

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola
Szerkezeti Biokémia Doktori Program

A flagellumspecifikus exportapparátus felismerési jelének azonosítása

Készítette:
Végh Barbara Márta

Doktori iskola vezetője:
Erdei Anna
akadémikus

Programvezető:
Gráf László
akadémikus

Témavezető:
Závodszy Péter
akadémikus

Kutatóhely:
MTA SzBK Enzimológiai Intézet
Budapest, 2008

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	2
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	4
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
BEVEZETÉS	6
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
Bakteriális szekréciós rendszerek.....	8
A flagelláris exportrendszer.....	11
A bakteriális flagellum	11
Molekuláris felépítés	13
Az axiális fehérjék terminális régióinak rendezetlensége	17
Chaperonok.....	18
Az exportszignál problematikája.....	19
Rekombináns fehérjék szekréciója	20
CÉLKITŰZÉSEK	23
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	24
Vegyszerek, anyagok.....	24
Baktériumtörzsek.....	24
Vektor	24
DNS konstrukciók készítése.....	25
Elektroporálás, expresszió.....	28
SDS-PAGE és Western-blott.....	28
Differenciális pásztázó mikrokolorimetria	29
Enzimaktivitás mérés.....	30
EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK	31
Az exportszignál lokalizálása	31
Flagellin fragmensek exportja	31
Fúziós fehérjék exportja	34
Nemspecifikus szekréció ellenőrzése	39
A FliS és FliC kapcsolata	40
Rekombináns fehérjék exportja.....	41

A flagelláris exportrendszeren alapuló expressziós rendszer működőképességének vizsgálata E. coli-ban.....	44
ÖSSZEFOGLALÓ.....	47
SUMMARY	49
PUBLIKÁCIÓK	51
IRODALOMJEGYZÉK	52

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Závodszy Péter akadémikusnak és Dr. Vonderviszt Ferencnek, akik munkámat irányították és támogatták. Köszönöm csoportunk tagjainak, Dr. Gál Péternek, Dr. Dobó Józsefnek, Hajdú Istvánnak, Kamondi Szilárdnak, akik munkájukkal, illetve tanácsaikkal nagyban hozzájárultak e dolgozat létrejöttéhez.

Köszönet illeti a csoport és az Enzimológiai Intézet minden munkatársát, akik segítségemre voltak az elmúlt évek során.

Köszönetet szeretnék továbbá mondani Dr. Friedrich Péter akadémikusnak, intézetünk volt igazgatójának, hogy munkámat a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Enzimológiai Intézetében végezhettem el és Dr. Gráf Lászlónak a Szerkezeti Biokémia Doktori Program vezetőjének.

Végül de nem utolsósorban köszönöm férjemnek, hogy támogatott és mellettem állt dolgozatom elkészítésének éveitől kezdve, valamint kisfiamnak a sok türelmemért.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

TTSS:	III-as típusú export rendszer (type three secretion system)
T4SS:	IV-es típusú export rendszer (type 4 secretion system)
Tat:	két arginin transzlokálódó rendszer (twin-arginine translocation)
<i>S. typhimurium</i> :	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
FliC:	flagellin
FliS:	flagellin specifikus chaperon
HAP1:	kampó asszociált fehérje 1
HAP2:	kampó asszociált fehérje 2
HAP3:	kampó asszociált fehérje 3
C1rCCP2:	humán C1r komplement kontrol protein típusú modul
C1rCCPSP:	humán C1r komplement kontrol protein és szerin proteáz típusú modulok
EGFP:	enhanced green fluorescent protein
IPMDH:	3-izopropil-malát dehidrogenáz
XynAcat:	xilanáz A katalitikus domén
PCR:	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
DSC:	differentiális pásztázó mikrokolorimetria (differential scanning calorimetry)
CD:	cirkuláris dikroizmus
SDS:	Na-dodecil-szulfát
BCIP:	5-bróm-4-klór-3-indolil-foszfát
NBT:	nitro-blue-tetrazolium

BEVEZETÉS

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 fehérjei 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 alapkutató felismerésekhez vezethet, hiszen a baktériumok egyik fontos élettani folyamatáról van szó, másrészt lehetővé teszi a rendszer biotechnológiai alkalmazásának megalapozását.

Mindezidáig nem ismert, hogy mi az a jel, szerkezeti vagy szekvenciális tulajdonság, amelynek alapján a flagellum-specifikus exportapparátus felismeri az exportálandó fehérjéket. 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.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Bakteriális szekréción rendszerek

A baktériumsejteket az eukarióta sejtekkel ellentétben nem egyetlen membrán határolja, hanem változatos felépítésű és vastagságú sejtfal, illetve Gram-negatív baktériumok esetében még egy külső membrán is. A baktériumsejtnek ezeken a rétegeken keresztül nemcsak a fertőzőképességhez szükséges faktorok kijuttatását kell biztosítania, hanem általában a környezetével folytatott anyagforgalmat is.

A fehérjék transzportálására különböző szekréción rendszerek alakultak ki. Gram-pozitív baktériumokban a fehérjeszekréción a megfelelő, úgynevezett szekréción szignállal való összekapcsolással általában egyszerűen megvalósítható, azonban nagyon alacsony határfokkall működik. Bizonyos szekréción rendszerek mind Gram-pozitív, mind Gram-negatív baktériumokban is előfordulnak, ilyen például a IV-es típusú. A Gram-negatív baktériumokban többféle szekréción mechanizmus létezik:

Az **I-es típusú** exportapparátus Gram-negatív baktériumok esetén számos különböző méretű és funkciójú fehérjét juttat a citoplazmából az extracelluláris médiumba. Az export egy lépésben történik stabil periplazmatikus intermedier nélkül. A szekréción szignál általában a szekretált fehérje C-terminális végén található és nem hasad le az export során. Több szekretált fehérjénél megfigyelhetünk glicin gazdag repetitív elemeket (GGXGXDXXX), amik specifikusan kötik a Ca^{2+} ionokat. Vannak olyan fehérjék is, amelyek nem rendelkeznek glicin gazdag ismétlődő régiókkal, de tartalmaznak egyéb ismétlődő egységeket, melyek sajátos béta topológiával rendelkeznek és Ca^{2+} ionokat találhatunk a hajtúikben. Több tanulmány is azt állítja, hogy ezek az ismétlődő szekvenciaelemek a szekretált fehérjék aktivitásához szükségesek. Az I-es típusú exportrendszereket jól demonstrálják az ABC-transzporterek (1. ábra), mely esetén az egy vagy két membránon átvivő csatornán keresztül szállítódnak a fehérjék (Deleplaire, 2004).

A legjobban ismert a **II-es típusú** mechanizmus, amit két lépéses vagy általános szekréción útvonalként is ismerünk. Jellegzetessége, hogy szubsztrátumai már végleges szerkezettel rendelkező fehérjék. Itt az exportrendszer (Sec rendszer) a belső membránon keresztül a periplazmába juttatja célfehérjéit, amelyek a szekréción közben lehasításra kerülő N-terminális szignálszekvenciát tartalmaznak. A sec-függő fehérjeexport-rendszereknél

jellemző egy körülbelül 30, főként hidrofób aminosavakból álló szignálszekvencia (1. ábra) (Cianciotto, 2005).

A **III-as típusú** exportrendszerek (TTSS), csak Gram-negatív fajoknál előforduló, bonyolult rendszerek. Ezek a baktériumok citoplazmájából virulens fehérjéket szekretálnak a belső és külső membránon keresztül a külső térbe, vagy közvetlenül a gazdasejt sejtplazmájába (Saier, 2004). Működési mechanizmusokról meglehetősen keveset tudunk. A III-as típusú szekrécións rendszerek fehérjekomplexumokból felépülő, vékony, merev, üreges tűszerű szerkezetek, amelyek a sejtthártyához vannak kihorgonyozva. Bár nagymértékben konzerváltak a különböző baktériumok esetén, az effektor molekulák meglehetősen egyedülállóak. A rendszer jellemzői (i) az általános fehérjeexportáló útvonalakon keresztül szekretált fehérjékre jellemző lehasadó szekrécións szignál hiánya, (ii) a szekretálódó fehérjék többségének van dajkafehérjéje (chaperon), (iii) szükségük van a sejtek közötti érintkezésre, mert a T4SS-hez hasonlóan különböző fehérjéket szállítanak különböző gazdasejtekbe. A Gram-negatív baktériumok nagy része a TTSS rendszertiket horizontális géntranszfer útján hozta létre. Az különbözteti meg a hasonló nem patogén baktériumoktól, hogy az exportrendszert extra kromoszómális DNS kódolja, ami úgynevezett patogénitási szigeteken helyezkedik el a genomban. Ezeknél a szigetekenél gyakori a magas GC tartalom, ami eltér a gazdasejtek kromoszómájától és ezek általában bekelődő szekvenciák, bakteriofág gének és transzportálódó elemek által határolt. A III-as típusú exportapparátust közel 25 gén kódolja, ezekből körülbelül 10 szekvenciális vagy membrántopológiai hasonlóságot mutat a flagelláris exportrendszer citoplazmában vagy a külső membránon előforduló fehérjéivel. Evolúciós hasonlóság figyelhető meg a flagelláris és a III-as típusú exportrendszerek között. A TTSS legfontosabb komponense az úgynevezett „needle complex” (injekciós tű), amely néhány külső membránfehérjéből áll, amelyek szekvenciális hasonlóságot mutatnak a szekretin családba tartozó transzportálódó fehérjékkel, mint néhány kevésbé konzerválódott lipoprotein, valamint a membrán asszociált ATPáz, ami feltehetően a szekrécións folyamatot stimulálja. A „injekciós tű” körülbelül 120 nm hosszúságú üreges cső, és két doménből áll: a baktérium sejt felszínéről kiugró tűszerű külső részből és a henger alakú horgony struktúrából. Biokémiai analízis alapján a „injekciós tű” 3 fő komponense az InvG (a secretin fehérjecsalád tagja), és két lipoprotein: a PrgH és a PrgK. A TTSS és a flagelláris exportapparátus közötti felépítésbeli hasonlóság ellenére a „injekciós tű” strukturális elemei és a bazális test között csak korlátozott szekvencia hasonlóság figyelhető meg (Galán, 1999). Az exportszignál

mibenléte sem ismert, a feltételezések szerint valahol a szekretált fehérjék N-terminális részén található.

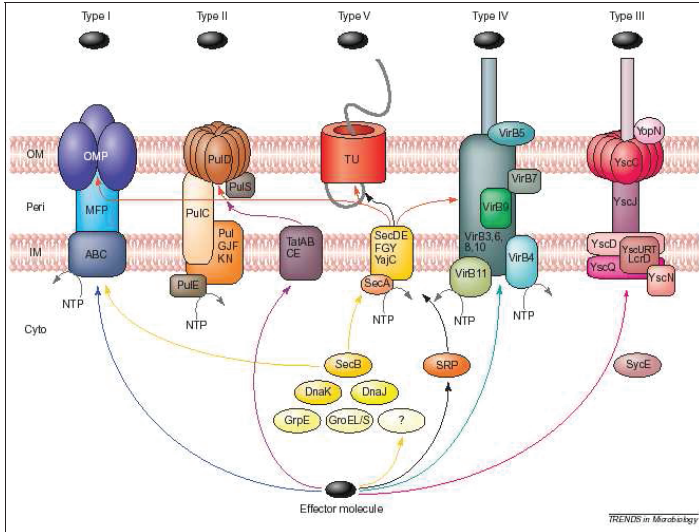
A III-as típusú exportrendszerek közül az egyik legjobban ismert a *Yersinia* baktériumok „injekciós tüje”, ennek a neve Ysc-Yop-rendszer (1. ábra). Az injekciós tűt a *Yersinia* szekréciós (Ysc) apparátusa, míg a szekretált effektor fehérjéket a *Yersinia* külső fehérje (Yop) apparátusa jelenti. A *Yersinia* baktériumok felszínén testhőmérsékleten a szekréciós apparátus számos példányban jelenik meg. Az injekciós tű alapja a bakteriális peptidoglikán sejtfalat és a két membránt is átvivő bazális test, ami egy, a baktérium felszínéből kinyúló, túszerű struktúrában végződik. A bazális test legbelsőbb része a fehérjepumpa, melynek egyik legfontosabb alkotórésze az YscN fehérje, egy ATP-áz. A bazális test külső része egy gyűrű alakú szerkezet, amely a YscC fehérje polimerizációjával jön létre. Maga a tű YscF fehérje polimerizációjával alakul ki (Cornelis, 2002).

A **IV-es típusú** szekréciós (T4SS) rendszerek széles körben elterjedtek mind Gram-negatív, mind Gram-pozitív baktériumok között. A T4SS-ek 3 fő funkciójuk van: (i) DNS ájtuttatása baktériumok vagy eukarióta sejtek között, közvetlen sejt-sejt kapcsolat révén; (ii) effektor molekulák bejuttatás eukarióta célsejtekbe; (iii) DNS-felvétel vagy -leadás a sejt és a külső közeg között. A T4SS egyik alosztálya a konjugációs mechanizmus, ami felelős egyrészt az antibiotikum rezisztencia gének átviteléért, másrészt fitness jelleg átviteléért a baktériumok között. Egy másik alosztálya az effektor transzlokáló rendszer, amit bakteriális patogének használnak effektor fehérjék és más molekulák szállítására az eukarióta célsejtekbe a gazdaszövetek gyarmatosítása céljából. Az exportálódó szubsztrátok egy C-terminális belső motívummal rendelkeznek, amit a konjugációs és az effektor transzlokációs rendszer felismer. Az *Agrobacterium tumefaciens* VirB/D4 rendszer szolgál modellként ennek megértéséhez, ami 11 VirB párképeződő alegységből (Mpf) és VirD4 szubsztrátreceptorból áll. Az Mpf alegységek egyedül pilus struktúrát mutatnak, a VirD4 receptorral együtt viszont egy szekréciós csatornát hoznak létre (1. ábra) (Christie, 2005).

A IV-es típusú exportrendszerek DNS-fehérje komplexeket, több alegységből álló toxinokat valamint monomer fehérjéket, mint például a RecA fehérje szekretálnak. Ebben az esetben bakteriális konjugációról beszélhetünk. Egy baktérium így adhat át genetikai információt egy másik baktériumnak. Ennél az exportrendszernél akár az extracelluláris tér, akár közvetlenül a gzdasejt a sec-függő és a sec-független úton is elérhető (Desvaux, 2004).

Az **V-ös típusú** exportrendszer reprezentálja a legnagyobb családját a fehérje transzlokáló külső membrán porinoknak, melyet a legegyszerűbb exportrendszernek

tekinthetünk. A fehérjék a külső membránon, a transzmembrán pórusokon keresztül mennek át, amit egy önmagát kódoló β -struktúra formál. Ennek egy jellemző példája az IgA1 szekréciója (Desvaux, 2004).



1. ábra Gram-negatív baktériumokban előforduló különböző szekréciós rendszerek közötti összefüggések sematikus ábrázolása. A kék nyíl bemutatja, hogy az effektor molekulák hogyan jutnak át a belső és külső membránon az I-es típusú szekréciós apparátus esetén. Lila nyíl jelzi, hogy érnek célba az effektor molekulák Tat (két arginin transzlokálódo rendszer) útvonalon. Az effektor molekulák átjutását a belső és külső membránon keresztül a IV-es típusú exportrendszernél világoskék, míg a III-as típusúnál pink nyíl mutatja. Sárga nyíl mutatja az effektor molekulák célba jutását molekuláris chaperonok, mint például a SecB segítségével. A piros nyilak jelzik, hogyan transzlokálódnak a molekulák a külső membránon keresztül.

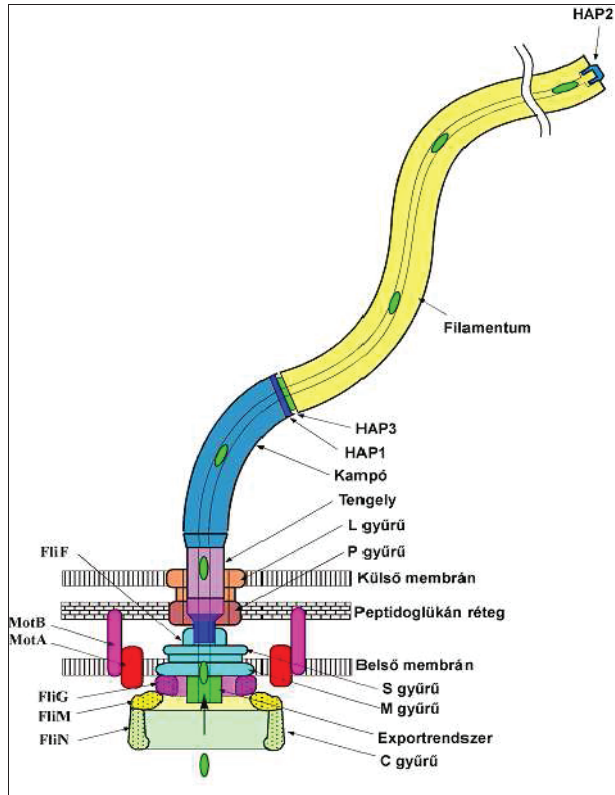
A flagelláris exportrendszer

A bakteriális flagellum

A flagellumok a baktériumok mozgásszervei (Namba, 1997) (2. ábra). Sejtmembránba ágyazott részük tartalmaz egy parányi, 50 nm átmérőjű, protonok által hajtott motort, amely akár 90 ezres percenkénti fordulatszám elérésére is képes. Minden egyes motorhoz egy-egy 5-10 μm hosszúságú helikális filamentum csatlakozik, amely a flagellin fehérje több tízezer kópiájából épül fel. Ezek a helikális filamentumok a baktérium helyváltoztatása során

egyetlen nagy helikális köteggé állnak össze, amely tengelye körül forogva mintegy propellerként hajtja előre a baktériumot. A motor tengelyét (rod) a külső helikális filamentumokkal az erősen görbült szerkezetű kampó (hook) köti össze. A kampót közel 130 azonos fehérjealegység (hook fehérje) alkotja. A kampó nemcsak passzív összekötő elem a motor és a filamentumok között, hanem olyan erőátviteli szerkezetként működik, amely képes a forgástengely irányának megváltoztatására. Bár a flagellin és a hook fehérje a flagellumok filamentáris részének fő alkotórészei, a filamentum szerkezetének kialakításában fontos szerepet játszanak még a HAP (HAP1, HAP2, HAP3) fehérjék. A HAP1 és HAP3 fehérjék néhány példánya egy vékony kapcsolózónát alakít ki a kampó és a helikális filamentumok között, míg a HAP2 fehérje a filamentumok végét lezáró molekuláris sapka felépítésében játszik szerepet (Yonekura, 2000). Morfológiai szempontból a bakteriális flagellumok – elsősorban a motor felépítésében részt vevő – gyűrű alakú képződményekből és egy a motor tengelyét, a kampót és a helikális filamentumokat magában foglaló axiális struktúrából állnak. A motor tengelyét felépítő 4-féle rod fehérjét, a hook fehérjét, a flagellint, és a HAP fehérjéket együttesen axiális fehérjéknek nevezik (Homma, 1990) (1. táblázat).

A bakteriális flagellumok axiális fehérjei három alcsoportba sorolhatók (Homma, 1990). A helikális filamentumokat felépítő flagellin elsődleges szerkezetét tekintve rokonságban van a filamentumokhoz proximálisan kapcsolódó HAP3 fehérjével. A kampó régiót alkotó hook fehérje egyáltalán nem hasonlít a flagellinhez, de különösen terminális régióiban, erős szekvenciális hasonlóságot mutat a flagellumok sejtmembránba ágyazott molekuláris motorjának tengelyét alkotó négyféle rod fehérjével és a HAP1 fehérjével. Végezetül a flagellumok végén sapkát formáló HAP2 fehérje és a többi axiális fehérje között semminemű homológia sem figyelhető meg.



2. ábra A bakteriális flagellumok szerkezeti diagramja. A különböző színek különböző fehérjekomponensekből álló szerkezeti egységet jelölnek. A filamentumok belső csatornáját szaggatott vonal jelzi. A filamentumok vastagsága 23 nm, míg hosszúságuk akár 5-10 μm is lehet. Az egyes fehérjék szerepéről a szövegben bővebb leírás található.

Molekuláris felépítés

A bakteriális flagellumok túlnyomó része a sejtmembránon kívül helyezkedik el. Az alkotó fehérjeegységek nem a hagyományos bakteriális exportmechanizmus révén kerülnek ki a sejtből, hanem a flagellumok belső csatornáján át a flagellumspecifikus exportapparátus segítségével (Iino, 1974), amely a feltételezések szerint a bazális test M gyűrűjének citoplazma felőli oldalán, az üreges C gyűrű által határolt térrészben helyezkedik el (Macnab, 2004). A flagellumspecifikus exportrendszer szerkezetéről, a felépítésében részt vevő

fehérjéről keveset tudunk. A legújabb vizsgálatok sikerrel azonosítottak egy flagellumspecifikus ATPáz molekulát (**FliI**), amely minden bizonnyal az exportapparátus egyik kulcsfontosságú eleme (Daughdrill, 1997, Vogler, 1991, Minamino, 2008). Ezt a feltételezést alátámasztja az a tény is, hogy a FliI fehérje aminosav-szekvenciája rokonságot mutat bizonyos baktériumok virulens fehérjéinek szekréciójára specializálódott exportrendszerek komponenseivel (Groismann, 1993, Hueck, 1998). A FliI egy 49 kDa nagyságú citoplazma fehérje, mely tartalmaz egy N-terminális flagellum-specifikus és egy C-terminális ATPáz régiót. A FliI fehérjén kívül Minamino és Macnab exportképtelen mutások genetikai analízisével még több olyan fehérjét azonosítottak, amelyek szerepet játszanak a flagellumspecifikus exportapparátus működésében. A 26 kDa nagyságú **FliH** citoplazma fehérje oldatban dimerként van jelen, és stabil komplexet ad a FliI-vel (FliH)₂FliI-ként. A FliI N-terminális régiója és a FliH dimerben szereplő mindkét FliH fehérje C-terminális régiója felelős a heterotrimer komplex kialakulásáért. Mindkét fehérjéről azt találták, hogy egyéb flagelláris komponens hiányában külső membránfehérjeként viselkednek (Minamino, 2004). A harmadik citoplazma fehérje, a **FliJ** 17 kDa nagyságú nagy valószínűséggel képez α -helikális coil-coil struktúrát az N-terminális közelében. Ez jellemző a III-as típusú citoplazma chaperonok családjára. Overexpresszió esetén számos export szubsztrát zárványtest formájában van jelen a citoplazmában, ám FliJ-vel együtt termeltetve elkerülhető az aggregáció. A FliJ bár nem chaperon, de chaperon-szerű aktivitást mutat (Minamino, 2004). Az export mechanizmus hatékonysága szempontjából a FliH-FliI komplex szerepe valószínűleg az, hogy a FliHx-FliI6 komplex és a FliA-FliB platform közötti különleges kölcsönhatások révén növeli az export szubsztrátok N-terminális szegmenseinek az export kapuhoz történő kapcsolódásának határfokát. Mivel ATPáz aktivitás nélkül a FliHx-FliI6 komplex kötése meggátolja az export folyamatot, úgy tűnik, hogy az export rendszer a fehérje letekeredésének és a polipeptid lánc kapun keresztüli kijuttatásának akadálytalan végrehajtásához, valamint a FliH2-FliI komplexeknek a kezdeti összekapcsolódás következő ciklusában történő felhasználásához az ATP hidrolízis energiáját használja. Ez az energia teszi lehetővé a FliHx-FliI6 komplex és a kijuttatandó fehérje szétválasztását, az export kapuról történő leválását. Mivel az export szubsztrátok N-terminális szegmenseinek összes export szignálja natív monomer formájú, a kezdeti összekapcsolódáshoz és a kapun történő belépéséhez nincs szükség az ATP hidrolízisre (Minamino, 2008).

A tengely-típusú (**FliE**, **FlgB**, **FlgF**, **FlgC**, **FlgG** és **FlgJ**) és a kampó típusú (**FlgD**, **FlgE** és **FliK**) fehérjék egy osztályba sorolhatók, míg a filament típusú (**FlgK**, **FlgL**, **FliD**,

csökken. Az axiális fehérjék átlagos mérete (40-50kDa) azt sugallhatná, hogy kitekeredett állapotban kell vándorolniuk, aminek azonban ellentmondani látszik, hogy a filamentumok maximális növekedési sebessége ekkor rendkívül gyors, kb. 0,05s alatti, térszerkezet kialakulást követelne meg.

Fehérje neve	Triviális név	Funkció	Típus
FlgK	HAP1	Kampó asszociált fehérje	Filament, axiális fehérje
FlgL	HAP3	Kampó asszociált fehérje	Filament, axiális fehérje
FliD	HAP2	Filamentum végét lezáró sapka	Filament, axiális fehérje
FliC	flagellin	Filamentum fehérje	Filament, axiális fehérje
FlgD		Kampó sapka fehérje	Kampó
FlgE	hook	Kampót alkotó fehérje	Kampó, axiális fehérje
FliK		Kampó hosszát szabályzó fehérje	Kampó
FlgB		Tengelyt alkotó fehérje	Tengely, axiális fehérje
FlgF		Tengelyt alkotó fehérje	Tengely, axiális fehérje
FlgC		Tengelyt alkotó fehérje	Tengely, axiális fehérje
FlgG		Tengelyt alkotó fehérje	Tengely, axiális fehérje
FlgJ		Tengely sapka fehérje	Tengely
FliE		MS gyűrű-rúd összekötő fehérje	Tengely
FlgH	L gyűrű	Tengelyt helyén tartó csapágó	Külső gyűrű komponens
FlgI	P gyűrű	Tengelyt helyén tartó csapágó	Külső gyűrű komponens
MotA		Motor álló részét alkotó fehérje	
MotB		Motor álló részét alkotó fehérje	
FliG		Rotor kapcsoló komplexet alkotó fehérje	
FliM		Rotor kapcsoló komplexet alkotó fehérje	C gyűrű
FliN		Rotor kapcsoló komplexet alkotó fehérje	C gyűrű
FliF		MS gyűrűt alkotó fehérje	
FliH		Kampó méretét szabályzó fehérje	Export komponens
FliA			Export komponens

Fehérje neve	Triviális név	Funkció	Típus
FliO			Export komponens
FliP			Export komponens
FliQ			Export komponens
FliR			Export komponens
FliS		FliC specifikus chaperon	Chaperon
FliT		FliD specifikus chaperon	Chaperon
FliJ		Általános chaperon	Chaperon
FlgN		FlgK, FlgL specifikus chaperon	Chaperon
FliI		ATPáz	
FliH		FliI negatív regulátor	

1. táblázat A flagelláris fehérjék elnevezése, funkciója.

Az axiális fehérjék terminális régióinak rendezetlensége

Korábbi vizsgálatok során limitált proteolízis, spektroszkópiás és kalorimetriás módszerek kombinált alkalmazásával megmutatták, hogy az axiális fehérjék három alcsoportjának reprezentánsaként választott flagellin, hook és HAP2 fehérjék monomer állapotukban egyaránt kiterjedt rendezetlen terminális régiókkal rendelkeznek (Aizawa, 1990, Vonderviszt, 1989, 1992, 1998). (Pl. a *Salmonella typhimurium*ból származó, 494 aminosavból álló flagellinmolekula kb. 66 N-terminális és 44 C-terminális aminosavnyi része, oldatban nem rendelkezik kompakt, stabilis térszerkezettel.) A szekvenciális hasonlóság az egyes csoportokon belüli fehérjék között éppen a terminális régióikban a legerősebb, ami ezen régiók hasonló szerkezeti tulajdonságaira utal. Mindez azt sugallja, hogy valamennyi axiális fehérje terminális régiói rendezetlenek, azaz a rendezetlen terminális régiók léte az axiális fehérjék általános szerkezeti sajátossága (Vonderviszt, 1992).

A rendezetlen terminális régiók a molekulák legkonzerválódottabb részeit foglalják magukban, amelyek a predikciós algoritmusok szerint valamennyi axiális fehérje esetében erős helikális köteg-képző tulajdonsággal is rendelkeznek. CD-spektroszkópiás mérések szerint a rendezetlen régiók polimerizáció/oligomerizáció során valóban α -helikális konformációt felvéve rendeződnek (Aizawa, 1990, Vonderviszt, 1995, 1998), s a

filamentumok belső magjának kialakításában vesznek részt. Laboratóriumunkban elvégzett korábbi vizsgálatok során kiderült, hogy a rendezetlen terminális régiók kiemelkedő szerepet játszanak az axiális fehérjék polimerizációs ill. aggregációs képességének szabályozásában (Vonderviszt, 1991, 1995).

Az axiális fehérjék a citoplazmában szintetizálódnak, majd a flagellum specifikus exportmechanizmus segítségével a flagelláris filamentumok belsejében található csatornán át jutnak el beépülési helyükre, a filamentumok végére (Iino, 1974, Jones, 1991 Macnab, 1995). Létfonosságú a baktérium számára, hogy a nagy mennyiségben szintetizálódott axiális fehérjék ne a sejten belül, hanem csak a megfelelő helyen, a filamentumok végén polimerizálódjanak. A rendezetlen terminális régiók akadályozzák meg, hogy az axiális fehérjék már a citoplazmában polimerizálni kezdjenek. A rendezetlen terminális régiójú monomerek nem képesek egymáshoz kötődni, a rendezetlen régiók nem képesek egymást rendezni, ezért nem is indul meg filamentumkezdemények vagy precipitálószerkek nélkül a flagellin vagy hook molekulák polimerizációja, a filamentáris szerkezet kialakulása. Csak egy jól definiált kötőfelület képes a rendezetlen régiók stabilizálására és rendezésére, s ez a mechanizmus biztosítja, hogy a polimerizáció csak a megfelelő helyen, a filamentumok végén történhet meg.

Chaperonok

A flagelláris exportapparátust felépítő fehérjék exportja részben a bakteriális citoplazmában lévő export chaperonok által szabályozott. Mivel a TTSS számos strukturális komponense homológ a bakteriális flagelláris exportapparátus komponenseivel azt gondolhatnánk, hogy kézenfekvő a két exportrendszer chaperonjainak hasonlósága. A flagelláris és a TTSS chaperonok ugyan különböző szerkezetűek oldatban, de hasonló feladatokat látnak el, kötik a fehérjéket kitekeredett állapotukban. A TTSS chaperonok elősegítik a rokon kötő partnerek exportját azáltal, hogy fenntartják a fehérjéket részben letekeredett állapotukban. (Evdokimov, 2003) A FlgN, FliT és FliS export chaperonok specifikusan kötik a FlgK, FlgL, FliD és FliC fehérjéket. Ezen chaperonok legfontosabb feladata, hogy megelőzzék a bakteriális flagellumot felépítő fehérjék összeépülését a citoplazmában. FlgN, FliT és FliS fehérjék között nincs nyilvánvaló aminosav hasonlóság. Ebből a szempontból a flagelláris chaperonok hasonlítanak a III típusú exportrendszer chaperonjaihoz, bár egy jelentős különbség fedezhető fel a két exportrendszer között. Míg a

TTSS esetén a chaperonok a szekretálódó fehérje N-terminális részéhez kötődnek, addig a flagelláris export chaperonok a partner C-terminálisát kötik. A *Salmonella typhimurium*ból származó FliS 135 aminosavból álló, a szerkezetjósító eljárások alapján főként α -helikális struktúrát mutató fehérje. Közvetlenül nem vesz részt a FliC szekréciónak, inkább csak megelőzi a FliC polimerizációját a citoplazmában. A flagellin feltekeredése után 4 morfológiai egységet (domént) találunk D0-D3, és a polimerizáció specifikusan a D0 rendezetlen szerkezetű doméntól függ, ami magában foglalja mind az N- mind C-terminális régiót. A flagellin C-terminális 40 aminosava szükséges és elégséges a szubsztrátspecifikus citoszolikus dajkafehérje a FliS megkötéséhez. Élesztő két-hibrid módszerrel igazolták, hogy a FliC C-terminális rendezetlen régiója szükséges a FliS kötéséhez (Ozin, 2003, Auvray, 2001).

Az exportszignál problematikája

A flagelláris exportrendszer a III-as típusú exportrendszerek közé sorolható. Ezek egyik fő jellegzetessége a lehasadó közös szekréciónak szignál hiánya. A III-as típusú exportrendszerrel kapcsolatos irodalomban is felfedezhető az a kettősség, ami a flagelláris exportrendszerénél is jellemző, mindkét esetben találhatunk példákat fehérje és mRNS természetű szignálra is.

Korábbi kísérletek azt mutatták, hogy az exportrendszer az exportszubsztrát N-terminális régióját ismeri fel. *E. coli* esetén Kuwajima és munkatársai megfigyelték, hogy az N-terminális 183 aminosav elegendő az exporthoz (Kuwajima, 1989).

Kornacker és munkatársai a *C. Crescentus* 591 aminosavból álló kampó fehérjéjénél lokalizáltak egy N-terminális közeli 21 aminosavas szignált, ami elegendőnek bizonyult az exportrendszer számára. A szignált a 38-58 közötti aminosavak adják (Kornacker, 1994).

Modell szubsztrátként az *Escherichia coli* FlgD, azaz kampó sapka fehérjét használva egy német kutatócsoport azt találta, hogy a fehérje N-terminális 71 aminosava tartalmazza az exportszignált. A nukleotid szekvencia változatai és a keret eltolásos mutációk elemzése az szignál fehérjejellegét sejteti. Továbbá az első nyolc aminosav fizikai, kémiai tulajdonságai alapján elengedhetetlen az export számára (Weber-Sparenberg, 2007).

Salmonella SopE fehérje esetén szintén a fehérjeszignálra kaphatunk bizonyítékokat. Karavalos és munkatársai demonstrálták, hogy a SopE 5' nem transzlálódó régiója nem játszik szerepet a fehérje TTSS-n keresztüli szekréciónak során. Továbbá a SopE szekretálódott a heterológ P_{BAD} promóter kontrollja alatt is, a szignált az N-terminális első 78 aminosav tartalmazza, bár az egzakt szignált ők nem határozták meg (Karavalos, 2005).

A *Yersinia enterocolitica* 12 különböző Yop fehérjét exportál a TTSS-n keresztül. Néhány Yop fehérje (YopE és YopN) N-terminális 15-17 aminosava elegendő heterológ fehérjék közvetlen exportjához. Ezen fehérjék vizsgálata során semmilyen közös szignálszekvencia nem figyelhető meg. Anderson és munkatársai azt mutatták ki, hogy a szekréciós szignál az mRNS-ben rejlik, mivel a polipeptid szekvencia engedékenynek bizonyult a mutációkra, leovasási keret eltolódásra. Anderson és munkatársai szerint *Yersinia* esetén a III típusú szekréciós szignál a Yop mRNS-ének 5' végén található (Anderson, 1999).

Escherichia coli esetén Majander és munkatársai arra az eredményre jutottak, hogy a flagellin fehérje esetén az 5' UTR (5' nem transzlálódó régió), ami tartalmazza a flagellin természetes promóterét, jelentős szerephez jut az export során. Kimutatták, hogy az *E. coli* flagellin első 183 aminosavát tartalmazó fragmentum csak abban az esetben szekretálódott, ha tartalmazta az 5' UTR-t is, szintetikus *trc* promóter kontrollja alatt a fehérje csak a sejten belüli térben volt detektálható. Ugyanebben a munkában azt is leírják, hogy a teljes hosszúságú flagellin esetén *trc* promótert alkalmazva a fehérje szekretálódott (Majander, 2005). Felmerül a kérdés, hogy ebben az esetben fehérje vagy mRNS szignálról van-e szó, hiszen magán a cikken belül is ellentmondó adatok találhatók.

Látható, hogy a szakirodalom nem egységes a flagelláris exportszignál mibenlétét illetően. Munkám során célom volt, hogy *Salmonella* esetében megtaláljam a lehetséges szignált és állást foglalhassak ebben a kérdésben. Eredményeimet előrevetítve a fehérje szignál tűnik a helyes válasznak.

Rekombináns fehérjék szekréciója

A rekombináns fehérjeexpresszió a modern alkalmazott biotechnológia egyik legfontosabb területének számít. Manapság számos expressziós rendszer áll a kutatók és felhasználók rendelkezésére. Ezek közül is kitűnnek a bakteriális expressziós rendszerek, mivel ezekben egyszerűen és viszonylag olcsón lehet előállítani rekombináns fehérjét. Léteznek olyan bakteriális expressziós rendszerek, melyek során a kívánt fehérje valamilyen úton a médiumba szekretálódik. Az I-es típusú szekréciós rendszer prototípusa a hemolizin transzport rendszer. Az I-es típusú szignálszekvencia független útvonalon keresztül egyetlen lépésben közvetlenül a külső médiumba jutnak a szekretált fehérjék. Az így exportált fehérjék (pl. a hemolizin) C-terminális doménjükben hordozzák az exportrendszer felismerési jelét. Ha ezt a – több mint 200 aminosavból álló – C-terminális szignáldomént a kijuttatni kívánt fehérjéhez kapcsoljuk, akkor a célfehérje az extracelluláris térbe juttatható (Shokri, 2003).

Nehézkessé teszi azonban ezt az eljárást, hogy egyidejűleg expresszálni kell a szekréciónak az apparátus fehérjéit kódoló géneket is (Choi, 2004, Cornelis, 2000), s a tapasztalatok szerint a szekréciónak hatékonysága erősen függ az exportálandó fehérje tulajdonságaitól.

A II-es típusú exportrendszer esetén a periplazmatikus térből a termeltetett fehérje általában csak nagyon alacsony határfokkal nyerhető ki. Számos periplazmába szekretált fehérje esetén a megfelelő dajkafehérjék (chaperonok) hiánya illetve nem elegendő mennyisége miatt gyakran hibás feltekeredés és degradáció figyelhető meg (Baneyx, 1999, Sandkvist, 2003). A szekréciónak határfoka is sokszor alacsony, a szignálszekvencia eltávolítása sem mindig tökéletes. A periplazmából az extracelluláris térbe jutás a külső membránon át passzív transzporttal megy végbe, ezért lassú és nehézkes. A külső membrán szerkezetét destabilizálva a transzport felgyorsítható, ez a kezelés azonban meggátolja ezen baktériumok fehérjetermelésre való folyamatos használatát.

A Wacker biotechnológiai cég kidolgozott egy a II-es típusú exportapparátust felhasználó szekréciónak rendszert, amely hatékony és megbízható szekréciónak biztosít a rekombináns fehérjék számára a médiumba, és a fehérjék széles skáláján alkalmazható antitest fragmenseken át peptidekig. Az általuk kifejlesztett és szabadalmaztatott WCM105-ös *E. coli* törzs használata során ellentétben más kereskedelmi forgalomban kapható *E. coli* törzsekkel a rekombináns fehérjék natív szerkezettel kerülnek a sejtkultúra felülszójába. Az expresszió során nagy tisztaság és magas hozam érhető el, például a 6,9 kDa nagyságú 3 diszulfidhidat tartalmazó hiruudin esetén 7 g/L (Leonhartsberger, 2006).

A két arginin transzport (Tat) útvonal is felhasználható rekombináns fehérjék exportjára. Ebben az esetben egy 14 aminosav hosszú szignálszekvencia van a célfehérjéhez fuzionáltatva. Erről a szignálról elmondható, hogy tartalmaz egy konzervált aminosav szekvenciát (S/T-R-R-X-F-L-K) és egy kevésbé hidrofób középso Alfa helikális régiót. Bár a Tat rendszer mechanizmusa nem teljesen tisztázott, az bizonyos, hogy a membránon keresztül átvivő csatorna minimum 70Å átmérőjű. Így ezzel a rendszerrel a heterológ fehérjék teljesen feltekeredett formában kerülhetnek be a citoplazmába. Hátránya viszont, hogy a transzport elég időigényes (Georgiou, 2005).

Stahl és LaVallie szabadalmi leírásban javasolta a flagellum-specifikus exportrendszer felhasználását heterológ fehérjék gazdasejtéből való kijuttatására. Eljárásuk lényege, hogy olyan fúziós konstrukciót hoznak létre, amelyben a flagellin fehérjét vagy annak nagyobb méretű N-terminális szegmensét kapcsolják a kijuttatandó fehérje N-terminálisához. Az eljárás alkalmazhatóságát azonban meggátolta az a tény, hogy nem ismerték megfelelően a flagellum-specifikus exportrendszer működését, az exportszignálról is csak annyit tudtak,

hogy valahol a flagellin N-terminális régiójában helyezkedik el (Ku wajima, 1989). Az általuk bemutatott példákban a flagellin mintegy 300 aminosavnyi N-terminális szegmensét használták az expresszált fehérje kijuttatására. A flagellumok centrális csatornája azonban meglehetősen szűk, mérete 20-25Å, ezért csak akkor van esély nagyobb méretű rekombináns fehérjék kijuttatására, ha minimalizálni tudjuk a szekréciót irányító szegmens nagyságát. Bár Western-blott segítségével kimutatták az exportált fúziós fehérjét, de nem adtak közvetlen bizonyítékot arra, hogy az export fehérjét eredményez (Stahl, 1989).

Hasonlóképpen Asaka és munkatársai japán szabadalmi bejelentésében az *E. coli* flagellin mintegy 240 aminosavas N-terminális fragmensét javasolták használni rekombináns fehérjék gazdasejtéből való kijuttatására. Úgy tűnik, a szerzők az N-terminális szakaszhoz kötik az exportfunkciót, és szükségesnek tartják, hogy az N-terminális, 10 aminosav hosszúságú szekvencia szerepeljen az exportszignált hordozó fragmensben (Asaka, 1997).

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám egyik alapvető célja, hogy megértsem a flagelláris exportrendszer működését, azonosítsam a lehetséges szignált, valamint tisztázni az export során esetlegesen közreműködő chaperonok szerepét. Céлом volt kimutatni, hogy valóban az axiális fehérjék rendezetlen terminális régiói irányítják ezen fehérjék exportálódását, valamint azonosítani, 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, hogy az alap kutatás eredményeit milyen módon lehetne az alkalmazott kutatásba átvinni, milyen biotechnológiai alkalmazása lehet az általunk feltérképezett rendszernek. Reményeim szerint az exportszignált hordozó rendezetlen szegmenseket génszabályozási módszerekkel a baktériumokban expresszálandó fehérjékhez kapcsolva azok a flagellumspecifikus exportapparátus segítségével a baktériumokból kijuttathatók. Az eljárás nagy előnyének tűnik, hogy a sejt kultúra felülűszóból a szekretált rekombináns fehérjék - számottevő szennyező anyag nem lévén - egyszerűen összegyűjthetők és tisztíthatók.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteim során különböző mértékben csonkolt flagellin szegmenseket és azokkal alkotott fúziós fehérjék előállítását és expressziójának vizsgálatát végeztem. A fehérjék előállítása *Salmonella typhimurium* baktériumban történt. A leírt kísérletek során a molekuláris biokémiai technikák rohamos fejlődése miatt különböző kitéteket használtam. Mivel ezek nem kapcsolódnak szervesen a dolgozat érdemi részéhez, csak a kívánt fehérjemolekulák gyorsabb és kényelmesebb előállítását szolgálták erről részletesen nem írnok. Valamint nem térek ki a ma már rutinszerűnek számító és a szakemberek számára közismert technikák (például PCR, DNS tisztítás, izolálás, SDS-PAGE, stb.) részletes ismertetésére sem.

Vegyszerek, anyagok

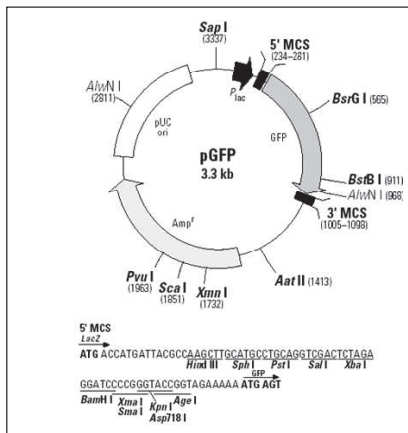
A kísérletek során felhasznált vegyszerek a Sigma, Merck, Reanal termékei voltak. Az oligonukleotid primereket az Invitrogen-től és a Szegedi Biológiai Központból rendeltük, a használt plazmidot a BD Bioscience Clontech cégtől szereztük be. A felhasznált restriktív endonukleáz, polimeráz, ligáz enzimek a Fermentas, BD Bioscience Clontech és a New England Biolabs cégek termékei voltak.

Baktériumtörzsek

Vizsgálataimban a DNS konstrukciók előállítása során *Escherichia coli* 71-18 baktériumtörzset, az expresszió során a *Salmonella typhimurium* flagellin és HAP2 deficiens (SJW2536) törzsét valamint a kereskedelmi forgalomban kapható *Escherichia coli* G1826 (genotípus F^- , *lacI^q* ampC:P_{trp} cI Δ fliC Δ motB *eda:Tn10*) törzsét használtam. Mindegyik törzs esetén a sejteket Luria-Bertani médiumban, 37°C-on növesztettem.

Vektor

Az általam vizsgált fehérjék termelése rekombináns technikával *Escherichia coli* illetve *Salmonella typhimurium* baktériumokban történt. A munka során felhasznált plazmid vektor a BD Bioscience Clontech által forgalmazott bakteriális expressziós rendszerekhez alkalmas pGFP vektor (5. ábra) volt, ami lac promótert és ampicillin rezisztencia gént tartalmaz.



5.ábra A pGFP vektor térképe

DNS konstrukciók készítése

A három N-terminálisan csonkolt flagellin FliC₆₆₋₄₉₄, FliC₃₀₋₄₉₄, és a FliC₁₄₋₄₉₄ Muta-Gene Phagemid (Bio-Rad) kittel készült és tartalmazzák a flagellin természetes promóterét, riboszómakötő helyét és pBR322 vektorba vannak illesztve.

A kiválasztott flagellin (FliC₁₋₁₉₂, FliC₁₄₋₁₉₂, FliC₁₋₁₂₀, FliC₁₋₆₅, FliC₁₄₋₉₉, FliC₁₄₋₆₅, FliC₂₆₋₄₇, FliC₂₆₋₃₆, és FliC₃₇₋₄₇) szegmenseknek megfelelő géndarabok klónozását polimeráz láncreakcióval végeztem, templátként a teljes hosszúságú flagellin DNS-t használva. A génbankban található FliC (ACCESSIOND:13689) szekvenciát (6. ábra) alapul véve megterveztem a PCR reakciókhoz szükséges primereket (2. táblázat). Az esetleges mutációk elkerülése végett hibajavító aktivitással rendelkező hőstabil DNS polimeráz enzimet (Advantage 2 DNA polimerase, BD Bioscience Clontech) használtam és a ciklusszámot a lehető legalacsonyabb értéken tartottam. A PCR termékeket gélből izoláltam, majd *HindIII* és *BamHI* enzimekkel emésztettem. A flagellin szakaszokat pGFP expressziós vektorba (BD Bioscience Clontech) ligáltam. Az általam használt vektor *lac* promóter kontrollja alatt működik. A kapott konstrukciók a flagellin szekvencia előtt

1	ATG gca caa gtc att aat aca aac agc ctg tgg ctg ttg acc cag	45
1	Met Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln	15
46	aat aac ctg aac aaa tcc cag tcc gct ctg ggc acc gct atc gag	90
16	Asn Asn Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu	30

91	cgt ctg tct tcc ggt ctg cgt atc aac agc gcg aaa gac gat gcg	135
31	Arg Leu Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala	45
136	gca ggt cag gcg att gct aac cgt ttt acc gcg aac atc aaa ggt	180
46	Ala Gly Gln Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly	60
181	ctg act cag gct tcc cgt aac gct aac gac ggt atc tcc att gcg	225
61	Leu Thr Gln Ala Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala	75
226	cag acc act gaa ggc gcg ctg aac gaa atc aac aac aac ctg cag	270
76	Gln Thr Thr Glu Gly Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln	90
271	cgt gtg cgt gaa ctg gcg gtt cag tct gct aac agc acc aac tcc	315
91	Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser	105
316	cag tct gac ctc gac tcc atc cag gct gaa atc acc cag gcg ctg	360
106	Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu	120
361	aac gaa atc gac cgt gta tcc ggc cag act cag ttc aac ggc gtg	405
121	Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val	135
406	aaa gtc ctg gcg cag gac aac acc ctg acc atc cag gtt ggt gcc	450
136	Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr Ile Gln Val Gly Ala	150
451	aac gac ggt gaa act atc gat atc gat ctg aag cag atc aac tct	495
151	Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys Gln Ile Asn Ser	165
496	cag acc ctg ggt ctg gat acg ctg aat gtg caa caa aaa tat aag	540
166	Gln Thr Leu Gly Leu Asp Thr Leu Asn Val Gln Gln Lys Tyr Lys	180
541	gtc agc gat acg gct gca act gtt aca gga tat gcc gat act acg	585
181	Val Ser Asp Thr Ala Ala Thr Val Thr Gly Tyr Ala Asp Thr Thr	195
586	att gct tta gac aat agt act ttt aaa gcc tcg gct act ggt ctt	630
196	Ile Ala Leu Asp Asn Ser Thr Phe Lys Ala Ser Ala Thr Gly Leu	210
631	ggt ggt act gac cag aaa att gat ggc gat tta aaa ttt gat gat	675
211	Gly Gly Thr Asp Gln Lys Ile Asp Gly Asp Leu Lys Phe Asp Asp	225
676	acg act gga aaa tat tac gcc aaa gtt acc gtt acg ggg gga act	720
226	Thr Thr Gly Lys Tyr Tyr Ala Lys Val Thr Val Thr Gly Gly Thr	240
721	ggt aaa gat ggc tat tat gaa gtt tcc gtt gat aag acg aac ggt	765
241	Gly Lys Asp Gly Tyr Tyr Glu Val Ser Val Asp Lys Thr Asn Gly	255
766	gag gtg act ctt gct ggc ggt gcg act tcc ccg ctt aca ggt gga	810
256	Glu Val Thr Leu Ala Gly Gly Ala Thr Ser Pro Leu Thr Gly Gly	270
811	cta cct gcg aca gca act gag gat gtg aaa aat gta caa gtt gca	855
271	Leu Pro Ala Thr Ala Thr Glu Asp Val Lys Asn Val Gln Val Ala	285
856	aat gct gat ttg aca gag gct aaa gcc gca ttg aca gca gca ggt	900
286	Asn Ala Asp Leu Thr Glu Ala Lys Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gly	300
901	gtt acc ggc aca gca tct gtt gtt aag atg tct tat act gat aat	945
301	Val Thr Gly Thr Ala Ser Val Val Lys Met Ser Tyr Thr Asp Asn	315
946	aac ggt aaa act att gat ggt ggt tta gca gtt aag gta ggc gat	990
316	Asn Gly Lys Thr Ile Asp Gly Gly Leu Ala Val Lys Val Gly Asp	330
991	gat tac tat tct gca act caa aat aaa gat ggt tcc ata agt att	1035
331	Asp Tyr Tyr Ser Ala Thr Gln Asn Lys Asp Gly Ser Ile Ser Ile	345
1036	aat act acg aaa tac act gca gat gac ggt aca tcc aaa act gca	1080
346	Asn Thr Thr Lys Tyr Thr Ala Asp Asp Gly Thr Ser Lys Thr Ala	360

1081	cta aac aaa ctg ggt ggc gca gac ggc aaa acc gaa gtt gtt tct	1125
361	Leu Asn Lys Leu Gly Gly Ala Asp Gly Lys Thr Glu Val Val Ser	375
1126	att ggt ggt aaa act tac gct gca agt aaa gcc gaa ggt cac aac	1170
376	Ile Gly Gly Lys Thr Tyr Ala Ala Ser Lys Ala Glu Gly His Asn	390
1171	ttt aaa gca cag cct gat ctg gcg gaa gcg gct gct aca acc acc	1215
391	Phe Lys Ala Gln Pro Asp Leu Ala Glu Ala Ala Ala Thr Thr Thr	405
1216	gaa aac ccg ctg cag aaa att gat gct gct ttg gca cag gtt gac	1260
406	Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp	420
1261	acg tta cgt tct gac ctg ggt gcg gta cag aac cgt ttc aac tcc	1305
421	Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser	435
1306	gct att acc aac ctg ggc aac acc gta aac aac ctg act tct gcc	1350
436	Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser Ala	450
1351	cgt agc cgt atc gaa gat tcc gac tac gcg acc gaa gtt tcc aac	1395
451	Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn	465
1396	atg tct cgc gcg cag att ctg cag cag gcc ggt acc tcc gtt ctg	1440
466	Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu	480
1441	gcg cag gcg aac cag gtt ccg caa aac gtc ctc tct tta ctg cgt	1485
481	Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg	495
1486	TAA tgc gtt aat ccg gcg att gat tca ccg aca cgt ggt aca caa	1530
496	End Cys Val Asn Pro Ala Ile Asp Ser Pro Thr Arg Gly Thr Gln	510

6. ábra *Salmonella typhimurium*ból származó flagellin szekvenciája

tartalmazzák a következő szekvenciárészletet: MTMITPSL, amely az expressziós vektor startkodonja és a *Hind*III klónozóhely között található. A *FliC*₁₋₁₉₂ és a *FliC*₁₄₋₁₉₂ esetén kétféle konstrukciót készítettem, míg az első esetben a flagellin 192 aminosavját stopkodon követi, addig a második esetben stopkodont már nem tartalmaz az elkészült konstrukció. Különböző méretű N-terminális flagellin szegmenseket emberi C1r fehérje CCP2 (complement control protein) doménjével fúzionáltattam. A humán C1r (ACCESSIOND:BC035220) cDNS-ből kiindulva PCR technikával állítottam elő a C1r CCP2 domént kódoló génszakaszt. A CCP2 forward primer BamHI restrikciós helyre készült, a reverz primer KpnI restrikciós helyre, mely elé stopkodon került. A PCR reakciót optimalizáltam és a megfelelő méretű PCR termékeket gélből való izolálás és restrikciós enzimekkel való emésztés után a *FliC* szakaszokat már tartalmazó plazmid vektorba ligáltam. Az összeillesztést úgy végeztem, hogy olyan fúziós fehérjeterméket kapjunk, ahol az N-terminálison a csonkított *FliC* a C-terminálison a C1r CCP2 domén található. A létrejött fúziós fehérjék egy 6 bázispárból álló szakaszt tartalmaznak a flagellin és a CCP2 domén között. A plazmidot *E. coli* 71-18 sejtekbe transzformáltam. A rekombináns klónokat restrikciós térképezéssel és szekvenálással ellenőriztük.

Forward primerek	FliC ₁ -	5' <i>GCGAAGCTTGACACAAGTCATTAATACAAACAGCCTG</i>
	FliC ₁₄ -	5' <i>GCGAAGCTTGACCCAGAATAACCTGAACAAATCCCAG</i>
	FliC ₂₆ -	5' <i>GCGAAGCTTGGGCACCGCTATCGAGCGTCTG</i>
	FliC ₃₆ -	5' <i>GCGAAGCTTGCGTATCAACAGCGCGAAA</i>
	EGFP	5' <i>GGGGATCCGATGATGATGATAAACCGATGGTGAGCAAGGG</i>
	C1rCCP1	5' <i>GGGGATCCGATGATGATGATAAACCGTGCCCCAGCCC</i>
	C1rCCP2	5' <i>CGGGATCCCCGTGTGGGCAGCCCCGAAC</i>
	XynAcat	5' <i>CGCGGATCCATACCTGCTCTGAAAGAAGTAC</i>
Reverse primerek	FliC ₋₁₉₂	5' <i>CGGGATCCGGCATAATCCTGTAACAGTTGCAGC</i>
	FliC ₋₁₂₀	5' <i>CGGGATCCCAGGCGCTGGGTGATTTC</i>
	FliC ₋₉₉	5' <i>CGGGATCCAGACTGAACCGCCAGTTC</i>
	FliC ₋₆₅	5' <i>CGGGATCCGGAAGCCTGAGTCAGACCTTTGAT</i>
	FliC ₋₄₇	5' <i>CGGGATCCACCTGCCGCATCGTCTTTTCGC</i>
	FliC ₋₄₄	5' <i>CGGGATCCATCGTCTTTTCGCGCTGTT</i>
	FliC ₋₃₆	5' <i>CGGGATCCCAGACCGGAAGACAGACG</i>
	EGFP	5' <i>CGGAATTCCTACTTGTACAGCTCGTCCAT</i>
	C1rCCP2	5' <i>GGGGTACCTTAGCACCGAGGAATCTTCTC</i>
	C1rSP	5' <i>GGGGTACCTCAGTCTCTCTCCTCCATCTC</i>
	XynAcat	5' <i>GGATCCCCGCTCAGGTGCCACTATCGC</i>

2. táblázat A munka során felhasznált primerek

Elektroporálás, expresszió

A jó klónokból 1 µg cirkuláris DNS-t elektroporációs technikával flagellintermelésre képtelen mutáns *Salmonella typhimurium* SJW2536 baktériumokba juttattam. A transzformált sejtek szelekcióját ampicillint tartalmazó Luria-Bertani táptalajon végeztem. Minden egyes fehérje konstrukcióból egy-egy kiválasztott kolóniát 37°C-on, ampicillint tartalmazó LB táptalajon, a logaritmusos fázis eléréseig növesztettem. Annak érdekében, hogy a sejtek épségét megőrizsem, a centrifugálás során alacsony fordulatszámot alkalmaztam és a felülúszót többször centrifugáltam. Ezt követően a felülúszót 5 kDa-nál vágó töményítő membrán használatával koncentráltam és SDS-PAGE-n ellenőriztem.

SDS-PAGE és Western-blott

A mintákat 12,5% illetve 15%-os gélen futtattam a (Laemmli, 1970) által kifejlesztett pufferrendszert használva. A géleket vagy Coomassie Brilliant Blue R250-el festettem vagy

0,45 μm -es pórusméretű nitrocellulóz membránra blottoltam át (Towbin, 1979). A membránokat 5%-os sovány tejport tartalmazó NaCl-os Tris pufferben inkubáltam egy éjszakán át az adott fehérjétől függően flagellin elleni, nyúlban termelt; C1r elleni, kecskében termelt vagy GFP elleni nyúlban termelt antitestekkel, majd anti-nyúl-IgG illetve anti-kecske-IgG és alkalikus foszfatáz konjugátumával egy órán át. Az előhívást 5-brom-4-klór-3-indolil-foszféttal (BCIP) és nitro-blue-tetrazolium-mal (NBT) végeztem.

Differenciális pásztázó mikrokolorimetria

Fehérjék térszerkezetének változásait termodinamikai paraméterek, entrópia (S), entalpia (H), hőkapacitás (C_p) változása kíséri. Ezek mérésére szolgál a differenciális pásztázó mikrokolorimetria (Differential Scanning Calorimetry, DSC), melynek segítségével tanulmányozható különböző fehérjék hőstabilitása, valamint a natív háromdimenziós térszerkezetükből való letekeredésük. Ezáltal a molekulán belüli (intramolekuláris) kölcsönhatások erősségére (van der Waals erők, H-hidak, stb.), a molekula kompaktságára, a kooperatív egységek (domének) számára következtethetünk.

A kalorimetriás mérések során a minta és a referenciaként használt puffer hőkapacitás-különbségét mérjük a hőmérséklet függvényében egy adott hőmérséklettartományban. A fehérjét vizes oldatukban vizsgáljuk, amelyben a molekulákat hidrátburok veszi körül, és így specifikus hőkapacitás-görbét kaphatunk ellentétben a száraz állapotúakkal.

Fehérjék esetében a külön-külön gyenge intramolekuláris kötőerők között együttműködés van, vagyis a sok kicsi együtt erősíti egymást (kooperatív kölcsönhatás). A fehérjék sokáig megőrzik intakt szerkezetüket emelkedő hőmérséklet mellett, azonban egy jól definiált hőmérsékletnél hirtelen elvesztik azt, azaz másodfajú fázisátalakuláson mennek át. A hőkapacitás görbéje Gauss-görbéhez hasonló, egy vagy több éles csúcsból áll. A hőkapacitás görbék maximumhelyei, az átalakulási hőmérséklet a molekulára jellemző.

A FliS kötődésének hatását a flagellin stabilitására differenciális pásztázó mikrokolorimetriával (Microcal VP-DSC) végeztem. A felfűtés sebessége $1^\circ\text{C}/\text{min}$ volt. A mérés előtt a minták 4°C -on a mérési pufferben (20mM Tris-HCl, pH:7,8) dializálódtak, és referenciaként a dialízis puffert használtam. A DSC mérések során kapott értékek az ezen a területen még gyakran használt cal-ban vannak megadva, $1 \text{ cal} = 4,18 \text{ J}$. A fehérjeoldatok koncentrációja a dialízist követően FliS (16,5kDa) 0,4 mg/ml, FliC (51,4kDa) 1,0 mg/ml volt.

Enzimaktivitás mérés

Rekombináns FliC₁₋₁₉₂-EGFP plazmidot tartalmazó *Salmonella typhimurium* (SJW2536) sejtek felülűsójának egy cseppjét UV fényel besugároztam. A kísérletet LEICA DM LS fluoreszcens mikroszkóppal végeztem.

A xilanáz A katalitikus doménje esetén enzimaktivitás mértem annak érdekében, hogy megbizonyosodjam, hogy az expresszált fehérje megfelelő konformációval rendelkezik-e. A mérés során a poliszacharidok lebontását katalizáló enzimreakció sebességét a képződő redukáló cukor mennyiségének mérésével állapítottam meg. A méréseket a dinitro-szalicilsav alkalmazásán alapuló módszerrel végeztem (Miller, 1959). 200µl Xilanáz A katalitikus doménjét tartalmazó SJW2536 sejtfeülűsőt vizsgáltam, hogy az milyen mennyiségű xilóz oldatnak megfelelő aktivitással bír.

IPMDH esetén az enzimaktivitás mérést 25°C-on hajtottam végre, a koncentrációk: NAD: 500 uM, IPM: 300 uM volt. A reakció folyamán az optikailag követhető jel a keletkező NADH 340 nm-n detektálható abszorpciója volt.

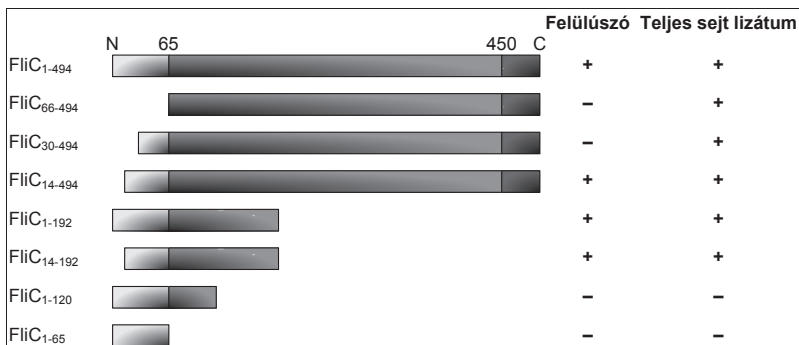
EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

Az exportszignál lokalizálása

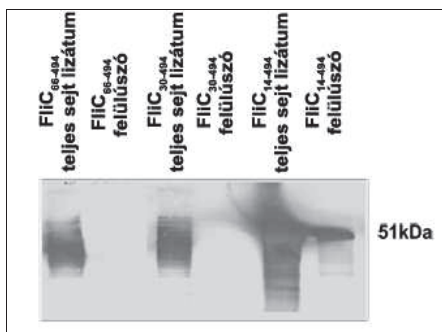
Flagellin fragmensek exportja

A bakteriális flagellumok túlnyomó része a sejtmembránon kívül helyezkedik el. Az alkotó fehérjealegységek nem a hagyományos bakteriális exportmechanizmusok révén kerülnek ki a sejtéből, hanem a flagellumok kb. 30Å átmérőjű belső csatornáján át a flagellumspecifikus exportapparátus segítségével, ami a flagelláris motor citoplazma felőli oldalán található. A flagellumok filamentáris részének kiépülése során a különböző szerkezeti egységek egymást követő lépésekben jönnek létre, lényegében abban a sorrendben, ahogy a sejtől kifelé haladva elhelyezkednek a végső szerkezetben. A filamentumok végét lezáró HAP2 sapka kulcsfontosságú szerepet játszik a helikális filamentumok felépülésében. A filamentumok centrális csatornáján keresztül exportálódó flagellin alegységek mindig a sapka alá épülnek be, annak hiányában a külső közegbe diffundálnak.

Munkám során megpróbáltam lokalizálni az exportszignált *Salmonella typhimurium* flagellin esetén, melynek érdekében nyolc FliC deléciós mutáns készítettem (7. ábra). A *S. typhimurium* flagellin 494 aminosavból áll, 51 kDa tömegű fehérje. A flagellin terminális régiói (N-terminális 66 aminosav, C-terminális 44 aminosav) oldatban monomer formában rendezetlen szerkezetet mutatnak. Az N-terminális deléciós mutánsok közül a FliC₆₆₋₄₉₄ a teljes N-terminális rendezetlen régiót, a FliC₃₁₋₄₉₄ az első harminc aminosavat nem tartalmazza, míg a FliC₁₄₋₄₉₄ esetén a mutáns flagellin a Thr14-es aminosavval kezdődik és mindegyik tartalmazza az ép C-terminális régiót. Mindhárom DNS konstrukció a flagellin természetes promóterének kontrollja alatt van. Ezeket a DNS konstrukciókat flagellin deficiens *Salmonella* SJW2536 sejtekbe transzformálva vizsgáltam a termelődött fehérje exportját. Az expresszió után immunobloton vizsgáltam, hogy a rekombináns fehérje a sejt felülűszóban vagy a sejt lizátumban jelenik-e meg. Mindhárom N-terminális deléciós mutáns detektálni tudtam *Salmonella* sejtekben (8. ábra). A sejt-felülűszóban a vad típusú FliC mellett csak a FliC₁₄₋₄₉₄ esetén kaptam a móltömegnek megfelelő helyen éles sávot, ami arra utal, hogy az exportszignál a Thr14 után kezdődik. 30 vagy több aminosav eltávolítása a fehérje N-terminálisáról a szekréciós képesség elvesztéséhez vezetett.



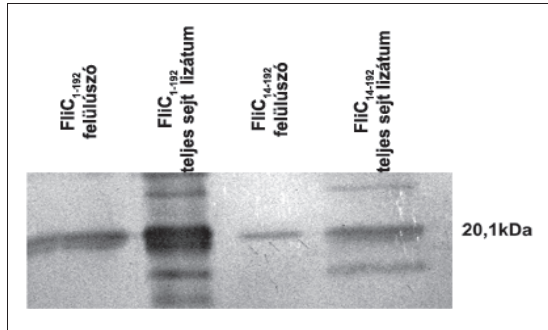
7. ábra *Salmonella typhimurium* (SJW2536) sejtekben expresszált csonkolt FliC fragmensek sematikus ábrázolása – eltérő színnel jelezve a rendezetlen régiókat (1-65 és 450-494) –, valamint a kapott polipeptidek megjelenése a felülűszóban és a sejt lizátumban.



8. ábra Az N-terminálisan csonkolt rekombináns flagellin fehérjék expressziója *Salmonella typhimurium* (SJW2536) sejtekben. Teljes sejt lizátum és a kultúra felülűszójának vizsgálata western blottal, poliklonális flagellin elleni antitesttel.

C-terminális deléciós mutánsokat is terveztem, mivel Kuwajima és munkatársai kimutatták, hogy a 497 aminosav hosszú, vad típusú *E. coli* flagellin N-terminális 183 aminosavát tartalmazó fehérje exportálódott a flagelláris exportapparátuson keresztül (Kuwajima, 1989). Fontos megjegyezni, hogy ezeknél, és a későbbi konstrukcióknál is már nem a flagellin saját promóterét, hanem az expressziós vektor által tartalmazott *lac* promóterét alkalmaztam. Az elkészült konstrukciók a következők voltak: FliC₁₋₁₉₂, ami a flagellin szerkezetében a D1 és D2 domének N-terminális szegmenseit tartalmazza, a FliC₁₋₁₂₀ ami a FliC N-terminális α -hélikális régióját tartalmazza, valamint a FliC₁₋₆₅, ami a FliC N-

terminális rendezetlen régiója. A megfelelő génkonstrukciókat pGFP plazmidba inszertáltam *lac* promóter kontrollja alatt, így ezeknél a konstrukcióknál nincs jelen a flagellin 5' nem átíródó régiója. *Salmonella* sejtekben történt expressziós kísérletek és az azt követő immunoblott során a FliC_{1-192} megjelenik a felülúszóban, de a FliC_{1-120} és a FliC_{1-65} esetében sem a sejt felülúszójában, sem a sejt lizátumában nem tudtam kimutatni a rekombináns fehérje jelenlétét (9. ábra).











9. ábra A C-terminálisan csonkolt rekombináns flagellin fehérjék expressziója *Salmonella typhimurium* (SJW2536) sejtekben. Teljes sejt lizátum és a kultúra felülúszójának vizsgálata western blottal, poliklonális flagellin elleni antitesttel.

Nagy C-terminális csonkolásnál, azt az eredményt kaptam, hogy az első 192 aminosavat tartalmazó fehérje (FliC_{1-192}) hatékonyan exportálódott. Nagyobb C-terminális csonkolás esetén, mint FliC_{1-120} és a FliC_{1-65} nem sikerült detektálni a rekombináns fehérjét sem a sejt kultúra felülúszójában, sem a feltárt sejtekben. A FliC_{1-65} csak a flagellin N-terminális rendezetlen régióját tartalmazza (Vonderviszt, 1989), míg a FliC_{1-120} magába foglalja az első α -hélixet is (Yonekura, 2003). A szintézist követően ezek a stabil szerkezettel nem rendelkező polipeptidláncok gyorsan degradálódhattak a citoplazmában és ez lehetett az oka annak, hogy nem sikerült egyik frakcióban sem detektálnom őket.

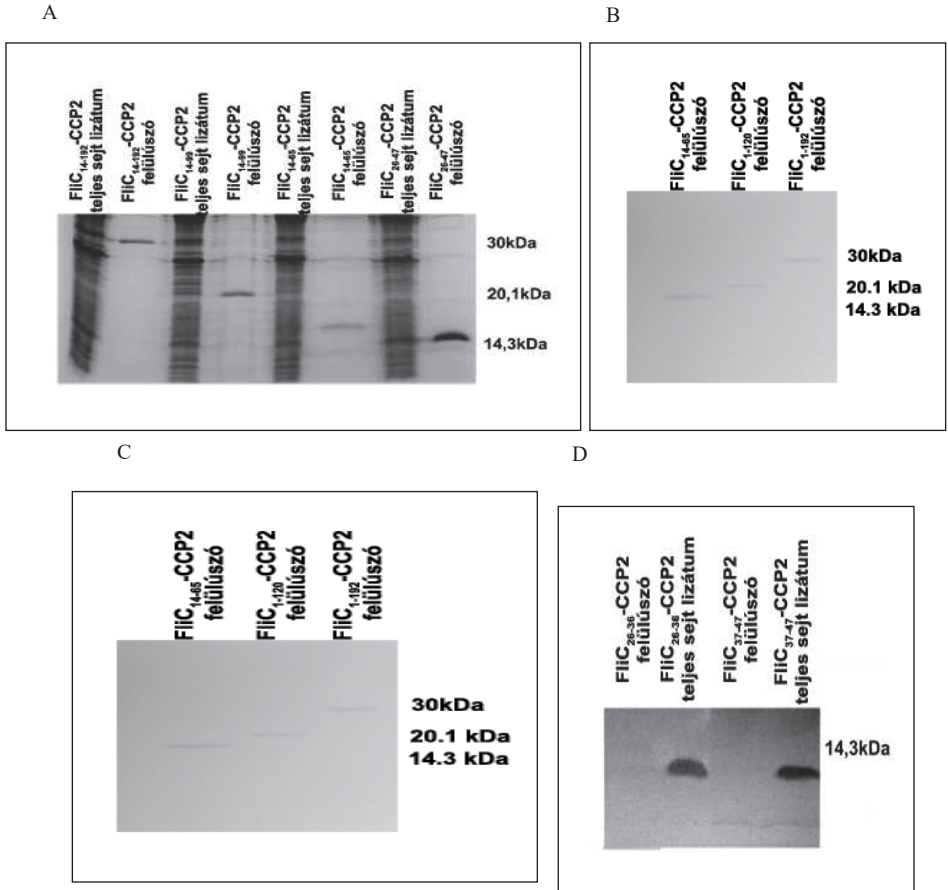
Összevetve az eddigi eredményeket készítettem egy olyan mutánst, ami mind az N-terminálisán mind a C-terminálisán csonkolt volt (FliC_{14-192}). Immunoblott analízissel kapott eredmények azt mutatják, hogy az exportszignál a fehérje Thr14 és Ala192 aminosavjai közötti régióban kell keresnünk.

Fúziós fehérjék exportja

Kis N-terminális fragmensek önmagukban nem stabilisak, ezért olyan konstrukciókat készítettem, amelyek N-terminálisán különböző méretű flagellin szegmens, C-terminálisán pedig egy kis méretű humán fehérje domén a C1rCCP2 (C1r komplement fehérje komplement kontrol protein 2 domén) található. Ezeknek a konstrukcióknak több szempontból is jelentőségük van. Egyrészt így kisebb FliC szakaszokat tartalmazó szegmensek detektálására is lehetőség nyílik, másrészt vizsgálható, hogy az exportrendszerünk alkalmas-e rekombináns fehérjék szekretálására. Azért ezt a fehérjedomént alkalmaztam, mert céloom egy olyan eukarióta fehérje választása volt, ami önmagában nagy valószínűséggel a baktériumban jelen levő egyik exportrendszert sem képes használni. Az exportszignál lokalizálása érdekében különböző konstrukciókat készítettem és vizsgáltam. A következő DNS konstrukciók készültek el: FliC₁₋₁₉₂-CCP2, FliC₁₄₋₁₉₂-CCP2, FliC₁₋₁₂₀-CCP2, FliC₁₄₋₉₉-CCP2 és FliC₁₄₋₆₅-CCP2 (10. ábra). Az utolsó konstrukció esetén a flagellinnek már csak az N-terminális rendezetlen régiója van jelen. A fúziós fehérjéket kódoló DNS szakaszokat pGFP expressziós vektorba inszertáltam, majd SJW2536 sejtekben expresszáltam, és vizsgáltam a fúziós fehérjék exportképességét. Az itt szereplő konstrukciók mindegyikéről elmondható, hogy SDS-PAGE-n és hC1r elleni antitesttel végzett immunobloton a sejt felülúszójában jelentek meg a móltömegük alapján várható helyen (11. ábra). A fúziós fehérjék szekréciónak hatékonysága összemérhető a vad típusú flagellinnel, Coomassie festett SDS gélen a sejt kultúra felülúszójában 10-15 mg/l koncentrációban jelent meg a termeltetett fehérje.

		Felülűszó	Teljes sejt lizátum
FliC ₁₋₁₉₂ -CCP2		+	-
FliC ₁₄₋₁₉₂ -CCP2		+	-
FliC ₁₋₁₂₀ -CCP2		+	-
FliC ₁₄₋₉₉ -CCP2		+	-
FliC ₁₄₋₆₅ -CCP2		+	-
FliC ₂₆₋₄₇ -CCP2		+	-
FliC ₂₆₋₃₆ -CCP2		-	+
FliC ₃₇₋₄₇ -CCP2		-	+

10. ábra *Salmonella typhimurium* (SJW2536) sejtekben expresszált C1r humán komplemen kontrol fehérje CCP2 doménjével fuzionáltatott FliC fragmensek sematikus ábrázolása és a kapott polipeptidek megjelenése a felülűszóban valamint a sejt lizátumban.



11. ábra Különböző N-terminális FliC fragmentek és az emberi C1r fehérje CCP2 doménjével alkotott fúziós fehérjék expresszió vizsgálata *lac* promóter kontrollja alatt *Salmonella typhimurium* (SJW2536) sejtekben. Teljes sejt lizátum és a kultúra felülűszoja Coomassie festett SDS gélen (A) és Western blotton (B, C, D). (A) Coomassie festett gél és (C) Western blott FliC₁₄₋₉₉-CCP2, FliC₁₄₋₉₉-CCP2, FliC₁₄₋₆₅-CCP2 és FliC₂₆₋₄₇-CCP2 fúziós konstrukciók esetén, (B) FliC₁₄₋₆₅-CCP2, FliC₁₋₁₂₀-CCP2 és FliC₁₋₁₉₂-CCP2 valamint (D) FliC₂₆₋₃₆-CCP2, FliC₃₇₋₄₇-CCP2 fúziós konstrukciók esetén.

Különböző fajokból származó flagellin szekvenciák analízise (12. ábra) során megállapítható, hogy az N-terminális rendezetlen régió esetén jelentős szekvencaazonosság található és ezen

belül is különösen a FliC₂₆₋₄₇ szegmens erősen konzerválódott, ami fontos funkcionális szerepére utal. Ezek alapján elkészítettem a FliC₂₆₋₄₇-CCP2 konstrukciót, és az expressziós kísérletek alapján ez is nagy hatékonysággal szekretálódott a médiumba. A továbbiakban megpróbáltam még tovább szűkíteni a szignált és elkészítettem a FliC₂₆₋₃₆-CCP2 és FliC₃₇₋₄₇-CCP2 konstrukciókat. Ezekben az esetekben már csak a sejt lizátumban jelent meg a rekombináns fehérje (11. ábra). Mindezek alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a flagelláris exportapparátus jelfelismerő szignálja flagellin esetén a Gly26 és a Gly47 között található.

Salmonella	MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTANIKG
Escherichia	AQVINTNSLSLITQNNINKNQSALSSSIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTSNIKG
Shigella	MAQVINTNSLSLITQNNINKNQSALSSSIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTSNIKG
Yersinia	MAVINTNSLSLLTQNNLNKSQSLSLGTAIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTSNIKG
Xanthomonas	MAQVINTNVMSLNAQRNLNTSSASMSTSIQRLSSGLRINSKDDAAGLAISERPTTQIRG
Pseudomonas	MALTVNTNLIASLNTQRNLNASSNDLNTSLQRLTTGYRINSKDDAAGLQISNRLSNQISG
Bordetella	MAAVINTNYLSLVAQNNLNKSQSALGSAIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTANVKG
B. cereus	MRINTNINSMRTQEYMRQNQAKMSTAMDRLSSGKRINNASDDAAGLAIAITMRARESG
B. halodurans	MKINNNIQALNAYRNLYQNQFQTSKNLEKLSGLRINRAADDAAGLAISEKMRSQIRG
Shewanella	MAITVNTNVTSLKAQKNLNTSASDLATSMERLSSGLRINSKDDAAGLAISNRLSNQVRG

12. ábra Különböző fajokból származó flagellin szekvenciák N-terminális része.

Mindazonáltal ez a szegmens nem mutat szekvenciális homológiát a többi, a flagelláris exportrendszer felépítő axiális fehérjével. A FliC₂₆₋₄₇ szegmens tartalmazza a SGL szekvencia motívumot (Homma, 1990), amely jelen van más flagelláris fehérjékben, de nem mondható el az axiális fehérjék mindegyikéről. Ezek a megfigyelések alátámasztják, hogy az exportrendszer által felismert jel nem szekvenciális, hanem magasabb szerkezeti szinten keresendő.

Mi lehet ez a magasabb szerkezeti szint? Hasonlóan a *Caulobacter crescentus* flagelláris kampó fehérjénél is az N-terminális rendezetlen régió része egy része a 38-58 elegendő ahhoz, hogy a molekula hatékonyan szekretálódjon a sejt felszínére (Kornacker, 1994). Úgy tűnik, hogy a terminális régiók rendezetlensége az axiális fehérjék egyedüli közös szerkezeti tulajdonsága (Vonderviszt, 1992, 1998). A feltételezést, a rendezetlen szegmensek alapvető szerepét illetően tovább erősíti az a megfigyelés, hogy a flagelláris rendszer felépülésének irányításában részt vevő FlgM fehérje (anti-sigma faktor), amely szintén a flagelláris exportmechanizmus révén távozik a sejtől és ugyancsak kiterjedt rendezetlen terminális régióval rendelkezik. A rendezetlen szegmensek elsősorban a FlgM molekula N-

terminális régiójában található, amelyről feltételezik, hogy az exportszignált is tartalmazza (Chilcott, 1998). Az összes axiális fehérje rendezetlen terminális régiói a predikációs algoritmusok szerint erős amfipatikus α -hélix-képző potenciált mutatnak (Chilcott, 1998, Homma, 1990). Mindez utalhat a flagellumspecifikus exportapparátus felismerési mechanizmusára is. Elképzeléseink szerint a másodlagos szerkezetjólás alapján nagy α -hélix-képző potenciállal rendelkező terminális régiók az azonosítás során egy a rendezetlen szegmensek helikális régióit stabilizáló templáthoz kötődnek, amely ugyanakkor – pl. egy keskeny vájat alján való – elhelyezkedésénél fogva nem képes kompakt, globuláris struktúrák részét képező helikális szerkezetekkel való kölcsönhatásra.

Hasonló felismerési mechanizmus más exportrendszerek esetén is megfigyelhető: pl. a mitokondriális mátrixba exportálódó fehérjék úgynevezett mátrixtargeting szignált hordoznak, amelyek alapján a fehérje-transzlokációs gépezet felismeri őket. Ez a mátrix-targeting szignált olyan 15-35 aminosavnyi szegmenst tartalmaz, amely képes megfelelő templáton (amfipatikus) helikális konformációt felvenni (Herrmann., 2000).

A FliC 22-42 szegmense, amely magába foglalja az azonosított export szignált jelentős részét, a szerkezetjóló módszerekkel α -helikális másodlagos szerkezetet mutat (Vonderviszt, 1990). Bár nagy felbontású szerkezetmeghatározó eljárással a flagelláris filamentum esetén nem volt feltételezhető helikális struktúra az exportszignálnak tulajdonítható szakaszánál, hanem egy szabálytalan küllő régió jelent meg, amely csatlakozás a filamentum külső és belső 'csöve' között (Yonekura, 2003).

A flagelláris export rendszer hasonlóságot mutat a III-as típusú exportrendszerekkel (Macnab, 2004, Blocker, 2003). A TTSS-ek exportszubsztrátjai nem tartalmaznak lehasítható szignált szekvenciát, valamint az exportért felelős közös szekvenciamotívumot sem találhatunk. Bizonyos esetekben tartalmaznak 15-30 aminosav nagyságú szegmenseket a fehérje N-terminális régiójában, amelyek az exportért felelősek (Lloy, 2001, Karavolos, 2005, Sory, 1995, Lee, 2004). Amíg a TTSS esetén ezek a szegmensek a fehérje N-terminálisán helyezkednek el, addig a flagelláris export szubsztrátoknál előfordul, hogy a felismerő jel az N-terminálistól 30-40 aminosavnyi távolságban található.

Felmerült az az elgondolás, hogy a TTSS exportszubsztrátjainak felismerő szignálja talán mRNS szinten keresendő (Anderson, 1997, 1999), bár vannak munkacsoportok, aki nem értenek ezzel egyet (Lloyd, 2001, Karavolos, 2005, Lee, 2004). Majander és munkatársai (Majander, 2005) *Escherichia coli* esetében megmutatták, hogy olyan N-terminális FliC polipeptidek, melyeknek hiányzik a C-terminálisa hatékonyan expresszálnak abban az esetben, amikor a megfelelő *fliC* promóter van jelen, ellenben akkor, amikor nem a flagellin

természetes promóterét használták, már az első 183 aminosavat tartalmazó fehérje sem exportálódott. Készítettek egy olyan konstrukciót, ami a FliC 5' nem transzlálódó régióját és egy idegen fehérjét tartalmazott és ezt is sikerült a felülúszóban detektálniuk. Ezek alapján azt a következtetést vonták le, hogy a szignál nem fehérje, hanem mRNS szinten található. Kísérleteim alapján az mRNS szignál nem játszik kizárólagosan fontos szerepet a szekréció szempontjából. Az általam vizsgált konstrukciók között találunk olyanokat, amelyek nem flagelláris eredetű *lac* promótert tartalmaznak és hatékonyan expresszálódnak önmagukban vagy fúziós fehérjeként, illetve van olyan konstrukció, amely tartalmazza a flagellin természetes promóterét ellenben N-terminálisan csonkolt (FliC₆₆₋₄₉₄, FliC₃₁₋₄₉₄) és csak a sejten belül mutatható ki. Bár eltérő organizmusból származó flagellin fehérjéket vizsgáltunk a nagyfokú szekvenaciaazonosság nem indokol ilyenfajta eltérést.

Nemspecifikus szekréció ellenőrzése

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjam arról, hogy a vizsgált fehérjék valójában a flagellumspecifikus exportrendszeren keresztül szekretálódnak a médiumba, nem pedig a sejt lízise vagy bármilyen egyéb sérülése során szabadulnak fel; kiválasztottam egy, a periplazmában jelen lévő fehérjét és arra immunoblottot végeztem. A maltóz kötő fehérje normálisan csak a periplazmában van jelen, és a maltóz kötő fehérje elleni monoklonális antitesttel (Sigma) végzett Western blott analízis szerint a felülúszóban nem, csak a sejt lizátumban jelent meg a várt helyen éles sáv (13. ábra).

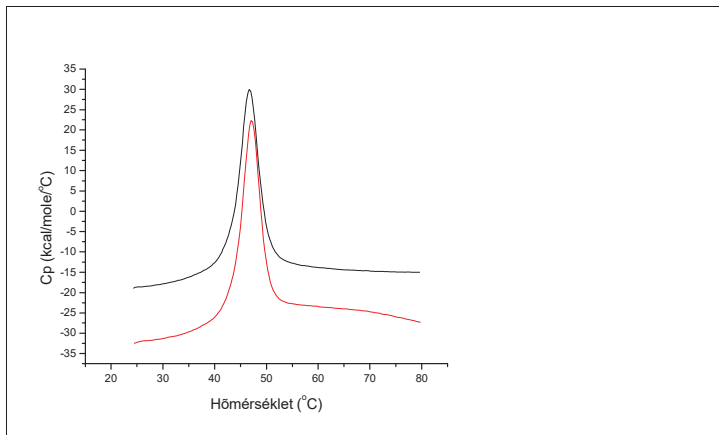


13. ábra Nemspecifikus szekréció ellenőrzése a periplazmában jelen lévő maltóz kötő fehérjével

A FliS és FliC kapcsolata

A bakteriális flagellum axiális komponensei a citoplazmában szintetizálódnak, és a flagellumspecifikus export rendszerrel jutnak át a sejtmembránon. A flagelláris chaperonokról tudott, hogy segítik az export folyamatát. A FliS, flagellin specifikus chaperon, a flagellin C-termilás rendezetlen régiójához kötődik. A flagelláris exportrendszer export csatornája túl szűk (20-30Å) ahhoz, hogy a transzportálandó, jól feltekeredett fehérjék átférhessenek rajta. Nyitott kérdés, hogy a flagelláris chaperonok hogyan képesek a célfehérjéket részlegesen letekeredett állapotban, export kompetens konformációban tartani.

Differenciális pásztázó mikrokalorimetriával végzett kísérletben vizsgáltam, hogy a FliS kötődésekor a flagellin szerkezete stabilizálódik-e. Felfűtésekot végeztem a 20-70°C hőmérséklet tartományban FliC-t, FliS-t önmagában illetve komplex formában vizsgálva.



14. ábra A FliS kötődésének hatása a flagellin stabilitására. A felfűtés sebessége 1°C/min volt. A fehérjeoldatok koncentrációja 20mM Tris-HCl, pH:7,8 pufferben FliS (16,5kDa) 0,4mg/ml, FliC (51,4kDa) 1,0 mg/ml. Fekete görbe FliC, $T_m=46,7^\circ\text{C}$ a piros görbe a FliC/FliS komplex, $T_m=47,1^\circ\text{C}$

A flagellin olvadási hőmérséklete $T_m=46,7^\circ\text{C}$, ami egybeesik a korábban mértekkel (Vonderviszt, 1989). A FliC-hez nagyon hasonló hődenaturációs görbét kaptam a FliS-t és FliC-t együtt tartalmazó minta esetén is. (14. ábra). Egymást követő felfűtések során mindkét esetben nagyfokú reverzibilitás tapasztalható. A FliS esetén ebben a hőmérséklet intervallumban nem tapasztalható hőkapacitás-változás. A csúc alatti területekből kiszámítható szabadentalpia változás FliC 248 kcal/mol és FliS/FliC 232 kcal/mol. A hasonló

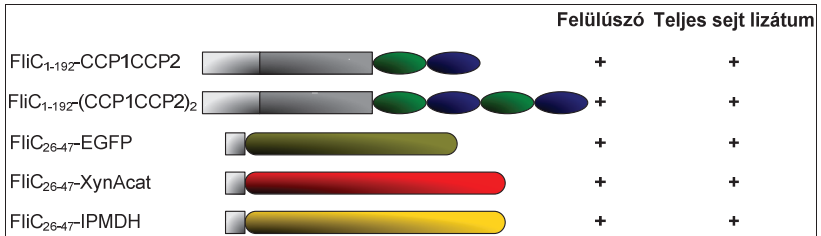
entalpiaváltozások és a szinte azonos átmeneti hőmérsékletek arra engednek következtetni, hogy a FliS kötődése a flagellinhez nem mutat szignifikáns változást a flagellin szerkezeti stabilitásában. DSC mérésekkel demonstráltam, hogy a FliS kötődése nem befolyásolja a flagellin kompakt középső részének szerkezeti stabilitását, s így a chaperon kötődése nem segíti elő a FliC letekeredését.

A flagelláris exportrendszer működését tanulmányozva Ozin és munkatársai megállapították, hogy a flagellin-specifikus FliS chaperon a flagellin rendezetlen C-terminális régiójához kötődik azt helikális konformációban stabilizálva (Ozin, 2003). Bár valószínűleg a flagellin alegységek átkelése a flagelláris filamentumok centrális csatornáján keresztül letekeredett állapotban történik ez nem a FliS funkciójának tekinthető.

Rekombináns fehérjék exportja

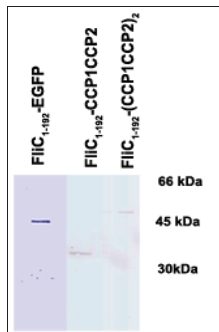
A bakteriális fehérjeexpresszió az alapkutatásban, biotechnológiában, gyógyszergyártásban (hatóanyag-termelésben) széleskörben alkalmazott eljárás, azonban az expresszált fehérjék tisztítása, natív formában való kinyerése sokszor nehéz és körülményes. Lényeges előrelépést jelentene, ha a flagellumspecifikus exportapparátus segítségével sikerülne megoldani az expresszált fehérjék kijuttatását a baktériumokból, hiszen így szükségtelemmé válna a sejtek feltárása, továbbá megszabadulnánk a nagy mennyiségben termeltetett fehérjék sejten belüli aggregációjának problémájától is. Az eljárás további előnye lehet, hogy a szekréciót irányító rendezetlen szegmensek enyhe proteolitikus kezeléssel valószínűleg egyszerűen eltávolíthatók. Kísérleteimmel demonstráltam, hogy az exportszignálhoz fuzionáltathatunk különböző méretű és tulajdonságú rekombináns fehérjéket és ezek szekretálódtak a médiumba.

Meglehetősen kevés információval rendelkezünk a kijuttatható fehérjék felületi és szerkezeti tulajdonságaival kapcsolatban. Nem tudható, hogy a fehérjék tulajdonságait illetően (pl. diszulfidhidak jelenléte, felületi töltöttség mértéke) milyen speciális követelményeket támaszt a flagelláris exportrendszer az exportálandó fehérjékkel kapcsolatban. Ezek eldöntésére különböző szerkezeti felépítésű és különböző számban ciszteint tartalmazó fehérjék (C1r CCP1CCP2, C1r(CCP1CCP2)₂, green fluorescent protein, xilanáz A katalitikus doménje, IPMDH (15. ábra)) exportképességét vizsgáltam.



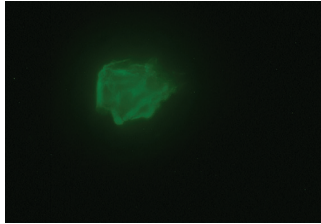
15. ábra Különböző szerkezeti felépítésű és különböző számban ciszteint tartalmazó fehérjékkel alkotott fúziós konstrukciók sematikus ábrája.

Az elkészült fúziós konstrukciók vizsgálatából kiderült, hogy a 4 ciszteint, (2 diszulfid hidat) tartalmazó 74 aminosavból álló humán C1rCCP2 exportálható, a továbbiakban kettő illetve négy CCP domént CCP1CCP2 (~17kDa) és (CCP1CCP2)₂ (~34kDa) fuzionáltattam a FliC₁₋₁₉₂ szegmenshez. Mindkét konstrukció esetén a külső médiumba szekretálódtak a fehérjék (16. ábra).



16. ábra FliC₁₋₁₉₂-fúziós konstrukciók felülűszőjének Western blott analízise GFP és humán C1r elleni antitesttel. A rekombináns fehérjék expressziója *Salmonella typhimurium* (SJW2536) sejtekben történt.

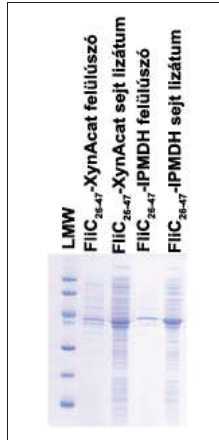
A szekretált rekombináns fehérje feltekeredésének teszteléséhez az *Aequorea victoria* baktériumból származó EGFP (green fluorescent protein) fehérjét szintén a FliC₁₋₁₉₂ szegmenshez fuzionáltattam. Az expressziós kísérletek során a FliC₁₋₁₉₂-EGFP rekombináns fehérje a sejt-felülűszőben exportálódott és GFP elleni antitesttel sikerült azonosítani (16. ábra). A felülűszőben szekretálódott EGFP aktív, ami a helyes feltekeredtséget feltételezi (17. ábra).



17. ábra Rekombináns FliC₁₋₁₉₂-EGFP plazmidot tartalmazó *Salmonella typhimurium* (SJW2536) sejtek felülúszójának egy cseppje UV fényel besugározva világít.

A humán C1r egy nagyobb, összetettebb a katalitikus domént is tartalmazó fragmensét (C1rCCP2SP) kapcsolva a flagellin első 192 aminosava után az exportrendszer már nem működött. A FliC₁₋₁₉₂-C1rCCP2SP (37,5kDa) esetén a rekombináns fehérje csak a sejten belüli térben volt kimutatható.

A *Thermotoga maritima* termofil eubaktériumból származó 1 doménes szerkezetű XynAcat, valamint a *Thermus thermophilus* eubaktériumból származó homodimeként aktív IPMDH fehérjéknek a korábbi vizsgálataim során azonosított exportszignálhoz (FliC₂₆₋₄₇) való fúziós konstrukcióját készítettem el. Vizsgáltam, hogy az expresszált fehérjék a sejten belül maradnak-e, vagy a tápoldatba jutnak. Mindhárom fúziós fehérje (FliC₂₆₋₄₇-XynAcat, FliC₂₆₋₄₇-IPMDH) esetén az expressziót követően a szekretálandó fehérje a sejt felülúszójában megjelent (18. ábra). Az expresszált fehérje a FliC₂₆₋₄₇-XynAcat és a FliC₂₆₋₄₇-IPMDH esetén enzimátikus aktivitást mutatott, ami arra utal, hogy natív konformációval rendelkezik.



18. ábra Flagellin deficiens *Salmonella typhimurium* (SJW2536) sejtekben szekrétált polipeptidek Coomassie festett 12,5%-os SDS gél analízise.

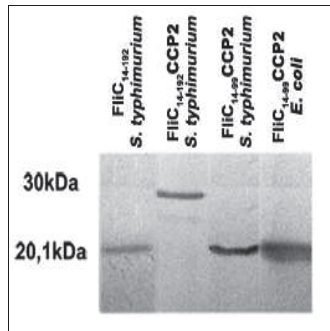
200µl Xilanáz A katalitikus doménjét tartalmazó SJW2536 sejtfeüliszó 12,3µl 1g/50ml Xilóz oldatnak megfelelő aktivitással bír.

Az exportszignált is tartalmazó flagellin szegmensekhez fuzionáltott fehérjék sikeresen exportálódtak a flagellumspecifikus export útvonalon keresztül. A CCP2 doménnel kapott eredmények azt mutatták, hogy a flagellumspecifikus exportszignál használható idegen rekombináns fehérjék baktériumban való termeltetésére és szekrécijára. Bár a flagellumok centrális csatornája meglehetősen szűk, a flagellumspecifikus exportapparátus révén nemesak kis méretű fehérjék kijuttatására van remény. Az expressziós rendszer alkalmazhatóságának jellemzése érdekében vizsgáltuk, hogy mekkora fehérjék kijuttatására képes, s az exportrendszer milyen speciális követelményeket támaszt az exportálandó fehérjék tulajdonságaival szemben.

A flagelláris exportrendszeren alapuló expressziós rendszer működőképességének vizsgálata *E. coli*-ban

Egy széleskörűen és biztonságosan alkalmazható expressziós rendszer kialakítása céljából a *Salmonella* gazdasejtről célszerű lenne áttérni *E. coli* alkalmazásra. Az első lépés találni egy olyan alkalmas *E. coli* gazdatörzset, ami flagellin és HAP2 deficiens, de flagelláris exportapparátusa megfelelően működik. Erre a célra a kereskedelmi forgalomban kapható *E.*

coli GI826 törzset választottam. A *Salmonella* és *E. coli* flagellinek N-terminális régióiban 70% feletti szekvenciális homológia figyelhető meg. Vizsgáltam, hogy a rendelkezésemre álló konstrukciók, hogy 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 (19. ábra). A sejtlízis vizsgálatot ebben az esetben is elvégeztem, és a kontrol fehérje csak a sejt lizátumban volt jelen.



19. ábra Flagellin deficiens *Salmonella typhimurium* (SJW2536) és *Escherichia coli* (GI826) sejtekben szekretált polipeptidek Western bolti analízise. Mindegyik rekombináns konstrukció heterológ *lac* promotert tartalmaz és nincs jelen a flagellin 5' nem transzlálódó régiója. A FliC₁₄₋₁₉₂ fragmens flagellin elleni antitesttel, míg az emberi C1r CCP2 doménjét tartalmazó konstrukciók C1r elleni antitesttel lettek azonosítva.

Ebből arra következtethetem, hogy a vizsgált fehérjék a flagellumspecifikus exportapparátust használták a szekretálódás során. Eredményeimből azonban egyértelműen arra lehet következtetni, hogy a kifejlesztett expressziós rendszer *E. Coli* gazdatörzsben is használható, aminek biotechnológiai szempontból nagy jelentősége lehet. Az általam tesztelt *E. Coli* GI826 törzs csak az előkísérletekhez szolgált, nem feltétlenül ez a legalkalmasabb a további munkákhoz. Ennek kiderítésére a jövőben még további kísérletek szükségesek.

Miért fontos a flagellinspecifikus exportapparátus működési mechanizmusának tanulmányozása? Nyilván gyógyászati szempontból is igen lényeges, hogy minél többet megtudjunk a betegségeinket okozó baktériumok tulajdonságairól. Esetünkben elég talán csak arra gondolnunk, hogy a flagellumspecifikus exportrendszer feltűnő hasonlóságot mutat bizonyos baktériumok virulens fehérjéinek célbajuttatását végző szekrécións rendszerekhez, amely ezen rendszerek közös eredetére, közös működési mechanizmusára utal.

- Az exportrendszer működésének megértéséhez tett kísérleteink során *Salmonella typhimurium* flagellin esetében igazoltuk, hogy a molekula rendezetlen N-terminális régiója hordozza a flagellumspecifikus exportapparátus azonosító jelét. Ezen belül megmutattuk, hogy a *Salmonella* flagellin N-terminális régiójának erősen konzerválódott Gly26-Gly47 szegmense elégséges az export számára.
- Eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy az exportszignál fehérjeszinten és nem mRNS szinten található.
- A flagelláris exportrendszer működését tanulmányozva megállapítottuk, hogy a flagellinspecifikus 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.
- Valamint igazoltuk, hogy az exportszignált hordozó rendezetlen szegmenst génebeszeti módszerekkel a baktériumokban expresszált rekombináns fehérjékhez kapcsolva azok a flagellum-specifikus exportrendszer segítségével a sejtből kijuttathatók, így az alapkutatásban elért eredményeink biotechnológiai szempontból is alkalmazhatók.

ÖSSZEFOGLALÓ

A baktériumok mozgásszervei a flagellumok. A helikális filamentumok a baktérium úszása során egyetlen nagy helikális köteggé állnak össze, amely tengelye körül forogva mintegy propellerként hajtja előre a baktériumot. A bakteriális flagellumok túlnyomó része a sejtmembránon kívül helyezkedik el. Az alkotó fehérjealegységek nem a hagyományos bakteriális exportmechanizmusok révén kerülnek ki a sejtől, hanem a flagellumspecifikus exportapparátus segítségével, amely a flagelláris motor citoplazma felőli oldalán helyezkedik el. A flagellumspecifikus export rendszer a szignál peptid független III-as típusú exportrendszerek közé sorolható. Korábbi kísérletek azt mutatták, hogy flagelláris axiális fehérjék N-terminális régiója szolgálhat felismerési jelként az exportrendszer számára, bár szekvenciális szinten semmiféle hasonlóság nem fedezhető fel. A flagelláris chaperonok segítik az export folyamatát. Flagellin specifikus export chaperon a FliS, mely a citoszolban a flagellin alegységek korai polimerizációját előzi meg.

Munkám célja volt, hogy *Salmonella typhimurium* flagellin esetén lokalizáljam az exportszignált valamint megvizsgálni, hogy valóban az axiális fehérjék rendezetlen N-terminális régiója játszik szerepet a flagellumspecifikus exportrendszer számára. További cél, hogy az alapkutatásban elért eredmények hogyan kamatoztathatók a biotechnológia számára. A lokalizált szignált különböző fehérjékhez fuzionáltatva az így keletkezett rekombináns fehérjék képesek-e a baktériumból kijutni a flagellumspecifikus exportapparátus segítségével.

Nyitott kérdés, hogy hogyan képesek a flagelláris chaperonok részlegesen letekerített állapotban tartani a flagelláris exportkomponenseket. DSC mérésekkel igazoltuk, hogy a FliS nem gátolja a flagellin központi részének feltekeredtségét, és nincs hatással a jól feltekeredett flagellin domének szerkezeti stabilitására.

Salmonella typhimurium flagellin esetén azonosítottuk az exporthoz szükséges szignált, ennek érdekében különböző flagellin deléciós mutánsok készültek. Kis méretű flagellin szegmenseket az emberi C1r komplement fehérje CCP2 doménjével fuzionáltattuk és így vizsgáltuk a rekombináns konstrukciók exportképességét. Sikeresen lokalizáltuk az exportszignált flagelláris exportapparátus esetén. A szekrécióhoz szükséges és elégséges a *Salmonella typhimurium* flagellin 26-47 közötti peptidszakasz, amit a flagellin N-terminális régiója tartalmaz. Megmutattuk, hogy akár eubaktériumból származó, akár emberi diszulfid hidakat tartalmazó fehérjéket kapcsolunk az N-terminális flagellin szegmens után a képződő fehérje hatékonyan szekretálódik a flagelláris exportútvonalon keresztül. Kísérletekkel alátámasztottuk, hogy a flagellinspecifikus export rendszer nagy mennyiségű (10-15mg/l

rázott kultúra) rekombináns fehérje szekréciójára alkalmas. Bebizonyítottuk, hogy a szalmonella esetén talált szignál alkalmazható *E. coli* esetén is.

SUMMARY

Bacteria swim by rotating their flagellar filaments, each of which has a helical shape and works as a propeller. External flagellar proteins, lying beyond the cytoplasmic membrane, are synthesized in the cell and exported by the flagellum-specific export apparatus to the site of assembly through the central channel of the filament. The flagellum-specific export system is a specialized, signal-peptide independent type III export machinery. Earlier studies suggested that the N-terminal region of flagellar proteins is essential for recognition for export, however, comparison of their amino acid sequences failed to identify a common recognition signal at the primary structure level. Flagellar chaperones are known to help the export process. FliS is a flagellar chaperone specific for flagellin which is the main component of flagellar filament. Premature polymerization of flagellin subunits is prevented by the FliS chaperones in the cytosol.

It is an open question whether flagellar chaperones can keep their target proteins in a partially unfolded export competent conformation. DSC experiments demonstrate that FliS binding does not interfere with the unfolding of the compact central part of flagellin, it has no effect on the structural stability of the well-folded flagellin domains.

The objective of this work was to localize the export signal in *Salmonella typhimurium* flagellin and to reveal the role of the disordered N-terminal region of the molecule in controlling recognition and translocation by the flagellum-specific export machinery. The export of various flagellin fragments and fusion constructs were studied and characterized. We also attempted to explore how the recognition signal could be used to direct secretion of overexpressed recombinant proteins from bacteria through the flagellum-specific export pathway.

To identify sequences essential for secretion of the *S. typhimurium* flagellin protein (FliC) across the cell envelope, we constructed various deletion mutants of flagellin. The role of the deleted segments in secretion was analyzed by testing for extracellular accumulation of the truncated flagellin by a Western blot assay of the culture medium. Also, small N-terminal fragments of flagellin were attached to the CCP2 domain of human complement protein C1r and the secretion ability of the fusion constructs was investigated. Our experiments also demonstrated that proteins with eubacterial or human origin, containing disulfide bonds (the

CCP2 module contains four cysteins), can be efficiently secreted through the flagellar export pathway.

We have localized the secretion signal required for export of flagellin by the flagellar export apparatus. Residues 26-47 of *Salmonella* flagellin were found to be sufficient and essential for secretion. This region lies within the disordered N-terminal part of flagellin. Amino acid sequence alignment of flagellins from various sources revealed that the region containing the export signal is highly conserved. Our experiments demonstrate that the flagellum-specific export system can be utilized to secrete large amounts (10-15mg/l shaker culture) of overexpressed recombinant proteins into the culture media by generating fusions to the secretion signal. The flagellar export system was successfully used to export recombinant proteins with different origin (e.g. eubacterial, human) in biological active form into the cell culture medium. The secretion signal identified in *S. typhimurium* was suitable for driving the secretion of recombinant proteins from the related Gram-negative *E. coli* bacteria.

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 FlHs 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**, Balczer 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.

IRODALOMJEGYZÉK

Aizawa SI, Vonderviszt F, Ishima R and Akasaka K (1990) Termini of *Salmonella flagellin* are disordered and become organized upon polymerization into flagellar filament. *J. Mol. Biol.* **211**, 673-677.

Anderson DM and Schneewind O (1999) *Yersinia enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation and secretion of YopQ. *Mol. Microbiol.* **31**, 1139-1148.

Anderson DM and Schneewind O (1997) A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* **278**, 1140-1143.

Asaka J, Fujiwara K, Kondo E and Kuwajima G (1997) Us of amino acid fragment of N end side of flagellin having excretion function. JP9168391A2 sz. Japán közzétett szabadalmi bejelentés

Auvray F, Thomas J, Fraser GM and Hughes C (2001) Flagellin polymerisation control by a cytosolic export chaperone. *J Mol Biol.* **308(2)**, 221-9.

Baneyx F (1999) Recombinant protein expression in *E. coli*. *Curr. Op. Biotechnol* **10**, 411-421.

Chilcott GS and Hughes KT (1998) The type III secretion determinants of the flagellar anti-transcription factor, FlgM, extend from the amino-terminus into the anti-sigma28 domain. *Mol. Microbiol.* **30**, 1029-1040.

Choi JH and Lee SY (2004) Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 625-635.

Christie PJ and Cascales E, (2005) Structural and dynamic properties of bacterial Type IV secretion systems. *Molecular Membrane Biology* **22(1-2)** 51-61.

Cianciotto NP (2005) Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends in Microbiology* **13**, 581-588.

Cornelis GR (2002) The Yersinia Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 742-752.

Cornelis P (2000) Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Curr. Op. Biotechnol* **11**, 450-454.

Daughdrill GW, Chadsey MS, Karlinsey JE, Hughes KT and Dahlquist FW (1997) The C-terminal half of the anti-sigma factor, FlgM, becomes structured when bound to its target, δ 28. *Nature Struct.Biol.* **4**, 285-291.

Delepelaire P (2004) Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* **1649**, 149-161.

Desvaux M, Parham NJ, Scott-Tucker A and Henderson I R (2004) The general secretory pathway: a general misnomer? *Trends in Microbiology* **12**, 306-309.

Evdokimov AG, Phan J, Tropea JE, Routzahn KM, Peters III HK, Pokross M and Waugh DS (2003) Similar modes of polypeptide recognition by export chaperones in flagellar biosynthesis and type III secretion. *Nat Struct Biol.* **10(10)**,789-93.

Galán JE and Collmer A (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**, 1322-1328.

Georgiou G and Segatori L (2005) Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Curr. Op. Biotech.* **16**, 538-545.

Groisman EA and Ochman H (1993) Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*. *EMBO J.* **12**, 3779-3787.

Herrmann JM and Neupert W (2000) Protein transport into mitochondria. *Curr. Op. Microbiol.* **3**, 210-214.

Homma M, DeRosier DJ and Macnab RM (1990) Flagellar hook and hook-associated proteins of *Salmonella typhimurium* and their relationship to other axial components of the flagellum. *J.Mol.Biol.* **213**, 819-832.

Hueck CJ (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**, 379-433.

- Iino T** (1974) Assembly of Salmonella flagellin in vitro and in vivo. *J. Supramol. Str.* **2**, 372-384.
- Ikeda T**, Yamaguchi S and Hotani H (1993) Flagellar growth in a filament-less *Salmonella fliD* mutant supplemented with purified flagellin and hook-associated protein 2. *J. Biochem.* **114**, 39-44.
- Jones CJ** and Aizawa SI (1991) The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly, and function. *Adv. Microbial Physiol.* **32**, 109-172.
- Karavolos MH**, Roe AJ, Wilson M, Henderson J, Lee JJ, Gally DL and Khan CM (2005) Type III secretion of the Salmonella effector protein SopE is mediated via an N-terminal amino acid signal and not an mRNA sequence. *J. Bacteriol.* **187**, 1559-1567.
- Kornacker MG** and Newton A (1994) Information essential for cell-cycle-dependent secretion of the 591-residue Caulobacter hook protein is confined to a 21-amino-acid sequence near the N-terminus. *Mol. Microbiol.* **14**, 73-85.
- Kuwajima G**, Kawagishi I, Homma M, Asaka JI, Kondo E and Macnab RM (1989) Export of an N-terminal fragment of *Escherichia coli* flagellin by a flagellum-specific pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **86**, 4953-4957.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259), 680-5.
- Lee SH** and Galán JE (2004) Salmonella type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol. Microbiol.* **51**, 483-495.
- Leonhartsberger S** (2006) *E. coli* expression system efficiently secretes recombinant proteins into culture broth. *BioProcess International* 2006. április
- Lloyd SA**, Norman M, Rosqvist R and Wolf-Watz H (2001) Yersinia YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol. Microbiol.* **39**, 520-531.
- Macnab RM** (2004) Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**, 207-217.

- Macnab RM** (1995) Flagella and motility. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, edn 2. (Ed. F.C. Neidhardt, J. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter & H.E. Umbarger), pp. - . Washington DC: American Society for Microbiology publications.
- Majander K**, Anton L, Antiainen J, Lang H, Brummer M, Korhonen TK, and Westerlund-Wikström B (2005) Extracellular secretion of polypeptides using a modified *Escherichia coli* flagellar secretion apparatus. *Nat. Biotech.* **23**, 475-481.
- Minamino T** and Namba K (2004) Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 5-17.
- Minamino T** and Namba K (2008) Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature* **451**, 485-489.
- Namba K** and Vonderviszt F (1997) Molecular architecture of bacterial flagellum. *Quart.Rev.Biophys.* **30**, 1-65.
- Ozin AJ**, Claret L, Auvray F and Hughes C (2003) The FliS chaperone selectively binds the disordered flagellin C-terminal D0 domain central to polymerisation. *FEMS Microbiol Lett.* **219(2)**, 219-24.
- Rüssmann H**, Kubori T, Sauer J and Galán JE (2002) Molecular and functional analysis of the type III secretion signal of the *Salmonella enterica* InvJ protein. *Mol. Microbiol.* **46**, 769-779.
- Saier MH, Jr** (2004) Evolution of bacterial type III protein secretion systems. *Trends Microbiol.*, **12**, 113-115.
- Sandkvist M** and Bagdasarian M (1996) Secretion of recombinant proteins by Gram-negative bacteria. *Curr. Op. Biotechnol.* **7**, 505-511.
- Shokri A**, Sandén AM and Larsson G (2003) Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 625-635.

Sory MP, Boland A, Lambermont I and Cornelis GR (1995) Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1998-2002.

Stahl ML and LaVallie ER (1989) Method for producing heterologous proteins. US4801536 sz. szabadalom

Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 1992;**24**, 145-9.

Vogler A, Homma M, Irikura VM and Macnab RM (1991) *Salmonella typhimurium* mutants defective in flagellar filament regrowth and sequence similarity of FliI to F0F1 vacuolar, and archaeobacterial ATPase subunits. *J.Bacteriol.* **173**, 3564-3572.

Vonderviszt F, Aizawa SI and Namba K (1991) Role of the disordered terminal regions of flagellin in filament formation and stability. *J. Mol. Biol.* **221**, 1461-1474.

Vonderviszt F, Imada K, Furukawa Y, Uedaira H, Taniguchi H and Namba K (1998) Mechanism of self-association and filament capping by flagellar HAP2. *J.Mol.Biol.* **284**, 1399-1416.

Vonderviszt F, Ishima R, Akasaka K and Aizawa SI (1992) Terminal disorder: A common structural feature of the axial proteins of the bacterial flagellum? *J.Mol.Biol.* **226**, 575-579.

Vonderviszt F, Kanto S, Aizawa SI and Namba K (1989) Terminal regions of flagellin are disordered in solution. *J. Mol. Biol.* **209**, 127-133.

Vonderviszt F, Závodszy P, Ishimura M, Uedaira H and Namba K (1995). Structural organization and assembly of flagellar hook protein from *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **251**, 520-532.

Weber-Sparenberg C, Pöplau P, Brookman H, Rochón M, Möckel C, Nietschke M and Jung H (2006). Characterization of the type III export signal of the flagellar hook scaffolding protein FlgD of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol.* **186(4)**:307-16.

Yonekura K, Maki S, Morgan DG, DeRosier DJ, Vonderviszt F, Imada K and Namba, K (2000) The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science* **290**, 2148-2152.

Yonekura K, Maki-Yonekura S and Namba K (2003) Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* **424**, 643-650.