

**Antimikrobiális hatással rendelkező növényi szimbiotikus peptidek
hatásmechanizmusának vizsgálata, valamint ezen peptidek kölcsönható partnereinek
meghatározás új, éllesztő két-hibrid rendszerre kialakított
S. meliloti ORFeome könyvtár segítségével**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Radvánszkiné Mikuláss Kata

Témavezető: Dr. Kereszt Attila

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémia Intézet

Szeged

2016.

BEVEZETÉS

A talajban található, az α -proteobaktériumok közé tartozó *Rhizobium* baktériumok és a *Leguminosea* családba tartozó hüvelyes növények (pl.: *Medicago truncatula*) között kialakuló nitrogénfixáló szimbiotikus kölcsönhatás során, a gazdanövény gyökerein kialakuló új szervben, a gümőben zajlik a baktériumok bakteroidokká történő differenciálódása és a légköri nitrogén redukálása ammóniává. Az IRLC (Inverted Repeat Lacking Clade) csoportba tartozó növényekben a bakteroidok differenciációja a baktérium sejtek nagymértékű megnyúlásával, a genom minden replikonjának nagyfokú amplifikációjával, detergensekkel szembeni megemelkedett érzékenységgel, membránjaik megváltozott permeabilitásával és osztódási képességük elvesztésével jár együtt. Így ezt a differenciálódási folyamatot egy végső, irreverzibilis folyamatnak tekinthetjük. A *Medicago truncatula* nitrogénfixáló gümőin végzett transzkriptom analízis segítségével azonosították a terminális differenciációért felelős, gümő specifikus ciszteinben gazdag (NCR) peptidek családját, mely több mint 600 tagból áll. Ezek a peptidek kizárólag a nitrogénfixáló gümők fertőzött sejtjeiben expresszálódnak.

A csoportunk által vizsgált NCR gének rövid, 25 – 60 aminosavból álló, szekretált peptideket kódolnak, melyek érett formái négy vagy hat ciszteint tartalmaznak konzervált pozíciókban. Szerkezetük alapján hasonlóságot mutatnak a skorpió toxinjával, és a növényi, ill. állati defenzinokkal. A közel 600 azonosított peptid elsődleges szekvenciáját tekintve gyenge homológiát mutatnak, és jelentős eltérések figyelhetők meg expressziós mintázatukat, izoelektromos pontjukat és antimikrobiális hatásukat tekintve. Elsődleges szerepük valószínűleg a szimbióta partner terminális differenciációjának irányítása. Csoportunkban korábban azt is kimutattuk, hogy a magasabb izoelektromos ponttal rendelkező NCR peptidek mind Gram negatív és Gram pozitív baktériumokkal, mind élesztőszerűen növekvő és fonalas gombákkal szemben is nagyfokú antimikrobiális aktivitást mutattak.

Az NCR peptidek széles hatásspektrumuknak és gyorsan megnyilvánuló öló, ill. gátló hatásuknak köszönhetően alkalmassá válhatnak a gyógyászatban a multidrog rezisztens kórokozókkal szemben már hatástalan antibiotikumok helyettesítésére. Ennek érdekében szükségszerű hatásmechanizmusuk pontosabb megismerése.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során célul tűztük ki, az antimikrobiális hatással rendelkező, kationos peptidek hatásmechanizmusának vizsgálatát, illetve a szimbiota partnerek terminális differenciációjában betöltött szerepük megismeréséhez, olyan technika kialakítását, mely megkönnyíti a növényi peptidek bakteriális kölcsönható partnereinek azonosítását.

A megvalósítás során a következő feladatokat terveztük végrehajtani:

1. Az NCR peptidek külső és belső membránra és membránpotenciálra gyakorolt hatásának meghatározása.
2. Az NCR peptidek baktériumokra kifejtett hatásának mikroszkópos vizsgálata.
3. A fehérje-fehérje kölcsönhatások tanulmányozására alkalmas, a *S. meliloti* 1021 törzs összes prediktált génjét tartalmazó (ORFeome) élesztő kettős-hibrid könyvtár létrehozása.
4. Az új *S. meliloti* ORFeome könyvtár használatának optimalizálása.
5. Az NCR247 peptid kölcsönható partnereinek azonosítása az új könyvtár alkalmazásával.
6. A kapott eredmények megerősítése más biokémiai technikák alkalmazásával

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Kationos peptidek hatásmechanizmusának vizsgálatához kapcsolódó anyagok és módszerek

Külső membrán permeabilitásának vizsgálata

A kationos peptidek külső membrán permeabilitására kifejtett hatását 1-N-phenylnaphthylamine (NPN) fluoreszcens festék segítségével mutattuk ki. A peptid kezelés 96-lyukú, sík aljú lemezben történt, ahol a peptidek membránkárosító hatásának köszönhetően bekövetkező fluoreszcencia szint változást mikrotiter lemez leolvasó készülék (FLUOstar OPTIMA; BMG Labtech) segítségével 355 nm-es excitáció és 405 nm-es emisszió mellett detektáltunk. Három mérési ciklust követően (minden ciklus 9 másodperc) adtuk az elegyhez a peptideket, majd a fluoreszcencia értékeket további 18 cikluson keresztül mértük.

Belső membrán áteresztőképességének vizsgálata

Az NCR peptidek belső membrán permeabilizáló hatásának mértékét a β -galaktozidáz enzim és az intakt membránokon átjutni képtelen szubsztrátja, az orto-nitrofenil- β -galaktozid (ONPG) segítségével határoztuk meg. A membrán károsodását, és a károsodás mértéke által meghatározottan bejutó szubsztrát enzimátikus hasítását spektrofotometriás módszerrel követtük nyomon. A méréseket Miller és mtsai által leírt módon végeztük el. A β -galaktozidáz enzim aktivitását a 420 nm-en kapott abszorbancia adatait (A_{420}), a kezelés időtartamát (t), a kezelt minták térfogatát (V) és a kezelt sejtek mennyiségét (OD_{600}) figyelembe véve számítottuk ki (Miller unit: $(A_{420}/t*V*OD_{600})*1000$). A membrán károsodását egy membrán impermeábilis DNS-kötő festék fluoreszcenciájának (excitáció: 530 nm; emisszió: 600 nm) mérésével is detektáltuk.

Membránpotenciál meghatározása

A szimbiotikus peptidek membránpotenciálra gyakorolt hatását a Life Technologies™ *BacLight*™ Bacterial Membrane Potential Kit-ben található DiOC₂(3) (3,3'-Dietiloxakarbocianin-jodid) membránpotenciál indikátor fluoreszcens festék segítségével határoztuk meg. A peptid kezelés hatására bekövetkező fluoreszcencia változást a vörös/zöld fluoreszcencia értékek hányadosával jellemeztük. A kit-ben található a kontrollként használható CCCP (karbonil cianid m-klorofenil hidrazon) proton ionofór kezelés eredményeihez viszonyítva adtuk meg a vizsgált peptidek membránpotenciálra gyakorolt hatásának mértékét.

Atomerő mikroszkópos vizsgálatok (AFM)

A baktériumok kezelését követően azokat frissen hasított 1 cm x 1 cm területű muszkovit csillám (SPI-Chem™ Mica Sheets, Structure Probe, Inc., West Chester, PA, USA) felületére rögzítettük. Az atomerő mikroszkópos kísérleteket Asylum Research MFP-3D típusú fejjel és Molecular Force Probe kontrollrel (Santa Barbara, CA, USA) végeztük. Vezérlő programként (MFP-3D Xop) IGOR Pro szoftvert (6.22A verzió, Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) használtunk.

A peptid kezelés hatására bekövetkező változásokat ugyanazokon a rögzített sejteken vizsgáltuk kezelés előtt, ill. kezelés után a sejtekről készült magasság és amplitúdó mérések segítségével.

Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok (SEM):

A kálium-foszfát pufferben mosott sejteket 30 °C-on 30 percig kezeltük a peptidekkel. A kezelt baktériumokat 2,5% (w/v) 0,1 M kakodilát pufferben feloldott glutáraldehiddel fixáltuk, majd kálium-foszfát pufferrel alaposan mostuk, és fokozatosan emelkedő koncentrációjú (50%-70%-80%-90%-95%-98%-100%) etanollal dehidratáltuk. A végén az abszolút etanolt t-butil-alkoholra cseréltük, melyben a mintákat egy éjszakán át 4 °C –on tároltuk. A mintákat fagyasztva szárítottuk, majd arannyal bevontuk. Az előkészített mintákat HITACHI S-4700 pásztázó elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

Az NCR peptidek kölcsönható partnereinek azonosításához kapcsolódó anyagok és módszerek

Élesztő két-hibrid rendszer során alkalmazott élesztő törzs, kompetens sejt készítése és transzformálása, valamint az alkalmazott táptalajok:

A klasszikus élesztő-két hibrid rendszerhez a *Saccharomyces cerevisiae* AH109 törzset (Clontech Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System) használtuk. A kompetens sejtek elkészítése és azok transzformálása publikált, de általunk optimalizált protokollok alapján történt. A transzformációs gyakoriságot SD-LT (leucin és triptofán mentes minimál táptalaj élesztőknek (Clontech)) táptalaj segítségével határoztuk meg. Az kölcsönható partnereket hordozó klónokat SD-HLT (hisztidin, leucin és triptofán mentes minimál táptalaj élesztőknek (Clontech)) valamint SD-AHLT (adenin, hisztidin, leucin és triptofán mentes minimál táptalaj élesztőknek (Clontech)) táptalajokra történő szélesztéssel szelektáltuk.

Az ORFeome alapú *S. meliloti* élesztő két-hibrid könyvtár létrehozása

A Gateway kompatibilis „préda” vektor kialakításához a pGADT7 AD vektort (Clontech) módosítottuk úgy, hogy a Gateway Vector Conversion System (Life Technologies) RfB kazettáját inszertáltuk a felnyitott vektorba. A *S. meliloti* ORFeome könyvtár minden egyes tagjának pGADT7GW-AD vektorba rekombináltatásához a Gateway LR reakciójának egy költséghatékonyabb változatát alkalmaztuk.

Fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatása az általunk létrehozott ORFeome könyvtár használatával

Az általunk optimalizált transzformálási lépések és a megfelelő táptalajra (SD-LT) való szélesztést követően kapott telepeket 96-lyukú, sík aljú mikrotiter lemezekben felnevesztettük és replica-plate technikával átvittük a szelektívebb táptalajokra (SD-HLT, SD-AHLT), ezzel lehetőséget teremtve nagyszámú telep gyors és egyszerű kezelésére. A gyenge és erős kölcsönhatások kimutatására alkalmas szelektív táptalajokon kapott telepeket kolónia PCR technikával és a sejtekből izolált DNS szekvenálásával ellenőriztük.

EREDMÉNYEK

Munkánk során a kationos, antimikrobiális hatással bíró peptidek hatásmechanizmusát vizsgáltuk, valamint ezzel párhuzamosan az NCR247 peptid lehetséges kölcsönható partnereit kerestük.

1. Az NCR peptidek külső és belső membránra és membránpotenciálra gyakorolt hatásának meghatározása.

Az 1-N-phenylnaphthylamine (NPN) fluoreszcens festék használatával kimutattuk, hogy a kationos NCR peptidek koncentrációtól függő mértékben képesek a baktériumok külső membránjának szerkezetét megbontani. A kontrollként használt Polymyxin B, melyről ismert, hogy kationos aminosavai révén destabilizálja a külső membránt, gyors és magas intenzitású fluoreszcenciát okozott. Ezzel szemben a vizsgált peptidek közül a kationos NCR335, s kisebb mértékben az NCR247 hatására tudtuk a fluoreszcencia gyors emelkedését megfigyelni, aminek az intenzitása azonban soha nem érte el a Polymyxin B által kiváltott szintet. Ebből arra következtethettünk, hogy a kationos peptidek valóban megbontják kis mértékben a sejtek külső membránját, ez a hatás nagyon gyors, de valószínűleg nem ez az elsődleges oka a sejtek pusztulásának. Az anionos illetve gyengén kationos (neutrális) peptidek nem rendelkeznek membránkárosító hatással.

A belső membrán permeabilizációjának kimutatására, a károsodás mértékének esetleges meghatározására kétféle módszert alkalmaztunk: Egyrészt tanulmányoztuk, hogy peptid kezelés hatására a membrán-impermeabilis DNS-kötő festék, a propídiium-jodid képes-e bejutni a sejtekbe. Másrészt a β -galaktozidáz enzim aktivitásának meghatározásával vizsgáltuk, hogy a peptidek átjárhatóvá teszik-e a bakteriális membránokat a szubsztrát és/vagy az enzim számára.

Vizsgálatunk során kimutattuk, hogy a kationos peptidek hatására a PI festék képes a baktériumok DNS-éhez kötődve fluoreszcencia szintemelkedést előidézni,

melynek mértéke a hővel elölt, membránjuk integritását teljesen elvesztő sejtekével megegyezik.

A β -galaktozidáz aktivitás mérés során azt tapasztaltuk, hogy a Polymyxin B-vel kezelt sejtek esetén a maximális enzim aktivitásnak mindössze 6 ± 3 százalékát tudtuk mérni, ami arra utal, hogy a Polymyxin B hatására a sejtek membránja nem esik szét. Hasonlóképp, a vizsgált peptidek közül a legmagasabb izoelektromos ponttal rendelkező NCR335 hatására a maximális aktivitás 20 ± 7 százaléka volt mérhető, ami erős membránkárosításra utal. Ezzel szemben a szintén magas antibakteriális aktivitással bíró NCR247 esetén ez az érték mindössze 2 ± 1 százalék volt. Az anionos peptidek ebben az esetben sem mutattak belső membránkárosító hatást.

A baktériumok membrán potenciáljára vonatkozó kísérletünk során a vártaknak megfelelően azt tapasztaltuk, hogy a kontrollként használt CCCP-hez és Polymyxin B-hez hasonlóan a kationos NCR peptidek is depolarizálják a baktériumok membránját. A folyamat sebessége eltérő a peptidek között. Míg az NCR335 peptid membrán depolarizáló hatása a kezelést (30 perces inkubáció) követően a baktérium populáció 100%-án megfigyelhető volt, addig az NCR247 peptid esetén ez a hatás időben elnyúltabbnak bizonyult. Ahogy az várható volt, az anionos peptid nem volt hatással a baktérium membránpotenciáljára.

2. Az NCR peptidek baktériumokra kifejtett hatásának mikroszkópos vizsgálata.

Pásztázó elektron mikroszkópos vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy az NCR335 peptiddel történt kezelés hatására kisebb aggregálódott sejtcsoportok jelentek meg, melyekben valószínűleg a sejttartalmukat elvesztett vagy éppen elvesztő sejtek láthatóak, míg NCR247 kezelést követően egy szinte hálózatos szerkezet kialakulása figyelhető meg. Az NCR335 peptiddel kezelt sejtek felszínén sok esetben kitüremkedések láthatóak, amik esetleg a sejttartalom kiáramlásának kezdeti szakaszának felelhetnek meg. Az NCR247 peptiddel kezelt sejteket sok esetben a felszínről "leszakadó", hálózattá alakuló struktúra köti össze. Érdekesség,

hogy a ciklikus pentakationos Polymyxin B szintén a sejtek aggregációját idézte elő, bár a hálózatos szerkezet nem alakult ki, azonban a sejtek középső része nagy mértékben felduzzadt.

Atomerő-mikroszkópos vizsgálatok során az NCR247 peptiddel történő kezelés hatására a bakteriális sejtek felszínének károsodása detektálható. Ezzel szemben a kationosabb NCR335 peptid hatására a baktérium sejtek valószínűleg oly mértékben károsodtak, hogy a vizsgálat során alkalmazott felületről a sejtek felúsztak, így vizsgálatuk lehetetlenné vált.

3. A fehérje-fehérje kölcsönhatások tanulmányozására alkalmas, a *S. meliloti* 1021 törzs összes prediktált génjét tartalmazó (ORFeome) élesztő kettős-hibrid könyvtár létrehozása.

A már létező *S. meliloti* 1021 ORFeome könyvtárat (<https://apps.vetmed.wsu.edu/kahn/>), a módosított pGADT7GW-AD vektorba rekombinálatva (Gateway LR reakció) létrehoztunk egy olyan új, ORFeome könyvtárat, mely a klasszikus élesztő két-hibrid rendszerben „préda” könyvtárként felhasználható. Az alkalmazott GATEWAY® LR reakció hatékonyságát a kapott telepek számának meghatározásával, valamint szekvenálással ellenőriztük. Az újonnan létrehozott ORFeome pool-ok közül ötöt szekvenáltunk meg Illumina MiSeq asztali szekvenálóval, mellyel minden pool esetén legalább 90 ORF-et azonosítottunk. Ez alapján megfelelőnek tekinthető az *en masse* rekombináció és a transzformáció hatékonysága.

4. Az új *S. meliloti* ORFeome könyvtár használatának optimalizálása.

Az általunk újonnan létrehozott *S. meliloti* ORFeome könyvtár alkalmasságának tesztelésére kontrollnak olyan fehérjéket választottunk ki, melyeknek ismertek, vagy feltételezhetőek a kölcsönható partnereik, mint pl.: i) a szimbiózis során fontos Hfq fehérje, mely homo-hexamer struktúra kialakítására képes; ii) a FixA és FixB fehérjék, melyek egy a szimbiózisban esszenciális elektron transzfer

flavoprotein komplex nagy valószínűséggel egymás kölcsönható feltételezett α ill. β alegységei; iii) az RM41 törzs 16-3 bakteriofág cI represszor fehérjéjének dimerizációs alegysége. Mind „pair-wise” (plazmid a plazmiddal) összehasonlítás, mind a teljes könyvtár (full screen) használata során ki tudtuk mutatni a kontrollként használt fehérjék közötti ismert kölcsönhatásokat és bizonyos esetekben újabb, eddig még nem ismert esetleges kölcsönható partnereket is képesek voltunk azonosítani.

5. Az NCR247 peptid kölcsönható partnereinek azonosítása az új könyvtár alkalmazásával.

A lehetséges (erős és gyenge) kölcsönható partnerek azonosítása céljából a transzformált sejteket az erős és a gyengébb szelekciós táptalajokra (SD- AHLT és SD-HLT) is kiszélesztettük. A legszelektívebb táptalajon (SD-AHLT) megjelenő kolóniák mindegyikében az SMc04012gént detektáltuk, mely az oligopeptidáz F (pepF) fehérjét kódolja. A kevésbé szelektív táptalajokon további 201 lehetséges kölcsönható fehérjét azonosítottunk.

6. A kapott eredmények megerősítése más biokémiai technikák alkalmazásával

Gyenge kölcsönható partnerek közül az RNS polimeráz szigma faktor FecI fehérjét (SMc04203) választottuk ki, melyről ismert, hogy expressziója a NCR247 peptid kezelés hatására megemelkedik. Az élesztő két-hibrid rendszerben kapott eredményeknek megfelelően immunprecipitációval is ki tudtuk mutatni a kölcsönhatást az NCR247 peptid és a HA jelöléssel ellátott FecI fehérje között.

Az erős kölcsönható partnerként azonosított oligopeptidáz F (pepF) (SMc04012) hisztidin címkével ellátott változata és az NCR247 peptid közötti erős kölcsönhatást is tudtuk igazolni hisztidin pull-down kísérletekkel.

A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Kata R. Mikuláss, Krisztina Nagy, Balázs Bogos, Zsolt Szegletes, Etelka Kovács, Attila Farkas, György Váró, Éva Kondorosi and Attila Kereszt (2016) „**Antimicrobial nodule-specific cysteine-rich peptides disturb the integrity of bacterial outer and inner membranes and cause loss of membrane potential**” *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 15:43

IF₂₀₁₅:2,083

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Van de Velde, W., G. Zehirov, A. Szatmari, M. Debreczeny, H. Ishihara, Z. Kevei, A. Farkas, K. Mikulass, A. Nagy, H. Tiricz, B. Satiat-Jeunemaitre, B. Alunni, M. Bourge, K. Kucho, M. Abe, A. Kereszt, G. Maroti, T. Uchiumi, E. Kondorosi és P. Mergaert (2010). "**Plant Peptides Govern Terminal Differentiation of Bacteria in Symbiosis.**" *Science* 327(5969): 1122-1126.

IF₂₀₁₀: 31.364

Nagy K, Mikuláss KR, Végh AG, Kereszt A, Kondorosi É, Váró G, Szegletes Z (2015). „**Interaction of cysteine-rich cationic antimicrobial peptides with intact bacteria and model membranes.**” *Gen Physiol Biophys.* 34(2):135-44

IF₂₀₁₅: 0,875

NYILATKOZAT

Alulírott Dr. Kereszt Attila, mint levelező szerző nyilatkozom, hogy Radvánszkiné Mikuláss Kata Antimicrobial nodule-specific cysteine-rich peptides disturb the integrity of bacterial outer and inner membranes and cause loss of membrane potential címmel megjelent közleményben végzett munkája meghatározó jelentőségű.

A jelölt által felhasznált tudományos eredmények eddig nem szerepeltek más doktori (Ph.D.) értekezésben, mint ahogyan a jövőben sem szerepelhetnek más doktori (Ph.D.) disszertációban.

Szeged, 2016. október 07.

.

Dr. Kereszt Attila (témavezető, levelező szerző)

Radvánszkiné Mikuláss Kata (jelölt)