



SZENT ISTVÁN EGYETEM

Doktori (Ph.D) értekezés tézisei

***A *Thermoplasma acidophilum* kinontestek vizsgálata lipid- és fehérje
analitikai módszerekkel***

Varga Sándor

Gödöllő

2016

A doktori iskola

Megnevezése: Környezettudományi Doktori Iskola

Tudományága: Környezettudomány

Vezetője: Csákiné Dr. Michéli Erika
Tanszékvezető, egyetemi tanár
Szent István Egyetem
Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar
Környezettudományi Intézet
Talajtani és Agrokémiai Tanszék

Témavezető: Dr. Nagy István
Kutató
Max Planck Intézet, Biokémiai Részleg
Struktúrbiológiai Osztály, Planegg, Németország

Dr. Kriszt Balázs
Tanszékvezető, egyetemi docens
Szent István Egyetem
Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

Bevezetés és célkitűzések

A mikroorganizmusok hatása a biológia és biotechnológia fejlődésére mindig is meghatározó jelentőséggel bírt. A bennük lezajló biokémiai és genetikai folyamatok nyomonkövetésére és manipulálására kifejlesztett technológiai megoldások mostanra számos esetben megoldást kínálnak a mikroorganizmusokban rejlő, az emberiség számára potenciálisan előnyös lehetőségek megismerésére és kiaknázására. Carl Woese 1977-ben fedezte fel az archeákat és a rendelkezésre álló riboszómális RNS szekvenciák valamint molekuláris biológiai bizonyítékok alapján javasolta az élővilág rendszerének felosztását három (Archaea, Bacteria és Eucarya) doménre.

Mostanra az archeák a képző eljárások technikai fejlődése nyomán kialakuló modern struktúrbiológia kedvelt kísérleti alanyai lettek néhány előnyös tulajdonságuk miatt. A *T. acidophilum* extremofil archaeon például kis mérete miatt az elektronok számára könnyen áthatolható, ezért jó minőségű tomogramok készíthetők róla. A *T. acidophilum* sejtek krio-elektromográfias (krio-ET) analízisének eredményeként kapott tomogramokon átlagosan 50 nm átmérőjű, gömb alakú, intracelluláris testek váltak láthatóvá. Az ezt követő kísérleteink kimutatták, hogy a sejtekből izolált gömb alakú sejtalkotók egyedi módon főként menakinonokból, gulopiranozil-(β 1-1)-caldarchaeoból és fehérjékből állnak.

A doktori munka elsődleges céljai a testeket alkotó anyagok azonosítása biokémiai módszerekkel, a testek felépítésének meghatározása elektronmikroszkópos vizsgálati módszerekkel, valamint a testek mennyiségi viszonyait befolyásoló környezeti feltételek (pH, oxigén, növekedési periódus...stb.) meghatározása voltak.

A kísérletes munka során az izolált *Thermoplasma* fehérjék az alkalmazott körülmények között kicsapódásra hajlamosnak mutatkoztak, ezért

másodlagos feladatként a következő feladatokat tűztük ki célul: (1.) különböző környezeti igényű archaeákból származó, small archaeal modifier proteinek (SAMP) tesztelése fehérje szolubilizáló fúziós partnerként; (2.) a SAMP-ok fehérje oldhatóságra gyakorolt hatásának összehasonlítása a kereskedelmi forgalomban kapható és széles körben használt szolubilizáló fehérjepartnerekkel; (3.) a megfelelő hatásfokú SAMP-ok célfehérjéről való enzimatiszikus eltávolításának vizsgálata a kiválasztott fajokból származó specifikusan hasító JAMM proteázokkal.

Anyag és módszer

A Thermoplasma kinontestek izolálása

A kinontestek (KT) tisztításához a sejt extraktumot, először hidroxipatit oszlopon tisztítottuk (Macro-Prep Ceramic Hydroxiapatite Type I 80 μ m, Bio-Rad). Az így kapott frakciókat egy Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare) oszlopon tovább tisztítottuk, és az elválasztott nagy molekulatömegű (MW) fehérjéket 15 %-os SDS gélen monitoroztuk. A Coomassie késsel megfestett, kutatás szempontjából jelentőséggel bíró fehérjesávokat kivágtuk és MALDI-TOF-MS-sel analizáltuk.

A Thermoplasma kinontestek lipid komponenseinek azonosítása

Az apoláros komponensek azonosításához a tisztított kinontesteket vékonyréteg kromatográfia (TLC), ultraviola (UV) spektrum és folyadékkromatográfiával kombinált tömegspektrometria (LC/MS) analízisnek vetettük alá. A liofilizált *T. acidophilum* sejtek és a Thermoplasma kinontestek (TaKT) lipidtartalmát kloroform, metanol és víz elegyével extraháltuk a vékonyréteg-kromatográfiás elválasztáshoz. A gulopyranosyl-(β 1-1)-caldarchaeol (GuC) és az izolált TaKT-ek 2D TLC vizsgálata a DSMZ

(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) poláris lipid alapú prokarióta osztályozási módszerének standard protokollján alapult. Az extraktumokat egy ALUGRAM SIL G/UV szilica géltre (Macherey-Nagel) töltöttük és ugyanazzal az oldószer eleggyel futtattuk. Az elválasztott lipideket először UV fényvel tettük láthatóvá, majd az UV-t nem abszorbeáló lipidek előhívásához a mintát szenesítettük. A TLC lemezt az előhívás után egy AIDA 2D denzitometriás szoftverrel (Raytest Isotopenmassgerate GmbH) analizáltuk és kiszámoltuk a szórást.

Az UV fényben látható lipidek UV abszorbanciáját egy Lambda 40 (Perkin Elmer) fotométerrel mértük meg a 210 nm – 400 nm tartományban.

LC/MS analízis

A TaKT-ek szerves oldószeres kivonatát egy 2,1x100 mm-es Waters X Terra-MS C8-as oszlopra töltöttünk. Az oszlopon megkötött anyagokat vízben oldott 0,05% TFA és 0,05% acetonitrilben oldott TFA grádiensével eluáltuk. Az eluált komponensek m/z arányát ESI-MS-sel (microTOF LC Bruker Daltonics) mértük meg a 100-1600 amu (atomic mass unit) tömeg intervallumban.

Izolált TaKT-ek krio-ET vizsgálata

A kolloidális arannyal kezelt tisztított TaKT-ek oldatát porózus szénnel borított réz gridre (Quantifoil) cseppentettünk, megszáritottuk és a vitrifikáláshoz folyékony nitrogénnel hűtött folyékony propán/etán keverékbe mártottuk. A vitrifikált mintákról egy 300 kV-on működtetett Tecnai G2 Polara (FEI Company) krio-elektronmikroszkóppal (krio-EM) készítettünk képeket. A képek feldolgozására az IMOD programcsomagot alkalmaztuk

A Ta0547 fehérje expressziójának nyomonkövetése Western blot technikával

A standard aerob körülmények között növesztett *T. acidophilum* sejtkultúrákból naponta mintát vettünk 6 napon keresztül. A sejteket feltártuk és a lizátumhoz 0,1 %-os végkoncentrációban SDS-t adtunk, majd -20 °C-on tároltuk. A fehérje koncentrációt BCA assay-vel (Bio-Rad) mértük meg és 1D-SDS gélen futtattuk, majd a fehérjéket egy Whatman NC membránra blottoltuk. A Western hibridizációt Ta0547 specifikus szérum antitestekkel és anti-nyúl másodlagos antitestekkel (IgG-peroxidáz (Sigma)) végeztük el. A detektáláshoz Luminol-t tartalmazó ECL oldatot (Sigma Aldrich) használtunk. A fényintenzitást LAS3000 (Fuji) képalkotó rendszerrel, az intenzitás értékeket Aida V.4.15.025 szoftverrel mértük (Raytest Isotopenmassgerate GmbH).

A TaKT asszociált fehérjék LC-MS/MS analízise

A tömegspektrometriai analízishez a mintákat denaturáltuk, a diszulfid kötések DTT-vel redukáltak, a keletkező tiol (-SH) csoportokat ezután jódiacetammiddal alkiláltuk. Ezt követően az oldatokat peptidázokkal kezeltük, „Stop and Go” extrakciós pipetta hegyekkel (STAGE) a szennyező sókat eltávolítottuk. Az összes megemésztett peptid keveréket online nanoLC-vel szeparáltuk és elektropray ionizációs tandem tömegspektrometriával analizáltuk. Az adatelemzés MaxQuant szoftverrel történt, a peptid azonosításhoz a Mascot (Matrix Science) adatbázis keresőmotorját használtuk.

Az intakt fehérjék molekulatömegének meghatározása Bruker Daltonics microTOF tömegspektrométerrel történt LC/MS üzemmódban. A fehérjék elválasztását egy Phenomenex Aeris WIDEPORÉ C4 3,6 μ (100 x 2,1 mm) oszloppal felszerelt HPLC Agilent 1100 eszközön végeztük el. A fehérjéket 0,05% TFA/H₂O és 0,05% TFA/ACN eluens közötti grádienssel eluáltuk. Az UV kromatogram felvétele 214 nm-en történt.

Az N-terminális fehérje szekvencia meghatározásához a széles körben elfogadott Edman degradációt használtuk. Ehhez az Applied Biosystems Model 492 cLC Procise Protein Sequencing System készüléket használtuk a gyártó útmutatója alapján működtetve.

Bioinformatikai módszerek

A fehérje homológia adatbázisban való keresés a National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLASTP kereső algoritmusával történt. A TaKT-ek esetleges transzmembrán (TM) hélixek kereséséhez/azonosításához a DAS-TM filter, Tmpred, Phobius és HMMTOP célszoftvereket használtuk. A Ta0547-es fehérje bioinformatikai jellemzéséhez a KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) adatbázis annotációjából indultunk ki. A másodlagos szerkezet predikciójához a Quick2D szoftvert használtuk. A homológ fehérjék kereséséhez a HMMER szoftvercsomagot használtuk, templátként a vitellogenin-N hmm (hidden Markov model) profilját használtuk (PF01347). A Ta0547 vitellogenin domén szerkezetének számítógépes modellezését a Modeller nevű szoftverrel végeztük el. A templát illesztéshez a TM-align algoritmust használtuk.

Elektronmikroszkópos analízis

A tisztított TaKT-ek és *T. acidophilum* sejtek negatív festéséhez és elektronmikroszkópos (EM) analíziséhez a mintát szén bevonatú hidrofílizált réz gridre helyeztünk valamint 2 %-os uranil-acetáttal kezeltük. Az elektron mikrofórákat a TaKT-ek esetében egy Philips CM200-as a sejtek esetében egy CM20-as transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) készítettük.

A *T. acidophilum* sejtek immunogold jelöléséhez a sejteket LR White gyantába (Fluka) ágyasztuk, majd vékony metszeteket készítettünk belőlük a gyártó utasításai szerint. A sejtmetseteket poliklonális nyúl antitestekkel

inkubáltuk, melyeket anti-nyúl IgG-arany konjugátummal jelöltünk és 2%-os uranil-acetáttal festettünk.

A krio-ET vizsgálatokhoz a *T. acidophilum* sejteket folyékony etánban pillanatszerűen lefagyasztottuk és folyékony nitrogénben tároltuk. A vitrifikált mintákat egy Philips CM300-as TEM készülékkel vizsgáltuk. A képfeldolgozáshoz EM és TOM szoftvercsomagokat használtunk.

A *Thermoplasma* SAMP expressziós vektorok előállítása

A *T. acidophilum*-ból származó, kodon optimalizált, szintetikus (Eurofins MWG OPERON) *Ta0895*, *Ta1019* és *Ta1442* géneket (feltételezett SAMP homológok) pET28a vektor *NdeI/XhoI* helyére inszertáltuk, ezáltal egy 6-His taggal látva el a gének N-terminális végét. Miután *E. coli* BL21 (DE3) (New England Biolabs) sejtekbe transzformáltuk a kialakított konstrukciókat, a célfehérjéket expresszáztattuk és a minták tisztaságát His-tag tisztítást követően SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) ellenőriztük.

JAMM proteáz expressziós vektorok és az expresszált proteázokon alapuló hasítási tesztek

A *H. volcanii*, *M. burtonii*, *N. maritimus* és *T. acidophilum* eredetű kodon optimalizált, N-terminális végen 6-His-taggal rendelkező *HVO_2505*, *Mbur_0623*, *Nmar_1227* és *Ta0623* JAMM proteáz géneket pET28a vektorba klónoztuk, az így kialakított konstrukciókkal *E. coli* BL21(DE3) sejteket transzformáltunk, majd a célfehérjéket expresszáztattuk. A *Hvo_2505*, *Nmar_1227* és *Mbur_0623* JAMM1 metalloproteázok hasítási aktivitását SAMP-pal fuzionáltatott szubsztrátokon teszteltük 20 µl-es térfogatú foszfátpufferben különböző hőmérsékleti értékeken. A reakció során esetlegesen keletkező hasítási termékeket SDS-PAGE-val tettük láthatóvá.

Az ScRpn11 fúziós fehérjevariánsok tisztítása, detektálása és oldhatóságuk összehasonlítása

A sejteket egy Avestin, Emulsiflex-C5 homogenizátorral tártuk fel, a sejtlyázumokból készített extraktumokat egy 1 ml-es térfogatú HisTrap HP oszlopra töltöttük fel egy ÄKTA basic (GE Healthcare) fehérjetisztító berendezés segítségével. Az eluált minták további tisztítását egy 2,4 ml térfogatú Superdex 200 PC 3.2/30 oszloppal (GE Healthcare) végeztük el. A célfehérjék molekulatömegének meghatározásához és azonosításukhoz LC/MS módszert használtunk. A tisztítás különböző fázisaiból származó, tagokkal ellátott fehérjék láthatóvá tételéhez és az expressziós szintjük összevetéséhez egy Agilent 2100 Bioanalyzer-t és a hozzá tartozó Agilent Protein 80 kit-et (Agilent Technologies) használtuk. Az adatok feldolgozásához és vizualizációjához 2100 Expert Software-t (Agilent Technologies) használtunk.

Eredmények

A *T. acidophilum* sejtek krio-elektrontomográfiája

A *T. acidophilum* sejtek mérete 0,5-3 μm , átlagos vastagságuk 0,2-0,5 μm , mely tulajdonságok megfelelő mértékben áthatolhatóvá teszik az elektronok számára, emiatt a sejt struktúrák feltárását célzó krio-ET vizsgálatok kedvelt modellorganizmusa. Anaerob körülmények között tenyésztett *T. acidophilum* sejtekről készített tomogramokon nagyszámú citoplazmikus, globuláris testecske volt látható. A képek analízise kimutatta, hogy a testek gömb alakúak, eloszlásuk a sejten belül egyenletes, és a *T. acidophilum* sejtek térfogatának akár 35-50 %-át is kitölthetik. A testek mérete Gauss-féle eloszlást követ 50 nm-es átlagértékkel és 15 nm-es szórással.

A TaKT-ek fő fehérjekomponensének, a Ta0547-nek az azonosítása

A sejtlyázatok citoszolikus fehérjéit oszlopkromatográfián alapuló tisztítási módszerekkel izoláltuk és a nagy molekulatömegű fehérje komplexeket MALDI-TOF-MS-sel analizáltuk. Ilyen módon azonosítani tudtuk a holtér frakcióiban domináns Ta0547-es fehérjét. Figyelemre méltó, hogy míg más nagyméretű fehérjekomplexek elhanyagolható mennyiségben voltak jelen, addig a frakciók negatív EM képein több nagy globuláris test látszott, melyek méret és alak tekintetében a krio-ET kísérletekben megfigyelt testekre hasonlítottak.

Ennek igazolásához specifikus, rekombináns Ta0547 fehérje elleni nyúl antitesteket termeltettünk. Az immunprecipitációval tisztított Ta0547 negatív festésű EM analízise során olyan gömb alakú testeket lehetett megfigyelni, melyek méretükben és alakjukban az oszlopkromatográfiás tisztítások során izolált testecskékhez hasonlítottak. Későbbi kémiai és biokémiai analízisek is azt mutatták, hogy a két tisztítási folyamatból származó testecskék mind szerkezetükben és kémiai/biológiai összetételükben megegyeznek és a Ta0547 valóban a TaKT-ek fő fehérje komponense.

A Ta0547-es fehérje bioinformatikai elemzése

A Ta0547 fehérje az UniProt adatbázis annotációja alapján ismeretlen funkciójú. A prediktált másodlagos szerkezet alapján szolubilis, szignál peptidet illetve transzmembrán domént nem tartalmaz. Az aminosav szekvencia alapján főleg α -hélixekből és rövid β -redőkből és az N-láncvégnél található kis kiterjedésű rendezetlen régiókból áll.

A Ta0547 a KEGG adatbázisban található annotáció szerint vitellogenin-N domén fehérje, azonban a Pfam adatbázisban való keresés nem mutatott ki egyezést a Ta0547 és a vitellogenin-N domén között. Az ellentmondás feloldásához a *T. acidophilum* proteomjában kerestünk vitellogenin-N-nel

(Pfam: PF01347) megegyező, hmm profillal rendelkező fehérjét, a keresés csak a Ta0547-es fehérje és a vitellogenin-N C-láncvégének egy rövid szekvenciájával mutatott ki egyezést. Ennek fényében a lipovitellin vitellogenin-N doménjének nagy felbontású kristályszerkezetét felhasználva (PDB: 1LSH) elkészítettük a Ta0547 fehérje prediktált 3D szerkezetét. A Ta0547 fehérje szerkezeti modelljének és a lipovitellin szerkezetének (313 - 435 aminosav intervallum) TM-align algoritmus szerinti illesztése majdnem teljes egyezést mutatott.

A TaKT-ekkel asszociált fehérjék azonosítása LC-MS/MS és Edman degradáció módszerekkel

A TaKT asszociált fehérjék és a proteom analitikai módszerek érzékenysége miatt detektált szennyeződések elkülönítésére az immunprecipitációs illetve oszlopkromatográfiás kísérletekből származó frakciókat LC-MS/MS analízisnek vetettük alá. A mintákból 7, a keresési feltételeknek megfelelő fehérjét mutattunk ki: Ta0547, Ta0337, Ta0437, Ta0438, Ta0182, Ta0093 és Ta1223a, melyek nagy valószínűséggel a TaKT-ek komponensei. Ezek a fehérjék a Ta0437-es fehérjét leszámítva kisebbek mint 20 kDa. A Ta0547, Ta0182, Ta0438 és Ta0337 funkciója nem ismert, a Ta1223a az archaeák Sec független iker arginin transzlokázaival, míg a Ta0437 számos organizmusban előforduló, anion transzporter és oxianion transzlokáz ATP-ázokkal mutatott homológiát. A kisméretű fehérjék MS alapú mennyiségi meghatározásából egyedüli következtetésként a Ta0547-es fehérje dominanciája volt levonható.

A TaKT-ek nem fehérje komponenseinek vizsgálata vékonyréteg kromatográfiával, ultraibolya spektroszkópiával és LC/MS-sel

A más organizmusokban előforduló lipidtestekre emlékeztető TaKT-ek izolálását és mikroszkópos megfigyelését követően a lehetséges lipidkomponensek kimutatása TLC-vel történt. Az általánosan alkalmazott

Bligh-Dyer összlipid extrakciós módszert használtuk a liofilizált *T. acidophilum* sejtek és az izolált TaKT-ek lipid összetevőinek extrakciójához. Az így kivont anyagokat TLC-vel szeparáltuk, és színező eljárásokkal láthatóvá tettük. A sejtek poláris lipid mintázata jól illeszkedett korábban publikált eredményekhez és két fő lipidkomponens jelenlétét igazolta: gulopiranozil-(β 1-1)-caldarchaeol (GuC/U4) és a domináló gulopiranozil-(β 1-1)-caldarchaetidilglicerol (GuCGp). A tisztított TaKT-ek esetében két fő komponenst azonosítottunk. Ezek közül a domináns az oldószer fronttal együtt futó menakinonok keveréke volt, az alkomponens pedig egy valamivel lassabban vándorló vegyület volt, ami megfelelt Shimada és kollégái által azonosított U4 (GuC) komponensnek. Ezt a GuCGp-ből származtatott kontroll GuC 2D TLC profilja alapján azonosítottuk.

A TaKT-ek fő komponensének a menakinon-7 (MK-7) bizonyult. Emellett még a *T. acidophilum* HO-62 törzsnél leírt thermoplasmaquinone-7 (TPQ-7), methionaquinone-7 (MTK-7) illetve, menakinon-4 (MK-4) kinonokat is kimutattuk kisebb mennyiségben.

A TaKT-ek karakterizálása krio-ET-vel

Hogy betekintést nyerjünk a TaKT struktúrájába, a méretkizárásos kromatográfiával (SEC) tisztított TaKT-eket krio-ET-vel vizsgáltuk. Az *in situ* megfigyeléseket alátámasztva, a TaKT-ek hozzávetőlegesen gömb alakúak és 25-60 nm-es átmérőjűek. A TaKT-ek többsége egy elektrondenz belső térrel rendelkezik, amit egy tömörebb határoló rész vesz körül. Egyes esetekben egy kisebb, üres belső résszel rendelkező, gömb alakú struktúra csatlakozott a nagyobb és tömör belső résszel rendelkező testekhez. A TaKT-ek határa nem folytonos, úgy tűnik, hogy diszkrét, egymással összeköttetésben álló, ~4 nm nagyságú, sűrűbb részek csoportosulásából áll össze, azt sugallva, hogy ez a határoló rész nem lipid természetű. Egyes esetekben hasonló

globuláris képletek megfigyelhetőek voltak a TaKT-ek belső terében is. A testek külsejéhez rögzített, kifelé álló tüske alakú struktúrák is láthatóak voltak.

A Ta0547 szerepe a struktúra kialakításában

A Ta0547 TaKT-ek struktúrájában, kialakulásában és/vagy stabilizálásában betöltött szerepének vizsgálatához EM megfigyelést alkalmaztunk. A struktúra biokémiai jellemzéséhez tisztított TaKT mintákat tripszinnel, nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) illetve n-dodecil- β -D-maltoziddal (DDM) kezeltük. Meglepő módon a membránfehérjék izolálására is használt DDM-es (10%) kezelés nem befolyásolta a testek struktúráját, ami egy feltételezett lipid határolóréteg hiányát jelezte. Ezzel ellentétesen a tripszines kezelés a testek széteséséhez vezetett, ami feltehetőleg a Ta0547 degradációjára vezethető vissza. Ezek az eredmények együtt ahhoz a feltételezéshez vezettek, miszerint a Ta0547 kiemelt szerepet játszik a TaKT-ek szerkezetének kialakításában.

A Ta0547 fehérje *T. acidophilum* sejteken belüli lokalizációjához a sejtekből készített vékony metszeteken immunogold jelölést használtunk. A Ta0547 fehérjék a TaKT-ek felszínén elszórtan fordultak elő jó egyezést mutatva az EM analízissel, ami szintén nem igazolta sem egy folytonos fehérjeréteg vagy egy lipid határolóburok jelenlétét.

A Ta0547 expressziós szintjében bekövetkező változások nyomonkövetése

A TaKT-ek komponenseinek azonosítását követően megkíséreltük a testek lehetséges fiziológiai szerepének meghatározását azáltal, hogy nyomon követtük a környezeti hatások következtében a Ta0547 expressziós szintjében bekövetkező esetleges változásokat. Ehhez Western blot analízissel monitoroztuk több változó hatását, úgymint megnöveltpH, aerob és anaerob környezet és a sejt kultúra kora. A tesztelt környezeti paraméterek érdekes

módon egyik esetben sem befolyásolták a Ta0547 expressziós szintjét a kultúra elindítását követő 2. napig. Változást csak a sejt kultúra kora okozott, a Ta0547 expressziós szintje folyamatosan növekedett hat napon át, amíg a sejtek (a hetedik napon) ki nem haltak.

A feltételezett *T. acidophilum* SAMP-ok expressziós tesztje *E.coli*-ban

A *T. acidophilum* Ta0895, Ta1019 és Ta1442 jelű fehérjék, feltételezett SAMP homológok. Ezek kodon optimalizált génjeit *E. coli*-ban expresszáztuk. A minták tisztasága közel homogénnek volt tekinthető már a His affinitás tisztítást követően. A Ta0895 volt a legígéretesebb fúziós tag fehérjeként használható jelölt, ugyanis amellett, hogy nagy tisztaságban és koncentrációban termelődött *E. coli*-ban, a többi SAMP-hoz képest ez a fehérje expresszáldott a legnagyobb mennyiségben a *T. acidophilum*-ban. Fúziós fehérjeként a szintetikus, kodon optimalizált Ta0895 verziót használtuk.

A kereskedelmi forgalomban kapható szolubilizáló tagekkel és a SAMP-okkal fuzionáltatott ScRpn11 variánsok oldhatóságának összehasonlítása

A Ta0895 fehérje expresszióra, illetve oldhatóságra gyakorolt relatív hatásának felméréséhez három archaea eredetű, Ta1019, Hvo_2619 és Mbur_1415, feltételezett SAMP-pal illetve hat, kereskedelmi forgalomban kapható fehérjével, 6His, Trx, GST, MBP, SUMO és NusA hasonlítottuk össze. Az ScRpn11 fehérjét a felsorolt tagek C-terminusához fuzionáltattuk majd expresszáztuk. Az expresszált fehérjék mennyiségét minden tisztítási lépést követően megmértük. A rekombináns ScRpn11-ek oldhatóságát a sejtextraktumokból határoztuk meg a rekombináns fehérje/összfehérje jelerősségből. A His-tag-tisztítást követően a SEC tisztításhoz csak az MBP, NusA, Ta1019 és Ta0895 tagekhez kapcsolt ScRpn11 fehérje minták szolgáltatnak megfelelő mennyiségű kiindulási terméket. Látszólag a hozam a

NusA-ScRpn11 és MBP-ScRpn11 fehérjék esetében volt a legmagasabb, azonban figyelembe kell venni, hogy a SAMP-okkal összekapcsolt fúziós fehérjék molekulatömege szignifikáns mértékben kisebb, mint a NusA-ScRpn11 és MBP-ScRpn11 fehérjék tömege. Ezért a kapott értékeket korrigáltuk a fúziós partner molekulatömegével a következő képlet szerint: $[\text{célfehérje MW} / (\text{célfehérje MW} + \text{tag fehérje MW})] * (\text{célfehérje mennyiség} / \text{összfehérje mennyiség})$.

Archaea eredetű metalloproteázok tesztelése SAMP hasítási aktivitás alapján

Hogy megvizsgáljuk a SAMP fúziós tagek enzimátikus eltávolításának lehetőségét a Hvo_2505, Nmar_1227 és Mbur_0623 JAMM1 metalloproteázokat SAMP-ScRpn11 és SAMP-Ta0547 szubsztrátvariánsokhoz adtuk, majd különböző hőmérsékleteken inkubáltuk a mintákat. A kezelt minták denaturáló SDS-PAGE analízise hasítási termékek jelenlétét mutatta ki Hvo_2505 és Ta0895_VAGG-Rpn8-Rpn11 illetve a Hvo_2505 és Ta0895_VSGG-Ta0547 párosításánál. A Hvo_2505 24, 37 és 48 °C-on mutatott aktivitást, azonban alacsonyabb hőmérsékleteken (10 °C) nem tapasztaltunk enzimműködést. A másik két enzim nem mutatott aktivitást egyetlen vizsgált körülmény esetében sem.

Az új tudományos eredmények összefoglalása

A *T. acidophilum* sejtekből – megjelenésükben az eukaryóták lipoprotein cseppecskéihez hasonló – gömb alakú lipid/fehérje agglomerációkat izoláltunk.

1. tézis: Az izolált *Thermoplasma* kinontestek fő fehérje komponense a Ta0547. A Ta0547-es fehérje a bioinformatikai elemzés alapján egy vitellogenin N-domén homológ.

2. tézis: Az izolált *Thermoplasma* kinontestek fő lipid összetevői a menakinon-7 és a gulopiranozil-(β 1-1)-caldarchaeol illetve kisebb mennyiségben tartalmaznak metilmenakinon, methionaquinone-7, thermoplasmaquinone-7 és menakinon-4 vegyületeket.

3. tézis: Az elektronmikroszkópos megfigyelések alapján a kinontestek megközelítőleg gömb alakúak, 25-60 nm-es átmérővel rendelkeznek és egy diszkrét egységekből álló réteg határolja őket, a Ta0547-es fehérje kulcsfontosságú szerepet játszik a megfelelő szerkezet fenntartásában.

4. tézis: A kinontesteket alkotó menakinonok és Ta0547 fehérjék mennyisége 6 napos sejtenyésztési ciklus esetében folyamatosan nőtt.

5. tézis: *E. coli* expressziós tesztek igazolták, hogy a *T. acidophilum* eredetű SAMP fehérjék képesek az ScRpn11 célfehérjét oldatban tartani.

6. tézis: Az összehasonlító tesztek eredményei szerint a Ta0895 SAMP volt a leghatékonyabb szolubilizáló partner a vizsgált fehérjék közül.

7. tézis: A Ta0895 fúziós partner specifikus eltávolítása lehetséges a *H. volcanii* eredetű Hvo_2505 metalloproteáz enzimmel.

Következtetések és javaslatok

A doktori munka elsődleges célja a *T. acidophilum*-ban felfedezett kinontestek izolálása, biokémiai és strukturális jellemzése volt. A TaKT-eket két különböző módszerrel tisztítottuk és a minták tisztaságát SDS-PAGE-val, TLC-vel, és EM-mel ellenőriztük. Ezen kísérletek szerint a TaKT-ek közel homogén tisztaságot értek el, ugyanis az aerob és anaerob környezetben növesztett sejtekből származó, immuno-precipitációval és/vagy oszlopkromatográfiával tisztított minták fehérje és lipid profilja megegyezett, ezzel szemben szignifikáns mértékben eltértek a sejtek összlipid illetve összprotein profiljától.

A TaKT asszociált fehérjék azonosítása és referenciákkal való összevetése különféle módszerekkel történt. Az azonosított proteinkészlet az összes eddig ismert lipidtest vagy lipid alapú sejtalkotó összetételétől eltér. Az LC-MS/MS alapú fehérjeazonosítási módszer szerint a Ta0547 a fő illetve a Ta1223a, Ta0438, Ta0093, Ta0182, Ta0337 és Ta0437 proteinek a másodlagos fehérjekomponensek. A fehérjék TM domén analízise szerint a Ta1223a valószínűleg, míg a Ta0337 talán TM fehérje, a többiek nem rendelkeznek TM doménnel.

Az izolált TaKT-ek TLC analízise a következő lipideket azonosította: MMK, TPQ-7 és MK-7 menakinonok, melyek közül az utóbbi a domináns. A másik fő komponens a GuC poláris lipid, mely a leírások szerint sejtmembrán alkotó molekula. Ez a lipid kompozíció azért szokatlan, mert az izoprenoid ubiquinonok és menakinonok lipofil, nem-fehérje komponensei a prokarióták elektrontranszfer láncának, e vegyületek szállítják az elektronokat a membránkötött fehérjekomplexek között. Növényekben és algákban lévő plasztoglobulusokban és plasztidokban kimutatták nem sejtmembránba ágyazódó kinonok akkumulációját, feladatuk feltételezések szerint a fotoszintézishez szükséges homeosztázis fenntartása a megfelelő anyagok

koncentrációjának növelésén és csökkentésén keresztül. A plaztoglobulusokkal szemben a TaKT-eket nem határolja lipidmembrán, elektronenz belső térrel rendelkeznek, amit sűrűbb, diszkrét, 4 nm-es globuláris struktúrákból álló csoportok határolnak szakaszosan, ami arra enged következtetni, hogy ez a határoló struktúra inkább fehérje, mint lipid természetű.

A TaKT-ek EM-mel megfigyelhető tulajdonságai, azt jelzik, hogy a TaKT-ek inkább lipoproteinszerű testecskék semmint lipidcseppek. A TaKT-ek és lipid partikulumok között megfigyelt hasonlóság csak a morfológia szintjére korlátozódik, mivel a fő asszociált fehérjék és lipidek eltérőek. Ennek ellenére feltételezhető, hogy a TaKT-ek a lipoprotein partikulumokhoz hasonlóan részt vesznek a lipidek sejten belüli transzportjában. Ezt alátámasztja, hogy a lipidtranszporthoz köthető vitellogenin-N domén fehérje (Pfam PF01347) hmm profil alapú illesztése a *T. acidophilum* proteomban egyedül a Ta0547 fehérje esetében adott találatot és a Ta0547 fehérje lipovitellin kristályszerkezet (1LSH) alapján elkészített szerkezeti modellje a lipovitellin helikális doménjének 313. és 435. aminosava közötti régió szerkezetével gyakorlatilag teljesen megegyezett.

Bizonyítottuk, hogy a TaKT-eket alkotó menakinon és Ta0547 mennyisége a 6 napos növekedési periódus alatt dinamikusán nőtt. A biokémiaileg észlelhető változások mellett a TaKT-eken látható változásokat is megfigyeltünk. A 7 napos kultúrák esetében, sokkal kevesebb TaKT-et észleltünk mint a 2 napos kultúrákból származó sejtekből, viszont a megmaradó néhány test mérete jelentősen megnövekedett. Mindemelllett a TaKT-ek aggregációja immunjelölt sejtekben és összeolvadó TaKT-ek *in vitro* körülmények között szintén megfigyelhető volt. Ezen felül észleltünk leváló/összeolvadó TaKT-eket, melyek egy primitív sejtservecske aktív biokémiai folyamataira utalhat.

A TaKT-ek és a hozzájuk társítható fehérjék és lipidek biokémiai szerepének tisztázásához a jövőben további kísérletek elvégzése lesz szükséges: a célgének KO mutagenézise, a fehérjék harmadlagos és negyedleges atomszintű szerkezetének meghatározása, a legtöbb lipidkomponens azonosítása LC/MS-sel támogatott lipid profil elkészítésével, a sejtmembrán lipidösszetételének illetve a TaKT-ek környezeti hatásra bekövetkező mennyiségi változásainak mérése.

A doktori munka másodlagos célja a TaKT fehérjék tisztítására alkalmas szolubilitást növelő fúziós partner fehérjék keresése volt. A homológia szerinti keresések alapján fehérje expressziós teszteket alakítottunk ki a Ta0895, Ta1019 és Ta1442 feltételezett *T. acidophilum* SAMP-ok vizsgálatára. Az elmélet teszteléséhez az ScRpn11 fehérjét a Ta0895 fehérje C terminális részéhez kapcsoltuk. Az expressziós tesztek bizonyították, hogy ez a SAMP képes a célfehérjét oldható állapotban tartani. Bízató eredmények után megkezdtük más SAMP-ok tesztelését is.

A tesztek során az ScRpn11 fehérjét fuzionáltattuk négy, Ta0895, Ta1019, Hvo_2619 és Mbur_1415, feltételezett SAMP-pal és hat, széles körben használt, kereskedelmi forgalomban kapható, fúziós fehérjepartnerrel és összehasonlítottuk az oldható fehérjék koncentrációját. A kísérlet első felében a kereskedelmi forgalomban lévő fúziós partnerek jelentősen jobban teljesítettek, azonban a centrifugálást követően a Sumo-ScRpn11, GST-ScRpn11, 6His-ScRpn11 és Trx-ScRpn11 fehérjék mennyisége a felülúszóban azt mutatta, hogy ezek a fehérjék az expresszió során kicsapódnak és zárványtestet képeznek. A His affinitás kromatográfiát követően, csak négy fehérje, MBP-ScRpn11, NusA-ScRpn11, Ta1019-ScRpn11 és Ta0895-ScRpn11 szolgáltatott elégséges kiindulási mennyiséget a SEC tisztításhoz. Esetükben magas oldható rekombináns fehérje / oldható összfehérje arány adódott. A His affinitástisztítást követően a rekombináns fehérje / összfehérje

arány alapján az MBP és NusA fúziós partnerek voltak a leghatékonyabb szolubilizálók. Azonban a molekulatömeg szerint elvégzett korrekció után a Ta0895 és Ta1019 bizonyult a leghatékonyabbnak.

Bizonyos kísérletekhez natív állapotú, fúziós partner nélküli fehérje megléte szükséges. Ezért a SAMP szolubilizáló fehérjék eltávolításához célul tűztük ki a fúziós partnert szükséges esetben specifikus helyen, lehetőleg alacsony hőmérsékleten lehasítani képes enzimek keresését. A célra négy archaea JAB domén metalloproteázát és feltételezett szubsztrátjaikat választottuk ki: *H. volcanii* (Hvo_2619 és Hvo_2505), *N. maritimus* (Nmar_1227), *M. burtonii* (Mbur_1415 és Mbur_0623) és *T. acidophilum* (Ta0895, Ta1019 és Ta0623). Ezek a mikrobák különféle hőmérsékletekhez alkalmazkodtak, az 1-2 °C-ot is elviselni képes, pszikrofil *M. burtonii* volt leginkább az érdeklődésünk fókuszában. A *Haloferax* Hvo_2505 enzim volt az egyetlen amelyik el tudott vágni néhány lineárisan kötődő SAMP-ot és bár ilyen módon a SAMP eltávolítása lehetséges, de az enzim aktivitásához szükséges feltételek messze esnek az ideálistól (2 M NaCl koncentráció és 24–48 °C-os hőmérséklet).

A Ta0895 fehérjén alapuló rendszer továbbfejlesztéséhez a kutatás következő szakaszában a néhány célfehérje degradációját okozó proteázok azonosítása, majd a proteáz fehérjét kódoló gént nem tartalmazó gazdasejt kiválasztása vagy előállítása és egy alacsony hőmérsékleten is működő, Ta0895 fehérjét specifikusan eltávolítani képes proteáz keresése a cél.

A témában megjelent publikációk listája

Folyóiratcikk:

Nagy, I., Knispel, R. W., Kofler, C., Orsini, M., Boicu, M., Varga, S., Weyher-Stingl, E., Sun, N., Fernandez-Busnadiego, R., Kukolya, J., Nickell, S. and Baumeister, W. (2016) 'Lipoprotein-like particles in a prokaryote: quinone droplets of *Thermoplasma acidophilum*', *FEMS*, doi: 10.1093/femsle/fnw169

Varga, S., Pathare, G. R., Baka, E., Boicu, M., Kriszt, B., Székács, A., Zinzula, L., Kukolya, J. and Nagy, I. (2015) 'Enhancing recombinant protein solubility with ubiquitin-like small archeal modifying protein fusion partners', *Journal of Microbiological Methods*, 118, pp. 113–122. doi: 10.1016/j.mimet.2015.08.017.

Kongresszusi kiadványokban megjelent közlemény:

Sándor Varga, Ganesh Pathare Ramnath, Erzsébet Baka, Marius Boicu, Balázs Kriszt, András Székács, József Kukolya, István Nagy (2015): ENHANCING RECOMBINANT PROTEIN SOLUBILITY WITH A SAMP FUSION PARTNER Hungarian Molecular Life Sciences 2015: Programme & Book of Abstracts. 304 p. (ISBN:978-615-5270-15-4)

Sándor Varga, Roland W Knispel, Christine Kofler, Marius Boicu, E Weyher-Stingl, Erzsébet Baka, József Kukolya, Stephan Nickell, Wolfgang Baumeister, István Nagy (2014): Blobology: The case of *Thermoplasma* quinone droplets. *ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA* 62 (Suppl.1), p. 79. 1 p. (Print ISSN: 1217-8950 Online ISSN: 1588-2640)