkadián ritmust mutat (Aoki és mtsai, 1995; 1997). 5' régiójában σ^{32} -konszenzus illetve CIRCE szabályzó elem nem lokalizálódik. A DnaK-homológ fehérjét csoportunk korábban azonosította (Lehel és mtsai, 1992), sejtbeli szerepéről azonban eddig adatok nem álltak rendelkezésre.

1994-ben a *Synechocystis*-szel közeli rokonságban álló *Synechococcus* PCC 7942-ben több *hsp 70* kópiát fedeztek fel (Nimura és mtsai, 1994a; 1994b). Ezek co-chaperone génjeikkel együtt a *grpE-dnaK1*, *dnaK2*, illetve *dnaK3-dnaJ* operonokban lokalizálódnak. Deléciós kísérletek alapján a *dnaK2* és 3, valamint a *dnaJ* is eszenciálisnak bizonyult, a *dnaK1* viszont minden különösebb következmény nélkül eliminálható a genomból (Oguchi és mtsai, 1997; Nimura és mtsai, 2001). A DnaK fehérjéről kimutatták, hogy a DnaK1 és 3 a sejtben konstitutívan fejeződik ki, csupán a DnaK2 mutat magas hőmérsékleten hősokk fehérjétől elvárható megnövekedett szintet és a három homológ közül csak ez utóbbi képes az *E. coli dnaK* mutáns hőérzékeny fenotípusát komplementálni (Nimura és mtsai, 2001). Sejtbeli lokalizációjukról kiderült, hogy a DnaK1 illetve 2 főleg citoszolikus fehérje, a DnaK3

viszont hosszú C-terminális doménjével perifériásan a tilakoid membránhoz kötődik (Nimura, 1996) csakúgy, mint a DnaJ protein, mely egyébként szintén konstitutívan képződik, túltermelése pedig toxikus az *E. coli* sejtre nézve (Oguchi és mtsai, 1997).

A *hsp 70* család képviselőit megtalálták *Aphanothece halophytica* sótűrő cianobaktériumban is (Lee és mtsai, 1997). Ebben a baktériumban a *grpE-dnaK-dnaJ* lókusztól többféle hosszúságú mRNS is készül, ami különböző promóter illetve transzkripció terminátor jelenlétére utal. Hő-, illetve sóstressz hatására mindhárom gén jelentősen megnövekedett indukciót mutat. A szerzők genomiális southern kísérleteik alapján két további *dnaK*-homológ gén meglétét valószínűsítik. A DnaK fehérje magas NaCl-koncentráció jelenlétében ATP-bontó aktivitást mutat, emellett részt vesz néhány réztartalmú proteinkomplex foldingjában is (Hibino és mtsai, 1999). A legújabb kísérletek szerint túltermelése hőtoleranciát idéz elő dohányban (Ono és mtsai, 2001).

7. A biológiai membránok és a hőmérsékleti stressz kapcsolata

7.1. A membrán, mint a “sejt hőmérője”

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

legfontosabb képviselői a monogalaktozil-diglicerid, a digalaktozil-diglicerid, a szulfolipid és a foszfatidil glicerol.

Csoportunk korábban kimutatta, hogy a növekedési hőmérséklet jelentősen befolyásolja a *Synechocystis* PCC6803 sejtek tilakoidjának hőstresszel szembeni ellenállóképességét. (Lehel és mtsai, 1993a). Az alacsony illetve magasabb hőmérséklethez adaptált cianobaktérium tenyészetek hőtűrése között 4-5°C különbség volt az utóbbi javára. Alacsony hőmérsékleten a membrán fluiditása, “folyékony” volta csökken, melyre a sejtek ellentétes irányú adaptív válasza a membrán mikroviszkozitásának csökkentése, hosszú távon döntően a zsírsavláncok telítetlenségének - a kettős kötések számának - növelésével (Raison, 1973), míg magas hőmérsékleten a fenti változások ellentétesen zajlanak le. A membránokban hőmérsékletváltozás hatására más folyamatok is lejátszódhatnak, például módosulhat a különböző lipidek mennyiségi aránya (Vígh és mtsai, 1985), illetve a zsírsavak térbeli eloszlása (Watanabe és mtsai, 1981), mely lépések mind a membránok alkalmazkodását szolgálják.

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

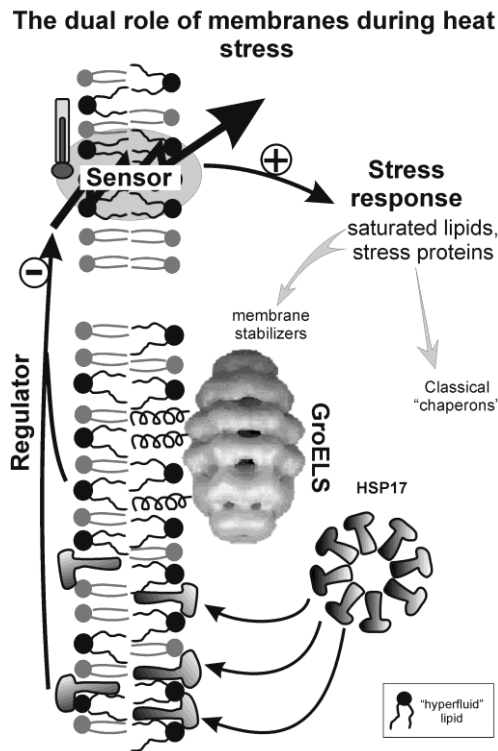
biológiai membránok állapotának akár igen minimális változásai is jelgenerátorként szolgálhatnak és aktiválhatják illetve szabályozhatják a stresszelhárító gének működését. A katalitikus hidrogénezés alkalmazásával tehát lehetőség nyílt redukálni a telítetlen lipidek mennyiségét, és ezúton a hőmérséklet csökkenése által előidézett membrán rigiditás növekedést utánozni.

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

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

7.2. A hősokk fehérjék szerepe a biológiai membránok védelmében

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



4. ábra. A biológiai membránok kettős szerepe hőmérsékleti stressz során. (Vígh és Maresca, 2002). A hőstressz módosítja a membrán fizikai állapotát, melynek hatására egy membránból kiinduló jel aktiválja a hősokk gének szintézisét. Ezután a képződött hősokk fehérjék specifikusan a membránlipidekhez kötődnek, helyreállítva ezzel a fiziológiás lipidrendet illetve membránszerkezetet, mely folyamatok visszacsatolásaként a hősokk gének transzkripciója leáll.

A hősokk válasz egyik kiváltó oka köztudottan a denaturálódott, részben vagy teljesen működésképtelen fehérjék citoplazmában való felhalmozódása. Néhány évvel ezelőtt közvetlen bizonyítékok kerültek napvilágra azzal kapcsolatban, hogy a hőhatások következtében megváltozott membránszerkezet hősokk gének transzkripcióját idézte elő (Carratú és mtsai, 1996; Vígh és mtsai, 1998).

Ezek a megfigyelések a korábban tárgyalt eredményekkel együtt mind a biológiai membránok kettős szerepére utalnak, vagyis egyrészt a sejt “hőmérőjeként” működve, meghatározó szerepet töltenek be a celluláris hőmérséklet-érzékelésben, másrészt - saját fizikai állapotuk modulálásán, illetve hősokk gének indukálásán keresztül – a károsító hatások kivédésének megindításában is részt vállalnak. A fenti elképzelés részletesebb modelljét a 4. ábra szemlélteti és foglalja össze.

ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Munkacsoportunk a membránszintű hőmérséklet érzékelés jelátviteli folyamatainak kérdéskörét vizsgálja szoros összefüggésben a termoadaptációban résztvevő stresszgének, molekuláris chaperone-ok transzkripció szintű szabályozási mechanizmusainak részletes feltárásával. Modellszervezetünk, a *Synechocystis* PCC 6803 cianobaktérium viszonylag egyszerű felépítése és adaptív képessége folytán kiválóan alkalmas ezen problémakör tanulmányozására. Korábbi kísérleteink során kimutattuk, hogy számos, a membránt bizonyítottan károsító stressztényező a fent említett géneket aktiválja, sőt az izoterm körülmények között végrehajtott szelektív membrán-módosítás is hasonló választ eredményez. Ezért a molekuláris chaperone-ok transzkripciójának és maguknak a stresszfehérjéknek részletes vizsgálata fontos információkat szolgáltat az azon feltételezésünk igazolására, miszerint a biológiai hőmérsékletérzékelés elsődlegesen a membránokhoz kapcsolt folyamat.

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

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

1. A *Synechocystis* PCC6803 genomiális térképén található *hsp70*-, *hsp40*- és *hsp20*-homológ ORF-ek transzkripció szinten kifejeződnek-e, és ha igen, akkor a róluk készülő mRNS-ek szintézise milyen mértékben hőindukálható?
2. A hőmérséklet emelésével növekvő transzkripció aktivitást mutató gének fehérje-termékei a sejt mely részein lokalizálódnak, esetleg kötődnek-e a membránokhoz?
3. Előállíthatóak-e életképes *hsp70*-deficiens mutánsok, és ha igen, ezen gének teljes vagy csupán részleges inaktivációja lehetséges?
4. Hatást gyakorol-e egy *hsp70*-homológ gén (akár részleges) inaktivációja a *Synechocystis*-ben megtalálható más családba tartozó chaperone-ok transzkripció, illetve transzláció szinten való kifejeződésére?
5. A *hsp70*-mutáns sejt vonal stressztűrő képessége csökken-e a vad típusú *Synechocystis*-sejtekéhez képest: milyen fiziológiás változásokat okoznak a különböző típusú stresszek (magas és alacsony hőmérséklet, nagy intenzitású fény, UV-B sugárzás) és ezek kombinációi?
6. Befolyásolja-e a *Synechocystis*-sejtben jelenlevő Hsp70 fehérjék mennyisége a membránok fizikai állapotát illetve összetételét?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A Synechocystis PCC6803 tenyésztése

A *Synechocystis* PCC6803 (Pasteur Culture Collection, Ripka és mtsai, 1979) sejteket 1% agart tartalmazó BG-11 (Currier és mtsai, 1997) lemezeken tartottuk fenn 30°C-on, folyamatos megvilágítás mellett. Az agarról először egy előkultúrát neveltünk (50 ml BG-11 tápoldatban), majd ezt felhasználva indítottunk 700 ml tenyészetet szintén BG-11-ben, amit a kísérletekhez használtunk. A sejteket $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intenzitású folyamatos fényben, 1% CO₂-tartalmazó steril levegővel buborékoltattuk 22, 30 vagy 36 °C-on. A növekedést a 800 nm-en mért abszorpció (HP8542A fotométer) változásával követtük. A kísérletekhez exponenciális fázisban lévő kultúrákat (OD₈₀₀=1,5-1,8) használtunk.

A különböző hőmérsékleteken történő kezeléseket változó térfogatú sejtszuszpenziók felhasználásával az Szegedi Biológiai Központban e célra kifejlesztett speciális inkubátorban végeztük.

Totál RNS tisztítása Synechocystisből

Az RNS tisztításánál Mohamed és Jansson (1989) módszere szerint jártunk el, a tisztítási módszert némileg módosítva. A különböző kezelések után 30 ml sejtszuszpenziót átöntöttünk ugyanolyan térfogatú, jéghideg 5% fenolt és 95% etanolt tartalmazó centrifugacsövekbe. Alapos elegyítés és ülepítés (9000xg, 4°C, 3 perc) után a csapadékot felszuszpendáltuk a felülúszó néhány ml-nyi maradékában. A mintát Eppendorf csövekbe tettük, lecentrifugáltuk (10000xg, 4°C, 1 perc) majd a pelletet kétszer cseppfolyós nitrogénben lefagyasztottuk és jégen felengedtük. 250µl reszuszpenziós pufferben (0,3M szukróz, 10mM nátrium-acetát, pH 4,5) és 37,5µl

500mM dinátrium-EDTA (pH 8) oldatban vettük fel az üledéket, majd jégen inkubáltuk 5 percig. Ezután 375µl lízis puffert (2% SDS, 10mM nátrium-acetát, pH 4,5) adtunk hozzá, 65°C-on tartottuk 3 percig és 700µl 65°C-os, vízzel telített savas fenollal egészítettük ki, majd újabb 3 percre 65°C-ra helyeztük, végül üleptítettük (10000xg, 4°C, 3 perc). A minta fent leírt fenolos extrakcióját megismételtük és az így nyert vizes fázist 700µl kloroformmal kezeltük, majd a fázisokat a fenti körülmények között végzett centrifugálással választottuk szét. Az RNS-t a vizes frakcióból 0,2 térfogat 10M lítium-klorid és 2,5 térfogat etanol segítségével egy éjszaka alatt csaptuk ki. Másnap centrifugálás (10000xg, 4°C, 15 perc) és szárítás után a totál RNS-t 40µl, dietil-pirokarbonáttal kezelt vízben szuszpendáltuk fel. Az RNS koncentrációját és tisztaságát fotométerrel (A_{260} , ill. A_{260}/A_{280}) határoztuk meg (Ausubel és mtsai, 1987).

Reverz transzkripció PCR analízis

A kísérleteket a GIBCO BRL “SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis” kitjének segítségével, a random hexamer módszer szerint végeztük, a gyártó utasításait pontosan követve. Templátként 3µg totál RNS-t használtunk és a különböző génekről készült cDNS-ek vizsgálatához az alábbi amplifikációs primereket alkalmaztuk:

dnaK1: RTK1 fwd: 5' CGTTTCCCCGACGATCATTA 3',
RTK1 rev: 5' CGATCGCTTCATAGTCACTG 3',
dnaK2: RTK2 fwd: 5'TGGCGATCGCCTAGTGGGGC3'
RTK2 rev: 5'TGGCCCCGGGACAGGGTGGTGT3'
dnaK3: RTK3 fwd: 5' TGGAATGGTTCCTCTCTCAA 3',
RTK3 rev: 5' AACCGTTTTGTAATGGGGCA 3',

grpE: RTE fwd: 5' ATGAACGAAGATCAAGTTTCCCT 3'
 RTE rew: 5' CCATTACCACTTCAGCTCCTTC 3'

dnaJ1: RTJ1 fwd: 5' AAGCCCGGCACTGGGGTTAA 3'
 RTJ1 rew: 5' CCCC GTAAACCAGCATCTCC 3'

dnaJ2: RTJ2 fwd: 5' ATTCAGGTACCGCCGGATCC 3'
 RTJ2 rew: 5' CAAACAGCCCCCCCAGGGTTA 3'

dnaJ3: RTJ3 fwd: 5' ATTTGGCCGATTCCGCCGTC 3'
 RTJ3 rew: 5' CCCAGGCATTTCCACCTCCA 3'

dnaJ4: RTJ4 fwd: 5' TGGTGGTTTTGGCAATGCCC 3'
 RTJ4 rew: 5' GGACTGGCCATACCTTTGCC 3'

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

Transzkripció startpont meghatározása

A fentiek szerint izolált totál RNS-t használva templátként, a reakciót a *dnaK2* mRNS-sel komplementer primerrel (5'TGGTAGTACCGAGGTCAATCCC3') végeztük. A szintetikus oligonukleotidot T₄ polinukleotid-kinázzal (USB) radioaktívan jelöltük a gyártó cég javaslatát követve. Ezután 5 pmol jelölt primert adtunk 25µg RNS-hez, majd 95°C-on két perces denaturálást követően 20 percig szobahőn hibridizáltuk az oligonukleotidokat a templáthoz ("annealing"). Az extenziós reakciót 42°C-on hajtottuk végre 15µl végtérfogatban 50mM Tris-HCl pH 8,2; 8mM MgCl₂; 50mM NaCl; 5mM DTT; 1mM dNTP; 20U RNasin (Promega) tartalmú pufferben, 12U AMV reverz transzkriptázzal (USB). A reakciót 30 perc elteltével leállítottuk, majd standard szekvenáló gélre vittük. A startpont helyének

megállapítása érdekében a fenti primerrel megszekvenáltuk a gén megfelelő szakaszát, Glatz és mtsai (1996) szerint.

Northern hibridizáció, denzitometria

A kísérletek során az alábbi DNS próbákat használtuk:

groESL: 0,4 kb (Lehel és mtsai, 1993b), *cpn60*: 0,66 kb (Lehel és mtsai, 1993b),
dnaK: 0,7 kb (Glatz és mtsai, 1996), *hsp17*: 0,4 kb (Horváth és mtsai, 1998),
rRNS: 0,7 kb (Tomioka és mtsai, 1981).

Az *rRNS* próba (Prof. Sugiura ajándéka) kivételével valamenyi szakaszt specifikus primerekkel polimeráz láncreakció segítségével amplifikáltuk, *Synechocystis* PCC6803 genomiális DNS-t használva templátként

A DNS próbákat Multiprime DNA labeling kit (Amersham) felhasználásával α -³²P-dCTP-vel (Izotóp Kft) radioaktívan jelöltük. A Northern-hibridizációt minden esetben Hybridization Incubator (model 310, Robbins Scientific) készülékben, 65°C-on végeztük. Az autoradiográfia -80 C-on történt, "intensifying screen" segítségével. A próbák előállításának és a hibridizáció pontos menetének leírását lásd Glatz Attila doktori disszertációjában (1999). A Northern-blot eredményének kiértékelése denzitometriás módszerrel készült, Genius Colorpage-HR5 PRO szkennel, ill. Advanced American Biotechnology (AAB) szoftver felhasználásával.

Mutagén vektor előállítása

A *dnaK2* mutáns konstrukció készítésénél minden esetben a szokásos molekuláris biológiai protokollokat követtük (Ausubel és mtsai, 1987). Első lépéseként a pUC18 (Yanisch-Perron és mtsai, 1985) vektor HincII helyére klónoztuk a *dnaK2* gén PCR segítségével felamplifikált (primerek: K2 fwd és mtK2rev), 1,7 kb

nagyságú szakaszát. A szekvencia közepéből egy 310 bp-os szakaszt HincII emésztéssel eltávolítottunk, s helyére a pUC4KIXX plazmidből (Pharmacia) SmaI-gyel kivágott 1,2 Kb méretű kanamicin gént tartalmazó kazettát ligáltuk. A konstrukciókat restriktációs emésztésekkel ellenőriztük. A *Synechocystis*-t a *dnaK2* gén orientációjával megegyező irányban kanamicin kazettát tartalmazó mutagén vektorral transzformáltuk.

Primerek: K2 fwd 5'TGGCGATCGCCTAGTGGGGC3'
mtK2 rev 5'CCAGCACCGGGAGCGCCTACC3'

A Synechocystis sejtek transzformálása

10ml *Synechocystis* tenyészetet 10 percig szobahőn centrifugáltunk (4300xg), majd a sejteket szuszpendáltuk 15ml BG-11-ben. Újabb centrifugálás után a sejteket felvettük 2ml BG-11-ben. A szuszpenzióból 100µl-es mennyiségeket vettünk ki, amelyekhez 1-3 µg mutagén vektor DNS-t adtunk. 1 órás, fényben (30°C-on) történt inkubálás után a sejtsuszpenziót BG-11-gyel ötszörösére hígítottuk (végtérfogat: 200µl), majd BG-11 lemezekre szélesztettük a sejteket. A lemezeket egy éjszakán át 30 C-on, sötétben inkubáltuk, majd fényre tettük. A megjelenő telepeket átoltottuk 5µg/ml kanamicint tartalmazó lemezekre. Ezután a kinőtt telepeket emelkedő (10-300µg/ml) mennyiségű Km-t tartalmazó lemezeken passzáltuk. Az utolsó passzálás után BG-11 tápoldatban (300µg/ml Km) előkultúrát indítottunk, majd a mutánsokat a korábban leírtak szerint növesztettük.

A Synechocystis kromoszómális DNS izolálása, genomiális Southern analízis

A szokásos módon növesztett *Synechocystis* kultúrából 250ml-t lecentrifugáltunk (9000xg, 10perc, szobahő), majd a sejteket 1ml TE-ben vettük fel. A

mintát Eppendorf csőbe áttettük és ülepités (10000xg, 2 perc, szobahő) után a pelletet 1 ml protoplasztáló (10mg/ml lizozim 0,5 M mannit 50 mM EDTA) oldatban vettük fel. 1,5 órás 37 C-on történő inkubálás és centrifugálás (lásd fent) után a protoplasztokat mostuk 0,5M mannit oldattal, majd felszuszpendáltuk 1,2 ml TE-ben. A kettéosztott mintákból a fehérjéket ugyanolyan térfogatú fenollal és kloroformmal történő kétszeres extrakcióval távolítottuk el. Az RNáz kezelést követő újabb fenolos tisztítás után a DNS-t etanollal kicsaptuk (Ausubel és mtsai, 1987), majd 100µl UP-vízben szuszpendáltuk.

A genomiális Southern analízishez 2-5 µg DNS-t emésztettünk a megfelelő restriktációs enzimekkel egy éjszakán át. Az emésztést 0,8%-os agaróz gélen megfuttattuk, majd a gél-t blottoltuk 0,4 M NaOH-ban a kapilláris módszerrel (Ausubel és mtsai, 1987). A hibridizálást a Northern technikánál ismertetett metodika szerint végeztük.

Tilakoid membrán izolálása

Az izolálásokat minden esetben a mintákat jégen tartva végeztük. 100 ml *Synechocystis* tenyészetből 10 percig tartó 5000xg centrifugálással kiülepitettük a sejteket, majd felszuszpendáltuk 3 ml pufferben (10mM TES-NaOH, pH 7.0, 10mM magnézium-klorid), ami 1-1 mM proteáz gátlót (PMSF, benzamidin, ε-amino-kapronsav) tartalmazott. A mintát a továbbiakban sötétben és jégen tartottuk. A sejteket, a szuszpenzióval azonos térfogatú 0.1 mm átmérőjű üveggyönggyel (Braun GmBH, Melsungen) együtt 3x3 percig kémcsőben vortexelve, s közben 3-3 perc hűtési időt biztosítva tártuk fel. Az üveggyöngyöket hagytuk leülepedni, majd 2x3 ml pufferrel mostuk, s az egyesített szuszpenzióból a sejtörmelékét és a fel nem tárt sejteket 5000xg, 10 perces centrifugálással eltávolítottuk. A felülúszóból kiülepitettük

(27.000xg, 30 perc) a tilakoid membránban gazdag frakciót, amit legalább egyszer mostunk, hogy a lazán kötődő fehérjéket (többségükben fikobiliproteinek) eltávolítsuk. Ezt követően a tilakoid pelletet izoláló pufferben felfuszpendáltuk és Chl *a* koncentrációját megmértük (Horváth és mtsai, 1998).

Western-analízis

Exponenciális fázisban lévő *Synechocystis*-kultúrákat ($OD_{800}=1,5-1,8$) fehér fényrel ($70 \mu E m^{-2} s^{-2}$) történő megvilágítás mellett 3 órán át inkubáltunk a megjelölt hőmérsékleteken. A sejteket ezután centrifugálással ülepítettük és SDS mintapufferben szuszpendáltuk fel. Az azonos fehérje-mennyiségeket 8-15%-os SDS-PAGE-gélen választottuk el (Laemmli, 1970), PVDF membránra blottoltuk (Millipore, Bedford, Ma) és a következő fehérjék ellen termeltetett antiszérumokkal reagáltattuk: *E. coli* DnaK (SPA-880, Stressgene), *Synechococcus* DnaK3 (H. Yoshikawa ajándéka), *Synechocystis* Hsp17 (E. Vierling ajándéka) és a laboratóriumunkban készített *Synechocystis* GroEL. Második ellenanyagként peroxidáz-konjugált anti-mouse (DnaK, DnaK3) illetve anti-rabbit IgG-t (Sigma) használtunk, az immunodetektálás ECL-metódus szerint történt (Amerham, UK).

Kétdimenziós fehérje gél-elektroforézis

Az izoelektromos fókuszálást O'Farrell (1975) módszere alapján végeztük. A rúd-géleket ezután vertikális SDS-poliakrilamid gélek tetejére helyeztük, majd megfuttattuk Laemmli (1970) szerint. A módszer részletes leírását illetően lásd Kovács Eszter PhD disszertációját (1998).

A fotoszintetikus oxigénfejlődés mérése

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

Fotoinhibíciós vizsgálatok

A különböző hőmérsékleteken növesztett *Synechocystis*-sejteket 10 perces 7000 rpm-en történő centrifugálással gyűjtöttük össze, majd az egyes minták klorofil-koncentrációit 6.5 µg klorofil/ml-re állítottuk be és az így elkészített sejszuszpenziókból 100-100 ml-t 1 cm rétegvastagságban mintatartókba helyeztünk. A fotoinhibíciós kezelések során az állandó 1200 µE m⁻² s⁻² fényintenzitást 6 db halogén spotlámpa segítségével értük el, majd a kultúrák 1 órát töltöttek normál intenzitású fényen (120 µE m⁻² s⁻²). Az egyes méréseknél szükséges állandó hőmérsékletet vízfürdők segítségével biztosítottuk. A kísérlet menete során a 30 percenként vett 2 ml térfogatú minták fotoszintetikus oxigén-fejlődését 2,5 (dimetil) p-benzokinon elektronakceptor jelenlétében, Hansatech DW2 oxigén-elektroddal vizsgáltuk. A felvett értékeket a kezelési idő függvényében Microcal Origin Professional 5.0 szoftverrel ábrázoltuk

UV-B tolerancia mérése

Az UV-B besugárzáshoz 330 ml *Synechocystis* sejt szuszpenziót (30 µg klorofil/ml) 15 mm mélységű, vízszintesen elhelyezett üveg mintatartóban, 30°C-on, állandóan kevertetve tartottunk. Közvetlenül az UV-B kezelés előtt, az azonos

kiindulási körülmények biztosítása érdekében, a mintákat a tenyésztési körülményeknek megfelelő intenzitású fehér fénnel világítottuk meg 1 órán keresztül. A 30°C-on növesztett kultúrákat 22°C-ra helyezve 312 nm maximális hullámhosszú, 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$ intenzitású UV-B sugárzással 90 percig kezeltük, majd a mintákat ismét a normál tenyésztési körülményeknek megfelelő fehér fényre helyeztük vissza. A sejtek fotoszintetikus aktivitásának alakulását -állandó keverés mellett- Hansatech DW2 oxigén-elektóddal követtük nyomon.

Zsírsavanalízis

A gázkromatográfiás vizsgálatokhoz a zsírsavak metilésztereit használtuk. A bepárolt összes lipidre ill. az előzőleg elválasztott és ampullákba kapart komplex lipid foltokra mintánként 3 ml 5% cc. sósavat tartalmazó metanolt öntöttünk, széndioxiddal lefűvattuk és leforrasztottuk. 2 órás 80°C-on történő inkubáció után az ampullákat feltörtük, tartalmukat kémcsövekbe vittük. 6ml víz és 3 ml petroléter hozzáadása és rázás után megvártuk a fázisok szétválását. A petroléteres fázist nitrogénnel szárazra pároltuk, majd benzolban vettük fel. A metilészter törzsoldatból 1-2 μl -t gázkromatografáltunk, 30m-es SP2330 kapilláris oszloppal felszerelt Jeol JGC-20K készüléket használva. Az oszlop és a láng-ionizációs detektor hőmérséklete 180°C ill. 260°C volt. Az egyes kromatográfiás csúcsok azonosítását sztenderdekkel ill. a retenciós idők alapján végeztük. Mennyiségi meghatározásukhoz 17:0 belső sztenderdet használtunk, a csúcsok alatti területek mérését elektronikus integrátor (HP 3394A) segítségével végeztük.

A zsírsavak meghatározásának hibája 2.5% alatt volt a fő komponensek ill. 5% az egyéb komponensek esetében.

Lipid extrakció és elválasztás

A lipideket Bligh és Dyer (1959) által leírt módon kloroform és metanol 1:2 arányú elegyével nyertük ki a sejtekből. A lipidek analízisét és lipidosztályokra történő elválasztását a Sato és Murata (1988) által közölt eljárás alapján végeztük. A szilikagél vékonyrétegen (Merck 5721) való azonosítás során a futtató közeg kloroform, metanol és 28%-os ammónium-hidroxid (65:35:5) elegye volt.

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

Fluiditás mérés fluoreszcencia anizotrópiával

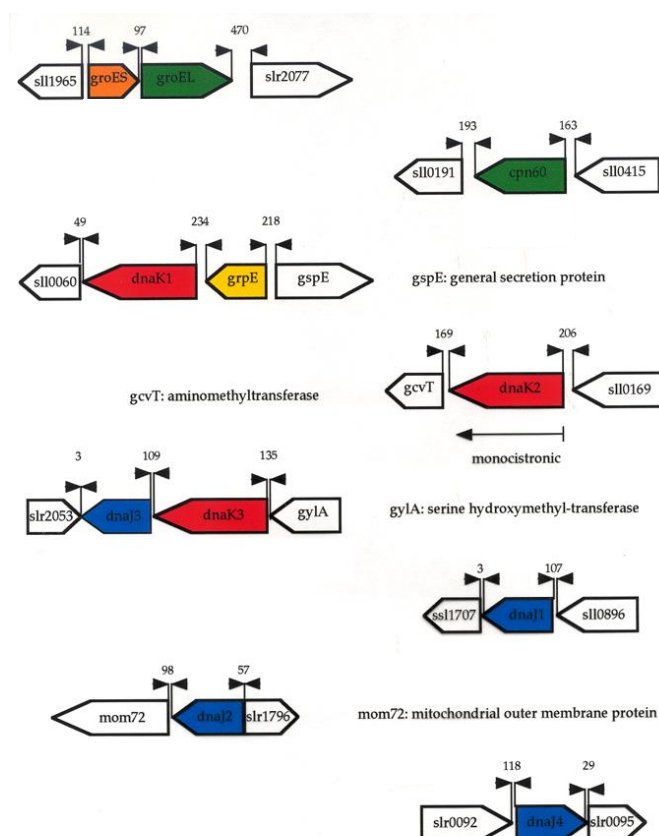
A tilakoid membrán fluiditását DPH (1,6-difenil 1,3,5-hexatrién) fluoreszcencia anizotrópiájának mérésével határoztuk meg (Barber és mtsai, 1984). A jelölés során 3 ml 3 μ g klorofill-a-t tartalmazó tilakoid szuszpenzióhoz (tilakoid izoláló médiumban) 3 μ l DPH törzsoldatot (0.2 mM, tetrahidrofuránban) adtunk. Ezután a szuszpenziót 40 percig sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A fluoreszcencia anizotrópia mérését fluoreszcens spektrométerrel végeztük (Quanta Master QM-1, Photon Technology International, Princeton, NJ, USA). A minta hőmérsékletét számítógép vezérelte átfolyós termosztáttal szabályoztuk, és a küvettában platina elektróddal mértük, a fűtési sebességet 0.5°C/percen tartva. A mérések során a gerjesztő fény hullámhossza 360 nm, a résszélesség 10nm volt. Az emittált fény intenzitását 460 nm-en detektáltuk ugyancsak 10 nm résszélesség mellett. A gerjesztő fényt Glan Thompson prizma segítségével polarizáltuk, és a

fluoreszcencia gerjesztő fény polarizációjának irányára merőleges ill. párhuzamos összetevőjét polarizációs szűrők alkalmazásával egyidejűleg mértük. A mért fluoreszcencia intenzitást a jelöletlen minta háttérével korrigáltuk. Az anizotrópiát Barber és mtsai (1984) alapján számoltuk. A tilakoidból izolált lipidekből liposzómákat készítettünk. 250 µg lipidet 100µl kloroformban vettünk fel, 2 µl DPH törzsoldatot (0.2mM, tetrahidrofuránban) adtunk hozzá, majd nitrogén alatt 10 ml-es szonikáló cső aljára pároltuk. A száraz lipid filmre 5 ml tilakoid izoláló médiumot mértünk. Ezt a lipid szuszpenziót jégen 3x20 másodpercig szonikáltuk Cell Disruptor B-30 (Branson Sonic Power Co., A SmithKleine Company) típusú szonikátorral. A kapott liposzóma szuszpenzió fluoreszcencia anizotrópiáját a hőmérséklet függvényében a fent leírt módon mértük.

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

1. A *hsp 70* géncsalád expressziójának tanulmányozása *Synechocystis*-ben

A számítógépes világhálón át 1996-ban elérhetővé vált a *Synechocystis* PCC 6803 teljes genomiális szekvenciáját magában foglaló CyanoBase adatbázis (Kaneko és mtsai, 1996). A rendelkezésre álló információk alapján kiderült, hogy a cianobaktérium törzs - az *Escherichia coli*-hoz illetve közeli rokonához, a *Synechococcus*-hoz hasonlóan - a *hsp 70* géncsalád tagjaiból több kópiát tartalmaz. A három *dnaK*-, négy *dnaJ*- és egy *grpE* homológ ORF egymáshoz viszonyított elhelyezkedését az 5. ábra szemlélteti.



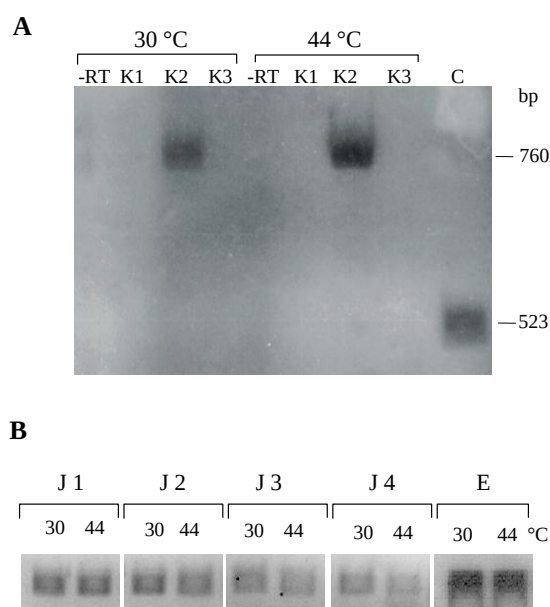
5. ábra. A *dnaK*, *dnaJ* és *grpE* géncsalád ORF-jeinek elrendeződése a *Synechocystis* PCC6803 genomjában. (Cyanobase).

Irodalmi adatok sokasága bizonyítja, hogy más szervezetekben a *hsp70* családba tartozó gének expressziós folyamatainak felderítése alapvető információkat adott az egyes chaperone fehérjék változatos fiziológiai szerepéről. A *Synechocystis* PCC6803 *dnaK* génjét kódoló ORF-et Chitnis és Nelson azonosította (1991). Genom Southern adataik alapján a szerzők egyetlen kópia *dnaK* jelenlétét feltételezték a *Synechocystis* genomban, mely számos stressztényező által indukálhatónak bizonyult (pl. magas hőmérséklet, UV-sugárzás, stb.). Munkacsoportunk korábbi eredményei tökéletesen alátámasztják ezt a megfigyelést, mivel csak egyetlen, a *dnaK2*-nek megfelelő transzkripciós jelet detektáltuk, amikor a magas hőmérséklet, illetve kadmium stressz által indukált expressziós szinteket vizsgáltuk Northern-hibridizációs technika segítségével (Glatz és mtsai, 1996). A magányos *dnaK* expressziós jel illetve a genomi szekvenciát tartalmazó adatbázisban található további homológok jelenléte között fennálló ellentmondást több oldalról közelítve kívántuk feloldani.

A *hsp70*-családba tartozó gének transzkripciós szinten való kifejeződését a rendkívül érzékeny Reverz-Transzkripciós (RT)-PCR technika segítségével vizsgáltuk (6 ábra; Varvasovszki és mtsai, 2003) mely segítségével olyan alacsony expressziós aktivitás is kimutatható, melynek detektálása a Northern-analízis alkalmazásával már nem lehetséges.

A kísérlet során 30°C-on növesztett sejteket tettünk ki szubletális hőstressznek (44°C). Ezek után az izolált mRNS-ből készített cDNS mennyiségét hasonlítottuk össze agaróz gélelektroforézis segítségével. Negatív kontrolként a reverz transzkriptáz enzim nélküli reakciókat (-RT) használtuk, a pozitív ellenőrzés során pedig egy –a kitben rendelkezésre álló- standard mRNS-sel (C) végeztük el a kísérletet.

Az RT-PCR eredményeként tapasztalhattuk, hogy a három *dnaK* homológ közül csak egyetlen, a *dnaK2* (K2) mutat hőindukálható expressziót, a másik két génről (*dnaK1* és 3: K1, 3.) pedig a növesztési hőmérsékleten egyáltalán nem készül mRNS, valamint egyik sem hőindukálható.

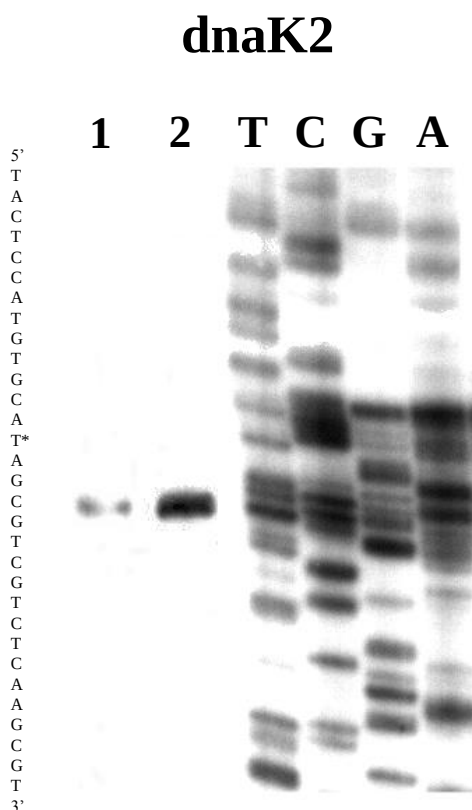


6. ábra. A *dnaK* (A), illetve a *dnaJ* és *grpE* (B) homológ gének transzkripciós aktivitásának vizsgálata normál (30°C) és hősokk (44°C) körülmények között.

Természetesen elképzelhető, hogy az utóbbi *dnaK* homológok egyéb, eddig még nem vizsgált stresszkörülmények között transzkripciós aktivitást mutatnak.

A fentiekkel szemben-meglepő módon a co-chaperone-ok (4db *dnaJ*: J1, 2, 3, 4 és 1 db *grpE*: E) transzkripciója konstitutívnek bizonyult, s magasabb hőmérsékleten sem tért el a normál körülmények között megfigyelhető szinttől. Ezen adatok jól korrelálnak Oguchi és társai (1997) eredményeivel, miszerint a *Synechococcus* PCC7942 DnaJ fehérjéjének mennyisége hősokk során nem változik számottevően. A co-chaperone gének konstitutív expressziója olyan celluláris folyamatokat feltételez, amelyekben esetleg a DnaJ és GrpE molekulák szinten tartott, állandó mennyisége szükséges.

A továbbiakban a *dnaK2*, a *hsp 70*-homológok közül az egyetlen magas hőmérsékleti stressz hatására indukciót mutató gén analízisére koncentráltunk. Transzkripciójának startpontját “primer extenziós” kísérlet alapján határoztuk meg, növekedési hőmérsékleten (30°C) tartott valamint hősokkolt (44°C) sejtekből izolált RNS-t használva templátként (7. ábra).



7. ábra. A *dnaK2* gén transzkripciós startpontjának meghatározása. A “primer extension” reakciót mind a 30°C-on (1), mind a 44°C-on (2) inkubált sejtekből izolált mintákon elvégeztük. A startpontot csillaggal jelöltük.

A *dnaK2* mRNS első nukleotidja (T) normál illetve hősokk körülmények között egyaránt az ATG kodontól számított –98. pozícióban található, ami azt jelenti, hogy e gén – a hősokktól függetlenül - ugyanarról a promóterről íródik át, azaz nincs külön *hsp*-promótere. A transzkripcióban résztvevő szabályozó elem mibenléte nem ismert, mivel az általában hősokk génekre jellemző konszenzus szekvenciák - σ^{32} –

kötőhely illetve CIRCE elem – egyike sem található meg a *dnaK2* ORF előtt. Ugyanakkor a Cyanobase adatbázis alapján tudjuk, hogy a *Synechocystis* genom egyáltalán nem tartalmaz σ^{32} faktort kódoló gént (Kaneko és mtsai, 1996). Megjegyzendő továbbá, hogy a szakirodalomban nem találtunk érdemi *Synechocystis* konszenzus promóter szekvenciát. Ennek oka lehet, hogy viszonylag kevés (többnyire fotoszintetikus) génről vannak részletes molekuláris genetikai adataink, és legalább hét szigma-faktort kódoló gén található a *Synechocystis* genomban (Kaneko és mtsai, 1996).

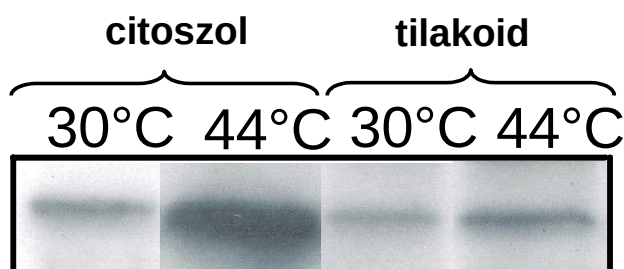
A többi *dnaK*-homológ esetében elvégzett hasonló kísérleteink alapján erősen valószínű, hogy a három gén közül kettő (*dnaK1* és *dnaK3*) transzkripcionálisan nem aktív, ún. pszeudogén, mivel mRNS termékeik Northern analízissel, RT-PCR technikával és primer extenziós kísérletekkel sem mutathatók ki, akár normál, akár adott stressz körülmények között vizsgáljuk őket.

2. A DnaK2 fehérje celluláris lokalizációja

A *dnaK2* gén 70 kDa-os fehérje termékét csoportunk már korábbi munkája során azonosította (Lehel és mtsai, 1992).

Jelen dolgozatban a DnaK2 fehérje celluláris lokalizációjára kívántunk fényt deríteni, mely információ közelebb vihet e chaperone sejtbeli szerepének tisztázásához. Az erre irányuló kísérlet során Western-blot segítségével megállapítottuk, hogy a DnaK2 protein normál hőmérsékleten (30°C) konstitutíven kifejeződik és mind a citoplazmában, mind a tilakoid membrán frakcióban megtalálható (8. ábra). Hő sokk hatására jelentős többlet képződik belőle, amely nagyrészt a citoplazmában marad, egy jól elkülöníthető mennyiség azonban

membránkötötté válik. A fentiek alapján elképzelhető tehát, hogy a chaperoninokkal és a Hsp 17-tel együtt a DnaK2 fehérje – melynek felépítése a kloroplasztiszbán található Hsp70 fehérjékkel mutat leginkább rokonságot - is aktív részt vállalhat a membrán hőstressz elleni védelmében.



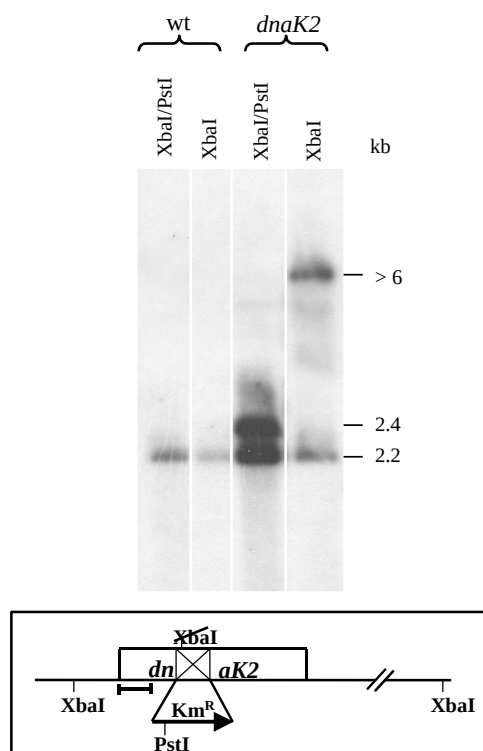
8. ábra. A DnaK2 fehérje celluláris lokalizációjának vizsgálata *Synechocystis* PCC6803 sejtekben Western-analízis segítségével.

3. *dnaK2*-mutáns *Synechocystis* törzs előállítása

A fenti kísérletek alapján úgy tűnik, hogy a *Synechocystis hsp70* homológjai közül csak a *dnaK2*-ről mondható el, hogy ténylegesen hősokk gén. Ezért érdekesnek tartottuk megvizsgálni, hogy a chaperone gén inaktiválása milyen fenotípusos változásokat okoz a cianobaktérium sejtek életében. Mivel a *Synechocystis* PCC6803 sejtek könnyen transzformálhatók és az exogén DNS nagy frekvenciával épül be a genomba, modellszervezetünk kiválóan alkalmas a homológ rekombinációval történő inszerciós mutagenézis adta lehetőségek kihasználására. (Williams, 1988).

Célunk megvalósítása érdekében a teljes *dnaK2*-t kódoló szekvenciát pUC18 vektorba klónoztuk. Ezután a gén közepének egy részét restrikciós hasítással eltávolítottuk, majd a helyére pUC4KIXX plazmidből izolált, kanamicin rezisztenciát

hordozó DNS darabot építettünk be (9. ábra; Varvasovszki és mtsai, 2003). Ily módon pozitív szelekciót (Km^R) biztosító mutagén vektort állítottunk elő. A konstrukciót *Synechocystis* sejtekbe transzformáltuk, majd a transzformáns jelölteket növekvő kanamicin koncentrációt tartalmazó lemezekre passzáltuk.



9. ábra. A *dnaK2*-mutáns törzs vizsgálata genomiális Southern technikával. A vad típusú sejtekből izolált DNS emésztettük XbaI-PstI ill. PstI enzimekkel. A mutáns DNS-t ugyanúgy XbaI-PstI és PstI emésztéssel ellenőriztük. A mutagén vektor sematikus térképét az alsó keretben tüntettük fel. A jobbra mutató nyíl a kanamicin kazettát jelzi.

Erre azért volt szükség, mert *Synechocystis* kromoszóma több példányban van jelen a sejtekben, így a teljes szegregációt fokozott szelekciós nyomással kell elősegíteni (Williams, 1988).

A homológ rekombináció megvalósulásának menetét genomiális Southern technikával követtük nyomon. A 9. ábrán látható, hogy a mutáns konstrukció

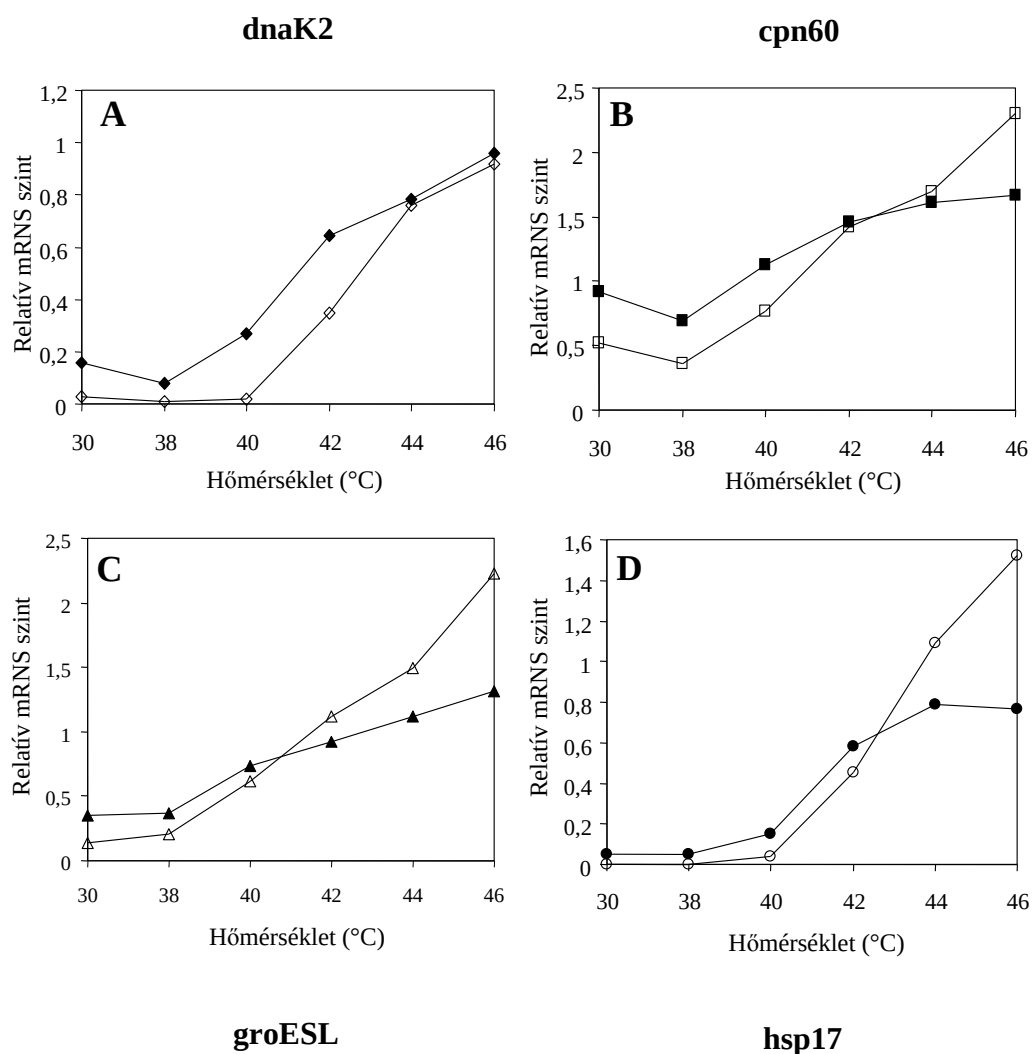
beépülése a drasztikus szelekciós körülmények ellenére (passzálások sorozata 300µg/ml kanamicint tartalmazó lemezekre, 6 hónapon keresztül) sem volt teljes, a *dnaK2* inszerciós inaktivációjának kísérlete merodiploid sejtvonalat eredményezett. A *dnaK2*-hiányos allél aránya a vad típusú génkópiákhoz viszonyítva kb. 50%-ra tehető. Ezen adatok alapján megállapítható tehát, hogy a *Synechocystis dnaK2* génje minden valószínűség szerint feltétlenül szükséges a sejtek életben maradásához, vagyis még normál körülmények között is esszenciális csakúgy, mint a *Synechococcus* PCC7942-ben található *dnaK2*-homológ (Oguchi és mtsai, 1997).

Ugyanakkor megjegyezzük, hogy a vad típusú és részleges mutáns kultúrák növekedése között az általánosan használt, normális növesztési hőmérsékleten (30°C) eltérés a konstrukció létrehozása óta nem tapasztalható, ami az általunk létrehozott merodiploid sejt vonal stabil voltára szolgálhat további bizonyítékként.

4. A *dnaK2* részleges inaktiválásának hatása a többi chaperone gén kifejeződésére: változások génexpressziós és fehérje-szinten

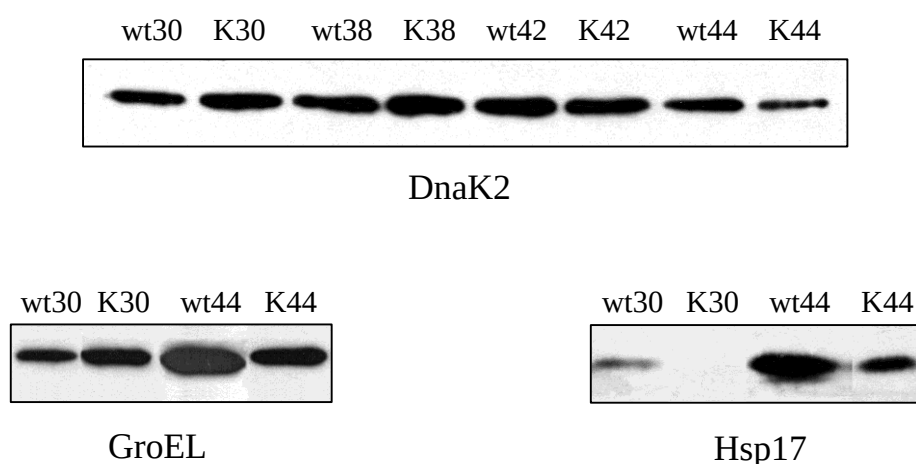
Irodalmi adatok sokaságával alátámasztott megfigyelés, hogy a különböző chaperone családok tagjai sejtbeli szerepüket egymással szorosan együttműködve töltik be. Ez alapján felmerülhet a kérdés, miszerint az egyetlen, hőre fokozottan átíró *hsp70* alléljainak részleges eltávolítása a cianobaktérium sejtéből mennyiben befolyásolja a többi hősokk gén expresszióját. E probléma felderítésének érdekében a vad típusú, illetve *dnaK2*-mutáns *Synechocystis* törzsekben található chaperone gének hőindukciós profilját Northern analízis segítségével vizsgáltuk (10. ábra; Varvasovszki és mtsai, 2003). A kísérlet során a kékalga tenyészeteket a normál

növesztési körülményektől (30°C) kezdve egyre emelkedő hőmérsékleteken inkubáltuk, belső standardként pedig 23S mRNS-t használtunk. A Northern-blot kiértékelése illetve a két sejtvonal chaperone-expressziós képének a belső standardra vonatkoztatott relatív összehasonlítása denzitometriás módszerrel történt.



10. ábra. Különböző chaperone gének hőindukciójának összehasonlítása vad típusú (üres szimbólumok) és *dnaK2*-mutáns (tele szimbólumok) *Synechocystis* sejtekben. A sejteket a megadott hőmérsékleteken inkubáltuk 30 percen keresztül, majd Northern-hibridizációval vizsgáltuk a *dnaK2* (A), a *cpn60* (B), a *groESL* (C) és a *hsp17* (D) expresszióját. A belső standardra (23S mRNS) vonatkoztatott kiértékelés denzitometriás módszerrel történt.

Joggal feltételezhettük, hogy a *dnaK2*-mutáns törzsben a többi chaperone gén megnövekedett expressziót mutat, mivel a sejt kompenzálni igyekszik a *hsp70*-homológ részleges inaktivációjának hatását. A 10. ábrát tanulmányozva arra a megállapításra juthatunk, hogy alacsony hőmérsékleteken ez igaz is: nem csak a többi chaperone mRNS szintje magasabb a mutánsban mintegy 42 °C-ig, mint a vad típusú sejtekben, de furcsa módon magának a *dnaK2*-nek a relatív mennyisége is a vad sejtekben mért szintek felett van. Magas, 42 °C feletti hőmérsékleteken azonban a helyzet ezzel éppen ellentétesen alakul, vagyis a mutáns sejtekben a két chaperonin valamint a *hsp17* mRNS mennyiségének növekedése megáll és jóval a vad típusban mért szintek alatt marad. Ettől a tendenciától csak a *dnaK2* mRNS mennyiségében van eltérés, mely ugyanis a mutánsban és a vad típusú sejtekben közel azonos mennyiségben található meg. Nagyon figyelemre méltó eredmény ez, hiszen a mutánsban az mRNS-ek relatív mennyisége a szubletális hőstressztől (42°C) kezdve válik kifejezetten alacsonyabbá a vad típusban mérthez képest, éppen abban a tartományban, ahol a chaperone-ok stresszelhárító szerepe kerül előtérbe.



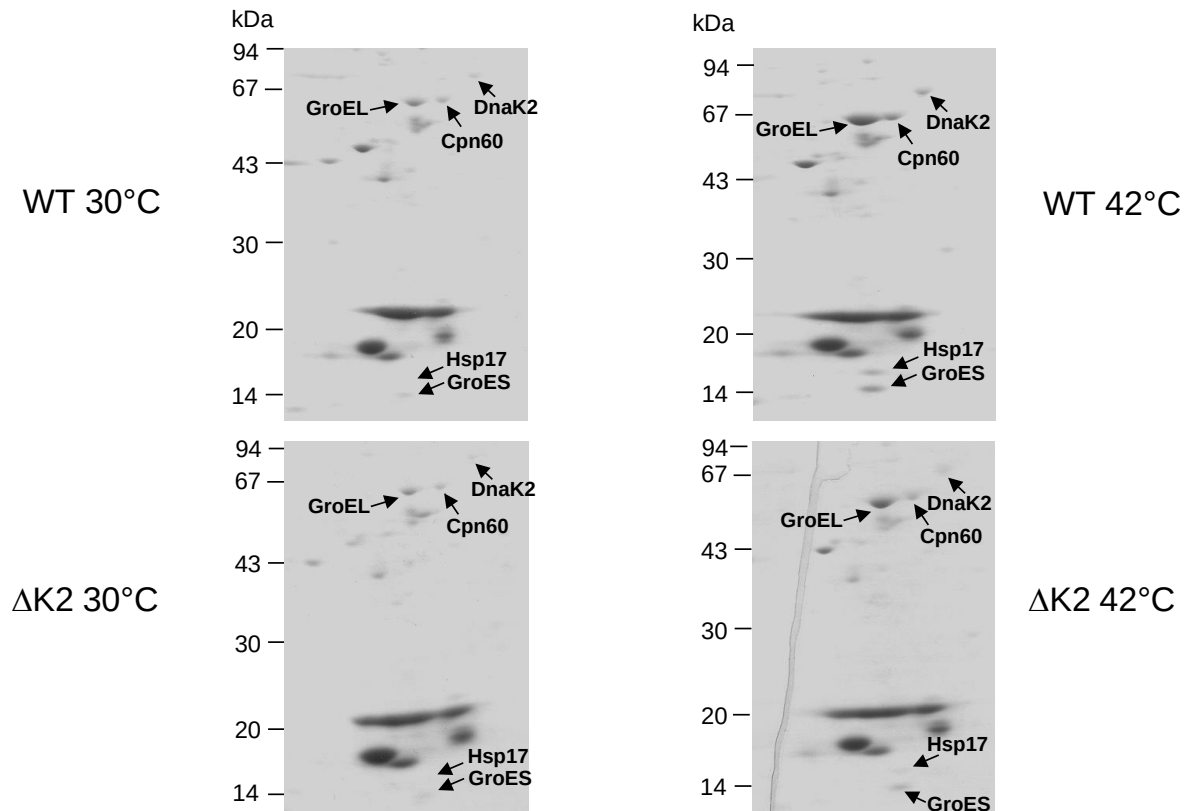
11. ábra. Western analízis a DnaK2, a GroEL és a Hsp17 fehérjék hőshock során történő mennyiségi változásainak vizsgálatára. A vad típusú (wt) illetve mutáns (K) sejteket a jelzett hőmérsékleteken 3 órán át inkubáltuk majd egy dimenziós SDS-PAGE-t követően a chaperone tartalmat Western-technikával - az egyes chaperone-ok ellen termeltetett specifikus poliklonális ellenanyagokat használva - tettük láthatóvá.

A továbbiakban a *dnaK2* chaperone gén részleges hiányának hatását a chaperon fehérjék mennyiségére két különböző módszer segítségével vizsgáltuk. A *dnaK2*, a *groEL*, illetve a *hsp17* gének fehérje termékeinek kifejeződését elsőként Western-technika alkalmazásával követtük nyomon (11. ábra; Varvasovszki és mtsai, 2003).

Az ábrán jól látható, hogy a mutáns sejtekben a DnaK2 mennyisége a mRNS-ek mennyiségének megfelelően alacsony hőmérsékleten magasabb, mint a vad típusú sejtekben. 42 ill 44 °C-okon azonban a mutáns sejtekben ebből a hősokkfehérjéből jóval kevesebb készült el, mint a vad típusú sejtekben. A DnaK2 fehérje redukált mennyisége láthatóan erősen befolyásolja a többi chaperone sejtbeli jelenlétének mértékét is, mivel a másik két stressz protein szintje – közülük is különösen a Hsp17-é – jelentősen csökken a *dnaK2*-mutáns törzsben 44 °C-on. Itt meg kell jegyeznünk, hogy a Hsp17 fehérje mennyisége a mutánsban - szemben a másik két vizsgált fehérjével és a mRNS szinttel- a várttól eltérően jóval alacsonyabb, mint a vad típusú sejtben. E jelenség okát nem tudjuk, de azt mindenképpen sejteti, hogy a Hsp17 fehérje szintézisében más szabályozó tényezők játszanak szerepet, mint a másik két hősokkfehérjében, valamint, hogy e fehérje mennyisége valószínűleg transzlációs szinten is szabályozódik.

A következő kísérlet során a vad típusú és a mutáns sejteket 30°C-on növesztettük és egy részüket 42°C-on, három órán keresztül hősokkoltuk, majd a belőlük izolált fehérjéket kétdimenziós gélen megfuttattuk és Coomassie-festéssel tettük láthatóvá. A 12. ábra alapján elmondhatjuk, hogy - a fent bemutatott Western-blotnak megfelelően - a mutáns sejtekben jelentősen kevesebb DnaK2 képződik, amely mennyisége hősokk hatására megnövelhető, de ezzel együtt a vad típusra

jellemző szint alatt marad. Hasonló tendenciát láthatunk - a fent ismertetett mRNS-szintű eredményekkel teljes összhangban - a többi chaperone esetében is.



12. ábra. A vad típusú és a DnaK2-deficiens *Synechocystis* fehérjeinek vizsgálata kétdimenziós gélelektroforézissel. A chaperone fehérjék pozícióját nyíllal jelöltük.

Itt jegyezzük meg, hogy míg *Synechococcus*-ban mind a *dnaK2* mind a *dnaK3* homológ gének kifejeződnek (Nimura és mtsai, 1994a; 1994b; 1996; 2001), addig *Synechocystis*-ben vizsgálataink szerint kizárólag az erősen hőindukálható *dnaK2* génről készül DnaK fehérje. A *Synechocystis*-genomban – a *Synechococcus*-hoz hasonlóan - egy *dnaJ* homológ gén (sll1933) található közvetlenül a *dnaK3* után. A két *dnaJ* gén más tulajdonságában is hasonlít egymásra: egyikben sem található meg a DnaJ-fehérjékre amúgy általában jellemző glicin/fenilalanin-gazdag régiót, illetve az ún. zinc-finger-domént kódoló nukleotid-szekvencia. A *Synechococcus* ezen *dnaJ* génje valószínűleg esszenciális, mivel – a *Synechocystis dnaK2*-éhez hasonlóan –

kanamicin-rezisztencia-kazetta beépítésével csak parciális szegregáció érhető el. Mivel a *Synechococcus* DnaK3 és DnaJ fehérjék jelentős mennyisége a tilakoid membránokban lokalizálódik, a szerzők feltételezése szerint ezen chaperone-ok a fotoszintézishez szükséges fehérjék tilakoid membránokba való jutását hívatottak segíteni. A *Synechocystis* esetében a Hsp70-család szerepe nem így alakul. A *Synechococcus* DnaK3 ellen termeltetett ellenanyag a *Synechocystis* tilakoid membrán frakciójában jelenlevő egyik fehérje ellen sem adott immunreakciót (Varvasovszki és mtsai, 2003). Ugyanakkor a jelen dolgozat 8. ábráján látható Western-analízis szerint a DnaK2 fehérje egy jól definiálható mennyisége tilakoidokhoz kötődik.

Az a tény, hogy a *Synechocystis*-genomból az irányított mutagenézis során nem sikerült az összes *dnaK2*-kópiát eltávolítani, arra enged következtetni, hogy a *dnaK2* fiziológiás körülmények között is esszenciális a sejt számára. A redukált géndózis ellenére normál kondíciók között a *dnaK2* mRNS illetve fehérje mennyisége azonos volt a vad típusban és a mutáns sejtekben. Magasabb hőmérsékleten viszont az összes vizsgált chaperone szintje csökkent a *dnaK2* merodiploid sejtekben. *Escherichia coli*-ban a *dnaK* gén mutációja 30 °C-on a többi hősokk fehérje magas bazális aktivitását okozta, 42°C-on pedig a hősokk válasz leállításában keletkeztek hibák, ami arra enged következtetni, hogy a DnaK a hősokk válasz negatív szabályozó faktorként is funkcionál (Tilly és mtsai, 1983; Gamer és mtsai, 1992). *Synechocystis*-ben a *dnaK2* gén részleges inaktivációja szintén befolyásolja a többi chaperone transzkripcióját illetve transzlációját magas hőmérsékleten, ám ez a hatás az *E. coli*-énál megfigyelten ellentétes irányban működik.

Általánosan elfogadott tény, hogy a különböző hősokk proteinek egymással szoros kapcsolatban fejtik ki működésüket. Valószínű tehát, hogy ha kivonunk egy szereplőt a rendszerből - akár részlegesen is, - az egész stresszelhárító “gépezet” sérül,

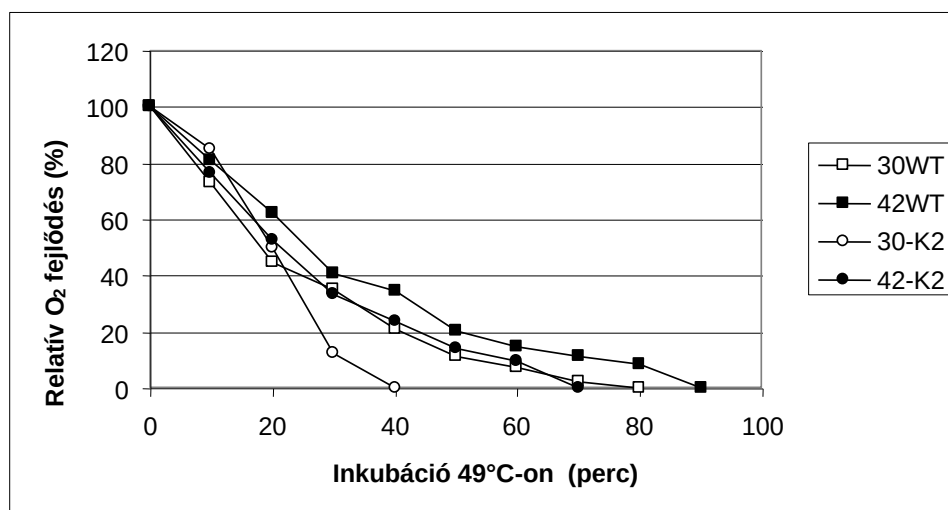
ami végül (esetleg negatív visszacsatolási mechanizmusok útján) más chaperone-partnerek expressziós szintjének csökkenésében is megnyilvánulhat. A fentiekből következik tehát, hogy a DnaK2 minden bizonnyal a *Synechocystis* magas hőmérsékleti stressz elleni védelmi rendszerének fontos szereplője, azonban még nem tisztázott, hogy a *dnaK2* redukált géndózisa közvetlen befolyást gyakorol-e a chaperone-ok expressziójára vagy hatása esetleg bonyolult, eddig feltáratlan sejtbeli mechanizmusokon át valósul meg.

5. A *dnaK2*-mutáns sejtvonala fiziológiás változásainak vizsgálata: a nagy intenzitású fény és az UV-B sugárzás következményeinek feltárása

A korábban ismertetett eredményekből következik, hogy a chaperone-“gépezet” egy fontos szereplőjének parciális eltávolítása a többi elem kifejeződését is jelentősen módosítja. Ennek hatását pedig fiziológiás szinten, a sejteket *in vivo* tanulmányozva is tapasztalnunk kell. Cianobaktérium kultúrákról lévén szó, kézenfekvő volt a sejtek egyik fő életfolyamatát, a fotoszintézist vizsgálni, annál is inkább, mivel a különböző stresszhatásokra bizonyítottan a fotoszintetikus rendszert magán hordozó tilakoid membrán, azon belül is a kettes számú fotoszisztéma (PSII) a legérzékenyebb (Berry és Bjorkman, 1980). A fiziológiás eltérések bemutatására többféle mérést is végeztünk.

Elsőként a magas hőmérsékleti stresszel kezelt kultúrák fotoszintetikus oxigénfejlődését követtük nyomon *in vivo* (Varvasovszki és mtsai, 2003). A vad típusú és a mutáns tenyészeteket 30°C-on felnövesztettük és egy részüket 3 órán át, szubletális hőmérsékleten (42°C) előkezeltük, majd a kontrol (kezelés nélküli) mintákkal együtt igen erős hősokknak (49°C) tettük ki. Várakozásainknak

megfelelően, normál körülmények között nem találtunk különbséget a vad típusú és a parciális *dnaK2*-mutáns kultúrák fotoszintetikus oxigén-fejlesztő képessége között (bemutatásra nem kerülő adat). A 13. ábrán látható, hogy a fotoszintetikus aktivitás magas hőmérsékleti kezelés hatására mindkét törzsben jelentősen csökkenni kezdett.

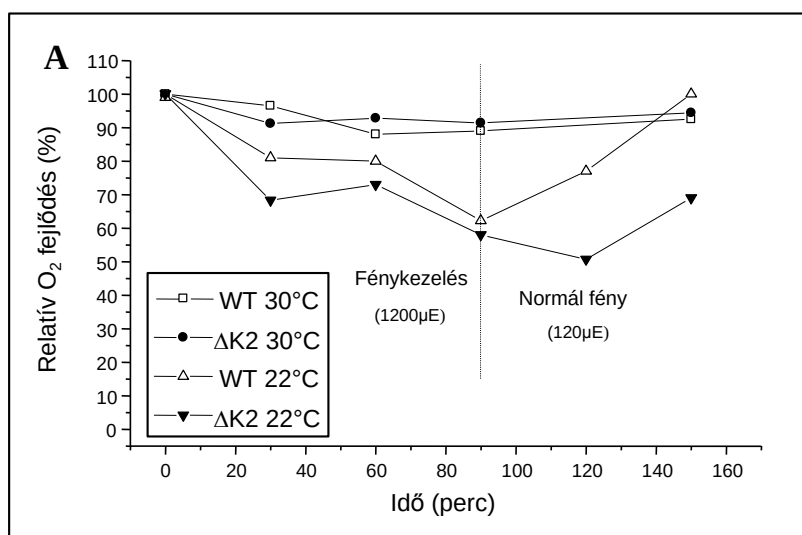


13. ábra. Vad típusú (WT) és *dnaK2*-mutáns (K2) *Synechocystis* sejtek fotoszintetikus aktivitásának vizsgálata extrém hősokk során. A tenyészeteket 3 órán keresztül inkubáltuk 30°C, illetve 44°C-on, majd 49°C-os extrém hősokkunk tettük ki sötétben a jelzett időintervallumokig. A hőstresszt követően a fotoszintetikus aktivitást Clark-típusú oxigén-elektrod segítségével határoztuk meg.

A *dnaK2*-mutáns kultúra nyilvánvaló hőmérséklet-érzékeny fenotípust mutatott. Szubletális kezelés nélkül a mutáns tenyészet (30-K2) feleannyi ideig (40 perc) fejleszt oxigént 49°C-on, mint a vad típus (30WT), vagyis feleannyi ideig képes életben maradni. Előkezelés után azonban a mutáns sejtvonala (42-K2) életideje jelentősen megnövekszik, elérve a 30°C-on növesztett vad típusú sejtek fotoszintetikus stabilitását. Megállapítható tehát, hogy a *dnaK2*-hiányos *Synechocystis* sejtek alapállapotban a vad típushoz viszonyítva kevésbé termotoleránsak, szuboptimális hőmérsékleten való előkezelés után viszont jó hőadaptációs képességgel rendelkeznek, bár túlélési idejük még ezzel együtt sem éri el a genetikailag nem módosított sejtekét. A fenti eredmények utalhatnak arra, hogy a

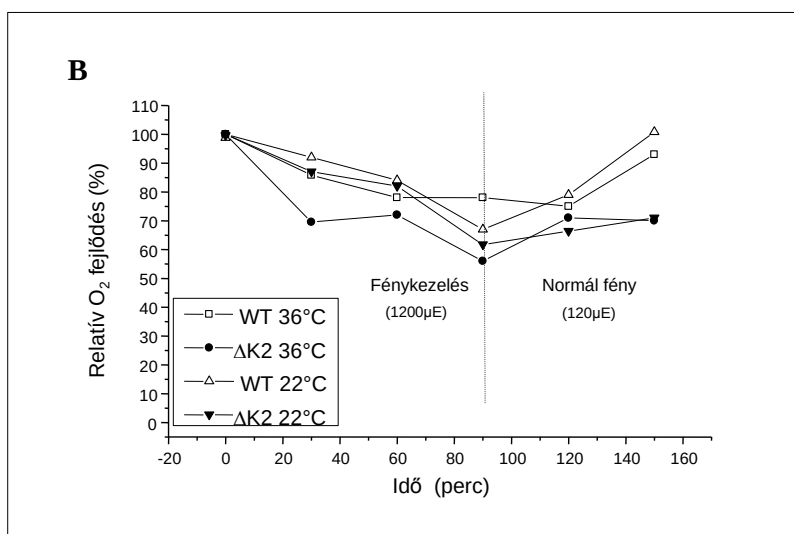
cianobaktérium sejtben a különböző stresszfehérjék egymáshoz viszonyított adott mennyisége és együttműködése nélkülözhetetlen a stressz elleni védelemben, míg a hőmérsékleti adaptációs folyamatokat mindez kevésbé érinti.

A továbbiakban a tenyészetek fénytűrését vizsgáltuk, mely szintén a fotoszintetikus rendszer és a tilakoid membránok épségéről és ezzel együtt voltaképpen a sejtek fiziológiás állapotáról ad képet. A kísérleteket a különböző növesztési hőmérsékleteken tenyésztett kultúrák relatív oxigén-fejlesztő képességét nyomon követve végeztük (Varvasovszki és mtsai, előkészítés alatt álló kézirat). A mintákat 90 percig a normálisnál tízszer nagyobb intenzitású ($1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fehér fénnel világítottuk meg, majd a kezelést követően fiziológiás fényviszonyok ($120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) közé helyeztük vissza. A fénystresszt a tenyésztési hőmérséklettől eltérő (22°C) hőfokon való kezeléssel kombináltuk, a kontrol méréseket pedig mindig a kiindulási hőmérsékleten végeztük.



14. a ábra. A 30°C -on tenyésztett vad típusú és *dnaK2*-mutáns *Synechocystis* sejtek fénytűrésének vizsgálata 30 illetve 22°C -on.

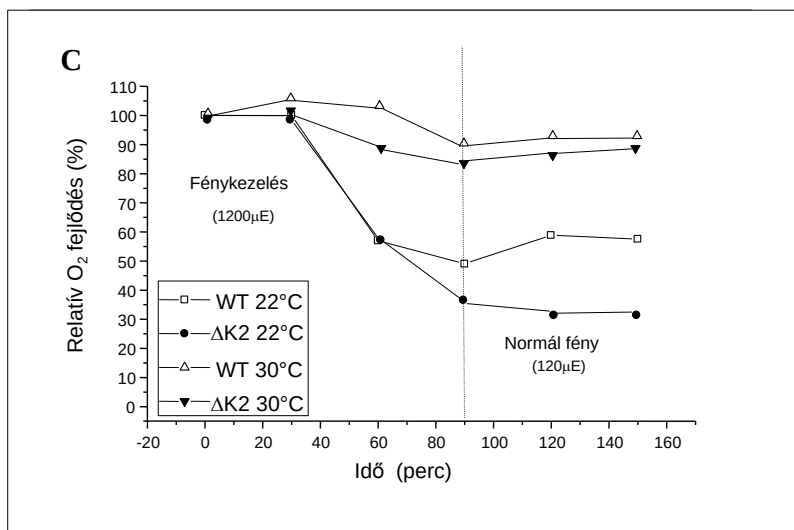
A 30°C-on nevelt sejteknél a fénystressz önmagában nem okozott számottevő változást sem a vad típus, sem pedig a *dnaK2*-mutáns fotoszintetikus aktivitásában (14. a ábra). Ugyanilyen mintákat 22°C-ra helyezve látható, hogy erős megvilágítás mellett mindkét törzs csökkenő mennyiségű oxigént bocsát ki, normál fényviszonyok közé kerülve azonban ez a szint újra növekedni kezd, és a vad típusú sejtek a mutánsoknál jóval gyorsabban képesek alapállapotba visszatérni.



14. b ábra. A 36 °C-on tenyésztett vad típusú és *dnaK2*-mutáns *Synechocystis* sejtek fénytűrésének vizsgálata 36 illetve 22 °C-on.

A 36°C-on növesztett kultúrák esetében az előzőleg leírtaktól eltérő tendenciát láthatunk (14. b. ábra). Az alacsony hőmérsékleti stressznek (22°C) is kitett sejtek fotoszintetikus aktivitása a fent ismertetett esethez hasonlóan alakult, de ezúttal a növesztési hőmérsékleten (36°C-on) fénykezelt mintáknál is erős fotoinhibíciós hatást figyelhettünk meg a kezelés során és a mutáns sejt típus mindkét hőmérsékleten sokkal érzékenyebb volt, mint a vad párja.

A harmadik mérésorozatban az elsőként bemutatott fénygátlás-kísérlet hőmérsékleti körülményeit megfordítva alkalmaztuk; ez alkalommal a hideghez (22°C) adaptált tenyészeteket kezeltük számukra viszonylag magasabb hőmérséklettel (30°C).



14. c ábra. A 22 °C-on tenyésztett vad típusú és *dnaK2*-mutáns *Synechocystis* sejtek fénytűrésének vizsgálata 22 illetve 30 °C-on.

A 14. c ábra tanulmányozásakor kitűnik, hogy a korábban vizsgált meleg-adaptált sejtekkel ellentétben, a 22°C-os kultúrák a saját növekedési hőmérsékletükön sokkal kevésbé viselték el a nagy intenzitású fénnel történő besugárzást, mint a számukra tulajdonképpen már hőstresszt jelentő 30°C-on, sőt ismét fiziológiás fényviszonyok közé kerülve is csak csökkent szintű oxigén-fejlesztésre voltak képesek.

A fent ismertetett kísérletsorozat több fontos összefüggésre hívja fel a figyelmet. Csoportunk korábbi munkája alapján tudjuk, hogy a növekedési hőmérséklet nagymértékben befolyásolja a biológiai membránok fizikai állapotát, melyek fluiditása a 22°C-hoz adaptált sejtekben a legnagyobb, a 30, illetve a 36°C-on tenyésztett kultúrákban pedig egyre kisebb. Ez az adaptációs folyamat során kialakult állapot hőkezelés hatására módosul: hidegstressz után a membránok rigidebbek, magas hőmérséklet alkalmazásakor viszont fluidabbak lesznek.

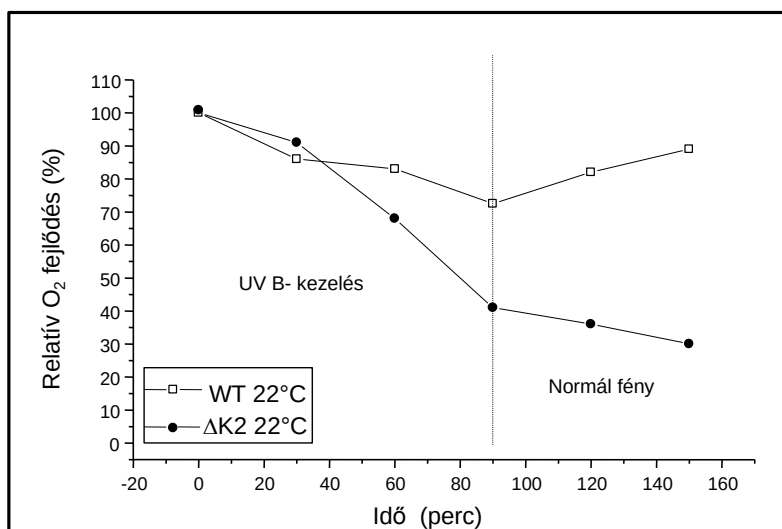
Amikor a tilakoidok fizikai állapota ily módon megváltozik, a bennük található fotoszintetikus rendszer elemei is különbözően reagálnak az őket érő stresszhatásokra,

pl. a nagy intenzitású fényre, melynek a fotoszintetikus működést gátló hatása fotoinhibíció néven ismert (Aro és mtsai, 1993). E folyamat során a II. fotoszisztéma fehérje-alegységei, ezek közül is elsősorban a D1 és kisebb mértékben a D2 proteinek károsodnak, melyeket aztán a sejt – integritásának védelme érdekében - működőképes elemekre cserél ki. Mivel a chaperone-ok egyik fontos funkciója éppen a stressz hatására károsodott fehérjék kijavítása illetve a helyettük újonnan képződő proteinek aktív szerkezetének kialakítása, nagyon valószínű, hogy fontos szerepet játszanak a fotoszintetikus apparátus védelmében is.

A nagy intenzitású látható fény mellett az ultraibolya sugárzás talán még károsítóbb hatást gyakorol a sejtekre, melyre azok sok egyéb komponense közül a PSII kiemelten érzékeny (Vass és mtsai, 1996). Az UV-B sugárzás (280-320 nm) a fotoszintetikus elektrontranszport rendszer roncsolásán kívül a D1 és D2 proteinek sérülését is okozza. Érdekes volt tehát megvizsgálni a vad típusú illetve *dnaK2*-mutáns *Synechocystis* tenyészetek fotoszintézisében UV-B-kezelés hatására bekövetkező változásokat, melyekre vonatkozó méréseket az előzőekhez hasonló módon, az oxigén felődésének követésével végeztünk (15. ábra; Varvasovszki és mtsai, előkészítés alatt álló kézirat).

A 30°C-on növesztett kultúrákat 22°C-ra helyezve 312 nm maximális hullámhosszú, 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$ intenzitású UV-B sugárzással 90 percig kezeltük, majd a mintákat a normál tenyésztési körülményeknek megfelelő fehér fényre helyeztük vissza. A 15. ábra alapján elmondhatjuk, hogy a mutáns sejtvonal oxigén-kibocsátó képessége a vad típusénál jóval drasztikusabban változva az eredeti érték 40%-ára esett vissza és fotoszintézisének intenzitása még az ultraibolya sugárzás megszüntetése után is fokozatos csökkenést mutatott, ami végül a sejtek pusztulását

eredményezte. A genetikailag nem módosított törzs ezzel szemben a kísérlet végére csaknem teljes mértékben visszanyerte fotoszintetikus aktivitását.



15. ábra. UV-B-sugárzás hatása a vad típusú és a *dnaK2*-mutáns sejtvonalak fotoszintetikus aktivitására. A 30°C-on tenyésztett kultúrák UV-B-tűrésének alakulását fotoszintetikus oxigén-fejlődésük nyomon követésével vizsgáltuk.

A fenti kísérleti eredményeket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a Hsp70 homológ chaperone parciális eltávolítása alapvető fiziológiás változásokat okoz *Synechocystis*-ben, mivel a *dnaK2*-mutáns törzs mind a fénystresszel, mind pedig az UV-B sugárzással szemben a vad típusnál kevésbé bizonyult ellenállóknak, különösen azokban az esetekben, amikor a fénykezeléseket hőmérsékleti stresszekkel kombináltuk.

A fotoszintetikus apparátus stresszérzékeny volta komponenseinek sokféleségéből és felettebb bonyolult szerkezetéből is adódik. A felépítésében résztvevő különböző típusú fehérjekomplexek finoman összehangolt működése a tilakoid membránokhoz kötött folyamat. A molekuláris chaperone-ok funkciója a fotoszintetikus apparátus védelmében valószínűleg kettős lehet. Egyrészt a bonyolult

fehérjekomplexek stresszhatások következtében kialakuló sérüléseit megakadályozva töltheti be klasszikus hősokk fehérje funkcióját, másrészt esetleg részt vehet közvetlenül a tilakoid membránok integritásának fenntartásában is. Utóbbi elképzelés létjogosultságát több megfigyelés is alátámasztja. Jelen dolgozat 8. ábráján látható, hogy a DnaK2 fehérje egy része alapállapotban is a tilakoid-frakcióban található, hősokk hatására pedig újabb, jól elkülöníthető mennyiség válik belőle membránkötötté. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai során azt is bizonyította, hogy a GroEL chaperonin (Kovács és mtsai, 1994b; Török és mtsai, 1997) és a Hsp17 is tilakoid-kötötté válik a hőstressz kezelés során (Horváth és mtsai, 1998; Török és mtsai, 2001; Tsvetkova és mtsai, 2002). Mivel a különböző chaperone-csoportok egymással szoros összefüggésben fejtik ki tevékenységüket, a DnaK mennyiségének változtatása szükségszerűen kihat a hősokk fehérjék más családjainak fehérjevédő tevékenységére és a membránokkal való kapcsolatára is.

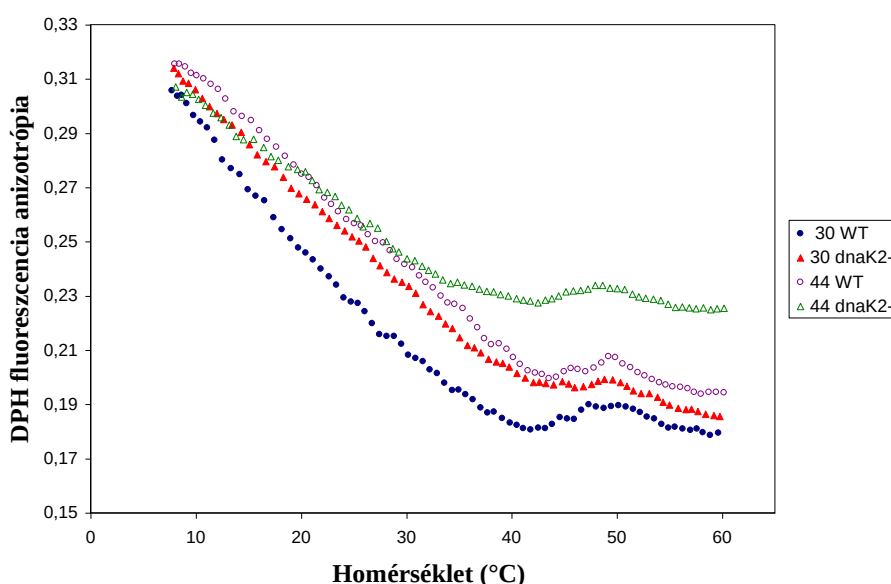
A korábban felsorolt megfigyelések fényében nyilvánvaló, hogy a DnaK2 protein csökkent mennyisége –akár közvetlenül, akár a többi chaperone-partner sejtbeli szintjének modulációján keresztül – a tenyészetek stressz-érzékenységét befolyásolhatja, hiszen a membránok védelmére és a fotoszintetikus folyamatokban résztvevő fehérjekomplexek javítására egyaránt kevesebb Hsp molekula jut.

6. A DnaK2 kulcsszerepének további bizonyítékai: változások a biológiai membránok fizikai állapotában és összetételében

Az előző fejezetben ismertetett megfigyelések kivétel nélkül egyben a DnaK2 fehérjének a biológiai membránokkal való szoros kapcsolatára is utalnak, mivel e chaperone a membránokhoz kötött élettani folyamatokra láthatóan számottevő hatást

gyakorol. A következő kísérletekben a különböző *Synechocystis* törzsek membránjainak fizikai állapotáról közvetlenebb módon is igyekeztünk képet kapni.

Ennek érdekében először a tilakoid membrán fluiditásának változását vizsgáltuk a vad típusú és a *dnaK2*-mutáns sejtvonalakban, magas hőmérsékleti kezeléssel (44°C, 3 óra) illetve anélkül. A mérést a steady-state fluoreszcencia anizotrópia technika segítségével valósítottuk meg (16. ábra; Varvasovszki és mtsai, előkészítés alatt álló kézirat). Szonda molekulaként a difenil-1,3,5-hexatriént (DPH) alkalmaztuk, amely a membrán különböző hidrofób régióiban egyforma valószínűséggel fordul elő (Shinitzky és Barenholz, 1978). A mérési hőmérséklet fokozatos emelkedése hatására a különböző sejtekből készített tilakoid-minták anizotrópiája – zsírsav láncainak “rendezetlensége” – csökken, ami egyben fluiditásuk növekedését (rigiditásuk csökkenését) is jelenti. A 44°C-on előkezelt tilakoidok anizotrópia-értéke adott mérési hőfokon a nekik megfelelő kontrol mintakénál mindig magasabban alakul, mely hatás a membránok termoadaptációjából adódik.



16. ábra. A tilakoid membrán fluiditás-változásának bemutatása vad típusú és *dnaK2*-mutáns sejtvonalakban steady-state fluoreszcencia anizotrópia technika segítségével.

A grafikont tanulmányozva ugyanakkor az is szembetűnő, hogy a mutánsból származó tilakoidok a vad típusnál mindkét esetben egyértelműen rigidebbek. Az 50°C körüli kismértékű anizotrópia-növekedés – mely mind a négy minta esetében megfigyelhető – a membránok fiziológiás szerkezetének nem lipid kettősréteg-jellegű, ún. fordított hexagonális fázisba történő hirtelen átalakulásával, fázisátmenetével magyarázható.

A tilakoid membránok összetételének vizsgálatát az őket alkotó lipid molekulák teljes analízisével végeztük. Az egyes lipidosztályok vékonyréteg-kromatográfiás elválasztása után a belőlük metilezéssel nyert zsírsavak mennyiségét gázkromatográfiás módszerrel határoztuk meg. A *Synechocystis* tilakoid membránjaiban előforduló zsírsavakat az I. A táblázat foglalja össze, az I. B panelen pedig a mennyiségi analízis eredménye látható. Utóbbi adatai közül az egyszerűen telítetlen 18:1 (olajsav) esetében figyelhető meg a legszembetűnőbb változás, mivel e zsírsavból a *dnaK2*-mutáns sejtek tilakoidjában a vad típussal összevetve kétszeres mennyiség található. További jelentős eltérés a mutánsra nézve, hogy a 18:2 (linolsav) és a γ 18:3 (γ -linolénsav) két illetve három darab kettős kötést tartalmazó zsírsavak szintje mintegy 20%-kal alacsonyabb. Valószínű tehát, hogy a tilakoidok olajsav-többletüket onnan nyerik, hogy a deszaturáció az olajsavtól a linolénsavig – a deszaturálást végző enzim komplex mennyiségének vagy aktivitásának csökkenése miatt - gátolt.

A parciálisan *dnaK2*-mutáns *Synechocystis* membránjainak a vad típushoz képest kialakuló fizikai állapotváltozásait bemutató kísérletek eredményének ismeretében több érdekes összefüggés került előtérbe.

A

16:0	palmitinsav
16:1	palmitoleinsav
18:0	sztearinsav
18:1	olajsav
18:2	linolsav
γ18:3	γ -linolénsav
α18:3	α -linolénsav

B

A tilakoid lipidek zsírsav összetétele (%)

Törzsek	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	γ 18:3	α 18:3	DBI
WT (30°C)	49.8	4.8	1.1	5.9	16.2	21.7	0.4	109.5
WT (3h 44°C)	50.5	4.5	1.7	5.7	16.1	21.1	0.4	107.0
ΔdnaK2 (30°C)	50.6	4.5	1.3	12.9	12.7	17.5	0.5	96.8
ΔdnaK2 (3h 44°C)	50.6	4.4	1.7	12.4	12.8	17.6	0.5	96.8

I. táblázat.

A. *Synechocystis* PCC6803 tilakoid membránjaiban előforduló zsírsavak.

B. A normál (30°C) illetve szubletális (44°C) hőmérsékleti kezelésnek kitett vad típusú és *dnaK2*-mutáns sejtekből izolált tilakoidok zsírsav-összetételének összehasonlítása. A metilezéssel nyert zsírsav metilészterek mennyiségét gázkromatográfiás módszerrel határoztuk meg.

Miután a *dnaK2*-mutáns törzsben a Hsp17 fehérje –amely fehérje amfitróp, membránhoz kötődő tulajdonságát csoportunk bizonyította (Horváth és mtsai, 1998) - mennyisége bizonyítottan lecsökken (lásd a 10., 11. illetve 12. ábrákat), ez a jelenség egyfajta másodlagos membrán-átrendeződést indíthatott el. A membránkötött hősokk fehérjék szintjének csökkenése membránfluidizáló hatással bír, melyet a rendszer a lipidek rigidizációjával (vagyis telítetlenségük csökkentésével) igyekszik kompenzálni (I. b. táblázat). A fenti folyamatok a homeoviszkozus adaptáció elvével teljes összhangban játszódnak le. Ez esetben azonban a fluiditás-kompenzáció minden

bizonynyal túlment a célon, hiszen a *dnaK2*-mutáns sejtek tilakoidja a vad típuséhoz viszonyítva végül rigidebbé vált – legalábbis a membránnak abban a mélységében, ahonnan a DPH próbával végzett fluoreszcencia-anizotrópia mérések tudósítanak (16. ábra). Elképzelhető továbbá, hogy a stresszfehérjék a lipidanyagcsere ma még feltáratlan pontjain - egyes folyamatokra vagy részfolyamatokra nézve - chaperone-ként is szabályozó hatással bírnak. E lehetőséget figyelembe véve az is könnyen előfordulhat, hogy az egyes hősokk proteinek mennyiségi viszonyainak átrendeződése a *dnaK2* parciális mutáns *Synechocystis*-ben rendkívül összetett, ma még csak részben magyarázható történéseket indít el.

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

A jelen dolgozatban közreadott kísérletek eredményének ismeretében **elsőként bizonyítottuk, hogy egy alapvető hősokk proteinre, a DnaK-re nézve mutáns szervezet egyben membrán-mutáns is**, a sejt fiziológiás folyamatainak különböző szintjein lejátszódó események pedig e mutáns törzsben egymással tökéletes összhangban alakulnak.

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Jelen dolgozatban a *Synechocystis* PCC6803 cianobaktérium *hsp70* chaperone családjának vizsgálatával foglalkoztunk.

1. Megállapítottuk, hogy a *Synechocystis*-genomban **a három *hsp70* homológ közül csak egyetlen, a *dnaK2* mutat hőindukálható expressziót**, a másik két gén (*dnaK1* és 3) pedig transzkripcionálisan nem aktív, ún pszeudogén, mivel mRNS-termékeik –jelen körülmények között- Northern-analízissel RT-PCR-technikával és primer-extenziós kísérletekkel sem mutathatók ki. A fentiekkel szemben **a co-chaperone-ok (4db *dnaJ* és 1 db *grpE*) transzkripciója konstitutívnek bizonyult**, s magasabb hőmérsékleten sem tért el a normál körülmények között megfigyelhető szinttől.
2. Western-blot analízis segítségével kimutattuk, hogy normál hőmérsékleten a **DnaK2 fehérje a citoplazmában és a tilakoid membrán frakcióban egyaránt megtalálható**, hősokk hatására pedig jelentős többlet képződik belőle, melynek egy része membránkötté válik.
3. Helyspecifikus inszerciós mutagenézis segítségével **részlegesen *dnaK2*-deficiens, ún. merodiploid sejtvonalat állítottunk elő**. A mutáns konstrukció beépülése a drasztikus szelekciós körülmények ellenére sem volt teljes, **a *dnaK2* gén** fiziológiás körülmények között is **esszenciálisnak bizonyult**.

4. A különböző sejtvonalak fotoszintetikus oxigén-fejlődését nyomonkövetve megállapítottuk, hogy **a részlegesen DnaK2-hiányos *Synechocystis* sejtek** normál körülmények között a vad típushoz viszonyítva **kevésbé termotoleráns fenotípust mutatnak**, magas hőmérsékleti **előkezelés után viszont jobb hőadaptációs tulajdonságokkal rendelkeznek**, bár túlélési idejük még ezzel együtt sem éri el a genetikailag nem módosított sejtekét.
5. A különböző növekedési hőmérsékletekhez adaptált vad, illetve *dnaK2*-mutáns tenyészetek **fénytűrésének** tanulmányozása a következő eredményeket hozta:
- **a 30°C-on nevelt sejteknél** a fénykezelés önmagában nem okozott számottevő változást egyik kultúra fotoszintetikus aktivitásában sem. E paraméter értéke ugyanezen törzseket 22°C-ra helyezve viszont mindkét törzs esetében csökkenést mutat.
 - **a 36°C-hoz adaptált kultúrák** vizsgálatakor már a csak fénykezelt kontrol mintáknál is fotoinhibíciós hatást figyelhettünk meg.
 - **a 22°C-on tenyésztett sejtek** a saját növekedési hőmérsékletükön sokkal kevésbé viselték el a fénykezelést, mint a számukra tulajdonképpen már hőstresszt jelentő 30°C-on, sőt ismét fiziológias fényviszonyok közé kerülve is csak csökkent szintű oxigén-fejlesztésre voltak képesek.
6. Az **UV-B tolerancia vizsgálatok** alapján kimutattuk, hogy a *dnaK2*-mutáns sejtvonal oxigén-kibocsátó képessége az eredeti érték 40%-ára esett vissza és fotoszintézisének intenzitása még az UV-B sugárzás megszüntetése után is fokozatos csökkenést mutatott, ami végül a sejtek pusztulását eredményezte.

A vad típusú törzs ezzel szemben a kísérlet végére csaknem teljes mértékben visszanyerte fotoszintetikus aktivitását.

7. A *Synechocystis* sejt **membránjaiban lezajló fizikai változásokat** a fluoreszcencia-anizotrópia módszerével **tanulmányozva kimutattuk, hogy** a magas hőmérsékleten előkezelt tilakoidok anizotrópia-értéke adott mérési hőfokon a nekik megfelelő kontrol mintákénál mindig magasabban alakul, mely hatás a membránok termoadaptációjából adódik. **A *dnaK2*-mutánsból származó tilakoidok a vad típusnál mindkét esetben egyértelműen rigidebbek.**
8. **A membrán zsírsav-összetételének analízisekor a mutáns sejtek tilakoid lipidjeiben az olajsav (18:1) mennyiségének** –a linolsav és a γ -linolénsav rovására történő- szignifikáns **növekedését regisztráltuk** a vad típushoz képest.
9. A dolgozatban ismertetett eredmények alapján **elsőként bizonyítottuk, hogy egy alapvető hősokk proteinre, a DnaK-ra nézve mutáns szervezet egyben membrán-mutáns is**, mely létezéséhez fiziológias folyamatainak minden szintjén tökéletesen modulált összhang fenntartása szükséges.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani az Szegedi Biológiai Központ vezetőinek, hogy PhD-hallgatói éveim alatt az Intézetben dolgozhattam.

Külön köszönettel tartozom a Biokémiai Intézet Igazgatójának, Vigh Lászlónak, aki egyben témavezetőm is. Köszönöm mindig inspiráló hatású szakmai tanácsait, munkám iránti bizalmát, sok lemondással járó, áldozatos tevékenységét, amellyel kutatásunk feltételeit biztosítja.

Köszönöm a kollégáimnak, a Molekuláris Stresszbiológiai Csoport jelenlegi és volt tagjainak, személy szerint Horváth Ibolyának, Kovács Eszternek, Glatz Attilának, Török Zsoltnak, és Balogh Gábornak a szakmai segítséget és a baráti légkört, amelyben munkámat végezhettem.

Köszönöm asszisztenseink, Barta Éva, Gazsóné Tombácz Zsuzsa, és Bogdán Istvánné, Gabi munkáját és segítőkészségét.

Köszönettel tartozom Vass Imrének és Cosmin Sicorának a fotoinhibíció és UV-B tolerancia témakörében végzett kísérletekben való segítségükért.

Köszönöm Farkas Tibornak és munkacsoportjának szakmai és emberi támogatását.

Köszönöm Tóth Sándorné Marikának a demonstrációs anyagok elkészítésében nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsósorban családomnak szeretném kifejezni köszönetemet támogatásukért és türelmükért.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezés alapjául szolgáló cikkeket *-gal jelöltük.

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

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

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

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

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

Török, Zs., Goloubinoff, P., Horváth, I., Tsvetkova, N. M., Glatz, A., Balogh, G., **Varvasovszki, V.**, Los, D.A., Vierling, E., Crowe, J. H. and Vígh, L. (2000) *Synechocystis* HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding.

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

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

Biochem. Biophys. Res. Commun. **289**, 908-915.

***Varvasovszki, V., Glatz, A., Shigapova, N., Jósvay, K., Vigh, L., Horváth, I.** (2003) Only one *dnaK* homolog, *dnaK2*, is active transcriptionally and is essential in *Synechocystis*.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **305**, 641-648.

***Varvasovszki, V.**, Glatz, A., Török, Zs., Balogh, G., Shigapova, N., Jósfa, K., Sicora, C., Vass, I., Vigh, L., Horváth, I. The fatty acid composition, physical state and stress tolerance of thylakoids are strongly affected in the merodiploid DnaK mutant of *Synechocystis* cells (előkészületben).

IRODALOMJEGYZÉK

Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230.

Aoki, S., Kondo, T., Ishiure, M. (1995) Circadian expression of the *dnaK* gene in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *J. Bacteriol.* **177**, 5606-5611.

Aoki, S., Kondo, T., Wada, H., Ishiure, M. (1997) Circadian rhythm of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 in the dark. *J. Bacteriol.* **179**, 5751-5755.

Aro, E.-M., Virgin, I., Andersson, B. (1993), Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* **1134**., 113-134.

Arsene, F., Tomoyasu, T., Bukau, B. (2000) *International Journal of Food Microbiology*, **55**, 3-9.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith J. A. and Struhl, K. (1987) Current protocols in Molecular Biology. Wiley, New York

Baird, P. N., Hall, L. M. C., Coates, A. R. M. (1989) Cloning and sequence analysis of the 10kDa antigen gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 931-939.

Barber, J., Ford, R.C., Mitchell, R.A.C., Millner, P.A. (1984) *Planta* **161**, 375-380.

Berry J. A., Bjorkman O. (1980) Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**, 491-553.

Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917.

Bukau, B. (1993) Regulation of the *Escherichia coli* heat shock response. *Mol. Microbiol.* **9**, 671-680.

Bukau, B., Horwich, A. L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**, 351-366.

Bukau, B. (1999) In: “*Molecular chaperones and folding catalysts. Regulation, cellular function and mechanism.*” Harwood Academic Publishers, Amsterdam, p.690.

Carratú, L., Franchescelli, S., Pardini, C. L., Kobayashi, G. S., Horváth, I., Vigh, L., Maresca, B. (1996) Membrane lipid perturbation modifies the setpoint of the temperature of heat shock response in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9090-9094.

Chitnis, P. R., Nelson, N. (1991) Molecular cloning of the genes encoding two molecular chaperone proteins of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **266**, 58-65.

Chow, K.-C. (2000) Hsp 70 (DnaK) – an evolution facilitator? *Trends in Genetics* **16**, 484-485.

Chow, K.-C. Tung, W. L. (2000) Magnetic field exposure enhances DNA repair through the induction of DnaK/J synthesis. *FEBS Lett.* **478**, 133-136.

Clarke, D. J., Jacq, A., Holland, I. B. (1996) A novel DnaJ-like protein in *Escherichia coli* inserts into the cytoplasmic membrane with a Type III topology. *Mol. Microbiol.* **20**(6), 1273-1286.

Connolly, L., Yura, T., Gross, C. A. (1999) Autoregulation of the heat shock response in procaryotes. In: "*Molecular chaperones and folding catalysts. Regulation, cellular function and mechanism.*" (Bukau, B. Ed.) Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 13-33.

Currier, T. C., Hurry, J. F., Wolk, C. P. (1977) Isolation and preliminary characterization of auxotrophs of a filamentous cyanobacterium. *J. Bacteriol.* **129**, 1556-1562.

Delaney, J. M. (1990) A *grpE* mutant of *Escherichia coli* is more resistant to heat than the wild type. *J. General Microbiol.* **136**, 797-801.

Deuerling, E., Schulze-Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk, A., Bukau, B. (1999) Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* **400**, 693-696.

Diamant, S., Peres Ben-zvi, A., Bukau, B., Goloubinoff P. (2000) Size-dependent disaggregation of stable protein aggregates by the DnaK chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* **280**, 21107-21113.

Ellis, R. J. (1987) Proteins as molecular chaperones. *Nature* **328**, 378-379.

Ellis, R. J. (1990a) The molecular chaperone concept. *Semin. Cell Biol.* **1**, 1-9.

Ellis, R. J. (1990b) Molecular chaperones, The plant connection. *Science* **250**, 954-959.

Ellis, R. J. (1992) Cytosolic chaperonin confirmed. *Nature* **358**, 191-192.

Ellis, R. J. (1993) The general concept of molecular chaperones. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **339**, 1-5.

Ellis, R. J. (1997) Do molecular chaperones have to be proteins? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 687-692.

Erickson, J. W., Gross, C. A. (1989) Identification of the σ^E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: A second alternate σ factor involved in high-temperature gene expression. *Genes. Dev.* **3**, 1462-1471.

Fleischmann, R. D. et al (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**, 496-512.

Gamer, J., Bujard, H., Bukau, B. (1992) Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor σ^{32} . *Cell* **69**, 833-842.

Genevaux, P., Schwager, F, Georgopoulos, C., Kelley, W. L. (2001a) The *djlA* gene acts synergistically with *dnaJ* in promoting *Escherichia coli* growth. *J. Bacteriol.* **183**, 5747-5750.

Genevaux, P., Wawrzynow, A., Zylicz, M., Georgopoulos, C., Kelley, W. L. (2001b) DjlA is a third DnaK co-chaperone of *Escherichia coli*, and DjlA-mediated induction of colanic acid capsule requires DjlA-DnaK interaction. *J. Biol. Chem.* **276**, 7906-7912.

Georgopoulos, C. P. and Welch, W. J. (1993) Role of major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **9**, 601-635.

Glatz, A., Horváth, I., Varvasovszki, V., Kovács, E., Török, Zs. and Vígh, L. (1996) Stress-induced activation of chaperone genes implies the operation of a novel transcriptional regulatory mechanism in the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. In: “*Genes and their products for tolerance to physical stresses in plants.*” (Leone, A. and Grillo, S. eds) Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 21-29.

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

Gragerov, A., Nudler, E., Komissarova, N., Gaitanaris, G., Gottesman, M. Nikiforov, V. (1992) Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10341-10344.

Gross, C. A. (1996) Function and regulation of the heat shock proteins. In: “*Escherichia coli and Salmonella*” (Neidhardt, F. C. Ed) ASM Press. Washington. 1382-1399.

Hartl, F. U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-580.

Hesterkamp, T., Bukau, B. (1998) Role of the DnaK and HscA homologs of Hsp70 chaperones in protein folding in *E. coli*. *The EMBO Journal* **17**, 4818-4828.

Hibino, T., Kaku, N., Yoshikawa, H., Takabe, T. Takabe, T. (1999) Molecular characterisation of DnaK from halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* for ATPase, protein folding, and copper binding under various salinity conditions. *Plant. Mol. Biol.* **40**, 409-418.

Hoff, K. G., Silberg, J. J., Vickery, L. E. (2000) Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7790-7795.

Homuth, G., Masuda, S., Mogk, A., Kobayashi, Y., Shumann, W. (1997) The *dnaK* operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic. *J. Bacteriol.* **179**, 1153-1164.

Horváth, I., Glatz, A., Varvasovszki, V., Török, Zs., Páli, T., Balogh, G., Kovács, E., Nádasdy, L., Benkő, S., Joó, F. and Vigh, L. (1998) Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of *hsp17* as a novel "fluidity gene". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **5**, 3513-3518.

Huang, H.-C., Sherman, M. Y., Kandrór. O., Goldberg, A. L. (2001) The molecular chaperone DnaJ is required for the degradation of soluble abnormal protein in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **276**, 3920-3928.

Jindal, S. (1996) Heat shock proteins, applications in health and disease. *TIBTECH* **14**, 17-20.

Kaneko T., Sato S., Kotani H., Tanaka A., Asamizu E., Nakamura Y., Miyajima N., Hirosawa M., Sugiura M., Sasamoto S., Kimura T., Hosouchi T., Matsuno A., Muraki A., Nakazaki N., Naruo K., Okumura S., Shimpo S., Takeuchi C., Wada T., Watanabe A., Yamada M., Yasuda M., Tabata S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803, II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**, 109-136.

Kawula, T. H., Lelivelt, M. J. (1994) Mutations in a gene encoding a new Hsp70 suppress rapid DNA inversion and *bgl* activation, but not *proU* derepression, in *hns-1* mutant *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**, 610-619.

Kelley, W. L. (1998) The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *TIBS* **23**, 222-227.

Kovács, E., Horváth, I., Glatz, A., Török, Zs., Bagyinka, Cs. and Vigh, L. (1994a) Molecular characterization, assembly and membrane association of the GroEL-type chaperonins in *Synechocystis* PCC 6803: Ed.: J.A.F. Op den Kamp, In: "*Structure, Biogenesis and Dynamics of Biological Membranes*", **NATO ASI Series**, Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, Series H: Cell Biology, Vol. **H82**: pp. 253-261.

Kovács, E., Török, Zs., Horváth, I. and Vígh, L. (1994b) Heat-stress induces association of the GroEL-analog chaperonin with thylakoid membranes in cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Phys. Biochem.* **32**, 285-293.

Kusukawa, N. és Yura, T. (1988) Heat shock protein GroE of *E. coli*: key protective roles against thermal stress. *Genes Dev.* **2**, 874-882.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685.

Laskey, R.A.; Honda, B.M.; Mills, A.D. and Finch, J.T. (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature, Lond.* **275**: 416-420.

Lee, B. H., Hibino, T., Jo, J., Viale, A. M., Takabe, T. (1997) Isolation and characterisation of a *dnaK* genomic locus in a from halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Plant Mol. Biol.* **35**, 763-775.

Lehel, Cs., Wada, H., Kovács, E., Török, Zs., Gombos, Z., Horváth, I., Murata, N. and Vígh, L. (1992) Heat shock protein synthesis of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: purification of the GroEL-related chaperonin. *Plant Mol. Biol.* **18**, 327-336.

Lehel, Cs., Gombos, Z., Török, Zs. and Vígh, L. (1993a) Growth temperature modulates thermotolerance and heat shock response of cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Physiol. Biochem.* **31**, 81-88.

Lehel, Cs., Los, D., Wada, H., Györgyey, J., Horváth, I., Kovács, E., Murata, N. and Vigh, L. (1993b) A second groEL-like gene, organized in a groESL operon is present in the genome of *Synechocystis* PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **268**, 1799-1804.

Lelivelt, M. J., Kawula, T. H. (1995) Hsc66, an Hsp70 homolog in *Escherichia coli*, is induced by cold shock but not by heat shock. *J. Bacteriol.* **177**, 4900-4907.

Lyman, S.K. and Schekman, R. (1996) Polypeptide translocation machinery of the yeast endoplasmic reticulum. *Experientia* **52**, 1042-1049.

Mager, W. H. and De Kruijff, A. J. J. (1995) Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol. Rev.* **59**, 506-531.

Marraccini P., Bulteau S., Cassier-Chauvat C., Mermet-Bouvier P., Chauvat F. (1993) A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Mol. Biol.* **23**, 905-909.

Mayer, M. P., Rudiger, S., Bukau, B. (2000) Molecular basis for interactions of the DnaK chaperone with substrates. *Biol Chem.* **381**, 877-885.

Meury, J., Kohiyama, M. (1991) Role of heat shock protein DnaK in osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**, 4404-4410.

Minami, Y, Hohfeld, J., Ohtsuka, K., Hartl, F.-U. (1996) Regulation of the heat shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homologue, Hsp 4. *J. Biol. Chem.* **271**, 19617-19624.

Mogk, A., Homuth, G., Scholz, C., Kim, L., Schmid, F. X. and Schumann, W. (1997) The GroE chaperonin machine is a major modulator of the heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* **16**, 4579-4590.

Mogk, A., Tomayasu, T., Goloubinoff, P., Rüdiger, S., Röder, D., Langen, H., Bukau, B. (1999) Identifications of thermolabile *E. coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO, J.* **18**, 6934-6949.

Mohamed, A., Jansson, C. (1989) Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol. Biol.* **13**, 693-700.

Morita, M.T., Tanaka, Y., Kodama, T., Kyogoku, Y., Yanagi, H., Yura, T. (1999) Translational induction of heat shock transcription factor σ^{32} : evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev.* **13**, 655-665.

Nagai, H., Yuzawa, H., Kanemori, M., Yura, T. (1994) A distinct segment of the σ^{32} polypeptide is involved in DnaK-mediated negative control of the heat shock response in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10280-10284.

Nakamura, Y. Kaneko, T. Hirosawa, M. Miyajima, N. and Tabata, S. (1998) Cyanobase, a WWW database containing the complete nucleotide sequence of the genome of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Nucleic Acids Res.* **26**, 63-67.

Narberhaus, F. (1999) Negative regulation of bacterial heat shock genes. *Mol. Microbiol.* **31**, 1-8.

Netzer, W. J., Hartl, F. U. (1998) Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and –independent mechanisms. *TIBS* **23**, 68-73.

Nimura, K., Yoshikawa, H., Takahashi, H. (1994a) Identification of *dnaK* multigene family in *Synechococcus* sp. PCC7942. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 466-471.

Nimura, K., Yoshikawa, H., Takahashi, H. (1994b) Sequence analysis of the third *dnaK* homologue gene in *Synechococcus* sp. PCC7942. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 848-854.

Nimura, K., Yoshikawa, H., Takahashi, H. (1996) DnaK3, one of the three DnaK proteins of cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942, is quantitatively detected in the thylakoid membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 334-340.

Nimura, K., Takahashi, H., Yoshikawa, H. (2001) Characterization of the *dnaK* multigene family in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *J. Bacteriol.* **183**, 1320-1328.

O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.

Ogata, Y, Mizushima, T., Kataoka, K., Kita, K., Miki T., Sekimizu, K. (1996) DnaK heat shock protein of *Escherichia coli* maintains the negative supercoiling of DNA against thermal stress. *J. Biol. Chem.* **271**, 29407-29414.

Oguchi, K., Nimura, K., Yoshikawa, H., Takahashi, H. (1997) Sequence and analysis of a *dnaJ* homologue gene in cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 461-466.

Ono, K., Hinino, T., Kohinata, T., Suzuki, S., Tanaka, Y., Nakamura, T., Takabe, T., Takabe, T. (2001) Overexpression of DnaK from halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* enhances the high-temperature tolerance of tobacco during germination and early growth. *Plant Science* **160**, 455-461.

Pelham, H. R. P. (1986) Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* **46**, 956-961.

Raison, J. K. (1973) Temperature-induced phase changes in membrane lipids and their influence on metabolic regulation. *Symp Soc Exp Biol.* **27**, 485-512.

Rippka, R. J. Deruelles, J. Herdman, M. Waterbury, J. B., Stanier, R.Y. (1979) Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**, 1-61.

Sato, N., Murata, N. (1988) *Meth. in Enzymol.* **167**, 251-259.

Schaffitzel, E., Rudiger, S., Bukau, B., Deuerling, E. (2001) Functional dissection of trigger factor and DnaK: interactions with nascent polypeptides and thermally denatured proteins. *Biol. Chem.* **382**, 1235-1243.

Seaton, B. L., Vickery, L. E. (1994) A gene encoding a DnaK/hsp70 homolog in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2066-2070.

Segal, G. and Ron E. Z. (1996) Regulation and organization of the *groE* and *dnaK* operons in Eubacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**, 1-10.

Shinitzky, M., Barenholz, Y. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **515**, 367-394.

Silberg, J. J., Hoff, K. G., Vickery, L. E. (1998) The Hsc66-Hsc20 chaperone system in *Escherichia coli*: Chaperone activity and interactions with the DnaK-DnaJ-GrpE system. *J. Bacteriol.* **180**, 6617-6624.

Skowrya, D., Georgopoulos, C., Zylicz, M. (1990) The *Escherichia coli* DnaK product, the Hsp 70 homologue, can reactivate the heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell* **62**, 939-944.

Stanier (Cohen-Bazire), G. (1988) Fine structure of cyanobacteria. *Methods in Enzymology* **167**: 157-172.

Stuart, R.A., Cyr, D.M., Craig, E.A. and Neupert, W. (1994) Mitochondrial molecular chaperones: their role in protein translocation. *TIBS* **19**, 87-92.

Tatsuta, T, Tomayasu, T., Bukau, B., Kitagawa, M., Mori, H., Karata, K., Ogura, T. (1998) Heat shock regulation of the *ftsH* null mutant of *Escherichia coli*: dissection of stability and activity control mechanisms of sigma32 *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **30**, 583-593.

Teter, S. A., Houry, W. A., Ang, D., Tradler, T., Rockabrand, D., Fischer, G., Blum, P., Georgopoulos, C., Hartl, F. U. (1999) Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell* **97**, 755-765.

Tilly, K., McKittrick, N., Zylicz, M., Georgopoulos, C. (1983) The DnaK protein modulates the heat shock response of *E. coli*. *Cell* **34**, 641-646.

Tomioka, N., Shinozaki K., Sugiura, M. (1981) Molecular cloning and characterization of ribosomal RNA genes from a blue-green alga, *Anacystis nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **184**, 359-363.

Török, Zs., Horváth, I., Goloubinoff, P., Kovács, E., Glatz, A., Balogh, G. and Vígh, L. (1997) 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**, 2192-2197.

Török, Zs., Goloubinoff, P., Horváth, I., Tsvetkova, N. M., Glatz, A., Balogh, G., Varvasovszki, V., Los, D. A., Vierling, E., Crowe, J. H., Vígh, L. (2001) Synechocystis

HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3098-3103.

Török, Zs., Tsvetkova, N. M., Balogh, G., Horváth, I., Nagy, E., Péntes, Y., Hargitai, J., Bensaude, O., Csermely, P., Crowe, J. H., Maresca, B., Vígh, L. (2003) Heat shock protein coinducers with no effect on protein denaturation specifically modulate the membrane lipid phase. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 3131-3136.

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

Ueguchi, C., Kakeda, M., Yamada, H., Mizuno, T. (1994) An analogue of the molecular chaperone DnaJ in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1054-1058.

Ueguchi, C., Shiozawa, M., Kakeda, M., Yamada, H., Mizuno, T. (1995) A study of the double mutation of *dnaJ* and *cbpA*, whose gene products function as molecular chaperones in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**, 3894-3896.

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

Vass, I. (1996): Adverse effects of UV-B light on the structure and function of the photosynthetic apparatus, In: (Pessarakli, M. Ed.), Handbook of Photosynthesis, Marcel Dekker Inc., New York, 931-950.

Vickery, L. E., Silberg, J. J., Ta, D. T. (1997) Hsc66 and Hsc20, a new heat shock cognate molecular chaperone system from *Escherichia coli*. *Protein Science* **6**, 1017-1056.

Vierling, E. (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biol.* **42**, 579-620.

Vígh L., Joó F. (1983) Modulation of membrane fluidity of catalytic hydrogenation affects the chilling susceptibility of the blue-green alga, *Anacystis nidulans*. *FEBS Lett.* **162**, 423-427.

Vígh, L.; Gombos, Z., Joó, F. (1985) Selective modification of cytoplasmic membrane fluidity by catalytic hydrogenation provides evidence on its primary role in chilling susceptibility of the blue-green alga, *Anacystis nidulans*. *FEBS Lett.* **191**: 200-204.

Vígh, L., Los, D. A., Horváth, I., Murata, N. (1993) The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalysed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene in *Synechocystis* PCC6803. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9090-9094.

Vígh, L., Török, Zs.; Kovács, E.; Glatz, A.; Balogh, N. and Horváth, I. (1994) Thermal acclimation and heat shock response of *Synechocystis* PCC 6803: the possible role of thylakoid

physical state, lipid saturation and molecular chaperones. Ed.: J.H. Cherry, In: "Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants", **NATO ASI Series**, Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg Series: Cell Biology, Vol. **H86**, pp. 77-95.

Vígh, L., Literáti, N., P., Horváth, I., Török, Zs., Balogh, G., Glatz, A., Kovács, E., Boros, I., Ferdinandy, P., Farkas, B., Jaszlits, L., Jednákovics, A., Korányi, L. and Maresca, B. (1997) Bimoclomol, a novel nontoxic, hydroxylamine derivative with stress protein-inducing activity and cytoprotective effects. *Nature Medicine* **3**, 1150-1154.

Vígh L., Maresca B. and Harwood J. (1998) Does membrane physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem. Sci.* **23**, 369-374.

Vígh, L., Maresca, B. (2002) 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: "*Sensing, Signaling and Cell Adaptation.*" (Storey, K. B. and Storey, J. M. eds) Elsevier Science B. V., Amsterdam. pp. 173-187.

Watanabe, T., Fukushima, H., Kasai, R., Nozawa, Y. (1981) Studies on thermal adaptation in *Tetrahymena* membrane lipids. Changes in positional distribution of fatty acids in diacyl-phospholipids and alkyl-acyl-phospholipids during temperature acclimation. *Biochim Biophys Acta.* **665**, 66-73.

Wild, J., Rossmeissl, R., Walter, W.A. and Gross, C.A (1996) Involvement of the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone team in protein secretion in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 3608-3613.

Williams J. G. K. (1988) Construction of specific mutations in the photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803, *Meth. Enzymol.* **167**, 766-778.

Yamashino, T., Kakeda, M., Ueguchi, C.és Mizuno, T. (1994) An analogue of the molecular chaperone DnaJ whose expression is controlled by σ^S during the stationary phase and phosphate starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **13**, 475-483.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotid sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

Yochem, J., Uchida, H., Sunshine, M., Saito, H., Georgopoulos, C., Feiss, M. (1978) Genetic analysis of two genes, dnaJ and dnaK, necessary for *Escherichia coli* and bacteriophage lambda DNA replication. *Mol. Gen. Genet.* **164**, 9-14.

Yoshimune, K., Yoshimura, T., Esaki, N. (1998) Hsc62, a new DnaK homologue of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250**, 115-118.

Yura, T., Nagai, H., Mori, H. (1993) Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 321-350.

Yura, T., Nakahigashi, K. (1999) Regulation of the heat shock response. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 153-158.

Zuber U., Schumann W. (1994) CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176**, 1359-1363.

Zuber, M., Hoover, T. A., Court, D. L. (1995) Analysis of a *Coxiella burnetti* gene product that activates capsule synthesis in *Escherichia coli*: requirement for the heat shock chaperone DnaK and the two-component regulator RcsC. *J. Bacteriol.* **177**, 4238-4244.

Zylicz, M., Georgopoulos, C. (1984) Purification and properties of the *E. coli* dnaK replication protein. *J. Biol. Chem.* **259**, 8820-8825.

Zylicz, M., Yamamoto, T., McKittrick, N., Sell, S., Georgopoulos, C. (1985) Purification and properties of the dnaJ replication protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260**, 7591-7598.

Zylicz, M., Ang, D., Georgopoulos, C. (1987) The *grpE* protein of *Escherichia coli*. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **262**, 17437-17442.

Zylicz, M., Ang, D., Librek, K. and Georgopoulos, C. (1989) Initiation of λ DNA replication with purified host- and bacteriophage-encoded proteins: the role of the DnaK, DnaJ and GrpE heat shock proteins. *EMBO J.* **8**, 1601-1608.