

PhD értekezés tézisei

Az mRNS export faktor TAP biokémiai és szerkezeti vizsgálata, valamint a virális CTE RNS-sel történő interakciója

LIKER ÉRIKA

Témavezető: Dr. Elena Conti

Európai Molekuláris Biológiai Laboratórium
Heidelberg, Németország

2002

BEVEZETÉS

Az eukarióta RNS-ek a sejtmagból, a transzkripció helyéről a citoplazmába, a funkció helyére transzportálódnak. Ez a transzport olyan faktorok közreműködésével jön létre, amelyek egyedi RNS szállítmányokat ismernek fel, és exportálnak. A különböző osztályokba tartozó RNS-ek nukleáris exportját specifikus faktorok irányítják. Az U snRNS-ek, a tRNS-ek, mRNS-ek és rRNS-ek nem versenyeznek egymással az export terén, ami arra enged következtetni, hogy a különböző típusú RNS-ek különböző export utakat járnak be.

A sejtek mRNS-einek nukleáris exportja igen szelektív folyamat, mivel csak a teljesen processzáladott RNS-ek exportálódnak. A splicingon nem teljes mértékben átesett pre-mRNS-ek és a kivágódott intronok a sejtmagban maradnak. Ezzel ellentétben retrovírusok esetén ahhoz, hogy a virális replikáció megtörténhessen, szükség van a splicing folyamaton át nem esett vagy csak részleges intron kivágódáson túljutott RNS transzkriptumoknak a gazdasejt citoplazmájába történő exportjára is. A retrovírusok ahhoz, hogy legyőzzék ezt a nukleáris retenciót, olyan *cis* RNS elemeket kódolnak, amelyek a nem érett RNS számára export szignálként funkcionálnak, és a sejt transzport rendszeréhez kapcsolódnak. Az egyik ilyen elem, a simian típusú D retrovírusok *cis* konstitutív transzport eleme (CTE) közvetlenül kapcsolódik a celluláris TAP fehérjéhez.

A humán TAP egy 70 kDa-os multidomén protein. A C-terminális rész a nukleáris pórus komplex komponenseihez kötődik, míg az N-terminális rész a CTE-RNS-hez és különböző RNS kötő fehérjékhez kapcsolódik. A CTE-RNS egy kiterjedt stem-loop szerkezettel rendelkezik, amely két belső, egymással megegyező hurkot foglal magába. Ezek a hurkok tükör szimmetrikusan helyezkednek el az RNS elemen. A belső hurkok szekvenciája konzervált, és ezek a hurkok szolgálnak a celluláris TAP fehérje interakciós helyéül. A simian típusú D retrvírusok intron kivágódáson át nem esett genomiális RNS-ének nukleáris exportjában beöltött szerepén túl a TAP fehérje a celluláris mRNS exportjában is közreműködik. Különböző kísérletek bizonyítják azonban, hogy a TAP interakciója a virális és celluláris RNS-ekkel különböző: míg a retrovírus RNS-hez közvetlenül kötődik, addig a celluláris RNS-hez valószínűleg adapter molekulákon keresztül kapcsolódik.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során a TAP – CTE-RNS interakció molekuláris szintű elemeinek meghatározását tűztem ki célul biokémiai és biofizikai módszerekkel. Ehhez kitűnő segítséget nyújt a Röntgen krisztallográfia. Ahhoz, hogy a Röntgen krisztallográfiához megfelelő vizsgálati anyagot szolgáltatassunk, előzetesen biokémiai módszerekkel meg kell találnunk a fehérjének azt a

minimális doménjét, amely a vad típusú fehérjével összevethető mértékben és specificitással képes az RNS-t megkötni. Meghatároztuk a legmegfelelőbb expressziós rendszert és fehérje tisztítási módszert, melyek segítségével a TAP fehérje minimális CTE-kötő doménjét kellő mennyiségben és tisztaságban képesek voltunk előállítani. A Tev proteáz hasító hellyel rendelkező GST fúziós *E. coli* expressziós vektor használatával, az affinitás és ioncserélő kromatográfia alkalmazásával képesek voltunk a baktérium sejtekből mg-nyi mennyiségű tiszta proteint előállítani literenként. A megfelelő mennyiségű és tisztaságú fehérje kinyerése után a kristályosítási kísérletek következtek, több száz kristályosítási körülmény kipróbálásával. Miután sikerült olyan kristályokat kapni, amelyek megfelelő felbontásban diffraktáltak, a szinkrotronban nyert diffrakciós adatokból a szerkezetet meghatároztuk. A szerkezeti információk segítségével mutagenézis vizsgálatok alapján igyekeztünk betekintést nyerni a funkció molekuláris alapjaiba.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A TAP fehérje expressziója és tisztítása

A TAP 102-372 protein fragmentumot glutation-S-transzferázzal (GST) fuzionáltatva *E. coli* BL21(DE3) sejtekben overexpresszáltuk. A GST és a TAP fehérje egy Tev proteáz hasító hellyel van összekötve, amely lehetővé teszi a tisztítás után a GST lehasítását. A baktérium kultúrát 37 °C-on LB táptalajon növesztettük, és 0,7 OD₆₀₀-nál 0,5 mM IPTG-vel indukáltuk, majd még négy órán át növesztettük. A hat liter kultúrából származó, centrifugálással összegyűjtött sejteket 150 ml A pufferben (50mM Tris-HCl pH 8,0, 100mM NaCl, 10% glycerin, 1 mM EDTA) 0,5 mg/ml lizozimmal és 1mM PMSF-fel felszuszpendáltuk és -80°C-on tároltuk. Felolvasztás után a sejteket szonikálással lizáltuk, az oldhatatlan anyagot 17000 rpm sebességgel

lecentrifugáltuk. Az oldható frakciót egy 5 µm-es fecskendőszűrőn átszűrtük, majd A pufferben equilibrált glutation gyöngyre tettük. A GST-TAP-ot redukált glutationnal eluáltuk, és 4 mM β-merkaptotetanolt tartalmazó A pufferben egy éjszakán át dializáltuk. A fúziós fehérjét 4°C-on 36 órán keresztül Tev proteázzal hasítottuk, majd a kationcserélő oszlopra tettük (Macroprep HiS, Bio-Rad), amelyet előzetesen A pufferrel equilibráltunk. A lehasított GST-t az oszlopról lemostuk, majd a tiszta TAP fehérjét 1 M NaCl-ot tartalmazó A puffer lineáris gradiensevel eluáltuk. Egy liter *E. coli* kultúrából több mint 10mg tiszta fehérjét nyertünk, amelyet 40 mg/ml koncentrációban B pufferben (20 mM Hepes pH 7,0, 100 mM NaCl, 10% glicerin) tároltunk. A többi TAP fragmentumot is hasonló módon expresszáltuk és tisztítottuk.

RNS *in vitro* transzkripció

A CTE-RNS T7 RNS-polimerázzal történő transzkripciójához a plazmidokat HindIII restrikciós enzimmel linearizáltuk, fenoloztuk, és etanollal kicsaptuk. A transzkripció reakciót a következő összetételű reakcióelegyen végeztük: 40mM Tris-HCl (pH 8,0), 5mM DTT, 1mM spermidin, 0,01% Triton X-100, 28mM MgCl₂, 4mM minden NTP-ből, 100µM linearizált DNS templát és T7 RNS-polimeráz kísérletileg meghatározott mennyiségben. A semlegesített pH-jú nukleotidokat (Sigma) 100mM oldatban -80°C-on tároltuk. A transzkripció reakcióelegyet két órán keresztül inkubáltuk 37°C-on, majd a templát DNS-t RNáz mentes DNáz I enzimmel (Roche) emésztettük. 0,1 térfogat 0,5M EDTA-t adtunk hozzá, hogy a transzkripció során képződött magnézium-pirofoszfát csapadékot feloldjuk, majd a mintát fenoloztuk, és sómentesítettük egy eldobható PD10 oszlopon (Amersham Biosciences). Végül a mintákat Speed Vac-ban koncentráltuk, hogy elérjük a kívánt töménységet. Az RNS-t 6 vagy 8 %-os denaturáló 8M ureát tartalmazó poliakrilamid gélen és 5 %-os natív poliakrilamid gélen futattuk meg.

Gél-shift jelölt RNS-sel

A gél-shift kísérlethez egy 224 nukleotid hosszú jelölt CTE-RNS próbát használtunk. A kötési reakciót kompetitor tRNS (300ng/µl), hering sperma egyes szálú DNS (30ng/µl) és M36 RNS (0,5µg/µl) jelenlétében *in vitro* transzlált fehérjékkel végeztük. Az M36 RNS ugyanolyan másodlagos szerkezettel rendelkezik, mint a CTE-RNS, de különböző pontmutációknak köszönhetően nem képes kötni a TAP fehérjét, ezért ez a legmegfelelőbb használható nem-specifikus RNS kompetitor. A kötő reakciót 10mM HEPES, pH 7,9, 50mM KCl, 5mM NaCl, 0,1mM EDTA, 10% glicerin, 0,5mM dithiothreitol és 0,025% NP-40 jelenlétében végeztük. A végső minta térfogat 10µl volt. Szobahőn történő 30 perces inkubálás után 1µl 0,2 mg/ml heparint és 0,05% brómfenol kéket tartalmazó oldatot adtunk a reakcióelegyhez, és az

inkubálást még 10 percig folytattuk. A mintákat 5%-os nem denaturáló poliakrilamid gélen (19:1 akrilamid:biszakrilamid arány) futtattuk meg állandó feszültségen (17 V/cm), 4°C-on 0,5x TBE pufferben. A komplexeket autoradiográfiával tettük láthatóvá.

Gél-shift jelöletlen RNS-sel

Ahhoz, hogy a kristályosítási körülményeket utánozzuk, az RNS-kötő kísérleteket jelöletlen RNS-sel és kompetitorok jelenléte nélkül végeztük. Ilyen módon a komplex képződés valós sztöchiometriai viszonyairól nyerhetünk információt. Az RNS kötést vizsgáló kísérlethez 2,5 µg CTE-RNS-t inkubáltunk különböző TAP fehérje fragmentumokkal, 1:1, 1:2 és 1:4 moláris arányban, 10 mM HEPES pH 7,9, 50 mM KCl, 10% glicerin, 0,5 mM DTT és 10 mM MgCl₂ tartalmú pufferben 30 percig, szobahőmérsékleten. A mintákat 5 %-os natív akrilamid géltre vittük fel. A géleket futtatás után toluidin kékkel festettük, alkalmanként kettős festést végeztünk. Toluidin kékkel az RNS-t, míg Coomassie Brilliant Blue-val a fehérjéket tettük láthatóvá.

Kristályosítás és adatgyűjtés

A TAP 102-372 protein fragmentumot gőz diffúziós módszerrel 4°C-on kristályosítottuk. A 20 mg/ml koncentrációjú fehérje oldatot azonos térfogatú 100 mM kakodilát pH 6,8, 18 % (w/v) polietilén glikol (PEG) 8000 és 20 mM EDTA tartalmú pufferrel kevertük össze. A kristályosító lemez edényeibe ugyanez az összetételű puffer került. Egy hét alatt túszerű kristályok jelentek meg, és 50 x 50 x 400 µm méretűre növekedtek. A kristályokat 100 mM kakodilát pH 6,8, 12 % (w/v) PEG 8000, 10 mM EDTA, 20% glicerin tartalmú oldatba téve cseppfolyós nitrogénben hűtött propánban fagyasztottuk le. A kristályok $P4_32_12$ ($a = b = 96,4 \text{ \AA}$, $c = 152,2 \text{ \AA}$) tércsoportba tartoztak, két molekula foglalt helyet az aszimmetrikus egységben, az oldószertartalom pedig 57 %-os volt. Az EMBL-ben levő CuK α Röntgen segítségével csak gyenge diffrakciót és alacsony felbontást kaptunk, míg a szinkrotronban 3 Å-nál is jobb felbontást tudtunk elérni. Az adatokat a Denzo/HKL program csomag segítségével processzáltuk.

A szeleno-metioninnel helyettesített TAP 102-372 fragmentumot hasonló körülmények között kristályosítottuk, amely időnként nagyobb cella egységgel rendelkező bipiramis alakú tetragonális kristályokat eredményezett. Ezek a kristályok a $P4_12_12$ ($a = b = 139,9 \text{ \AA}$, $c = 206,7 \text{ \AA}$) tércsoportba tartoztak, az aszimmetrikus egység négy molekulát tartalmazott, és 70 % oldószertartalma volt. Miután az arzenát tartalmú puffert bisz-trisz-propánra cseréltük a stabilizáló oldatban, az ESFR ID14-4 szinkrotron sugárban a MAD kísérlethez a szelén abszorpciós csúcsa körüli hullámhosszon gyűjtöttünk adatokat. Három adatsort gyűjtöttünk, 3,5 Å, 3,5 Å és 3,15 Å felbontásban, 12666 eV, 12661 eV és 13200 eV hullámhosszon.

AZ EREDMÉNYEK ÉS ÖSSZEFOGLALÁSUK

A CTE-t magában hordozó retrovírus RNS gazdasejtbe történő exportja a celluláris TAP fehérje fragmentumával való közvetlen kapcsolaton keresztül valósul meg. Ennek a munkának a célja az volt, hogy betekintést nyerjünk a TAP-CTE kapcsolat molekuláris alapjaiba. E cél megvalósítása érdekében meghatároztuk a TAP minimális CTE-kötő doménjének Röntgen krisztallográfiás szerkezetét, és ezeknek a szerkezeti adatoknak a segítségével mutagenézis vizsgálatokkal teszteltük a TAP interakciós felszínét.

Az eredményeket összefoglalva arra a következtetésre juthatunk, hogy a TAP minimális CTE-kötő doménje két egymástól független globuláris domént tartalmaz. Az N-terminális domén úgy hajtogatódik és funkcionál, mint egy RNP domén, annak ellenére, hogy nem rendelkezik kanonikus konzervált szekvencia motívumokkal. A C-terminális domén egy LRR-t tartalmazó fehérje fragmentum, amely nem mutat általános RNS-kötő aktivitást, de jelenlétére szükség van a CTE-RNS-hez való specifikus kötődéshez. A két független doménnek a spliceosome komplex U2B'' és U2A' komponenseihez hasonló szerkezeti és biokémiai tulajdonságai vannak. A szerkezetre alapozott mutációk vizsgálatával kimutattuk, hogy az RNP β -sheet platformján helyet foglaló pozitív aminosavak valószínűleg szerepet játszanak az RNS kötésben, az U2B'' és a kanonikus RNP fehérjékhez hasonlóan. Egy, az RNP platform mögött elhelyezkedő hélixen azonosított aminosav fontos szerepet játszik vagy az RNP-

LRR, vagy pedig az RNP-RNS interakcióban. Az LRR domén külső konvex felületén található pozitív töltésű terület valószínűleg szintén szerepet játszik az RNS kötésben, ami arra utal, hogy a CTE-RNS felismerés specifikus, hasonlóan ahogy a U2A' fehérje pozitív töltésű része felismeri az U2 snRNS-t. Ezen hasonlóságok ellenére elképzelhető, hogy a TAP és U2A' LRR doménjének specifikus RNS kötésben betöltött szerepe bizonyos mértékben különbözik. A legnyilvánvalóbb különbség az, hogy míg a CTE-RNS felismeréshez az RNP és LRR domének a flexibilis N-terminális régióval együtt egy polipeptiden helyezkednek el, addig az U2B'' és az U2A' proteinek különálló fehérjeként funkcionálnak. Ezen kívül, a TAP fehérje konkáv felületén elhelyezkedő konzervált aminosavak mutációja nincs hatással az *in vitro* CTE kötésre és az *in vivo* exportra, mint ahogy ezt egy U2B''-U2A' típusú fehérje-fehérje interakciónál elváránk.

Ahhoz, hogy a CTE-RNS – TAP interakció molekuláris részleteibe betekintést nyerhessünk, a komplex kristály szerkezetét kell meghatároznunk. Az RNS mérete miatt ez egy hosszú távú project, és túlmutat ennek a munkának a hatáskörén és időintervallumán. A teljes project részeként meghatároztuk azt a legkisebb CTE-RNS fragmentumot, ami kristályosításra alkalmas, de még mindig rendelkezik TAP kötő aktivitással. Megmutattuk, hogy a kettős „hammerhead” ribozim stratégia alkalmas arra, hogy a transzkripciót úgy hajtsuk végre, hogy az RNS 3' vége homogén legyen, és az 5' végén elkerüljük a nem specifikus nukleotidok jelenlétét. A heidelbergi csoportban a CTE-RNS –

TAP komplex szerkezeti vizsgálata jelenleg is folytatódik ezeknek az eredményeknek a felhasználásával.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A PHD DOLGOZAT A KÖVETKEZŐ PUBLIKÁCIÓN ALAPUL:

Liker, E., Fernandez, E., Izaurrealde, E. and Conti E. (2000) The structure of the mRNA export factor TAP reveals a *cis* arrangement of a non-canonical RNP domain and an LRR domain. *EMBO J.* **19**, 5587-5598.

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK:

Busheva, M., Garab, G., **Liker, E.**, Toth, Zs., Szell, M. and Nagy, F. (1991) Diurnal fluctuations in the content and functional properties of the light harvesting chlorophyll a/b complex in thylakoid membranes. *Plant Physiol.* **95**, 997-1003.

Liker, E. and Garab, G. (1995) Diurnal fluctuation in the composition of chlorophyll a/b light harvesting antenna of photosystem 2 in young wheat leaves. *Physiologia Plantarum* **93**, 187-190.

KONFERENCIA ÖSSZEFOGLALÓK:

Istokovics, A., Lajko, F., **Liker, E.**, Barzda, V., Simidjiev, I. and Garab, G. (1992) Inhibition of the light induced reversible structural rearrangements of the macrodomains and the phosphorylation of membranes by quinone antagonists. *Research in Photosynthesis*, Kluwer Academic Publishers, Vol. II. (ed. Norio Murata) pp. 631-634.

Liker, E., Busheva, M., Nagy, F. and Garab, G. (1993) Diurnal fluctuation in the structure and function of LHCII in wheat thylakoids. 11th International Biophysics Congress July 25-30, 1993 Budapest, Hungary, Book of Abstracts pp. 193.

Liker, E., Cheng, L., Garab, G. and Allen, J.F. (1995) Sensitivity of the phosphorylation of different phosphoproteins to Q₀ and Q_i site inhibitors of the cytochrome b₆/f complex in chloroplast thylakoids. in *Photosynthesis: from Light to Biosphere* (ed: Mathis, P.) Vol.I. pp. 85-89. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.