

***Escherichia coli* aminosav-transzporterek
vizsgálata**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Szegedi Tudományegyetem

Biológiai Doktori Iskola

Készítette: Szvetnik Attila

Témavezető: Dr. Kálmán Miklós

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány

Biotechnológiai Intézet

Szeged, 2008

1. TARTALOMJEGYZÉK

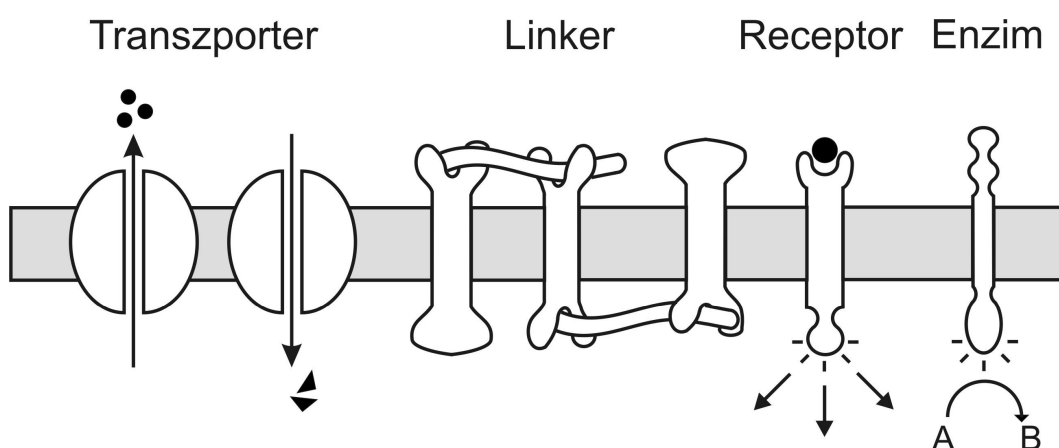
1. TARTALOMJEGYZÉK	2
2. BEVEZETÉS	4
2.1. A membránfehérjék élettani szerepe és jelentősége	4
2.2. A membránfehérjék csoportosítása	5
2.3. A transzmembrán fehérjék jellemzői és általános felépítése	7
2.4. A membránfehérjék vizsgálata	11
2.4.1. A topológia vizsgálata	12
2.4.1.1. A predikciós programok és korlátaik	14
2.4.1.2. A topológia meghatározására alkalmas kísérletes módszerek	15
2.4.1.2.1. Glikozilációs scanning	15
2.4.1.2.2. Cisztein-scanning	16
2.4.1.2.3. Proteázok és antitestek alkalmazása	16
2.4.1.2.4. Riporter fehérje fúziók	16
2.4.1.2.5. Biotiniláció	18
2.4.2. A térszerkezet vizsgálata	19
2.4.2.1. Mennyire elfogadható a kapott szerkezet?	21
2.5. Transzportfolyamatok <i>Escherichia coliban</i>	21
2.5.1. A metionin-transzport <i>Escherichia coliban</i>	23
2.5.2. A glutaminsav-transzport <i>Escherichia coliban</i>	24
2.5.2.1. A GltS	26
3. CÉLKITŰZÉS	28
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	29
4.1. Bakteriális törzsek és plazmidok	29
4.2. Vegyszerek	29
4.3. Táptalajok és tápoldatok	30
4.4. Plazmidtisztítás és transzformálás	31
4.5. A <i>metD</i> lókuszt azonosításánál alkalmazott módszerek	31
4.5.1. A <i>metD</i> promóterének vizsgálatához szükséges plazmidok készítése	31
4.5.2. Kromoszómális deléciók létrehozása	32
4.5.3. Komplementáló plazmidok készítése	32
4.6. A topológia vizsgálatához felhasznált módszerek	33

4.6.1. A <i>TnphoA</i>	33
4.6.2. A λ <i>TnphoA</i> szaporítása és titrálása	33
4.6.3. λ <i>TnphoA</i> mutagenézis és screening	34
4.6.4. A pGE1 és pGL2 plazmidok készítése	35
4.6.5. Egyirányú deléciók kialakítása	35
4.6.6. Fúziók létrehozása polimeráz láncreakcióval	37
4.6.7. A fúziós pontok helyének vizsgálata	37
4.6.8. Western-blot	38
4.7. Enzimatis mérések	38
4.7.1. Az alkalikus foszfatáz aktivitás meghatározása	38
4.7.2. A β -galaktozidáz aktivitás meghatározása	39
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	40
5.1. A metionin-transzport vizsgálata	40
5.1.1. A <i>metD</i> lókus azonosítása	40
5.1.1.1. A fenotípus tesztelése	41
5.1.1.2. Az <i>abc</i> promóterének vizsgálata	42
5.1.1.3. Az L-metionin transzport multiplicitásának kérdése	44
5.1.1.4. Kitekintés	46
5.1.2. A GltS topológiája	48
5.1.2.1. A GltS topológiájának predikciója	48
5.1.2.2. Kísérletes stratégia	48
5.1.2.3. Western-blot analízis	52
5.1.2.4. A GltS topológia modellje riporter fúziók alapján	53
5.1.2.5. A GltS topológiája	55
5.1.2.6. Összehasonlítás az emlős glutaminsav transzporterekkel	58
5.1.2.7. Riporter fúziók vagy cisztein-hozzáférési kísérletek?	60
6. ÖSSZEFOGLALÁS	62
7. SUMMARY	65
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	68
9. IRODALOMJEGYZÉK	69
10. FÜGGELÉK	78

2. Bevezetés

2.1 A membránfehérjék élettani szerepe és jelentősége

Az élőlényekben a biológiai membránok egyrészt elhatárolják a különböző összetételű kompartmenteket, másrészt a bennük elhelyezkedő membránfehérjék révén szelektív anyag- és információáramlást képesek lebonyolítani közöttük. A membránproteinek segítik az életfolyamatokhoz szükséges anyagok szabályozott ki- és bejuttatását a sejtbe, felfogják és közvetítik a közegből származó jeleket (szignál transzdukció), enzimatis aktivitással átalakíthatnak más molekulákat, és konkrét fizikai összeköttetést biztosítanak az egyes kompartmentek, például az extracelluláris tér és a citoplazma között (1. ábra).



1. ábra A membránfehérjék négy funkciója

A négy fő funkció révén a membránproteinek szinte az összes alapvetően fontos biológiai folyamatban részt vesznek. Az anyag- és jelátvitel lebonyolítása révén biztosítják a sejtek közötti kommunikáció formáit, a külső körülményekhez történő adaptáció lehetőségét. Ez a hormonális szabályzás, immunrendszer, ingerület-átvitel, energiatermelés, izomműködés, apoptózis, morfogenezis, sejtosztódás, a homeosztázis fenntartásának az alapja.

Egyszerűbb szervezeteknél - mint például a baktériumoknál - az élettani folyamatok nagyrésze a plazmamembránhoz kapcsolódik. Itt zajlik az anyagtranszport, az energiatermelés, az energiátárolás protonmotoros erő formájában, a transzmembrán jelátvitel, kemotaxis, a sejt mozgása a flagellumok révén, a sejtfal szintézis és a sejtosztódás irányítása.

A kompartmentalizáció miatt az eukarióták bonyolult belső membránrendszere (sejtszervecskék) további funkciókat irányít: a sejtmag és a citoplazma közötti anyagtranszportot, a fehérjék módosítását és elosztását (endoplazmatikus retikulum, Golgi-készülék), lebontó folyamatokat (lizoszóma, peroxiszóma), vezikuláris transzportot.

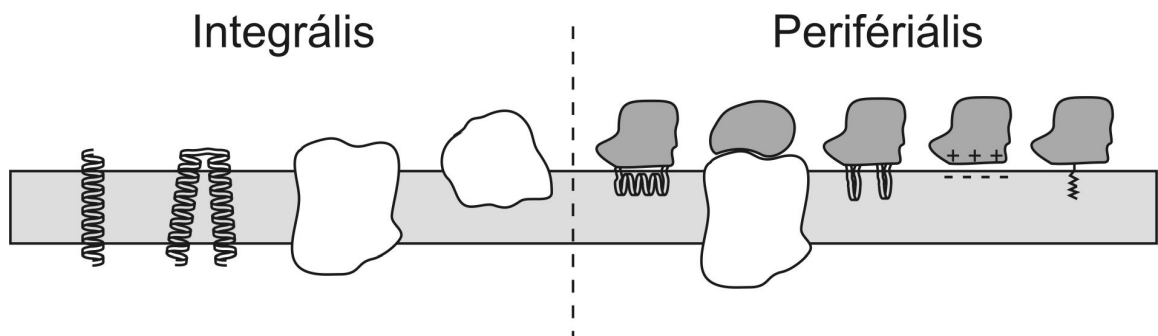
A membránfehérjék módosult vagy hibás működése – a fentiekből következően - rendkívül sok betegség okát képezi az emberi szervezetben is. A cisztikus fibrózis, Alzheimer-kór, szív-, vese- és emésztőrendszeri betegségek, cukorbetegség, multidrog rezisztencia, idegrendszeri betegségek, magas vérnyomás kóroka egyértelműen membránproteinekhez kapcsolható. A betegségek kezelésekor a gyógyhatású anyagok felszívódását és kiürülését, illetve a kórokozó mikroorganizmusok elleni védekezés lehetőségeit szintén a membrán transzportfolyamatai határozzák meg. Mindezek alapján nem meglepő, hogy a membránproteinek egyre növekvő figyelmet és érdeklődést váltanak ki az alapkutatás, az alkalmazott kutatás, az orvostudomány és a gyógyszeripar részéről egyaránt. Becslések szerint a jelenlegi gyógyszertargetek kb. 60 %-a membránprotein (receptorok és ioncsatornák) és a jövőben ez a hányad valószínűleg tovább fog emelkedni. A membránfehérjék gyakorisága és óriási jelentősége ellenére összességében keveset tudunk róluk. Vizsgálatuk nehezebb a szolubilis fehérjéknél, és az eddigi jelentős erőfeszítések ellenére még mindig van néhány leküzdhetetlennek tűnő technikai akadály.

2.2 A membránfehérjék csoportosítása

A fenti funkcionális felosztás (receptor, linker, enzim, transzporter) mellett számos egyéb sajátosság szerint is csoportosíthatjuk a membránfehérjéket. A legfontosabb szempontokat és a dolgozat további részében használt fogalmakat szeretném definiálni az alábbiakban.

A membránfehérjék olyan proteinek, amelyek a biológiai membránokhoz gyengébben-szorosabban kapcsolódnak. A kötődés erőssége alapján két csoportot lehet megkülönböztetni. Az integrális vagy intrinsic membránfehérjék a lipid kettősrétegbe süllyednek, olyan erős kölcsönhatást kialakítva a membránnal, hogy csak annak károsításával, detergensekkel vagy apoláris oldószerekkel vonhatók ki. A perifériális vagy extrinsic membránproteinek lazábban kapcsolódnak a membránhoz, emiatt könnyebben leválaszthatók (pl. magas só koncentrációval vagy a pH változtatásával). A perifériális membránproteinek többféleképpen,

parallel α -hélixszel, hidrofób hurok szekvenciával, kovalensen kötött lipid-ankorral (horgony) és ionos kölcsönhatással rögzíthetik magukat a membránhoz (2. ábra).



2. ábra A membránfehérjék típusai a membránhoz való kötődés alapján
A perifériális fehérjéknél a kötődés formái sorrendben: bemerülő α -hélix, kapcsolódás integrális TMP-hez, bemerülő hidrofób hurok, ionos kölcsönhatás, lipid-ankor.

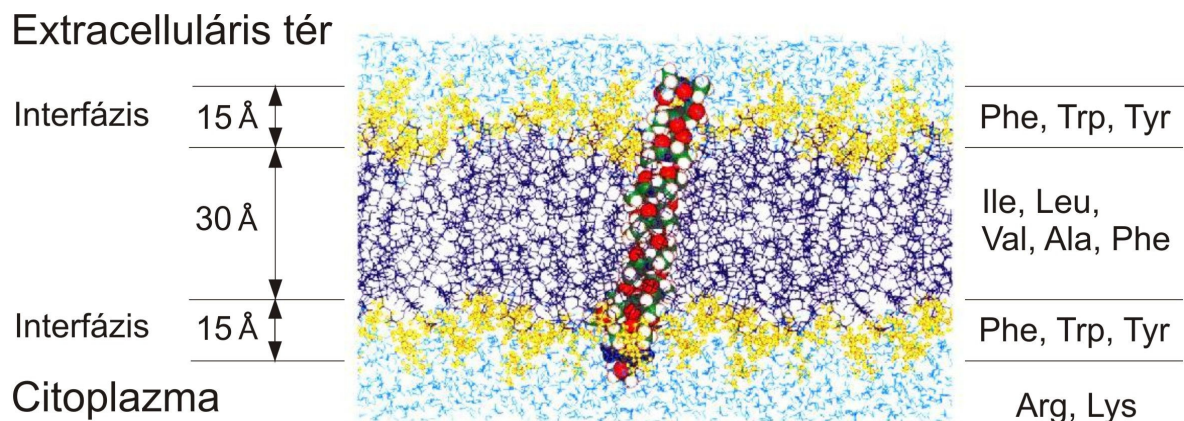
Lényeges, hogy egy membránprotein (MP) a membrán által elválasztott kompartmentekkel hogyan tart kapcsolatot. A monotopikus fehérjék kizárólag az egyik kompartmenttel érintkeznek (pl. perifériális MP-k). A bitopikus fehérjék egyetlen transzmembrán szegmens révén mindkét kompartmentbe benyúlnak. A kettő vagy több transzmembrán szegmessel rendelkező fehérjéket politópikusnak nevezik. Utóbbi két csoportot nevezzük transzmembrán fehérjéknek.

A transzport energiaigénye szerint lehet aktív és passzív. A transzporterek közül a csatorna-fehérjéken (porinok és ioncsatornák) passzívan, facilitált diffúzióval jut keresztül a szubsztrát. Aktív transzport során ATP (elsődleges aktív transzport), vagy a membrán két oldalán fenntartott ion koncentráció különbség szolgálhat energiaforrásként (másodlagos aktív transzport). Utóbbi csoportnál a szubsztrát transzportálásának az iránya lehet megegyező (szimport), vagy ellentétes irányú (antiport) az ion-gradienssel.

A „permeáz” kifejezéssel sokszor találkozhatunk a membránfehérjékkel kapcsolatosan, az egyik legrégebbi és sokféle értelemben használt fogalom. Számos eltérő definíció írja le, a legtagabb értelmezés szerint (Merriam-Webster orvosi szótár) bármely molekula, ami egy másik molekula sejtmembránon keresztüli átjutását segíti. Leggyakrabban a transzporterek szinonímájaként használják.

2.3 A transzmembrán fehérjék jellemzői és általános felépítése

A membránfehérjékben a transzmembrán szegmens(ek) tulajdonságai a membránok általános felépítéséhez igazodnak. A biológiai membránok alapja egy 6-9 nm vastag lipid kettősréteg. Ebben a szendvics-szerkezetben a hidrofób karakterű belső magot az amfipatikus lipidek feji része által kialakított hidrofil réteg borítja. A flexibilis membránban a lipidek viszonylag szabadon mozoghatnak többféle irányban is. A hőmozgás eredményeképpen a hidrofil réteg nem homogén, sokkal inkább egy grádiens, interfázis alakul ki a teljesen hidrofób membrán-mag és a vizes fázis között (Andersen és Koeppe, 2007; 3. ábra). Az egyedi transzmembrán szegmensek teljesen követik a lipid kettősréteg hidrofobicitási karakterét.

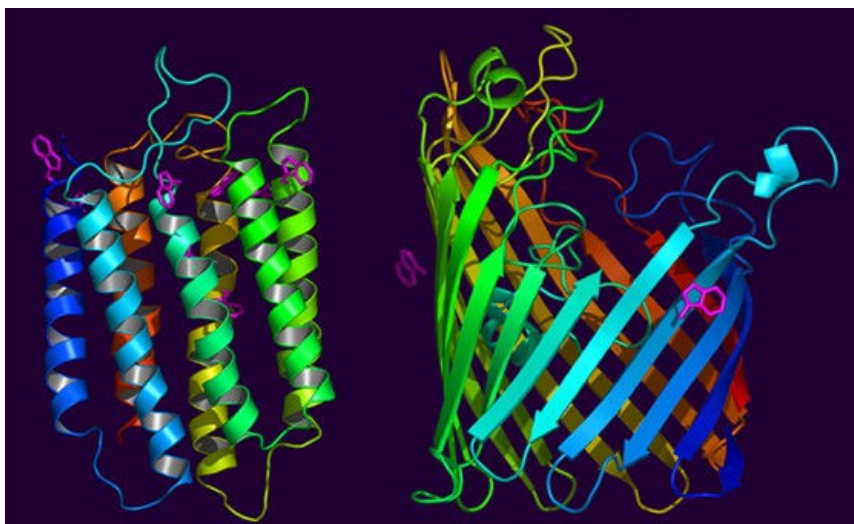


3. ábra Transzmembrán α -hélix a membránban
A feltüntetett aminosavak az átlagosnál gyakrabban fordulnak elő a jelölt rétegekben.

A politópikus membránproteineknél viszont az egész transzmembrán domén felülete együttesen alakítja ki a szükséges sávozottságot. A lipid kettősréteg és a belemerülő fehérjék hidrofobicitási karaktere nem mindig kompatibilis, hiszen a membránokat becslések szerint több mint ezer különböző lipid alkotja (van Meer, 2005). A specifikus összetétel egyben meghatározza a membrán (és a hidrofób mag) lokális vastagságát, fluiditását, esetleges görbületét. Az adott specifikus közeghez nem minden fehérje tud jól illeszkedni (hidrofób mismatch), emiatt a lipid kettősréteg önmagában is képes befolyásolni, szabályozni a belemerülő fehérje aktivitását (Andersen és Koeppe, 2007) és lokalizációját (McIntosh és Simon, 2006).

Felépítésük alapján az integrális membránfehérjéket két családba lehet sorolni. A kisebbik csoportot alkotják a Gram (–) mikroorganizmusok külső membránjában, archeákban, a

mitokondriumban és a kloroplasztban előforduló porinok. Esetükben a membránt átszelő ún. transzmembrán szekvenciák (TMS-ek) β -redős szerkezetűek, amelyek egy képzeletbeli henger palástját formázzák (β -hordó struktúra). A membránproteinek túlnyomó többségében viszont a transzmembrán szakaszok másodlagos szerkezete α -hélikális (4. ábra). Mivel utóbbi típus tekinthető általánosnak, valamint az általam vizsgált transzporterek is ebbe a csoportba tartoznak, az alábbiakban ezt a fajta szerveződést szeretném részletesebben tárgyalni.



4. ábra A membránfehérjék két családja
Baloldalon a bakteriorodopszin (α -hélikális), jobboldalon a mátrix porin (β -redős) látható.

A membránt átérő α -hélixek tipikusan 20-30 aminosavból épülnek fel, és a membrán síkjára nagyjából merőlegesen helyezkednek el. Az összes aminosav előfordulhat TMS alkotóként, de a hidrofób karakterűek vannak többségben: leucin, izoleucin, valin, alanin, fenilalanin. *In vitro* kísérletekben a prolin és a glicin a hélix-szerkezet destabilizációját okozza, mégis viszonylag gyakran előfordulnak a politópikus membránfehérjék TMS-eiben (a prolin kb. 5 %, Wallin és mtsai, 1997). Ahhoz, hogy egy fehérjeszekvencia be tudjon épülni a membránokba, gyakran elegendő egy megfelelő hosszúságú hidrofób szakasz. Ezt az egyszerűsítő szemléletet módosítják az újabb kísérleti megfigyelések, miszerint megfelelő környezetben gyakorlatilag bármilyen szekvencia képezhet transzmembrán szegmenst (Ota és mtsai, 1999). Másodlagos szerkezetét tekintve a TMS belső 12-13 aminosavnyi része a szekvenciától függetlenül hélikális szerkezetű (Nilsson és mtsai, 1998).

A poláros aminosavak közül gyakori a kisméretű, hélixek közötti interakciókban résztvevő szerin és treonin, viszont nagyon ritkák a nagyobb méretű, erősen poláros vagy töltéssel rendelkező aminosavak. Az aromás aminosavak a foszfolipidek poláros feji részével tudnak

kölcsönhatást kialakítani, ennek megfelelően gyakrabban fordulnak elő a hélixek végein. A politópikus fehérjék esetén a fehérje alsó és felső felületén ún. aromás övet lehet megfigyelni (Reithmeier, 1995).

Politópikus fehérjéknél a lipidekkel érintkező TMS-eknél további amfipatikus karakter figyelhető meg. Kialakul egy erősen hidrofób oldal, ami a lipid oldalláncokkal érintkezik, a hélix másik oldala pedig kevésbé hidrofób. Ennek a hidrofób momentumnak a nagysága és irányultsága predikciós jelentőséggel bír. A belső TMS-eknél ez kevésbé, vagy egyáltalán nem figyelhető meg, kisebb átlagos hidrofobicitásuknak és az összetettebb interakcióknak köszönhetően.

A kettőnél több TMS-t tartalmazó proteinek esetében a hélixek nagyon kompakt, minimális térkitöltésű „kötegeket” alkotnak. A pakolódás mértéke a szolubilis fehérjékhez képest nagyobb (Eilers és mtsai, 2000). A szoros interakciót alapvetően kétfajta kölcsönhatási típus, motívum biztosítja. Az első a glikoforin A esetében figyelték meg először: a hélixek érintkező oldalain kis oldalláncú aminosavak helyezkednek el, sima kapcsolódási felületet képezve. A GxxxG, illetve általánosan a ZxxxZ (ahol Z=kis oldalláncú aminosav; Gly, Ala, Ser, Thr) motívumot ezután sok más membránproteinben is megtalálták. Feltételezések szerint a kis oldalláncok miatt a C α hidrogénjei részt tudnak venni hidrogénkötések kialakításában (Curran és Engelman, 2003), ezáltal a hélixek legszorosabb pakolódását és a fehérje egészének stabilizációját teszik lehetővé (Walters és DeGrado, 2006; Eilers és mtsai, 2002).

A másik kölcsönhatás a szolubilis proteineknél is nagy jelentőséggel bír (például a leucin-zipzár fehérjék esetében). A szakirodalom a szemléletes „knobs-into-holes” kifejezést használja a Crick által bemutatott kölcsönhatásra (Crick, 1953). Az α -hélixek felülete egyenetlen, hepehupás, mert az aminosav oldalláncok térbeli kiemelkedéseket (knobs) és hiányuk bemélyedéseket (holes) alakít ki. Amennyiben a „göngyöök” jól illeszkednek egymáshoz és komplementer felületet alkotnak, akkor a szomszédos hélixek között erős interakció alakul ki. Membránfehérjéknél az LxxLxxxLxx motívum a hélix-hélix kapcsolatok 42 %-ért felelős, az oldallánc mérete miatt azonban kevésbé szoros kölcsönhatást biztosít a GxxxG-hez képest. A motívumban a leucint helyettesítheti alanin, izoleucin és valin is (Eilers és mtsai, 2002).

A szabályos α -hélixben az oldalláncok redők és árkok vonulatait alakítják ki. A szabályos α -hélix tengelyéhez képest ezek 26 fokos szögben futnak. A szomszédos hélixek a

legszorosabban úgy tudnak elhelyezkedni, ha az egyik hélix redője pontosan a másik árkába illeszkedik. Emiatt a TMS-ek leggyakrabban 0-40 fokos szöget zárnak be (Bowie, 2005).

A transzmembrán hélixeket egyszerűsítésképpen egyenes, henger-szerű struktúraként szoktuk ábrázolni és elképzelni. A bővülő számú nagyfelbontású kristályszerkezetek szerint azonban túlnyomó többségben vannak a görbült, torzult szerkezetű hélixek. Részben az eltérő torzulás lehetősége biztosítja a megegyező alapstruktúrájú fehérjék sokféleségét és ezzel evolúciójuk alapját (Yohanna és mtsai, 2004). Érdekes példaként megemlíteni a G-protein kapcsolt receptorok családját vagy a Nagy Facilitátor Szupercsaládot (MSF). Mindkét esetben egy azonos alapváz-struktúra figyelhető meg, az elsődleges szekvenciák ugyanakkor csak kevésbé homológok (Bowie, 2005; Hirai és mtsai, 2003).

A transzmembrán szegmenseket változatos hosszúságú, összetételű és szerkezetű hurokszekvenciák kötik össze. Az erősen poláris, valamint a töltéshordozó aminosavakat tartalmazó szegmensek összetételük révén irányítják a politópikus fehérjék membránbeli lefutását. Egy TMS membránbeli irányultságát alapvetően a hidrofób szekvencia két oldalán elhelyezkedő töltéssel rendelkező aminosavak határozzák meg. Már ismert topológiájú membránproteinek összehasonlításakor észrevették, hogy a pozitív töltést hordozó aminosavak többsége a citoplazmatikus térben helyezkedik el (von Heijne, 1986; von Heijne és Gavel, 1988). Ez az ún. „pozitív belül”-szabály általánosságban is megfigyelhető tendencia, bár kifejezettebb a prokarióta szervezetekben (Gafvelin és mtsai, 1997).

A membránfehérjék szerkezetét tovább differenciálva, a többségben lévő poláros karakterű hurkok mellett előfordulnak apolárisak is, amelyek a membránba merülve részt vesznek az α -hélix-köteg kialakításában (ún. bemerülő hurkok). Az aquaporinok esetében a membrán mindkét oldaláról benyúlik egy-egy ilyen hurok. Az egymás felé néző szekvenciák a membrán közepén találkoznak és a vízmolekulákat áteresztő pórust alakítják ki (Murata és mtsai, 2000; Fox és Lu, 2007). Hasonló struktúrát írtak le számos más transzporter fehérjében is (Gltph: Yernool és mtsai, 2004; KcsA: Roux és McKinnon, 1999; EEAT: Slotboom és mtsai, 1999, GlpF: Fu és mtsai, 2000) így ez a struktúra egyre inkább gyakorinak tűnik a transzporterek körében. Bioinformatikai predikciók alapján a politópikus MP-ek 10 %-ánál előfordulnak (Viklund és mtsai, 2006).

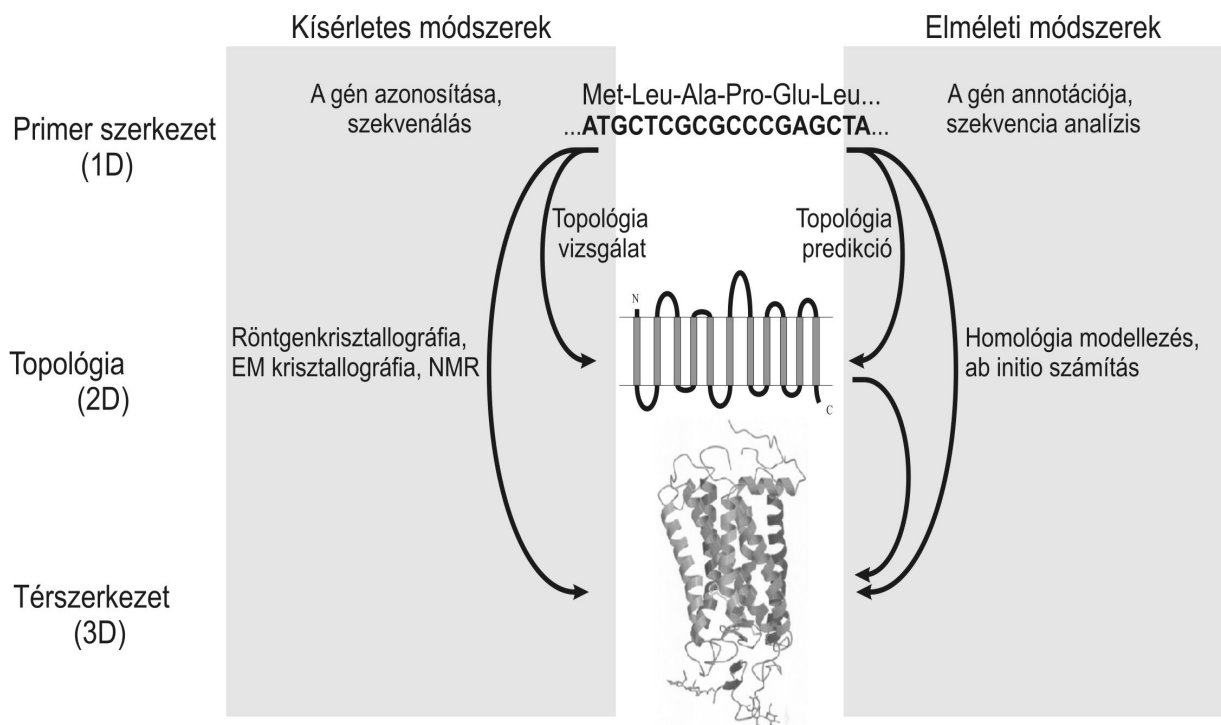
Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a bővülő térszerkezeti információk jelentősen összetettebb képet tárnak elénk a TMS-ek szerkezetéről, mint ahogyan azt néhány évvel korábban elképzeltük.

2.4 A membránfehérjék vizsgálata

Kísérletes szempontból a TMP-k vizsgálata jóval nehezebb, mint a szolubilis fehérjéké. Két évtizeddel korábban azonban még úgy tűnt, a bioinformatika képes lesz a technikai problémákat ellensúlyozni. A TMP-k szerkezetének elméleti predikciója, vizsgálata akkoriban könnyebbnek látszott, mint a szolubilis fehérjéké. A komoly elvárások alapja az volt, hogy az α -hélix köteg típusú TMP-k szerveződése alapvetően egyszerű. Elvileg csak a transzmembrán régiókat kell kijelölni, azután ezek membránbeli lefutását meghatározni, végül a TMS-ek összerendeződését kitalálni. A bioinformatika könnyű és gyors kezdeti sikereket ért el a TMS-ek kijelölésében (Kyte és Doolittle, 1982), valamint a topológia predikciójában a „pozitív belül” szabály megfigyelésével (von Heijne, 1986). A hélixek pakolódásának a kérdése is megoldhatónak tűnt, mivel a szolubilis fehérjékhez képest jóval kevesebb térbeli pozícióval és mozgási lehetőséggel kell számolni. Az utóbbi kb. 10 év eredményei azonban ennél bonyolultabb szerveződésre és finomabb kölcsönhatásokra engednek következtetni.

Becslések szerint az élőlényekben átlagosan a gének 20-30 %-a kódol membránfehérjét (Krogh és mtsai, 2001). Ehhez képest és óriási jelentőségükhöz viszonyítva a róluk rendelkezésre álló adatmennyiség kicsi, a szolubilis fehérjékkel összevetve pedig elenyészőnek is mondhatnánk. A nagyfelbontású térszerkezetek száma bár gyarapodik, összesen csak 178 különböző fehérje struktúrája ismert (MPDB, 2007. decemberi állapot). Ugyanakkor, ez a szám az összes membránproteint tartalmazza, tehát a perifériális fehérjék típusait is. Emiatt a jelenleg jellemzett 102 fehérjecsaládból mindössze csak 36 tartalmaz poliotópikus transzmembrán fehérjét (MPDB; Raman és mtsai, 2006). Elenyészően kevés az ismert térszerkezetű eukarióta fehérjék száma, a humán membránproteineket az aquaporinok és a leukotrién C4 szintáz képviselik (l. Függelék). Kijelenthetjük, hogy a folyamatosan fejlődő szoftverek és informatikai kapacitás ellenére a bioinformatika még napjainkban sem tudja pótolni a membránproteinekkel kapcsolatos ismeretek hiányát; a lényeges információkat a kísérletes módszerek szolgáltatják. Természetesen, az eredmények kiértékeléséhez nélkülözhetetlenek speciális szoftverek, de önmagukban még nem elegendőek.

A TMP-k vizsgálatakor három szerkezeti szintet lehet megkülönböztetni (5. ábra). Először is, valamilyen módon meg kell ismerni a fehérje aminosavsorrendjét, azaz elsődleges szerkezetét. Ehhez szükséges a fehérjét kódoló gén szekvenciája vagy a tisztított fehérje. Sok esetben ma már rendelkezésre áll a vizsgált organizmus teljes genomszekvenciája.



5. ábra Az integrális membránproteinek vizsgálati szintjei és módszerei (EM kristallográfia-elektron mikroszkópiával kombinált elektron diffrakció).

Ez azonban még nem jelenti azt, hogy egy adott funkcióhoz nagyon könnyű lenne a kódoló géneket hozzárendelni. A világ legjellemzettebb élőlényének, az *Escherichia coli*-nak a teljes genomszekvenciáját 1998 óta ismerjük. Ennek ellenére ismeretlen a gének kb. 24 %-ának a feladata és mindössze 66 %-ról vannak kísérletes adatok (Karp és mtsai, 2007; Riley és mtsai, 2006). Még rosszabb a helyzet az eukarióták esetében: a *Saccharomyces cerevisiae* esetében 37 %, *Arabidopsis thaliana*-nál 5 %, *Drosophila melanogaster*-ben és egérben 4-4 % a kísérletesen igazolt funkciójú gének aránya.

A szakirodalom, bioinformatikai eszközök és az Interneten elérhető adatbázisok felhasználásával azonban sokszor sikerül a kódolt fehérjék funkcióira következtetni. Az aminosavsorrend birtokában mind kísérletes, mind elméleti módszerekkel megközelíthetőek a magasabb szerkezeti szintek: a topológia és a háromdimenziós dimenziós struktúra.

2.4.1. A topológia vizsgálata

A membránfehérjék membránbeli lefutása, más szóval topológiája lényegében a kétdimenziós szerkezetet jelenti. Meghatározása sokféle biokémiai és molekuláris biológiai

technikával elvégezhető, manapság már 400-nál is több TMP membránbeli lefutása ismert (Elofsson és von Heijne, 2007).

Az élő szervezetekben a membránok különböző fizikai és biokémiai jellemzőkkel leírható kompartmentek határát képezik. A biokémiai módszerek a membrán elhatároló funkcióját használják ki a topológia vizsgálatához. A membrán egyik oldalára olyan reagenseket vagy fehérje molekulákat juttatnak, amelyek számára csak az azonos oldalon megtalálható fehérje hurkok hozzáférhetőek. A riporter fúziós eljárás az elválasztott kompartmentekben uralkodó eltérő fiziológiai körülményeken alapul (Jennings, 1989; Traxler és mtsai, 1993). Mindkét stratégia közös jellemzője, hogy a vizsgált fehérje megfelelően módosított változatait kell előzőleg létrehozni (van Geest és Lolkema, 2000). A membránfehérjék módosítását az teszi lehetővé, hogy meglepően stabil a szerkezetük. Mutagenesis vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy nagyon kevés olyan egyedi mutáció van, amely önmagában a fehérje inaktivációjához vagy a szerkezet felbomlásához vezet. Néhány bakteriális membránprotein esetében végeztek ún. scanning analízist, amely során az összes aminosavat egyenként cserélik valamilyen semleges karakterű, kisméretű aminosavra, alaninra (alanin-scan) vagy ciszteinre (cisztein-scan). A laktóz permeáz esetében mindössze hat (401 aa-ból, Frillingos és mtsai, 1998), a tetraciklin rezisztencia fehérjében tizenhét (400 aa-ból, Tamura és mtsai, 2001) ilyen kulcsfontosságú aminosav volt. Az egyes fehérjerészek azonban eltérő érzékenységet mutatnak a különböző módosításokkal szemben. A transzmembrán szekvenciák például sokkal érzékenyebbek a töltéssel rendelkező aminosavak beépítésére, rövid deléciókra, ezzel szemben a hurkok (különösen a hosszabbak) jól tűrik az aminosav cserét, deléciókat és inszerciókat is (Weinglans és Kaback, 2000). A membránfehérjék többsége még csonkolt formájában is megőrzi a natív topológiáját. Emiatt lehetséges a riporter fúziós stratégia sikeres alkalmazása (lásd alább).

Az integrális membránproteineknek általában egyetlen jól meghatározott membránbeli lefutása van. Feltételezések szerint azonban léteznek olyan proteinek is, amelyek módosítatlanul is kétféle „stabil” topológiát vehetnek fel (Rapp és mtsai, 2006). Ezeknél a pozitív töltést hordozó aminosavak azonos számban vannak jelen a membrán két oldalára kerülő hurkokban. A kettős topológiájú (dual-topology) fehérjék 1:1 arányban, ellentétes orientációban vannak jelen. A csoport legjobban vizsgált tagja az EmrE, egy kisméretű multidrogrezisztencia fehérje. A legújabb szerkezeti modell (Chen és mtsai, 2007; Pornillos és mtsai, 2005) és cisztein-hozzáférési vizsgálat (Nara és mtsai, 2007) szerint az aktív fehérje homodimer, amit két antiparallel helyzetű monomer alkot. Egy másik kutatócsoport eredménye szerint a parallel kapcsolt tandem párok is aktívak (Steiner-Mordoch és mtsai,

2008; Schuldiner, 2007), ami egyféle topológiára enged következtetni. Az EmrE szerkezetén túlmutató, a vizsgálati módszerek megbízhatóságára is kiterjedő, több éve tartó vitában úgy tűnik az *in vivo* biokémiai eredmények tűnnek meggyőzőbbnek, és a kristályszerkezet kerül elutasításra (McHaourab és mtsai, 2008). Ez egyben azt is jelenti, hogy a kettős topológiájú membránfehérjék létezésére - bár kiváló elméleti háttérrel biztosítanak a membránfehérjék evolúciójának magyarázatára (Rapp és mtsai, 2007.; Lolkema és mtsai, 2008) - jelenleg nincs egyértelmű kísérletes bizonyíték.

A fehérje önálló tulajdonságai mellett a közeg, konkrétan a membrán lipidösszetétele is erősen befolyásolja a membránbeli lefutást (van Klompenburg és mtsai, 1997). Bogdanov és munkatársai (2002) egy genetikailag módosított, foszfatidil-etanolamin (PE) szintézis deficiens *E. coli* törzsben vizsgálták a laktóz permeáz (LacY) működését. A mutáns törzsben a LacY fehérje első fele ellentétes orientációt vett fel, míg második fele megtartotta a normál lefutását. Még érdekesebb azonban az az eredmény, hogy kívülről adagolt PE hatására a fehérje visszanyerte a natív topológiáját és aktivitását is. A csoport későbbi munkája (Zhang és mtsai, 2003) szerint a fenil-alanin permeáz (PheP) és a γ -amino-vajsav transzporter (GabP; Zhang és mtsai, 2005) esetében is topológia változáshoz vezetett a PE-hiányos közeg, amely reverzibilisnek bizonyult PE adagolás hatására.

Bár a PE-hiányos membrán nagyon eltér a fiziológiás állapottól - hiszen az *E. coli* membránlipidjeinek 75 %-a PE -, felmerül annak a lehetősége, hogy a membránfehérjék topológiája a membránba történő beépülés után is dinamikusan változhat, és ezt a membrán lipid összetétele szabályozhatja.

2.4.1.1 A predikciós programok és korlátaik

A transzmembrán szegmensek kijelölését és a topológia előrejelzését sokféle, különböző megközelítést alapul vevő szoftverrel elvégezhetjük. A legegyszerűbbek az egyes aminosavakhoz különböző hidrofobicitási értékeket rendelnek hozzá, majd egy 16-30 aminosavas szegmens átlagát ábrázolják. A keletkező grafikonon látható nagy hidrofobicitási csúcsok kijelölik a lehetséges TMS-eket. Sajnos, ez a nagyon egyszerű megközelítés nem képes megkülönböztetni a globuláris fehérjéket a membránfehérjéktől, a szignálszekvenciákat a TMS-ektől. A második generációs szoftverek már valódi topológia predikciót biztosítanak és összetett elméleti módszereket alkalmaznak: homológia-keresést, tanuló neuron-hálózatot,

Rejtett Markov-modellt, és ezek kombinációit. A szerzők a 90-es évek második felétől sorra publikálták a pontosabbnál pontosabb szoftvereket, nemegyszer 85-95 % feletti találati arányt említve (pl. Rost és mtsai, 1995; Gromiha, 1999). A kevésbé fényes felhasználói tapasztalatok aztán a valós pontosság szisztematikus vizsgálatához vezettek (Möller és mtsai, 2001; Ikeda és mtsai, 2002; Chen és mtsai, 2002). Általánosságban a következő hiányosságokat tapasztalták: a legjobb módszerek is átlagosan kb. 70 %-os valószínűséggel dolgoznak, a TMS-ek eleje és vége nehezen meghatározható, az ötnél több TMS-sel rendelkező fehérjéknél szignifikánsan rosszabb predikciós hatékonyságot lehet elérni (Chen és mtsai, 2002; Elofsson és von Heijne, 2007). A programok tehát feltétlenül hasznosak és segíthetik a kísérletes munkát, de nincs tökéletes szoftver. A bonyolultabb szekvencia környezetben megbízhatatlanok; „a predikció az csak predikció” (Elofsson és von Heijne, 2007). Véleményem szerint, a lipid-környezet - és bizonyos belső hélixek számára a fehérje közeg - figyelembe vétele nélkül a lineáris szekvencia információ eleve nem elegendő a hatékony predikcióhoz.

2.4.1.2 A topológia meghatározására alkalmas kísérletes módszerek

2.4.1.2.1 Glikozilációs scanning

Eukarióta membránproteinek vizsgálatára elterjedten alkalmazott megoldás. Az endoplazmatikus retikulum lumenében található az oligoszacharid transzferáz (OST) enzim, amely az Asn-X-Thr/Ser konszenzus szekvencia aszparaginjához egy oligoszacharid molekulát kapcsol (N-glikoziláció). Mivel a reakció kompartment-specifikus módon játszódik le, alkalmas a topológia felderítésére. A glikozilációs scanning első lépése a vizsgált proteinben normálisan előforduló glikozilációs helyek eliminálása. A módosított fehérje különböző régiókban irányított mutagenézissel új konszenzus glikozilációs helyet hoznak létre. Az endoplazmatikus retikulum lumenébe kerülve a módosított régió bekövetkezhet az N-glikoziláció, míg a citoplazmában elmarad. Az egyetlen helyen glikozilált fehérje SDS poliakrilamid gélen megfuttatva hozzávetőlegesen 2,5 kDa-nal nagyobb molekulatömegűnek látszik, mint a módosítatlan forma.

2.4.1.2.2 Cisztein-hozzáférés

Az eljárás alapja az, hogy a cisztein szulfhidril reagensekkel reakcióba lép, melynek eredményeképpen kovalensen módosított cisztein oldalláncot kapunk. Különböző membránon átjutó és impermeábilis szulfhidril reagensek ismertek, amelyek lehetnek fluoreszcens sajátosságúak, tartalmazhatnak biotin csoportot vagy radioaktív jelölést. A detektálás ennek megfelelően fluoreszcencia alapján, sztreptavidin kötődése révén és autoradiográfiával történik. A cisztein-scanning mutagenesis során egyetlen ciszteint tartalmazó fehérje sorozatot kell létrehozni. A „nemkívánatos” ciszteineket általában szerinre cserélik. A cisztein viszonylag hidrofób, kisméretű aminosav, ezért új helyekre való beépítését a fehérje általában tolerálja. A fentiekben felsorolt reagensek segítségével a ciszteinek lokalizációja meghatározható teljes sejtes rendszerekben, szferoplasztokban és vezikulákban is. A módszer nagy előnye, hogy a vizsgált fehérjében csak kisebb változtatásokat, pontmutációkat kell létrehozni, amelyek általában nem befolyásolják az aktivitást és a szerkezetet, így a topológiát sem.

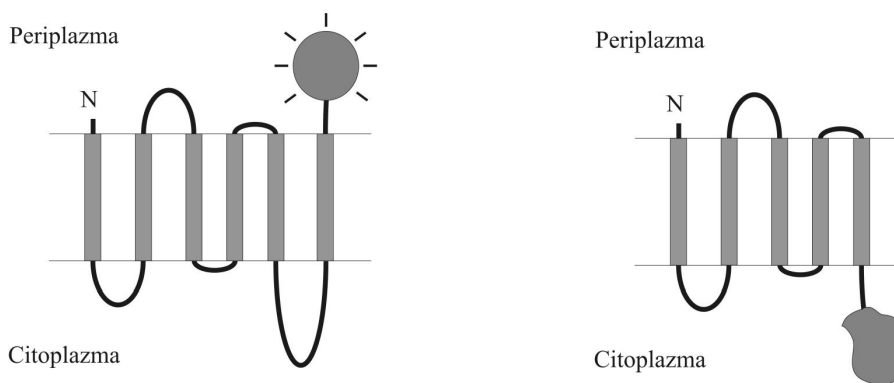
2.4.1.2.3 Proteázok és antitestek alkalmazása

Nagyméretű molekulák nem képesek átjutni a membránon, így számukra csak az azonos oldalon található membránfehérje-részek hozzáférhetőek. Ezek alapján proteázok és antitestek is használhatók a membránbeli lefutás meghatározására. Ilyenkor a membránprotein szekvenciájába specifikus proteáz felismerő helyet (pl. His-tag, Xa faktor), illetve epitópot (pl. Myc, FLAG, prolaktin) építenek.

2.4.1.2.4 Riporter fehérje fúziók

Az 1980-as évek közepétől kezdődően egyre nagyobb teret hódít a génfúziós stratégia, elsősorban bakteriális proteinek analízisében. Alkalmazása nem csak topológiai információkat biztosít, hanem a membránproteinek összeszerelődését, ennek szabályosságait is vizsgálhatóvá teszi. A módszer két alapvető kísérleti eredményen alapul. Az első közülük az, hogy sikerült olyan ún. riporter fehérjéket találni, amelyek a bakteriális citoplazma membránnak csak az egyik oldalán mutatnak magas aktivitást. A másik fontos tapasztalat az,

hogy a transzmembrán szakaszok orientációját a közvetlenül előttük és utánuk található szignálok határozzák meg elsősorban. Ezért, ha egy politópikus membránprotein végéről néhány transzmembrán szakaszt eltávolítunk, akkor a rövidített fehérje lefutása legtöbbször ugyanolyan marad, mint a teljes fehérje megfelelő szakaszának lefutása. Az eljárás során a riporter fehérjék promóter és startkodon nélküli génjét a membránfehérje génjének különböző pontjaihoz illesztik a megfelelő leolvasási keretben. A hibrid génről a baktérium sejtekben egy fúziós fehérje képződik, amely beépül a citoplazma membránba. A riporter fehérje vagy a citoplazmában marad, vagy kijut a periplazmatikus térbe attól függően, hogy a membránprotein mely részéhez kapcsolódik. A riporter enzim aktivitása alapján ezután következtetni lehet a fúziós pont szekvenciakörnyezetének lokalizációjára (6. ábra).

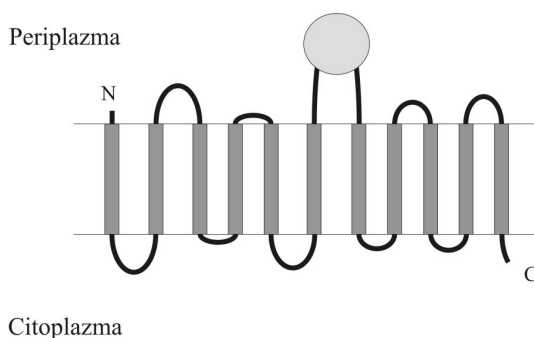


6. ábra A riporter fúziós technika alapja

Egy periplazmatikusan aktív riporter viselkedése (pl. alkalikus foszfatáz). A magas enzimaktivitás azt jelzi, hogy a riporter kijutott a periplazmatikus térbe. A citoplazmába kerülő riporter inaktív marad.

Riporter fehérjeként elsőként az *Escherichia coli* alkalikus foszfatázát (PhoA) alkalmazták topológia meghatározására (Manoil és Beckwith, 1986). A PhoA a periplazmatikus térben működőképes, a citoplazmában inaktív. A sejten belüli körülmények között néhány eszenciális diszulfid-híd nem tud létrejönni, ezért az aktív konformáció sem alakulhat ki. A PhoA „komplementereként” kezdték használni később az *Escherichia coli* β -galaktozidáz enzimét (LacZ), mint citoplazmatikusan aktív riportert. A periplazmatikus régiókhoz fuzionált β -galaktozidáz csak alacsony aktivitást mutat, mert a transzport során beszorul a membránba. Emiatt citoplazmatikus régiók azonosítására alkalmas. A PhoA és LacZ riporterek aktivitása kromogén szubsztrátok segítségével egyszerűen nyomon követhető és mennyiségileg mérhető (Maniatis és mtsai, 1982; Brickman és Beckwith, 1975). A topológia vizsgálatára más fehérjék is alkalmasnak bizonyultak. Ilyenek például az intracellulárisan aktív kloramfenikol-acetil-transzferáz és a GFP, valamint a periplazmában működő β -laktamáz.

Egy membránprotein lefutásának meghatározásához számos fúziós fehérjét kell kialakítani, amelyekben a fúziós pont különböző régiókban van. Az egyik megoldás során a membránfehérje génjének 3' végéről irányított mutagenézissel egyre hosszabb szekvenciát távolítanak el, majd a megmaradó végekhez kapcsolják a riporter géneket. Végeredményben a fúziós pont az N-terminálshoz egyre közelebb kerül, és különböző méretű C-terminális szekvencia részek teljesen hiányoznak a fúziós fehérjéből (C-terminális csonkolás). Ez a stratégia nagyon célravezető és sikeres, ugyanakkor a C-terminális szekvenciák eltávolításával elveszhetnek bizonyos topológiát befolyásoló szignálok is, ezért az eredmények értékelésekor körültekintően kell eljárni. Az ún. szendvics fúziók kisebb mértékben zavarják a normális lefutást. Ez esetben a riporter gént - a leolvasási keretet figyelembe véve - beépítik a membránfehérje génjébe és nem mögé illesztik. Tehát a teljes vizsgált protein megmarad, és a riporter egy N-terminális és egy C-terminális szakasz közé ékelődik (7. ábra).



7. ábra A szendvics-fúzió szerkezete

2.4.1.2.5 Biotiniláció

A biotin karboxilázok kovalensen kötött biotin segítségével katalizálják a karboxil-csoport átadását metabolitok között. A biotin csoport kötődése a citoplazmában történik poszttranszlációsan. E kompartment-specifikus folyamatot a biotin ligáz katalizálja. *E. coli*-ban az acetil-CoA-karboxiláz az egyetlen biotinálódó fehérje. Az acetil-CoA-karboxiláz egy nyolcvan aminosavas fragmentje, a BAD domén szükséges a biotinilációhoz. A BAD domén szendvics fúziókban és C-terminális csonkolás során is használható lokalizációt jelző markerként. A periplazmatikusan elhelyezkedő fehérje szekvenciához fuzionált BAD domén általában nem biotinilálódik. Abban az esetben viszont igen, ha a régió lassan transzportálódik. Ilyen módon a BAD fragment a membránproteinek összeépülésének

kinetikájáról is adhat információt. A biotin jelenlétét a biotin-avidin rendszerrel lehet detektálni.

2.4.2. A térszerkezet vizsgálata

A háromdimenziós szerkezet meghatározását jelenleg (az alkalmazás gyakoriságának sorrendjében) röntgenkristallográfiával, mágneses magrezonancia spektroszkópiával (NMR), elektron mikroszkópiával kombinált elektron diffrakcióval (EM kristallográfia) és elméleti számításokkal végzik. Szerkezeti információkat szolgáltat még ezeken kívül az atomi erő mikroszkópia (AFM) is, de kisebb felbontásából adódóan elsősorban nagyobb konformációs különbségek, valamint fehérje-fehérje kölcsönhatások, komplexek megfigyelésére alkalmas.

Az összes kísérletes megoldáshoz nagy fehérje koncentráció szükséges, és a membránfehérjék esetében a problémák már ennél a kritériumnál elkezdődnek (1. táblázat).

Módszer	Szükséges fehérje koncentráció (mg/ml)	Kristály	Felbontás (Å)
Röntgenkristallográfia	10	Szükséges (3D)	1,5-2,5
EM kristallográfia (kis target)	1	Szükséges (2D)	1,9-4
EM kristallográfia (nagy target)	0,1	Nem szükséges	10-20
NMR-spektroszkópia	10	Nem szükséges	Nem értelmezhető

1. táblázat A kísérletes szerkezet-vizsgálati módszerek összehasonlítása
(Lacapere és mtsai, 2007)

A membránfehérjék túltermeltetése mind az eukarióta, mind a prokarióta szervezetekben komoly kihívást jelent. Szerkezetvizsgálati szempontból azok a fehérjék jelentenek könnyebb feladatot, amik eleve nagy mennyiségben fordulnak elő (pl. rodopszin, citokrómok). A célfehérje azonban legtöbbször kis mennyiségben van jelen és mennyiségük megnövelése gyakran önmagában toxikus a gazdasejt számára.

A prokarióta eredetű fehérjéknél a legkedveltebb heterológ expressziós gazdaszervezet még napjainkban is az *Escherichia coli*. A MP-ek expressziójakor tapasztalható toxicitás egyik oka a szekréciós rendszer túlterhelése, aminek következményeként a légzési lánc, a citromsav ciklus és más fontos endogén proteinek mennyisége lecsökken (Wagner és mtsai,

2007). A toxicitás problémája mellett a topológia és a háromdimenziós szerkezet kialakításának a folyamata is eltér(het) az idegen környezetben.

Még több faktor nehezíti az eukarióta eredetű fehérjék túltermeltetését prokarióta gazdaszervezetekben. A prokariótákban ugyanis jelentősen eltérő a lipid összetétel (pl. a membránból hiányzik a koleszterin), a dajka-fehérjék mennyisége, a fehérje szintézis sebessége, a folding sebessége, a szekréció mechanizmusa, kisebb a betölthető membránfelület, inkomplett vagy hiányzik a poszttranszlációs modifikáció (pl. nincs glikoziláció) (Wagner és mtsai, 2006). Az általában jól működő „pozitív belül” szabály az eukarióta fehérjéknél kevésbé markáns. Mindezek ellenére vannak példák eukarióta MP-k funkcióképes formában történő heterológ expressziójára (pl.: humán CB2 receptor, emlős SERT).

A sikeres termeltetést követően a target fehérjét ki kell tisztítani. Ennek megkönnyítése érdekében gyakran módosítják a célfehérje szekvenciáját (leggyakrabban His-taggal).

A membránfehérjék helyes térszerkezetének kialakításához és megtartásához a lipid-közeg elengedhetetlenül szükséges. Amennyiben a túltermeltetés során a fehérje a gazdaszervezet membránjába képes beépülni, akkor a tisztítás lehetséges ún. detergens micellák létrehozásával. Különböző detergensok kipróbálásával és a preparálás körülményeinek változtatásával szerencsés esetben megőrizhető a fehérje aktivitása. Ha a target fehérje zárvány testet (inclusion body) képez, akkor a tisztítás jóval bonyolultabb és nehezebb, hiszen a fehérje normál szerkezetét is vissza kell állítani. A tisztítás módszere nagyban függ a fehérje egyedi tulajdonságaitól, emiatt gyakorlatilag csak speciális megoldások léteznek, nincs általánosan alkalmazható technika.

Egy lehetséges megoldás lehet a fenti problémákra a sejtextraktumokkal történő *in vitro* fehérjetermelés. Ez a sejtben történő expresszió számos problémáját megkerüli, és ezért komoly előrelépéssel kecsegtet a membránproteinek szerkezetvizsgálatában. A módszer előnye a könnyebb tisztíthatóság, a jó konverziós arány és az, hogy a termeltetés körülményei széles skálán változtathatók. A reakciót továbbá ki lehet egészíteni egyéb szükséges összetevőkkel, mint például dajka-fehérjékkel, diszulfid izomerázzal, glikozilációs enzimekkel. A fehérjék könnyebb izotópos jelölése mellett, lehetséges speciális hidrofób közegek előállítása is, akár membránba illesztés is. A kapott fehérjemennyiség eléri a szerkezetvizsgálathoz szükséges mg/ml-es koncentrációt (Junge és mtsai, 2008).

A tisztított fehérje sorsa ezután a választott szerkezet-meghatározó módszertől függ. Túlnyomó többségben a röntgenkristallográfiát és az NMR spektroszkópiát használják napjainkban. A két módszer alkalmazhatósága eltérő, emiatt más szerkezeti kérdések

megválaszolására használhatók. Kisebb méretű proteinek vagy peptidek vizsgálatára (<40 kDa) inkább az NMR spektroszkópia alkalmas. A módszer óriási előnye, hogy a minta oldatban, a fiziológiához közelebbi körülmények között is analizálható, így lehetővé teszi különböző dinamikus folyamatok megfigyelését is (Tamm és Liang, 2006).

Nagyobb proteinek röntgenkrisztallográfiával vagy elektronkrisztallográfiával vizsgálhatók, amihez azonban már két- illetve háromdimenziós kristályokra van szükség. Az analizálható maximális fehérje méretet jelenleg a számítógépes kiértékelési kapacitás korlátozza.

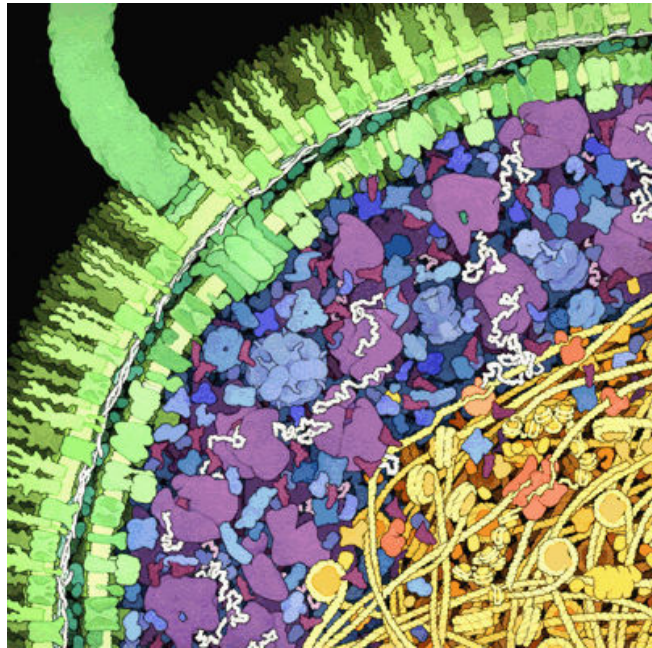
2.4.2.1 Mennyire elfogadható a kapott szerkezet?

A fentiekből már érzékelhető, hogy a térszerkezet-vizsgálat bonyolult folyamatsorában több lépés is erősen befolyásol(hat)ja a célfehérje szerkezetét. A szerkezet konkrét meghatározása is a valós környezettől nagyon eltérő közegben történik. *In vivo* körülmények között a TMP-k membránokba ágyazva, specifikus lipid-összetételű közegben vannak. A speciális környezet megváltozása önmagában a harmadlagos szerkezet változásához vezethet. A lipid-kettősréteg hiánya a háromdimenziós fehérje kristályokban olyan szerkezetet eredményezhet, amely messze áll a funkcionális formától. Az oldat-közegű NMR vizsgálatok sem mentesek a problémáktól, például gyakran figyelhetők meg instabil negyedleges szerkezet módosulások (Lacapere és mtsai, 2007). A szerkezet-vizsgálat emiatt speciális szakértelmet és összetett laboratóriumi háttérrel igényel.

2.5 Transzportfolyamatok *Escherichia coli*-ban

A Gram-negatív baktériumok sajátossága, hogy a citoplazma membránon kívül, egy sajátos összetételű, a sejtfal részét képező külső membránnal (KM) is rendelkeznek (8. ábra). A külső membrán szelektív határoló funkciót lát el, megvédi a baktérium sejtet a környezetében lévő káros anyagoktól. A belső membrántól eltérően a KM aszimmetrikus felépítésű: a belső foszfolipid réteg mellett egy külső lipopoliszacharid réteg alkotja. A membrán tömegének mintegy 50 %-át adják az itt található membránfehérjék (sejtenként kb. 100000 db), amelyek β -hordó típusú szerkezettel rendelkeznek.

A periplazmatikus térben nincs ATP és proton grádiens (Bos és mtsai, 2007), így közvetlen felhasználható energiaforrás hiányában a molekulák túlnyomórészt passzív transzporttal jutnak át a membránon.



8. ábra Az *E. coli* sejt keresztmetszeti képe (művészi ábrázolás)
Származás: <http://mgl.scripps.edu/people/goodsell>; David S. Godsell engedélyével.

A KM a belső membránhoz képest nagyobb áteresztőképességű, viszont a speciális lipopoliszacharid külső rétegnek köszönhetően a hidrofób karakterű anyagok bejutását hatékonyan képes gátolni. A 600 Dalton-nál kisebb molekulasúlyú hidrofíl karakterű anyagok könnyen átdiffundálnak a széles szubsztrátspecifitású porinokon keresztül a periplazmatikus térbe. A nagyobb molekulák transzportját specifikus csatornák végzik. Léteznek bonyolult aktív transzport folyamatok is a külső membránban. Ilyen például a TonB rendszer, amely a belső membrán protonmotoros erejének felhasználásával energetizálja a KM-ben zajló receptor-mediált felvételi folyamatokat (Wandersman és Delepelaire, 2004).

A baktérium sejt térfogatának mintegy 10 %-át adó periplazmatikus térben a citoplazmához képest eltérő körülmények vannak. A jelenlévő nagy mennyiségű fehérje és poliszacharid miatt a fehérjék diffúziójának sebessége mintegy két nagyságrenddel kisebb a citoplazmához képest (Foley és mtsai, 1989). A periplazma oxidatív közege lehetővé teszi a diszulfid hidak kialakulását.

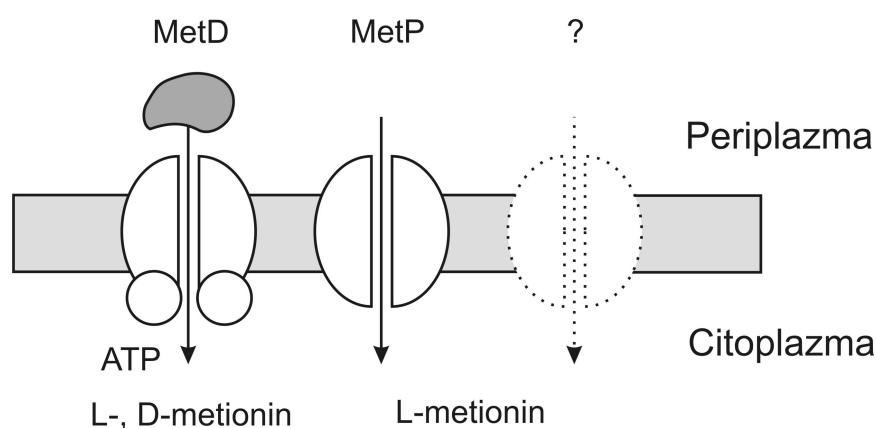
A periplazmatikus térből a hidrofíl metabolitok már aktív transzporttal jutnak tovább. *E. coli*-ban ez történhet csatorna-fehérjéken keresztül facilitált diffúzióval (pl. aquaporinok), valamint elsődleges és másodlagos aktív transzporttal is. Az elsődleges aktív transzportot ABC-fehérjék (ATP-binding cassette) végzik. Az *E. coli* 79 ABC-transzportert kódol, egy

részüknél ma sem ismert a pontos funkció. Alapszerkezetükre jellemző, hogy két transzmembrán doménhez két ABC-domén kapcsolódik. A bakteriális ABC-transzporterek effluxot és influxot egyaránt katalizálhatnak. Influx esetén egy, a szubsztrát megkötését és szállítását végző, periplazmatikus szubsztrát-kötő fehérje is segíti a hatékonyabb transzportot.

A másodlagos aktív transzporterek elsősorban H^+ , ritkán Na^+ vagy más oldott anyag koncentrációkülönbségét használják fel a szubsztrát mozgatásához. A transzport iránya alapján megkülönböztetünk antiportereket (ellentétes irányú; pl.: NhaA) és szimportereket (azonos irányú; pl.: PutP).

2.5.1 A metionin-transzport *Escherichia coli*-ban

A metionin transzportról kevés információ áll rendelkezésünkre. Az egyik legkorábbi vizsgálat bizonyította, hogy az L-metionin felvételét legalább két transzportrendszer végzi (Kadner és Watson, 1974). Különböző mutációt hordozó törzsek fenotípusa alapján megkülönböztethető volt egy nagy affinitású (*metD*; $K_D = 0,1 \mu M$), valamint egy kisebb affinitású (*metP*; $K_D = 40 \mu M$) transzporter. A metionin felvétel kinetikáját már a 70-es évek második felében jellemezték, azonban a transzportban résztvevő fehérjéket és az azokat kódoló géneket még ma sem ismerjük teljesen (9. ábra).



9. ábra Metionin transzporterek *E. coli*-ban

A metionin az *E. coli* számára nem esszenciális aminosav, B12-vitamin-függő (MetH) és független (MetE) módon is képes megszintetizálni. A bioszintézisben résztvevő gének

inaktiválásával metionin auxotróf törzseket lehet izolálni, amelyek metionin igénye D-metioninnal is biztosítható. A D-metionin kizárólagos transzportere a nagy affinitású rendszer, amely az L- és D-metionin mellett a sejt számára toxikus α -metil-metionint és egyéb metionin-analógokat is transzportál. A D-metionin transzportja ATP-függő, valamint ozmotikus sokk érzékeny. Ez utóbbi tulajdonság egy periplazmatikus kötő-fehérje jelenlétére utal, és együttesen e jellemzők a bakteriális ABC-transzporterek sajátosságai.

A nagy és kis affinitású rendszert a citoplazma L-metionin koncentrációja szabályozza. A *metD* esetén bizonyos, hogy a MetJ represszor képes befolyásolni az expressziót (Kadner, 1977). Kapcsoltság alapján a *metD* lokalizációját egészen pontosan meg lehetett határozni: a lókuszt az *E. coli* genom *proS* (4,7 perc) és *rrnH* (4,8 perc) között helyezkedik el (Bohman és Isaksson, 1980; Ellwood és Nomura, 1982; Berlyn, 1998). A lókuszt konkrét azonosítása képezi a jelen dolgozat egy részét.

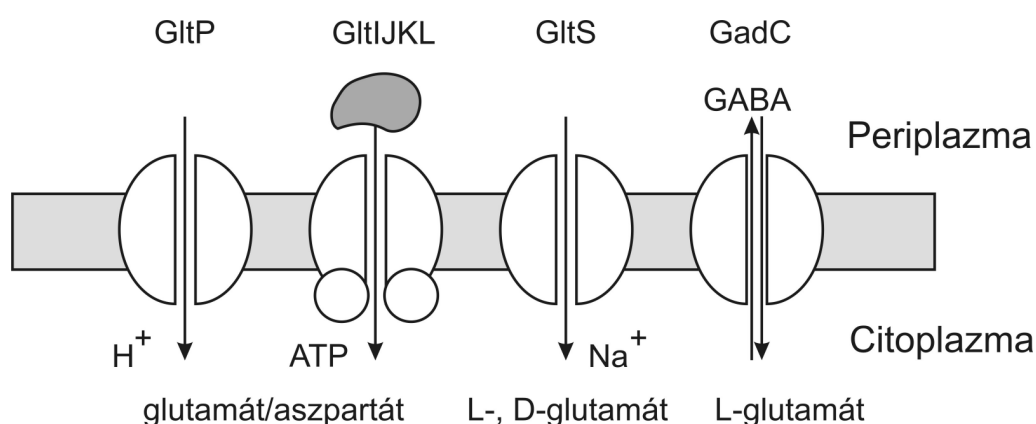
A *metP* még a nagy affinitású rendszerhez képest is jóval kevésbé jellemzett, a kinetikai adatokon kívül szinte nincs is róla más információ, a felelős géneket még nem azonosították. A kis affinitású rendszer jelenlétére Kadner és Watson mutagenézis kísérletekből (1974) következtetett. A nagy affinitású rendszer kiiktatása csak a D-metion felvételét akadályozza meg, viszont nem befolyásolja az *E. coli* L-metionin minimál tápoldatban való szaporodását. A mutagenézis során izoláltak olyan törzseket is, amelyek nem tudták a D-metionint transzportálni és az L-metionin transzportjuk is módosult volt. Alacsony külső L-metionin koncentráció (10 $\mu\text{g/ml}$) esetén csak nagyon lassan osztódtak, míg 100 $\mu\text{g/ml}$ L-metionin mellett nem tapasztaltak szaporodási különbséget a ΔmetD vagy vad típusú törzsekkel összehasonlítva. Utóbbi tapasztalat arra utal, hogy valójában három transzporter végez L-metionin felvételt *Escherichia coli*-ban, a harmadik rendszer lehet egy metionin-analóg transzportere, vagy egy kevésbé specifikus aminosav permeáz.

2.5.2 A glutaminsav-transzport *Escherichia coli*-ban

A glutaminsav egy központi jelentőségű aminosav, a glutaminnal együtt a legfontosabb amino-csoport donor és nitrogén-forrás (Reitzer, 2003). A legnagyobb mennyiségben előforduló anion a citoplazmában, amely a fő ozmotikum K^+ ellenionjaként van jelen. Hiperozmotikus sokk esetén időleges védőfaktorként viselkedik és a K^+ -mal együtt

megnövekszik a glutamát koncentráció (Csonka, 1989), illetve szabályozó faktorként biztosítja a megfelelő adaptációhoz szükséges gének expressziójának aktiválását és gátlását (Lee és Gralla, 2004; Gralla és Vargas, 2006). Egy másik igen fontos glutaminsavhoz kapcsolódó folyamat az extrém savstresszel (pH=2-3) szembeni védekezés egyik formája. A citoplazmatikus pH gyors csökkenésének ellensúlyozására a glutaminsav-pool dekarboxilezése zajlik le, amely során egy H^+ beépülésével γ -amino-vajsav (és CO_2) keletkezik, amit a GadC antiporter kijuttat a sejtől (Foster, 2004).

A glutaminsav felvételére is jellemző a multiplicitás, *Escherichia coli*-ban négy felvételi rendszer létezik, amelyek transzporttulajdonságaik alapján jól elkülöníthetők (10. ábra).



10. ábra Glutamát transzporterek *E. coli*-ban

A GltP egy H^+ /aszpártát-glutamát transzporter, amely β -hidroxi-aszpártáttal és ciszteáttal gátolható, kötő-fehérje independens. (*Rhodobacter*-ben visszaállította a glutamát-specifikus kemotaxist.) A GltIJK egy aszpártát/glutamát specifikus ABC-transzporter rendszer, ozmotikus sokk érzékeny és ciszteáttal gátolható. A harmadik transzporter (GltS) az *E. coli*-ban található néhány Na^+ -szimporter egyike, kötő-fehérje független, kizárólag glutamátot és annak analógjait képes felvenni, aszpártáttal nem gátolható. A negyedik rendszer az extrém savstressz során működő GadC, egy glutamát/ γ -amino-vajsav antiporter.

A glutamát-transzport szabályozásáról keveset tudunk. A négy rendszer együttes kifejeződése vad típusú *E. coli* törzsekben olyan alacsony, hogy azok glutaminsavat, mint egyedüli szén- és nitrogénforrást tartalmazó táptalajon nem képesek szaporodni (Halpern és Even-Shoshan, 1967).

A fentiekén kívül néhány egymástól független kísérlet szolgáltatott adatot a regulációról, szisztematikus vizsgálatot azonban még nem végeztek. A tapasztalat szerint szukcinát

minimál tápoldatban a GltI kötő-fehérje mennyisége 3-5-szörösére növekszik a glükóz minimálhoz tápoldathoz képest (Willis és Furlong, 1975). Aszpartát minimálon tápoldatban a glutamát felvétel kb. ötszörösére növekszik, amelyért feltehetően a GltS mennyiségének növekedése felelős (Kahane és mtsai, 1976). Zimmer és mtsai (2000) a *gltIJKL* expressziójának növekedését tapasztalták nitrogén-limitált közegben microarray-kísérletben.

A GltS

E. coli-ban 40 mM NaCl jelenlétében a glutaminsav transzport nagy részét a Na^+ -függő glutaminsav szimporter (GltS) végzi (Schellenberg és Furlong, 1977). A GltS fehérje egy 401 aminosavból felépülő, erősen hidrofób természetű permeáz. Az aminosavak 73%-a nem poláris, 63 közülük leucin. Az *E. coli* K-12 törzsben 42425, míg a B-ben 42455 dalton molekulatömegű (az utóbbiban a 378. aminosav glicin helyett szerin). A GltS elősegíti néhány toxikus L-glutaminsav analóg, az alfa-metil-glutaminsav, a homociszteinsav (Essenberg, 1984) és a sejtfal komponens D-glutaminsav felvételét is. Működése során egy glutaminsavval legalább kettő Na^+ -t transzportál a citoplazmatikus térbe (Tolner és mtsai, 1995).

A GltS génje a baktérium kromoszómájának 82. percére térképeződik (Marcus és Halpern, 1969). A *gltS* struktúrgén ATG startkodonjától 5' irányban a konszenzushoz közeli -35-ös, -10-es és Shine-Dalgarno-szekvenciák találhatók, terminációja feltehetően rho-independens (Deguchi és mtsai, 1990; Kálmán és mtsai, 1991). A *gltS* gén túl magas szintű kifejeződése - mint általában a membránfehérjéké - gátolja a növekedést (Kálmán és mtsai, 1991).

A GltS szekvenciáját, működését tekintve is jelentősen eltér a többi glutaminsav transzportertől (Tolner és mtsai, 1995), emiatt a hozzá hasonló proteinekkal együttesen egy önálló családba sorolták (Saier, 2000). Ebbe az ún. ESS-családba (Glutamate: Na^+ Symporter; TC #2.A.27) jelenleg több, mint 220 fehérje tartozik, legjellemzettebb tagja és modell fehérje az *E. coli* GltS. A nagyszámú homológ fehérje különböző baktérium törzsekből származik, némelyik több GltS-ortológot is kódol (pl. *Fusobacterium nucleatum*). A GltS pontos élettani feladata még nem tisztázott, de a glutaminsav számos fontos szerepe alapján lehetséges a részvétele a hiperozmotikus stressz, az extrém savstressz és a nitrogén metabolizmus folyamataiban. A Na^+ -kotranszporterek esetében feltételezhető, hogy funkciójuk a szimbiózissal vagy a patogenitással kapcsolatos (Hase és mtsai, 2001). Utóbbi

lehetőséget támasztja alá az a tény, hogy a GltS homológokat sok esetben patogén mikroorganizmusok kódolják. A kinetikai mérések alapján a GltS 10-15 mM-nál nagyobb Na^+ koncentrációjú közegben biztosít hatékony transzportot (és esetlegesen evolúciós előnyt) a hordozó baktériumok számára.

A GltS szerkezete nem ismert, a fehérje kétdimenziós struktúrájának vizsgálata a jelen dolgozat tárgyát képezi.

3. Célkitűzés

1. Szakirodalmi adatok alapján valószínűsítettük, hogy az *E. coli* nagy affinitású metionin transzporterét (MetD) az *abc-yaeE-yaeC* klaszter kódolja. Célunk ennek a feltételezésnek a kísérletes bizonyítása volt.
2. A GltS glutamát permeáz szerkezete nem ismert. Célunk a GltS kétdimenziós membránbeli lefutásának meghatározása volt molekuláris biológiai eszközök felhasználásával.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Bakteriális törzsek és plazmidok

Klónozási célokra *E. coli* DH5 α (F^- *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG* $\Phi80dlacZ\Delta M15$ $\Delta(lacZYA-argF)U169$, *hsdR17*($r_K^- m_K^+$), λ^-) törzset alkalmaztunk. A λ Tn*phoA* szaporítására az amber szupresszor LE392 [$e14^-(mcrA)$, *hsdR514*, *supE44*, *supF58*, *D(lacIZY)6*, *galK2*, *galT22*, *metB1*, *trpR55*] *E. coli* törzset használtuk. A λ Tn*phoA* mutagenezist, az egyirányú deléciókat és a mutánsok screeningjét az alkalikus foszfatáz-, β -galaktozidáz- és rekombináció-deficiens CC118 (Manoil és Beckwith, 1985) [*araD139*, *D(ara,leu)7697*, *DlacX74*, *phoAD20*, *galE*, *galK*, *thi*, *rpsE*, *rpoB*, *argE_{am}*, *recA1*] *E. coli* törzsben végeztük.

A metionin transzport vizsgálatokhoz a metionin auxotróf MTD23 (Δ *metE*, Δ *metH*) és az MTD234 (Δ *metE*, Δ *metH*, Δ *mmuP*) törzseket használtuk fel (Thanbichler és mtsai, 1999).

Az *abc* promóterének vizsgálatát a JM109 (*endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB⁺* $\Delta(lac-proAB)$ *e14-* [F' *traD36 proAB⁺ lacI^f lacZ\Delta M15*] *hsdR17*($r_K^- m_K^+$)) törzsben végeztük.

A GltS topológia vizsgálatához a pCP1(–) direkt szelekciós vektorból (Gál és mtsai, 1999) indultunk ki. A *gltS* gén folyamatos, gyenge kifejeződését az *E. coli* módosított *lac* promótere biztosítja. Ezek a plazmidok sejtenként kb. 40 kópiában vannak jelen.

A metionin transzportért felelős gének expressziójához az arabinózzal indukálható pBAD-expressziós vektorokat alkalmaztunk (Guzman és mtsai, 1995). A kromoszómális deletánsok létrehozásához a kanamicin rezisztencia kazetta a pUC4K plazmidból (Pharmacia) származik. A promóter teszteléséhez a pRS415 vektort használtuk (Simons és mtsai, 1987). A MetJ represszor génjét a pWMJ plazmidból hasítottuk ki (Nakamori és mtsai, 1999).

4.2 Vegyszerek

A táptalajkomponenseket a Difco-tól, a Reanal-tól és a Molar Chemicals-tól szereztük be. Az 5-bróm-4-klór-3-indolil-foszfát (BCIP), az 5-bróm-4-klór-3-indolil- β -D-galaktozid (Xgal), a para-nitrofenil-foszfát (Sigma 104), az orto-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid, az L- és D-

metionin, az α -metil-metionin, az arabinóz és az egyéb felhasznált vegyszerek a Sigma-tól származnak.

A felhasznált restrikciós enzimeket a New England Biolabstól és az MBI Fermentastól, az exonukleáz III-at, az S1 nukleázt, a T4 DNS polimerázt és a T4 DNS ligázt az MBI Fermentastól szereztük be. Pfu és Taq polimerázokat ugyancsak az MBI Fermentastól valamint a Zenon Kft-től szereztük be. Az enzimatis reakciókat, valamint a polimeráz láncreakciókat a gyártók javaslatai szerint végeztük.

A riporterek detektálásához szükséges tormaperoxidáz konjugált antitesteket (ab6646 és ab7319) az Abcam-től vásároltuk. A peroxidáz aktivitás detektálását kemilumineszcenciás módszerrel végeztük; ehhez a SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) és a Lumi-light Western Blotting Substrate (Roche) oldatait használtuk.

4.3 Tápoldatok és táptalajok

Minimál tápközegként M9-oldatot alkalmaztunk (0,2 % glükóz; Maniatis és mtsai, 1982), szükség szerint kiegészítve 3,3-100 $\mu\text{g/ml}$ L- és 10 $\mu\text{g/ml}$ D-metioninnal, 250 $\mu\text{g/ml}$ α -metil-metioninnal. A pBAD18 és 33 vektorok alkalmazásakor a fehérjék expresszióját 0,05 % arabinózzal indukáltuk.

A foszfátáz aktivitás méréséhez az alacsony foszfáttartalmú PAT tápoldatban növesztettük a baktériumokat. 10 g triptont, 5 g élesztő kivonatot és 2,5 g NaCl-t 200 ml desztillált vízben melegítéssel feloldottunk. 0°C-ra való lehűtés után kevertetés mellett hozzáadtunk 2,28 ml 25% NH_4OH -t és 30 ml 1 M MgCl_2 -t, majd 0°C-on kevertettük 2 órán át. Az anorganikus foszfát MgNH_4PO_4 csapadék formájában kiválik. 0,22 mm pórusátmérőjű Millipore szűrőn kétszer átszűrtük az oldatot. Ezután hozzáadtunk 10 g MOPS-t, és 1000 ml-re egészítettük ki a térfogatot. Végül az oldathoz 1 ml 1 M MgSO_4 -t és 1 ml 1 M CaCl_2 -t adtunk, a pH-t 7,0-re állítottuk (37% HCl oldattal), majd kuktázva sterilizáltuk.

Minden más kísérletben LB tápközeget (Maniatis és mtsai, 1982) használtunk. A táptalajokat 1,7 % agarral szilárdítottuk. Az Xgal-t 50 $\mu\text{g/ml}$, a BCIP-et 40 $\mu\text{g/ml}$, a kanamicint 50 $\mu\text{g/ml}$, kloramfenikolt 35 $\mu\text{g/ml}$, ampicillint 100 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban használtuk, kivéve a pCP1(-)::Tn*phoA* dúsításakor, amikor 300 $\mu\text{g/ml}$ kanamicint alkalmaztunk.

4.4 Plazmidtisztítás és transzformálás

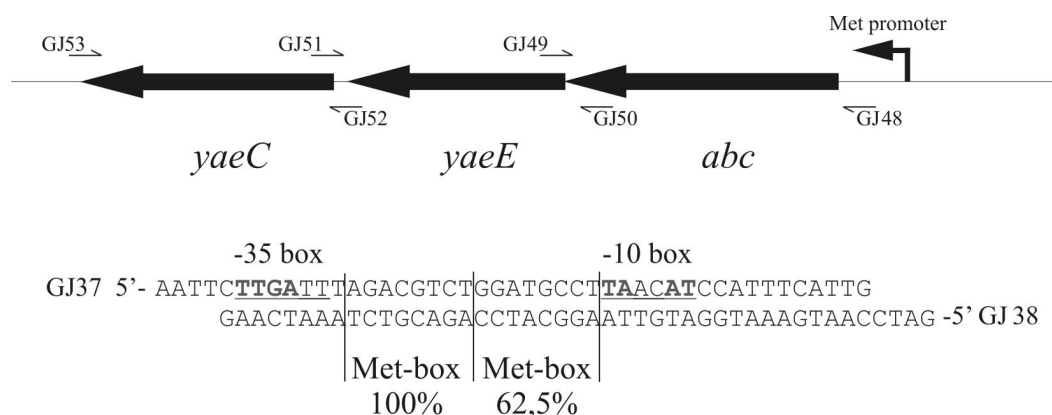
A plazmid DNS-t hagyományos alkalikus lízises technikával (Maniatis és mtsai, 1982), illetve a Qiagen kitjeit használva tisztítottuk. A DNS transzformálását a CaCl_2 -módszerrel (Maniatis és mtsai, 1982), vagy elektroporációval (Invitrogen, The Electroporator II Manual) végeztük.

4.5 A *metD* lókuszt azonosításánál alkalmazott módszerek

4.5.1 A *metD* promóterének vizsgálatához szükséges plazmidok készítése

A promóter fragmentet a GJ37 (5'-AATTCTTGATTTAGACGTCTGGATGCCTTAACA-TCCATTTCATTG-3') és GJ38 (5'-GATCCCAATGAAATGGATGTTAAGGCATCCAGACGTCTAAATCAAG-3') primerek hibridizálásával állítottuk elő (11. ábra). A szekvenciát úgy terveztük, hogy *EcoRI-BamHI* kompatibilis ragadós végekkel rendelkezzen. A promótert ezután *EcoRI-BamHI* hasított pRS415 promóter-tesztelő vektorba (Simons és mtsai, 1987) ligáltuk (pROMET1).

A szabályzás vizsgálatához szükségünk volt egy MetJ represszort túltermelő konstrukcióra is. A MetJ gént a pWMJ plazmidból *XbaI-KpnI* fragmentként átépítettük a pBAD33 expressziós vektorba (pMJ33).



11. ábra A metionin transzporter azonosításához felhasznált primerek helyzete
A sigma 70-es konszenzus promóterrel megegyező nukleotidokat vastag betűkkel emeltem ki.

4.5.2 Kromoszómális deléciók létrehozása

Delécióinkat ET-klónozással alakítottuk ki (Muyrers és mtsai, 1999). A céltörzsbe először betranszformáltuk a pBAD $\alpha\beta\gamma$ plazmidot, ezután ebből készítettünk elektrokompetens sejteket. Éjszakán át növesztett starter kultúrát 100-szorosan visszahígítunk, majd 37 °C fokon inkubáltuk. Amikor a sejtdenzitás elérte az OD₆₀₀ = 0,2 értéket, 0,1 % arabinózzal indukáltuk a sejt kultúrát, amit további 1 óra inkubálás után 0 °C fokra hűtöttünk. A sejteket centrifugálás után kétszer mostuk jéghideg desztillált vízzel, majd kétszer 10 %-os glicerinnel, végül 300-szorosan koncentrálnak 10 %-os glicerinen vettük fel. Szétmérés után a csöveket folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd -80 °C fokon tároltuk.

Az előre elkészített kompetens sejtekbe 100-500 ng lineáris DNS-t elektroporáltunk, majd a sejteket kanamicin tartalmú LB lemezekre szélesztettük.

A MetD kiiktatásához készítettünk egy deletáló konstrukciót, amelyben a *metD* körüli kromoszómális DNS szekevenciák közé egy kanamicin rezisztencia kazettát építettünk. A GJ28 (5'-ATGCATAGTTAGTCGTGGCATCTCGA -3') és GJ29 (5'-AGAAGCGGCC-ATATCAATATG -3') valamint a GJ35 (5'-GTCGACGCCTATTTGCTCGAACTG -3') és GJ36 (5'-ATGCATTTTATAGGCTGTTTCCACAATT-3') primerek felhasználásával amplifikáltuk az upstream és downstream kromoszómális szekvencia-környezet, majd a fragmenteket *XcmI* emésztett T-vektorba ligáltuk (pMON38201). Az upstream határoló szekvenciát hordozó plazmidból (GJ35-36 termék) a kis *NsiI-SalI* fragmentet átépítettük az ugyanígy hasított másik kromoszómális szekvenciát hordozó vektorba. Ezek után az *NsiI* helyre építettük a kanamicin rezisztencia kazettát (*PstI/pUC4K*). A kész konstrukcióból *BamHI-SalI* emésztéssel kihasítottuk a deletáló konstrukciót, majd izolálás után elektroporáltuk a fenti módon ET-klónozáshoz előkészített K-12 törzsbe. A kapott kanamicin rezisztens telepeket PCR-rel teszteltük a GJ29-35 primerekkel.

A fenotípus teszteléséhez metionin-auxotróf (MTD23), illetve S-metil-metionin transzporter (*mmuP*) deléció *E. coliba* (MTD234) is átvittük a *metD* deléciót P1 fágtranszdukcióval.

4.5.3 Komplementáló plazmidok készítése

Az *abc*, *yaeE* és *yaeC* géneket kolónia PCR-rel, *Pfu* polimerázzal felamplifikáltuk. A felhasznált primerek a következők voltak: GJ48 (5'-TCACGGTACCGAGA-

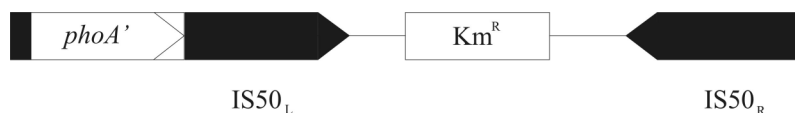
TGCCACGACTAACTT-3') és GJ49 (5'-CACATCTAGAGCTCAGACATAACCCAGTAC-3') az *abc*, GJ50 (5'-TCACGGTACCTGCCTGGCTGCAGGAACAC-3') és GJ51 (5'-TCACTCTAGATGTTGTGTTGAACGTTACTTG-3') a *yaeE*, GJ52 (5'-TCACGGTACCACTCGCAAGTAACGTTTACC-3') és GJ53 (5'-CACATCTAGATTACCAGCCTTTAACAGCTC-3') a *yaeC* klónozásához. A fragmenteket *XbaI-KpnI* emésztés (és gélizolálás) után pBC SK (-) klónozó vektorba ligáltuk, végül restrikciós ellenőrzés után szekvenáltattuk a géneket.

A fenotípus teszteléséhez expressziós vektorokba (pBAD18 és 33) építettük át a géneket egyenként, illetve egy negyedik konstrukcióban az *abc* és *yaeE* géneket együttesen. A konstrukciók segítségével lehetővé vált, hogy az összes variációban expresszáljuk a géneket.

4.6 A topológia vizsgálatához felhasznált módszerek

4.6.1 A *TnphoA*

Fúziós fehérjék létrehozásának legegyszerűbb módja a transzpozonos mutagenézis. A *TnphoA*-t (12. ábra) úgy hozták létre, hogy a Tn5 baloldali inszerciós elemébe beillesztették az *E. coli* szignál szekvencia nélküli alkalikus foszfatáz génjét (Manoil és Beckwith, 1985). Emiatt a *phoA'* egy 50 bázispár hosszúságú Tn5 eredetű linkerrel kapcsolódik a fúziós partnerhez. Magas foszfatáz aktivitást akkor tapasztalunk, ha a *TnphoA* a megfelelő leolvasási keretben egy periplazmatikus fehérjerészt kódoló szekvenciába épül. A mutánsokat a transzpozon által biztosított kanamicin rezisztencia révén tudtuk elkülöníteni.



12. ábra. A *TnphoA* vázlatos szerkezete

4.6.2 A λ *TnphoA* szaporítása és titrálása

A λ *TnphoA* (Manoil és Beckwith, 1985) szaporítása, hígítása és titrálása során mindig 10 mM MgSO₄-tartalmú közegben dolgoztunk. A λ *TnphoA* szaporítását hagyományos protokoll alapján végeztük (Maniatis és mtsai, 1982). 100 μ l, éjszakán át LB tápoldatban növesztett

LE392 kultúrához kb. 3×10^6 λ Tn*phoA* fágot adtunk, majd 37 °C-on 20 percig inkubáltuk rázatás nélkül. Ezután hozzáadtunk 4 ml LB-t, és 37 °C-on, feltisztulásáig intenzíven ráztuk a kultúrát. Ezután 100 μ l kloroformot adtunk a szuszpenzióhoz, vortexszel kevertük, majd 4 °C-on tároltuk felhasználásig. A fág titrálásához elkészítettük a preparátumok 10^5 -szeres és 10^7 -szeres hígítását. 100 μ l hígított fágot adtunk 200 μ l, éjszakán át növesztett LE392 kultúrához, majd 4 ml megolvasztott, kb. 50 °C-os 0,7 % agar LB-vel keverve 1,5 % agarral szilárdított táptalajra terítettük. A preparátumok titerére az éjszakán át, 37 °C-on való inkubáció után kapott plakkok számából, visszaszámolással következtettünk. A preparátumok koncentrációja $2-3 \times 10^{10}$ PFU/ml volt.

4.6.3 λ Tn*phoA* mutagenézis és screening

Éjszakán át növesztett, a pCP1(-) plazmidot hordozó CC118 törzset húszszorosán visszahígítottunk LB tápoldattal, kb. $OD_{600} = 0.6$ -ig növesztettük, majd kb. tízszeres feleslegben λ Tn*phoA* fággal fertőztük. Ez a fág a genomjában nonsense mutációkat, ún. amber-mutációkat hordoz, emiatt csak speciális amber szupresszor törzsön, pl. az LE392 *E. coli* törzsön szaporítható. A CC118 nem amber szupresszor törzs, emiatt a λ Tn*phoA* ugyan bejuttatja genomját a sejtekbe, de nem képes azokban szaporodni. 20 percig inkubáltuk az elegyeket szobahőmérsékleten, majd 37 °C-on ráztuk egy órán át. A mutagenézis hatékonyságának megállapítására az elegy egy részét szélesztettük BCIP/Km/Cm tartalmú táptalajra. Az elegyet 35-szörösre hígítottuk 30 μ g/ml kloramfenikolt és 50 μ g/ml kanamicint tartalmazó LB tápoldattal, majd másfél óráig ráztuk 37 °C-on. Ekkor a kanamicin koncentrációját 300 μ g/ml-re növeltük azért, hogy a transzpozont a pCP1(-)-on hordozó sejtek növekedését segítsük elő. Ezután a sejt kultúrákat 37 °C-on egész éjszakán át tovább növesztettük. A felszaporodó sejteket BCIP/Km/Cm tartalmú táptalajon teszteltük. A kromogén BCIP-et az alkalikus foszfatáz kék színű terméké alakítja, így vizuálisan elkülöníthetők az aktív GltS::PhoA fúziót termelő kolóniák.

4.6.4 A pGE1 és pGL2 plazmidok készítése

Az egyirányú deléciók kivitelezéséhez olyan plazmidokat készítettünk, amelyek a *gltS* után megfelelő restrikciós hasítóhelyeket és a start kodon nélküli *phoA* (pGE1) és *lacZ* (pGL2) riporter géneket tartalmazzák.

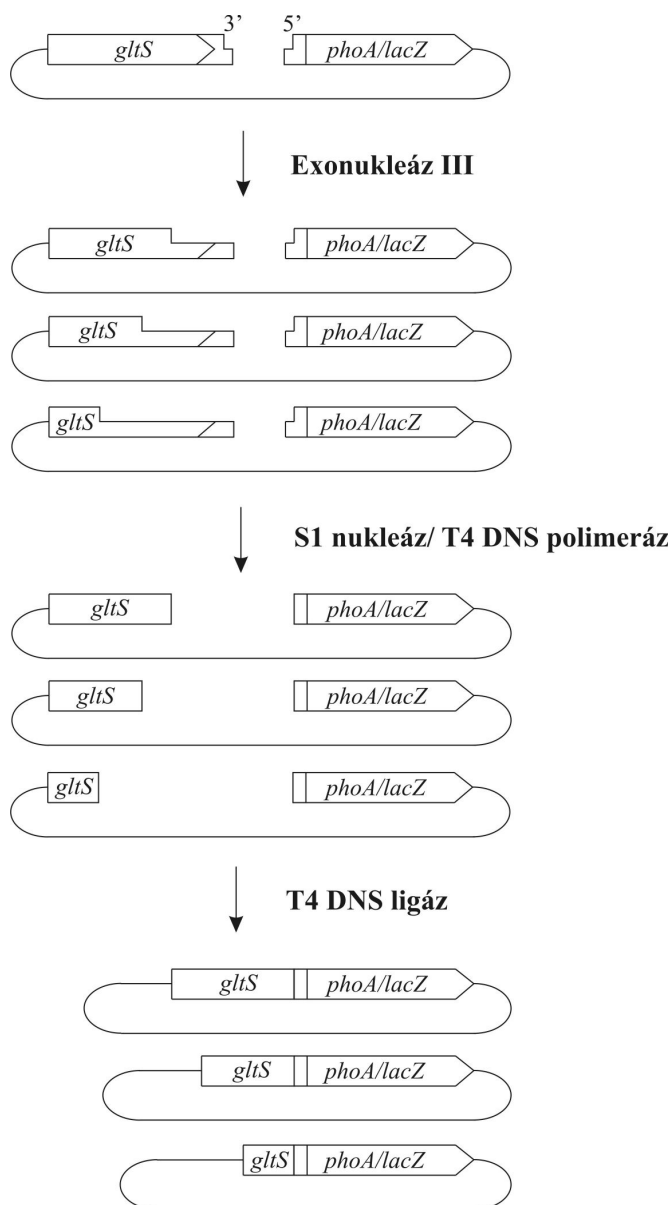
A pGE1 esetében a pBC SK(–) poliklónozó helyét *Bss*HII-*Bss*HII fragmentként beklónoztuk a pCP1(–) *Mlu*I helyére. A megfelelő orientációt *Cla*I restrikciós enzimmel ellenőriztük. A pGE1 esetében a létrehozott pCP-NPX plazmidot *Pst*I és *Xho*I restrikciós enzimekkel hasítottuk, majd beligáltuk a pPHO7-ből a megegyező enzimekkel kihalászott, *phoA*’-ot tartalmazó fragmentet.

A pGL2 konstrukciója során a pCP-NPX-ből *Apa*LI és *Sph*I restrikciós hasítással eltávolítottuk a nem expresszálandó *lacZα* fragmentet. A keletkezett pCPII-NPX-et *Pst*I és *Nco*I restrikciós enzimekkel hasítottuk, majd beligáltuk a pNM482 *Pst*I-*Nco*I fragmentjét, ami a start kodon nélküli *lacZ* struktúrgént hordozza. Az irányított *lacZ* fúziók kialakításához egy hosszabb linkert hordozó pGL2 származékot is készítettünk (pGL3). Ez esetben a pNM482 *Sma*I-*Nco*I nagy fragmentjét ligáltuk az ugyanezekkel az enzimekkel emésztett pCP-NPX-be.

4.6.5 Egyirányú deléciók kialakítása

Az exonukleáz III a DNS szálainak 3’ végeit rövidíti. A folyamatos emésztés eredményeképpen 5’ egyes szálú túlnyúló végek keletkeznek. Ha a reakcióelegybe az enzimet feleslegben adjuk, akkor a molekulák többségében az emésztődés ugyanakkora sebességgel történik. Megfigyelték, hogy a legalább négy nukleotidból álló túlnyúló 3’ végek megakadályozzák az exonukleáz III támadását (Henikoff, 1984). Egy megfelelően kialakított DNS molekulát tehát exonukleáz III-as, majd S1 nukleázos kezeléssel lehetséges kontrollálható módon az egyik vége felől megrövidíteni (13. ábra). A deléciókat *Not*I és *Pst*I restrikciós enzimekkel hasított pGE1 és pGL2 vektorok felhasználásával végeztük. A riporter géneket a *Pst*I restrikciós enzim által kialakított 3’ túlnyúló véggel védelmeztük. A reakciót Henikoff (1987) leírása alapján végeztük. Kísérleteinkben előzetes méréseink szerint 35 °C-on az exonukleáz III emésztés sebessége 300 nukleotid/perc volt. A reakciókat az exonukleáz

III hozzáadásával indítottuk el, majd 15 másodpercenként 2 µl reakcióelegyet átpipettáztunk az előre elkészített, és jégen tárolt S1 nukleáz elegyekbe.



13. ábra Egyirányú deléciók készítése

Az S1 nukleázos reakciókat az összes minta kimérése után 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 0,3 M Trizma Base-t és 0,05 M EDTA-t tartalmazó oldattal leállítottuk. Hőinaktiválás és etanolos kicsapás után az esetleges egyes szálú részeket T4 DNS polimerázzal feltöltöttük, illetve leemésztettük, majd a mintákat T4 DNS ligázzal kezeltük. A reakció eredményeképpen a különböző mélységig csonkolt *gltS*-hez kapcsolódnak a szignálszekvencia nélküli *phoA* és *lacZ* gének. A ligátumot CC118 kompetens sejtekbe

transzformáltuk. Az aktív fehérjét termelő vonalak BCIP/Cm, illetve Xgal/Cm tartalmú táptalajon kék színű telepeket adnak.

4.6.6 Fúziók létrehozása polimeráz láncreakcióval

Az egyirányú deléciókkal néhány pozíció helyzetét nem sikerült egyértelműen azonosítani. A kérdéses helyekhez irányítottan építettük hozzá a riporter géneket. A *gltS* megfelelő méretű fragmentjeit *Pfu* polimerázzal és specifikus oligodukleotidokkal a pCP1(–) templátról amplifikáltuk. Reakcióinkban az egyik primer mindig az AT473 volt, ami a *gltS* promóteréhez hibridizál.

A LacZ fúziókhoz a következő specifikus oligonukleotidokat használtuk fel: a V170-hez a GJ25-öt (5'-CCACCAGACCGAACGTTGCA-3'), a R92-höz a GJ30-at (5'-CACGCCCCA-CCGGCACGCAA-3'), a R273-hoz a GJ31-et (5'-CACGCTCAAAGACG-CGGTA-3') és végül a D334-hez a GJ32-t (5'-CATCGTAGTTTTTGCCCATCA-3'). Az amplifikátumokat *BcuI* emésztés után a *BcuI* és *SmaI* hasított pGL3 plazmidba ligáltuk.

Az AT473-GJ32 fargmentet a D334-es PhoA fúzió elkészítéséhez is felhasználtuk, *BcuI*-gyel emésztettük és beépítettük *BcuI* és *SmaI* hasított pGE1 plazmidba. A R273 és R92 fúziókat a GJ33 (5'-GTCAGGTACCCACGCCCACCGGCACGCAA-3') és a GJ34 (5'-GTCAGG-TACCCACGCTCAAAGACGCGGTA-3') primerek felhasználásával készítettük el. A *BcuI* és *SmaI* enzimekkel emésztett PCR termékeket a pGE2 plazmidba építettük, amit a D334-es PhoA fúziót hordozó plazmid *KpnI* helyet tartalmazó *XhoI*-*SmaI* fragmentjének deletálásával hoztunk létre.

4.6.7 A fúziós pontok helyének vizsgálata

A *gltS* promóteréhez és a riporter génnek elejéhez szintetizált oligonukleotidokkal PCR reakciót végeztünk. Az amplifikált fragmentek méretét 1,5 %-os agaróz gélen molekulásúly marker mellett, az UVP Gelbase program-csomagjának felhasználásával becsültük meg. A felhasznált primerek szekvenciája:

AT473 5'-TTAATGTAAGTTAGCTCACTCAT-3' (a *gltS* promóteréhez);

GJ23 5'-CCTCTTCGCTATTACGCCAG-3' (a *lacZ*' elejéhez);

GJ7 5'-GCAGTAATATCGCCCTGAGCAG-3' (a *phoA* ' elejéhez)

Az alkalmazott PCR-program: 94 °C 2,5 perc előzetes denaturáció, 30 ciklus (94 °C 1 perc; 53 °C 1 perc; 72 °C 1,5 perc), majd 72 °C 5 perc.

A pontos beépülési helyeket szekvenálással határoztuk meg a GJ7 és GJ23 oligonukleotidok felhasználásával. A szekvenálást a Szegedi Biológiai Központ automata szekvenáló laboratóriumában végeztettük el.

4.6.8 Western-blot

A LacZ és PhoA fúziós fehérjéket Western-blottal detektáltuk. A fúziós fehérjéket kódoló plazmidot hordozó CC118 sejtekből friss kultúrát növesztettünk. Megfelelő sejtdenzitás elérése után ($OD_{600} = 0,45-0,8$) a sejteket lecentrifugáltuk, majd szonikálással feltártuk. A teljes fehérjetartalom mérése után (Bradford, 1976) az azonos összfehérje mennyiségű lizátumokat 1 % SDS, 1 % β -merkaptotanol, 25 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10 % glicerol és 0,001 % brómfenolkék tartalmú oldatban 95 °C-on 5 percig denaturáltuk. A mintákat ezután 6 %-os poliakrilamid gélen választottuk el, majd PVDF membránra (Immobilon-P, Millipore) vittük át elektroforézissel. A fúziós fehérjéket LacZ és PhoA sepcifikus, tormaperoxidáz-konjugált poliklonális antitestekkel jelöltük (ab6646, ab7319; Abcam), majd a peroxidáz aktivitást kemilumineszcens szubsztráttal vizualizáltuk (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) vagy Lumi-light Western Blotting Substrate (Roche)). A jeleket Röntgen-filmen rögzítettük.

4.7 Enzimatis mérések

4.7.1 Az alkalikus foszfátáz aktivitás meghatározása

A mérendő törzseket éjszakán át növesztettük foszfát-szegény (PAT) tápoldatban, majd 30-szorosan visszahígítottuk, és $OD_{600} = 0,3-0,5$ -ig növesztettük. 1 ml baktérium kultúrát lecentrifugáltunk, és a sejteket felszuszpendáltuk 1 ml 1 M Tris-Cl, pH = 8,0 pufferben. Vak próbaként a szuszpenziós puffert használtuk. A szuszpenziókhoz 100 μ l 0,4 % para-nitrofenil-foszfátot tartalmazó szuszpenziós puffer oldatot adtunk, és az elegyeket 10-30 percig

inkubáltuk 37 °C-on, majd a reakciót 100 µl 1 M K₂HPO₄-tal állítottuk le. Az elegyeket lecentrifugáltuk, és a felülúszó optikai denzitását 420 nm-en mértük. A foszfatáz aktivitás számolásának képlete: $U_{\text{PhoA}} = \text{OD}_{420} \times 1000 / \text{OD}_{600} \times \text{eltelt idő percben}$ (Brickman és Beckwith, 1975).

4.7.2 A β-galaktozidáz aktivitás meghatározása

Éjszakán át LB tápoldatban felnevesztett sejt kultúrából 50-szeres hígítást készítettünk, és felszaporítottuk a törzseket $\text{OD}_{600} = 0,3-0,5$ értékig. Minden kultúrából 800-800 µl-t lecentrifugáltunk és Z-pufferben (Maniatis és mtsai, 1982) felszuszpendáltunk. Újabb centrifugálás után 800 µl Z-pufferben vettük fel a baktériumokat. Minden csőhöz 20 µl kloroformot és 20 µl 0,1 %-os SDS-oldatot cseppentettünk, majd az elegyeket 10 másodpercig vortexeltük. 28 °C-os előinkubálás után 160 µl 4 mg/ml koncentrációjú, orto-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid oldattal indítottuk a reakciókat. 10-20 perc inkubálás után a reakciókat 400 µl 1M Na₂CO₃-oldattal állítottuk le. Az elegyeket lecentrifugáltuk és mértük a felülúszó optikai denzitását 420 és 550 nm-en. A β-galaktozidáz aktivitást (U_{LacZ}) a következő képlettel számoltuk: $(\text{OD}_{420} - 1,75 \times \text{OD}_{550}) \times 1000 / \text{OD}_{600} \times \text{eltelt idő percben}$ (Miller, 1972). Minden enzim aktivitásra vonatkozó adatunk legalább három párhuzamos mérés eredményének az átlaga.

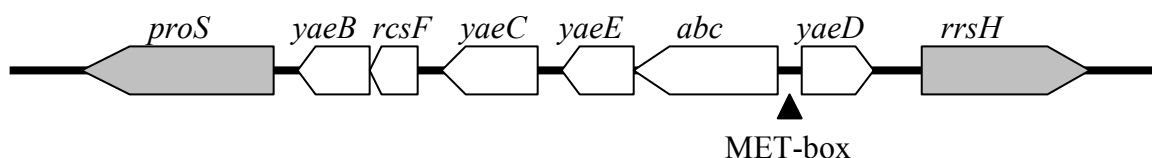
5. Eredmények és értékelésük

5.1 A metionin-transzport vizsgálata

5.1.1 A *metD* lókuszt azonosítása

Az *E. coli* metionin transzportjával kapcsolatos első adatokat Kadner és munkatársai publikálták 1974-től kezdődően. Mivel a nagy affinitású rendszer a D-metionin kizárólagos transzportere, a *metD* fenotípusa könnyen követhető. Emiatt az *E. coli* genetikai térképezésénél a *metD*-t markerként felhasználták, és már a genom-korszakot megelőzően is elég pontosan meghatározták a helyét. Azonosítása azonban az *E. coli* genomprogram eredményeinek publikálása (Blattner és mtsai, 1997) után sem történt meg.

A lókuszt azonosításához - a teljes *E. coli* genomszekvencia ismerete mellett - a következő szakirodalomban elérhető információk álltak rendelkezésünkre. A géntérképezés eredményei alapján a keresett gén a *fhuA* és *proA* (még pontosabban a *proS* és *rrsH*) markerek között helyezkedik el (Kadner és Watson, 1974; Berlyn, 1998). A korai biokémiai eredmények alapján tudtuk, hogy egy ABC-transzportert kell keresni (Kadner és Winkler, 1975), amely a MetJ represszor szabályozása alatt áll (Kadner, 1975). A *fhuA* és *proA* között mindössze három lehetséges membránfehérje génje található, és ezek közül kettő homológiavizsgálat alapján más funkciót lát el. A harmadik gén viszont egy lehetséges ABC-transzporter, amit a genom bioinformatikai vizsgálatakor tőlünk függetlenül is annotáltak (Paulsen és mtsai, 1998; Linton és Higgins, 1998). A talált *abc-yaeE-yaeC* géneket sorrendben ATPáz domén, transzmembrán domén és egy periplazmatikus kötő fehérje génjeként, tehát egy tipikus bakteriális ABC-transzporter rendszerként írták le, funkciót azonban nem párosítottak a lókuszhhoz (14. ábra).



14. ábra A *proS-rrsH* régió szerkezete az *E. coli* genomban

A fenti ismeretek birtokában egy neurális hálózat alapú promóter predikciós program segítségével megvizsgáltuk a régió szekvenciáját. Az *abc* előtt megtaláltuk a metionin regulon

általános szabályzó fehérjéjének kötő-helyét (AGACGTCT; MET-box) két kópiában, 100 és 62,5 % azonossággal. Az *abc* nyitott leolvasási keretben az ATPázokra jellemző Walker-A, linker peptid és Walker-B motívumokat találtunk.

A szekvenciák további analízisével megállapítottuk, hogy az *abc* és *yaeE* nyitott leolvasási keretek nyolc nukleotidnyi szakaszon átfednek egymással. Emellett, a *yaeE* feltehetően egy öt TMS-sel rendelkező membránproteint kódol. A *yaeC* a *yaeE* STOP kodonja után kezdődik 39 nukleotiddal, a kódolt proteinben azonosítható egy lehetséges szignál szekvencia és egy prokarióta lipoprotein kötőhely. Mindezen tapasztalatok alapján, de különösen a MET-boxok jelenlétével, megalapozottá vált az a feltételezés, hogy az L- és D-metionin felvételéért felelős transzportert az *abc-yaeE-yaeC* klaszter kódolja.

5.1.1.1 A fenotípus tesztelése

Mivel kizárólag a *metD* felelős a D-metionin és a toxikus α -metil-metionin (α MM) felvételéért, metionin auxotróf törzsben a fenotípus nyomonkövetése könnyen kivitelezhető. Egyszerű növesztési kísérletben, D-metioninnal kiegészített és anélküli glükóz minimál tápoldatban (M9) összehasonlítható az egyes törzsek szaporodási képessége.

Törzs	Genotípus, jellemzés	Növekedés M9 + 10 μ g/ml D- metionin	Növekedés M9 + 250 μ g/ml α MM
MTD23	$\Delta metE$, $\Delta metH$	M. Thanbichlertől	
MTD234	$\Delta metE$, $\Delta metH$, $\Delta mmuP$		
MK 1958	K-12 $\Delta metD$	+	+
MK 1962	MTD23 $\Delta metD$	–	
MK 2053	MTD234 $\Delta metD$	–	
	pBAD18- <i>abc</i>	–*	+♦
	pBAD18- <i>yaeE</i>	–*	+♦
	pBAD18- <i>yaeC</i>	–*	+♦
	pBAD18- <i>abc-yaeE</i>	–*	+♦
	pBAD18- <i>abc</i> + pBAD33- <i>yaeE</i>	–*	+♦
	pBAD18- <i>abc</i> + pBAD33- <i>yaeC</i>	–*	+♦
	pBAD18- <i>yaeE</i> + pBAD33- <i>yaeC</i>	–*	+♦
	pBAD18- <i>abc-yaeE</i> + pBAD33- <i>yaeC</i>	+*	–♦

2. táblázat A fenotípus tesztelésekor felhasznált törzsek és növekedési képességük

*- MK1962 törzsháttér; ♦-MK1958 törzsháttér.

A vizsgált lókuszt kiiktatásához egy kanamicin rezisztencia kazettát építettünk az *E. coli* K-12-es törzs *abc-yaeE-yaeC* génklaszterének helyére ET-rekombinációs módszerrel (Muyers

és mtsai, 1999). Ezt a deléciót transzdukáltuk (P1 fággal) azután különböző metionin auxotróf törzsekbe a fenotípus vizsgálatához (MTD23 és MTD234; 2. táblázat).

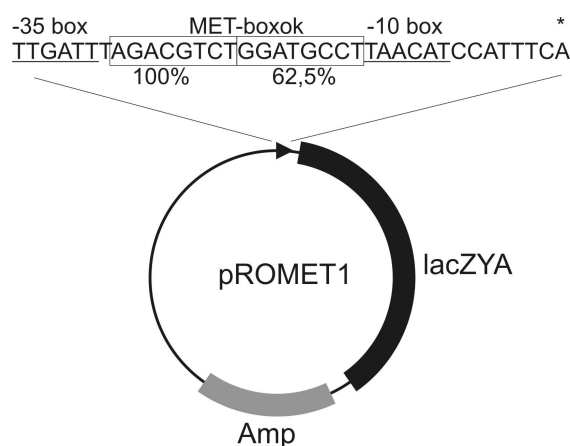
A klaszter deléciójának hatását metionin auxotróf törzsháttéren (MK1962-nél) 10 µg/ml D-metioninnal kiegészített, K-12 törzsháttéren (MK1958-nál) 250 µg/ml α-metil-metioninnal (αMM) kiegészített glükóz minimál (M9) táptalajon vizsgáltuk. Várakozásainknak megfelelően előbbi törzs képtelen volt az osztódásra, utóbbi viszont a toxikus szubsztrát mellett is képes volt szaporodni. Ezzel bizonyítást nyert, hogy a klaszter valóban a nagy affinitású metionin transzport rendszert kódolja.

Ezek után a gének szerepének vizsgálatához komplementációs kísérleteket terveztünk. Az operon génjeit különböző kombinációkban expressziós vektorokba (pBAD18 és 33) építettük, majd a fenti *metD* deficiens (MK1958 és 1962) törzsekbe transzformáltuk. A transzformánsokat párhuzamosan D-metioninnal, vagy a toxikus αMM-nal kiegészített M9-minimál lemezekre szélesztettük. A kialakított törzsek közül csak azoknál tapasztaltuk a szaporodási képesség visszaállását D-metionint tartalmazó, és növekedési gátlás megjelenését αMM-t tartalmazó lemezekben (2. táblázat), amelyekben mindhárom gént expresszáltuk. Ezzel sikerült bizonyítani, hogy az *abc-yaeE-yaeC* klaszter által kódolt fehérjék mindegyike szükséges a D-metionin és az αMM felvételéhez.

5.1.1.2 Az *abc* promóterének vizsgálata

A komplementációs kísérletekben a gének expressziója nem a saját promóterük irányítása alatt állt. Kíváncsiak voltunk tehát arra, hogy az *abc* gén előtt azonosított promóter valóban működőképes-e. A MET-boxok jelenléte arra utalt, hogy a MetJ represszor szabályozza a klaszter kifejeződését. A MetJ egy homodimer fehérje, amelynek kötődéséhez általában kettőt, egymás után elhelyezkedő MET-box szükséges (Marincs és mtsai, 2006). A kapcsolódó monomerek közötti kooperatív kölcsönhatás miatt a boxok száma és azok konszenzus szekvenciával való egyezése meghatározza a represszió mértékét (Old és mtsai, 1991).

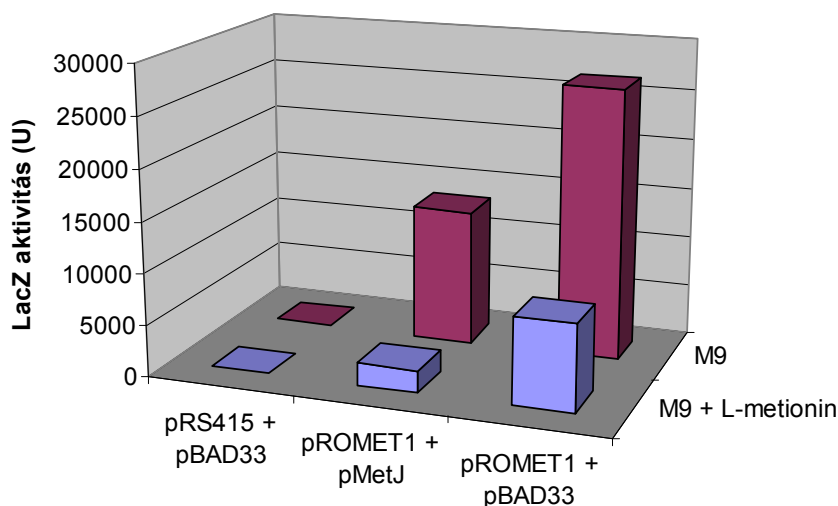
Kíváncsiak voltuk arra is, hogy az azonosított MET-boxok tudják-e biztosítani a MetJ megfelelő kapcsolódását a promóter régióhoz. A felmerülő kérdések megválaszolására a promóter szekvencia 37 bázispáros darabját beépítettük a pRS415 promóter tesztelő vektorba (pROMET1; 15. ábra), amely a β-galaktozidáz riporter kifejeződését teszi lehetővé.



15. ábra A promóter tesztelésére készített konstrukció vázlata

A pROMET1 plazmiddal transzformált *E. coli* (JM109) sejtekben magas β -galaktozidáz aktivitást tapasztaltunk, amely igazolja, hogy a hordozott DNS szekvencia képes valódi promóterként működni (16. ábra). Ha L-metioninnal kiegészített minimál tápoldatban növesztettük a sejteket, akkor közel harmadára csökkent a riporter aktivitása.

Plazmidok <i>E. coli</i> JM109-ben	U_{LacZ} (M9)	Szórás	U_{LacZ} (M9 + 100 μ g/ml L-metionin)	Szórás
pROMET1, pBAD33	26643	753	8476	190
pROMET1, pMETJ	13332	400	2145	38
pBAD33, pRS415 (K)	19	4	19	2



16. ábra Az L-metionin és a MetJ szabályozó hatása
L-metionin koncentráció: 100 μ g/ml.

Ezért a hatásért feltételezhetően a kromoszómális *metJ*-ről kifejeződő MetJ a felelős, de más szabályozó fehérje szerepét sem lehet kizárni. A MetJ reguláló hatásának konkrét bizonyításához a *metJ* gént (Hiroshi Takagi laborjából, Nakamori és mtsai, 1999) expressziós

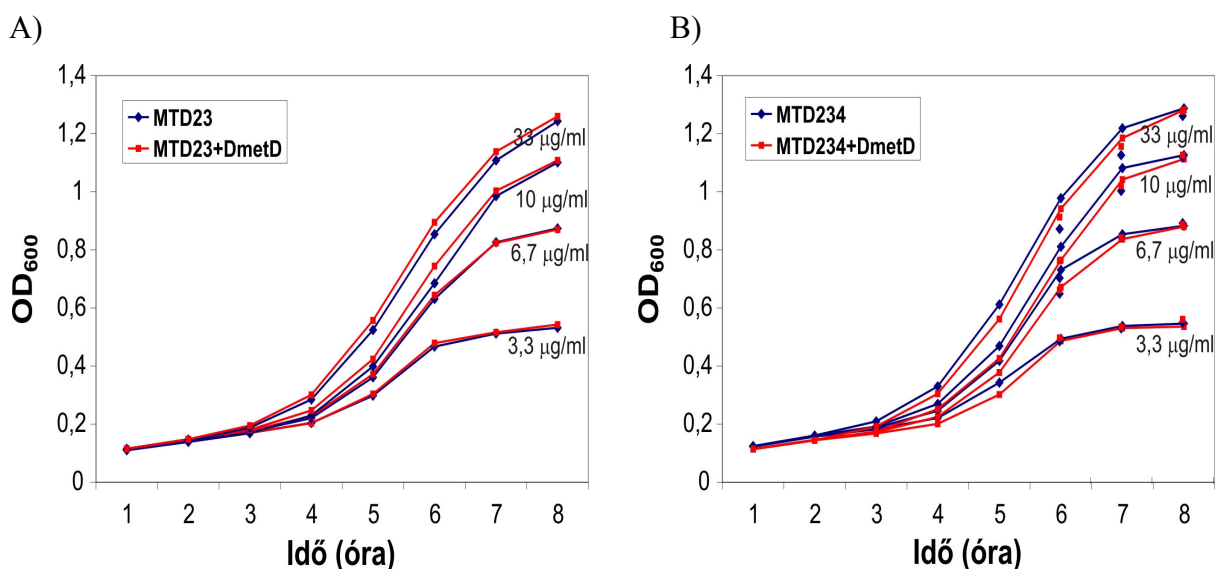
vektorba (pBAD33) klónoztuk (pMETJ), majd vizsgáltuk a MetJ szabályozó képességét a pROMET1 riporter plazmid segítségével. A MetJ túlexpressziója mintegy felére csökkentette a riporter fehérje aktivitását, azaz represszálta a promóter működését. A megemelt MetJ koncentráció és a szintén gátló hatású L-metionin jelenlétében még további, ~12-szeres csökkenést tapasztaltunk a promóter aktivitásában. Ezzel igazoltuk, hogy a MetJ valóban képes kötődni az *abc* promóteréhez.

A fenotípus tesztje és a promóter viselkedése alapján egyértelművé vált, hogy az *abc-yaeE-yaeC* klaszter a metionin-regulon részét képezi, és a nagy affinitású metionin transzportert kódolja. Ennek megfelelően a gének új, hivatalos elnevezése sorrendben *metN*, *metI* és *metQ* lett.

5.1.1.3 Az L-metionin transzport multiplicitásának kérdése

Kadner és munkatársai legalább két különböző L-metionin felvételi rendszert írtak le, amelyek közül az egyiket sikerült azonosítanunk. Az elkészített *metD* deléciós törzs lehetőséget ad a kis affinitású transzporter azonosítására is. A projekt sikeres folytatásának reményében vizsgáltuk a *metD* deléciós és metionin auxotróf (MTD23) törzs szaporodási képességét L-metioninnal kiegészített glükóz minimál tápoldatban. Kadner és Watson (1974) eredményének megfelelően nem tapasztaltunk különbséget közöttük (17. ábra „A”).

A *metP* azonosítására irányuló mutagenézis kísérlet elvégzése előtt szakirodalmi kutatást végeztünk a lehetséges gének összegyűjtésére. A legvalószínűbb jelöltünk, egy metionin-analóg permeáz, az *mmuP* kódolta S-metil-metionin transzporter (Thanbichler és mtsai, 1999) volt. Az azonosság eldöntéséhez a *metD* deléciót a metioin auxotróf és S-metil-metionin permeáz gén deficiens MTD234-be transzdukáltuk át. Amennyiben az *mmuP* kódolja a kis affinitású transzportert, Kadner és Watson (1974) eredményei alapján a kettős deléciós törzs (*ΔmmuP* és *ΔmetD*) lassabb szaporodásra képes alacsony (10 μg/ml) L-metionin koncentráció jelenlétében, mint a *ΔmetD* deficiens. A fenotípus tesztelését folyadékkultúrában (M9-minimál) különböző L-metionin koncentrációk (3,3-6,7-10-33 μg/ml) mellett végeztük. Sajnálatos módon a törzsek között nem tapasztaltunk számottevő különbséget az osztódás ütemében (17. ábra „A” és „B”) még alacsony L-metionin koncentráció mellett sem. Az eredmény arra utal, hogy az S-metil-metionin permeáz nem azonos a kis affinitású L-metionin transzporterrel. Később Zhang és munkatársai (2003) megerősítették ezt a következtetést.



17. ábra Növekedési görbék különböző L-metionin koncentrációjú tápoldatban
A: kék-MTD23, narancs-MTD23 $\Delta metD$. **B:** kék-MTD234, narancs-MTD234 $\Delta metD$. A kísérlet 3,3-6,7-10-33 $\mu\text{g/ml}$ L-metioninnal kiegészített M9 minimál tápoldatban történt.

Kadner és Watson eredményei alapján az izolált *metD-metP* kettős mutáns törzsek magas, 100 $\mu\text{g/ml}$ L-metionin koncentráció mellett ugyanúgy képesek növekedni, mint a kiindulási metionin auxotróf törzs. Ezek alapján tehát a MetD és MetP mellett legalább még egy, alacsony affinitású transzporter jelenlétére következtethetünk. Elképzelhető az is, hogy az MmuP ez a harmadik transzporter, csak a funkcionális MetP jelenlétében nem tapasztalható fenotipikus különbség a *metD* deficiens és *metD-mmuP* kettős mutáns törzsek között. Zhang és mtsai (2003) eredményei azonban ezt a feltételezést nem támogatják, így a *metP* és a harmadik transzporter identitása továbbra is kérdéses maradt.

5.1.1.4 Kitekintés

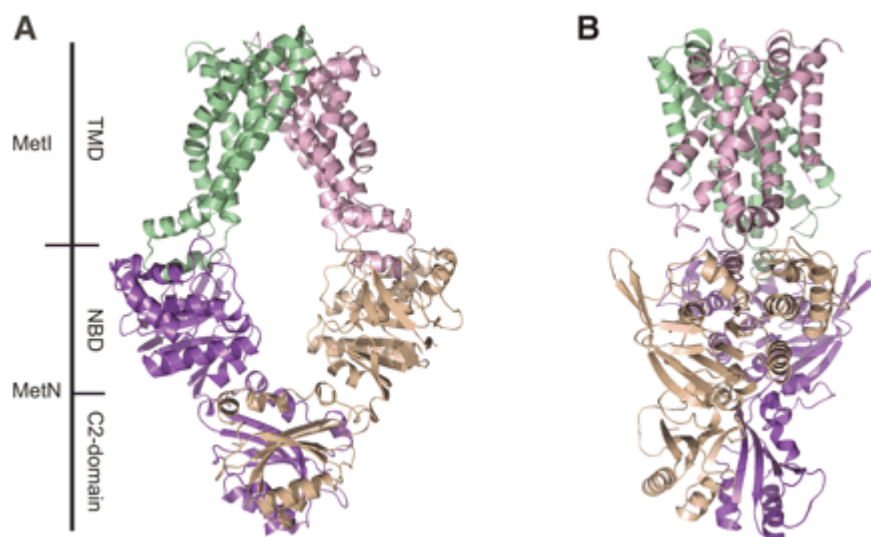
Publikációnkkal gyakorlatilag egyidőben (Gál és mtsai, 2002) jelent meg Merlyn és munkatársainak (2002) cikke, amelyben ugyanazokra a következtetésekre jutottak, mint csoportunk. 2003-ban hasonló, ugyanakkor bővebb publikációjukban Zhang és munkatársai szintén megerősítették eredményeinket. Radioaktív aminosav felvételi tesztekkel egyértelműen bizonyították, hogy a MetD valóban képes az L- és D-metionin, valamint az N-formil-L-metionin felvételére is. A *metD* deficiens törzs L-metionin transzportja gátolható

volt L-metioninnal, és kisebb mértékben L-treonin, L-valin, L-alanin és L-leucin magas koncentrációjával.

Filogenetikai analízisük szerint a *metD* széles körben elterjedt a Gram-pozitív és -negatív baktériumok között egyaránt. Megállapították továbbá, hogy a transzportrendszer egy új ABC-transzporter családot alkot, amelyet Methionine Uptake Transporter (MUT) családnak nevezték el (TC #3.A.1.23). Érdekes módon a MUT család filogenetikai szempontból közelebb áll a poláris aminosav transzporter családhoz (PAAT family, TC# 3.A.1.3), mint a hidrofób aminosav transzporter családhoz (HAAT, TC# 3.A.1.4). A három gént általában hasonló méretűnek találták, a transzmembrán domén öt lehetséges TMS-sel rendelkezik. Az *E. coli*tól eltérően, néhány baktérium genomjában (pl. *Salmonella*, *Yersinia*) két MUT-családba tartozó fehérje is jelen van.

A MUT család számos tagja befolyásolja a hordozó baktérium patogenitását. A *Salmonella typhimurium* ismeretlen funkciójú *sbfa* génje eszenciális szerepet játszik egerek megfertőzésében (Pattery és mtsai, 1999). A *Haemophilus influenzae hlpA* génjének mutációja nagymértékben csökkenti a baktérium terjedését patkányokban (Chanyangam és mtsai, 1991). Egy másik MUT-transzporter (AbcBCD) a *Helicobacter pylori* kolonizációjához eszenciális (Hendricks és Mobley, 1997). A *Yersinia pestis* külső metionin forrást igényel a szaporodásához (Brubaker, 1972), így a metionin transzporter lehetséges gyógyszer target lehet ebben az organizmusban is. Szekvencia homológia alapján *Bacillus subtilis*ban is sikerült azonosítani a nagy affinitású L-metionin transzportert (Hullo és mtsai, 2004). Hasonlóan az *E. coli*hoz további transzporterek jelenlétét feltételezik, amelyeket azonban eddig még nem sikerült megtalálni.

2008-ban amerikai kutatóknak sikerült az *E. coli* MetNI (korábban Abc és YaeE) térszerkezetét röntgendiffrakciós módszerrel megfejteniük (Kadaba és mtsai, 2008). Az aktív transzporter négy egységből áll: két transzmembrán (MetI) és két ATP-kötő (MetN) fehérjéből. Utóbbiak C-terminálisán egy másik domén (C2) is megtalálható, amelynek a funkciója ismeretlen volt (18. ábra).



18. ábra A MetNI térszerkezete (befelé nyitott konformáció)
TMD-transzmembrán domén, NBD-nukleotid-kötő domén. (Kadaba és mtsai, 2008).

A transzmembrán domének a predikcióknak megfelelően 5-5 TMS-ből állnak, az N- és C-terminális a membrán ellentétes oldalain helyezkedik el. Bizonyították, hogy a C2-domének képesek szabályozni a metionin transzportot. Az ATP-kötő hely ugyanis a két ATP-kötő domén összekapcsolódásával, az illeszkedő felületeken alakul ki. Az L-metionint kötő C2-domének távol tartják egymástól az ATPáz alegységeket, így végeredményben megakadályozzák a transzportot. Ezzel tehát sikerült megérteni azt a korai kísérleti megfigyelést is, hogy a citoplazmatikus metionin koncentráció képes közvetlenül szabályozni a metionin felvételét.

5.1.2 A GltS topológiája

5.1.2.1 A GltS topológiájának predikciója

A membránfehérjék topológia vizsgálata lényegében a transzmembrán szegmenseket összekötő hurokszekvenciák helyzetének meghatározását jelenti. A kétdimenziós szerkezet jellemzéséhez minimálisan elegendő egy hurokról egy kísérleti adat (pl. proteáz hasítás, Cys-hozzáférés, riporter aktivitás). Mivel azonban majdnem az összes kísérletes módszer valamilyen módosított formában vizsgálja a célfehérjét, a módosítások (költség)hatékony elhelyezéséhez előzetes információkra van szükség. Tudni kell, hogy hol találhatóak a hurkok, és a módosításokat oda érdemes tervezni. A vizsgálandó membránprotein előzetes jellemzésére TMS predikciós szoftvereket alkalmaznak. A világhálón sokféle ilyen számítógépes eszköz elérhető, és segítségükkel gyorsan képet alkothatunk a lehetséges hurok- és TM szekvenciák elhelyezkedéséről.

Munkánk kezdetén az összes elérhető szoftverrel megvizsgáltuk a GltS szekvenciáját. A különböző predikciók szerint a lehetséges TMS-ek száma 9-12 (3. táblázat). Munkahipotézisként a lehető legtöbb, azaz 12 TMS jelenlétét feltételeztük.

Program/ algoritmus	TMS-ek száma
PredictProtein	12
TOPPRED2	12
MEMSAT	11
Kyte-Doolittle	12
TMPRED	12 v. 11
DAS	12 v. 9
HMMTOP	11
SOSUI	11
TMHMM	11 v. 9
TMAP	10
PHDhtm	12

3. táblázat A GltS-ben prediktált TMS-ek száma

5.1.2.2 Kísérletes stratégia

A topológia vizsgálatához a viszonylag egyszerű és széles körben sikerrel alkalmazott génfüziós stratégiát alkalmaztuk. A periplazmatikus hurkok kijelöléséhez az alkalikus foszfátázt (PhoA), citoplazmatikus riporterként pedig a β -galaktozidáz (LacZ) enzimet

választottuk. A C-terminális csonkolásos stratégiával GltS-riporter fúziókat hoztunk létre különböző molekuláris biológiai technikákkal. Konstrukcióink többsége random fúziós pont kialakításával történt (transzpozonos mutagenézis, egyirányú deléciók), a kimaradó vagy bizonytalan helyzetű régiókba irányított fúziókat terveztünk.

Fúzió	Módszer	Fúziós pont	PhoA aktivitás (U)	Szórás
1	TnphoA	T14	65	5
2	TnphoA	K22	11	2
3	Egyirányú deléció	G57	198	13
4	TnphoA	E59	190	15
5	Egyirányú deléció	S65	222	2
6	Egyirányú deléció	P69	206	8
7	TnphoA	G79	33	1
8	PCR	R92	6	1
9	Egyirányú deléció	V100	65	4
10	Egyirányú deléció	A110	162	15
11	Egyirányú deléció	S117	195	13
12	TnphoA	G120	40	0
13	LacZ fúzióból átépítve	W144	38	1
14	LacZ fúzióból átépítve	A161	25	1
15	TnphoA	V170	19	2
16	Egyirányú deléció	V230	145	11
17	Egyirányú deléció	K232	165	14
18	Egyirányú deléció	A242	134	5
19	PCR	R273	7	1
21	Egyirányú deléció	A290	163	18
21	Egyirányú deléció	M292	202	11
22	Egyirányú deléció	K295	189	18
23	Egyirányú deléció	A303	195	10
24	Egyirányú deléció	T314	165	9
25	TnphoA	A318	145	7
26	Egyirányú deléció	W326	76	5
27	PCR	D334	6	1
28	Egyirányú deléció	K391	113	13
29	Egyirányú deléció	I398	89	1
30	Egyirányú deléció	A400	135	11
pCP1(-)		–	2	0
pGE1		–	2	0

4. táblázat A topológia meghatározásához felhasznált PhoA-fúziók jellemzői

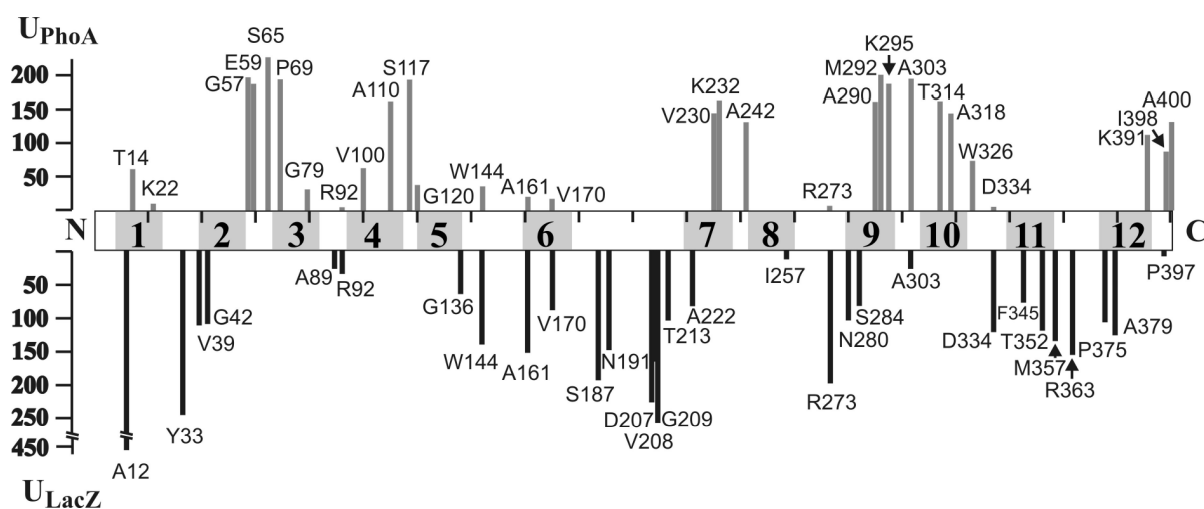
A riporter fúziók kialakításának a legegyszerűbb módja a transzpozonos mutagenézis, a GltS vizsgálatát ezzel kezdtük. A *TnphoA* (Manoil és Beckwith, 1986) egy promóter és szignál-szekvencia nélküli alkalikus foszfatáz gént kódol (*phoA*), amely csak abban az

esetben tud átíródni, ha a transzpozon éppen a target gén leolvasási keretének megfelelően integrálódik. Foszfataáz aktivitás pedig csak akkor tapasztalható, ha a riporter kijut a periplazmatikus térbe, mivel az enzim aktív konformációjához diszulfid-hidak kialakulása szükséges. A *gltS*-t plazmidon hordozó *E. coli* sejteket fertőztük a *TnphoA*-t kódoló λ -fággal (λ *TnphoA*). A transzpozon által kódolt kanamicin rezisztencia alapján szelektálni tudtunk a plazmidba történő integrációra, majd a plazmidok izolálása és újratranszformálása után a foszfataáz aktivitást mutató telepeket vizsgáltuk. A beépülési helyeket PCR-es analízissel határoltuk be, a pontos helyet szekvenálással azonosítottuk.

Fúzió	Módszer	Fúziós pont	LacZ aktivitás (U)	Szórás
1	Egyirányú deléció	A12	454	64
2	Egyirányú deléció	Y33	240	13
3	Egyirányú deléció	V39	115	7
4	Egyirányú deléció	G42	113	14
5	Egyirányú deléció	A89	28	4
6	PCR	R92	36	3
7	Egyirányú deléció	G136	67	17
8	Egyirányú deléció	W144	143	10
9	Egyirányú deléció	A161	155	20
10	PCR	V170	92	12
11	Egyirányú deléció	S187	200	2
12	Egyirányú deléció	N191	153	15
13	Egyirányú deléció	D207	235	17
14	Egyirányú deléció	V208	171	17
15	Egyirányú deléció	G209	268	19
16	Egyirányú deléció	T213	105	9
17	Egyirányú deléció	A222	87	8
18	Egyirányú deléció	I257	24	5
19	PCR	R273	212	24
20	Egyirányú deléció	N280	102	17
21	Egyirányú deléció	S284	87	18
22	Egyirányú deléció	A303	25	9
23	PCR	D334	127	19
24	Egyirányú deléció	F345	80	4
25	Egyirányú deléció	T352	121	15
26	Egyirányú deléció	M357	140	22
27	Egyirányú deléció	R363	151	28
28	Egyirányú deléció	P375	114	11
29	Egyirányú deléció	A379	131	24
30	Egyirányú deléció	P397	17	6
pGL2		–	1	0
pGL3		–	1	0

5. táblázat. A topológia meghatározásához felhasznált LacZ-fúziók jellemzői

Harminckét független mutagenézis kísérlet során mindössze hét olyan klónt azonosítottunk, amelyeknél a *TnphoA* különböző pozíciókba integrálódott. Ráadásul a kapott beépülési helyek sem feleltek meg a várakozásainknak, csak két egyértelműen informatív, nagy PhoA aktivitású fúzió volt közöttük. Úgy tűnt, hogy a szükséges nagyszámú fúzió kialakítása a transzpozonnal lassú és kétséges végeredménnyel jár. Ezért kerestünk egy hatékonyabb és irányíthatóbb módszert, amellyel gyorsan, elegendően sok konstrukció készíthető. Választásunk az exonukleáz III és S1 nukleáz enzimek kombinált alkalmazásán alapuló egyirányú deléciós technikára esett, mivel ezzel a módszerrel egyetlen kísérletben nagyszámú fúzió alakítható ki kontrollálható módon. A transzpozonos próbálkozás arról azonban meggyőzött minket, hogy a PhoA mellett szükség lesz - a citoplazmatikus hurkok egyértelmű azonosításához - egy kizárólag citoplazmatikusan aktív riporter alkalmazására is. Viszonylag egyszerűen mérhető aktivitása miatt a β -galaktozidázt választottuk, és LacZ-vel is készítettünk egy sorozat fúziós fehérjét. Az egyirányú deléciókkal kapott, több mint ötven különböző fúziós fehérje és a hozzájuk tartozó riporter aktivitások már elég jó képet adtak a GltS kétdimenziós szerkezetéről. Bizonyos pozíciók azonban továbbra is „lefedetlenek” maradtak. Ezek jellemzésére irányítottan, specifikus primerek és PCR segítségével alakítottunk ki fúziókat. Végül összesen 60 génfúziót használtunk fel a szerkezet jellemzésére (4-5. táblázat; 19. ábra), amelyekkel minden hurok szekvenciát legalább két enzimaktivitással tudtunk jellemezni.



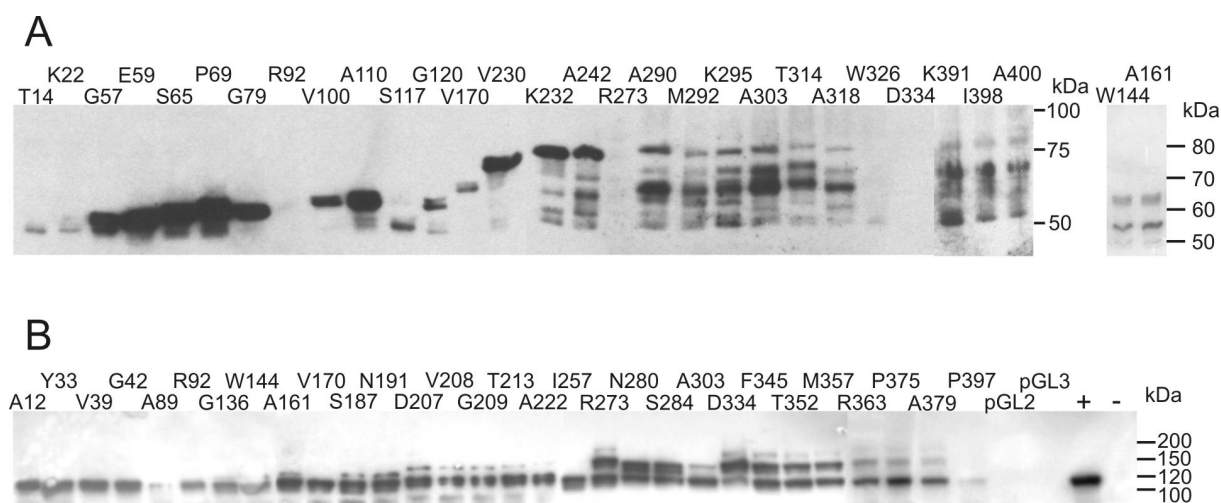
19. ábra A fúziós pontok és a riporter aktivitások

A szürke téglalapok a PHDhtm programmal prediktált TMS-eket szimbolizálják (Rost et al., 1996). N-N terminális; C-C terminus. U_{LacZ} - β -galaktozidáz aktivitás-fekete függőleges vonalak; U_{PhoA} , alkalikus foszfatáz aktivitás-szürke függőleges vonalak. A GltS-t szimbolizáló vízszintes téglalapban lévő kis vonalak 20 aminosavaként vannak elhelyezve. A jelölt aminosavak fúziós pontjainkat jelölik.

5.1.2.3 Western-blot analízis

A riporter aktivitások önmagában nem elegendők a topológia korrekt megrajzolásához. Amikor egy adott pozícióban nagy riporteraktivitást tapasztalunk, annak két oka lehetséges. Az első, hogy a fúzió intakt és valóban a megfelelő kompartmentben található a fúziós pont. Az is előfordul azonban, hogy valamilyen okból (például proteolitikus degradáció hatására) az aktív riporter leválik a partnerről, és szolubilis formában van jelen a sejtben. Az is előfordulhat, hogy ugyanakkora mennyiségű membrán-kötött riporter sztérikus okok, vagy a korlátozottabb szubsztrát diffúzió miatt kisebb aktivitást produkál, mint a szabad forma. Az aktivitás önmagában tehát félrevezető lehet, emiatt tartják szükségesnek a fúziók szekvenciaanalízise mellett maguknak a fúziós fehérjéknek a detektálását is. Többféle, a riporter fehérjékre specifikus antitest is hozzáférhető a kereskedelmi forgalomban, így Western-blot analízissel vizsgálni lehet a fúziós proteineket.

Az egyes fúziókat termelő törzseket exponenciális fázisban lecentrifugáltuk, majd szonikálást és centrifugálást követően meghatároztuk a felülúszó összfehérje tartalmát (Bradford-reakcióval). A Western-blot során a poliakrilamid gélekre azonos összfehérje-mennyiségű sejtlyázátumot vittünk fel. A gélelektroforézis és transzfer után a fúziós fehérjéket alkalikus foszfatáz és β -galaktozidáz specifikus, tormaperoxidázzal konjugált poliklonális antitestek segítségével vizualizáltuk. A vizsgálat során nem várt nehézségekkel találtuk szembe magunkat. A legszembetűnőbb tapasztalat az volt, hogy a kétféle riporterrel kialakított fúziók másként viselkedtek, például eltérő mértékű degradációt mutattak (20. ábra).



20. ábra A fúziós fehérjék detektálása Western-blottal

A: alkalikus foszfatáz fúziók, B: β -galaktozidáz fúziók; +: *E. coli* K-12 IPTG-vel indukálva. (PhoA-47 kDa, LacZ-117 kDa). A jelölt aminosavak fúziós pontjainkat jelölik.

A foszfatáz fúzióknál majdnem mindegyik intakt fúziós fehérjét tudtuk detektálni. Ugyanakkor megfigyelhető, hogy a jelek intenzitása csökken és egyre nagyobb mértékű degradáció látható, ahogy a GltS-ből egyre hosszabb darab van jelen a fúziós fehérjében. Elképzelhető, a nagyobb hidrofób rész jelenléte miatt a transzfer rosszabb hatékonysággal zajlott.

Összességében elmondhatjuk, hogy a PhoA esetén detektált jelek összeegyeztethetők a mért riporter aktivitásokkal. A nagyon kicsi aktivitású fúzióknál kevés vagy nem látható jelet kaptunk (pl. R92 és D334 PhoA fúziók), ami gyors degradációs folyamatokra utal.

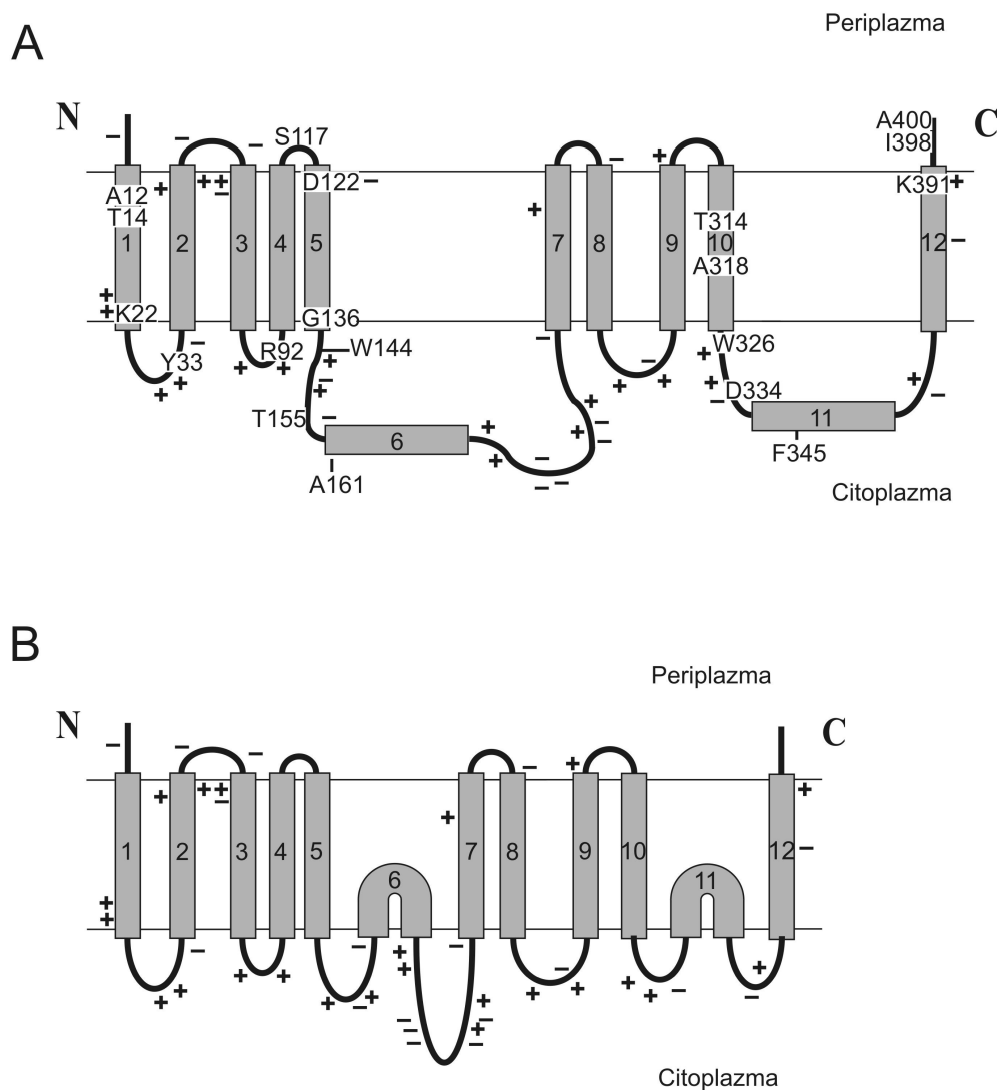
A LacZ-fúziók esetén még az előbbinél is nagyobb akadályokkal kerültünk szembe. Sok kísérlet és antitest-csere után harmincból 18 esetben tudtuk detektálni a teljes fúziós protein halvány jelét. Viszont mindegyik mintában megjelent egy, a szabad β -galaktozidáz méretének megfelelő jel. Az R273-as fúziótól kezdődően egy erős degradációs csík is látható. Ugyanakkor az enzimaktivitások nem függenek a szolubilis LacZ-nek tűnő jel intenzitásától (pl.: I257 és A303 LacZ fúziók), és összességében jól kiegészítik a megbízhatóbb alkalikus foszfatázos eredményeket. A szakirodalomban más laboratóriumok is beszámoltak hasonló detektálási nehézségekről a LacZ-vel kapcsolatban, emiatt úgy gondoljuk, az aktivitás értékeket - a detektálási problémák ellenére - érdemes figyelembe venni.

5.1.2.4 A GltS topológia modellje riporter fúziók alapján

A GltS membránbeli lefutásának meghatározásához összesen hatvan riporterfúziót használtunk fel. Néhány alább részletezett példától eltekintve az enzimaktivitás értékek jól kiegészítik egymást, és a fehérje nagy részének a lefutása ezek alapján egyértelmű. A C-terminális csonkolás módszerének természetesen vannak hátrányai, hiszen a vizsgált protein erősen módosított formája van csak jelen. A rövidített forma általában megőrzi a natív lefutását, de előfordul(hat), hogy a C-terminális felől elhelyezkedő topológiát meghatározó szignálok eltávolításával módosul a szerkezet. A szakirodalom részletesen bemutat néhány tipikus hibalehetőséget (van Geest és Lolkema, 2000), ezeket figyelembe vettük az eredmények értékelésénél.

Az első két fúzió ellentmondó következtetésre vezet az első feltételezett TMS-t illetően (19. ábra). A T14-es PhoA fúzió közepes aktivitást mutat, tehát a szekvenciárész gyenge szignálpeptidként bizonyos valószínűséggel ki tudja vezetni a riportert a periplazmatikus

térbe. A T14-ig tartó szegmens maradéka tehát elég hidrofób a membránba való beépüléshez. A K22-es pozíció viszont egyértelműen citoplazmatikus lokalizációra utal. A második TMS irányultsága teljesen egyértelmű a körülötte lévő aktivitások alapján. Előtte egy nagy és két közepes LacZ, utána négy nagy PhoA aktivitású fúzió: az első hurok a membrán citoplazma felőli oldalán helyezkedik el. Ezt megerősíti a szegmens erős nettó pozitív töltése is (egy Arg és három Lys). A képet csak az A12-es pozícióban tapasztalt nagy LacZ aktivitás zavarja meg.



21. ábra A GltS topológia modelljei a riporter aktivitások alapján

A szürke, számozott téglalapok a lehetséges transzmembrán szekvenciákat szimbolizálják. A jelölt aminosav pozíciók a szövegben kiemelt fúziók fúziós pontjai. „A” a 6. és 11. prediktált TMS nem íveli át a membránt; „B” a hidrofób karakterű szekvenciák bemerülő hurkokat képeznek

Azoknál a fehérjéknél, ahol az N-terminális a periplazmába nyúlik megfigyelték (van Geest és Lolkema, 2000), hogy az első TMS-ből megmaradó néhány aminosav gyakran nem

elegendő ahhoz, hogy a riportert a membránhoz rögzítse. Emiatt a fúziós fehérje szolubilizálódik és nagy aktivitást mutat. Az A12-es LacZ fúzió pontosan így viselkedik, aktivitása (454 U) közel kétszer akkora, mint a többi nagy aktivitású fúzióé (220-240 U). Összességében tehát az első hidrofób szegmens valódi TMS-nek tűnik, ami kívülről a citoplazma felé irányul.

Egy másik magyarázatra szoruló terület a 3. és 4. TMS közötti rövid hurok. Várakozásunkkal ellentétben az itt található LacZ fúziók csak kis aktivitást mutattak. A kérdéses rövid szekvencia (RAGGR) ugyanakkor nagyon hasonlít a Nagy Facilitátor Szupercsalád erősen konzervált „RXGRR” motívumához, amelyet kulcsfontosságú citoplazmatikus kihorgonyzó szekvenciaként jellemeztek (Jessen-Marshall és mtsai, 1995; Sato és Mueckler, 1999).

A fehérje további részében az alternáló enzimaktivitások elég egyértelműen jelzik a membránbeli lefutást. A membrán periplazmatikus oldalán található a 4., a 7., a 9. hurok és a C-terminális. Az eredmények alapján felvázolható volt a GltS kétdimenziós szerkezeti modellje (21. „A” ábra). A GltS 10 transzmembrán szekvenciával rendelkezik, két további prediktált hidrofób szegmens pedig nem valódi transzmembrán szegmens. Utóbbiak feltételezésünk szerint hurkot képezve a membránba merülve helyezkednek el (ún. „reentrant loop”-ok; 21. „B” ábra).

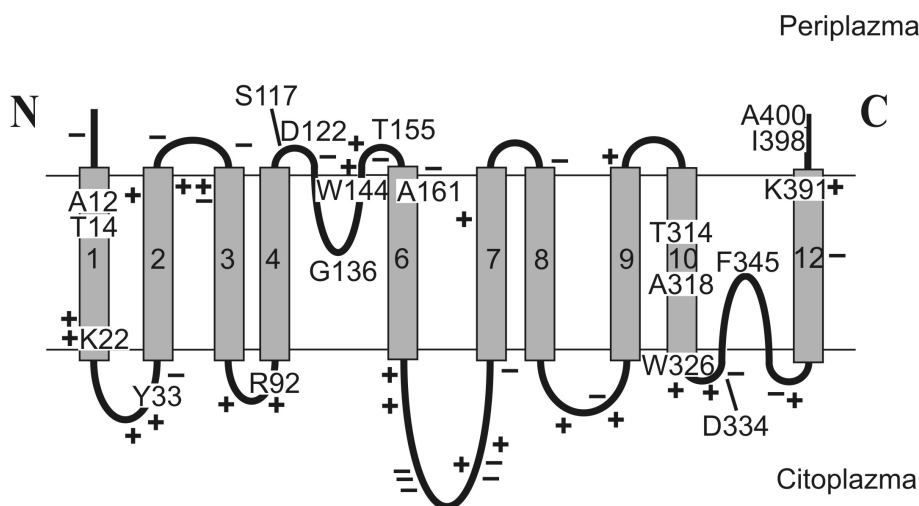
5.1.2.5 A GltS topológiája

Eredményeink publikálása előtt nem sokkal jelent meg egy tanulmány, amelyben a GltS topológiáját cisztein-hozzáférési kísérletekkel vizsgálták (Dobrowolski és mtsai, 2007). A szerzők hidrofobicitási karakterisztikájuk alapján hasonlóságot találtak a GltS és a *Klebsiella pneumoniae* citrát transzportere (CitS) között. Az általuk korábban már alaposan jellemzett CitS 11 TMS-sel rendelkezik és az első TMS kivételével valóban megegyező hidrofobicitási profilt mutat a GltS-sel. Klasszifikációs módszerük (Memgen) kísérletes bizonyításához kezdték vizsgálni a GltS lefutását. Az általuk leírt szerkezet jórészt megegyezik a mi riportert fúziókon alapuló struktúránkkal. Tíz TMS-t azonosítottak, az N- és C-terminális egyaránt a periplazmatikus térbe nyúlik. Lényeges eltérés van azonban az 5. és a 6. prediktált TMS elhelyezkedésében (22. ábra). Modelljünkben a 6. hidrofób szekvencia valódi TMS, az 5. viszont nem az.

A Memgen-szerkezet komoly fejtörést okozott, az ellentmondás elsőre feloldhatatlannak tűnt. A riporter fúziós kísérletek eredményeit két további foszfatáz fúzióval kiegészítettük (W144 és A161), és újabb ellenőrzések után továbbra is helyesnek találtuk. A probléma megoldását végül az eltérő módszerek alkalmazásában, konkrétan a C-terminális csonkolás technika „mellékhatásában” találtuk meg.

A Dobrowolski és munkatársai által alkalmazott cisztein-hozzáférési módszer ugyanis a lehető legkisebb módosítással jár, és a célfehérjét a valóshoz legközelebb álló állapotában vizsgálja. Ehhez aminosavcserékkel egy cisztein-mentes targetfehérje változatot kell létrehozni, majd a vizsgálandó helyeknek megfelelően egy sorozat egyedi ciszteinnel rendelkező mutánst. Megfelelő reagensekkel és fluoreszcens jelölő molekulával az egyedi cisztein lokalizációja meghatározható. Az általunk alkalmazott C-terminális csonkolás ehhez képest durva beavatkozás, a vitatott helyzetű régióban található fúzióknál a GltS fele hiányzik. A nem elegendően önálló struktúrájú szekvenciák, a C-terminális felőli topológia meghatározó tényezők hiányában más szerkezetet is felvehetnek. Emellett a nagyméretű fúziós-partnerek is torzíthatják a natív szerkezetet.

A CitS vizsgálatok a vitatott helyzetű szekvenciáról (a GltS 5. hidrofób szegmense, CitS-ben az ún. „Vb” régió) bizonyították, hogy nem transzmembrán szekvencia. Feltételezések szerint a 22. ábrán látható módon egy bemerülő hurkot képez, de kísérletekkel ezt még nem támasztották alá.



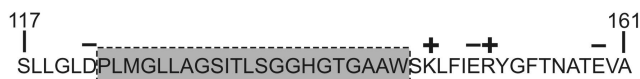
22. ábra A GltS topológiája

A riporter fúziók és a cisztein-hozzáférési kísérletek eredményeivel is összeegyeztethető topológia-modell. A szürke, számozott téglalapok a lehetséges transzmembrán szekvenciákat szimbolizálják. A jelölt aminosavak a szövegben is kiemelt fúziók fúziós pontjai.

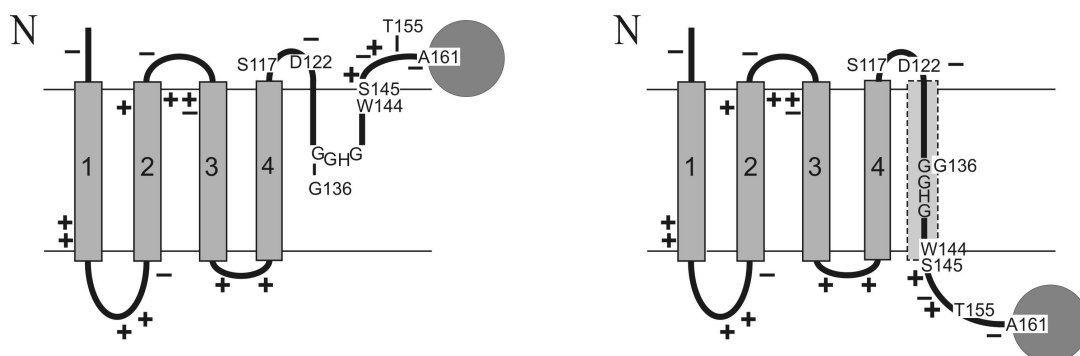
A régió hidrofobicitása, hossza és töltéseloszlása alapján megfelel a valódi TMS-ek jellemzőinek (23. ábra „A”). Néhány predikciós program valóban TMS-nek jelzi, ugyanakkor

a cisztein-hozzáférési eredmények szerint nem az. A W144, A161 és a V170-es fúzióinkban azonban egyértelműen valódi TMS-ként viselkedik, amely a riportereket a citoplazmatikus térbe vezeti (23. ábra „B” jobboldali része).

A



B



23. ábra A 5. prediktált TMS szekvencia és viselkedése

A: a prediktált 5. TMS és szekvencia környezete. B: a régió lehetséges szerkezeti fúziós fehérjéinkben. A tapasztalt riporter enzimaktivitások a jobboldali struktúra kialakulására utalnak. A 122-es és 155-ös pozíciók a periplazma felől hozzáférhetőek voltak Dobrowolski és mtsai (2007) cisztein-hozzáférési kísérleteiben. A többi jelölt aminosav riporter fúzióink helyét jelzik a régióban.

Az 5. hidrofób szegmens érzékeny és befolyásolható szerkezetére szakirodalmi adatokat is találtunk. A Vb régió TMS-ként való viselkedésére a Lolkema-labor munkája (van Geest és mtsai, 1999.) szolgáltatott bizonyítékot. A leader peptidáz (Lep) tesztrendszerben az individuálisan jelenlévő Vb régió képes volt az ER membránba inszertálódni, bár ennek hatékonyságát és stabilitását a szekvenciakörnyezet jelentősen befolyásolta.

A szerkezeti modellek közötti látszólagos ellentmondás tehát feloldható azzal a feltételezéssel, hogy az 5. prediktált TMS egy szenzitív (vagy nem-meghatározott) struktúrájú régió, amelyet a natív szekvenciakörnyezet stabilizál. Amennyiben a C-terminális felőli topológia meghatározó tényezők hiányoznak, a szegmens helyzete megváltozik, és a Vb régió valódi TMS-ként viselkedik. A GltS-sel végzett cisztein-hozzáférési és riporter fúziós vizsgálatok tehát egyaránt helyesen írják le az adott módosított fehérjék struktúráit. A Vb régió sajátos szekvenciája miatt azonban a fúziós fehérjékben a megmaradó GltS topológiája nem azonos a natív fehérjéjével. Eredményeink összhangban vannak és alátámasztják a Dobrowolski és munkatársai által bemutatott szerkezetet (22. ábra). Sőt, a régióbeli fúzióink

viselkedése a „bemerülő hurok”-elképzelés első kísérletes bizonyítékát adják, egyben rámutatnak a 6. prediktált TMS szerkezet stabilizáló hatására is.

A topológia modell szerint a GltS egy szimmetrikus felépítésű transzmembrán fehérje. Tíz membránt átérő szegmenst azonosítottunk, a fehérje N- és C-terminálisa a plazmamembrán periplazmatikus tér felőli oldalán helyezkedik el. A fehérje két nagyobb, öt-öt transzmembrán szegmenst tartalmazó, antiparallel helyzetű egységből áll. Eredményeink megerősítik, hogy a 4-5. és 9-10. transzmembrán szegmensek közötti két hidrofób régió a membránba bemerülő hurkot alkot.

A GltS membránbeli lefutásának ismerete további kutatások alapjául szolgálhat, amelyeknek két fő lehetséges iránya a következő. A topológia modell alapján elméleti módszerekkel is vizsgálhatóvá válik a GltS működése és háromdimenziós szerkezete. Emellett a szerkezet a kísérletes analízist is nagyban segíti, hiszen könnyebb behatárolni a fehérje működéséhez szükséges aminosavak helyét. Elképzelhető, hogy a bemerülő hurkok a háromdimenziós szerkezetben térben közel helyezkednek el, és csúcspontjaik kapcsolatban állnak egymással. Emiatt lehetséges, hogy a szubsztrátok transzportjában is fontos szerepet játszanak, ahogy ez több más transzporter fehérjénél megfigyelhető (pl. aquaporinok, Glt_{ph}).

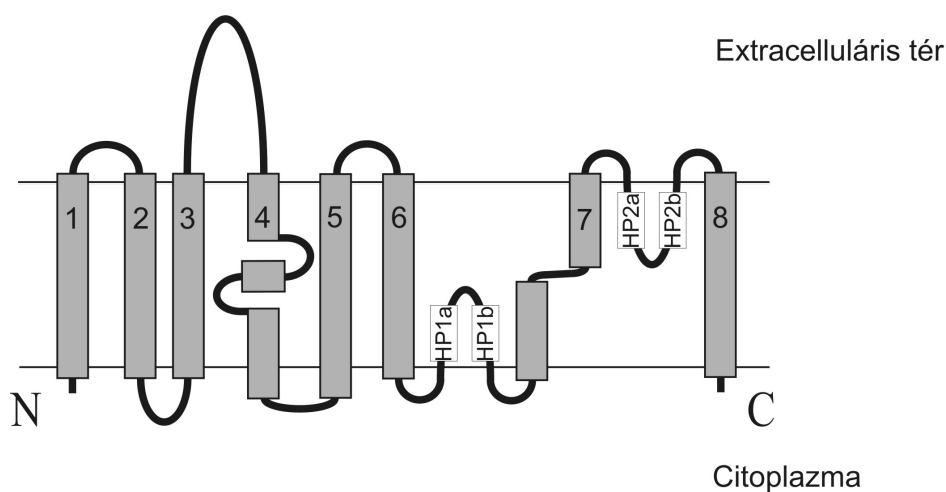
5.1.2.6 Összehasonlítás az emlős glutaminsav transzporterekkel

A glutaminsav és a nátrium-kapcsolt glutaminsav transzporterek fontos szerepet játszanak a baktériumoktól az emberig minden szervezetben. Az emlős központi idegrendszerben a többi neurotranszmitterhez képest a glutaminsav extrém nagy mennyiségben van jelen, amely elérheti az 5–10 mmol/kg-os koncentrációt (Sheldon és Robinson, 2007). A nagy mennyiségű extracelluláris glutaminsav viszont toxikus az idegsejtek számára, ezért nagyon fontos a gyors visszajuttatása a citoplazmába. Ezt a feladatot - túlnyomó részben – nátrium-kapcsolt glutaminsav transzporterek végzik (EAAT-k).

A glutaminsav transzport módosulásait számos pszichiátriai- és egyéb kórképpel is összefüggésbe lehet hozni. A skizofrénia, major depresszió, amiotrófiás laterális szklerózis (ALS vagy Lou Gehrig-betegség), epilepszia, Huntington-kór, Alzheimer-kór, Parkinson-kór, agyi ischaemia, kényszerbetegség (OCD) és a demencia bizonyos formái esetében megváltozott glutaminsav transzport aktivitás figyelhető meg, vagy feltételezhető (Beart és O'Shea, 2007; Sheldon és Robinson, 2007). A GltS szekvenciája nem hasonlít az utóbbi

csoportba sorolható fehérjékéhez, mégis érdemes lehet összevetni a kétdimenziós szerkezeteket.

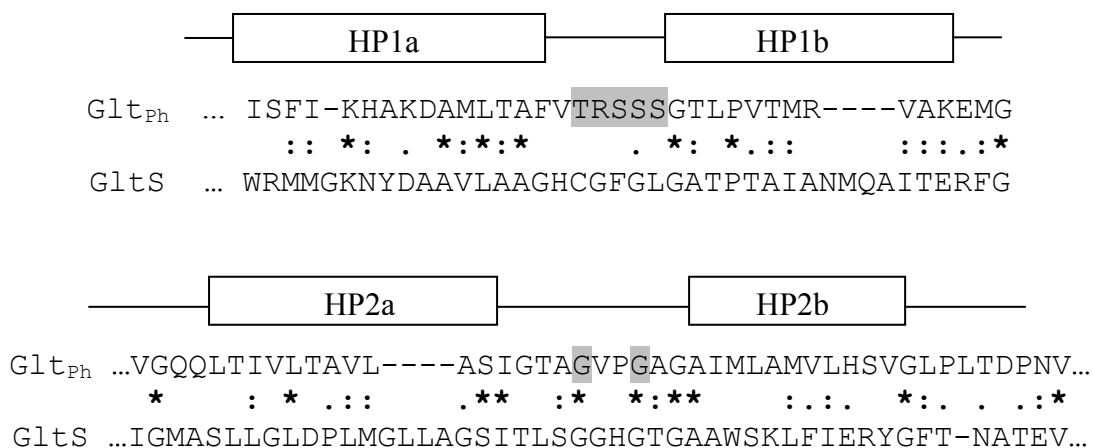
Az emlős glutaminsav transzporterek struktúrájának és funkciójának megismerésében a legnagyobb előrelépés a *Pyrococcus horikoshii* Glt_{ph} protein térszerkezetének röntgenkristallográfiás meghatározása volt (Yernool és mtsai, 2004). A Glt_{ph} 37 %-os homológiát mutat a humán EAAT2 fehérjével. Az aktív komplex trimer szerkezetű, amelyben a citoplazma felőli oldalon egy nagy, egészen a membrán feléig benyúló hidrofíl mélyedés található. A monomer Glt_{ph} szerkezete aszimmetrikus, összesen nyolc TMS-sel rendelkezik, az N- és C-terminális a citoplazmatikus térbe nyúlik (24. ábra).



24. ábra A Glt_{ph} topológiája (Yernool és mtsai, 2004).
A szürke, számozott téglalapok a transzmembrán szekvenciákat szimbolizálják.

Két bemerülő hurok található a fehérjében, az egyik a 6.-7. TMS, a másik a 7.-8. TMS között. A struktúra alapján ez a két hurok alkotja azt a transzport során felváltva nyíló kapu-rendszert, amelyen keresztül a glutaminsav a citoplazmába jut.

A szekvenciák összevetésekor a kifelé irányuló hurkok szekvenciájában szembetűnő hasonlóságot nem lehet észrevenni. A GltS-ben nem található meg az a konzervált „TRSSS” motívum sem, ami a Glt_{ph}-ban a glutamil-csoportot koordinálja (25. ábra). A befelé irányuló hurkokban összességében szintén kicsi a hasonlóság, ugyanakkor pont a hurok csúcsa az, ami figyelemre méltó egyezést mutat. A GltS esetében feltételezhetően a GGHG szekvencia képezi a hajtú-struktúrát (Sobczak és Lolkema, 2005). A 12 aminosavnyi területen 6 aminosav azonos, és ezek közül kettő a Glt_{ph}-ban azonosított, Na⁺-kötésért felelős glicineket jelenti.



25. ábra A Glt_{Ph} és GltS bemeülő hurok szekvenciáinak összehasonlítása
 A HP1a, -b és HP2a, -b a bemeülő hurok rövid héixei. A csillag az azonosságokat jelöli, a szürke kiemelés a transzportban fontos aminosavakat jelöli a Glt_{Ph}-ban. Az összehasonlítást a ClustalW programmal végeztük.

Elképzelhető tehát, hogy a befelé irányuló hurok a GltS esetében is a Na⁺ megkötését végzi. A GltS funkcionális vizsgálata során érdemes tehát a G136 és G139 aminosavak szerepét megvizsgálni.

5.1.2.7 Riporter fúziók vagy cisztein-hozzáférési kísérletek?

Az általunk végzett topológia-vizsgálat eredményei túlmutatnak a GltS-ről nyert szerkezeti információkon. Munkánk során az alkalmazott kísérletes stratégia előnyével és hátrányával egyaránt szembesültünk, a tanulságokat érdemes összegezni.

A riporter fúziós módszer alkalmazásakor többféleképpen is kialakíthatóak a szükséges konstrukciók. Az általunk használt módszerek közül kiválóan működött az egyirányú deléciós technika, mivel egy kísérlettel nagyszámú értékelhető fúziót sikerült előállítani. Azonban még ezzel a technikával sem tudtuk minden pozíció helyzetét egyértelműen azonosítani. Ezért célravezetőbbnek tűnik a kevesebb, de irányított módon kialakított fúziók létrehozása. Ez lehetővé teszi azt is, hogy úgy tervezzük meg a konstrukciókat, hogy a riporter kicserélhetőek legyenek, így minden pozícióból informatívabb adatok nyerhetők.

Az alkalmazott riporterok közül a detektálási problémák a β-galaktoszidáz használatát körülményessé teszik, ezért érdemes lehet más citoplazmatikus jelző fehérjét, mint például a GFP-t vagy esetleg a kloramfenikol acetil-transzferázt választani.

A kisebb szerkezet-módosító hatása miatt a cisztein-hozzáférfési módszer alkalmasabbnak tünik a membránfehérjék topológiájának vizsgálatára. Ugyanakkor, ha a célfehérje egyszerű szerkezetű, jól prediktálható transzmembrán szegmensekkel rendelkezik, akkor a jóval egyszerűbb C-terminális csomkolásos stratégia is sikerrel alkalmazható. A riporter fúziók emellett a fehérjeszerkezet kialakulásának dinamikájáról, a fehérjerészek szerkezeti önállóságáról, valamint a topológia meghatározó tényezőkről is hasznos információkat adhatnak. A módszer flexibilitásának köszönhetően alkalmas a fehérjék széles körének gyors vizsgálatára, amelyet szükség esetén ki lehet egészíteni a bonyolultabb, de finomabb analízist biztosító cisztein-hozzáférfési technikával. Összetettebb szerkezetű fehérje vizsgálatokor a két módszer párhuzamos alkalmazása komplexebb információkat adhat, ahogy azt a GltS esetében tapasztaltuk.

6. Összefoglalás

A membránfehérjék nagyon sok, alapvető életfolyamatban vesznek részt, a funkcióképes membránok nélkülözhetetlen összetevői. Segítik az életfolyamatokhoz szükséges anyagok szabályozott ki- és bejuttatását a sejtbe, felfogják és közvetítik a közegből származó jeleket (szignál transzdukció), enzimatisz aktivitással átalakíthatnak más molekulákat, és konkrét fizikai összeköttetést biztosítanak az egyes kompartmentek, például az extracelluláris tér és a citoplazma között. A sokféle fontos funkció miatt hibás működésük vagy hiányuk számos betegség kóroka. A rendelkezésre álló teljes genom szekvenciák bioinformatikai elemzése alapján a membránfehérjét kódoló gének gyakoriak, a nyitott leolvasási keretek mintegy 20-30 %-át adják. Óriási jelentőségükhöz képest viszont kevés információ áll rendelkezésre a szerkezetükről és működésükről.

A genomika, a proteomika, a rendszerbiológia, a bioinformatika és a nagy áteresztőképességű módszerek óriási mennyiségű információ felhalmozását biztosítják, ezzel nagy komplexitású, átfogó kutatások kivitelezését teszik lehetővé. Természetesen ezek a hatékony eszközök sem tudnak megválaszolni minden felmerülő kérdést. A világ legjellemzettebb élőlényét, az *Escherichia coli*-t a tudomány több mint 120 éve vizsgálja, és 1997-ben publikálták a K-12 törzs teljes genom szekvenciáját is. Ma már számos más törzsének is ismerjük a teljes DNS szekvenciáját, ennek ellenére a gének 24 %-ának a feladatáról nincs pontos ismeretünk, és csak 66 %-ról vannak kísérletes adatok (Karp és mtsai, 2007). Még rosszabb a helyzet az Eukariótákban: a *Saccharomyces cerevisiae* esetében 37 %, *Arabidopsis thaliana*-nál 5 %, *Drosophila melanogaster*-ben és egérben 4-4 % a kísérletesen igazolt funkciójú gének aránya.

A membránfehérjék esetében hasonló arányú az azonosítatlan gének száma. Az *E. coli* genomjában közel 900, legalább egy transzmembrán szegmenssel rendelkező fehérjét azonosítottak, ami azt jelenti, hogy a lehetséges gének mintegy 21 %-a kódol integrális membránfehérjét. A transzporterek számát ezen belül kb. 400-ra becsülik, közülük 180 teljesen ismeretlen funkciójú.

Munkám során az *E. coli* baktérium két különböző aminosav felvételéért felelős transzport-rendszerét vizsgáltam. A nagy affinitású metionin transzporter génjei az ismeretlen funkciójú leolvasási keretek közé tartoztak, feladatukat vizsgálatainkkal sikerült azonosítani. A dolgozat másik részét a glutaminsavat transzportáló GltS kétdimenziós szerkezetének vizsgálata és annak tanulságai képezik.

A nagy affinitású metionin transzport-rendszer azonosítása

E. coli-ban az L-metionin felvételét legalább két transzporter végzi (Kadner és Watson, 1974). Leírtak és jellemeztek egy nagy (*metD*) és egy kis (*metP*) affinitású felvételi rendszert. A *metD* pozícióját egészen pontosan sikerült behatárolni géntérképezéssel. Azt is igazolták, hogy a MetD egy ABC-transzporter, a D-metionin és a toxikus α -metil-metionin kizárólagos transzportere, emellett kifejeződése a MetJ fehérje szabályozása alatt áll. A D-metionin transzportja ozmotikus sokk érzékeny, ami egy periplazmatikus kötő-fehérje jelenlétére utal. A kis affinitású transzporterről nagyon kevés információ áll rendelkezésre, génjét még ennek sem sikerült azonosítani.

A *E. coli* géntérképe és genomszekvenciája összevetésekor azt vettük észre, hogy a *metD*-t határoló markerek között csak néhány lehetséges gén kódol membránfehérjét, és ezek közül mindössze egy lehet ABC transzporter. Utóbbi promóterében egyértelműen felismertük a MetJ szabályozófehérje kötődési helyét is, emiatt nagy valószínűséggel prediktáltuk az *abc-yaeE-yaeC* operon funkcióját. A klaszter irányított kiiktatásával valóban D-metionin transzport-deficiens törzset kaptunk. Ezután az egyes nyitott leolvasási kereteket expressziós vektorokba építettük. A kapott konstrukciók segítségével igazolni tudtuk, hogy a transzport csak akkor áll helyre, ha a három gén együttesen fejeződik ki. Megállapítottuk továbbá, hogy az operon expresszióját a MetJ represszor valóban szabályozza.

A *metD* azonosításával lehetőség nyílt az *E. coli* további metionin transzportereinek vizsgálatára is. A szakirodalom alapján az S-metil-metionin permeáz (MmuP) tűnt az egyik lehetséges kis affinitású transzporter-jelöltnek. A feltételezés ellenőrzésére létrehoztunk egy metionin auxtróf kettős deletáns törzset ($\Delta metD$, $\Delta mmuP$). A fenotípus tesztelés eredménye azonban arra utalt, hogy az S-metil-metionin permeáz nem azonos a kis affinitású L-metionin transzporterrel.

Az *E. coli* L-metionin felvételével kapcsolatos vizsgálataink eredményeként tehát azonosítottuk a nagy affinitású transzport rendszert. Megállapítottuk, hogy a *metD* lókuszt három gén alkotja, amelyek egy tipikus bakteriális ABC-transzporter rendszert kódolnak. A fenotípus tesztek és a promóter viselkedése alapján egyértelművé vált, hogy az *abc-yaeE-yaeC* klaszter a metionin-regulon részét képezi. Ennek megfelelően a gének új, hivatalos elnevezése sorrendben *metN*, *metI* és *metQ* lett. A nagy affinitású transzport rendszer azonosításával lehetővé vált a többi L-metionin transzporter génjeinek felkutatása is.

Bemerülő hurkok a GltS-ben

A glutaminsav egy központi jelentőségű aminosav, a glutaminnal együtt a legfontosabb amino-csoport donor és nitrogén-forrás (Reitzer, 2003). A legnagyobb mennyiségben előforduló anion a citoplazmában, amely a fő ozmotikum K^+ ellenionjaként van jelen.

A glutaminsav felvételére is jellemző a multiplicitás, *E. coliban* négy felvételi rendszer található. A dolgozat második része a Na^+ -dependens GltS kétdimenziós szerkezetének vizsgálatát mutatja be.

Molekuláris biológiai technikák alkalmazásával, konkrétan riporter fúziók segítségével határoztuk meg a fehérje membránbeli lefutását. A GltS különböző hosszúságú fragmentjeihez riporter fehérjéket illesztettünk (PhoA, LacZ) génmanipuláció segítségével. A riporterek kompartment specifikus aktivitása miatt - enzimátikus mérést követően - eldönthető, hogy a fúziós pont a citoplazmában vagy a periplazmában lokalizálódik. A kialakított 60 fúzió révén végeredményben az összes hurok elhelyezkedésére tudtunk következtetni.

Munkánkkal párhuzamosan egy másik kutatócsoport ún. cisztein-hozzáférési kísérletekkel vizsgálta a GltS topológiáját (Dobrowolski és mtsai, 2007). Az általuk kapott kétdimenziós szerkezet jórészt megegyezett a riporter fúziók alapján készített modellel, viszont az 5-6. prediktált transzmembrán szegmensek eltérő pozícióját mutatta. A látszólagos ellentmondás feloldható volt azzal a feltételezéssel, hogy a prediktált 5. TMS egy szenzitív bemerülő hurkot képez, amit az utána következő 6. TMS stabilizál. Utóbbi hiányában és speciális szekvenciájának köszönhetően, a szegmens valódi transzmembrán szekvenciaként képes viselkedni.

Az eredmények alapján a GltS egy szimmetrikus felépítésű transzmembrán fehérje. Tíz membránt áterő szegmenst azonosítottunk, az N- és C-terminálisa a plazmamembrán periplazmatikus tér felőli oldalán helyezkedik el. A fehérje két nagyobb, öt-öt transzmembrán szegmenst tartalmazó, antiparallel helyzetű egységből áll. A 4-5. és 9-10. transzmembrán szegmensek közötti két hidrofób régió feltételezhetően a membránba bemerülő hurkot alkot. Elképzelhető, hogy utóbbiak a háromdimenziós struktúrában térben egymáshoz közel helyezkednek el, és a hurkok csúcspontjai kapcsolatban állnak egymással. Emiatt lehetséges, hogy a szubsztrátok transzportjában is fontos szerepet játszanak, ahogy ez több más transzporter fehérjénél megfigyelhető.

A leírt kétdimenziós szerkezet lehetőséget teremt a GltS térszerkezetének és működésének elméleti vizsgálatához, valamint a kísérletes funkcionális analízis alapjául szolgál.

7. Summary

Membrane proteins take part in lot of basic vital processes and are indispensable parts of biomembranes. They promote the regulated transport of the required substances, mediate the transfer of environmental signals (signal-transduction), modify other molecules and create physical connection between the compartments (e.g. the cytoplasm and the extracellular space). According to this, their malfunction or absence can cause numerous illnesses. The bioinformatic analyses of the available total genome sequences revealed that membrane protein-coding genes are common, they represent the 20-30 % of ORFs. Compared to their huge importance, little is known about the structure and mechanism of membrane proteins.

Genomics, proteomics, system biology, bioinformatics and high throughput techniques can provide large amount of informations, giving us the possibility to perform extensive and complex research projects. However, these efficient tools still leave unanswered questions. *Escherichia coli*, the most characterized living form in the world, has been investigated for more than 120 years. The full genome sequence of the K-12 strain was published in 1997. Nowadays many other strain's sequence is available, nevertheless we do not have precise information about 24% of the ORF's function, and only 66% is verified experimentally (Karp et al, 2007). The situation of the eukaryotes is much worse, the proportion of the genes with justified function is 37% in *Saccharomyces cerevisiae*, 5% in *Arabidopsis thaliana*, 4 % in *Drosophila melanogaster* and in mouse respectively.

Similar observations can be made in case of membrane proteins too. *E. coli* codes almost 900 proteins containing at least one transmembrane segment, which means that 21 % of the ORFs encode integral membrane proteins. The number of transporters is estimated to be 400, 180 with unidentified function.

In the course of my work I examined two different *Escherichia coli* amino acid transporter systems. The genes of the high affinity methionin transporter (MetD) were amongst the unidentified ORFs. We managed to prove their function with our examinations. The other part of the dissertation presents the structural analysis of the glutamate specific transporter GltS and details of its consequences.

Identification of the high-affinity methionine transport system

In *Escherichia coli* at least two L-metionin uptake systems exist (Kadner and Watson, 1974). A high-affinity (*metD*) and a low-affinity (*metP*) transporter was characterised. The

position of the *metD* system was punctually circumscribed with genetic mapping experiments. MetD was characterized as an ABC-transporter and the unique uptake system for D-methionine and the toxic α -methylmethionine. Its expression is under the control of the MetJ repressor. The D-methionine transport was proved to be an osmotic shock sensitive process, which suggests the presence and participation of a periplasmic binding protein. The low affinity transport system is even less characterized, its genes are still unidentified.

We compared the genetic map and the genome sequence of *E. coli* and noticed that there are only few membrane protein coding ORFs in the region of interest, and only one of them is a possible ABC-transporter. In the promoter sequence of the latter, we could identify possible binding sites of the MetJ regulator, so we could predict the function of the *abc-yaeE-yaeC* with high probability. The directed destruction of the operon indeed resulted in a D-methionine transport deficient strain. Each ORF was built in expression vectors, and the created constructions were used for complementation test. Only the collective expression of the three ORFs could re-establish the transport.

The identification of the high-affinity methionine transporter gave us the possibility to further characterize the other methionine permeases. The S-methyl-methionine transporter (MmuP) seemed to be possible candidate for the MetP system based on previously published data. To prove this assumption, we created a double deletion ($\Delta metD$, $\Delta mmuP$) methionine auxotroph *E. coli* strain. The result of the phenotype-test clearly indicated that the MmuP is not identical with the low affinity L-methionine transporter.

Our examination of the L-methionine uptake in *E. coli* resulted in the identification of the high-affinity transport system. We revealed that the *metD* locus contains three genes. From these ORFs three proteins are expressed which form a typical ABC-transporter system. The promoter activity and phenotype tests proved that the *abc-yaeE-yaeC* gene cluster is part of the methionine regulon, according to this the genes were renamed as *metN*, *metI* and *metQ* respectively. The identification of the high-affinity transport system gives us the possibility to explore the genes of other L-methionine transporters.

Reentrant loops in GltS

The second part of this thesis describes the two dimensional structural analysis of GltS, which is one of the L-glutamate transporters in *E. coli*.

Glutamate has a central metabolic role in *E. coli*. Together with glutamine they are the most important nitrogen sources and amino-group donors (Reitzer, 2003). It is the most abundant

anion in the cytoplasm as the counter-ion of K^+ . There are multiple glutamate-specific transporter systems in *E. coli*. The second part of the dissertation presents the two-dimensional structural analysis of the Na^+ -dependent symporter GltS.

With molecular biological techniques, namely reporter fusions, we analysed the membrane topology of GltS. Two reporter proteins (PhoA and LacZ) were fused to different length N-terminal parts of the GltS by gene manipulation methods. As the reporters have compartment specific activities, after enzymatic measurements it is possible to identify the periplasmic or cytoplasmic localization of the fusion points. With large number of fusions, the position of all loop regions could be deduced.

Parallel to our study, another research team examined the topology of the GltS by the cysteine accessibility technique ((Dobrowolski és mtsai, 2007). Their structural model is in good correlation with our reporter fusion-based topology, only the 5-6. hydrophobic segments were found to be in different position. This contradiction was resolved by assuming that the 5. predicted transmembrane segment has a sensitive structure, which is stabilized by the following 6. TMS. In the absence of the latter, and due to its special sequence composition, the 5. segment can behave like a real transmembrane segment.

Based on the combined results, GltS is a symmetrical protein. Ten transmembrane segments (TMS) were detected, the N- and C-terminal faces the periplasmic side of the plasmamembrane. The protein is formed from two larger antiparallel domains containing five TMSs each. Our results are in agreement with the hypothesis that two hydrophobic reentrant loops exist between the 4-5. and 9-10. transmembrane segments. The first reentrant loop stretches into the membrane from the periplasmic space, the other from the cytoplasm. It is conceivable, that the two loops are connected to each other in the three dimensional structure. Thus, they can play an important role in the transport process, as it was observed with many transporters. Based on our experiences the structure of the first loop is sensitive, the following transmembrane segment seems to be necessary for its stabilization. In the absence of the latter, the fundamentally hydrophobic loop behaves like a real TMS. Based on the presented two-dimensional structure, the theoretical computation of the three-dimensional structure is possible. It can also help in the better understanding of L-glutamate transport, and identification of the substrate binding sites.

8. Köszönetnyilvánítás

A legnagyobb köszönettel szüleimnek tartozom, akik lehetővé tették számomra, hogy egyetemre járhasak és mindenben segítettek, támogattak.

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Kálmán Miklósnak, hogy bizalmával és tanácsaival megajándékozott. Dr. Gál József szintén döntő mértékben járult hozzá a disszertáció elkészüléséhez. Nemcsak a felhasznált publikációk megalapozását köszönöm neki, hanem kutatói fejlődésem elindítását is. Emlékezetes magyarázataiból most is építkezek, sokat közülük csak mostanában értettem meg igazán.

Köszönöm Enikőnek, hogy mindig és mindenhowy segít és segített az utamon. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Nagy Lászlónak hozzájárulásáért.

A sok mindennapi segítség mellett, hálás vagyok jelenlegi és volt kollégáimnak, mert megértéssel, nyitottsággal és barátsággal viszonyultak hozzám. Köszönöm Vörös Andreának, Dr. Bihari Zoltánnak, Dr. Kesserű Péternek, Dr. Kiss Istvánnak, Dr. Schnell Róbertnek, Kálmán Péternek, Dr. Csontos Józsefnek, Balázs Margitnak, Mlinarics Edinának, Bordás Diának és a BayBio összes dolgozójának!

9. Hivatkozások

Andersen OS, Koeppe RE (2007) Bilayer Thickness and Membrane Protein Function: An Energetic Perspective. 36: 107-130 Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure

Beart PM, O'Shea RD (2007) Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. Br J Pharmacol. 2007 150(1):5-17. Review.

Berlyn MK (1998) Linkage map of Escherichia coli K-12, edition 10: the traditional map. Microbiol Mol Biol Rev 62: 814–