

Doktori (Ph.D) értekezés tézisei

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

Készítette: Szvetnik Attila

Témavezető: Dr. Kálmán Miklós egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány

Biotechnológiai Intézet

Szeged, 2008

Bevezetés

A membránfehérjék nagyon sok, alapvető életfolyamatban vesznek részt, a funkcióképes membránok nélkülözhetetlen összetevői. Segítik a szükséges anyagok szabályozott ki- és bejuttatását a sejtbe, felfogják és közvetítik a közegből származó jeleket (szignál transzdukció), enzimatikus 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 genomszekvenciák 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 colit* a tudomány több mint 120 éve vizsgálja, és 1997-ben publikálták a K-12 törzs teljes genomszekvenciáját 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. 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.

Módszerek

Plazmid DNS izolálása

Baktériumsejtek transzformálása

DNS restrikciós emésztése és ligálása

Transzpozonos mutagenézis

Egyirányú deléciók készítése

Polimeráz láncreakció

Agaróz gélelektroforézis

Poliakrilamid gélelektroforézis

ET-rekombináció

Western-blot

Alkalikus foszfatáz enzimaktivitás mérés

β -galaktozidáz enzimaktivitás mérés

Célkitűzés

1. Szakirodalmi adatok alapján valószínűsítettük, hogy a nagy affinitású metionin transzporterét (MetD) az *E. coli abc-yaeE-yaeC* génklasztere 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.

Eredmények

A nagy affinitású metionin transzport-rendszer azonosítása

*E. coli*ban az L-metionin felvételét legalább két transzporter végzi. Kadner és Watson leírt és jellemzett egy nagy (*metD*) és egy kis (*metP*) affinitású felvételi rendszert. A *metD* pozícióját egészen pontosan sikerült behatárolni géntérképezéssel, de a génjét – hasonlóan a *metP*-hez – még nem azonosították.

Az *E. coli* géntérképének és genomszekvenciájának 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

Molekuláris biológiai technikák alkalmazásával, konkrétan riporter fúziók segítségével határoztuk meg a GltS membránbeli lefutását. A GltS különböző hosszúságú N-terminális fragmentjeihez riporter fehérjéket illesztettünk (PhoA, LacZ) génmanipuláció segítségével. A riporterok 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. Ezek alapján felépítettük a GltS topológia-modelljét.

Munkánkkal párhuzamosan egy másik kutatócsoport ún. cisztein-hozzáférési kísérletekkel vizsgálta a GltS topológiáját. Az általuk

kapott kétdimenziós szerkezet jórészt megegyezett a riporter fúziók alapján készített modellel, viszont az 5-6. prediktált transzmembrán szegmensek (TMS) 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 átérő 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 analízist is megkönnyíti.

Tézispontok:

1. Az *abc* nyitott leolvasási keret előtt egy promóter aktivitású szekvencia található.
2. A MetJ regulátor képes szabályozni a promóterról történő expressziót.
3. A D-metionin transzportert az *abc-yaeE-yaeC* operon kódolja.
4. A transzportfolyamathoz mind a három kódolt fehérje együttes jelenléte szükséges.
5. A kis affinitású metionin transzporter nem azonos az S-metil-metionin transzporterrel.
6. A GltS tíz transzmembrán szegmással rendelkezik.
7. Az N- és C-terminális a periplazmatikus oldalon helyezkedik el.
8. A fehérje két antiparallel helyzetű részre osztható, amelyekben egy-egy lehetséges bemező hurok található.
9. A 4-5. TMS közötti hidrofób régió a GltS további részének hiányában valódi TMS-ként viselkedik.
10. A riporter fúziós technológia alapvetően összeegyeztethető eredményeket adott a cisztein hozzáférési vizsgálatokkal.

Publications referred in the Dissertation

Szvetnik A, Gal J, Kalman M. (2007) Membrane topology of the GltS Na(+)/glutamate permease of Escherichia coli. *FEMS Microbiol Lett.* 275: 71-79.

Gal J, **Szvetnik A**, Schnell R, Kalman M. (2002) The metD D-methionine transporter locus of Escherichia coli is an ABC transporter gene cluster. *J. Bacteriol.* 184(17):4930-2.

Egyéb publikációk

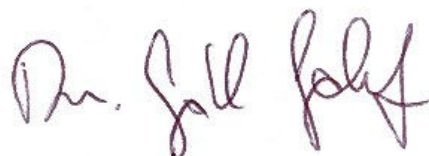
Szvetnik A. (2007). Eszköz szélesztett sejtkolóniák kézi felszedésére táptalajról. (Használati minta oltalom)

Nagy L, Csintalan G, Kálmán E, Sipos P, **Szvetnik A.** (2003) Applications of metal ions and their complexes in medicine I *Acta Pharm Hung.* 73(4):221-36.

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott Dr. Gál József kijelentem, hogy a Gal J, Szvetnik A, Schnell R, Kalman M. The metD D-methionine transporter locus of Escherichia coli is an ABC transporter gene cluster. J. Bacteriol. 2002. 184(17):4930-2. publikációban Szvetnik Attila meghatározó fontosságú szerepet játszott, és ezen eredményeket az „*Escherichia coli* aminosav transzporterek vizsgálata” című doktori értekezésének tézispontjaiként felhasználhatja.

Kijelentem, hogy a fenti publikációban közzétett eredményeket eddig nem használtam fel tudományos fokozat megszerzéséhez és ezt a jövőben sem teszem, illetve más jelöltnek nem adok ki hasonló jellegű nyilatkozatot a fenti publikációt illetően.



Dr. Gál József

2008.08.28. Lexington, Kentucky, Amerikai Egyesült Államok