

**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: Vigh László, Ph.D, D. Sc

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

Szeged, 2003.

Bevezetés és előzmények

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

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

A *hsp 70* család tagjai közül *Synechocystis*-ben korábban egy *dnaK*-homológ gént izoláltak, melynek transzkripciósi aktivitása szubletális hőstressz hatására fokozódik (Chitnis és Nelson, 1991). A DnaK-homológ féherjét csoportunk korábban azonosította, sejtbeli szerepéről azonban eddig adatok nem álltak rendelkezésre. A *hsp 70* (*dnaK*) chaperone géneket egyébként más cianobaktériumokban is megtalálták, így például a *Synechocystis* közeli rokonában, a *Synechococcus* PCC7942-ben, ahol e génből több kópiát fedeztek fel (Nimura, 1994). Ezek co-chaperone géneikkel együtt különféle elrendeződésű operonokban lokalizálódnak. Deléciós kísérletek alapján a *dnaK2* és 3, valamint a *dnaJ* is eszenciálisnak bizonyult, a *dnaK1* viszont minden különösebb következmény nélkül eliminálható a genomból (Oguchi, 1997, Nimura, 2001). A DnaK féherjékről kimutatták, hogy a DnaK1 és 3 a sejtben konstitutívan fejeződik ki, csupán a DnaK2 mutat magas hőmérsékleten hősokk féherjétől elvárható megnövekedett (Nimura, 2001). Sejtbeli lokalizációjukról kiderült, hogy a DnaK1 illetve 2 főleg citoszolikus féherje, a DnaK3 viszont hosszú C-terminális doménjével perifériásan a tilakoid membránhoz kötődik csakúgy, mint a DnaJ protein (Nimura, 1996).

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

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

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

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

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

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

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

Célkitűzések

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

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

1. A *Synechocystis* PCC6803 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 transzkripciósi 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 inaktívációja lehetséges?
4. Hatást gyakorol-e egy *hsp70*-homológ gén (akár részleges) inaktívációja a *Synechocystis*-ben megtalálható más családba tartozó chaperone-ok transzkripciósi, illetve translációsi 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 a membránokhoz kötött fotoszintetikus folyamatok tükrében?
6. Befolyásolja-e a *Synechocystis*-sejtben jelenlevő Hsp70 fehérjék mennyisége a membránok fizikai állapotát illetve összetételét?

Eredmények összefoglalása

Vizsgálataink során az alábbi eredményekről számolhattunk be:

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

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

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