

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Vonderviszt Ferenc egyetemi tanárnak, hogy tanácsaival, szakmai hozzáértésével nagyban segítette munkámat.

Különös hálával tartozom Dr. Jankovics Hajnalkának, aki mindig a rendelkezésemre állt. Ez úton szeretném megköszönni a rám áldozott idejét, türelmét, és azt, hogy kutatásom segítése mellett a precizitás fontosságára is tanított.

Köszönet Papné Klein Ágnesnek és Dr. Tóth Balázsnak, hogy kérdéseimmel mindig bizalommal fordulhattam hozzájuk.

Munkámat az OTKA K104726 pályázat anyagi támogatásával végeztem.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Neidhardt F. C., Ingraham J., Low K. B., Magasnik B., Schaechter M., Umbarger M. E., Macnab R. M. : Flagella and motility. In: *Escherichia coli and Salmonella American Society for Microbiology Press, Washington D.C., 1996.*, 123-145.
2. Namba K., Vonderviszt F. (1997) Molecular Architecture of Bacterial Flagellum *Quart. Rev. Biophys.* 30:1-65
3. Yamashita I., Haregawa K., Suzuki H., Vonderviszt F., Mimori-Kiyosue Y., Namba K. (1998) Structure and Switching of Bacterial Flagellar Filaments Studied by X-ray Fiber Diffraction. *Nat. Struct. Biol.* 1998:125-132
4. Evans L. D. B., Hughes C., Fraser G. M. (2014) Building a Flagellum Outside the Bacterial Cell *Trends Microbiol.* 10:566-572.
5. Evans L. D., Poulter S., Terentjev E. M., Hughes C., Fraser G. M. (2013) A Chain Mechanism for Flagellum Growth *Nature* 504(7479):287-290
6. Burinshaw B. J., Strynadka N. C. (2014) Assembly and Structure of the T3SS *Biochim. Biophys. Acta* 8:1649-1663
7. Abrusci P., Vergara-Irigaray M., Johnson S., Beeby M. D., Hendrixson D. R., Roversi P., Friede M. E., Deane J. E., Jensen G. J., Tang C. M., Lea S. M. (2013) Architecture of the Major Component of the Type III Secretion System Export Apparatus *Nature Struct. Mol. Biol.* 1: 99–104
8. Hueck C. J. (1998) Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. *Mol. Biol. Rev.* 62:379–433
9. Kosarewicz A., Königsmaier L., Marlovits T. C. (2012) The Blueprint of the Type-3 Injectisome. *Philos. Trans. R. Soc, Lond. B Biol. Sci.* 367:1140–1154
10. Kawamoto A., Morimoto Y. V., Miyata T., Minamo T., Hughes K. T., Kato T., Namba K. (2013) Common and Distinct Structural Features of Salmonella Injectisome and Flagellar Basal Body *Sci. Rep.* 3:33-69
11. Vonderviszt F., Namba K.: Structure, function and assembly of flagellar axial proteins In Scheibel, T. (ed) *Fibrous Proteins* , *Landes Biosciences, Austin, 2008.*, 58-76.
12. Végh B. M. (2008) A flagellumspecifikus exportapparátus felismerési jelének azonosítása, *PhD értekezés, Eötvös Loránd Tudományegyetem*

13. Ibuki T. et al. (2011.) Common Architecture of the Flagellar type III Protein Export Apparatus and F- and V-type ATPases. *Nature Struct. Mol. Biol.* 18: 277–282
14. Minamo T., Imada K., Namba K. (2008) Mechanisms of Type III Protein Export for Bacterial Flagellar Assembly, *Mol. BioSyst.* 4:1105–1115.
15. Minamino T. (2014) Protein Export Through the Bacterial Flagellar Type III Export Pathway *Biochim. Biophys. Acta*, 8:1642-1648
16. Ferris H. U., Minamo T. (2006) Flipping the Switch: Bringing Order to Flagellar Assembly *Trends Microbiol* 14(12):519-526.
17. Meshcheryakov V. A., Barker C. S., Kostyukova A. S., Samatey F. A. (2013) Function of FlhB, a Membrane Protein Implicated in the Bacterial Flagellar Type III Secretion System *PLoS One* 2013 8(7):683-684
18. Uchida Y., Minamo T., Namba K., Imada K. (2012) Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of the FliH-FliI Complex Responsible for Bacterial Flagellar Type III Protein Export *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun* 68:1311-1314.
19. Beatson S.A., Minamino T., Pallen M. J. (2006) Variation in Bacterial Flagellins: From Sequence to Structure *Trends. Microbiol.* 14: 151-155.
20. Minamo T., Morimoto Y. V., Hara N., Namba K. (2011) An Energy Transduction Mechanism Used in Bacterial Flagellar Type III Protein Export *Nat. Commun.* 2:475
21. Homma M., Kutsukake K., Hasebe M. et al. (1990.) FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A Family of Structurally Related Proteins in the Flagellar Basal Body of *Salmonella Typhimurium* *J. Mol. Biol.* 211:465-477.
22. Homma M., DeRosier D. J., Macnab R. M. (1990) Flagellar Hook and Hook-Associated Proteins of *Salmonella Typhimurium* and Their Relationship to Other Components of the Flagellum *J. Mol. Biol.* 213: 819-832.
23. Wilson D. R., Beveridge T. J. (1993) Bacterial Flagellar Filaments and Their Component Flagellins *Can. J. Microbiol.* 39: 451-474.
24. Yonekura K., Maki-Yonekura S., Namba K. (2003) Complete Atomic Modell of the Bacterial Flagellar Filament by Electron Cryomicroscopy *Nature* 424:643-650
25. Samatey F. A., Imada K., Nagasima S., Vonderviszt F., Kumasaka T., Yamamoto M., Namba K. (2001) Structure of the Bacterial Flagellar Protofilament and Implications for a Switch for Supercoiling *Nature* 410:331-337
26. Végh B. M., Gál P., Dobó J., Závodszky P., Vonderviszt F. (2006) Localization of the Flagellum-Specific Secretion Signal in *Salmonella* Flagellin *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345: 93-98.

27. Gál P., Végh B. M., Závodszky P., Vonderviszt F. (2006) Export Signals *Nat.Biotechnol.* 4:900-901
28. Dobó J., Varga J., Sajó R., Végh B. M., Gál P., Závodszky P., Vonderviszt F. (2010) Application of a Short, Disordered N-terminal Flagellin Segment, a Fully Functional Flagellar Type III Export Signal, to Expression of Secreted Proteins *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 891-899.
29. Wéber A. (2013) Génkonstrukció előállítása a flagelláris exportrendszer hatékonyságának vizsgálatára , *Szakdolgozat, Pannon Egyetem*
30. Klein Á., Tóth B., Jankovics H., Muskotál A., Vonderviszt F. (2012) A Polymerizable GFP Variant Protein Eng. Des. Sel. 25(04):153-157
31. BME Online jegyzetadatbázis, DNS klónozás tárgy, laborgyakorlati leírása (<http://ftp.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/dnsklon/laborgyak/trafo.pdf>)
32. Barna J., Lengyel K., Vellainé Takács K., Billes V., Kovácsné Sigmond T., Varga M., Horváth Péter, Ari E., Vellai T.: Genetikai gyakorlatok; *Eötvös Loránd Tudományegyetem, 2013.*
33. Ádám V.: Orvosi biokémia, *Semmelweis Kiadó, 1996.*
34. Nyitrai L., Alexa A., Fodor K., Garai Á., Glatz G., Radnai L., Rapali P., Szakács D., Várkuti B., Zeke A.: Géntechnológia és fehérjemérnökség, *Eötvös Loránd Tudományegyetem, 2013.*
35. Damjanovich S., Fidy J., Szöllősi J.: Orvosi biofizika; *Medicina Könyvkiadó Zrt., 2007.*
36. Galbács G., Galbács Z., Sipos P.: Műszeres analitikai kémiai laboratóriumi gyakorlatok, *JATEPress Kiadó, 2008.* 104
37. Chalfie M., Kain S.: Green Fluorescent Protein, *Wiley-Liss INC.,1998. ISBN:0-471-17839-X*
38. Goodsell D. (2003. June) Molecule of the Month: Green Fluorescent Protein (GFP) *RCSB Protein Data Bank* , doi:10.2210/rcsb_pdb/mom_2003_6
39. Komoriya K., Schibano N., Higano T., Azuma N., Yamaguchi S., Aizawa S. I. (1999) Flagellar Proteins and Type III-Exported Virulence Factors are the Predominant Proteins Secreted into the Culture Media of Salmonella Typhimurium *Mol. Microbiol.* 34(4):767-779

9.FÜGGELÉK

9.1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

FliC:	flagellin
GFP:	zöld fluoreszcens fehérje (“Green Fluorescent Protein”)
ES:	export-szignál
ES-GFP:	Az export szignált vagy annak egy módosított változatát és kijuttatandó idegen fehérjeként GFP-t tartalmazó fúziós fehérje.
pKOT ES-GFP:	A 6. ábrán látható plazmid, illetve az ilyen plazmidot tartalmazó sejt kultúra. Módosítatlan flagellin-exportszignált tartalmaz, a kódolt kijuttatandó sejtidegen fehérje a Green Fluorescent Protein.
ES Δ 26-30-GFP:	A pKOT ES-GFP-től annyiban különbözik, hogy az expresszálandó flagellin export-szignál az <i>N</i> -terminálishoz közelebbi végén 5 aminosav hiányzik.
ES Δ 43-47-GFP:	A pKOT ES-GFP-től annyiban különbözik, hogy az expresszálandó flagellin export-szignál a <i>C</i> -terminálishoz közelebbi végén 5 aminosav hiányzik.
LB:	“Lysogeny broth”; egy peptideket, vitaminokat és ásványi anyagokat tartalmazó, széleskörűen alkalmazott tápoldat.
SOC:	“Super Optimal broth with Catabolite repression”; az LB tápoldat egy olyan módosulata, mely elősegíti a plazmidok általi sejtttranszformációt, emellett hozzáadott glükózt is tartalmaz.
OD ₆₀₀ :	A baktériumok sűrűségét (optical density) egy elegyben jellemezhetjük a 600 nm-es hullámhosszon mért abszorbanciával.
SDS:	nátrium-dodecil-szulfát
PAGE:	Poliakrilamid-gélelektroforézis
TCA:	triklór-ecetsav
TEMED:	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etiléndiamin
APS:	ammónium-perszulfát
TEB:	Tris-EDTA-bórsav puffer

9.2. VIZSGÁLT EXPORTSZIGNÁL-GFP KONSTRUKCIÓK SZEKVENCIÁI

Jelölések:

TEV-vágóhely: **enlyfq**

ES variáns: dőlt betűvel

sfGFP linkerei: **legs**, **el**

FliC c46: dajkafehérje-kötő szakasz

(ES-GFP) **6His-ES-TEV-sfGFP-TEV-FliCc46-6His:**

mhhhhhhpggtaierlssglrinsakddaagt**enlyfq****legs**mvskgeelftgvpilveldgdvngkhkfsvrgegegdngkltkfictt
tgklpvpwptltvtlttygvqcfsrypdhmkqhdfkssampegvqvqertisfkddgtyktraevkfegdtlvnrielkgidfkedgnilghkleyn
nfnshnvyitadkqkngikanfkihrnvedgsvqladhyqqntpigdgpvllpdnhylstqsvlskdpnekrdhmvllfvtaagitlgmdel
ykel**enlyfq**gsarsriedsdyatevsnmrsaqilqqagtsvlaqanqvpqnvslrrhhhhhh*

346 aminosav

M: 38,6 kDa

(ESΔ26-30-GFP) **6His-ESΔ26-30-TEV-sfGFP-TEV-FliCc46-6His:**

mhhhhhhpg.....rlssglrinsakddaagt**enlyfq****legs**mvskgeelftgvpilveldgdvngkhkfsvrgegegdngkltkfictt
gklpvpwptltvtlttygvqcfsrypdhmkqhdfkssampegvqvqertisfkddgtyktraevkfegdtlvnrielkgidfkedgnilghkleyn
fnshnvyitadkqkngikanfkihrnvedgsvqladhyqqntpigdgpvllpdnhylstqsvlskdpnekrdhmvllfvtaagitlgmdely
kel**enlyfq**gsarsriedsdyatevsnmrsaqilqqagtsvlaqanqvpqnvslrrhhhhhh*

341 aminosav

M: 38,15 kDa

(ESΔ43-47-GFP) **6His-ESΔ43-47-TEV-sfGFP-TEV-FliCc46-6His:**

mhhhhhhpggtaierlssglrinsak.....tg**enlyfq****legs**mvskgeelftgvpilveldgdvngkhkfsvrgegegdngkltkfictt
lpvpwptltvtlttygvqcfsrypdhmkqhdfkssampegvqvqertisfkddgtyktraevkfegdtlvnrielkgidfkedgnilghkleynfns
hnvyitadkqkngikanfkihrnvedgsvqladhyqqntpigdgpvllpdnhylstqsvlskdpnekrdhmvllfvtaagitlgmdelykel
enlyfqgsarsriedsdyatevsnmrsaqilqqagtsvlaqanqvpqnvslrrhhhhhh*

341 aminosav

M: 38,2 kDa