



XXXII. OTDK

2015

Biológia Szekció



**A flagelláris exportszignál meghatározó
szegmenseinek azonosítása**

készítette:

Baráth Veronika

kémia alapszak, 3. évfolyam

témavezető:

Dr. Vonderviszt Ferenc

egyetemi tanár

Dr. Jankovics Hajnalka

egyetemi adjunktus

Műszaki Kémiai Kutatóintézet, Bio-Nanorendszerek
Laboratórium

**Pannon Egyetem
Veszprém
2014**

TARTALOMJEGYZÉK

1. Irodalmi áttekintés.....	2
1.1. A bakteriális flagellum.....	2
1.2. A flagellin-export mechanizmusa.....	4
1.3. A flagellin szerkezete és az export-szignál helye.....	6
1.4. Az alkalmazott génkonstrukció bemutatása.....	9
2. Célkitűzés	11
3. Felhasznált anyagok és módszerek	12
3.1. Szükséges vegyszerek és eszközök.....	12
3.2. Alkalmazott módszerek elméleti alapja.....	12
3.2.1. Baktériumok transzformációja plazmid DNS-sel	12
3.2.2. Gélelektroforézis	13
3.2.3. Fluorimetria	15
4. Az elvégzett kísérletek leírása.....	18
4.1. A munkafolyamat összefoglalása	18
4.2. Plazmidok sokszorosítása <i>E.coli</i> törzsben és a DNS tisztítása.....	19
4.3. Agaróz gél készítése és futtatása.....	21
4.4. Elektrokompetens sejtek készítése.....	22
4.5. Sejt-transzformálás elektroporálással.....	23
4.6. Fehérjék kicsapása TCA-val	24
4.7. SDS-Poliakrilamid gélelektroforézis.....	24
4.8. Fluorimetriás mérés	28
5. Az eredmények értékelése.....	29
6. Összefoglalás.....	34
7. Köszönetnyilvánítás	35
8. Irodalomjegyzék	36
9. Függelék	39
9.1. Rövidítések jegyzéke.....	39
9.2. Vizsgált exportszignál-GFP konstrukciók szekvenciái	40

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

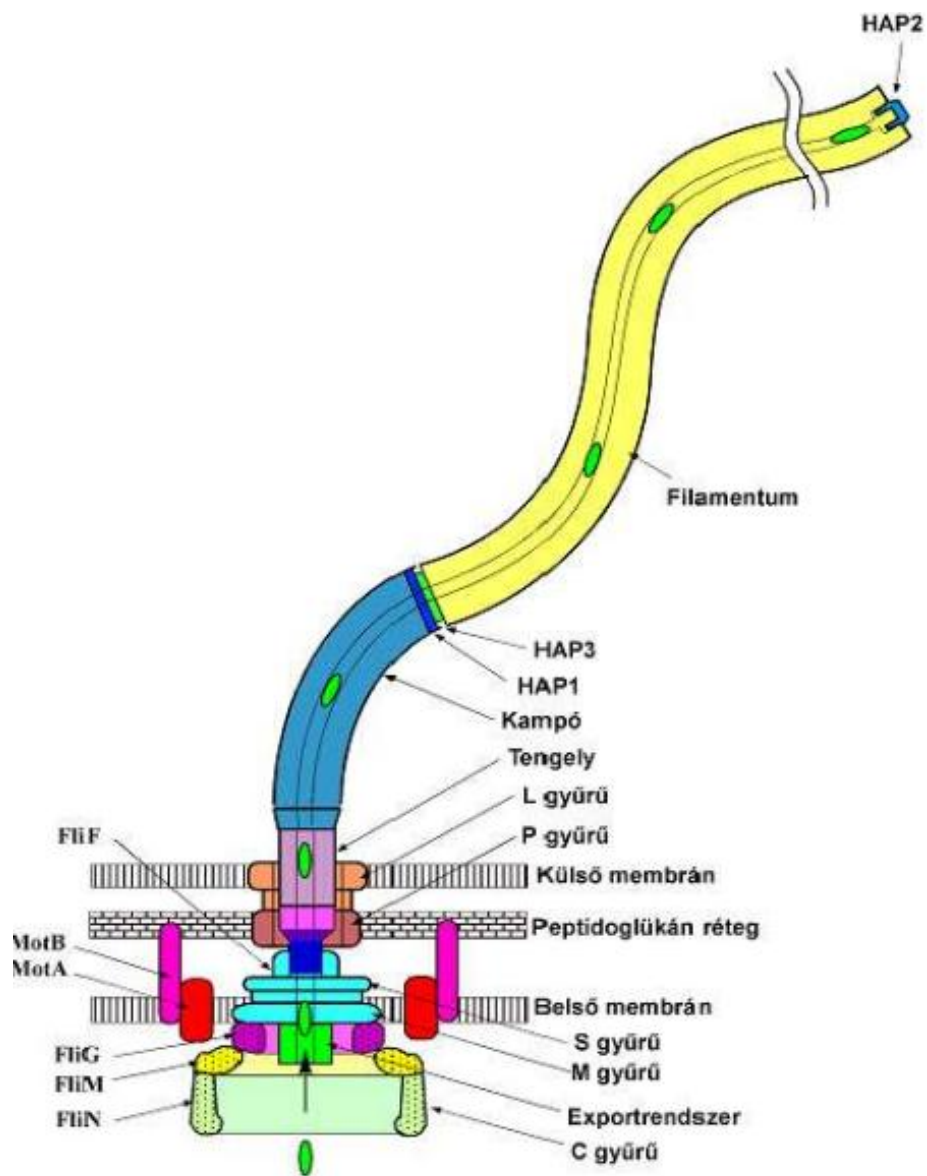
1.1. A BAKTERIÁLIS FLAGELLUM

Sok baktérium, köztük a szalmonella is a flagellum nevű mozgásszervvel úszik [1]. Ez egy olyan molekuláris gépezet, mely egy a membránba ágyazott, 50 nm átmérőjű protonok által hajtott motorból, és a vele összeköttetésben álló helikális filamentumból áll. A nanomotor szabadon foroghat az óramutatóval megegyező és ellentétes irányba is, akár 100 000 rpm (1700Hz) sebességgel. Ennek hatására a közegbe kinyúló, 5-10 µm hosszú, 120-150 Å átmérőjű filamentumok forgás közben egy helikális köteggé rendeződnek, mely propellerként hajtja előre a baktériumot.

Közelebbről vizsgálva látható, hogy a flagellum öt fő részre osztható: a bazális testre, kampóra, a kampó-filamentum kapcsolódási zónára, a filamentumra és az azt lezáró sapkára [2, 3, 4]. A flagellum felépítését az 1. ábra szemlélteti.

A motor négy gyűrű formációból és egy központi tengelyből épül fel. A motor tengelyét a filamentumokkal az erősen görbült szerkezetű kampó köti össze. Ez azonban nem csak passzív összekötő elemként funkcionál, hanem erőátviteli szerkezet is, ami megváltoztatja a forgás irányát. Ez azért szükséges, mert a helikális köteggé összeállt filamentumok nem a motor tengelye körül, hanem arra közel merőleges irányban, a saját hossz tengelyük körül forognak. A kampó és a filamentum közti kapcsolózónát az ún. HAP1 és HAP3 fehérjék egy-egy vékony rétege építi fel. Ezt követi a mintegy 30 000 flagellin fehérjéből (FliC) felépülő filamentum, melyet a HAP2 fehérjékből álló, pentamer szerkezetű sapka zár le. A motor tengelyét felépítő ötféle "rod" fehérjét, a kampó fehérjét, a flagellint és a HAP fehérjéket együttesen axiális fehérjéknek nevezzük.

A flagellum felépítésekor először a bazális test jelenik meg [5]. Az axiális fehérjék a citoplazmában szintetizálódnak, majd a filamentum belsejében található 2 nm széles csatornán áthaladva jutnak el végső helyükre, az épülő filamentumok végére. A flagellum épülését szabályzó exportmechanizmus ún. III-as típusú [6, 7], mely nagy hasonlóságot mutat a sok kórokozó baktériumban a virulencia tényezők gazdasejt citoplazmájába juttatásáért felelős rendszerekkel [8, 9, 10].



1. ábra: A flagellum részletes szerkezete. A különböző színek más-más fehérjekomponensekből álló szerkezeti egységeket jelölnek. Jól látható a több gyűrűből álló, membránba ágyazott motor, a kék színnel jelölt kampó és a sárga filamentum. A 2 nm átmérőjű csatornában haladnak beépülési helyük felé a zöld oválissal jelzett flagellin egységek [11, 12].

1.2. A FLAGELLIN-EXPORT MECHANIZMUSA

A flagelláris exportrendszer pontos működése a mai napig sem teljesen tisztázott. Alapja, hogy az exportrendszer vízdékony fehérjéből felépülő komplexuma felismeri a kijuttatandó fehérje export-szignálját, és ATP hidrolízisből és a belső membrán két oldala közötti protonkoncentráció-különbségből energiát nyerve az exportrendszer membránba ágyazott komponensei a sejten kívülre transzportálják a fehérjéket. A következőben a mechanizmus feltételezett folyamatait fejtem ki bővebben a flagellin exportjára koncentrálva a [13-20] cikkek alapján (2. ábra).

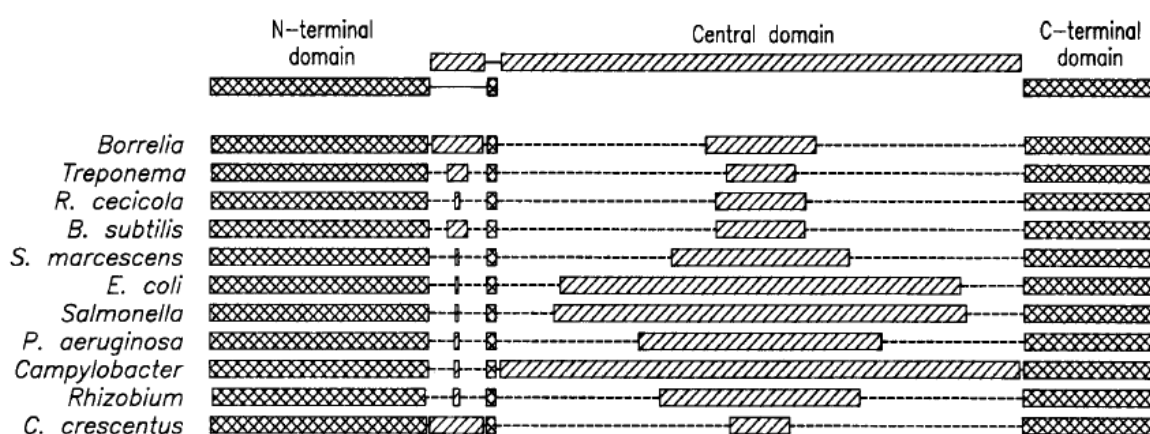
A flagellin, akárcsak a többi axiális fehérje a citoplazmában szintetizálódik, igen nagy mennyiségben. A C-terminális rendezetlen régióhoz kapcsolódó dajkafehérje, a FliS felelős azért, hogy a fehérjék polimerizációja ne induljon meg a sejten belül.

Ahhoz, hogy a flagellin megkezdhesse útját beépülési helye, a filamentum vége felé, át kell haladnia egy, a membránba ágyazott csatornán, melyet az FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ és FliR fehérjék építenek fel. A nagy C-terminális, citoplazmikus doménnel rendelkező FlhA és FlhB alkotja az export-apparátus vízdékony komponenseinek „kikötő felületét”. Az FlhB-nek nemcsak a megfelelő kötőhely biztosításában van szerepe. Az axiális fehérjék exportjának sorrendje ugyanis szigorúan meghatározott. Először a kampó építése zajlik, az ahhoz szükséges fehérjék haladnak át a csatornán. Amint a kampó eléri a megfelelő, $55\pm 5,9$ nm-es nagyságot a kiválasztórendszer „átkapcsolja” szubsztrát-specifitását kampó-típusú exportról filament-típusúra. Ebben a folyamatban van kulcsfontosságú szerepe az FlhB fehérjének, bár a pontos mechanizmus még nem ismert [16, 17].

Az FlhA-FlhB felülethez azonban a flagellin-dajkafehérje komplex önmagában nem képes kötődni. Ehhez szükség van a FliI fehérjére. Ez egy ATPáz enzim, mely regulátor-fehérjéjével, a FliH-val komplexet alkotva (FliH₂FliI-komplex) van jelen [18]. A komplex kezdetben a FliN-hez kötődik. Ott képes megkötni az axiális fehérjekompelexeket. Amint ez bekövetkezik, elválik a FliN-ről és az exportkapuhoz szállítja azokat. A FliH bár elnyomja az ATP hidrolízist, közben megkönnyíti a komplex megkötődését az FlhA-FlhB felülethez. Itt az FliI egy hatos gyűrűt alkot, és segíti a szubsztrát (azaz a flagellin) N-terminális végének belépését a szűk (2 nm átmérőjű [19]) csatornába. Az ATP hidrolízis energiája a FliI-komplex leválására fordítódik. A flagellin további átrendeződése és transzportja a belső membrán két oldala között fellépő protonkoncentráció-különbségből energiát nyerve zajlik [20].

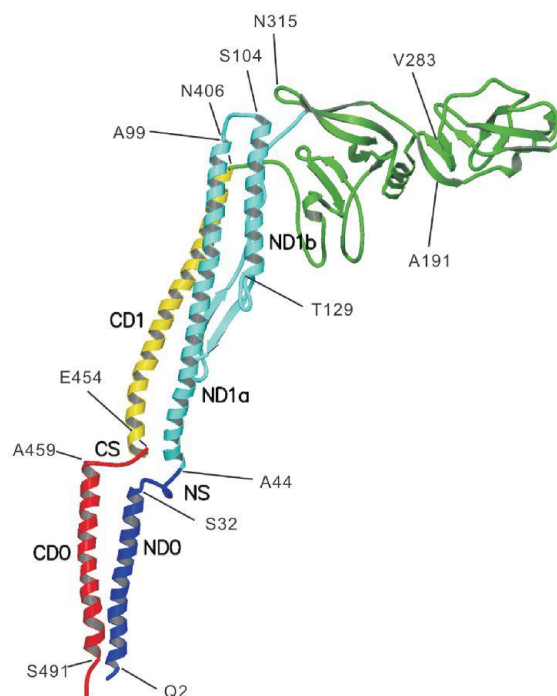
1.3. A FLAGELLIN SZERKEZETE ÉS AZ EXPORT-SZIGNÁL HELYE

A vad típusú *Salmonella* SJW1103 törzs flagellinje látható a 4. ábrán. Ez a fehérje 494 aminosavból áll, és a többi axiális fehérjéhez hasonlóan konzervált terminális régiók és variábilis közbenső rész jellemzi. Ebből adódóan a középső régiót megváltoztathatjuk (deléciókat és inszerciókat végezhetünk) anélkül, hogy a fehérje alapvető harmadlagos szerkezetét nagymértékben megváltoztatnánk. A flagellin esetében az *N*-terminális konzerválódott régió kb. 180, míg a *C*-terminális 100 aminosav hosszúságú szakasz (3. ábra) [21, 22].



3. ábra: Különböző baktériumokból származó flagellinek szekvenciáinak összehasonlítása. A sűrűn sávozott részek mutatják az erősen konzerválódott régiókat, a sima sávozás jelöli a homológ variábilis szekvenciákat, a szaggatott vonal pedig a hiányzó szegmenseket jelzi [23].

A flagellin molekula négy, rövid antiparalell láncokon keresztül lineárisan összekapcsolt nemfolytonos doménből áll (4. ábra) [24]. Az *N*-terminális végtől elindulva és a láncot követve először a D0 doménből indulunk (ND0), majd a D1-en és D2-n áthaladva jutunk a D3-hoz és onnan visszakanyarodva ismét a D2-n, majd a D1-en keresztül jutunk el a lánc *C*-terminális végéhez, ami ugyancsak a D0 doménben található (CD0). A doméneket összekötő antiparalell láncok közül a D0 és D1-et összekötő két régió a többinél hosszabb, ezeket spoke régióknak nevezzük.

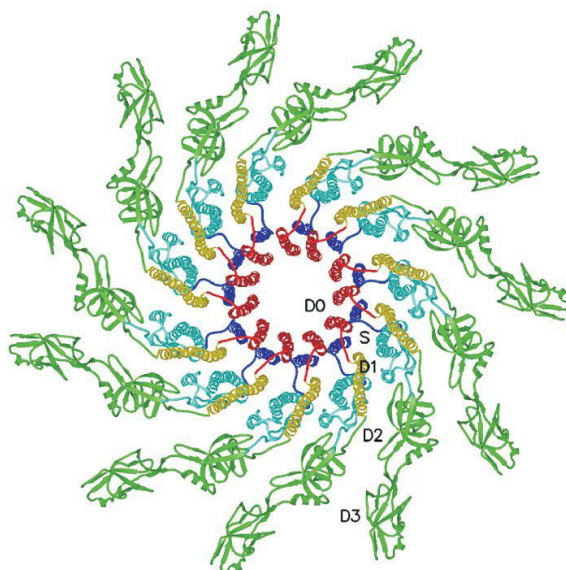


4. ábra: A flagellin molekula szalagmodellje. D0 doménből indulva (ND0), D1-en, D2-n áthaladva jutunk a D3-hoz, onnan visszakanyarodva D2-n, majd a D1-en keresztül jutunk el a lánc C-terminális végéhez, a D0 doménben (CD0). Az α -hélixek színesen, míg a jellemzően β -szálas részek egységesen zöld színnel vannak jelölve (az N-terminális végtől a C-terminálisig a szivárvány színei szerint haladunk) [24].

A D0-ban elhelyezkedő terminális régiók α -helikális szerkezetűek (CD0 és ND0). Ha az ezután következő spoke régiót a domének méretéhez viszonyítjuk, azt láthatjuk, hogy azoknak több mint harmada (CS, NS). A D0 és a D1 vertikális kiterjedése kb. 50 Å és 80 Å, a spoke régió hossza 20 Å. A D2 domént a D0-val és D1-gyel ellentétben főként β -szálak alkotják, egy 3_{10} -hélix és egy rövid α -helikális szakasz kivételével. A β -szálak jórészt szabálytalan orientációjú β -hajtók sorozatából állnak. Maga a domén három hidrofób régiót tartalmaz, kettő jól körülzárt, hidrofób maggal rendelkezik. A D3 domén a D2-höz hasonlóan β -szálakból és egy rövid α -helikális részből áll. A benne elhelyezkedő aminosavak tizenöt hidrofób oldallánca egy hidrofób magot alkot [25].

A flagellin molekula szerkezetének ismerete fontos ahhoz, hogy megértsük, hogyan építik fel a flagellin monomerek a filamentumot. Ennek keresztmetszeti képét az 5. ábrán láthatjuk. A flagellinek 11 protofilamentumba rendeződnek, melyek a flagellum hossz tengelyével közel párhuzamosan futnak. A hidrofób magú, variábilis D2 és D3 domének helyezkednek el a közeg felé. A D3 domén nem is vesz részt a filamentális szerkezet kialakításában, módosítása lényeges szerkezeti változást nem okoz. Legfelül a konzerválódott

régiókat tartalmazó D0 domén van. Az axiális irányban egymás felett levő alegységei alakítják ki a folytonos filamentáris szerkezetet [3, 24].



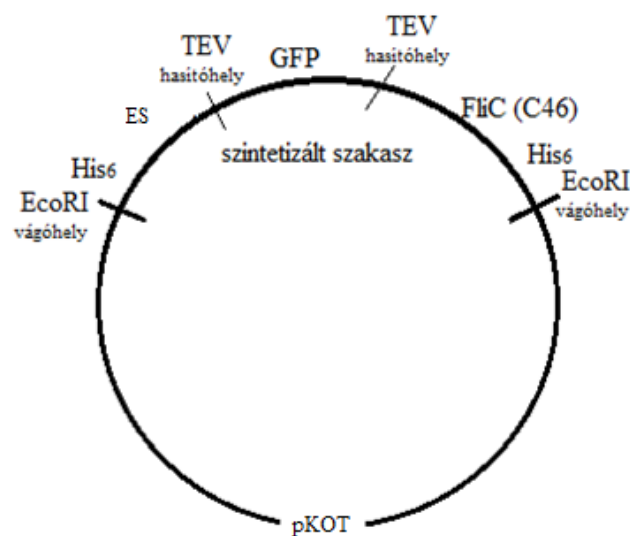
5. ábra: A flagelláris filamentum keresztmetszeti képe. Jól láthatók a 11 protofilamentumba rendeződő flagellinek. A külső kört a flagellinek D3 és D2 doménjei alkotják (zöld), a középsőt a D1 (világoskék-sárga). A folytonos filamentáris szerkezetet a D0 domén axiális irányban egymás felett levő alegységei alakítják ki (kék-piros) [24].

Mint láthattuk, a fehérje közbenső része igen variábilis, akárcsak a többi axiális fehérje esetében. Szekvenciális szinten nincs az axiális fehérjék mindegyikében fellelhető közös sajátosság - nincs lehasításra kerülő szignálpeptid vagy közös szignálszekvencia. A terminális régiók rendezetlensége az axiális fehérjék egyedüli közös szerkezeti sajátossága, ezért a kutatások itt kezdték el keresni az exporthoz szükséges szakaszokat. *N*-terminálisan csonkolt fragmenseket használva azt tapasztalták, hogy az első 13 aminosav nem szükséges az exporthoz, viszont 29 vagy több aminosav eltávolítása az exportképesség elvesztésével járt. Végül a flagellin erősen konzerválódott Gly26-Gly47 szegmensét azonosították, mint az export-szignál helyét [12,26,27].

1.4. AZ ALKALMAZOTT GÉNKONSTRUKCIÓ BEMUTATÁSA

Az export-apparátus akkor is felismeri és a sejten kívüli közegbe juttatja a fehérjét, ha az export-szignál mögé egy a sejt számára idegen fehérjét kapcsolunk [29]. Ennek a gyakorlati alkalmazásban van nagy jelentősége, hiszen ekkor a baktériumok által szintetizált fehérjét a felülúszóból tudjuk tisztítani. Így nagyobb tisztasággal és gyorsasággal nyerhető ki a fehérje, mivel a sejteket nem szükséges szétroncsolni (lizálni), majd a terméket a többi sejtalkotótól szeparálni. Nagy előny az is, hogy így a sejtek akár folyamatos termelésre is alkalmasak.

A kutatócsoportban, melyben tanulmányaimat folytatom, egy korábbi munka során létrehoztak egy olyan plazmidot, melyet a sejtekbe juttatva vizsgálható az export hatékonysága [29]. Én is ezt, és ennek módosított változatait használtam fel kutatásaim során. A plazmid rajza a 6. ábrán látható.



6. ábra: A felhasznált plazmid vázlatos rajza. Két EcoRI vágóhely között helyezkedik el a beillesztett szakasz, mely kódolja az export-szignált, a kijuttatni kívánt fehérjét (GFP) és a dajkafehérje megkötését szolgáló FliC C-terminálisának egy rövid szakaszát. A termeltetett fehérje tisztítását a hisztidinben gazdag régiók könnyítik meg. A termékről a kinyerés után már felesleges részeket TEV proteázzal hasíthatjuk le. A GFP más fehérjére is kicserélhető [29].

A génkonstrukció alapjául szolgáló pKOT plazmid úgy készült, hogy pBR322 plazmidba illesztették a szalmonella flagellinjét kódoló szakaszt, annak minden regulátorával

együtt. A pKOT plazmidot EcoRI vágóhelyénél hasítva egy szintetizált szakaszt illesztettek be. Ez a szakasz kódolja a sejt számára idegen Green Fluorescent Proteint (GFP), ami rendelkezik *N*-terminális végén a flagellin export-szignáljával (ES) és *C*-terminális vége azonos a flagellin *C*-terminális régiójának egy szakaszával (FliC C46), ami a FliS dajkafehérje kötőhelye. Az így szintetizálódott ES-GFP fúziós fehérje az export-szignálnak köszönhetően kijuthat a felülúszóba. A GFP azért jó választás kijuttatandó fehérjének, mert fluoreszcencia spektroszkópiával könnyen detektálható. A flagellin D3 doménjét GFP-re kicserélve már bebizonyították, hogy az így létrejött flagellin-GFP módosulat sikeresen transzportálódik, és GFP része fluoreszcens tulajdonságát is megtartja [30]. A génkonstrukcióról termelődő fúziós fehérjétől is hasonló viselkedés várható.

Két végén a génkonstrukció által kódolt fehérje His₆ régiókat tartalmaz, mely az affinitás-kromatográfiás tisztítást teszi lehetővé Ni²⁺ tartalmú oszlopon. Végül a GFP tisztán is kinyerhető, ha az immár felesleges részeket lehasítjuk róla TEV proteáz enzim segítségével. A GFP-t kódoló szakasz kicserélhető, ha a jövőben a plazmidot egyéb fehérje felülúszóba juttatására kívánjuk használni.

Az általam használt plazmidok a flagellin export-szignáljának módosított változatait tartalmazzák. A szintetizálódó export-szignálok egyikénél az eredeti szignálhoz képest a flagellin 26.-30. aminosaváig tartó szakasza hiányzik (ESΔ26-30-GFP), a másikonál a 43.-47. (ESΔ26-30-GFP) – vagyis az export-szignál első, ill. utolsó 5 aminosava. Ezek exportjának hatékonyságát hasonlítottam össze a módosítatlan export-szignált tartalmazóéval (pKOT ES-GFP).

2. CÉLKITŰZÉS

A bakteriális flagellum III-as típusú kiválasztórendszerének transzport-mechanizmusa még nem teljesen ismert. Ha ezt a folyamatot sikerül részleteiben megismernünk, nagyban nő felhasználhatósága a sejtek által termelt idegen fehérjék kijuttatására a felülűszóba. Ennek gyakorlati haszna igen jelentős, hiszen a terméket sokkal könnyebb a sejteken kívüli folyadéktérből tisztítani, mint ha a sejteket először lizálnunk kéne. Utóbbi esetben ugyanis sokkal többféle fehérje szabadulna ki az elegybe, vagyis nőne a szükséges tisztítási lépések száma.

Előző kutatások a flagellin rendezetlen *N*-terminális régiójában található, a 26. aminosavától a 47.-ig tartó szegmensét azonosították, mint az export-szignál helyét [12, 26, 27]. Igazolták azt is, hogy ezt a szakaszt idegen fehérjéhez kapcsolva a sejt transzportálni képes az így képződött export-szignál-fehérje molekulát. A kutatócsoportban korábban már elkészült egy olyan fúziós konstrukció, mellyel vizsgálható a flagelláris exportrendszer működése és szabályozása. Munkámat én is ennek felhasználásával végezhettem.

Célul tűztem ki annak vizsgálatát, hogy a flagellin export-szignál helyeként korábban azonosított 26.-47. szakasz tovább rövidíthető-e az export hatékonyságának megváltoztatása nélkül. Dolgozatomban az export-szignálnak egy az *N*- és egy a *C*- terminális végén öt aminosavval megrövidített módosulatát tanulmányozom (ESΔ26-30-GFP és ESΔ43-47-GFP), és hasonlítom össze az eredeti export-szignál hatékonyságával.

Ehhez előre elkészített, mutáns export-szignált kódoló gént tartalmazó plazmidokat juttattam saját flagellin termelésre nem képes (de az export-apparátus többi elemével rendelkező) sejtekbe. A módosított export-szignál kódja mögött a plazmidban idegen fehérjé-génként GFP szerepel. Ez lehetővé teszi, hogy a kijutott fehérjét ne csak SDS-PAGE kép alapján azonosíthassam a felülűszóban, hanem mennyiségét pontosan és egyszerűen mérhessem fluoriméterrel mind a sejteken kívüli oldatban, mind a sejtekben. A kapott intenzitásértékek alapján (amik arányosak az ES-GFP-koncentrációval) kiszámíthatom, hogy a termelt fehérjemennyiség hány százaléka jut ki a sejt belsejéből, így információt kaphatok az export hatékonyságáról. Ezt módosítatlan export-szignálú minták adataival összevetve megállapíthatom a kivágott szakasz jelentőségét.

3. FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. SZÜKSÉGES VEGYSZEREK ÉS ESZKÖZÖK

A plazmidok vizsgálatához a Biometra gélelektroforézisre alkalmas készülékét, a Sigma által forgalmazott agarózt és a Biotium gélfestékét (GelRed Nucleic Acid Stain, 10.000x in DMSO) használtam. Markerként a Thermo Scientific O'GeneRuler nevű termékét használtam. A PAGE esetében a szintén Thermo Scientific által gyártott *PiercePrestained Protein MolecularWeight Marker*-t alkalmaztam.

A tápoldatok és táptalajok készítéséhez felhasznált LB tápoldat a Scharlau gyártmánya, a szelektív növesztésért ampicillint adtam a tápoldathoz (Ampicillin Sodium Salt – Sigma Aldrich). A baktériumok növesztését táptalajon egy éjszakán át végeztem 37°C-on Thermocenter hőinkubátorban.

A felhasznált eszközöket és LB tápoldatokat, LB-agar táptalajokat SANYO LaboAutoclave (MLS-3780) használatával sterilizáltam 121°-on 20 perc alatt. A baktériumsejtekből a Viogene által gyártott MIDI Kit-tel tisztítottam a plazmidokat. A *Salmonella typhimurium* baktériumok transzformációjához a BioRad elektroporátor készülékét használtam.

Ülepítési lépéseknél az alkalmazott fordulatszámtól függően használtam az alábbi centrifugákat: Eppendorf Centrifuge 5415R, Heraeus Biofuge-pico, Heraeus Biofuge-primor, OptimaTM Ultracentrifuge (Beckman Coulter).

Vizsgálataim során az oldatok készítéséhez és egyéb teendőkhöz Millipore nagytisztaságú desztillált vizet használtam (MQ H₂O).

3.2. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK ELMÉLETI ALAPJA

3.2.1. BAKTÉRIUMOK TRANSZFORMÁCIÓJA PLAZMID DNS-SEL

A transzformáció célja, hogy kívülről plazmidokat juttassunk a baktériumba, és a felvett plazmidról a gének kifejeződjenek [31, 32]. Ehhez ún. kompetens sejtek szükségesek. Ezek olyan sejtek, melyek képesek DNS-t felvenni környezetükből. A sejt kompetenciája mellett a megfelelő pufferoldat, és a plazmid alakja, mérete is fontos tényező. A két

legelterjedtebb transzformálási módszer a hősokk technika és az elektroporáció. Munkám során én is ezeket alkalmaztam.

A hősokk transzformáláshoz kémiai kompetens sejteket alkalmazunk. Ezeket Ca^{2+} és Mg^{2+} -ionokkal kezelik, melynek célja, hogy a kalcium ionok hídként összekössék a sejtmembrán felületén levő makromolekulákat és a DNS-t.

Hősokk alkalmazásán egy 1-2 percig tartó hirtelen hőfokemelést (ált. 37 vagy 42°C-ra) értünk. A meleg hatására a membránt alkotó lipidmolekulák elfolyósodnak, a membrán áteresztőképessége megnövekszik. Ekkor a már a sejt felületén megkötött DNS-molekulák nagyobb eséllyel bejuthatnak a sejtbe hőmozgásuk révén, mint ha csak közegben oldott állapotban lennének jelen.

Az elektroporálás során a DNS-t és a baktériumokat tartalmazó szuszpenziót egy több ezer voltos elektromos kisülésnek tesszük ki, ami pórusokat nyit a baktérium falán. A DNS így juthat be a sejt belsejébe, és amikor a sejt membránja regenerálódik, a DNS már benn marad. Ennél az eljárásnál elektrokompetens sejteket használunk, amelyeket előzetesen elektromos vezetőktől mentes oldatokkal mosunk. Ez általában desztillált vízből és valamilyen krioprotektív anyagból (pl. glicerin) áll. A vezetőktől (pl. ionok) való mentesség azért lényeges, mert különben az elektrosokk alkalmazása során rövidzárlat keletkezne, és a transzformálódás elmaradna.

3.2.2. GÉLELEKTROFORÉZIS

A gélelektroforézis azon az elven alapul, hogy a töltéssel rendelkező molekulák elektromos térben az ellentétes töltésű elektróda felé vándorolnak [33, 34]. A vándorlás sebessége függ a molekula töltésétől, tömegétől és alakjától, továbbá az elektromos térerősségtől és a gél anyagi minőségétől is. Ha egy molekula mérete kicsi a pórusokhoz képest, akkor gyorsan mozog, míg ha nagyobb (azonos töltés, alak mellett) lassabban. Hasonlóképpen, azonos méretű és alakú molekulák közül a nagyobb töltésű vándorol gyorsabban az ellentétes töltésű elektród felé. Ezek a tulajdonságok teszik lehetővé, hogy különböző minőségű és pórusméretű gélekben az eltérő tulajdonságú biomolekulákat elválasszuk egymástól.

Az SDS-PAGE (SDS: nátrium-dodecil-szulfát, PAGE: Poliakrilamid-gélelektroforézis) a fehérjék elválasztásának egyik leggyakoribb módszere. Az elválasztáshoz használt poliakrilamid gél az elválasztandó molekulákkal nem reagál és egyben molekulaszűrő is.

Ha a fehérjét csupán molekulatömegük alapján akarjuk elválasztani (kiküszöbölve pl. a molekula-alak hatásait), akkor a fehérjét denaturálnunk kell. Erre szolgál a nátrium-dodecil-szulfát (SDS). A fehérje-oldathoz hozzáadott SDS elhasítja a hidrogén-hidakat, semlegesíti a fellépő hidrofób kölcsönhatásokat, és végeredményben kitekeri a fehérjét. A fehérjének az aminosavak számával arányos, nagy negatív össztöltése lesz. Ha a fehérje diszulfidhidakat tartalmaz, akkor azokat is redukálnunk kell, pl. merkaptotetanollal.

A legtöbb fehérje elektroforetikus mobilitása SDS-poliakrilamid gélben logaritmikusan arányos a tömegével. Így, ha ismert molekulatömegű fehérjék (markerek) is rendelkezésünkre állnak, akkor a módszer különböző fehérjék azonosítására is alkalmas.

Az SDS gélelektroforézist a felülúszóban jelen lévő ES-GFP fehérje kimutatására használtam, emellett alkalmas a sejtkultúráim vírusmentességének ellenőrzésére is.

A DNS-ek elválasztása hasonlóan, de agaróz alapú gélen történik. Az agaróz a vörösmoszatok agar-agarjának egyik poliszacharid összetevője, mely a D-galaktóz és 3,6-anhidro-L-galaktopiranoz lineáris polimere. Agaróz gélben néhány 10 bp-tól több 10 kbp-ig terjedő méretű DNS molekulákat lehet szétválasztani. A DNS molekula össztöltése a negatív töltésű cukorfoszfát gerince miatt egyenesen arányos a hosszúságával. Ezért egy vízszintesen elhelyezett agaróz gélben a pozitív pólusa felé vándorló DNS molekulák sebessége arányos lesz a hosszukkal.

Az agaróz 0,5-2%-os oldata forralással készül. Dermedéskor az agaróz térhálós szerkezetű lesz. A forralást követően a gélhez fluoreszcens festéket is adunk, amely a DNS-hez kötődve azt UV fényben láthatóvá teszi. Régebben etídium-bromidot alkalmazták erre a célra, azonban ez erősen mutagén hatású, ezért manapság más, biztonságosabb festékek is kaphatók helyette.

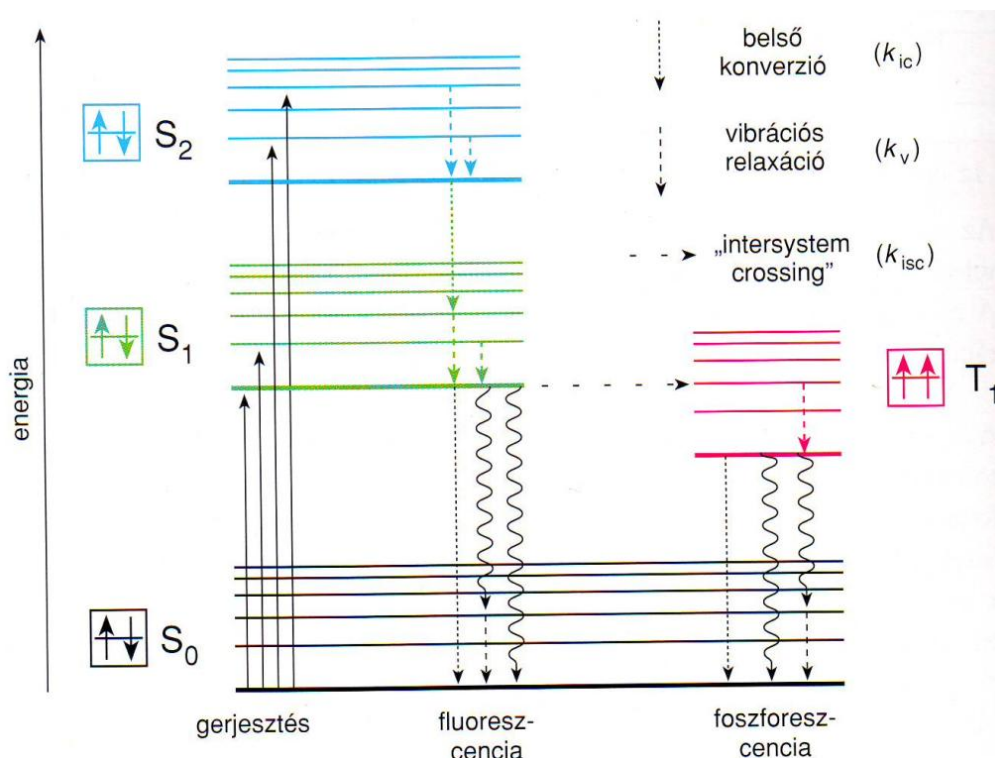
Minden egyes mintához ún „loading dye”-t is adunk, ami egyrészt nagyobb sűrűsége révén a zsebek alján tartja a mintákat, ill. futtatáskor figyelemmel kísérhetjük, hogy hol tart az elektroforézis. A megfuttatott gél végül UV fénnel világítjuk meg, ekkor a gélhez adott fluoreszcens festéknek köszönhetően világítani fognak a DNS sávjai a gélben. A láthatóvá vált DNS sávokat ki is vághatjuk a gélből további tisztításra, felhasználásra.

Az elektroforézishez az egyik leggyakrabban használt puffer a Tris-EDTA-bórsav (TEB). A puffer ionerőssége fontos tényező a DNS elektroforetikus mobilitása szempontjából. Túl alacsony ionerősségnél a DNS csak lassan képes haladni, míg ha túl magas az ionerősség, akkor a vezetőképesség is növekszik. Így azonban túl sok hő képződik, a megnövekedett hőmozgás fokozza a diffúziót, ami miatt a sávok kiszélesednek, a DNS-minták akár részben denaturálódhatnak, végül a gél is megolvadhat.

A DNS molekulák alakja itt is jelentősen befolyásolja a mobilitást. A cirkuláris/relaxált plazmid formák széttekeredtségük miatt lassabban haladnak, mint az erősen kondenzált, szuperhelikális DNS-ek, a linearizált plazmidok sebessége pedig a kettő közötti. Ezért a fehérjék elválasztásához hasonlóan itt is szükséges lehet denaturáló-szer (pl. karbamid) alkalmazása.

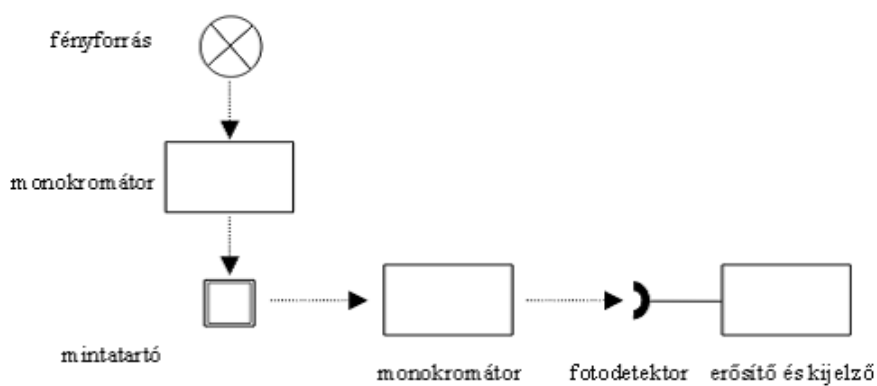
3.2.3. FLUORIMETRIA

A fluorimetriás mérés alapja, hogy az anyagot (monokromatikus) fénnel besugározva, annak elektronjai a fotonoktól energiát felvéve gerjesztődnek (abszorpció), -magasabb, a környezettel való egyensúlynak nem megfelelő elektron, és vibrációs szintre kerülnek [35]. Ahhoz, hogy az egyensúly visszaállhasson, az elektroneloszlásnak vissza kell térnie az alapállapotba. A lehetséges energia-leadási utakat szemlélteti a Jablonski diagram (7. ábra). A gerjesztett molekula (függetlenül attól, hogy melyik szingulett állapotba gerjesztettük) először igen gyors átmenetekkel az S_1 elektronállapot alap vibrációs szintjére kerül (Kasha-szabály), innen azonban többféle úton juthat az alapállapotba (S_0). Ezek közül az egyik lehetőség, ha a többletenergiát foton formájában kibocsátja (emisszió), ezt hívjuk lumineszcenciának. Két fajtáját különböztetjük meg, ha az emisszió folyamán történik spinváltás foszforeszcenciáról, ha nem, fluoreszcenciáról beszélünk. A kettőt spektrumuk és időbeli lecsengésük alapján különíthetjük el. A fluoreszcencia-foton energiája a foszforeszcencia-fotonénál nagyobb (de az abszorbeáltnál kisebb). A fluoreszcencia spektrum a kisebb hullámhosszak (vörös) felé tolódik el a besugárzott fényhez képest. Élettartama 1 ns - 10 μ s.



7. ábra: Példa a gerjesztési átmeneteket bemutató Jablonski-diagramra [35].

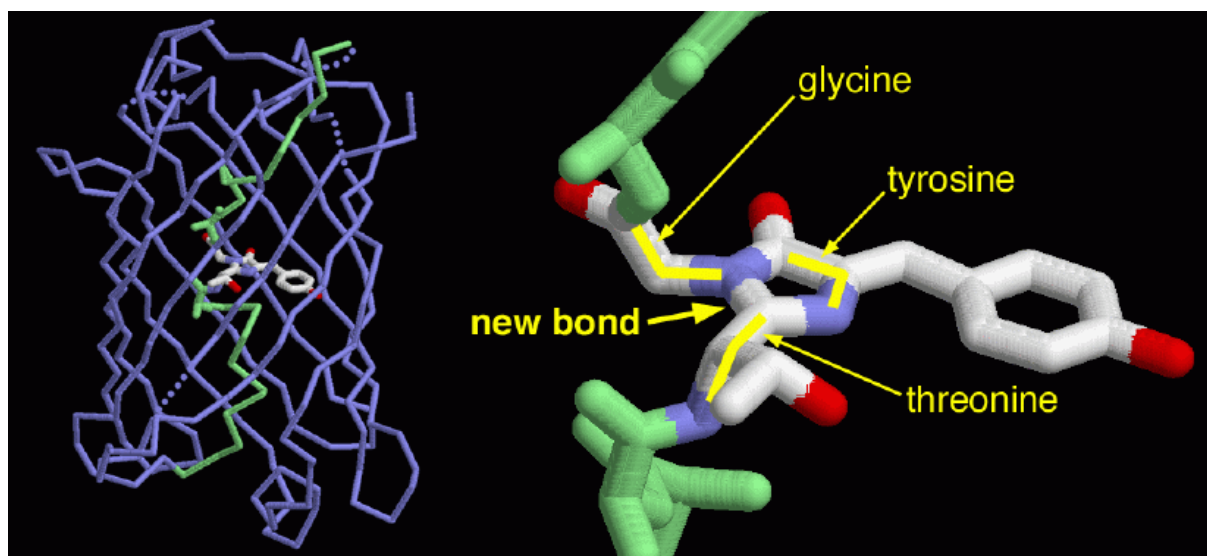
Az emisszió a besugárzás irányától függetlenül, minden irányban történik, detektálni azonban a gerjesztő sugárra merőleges irányból célszerű (így kerül a lehető legkevesebb zavaró foton a számlálóba).



8. ábra: A fluoriméter vázlatos felépítése [36]

A fényforrásból érkező (majd monokromatizált) fény gerjeszti a mintatartóban levő fluoreszcens anyagot. A minta a többlet-energiáját foton formájában kisugározza minden irányban. A detektálást a besugárzásra merőleges irányban végezzük, így a legkisebb a gerjesztő fény zavaró hatása.

Méréseim során a detektálást az export-szignálhoz kapcsolódó GFP (zöld fluoreszcens fehérje) tette lehetővé (9. ábra). Ez egy 238 aminosavból álló, 26,9 kDa tömegű molekula, mely kék (475 nm) és ultraibolya (396nm) fénnel gerjeszthető, és 508 nm hullámhosszon bocsát ki maximális intenzitású zöld fényt [37]. Ez a tulajdonsága a különleges szerkezetének köszönhető, melyben három aminosav egymással egy delokalizált elektronrendszerű gyűrűs komplexet képez: a Ser-65, Tyr-66 és Gly-67, melyek külön-külön nem, de így együttesen képesek fényelnyelésre, majd az elnyelt fény energiáját újra kisugározva a fehérje világít.



9. ábra: GFP szerkezete a molekula közepén a fluoreszcenciáért felelős három aminosav alkotta kromofórral [38].

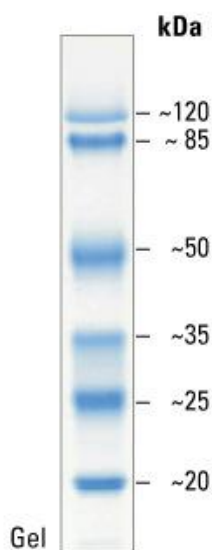
4. AZ ELVÉGZETT KÍSÉRLETEK LEÍRÁSA

4.1. A MUNKA FOLYAMAT ÖSSZEFOGLALÁSA

Az előre elkészített plazmidmintákat hősokk-technikával *E. coli* TOP10 törzsbe juttatva szaporítottam fel, majd tisztítottam (Qiagen Midiprep). Az előállított plazmidok mennyiségét agarózgél-elektroforézissel ellenőriztem. A friss plazmidokat *Salmonella typhimurium* SJW2536 törzsbe elektroporáltam, ami nem tartalmazza a flagellin génjét, azaz saját flagellin-termelésre nem képes. Az így elkészített sejtekből ampicillines táptalajra szélesztettem. Az elkészült lemezekről mintatelepeket választottam és leoltottam 3 ml LB-be. Egy éjszakán át növesztettem 37 °C-on, 290 rpm rázatás mellett.

A maradék tenyésztel kétféle vizsgálatot végeztem. Mindegyik esetén az SJW2536 törzsből növesztett tenyészetet használtam negatív próbaként (nem tartalmaz GFP-t), és a vizsgált plazmidokkal analóg, „pKOT ES-GFP” kódnevű plazmiddal (mely a teljes export-szignált módosítatlanul tartalmazza) készült sejt kultúrát használtam pozitív próbaként, mivel ennek felülűszójában már előzőekben bizonyítottan van ES-GFP fúziós fehérje [29].

Az első vizsgálathoz a tenyészet 1 ml-ének felülűszójából TCA-val (trikloro-ecetsav) kicsaptam a fehérjéket. Ezeket poliakrilamid-gélelektroforézissel (PAGE) analizáltam. A fehérjék azonosításához egy a 20-120 kDa tartományt felölelő markert (10. ábra) használtam (*Thermo Scientific Pierce Prestained Protein Molecular Weight Marker*) viszonyításként, mivel az ES-GFP-FliC (C46) fehérje molekulatömege 38,6 kDa.



10. ábra: *Thermo Scientific Pierce Prestained Protein Molecular Weight Marker* gélképe, a sávoknak megfelelő kDa értékekkel

Az előhívott géleken látható, hogy az adott minta tartalmaz-e ES-GFP fúziós fehérjét és a sáv intenzitásából a koncentráció is becsülhető, emellett a kultúra vírusmentességének ellenőrzésére is alkalmas.

A tenyészet maradékával fluorimetriás mérést végeztem. Ám annak érdekében, hogy az ezzel a módszerrel mért értékek összehasonlíthatók legyenek, előbb megmértem a sejt kultúrák optikai sűrűségét 600 nm hullámhosszon (OD_{600}). Ennek lényege, hogy a fotométerrel 600 nm hullámhosszon mért abszorbancia nagysága arányos egy adott térfogatban jelenlevő sejtek számával.

Ez után a kultúrák 1 ml-ét 40000 rpm sebességgel 15 percig fugáltam. Két minta készült belőle: az egyik a leszívott felülúszó, a másik az (1 ml) tápoldatban szuszpendált csapadék (pellet). Az egyikkel a felülúszóba kijutott ES-GFP mennyiségét mértem, a másikkal a sejtek belsejében (pellet) maradtat. Ennél a mérésnél arra kerestem a választ, hogy milyen a fehérje megoszlási aránya a felülúszó és a sejtek belseje között, azaz a módosított export-szignál milyen hatékonysággal képes kijuttatni a fehérjét a sejtől az eredetihez képest. A mintákat tízszeresükre hígítva fluoriméterrel vizsgáltam 500-600 nm hullámhosszon, 1 másodperces átlagolási idővel. A gerjesztési hely 488 nm-nél volt, a gerjesztési és az emissziós ablakot is 5 nm szélességűre állítottam.

A GFP csúcsát az előzőeknek megfelelően 508-510 nm közé vártam. Előzetesen felvettem az azonosan hígított tápoldat fluorimetriás görbáját is, mely ezen a tartományon egy szélesedő csúcsot tartalmazott az 520 nm helyen. Ezzel a háttérrel a mért értékeket korrigáltam.

A műveleteket a következő protokollok szerint végeztem:

4.2. PLAZMIDOK SOKSZOROSÍTÁSA *E. COLI* TÖRZSBEN ÉS A DNS TISZTÍTÁSA

A kutatócsoport által korábban elkészített plazmidokat *E. coli* TOP10 törzsből felszaporítottam. Ebből kémiai kompetens sejtek álltak rendelkezésemre, azaz a plazmid vektorokat hősokk technikával tudtam bejuttatni.

Ezt a következő protokoll szerint végeztem: Előkészítettem a jeget, SOC tápoldatot a vízfürdőt (Lab-Line Multi BlockHeater) felmelegítettem 42°C-ra. A -80°C-on tárolt TOP10 törzset (50 µl) jégbe állítva kiengedtem, majd 0,5 µl plazmidot adtam hozzá, és pipettaheggyel óvatosan megkevertem. 30 percen át hagytam jégen állni, ez idő alatt a plazmid-sejt elég jól elkeveredhetett egymással, és a plazmidoknak volt alkalma kapcsolódni

a sejtmembránhoz a Ca^{2+} -ionok segítségével. 90 s időtartamra az előmelegített vízfürdőbe helyeztem a mintákat, azaz hősokkot alkalmaztam. A sejteket visszatettem a jégre 2 percre, majd 500 μl SOC tápoldatba oltottam őket és $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 290 rpm-mel rázatva, 1 órán át inkubáltam. 50 ill. 450 μl -rel ampicillines LB-táptalajra szélesztettem, és a lemezeket egy éjszakán át $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltam.

Mivel csak az a sejt ampicillin-rezisztens, amelyik sikeresen felvette a plazmidot, így a telepek biztosan olyan sejtekből állnak, melyek osztódásukkor a plazmidokat is sokszoroztják. Ezekből 5 ml steril LB-tápoldatba leoltottam, és 8 órán át $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, 290 rpm-en rázatva inkubáltam (STARTER). Az így előállított STARTER-t 150 ml steril LB-tápoldatba átoltottam, és másnap reggelig a már ismertetett módon inkubáltam.

Ez idő alatt a felszaporodott kóli-baktériumok elegendő plazmidot termeltek ahhoz, hogy érdemes legyen azt kinyernem. Ezt a DNS-tisztítási folyamatot ún. Midiprep Kittel végeztem, az abban leírt használati útmutató szerint. 150 ml tenyészetet 6000 xg-n fugáltam, 15 percen át, $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on (HeraeusBiofuge primo R). A csapadékról leszívtam a felülúszót, a visszamaradt pelletet felszuszpendáltam 6 ml P1 pufferben (LyseBlue-t tartalmaz, ezért rázni, vortexelni kell a teljes szuszpendáláshoz, és minden pipetázás előtt újra fel kell rázni). 6 ml P2 puffert adtam hozzá, és a csövet 4-6-szor átfordítva jól elkevertem az elegyet, míg kék színű és homogén lett. Szobahőmérsékleten 5 percig inkubáltam, közben előkészítettem a QIAfilterCartridge-ot, amit egy Falcon-csőbe állítottam. 6 ml hűtött P3 puffert adtam a lizátumhoz, és azonnal elkevertem a csövet 4-6-szor felfordítva. Az elegyet a QIAfilterCartridge-ba öntöttem, 10 percig állni hagytam. A HiSpeed Midi nevű részbe (ez tartalmazza az elválasztó oszlopot) 4 ml QBT puffert tettem, és hagytam, hogy magától átcsepegjen a gravitáció hatására. A QIAfilter kupakját lecsavarva óvatosan belehelyeztem a dugattyút és tartalmát a HiSpeed Midi-be fecskendeztem. (A nem oldódó sejtmaredek a fecskendőben maradnak.) Megvártam, míg az oszlopra juttatott folyadék lecsepeg. (A DNS az oszlopon marad.) Az oszlopot 20 ml QC pufferrel mostam (tisztítási lépés). Végül a DNS-t az oszlopról 5 ml QF pufferrel eluáltam egy tiszta csőbe. 3,5 ml izopropanolt adtam hozzá és 2 percig szobahőn inkubáltam. Ez idő letelte után 16000 xg sebességgel 30 percig $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fugáltam. Leszívtam a felülúszót, és a cső alján maradt csapadékot 3 ml 70%-os etanolban felszuszpendáltam. Ezt újra lefugáltam 16000 xg-vel 5 percig $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A felülúszót ismét leszívtam, a DNS-t (a csapadék) 10 percig szárítottam. Végül 100 μl TE pufferben szuszpendáltam, és negyed órán át $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottam, hogy biztosan feloldódjon. (Ha van benn nem oldódó darabka, azt nagy sebességgel 1 percig szobahőn fugálással lehet eltávolítani.) A kész plazmidot hosszútávú felhasználásra $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on kell tárolni.

4.3. AGARÓZ GÉL KÉSZÍTÉSE ÉS FUTTATÁSA

A tisztított plazmidok mennyiségét és tisztaságát agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. Az előhívás után megjelenő sávok helyéből láthatom, hogy a plazmidok megfelelő méretűek-e (valóban a megfelelő plazmidokat sokszorosítottam) és a sávok erősségéből becsülhető a DNS-koncentráció a mintában. Erre azért van szükség, mert ha a koncentráció nagy, kevesebb térfogatú minta hozzáadása szükséges, mikor a plazmidokat kompetens sejtekbe juttatom elektroporálással, míg hígabb minták esetén ugyanannyi sejthez többet kell majd adnom, ha ugyanolyan hatékony bejutási arányt szeretnék.

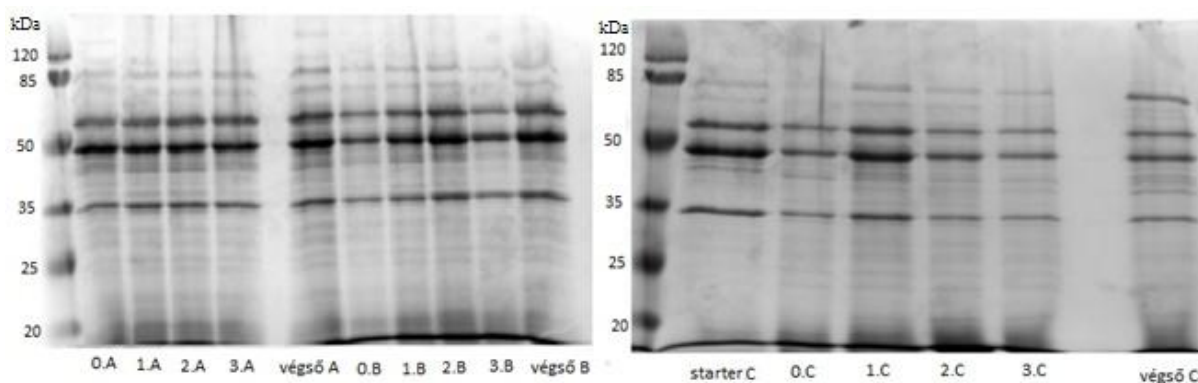
Az elektroporálást 1%-os agaróz gélben végeztem. Ezt úgy készítettem el, hogy 0,35 g agarózt és 35 ml 1xTEB-et összemértem egy kisebb méretű Erlenmeyer-lombikban. Az elegyet 300 Watton kb. 1 percig melegítettem mikrohullámú sütőben, majd addig kevergettem, míg az agaróz teljesen feloldódott. Ezután megvártam, míg a homogén oldat annyira lehűl, hogy szabadkézzel is meg tudtam fogni. Ekkor hozzáadtam 3,5 µl GelRed festéket. Miután ismét jól elkevertem, a vízszintes öntőformába öntöttem. Ebbe előzetesen már belehelyeztem a fésűt, amit a dermedt gélből óvatosan kiemelve hátramaradnak a minták betöltésére szolgáló zsebek. A gél dermedési ideje kb. 1 óra volt. A megdermedt gélből a fésűt kivettem és az öntőforma keretét óvatosan leválasztottam. A gél a TEB pufferral töltött futtatókádba helyeztem, majd a mintákat a zsebekbe töltöttem. Középre 3 µl-t vittem fel az O'GeneRuler nevű DNS-markerből (Thermo Scientific). Mellé két oldalra vittem fel a saját plazmid-mintáimat. Ezek 2 µl-éhez 8 µl desztillált vizet és 2 µl 6x Orange LD (loadingdye)-t adtam. 100 Volt feszültséget alkalmazva addig futtattam a mintákat, míg a frontvonal a gél végére ért. A kész gél UV fény alatt vizsgáltam, és elektronikusan dokumentáltam.

4.4. ELEKTROKOMPETENS SEJTEK KÉSZÍTÉSE

Az elkészített és leellenőrzött génkonstrukciót egy olyan baktériumba kellett ezután transzformálnom, amely a plazmid által kódolt fúziós fehérje expressziójára alkalmas. Erre a *Salmonella typhimurium* SJW2536 törzset használtam. Ezeket először elektrokompétenssé kellett tennem.

20 ml LB-tápoldatba leoltottam SJW2536 glicerines tenyészetből. Ezt 37 C°-on, 280 rpm sebességű rázatás mellett inkubáltam egy éjszakán át. Ez szolgált starterként a nagyobb mennyiségű kultúra előállításához. A művelet elvégzéséhez szükséges egyéb anyagokat és eszközöket autoklávban sterilizáltam. Ezek: 100 ml LB (20g táppor / liter hígítással), 55 g 10%-os glicerinoladat (49,5 g dH₂O+5,5 g tiszta glicerin, Eppendorf csövek, pipettahegyek, megfelelő méretű pipetták. A sterilitás különösen fontos ennél a műveletnél, hiszen az elkészült kompetens sejtek a kiindulási alapjai lesznek az elkövetkező vizsgálatoknak. Ha a sejt kultúrák már ekkor szennyeződnek vagy vírussal fertőződnek, az ellehetetleníti a további munkát.

Másnap a startert steril 100 ml LB tápoldathoz adtam, és körkörös rázóban rázatva 37 C°-on 2-3 órán át inkubáltam OD₆₀₀≈1-ig. A tenyészetet 50 ml-es hűtött falcon centrifugacsövekbe (zárható, steril műanyagcső) pipettával kettéosztottam. Mivel a kompetens sejtek hőérzékenyek, csak akkor állítható elő hatékony tenyészet, ha ezután az összes lépés során az elegyet, eszközöket és tárolóedényeket végig jégen tartom. Az 50 ml-es kultúrákat 5 perc jégen pihentetés után 10 percig centrifugáltam 6 C°-on 4000 rpm sebességgel (Heraeus Biofuge primo R). Lepipettáztam a felülúszót, a csapadékot szuszpendáltam 10-10 ml 4 C°-os 10%-os steril glicerinoladatban. A két elegyet egybepipettáztam és újra centrifugáltam a már leírt módon. A csapadékot 20 ml jéghideg glicerinoladatban szuszpendáltam, majd a centrifugálási lépést még kétszer ismételtam, egyszer 10 ml majd végül 400 µl jéghideg glicerinoladatban szuszpendálva a csapadékot. Az így kezelt minták nem tartalmazznak vezető anyagokat (ionok), ill. a sejteket a fagykártól a glicerin védi. A mintákat jégbehűtött 1,5 ml-es Eppendorf-csövekbe porcióztam 50 µl-enként és felhasználásig -80 C°-on tároltam. A vírusmentesség ellenőrzésére minden mosási lépés után, és a végtermékből is 10 µl-t 2 ml LB-be oltottam, és az ebből készített mintákat PAGE segítségével vizsgáltam (11. ábra).



11. ábra: A felhasznált elektrokompetens sejtek gélképei, előállítási lépésenként.

A gélek az elkészült elektrokompetens sejtek szennyezés és fertőzés mentességét igazolják.

A gélek első zsebébe markert vittem fel, mely ismert molekulatömegű fehérjéket tartalmaz.

Háromszor készítettem elektrokompetens sejteket. Az 1. mérési sorozat adatai „0.A”-tól „végső A”-ig, a „2. 0.B”-től „végső B”-ig, a 3. sorozat „starter C”-től „végső C”-ig tart. A starter megjelölés a közvetlenül inkubátorból kivett sejt kultúrára vonatkozik. A 0. sorszám az első fugálás előtti állapotban vett minta, az 1., 2., 3. az 1., 2. ill. 3. fugálás után vett minta. A „végső” megjelölés a végtermékeket jelöli.

4.5. SEJT-TRANSZFORMÁLÁS ELEKTROPORÁLÁSSAL

Az elkészített elektrokompetens sejtek már alkalmasak arra, hogy a plazmidokat felvehessék. Ehhez a -80°C -on tárolt 50 μl -nyi kompetens sejteket jégre helyezve kiengedtem, majd 1 μl DNS-t pipettáztam hozzá és pipettahegygel körkörösén óvatosan megkevertem, majd a biztos homogenitás eléréseért még 1 percig jégen tartottam. Steril elektroporáláshoz használható küvettákat és SOC tápoldatot is jégen hűtöttem. A sejt-elegyet (2 mm-es) küvettába pipettáztam át, és az elektroporátorba (Bio-RAD GenePulserXcell) helyeztem. Time Constant Protocolt használva, 2500 V elektrosokkot alkalmaztam, 10 ms időtartamig. A program végeztével a sejtekhez azonnal 500 μl SOC tápoldatot adtam. Az elegyet tenyészcsőbe steril, műanyag pasteur-pipettával átpipettáztam és 1 órán át 37°C -on, 300 rpm rázatás mellett inkubáltam. Végül az elegyből 50 ill. 450 μl -t ampicillint tartalmazó LB táptalajra szélesztettem. Egész éjszakás inkubálás után (37°C -on, 280 rpm rázatás mellett) ezeken a lemezekon nőtt telepekből ampicillines tápoldatba leoltva, azokat inkubálva kaptam a vizsgálandó mintáimat.

4.6. FEHÉRJÉK KICSAPÁSA TCA-VAL

Az előzőeknek megfelelően felnövesztett kultúrákból 1,5-1,5 ml-t centrifugacsövekbe töltöttem és 22 000 rpm sebességgel 10 °C-on 15 percig fugáltam (Beckman Coulter –Optima™ MAX-E Ultracentrifuge). A fugálási csapadékról óvatosan leszívtam a felülúszót és jégbe hűtött eppendorf csövekbe töltöttem. 67 µl TCA-t (trikloro-ecetsav) adtam hozzájuk, és az elegyet pipettával körkörösén óvatosan megkevertem. 15 percig jégen tartottam őket, ezalatt a TCA kicsapta a mintában található fehérjéket. 10 percig 13 000 rpm sebességgel, 6 °C-on (Eppendorf Centrifuge 5415R) centrifugáltam. A felülúszót óvatosan lepipettáztam. A fehérje-csapadékot kétszer szuszpendáltam (vortexszeléssel) 330 µl 100%-os acetonban, és minden mosás után újra lefugáltam (a már leírt beállításokkal). Végül a felesleges acetont eltávolítottam, a csapadékot pár percig szárítottam. Az így kinyert fehérjéket gélelektroforézishez készítettem elő. A csapadékot feloldottam 16 µl MP-ben (Minta Puffer) és 2 µl 1M-os Tris (pH=8,0) pufferben. Az egyenletes elkeveréshez pillanatfugáltam (BIOSAN Combi-Spin FUL-2400N), vortexszeltem, majd ismét fugáltam. A megfelelő pH-n a festékanyag kék színű. Ha alapos elkeverés után valamelyik oldat zöld vagy sárga, még 2 µl Tris-puffert adtam hozzá a megfelelő pH eléréséhez. Végül 10 percig forraltam lobogó vízfürdőn.

4.7. SDS-POLIAKRILAMID GÉLELEKTROFORÉZIS

Az előkészített mintákat SDS-PAGE-sel vizsgáltam. Ehhez először 12%-os poliakrilamid gélre öntöttem. Mivel az akrilamid mérgező, a műveletet kesztyűben végeztem, és ügyeltem arra, hogy folyékony formába ne kerüljön a lefolyóba.

Az akrilamid gélhez szükséges előre elkészített oldatok: Szeparáló gél: 2,8 ml A puffer (182 g Tris-HCl + 4g SDS / liter, pH 8,8)+21,75 ml MQ H₂O+15,75 ml 40%-os akrilamid oldat; Koncentráló gél: 6,3 ml B puffer (61 g Tris-HCl+ 4g SDS / liter, pH 8,8)+15,9 ml MQ H₂O+2,825 ml 40%-os akrilamid oldat; Futtatópuffer: 30,3 g Tris+14g Glicin+ 10g SDS / liter tízszeresen hígítva. A gélek festését Staining Solution-nal végeztem, ami 1 g ComassieBlue R-250 festéket, 300 ml MeOH-t, 50 ml cc.ecetsavat és 650 ml MQ H₂O-t tartalmaz. Az előhíváshoz használt oldat: Destaining Solution (/liter): 300 ml MeOH+50 ml+ cc.ecetsav+650 ml MQ H₂O.

A gélt a következő arányok szerint készítettem:

12 %-os Szeparáló gél (per gél):

- Szeparáló gél (alap) 4 ml
- APS 20 μ l
- TEMED 2 μ l

A Szeparáló gél alapját előzőleg keverjük ki és a hűtőben tároljuk felhasználásig. Tartalmazza az SDS-t, akrilamidot és megfelelő pH-jú puffert. Az APS (ammónium perszulfát) spontán bomlásából szabadgyökök keletkeznek, melyek megindíthatják az akrilamid polimerizálódását. Ez a folyamat azonban lassú, a TEMED (N-tetrametil-etiléndiamin) hozzáadásával gyorsítható az által, hogy a TEMED az APS bomlásából felszabaduló gyököket stabilizálja, így azok hatékonyabban reagálhatnak az akrilamiddal.

Az elkészült oldatot öntőkeretbe fogott üveglapok közé pipettáztam. Az üveglapok között 0,75 mm rés van, ez lesz a megdermedő gél vastagsága. A gél fölé vizet rétegeztem, hogy ne alkosson meniszkuszt, hanem fázishatára vízszintes legyen. A gél dermedési ideje kb. 1 óra. A megszilárdult gélről a vízréteget papírral leitattam mielőtt a következő gélréteget felvittem volna. Az a következőképp készült:

4%-os Koncentrálo gél (per gél):

- Koncentrálo gél (alap) 1,67 ml
- APS 10 μ l
- TEMED 2 μ l

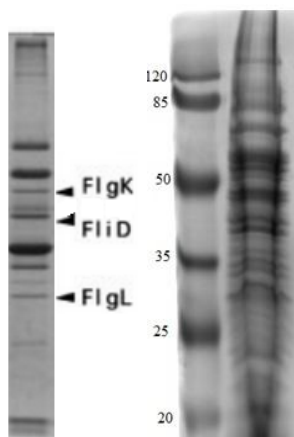
A folyadékkal színig töltöttem a lemezt és óvatosan belehelyeztem a fésűt, melyet a megszilárdult gélből kiemelve kaptam a mintáim betöltésére szolgáló zsebeket. Ez a felső, Koncentrálo gél igen híg, a fehérjék elválasztására nem alkalmas. Arra szolgál, hogy az egyes zsebekbe felvitt minták egyformán gyorsan haladjanak a kétféle gél határáig, és ott aztán egy időben kezdjék meg vándorlásukat az alsó, Szeparáló gélben.

Az elkészült gélt futtatókádba helyeztem és a kádat megtöltöttem a futtatópufferrel (a gélek közt színig, kívül csak feléig). A gél zsebeibe pipettáztam a mintákat. Az első zsebbe 3 μ l, a fehérjéim méretének megfelelő markert tettem (ladder). 30 mA/gél áramot alkalmazva addig futtattam a mintákat, míg a mintapufferben levő festék, a minták frontvonala a gél aljára ért.

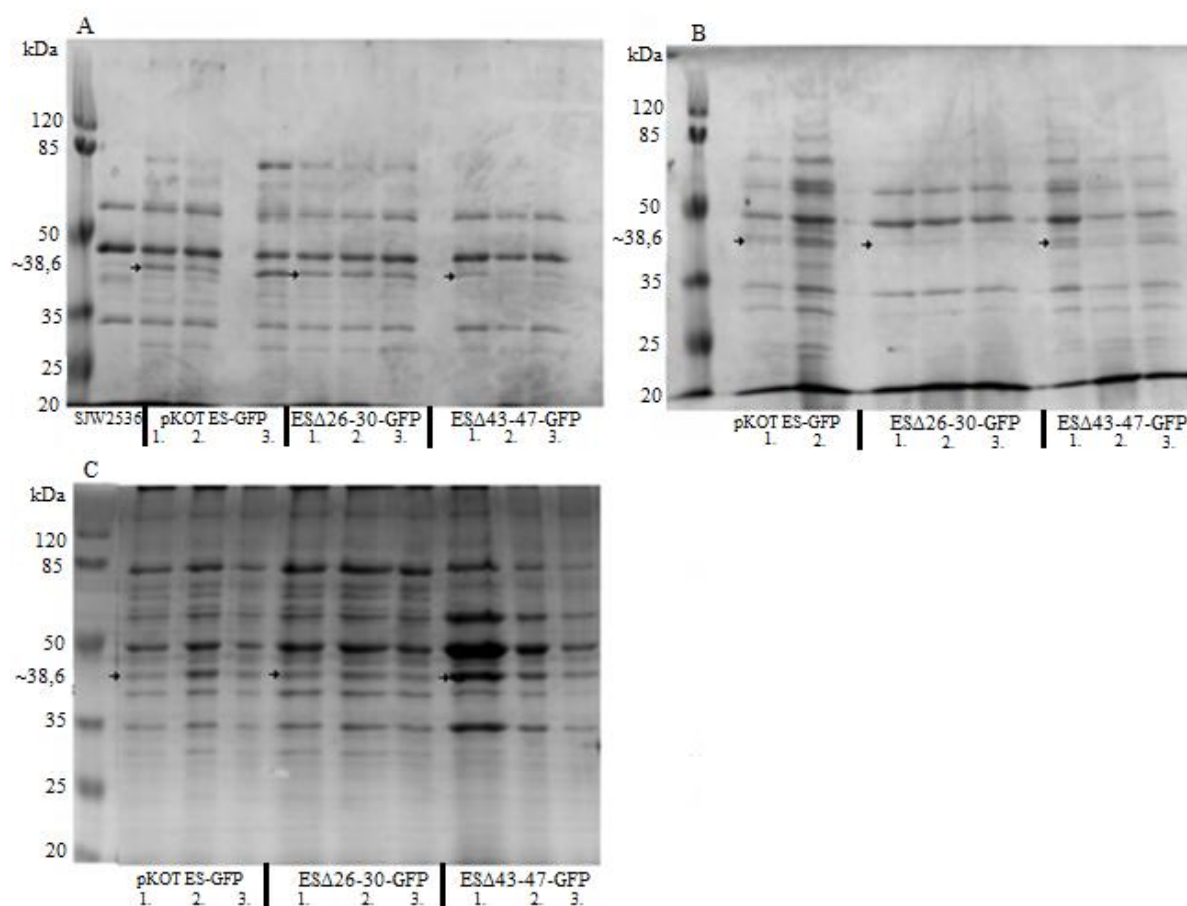
Ekkor a fehérjék sávjai a gélben még nem láthatók, ezeket egy festési eljárással elő kell hívni. Ehhez Comassie Blue festéket tartalmazó metanolos-ecetsavas oldatot használtam.

A kék színű festék a fehérjékhez kötődik, előhívó, mosófolyadékba áthelyezve a festék a gélből kimosható, kivéve a fehérjék által megkötött molekulákat.

Először a gél festő folyadékban (StainingSolution) áztattam, ez után a festő folyadékot kicseréltem az előhívó folyadékra (DestainingSolution). Folyamatos rázatás mellett hagytam ázni addig, míg a minták sávjai jól láthatóvá váltak. A kész géleket elektronikusan dokumentáltam. A minták akkor tekinthetők vírusmentesnek, ha mintázatuk jó egyezést mutat a 12. ábrán bal oldalt láthatóval, ami a SJW2536 gélképe [39]. A mintáink ettől abban különböznek, hogy 38,6 kDa-nál megjelenik az ES-GFP fúziós fehérje sávja. Intenzitásából előzetes becslés tehető a GFP mennyiségére, ám mivel a sávok általában igen halványak, ennek hibája igen nagy. Ezért mennyiségi meghatározáshoz nem a gélképeket használtam fel, inkább csak a GFP meglétéről, és a sejtek szennyezésmentességéről bizonyosodtam meg általuk. A GFP mennyiségét fluoriméterrel pontosabban lehet mérni. Ha a sejtek vírusosak, akkor lizálódnak, így a sejt összes fehérjéje a felülúszóba kerül (12. ábra, jobb oldal). Ekkor nem kaphatunk információt az export hatékonyságáról.



12. ábra: Balra: a tiszta *Salmonella typhimurium* SJW2536 törzs gélképe [39].
Jobb oldalon: a fertőzött sejtekre jellemző gélkép



13. ábra: A vizsgált sejtkultúrákból készült fehérjeminták gélképei, a GFP tartalom és a szennyezésmentesség igazolásához.

A): 2014. 08. 05-i kísérletek. 1. zseb: protein molekulatömeg marker, 2. zseb: SJW2536 (negatív próba), 3.-5. zseb: pKOT ES-GFP párhuzamos mérések (1.,2.,3.) 6.-8. zseb: ESΔ26-30-GFP párhuzamos mérések (1.,2.,3.) 8.-10. zseb: ESΔ43-47-GFP párhuzamos mérések (1.,2.,3.)

B): 2014. 08. 06-i kísérletek. 1. zseb: protein molekulatömeg marker 2.-3. zseb: pKOT ES-GFP párhuzamos mérések (1.,2.) 4.-6. zseb: ESΔ26-30-GFP párhuzamos mérések (1.,2.,3.) 9.-11. zseb: ESΔ43-47-GFP párhuzamos mérések (1.,2.,3.)

C): 2014. 10. 22-i kísérletek. 1. zseb: protein molekulatömeg marker 2.-4. zseb: pKOT ES-GFP párhuzamos mérések (1.,2., 3.) 5.-7. zseb: ESΔ26-30-GFP párhuzamos mérések (1.,2.,3.) 8.-10. zseb: ESΔ43-47-GFP párhuzamos mérések (1.,2.,3.)

A módosítatlan ES-GFP kb.38,6 kDa méretű. A deléciós módosulatok (ESΔ26-30-GFP és ESΔ43-47-GFP) valamivel kisebbek: 38,15 ill. 38,2 kDa. A megfelelő méretű sávok (fekete nyilakkal jelölve) megléte bizonyítja, hogy a felülírtakban van kijutott ES-GFP fúziós fehérje. A gélképek mintázata alapján a kiindulási sejtkultúrák fertőzésmentesek.

4.8. FLUORIMETRIÁS MÉRÉS

Ennél a mérésnél arra kerestem a választ, hogy milyen a fehérje megoszlási aránya a felülúszó és a sejtek belseje között - azaz a módosított export-szignál milyen hatékonysággal képes kijuttatni a fehérjét az eredetihez képest.

Ehhez a tenyészetekből 1 ml-t készítettem elő, úgy hogy 40 000 rpm fordulatszámon 15 percig fugáltam, majd leszívtam a felülúszót. A centrifugacső alján maradt csapadékot, a pelletet a felülúszóval azonos mennyiségű, azaz 1 ml tápoldatban szuszpendáltam. A felülúszóban mért GFP mennyiség arról ad információt, hogy mennyi fehérje jutott ki a sejtéből, a pellet a sejtben maradt mennyiséget adja meg. Mivel a GFP igen erősen fluoreszkál, ezek a minták a méréshez még igen tömények lettek volna. Ezért az így elkészült törzsoldatokból egy keveset tízszeresére hígítottam NaCl-Tris-EDTA (pH=8,0) pufferrel, és úgy mértem.

A mérést 500-600 nm hullámhosszon 1 s átlagolási idővel végeztem. A gerjesztési hely 488 nm-nél volt, a gerjesztési és az emissziós ablak is 5 nm szélességűre lett állítva. Ezek a beállítások megegyeztek a korábban a pKOTES-GFP-re végzett hasonló vizsgálatokéval [29], így az általam kapott értékeket az ott közölt adatokkal is összehasonlíthattam.

A GFP csúcsát 508 nm körül vártam. Előzetesen felvettem az azonosan hígított tápoldat fluorimetriás görbéjét is, mely ezen a tartományon egy szélesedő csúcsot tartalmazott az 520 nm helyen. Ezt a háttérrel minden mért görbéből kivontam.

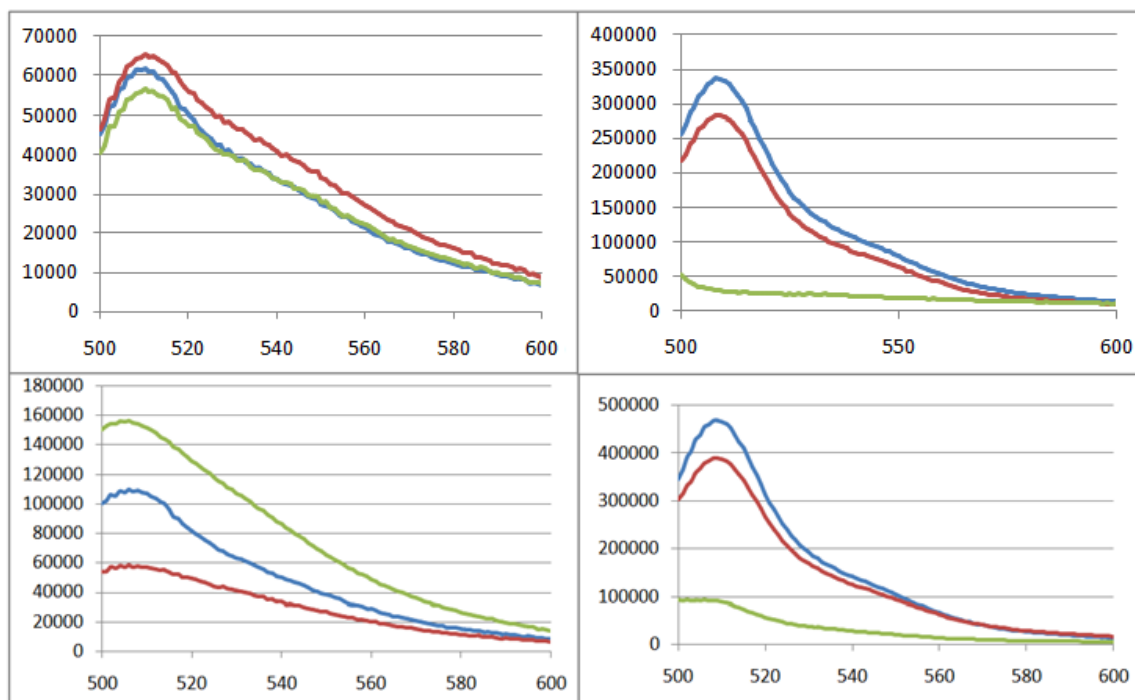
Első kísérleteim során még nem mértem meg a sejt kultúrák OD_{600} értékét. Ennek oka az volt, hogy a termelés mértékére nem voltunk kíváncsiak, csak a termelt fehérjemennyiség megoszlására a felülúszó és a pellet között. Ez az arány a termelt GFP abszolút mennyiségétől független. Azonban néha azt tapasztaltam (főként aESΔ43-47-GFP mintáknál, de esetenként a többinél is), hogy a sejtek valamiért nem termelték megfelelő mennyiségben az ES-GFP-t (kb. 1/7 részét a várnak). Ennek oka ismeretlen, vizsgálatát megnehezíti látszólag szabálytalan előfordulása. Emiatt célszerűvé vált a mért intenzitásokat $OD_{600}=1$ -es értékre normálni (vagyis a kapott intenzitásokat a mért sejtsűrűséggel osztani). Így a kapott csúcsértékek is jobban összehasonlíthatóak.

5. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Többször végeztem mérési sorozatokat a három féle minta (pKOT ES-GFP, ESΔ26-30-GFP és ESΔ43-47-GFP) mindegyikére. Ezek közül a 08.05-én és 08.06-án és a 10.22-én mért minták szolgáltatottak megbízható adatokat. Minden felhasznált minta géliképe alapján vírusmentes, és megjelenik a GFP-nek megfelelő méretű sáv is (12. ábra).

A 10.22.-i mintákhoz rendelkezésre állt OD_{600} adat is, ezért az ezekből kapott eredmények pontosabbnak tekinthetők a pKOT ES-GFP-re és a ESΔ26-30-GFP módosításra. Az ESΔ43-47-GFP minták esetében azonban kevés fehérje termelődött. Ennek ellenére az egyik mintában még felismerhető volt a (csökkent intenzitású) GFP-csúcs, így ez alapján a felülúszó-pellet megoszlási arány számítható volt. (A másik két mintában bár a korrekció után maradt intenzitásértékek azt mutatták, hogy lehet benn GFP, nem volt látható egyértelmű csúcs, így a csúcstarték hiányában nem számolhattam megoszlási arányt sem. Ezért ezeket a méréseket nem használtam fel.)

Régebbi, optikai sűrűségadattal még nem rendelkező mintáim (08.05. és 08.06-i minták) között azonban volt három olyan ESΔ43-47-GFP minta, melyek a mért fluorimetriás intenzitások alapján normál termelést mutattak. Így erről a módosításról is van kellő mennyiségű adat.



14. ábra: Az átlagos intenzitásértékek ábrázolása a hullámhossz függvényében.

Fent: 10.22-i adatok alapján (OD_{600} -ra normált), balra: felülúszó, jobbra: pellet

Lent: 08.05. ill. 08.06-i adatok alapján, balra: felülúszó, jobbra: pellet

A színek jelentése:

- pKOT ES-GFP
- ESΔ26-30-GFP
- ESΔ43-47-GFP

A kapott görbék értékeinek átlagolásával (a különböző export-szignálú mintákra) kaptam a fentebb látható ábrákat (14. ábra). Emellett a korrekció után kapott görbék csúcserőit és helyét minden esetben feljegyeztem. Adott mintára kiszámítottam, hogy az összes termelt GFP mennyiség (ami a két csúcserővel jellemezhető) hány százaléka volt a felülúszóban és mennyi maradt a pelletben. Ezeket egy-egy fajta mintára átlagoltam (1. és 2. táblázat). A hiba nagyságát a szórások kiszámításával jellemeztem. Az így kapott értékekkel már jellemezhető az export-szignál módosulatok hatékonysága.

A)

Minta	Maximum helye (nm)	Maximum intenzitás	%
SJW2536 1. f. u.	521	71482	-
SJW2536 1. p.	500	81146	-
SJW2536 2. f. u.	521	121322	-
SJW2536 2. p.	500	153570	-
pKot ES-GFP 1. f.u.	508	268852	20,30
pKot ES-GFP 1. p.	509	1055815	79,70
pKot ES-GFP 2. f.u.	506	202069	17,44
pKot ES-GFP 2. p.	509	956733	82,56
ESΔ26-30-GFP 1. f.u.	506	157213	18,71
ESΔ26-30-GFP 1. p.	508	683249	81,29
ESΔ26-30-GFP 2. f.u.	504	93444	8,62
ESΔ26-30-GFP 2. p.	509	990666	91,38
ESΔ43-47-GFP 1. f.u.	504	376045	64,47
ESΔ43-47-GFP 1. p.	506	207248	35,53
ESΔ43-47-GFP 2. f.u.	506	334039	65,35
ESΔ43-47-GFP 2. p.	506	177101	34,65
ESΔ43-47-GFP 3. f.u.	506	297093	56,17
ESΔ43-47-GFP 3. p.	506	231818	43,83

B)

Minta	%	szórás	átlagos %
pKot ES-GFP 1. f.u.	20,30	2,02	18,87
pKot ES-GFP 2. f.u.	17,44		
ESΔ26-30-GFP 1. f.u.	18,71	7,13	13,66
ESΔ26-30-GFP 2. f.u.	8,62		
ESΔ43-47-GFP 1. f.u.	64,47		
ESΔ43-47-GFP 2. f.u.	65,35	5,07	62,00
ESΔ43-47-GFP 3. f.u.	56,17		
pKot ES-GFP 1. p.	79,70	2,02	81,13
pKot ES-GFP 2. p.	82,56		
ESΔ26-30-GFP 1. p.	81,29	7,13	86,34
ESΔ26-30-GFP 2. p.	91,38		
ESΔ43-47-GFP 1. p.	35,53		
ESΔ43-47-GFP 2. p.	34,65	5,07	38,00
ESΔ43-47-GFP 3. p.	43,83		

1. táblázat: A 2014. 08. 05/06-i sejt kultúrákból készített felülúszó (f.u.) és pellet (p.) minták fluorimetriás adatai

A) Ebben a táblázatban adtam meg a kapott intenzitás-görbe maximumának helyét és intenzitását, és az egyes sejt kultúráknál az összesen termelt GFP százalékos megoszlását (a maximum intenzitások alapján számítva).

B) Az A) rész megoszlási arányait az ES-mutánsok egyes fajtáira átlagoltam. A mérések szórását is feltüntettem.

A)

Minta	Maximum helye (nm)	Maximum intenzitás	%
SJW2536 f. u.	527	26208	-
SJW2536 p.	500	38166	-
pKot ES-GFP 1. f.u.	511	65848	15,50
pKot ES-GFP 1. p.	508	358972	84,50
pKot ES-GFP 2. f.u.	509	70314	16,85
pKot ES-GFP 2. p.	508	347011	83,15
pKot ES-GFP 3. f.u.	508	49650	14,05
pKot ES-GFP 3. p.	508	303658	85,95
ESΔ26-30-GFP 1. f.u.	510	83536	21,92
ESΔ26-30-GFP 1. p.	508	297507	78,08
ESΔ26-30-GFP 2. f.u.	510	52008	17,55
ESΔ26-30-GFP 2. p.	509	244413	82,45
ESΔ26-30-GFP 3. f.u.	510	60362	16,43
ESΔ26-30-GFP 3. p.	509	306963	83,57
ESΔ43-47-GFP f.u.	509	55808	66,22
ESΔ43-47-GFP p.	509	28471	33,78

B)

Minta	%	szórás	átlagos %
pKot ES-GFP 1. f.u.	15,50		
pKot ES-GFP 2. f.u.	16,85	1,40	15,47
pKot ES-GFP 3. f.u.	14,05		
ESΔ26-30-GFP 1. f.u.	21,92		
ESΔ26-30-GFP 2. f.u.	17,55	2,90	18,63
ESΔ26-30-GFP 3. f.u.	16,43		
ESΔ43-47-GFP f.u.	66,22	-	66,22
pKot ES-GFP 1. p.	84,50		
pKot ES-GFP 2. p.	83,15	1,40	84,53
pKot ES-GFP 3. p.	85,95		
ESΔ26-30-GFP 1. p.	78,08		
ESΔ26-30-GFP 2. p.	82,45	2,90	81,37
ESΔ26-30-GFP 3. p.	83,57		
ESΔ43-47-GFP p.	33,78	-	33,78

2. táblázat: A 2014. 10. 22-i sejt kultúrákból készített felülúszó (f.u.) és pellet (p.) minták fluorimetriás adatai

A) Ebben a táblázatban adtam meg a kapott intenzitás-görbe maximumának helyét és intenzitását, és az egyes sejt kultúráknál az összesen termelt GFP százalékos megoszlását (a maximum intenzitások alapján számítva).

B) Az A) rész megoszlási arányait az ES-mutánsok egyes fajtáira átlagoltam. A mérések szórását is feltüntettem.

Mivel az adatok igen nagy hasonlóságot mutatnak még a különböző időpontokban készült minták esetében is, kijelenthető, hogy az adatok jól reprodukálhatóak, és valóban alkalmasak a módosított export-szignál hatásának jellemzésére.

Az adatok alapján megállapítottam, hogy az 26.-tól a 30. aminosavig tartó deléción nem változtatja meg az export hatékonyságát. Az átlag görbéken is látható, hogy a módosítatlan (pKOT ES-GFP) és az ESΔ26-30-GFP minták hasonlóképp viselkedtek, a termelt GFP mennyisége is jó egyezést mutat. Mindkét változat esetében a GFP kb.15%-a juthat ki a felülúszóba, a többi a sejt belsejében gyűlt fel. Hasonló mérést a viszonyítási sejtek (pKOT ES-GFP) esetében már végeztek [29], az ott szereplő intenzitások alapján számítva a felülúszóban az összeg 19,4%-a volt. Ez az érték megfelel az általam mértegyes eredményeknek, vagyis a méréseket sikeresen reprodukáltam. Ezek alapján kijelenthető, hogy a flagellin 26-30 szakasza valószínűleg nem része az export-szignálnak.

Az ESΔ43-47-GFP minták esetében az eredmény meglepő értékeket mutatott. Előzetes feltételezésünk az volt, hogy ha a megváltoztatott rész valóban az export-szignálhoz tartozik, és annak működéséhez szükséges, akkor a módosított változat kevésbé hatékonyan tudja majd kijuttatni a felülúszóba a fehérjét, ezért annak aránya növekszik a pelletben. Ehelyett azonban azt láthatjuk, hogy az ESΔ43-47-GFP minták esetében a felülúszóban mért ES-GFP mennyisége elérte, vagy akár meg is haladta a másik két minta eredményét. Azonban normál termelés esetén is lényegesen kevesebb, csak feleannyi ES-GFP képződött, mint a pKOT ES-GFP és az ESΔ26-30-GFP minták esetében. Vagyis a termelt fehérje nagy része, kb. 65%-a kijutott a felülúszóba, és a sejtek belsejében alig maradt. Ennek oka még további kutatást igényel, de az kijelenthető, hogy a 43. aminosavtól a 47.-ig tartó deléción nagyban befolyásolta az export-tulajdonságokat, tehát ennek a szakasznak fontos szerepe lehet a flagellin export-szignáljában. Egyik lehetséges magyarázat a megnövekedett kijutási arányra az, hogy a 43.-47.szakasz szerepe negatív regulátorként szabályozni a fehérjetranszport maximális ütemét. Ugyanakkor, ha a sejtekben maradó GFP inklúziós testeket alkot, a jelenség magyarázata az is lehet, hogy a 43.-47.szakasz hiánya miatt a fehérje oldhatóbbá válik – ezáltal növelve a kijutás esélyét. Ezért következő lépésként az inklúziótest-képződés vizsgálatát tervezem.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A bakteriális flagellumot felépítő fehérjék a citoplazmában szintetizálódnak majd a III. típusú flagelláris exportrendszer segítségével, egy 2 nm átmérőjű belső csatornán át jutnak el beépülési helyükre, a flagellum végére. Az exportálandó (axiális) fehérjék közös tulajdonsága terminális régiók rendezetlensége. Mivel a fehérjék *N*-terminális részükkel előre vándorolnak a belső csatornában, már korábban feltételezhető volt, hogy az export-szignálnak itt kell elhelyezkednie. A flagellin esetében az erősen konzerválódott Gly26-Gly47 szegmensét azonosították, mint az export-szignál helyét.

Az export-apparátus akkor is felismeri és a sejten kívülre juttatja a fehérjét, ha az export-szignáljuk mögé egy, a sejt számára idegen fehérjét kapcsolunk. Ennek a gyakorlati alkalmazásban nagy jelentősége van, hiszen ha a baktériumok által szintetizált fehérjét a sejtek felülúszójából tudjuk tisztítani, az a terméket feldolgozó lépések számát csökkenti. Így nagyobb tisztasággal és gyorsabban nyerhető ki a fehérje, hiszen nem szükséges a sejteket lizálni, majd a terméket a többi sejtalkotótól szeparálni. Ez a gyakorlat azonban megköveteli az export-szignál működésének megértését, és pontos helyének, egyes szakaszai funkciójának felderítését.

Kutatásom célja a Gly26-Gly47 szakasz további szűkítése, ill. annak vizsgálata volt, hogy egyes darabjait eltávolítva a módosítás hogyan hat az exportra. Dolgozatomban az export-szignálnak egy az *N*- és egy a *C*- terminális végén öt aminosavval megrövidített módosulatát tanulmányoztam (ES Δ 26-30-GFP és ES Δ 43-47-GFP), és hasonlítottam össze az eredeti export-szignál hatékonyságával.

Megállapítottam, hogy a Δ 43-47 módosítás jelentősen befolyásolta az exportot, ami arra utal, hogy ténylegesen az export-szignálhoz tartozik. Pontos szerepe azonban további kutatásokat igényel. A Δ 26-30 módosítás gyakorlatilag nem befolyásolta a transzportot, ezáltal az export-szignált tartalmazó szakaszt a 31-47-ig tartó szegmensre szűkítettem. Ezzel egy lépessel közelebb kerültünk a flagelláris export-szignál működésének megértéséhez, és hatékonyabb felhasználásához a citoplazmában termeltetett fehérjék sejten kívül juttatására.