

A flagellumspecifikus exportapparátus felismerési jelének azonosítása

Doktori értekezés tézisei

Végh Barbara Márta

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar

Biológia Doktori Iskola

Doktori iskola vezetője: Erdei Anna, az MTA doktora

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: Gráf László, az MTA doktora

Témavezető

Závodszy Péter, az MTA doktora

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ Enzimológiai Intézet

Budapest, 2008

Tudományos előzmények

A baktériumok többféle rendszerrel is rendelkeznek, melyekkel különféle fehérjéket juttathatnak ki a baktériumsejt belsejéből a külvilág felé, ahol azok különböző feladatokat látnak el. Ezek a kiválasztó (szekréción) rendszerek különböző mechanizmusokat használnak fel a fehérjék baktériummembránokon keresztüli kijuttatására. Ezen exportrendszereket felhasználhatjuk rekombináns fehérjét szekretáló expressziós rendszerek kialakítására. Gram-negatív baktériumok esetében több (I-V) lényegében különböző szekréción mechanizmus is ismert. A legjobban jellemzett II-es és IV-es típusú exportrendszer esetén a fehérje egy lépésben, hasítatlanul jut ki a külső térbe. A bakteriális flagellumok axiális fehérjéi egy speciális exportapparátus segítségével, a filamentumok centrális csatornáján keresztül jutnak el beépülési helyükre, a filamentumok végére. A III. típusú kiválasztás sajátossága, hogy a kijuttatandó fehérjékről hiányzik a többi rendszerre jellemző ún. szignál szekvencia. Az egyik legérdekesebb, az általam is vizsgált, a III-as típusú exportrendszerekkel rokonságot mutató flagelláris export apparátus. A flagelláris exportrendszer tanulmányozása egyrészt érdekes alapvetési felismerésekhez vezethet, hiszen a baktériumok egyik fontos élettani folyamatáról van szó, másrészt lehetővé teszi a rendszer biotechnológiai alkalmazásának megalapozását.

Mindeközben nem ismert, hogy mi az a jel, szerkezeti vagy szekvenciális tulajdonság, amelynek alapján a flagellum-specifikus exportapparátus felismeri az exportálandó fehérjét. Szekvenciális szinten semmiféle olyan, az axiális fehérjék mindegyikében fellelhető közös sajátosságot sem sikerült kimutatni, amely az exportapparátus számára azonosító jelként szolgálhatna. Nincs lehasításra kerülő szignálpeptid, semmiféle közös szignálszekvencia. Mindez azt sugallja, hogy az exportrendszer által felismert jel nem szekvenciális, hanem magasabb szerkezeti szinten keresendő. Úgy tűnik, hogy a terminális régiók rendezetlensége az axiális fehérjék egyedüli közös szerkezeti sajátossága. A flagelláris exportapparátust felépítő fehérjék exportja és az exportrendszer kiépülési folyamata részben a bakteriális citoplazmában lévő export chaperonok szabályozása alatt áll. A rekombináns fehérjeexpresszió napjaink biotechnológiai gyakorlatának egyik legfontosabb lépése. Manapság számos expressziós rendszer áll a felhasználók rendelkezésére, ezek közül kitűnnek a bakteriális expressziós

rendszerek. Legelterjedtebbek a T7 RNS polimeráz használatán alapuló rendszerek, amelyeknél azonban a rekombináns fehérje általában oldhatatlan zárványtesteket alkot a baktérium belsejében. A baktériumokkal termeltetett fehérjék izolálása és tisztítása nagymértékben leegyszerűsödik, ha az adott fehérje a tápoldatba, vagy legalábbis a periplazmába exportálódik. Ekkor egyrészt a szennyező fehérjék mennyisége jóval kevesebb, másrészt kisebb az inklúziós testek képződésének valószínűsége, a termeltetett fehérje kevésbé hajlamos az aggregálódásra és denaturálódásra. Bár az utóbbi években számos próbálkozás történt hatékony bakteriális szekréción rendszer létrehozására, azonban máig sem rendelkezünk minden szempontból kielégítő megoldással.

Célkitűzések

Munkám alapvető célja, hogy megértsem a flagelláris exportrendszer működését, azonosítsam a lehetséges szignált, tisztázzam az export során esetlegesen közreműködő chaperonok szerepét. Céлом volt kimutatni, hogy valóban az axiális fehérjék rendezetlen terminális régiói irányítják ezen fehérjék exportálódását. Azt is fel akartam deríteni, hogy a rendezetlen régiók mely szegmensei tartalmazzák az exportszignált és milyen kölcsönhatásban állnak a jelenlevő chaperonokkal. Analizálni szerettem volna az exportszignál mibenlétét azért is, hogy tisztázzam, hogy a III-as típusú exportrendszer esetén az irodalomban tapasztalható mRNS kontra fehérjeszignál problémakört tekintetbe véve a flagelláris exportrendszer milyen típusú szignállal működik. Céлом volt a továbbiakban annak a tanulmányozása is, hogy az alapkutatás eredményeit milyen módon lehetne az alkalmazott kutatásba átvinni, milyen biotechnológiai alkalmazása lehet az általam feltérképezett rendszernek. Reményeim szerint az exportszignált hordozó rendezetlen szegmenseket génszabásos módszerekkel a baktériumokban expresszálandó fehérjékhez kapcsolva azok a flagellumspecifikus exportapparátus segítségével a baktériumokból kijuttathatók. Az eljárás nagy előnyének tűnik, hogy a sejtkultúra felülszóból a szekretált rekombináns fehérjék - számottevő szennyező anyag nem lévén - egyszerűen összegyűjthetők és tisztíthatók.

Alkalmazott módszerek

Az exportszignál lokalizálása érdekében a különböző mértékben csonkolt flagellin szegmenseket a klasszikus molekuláris biológia eszközeinek felhasználásával (PCR, agaróz gélelektroforézis, DNS izolálás és tisztítás, klónozás) állítottam elő. A rekombináns fehérje kifejezése *Salmonella typhimurium*, illetve *Escherichia coli* baktériumtörzsekben történt elektroporációs transzformálási technika segítségével. A minták koncentrációját 5 kDa-nál vágó töményítő membrán alkalmazásával végeztem. A kifejeződő fehérjéket SDS gél elektrolízissel és Western bloton vizsgáltam.

A rekombináns fehérjék exportja során a keletkező fehérjék enzimátikus aktivitásának vizsgálatával igazoltam a natív szerkezet létrejöttét.

Differenciális pásztázó mikrokolorimetriai mérésekkel demonstráltam, hogy a flagellin specifikus FliS chaperon kötődése nem gátolja a flagellin kompakt középső részének hőmérséklet indukált letekeredését, szerkezeti stabilitását.

Tudományos eredmények

1. A *Salmonella typhimurium* flagellin esetében igazoltam, hogy a molekula rendezetlen N-terminális régiója hordozza a flagellumspecifikus exportapparátus azonosító jelét. Ennek érdekében különböző flagellin deléciós mutánsokat készítettem. Az N-terminálisan csonkolt fragmenseket használva az tapasztalható, hogy az első 13 aminosav nem szükséges az exporthoz, viszont 29 vagy több aminosav eltávolítása az exportképesség elvesztésével jár. Nagyobb C-terminális csonkolás azt mutatta, hogy az első 192 aminosav már hordozza a szignált. A kis méretű flagellin szegmenseket az emberi C1r komplement fehérje CCP2 doménjével fuzionáltattam és így vizsgáltam a rekombináns konstrukciók exportképességét.
2. Megmutattam, hogy a *Salmonella* flagellin N-terminális régiójának erősen konzerválódott Gly26-Gly47 szegmense elégséges az export számára. Eredményeim egyértelműen bizonyítják, hogy az exportszignál fehérjeszinten és nem mRNS szinten található.

3. A flagelláris exportrendszer működését tanulmányozva megállapítottam, hogy a flagellin-specifikus FliS chaperone a flagellin rendezetlen C-terminális régiójához kötődik azt helikális konformációban stabilizálva. A FliS kötődése nem befolyásolja a flagellin kompakt részének szerkezeti stabilitását, ami arra utal, hogy nem a FliS feladata a flagellin alegységek exportkompetens konformációjának kialakítása.
4. Igazoltam, hogy az exportszignált hordozó rendezetlen szegmenst génszintézeti módszerekkel a baktériumokban expresszált rekombináns fehérjékhez kapcsolva azok a flagellum-specifikus exportrendszer segítségével a sejtből kijuttathatók. Egyéb kísérletekkel demonstráltam, hogy akár eubaktériumból származó, akár emberi diszulfidhidakat tartalmazó fehérjéket kapcsolunk az N-terminális flagellin szegmens után a képződő fehérje hatékonyan szekretálódik a flagelláris exportútvonalon keresztül. Kísérletekkel alátámasztottam, hogy a flagellinspecifikus export rendszer nagy mennyiségű (10-15mg/l rázatott kultúra) rekombináns fehérje szekrécijára alkalmas.
5. Arra is kíváncsi voltam, hogy a szalmonella esetén talált szignál alkalmazható-e *E. Coli* baktérium esetén is. A *Salmonella* és *E. coli* flagellinek N-terminális régióiban 70% feletti szekvenciális homológia figyelhető meg. Tanulmányoztam, hogy a rendelkezésemre álló konstrukciók, hogyan viselkednek az *E. coli* GI826-os törzsben. A teljes hosszúságú FliC a természetes és a *lac* promóterrel is szekretálódik, valamint a *Salmonella* esetében az N-terminális 192 aminosav hosszúságú szignál itt is elegendőnek tűnt az exportrendszer számára.

Publikációk

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

Végh BM, Gál P, Dobó J, Závodszy P and Vonderviszt F (2006) Localization of the flagellum-specific secretion signal in *Salmonella* flagellin. *BBRC* **345** (1), 93-98.

Gál P, **Végh BM**, Závodszy P and Vonderviszt F (2006) Export signals. *Nat Biotechnol.* **24(8)**, 900-901.

Muskotál A, Király R, Sebestyén A, Gugolya Z, **Végh BM** and Vonderviszt F (2006) Interaction of FliS flagellar chaperone with flagellin. *FEBS Lett.* **580(16)**, 3916-3920.

Sebestyén A, Muskotál A, **Végh BM** and Vonderviszt F (2008) The Hypervariable D3 Domain of Salmonella Flagellin in An Autonomous Folding Unit. *Protein & Peptide Letters* **15(1)**, 54-57.

Szabadalom

Vonderviszt F, **Végh BM**, Gál P, Dobó J és Závodszy P Eljárás baktériumokban termeltetett rekombináns fehérjék sejtől való kijuttatására a flagellum-specifikus exportapparátus segítségével

Hazai (P0500428; 2005. április 29.) és nemzetközi (PTC/HU06/00039; 2006. május 02) szabadalmi bejelentés

Egyéb közlemények

Harmat V, Gál P, Kardos J, Szilágyi K, Ambrus G, **Végh B**, Náray-Szabó G and Závodszy P (2004) The structure of MASP-2 reveals that nearly identical substrate specificities of C1s and MASP-2 are realized through different sets of enzyme-substrate interactions. *J. Mol. Biol.* **342**, 1533-1546.

Gál P, Harmat V, Kocsis A, Bián T, Barna L, Ambrus G, **Végh B**, Balczér J, Sim RB, Náray-Szabó G and Závodszy P (2005) A true autoactivating enzyme. Structural insight into mannose-binding lectin-associated serine protease-2 activation. *J. Biol. Chem.* **280**, 33435-33444.