

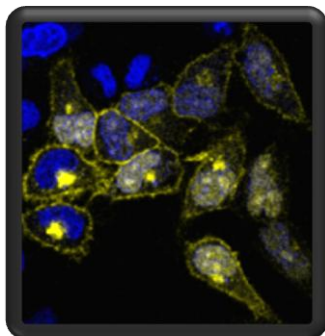
Küldő Intézmény

Budapesti Műszaki és
Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar



Kutatóhely

MTA TTK MFI
Fehérjekonformációs
Betegségek Laboratórium



Egy membránfehérje a sejtmagban

A 2012-es BME VBK TDK Konferencia kiemelt első dolgozata a Biokémia és Élelmiszertudomány Szekcióban

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Vodicska Barbara

BME VBK biomérnök, MSc II. félév

2012



Témavezető:

Dr. Welker Ervin, DSc

Laboratóriumvezető

MTA TTK MFI
Fehérjekonformációs
Betegségek Laboratórium

Konzulens:

Nyeste Antal

PhD hallgató

MTA TTK MFI
Fehérjekonformációs
Betegségek Laboratórium



A dolgozat bemutatását a TÁMOP - 4.2.2.B-10/1--2010-0009
"Új tehetséggondozó programok és kutatások a Műegyetem tudományos műhelyeiben"
című program támogatta.

Tartalomjegyzék

Rövidítések	4
Absztrakt.....	5
Célkitűzés	6
Irodalmi áttekintés	7
A prion fehérjecsalád.....	7
A szekréciós útvonal.....	8
Szignálhipotézis.....	8
SS – szekréciós szignál.....	9
A szekréció folyamata	9
GPI-horgony	10
KDEL – egy ER-retenciós szignál.....	11
Nukleáris lokalizációs szignál	11
GFP és YFP	12
Felhasznált anyagok, eszközök és módszerek	14
Plazmidkonstrukciók	14
Emlős sejtkultúra	15
Transzfekció	15
Fluoreszcens mikroszkópia.....	16
Statisztika.....	16
Megjegyzés	17
Eredmények és diszkusszió	18
Összegzés.....	29
Tervezett kísérletek a témában	30
Köszönetnyilvánítás.....	31

Tartalomjegyzék

Irodalomjegyzék	32
Függelék	35

Rövidítések

- ✿ aTI – alternatív transzláció-iniciáció
- ✿ DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Médium
- ✿ ER – endoplazmás retikulum (jelen dolgozatban a durva felszínűre alkalmazom)
- ✿ GFP – zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)
- ✿ GPI-horgony – glikozil-foszfatidil-inozitol-horgony
- ✿ NLS – sejtmag lokalizációs szignál (nuclear localisation signal)
- ✿ PrP – Prion fehérje
- ✿ Sho – Shadoo fehérje
- ✿ SRP – szignálfelismerő részecske (signal recognition particle)
- ✿ SS – szekréciós szignál
- ✿ YFP – sárga fluoreszcens fehérje (yellow fluorescent protein)

Absztrakt

A prion családba tartozó Prion (PrP) és Shadoo (Sho) fehérjék membránfehérjék, melyek szekréción szignállal rendelkeznek N-terminálisukon, és így a szekréción útvonalra kerülnek szintetizálódásuk során. C-terminálisukon glikozil-foszfatidil-inozitol(GPI)-horgony található, ennek segítségével kapcsolódnak a sejtmembránhoz. A fehérjék szubcelluláris lokalizációját fúziós konstrukciókban vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy míg a Prion fehérje az emlős sejtek sejtmembránjában volt megtalálható, a Shadoo fehérje a normális membránlokalizáció mellett sejtmagi lokalizációt is mutatott a sejtek egy részében. TDK munkámban ezen kettősség okának feltárására koncentráltam.

Különböző fúziós fluoreszcens jelöléssel ellátott konstrukciókat emlős sejtenyészetben expresszáva vizsgáltam, hogy a Shadoo fehérje melyik része felelős a szokatlan viselkedésért. Mindkét fehérjében (PrP és Sho) található olyan szekvenciárészlet, amely a citoszolból a sejtmagba képes irányítani fehérjét, azonban az, hogy egy szekréción fehérje hogyan kerülhet a citoszolba, nem világos.

Kísérleteim során azonosítottam a Prion és a Shadoo fehérjének azt a szegmensét, amely eltérő szubcelluláris lokalizációjukért felelős: azt találtam, hogy a Prion fehérje GPI-szignáljának jelenlétében a citoszolikus/magi lokalizáció minimálissá válik. Ezzel ellentétben ugyanazon a fehérjekonstrukción a Shadoo fehérje GPI-szignáljának jelenlétében jelentős magi lokalizáció figyelhető meg. Eredményeim arra utalnak, hogy fehérjék számára létezik átmenet a szekréción útvonal és a citoszol között, amely szignáltranszdukcióban való részvétel, illetve kettős funkció ellátása esetén bírhat nagy jelentőséggel. Az átmenet mechanizmusának megértése további kutatómunkát igényel.

Célkitűzés

Laboratóriumunk fehérjekonformációs betegségekkel, különösen a prionokkal kapcsolatos betegségekkel foglalkozik. A prion család két tagja, a Prion és a Shadoo fehérje viselkedése áll vizsgálódásaink középpontjában, melyek mindketten a szekréciós útvonalra kerülnek szintetizálódásuk során.

A Shadoo fehérje a Prion fehérjéhez hasonlóan GPI-horgonnyal kötődik a plazmamembrán külső rétegéhez. Annak ellenére, hogy a fehérje a szekréciós útvonalra van elkötelezve, egy frakciója a sejtek magjában jelenik meg, ellentétben a Prion fehérjével, amely szinte kizárólag membránlokalizációt mutat. Mindkét fehérje N-terminális felében azonosítottak olyan szekvenciát, amely az esetlegesen a citoszolban megjelenő konstrukció magi dúsulásáért felelős, ám a két fehérje közti szubcelluláris lokalizációbeli eltérés oka nem nyilvánvaló.

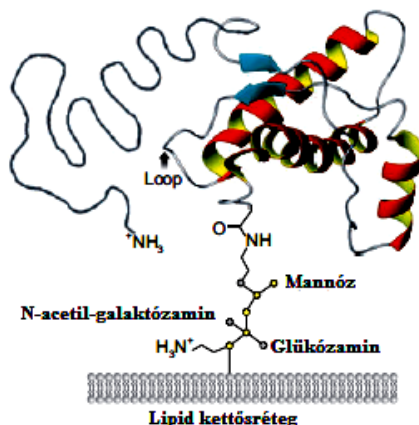
Munkám során annak megfejtését tűztem ki célul, hogy mi okozza a két fehérje eltérő viselkedését; pontosabban a Shadoo fehérje melyik szakasza felelős a szekréciós útvonalra szánt fehérje egy frakciójának citoszolikus/magi megjelenéséért, illetve milyen mechanizmus áll a meglepő magi lokalizáció mögött.

Irodalmi áttekintés

A dolgozatban megjelenő fogalmak és mechanizmusok érthetősége kedvéért a következő fejezetben a prion fehérjecsaládot, a szekréció, illetve bizonyos kompartmentekbe irányuló transzport folyamatát, valamint a fluoreszcens jelölőfehérjéket mutatom be nagyvonalakban a szakirodalom segítségével.

A prion fehérjecsalád

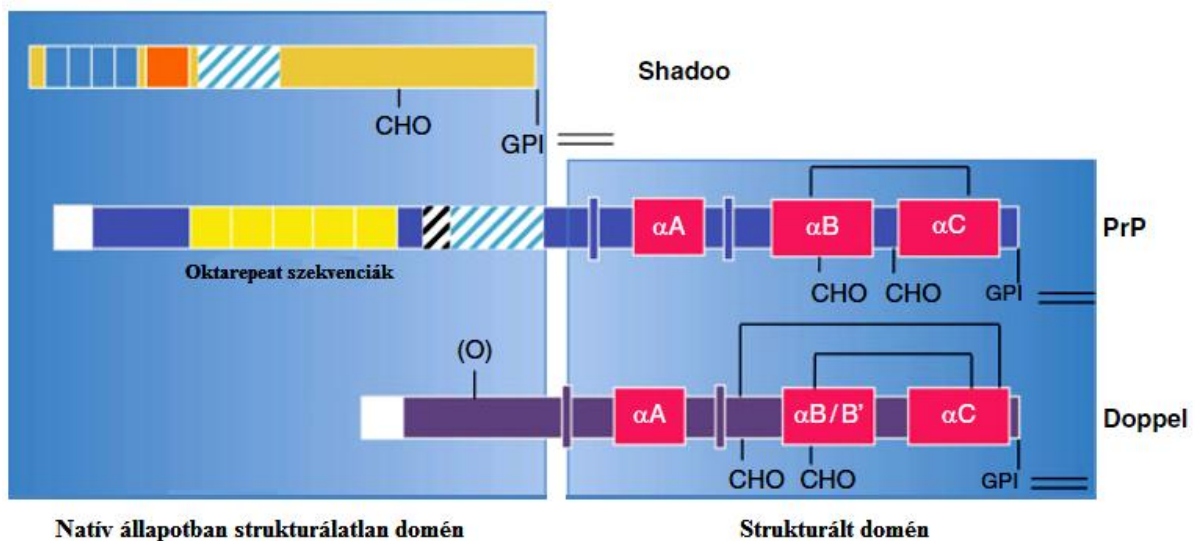
A prionbetegségek, összefoglaló néven a fertőző szivacsos agysorvadások (angol nevén TSE, transmissible spongiform encephalopathies) gyógyíthatatlan, neurodegeneratív betegségek, melyek legtöbb esetben halállal végződnek. A betegség során a sejtben fiziológiásan is megtalálható Prion fehérje (PrP^{C} , 1. ábra) abnormális konformációjú változata (PrP^{Sc}) jelenik meg és akkumulálódik az agyban. A prion kifejezést magára a fehérje természetű, nukleinsavmentes, fertőző ágensre használjuk. A betegség kialakulása lehet sporadikus, genetikai vagy fertőzőes eredetű, velejárója a Prion protein aggregációja és az idegsejtek pusztulása. A fertőzést általában orvosi beavatkozás (műtét, szervátültetés, stb.), illetve egy beteg állat valamely részének (pl. hús, agy) elfogyasztása okozza. A prionbetegségek közé soroljuk többek között emberben a kurut és a Creutzfeldt-Jacob kórt (CJD), birkában a súrlókórt (vagy scrapie-t) és a szarvasmarhákban megjelenő kergemarhákórt (BSE, bovine spongiform encephalopathy). Bár megjelenésük aránya csekély, átvihető, "fertőző" természetük mind közegészségügyi, mind élelmiszer-biztonsági szempontból kiemelkedő jelentőségűvé teszi őket.^{(1) (2) (3)}



1. ábra: A PrP^{C} szerkezete ⁽²⁾

A sejtben megtalálható Prion fehérje harmadlagos szerkezete. Szürke vonallal a strukturálatlan régió, piros/sárgával az α -hélix, kézzel a β -lemez szerkezetek láthatók.

A prion családnak eddig három tagja ismert, melyek hasonló strukturális felépítéssel rendelkeznek: a Prion fehérje (PrP), a Doppel (Dpl) és a Shadoo (Sho) (2. ábra). A két utóbbinak sem fiziológias funkciója sem esetleges szerepe a prionbetegségekben még nem teljesen ismert, mégis úgy tűnik, a PrP-nek és a Sho-nak átfedő a szerepe, így képesek komplementálni egymás funkcióját. ⁽⁴⁾ Mindhárom fehérje szekréción és GPI-horgony szignállal is rendelkezik. Szintetizálódásuk során a szekréción szignál segítségével kerülnek a szekréción útvonalra, majd azon keresztül GPI-horgonnyal felszerelve a plazmamembrán külső felszínére. ^{(4) (5)}



2. ábra: A prion család tagjai és felépítésük ⁽⁵⁾

Kék csíkozással a centrális hidrofób régió, CHO jelöléssel az N-glikoziláció látható.

A diszulfidhidak fekete vonalakként az α -hélixek piros téglalapokként vannak feltüntetve.

Mint ahogy dolgozatomban elsősorban a Prion és Shadoo fehérjék szubcelluláris lokalizációjával foglalkozik, a következőkben röviden áttekintem, hogyan jutnak el a fehérjék specializált funkcióik ellátásához a sejt megfelelő kompartmentjébe. Azokba a kompartmentekbe irányuló fehérjeútvonalakat taglalom röviden, amelyeket dolgozatomban később érintek a Shadoo fehérje sejten belüli „trafficking”-je kapcsán.

A szekréción útvonal

Szignálhipotézis

A szignálhipotézis atyja, Günter Blobel rávilágított, hogy a fehérjék gyakran szignálszekvenciák segítségével érik el sejten belüli vagy kívüli lokalizációs céljukat,

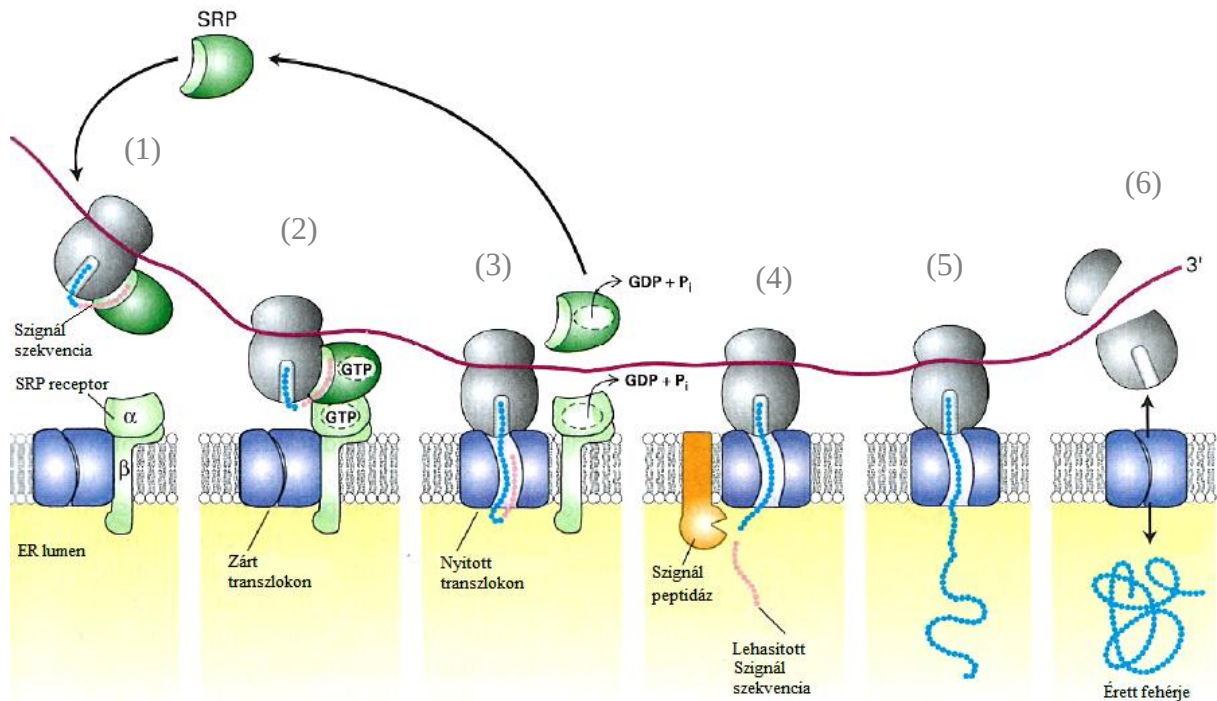
melynek felfedezéseért 1999-ben Fiziológiai és orvostudományi Nobel-díjjal tüntették ki. ⁽⁶⁾ A kezdeti hipotézis továbbfejlesztéseként felfedezte, hogy nemcsak a szekréciós kiválasztódáshoz, hanem más kompartmentek (pl. a sejtmag) eléréséhez is szükség lehet szignálszekvenciák jelenlétére. ⁽⁶⁾

SS – szekréciós szignál

A kiválasztódásra szánt és a plazmamembrán-fehérjék szekréciós szignálszekvenciájuknak (SS) köszönhetően kerülnek a szekréciós útvonalra, melynek első állomása az endoplazmás retikulum (ER). Ennek az SS-nek a jelenléte a fehérjében elégséges feltétel az ER-membránon való átjutáshoz, tehát nagyrészt azok a fehérjék jutnak be az ER lumenébe, amelyek rendelkeznek ilyen szignállal. A 13-36 aminosavból álló szignálszekvenciák általában a szekréciós útvonalra kerülő fehérjék N-terminálisán találhatók, középső részükön 10-15 hidrofób aminosavval. ^{(7) (8)}

A szekréció folyamata

A szignálhipotézis alapján a szekréciós fehérjék útjukat kotranszlációs transzlokációval kezdik az ER lumenébe. A riboszómán elsőként szintetizálódó szignálszekvenciához transzláció közben egy ribonukleotid típusú jelfelismerő részecske (SRP, signal recognition particle) köt, amely a riboszómát az ER-felszínén lévő SRP receptorhoz irányítja. Ezzel egyidőben a transzlokációhoz szükséges csatorna toborzása is megtörténik (3. ábra). A polipeptidlánc szintézise folytatódik, miközben az összeállt transzlokonon át bejut az ER-lumenbe, ahol chaperone fehérjék gátolják a feltekeredését a transzláció ideje alatt. A szignálpeptidáz lehasítja a szignálpeptidet, majd a transzláció és transzlokáció végeztével a fehérje felveszi natív konformációját. ^{(7) (8) (9)}



3. ábra: A kotranszlációs transzlokáció folyamata az ER lumenbe ⁽⁹⁾

Az SRP kötődése a riboszómához (1), a komplex kapcsolódása az SRP-receptorhoz (2), kotranszlációs transzlokáció, az SRP leszakadása (3), a szignálpeptidáz lehasítja a szignálfehérjét (4), a kotranszlációs transzlokáció folytatódik (5), a fehérje feltekeredése és a transzlációs komplex szétesése (6).

Az ER lumenben a fehérje folyamatosan glikozilálódik és deglikozilálódik, amely jelenség a helyes feltekeredés ellenőrzésére szolgál. A fehérje transzportvezikulumok segítségével továbbvándorol a Golgi-apparátusba, ahol az esetleges poliszacharid részek módosítása megtörténik. Ezen oldott fehérjék Golgiba irányuló vezikuláris transzportja nonspecifikus mechanizmus annyiban, hogy nem igényel specifikus szignált. Végül a fehérje (térszerkezet alapján) osztályozásra kerül, így lizoszómákba, szekretálódó granulumokba vagy a plazmamembránba irányítódik ^{(8) (10)}

GPI-horgony

Bizonyos fehérjék sejtmembránhoz való kapcsolódása glikozil-foszfatidil-inozitol(GPI)-horgony segítségével történik. Ennek létrejöttéhez a szekréciós fehérjének rendelkeznie kell GPI-szignált kódoló szekvenciával. A 20-30 aminosav hosszúságú hidrofób GPI-szignál a fehérje C-terminálisán található, ez köti időlegesen a fehérjét az ER-membránhoz. Egy előre elkészült GPI-egység a szignálpeptid lehasadása után a fehérje új C-terminálisához

kapcsolódik, így a glikozilált polipeptidlánc a Golgiba juthat, ahonnan a plazmamembrán külső részébe kerül. A GPI két zsírsavlánca a foszfolipid kettősrétegbe nyúlik, míg a poláris rész kovalensen köti a horgonyt a fehérje C-terminálisához. A GPI-horgonyos fehérjék nagyrészt a plazmamembrán lipidraft kompartmentumában lokalizálódnak.^{(8) (9) (11)}

KDEL – egy ER-retenció szignál

Az szekréciós útra kerülő fehérjék nem mindegyike hagyja el végérvényesen az ER-t, ugyanis léteznek ER-rezidens fehérjék, melyek funkciójukat az ER-ben kell, hogy betöltsék. A bizonyíték, hogy az ER visszatart bizonyos fehérjéket abból a felfedezésből született, hogy az immunoglobulin-kötő fehérje (BiP) és a protein diszulfid-izomeráz (PDI) több ER-rezidens fehérjével együtt azonos szekvenciával rendelkezik karboxi-terminálisán, amelyet ha letörölnek, ezek a fehérjék szekretálódnak. Ha ezt a szekvenciát más szekréciós fehérjék C-terminálisára helyezik, a fehérjék az ER-ben maradnak, és nem hagyják el a sejtet. A szekvencia 4 aminosavból áll: lizin-aszpartát-glutamát-leucin, egybetűs kóddal KDEL, innen kapta nevét a szignál.^{(10) (12)}

Miután kijutottak az ER-ből, a KDEL szignállal jelölt fehérjék hozzákötnek a Golgiban vagy egy köztes kompartmentumban található ERD2-nek elnevezett receptorhoz. A kötődés kiváltja az ERD2 retrográd transzportútvonalra kerülését, így magával viszi a jelölt fehérjét. Az ER-be történő visszajutás után a receptor-ligand komplex disszociál, felszabadítva ezzel az ERD2 molekulát, hogy az kiindulási helyére visszajutva újabb fehérjék transzportját kezdeményezhesse.⁽¹³⁾

Nukleáris lokalizációs szignál

A sejtmag fehérjéi a citoszolban lévő szabad riboszómákon szintetizálódnak. Sok fehérjén, mely a szintézist követően a magba kerül, egy 4-10 nagyrészt bázikus aminosavból álló, úgynevezett nukleáris lokalizációs szignál (NLS) található. Ezt a szekvenciát egy receptorfehérje (importin) ismeri fel, melynek kapcsolódásával elindul a komplex energiaigényes transzportja a magba a nukleáris pórusokon keresztül. A bejutás után a receptor leválik a fehérjéről, és visszaáramlik a citoplazmába.⁽¹¹⁾

Sok fehérje azonban nem ezt a klasszikus útvonalat használja a sejtmagba történő bejutáshoz. Erre példa a kísérleteimben használt NLS, amely a QKI-5 fehérje (Quaking I-5 Protein) 7 aminosavból álló (RVHPYQR) szekvenciárészlete. Jiang Wu és társai kísérletei

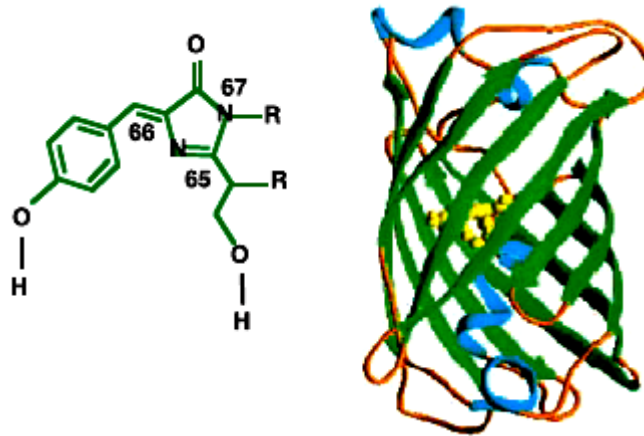
alapján ez a szekvencia teszi lehetővé a QKI-5 fehérje nukleáris lokalizációját, és fúziós fehérjeként más peptidek (pl. GFP) nukleáris transzportját is biztosítja. ⁽¹⁴⁾

GFP és YFP

A szubcelluláris lokalizáció vizsgálatához egyszerű megoldás a fehérje fúziós fluoreszcens jelölése. Ehhez egy megvilágítás hatására fluoreszkáló fehérje szekvenciáját egy leolvasási keretbe kell klónozni a vizsgálandó fehérjével, így az fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva pontosan a tanulmányozni kívánt fehérje helyét mutatja meg. Ilyen fluoreszkáló fehérje például a zölden világító GFP, vagy a sárga fényt emittáló YFP.

Az eredeti zöld fluoreszcens fehérjét (GFP, green fluorescent protein) biolumineszcens medúzából (*Aequorea victoria*) izolálták. Ebben a fajban fénykibocsátás akkor történik normális besugárzásra, amikor kalcium köt az aequorin nevű fényérzékeny fehérjéhez. Ez önmagában kék fényt bocsátana ki, ám ezt a kék fényt elnyeli a szintén ebben a medúzafajban található zöld fluoreszcens fehérje, mely így a zöld hullámhossz-tartományban detektálható fényt sugároz ki. A GFP működéséhez nem igényel szubsztrátot vagy koenzimet, ezért használata igen elterjedt lett a kutatásban, mint génexpressziós marker. Rekombináns DNS-technológiákkal előállított, kis fotodegradációjú fúziós molekulaként láthatóvá teszi a sejtben a vizsgálni kívánt fehérjéket, míg azok eredeti funkciója általában megmarad, ezáltal különböző endogén folyamatok nyomon követhetőkké és sokszor mennyiségileg is meghatározhatókká válnak. ^{(15) (16) (17)}

A GFP-nek sok mutánsát létrehozták a dimerizációs hajlam és az érési idő csökkentésére, a fluoreszcens spektrum megváltoztatására, valamint a jobb expressziós tulajdonságok és a nagyobb stabilitás elérése érdekében. A GFP család tagjai 238 aminosavból állnak, bennük a 3-aminosavból felépülő fluorofór a 11 szálú β -hordó szerkezetben található. (4. ábra) A családba tartozik a sárga fluoreszcens fehérje (YFP, yellow fluorescent protein), amely struktúrájában hasonló a GFP-hez, ám 5 mutáció hatására nagyobb hullámhosszon gerjeszthető, illetve nagyobb hullámhosszon és megnövelt fényerővel emittál fényt, mindemellett viszont érzékenyebb a pH-változásokra és a magas halogénion-koncentrációra. Az EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) nevét onnan kapta, hogy expressziós szintjét kodonoptimalizációval megnövelték emlős sejtekben. Kísérleteimben magam is EYFP-t használtam fúziós fluoreszcens jelölésre. ^{(16) (18) (19)}



4. ábra: A vad típusú GFP kromofórjának és annak fehérjén belüli elhelyezkedésének sematikus ábrázolása ⁽¹⁵⁾

A 3 aminosavból (Ser⁶⁵, Tyr⁶⁶, Gly⁶⁷) álló ciklikus kromofór a 11-szálú β -hordóban található központi α -hélix szerkezetben foglal helyet.

Munkám során tehát részben általam készített, többségében szekréciós (SS) és GPI-horgony szignállal (valamint némely esetben NLS-sel, illetve KDEL szekvenciával) ellátott Prion és Shadoo fehérjekonstrukciók emlős sejtbeli szubcelluláris lokalizációját vizsgáltam fúziós fluoreszcens jelöléssel (EYFP) konfokális mikroszkóp segítségével. A következő fejezetben a kutatómunkához szükséges módszerek pontos körülményeit és az ezekhez használt anyagok eredetét részletezem.

Felhasznált anyagok, eszközök és módszerek

Plazmidkonstrukciók

A plazmidokat a pEGFP-C1 (Clontech Laboratories, Inc.) vektorból származtatott konstrukciókból állítottuk elő, amely tartalmazza az *egér* Prion, illetve Shadoo fehérje génjének két szakaszát, a szekréciós szignálszekvenciát és a GPI-szignált. (Uniprot azonosító: P04925 és Q8BWU1). A klónozáshoz szükséges enzimeket és a hozzájuk tartozó puffereket a Fermentas cégtől rendeltük. A linker oligonukleotidok és a mutagenézis primerek szintézisét a Microsynth AG (Ausztria) végezte. A munkálatokhoz szűrt Milli-Q (Millipore™) vizet használtam. Az összes konstrukció megfelelőségét szekvenálás bizonyította (Microsynth AG, Ausztria, Sanger-féle láncterminációs módszerrel).

A plazmidkonstrukciók nagy részét munkatársaim korábban készítették más célokra. Amikor elkezdtem foglalkozni a témával, ezeket a konstrukciókat nem kellett magamnak klónoznom, a labor plazmidraktárában már készen találtam őket – legtöbbjükért köszönet *Tóth Eszter* PhD hallgatónak (kódszámuk 4-gyel kezdődik), illetve *Kulcsár Péter* szakdolgozónak (8-as kezdőszámú konstrukció). A sejt kultúrás munkákat, a plazmidokkal való transzfekciókat, a transzfektált sejtek fluoreszcens mikroszkóppal történő analízisét, a sejtszámolást és az ebből készített statisztikát magam végeztem. Szintén magam készítettem az újabb, QKI-5 NLS-sel rendelkező konstrukciókat, amikor a kutómunka során felmerülő kérdések megválaszolásához elkészítésük szükségessé vált (kódszámuk 7-tel kezdődik). A QKI-5 NLS és KDEL szekvenciák bevitele linkerligálással, a YFP kezdő ATG tripletének cseréje mutagenézis PCR-rel történt (QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene).

Az általam készített konstrukciók klónozásának rövid folyamata:

(konstrukciólistát ld. alább)

- **7005:** 4017-ből; NLS-hez két oligonukleotid tervezése, linkerré hibridizáltatása, klónozása túlnyúlókkal az EYFP és a PrP GPI-szignál közé (HindIII és EcoRI hely közé).
- **7011:** 8009-ből; az előbbi hibridizált, NLS-t tartalmazó linker ligálásával EYFP és Sho(d) közé (HindIII és EcoRI hely).
- **7013:** Két másik általam készített, a dolgozatban nem bemutatott konstrukció felhasználásával (Sho-szignálos konstrukcióból SS-EYFP-NLS rész áttétele egy PrP GPI-t tartalmazó vektorba NheI-EcoRI hely közé), majd mutagenézis PCR-rel (EYFP kezdő metioninjának elmutálása).

- **7015:** Egy általam készített, a dolgozatban nem bemutatott Sho-szignálos konstrukcióban (SS-EYFP-NLS-GPI) az EYFP kezdő metioninjának elmutálása mutagenézis PCR-rel.
- **7024:** 7015-ben GPI-szignál cseréje KDEL szekvenciára (oligonukleotid tervezése, linkerrel hibridizáltatás, klónozás túlnyúlókkal EcoRI-BamHI hely közé).

Kód	SS	Jel	Fehérje	GPI
4013	PrP	EYFP		Sho
4016	PrP	EYFP	PrP	PrP
4017	PrP	EYFP		PrP
4021	Sho	EYFP	Sho	Sho
4022	Sho	EYFP		Sho
4030		EYFP	Sho	Sho
4045		EYFP	PrP	PrP
4098	Sho	EYFP	Sho	PrP
4101	Sho	EYFP	Sho	
7005	PrP	EYFP	QKI5	PrP
7011	Sho	EYFP	QKI5+Sho(d)	Sho
7013	Sho	EYFP	QKI5	PrP
7015	Sho	EYFP	QKI5	Sho
7024	Sho	EYFP	QKI5	KDEL
8009	Sho	EYFP	Sho(d)	Sho

5. ábra: Konstrukciólista

Az oszlopok rendre: a konstrukció laboratóriumunkban használt azonosító száma, a szekréciós szignál jelenléte és eredete, fluoreszcens marker fehérje, a vizsgált fehérje vagy peptidrész, GPI-szignál jelenléte és eredete. (QKI5: QKI-5 NLS, Sho(d): Sho az NLS szekvenciája nélkül, KDEL: ER retenciós szignál)

Emlős sejtkultúra

A transzfekciókhoz HeLa (humán méhnyakrák) sejtvonalat használtam. A sejteket 37°C-os, 5% CO₂-ot tartalmazó párasított inkubátorban tartottam fenn 10% hővel inaktivált magzati szarvasmarha szérummal (fetal bovine serum, FBS, Lonza) és 100 egység/ml penicillinnel valamint 100 µg/ml sztreptomocinnel (Lonza) kiegészített magas glükóztartalmú Dulbecco's Modified Eagle's Médiumban (komplettált DMEM, Lonza). A sejtkultúra passzálása hetente kétszer történt, 95-100%-os konfluencia elérésekor.

Transzfekció

A transzfektálás előtt egy nappal közel konfluens sejtenyészetből hígítás, majd Bürker-kamrás sejtszámlálás után 500 µl komplettált DMEM-ben $2,5 \times 10^4$ sejtet tettem Labtek-II nyolcüregű kamra (Labtek) welljeibe. Egnapos inkubálás után Turbofect reagens (Fermentas) segítségével a gyártó által megadott protokoll alapján végeztem a transzfekciót.

50 µl szérummentes DMEM-hez 500 ng plazmidot adtam, majd a keveréket 1 µl Turbofect reagenssel 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltam, melynek végétével a welllekben lévő sejtekhez 50-50 µl keveréket adtam cseppenként. A médiumot 3 órás 37°C-os inkubálás után lecseréltem komplettált DMEM-re, majd 24 órán keresztül folytattam a transzgén expresszálatást.

Fluoreszcens mikroszkópia

Analízis előtt a sejteket a következő módszerrel fixáltam: a médiumot leszívtam, a wellket 200 µl PBS-sel (phosphate buffered saline) mostam, majd a PBS eltávolítása után 100 µl 4%-os para-formaldehidet (4% PFA, PBS-ben) 5 percig hagytam a sejteken. A PFA leszívását követően a kiszáradás elkerülése végett a fixált sejteket 200 µl PBS-ben tároltam (4°C-on).

A transzfektált sejteket sárga fluoreszcens fehérje kifejeződése jelezte, így annak lokalizációját fluoreszcens, illetve konfokális mikroszkóp segítségével monitorozni tudtam. A sejtek magját a PBS leszívása után Hoechst 33342 festékkel 3,3 µM-os koncentrációban festettem 5 percig, majd a festékoldat leszívása után PBS-ben tároltam a sejteket a mikroszkópozáshoz. A használt pásztázó lézerrel működő konfokális mikroszkóp típusa Olympus FluoView™ FV1000 (pásztázó egység IX81 inverz mikroszkóppal), melyet a következő beállításokkal működtettünk:

- 60x-os nagyítású olajimmerziós objektív (UPLFLN),
- mintavétel sebessége: 8 µs/pixel, sorátlagolás 2x, pásztázás módja: szekvenciális egyirányú,
- gerjesztő fény hullámhossza: Hoechst 33342 – 405 nm, EYFP – 515 nm,
- detektálás hullámhossza: Hoechst 33342 – 425 és 475 nm között, EYFP – 530 és 630 nm között,
- a transzmissziós képeket 525 nm-en rögzítettük.

Statisztika

A számolás közvetlenül a mikroszkópon történt fluoreszcens üzemmódban, illetve képek alapján konfokális üzemmódban. A konfokális üzemmód használatáért és a képek készítéséért köszönet illeti Nyeste Antal és Tóth Eszter PhD hallgató csoporttársaimat. A kísérleteket háromszor ismételtam. Minden konstrukcióból kísérletenként minimum egy wellt számoltam

le úgy, hogy biztosan legyen 100 megvizsgálható transzfektált sejt wellenként. A sejtszámoláshoz a wellen belül random módon választottuk ki a vizsgálni kívánt területeket.

Minden wellben leszámoltam legalább 100 transzfektálódott sejtet, és azon belül a nukleáris YFP lokalizációt mutatóakat is. A konstrukciók magi lokalizációjának aránya a magi lokalizációt mutató sejtek számának és az összes transzfektált sejt számának aránya százalékos formában. A párba állított konstrukciók maglokalizációs százalékait Mann-Whitney U-teszttel vettem össze 5%-os konfidenciaszinten. A kiértékeléshez a STATISTICA programot használtam. A statisztikai táblázatok a függelék 2. ábráján láthatók.

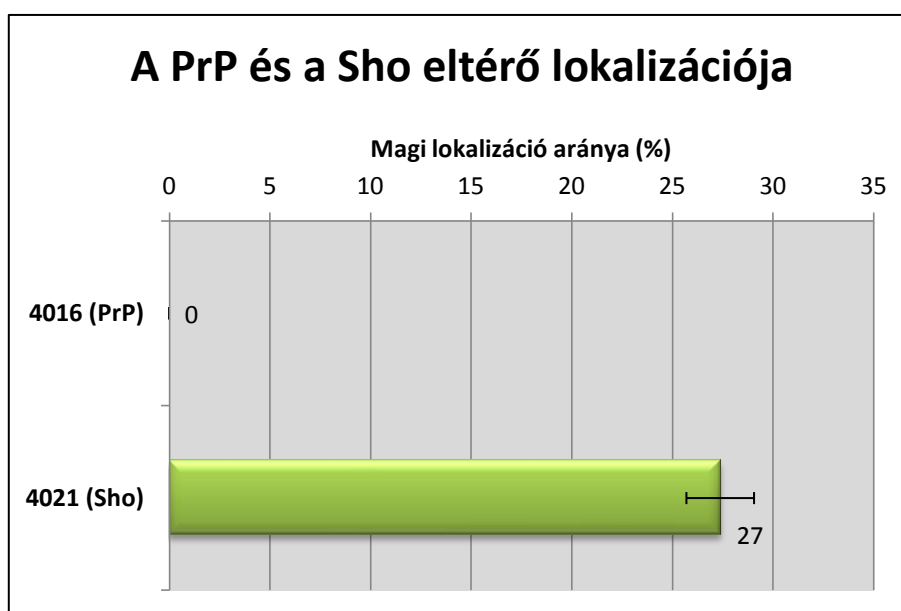
Megjegyzés

Szakkolgozatomban kifejtettem, hogy a fluoreszcens fehérje elején található ATG triplet és környezete, mint transzláció-iniciációs hely problémát okoz fúziós fluoreszcens jelöléssel ellátott szekréciós fehérjék szubcelluláris lokalizációjának vizsgálatakor, hiszen egy csonka – szekréciós szignál nélküli - fehérje szintézise indul meg a sejtek egy frakciójában. Ezen jelenség mögött az alternatív transzláció-iniciáció egyik formája állhat. ⁽²⁰⁾ ⁽²¹⁾ Ez a fehérje nem kerül a szekréciós útvonalra, hanem a citoszolba jutva torzíthatja a lokalizációs mintázatot. Ennek okán jelen kísérleteinket az EYFP kezdő metioninjában mutáns változatával végeztük, amelyek leucinnal, illetve szerinnel vagy glicinnel indulnak, így kiküszöbölve az alternatív transzláció-iniciációból eredő esetleges hibás értelmezéseket.

Eredmények és diszkusszió

TDK témám a következő érdekes probléma felvetődésével indult. A Prion és a Shadoo fehérje szubcelluláris lokalizációját fúziós fluoreszcens jelöléssel vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy míg a Prion fehérje az emlős sejtek sejtmembránjában volt megtalálható, a Shadoo fehérje az elvárt membránlokalizáció mellett sejtmagi lokalizációt is mutatott a sejtek egy részében (6. ábra).

Kód	SS	Jel	Fehérje	GPI
4016	PrP	EYFP	PrP	PrP
4021	Sho	EYFP	Sho	Sho

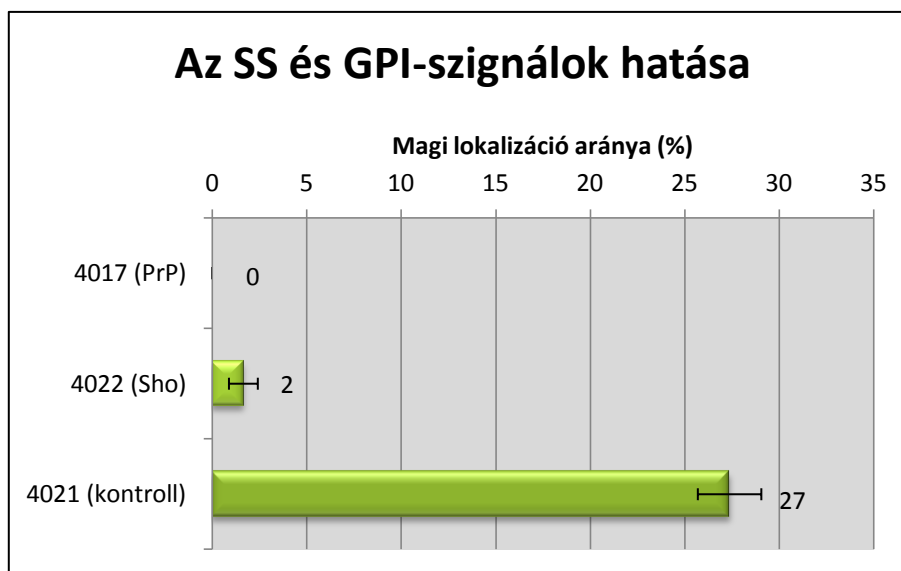


6. ábra: A PrP és a Sho eltérő lokalizációja

Fent a konstrukciók szerkezete, a diagramon a magi lokalizációs eredmények láthatók. A PrP-s konstrukció csak membránlokalizációt mutatott, a Sho-s konstrukcióban a magi lokalizáció aránya 27%. A két eredmény szignifikánsan különbözik (Függelék 2. ábra).

Hogy megbizonyosodjak arról, hogy a magbamenetel a fehérje jelenlétéhez köthető, olyan konstrukciók lokalizációját vizsgáltam meg, amelyek csak a szignálszekvenciákat tartalmazzák (7. ábra). A PrP-szignálos konstrukció nem, míg a Sho-szignálos elenyésző mennyiségben adott magjelet, habár minden kísérletnél a pozitív kontrollként transzfektált 4021-es konstrukció a rá jellemző 30% körüli maglokalizációs arányt mutatta. A két SS hatásában a különbség nem szignifikáns (Függelék 2. ábra).

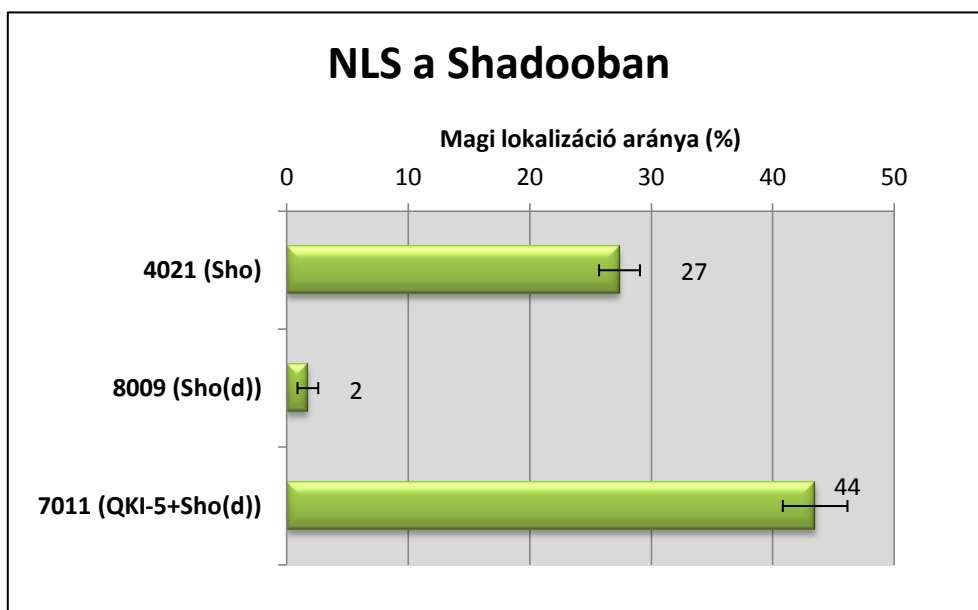
Kód	SS	Jel	GPI
4017	PrP	EYFP	PrP
4022	Sho	EYFP	Sho



7. ábra: Csak szignálszekvenciákat tartalmazó konstrukciók

A Shadoo fehérje sejtmagi lokalizációját nemcsak azért találtuk érdekesnek, mert ez nagyon szokatlan egy szekrécios útvonalra elkötelezett fehérje esetében, hanem azért is, mert *Yaping Gu* és társai szerint a PrP szekvenciájában két egymástól független nukleáris lokalizációs szignál is található. ⁽²²⁾ Mindegyik szignál hatékony egy másik fehérje kontextusában is, például a borjú szérum albumin fehérjét képesek a sejtmagba küldeni. ⁽²²⁾ Munkatársaim kísérleteik során a Shadooban is találtak ilyen szekvenciát, amely a citoszolikus, szignálpeptid nélkül expresszált fehérjéket képes a sejtmagban dúsítani. Ezt a szekvenciát eltávolítva [Sho(d)] a magi lokalizáció szinte teljesen megszűnt. Ha a kiűtött szekvencia helyére QKI-5 NLS-t tettem [QKI-5+Sho(d)], a magi lokalizáció aránya újra megemelkedett (8. ábra). Ez a kísérlet rávilágított, hogy a Shadoo fehérje NLS-e a fehérjének csak a citoszolból a sejtmagba juttatásában játszik szerepet, a Shadoo fehérje „trafficking”-jének más szakaszában nincs szerepe, egy másik NLS-sel felcserélhető.

Kód	SS	Jel	Fehérje	GPI
4021	Sho	EYFP	Sho	Sho
8009	Sho	EYFP	Sho(d)	Sho
7011	Sho	EYFP	QKI5+Sho(d)	Sho



8. ábra: NLS a Shadooban

Fent a konstrukciók szerkezete, a diagramon a magi lokalizációs eredmények láthatók.

Mivel a nukleáris lokalizációs szignál csak citoszolikus fehérjét képes a magba transzportálni, a fenti eredményekből úgy tűnik, hogy a Prion fehérje a szekréción utvonalon marad, míg a Shadoo fehérje egy része a citoszolba és onnan a magba kerül. A kérdés tehát az: hogyan kerülhet a Shadoo fehérje a citoszolba?

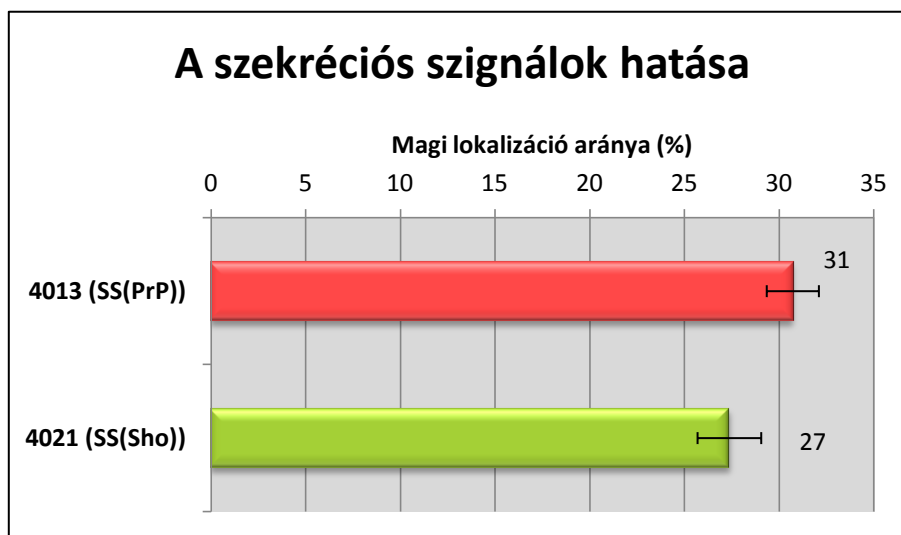
Elképzelhető, hogy a szekréción szignálok eltérő hatékonyságából ered a különbség. *Neena S Rane* és munkatársai *in vivo* kísérletekben mérték a PrP szignáljának hatékonyságát.⁽²³⁾ Az eredmények alapján a citoszolba kerülő fehérjemennyiség 5-15% közé tehető, azaz a PrP szignálja nem tökéletes hatékonysággal működik. Ugyanakkor azt is találták, hogy még a leghatékonyabb szignálszekvenciák is engednek át detektálható mennyiségű fehérjét a citoszolba.⁽²³⁾ Mivel a Sho és a PrP szekréción szignálszekvenciája igen különböző (9. ábra) annak kiderítésére, hogy közöttük van-e hatékonyságbeli eltérés kísérletesen próbáltam választ keresni. Olyan konstrukciók lokalizációját vizsgáltam, amelyek csak a szignálszekvenciájukban különböznek (10. ábra). Mindkét esetben a magi lokalizáció 30% körüli, az eredmények alapján nincs szignifikáns különbség a két SS hatásában, tehát ez nem indokolhatja az eltérő viselkedést.

```
CLUSTAL O(1.1.0) multiple sequence alignment

SP|sp|P04925|1-22|PRIO_MOUSE  --MANLGYWLLALFVTMWTDVGLC----- 22
SP|sp|Q8BWU1|1-24|SPRN_MOUSE  MNWTAATCWALLLA-----AAFLCDSCSA 24
                                :   * * *   .  **
```

9. ábra: A PrP és a Sho SS-ének illesztése az UniProt szekvencia-összehasonlító segítségével

Kód	SS	Jel	Fehérje	GPI
4013	PrP	EYFP	Sho	Sho
4021	Sho	EYFP	Sho	Sho



10. ábra: Konstrukciók a Sho és a PrP szekréciós szignálok hatásának vizsgálatára

A két minta mögött álló sokaság nem bizonyult szignifikánsan különbözőnek (Függelék 2. ábra).

Korábbi kísérleteim (8. ábra) megmutatták, hogy a Shadoo fehérje NLS-e lecserélhető, nem játszik szerepet a fehérje citoplazmatikus megjelenésében, csupán a fehérje magi dúsulásaért felelős. Így csak a fehérje maradék C-terminális fele, illetve a GPI szignál szekvencia tartalmazhat olyan információt, ami megmagyarázza a Shadoo és Prion fehérjék eltérő szubcelluláris előfordulását.

Először a két fehérje GPI szignál szekvenciájának hatását hasonlítottam össze. Az UniProt szekvenciaillesztővel kapott eredményekből látszik, hogy a két szekvencia meglehetősen különböző (11. ábra).

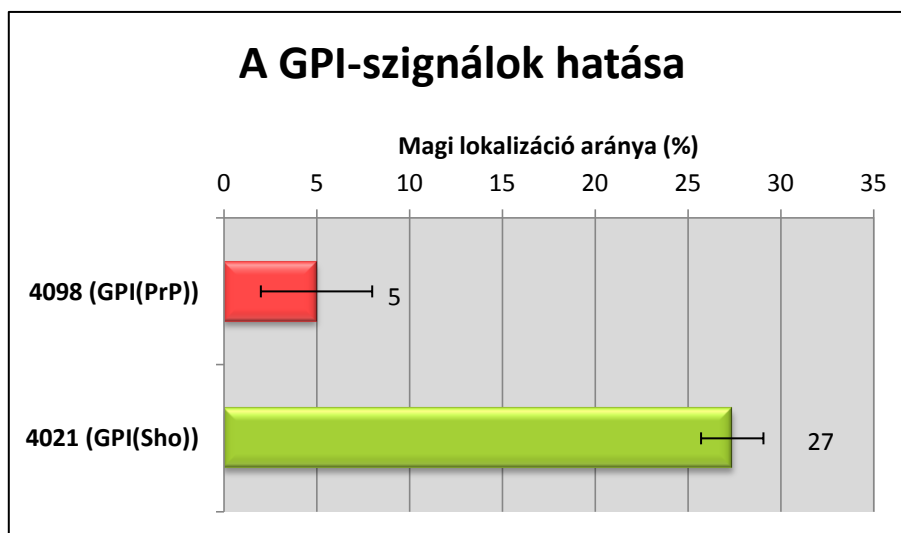
CLUSTAL O(1.1.0) multiple sequence alignment

```
SP|sp|P04925|231-254|PRIO_MOUSE SSTVLFSSPPVILLISFLIFLIVG----- 24
SP|sp|Q8BWU1|123-147|SPRN_MOUSE --SGSVHSPRI-----CLLLGGTLGALELLRP 25
                                : . ** : *::*
```

11. ábra: A PrP és a Sho GPI-szignáljának illesztése
az UniProt szekvencia-összehasonlító segítségével

Hogy megvizsgáljam, ad-e lokalizációs különbséget a fehérjék ezen része, a 12. ábra látható konstrukciókat transzfektáltam HeLa sejtekbe. A két konstrukció csak a GPI-horgony szignálban különbözik, a többi részük teljesen megegyezik. A korábbi kísérletből következik (10. ábra), hogy mindegy, melyik SS-t tesszük a konstrukcióba, így itt mindkét esetben a Sho SS-ét használtam.

Kód	SS	Jel	Fehérje	GPI
4098	Sho	EYFP	Sho	PrP
4021	Sho	EYFP	Sho	Sho



12. ábra: A Sho és a PrP GPI-szignáljának hatása

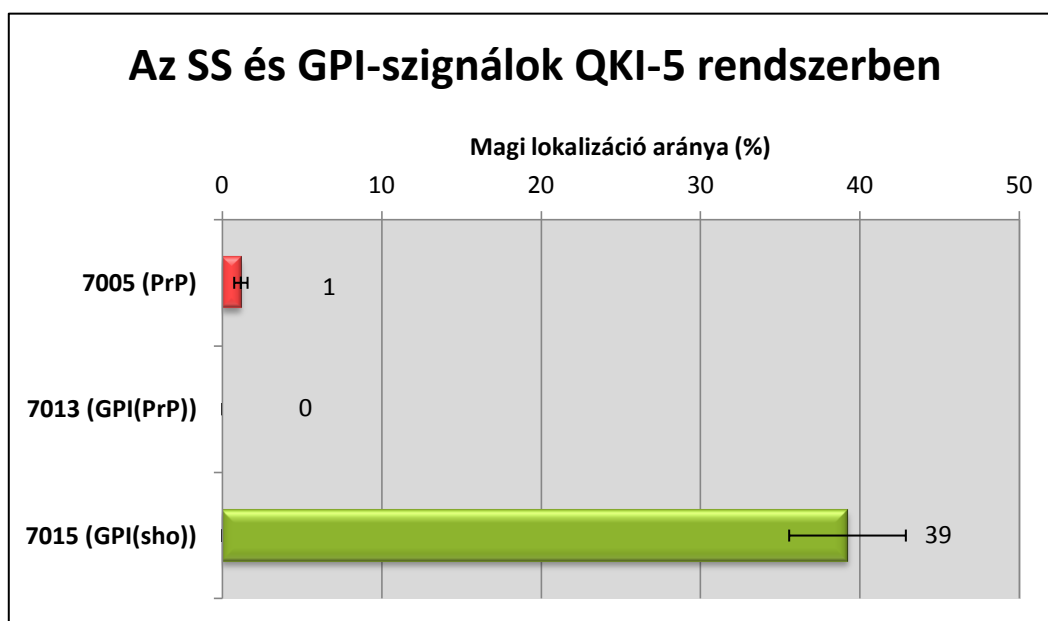
A Mann-Whitney U-teszt szerint szignifikáns különbség mutatkozik a két GPI-szignál magi lokalizációra gyakorolt hatásában (Függelék 2. ábra).

A Shadoo GPI-szignállal rendelkező fehérje szignifikánsan nagyobb százalékban mutatott magi lokalizációt, mint a Prion GPI-szignálos fehérje.

Ez az eredmény felvetette annak lehetőségét, hogy a Prion és Shadoo fehérjék szekréciónál utvonali helyetti eltérő arányú citoszolikus, illetve magi megjelenéséért teljes egészében a GPI-szignálok különbözősége a felelős, a fehérje maradék részének szekvenciája semmi ilyen jellegű információt nem hordoz.

Ezen lehetőség számbavételére megvizsgáltam, hogy egy független rendszerben is tapasztalható-e a Sho-s konstrukció furcsán magas magi lokalizációs viselkedése. A következő kísérletben egy kisebb aminosav-szekvenciával – a QKI-5 fehérje nukleáris lokalizációs szignáljával – helyettesítettem a PrP és a Sho szekvenciáját. Így, ha a konstrukció a Sho szekréción szignáljával a citoszolba is kerül, a QKI-5 NLS a magba fogja juttatni. Ha pedig a PrP szekréción szignáljával nem, vagy csak nagyon kis mértékben kerül a konstrukció a citoszolba, akkor nem fogunk magi lokalizációt látni.

Kód	SS	Jel	Fehérje	GPI
7005	PrP	EYFP	QKI5	PrP
7013	Sho	EYFP	QKI5	PrP
7015	Sho	EYFP	QKI5	Sho



13. ábra: Szignálok vizsgálata a QKI-5 NLS-es rendszerben

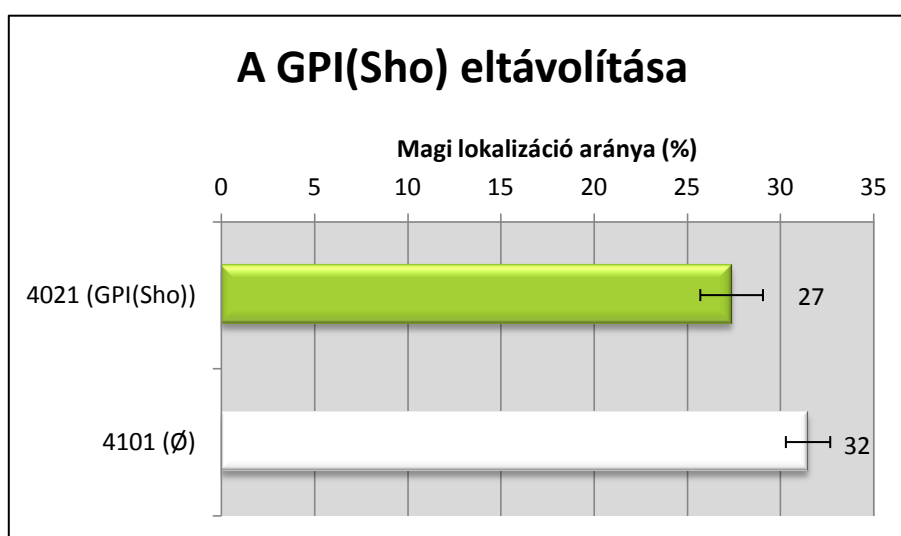
A Sho-s és PrP-s eredmények szignifikánsan különböznek (Függelék 2. ábra).

Az eredmények a 13. ábra alapján igazolták ezeket az elvárásokat. A Shadoo-szignálos konstrukció (7015) itt is szignifikánsan nagyobb százalékban lokalizálódott a magban, mint a PrP-szignálos (7005), amely elenyésző százalékban adott magjelet hasonlóan az egész fehérjét tartalmazó konstrukcióhoz (4016, 6. ábra). Természetesen elkészítettem azt a konstrukciót is, amely csak a GPI-szignálban különbözött. A PrP GPI-szignálját tartalmazó konstrukció (7013) egyáltalán nem mutatkozott a magban, míg a Sho GPI-szignálosnál (7015) a sejtek 40%-ában magi dúsulást figyeltem meg.

Ezek az eredmények egyértelműen megmutatták, hogy a két fehérje, a Prion és a Shadoo szubcelluláris lokalizációjában látható különbség a GPI-szignálszekvenciák különbözőségére vezethető vissza. Ha a Shadoo GPI-szignálja felelős a fehérje egy részének a szekréciónál helyetti citoszolikus megjelenéséért, akkor a GPI-szignálszekvencia hiánya meg kell hogy szüntesse a fehérje nukleár-citoplazmikus kompartmentben való megjelenését.

Következő lépésként megvizsgáltam egy olyan konstrukció lokalizációját, amelyből hiányzik a GPI-szignál (14. ábra). Ezen konstrukció (4101) magi lokalizációs aránya nem mutatott szignifikáns eltérést a Sho GPI-szignált tartalmazó kontrollhoz képest (Függelék 2. ábra).

Kód	SS	Jel	Fehérje	GPI
4021	Sho	EYFP	Sho	Sho
4101	Sho	EYFP	Sho	



14. ábra: A GPI-szignál eltávolítása

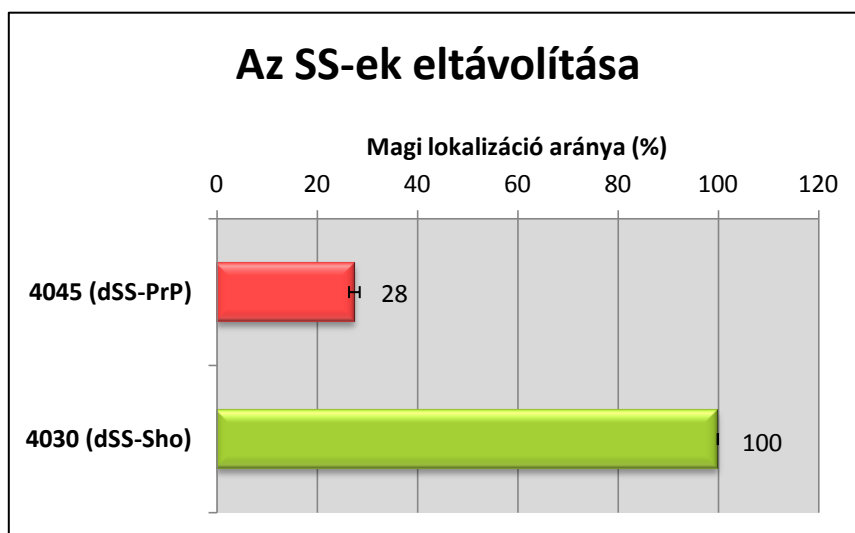
Ebből arra a következtetésre jutottam, hogy a Sho GPI-szignáljának jelenléte nem változtatja meg a magba menetel arányát, tehát a fehérje ezen része nem hozhatja ki a konstrukciót az ER-ből, illetve a szekréciónálról.

Alternatív magyarázat lehet, ha nem a Sho GPI-szignálja téríti le a fehérje egy részét a szekréciónálról, hanem a PrP GPI-szignál tarja rajta őket. *Christina Hölscher* és szerzőtársai *in vitro* kísérleteikben 2001-ben azonosítottak a PrP szekvenciájában az N-terminális SS-en kívül egy olyan részt, amely szekréciónál szignálként képes működni.⁽²⁴⁾ Ez a szekvencia a PrP 231-254-es hidrofób aminosavrészlete, nevezetesen a GPI-szignál. Kísérleteikkel bebizonyították, hogy ez a C-terminális szignál poszttranszlációsán működik, tehát a transzlokáció az ER membránjába a szintézis után történik. Megmutatták, hogy SS

nélküli PrP konstrukciók is képesek ilyen módon az ER-be kerülni, bár csökkent hatékonysággal, a GPI-szignál tehát „menti” a citoszolba került PrP-t a degradációtól azáltal, hogy bejuttatja az ER-be. A GPI-szignál poszttranszlációs transzlokációs hatékonyságát 5%-nak mérték az N-terminális SS hiányában.

Bár a Prion fehérje GPI-szignáljának ez az 5%-os poszttranszlációs transzlokációs aktivitása nem tűnt nagyon hathatósnak, megvizsgáltam, hogy ez a mechanizmus elég hatékony-e a fehérje magi lokalizációjának lecsökkentésére. Ebben a kísérletben SS nélküli konstrukciókat transzfektáltam, így azok citoszolikusan transzlálódnak (15. ábra). A kísérlethez felhasználtam egyik munkatársam, Tóth Eszter eredményét, aki korábban azt találta, hogy az SS és GPI-szignál nélküli Prion fehérje a sejtek 100%-ának a magjában dúsul. Tehát az általam vizsgált PrP variáns, amelyik nem rendelkezik SS-sel (4045), a citoszolban expreszálódik és magi dúsulást kell mutasson, hacsak a PrP GPI-szignáljának jelenléte nem okozza az ER-be való transzlokációját. Ennek a jelenségnek a Shadoo fehérje szignáljával nem kellene megtörténnie.

Kód	SS	Jel	Fehérje	GPI
4045		EYFP	PrP	PrP
4030		EYFP	Sho	Sho



15. ábra: Szekréciós szignál nélküli PrP és Sho konstrukciók

Az eredmények szignifikánsan különböznek (Függelék 2. ábra).

Az eredmények azonban kissé különböztek a várttól: azt mutatják, hogy a Prion fehérje GPI-szignálja elegendően hatékony a citoszolba irányított fehérje magi dúsulásának szignifikáns lecsökkentésére azáltal, hogy a fehérjevariáns jelentős részét az ER-be irányítja. A magi lokalizáció sokkal alacsonyabb a PrP-s konstrukció esetében, mint a Shadooéban. Ez

az eredmény magyarázatot ad azon jelenség hátterére és mechanizmusára, amely a Shadoo és Prion fehérjék eltérő arányú maglokalizációját okozza. Ugyanakkor kísérleteinkben a Prion fehérje GPI-szignáljának poszttranszlációs ER-transzlokációs hatékonysága jelentősen nagyobbak tűnik az irodalomban leírtnál.

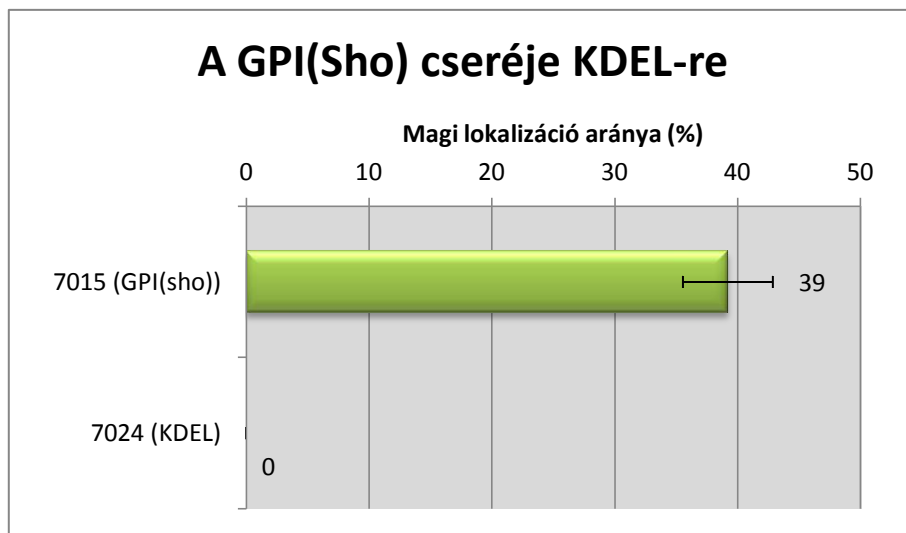
Mint azt *Christoffer Lund* és társai a Prion fehérjéről írták, szekréciós fehérjék citoplazmás megjelenése három fő módon lehetséges. Az egyik feltételezett folyamat a sérült fehérjeválasz (UPR, unfolded protein response) következtében beinduló retrotranszlokáció az ER-ből, amely csökkent proteoszóma aktivitás mellett a fehérje feldúsulását eredményezi a citoplazmában. A másik valószínűsíthető ok már az ER import szintjén keresendő. A kotranszlációs transzlokáció gátolva lehet, ha telített az ER transzlokációs gépezete, vagy túl sok a hibásan feltekeredett fehérje az ER lumenben. A harmadik az alternatív transzláció-iniciáció (aTI) jelensége, amely szekréciós szignál nélküli konstrukciók megjelenését eredményezheti, ha egy downstream (pl. a fluoreszcens fehérje elején lévő) transzláció-iniciációs helynél kezdődik a transzláció. ^{(21) (25)}

BSc szakdolgozatomban ezt a harmadik lehetőséget vizsgáltam. Az aTI jelenség jelen munkámban kizárható, hiszen kísérleteimhez olyan konstrukciókat használtam, melyben az SS után következő fluoreszcens fehérje DNS-szekvenciájának indító ATG triplete meg van változtatva, így szignálpeptid nélküli fehérje nem keletkezhet.

Következő kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a fehérje citoszolikus és így magi megjelenése a transzlokációs mechanizmus túlterheléséből következik-e be, azaz a fehérje szóban forgó frakciója be sem kerül az ER-be, vagy bekerül a szekréciós útvonalra és a membránba való útjának egy későbbi állomásából, az ER-ből vagy a Golgiból kerül vissza a citoszolba.

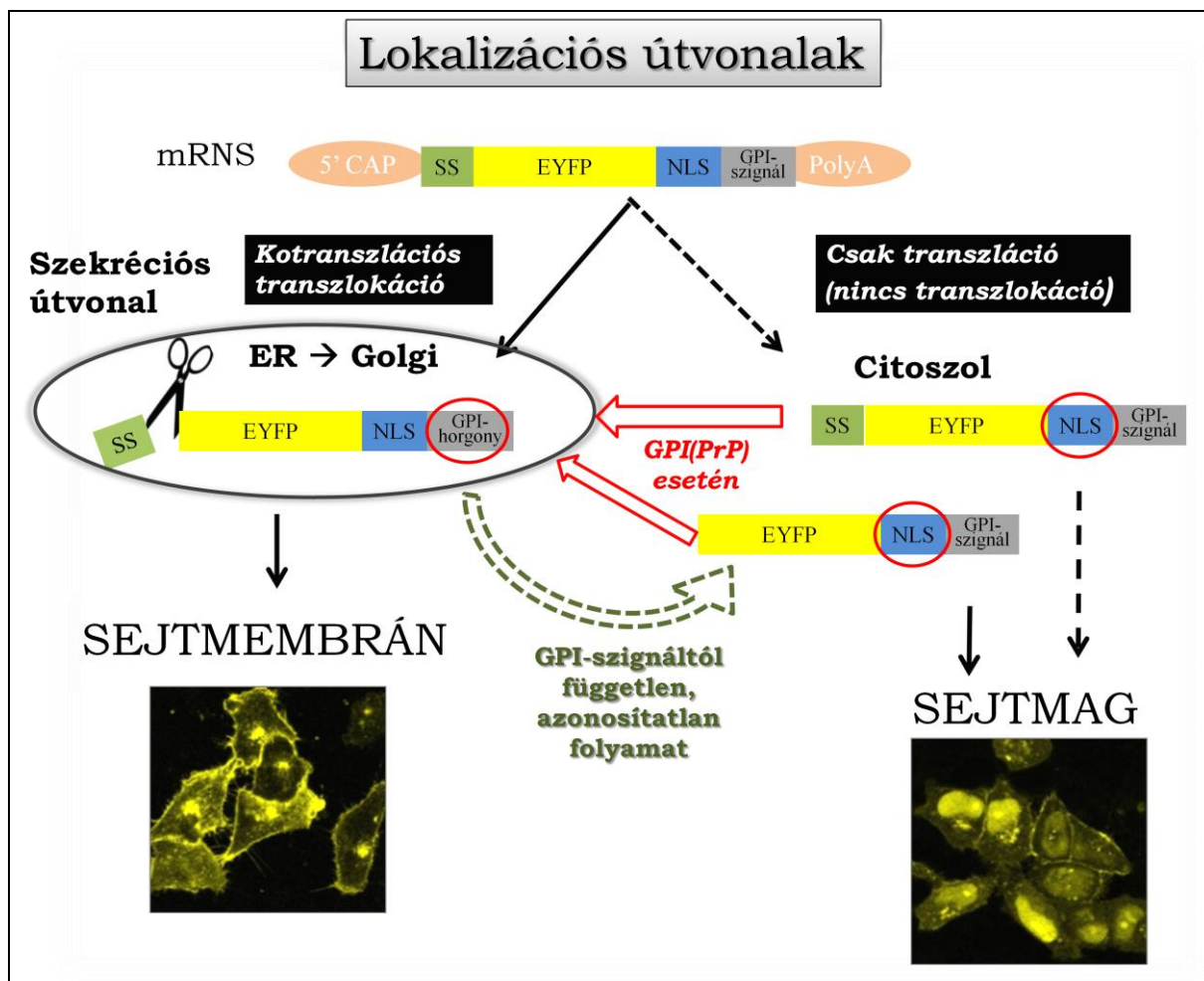
Ehhez a kísérlethez a GPI-szignált KDEL szekvenciára, egy ER retenciós szignálra cseréltem (16. ábra). Az irodalomból tudható, hogy a KDEL szekvencia citoszolikus kifejeződése nem jár a fehérjének a citoszólból való transzlokációjával, az ER-ben való megjelenésével. ⁽²⁶⁾ Így, ha a fehérje egy frakciója be sem kerül az ER-be, a KDEL-t tartalmazó konstrukció ugyanolyan magi jelet fog mutatni, mint a GPI-szignálos konstrukció. Ha azonban a szekréciós útvonal egy későbbi szakaszáról kerül vissza a citoszolba, akkor az ER-retenciós szignál megszüntetheti a fehérje magi megjelenését.

Kód	SS	Jel	Fehérje	GPI
7015	Sho	EYFP	QKI5	Sho
7024	Sho	EYFP	QKI5	KDEL



16. ábra: GPI-szignál cseréje KDEL-re

A 7024-es konstrukció nem mutatott magi lokalizációt, ami azt a magyarázatot támasztja alá, hogy a magi frakció megjelenése a Shadoo fehérje esetén elsősorban nem a szekréciós szignál elégtelen hatékonyságának vagy az ER kotranszlációs transzlokációs mechanizmus túlterheltségének a következménye. Ez az eredmény arra utal, hogy a Shadoo fehérje egy frakciója az ER elhagyása után, vélhetőleg a Golgiból, vagy a szekréciós útvonal későbbi állomásából kerül vissza a citoszolba (17. ábra). Ennek a kérdésnek az eldöntése további kutatómunkát igényel.



17. ábra: Az eredmények fényében feltételezett lokalizációs útvonalak

Membránjelet akkor kaphatunk, ha az NLS-t tartalmazó szekrécións fehérjekonstrukció kotranszlációs transzlokációval jut az ER-be, illetve ezt megkerülve a citoszból (pl. a PrP GPI-szignál közreműködésével) transzlokálódik az ER-be. Ezáltal érthetővé válik a PrP GPI-szignált hordozó fehérjék szinte kizárólagos membránlokalizációja. Magjel akkor várható, ha a fehérje a citoszolba kerül, amely történhet transzlokáció nélküli transzláció esetén, illetve GPI-szignáltól független, pillanatnyilag azonosítatlan folyamattal az ER elhagyása után, vélhetőleg a Golgiból, vagy a szekrécións útvonal későbbi állomásából, mely a Shadooban talált NLS fényében magyarázatot adhat a magi lokalizáció megjelenésére.

A Prion fehérje GPI-szignálszekvenciájának itt leírt igen hatékony transzlokációs képessége különösen érthető annak a ténynek a fényében, hogy a Prion fehérje citoszolikus megjelenése toxikus hatású bizonyos idegi sejtpopulációkban.⁽²³⁾ Így a GPI-szignálszekvencia hatékonyan segíti a toxikus, citoszolikus Prion fehérje eltávolítását a citoszoliból.

Összegzés

A Shadoo fehérje a Prion fehérjéhez hasonlóan GPI-horgonnyal kötődik a plazmamembrán külső rétegéhez. Annak ellenére, hogy a fehérje a szekréciós útvonalon szintetizálódik, egy frakciója a sejtek magjában jelenik meg. A fehérje N-terminális felében azonosítottak egy szekvenciát, amely a citoszolban megjelenő fehérje magi dúsulásáért felelős. Munkám célja annak megértése volt, hogy a fehérje melyik szakasza felelős a szekréciós útvonalra szánt fehérje egy frakciójának citoszolikus megjelenéséért, illetve milyen mechanizmus áll a szokatlan kettős, szekréciós útvonalhoz tartozó, illetve citoszolikus/magi lokalizáció mögött. Különös tekintettel voltam arra a tényre, hogy a Prion fehérje, amely szintén tartalmaz magi lokalizációt eredményező szignált (NLS-t), nem mutatja a szokatlan kettős lokalizációt, vélhetőleg azért, mert a Prion fehérje nem kerül a citoszolba, ott nem dúsul.

Kísérleteim során azonosítottam a Prion és a Shadoo fehérjének azt a szegmensét, amely eltérő szubcelluláris lokalizációjukért felelős: azt találtam, hogy a Prion fehérje GPI-szignáljának jelenlétében a citoszolikus/magi lokalizáció minimálissá válik. Ezzel ellentétben ugyanazon a fehérjekonstrukción a Shadoo fehérje GPI-szignáljának jelenlétében jelentős magi lokalizáció figyelhető meg. Ennek a különbségnek a hátterében, a Prion fehérje GPI-szignáljának az a képessége áll, amellyel a citoszolikus fehérjéket képes poszttranszlációsan az ER-be transzlokálni. Eredményeink támogatják azt az interpretációt, amely szerint a vizsgált szekréciós útra szánt fehérjék elsősorban nem a szekréciós szignálok gyenge transzlokációs hatékonysága vagy a kotranszlációs transzlokációs mechanizmus túlterheltsége miatt kerülnek a citoszolba.

Eredményeim arra utalnak, hogy a szekréciós útvonalon szintetizálódó fehérjék számára létezik átmenet a szekréciós útvonal és a citoszol között, amely szignáltranszdukcióban való részvétel, illetve kettős funkció ellátása esetén bírhat nagy jelentőséggel. Az átmenet mechanizmusának megértése további kutatómunkát igényel.

Tervezett kísérletek a témában

A munka folytatásaként a szekréciós útvonalról a citoszolba történő feltételezett átmenet mechanizmusának megértésén dolgozom. Olyan konstrukciókat fogok készíteni, ahol a szekréciós szignálba egy tag-et építek be, amely lehetővé teszi a tag immunodektálását és így a fehérjén a szekréciós szignál jelenlétének meghatározását.

Továbbá az itt használt konstrukciók egy részénél fotokonvertálható fluoreszcens fehérje klónozását tervezem az EYFP helyére, amely lehetővé tenné a fehérje „trafficking”-jének követését egy adott kompartmentből kiindulva.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm mentoromnak, *Nyeste Antalnak*, a Prion- és Fehérjekonformációs Betegségek Laboratóriumában dolgozó PhD hallgatónak a konfokális mikroszkóppal készített felvételek készítésében és a speciális ismeretek megszerzésében nyújtott segítségét. Szintén köszönet illeti témavezetőmet, *Welker Ervint*, aki szakmai tapasztalataival segítette munkámat és biztosította a kísérletek infrastrukturális hátterét.

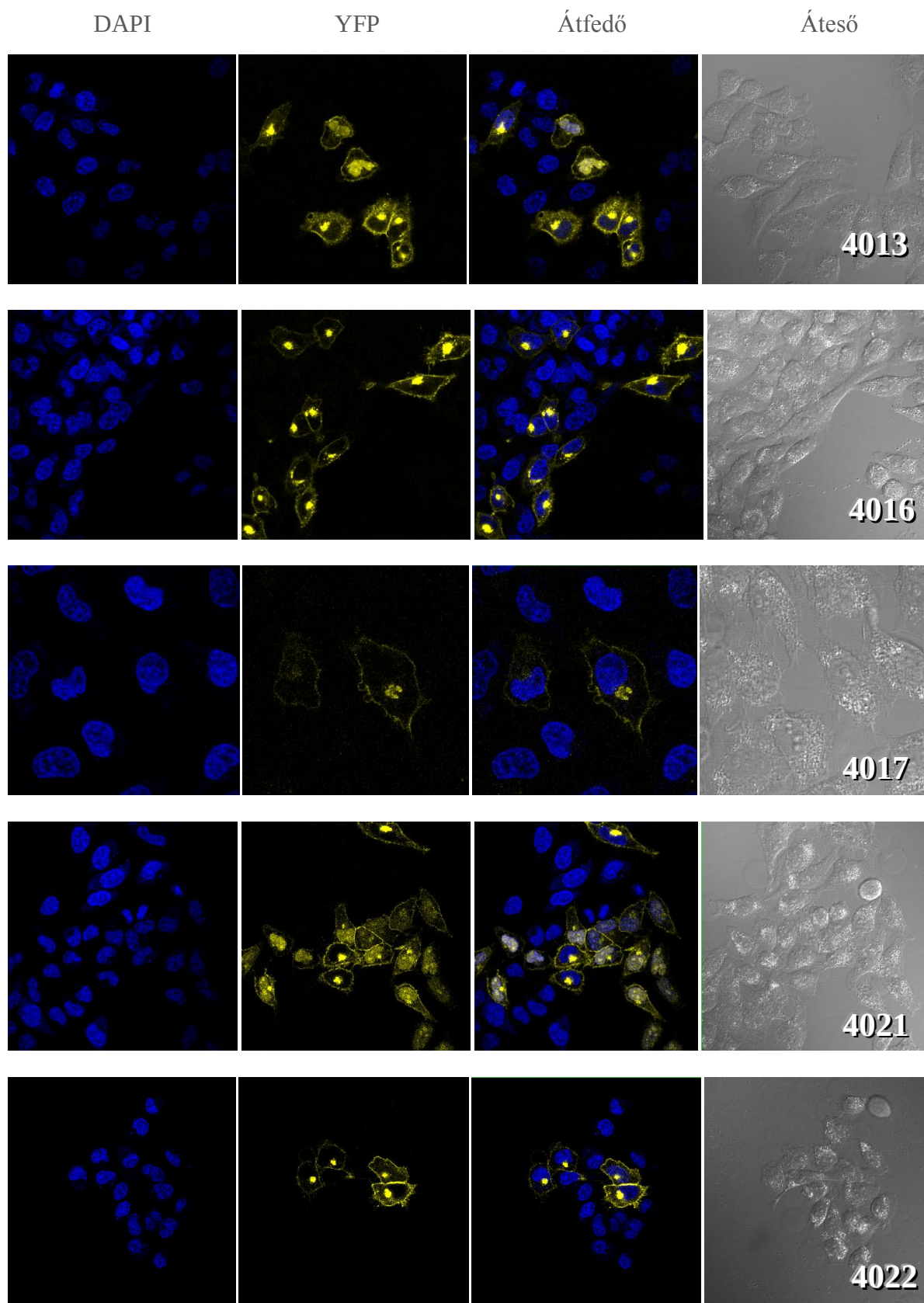
Irodalomjegyzék

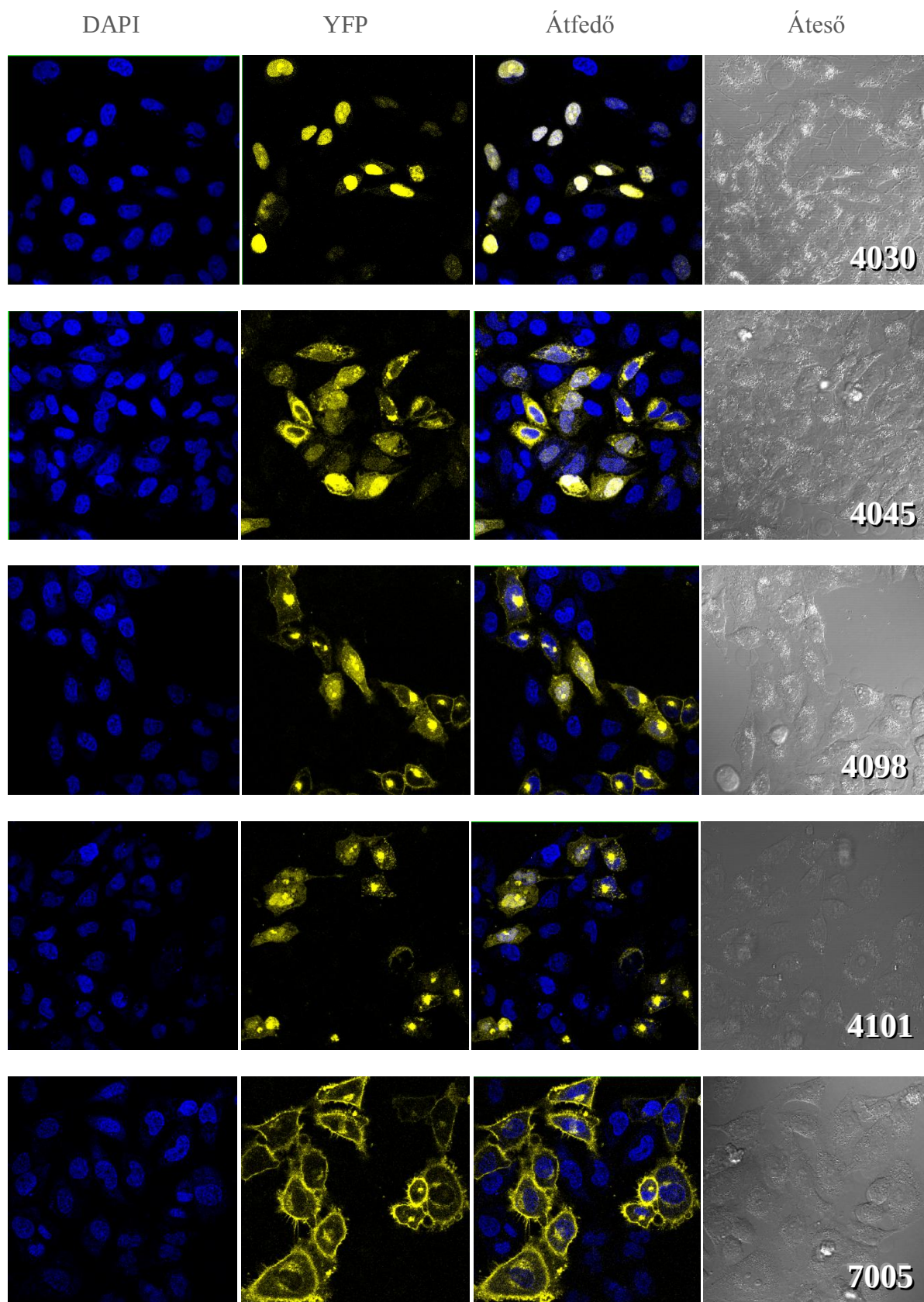
1. **Rafael Linden, Vilma R. Martins, Marco A. M. Prado, Martín Cammarota, Iván Izquierdo, Ricardo R. Brentani.** Physiology of the Prion Protein. *Physiol. Rev.* 88 (2008) 673–728.
2. **Adriano Aguzzi, Christina Sigurdson, Mathias Heikenwaelder.** Molecular Mechanisms of Prion Pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 3 (2008) 11-40.
3. **Aguzzi, A., Baumann, F., Bremer, J.** The prion's elusive reason for being. *Annu. Rev. Neurosci.* 31 (2008) 439-477.
4. **J.C. Watts, B. Drisaldi, V. Ng, J. Yang, B. Strome, P. Horne, M.S. Sy, L. Yoong, R. Young, P. Mastrangelo, C. Bergeron, P.E. Fraser, G.A. Carlson, H.T. Mount, G. Schmitt-Ulms, D. Westaway.** The CNS glycoprotein Shadoo has PrP(C)-like protective properties and displays reduced levels in prion infections. *EMBO J.* 26 (2007) 4038-50.
5. **David Westaway, Nathalie Daude, Serene Wohlgemuth, Paul Harrison.** The PrP-Like Proteins Shadoo and Doppel. *Top Curr. Chem.* 2011.
6. **Blobel, Günter.** Protein Targeting (Nobel Lecture). *Physiology or Medicine.* (1999) 244-287.
7. **Livia, Sarkadi.** *Biokémia mérnök szemmel.* (2007).
8. **Dr. Bálint, Miklós.** *Molekuláris Biológia I.*
9. **Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell.** *Molecular Cell Biology.* Sixth Edition.
10. **R.B.Pelham, Hugh.** Heat shock and the sorting of luminal ER proteins. *The EMBO Journal.* 8 (1989) 3171-3176 .
11. **Kovács, János.** *Sejttan.* 1999.
12. **Pelham, Sean Munro and Hugh R. B.** A C-Terminal Signal Prevents Secretion of Luminal ER Proteins. *Cell.* 48 (1987) 899-907.
13. **M.J. Lewis, H.R. Pelham.** Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell.* 68 (1992) 353-364.
14. **Jiang Wu, Li Zhou, Kathryn Tonissen, Ronald Tee, and Karen Artzt.** The Quaking I-5 Protein (QKI-5) Has a Novel Nuclear Localization Signal and Shuttles between the

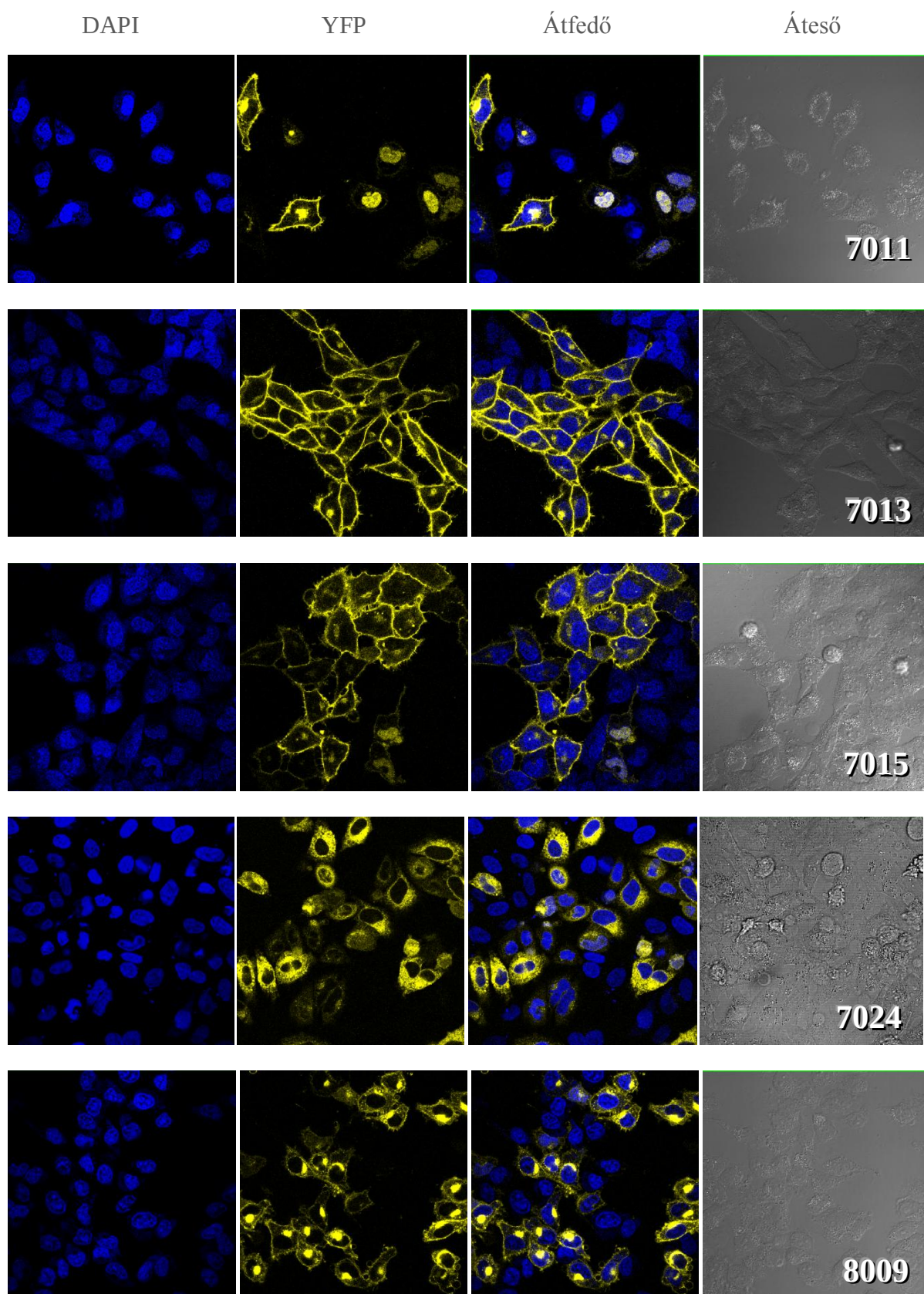
- Nucleus and the Cytoplasm. *The Journal of Biological Chemistry*. 274, 41. (1999) 29202-29210.
15. **Jennifer Lippincott-Schwartz, George H. Patterson.** Development and Use of Fluorescent Protein Markers in Living Cells. *Science*. 300 (2003) 87-91.
16. **Martin Chalfie, Yuan Tu, Ghia Euskirchen, William W. Ward, Douglas C. Prasher.** Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science*. 263 (1994) 802-805.
17. **Tsien, R.Y.** The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*. 67 (1998) 509-44.
18. **Takeharu Nagai, Keiji Ibata, Eun Sun Park, Mie Kubota, Katsuhiko Mikoshiba, Atsushi Miyawaki.** A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology*. 20 (2002) 87-90.
19. **Raul Perez-Jimenez, Sergi Garcia-Manyes, Sri Rama Koti Ainavarapu and Julio M. Fernandez.** Mechanical Unfolding Pathways of the Enhanced Yellow Fluorescent Protein Revealed by Single Molecule Force Spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*. 281 (2006) 40010-40014.
20. **Kozak, Marilyn.** The Scanning Model for Translation: An Update. *The Journal of Cell Biology*. 108 (1989) 229-241.
21. **Christoffer Lund, Christel M. Olsen, Susan Skogtvedt, Heidi Tveit, Kristian Prydz, Michael A. Tranulis.** Alternative Translation Initiation Generates Cytoplasmic Sheep Prion Protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 284 (2009) 19668–19678.
22. **Yaping Gu, Joerg Hinnerwisch, Rebecca Fredricks, Sudheera Kalepu, Ravi Shankar Mishra, and Neena Singh.** Identification of cryptic nuclear localization signals in the prion protein. *Neurobiology of Disease*. 12 (2003) 133–149.
23. **Neena S Rane, Jesse L Yonkovich, Ramanujan S Hegde.** Protection from cytosolic prion protein toxicity by modulation of protein translocation. *The EMBO Journal*. 23 (2004) 4550–4559.
24. **Christina Hölscher, Ute C. Bach, and Bernhard Dobberstein.** Prion Protein Contains a Second Endoplasmic Reticulum Targeting Signal Sequence Located at Its C Terminus. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (2001) 13388 –13394.

25. **Jiyan Ma, Susan Lindquist.** Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *PNAS*. 98 (2001) 14955–14960.
26. **Alan M. Jones, Eliot M. Herman.** KDEL-Containing Auxin-Binding Protein Is Secreted to the Plasma Membrane and Cell Wall. *Plant Physiol*. 101 (1993) 595-606.
27. **Günter Blobel, Bernhard Dobberstein.** Transfer of protein across membranes. *The Journal of Cell Biology*. 67 (1975) 852-862.
28. **K.S. Lee, A.C. Magalhaes, S.M. Zanata, R.R. Brentani, V.R. Martins and M.A. Prado.** Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *J Neurochem*. 79 (2001) 79-87.
29. **Billy Tsai, Yihong Ye, Tom A. Rapoport.** Retro-Translocation of Proteins from the ER into the Cytosol. *Nature*. 3 (2002) 246-255.

Függelék







1. ábra (függelék): Konfokális fluoreszcens fotók

A sorokban a konstrukciók képei, az oszlopokban rendre a magfotók, a YFP jel, (az mCherry kotranszfekciós jel,) majd ezek átfedő képei, végül az áteső fényvel készített fényképek láthatók.

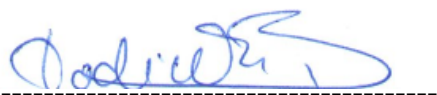
Mann-Whitney U Test By variable Groups Marked tests are significant at p <,05000										
	Rank Sum Group 1	Rank Sum Group 2	U	Z	p-value	Z - adjusted	p-value	Valid N - Group 1	Valid N - Group 2	2*1sided - exact p
4016-4021	6	30	0	-2,09	0,0369	-2,139	0,0325	3	5	0,0357
4013-4021	25,5	19,5	4,5	1,225	0,2207	1,2299	0,2187	4	5	0,1905
4017-4022	7,5	13,5	1,5	-1,09	0,2752	-1,291	0,1967	3	3	0,2
4021-4098	10	35	0	-2,33	0,02	-2,337	0,0195	4	5	0,0159
4021-4101	26,5	18,5	3,5	1,47	0,1416	1,5013	0,1333	4	5	0,1111
8009-7011	10	26	0	-2,17	0,0304	-2,165	0,0304	4	4	0,0286
7005-7015	15	51	0	-2,65	0,0081	-2,666	0,0077	5	6	0,0043
7013-7015	15	51	0	-2,65	0,0081	-2,784	0,0054	5	6	0,0043
7015-7024	39	6	0	2,195	0,0282	2,2419	0,025	6	3	0,0238

2. ábra (függelék): A Mann-Whitney U-teszt eredményei táblázatosan

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Kijelentem, hogy a dolgozat kizárólag saját kutatómunkám eredményeit tartalmazza, és ezek az eredmények korábbi dolgozatban még nem szerepeltek.

Budapest, 2012. december 10.



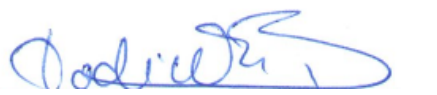
Szerző



Témavezető

Kijelentem, hogy a most benyújtott OTDK dolgozatom a BSc szakdolgozatomhoz képest új tudományos eredményeket tartalmaz.

Budapest, 2012. december 10.



Szerző



Témavezető