

Role povrchového náboje kryptogeinu na schopnost přenášet steroly a mastné kyseliny mezi membránami

Michal Obořil, Veronika Plešková, Kateřina Dadáková, Tomáš Kašparovský, Jan Lochman

Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2 61137 Brno

ABSTRACT

Cryptogein belongs to the family of elicitors, which are small (98 amino acids) proteins with highly conserved tertiary structure. Cryptogein is secreted by pathogenic oomycete *Phytophthora cryptogea* infecting tobacco plants. Tertiary structure of cryptogein is determined by five α -helices, double-stranded antiparallel β -sheet, Ω -loop and hydrophobic cavity localized in the protein core. The cavity is connected by a tunnel with protein surface and enables cryptogein to bind and transfer non-specific fatty acids and sterols. The ability of cryptogein to transfer sterols between plasma membranes of a plant and *Phytophthora* is probably involved in triggering of plants defense responses. In order to determine lipid transfer ability of recombinant mutants of cryptogein, the fluorescence method in several arrays was used.

ÚVOD

Rod *Phytophthora* patřící mezi oomycety zahrnuje více než sto popsaných vysoce patogenních druhů. Jedná se o specifické hemibiotrofy parazitující převážně na vyšších rostlinách, mezi nimiž jsou i některé ekonomicky významné druhy. Zástupci rodu *Phytophthora* nejsou schopni syntézy některých sterolů, proto syntetizují malé globulární proteiny patřící do skupiny LTP (*lipid transfer proteins*) nazývané elicitory (Vauthrin et al. 1999). Některé elicitory jsou však zároveň ligandy pro vysoce afinitní místo (receptor) na plazmatické membráně hostitelské rostliny a jsou následně zodpovědné za inkompatibilní interakci mezi patogenem a hostitelskou rostlinou (Lloyd 1995). Z tohoto pohledu se tedy pravděpodobně jedná o produkty genů avirulence (model gen vs. gen). Klíčové části primární struktury elicitorů jsou mezi jednotlivými elicitory evolučně silně konzervované, a proto se zástupci této proteinové rodiny vyznačují takřka identickou terciální strukturou. Podle izoelektrického bodu můžeme elicitory dělit na bazické - β -elicitory a kyselé α -elicitory vykazující řádově nižší biologickou aktivitu (Ponchet et al. 1999).

Kryptogein je dobře charakterizovaný elicitor sekretovaný oomycetou *Phytophthora cryptogea* parazitující na rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum*). Kryptogein je β -elicitor ($pI \approx 8$) o velikosti zhruba 10 kDa skládající se z 98 aminokyselin obsahující tři disulfidické můstky (Fefeu et al. 1997).

V poslední době se předpokládá, že pro vazbu kryptogeinu k vysokoafinitnímu místu na plazmatické membráně tabáku je nutná tvorba komplexu kryptogein-sterol. Tento aktivní komplex následně spouští dvě obranné kaskády vedoucí jednak k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS) a jednak k indukci systémově získané rezistence (SAR) [(Mauch-Mani et Metraux 1998)].

K objasnění vztahu mezi strukturou kryptogeinu a jeho schopností vázat či přenášet steroly a mastné kyseliny byla navržena sada mutantních forem kryptogeinu (Val84Phe, Leu41Phe, Val84Phe/Leu41Phe a Lys13Val). Tyto proteiny byly připraveny cíleně řízenou mutagenezí a následnou expresí v kvasině *P. pastoris*. U těchto proteinů byla pomocí fluorimetrických metod stanovena disociační konstanta tvorby komplexu kryptogein-sterol a schopnost přenášet steroly a s lipidy mezi biologickými membránami (Osman et al. 2001).

MATERIÁL A METODY

Chemikálie

K měření přenosu sterolů a k stanovení disociační konstanty byly použity zásobní roztoky dehydroergosterolu (DHE) a stigmasterolu o koncentracích 1mg/ml rozpuštěné v etanolu. K měření přenosu mastných kyselin byly použity roztoky fosfatidyl cholinu, fosfatidyl serinu, NBD-PC (7nitrobenzofurazan-fosfatidyl cholin) a cholesterolu o koncentracích 5 mg.ml⁻¹ rozpuštěné v chloroformu.

Izolace rekombinantních proteinů

Divoký kryptogein byl exprimován pomocí vektoru *pPIC9* s vloženým genem *X24* pocházejícím z *P. cryptogea*. Gen *X24* byl na N-konci rozšířen o kodon pro glycin z důvodu specifitějšího štěpení signální sekvence proteázou KEX2. Ke konstrukci mutantních forem byla použita cíleně řízená mutageneze pomocí *Quick chase II XL* kitu (Stratagene, USA). Produkt byl ověřen sekvencí, transformován do *P. pastoris* a exprimován ve fermentoru *Biostat-DCU* (Sartorius, Německo) [*Pichia* fermentation process guidelines – Invitrogen]. Fermentační médium bylo zakoncertováno pomocí ultrafiltrace (3 kDa cut-off membrána), dialyzováno a proteiny byly purifikovány pomocí FPLC na matrici *Source 15S* (GE HealthCare, USA) pomocí gradientu NaCl v acetátovém pufru (5 mM, pH 5.0). Frakce obsahující kryptogein byla dialyzována a zakoncentrována na *Speed-Vac* systému (Thermo, USA).

Stanovení disociační konstanty komplexu kryptogein-dehydroergosterol

Do 2 ml pufru (10mM MES, pH 7.0) bylo přidáno 20 µl proteinu (1 mg.ml⁻¹), vlnové délky EX/EM přístroje byly nastaveny na 325/370 nm a protein byl titrován 10 µl přidavky 0,2 mM DHE. Fluorescence byla měřena na fluorimetru *Perkin Elmer Luminiscence Spectrometer LS 50B* (Perkin Elmer, Německo) v míchané kyvetě o objemu 2ml.

Disociační konstanta jednotlivých mutantních forem kryptogeinu byla spočtena pomocí rovnice: $1/C_b = (K_d/NA)(1/C_f) + 1/NA$, kde C_b je koncentrace navázaného DHE, C_f je koncentrace volného DHE, K_d je disociační konstanta komplexu kryptogein-DHE, A je koncentrace akceptoru (zkoumaného proteinu) a N je počet vazebných míst. Ze závislosti známé koncentrace DHE na experimentálně získané fluorescenci jednotlivých přidavek byl sestrojen graf $1/C_b$ vs. $1/C_f$, z jehož rovnice byla spočtena disociační konstanta K_d .

Měření schopnosti přenášet steroly

K měření elicitem indukovaného přenosu sterolů mezi micelami byly použity stigmasterolové micely a dehydroergosterolové micely. Do 2 ml pufru (10 mM MES pH 7.0) obsahujícího 0,63 μM DHE bylo přidáno 3 μM stigmasterolu. Následně byla měřena fluorescence po přidání proteinu při vlnových délkách EX/EM 325/370 nm.

Měření schopnosti přenášet fosfolipidy

Donorní lipozomy byly připraveny smícháním 160 μl NBD-PC, 40 μl PS a 80 μl cholesterolu, akceptorní smícháním 160 μl PC, 40 μl PS a 80 μl cholesterolu. Chloroform byl odpařen pod dusíkem a poté hodinu na vakuové odparce. Pelet byl resuspendován v pufru (10m MES, pH 7.0). Směs byla sonikována při 40°C v 5 minutových intervalech.

Přenos lipidů byl měřen v 2 ml pufru (10mM MES, pH 7.0) obsahujícím 30 μl donorních a 50 μl akceptorních lipozomů při vlnových délkách 460/534 nm. Po přidavku 20 μl elicitinu (1 mg. ml^{-1}) byl zaznamenán vzrůst fluorescence (Mikeš et al. 1998).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Mutantní formy kryptogeinu

Molekulové modelování komplexu elicitin-ligand pomohlo odhalit aminokyselinové zbytky podílející se na interakci mastných kyselin a sterolů s hydrofobní kavitou elicitinů (Dobeš et al. 2004). Na základě výsledků byly vybrány dva aminokyselinové zbytky – Leu41 a Val84. Leu41 se pravděpodobně podílí na vazbě flexibilních mastných kyselin (nachází se na Ω -smyčce), zatímco Val84 má podíl na vazbě rigidnějších sterolů (mutace směřovaná do hydrofobní kavity). Z těchto důvodů byly navrženy tři mutantní formy kryptogeinu, Leu41Phe – záměna leucinu za objemný fenylalanin by měla vést ke snížené schopnosti vázat mastné kyseliny, Val84Phe - záměna valinu za fenylalanin by měla vést ke snížené vazbě sterolů a Leu41Phe/Val84Phe, která by měla vykazovat kombinaci vlastností obou předešlých mutantních forem Val84Phe a Leu41Phe. Navíc byl navržen protein Lys13Val, u kterého dojde záměnou lysinu za valin k eliminaci povrchového náboje u vstupu do hydrofobní kavity, což by mělo vést k snížené schopnosti vázat steroly. Případné změny v celkové struktuře proteinu byly vyloučeny pomocí dalších modelovacích metod (Lochman et al. 2005).

Stanovení disociačních konstant komplexů elicitin-dehydroergosterol

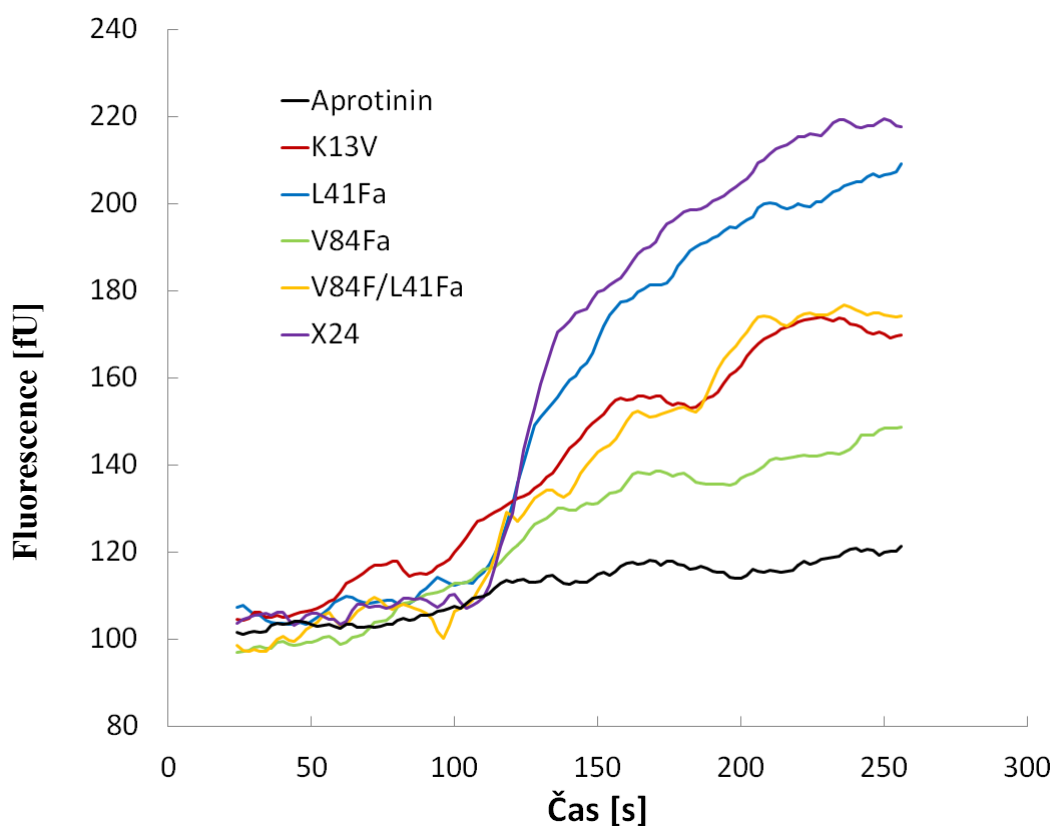
Hydrofobní kavita v jádře elicitinů je příčinou za různě silné interakce elicitinů s řadou lipidických látek. Síla interakce jednotlivých mutantních forem kryptogeinu se steroly byla určena experimentálně získanou disociační konstantou komplexu kryptogein-sterol. K měření byl použit dehydroergosterol (DHE). K vyloučení nespecifických interakcí byl jako negativní kontrola použit aprotinin (malý bazický protein). Disociační konstanty spočtené z fluorimetrických dat (Tabulka 1) jsou v souladu s predikcí molekulového modelování, proteiny Val84Phe/Leu41Phe a Val84Phe sterol vůbec neváží, protein Lys13Val a LEU41F v omezené míře.

Tabulka 1. Disociační konstanty mutantních forem kryptogeinu. Disociační konstanty komplexů elicitin-dehydroergosterol vypočtené z hodnot fluorescenční křivky pro jednotlivé přídavky dehydroergosterolu pomocí rovnice $1/C_b = (K_d/NA)(1/C_f) + 1/NA$

Protein:	K_d (μM)
Kryptogein (X24)	$0,255 \pm 0,014$
Leu41Phe	$0,672 \pm 0,046$
Lys13Val	$0,913 \pm 0,047$
Val84Phe	Neváže
Val84Phe/Leu41Phe	Neváže

Analyza schopnosti jednotlivých mutantních forem kryptogeinu přenášet steroly

Elicitiny vykazují společnou schopnost přenášet lipidické látky mezi biologickými membránami. Měření schopnosti přenosu sterolů bylo prováděno za kritickou micelární koncentrací DHE ($\text{CMC}_{\text{DHE}} = 0,025 \mu\text{M}$), tudíž po krátké době po přídavku DHE do pufru se vytvořily donorní micely. Po přidání řádově vyšší koncentrace stigmasterolu, se vytvořil přebytek akceptorních micel. Přídavek kryptogeinu poté vedl k růstu fluorescence, což je způsobeno zředěním DHE do přebytku přítomných stigmasterolových micel (Obr. 1).



Obr. 1. Přenos sterolů mezi DHE a stigmasterol micelami katalyzovaný jednotlivými elicitiny a aprotininem měřený jako změna fluorescence DHE. Elicitiny a aprotinin byly přidány ve 120s.

Z počátečního nárůstu fluorescence po přidání jednotlivých proteinů, můžeme kvantifikovat schopnost jednotlivých mutantních kryptogeinů a aprotininu (negativní kontrola) přenášet steroly (Tabulka 2).

Tabulka 2. *Přenos mastných kyselin a sterolů.* Hodnoty počátečního nárůstu fluorescence po přidavku elicitinů pro přenos DHE a NBD-PC (7-nitrobenzofurazan-fosfatidyl cholin).

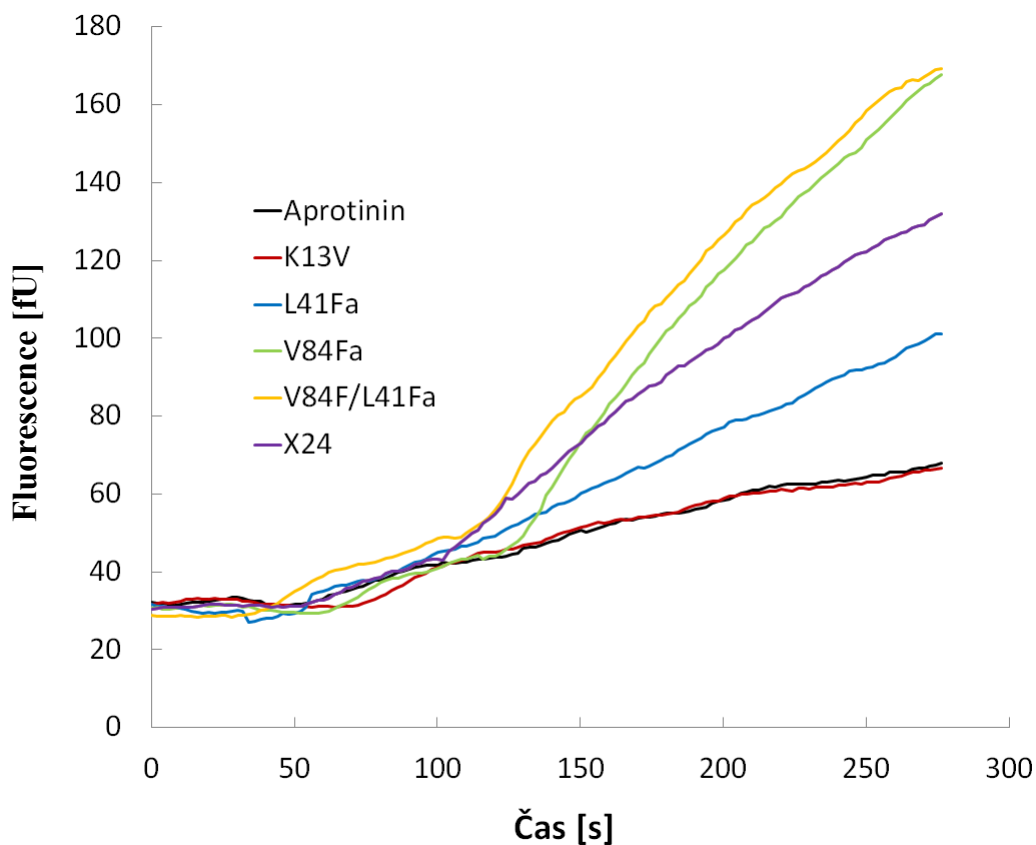
Protein:	Přenos DHE	Přenos NBD-PC
Aprotinin	0,194 ± 0,0076	0,152 ± 0,0013
Lys13Val	0,591 ± 0,0120	0,107 ± 0,0024
Leu41Phe	1,384 ± 0,0676	0,320 ± 0,0010
Val84Phe/Leu41Phe	0,382 ± 0,0096	0,764 ± 0,0047
Val84Phe	0,544 ± 0,0224	0,744 ± 0,0087
X24	2,512 ± 0,0634	0,515 ± 0,0045

U proteinů Val84Phe a Val84Phe/Leu41Phe je schopnost přenosu sterolů značně omezená, což je ve shodě s předešlým stanovením disociačních konstant – kryptogein nesoucí mutaci Val84Phe není schopen vazby a tudíž ani přenosu sterolů mezi membránami. Protein Lys13Val také vykazuje silně sníženou schopnost přenášet steroly, což se neshoduje s výsledky z měření disociačních konstant neboť protein Lys13Val byl schopný vázat volný sterol v pufru. Tento rozpor ukazuje na pravděpodobně zásadní vliv změny povrchového náboje na interakci elicitinů s plazmatickou membránou.

Analýza schopnosti jednotlivých mutantních forem kryptogeinu přenášet mastné kyseliny

Za daných podmínek (viz. Materiál a Metody) podmínek tvoří NBD-phosfatidyl cholin (7-nitrobenzofurazan-fosfatidyl cholin) ve vodě lipidické vložky – Liposomy obsahující fluorescenční fosfolipid NBD-PC (7-nitrobenzofurazan-fosfatidyl cholin) podléhají samozhášecímu efektu. Přidáme-li k nim však akceptorové liposomy obsahující fosfatidyl cholin, fluorescence pomalu stoupá díky samovolná výměně. Přídavek kryptogeinu poté způsobí rychlejší nárůst fluorescence odpovídající zvýšenému rychlosti přenosu NBD-PC mezi liposomy katalyzovaném kryptogeinem (Obr. 2). Rychlosti vyjádřené hodnotami směrnice počátečního růstu fluorescence po přidání jednotlivých elicitinů jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 2).

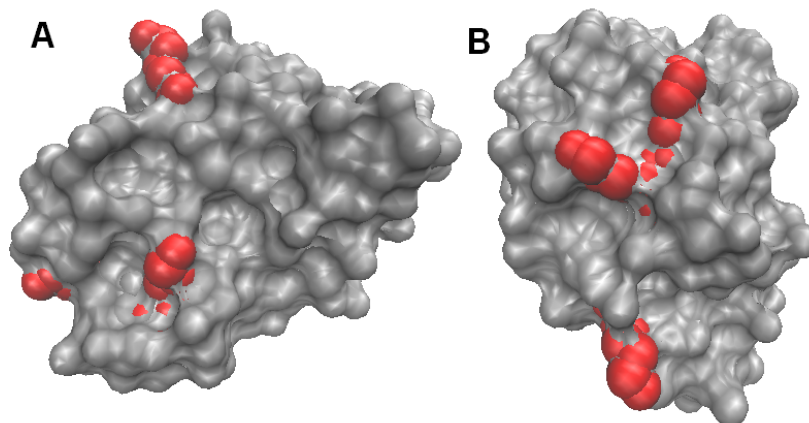
Z výsledků je patrné, že proteiny Val84Phe a Val84Phe/Leu41Phe přenášely mastné kyseliny mezi liposomy účinněji než divoký kryptogein X24. Tento jev se dá vysvětlit tím, že mastné kyseliny nekompetují se sterolem o vazebné místo v kavitě, neboť dané proteiny sterol nevážou a také tím, že objemné reziduum na pozici VAL84 zvětší povrch i hydrofobicitu kavity v jádře proteinu. Kryptogein nesoucí mutaci Lys13Val nepřenáší mastné kyseliny vůbec, což opět dokazuje důležitost povrchového náboje na interakci s plazmatickou membránou, v případě přenosu mastných kyselin je tento efekt ještě patrnější než v případě přenosu sterolů. Protein Leu41Phe má sníženou schopnost přenosu mastných kyselin, což je v dobré shodě s daty z molekulového modelování (Dobeš et al. 2004).



Obr. 2. Přenos mastných kyselin mezi NBD-PC liposomy a PC liposomy katalyzovaný jednotlivými elicitiny a aprotininem měřený jako změna fluorescence NBD-PC. Akceptorové liposomy byly přidány k donorovým v 50 s a v 120 s byly přidány elicitiny a aprotinin.

Nová sada mutantních forem kryptogeinů

Na základě získaných dat z fluorescenčních analýz měření vazby a přenosu sterolů a mastných kyselin vyplývá, že rozložení povrchového náboje má klíčový význam na interakci proteinu s plazmatickou membránou. Pro detailnější objasnění vlivu povrchového náboje na interakci kryptogeinu s membránou a vysokoafinitním vazebním místem byla navržena další sada mutantních forem kryptogeinu, u kterých budou postupně nahrazovány povrchové lysiny za threonin. Tím bude docházet k postupné eliminaci povrchového náboje v daných pozicích. Ze strukturního pohledu budou klíčové pravděpodobně dva krajní případy, kdy bude kryptogein zbaven náboje na straně v okolí kavity, o které se domníváme, že je nezbytná k vazbě na vysoce afinitní místo na plazmatické membráně (lyzinové zbytky 13, 61, 62) a na straně opačné (lyzinové zbytky 48, 94, 39) (Obr. 3).



Obr. 3. Lyziny podílející se na interakci kryptogeinu s plazmatickou membránou. A: lyziny, které se pravděpodobně nepodílí na interakci kryptogeinu s plazmatickou membránou (Lys 39, Lys 48, Lys 94), B: lyziny, které jsou pravděpodobně nezbytné pro interakci kryptogeinu s plazmatickou membránou (Lys 13, Lys 61, Lys 62). Obrázek byl vytvořen pomocí software VMD (University of Illinois).

ZÁVĚR

Fluorescenční měření se sadou mutantních kryptogeinů Val84Phe, Leu41Phe, Val84Phe/Leu41Phe a Lys13Val pomohla částečně objasnit vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou elicitinů. Měření dále ukázala na silný vliv povrchového náboje na schopnost elicitinů interagovat s plazmatickou membránou hostitele a na jejich schopnost přenosu sterolů a mastných kyselin.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Dobeš P., Kmuniček J., Mikeš V., Damborský J. (2004): Binding of fatty acids to β -Cryptogein: quantitative structure-activity relationships and design of selective protein mutants. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, 44: 6565-6577.
- Fefeú S., Bouaziz S., Huet J.-C., Pernollet J.-C., Guittet E. (1997): Three-dimensional solution structure of β -cryptogein, a β -elicitin secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. *Protein Sci.*, 6: 2279-2284.
- Lloyd M. Yu. (1995): Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Colloquium Paper*, 92: 4088-4094.
- Lochman J., Kasparovsky T., Damborský J., Osman H., Marais A., Chaloupková R., Ponchet M., Blein J.-P., Mikeš V. (2005): Construction of cryptogein mutants, a proteinaceous elicitor from *phytophthora*, with altered abilities to induce a defense reaction in tobacco cells. *Biochemistry*, 44: 6565-6572.
- Mauch-Mani B., Metraux J.P. (1998): Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*, 82: 535-540.
- Mikeš V., Milat M.-L., Ponchet M., Panabie`res F., Ricci P., Belin J.-P., Elicitins (1998): Proteinaceous Elicitors of Plant Defense, Are a New Class of Sterol Carrier Proteins. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 245: 133-139.

- Osman H., Mikeš V., Milat M.-L., Ponchet M., Marion D., Prange T., Maume B.F., Vauthrin S., Blein J.-P. (2001): Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogein and compete with sterols. *FEBS Letters*, 489: 55-58.
- Ponchet M., Panabiere F., Milat M.-L., Mikeš V., Montillet J.-L., Suty L., Triantaphylides C., Tirilly Y., Blein J.-P. (1999): Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell. Mol. Life Sci.*, 56: 1020-1047.
- Vauthrin S., Mikeš V., Milat M.-L., Ponchet M., Maume B., Osman H., Blein J.-P. (1999): Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1419: 335-342.