

*Egy szerralizin, a PrtA szerepe a Photorhabdus
fertőzési folyamatában*

TÉZISEK

Felföldi Gabriella

Biológia Doktori Iskola

Iskolavezető:
Prof. Erdei Anna, CMHAS
Tanszékvezető egyetemi tanár

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető:
Prof. Gráf László, MHAS

Témavezető
Dr. Venekei István, docens



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék
Budapest, 2010

Bevezető

Patogén mikroorganizmusok eltérő gazdaszervezeteket képesek megtámadni. Ha megértjük, hogy mi rejlik a gazda specifikus fertőzőképesség mögött, akkor az nagymértékben hozzájárulhat a mikrobiális fertőzések megelőzéséhez, illetve alternatív kezelésének kifejlesztéséhez. Azonban ehhez olyan patogén-gazda molekuláris interakciók felderítése szükséges, amelyek meghatározóak a fertőzés kialakításában.

A mikroorganizmusok nagyon sok virulencia faktorral rendelkeznek. Ezek a virulencia faktorok lehetnek toxinok, vagy enzimek. A patogének által szekretált enzimek részt vehetnek a fertőzés kialakításában, mivel elősegíthetik a patogén túlélését és szétterjedését a gazdaszervezetben. Az enzimikus virulencia faktorok közül a proteázok megtámadhatják a gazdaszervezet védekező rendszerét, például az immunproteinek hasításával. Annak ellenére, hogy nagy számban ismerünk már patogének által szekretált enzimeket, csak néhány esetben ismeretes ezek valódi funkciója. Ilyen például a *Bacillus thuringiensis* által termelt inhibitor A, és a *Serratia marcescens* proteázai, amelyek specifikusan hasítják a rovarok immunfehérjéit, mint a cekropinokat és attacinokat, valamint a *Bacteroides fragilis* és a *Clostridium* spp. cink-metalloproteázai amelyeknek közvetlen toxikus aktivitásuk van.

Különböző, eltérő gazdaszervezetű patogének enzimei között megtalálhatóak a szerralizin típusú Zn-metalloproteázok (M10 család) is. Többen arra a következtetésre jutottak, hogy ezek nem-specifikus enzimek, így például a szövetek biokonverziójában vehetnek részt, mivel különböző szintetikus szubsztrátokon illetve biológiai eredetű, denaturált oligopeptideken vizsgálva őket, hasító helyük nem bizonyult oldallánc specifikusnak. Azonban a szintetikus szubsztrátokon tett megfigyelések csak kevésbé informatívak a szerralizinek (és más proteázok) valódi funkcióját tekintve. Így nem lehet kizárni azt a lehetőséget, hogy fiziológiás körülmények között a szerralizinek specifikus funkciókat ellátó természetes szubsztrátokkal rendelkeznek. Azonban ilyen természetes szubsztrát, vagy más, szerralizinekkel interakcióba kerülő protein eddig még nem ismert, néhány olyan inhibitor kivételével, amelyet a baktérium együtt termel a proteázával. Így kísérletesen még nem bizonyított az a feltevés, hogy a szerralizinek működhetnek esetleg virulencia faktorként is. Az egyetlen megfigyelés, amely ezt a feltételezést alátámaszthatja, az egy *in vitro* kísérlet volt, ahol kimutatták, hogy a *Proteus mirabilis* ZapA enzime, és a *Serratia marcescens* által termelt szerralizin képes hasítani az IgA és IgG proteineket, valamint egyes humán defenzineket, illetve sejt mátrix és filamentum proteineket. Azonban az itt alkalmazott *in vitro* körülmények ebben az esetben sem feleltek meg a fiziológiás

körülményeknek, mivel túl hosszú volt az inkubációs idő (3-24 óra), és az enzim-szubsztrát arány is túl nagy volt (1:10-1:6000), amely nem mutat olyan mértékű szenzitív hasítást, ami egy target fehérje esetében elvárható lenne.

Az egyik jól tanulmányozott, és ismert szerralizin típusú proteáz a rovarpatogén *Photorhabdus* által termelt PrtA, amely egy 55 kDa-os, RTX (repeats-in-toxin)-szerű metalloproteáz. Elsőként egy növény patogén, az *Erwinia chrysanthemi* tanulmányozása során írták le, majd később megtalálták más patogéneknél is, mint a rovar patogén *Xenorhabdus* és *Photorhabdus* törzsekben. A PrtA szekréciónál mindkét törzs esetében tanulmányozták mind *in vitro* kultúrában, mind fertőzést követően. Anti-PrtA immunreakció segítségével kimutatták, hogy *Photorhabdus* fertőzés során a PrtA először a rovar lárvá bélcsatornájában jelenik meg, majd a zsírtestben, izmokban, és a velük kapcsolatban levő tracheákban. Egy nagymértékben szenzitív, specifikus mesterséges szubsztrát kifejlesztésével kimutathatóvá vált a PrtA termelésének dinamikája: a PrtA a fertőzést követő 14. órában jelenik meg először a lárvá szöveteiben, majd 10 órával később a hemolimfában is.

Ezek az adatok azonban nem elegendőek ahhoz, hogy eldönthessük, a PrtA működhet-e virulencia faktorként, és hogy milyen szerepet játszik a fertőzés során. Egy proteáz (vagy bármilyen enzim) funkciójának megértéséhez meg kell ismernünk annak proteolitikus rendszerét, ami magába foglalja magát az enzimet, az összes lehetséges természetes szubsztrátját, valamint inhibitorát. A nagyszámú proteáz közül csak néhánynak ismert a proteolitikus rendszere (ezek is csak részlegesen), ezek között azonban nincsenek patogének által szekretált proteázok rendszerei. Egy ilyen, patogének által szekretált proteáz rendszerének tanulmányozása, térképezése során új, eddig még nem ismert komponensekre, funkciókra is fény derülhet, ami új megvilágításba helyezheti egy gazdaszervezet védekező mechanizmusait.

Egy ilyen tanulmányhoz azonban a megfelelő modell kiválasztása elengedhetetlen. A szóba jöhető modellek közül a rovar-rovar patogén baktérium modell rendszer egy lehetőség, melynek számos előnye van: nemcsak könnyen kezelhető és alacsony költségű, de tartalmazza a vele született immunitást, amely az egész állatvilágban hasonló funkciójú elemekből épül fel, és gyakran molekuláris komponensei is közel azonosak. Ezért egy rovar-rovar patogén baktérium rendszerben tett megállapítások nagymértékben felhasználhatóak lehetnek, és átültethetőek akár a humán – humán patogén baktérium rendszerek vizsgálatában is. A kísérleteimben használt gazdaszervezet a *Manduca sexta* volt, amely méretének, és a belőle nyerhető hemolimfa mennyiségének köszönhetően a biokémiai kutatásokban széles

körben alkalmazott rovar modell. Patogénnek a *Photorhabdus luminescens* választottam, amely egy intenzíven tanulmányozott rovarpatogén az érdekes életciklusa, és rendkívüli fertőzőképessége miatt.

Célkitűzések

Munkám fő célja az volt, hogy olyan fehérjéket találjak és azonosítsak *Manduca sexta* hemolimfában amelyek a *Photorhabdus luminescens* által termelt szerralizin típusú enzim, a PrtA célfehérjei. Feltételeztem, hogy a target proteinek azonosítása és funkciójuk megismerése rámutathat egy szerralizin típusú enzim szerepére, valamint bizonyíthatja a mikroorganizmus patomechanizmusában való részvételét.

Főbb célok:

- A lehető legtöbb *Photorhabdus* törzs proteolitikus aktivitásának időbeni összehasonlításával olyan proteáz(ok) keresése növekvő kultúrában és fertőzés során, amely(ek) részt vehet(nek) a korai fertőzési fázisban.
- A PrtA természetes célfehérjeinek megkeresése *Manduca sexta* hemolimfában, valamint PrtA-val való hasításuk vizsgálata *in vitro*.
- A megtalált célfehérjék megfelelő mértékű tisztítása, és izolálása N-terminálisuk meghatározására.
- A célfehérjék és funkciójuk azonosítása adatbázis használatával és kísérletes eszközökkel.

Anyagok és módszerek

1. Baktérium törzsek és rovarok

- A *Photorhabdus* törzseket az Eötvös Loránd Tudományegyetem Genetikai Tanszékéről származnak.
- A *Manduca sexta* (Dohányzsender, Lepidoptera, *Sphingidae*) petéket a Bath-i Egyetem (Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, Egyesült Királyság, Bath) önzetlen ajándéka volt, a lárvákat laboratóriumunkban keltettük és tartottuk a kísérletekig.
- *Galleria mellonella* kultúrát laboratóriumunkban tartottuk fenn.

2. *Photorhabdus* törzsek proteáz aktivitásának vizsgálata

- A kísérleteket natív és SDS gélelektroforézist követő zimográfias eljárással illetve kromogén szubsztrát alkalmazásával végeztem.

3. PrtA természetes célfehérjéinek keresése, és azonosítása

- Az egyes PAT fehérjék N-terminálisának meghatározásához megfelelő tisztaságú frakciókat állítottam elő az általam kidolgozott tisztítási lépésekkel.
- A hemolimfa és az általam (részlegesen) megtisztított fehérje mintákat heterológ expresszióval előállított, majd tisztított PrtA-val kezeltem, majd a fehérjék hasítását SDS gélelektroforézissel és N-terminális szekvenálással analizáltam. A pUC19 plazmid, amely tartalmazta a *Photorhabdus ssp. akhurtii* W14-ből klónozott PrtA-t önzetlen ajándékként kaptam prof. Richard French-Constant-tól (Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, Bath, Egyesült Királyság)
- A tizenkét serpin-1 variáns kódoló Bluescript plazmidokat önzetlen ajándékként kaptam prof. Mike Kanost-tól (Department of Biochemistry, Kansas State University, U.S.A).
- Az N-terminális szekvenálásokat Dr Patthy András végezte (Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biokémiai tanszék, Budapest).

4. A szerin proteáz homolog-3 (SPH-3) *Manduca sexta* immunitásában betöltött szerepének vizsgálata RNS interferenciával (RNSi).

- RNSi
 - Az SPH-3 dsRNS-ének előállítását sztenderd eljárás alapján végeztem.

- A *Manduca sexta*ban RNSi-vel kiütött SPH-3 hatását RT-PCR-rel vizsgáltam tizenkét gén esetében.
- A kiütött SPH-3 immun-fiziológiai hatását *in vitro* patogén növekedési, halálozási és zárványképződést kimutató bioesszékkel, illetve fenoloxidáz aktivitásának mérésével vizsgáltam.

Tézisek

1. *Photorhabdus* törzsek proteáz aktivitásának vizsgálata

- Összehasonlítottunk húsz különböző *Photorhabdus* törzs proteolitikus aktivitását mind növekvő kultúrában, mind a fertőzés során.
- SDS és natív gélelektroforézist követő zimográfias eljárással két proteáz volt detektálható; PrtA szerralizint és a Php-C oligopeptidáz A-t, míg kromogén oligopeptid szubsztrátot alkalmazva egy harmadik aktivitás is mérhető volt, amit laborunkban Php-B-nek nevezünk el.
- PrtA volt a legkorábban szekretálódott enzim mind növekvő kultúrákban, mind fertőzés során, ami egy lehetséges virulencia faktor elvárásaival megegyezik.

2. PrtA természetes célfehérjéinek keresése, és azonosítása

- *Manduca sexta* hemolimfában tizenhat olyan célfehérjét találtam, amelyeket a PrtA szelektíven hasít. Ezeket a fehérjéket PAT-X proteineknek neveztem el, ahol a PAT a PrtA target rövidítése, míg az X az egyes fehérjék molekulatömegére utal.
- Kilenc PAT protein tudtam olyan mértékben megtisztítani, amely elegendőnek bizonyult N-terminálisuk meghatározására. Ezek közül hat fehérje azonosítása volt lehetséges az NCBI protein adatbázisból;
 - PAT-63, a *M. sexta* β -1,3 glükán felismerő protein-2 (β -1,3-GRP-2);
 - PAT-54a, a *M. sexta* hemocita aggregációs inhibitor protein (HAIP);
 - PAT-35 a és b, *M. sexta* scolexin A és B, kimotripszin-szerű proteinázok;
 - PAT-52, *M. sexta* szerpin-1, melynek tizenkét C-terminális szekvencia variánsa van;
 - PAT-41, *M. sexta* szerin proteáz homológ-3 (SPH-3), melyet immun indukálható proteinként tartanak számon;

- A PAT-110 és PAT-90 esetében az adatbázis nem tartalmazott olyan fehérjéket, amelynek megfelelték volna. Ezek a *M. sexta* fehérjék még nem ismertek. Ez a két fehérje, de a többi, ugyancsak azonosítatlan fehérje is feltételezhető, hogy rendelkezik immunfunkcióval, és talán új, még nem ismert résztvevői az immunrendszernek.

3. Az egyik PAT protein, a szerin proteáz holológ-3 (SPH-3) funkciójának vizsgálata

- Kísérleteimmel alátámasztottam, hogy az SPH-3 immun indukálható protein. Kimutattam, hogy nem patogén *E. coli* vagy patogén *Photorhabdus* TT01 fertőzést követően az SPH-3 mRNS mennyisége drasztikusan megnőtt a rovar lárva zsírtestjében, illetve hemocitáiban.
- RNSi technikával kiütöttem az SPH-3-at, amely rámutatott az SPH-3 lehetséges központi szerepére a *Manduca sexta* immunrendszerében a következő patofiziológias hatásokkal:
 - Jelentősen megnőtt a rovarok *Photorhabdus* fertőzést követő mortalitása. A dsSPH-val kezelt rovarok túlélési ideje (12-21 óra) 50%-kal csökkent a kontroll rovarokéhoz képest (24-36 óra).
 - A tesztelt hat mintázat felismerő fehérje (Hemolin; Immulectin-2; Peptidoglikán Felismerő Fehérje, PGRP; Mintázat Felismerő Szerin Proteáz, PRSP, más néven hemolimfa proteáz-14; β -1-3-Glükán Felismerő Protein-1, β -GRP-1; és β -1-3- Glükán Felismerő Protein-2, β -GRP-2) mRNS szintje RNSi hatására nem változott, míg az összes tesztelt effector molekulák (attacin, cecropin, lebocin, lizozim, moricin, profenoloxidáz) mRNS szintje nullára csökkent.
 - A hemolimfa melanizációs képessége és baktérium növekedését gátló hatása, valamint a fertőzést követően kialakuló zárványok, zárvány csomók száma nagymértékben lecsökkent.

Következtetések

Az a tény, hogy mind, az általam vizsgált húsz *Photorhabdus* törzs a PrtA-t szekretálta a legkorábban mind növekvő kultúrában, mind pedig a fertőzést követően, joggal veti fel azt a lehetőséget, hogy a PrtA-nak lehet szerepe a *Photorhabdus* fertőzési mechanizmusában. Hogy alátámasszam ezt a feltételezést, *Manduca sexta* hemolimfában kerestem, és találtam tizenhat olyan célfehérjét (PAT fehérjék), amelyeket a PrtA szenzitíven hasít. Az azonosított célfehérjék közül mind immunfehérjének bizonyult.

Az azonosított target fehérjék közül az SPH-3-at (szerin proteáz homológ-3; PAT-41) vizsgáltam tovább. Ez a protein azon fehérjék népes családjába tartozik, amelyek aminosav szekvenciájukban ugyan hasonlítanak a szerin proteázokhoz, de katalitikusan inaktívak.

Az SPH-3 RNSi-vel történő kiütését követően kimutattam, hogy az immunválaszt hordozó, összes jelenleg ismert antimikrobiális fehérje és peptid génjének expressziója leállt, míg az immun receptorok expressziója, ill. indukciója változatlan maradt. Ezzel egyidejűleg jelentősen megnőtt a rovarok *Photorhabdus* fertőzést követő mortalitása is. Ebből arra következtettem, hogy az SPH-3, lévén extracelluláris protein, a sejten kívüli immun jelátviteli útvonalban helyezhető el, és valamilyen központi szerepet tölthet be a génexpresszió szabályozásába. Ilyen szerepkört még egyetlen eddig vizsgált SPH proteinre sem írtak le. Az a tény, hogy az SPH-3 kiütése egyedül az immun effektor gének expressziójára volt hatással rendkívül figyelemre méltó. Az eddigi leírások alapján a jelátvitel, mint egyirányú útvonal vezet mind a receptor, mind pedig az effektor gének indukálásához. Az eredményeim azonban azt sugallják, hogy az az útvonal, amely az effektor gének indukációjához vezet, elkülönül attól, amely a felismerő fehérjék génexpressziójáért felelős. Ez a megfigyelés új megvilágításba helyezheti a rovarok immunrendszerének működését.

Azzal, hogy azonosítottam különböző funkcióval rendelkező immun proteineket (PAT fehérjék) *Manduca sexta* hemolimfában, amelyeket a PrtA szelektíven hasít, egyértelmű bizonyítékot nyújthat arra, hogy a PrtA mint lehetséges virulencia faktor beavatkozik a rovarok immunrendszerének három fontos folyamatába: (i) a rovarok patogén felismerő mechanizmusába (β -1,3-GRP-1 és β -1,3-GRP-2); (ii) az immun-jelátviteli rendszerbe és szabályozásba (HAIP, SPH-3, és szerpin-1); valamint (iii) az antimikrobiális effektor aktivitásba (scolexin A és B). Amennyiben az *in vitro* megfigyeléseim megfelelően tükrözik az *in vivo* folyamatokat, elmondhatom, hogy első alkalommal, sikerült egy szerralizin típusú enzim lehetséges funkciójára rámutatni. Mivel a PrtA már a gazdaszervezet fertőzésének kezdeti szakaszában beavatkozik mind a patogén felismerésbe, mind pedig a patogén

eliminálási folyamatokba több immunprotein hasításával, így összetett szuppresszív hatással rendelkezhet, mely a természetes immunrendszer elemeire irányul. Eredményim azt is sugallják, hogy más szerralizinek, beleértve a human patogének szerralizinjeit is, természetes cél fehérjéit inkább a természetes immunrendszer elemei között, mint az adaptív immunrendszer elemei között kellene keresni. Egy ilyen enzim a patogén szempontjából rendkívül előnyösnek bizonyulhat, hiszen az első akadályok, amiket egy kórokozónak le kell győznie a fertőzés során azok a természetes immunrendszer elemei.

A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények:

- **Gabriella Felföldi**, Judit Marokházi, Miklós Képiró, and István Venekei Identification of natural target proteins indicates functions to a serralsin-type metalloprotease, PrtA, in anti immune mechanisms Applied and Environmental Microbiology 2009 May;75(10):3120-6. (IF, 4.004)
- Marokházi J., Lengyel K., Pekár S., **Felföldi G.**, Patthy A., Gráf L., Fodor A. and Venekei I. (2004) Comparison of proteolytic activities produced by the entomopathogenic *Photorhabdus* bacteria: strain and phase dependent heterogeneity in the composition and activity of four enzymes. Applied and Environmental Microbiology, 70(12):7311-20. (IF, 4.004)
- Eleftherianos I, Gokcen F, **Felföldi G**, Millichap PJ, Trenczek TE, French-Constant RH, Reynolds SE. The immunoglobulin family protein Hemolin mediates cellular immune responses to bacteria in the insect *Manduca sexta*. Cell Microbiol. 2007 May;9(5):1137-47 (IF, 2007: 5.293)
- Eleftherianos I, **Felföldi G**, French-Constant RH, Reynolds SE. Induced nitric oxide synthesis in the gut of *Manduca sexta* protects against oral infection by the bacterial pathogen *Photorhabdus luminescens*. Insect Mol Biol. 2009 18(4):507-16 (IF, 2.784)

Tudományos Prezentációk:

- Felföldi Gabriella, Marokházi Judit, Lengyel Katalin, Patthy András, Gráf László, Fodor András, Venekei István: Proteolitikus enzimek szerepe a *Photorhabdus* rovarpatogén baktérium fertőzési folyamatában Magyar Biokémiai Társaság Molekuláris Biológiai Szakosztályának éves munkaértekezlete Sopron, 2004. 05. 10-13, poster

- Judit Marokházi, **Gabriella Felföldi**, Nikolett Mihala, Ferenc Hudecz, András Patthy, András Fodor, László Gráf, István Venekei: Identification of cleavage site and natural substrate specificity of PrtA, a serralsin-type metalloprotease from the entomopathogenic microorganism *Photorhabdus* 30th FEBS Congress - 9th IUBMB Conference Budapest, Hungary 2005. Július 2-7, poster
- **Gabriella Felföldi**, Ioannis Eleftherianos, Richard French-Constant, István Venekei, Stuart E. Reynolds: The role of Serine Protease -3 (SPH-3) in *Manduca sexta* shown by RNAi. 7th International Workshop on the Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera Orthodox Academy of Crete, Crete, Greece, Aug. 20-26, 2006, presentation
- **Gabriella Felföldi**, Ioannis Eleftherianos, Richard French-constant, Stuart E. Reynolds: The Serine Protease Homologue -3 (SPH-3) mediates immune response in *Manduca sexta*. '06 Royal Entomological Society National Meeting University of Bath Bath, United Kingdom, Sept. 20-22, 2006, poster