

Gümő-specifikus NCR peptidek azonosítása, vad és mutáns *Medicago truncatula* gyökérgümők összehasonlító fehérjeanalízise, és az NCR247 lehetséges bakteriális interakciós partnereinek felderítése

Ph.D. értekezés tézisei

Dürgő Hajnalka

Témavezető: Dr. Medzihradszky-Fölkl Katalin

Biológia Doktori Iskola
MTA SZBK Biokémiai Intézet
SZTE TTIK

Szeged

2015

1. Bevezetés

A Rhizobium-baktériumok aerob Gram-negatív baktériumok, a gazdanövényrel szimbiózisban élnek. A kapcsolat mindkét partner számára előnyös, mert amíg a baktérium képes a légköri nitrogén megkötésére és ammóniává alakítására, s így az felhasználhatóvá válik a pillangós virágúak, közvetlen pedig még több növény számára, addig a növény a fotoszintézisből származó szerves anyagokkal látja el szimbiotá partnerét. A mikrobiális élőlények és gazdaszervezeteik közötti szimbiotikus kapcsolatok eredményezhetik egy új, a későbbiekben a szimbiózis folyamatának helyt adó szerv kialakulását, a Rhizobium-fajok a gazdanövény gyökerén hozzák létre ezt a sejtburjánzással keletkező „szervet”, a gyökérgümőt. A gümők belsejében membránnal körülzártan találhatóak az endoszimbiotá életmódú, nitrogénkötést végző, átalakult baktériumok, melyeket bakteroidoknak nevezünk. A Rhizobium-baktériumok csak a pillangósokkal szimbiózisban, a gyökérgümőkben élve tudják a levegő nitrogénjét megkötni, mesterséges táptalajon és a talajban szabadon élő formában nem. A pillangós virágú növények és a baktériumok szimbiózisa soklépéses, bonyolult folyamat eredményeként alakul ki, melynek kiváltó oka a talaj alacsony NH_4^+ szintje, azaz a növény nitrogén-éhsége.

A fertőzés és gümőképzés folyamata egy állandó információ- és „szabályzóanyag” csere a növény és a prokarióta között, melynek egyik jelentős lépése az addig néma növényi gének aktiválódása, a növényi nodulációs gének átíródása. A nodulációs gének bekapcsolásuk ideje szerint két csoportba sorolhatóak: a korai nodulin gének (*Enod*) a növény-baktérium kölcsönhatás kezdeti szakaszában, a késői (*Late-nod*) gének pedig a gümő

kialakulását követően lépnek működésbe. A bakteroid-differenciálódás kiváltó molekulái és irányítói a növény által termelt gümőspecifikus növényi faktorok (Nodule-Specific Peptides, *nsPEPs*). Az *nsPEP*-ek rendkívül nagy számban termelődnek a gümőben. Biokémiai jellemzőik alapján három nagy csoportba sorolhatjuk őket, mi a legnépesebb csoporttal, a gümő-specifikus cisztein-gazdag peptidek (Nodule-Specific Cysteine Rich Peptides, NCR) családjával foglalkoztunk. Genomikai adatok alapján több mint 500 fehérje tartozik ide. Közös jellemzőjük, hogy viszonylag kicsik, 3-10 kDa méretűek, az érett fehérjék általában 30-50 aminosav hosszúak, ehhez kapcsolódik még az éretlen fehérjében a 20-29 aminosavból álló szignál szekvencia. Az érett fehérjében 4 illetve 6 cisztein található konzervált elrendezésben. Izoelektromos pontjuk 3-11 között változhat, tehát kationos, semleges és anionos karakterűek egyaránt vannak közöttük. Szekvencia-homológiát nemigen mutatnak más peptidekkel, de szerkezetük alapján hasonlítanak növényi antimikrobiális peptidekhez, a defenzinokhoz. A szerkezeti hasonlóságból kiindulva további *in vitro* vizsgálatokból kiderült, hogy több NCR peptid rendelkezik antimikrobiális hatással különböző Gram-negatív vagy Gram-pozitív baktériumokon, és különböző patogén gombafajokkal szemben. Kísérletek alapján úgy tűnik, hogy baktériumokkal szembeni toxikus hatásukat leginkább anionos vagy kationos mivoltuk befolyásolja. A kationos NCR-peptidek célpontjai főként a bakteriális membránban találhatóak, míg az anionos NCR-ek a bakteroid citoplazmájában halmozódnak fel. Az NCR-ek egyrészt azáltal fejtik ki antimikrobiális hatásukat, hogy átjárhatóvá teszik a baktériumok sejtmembránját, gátolva azok légzését és szaporodását, lehetséges intracelluláris célpontjaiknak pedig főként a sejtosztódásban szerepet játszó fehérjék bizonyultak.

2. Célkitűzés

Munkánk során a nitrogénkötő szimbiózisban szerepet játszó legfontosabb növényi fehérjék csoportjára, az NCR peptidekre fókuszáltunk. Míg mRNS-szinten már rengeteg információ állt rendelkezésre ezekről a géntermékekről, fehérje-formájában még senki sem azonosította őket. Kérdéses volt, hogy mindezen géntermékek egyáltalán megjelennek-e a bakteroidokban, s ha megjelennek, mikor teszik azt, mennyi lehet az NCR fehérjék féléletideje, s egymásra milyen hatást gyakorolhatnak, stb. Kísérleteinket *Sinorhizobium medicae* (WSM419) és *S. meliloti* (Sm1021) baktériumokkal fertőzött *Medicago truncatula* A17 Jemalong növény indeterminált gümőivel végeztük. A vad típusú növény gyökérgümőinek vizsgálata mellett *M. truncatula* 6V (*dnf7*) mutáns gümőinek növényi és bakteriális eredetű fehérjéit is analizáltuk.

Céljaink az alábbiak voltak:

- 1) Vizsgálódásunk elsődleges célja az volt, hogy a baktériumok transzformálására és irányítására szolgáló növényi-eredetű NCR peptidek jelenlétét kimutassuk a bakteroidokban (*S. medicae*-vel fertőzött vad típusú *M. truncatula* gümőkől). Célunk volt továbbá a detektált szekvenciák alapján a szignál-peptidáz hasítóhelyének igazolása.
- 2) Arról is igyekeztünk információt szerezni, hogy mi lehet a biológiai szerepe ezeknek a polipeptideknek. Ehhez ki akartuk deríteni, hogy:

a) van-e különbség a különböző fejlődési stádiumban levő bakteroidok NCR-tartalmában,

b) mi a különbség a vad típusú és egy adott fenotípussal rendelkező mutáns növény (*M. truncatula* 6V/*dnf7*) gümőinek NCR és bakteriális fehérje tartalmában,

c) mely bakteriális és növény fehérjék hatnak kölcsön egy bizonyítottan antimikrobiális hatású NCR peptiddel.

A fenti célok eléréséhez ki kellett dolgoznunk a megfelelő minta előkészítő eljárásokat, a gümő szöveti szerkezetéből adódóan meg kellett találni a megfelelő módszert a növényi és a bakteriális eredetű sejtek elkülönítésére, majd a bakteroidok anyagának feltárására. Mivel a későbbiekben a vad-típusú növények mellett bizonyos mutánsok gyökérgümőit is vizsgálni szándékoztunk, és össze is kívántuk hasonlítani a kapott eredményeket, ezért az analízis teljes folyamatát ehhez a célhoz igazítottuk.

3. Alkalmazott módszerek

1. Különböző fejlettségi állapotú bakteroidokat eredményező minta-előkészítési eljárások („rövid” és Percoll-grádiensen végzett ultracentrifugálás)
2. Bakteriális sejtfeltárás ultrahangos szonikálással
3. C-terminálisán StrepII- vagy FLAG-tag jelölt NCR247 peptiddel végzett affinitás-kromatográfia
4. Fehérjék gélben és oldatban emésztése
5. Fehérjeazonosítás *LC-MS/MS* analízissel, az adatok kiértékelése Protein Prospector szoftver segítségével két adatbázisból (Uniprot, és egy „házi” NCR-adatbázis)
6. A különböző fejlettségi állapotú minták NCR peptid tartalmának peptidszintű összehasonlítása fitXIC programmal (referencia-lista)
7. Vad és mutáns növény gümőiben felhalmozódó bakteroidok fehérjekészletének összehasonlítása relatív kvantitatív analízissel (spektrumszámlálás)

4. Eredmények

1. Az NCR peptidek fehérjeszintű azonosítását intakt gümőkől és bakteroidokból nyert frakcionálatlan fehérje-elegyből végeztük. A további tisztítást két egymást követő folyamatban végeztük, az első, „rövid” tisztítási folyamat eredményeként egy olyan baktériumelegyet vizsgáltunk, amely az átalakulás összes fázisát képviseli. Az ezt követő Percoll-grádiensen történő centrifugálással a már teljesen differenciálódott bakteroidok frakciója különíthető el. Az intakt gümőből két, a preparációk utáni bakteroid-mintákból 3-3 független biológiai mintát vizsgáltunk, hogy meggyőződjünk eredményeink reprodukálhatóságáról.

Az intakt gümő mintákból a technikai ismétlésekkel összesen ~300 fehérjét tudtunk azonosítani, ezeknek több mint a fele növényi eredetű volt, közöttük 45 NCR peptid.

A rövid tisztítási eljárás után kapott mintákból, a három független biológiai mintát együttvéve, az azonosított fehérjék száma megközelítette a 600-at, ennek 2/3-a bakteriális fehérje volt, a növényi fehérjék közül 118 volt NCR peptid.

Az érett, nitrogén-fixáló bakteroidból, a három egymástól független minta eredményeit együtt kezelve 313 bakteriális fehérjét és 103 növényi eredetű fehérjét azonosítottunk, ebből 75 volt NCR.

A kísérletsorozatban összesen 138 NCR peptidet találtunk. Az intakt gümők analízisének eredményei azt mutatták, hogy az abundáns NCR peptidek detektálhatóak ilyen komplex elegyben is. Azonban a tovább tisztított

mintákból sokkal több bakteriális, valamint növényi NCR fehérjét azonosítottunk, tehát a bakteroidok izolálására mindenképp szükség van. Az azonosított NCR-ek jelentős részénél sikerült az érett peptid N-terminális szekvenciáját detektálnunk, így ezeknél bizonyítást nyert a szignál-peptidáz valós hasítási helye.

Megvizsgáltuk továbbá, hogy van-e különbség a különböző fejlődési stádiumban levő bakteroidok NCR-tartalmában. Miután az automatikus adatgyűjtés során a prekursor ion kiválasztása némiképp esetleges, ezért a két tisztítási eljárásból származó NCR-készlet összevetésekor az MS- és retenciós idő-alapú adat-összehasonlítást választottuk. Az MS-adatokat a fitXIC program segítségével vetettük össze. Egy NCR peptidet abban az esetben tekintettünk a preparálási eljárás szempontjából egyedinek, ha legalább egy triptikus peptidje minimum két ismétlésben detektálható volt, és a másik preparálási eljárás LC-MS kísérleteiben egyszer sem volt detektálva. Ezen kritériumok alapján a következő különbségeket találtuk. 12 NCR peptidet csak a bakteroid-keverék tartalmazta, így ezek a molekulák várhatóan a gümőfejlődés korai szakaszában szükségesek. Öt NCR peptid csupán az érett bakteroid elegyben volt kimutatható, ami utalhat arra, hogy későbbi vagy hosszabban tartó szerepük van a szimbiózis folyamatában.

2. Következő vizsgálatunkban *S. medicae* WSM419 baktériummal fertőzött *M. truncatula* vad típusú és 6V mutánsa gümőinek fehérjekészletét hasonlítottuk össze. A 6V mutánt az teszi érdekessé, hogy az NCR169 gén hiányában légköri nitrogén kötésére képtelenné válik. Ezzel a munkával egy konkrét NCR peptid hatásáról szereztünk fehérje-szintű bizonyítékokat. A kvantitatív értékelést a spektrumszámlálás módszerével végeztük. A két

minta fehérje-tartalmának összehasonlításakor minimum 50% változást tekintettünk szignifikánsnak. Tizenhat olyan fehérjét azonosítottunk a mintákban, amelyek nagyobb mennyiségben voltak jelen a mutáns növényekről gyűjtött gümőkben. Ezek között pillanatnyilag szisztematikus összefüggést nem tudunk kimutatni. Némiképp több, 23 fehérje “tűnt el” vagy mutatott jelentős csökkenést a mutáns gümőkben. A mutánsból jelentős mennyiségben „hiányzó” fehérjék egytől egyig a szimbiózissal és a nitrogén-fixálással összefüggő géntermékek (NifT/FixU family protein, Ferredoxin III 4(4Fe-4S) nif-specific, Nitrogenase protein, Nitrogen fixation protein NifX, stb), NCR vagy GRP peptidek voltak, azaz eredményeink fehérje-szinten igazolják, hogy a 6V mutáns bakteroidjaiban a nitrogén-fixálás nem működik megfelelően. A gél-mintákból származó eredmények aláhúzzák, hogy a fehérjék frakcionálása lehetővé teszi több komponens azonosítását, kvantitatív összevetését, ez azonban inkább a nagyméretű fehérjék esetében működik jól, a kisméretű, kevés triptikus peptidet produkáló NCR fehérjék tapasztalataink szerint „elvesznek” a gélfuttatás során. Az oldatban és gélben emésztést együtt használva kaphatjuk a legteljesebb képet a minta fehérjetartalmáról.

Összesen 139 NCR peptidet azonosítottunk ezekben a kísérletekben. Ezeknek csaknem a felét kizárólag a vad típusú növény gümőiből sikerült kimutatni, míg egyetlen olyan NCR peptidet sem találtunk, ami kizárólag a mutáns növényre lett volna jellemző. Az első kísérlethez képest új NCR-eket is azonosítottunk.

3. Munkánk harmadik részében az NCR247 peptid biológiai szerepére kerestünk választ lehetséges kölcsönható partnereinek azonosításával. Az

NCR247 peptidet -erős hidrofil karaktere és extrém magas izoelektromos pontja miatt évek óta vizsgálják, több publikáció és doktori dolgozat bizonyította eme peptid antimikrobiális hatását különböző Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumokkal és humán patogén gombafajokkal szemben. Transzkriptom-analízis eredményei alapján a peptid génje a gümőfejlődés korai szakaszában termelődik. Az NCR247 kölcsönható partnereinek tömegspektrometriás azonosításához kémiaiilag szintetizált, diszulfid-hidakat nem tartalmazó peptidet használtunk (akárcsak a biológiai hatás tanulmányozásához), amelyet StrepII- vagy FLAG-taggel láttak el a fehérje-komplexek könnyebb izolálása érdekében. *S. meliloti* (Sm1021) baktérium kultúráját és ezen baktériumok *M. truncatula* gümőiből izolált bakteroid formáit vizsgáltuk. *In vitro* kísérleteket végeztünk a megfelelő gyöngyre kötött peptiddel és a baktériumokból vagy bakteroidokból izolált fehérje-elegyekkel. Hét esetben baktériummal, egy esetben bakteroid mintával dolgoztunk, kontroll kísérletek elvégzésével. A baktérium-kultúrákból származó eredményeket összesítve azt kaptuk, hogy a lehetséges interakciós partnereként azonosított fehérjék többségében a riboszómális fehérjék közül kerültek ki, 14 kis és 12 nagy riboszómális fehérje-alegységet azonosítottunk. A riboszómális fehérjék mellett a GroEL bakteriális chaperon, piruvát dehidrogenáz-komplex, transzaldoláz, RNS-polimeráz béta és béta' alegységei, elongációs faktorok és egyéb fehérjék is jelen voltak az affinitáskromatográfiával „kifogott” fehérjekomplexben. A baktérium és bakteroid mintákból származó lehetséges kölcsönható fehérjéket funkcionális csoportokba soroltuk, ez alapján a riboszómális fehérjéken túl transzport fehérjék és nukleotid kötással kapcsolatos fehérjék voltak legnagyobb

számban jelen, mint lehetséges kölcsönható partnerek szabadon élő baktériumból.

A bakteroidokban a GroEL és piruvát dehidrogenáz-komplex, kisebb mennyiségben riboszómális fehérjék kötődtek az NCR peptidhez. Bakteroid mintákban ezen kívül a nitrogénáz komplex elemeit, valamint NCR peptideket is azonosítottunk (NCR028, NCR169, NCR290) kölcsönhatóként. Bakteroid mintából természetesen kevesebb lehetséges fehérjepartneret találtunk, a funkcionális csoportosítás szerint a fent felsoroltakon túl transzportfehérjék és nitrogén-fixálásban szerepet játszó fehérjék is jelentős számban azonosításra kerültek. Az NCR247-GroEL kölcsönhatást több oldalról is megvizsgálva (immuno-precipitációs kísérletek) egyértelművé vált, hogy az NCR247 kötődik a GroEL fehérjéhez, a két fehérje komplexet képez. Biológiailag releváns lehet az is, hogy az NCR247 kölcsönhatásba lép a nitrogén-fixálásban szerepet játszó fehérjékkel és más NCR peptidekkel, bár még nem tisztázott, hogy közvetlenül vagy más fehérjék közvetítésével teszi-e ezt.

5. Összefoglalás

1. Közel 200, genomikai és transzkriptomikai vizsgálatok alapján a fertőzött gümősejtekben expresszálo NCR peptid fehérjeszintű jelenlétét igazoltuk *Medicago truncatula* gyökérgümőiben. A gümők korai és későbbi NCR-készletének azonosításához különböző bakteroid-elegekkel, de teljesen megegyező minta-előkészítési eljárásokkal dolgoztunk, ennek eredményeképp azonosítottunk néhány, a gümőfejlődés kezdeti szakaszára jellemző NCR peptidet.

Az érett polipeptidek közel felénél igazoltuk a prediktált szignál szekvenciát, azaz a várt N-terminust detektáltuk.

2. Vad típusú és 6V mutáns (*dnf7*) (nitrogén-kötésre képtelen) *M. truncatula* gyökérgümők fehérjetartalmának szemi-kvantitatív összehasonlítását végeztük el. Eredményeink azt mutatják, hogy mutáns növényben az NCR169 hiányából következően a nitrogén-kötésben szerepet játszó fehérjék termelése gátolt. A vad típusú növényből azonosítottunk számos olyan NCR peptidet is, amelyek a mutánsból már hiányoztak, valószínűleg a mutációért felelős NCR169 termelődése után lépnek csak akcióba.

3. Az NCR247 antimikrobiális hatású peptid kölcsönható fehérje-partnereit azonosítottuk baktérium és bakteroid mintákban. Nagyszámú riboszómális fehérjét, a GroEl bakteriális chaperont és egyéb fehérjéket, köztük NCR peptideket detektáltunk. A kötődések biológiai relevanciája a riboszómális fehérjék és a GroEl esetében további bizonyítást is nyert.

6. Közlemények

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

Attila Farkas, Gergely Maróti, **Hajnalka Dürgo**, Zoltán Györgypál, Rui M. Lima, Katalin F. Medzihradzsky, Attila Kereszt, Peter Mergaert, and Éva Kondorosi. The *Medicago truncatula* symbiotic peptide NCR27 contributes to bacteroid differentiation through multiple mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, 111, 5183-5188.

IF: 9.809

Hajnalka Durgo, Eva Klement, Eva Hunyadi-Gulyas, Attila Szucs, Attila Kereszt, Katalin F. Medzihradzsky, Eva Kondorosi. Identification of Nodule-Specific Cysteine-Rich Plant Peptides in Endosymbiotic Bacteria.

Proteomics, in press

IF: 3.973

Egyéb publikáció:

Fekete A, Kenesi E, Hunyadi-Gulyas E, **Durgo H**, Berko B, Dunai ZA, Bauer PI. The guanine-quadruplex structure in the human *c-myc* gene's promoter is converted into B-DNA form by the human poly(ADP-ribose)polymerase-1. *Epub* 2012 Aug 6.

PLoS One, IF: 4.092

Összesített IF: 17.874