

Részletes zárójelentés
az F67735 számú fiatal kutatói OTKA pályázathoz
(Alfa-hélix és béta-hordó fehérjék membránba ágyazódása)

1. Célkitűzések, a munka feltételei, változások a munkatervhez képest

Jelen pályázatban célul tűztük ki béta-hordó és alfa-hélix fehérjék szerkezetének, "hajtogatódásának", és lipidmembránokba való beépülésének vizsgálatát. Választásunk egyrészt a FomA nevű bakteriális fehérjére (béta-hordó), másrészt a V-ATPáz *c* alegységére (alfa-hélix) esett. Laboratóriumunkban az elmúlt évek során sikeresen alkalmaztuk a rendelkezésünkre álló biofizikai módszereket lipidmembránok, fehérjék, és lipid-fehérje kölcsönhatások tanulmányozása során, így a választott objektumok vizsgálata is igen ígéretesnek mutatkozott. Sajnos a V-ATPáz *c* alegységét a pályázat futamideje alatt nem sikerült megfelelő mennyiségben, tisztán kinyerni természetes membránokból, így a *c* alegység transzmembrán szegmenseivel analóg szintetikus polipeptideken végeztünk vizsgálatokat (lásd 2. pont). A béta-hordó fehérjét Németországból kaptuk. Mivel ott is voltak fennakadások a tisztításban, és felmerültek mintasorozatok közti eltérések, illetve a denaturáló szerekkel kapcsolatos problémák is, a vártnál nehezebben haladtunk előre a projekt megvalósításában. Ehhez hozzájárult az is, hogy mind az ESR, mind a fluoreszcencia spektrométerünk meghibásodott időközben, és szervízben voltak több hónapig. Mindezen körülmények mellett is igyekeztünk előrehaladni a pályázatban megjelölt célkitűzések felé.

2. A V-ATPáz *c* alegysége

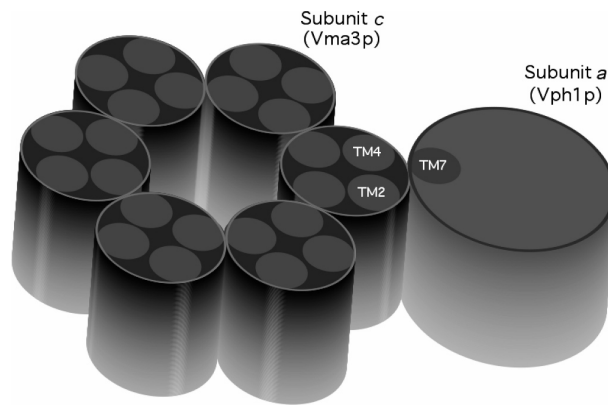
A V-ATPáz számos sejtorganelumban és bizonyos sejtek esetén a plazmamebránban is megtalálható. Funkciója az, hogy az ATP hidrolíziséből nyert kémiai energiát mechanikai energiává alakítja, és ezt felhasználva protonokat pumpál a citoplazmából a membrán tulsó felére. Két doménből áll. A V_o domén a membránban helyezkedik el, és 5 különböző alegységet tartalmaz. Ezek közül a *c* alegységek rendkívül hidrofób proteolipidek, melyek 4,

illetve 5 transzmembrán hélixszel rendelkeznek. A *c* alegységnek fontos szerepet tulajdonítanak a protontranszportban.

Céljaink között szerepelt az, hogy kidolgozzunk egy eljárást a natív és hisztidinnel jelölt *c* alegység tisztítására élesztő vakuólumból, majd ezt a fehérjét további vizsgálatainkhoz membránba építsük. Bár a V-ATPáz csoportunk egyik kiemelt kutatási objektumává vált az utóbbi években, a fehérje tisztításával laboratóriumunkban csak nem régóta foglalkozunk, és mivel korábban nem voltak ilyen irányú tapasztalataink, a módszer kidolgozása, a tisztítási lépések optimalizálása rendkívül sok időt vett igénybe. A membránfehérjék tisztítása egyébként is sokkal bonyolultabb és nehezebb feladat, mint a vízdékony fehérjéké. Az atomszerkezet (Röntgen szórással történő) meghatározásának feltétele a tisztított és kristályosított fehérje előállítása. Mindeztidáig azonban ez senkinek nem sikerült, sem a *c*, sem az *a* alegység esetében. Mostanra azonban már rutinszerűen tudunk élesztő vakuólumot izolálni, és abból magas V-ATPáz aktivitással bíró vezikulákat készíteni. A vakuólum preparátumból tovább lépve, a natív V-ATPáz és magának a *c* alegységnek a tisztítását még nem sikerült kidolgozni. Ezzel párhuzamosan próbálkoztunk megfelelő vektor (DNS szakasz) beszerzésével, mellyel hisztidinnel jelölt *c* alegységet tudnánk izolálni, de sajnos ezen próbálkozásunk sokáig sikertelen volt. Az elmúlt év végén egy francia kutatócsoporttól kaptunk egy pET-28a-HSV-16K nevű bakteriális expressziós plazmidot, melynek segítségével *Escherichia coli* sejtekben a *c* alegységet elvileg túl lehet termeltetni. A plazmidot Rosetta2 *E. coli* sejtekbe transzformáltuk, majd IPTG-vel indukáltuk a plazmid által kódolt, patkányból származó (Atp6v0c) *c* alegység termelődését. A fehérje N-terminálisán His-tag-et tartalmaz, így Ni-NTA gyöngyökkel (affinitás kromatográfia) próbáltuk specifikusan tisztítani. Ezzel a módszerrel sikerült *c* alegységet izolálni, melyet a tisztítás után Western-blot technikával ki tudtunk mutatni. Ehhez a fehérje N-terminálisához közeli HSV-tag-re specifikus, HRP-vel konjugált, elsődleges antitestet használtunk. Sajnos azonban kiderült, hogy a *c* alegységet nagy mennyiségben egy másik fehérje szennyezi, ráadásul a kitermelés hatásfoka sem megfelelő még. Mint kiderült, az említett francia kutatócsoport is hasonló problémákkal küzd. Mindenesetre a tisztításon továbbra is dolgozunk, és az eljárásról próbálunk javítani, illetve más kutatócsoportokkal is felvettük a kapcsolatot (a világon nagyon kevés laboratóriumban próbálkoznak a *c* alegység tisztításával).

Mivel a natív *c* alegység nem állt rendelkezésre tisztított formában, egy korábban megkezdett

projekt folytatásaként, az élesztő V-ATPáz *c* alegységének (Vma3p) transzmembrán szegmenseivel analóg szintetikus polipeptideken végzett kísérleteinket is folytattuk. Mivel irodalmi adatok azt valószínűsítik, hogy a proton transzportban mind a *c* alegységnek, mind az *a* alegységnek (Vph1p) fontos szerepe van, vizsgáltuk az *a* alegység egyik transzmembrán hélixét is (melyen a kulcsfontosságú Arg található) (1. ábra).



1. ábra A *c* és *a* alegység, ill. transzmembrán héliceiknek sematikus ábrázolása.

A transzmembrán szakaszok azonosítása után, a polipeptideket a Pepceuticals nevű cég szintetizálta. Vizsgálatainkhoz a peptideket foszfolipid membránokba (DMPC, DPPC, DOPC, DMPG, DOPG) építettük be, majd ESR (Elektronspin Rezonancia) és FTIR (Fourier Transzformációs Infravörös) spektroszkópiával vizsgáltuk a lipid-fehérje kölcsönhatásokat, a peptidek oligomerizációját, másodlagos szerkezetét és membránbeli orientációját. A spinjelzett lipidekkel végzett ESR méréseinkből, spektrum-kivonással meghatároztuk a peptidek által immobilizált lipidek hányadát. Ezen adatok azt mutatták, hogy a peptidek a lipidmembránokban oligomereket képeznek. Továbbá azt is kimutattuk, hogy a *c* alegység negyedik hélixével analóg peptid (TM4) és az *a* alegység hetedik hélixével analóg peptid (TM7) között kölcsönhatás van, amit alátámasztottak a polarizált ATR (csillapított teljesvisszaverődéses) infravörös mérések is. Ez a megfigyelés megerősítette azon korábbi elképzeléseket, melyek az *a* és *c* alegység kölcsönhatására vonatkoztak. Az infravörös spektrumok Amid I sávjának analíziséből meghatároztuk a peptidek alfa-hélix és béta-lemez tartalmát. Kimutattuk, hogy a TM2, TM4, és TM7 peptidek döntően alfa-hélix másodlagos szerkezettel rendelkeznek. A hélixek membránbeli orientációját is meghatároztuk a polarizált spektrumokból számolt dikroikus arányok segítségével. Ezzel párhuzamosan a lipidláncok dőlésszögét is kiszámoltuk. A különböző lipidekből készített membránokon végzett mérések

összehasonlításából megállapítottuk, hogy a peptidek negatívan töltött lipidekkel erősebb kölcsönhatást mutatnak, mint az ikerionos (nulla eredő töltéssel rendelkező) lipidekkel. Mivel korábbi kutatások alapján feltételezhető, hogy bizonyos V-ATPáz inhibitorok célpontja a V_o domén, így egy jól ismert, természetes alapú (Concanamycin A), és egy nemrég mesterségesen előállított (INDOL0) inhibitornak a peptidekkel való kölcsönhatását is megvizsgáltuk lipidmembránokban. Kimutattuk, hogy előbbi a TM4 és TM7 peptiddel is, míg utóbbi a TM4 peptiddel mutat erősebb kölcsönhatást, így valószínűsíthető, hogy a V_o domén 'forgó' és 'statikus' elemei is tartalmaznak inhibitorspecifikus kötőhelyeket.

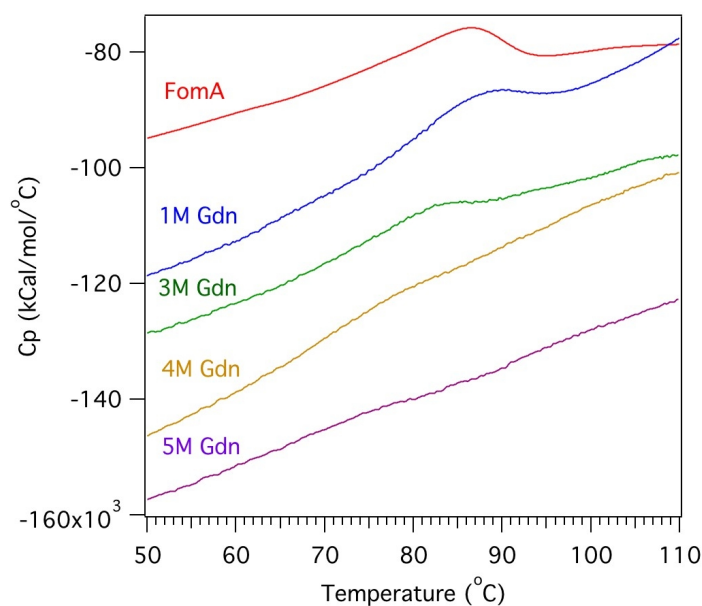
A polipeptideken végzett vizsgálatainkat egy rangos folyóiratban publikáltuk.

3. A FomA fehérjén végzett vizsgálatok

Gram-negatív baktériumok külső membránjában nagy számban fordulnak elő transzmembrán béta-hordó fehérjék, melyek némelyikéről kimutatták, hogy képesek spontán módon feltekeredni detergens micellákban és lipid kettősrétegekben. Tulajdonságaikból adódóan ezek a fehérjék jól használhatók modellként is fehérjék stabilitásának, ki- és betekeredésének vizsgálatához.

A béta-hordó fehérjék közül mi a *Fusobacterium nucleatum* külső membránjából származó FomA nevű fehérjét választottuk. Ez egy feszültségfüggő porin fehérje, mely jelenlegi tudásunk szerint 14 vagy 16 béta-lemezt tartalmaz. A fehérjét vizsgálatainkhoz Németországból (Konstanz, Jörg Helmut Kleinschmidt laboratóriuma) kaptuk tisztított formában, LDAO detergens micellákban "feltekert" állapotban. Bár a fehérje "tekeredésének" vizsgálatára az irodalomban lehetett már találni kísérleteket, termikus stabilitására korábban nem volt adat, így mi először a hőmérséklet okozta kitekeredéshez tartozó átmenet hőmérsékletét és hőváltozását tanulmányoztuk differencia pásztázó kalorimetriával (DSC). Vizsgáltuk továbbá denaturáló ágensek (pl. urea) hatását is erre a folyamatra. Mivel korábban még nem dolgoztunk ilyen denaturáló szerekkel, a kis mintatérfogat és a meglehetősen magas reagens koncentráció (5-8 M) miatt magát a mintaelőkészítést is ki kellett dolgozni, ill. optimalizálni. Az első mérések alapján úgy tűnt, hogy a kitekeredés rendkívül magas hőmérsékleten, 100 °C körül megy végbe, és hogy az urea az átmenet hőmérsékletét alacsonyabb hőmérsékletek felé tolja el. Mikor Németországból további, újabb izolálásokból

származó mintákat kaptunk, a kitekeredés vizsgálatára irányuló mérések eltérő eredményekhez vezettek. Az eltérések okát próbáltuk kideríteni. Vizsgálatainkból kiderült, hogy az első mintasorozattal vagy az izolálással probléma lehetett, valamint az is, hogy az urea zavarja a DSC méréseket a 80-100 °C-os tartományban. A további izolálásokról származó minták mérési eredményei már reprodukálhatónak bizonyultak. Ezekből meghatároztuk, hogy a fehérje kitekeredése 85 °C fok körül zajlik, és hogy az átmenetet megközelítően 120 kCal/mol entalpiaváltozás kíséri. Megállapítottuk, hogy ez a termikus átalakulás irreverzibilis és valószínűleg aggregációval végződik. Az átmenethez tartozó entalpiaváltozás összemérhető más béta-hordó, ill. alfa-hélix fehérjékre kapott irodalmi értékekkel. Hogy az urea zavaró hatását elkerüljük, méréseinkhez egy másik széles körben alkalmazott denaturáló szert, a guanidin-hidrokloridot alkalmaztuk, mely az említett zavaró hatást nem mutatta. A guanidin koncentrációjának növelésével (1-5 M) a fehérje szerkezeti átalakulásához tartozó hőmérséklet fokozatosan tolódik az alacsonyabb hőmérsékletek felé (5 M esetén egészen 75 °C-ig), és az entalpiaváltozás is csökkenő tendenciát mutat (2. ábra).



2. ábra Normált DSC termogramok guanidin-hidroklorid jelenlétében és anélkül (FomA).

A denaturáló szer destabilizálja a fehérje szerkezetét és így a kitekeredés könnyebben végbemegy, a kitekeredési folyamat azonban irreverzibilis marad. (1 M guanidin koncentráció esetén egy enyhe stabilizáló effektus figyelhető meg. Ennek magyarázatát még keressük.)

Annak kiderítésére, hogy a kitekeredés denaturáló szer jelenlétében szobahőmérsékleten is végbemegy-e, ill. hogy ennek a folyamatnak milyen a sebessége, inkubációs méréseket terveztünk.

Mivel a FomA fehérje több triptofánt (Trp) is tartalmaz, lehetőség nyílik arra, hogy Trp-fluoreszcenciával is vizsgáljuk a fehérje szerkezeti átalakulásait, ugyanis a Trp fluoreszcencia jele függ attól, hogy az aminosav milyen környezetben (hidrofób/hidrofil) található. Fluoreszcencia spektroszkópiával vizsgálva a fehérje hőstabilitását, a DSC eredményekkel tökéletesen összhangban lévő eredményre jutottunk, miszerint a denaturációs folyamatok a 80-90 °C tartományban zajlanak le. A kétféle mérési technikából származó egybehangzó eredmények biztosítottak minket arról, hogy a független módszerek adatait egymással összehasonlításban, illetve egymás kiegészítéseként is alkalmazhatjuk. Ennek azért lehet jelentősége, mert a kétféle módszer adatainak kombinálásával termodinamikai paraméterek határozhatók meg. A guanidin-hidroklorid jelenlétében végzett fluoreszcencia mérésekből azonban kiderült, hogy ez a denaturáló szer intenzív fluoreszcencia jelet ad a Trp emissziós tartományában a mérések kiértékelését nagymértékben bizonytalanná téve. Ezért ezekben a kísérletekben vissza kellett térni a másik denaturáló ágenshez, az ureához. (Ez sajnos némely esetben megnehezíti a DSC és fluoreszcencia adatok összehasonlítását.) Az inkubációs mérésekből arra a következtetésre jutottunk, hogy a fehérje rendkívül stabil, még igen magas urea koncentráció (8 M) mellett is csak nagyon lassan tekeredik ki 30 °C-on, ugyanis a Trp emissziós sávjának eltolódási görbéje 24 óra alatt sem ért el telítést. Továbbá a Trp sáv eltolódása jóval kisebb mértékű a termikus stabilitási méréseknél megfigyelteknél, ami csak részleges kitekeredésre utal az alkalmazott inkubációs körülmények között.

Célkitűzéseink között szerepelt az is, hogy megvizsgáljuk a fehérje tulajdonságait különböző összetételű lipidmembránokban is. Kleinschmidt és munkatársai egy másik béta-hordó fehérje esetén kimutatták, hogy a fehérje stabilitása lipidmembránba építve jelentősen növekszik a detergens micellákban lévő állapothoz képest. Mivel a fehérje egy rokon-fehérje, és a vizsgált rendszer is hasonló, becsléseink szerint az általunk vizsgált FomA fehérje tranzíciós hőmérséklete 100-110 °C környékére várható lipidmembránokban, ami vizes mintákról lévén szó eléggé megnehezíti (vagy akár lehetetlenné is teszi) a fehérje vizsgálatát ilyen környezetben. Részben ez is oka, hogy először a könnyebben elérhető és vizsgálható forma (detergens micella) tanulmányozását helyeztük előtérbe. Mindezek mellett is, a lipidrendszerek tanulmányozása még terveink között szerepel és az előkísérletek már

folyamatban vannak.

A projekt megvalósítása során, technikai újításként sikerült kiépíteni egy olyan mérési elrendezést, melyben egyidejűleg tudjuk mérni egy minta ESR és fluoreszcencia spektrumát. A méréshez a mintát kvarc kapillárisba töltjük, majd az ESR készülék rezonátorába helyezzük. A fluoreszcenciához szükséges gerjesztő fényt és a minta által emmitált fényt egy-egy optikai szállal vezetjük a kapillárisba, illetve a kapilláristól a fluoriméter detektorához. Ezzel az elrendezéssel, spin-jelzett lipideket beépítve a lipidmembránba új lehetőségek nyílnak a fehérjék hajtogatódásának vizsgálatára is. (Sajnos a FomA fehérje esetén e módszer lehetőségeit még nem tudtuk kiaknázni.)

A FomA fehérjével kapott eddigi eredményeket hamarosan egy nemzetközi konferencián mutatom be (14. ECSBM, 08.29. – 09.03., 2011, Coimbra, Portugal). A kísérleti adatokból ugyancsak előkészületben van egy kézirat, melyet (néhány kiegészítő mérés után) rangos nemzetközi folyóiratban szeretnénk publikálni.

4. Nagyobb változások a költségtervben

Az eredeti költségtervben szerepelt egy hűtős termosztát vásárlása, melyet az infravörös spektrométer mintatartójának termosztálására szerettünk volna használni. Időközben felmerült a lehetőség, hogy intézetünkben az egyik meglehetősen régi és gyakran gondokkal küszködő infravörös spektrométert lecseréljük egy újra. Ez csak többféle anyagi forrás összerakásával jöhetett létre, és mivel csoportunk – beleértve magamat is – a legjelentősebb felhasználója ennek a módszernek, a termosztátra szánt összeget a spektrométer megvásárlására fordítottam (természetesen az OTKA engedélyével). A hűtős termosztátot közben sikerült más források segítségével beszerezni/megépíteni. Ezen kívül néhányszor kellett kisebb átcsoportosításokat kérnem az OTKA-tól, elsősorban a készletbeszerzés javára (pl. a megmaradt beruházási keret terhére).

5. Egyéb

Bár a pályázatban kitűzött célokat csak részben sikerült teljesíteni (de azokból egy közlemény született nívós folyóiratban és egy másik előkészületben van, ill. eredményeimet nemzetközi konferencián is bemutatom poszteren), a projekt teljesítése során, mint fiatal kutató, sok hasznos és új elméleti és gyakorlati ismeretre tettem szert (egy projekt menedzselésével kapcsolatban is), amiket a továbbiakban hasznosítani tudok majd. A pályázat támogatását az OTKA-nak ezúton is köszönöm!

Szeged, 2011.08.24.

Kóta Zoltán témavezető