

Debreceni Egyetem
Általános Orvostudományi kar
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet
Retrovirális Biokémiai Kutató Laboratórium

A humán NOD-like receptor NLRC5 fehérje vizsgálata

Kovács Elek Gergő
II. éves Biotechnológia MSc hallgató

Témavezető:
Dr. Mótyán János András

Debrecen

2014



DEBRECENI EGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS TECHNOLÓGIAI KAR

UNIVERSITY OF DEBRECEN • FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY



1949

NYILATKOZAT

(A DE TTK hallgatóinak diplomadolgozatához/szakdolgozatához)

Alulírott KOVÁCS ELEK GÉRGY (Neptun kód: FWHKHM) jelen nyilatkozat aláírásával kijelentem, hogy a

A HUMAN NOD-LIKE RECEPTOR NLRCS FEHERJE VIZSGÁLATA

című diplomadolgozat / szakdolgozat (felesleges törlendő) – a továbbiakban: dolgozat – önálló munkám, a dolgozat készítése során betartottam a szerzői jogról szóló 1999. évi LXXVI. tv. szabályait, valamint az Egyetem által előírt, a dolgozat készítésére vonatkozó szabályokat, különösen a hivatkozások és idézések tekintetében¹.

Kijelentem továbbá, hogy a dolgozat készítése során az önálló munka tekintetében a témavezetőt nem tévesztettem meg. Meg nem engedtem segítséget nem vettem igénybe, a dolgozatot más oktatási intézményben szakdolgozatként vagy diplomamunkaként korábban nem nyújtottam be.

Jelen dolgozat aláírásával tudomásul veszem, hogy amennyiben bizonyítható, hogy a dolgozatot nem magam készítettem, vagy a dolgozattal kapcsolatban szerzői jogsértés ténye merül fel, illetve a dolgozatot korábban más oktatási intézményben is benyújtottam, úgy a Debreceni Egyetem megtagadja a dolgozat befogadását és ellenem fegyelmi eljárást indíthat. A dolgozat befogadásának megtagadása és a fegyelmi eljárás indítása nem érinti a szerzői jogsértés miatti egyéb (polgári jog, szabálysértési jog, büntetőjogi) jogkövetkezményeket.

Debrecen, 2014.év5.....hó09.....nap

Kovács Elek Gérgy
Hallgató aláírása

Alulírott témavezető kijelentem, hogy az ezúton benyújtott szakdolgozat / diplomamunka az én szakmai irányításommal, a jelölttel folytatott rendszeres szakmai konzultáció mellett készült, a hallgató önálló munkáját tükrözi. A dolgozatot áttekintettem, a záró- vizsgán történő védésre bocsátásra megfelelőnek és a könyvtár honlapjára feltölthetőnek találtam.

Debrecen, 2014.év05.....hó09.....nap

DEBRECENI EGYETEM
Egészségtudományi Centrum
Általános Orvostudományi Kar
BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI INTÉZET
32 Debrecen, Nagyerdei krt. 98 / Pf. 6
Tel.: 52/416-432

[Signature]
(témavezető aláírása)

DE, ÁOK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet

¹ 1999. évi LXXVI. tv. 34. § (1) A mű részletét – az átvévő mű jellege és célja által indokolt terjedelemben és az eredetihez híven – a forrás, valamint az ott megjelölt szerző megnevezésével bárki idézheti.

36. § (1) Nyilvánosan tartott előadások és más hasonló művek részletei, valamint politikai beszédek tájékoztatás céljára – a cél által indokolt terjedelemben – szabadon felhasználhatók. Ilyen felhasználás esetén a forrást – a szerző nevével együtt – fel kell tüntetni, hacsak ez lehetetlennek nem bizonyul.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
Bevezetés	5
Az intracelluláris NOD-like receptor (NLR) család	5
A humán NOD-like receptor family CARD domain containing 5 (NLRC5) fehérje...8	
Az inflammaszómáról és szerepéről	12
Célkitűzések	19
Anyagok és Módszerek	20
Anyagok.....	20
Módszerek.....	21
DH5 α sejtek transzformálása	21
Plazmid preparálás	22
pcDNA3.1 NLRC5-Flag plazmid restrikciós ellenőrzése.....	23
293T sejtek tenyésztése	24
293T sejtek transzfektálása	24
A sejtek feltárása fagyasztás-olvasztás módszert alkalmazva	25
Western-blot analízis	25
Gélszűrés.....	26
Eredmények	27
pcDNA3.1-NLRC5-Flag plazmid restrikciós ellenőrzése	27
Western-blot analízis.....	29
Molekulatömeg meghatározása gélszűréssel	32
Összegzés	34
Köszönetnyilvánítás	36
Irodalomjegyzék	37

Rövidítések jegyzéke

AD	Acidic transactivation domain
Apaf1	Apoptotic peptidase activating factor 1
BIR	Baculoviral inhibitory repeat-like domain
CARD	Caspase-recruitment domain
CITA	MHC class I transactivator
CIITA	MHC class II transactivator
CLR	C-type lectin receptors
CRP	C-reactive protein
DAMP	Danger-associated molecular patter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Fetal bovine serum
LRR	Leucine-rich repeat
MBL	Mannose-binding lectin
NACHT	Domain present in <u>NA</u> IP, <u>CI</u> ITA, <u>HE</u> T-E, <u>TP</u> -1
NBD	Nucleotid binding domain
NF-kB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLR	NOD-like receptors
NLRC5	NOD-like receptor family CARD domian containing 5
NOD	Nucleotide binding oligomerization domain
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
PKR	Prokinectin receptors
PRR	Pattern recognition receptors
PYD	Pyrin domain
RFX	Replication factor X
RLH	RIG-like helicazes
TLR	Toll-like receptors

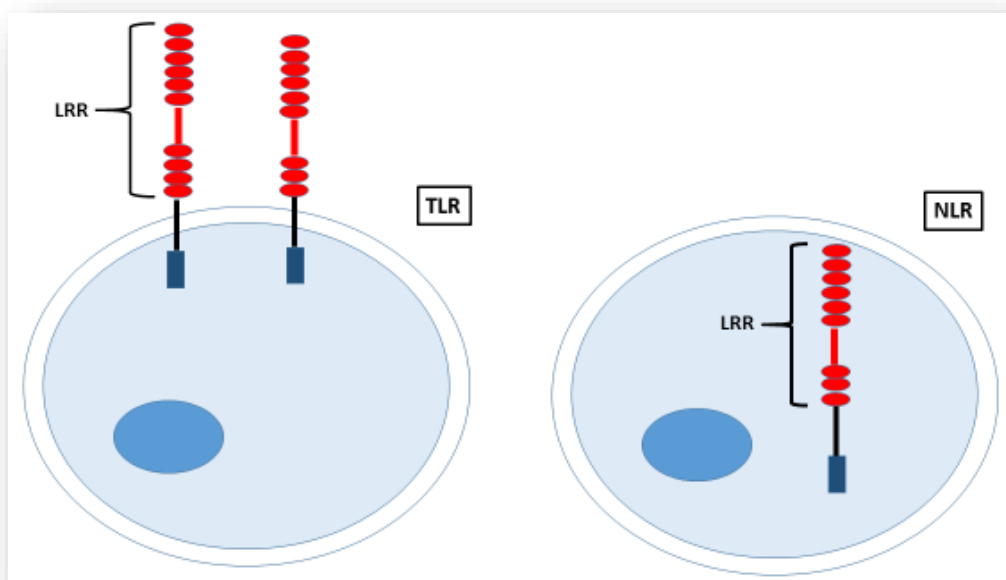
Bevezetés

Az intracelluláris NOD-like receptor (NLR) család

Az NLR receptor család tagjai fontos szerepet játszanak a veleszületett immunrendszer folyamataiban, mint mintázat felismerő receptorok (pattern recognition receptors, PRR's) fontos funkciójuk a patogén csoportokra jellemző közös molekuláris mintázatok felismerése [Neerincx és mtsai, 2012]. Így beszélhetünk mikrobiális molekuláris mintázatokról (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), valamint veszélyforrást jelző molekuláris mintázatokról (danger-associated molecular pattern, DAMP), melyeket a mintázatfelismerő receptor családok tagjai képesek felismerni és jelenlétükre reagálva a veleszületett immunitás egyik alappilléreként elindítani különböző szignáltranszdukciós útvonalakat. A baktériumokra jellemző lehet a peptidoglikán és a muramil dipeptid, a vírusokra az egyszálú vagy a duplaszálú RNS (ssRNS vagy dsRNS), továbbá a gombákra a β -glukán vagy a hifa mannóz, melyek jelenlétét a különböző PRR családba tartozó receptor fehérjék érzékelnek [Benkő, 2011].

A mintázatfelismerő receptorok három csoportba sorolhatók: vannak szekretált/szolubilis, membránkötött, valamint intracelluláris molekuláris mintázatot felismerő receptorok. A szekretált/szolubilis receptorok csoportjába tartozó receptorok például a mannóz-kötő lektin (mannose-binding lectin, MBL), a C-reaktív fehérje (C-reactive protein, CRP) és az ún. surfactant fehérjék (surfactant proteins). A membránkötött receptorok közül a legfontosabbak a CD14, a scavenger receptorok (scavenger receptors), a C-típusú lektin receptorok (C-type lectin receptors, CLR) és a Toll-szerű receptorok (Toll-like receptors, TLR1-TLR11). Az intracellulárisan elhelyezkedő mintázatfelismerő receptorok közé tartoznak többek között a prokinectin receptorok (prokinectin receptors, PKR), a Nod-szerű receptorok (Nod-like receptors, NLR) és a RIG-szerű helikáz receptor (RIG-like helicases, RLH) család tagjai [Benkő, 2011].

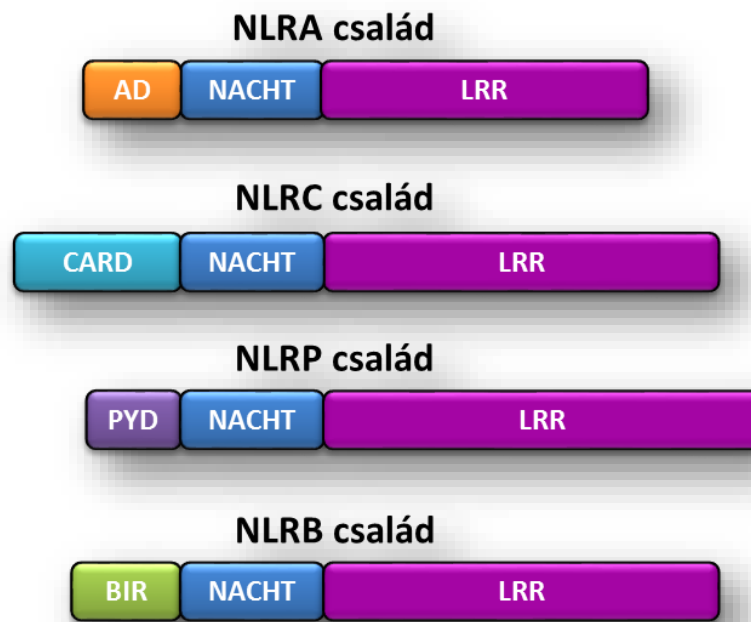
Ezek közül a TLR és az NLR család tagjaira jellemző, hogy leucin gazdag ismétlődéseket (leucine-rich repeats, LRR) tartalmazó doménnal rendelkeznek [1. ábra].



*1. ábra: **LRR** régiót tartalmazó receptor családok.*

A TLR típusú receptorok sejtfelszínen vagy sejtkompartmentek membránján kötve helyezkednek el, míg az NLR család tagjai intracellulárisan, a citoplazmában.

Az NLR család tagjainak felépítéséről általánosan elmondható, hogy három speciális domén mindig megtalálható a fehérjecsalád tagjaiban. Centrálisan található a NAIP, CIITA, HET-E, TP-1 fehérjékben jelenlévő (domain present in NAIP, CIITA, HET-E, TP-1, NACHT) domén, melyet szokás **nukleotidkötésért és oligomerizációért felelős doménnek** (nucleotide binding oligomerization domain, NOD) vagy nukleotidkötő doménnek (nucleotide binding domain, NBD) is nevezni. Jellemzően megtalálható bennük a C-terminálisan elhelyezkedő, leucin-gazdag ismétlődéseket tartalmazó LRR domén, valamint a fehérje N-terminális részén helyezkedik el az effektor domén [2. ábra].



2. ábra: Az NLR család tagjainak felosztása: NLRA, NLRC, NLRP és NLRB családok. A NACHT domén erősen konzervált, míg az LRR ismétlődések száma receptoronként változó lehet. A C-terminális LRR doméneket lila, míg a centrális NACHT domének kék színűek, míg a különböző típusú N-terminális effektor domének más-más színnel vannak jelölve.

A három általánosan jelenlévő domén mindegyike fontos szerepet tölt be a fehérje működése szempontjából. A NACHT doménnek a nukleotid kötésben, valamint az oligomerizációban van szerepe, az LRR domén az önszabályozásért és ligand kötésért felelős, míg az effektor domén az inflammaszóma aktivációban vagy szignáltranszdukciós folyamatokban játszhat szerepet.

Molekuláris vizsgálatok alapján négy különböző effektor domén típust különböztetünk meg, a különböző fehérjék NLR-alcsaládokhoz történő sorolása ezen effektor domén jellege alapján történik. Így megkülönböztethetünk acidic transactivation domain-t (AD) tartalmazó NLRA családot, kaspáz toborzó domént (caspase-recruitment domain, CARD) tartalmazó NLRC családot, pyrin domain-t (PYD) tartalmazó NLRP családot, valamint baculoviral inhibitory repeat-like domain-t (BIR) tartalmazó NLRB családot [2. ábra] [Kanneganti és mtsai, 2007].

Az effektor domén az NLR fehérjecsalád tagjaiban a legtöbb esetben vagy CARD vagy PYD domén [Neerincx és mtsai, 2013]. Az NLR fehérjék a CARD domén segítségével lehetnek képesek az inflammaszóma közvetlen aktivációjában részt venni, míg a PYD domén segítségével szignáltranszdukciós útvonalakban vállalnak szerepet. Előfordulhat az is, hogy egyetlen fehérjén belül több különböző effektor domén is megtalálható, ilyen például a MHC class II transactivator (CIITA) fehérje [3. ábra]. Egyes fehérjék esetében a CARD domén szekvenciája csak kismértékű hasonlóságot mutasson más CARD domének szekvenciájával. Ilyen fehérje például maga a NOD-like receptor family CARD domain containing 5 (NLRC5) fehérje is, melynek CARD doménjét szokás nem-típusos CARD doménként (untypical CARD, uCARD) is jelölni. A NACHT domén az oligomerizációban és nukleotid kötésben résztvevő, ATP-áz aktivitással rendelkező domén [Kufer és mtsai, 2011].

A humán NOD-like receptor family CARD domain containing 5 (NLRC5) fehérje:

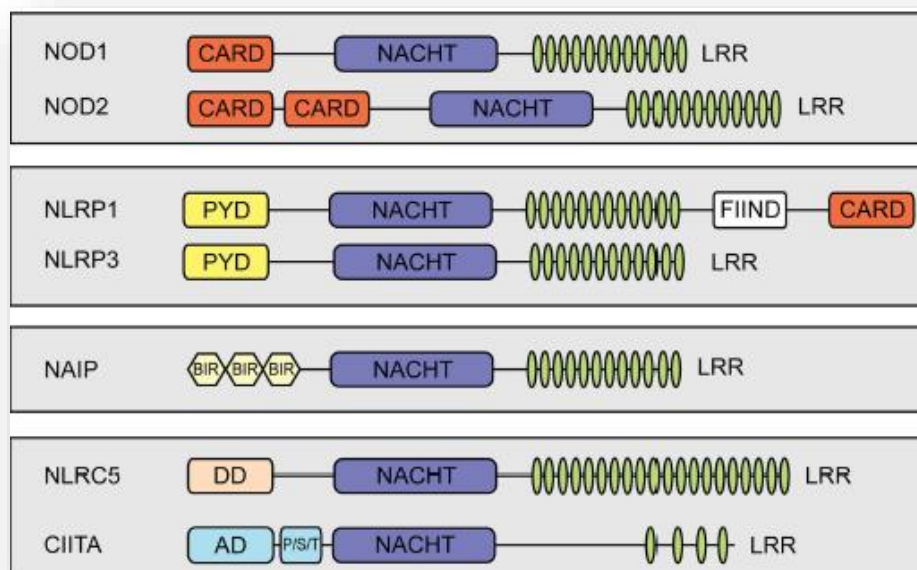
Az NLRC5 elnevezés arra utal, hogy az NLRC5 receptor a NOD-like receptor családba tartozó fehérje, mely CARD típusú effektor domént tartalmaz, az ötös szám pedig arra utal, hogy ötödikként írták le. A fehérje „nucleotide-binding oligomerization domain protein 27” (NOD27) és „nucleotide-binding oligomerization domain protein 4” (NOD4) néven is ismert, azonban a dolgozatban az NLRC5 elnevezést használok.

Habár intenzíven tanulmányozott molekuláról van, jelenleg még kevés irodalmi adat elérhető a fehérjére vonatkozóan. Mindössze 37 db közlemény található a Pubmed adatbázisban az NLRC5 kifejezésre keresve [Pubmed adatbázis]. Elsősorban funkcionális vizsgálatok eredményeit bemutató közleményeket publikáltak, kevés információ áll rendelkezésre a fehérje szerkezetére vonatkozóan.

Az NLR család különleges tagjaként tekinthetünk rá. A fehérjecsaládon belül a legnagyobb mérettel rendelkező fehérje: 1866 aminosav hosszúságú és molekulatömege 204 kDa, továbbá szokatlanul nagyszámú LRR ismétlődést tartalmaz [Mótyán és mtsai, 2013]. A kutatócsoportunk által elvégzett szekvencia-analízisek és az elkészített homológ modell alapján a C-terminálison lévő doménjében a leucin gazdag ismétlődések száma eléri a 43-at [Mótyán és mtsai, 2013], míg a UniProt adatbázisban szereplő adatok szerint mindösszesen

26 db-ot tartalmaz [UniProt adatbázis], más irodalmi adatok szerint pedig csak 27 LRR van jelen a fehérjében [Benkő és mtsai, 2010]. Fontos megemlíteni, hogy az N-terminálisán lévő CARD doménje egy olyan speciális CARD domén, amely csak kismértékű hasonlóságot mutat más CARD domén szekvenciákkal. Ezen különbség okán death domain (DD) névvel is szokták illetni az NLRC5 fehérje nem-tipikus CARD doménjét [3. ábra] [Neerincx és mtsai, 2013]. 2014. május 1-én publikálták az NLRC5 fehérje CARD doménjének NMR módszerrel történő szerkezetvizsgálatát [Gutte és mtsai, 2014]. Sem a frissen publikált közlemény, sem az NMR szerkezet nem elérhető jelenleg, azonban a szerzők eredményei várhatóan segíthetnek a nem-tipikus CARD domén jobb megismerésében és az effektor domén funkciójának azonosításában. Továbbá, fontos adatokkal szolgálhat a kutatócsoportunk által elkészített homológ modell helyességének ellenőrzésében is.

A más kutatócsoportok által végzett Western-blot analízisek során tapasztalt kettős sávok megjelenése a fehérje poszttranszlációs módosulására utal, azonban ezen módosítások természete jelenleg nem ismert [Neerincx és mtsai, 2010].

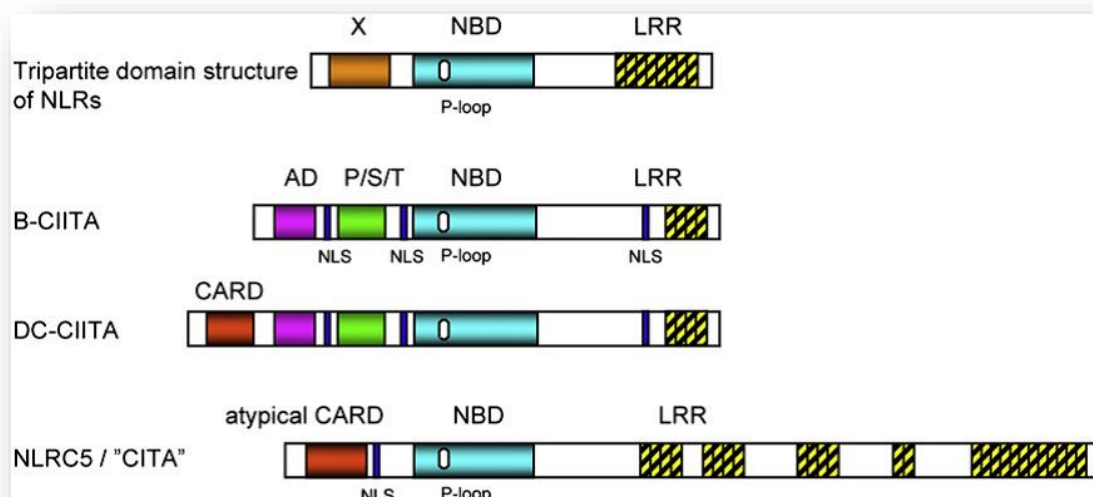


3. ábra: Az emlős NLR család sematikus ábrázolása

A CARD domént tartalmazó NLRC családot szokás NOD-ként is nevezni, például a NOD1 fehérje másik neve NLRC1, míg az NLRC5 NOD4-ként is ismert.

Ábra forrása: [Neerincx és mtsai, 2013].

Az NLR receptor fehérje család tagjai túlnyomó részt klasszikus mintázatfelismerő receptorként működnek, főként a veleszületett immunitás reakcióinak kialakításában. Nagy részük valamilyen módon érintett az NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) szignalizációban, az IL-1 β és az IL18 termelésben [Neerincx és mtsai, 2013]. Azonban a család egyes különleges tagjai, mint a CIITA az MHC II transzaktiváció kulcsfontosságú reguláló fehérjéjeként tölt be fontos szerepet. Szekvenca analízis alapján az NLRC5 fehérje az NLR családon belül leginkább ezen CIITA fehérjével mutat hasonlóságot [Zhao és Shao, 2012] [4. ábra], valamint a CIITA fehérjéhez hasonlóan [Tosi és mtsai, 2002] foszforiláció/defoszforiláció által módosul poszttranszlációsán.



4. ábra: NLRC5/CITA és CIITA

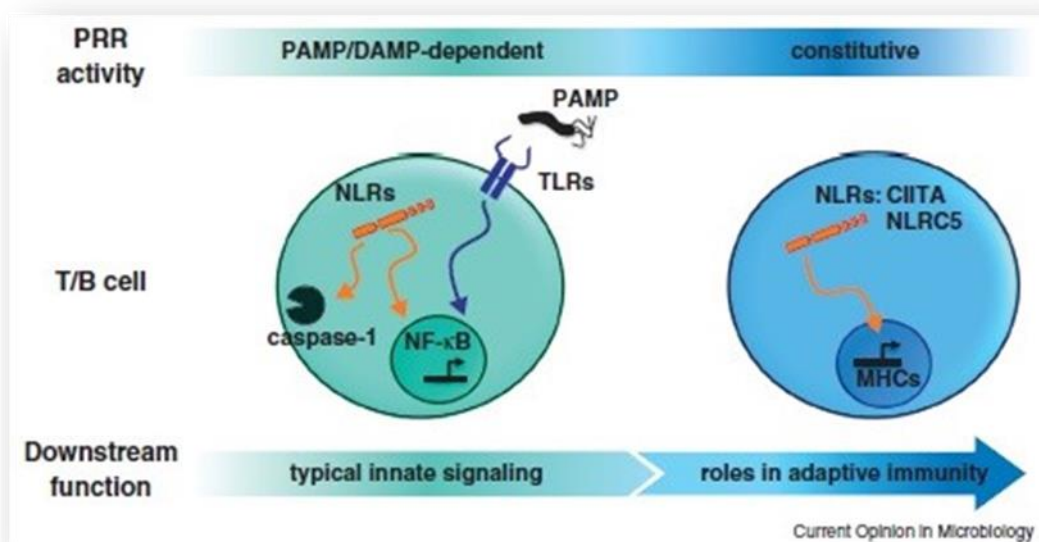
Az NLRC5-öt, újonnan felfedezett funkciójából adódóan, szokás CITA-nak is nevezni (MHC class I transactivator), hasonlóan a CIITA-hoz (MHC class II transactivator).

A B-CIITA a B sejtekben, míg a DC-CIITA a dendritikus sejtekben megtalálható izoformát jelöli.

Ábra forrása: [Meissner és mtsai, 2012]

Kézenfekvő volt tehát a feltevés, hogy funkcióját illetően is hasonlóság lehet a két fehérje között. Így kezdték el vizsgálni [Zhao és Shao, 2012] [Yao és mtsai, 2012], hogy az NLRC5 fehérjének vajon hatása van-e az MHC II vagy MHC I kifejeződésében. NLRC5^{-/-} knockout egereken végzett vizsgálatok alapján igazolták, hogy az MHC class I és a hozzá kapcsolódó gének mRNS szintje jelentősen alacsonyabb CD4⁺ T-sejtekben, CD8⁺ T-sejtekben

és B sejtekben, mint nem knockout sejtekben [Yao és mtsai, 2012]. Ezen tanulmány rámutatott, hogy az NLRC5-nek kritikus szerep jut az MHC class I által mediált immunológiai folyamatokban, valamint arra is fény derült, hogy az MHC class II transzaktivációban az NLRC5-nek nincs meghatározó szerepe [Zhao és Shao, 2012]. Meissner és munkatársai kimutatták, hogy az NLRC5 a Replication factor X (RFX) transzkripciós komplexszel interakcióban végzi az MHC I promóter transzaktiválását [Meissner és mtsai, 2012]. Az irodalmi adatok arra utalnak, hogy a feltételezés igaz volt, miszerint a CIITA-hoz hasonlóan az NLRC5 fehérje sem egy „átlagos” mintázatfelismerő receptor. Újabban szokás CIITA-nak is nevezni, utalva ezzel frissen felfedezett funkciójára, azaz az MHC class I transzaktivációjában betöltött kritikus szerepére.



5. ábra: Az NLR család fehérje funkciói.

Balra a tipikus veleszületett immunitási folyamatokban az NLR család tagjai - mint mintázatfelismerő receptorok - részt vállalnak az NF-κB szignalizációban valamint a kaspáz-1 aktivációban. Jobbra az adaptív immunválaszban, mint az MHC fehérjék transzaktivátorai vállalnak reguláló szerepet.

Ábra forrása: [Michallet és mtsai, 2013]

Az inflammaszómáról és szerepéről:

Az tehát bizonyítást nyert, hogy az NLRC5-nek szerepe van az MHC-I kifejeződésében [5. ábra]. Mindemellett más funkcióját is feltételezték és vizsgálták az NLRC5 receptor fehérjének, nevezetesen inflammaszóma aktivációban betöltött szerepére voltak kíváncsiak.

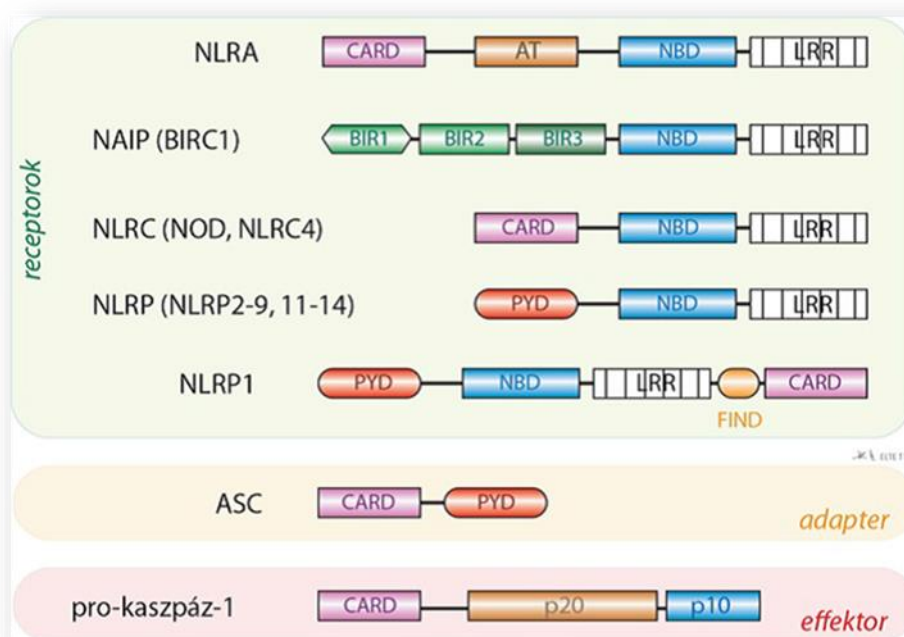
Ahhoz, hogy ezt a fogalmat megértsük, először beszélnünk kell a piroptózis fogalmáról. A piroptózist eredetileg a makrofág sejtek bakteriális fertőzést követő sejthalálának leírására használták. Az elnevezés arra utal, hogy egy olyan programozott sejthalálról van szó, melyben pro-kaspáz aktivációra (kaspáz-1) van szükség, emellett gyulladást serkentő interleukineket is kibocsájtanak a sejtek. A piroptózissal kapcsolatban fontos megjegyeznünk [1. táblázat], hogy aktiválódását elsősorban mikrobiális kórokozók váltják ki. Ugyanakkor ma már azt is tudjuk, hogy akár infarktus is előidézhetheti, de vannak adatok arról is, hogy kemoterápiás szerek alkalmazására is bekövetkezhethet. Daganat terápiás kezelések új formája lehet talán a kemoterápiás szerek és a kaspáz-1 kontrollált aktiválásának együttes alkalmazása, melyekkel serkenteni lehet a szelektív antitumor immunválaszt, azaz a transzformálódott sejtek célzott pusztulását. A kaspáz-1 eredeti neve ICE (interleukin converting enzyme) és a piroptózis során az inflammaszóma komplexben történő aktiválódása a gyulladást előidéző citokinek kibocsájtásához vezet (IL-1 β és IL-18) [Juhász és mtsai, 2013].

1. táblázat: Programozott sejthalál típusok összehasonlítása.

Táblázat forrása: [Juhász és mtsai, 2013].

Típus	Stimulus	Fenotípus	Következmény
Apoptózis	halál receptor aktiváció, DNS károsodás, reaktív oxigén gyökök	piknózis, DNS fragmentáció, „blebbing”	Apoptotikus testek keletkezése, fagocitózis
Necroptózis	TNFR1 receptor aktiváció és XIAP gátlás (Smac), TNFR1 receptor aktiváció és kaspáz gátlás, TRAILR1 + kaspáz gátlás	Citoplazmatikus duzzadás, sejtorganelumok duzzadása, sejtmembrán dezintegráció	A sejt beltartalmának kiáramlása, gyulladás
Piroptózis	Bakteriális fertőzés, Virális fertőzés, Infarktus	Citoplazma duzzadás, DNS fragmentáció, Pórusképződés	Citokin szekréció, duzzadás

A citokinek kibocsátása megtörténik még mielőtt a sejten a piroptózis bármilyen morfológiai bélyege megjelenne. A piroptózisról elmondható tehát, hogy sejtmorfológiát tekintve mutat hasonlóságot az apoptózissal és a necroptózissal is. Molekuláris sejtbiológiai szinten azonban megjelennek az NLR receptorok a rendszerben. Ugyanis a már többször említett mintázat felismerő receptor funkciójuk itt jut érvényre, mégpedig úgynevezett piroptózist kiváltó jelek (pyroptotic trigger) érzékelése révén (például: bakteriális peptidoglikánt vagy flaggelint) [Juhász és mtsai, 2013]. Funkciójuk a PAMP felismerését követően a pro-kaspáz1 aktivációban teljesedik ki. A pro-kaspáz1 aktiválására képes komplexek az inflammaszóma és a piroptoszóma. Fontos megemlíteni, hogy az NLR fehérjék közvetett vagy közvetlen kaspáz toborzó képességük alapján funkcionális hasonlóságot mutatnak az apoptotic peptidase activating factor 1 (Apaf1) fehérjével, amely oligomerizációjával a prokaspáz-9 iniciátor kaspázt aktiváló apoptoszómát állítja össze [Juhász és mtsai, 2013]. Feltételezések szerint az inflammaszóma szerkezete kétféle elrendezést mutathat az alapján, hogy a résztvevő NLR fehérje rendelkezik-e közvetlen kaspáz toborzó képességgel, tehát tartalmaz-e CARD-domént vagy sem [6. és 7. ábra].

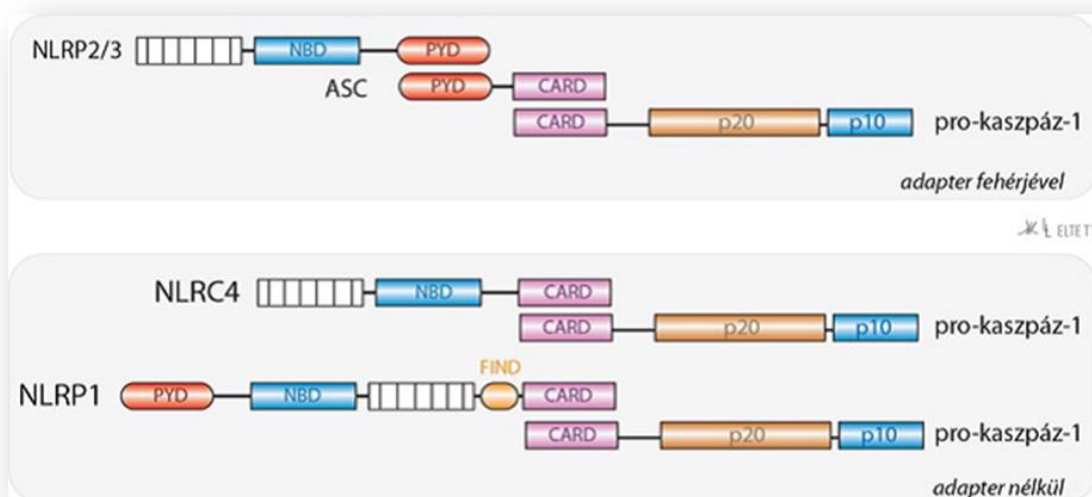


6. ábra: Az NLR receptorok, az ASC adapter fehérje és a pro-kaspáz-1 szerkezete.

Az ASC adaptor fehérje CARD doménje segítségével végzi el a kaspáz toborzó funkciót és PYD doménje révén képes kapcsolódni a CARD domént nélkülöző NLR fehérjékhez.

Ábra forrása: [Juhász és mtsai, 2013].

Amennyiben a fehérje nem rendelkezik CARD doménnel, szükség van a kaspáz aktivációhoz egy adaptor fehérjére, ami rendelkezik CARD doménnel [6. ábra]. Ezt a fehérjét szokás ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD) fehérjének nevezni [7. ábra]. A komplexbe a CARD régiója révén beépült pro-kaspáz1 parciális proteolitikus hasítási folyamatok révén válik „érett”, aktív enzimmé [Juhász és mtsai, 2013].

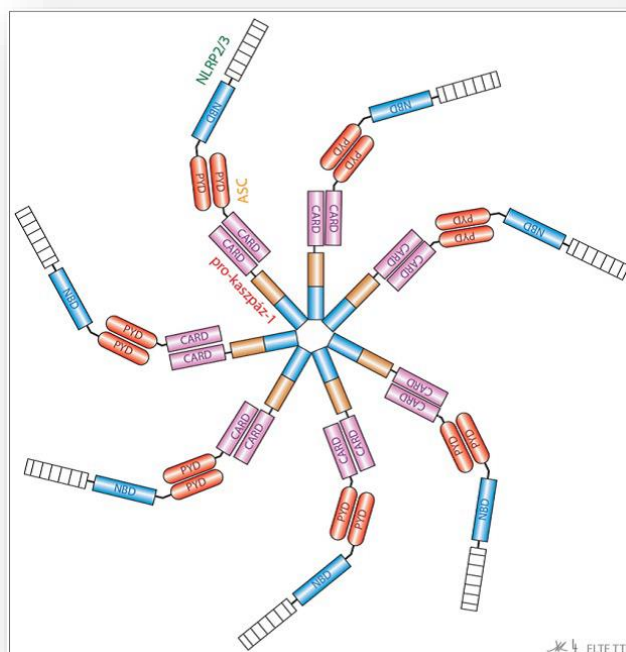


7. ábra: Az inflammaszóma alkotóelemeinek kapcsolódási lehetőségei.

Az NLRP1 fehérjének nincs szüksége az adaptor ASC fehérjére, közvetlen kaspáz aktivációra képes CARD doménje segítségével. Míg a NLRP3 fehérjének az ASC adaptor fehérjével közvetetten sikerül létrehozni a kaspáz aktivációt.

Ábra forrása: [Juhász és mtsai, 2013].

Az inflammaszómaiban az NLR molekulák úgy állnak össze, hogy NACHT doménjük segítségével összekapcsolódva képezik a komplex alapját, melyben központilag helyezkednek el a pro-kaspáz1 molekulák [8. ábra]. Az említett pro-kaspáz1 aktivációra képes másik komplex a piroptoszóma, melyben NLR molekulák nélkül több ASC molekula összekapcsolódásával valósul meg a pro-kaspáz1 aktiváció.



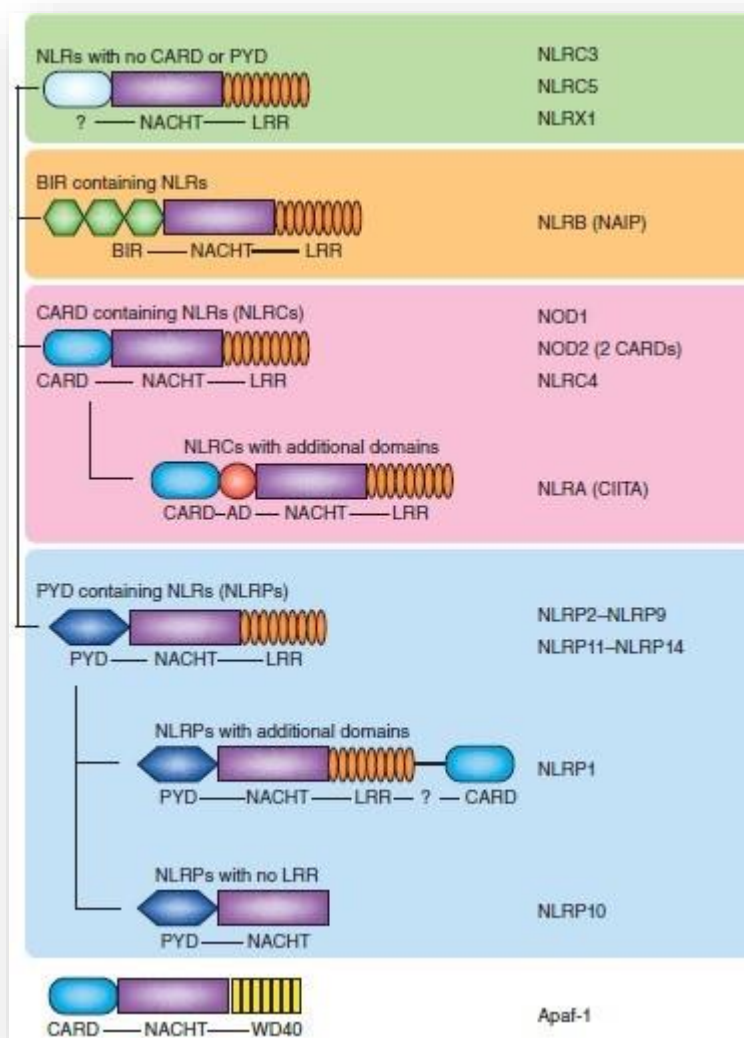
8. ábra: **Inflammaszóma felépítése ASC molekulák segítségével, az NLRP3 oligomerizációja révén.**

Ábra forrása: [Juhász és mtsai, 2013].

Jelen ismereteink alapján az NLRC5 inflammaszóma aktivációban betöltött szerepe még nem tisztázott. A megjelent publikációk sok esetben ellentmondásosak. Egyes tanulmányok szerint az NLRC5 az inflammatórikus szignálutvonalaknak negatív modulátora [Benkő és mtsai, 2010], míg más tanulmányok szerint az NLRC5 az NLRP3-al kooperációban végzi az inflammaszóma aktivációt [Davis és mtsai, 2011].

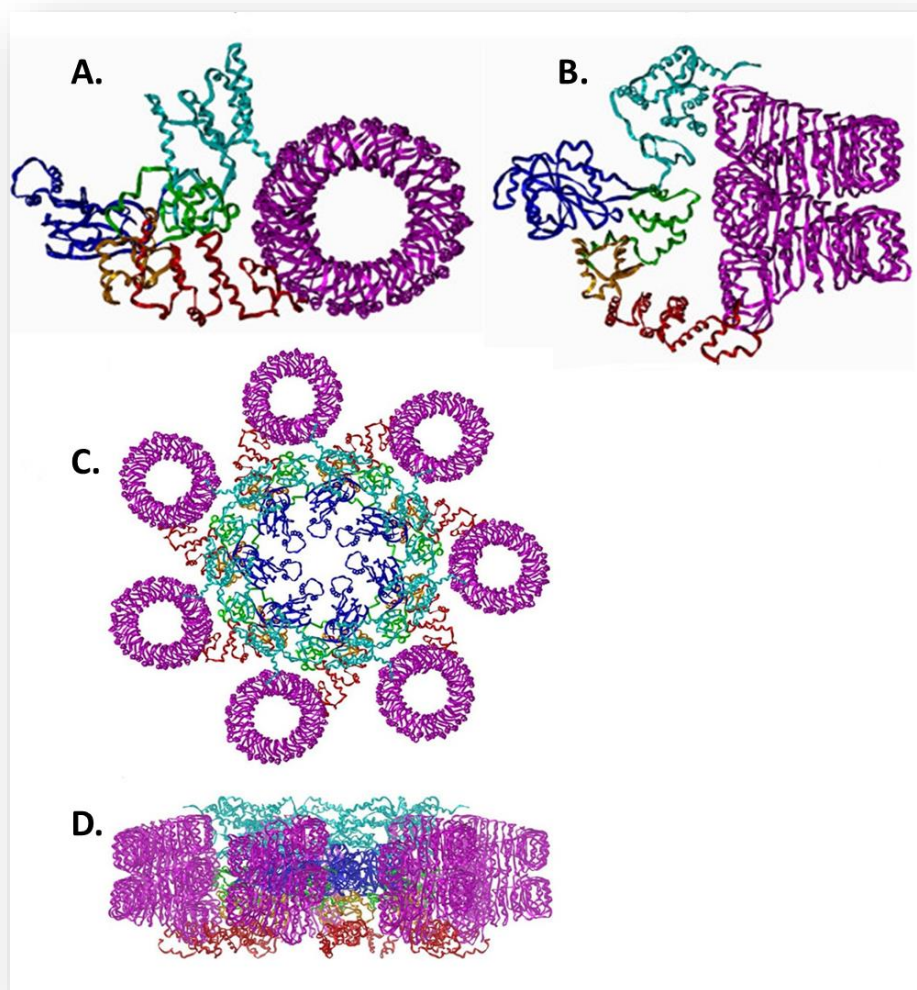
Kutatócsoportunk a közelmúltban publikálta a teljes hosszúságú humán NLRC5 monomer és homo-heptamer fehérje feltételezett háromdimenziós szerkezetének modelljét [Mótyán és mtsai, 2013] [10. ábra]. A számítógépes modellezés elméleti alapját az előzőekben már leírt hasonlóság képezi miszerint, kaszpáz toborzó képességük alapján funkcionális hasonlóságot mutat az Apaf1 fehérjével [9. ábra], amely oligomerizációjával a prokaspáz-9 iniciátor kaszpázt aktiváló apoptoszómát állítja össze [Yuan és mtsai, 2010] [Juhász és mtsai, 2013].

Az NLRC5 fehérje feltételezhetően aktivációt követően oligomerizálódik, az Apaf1 fehérjéhez hasonlóan [Mótyán és mtsai, 2013].



9. ábra: **Humán NLR fehérjék és az Apaf1 fehérje strukturális felépítésének összehasonlítása.** Az NLRC5 nem karakterizált effektor doménnel van jelölve. Később kiderült, hogy effektor doménje CARD domén ugyan, de nem mutat teljes hasonlóságot más receptorok tipikusnak nevezhető CARD doménjével.

Ábra forrása: [Kufér és mtsai, 2011].



10. ábra: **A teljes hosszúságú humán NLRC5 fehérje homológ modelljéről készült szalagmodell.** Az ábrán a monomer fehérje jószolt háromdimenziós szerkezete látható felül- (A) és oldalnézetben (B) és a homo-heptamer szerkezete felül- (C) és oldalnézetben (D).

Színkódok: ciánkék-uCARD; kék-NACHT; zöld-AxP;

narancssárga-WH; piros-SH; magenta-LRR.

Ábra: Mótyán és mtsai, 2013 alapján.

Így az Apaf1 molekulát alapul véve készült el a 10. ábrán látható monomer és a homo-heptamer humán NLRC5 fehérje feltételezett fehérjeszerkezetének szalagmodellje [10.ábra]. Homológia lapján lettek azonosítva a következő domének melyek a modellen láthatók: a small helical domain (AxP), a winged helix (WH) és a superhelical (SH) domén. Az AxP domén az Apaf-1 molekula small helical doménjével mutat hasonlóságot. A WH domén a

legtöbb NLR-ben megtalálható erősen konzervált régió, melynek az ATPáz funkció ellátásában van szerepe, az SH domén funkciója a mai napig ismeretlen [Mótyán és mtsai, 2013].

A homo-heptamer fehérje háromdimenziós szerkezetében látható, hogy a kézzel jelölt NACHT domének elsősorban a negyedleges szerkezet (az oligomer forma) kialakításában vesznek részt [10.ábra]. A ciánkékkel jelölt CARD domének a komplexben centrálisan, a felületen elhelyezkedve, kölcsönható partnerek számára hozzáférhetően találhatók [10.ábra] és feltételezhetően a pro-kaspáz1 kötésében játszanak szerepet.

Célkitűzések

Munkám során azokhoz a vizsgálatokhoz csatlakoztam, melynek célja a kutatócsoportunk által publikált teljes hosszúságú humán NLRC5 fehérje homológ modell helyességének molekuláris biológiai vizsgálatokkal történő igazolása.

Munkánk során célul tűztük ki az NLRC5-Flag fúziós fehérje overexpresszálását 293T sejtekben és immunológiai módszerrel történő kimutatását.

Célunk volt az overexpresszált humán NLRC5-Flag fúziós fehérje kimutatására használható Western-blot módszer alkalmazása, melyhez anti-Flag antitesteket kívántunk tesztelni.

Annak érdekében, hogy jövőbeli kísérleteink során a humán NLRC5-öt expresszáló sejtvonalakban is igazolni tudjuk az endogén fehérje jelenlétét, terveztük a fúziós fehérje azonosítását anti-NLRC5 antitestekkel is.

További célunk volt az NLRC5 fehérje feltételezett oligomerizációjának vizsgálata is: a monomer valamint az oligomer forma molekulatömegének meghatározása gélszűrés alkalmazásával.

Anyagok és módszerek

Anyagok:

Expressziós plazmid:

A kísérletünkhöz használt pcDNA3.1-NLRC5-Flag plazmid-ot (koncentráció: 5092ng/μl) Dr. Benkő Szilviától kaptuk (Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Élettani Intézet) [Benkő és mtsai, 2010].

Plazmid tisztítás:

A plazmid tisztításához Nucleobond Extra Midi Plus Kit-et használtunk (Macherey Nagel; 740410.10).

Plazmid restrikciós ellenőrzése:

A restrikciós hasításhoz Kpn1 (New England Biolabs, R0142S) és Xho1 (New England Biolabs, R0146S) restrikciós enzimeket használtuk fel.

293T sejtek tenyésztése:

A 293T sejtek tenyésztéséhez szérummal és antibiotikummal kiegészített Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) tápfolyadékot használtunk [500ml DMEM, 50ml FBS, 5ml streptomycin]. Inkubátorban 37°C-on 5% CO₂ koncentráció mellett tenyésztettük a sejteket.

293Tejtek transzfektálása:

A transzfektáláshoz kalcium foszfát pufferes módszert alkalmaztunk. A transzfekcióhoz az alábbi puffert készítettük el:

„A” puffer: 0,25M CaCl₂;

„B” puffer (2X HBS): 50mM HEPES puffer [1,5mM Na₂HPO₄, 280mM NaCl, pH 7,05-7,12]

Western-blot analízishez használt antitestek:

A Western-blot analízishez használt antitesteket a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: Felhasznált antitestek

Antitest típusa	Antitest gyártója	Antitest termékkódja	Klonalitás
anti-NLRC5	ABCAM	AB105411	poliklonális
anti-NLRC5	Antibody Verify	AAS80604C	poliklonális
anti-NLRC5	Antibody Verify	AAS81604C	poliklonális
anti-NLRC5	Avia Systems Biology	ARP60481_P050	poliklonális
anti-Flag	Sigma	F7425	poliklonális
anti-Flag	Sigma	F1804	monoklonális

Módszerek:

DH5α sejtek transzformálása:

A plazmid transzformálását DH5α sejtekbe hősokk-módszer alkalmazásával végeztük a következő protokoll alapján:

- 70μl sejtsuszpenziót falkoncsőbe mértünk majd 10ng pcDNA3.1-NLRC5-Flag plazmidot adtunk hozzá
- inkubáltuk jégen 30 percig
- hősokkot alkalmaztunk 42 °C-on 2 percig
- inkubáltuk jégen 2 percig

- 1 ml-re kiegészítettük SOC oldattal
- rázattuk 37 °C-on 60 percig
- 150µl-nyi szuszpenziót szélesztettünk ampicilin tartalmú agar lemezre
- inkubáltuk 37 °C-on egy éjszakán át

Transzformálás után az egyedül álló telepek felvétele következett.

Folyékony kultúrát indítottunk: 5ml LB és 5µl ampicilin keverékébe raktunk a fokpiszkálóval felvett telepeket. A folyékony kultúrákat 6 órán át 37 °C-on rázattuk. Az idő lejártá után 100ml LB és 100 µl ampicilin keverékét tartalmazó lombikba raktunk 5 ml-t a kultúrákból. Majd ezt követően egy éjszakán át rázattuk 37 °C-on.

Plazmid preparálás:

A pcDNA3.1-NLRC5-Flag plazmid preparálását Nucleobond Extra Midi Plus Kit segítségével végeztem, a gyártó által ajánlott protokoll alapján:

- a DH5α sejtekből indított éjszakai tenyészetet lecentrifugáltuk 6000 rpm; 4°C; 15 perc
- a pelletet szuszpendáltuk RNaseA-val (8ml-re kiegészített resuspension pufferben)
- 8ml lízispuffer adtunk hozzá
- 5X megforgattuk a csövet
- inkubáltuk 5 percig szobahőmérsékleten
- ekvilibráltuk az oszlopot 12ml ekvilibráló puffer alkalmazásával (oszlop karimára mérve)
- 8ml neutralizáló puffert adtunk hozzá
- összekevertük majd a csövet 10-15X megforgattuk
- centrifugáltuk 12000 rpm-en; 4°C-on; 10 percig
- felülúszót rámértük az oszlop szűrőjére
- mostuk 5ml equilibration puffer-el
- mosás után a szűrőt eltávolítottuk
- 8ml wash pufferrel mostuk

- plazmidot elválasztottuk 5ml elution pufferrel új centrifugacsőbe
- 3.5ml izopropanolt hozzáadtunk a csőben lévő elegyhez, majd vortexeltük
- 2 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten
- az elegyet felszívtuk egy 30 ml-es fecskendőbe
- a fecskendőre ráraktuk a Nucleobond Finalizer szűrőt, amin a felszívott folyadékot lassan és egyenletesen átnyomtuk, majd az átfolyt folyadékot eldobtuk
- ezt követően a 2ml steril 70% os etanolt szívtunk fel a fecskendőbe, amit majd lassan átnyomtuk a Finalizer szűrőn
- a Finalizer membrán szárítottuk (levegő átfúvatással, többszöri alkalommal)
- 1 ml es fecskendőbe 200µl Redisolving Trish puffert szívtunk fel majd ezt is átnyomttuk a Finalizer-en, DE az átfolyó anyagot steril Eppendorf-ba gyűjtöttük, az átfolyóval többször is mostuk a membránt, majd levegővel is átfúvattuk, hogy a lehető legtöbb átfolyót össze tudjuk gyűjteni.

pcDNA3.1 NLRC5-Flag plazmid restrikciós ellenőrzése:

A restrikciós ellenőrzést Kpn-I és Xho-I enzimek felhasználásával végeztük el. Az alábbi reakcióelegyeket állítottuk össze (2. táblázat).

2. táblázat: **A pcDNA3.1 NLRC5-Flag plazmid restrikciós ellenőrzése során összeállított reakcióelegyek**

Minta száma	DNS Ladder, Standard (µl)	pcDNA3.1-NLRC5-Flag plazmid (µl)	NEB4 puffer (µl)	Restrikciós enzim (µl)	NFW-nuclease free water (µl)	6X loading (µl)	Össz. térfogat (µl)
1.	1	0	0	0	4	1	5
2.	0	0,5	0	0	9,5	2	11
3.	0	0,5	1	0,5 Kpn-I	8	2	11
4.	0	0,5	1	0,5 Xho-I	8	2	11
5.	0	0,5	1	0,5 Kpn-I és 0,5 Xho-I	7,5	2	11

A mintákat 60 percig inkubáltuk 37°C-on, eközben megtörtént a plazmid enzimek általi hasítása. Ezt követően mindegyikhez hozzáértünk még 2 µl 6X loading puffert, majd szuszpendálást követően 1%-os agaróz gélen 100V-on megfuttattuk a mintákat. A gél festését etidium-bromiddal végeztük.

293T sejtek tenyésztése:

A 293T sejteket DMEM médiumot használva tenyésztettük. A sejteket tartalmazó T75-ös flaskákat inkubátorban tároltuk 37°C-on 5% CO₂ koncentráció mellett. A sejtek passzálását ~70%-os konfluencia értéknél a következő protokoll alapján végeztük:

- Tápfolyadékot leszívtuk a sejtekről
- Sejteket óvatosan mostuk 10ml PBS-el
- 3ml tripszin-t mértünk a sejtekre, mellyel 5-10 percet inkubáltuk (inkubátorban)
- 15ml tápfolyadékot hozzáadtunk és szuszpendáltuk a sejteket
- 15ml szuszpenziót leszívtunk
- A maradék 3ml szuszpenziót kiegészítettük 12ml tápfolyadékkal
- A flaskát visszahelyeztük az inkubátorba

293T sejtek transzfektálása:

A 293T sejtek transzfektálását Ca²⁺-foszfát pufferes módszer alkalmazásával végeztük el, a következő protokoll alapján:

- 6 lyukú plate-en wellen-ként 4X10⁵ sejtet raktunk ki, majd a sejteket ~50-60%-os konfluencia eléréséig növesztettük
- „A” és „B” puffert készítünk
- az „A” pufferhez 0,55 µg pcDNA3.1-NLRC5-Flag plazmidot adtunk hozzá, mialatt apró buborékokat képeztünk pipettával a „B” pufferben, cseppenként az „A” puffer tartalmát hozzáadtuk a „B”-hez
- 5 másodpercig vortexeltük az elegyet
- szobahőmérsékleten 20 percig inkubáltuk az elegyet

- ezt követően a 6 lyukú plate-n lévő wellék-be óvatosan cseppenként hozzáadtuk a sejtekhez a transzfekciós elegyet, majd óvatosan vertikálisan és horizontálisan is mozgattuk a plate-et
- majd a plate-t az inkubátorba helyeztük egy éjszakára
- másnap a sejteket felkapartuk és 2ml proteáz inhibitor koktéllal kiegészített PBS-ben vettük fel, wellenként 300µl prot. inhib. PBS-be kapartuk fel a sejteket

A sejtek feltárása fagyasztás-olvasztás módszerrel:

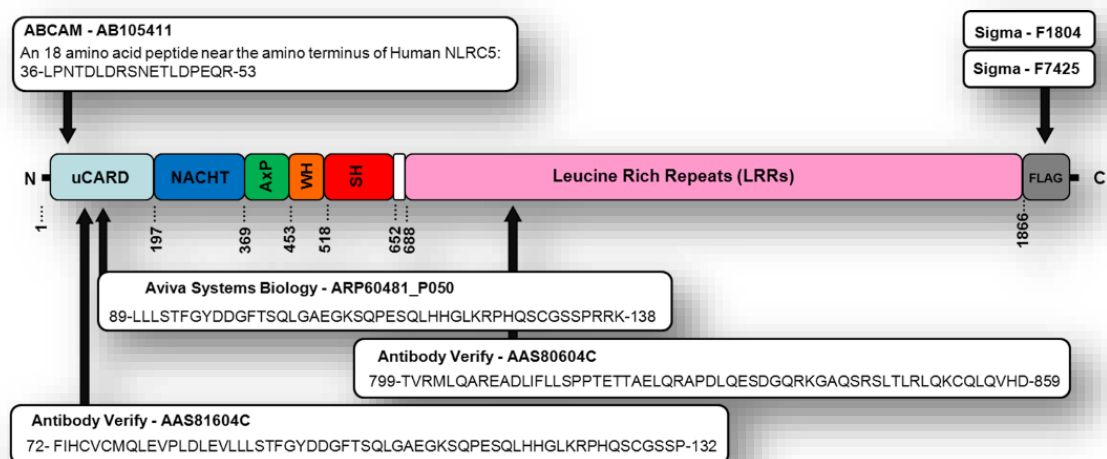
- a teljes sejtlizátumot fagyasztottuk és felolvasztottuk egymást követő öt alkalommal
- majd lecentrifugáltuk a sejtlizátumot 13200 rpm-en 15 percen át
- a felülúszót tiszta Eppendorf csőbe mértük át

Nano-drop készülékkel megmértük a minta fehérjekoncentrációját.

A sejtlizátumokat a sejtek feltárása után -20°C-on tároltuk felhasználásig.

Western-blot analízis:

A overexpresszált NLRC5-Flag fúziós fehérje kimutatását Western-blot analízissel végeztük el, anti-Flag és anti-NLRC5 antitesteket alkalmazva [11. ábra].



11. ábra: Az NLRC5 fehérje doménszerkezetének sematikus ábrázolása, valamint a használt antitestek és azok immungén szekvenciáinak bemutatása.

A Western-blot analízis első lépéseként a mintákat 8%-os poliakrilamid gélen, 130V-os feszültség alkalmazásával futtattuk meg (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), melyet a nitrocellulóz membránra történő blottolás követett.

Blottolás nitrocellulóz membránra:

- blottoló szendvicset összeállítottuk (a szendvics összeállítása alatt és előtt a szivacsokat buborék mentesíteni kell)
- blottoltuk 100V-on egy órán át
- blokkolás: blottolás után a szendvicset szétszedtük, a membránt billegtettük 1%-os tejporos TBS oldatban 1 órán át szobahőmérsékleten
- ezt követően a membránt az első antitest 0,1%-s tejporos TTBS oldatában 1 éjszakán át 4°C-on billegtettük, (anti-Falg F7425 antitest estében 5000X hígítást alkalmazva)
- mostuk a membránt 3X15 percen át TTBS oldatban, szobahőmérsékleten billegtetve
- a membránt a második antitest (Goat-Antirabbit, Bio-Rad 170-6515) 0,1%-os tejporos TTBS oldatában 1 órán át szobahőmérsékleten billegtettük, (10.000X hígítást alkalmaztunk)
- mostuk a membránt 3X10 percen át TTBS oldatban szobahőmérsékleten billegtetve
- előhívás: ECL reagenssel sötétszobában (Thermo Scientific-34095)

Gélszűrés

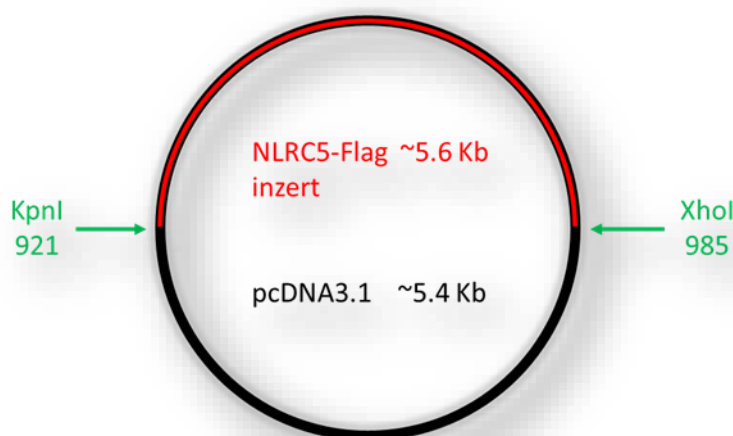
A gélszűrést AKTA purifier folyadékkromatográfiás készüléken végeztük (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Svédország), Superose TM⁶ oszlop (GE Healthcare Life Sciences) használatával. Ekvilibráló pufferként PBS-t használtunk. 400µl teljes sejtlizátumot (6.2mg/ml) injektáltunk, 0,4µl áramlási sebesség mellett végeztük az elválasztást, 1ml-es frakciókat szedtünk. Az oszlop kalibrálását Tóth Ferenc végezte ismert molekulatömegű standardsor felhasználásával.

Eredmények

pcDNA3.1-NLRC5-Flag plazmid restrikciós ellenőrzése:

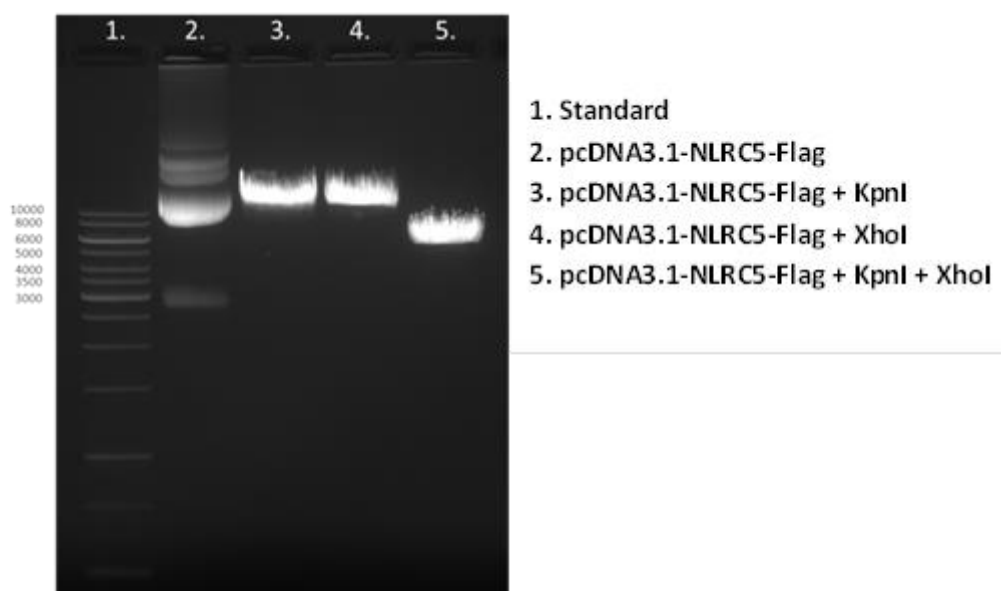
Az NLRC5-flag fúziós fehérjét kódoló gént tartalmazó pcDNA3.1-NLRC5-Flag plazmid-konstruktot Dr. Benkő Szilvia bocsájtotta rendelkezésünkre. Dr. Benkő Szilvia és kutatócsoportja előzőleg már alkalmazta ezt a plazmidot transzfekciós kísérletekben [Benkő és mtsai, 2010], melynek során az inzert szekvenciáját szekvenálással ellenőrizték. Annak érdekében azonban, hogy a transzfekciós kísérletek sikerességét biztosítsuk, a tisztított plazmid restrikciós ellenőrzést is elvégeztünk.

A restrikciós ellenőrzés során azokat az enzimeket használtuk, amelyeket a vektorkonstrukció elkészítéséhez használtak. Így KpnI és/vagy XhoI enzimekkel hasítottuk a plazmidot [2. táblázat], a keletkező fragmentek várható méretét a plazmid és az inzert szekvenciájának ismeretében meg tudtuk jósolni [12. ábra].



12. ábra: A pcDNA3.1-NLRC5-Flag plazmid sematikus ábrázolása és a KpnI és XhoI restrikciós endonukleázok hasítási helyei a pcDNA3.1 plazmidban.

Azokban a mintákban, ahol csak egy enzimmel hasítottuk a plazmidot [13. ábra, 3. és 4. minta], egy db linearizált DNS fragmentet kaptunk, enzimatis hasítás nélkül [13. ábra, 1. minta] az intakt cirkuláris DNS futott a gélben, abban az esetben pedig ahol mindkét enzimmel hasítottunk [13. ábra, 5. minta], ott a hasítás 2 db DNS fragmentet eredményezett. Az inzert és a plazmid méretének ismeretében ki tudtuk számolni, hogy a duplán hasított plazmid két linealizált fragmentje milyen mérettartományba esik. A linearizált formánál ~11 kb méretű sávot kapunk, míg a két enzimmel való hasításnál egy ~5,4 (plazmid) és egy ~5,6 kb (inzert) méretű fragmentet.



13. ábra: **Agaróz gélelektroforézis képe.**

Azért láthatunk egyetlen egy sávot az 5. mintában ~5,5 kb méretnél, mert az inzert és a plazmid mérete közel azonos a két enzim hasítása után.

Az 13. ábra alapján megállapítottuk, hogy a hasítások sikeresek voltak és mind a Kpn-I, mind a Xho-I enzimmel végzett hasítás eredményeként a vártnak megfelelő méretű fragmentek jelentek meg. Az emésztetlen plazmid esetében a cirkuláris forma futási sajátosságai révén látszik több sáv, melyek térbeli elrendeződéséből fakadnak (szupertekercs szerkezet). A két különböző enzimmel történő hasítás esetében a keletkező - közel azonos méretű - fragmentek csak egy sávot mutatnak, a vártnak megfelelő mérettartományban.

Western-blot analízis

Vizsgálataink során sikeresen mutattuk ki az overexpresszált NLRC5-Flag fúziós fehérjét mind a monoklonális, mind a poliklonális anti-Flag antitestekkel [14. ábra]. A poliklonális anti-Flag antitest érzékenyebbnek bizonyult a monoklonálishoz képest, ezért előbbi választottuk a Western-blot analízisekhez a monoklonális anti-Flag antitest helyett.

Az anti-Flag antitestek mellett anti-NLRC5 antitesteket is teszteltünk annak érdekében, hogy jövőbeli kísérleteink során a humán NLRC5-öt expresszáló sejtvonalakban is igazolni tudjuk az endogén fehérje jelenlétét. Az első elvégzett kísérletek után a kipróbált anti-NLRC5 antitest nem bizonyult kellően érzékenynek a fúziós fehérje kimutatásában, így a sikertelennek értékelt kísérleteket követően újabb anti-NLRC5 antitestet próbáltunk ki. Így összesen 4 különböző anti-NLRC5 antitestet rendeltünk meg és teszteltünk. Az antitestek kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy olyan antitesteket használjunk, mely a gyártó adatai szerint a humán fehérje kimutatására alkalmasak Western-blot analízissel, valamint hogy az antitest (szintetikus peptid szekvenciával történő) előállításához használt immunogén szekvenciájuk különböző legyen annak érdekében, hogy más-más epitópokat legyen képes felismerni [3. táblázat].

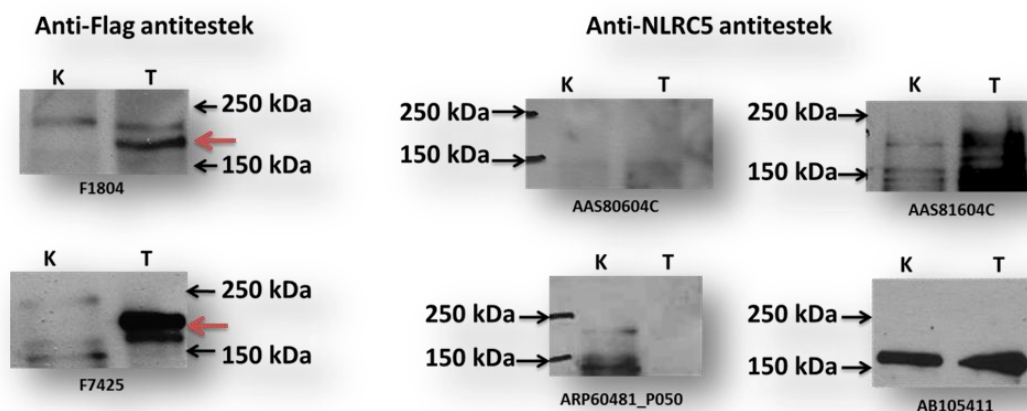
3. táblázat: Kereskedelmi forgalomban kapható anti-NLRC5 antitestek, klonalitásuk és immunogén szekvenciáik.

*A táblázatban szereplő antitestek jól reprezentálják a piacon elérhető anti-NLRC5 antitestek csaknem teljes skáláját. A vastagon szedett anti-NLRC5 antitesteket teszteltük. * A gyártó kérésünkre az alábbi immunogén szekvenciát adta meg: 36-LPNTDLDRSNETLDPEQR -53, mely feltehetően megegyezik azon antitestek immunogén szekvenciájával is, ahol a termékinformáció csak a „Humán NOD4 N-terminális közeli 18 aminosavából álló peptidszakasz” kifejezést tartalmazza. A táblázat nem tartalmazza a 2013/08 óta piacra került antitesteket.*

Antitest	Gyártó	Klonalitás	Immunogén szekvencia
AAP60481	Avia Systems Biology	poliklonális	89-LLSTFGYDDGFTSQLGAEGKSQPESQLHHGLKRPHQSCGSSPRRKQCKK-138
AAS80604C	Antibody Verify	poliklonális	799- TVRMLQAREADLIFLLSPPTETTAELQRAPDLQESDQGRKGAQSRSLTLRLQKCLQVHD-859
AAS81604C	Antibody verify	poliklonális	72- FIHCVMQLEVLPLDLEVLSTFGYDDGFTSQLGAEGKSQPESQLHHGLKRPHQSCGSSP-132
AB105411	ABCAM	poliklonális	Humán NOD4 N-terminális közeli 18 aminosavából álló peptidszakasz (36-LPNTDLDRSNETLDPEQR -53)
SAB3500545*	SIGMA	poliklonális	Humán NOD4 N-terminális közeli 18 aminosavából álló peptid szakasz
PAB19299	Abnova	poliklonális	Humán NOD4 N-terminális közeli 18 aminosavából álló peptidszakasz
PA521017	Thermo Scientific	poliklonális	Humán NOD4 N-terminális közeli 18 aminosavából álló peptidszakasz
LS-B5328	LSBio	poliklonális	Humán NOD4 N-terminális közeli 18 aminosavából álló peptidszakasz
ABIN783699	antibodies-online	poliklonális	Humán NOD4 N-terminális közeli 18 aminosavából álló peptidszakasz
AP26258PU-N	Acris antibodies	poliklonális	Humán NOD4 N-terminális közeli 18 aminosavából álló peptidszakasz
119-15145	Raybiotech	poliklonális	Humán NOD4 N-terminális közeli 18 aminosavából álló peptidszakasz
OAPB01164	Avia Systems Biology	poliklonális	Humán NOD4 N-terminális közeli 18 aminosavából álló peptidszakasz

Az egyes anti-NLRC5 antitestekkel végzett Western-blot kísérletek mellett elvégeztük a fúziós fehérje kimutatását a poliklonális anti-Flag antitest használatával is, mely utóbbit kontrollként használtuk. Míg a transzfektált sejtek teljes lizátumának vizsgálata során az NLRC5-Flag fehérje esetében az anti-Flag antitest használatával a várt mérettartományban (~200 kDa) kaptunk sávokat, addig az anti-NLRC5 antitestek esetében ugyanazon méretnél nem volt egyértelmű a fúziós fehérjének megfelelő sáv megjelenése.

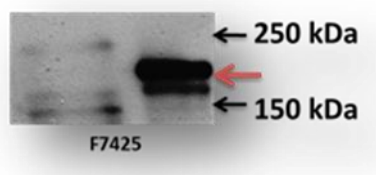
A kereskedelmi forgalomban kapható anti-NLRC5 antitestek közül az általam tesztelt 4 antitestről elmondhatom, hogy a poliklonális anti-Flag antitesthez képest kevésbé bizonyultak érzékenynek az NLRC5-Flag fúziós fehérje kimutatásában [14. ábra].



14. ábra: **Különböző antitestekkel végzett Western-blot eredményei.**

A „K” a kontroll (nem transzfektált) 293T sejtekből, míg a „T” az NLRC5-Flag transzfektált 293T sejtekből készült teljes sejtlizátumot jelöli.

Mivel nem bizonyult elég hatékonynak egyik anti-NLRC5 antitest sem a fúziós fehérje kimutatására, ezért nem sikerült azokat a távolabbi tervek között is szereplő vizsgálatokban, azaz az endogén NLRC5 fehérje kimutatására sem felhasználni, holott például az irodalmi adatok alapján az endogén NLRC5-öt tartalmazó HeLa sejtvonalból is készítettünk sejtlizátumot.



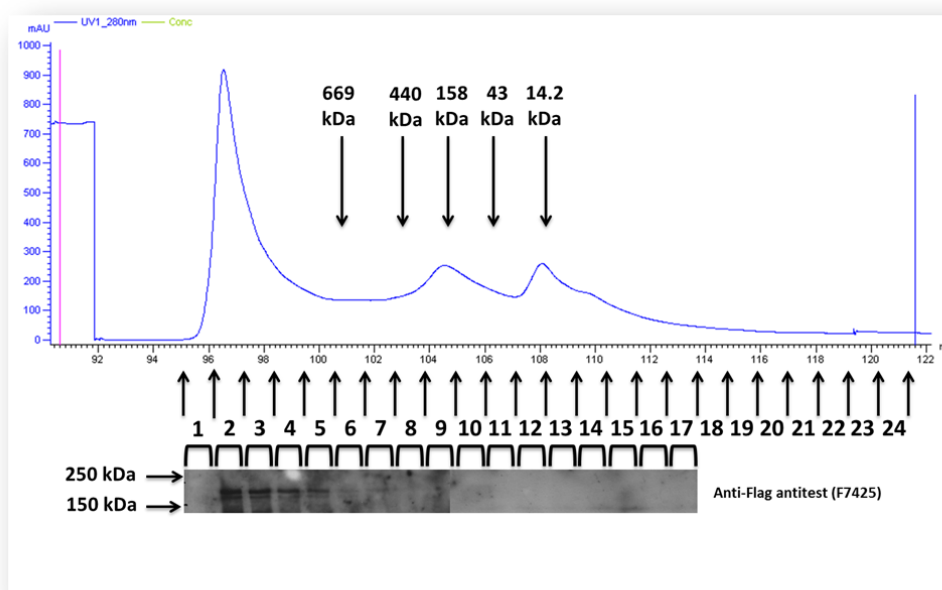
15. ábra: **Overexpresszált NLRC5-Flag fehérje kimutatása során tapasztalt dupla sávok.**

A poliklonális anti-Flag antitesttel készített blot képeken dupla sáv megjelenését tapasztaltuk [15. ábra], mely jelenséget más kutatócsoport is tapasztalta korábban az NLRC5 fehérje vizsgálata során [Neerinx és mtsai, 2010]. Neerinx és kutatócsoportja szerint is

egyfajta poszttranszlációs módosításról lehet szó, azonban a feltételezett módosítás természetéről még nem áll rendelkezésre irodalmi adat.

Molekulatömeg meghatározása gélszűréssel

A következő lépésként az NLRC5 fehérje molekulatömegét vizsgáltuk gélszűréssel, valamint a fehérje feltételezett oligomerizációját kívántuk igazolni. A gélszűrés során szedett frakciókból Western-blot analízist végeztünk poliklonális anti-Flag antitest használatával.



16. ábra: Gélszűrés során kapott kromatogram és az egyes frakciók Western-blot analízisének eredménye.

A kromatogram felett látszanak a kalibrációhoz használt fehérjék molekulatömegei. A kromatogram alatt nyilakkal vannak jelölve a szedett frakciók, melyekhez kis kapcsokkal vannak kötve a frakciókból kapott Western-blot képek eredményei.

A 16. ábrán bemutatott, a 2-5 frakciók esetében megjelenő sávok alapján megállapítottuk, hogy az NLRC5 fehérje feltételezett oligomerizációja megtörténik. A Western-blot eredmény alapján igazolható az oligomer forma jelenléte, azonban ezen eredmények alapján az oligomer tagszáma pontosan nem határozható meg, nem igazolható egyértelműen a homo-heptamer kialakulása. A 8-as és 9-es frakciókba várt monomer formát

nem sikerült kimutatni, aminek oka véleményünk szerint az lehet, hogy az NLRC5 molekulák túlnyomó többsége részt vesz az oligomerizációban, így a monomer forma koncentrációja nem éri el a detektáláshoz szükséges értéket.

Összegzés

Munkám során olyan feladatok elvégzését tűztük ki célul, melyek részét képezik a teljes hosszúságú humán NLRC5 fehérje homológ modell helyességének molekuláris biológiai vizsgálatokkal történő igazolásának.

Munkám során az NLRC5-Flag fúziós fehérjét 293T sejtekben overexpresszáltattuk az NLRC5 fehérje további vizsgálata céljából.

A rendelkezésünkre bocsájtott pcDNA3.1-NLRC5-Flag plazmidot DH5 α sejtekbe transzformáltuk, majd a plazmid tisztítását követően használtuk fel 293T sejtek transzfekciójához. A kísérletek sikeressége érdekében felhasználás előtt elvégeztük a plazmid restrikciós hasítással történő ellenőrzését is.

Az NLRC5-Flag fúziós fehérje túltermeltetéséhez a 293T sejtek transzfekcióját kalcium foszfát pufferes transzfekciós protokollt alkalmazva végeztük el.

A fúziós fehérje kimutatására különböző, a kereskedelmi forgalomban elérhető anti-NLRC5 és anti-Flag antitesteket teszteltünk. Az anti-Flag antitestek közül mind a monoklonális mind a poliklonális antitestekkel sikerült kimutatnunk az overexpresszált NLRC5-Flag fehérjét. Mivel a poliklonális anti-Flag antitest érzékenyebbnek bizonyult a monoklonálisnál, ezért további munkáink során a poliklonális antitestet használtuk.

Olyan anti-NLRC5 antitesteket teszteltünk, melyek különböznek az előállításukhoz használt immunogén szekvenciában, így más-más epitópok felismerésére alkalmasak. Az általunk tesztelt anti-NLRC5 antitestek az előállításukhoz használt immunogén szekvencia tekintetében csaknem teljesen lefedjik a kereskedelmi forgalomban kapható anti-NLRC5 antitestek teljes skáláját. Vizsgálataink eredményeként megállapítottuk, hogy az általunk tesztelt anti-NLRC5 antitestek nem elég érzékenyek az overexpresszált NLRC5 kimutatására Western-blot analízissel és ezért nem használhatóak fel az NLRC5 fehérje kimutatására olyan sejtvonalakban (pl. HeLa), amelyekben irodalmi adatok alapján jelen van az endogén fehérje. A poliklonális anti-Flag antitesttel végzett Western-blot analízisek során a ~200kDa méretű NLRC5 fehérje esetében dupla sáv megjelenését tapasztaltuk, a Neerincx és munkatársai által végzett kísérletek eredményéhez hasonlóan [Neerincx és mtsai, 2010]. Feltételezéseink szerint

is a dupla sávok megjelenésének az oka valamilyen poszttranszlációs módosulás lehet, melynek vizsgálata jelenleg is folyik munkacsoportunkban.

A feltételezett oligomerizáció vizsgálatára gélszűrés vizsgálatot végeztünk, melynek során megállapíthattuk, hogy az NLRC5 fehérje feltételezett oligomerizációja megtörténik. Az oligomerizációt sikeresen igazoltuk, azonban a pontos sztöchiometriai arányok meghatározásához még további vizsgálatokra lesz szükség, ugyanis a fúziós fehérjét több frakcióban is azonosítottuk, ami nem teszi lehetővé a heptamer (vagy más tagszámú oligomer) forma egyértelmű azonosítását. Mivel a monomer formát gélszűrés után egyetlen frakcióban sem sikerült kimutatnunk, feltételezésünk szerint az NLRC5 fehérje molekulák túlnyomó része részt vesz az oligomerizációban.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Tózsér József professzor úrnak, hogy lehetővé tette munkámat a Retrovirális Biokémiai Kutatócsoportban.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Mótyán Jánosnak lelkiismeretes témavezetéséért, mind elméleti mind gyakorlati tanácsaiért, útmutatásaiért.

Köszönöm Dr. Farkas Bencének a Western-blot analízisek és a sejtlaboros munkák során nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom a Retrovirális Biokémiai Kutatócsoport minden dolgozójának a munkám során nyújtott támogatásért és segítségért.

Köszönöm Dr. Benkő Szilviának és Varga Alíznek a munkám elvégzéséhez nyújtott segítségüket.

Köszönetet szeretnék mondani édesanyámnak és édesapámnak, hogy támogatásukkal lehetővé tették számomra tanulmányaim és egyetemi munkáim elvégzését.

Irodalomjegyzék

Könyvek, cikkek, tanulmányok

- Benkő S, Magalhaes JG, Philpott DJ, Girardin SE. (2010) **NLRC5 limits the activation of inflammatory pathways.** *J Immunol.* 185(3): 1681-91.
- Davis BK, Roberts RA, Huang MT, Willingham SB, Conti BJ, Brickey WJ, Barker BR, Kwan M, Taxman DJ, Accavitti-Loper MA, Duncan JA, Ting JP. (2011) **Cutting edge: NLRC5-dependent activation of the inflammasome.** *J Immunol.* 186(3): 1333-7.
- Kanneganti TD, Lamkanfi M, Núñez G. (2007) **Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease.** *Immunity* 27(4): 549-59.
- Kufer TA, Sansonetti PJ. (2011) **NLR functions beyond pathogen recognition.** *Nat Immunol.* 12(2): 121-8.
- Meissner TB, Li A, Kobayashi KS. (2012) **NLRC5: a newly discovered MHC class I transactivator (CITA).** *Microbes Infect.* 14(6): 477-84.
- Michallet MC, Rota G, Maslowski K, Guarda G. (2013) **Innate receptors for adaptive immunity.** *Curr Opin Microbiol.* 16(3): 296-302.
- Mótyán JA, Bagossi P, Benkő S, Tőzsér J. (2013) **A molecular model of the full-length human NOD-like receptor family CARD domain containing 5 (NLRC5) protein.** *BMC Bioinformatics.* 14: 275.
- Neerincx A, Rodriguez GM, Steimle V, Kufer TA. (2012) **NLRC5 controls basal MHC class I gene expression in an MHC enhanceosome-dependent manner.** *J Immunol.* 188(10): 4940-50 .
- Neerincx A, Castro W, Guarda G, Kufer TA. (2013) **NLRC5, at the Heart of Antigen Presentation.** *Front Immunol.* 4: 397.

- Tosi G, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. (2002) **Phosphorylation of CIITA directs its oligomerization, accumulation and increased activity on MHCII promoters.** *EMBO J.* 21(20):5467-76.
- Yao Y, Wang Y, Chen F, Huang Y, Zhu S, Leng Q, Wang H, Shi Y, Qian Y. (2012) **NLRC5 regulates MHC class I antigen presentation in host defense against intracellular pathogens.** *Cell Res.* 22(5): 836-47.
- Yuan S, Yu X, Topf M, Ludtke SJ, Wang X, Akey CW. (2010) **Structure of an apoptosome-procaspase-9 CARD complex.** *Structure.* 18(5): 571-83.
- Zhao Y, Shao F. (2012) **NLRC5: a NOD-like receptor protein with many faces in immune regulation.** *Cell Res.* 22(7): 1099-101.

Internetes hivatkozások

Pubmed adatbázis:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=NLRC5>

Utolsó hozzáférés dátuma: 2014.05.09.

Uniprot adatbázis:

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q86WI3>

Utolsó hozzáférés dátuma: 2014.05.09.

Benkő S; (2011) **A Nod-like receptorok NLR vizsgálata immunkompetens sejtekben**
Tudományos hétfő előadássorozat, Debreceni Egyetem, 2011

http://aok.unideb.hu/sites/default/files/galeria/2011/10/benko_szilvia_pdf_37731.pdf

Utolsó hozzáférés dátuma: 2014.05.09.

Juhász G, Kovács A, László L, Lőw P, (2013) **Az őnemésztés, sejtpusztulás és megújulás molekuláris sejtbíológíájá című könyve.** (270-298.o) (Szerk. Lőw P.).

<http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/onemesztes/book.pdf>

Utolsó hozzáférés dátuma: 2014.05.09.

Gutte PTM, Jurt S, Grütter MG, Zerbe O. (2014) **Unusual Structural Features Revealed by the Solution NMR Structure of the NLRC5 Caspase Recruitment Domain**
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi500177x?journalCode=bichaw>

Elektronikus publikálás ideje: 2014.05.01.

Utolsó hozzáférés dátuma: 2014.05.09.