

Doktori értekezés tézisei

**ERD14:**  
**egy funkcionálisan rendezetlen dehidrin fehérje**  
**szerkezeti és funkcionális jellemzése**

DR. SZALAINÉ ÁGOSTON *Bianka Ildikó*

*Témavezetők*

Dr. PERCZEL András egyetemi tanár

és

Dr. TOMPA Péter

*Kémia Doktori Iskola*

Iskolavezető: Dr. INZELT György egyetemi tanár

*Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia doktori program*

Programvezető: Dr. PERCZEL András egyetemi tanár

Budapest, 2013.

## Bevezető

A dehidrinek növényi stressz fehérjék, melyek a LEA (Late Embryogenesis Abundant) fehérjecsaldába tartoznak. Fontos szerepet töltenek be egyrészt a növényi mag fejlődésében, másrészt a növény abiotikus stressz elleni védekezésében, vagyis hideg, szárazság és magas sótartalom tűrésében. Annak ellenére, hogy már sok vizsgálatban megcélozták a dehidrinek molekuláris funkciójának feltárását, a pontos szerepük a stresszválasz során még mindig homályos. Sokféle lehetséges funkciót vetettek már fel, illetve vizsgáltak, a vízpuffertól a chaperon (dajka) hatásig, a membrán stabilizátortól a gyökfogóig, akár oly módon is, hogy az egyes dehidrinek esetleg különböző – vagyis nem egységes – funkciót tölthetnek be. A jelen munkában vizsgált ERD14 (Early Response to Dehydration 14) fehérjére például kimutatták *in vitro* körülmények között, hogy hatásos chaperon és membránkötő képességgel rendelkezik<sup>1</sup>.

Az egyes dehidrinek aminosav szekvenciája általában igen eltérő egymástól, de tartalmaz specifikus konzervált régiókat, úgy nevezett szegmenseket. Ezek közül a K-szegmens a legfontosabb, mely minden dehidrinben legalább egyszer előfordul, míg az ugyancsak konzervált Y-, S- és ChP-szegmensek jelenléte nem minden esetben adott. Az egyes szegmensekkel különböző molekuláris funkciókat hoztak összefüggésbe, mint például a membránkötést és antibakteriális hatást (K-szegmens), a foszforilációt és kalciumkötést (S-szegmens) valamint a chaperon hatást, foszforilációt és nukleáris lokalizációt (ChP-szegmens).

Szerkezeti oldalról tekintve a dehidrinek úgynevezett funkcionálisan rendezetlen fehérjék (intrinsically disordered proteins, IDPs), vagyis olyan fehérjék, melyek természetes körülmények között sem vesznek fel egyetlen határozott térszerkezetet, hanem állandó mozgásban, konformációs átrendeződésben maradnak. Ez felveti azt a kérdést, hogy például az ERD14 hatásos chaperon effektusa hogyan magyarázható stabil szerkezet nélkül. Klasszikus értelmezésben a chaperonok (dajka fehérjék) olyan nagy kiterjedésű és komplex szerkezetű fehérjék, melyek segítik más fehérje vagy RNS molekulák feltekeredését. Az ERD14-hez hasonlóan viszont más, részben vagy teljesen rendezetlen chaperonok is ismertek. Ezek részletes vizsgálata az utóbbi időben intenzíven folyik, mégis a molekuláris hatásmechanizmusuk még mindig megfoghatatlan.

Továbbá, a jelen munka megkezdéséig egyetlen egy dehidrint sem vetettek alá olyan részletes szerkezeti jellemezésnek, mely rámutathatott volna esetleges, részlegesen feltekeredett szerkezeti elemekre a rendezetlen fehérjelánc mentén.

---

<sup>1</sup> Dénes Kovács et al., "Chaperone Activity of ERD10 and ERD14, Two Disordered Stress-related Plant Proteins," *Plant Physiol* 147, no. 1 (2008): 381–90.

## Célkitűzések

Munkám célja az ERD14 nevű dehidrin részletes szerkezeti elemzése és funkcionális vizsgálata volt *in vitro* és *in vivo* körülmények között. Ezen belül az elvégzendő kísérletek a fehérje szerkezeti állapotának – vagyis rendezetlenségének – részletes elemzésére, a chaperon hatásának *in vivo* kimutatására és a funkcionálisan jelentős szekvenciareszek felderítésére irányultak.

Az ERD14 szerkezeti elemzéséhez először is egy részletes *in vitro* NMR vizsgálatot kívántam végezni, ide értve a méréshez szükséges megfelelően izotópjelölt és tisztított fehérjék előállítását, a spektrumok jelhozzárendelését (asszignációját) és a fehérje ezen alapuló szerkezeti és dinamikai jellemzését. Továbbá, a munkám kezdetekor még hiányos irodalmi háttér szükségessé tette az aktuálisan használatos másodlagos kémiai eltolódások kiszámítására és kiértékelésére használatban lévő módszerek összevetését, és funkcionálisan rendezetlen fehérjék analízisére való használhatóságuk megvizsgálását. Az ERD14 *in vivo* szerkezeti állapotának kimutatása érdekében egy speciális NMR technikát, az úgynevezett sejten belüli (in-cell) NMR spektroszkópiát terveztem alkalmazni, ide értve a megfelelő minták előállítását, mérését és kiértékelését.

A funkcionális vizsgálataim az ERD14 ismert *in vitro* chaperon hatásának *in vivo* körülmények közötti visszaigazolására irányultak. Ennek érdekében egy új vizsgálati módszert kívántam kifejleszteni, amely a viszonylag egyszerűen kezelhető *E. coli* sejteket alkalmazza az *in vivo* vizsgálatra. Olyan háromféle abiotikus stresszhelyzet sejtekre gyakorolt hatását kívántam vizsgálni, melyek növényekben a dehidrinek kifejeződését idézik elő.

Munkám további céljával olyan mutáns ERD14 fehérjék létrehozását és vizsgálatát tűztem ki, melyek szekvenciájából kivágásra kerülnek egyes, a funkcióban esetlegesen fontos szerepet betöltő konzervált részek. Ezen mutánsok szerkezeti és funkcionális tulajdonságait kívántam a vad típusú (eredeti szekvenciájú) ERD14 fehérje tulajdonságaival összevetni.

## Módszerek

Az ERD14 fehérje rekombináns úton történő előállítására és tisztítására standard molekuláris biológiai módszereket alkalmaztam. A mutáns ERD14 konstrukciókat mutagén primereket alkalmazó PCR reakció segítségével hoztam létre. Ezekből a vad típusú fehérjéhez hasonlóan állítottam elő és tisztítottam az egyes fehérjéket. A mutáns és vad típusú fehérjék szerkezeti összevetését gélelektroforézissel, CD spektroszkópiával és méretkizárásos kromatográfiával végeztem.

A vad típusú ERD14 részletes szerkezeti elemzéséhez mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópiát alkalmaztam *in vitro* körülmények között. Kifejeztettem a méréshez szükséges egyszeresen ( $^{15}\text{N}$ ) és duplán ( $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ ) izotópjelölt, tisztított ERD14 fehérjét. A mért spektrumokat felhasználtam a fehérje gerinc jeleinek jelhozrendeléséhez (asszignációjához), valamint kiértékeltem az ezáltal elérhető kémiai eltolódási és relaxációs adatokat, a fehérje szerkezeti és dinamikai jellemzése érdekében. Ennek során összevettem a másodlagos kémiai eltolódások (SCS) kiszámítására aktuálisan elérhető referencia adatokat és a kiértékelésükre használatban lévő módszereket. Megvizsgáltam ezek használhatóságát az ERD14 (illetve más funkcionálisan rendezetlen fehérjék) analízise során.

Az ERD14 *in vivo* szerkezeti állapotának kimutatása érdekében egy speciális NMR technikát, az úgynevezett sejten belüli (in-cell) NMR spektroszkópiát alkalmaztam. Előállítottam az ehhez szükséges egyszeresen ( $^{15}\text{N}$ ) izotópjelölt ERD14-et tartalmazó élő *E. coli* sejteket, elvégeztem a méréseket és összevettem ezek eredményét a megfelelő referencia és kontroll spektrumokkal.

Az ERD14 funkcionális vizsgálata érdekében egy új vizsgálati módszert fejlesztettem ki és teszteltem a fehérje *in vivo* chaperon hatásának mérésére. Négy különböző stressz behatását vizsgáltam fehérjét tartalmazó illetve kontroll *E. coli* sejtekre. A sejtek relatív életképességét az eddigi irodalmi példáktól eltérően a BacTiter-Glo<sup>TM</sup> Microbial Cell Viability Assay (Promega) használatával állapítottam meg.

## Eredmények

- Az elvégzett részletes NMR vizsgálat során igazoltam, hogy az ERD14 fehérje híg oldatban valóban funkcionálisan rendezetlen. Sikerral elvégeztem a teljes jelhozzárendelést az aminosavlánc gerinc atomjaira és kiértékeltem az ezáltal elérhető kémiai eltolódás és relaxációs adatokat. Kimutattam öt olyan régiót az ERD14 szekvenciáján belül, mely mozgásában korlátozott, és részleges, 5-15%-os hajlamot mutat  $\alpha$ -helikális másodlagos szerkezet felvételére. Ezen régiók átfedésben vannak a fehérje konzervált szegmenseivel (K-, S- és ChP-szegmensek), és lehetséges, hogy előre formált szerkezeti elemek (preformed structural elements) szerepét töltik be a fehérje funkciója során.
- Összevettem a másodlagos kémiai eltolódások kiszámítására jelenleg rendelkezésre álló referencia adat készleteket és a kiértékelésükre használatban lévő módszereket. Megvizsgáltam ezek használhatóságát az ERD14 és más funkcionálisan rendezetlen fehérjék analízise során. Felmutattam az alkalmatlan referencia eltolódási értékek használatából eredő jellemző hibákat, és azonosítottam a funkcionálisan rendezetlen fehérjék közel natív körülmények közötti vizsgálatához leginkább alkalmas három referencia eltolódási készletet.
- Vizsgálataim során kimutattam, hogy a mutáns ERD14 fehérjék (melyekből egyenként hiányoznak a konzervált szegmensek) szerkezetileg a vad típusú fehérjéhez hasonlóan funkcionálisan rendezetlenek. Ez az eredmény továbbá azt is bizonyítja, hogy a vad típusú ERD14 valóban nem rendelkezik harmadlagos szerkezeti elemekkel.
- Kimutattam, hogy az ERD14 élő *E. coli* sejteken belül is funkcionálisan rendezetlen, úgy ahogy *in vitro* körülmények között is. Azonosítottam három, a K-szegmensekkel egybeeső szekvenciaszakaszt, mely az élő sejten belül kötődésben vesz részt, és így e régiók lehetséges funkcionális szerepére utal.
- Kifejlesztettem és teszteltem egy új vizsgálati módszert ERD14 és más dehidrin fehérjék *in vivo* chaperon hatásának mérésére. A módszer fehérjék védő hatását képes kimutatni négy különböző stresszhelyzet *E. coli* sejtekre gyakorolt hatása során.
- Az új módszer segítségével kimutattam, hogy mind a négy vizsgált körülmény esetén az ERD14 nagymértékben képes megvédeni a sejteket, tehát *in vivo* chaperon hatással bír. Továbbá kimutattam egy mutáns ERD14 fehérje (melyből mindhárom K-szegmens hiányzik) vizsgálata által, hogy ez a funkció összefügg a K-szegmensek jelenlétével.

## Következtetések

Összefoglalásképpen elmondható, hogy munkámban mind a szerkezeti, mind a funkcionális elemzés alátámasztja a K-szegmensek *in vivo* jelentőségét, és az élő sejten belül is bizonyítja az ERD14 funkcionálisan rendezetlen állapotát.

Ezen eredmények kétféle jelentőséggel bírnak: egyrészt a szerkezeti elemzés alátámasztotta, hogy az ERD14 egy funkcionálisan rendezetlen fehérje, mely még az élő sejten belül is megtartja rendezetlen állapotát, másrészt az *in vivo* chaperon vizsgálat rámutatott arra is, hogy rendezetlensége valóban az aktív, funkcionális állapota a vizsgált fehérjének. Ez ellentétes azzal az általános és még igen elterjedt felfogással, hogy a rendezetlen funkcionális fehérjéknek – és ezen belül a dehidrineknek is – általában elsőként fel kell tekeredniük ahhoz, hogy aktiválódjanak. Továbbá a jelen eredmények arra is rámutatnak, hogy az ERD14 rendezetlen állapota ellenére is túlél a sejten belül, mely azonban még sok esetben vitatott kérdés a funkcionálisan rendezetlen fehérjék esetén.

Megállapítottam, hogy a konzervált K-szegmensek előre formált helikális elemeket tartalmaznak a sejten belüli kötődéshez, és hogy ezek a szegmensek feltétlenül szükségesek a fehérje működéséhez. A K-szegmensek a dehidrinek legerősebben konzervált szekvenciariészei, és a bemutatott eredményeim ezek jelentőségét támasztják alá.

A chaperon hatás molekuláris mechanizmusát tekintve kísérleteim alapján feltételezhető, hogy az ERD14 a K-szegmensei segítségével kötődik szubsztrátjaihoz, és így segíti passzív (entrópiikus helykizárás által gátolhatja aggregációjukat) vagy aktív módon (entrópiikus energia átadásával mentheti meg a fehérjét egy úgy nevezett feltekeredési csapdából) a hibás szerkezetű fehérjék helyes feltekeredését. A fehérje hatásmechanizmusának pontosabb feltárása érdekében viszont még további mutánsok vizsgálata szükséges<sup>2</sup>. Végezetül megjegyzendő, hogy a dehidrinek sejten belüli hatása akár még ennél is összetettebb lehet – víz visszatartás, ion puffer és gyökfogó hatásuk mind működhetnek a jelen munkában vizsgált chaperon hatás mellett. Tehát annak ellenére, hogy munkámban jelentős eredményeket mutathattam be, még további kutatásokra van szükség, amíg teljesen megérthetjük a dehidrinek és más funkcionálisan rendezetlen chaperonok hatásmechanizmusát.

---

<sup>2</sup> kézirat elkészítése folyamatban: **Bianka Szalainé Ágoston** et al., “Functional Disorder of Plant Dehydrin ERD14 *in vivo*,” 2013.

## Közlemények

*A dolgozat témájában megjelent közlemények:*

- Szalainé **Ágoston B.**, Kovács D., Tompa P., Perczel A.: „*Full Backbone Assignment and Dynamics of the Intrinsically Disordered Dehydrin ERD14*“ Biomolecular NMR Assignments (2011) 2: 189-193.
- Kovács D., **Ágoston B.**, Tompa P.: "*Disordered plant LEA proteins as molecular chaperones*" Plant Signaling and Behavior (2008) 3: 710-713.

*Egyéb közlemények:*

- Kovács D., Rakács M., **Ágoston B.**, Lenkey K., Semrad K., Schroeder R., Tompa P.: „*Janus chaperones: assistance of both RNA- and protein-folding by ribosomal proteins*” FEBS Letters (2009) 583, 88-92.
- Mohammed-Ziegler I., Tánzos I., Hórvölgyi Z., **Ágoston B.**: "*Water-repellent acylated and silylated wood samples and their surface analytical characterization*" Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects (2008) 319: 204-212.
- Tollinger M., Kloiber K., **Ágoston B.**, Dorigoni C., Lichtenecker R., Schmid W., Konrat R.: "*An Isolated Helix Persists in a Sparsely Populated Form of KIX under Native Conditions*" Biochemistry (2006) 45: 8885-8893.