

# Wpływ podwyższonej temperatury na ekspresję białek szoku termicznego (Hsp70) u terenowych szczepów *Mannheimia haemolytica* serotyp 1

RENATA URBAN-CHMIEL

Zakład Prewencji Weterynaryjnej Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych  
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Urban-Chmiel R.

## Influence of increased temperature on heat shock protein expression amongst wildtype *M. haemolytica* strains

### Summary

The purpose of the study was to estimate the influence of temperature increase on Hsp70 induction in *M. haemolytica* serovar 1 strains. Three wildtype *M. haemolytica* strains, obtained from calves respiratory tracts and incubated at a temp of 41.5°C for 2 hours were used as the research material. Analyses of particular fractions were carried out by SDS-PAGE electrophoresis and identification of obtained proteins by immunoblotting (Western blotting) using polyclonal rabbit anti Hsp70 antibodies. The first step was to separate the capillaries in gradient pH 5/7 and 3/10 which was carried out in two-dimensional electrophoresis. The second step was carried out in SDS-PAGE electrophoresis using 4% stacking and 12% resolving gels. An analysis of SDS-PAGE electrophoresis revealed additional protein fractions, displaying positive reactions with anti-Hsp70 antibodies. The presence of these proteins was observed both in membrane and cytoplasmic bacterial cell fractions. The molecular weight of the obtained proteins ranged between 77.5-79 kDa. The additional protein fractions were present in membrane fractions between molecules, weighed 22-26 kDa, as well as displaying a positive reaction with anti-Hsp70 antibodies. The electrophoregrams obtained in 2D electrophoresis revealed the presence of additional spots in membrane, cyto- and periplasmic fractions. The obtained results suggest the potential for *M. haemolytica* strains to produce Hsp70 during stress induced by temperature increase.

**Keywords:** *Mannheimia haemolytica*, heat shock proteins (Hsp)

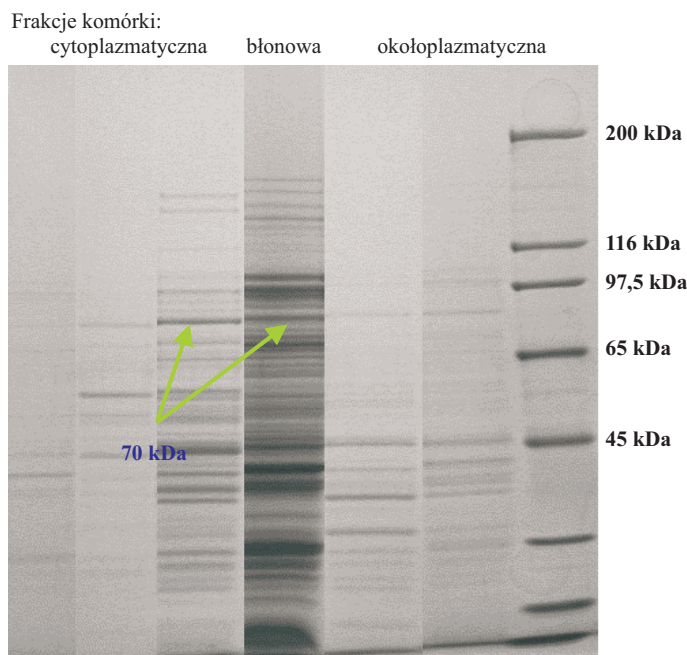
W czasie wzrostu temperatury tak w komórkach pochodzących od organizmów wyższych, jak również w komórkach bakteryjnych obserwowane są zmiany na poziomie ich metabolizmu. Efektem tego jest pojawienie się specyficznych białek określanych jako tzw. białka szoku termicznego (heat shock proteins – HSP) (1), syntetyzowanych jako odpowiedź na bodziec stresowy. Białka szoku termicznego tworzą filogenetycznie starą rodzinę protein o masach od 15 do 110 kDa. Produkowane są one zarówno przez komórki prokariotyczne, jak i eukariotyczne w odpowiedzi na czynniki, takie jak: zmiana temperatury, brak substancji odżywczych oraz stres tlenowy (3, 10, 12). W zależności od genów kodujących poszczególne grupy białek wyróżniamy białka GroEL- oraz DnaK-zależne. Pełnią one zróżnicowane funkcje w komórkach, wpływając – między innymi – na ich zwiększoną oporność na czynniki zewnętrzne poprzez stabilizację struktur cytoplazmatycznych. Obecność Hsp u bakterii może potęgować patogenne funkcje drobnoustrojów chorobotwórczych podczas zakażenia. W tej grupie białek

szczególną rolę przypisuje się proteinom Hsp60 o masie 50-65 kDa oraz Hsp70 (70-84 kDa), które są głównym celem zarówno humoralnej, jak i komórkowej odpowiedzi immunologicznej (14, 15). U Mosier i wsp. (9) wykazano m.in., że obecność immunogenego Hsp o masie 54 kDa u *M. haemolytica* indukuje wysokie miana przeciwciał, chroniących cielęta przed zakażeniem. Ponadto stwierdzono obecność reakcji krzyżowych tego białka z Hsp60 *E. coli*, Hsp62 *Brucella abortus* oraz z Hsp65 pochodzącego z *Mycobacterium tuberculosis* (9, 14). Uważa się, że Hsp 70 jest odpowiedzialne za zmiany w konformacji białek komórki, co w efekcie prowadzi do uzyskania odmiennych właściwości fizycznych. Przekształcona w ten sposób komórka bakteryjna jest bardziej oporna na działanie wyższych temperatur (13).

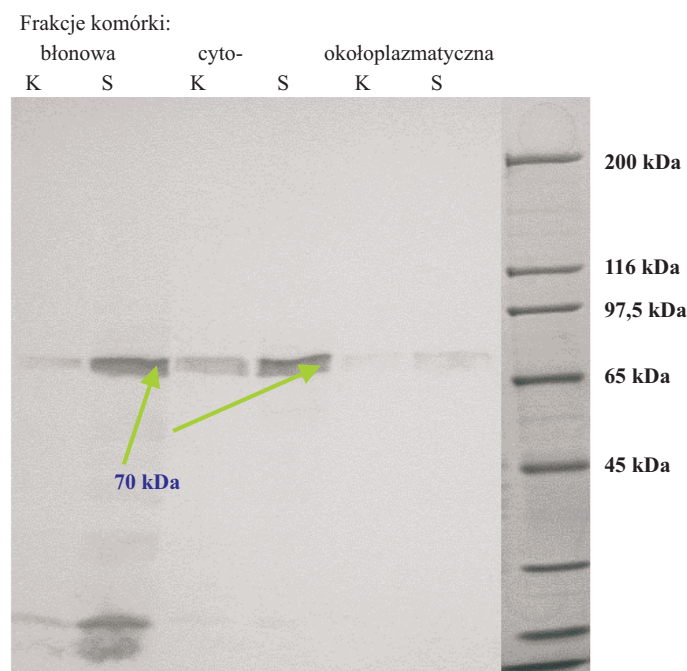
Celem badań była analiza elektroforetyczna białek szoku termicznego poszczególnych frakcji komórek szczepu *M. haemolytica* serotyp 1 poddanych działaniu podwyższonej temperatury w warunkach *in vitro*.

## Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły trzy terenowe szczepy *M. haemolytica* serotyp 1 izolowane od cieląt z dróg oddechowych. Bulionową, 4,5-godz. hodowlę bakterii poddano działaniu temp. 41,5°C przez 2 godz. (1). Kontrolę stanowiła hodowla bulionowa szczepu *M. haemolytica* inkubowana w temp. 37°C. Zawiesiny komórek frakcjonowano wg Goulhen i wsp. (2) w modyfikacji Paju i wsp. (11), uzyskując frakcję okołoplazmatyczną oraz błonową.



Ryc. 1. Profile białkowe *M. haemolytica* w elektroforezie SDS-PAGE



Ryc. 2. Obraz immunoblotingu *M. haemolytica* serotyp 1 z poliklonalnymi króliczymi przeciwciałami anti Hsp70

Objaśnienia: K – (kontrola) komórki nie poddane działaniu podwyższonej temperatury; S – komórki poddane działaniu podwyższonej temperatury

Analizę elektroforetyczną poszczególnych frakcji przeprowadzono w gradiencie 5-15% żelu poliakrylamidowego (SDS-PAGE) wg Laemmli (6). Jako żel wprowadzający zastosowano 4% poliakrylamid w buforze Tris-HCl o pH 6,8.

Identyfikację uzyskanych białek przeprowadzono z wykorzystaniem immunoblotingu (Western blotting) z króliczymi, poliklonalnymi przeciwciałami anti Hsp70 (16). W elektroforezie dwukierunkowej, w pierwszym etapie wykonano rozdział w kapilarach w gradiencie 5/7 i 3/10 (8). Rozdział drugiego kierunku prowadzono w SDS-PAGE w 4% wprowadzającym i 12% rozdzielającym żelu poliakrylamidowym. Żele wybarwiano srebrem.

Analizę obrazów elektroforetycznych oraz reakcji uzyskanych w immunoblotingu przeprowadzono przy użyciu densytometru w zakresie fal światła widzialnego z oprogramowaniem Quantity One 2000 (BioRad).

## Wyniki i omówienie

W obrazach SDS-PAGE uzyskano dodatkowe frakcje białkowe, które wykazywały pozytywne reakcje z przeciwciałami anti Hsp70 (ryc. 1, 2). Obecność tych białek stwierdzono we frakcji błonowej i cytoplazmatycznej. Masa uzyskanych białek kształtowała się na poziomie od 77,5 do 79,7 kDa. We frakcji błonowej zaobserwowano dodatkowe prążki o masie 26,3 i 22,5 kDa, które również reagowały z przeciwciałami anti Hsp70. Może to świadczyć o obecności reakcji krzyżowych zachodzących w obrębie tych białek, wynikających np. z ich wspólnego pochodzenia bądź degradacji białka 77,5 kDa na frakcje o mniejszej masie, co sugerują Jayaraman i wsp. (4). Według Rasond i wsp. (13), białko Hsp 70 cechuje wielodomenowa struktura, której poszczególne fragmenty zawarte są w obrębie masy 70 kDa, 45-40 kDa oraz 10-15 kDa i mogą być zlokalizowane w różnych frakcjach komórki.

Elektroforegramy uzyskane w elektroforezie dwukierunkowej wykazywały obecność dodatkowych plamek (spot) we frakcji błonowej, cytoplazmatycznej oraz okołoplazmatycznej komórki, które nie były obecne we frakcjach uzyskanych z komórek nie poddanych działaniu szoku termicznego (ryc. 3, 4). Należy zaznaczyć, że białka z frakcji okołoplazmatycznej, w odróżnieniu od białek zlokalizowanych we frakcji błonowej i cytoplazmatycznej, nie wykazywały reakcji z przeciwciałami anti Hsp70. Sugeruje się, że białka Hsp kodowane przez geny GroEL najczęściej występują we frakcji cytoplazmatycznej oraz błonowej komórki bakteryjnej. Natomiast białka pochodzenia DnaK, reagujące z przeciwciałami anti Hsp70, powinny być zlokalizowane głównie we frakcji cytoplazmatycznej komórki (2). Inną sugestią na temat umiejscowienia Hsp70 charakteryzowanego u *Vibrio cholerae* oraz *Streptococcus mutans* podali Jyot i wsp. (5) oraz Jayaraman i wsp. (4), którzy za główną lokalizację tego białka uznali frakcje: cytoplazmatyczną i błonową komórki. Lokalizacja poszczególnych Hsp może być uzależniona od wielu czynników, m.in. od rodzaju bak-

terii, stopnia nasilenia reakcji stresowej, masy cząsteczkowej wytwarzanego białka oraz wielu innych czynników wewnętrznych i zewnętrznych.

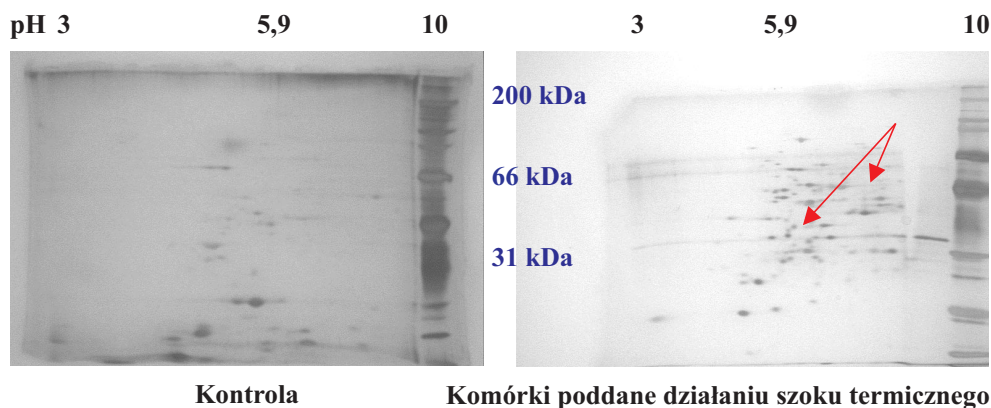
W badaniach własnych, przeprowadzonych na komórkach *Mannheimia haemolytica* 1 analiza białek Hsp w oparciu o przeciwciała anty Hsp 70 wykazała, że białko DnaK stwierdzono we frakcjach błonowej oraz cytoplazmatycznej komórek. Największą ekspresję tego białka stwierdzono we frakcji błonowej, co może sugerować, że geny kodujące to białko są zlokalizowane właśnie w tej frakcji (17).

Reasumując można podkreślić, że w warunkach stresu wywołanego podwyższoną temperaturą szczepu *M. haemolytica* serotyp 1 wykazują zdolność do produkcji białek szoku termicznego Hsp70. Białka te zlokalizowane są w obrębie poszczególnych frakcji komórki, a ich umiejscowienie uzależnione jest, między innymi, od genów (GroEL, DnaK), które odpowiedzialne są za ich kodowanie (4, 17).

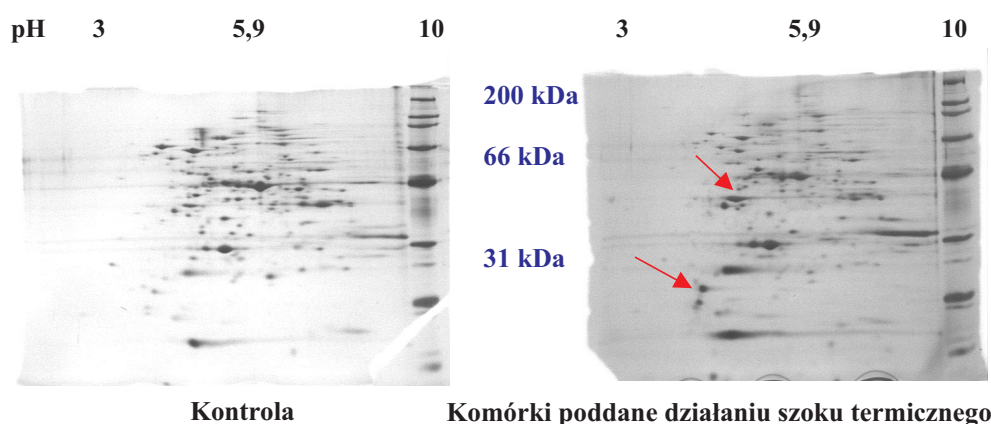
Obecność tych białek jest jednym z czynników, które mogą istotnie wpływać na zwiększoną produkcję leukotoksyny przez komórki bakteryjne, co może odgrywać znaczącą rolę w patogenezie syndromu oddechowego bydła z udziałem szczepów *M. haemolytica*.

### Piśmiennictwo

1. Feder M. E., Hofmann G. E.: Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Ann Rev. Physiol.* 1999, 61, 243-282.
2. Goulhen F., Hafezi A., Uitto V. J., Hinode D., Nakamura R., Grenier D., Mayrand D.: Subcellular localization and cytotoxic activity of the GroEL-like protein isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 1998, 66, 5307-5313.
3. Iwahashi H., Obuchi K., Fujii S., Komatsu Y.: Effect of temperature on the role of Hsp 104 and trehalose in barotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microb. Letters* 1997, 416, 1-5.
4. Jayaraman G. C., Burne R. A.: DnaK expression in response to heat shock of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microb. Letters* 1995, 131, 255-261.
5. Jyot J., Gautam J. K., Raje M., Ghos A.: Localization of DnaK and GroEL in *Vibrio cholerae*. *FFEMS Microb. Letters* 1999, 172, 165-171.
6. Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 1970, 227, 680-685.
7. Love B., Hirsh D.: *Pasteurella multocida* produces heat shock proteins in turkeys. *Infect. Immun.* 1994, 62, 1128-1230.
8. Molloy M. P., Phadke N. D., Maddock J. R., Andrews P. C.: Two-dimensional electrophoresis and peptide mass fingerprinting of bacterial outer membrane proteins. *Electrophoresis* 2001, 22, 1686-1696.
9. Mosier D., Iandolo J., Rogers D., Uhlich G., Crupper S.: Characterisation of a 54-kDa heat shock inducible protein of *Pasteurella haemolytica*. *Vet. Microb.* 1998, 60, 67-73.



Ryc. 3. Profile białek Hsp frakcji cytoplazmatycznej *M. haemolytica* serotyp 1 w elektroforezie dwukierunkowej (2D)



Ryc. 4. Profile białek Hsp frakcji błonowej *M. haemolytica* serotyp 1 w elektroforezie dwukierunkowej (2D)

10. Muthaira L. M., Klinck J., Yamaguchi H., Davey M.: Purification, characterization and immunochemical properties of a novel 60-kDa protein of *Vibrio anguillarum* strains. *FEMS Microb. Letters* 1998, 168, 111-117.
11. Paju S., Goulhen F., Asikainen S., Grenier D., Mayrand D., Uitto V.: Localization of heat shock proteins in clinical *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains and their effects on epithelial cell proliferation. *Microbiology Letters* 2000, 182, 231-235.
12. Piper P.: Differential role of Hsps and trehalose in stress tolerance. *Trends Microb.* 1998, 6, 43-44.
13. Rasmond J., Absen O.: Molecular chaperones: towards a characterization of the heat shock protein family. *Trends Cell Biol.* 1997, 7, 129-133.
14. Shinnick T. M., Vodkin M. H., Williams J. C.: The *Mycobacterium tuberculosis* 65-kilodalton antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen and to the *Escherichia coli* GroEL protein. *Infect. Immun.* 1988, 56, 446-451.
15. Skar C. K., Krüger P. G., Bakken V.: Characterization and subcellular localization of the GroEL-like and DnaK-like proteins isolated from *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953. *Anaerobe* 2003, 9, 305-312.
16. Towbin H., Staehelin T., Gordon J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, 76, 4350-4354.
17. Urban-Chmiel R., Wernicki A., Puchalski A.: Analiza białek szoku termicznego (HSP70) wśród terenowych szczepów *M. haemolytica* serotyp 1. Materiały XII Kongresu PTNW, Warszawa 2004, s. 168.

Adres autora: dr Renata Urban-Chmiel, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: renata.urban@ar.lublin.pl