

A T7 bakteriofág atomi erőmikroszkópos ultrastruktúrája és nanomechanikai tulajdonságai

Doktori tézisek

Vörös Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Kellermayer Miklós egyetemi tanár, D.Sc.
- Hivatalos bírálók: Dr. Dobó-Nagy Csaba egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Végh Attila Gergely tudományos munkatárs, Ph.D.
- Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Monos Emil professzor emeritus, D.Sc.
- Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Alpár Alán egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Bugyi Beáta egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2018

BEVEZETÉS

A vírusok fertőző obligát intracelluláris paraziták, melyeket egy nanométeres nagyságrendű fehérje kapszid és a benne foglalt örökítőanyag épít fel. A kapszid feladata, hogy megvédje az örökítőanyagot a külső káros kémiai és fizikai hatásoktól, továbbá DNS vírusok esetén egyaránt felel az örökítő anyag továbbításáért: a kapszidba csomagolásért és a gazdaszervezetbe juttatásért.

Kutatócsoportunk régóta érdeklődik a T7 bakteriofág szerkezeti felépítése és stabilitása iránt. A T7 bakteriofág a *Podoviridae* családhoz tartozik és a *Escherichia coli* baktérium törzseit fertőzi. A T7 bakteriofág feji és farki régióra tagolható, ahol a feji rész egy T=7 szimmetriájú ikozaéderes héjből és egy belső magból áll. A belső magot gp14, gp15, gp16 és gp8 fehérjék alkotják, a héjat pedig 415 darab gp10A fehérje építi fel. A héjat képező strukurális fehérjék kétféle alegységbe rendeződnek: ötösével pentamereket, hatosával hexamereket alkotnak. A pentamerek a 12 ikozahedrális csúcs 11 pontján helyezkednek el, míg az utolsó csúcs a tizenkettes elrendeződésű gp8 konnektor fehérjéssel van betöltve. A 60 hexamer pedig dupla sorba rendeződve a pentamerek közötti területet tölti ki. Az érett kapszid egy 40 kbp hosszúságú DNS-t foglal magába. Az utóbbi években vált ismertté, hogy a vírusok geometriájának jelentős szerepe van a strukurális és mechanikai stabilitásuk kialakításában.

Korábban, kutató csoportunkban a T7 bakteriofág szerkezetét és mechanikai stabilitását főként abszorpciós spektroszkópiai módszerekkel vizsgálták, melyek kimutatták, hogy a fág három jelentős hőmérséklet-függő szerkezeti változáson megy keresztül. Az első átmenet 50-55 °C körül történik, melyet a kapszidba zárt DNS rendezettségének csökkenése kísér és a kapszid fehérjeszerkezetének fellazulására utal. A második átmenet 80-85 °C körül következik be, mely feltehetőleg a dupla szálú DNS szétválása miatt megy végbe. Végül a harmadik átmenet 90-95 °C körül látható, és az alfa-helikális fehérjeszerkezet felbomlásához köthető.

Egy nagy felbontású technika, az atomerő mikroszkópia (AFM) segítségével megpróbáltuk feltárni ezen strukurális változások mögött rejlő mechanizmusokat. Az AFM-es képalkotás lehetővé teszi a kapszid szerkezetének precíz feltérképezését és az általános méretek meghatározásán túl a kapszomerek elrendeződését és az alattuk húzódó fehérjeszerkezet azonosítását. Továbbá, az *in situ* erőspektroszkópia az AFM-et egyedülálló eszközzé teszi a vírusok mechanikai tulajdonságainak vizsgálatára. A jelen dolgozat összegzi azon kísérleteinket, melyek célja a T7 bakteriofág szerkezeti felépítésének, nanomechanikájának és az erő-vezérelt szerkezeti átalakulásainak alaposabb megértése.

CÉLKITŰZÉSEK

Bár ismert, hogy a vírusok hőkezeléssel inaktiválhatók, a kezelés hatására bekövetkező szerkezeti változásokat kísérő mechanikai átalakulások még feltáratlanok. Továbbá a DNS kiszabadulásának mechanikája és a folyamat során a kapszidban fellépő dinamikus változások még mindig ismeretlenek. Az AFM egy kiválóan alkalmas eszköz a nanométeres nagyságrendű partikulumok különböző környezeti feltételek mellett történő részletes szerkezeti vizsgálatára, ezentúl lehetővé teszi a partikulumok mechanikai vizsgálatát is. Az AFM ezen kedvező adottságait kihasználva a következő kérdésekre kerestünk választ a vizsgálataink során:

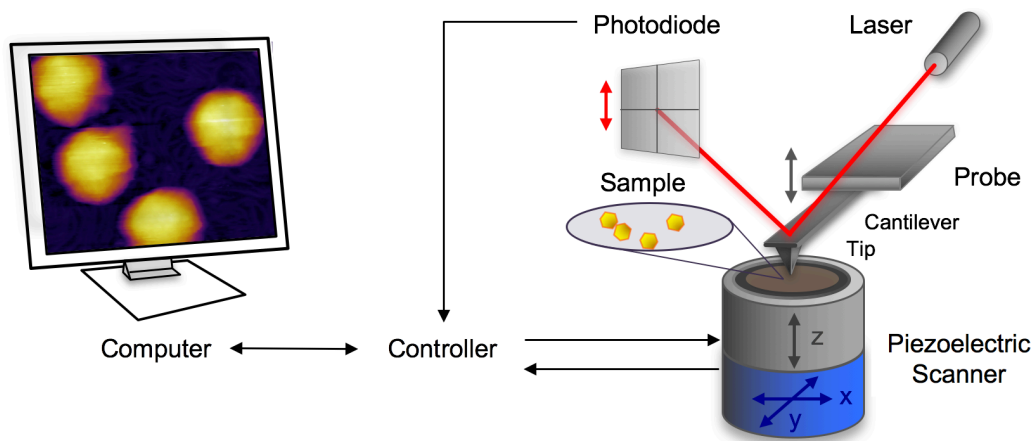
- Milyen változások következnek be a kapszid szerkezetében hőkezelés hatására?
- Hogyan befolyásolják ezek a szerkezeti változások a partikulumok mechanikai tulajdonságait?
- Hogyan járul hozzá a genomiális DNS a kapszid mechanikai stabilitásához?
- Milyen kapcsolatban vannak a kapszid mechanikai tulajdonságai a kapszomer fehérjék topológiájához, dinamikájához és a kapszomerek közötti kölcsönhatásokhoz?
- Mi a külső mechanikai erő szerepe a T7 fágban tárolt DNS kiszabadulásának előidézésében?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vírusok topográfiájának atomi erőmikroszkópos vizsgálata

A felszínhez rögzített vírus partikulumokról PBS pufferben (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) non-kontakt üzemmódban alkottunk képet.

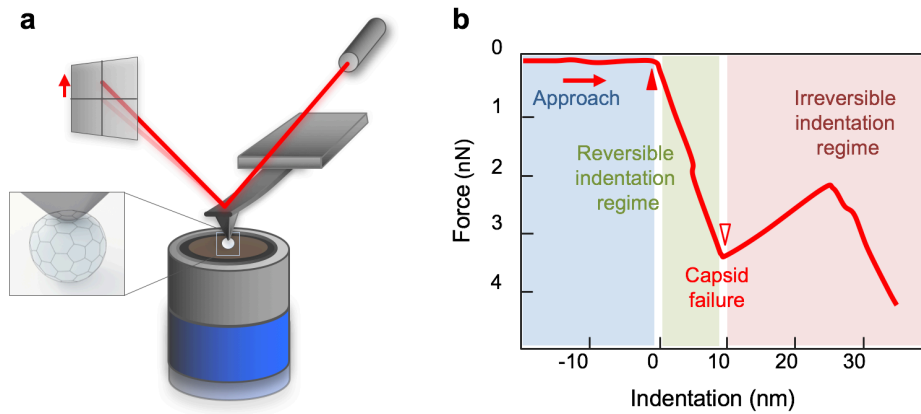
Az AFM egy rugólapka végére erősített hegyes tűvel a felszínhez igen közel kerülve pásztázik (**1. ábra**), melynek során a minta és a tű között ébredő erők a rugólapkát elhajlítják. Az elhajlást a rugólapka hátuljára fókuszált, majd egy kvadráns fotodiódára visszaverődött lézer sugár segítségével rögzíti. A kiválasztott terület pásztázását az x-y irányú piezo kristályok teszik lehetővé a minta horizontális mozgatása által. A vírus partikulumok felszínhez rögzítését két lépcsős felületkezelési eljárással biztosítottuk, melynek során a kapszid fehérjét keresztkötöttük a felszínhez. Az első lépés a felszín poly-L-lizines kezelése, melynek során kovalensen kötött, pozitív töltésű amino csoportokat vittünk a felszínre. A második lépés a felszín keresztkötő glutáraldehides kezelése, mely növeli az AFM-es pásztázás stabilitását folyadék közegben.



1. ábra Egy tipikus AFM-es mérési elrendezés sematikus ábrája.

Vírusok mechanikájának atomi erőmikroszkópos vizsgálata

A mechanikai manipulációt megelőzően képet alkottunk a víruspartikulumokról, hogy meggyőződjünk az épségükről és hogy az AFM tűt egy kiválasztott partikulum fölé pozícionáljuk. Ezután a partikulumot a csúcsánál benyomtuk, míg a tűre kifejtett erő egy előre meghatározott maximális értéket elért, majd a tűt konstans sebességgel visszahúztuk. Az indentációs mérések eredményeként erő-elmozdulás görbéket kaptunk, melyek analízise információt adott a kapszidok mechanikai tulajdonságairól. A **2.a ábra** egy indentációs mérés kísérleti elrendezését mutatja, míg a **2.b ábra** egy reprezentatív sematikus erő-elmozdulás görbét, mely három fő régióra osztható. Az első régióban a tű közelít a felszínhez de még nem lép kontaktusba a mintával, így a rugólapka nem hajlik el és a mért erő nulla. Miután a tű eléri a kapszidot (**2.b ábra**, teli háromszög) az erő hirtelen elkezd növekedni. Az erőgörbe ezen pozitív meredekségű lineáris szakasza a víruspartikulum deformációjának felel meg, ahol a lineáris szakasz meredeksége megadja a partikulum rugóállandóját. Amikor a kapszid nem bír ellenállni további terhelésnek, a kapszid beroppan és a mért erő hirtelen leesik (**2.b ábra**, üres háromszög). A kapszid összeroppanását követő régió a rugólapka egyensúlyi állapotához tartó terheletlen rezgésének felel meg. Így ennek a szakasznak a meredeksége egyenlő a rugólapka rugóállandójával. Ezentúl az indentációs mélység, a kontakt pont és az összeroppanás közötti szakasz (**2.b ábra**, zöld terület szélessége) és az ehhez tartozó törési erő további információt nyújt a kapszid mechanikai tulajdonságairól.

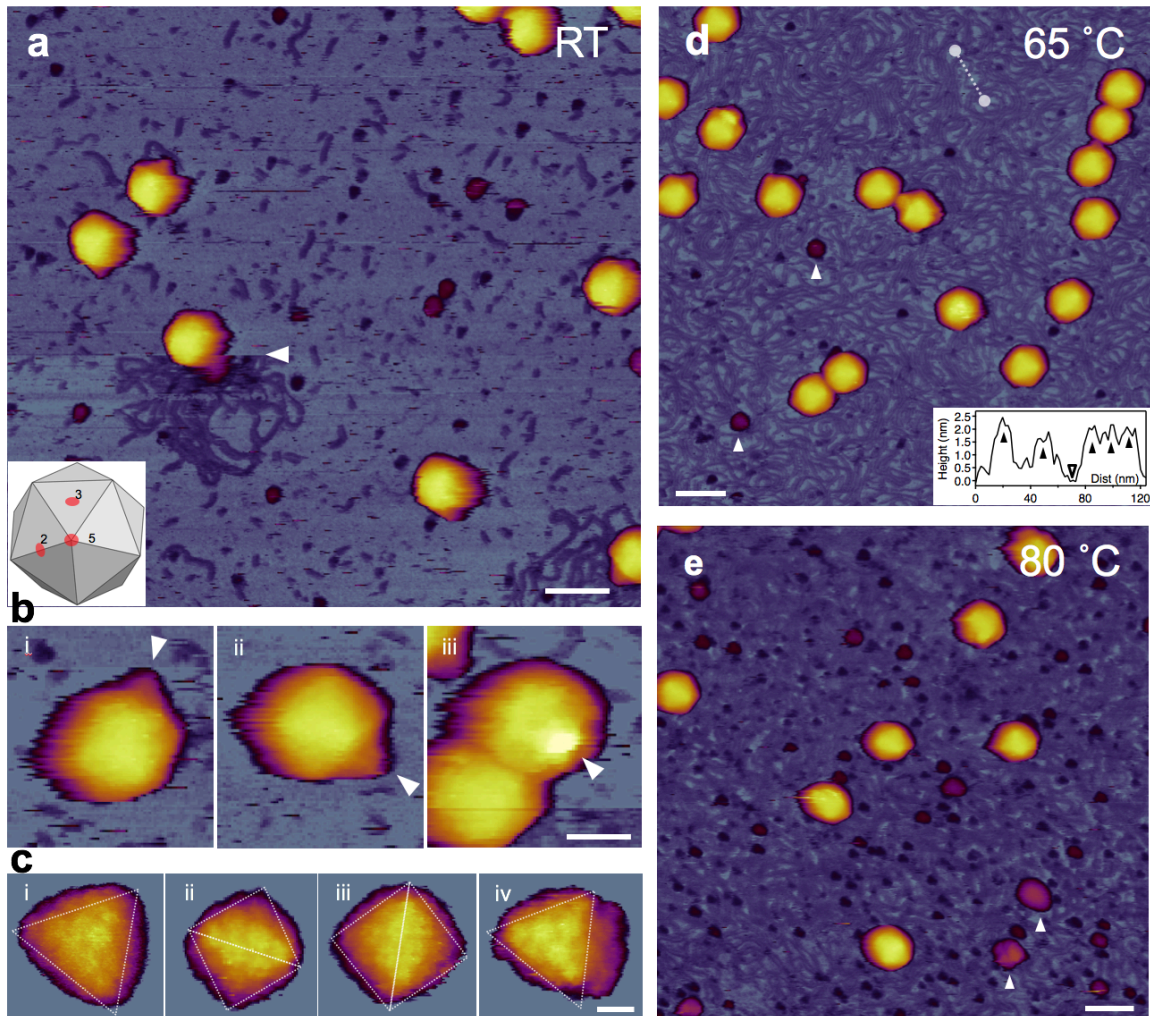


2. ábra Virus nanoindentáció sematikus ábrája. (a) A vírus partikulum AFM tűvel történő benyomásának következtében a rugólapka elhajlik; a tű által kifejtett erőt a fotodiódára vetülő lézersugár elmozdulásából számoljuk. (b) Az indentációs erő az indentációs mélység függvényében ábrázolva.

EREDMÉNYEK

A T7 bakteriofág hőmérséklet-függő topográfiája és nanomechanikája

A hőkezelés indukálta szerkezeti változások feltérképezéséhez két lépcsőben melegítettük a fágokat (65 °C, 80 °C), majd AFM segítségével vizsgáltuk a kapszidra kifejtett hatását. A szobahőmérsékleten pásztázott képeken a felszínhez kötött vírusok ép, gömb alakú partikulumként jelentek meg (**3.a-c ábra**). Hegyes tűt használva a kapszidok közepén található pórusok is feloldhatóvá váltak, ami lehetővé tette a felszínhez való kötődés szimmetriájának azonosítását. Egyes vírusok körül DNS szálak csoportosultak az alkalomszerű, mechanikailag-indukált DNS kilökődés miatt. A legtöbb víruspartikulum felületén különböző helyeken a kúp alakú farok régió is láthatóvá vált, függően csillámhoz való kötődés orientációjától (**3.b ábra**). A háttérben gömbszerű partikulumok is megjelentek, melyek feltehetőleg a DNS kilökődés során egyidejűleg távozott magfehérjékből származnak.

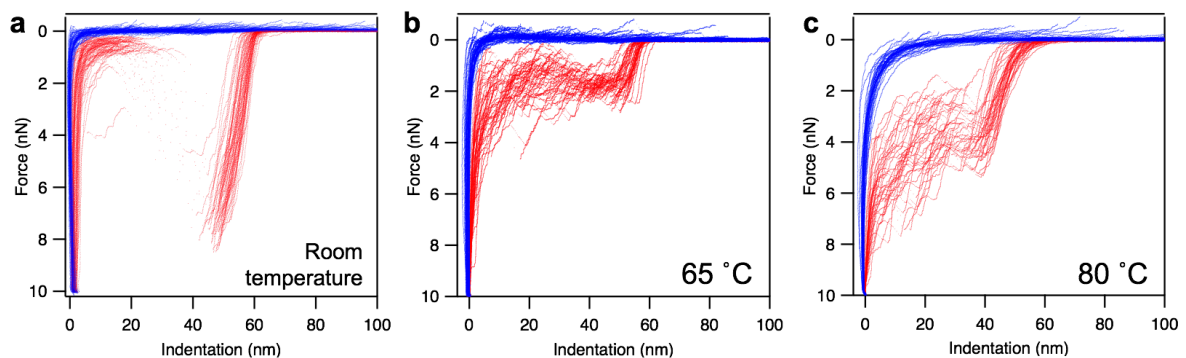


3. ábra Felszínhez rögzített kezeletlen T7 bakteriofágok AFM-es topográfiája. **(a)** 1 μm x 1 μm -es minta terület topográfiai képe. A fehér nyíl a hirtelen bekövetkezett mechanikailag indukált DNS kilöledés eredményét mutatja. Méretskála: 100 nm. **(b)** A szobahőmérsékleten pásztázott T7 fágok AFM képein különböző orientációban elhelyezkedő kúpszerű farkirégiók. A fehér nyilak a farki régiók csúcspontjaira mutatnak. Méretskála: 30 nm. **(c)** T7 fágok felszínének és jól kivehető kapszomerjeinek nagyfelbontású AFM képe. Partikulumok felszíne kétszeres (ii, iii) és háromszoros (i, iv) szimmetriásokból nézve. Méretskála: 10 nm. **(d)** 1 μm x 1 μm -es, 65 °C-on kezelt minta terület topográfiai képe. A fehér nyilak a nagy (>10 nm) gömszerű partikulumokat jelölik. Méretskála: 100 nm. **Betétábra**, a háttér egy tetszőlegesen kiválasztott szakaszának (fehér szaggatott vonal) magasságprofilja. **(e)** 1 μm x 1 μm -es, 80 °C-on kezelt minta terület topográfiai képe.

A kapszid szerkezetének szobahőmérsékleten történő topográfiai vizsgálata után a mintát 15 percen át hőkezeltük 65 °C-on, majd képkötés céljából visszahűtöttük 20 °C-ra (**3.d ábra**). A 65 °C-os hőkezelés után a minta topográfiája jelentősen megváltozott (**3.d ábra**). A csillámfelület DNS-ek hálózata borította, a legtöbb kapszidról a kúp alakú farki régió eltűnt, továbbá a háttérben számos nagy (>10 nm), göbszerű partikulum vált láthatóvá, melyek feltehetőleg a letörött farki régiók maradványai. A kapszidok felszínén jobban kivehetővé váltak az ikozaéder élek és lapok, ami a DNS kilöködése miatt bekövetkező enyhe kapszid

zsugorodással magyarázható (**3.d ábra**). A 80 °C-os hőkezelés hatására a háttérrel még sűrűbben borította DNS (**3.e ábra**). Továbbá számos gömbszerű partikulum, valamint nagy méretű aggregátum is megjelent elszórtan a háttérben, melyek a kapszidfal maradványai lehettek. A nagyfelbontású AFM képeken a kapszomerek duzzadtabbnak látszottak, fogaskerékszerű szerkezetük pedig kevésbé volt kivehető.

A vírus partikulumok hőkezelés hatására bekövetkezett topográfiai változásainak vizsgálata után indentációs méréseket végeztünk, hogy feltárjuk a hőkezelés okozta nanomechanikai változásokat is (részleteket lásd a Módszerek fejezetben). A szobahőmérsékleten, valamint 65 és 80 °C-os hőkezelés után regisztrált erőgörbéket a **4. ábra** mutatja.



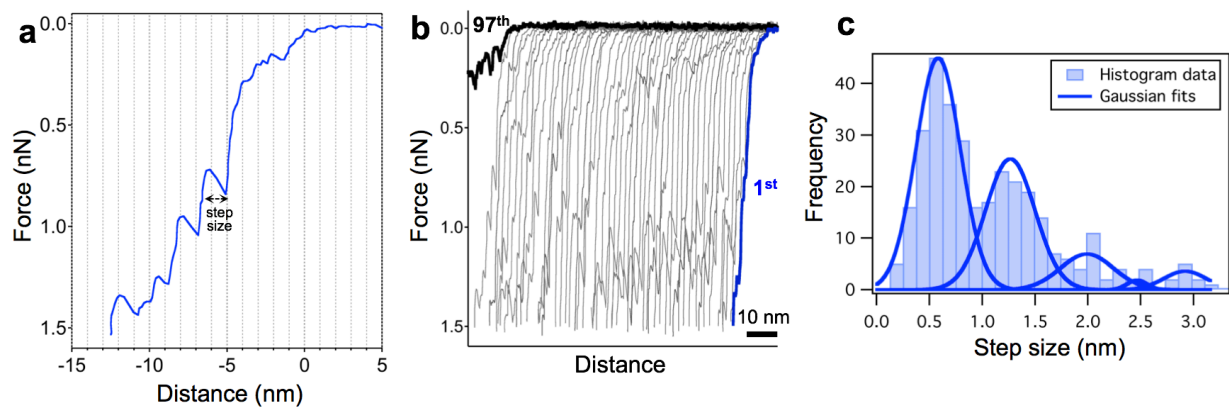
4. ábra A T7 bakteriofág nanomechanikája. Különböző fág partikulumokon független mérések sorozatán keresztül rögzített, majd egymásra vetített erő-indentációs görbék szobahőmérsékletű (**a**), valamint 65 °C (**b**) és 80 °C (**c**) hőmérsékleten kezelt minták esetén.

Az erőgörbék analízise azt mutatta, hogy a kapszid betöréséhez szükséges erő jelentősen lecsökkent a 65 °C-os hőkezelés hatására (6.80 nN-ról 1.61 nN-ra), ami arra utal, hogy a kapszidba zárt DNS jelenléte jelentősen hozzájárul a mechanikai stabilitás kialakításához. Különös módon a 80 °C-os hőkezelés hatására a töréshez szükséges erő kissé megnövekedett, ami feltehetőleg a kapszomer fehérjékhez köthető szerkezeti átalakulás következménye. A 65 és 80 °C között történt átrendeződés hozzájárulhatott a kapszidok teljes mechanikai stabilitásának növekedéséhez. Az erőgörbék alapján számított rugóállandó mintegy kétszer akkora volt szobahőmérsékleten, mint a DNS-ét vesztett vagy hőkezelt kapszidok esetén. Ez arra utal, hogy a kapszidba zárt DNS jelenléte hozzájárul a kapszid rugalmasságának kialakításához. A maximális benyomódás mértéke fokozatosan emelkedett a hőkezeléssel, feltehetőleg a töréshez szükséges erő és a rugóállandó változásának együttes hatásának következtében.

A T7 bakteriofág erő-vezérelt strukturális változásai

Annak érdekében, hogy információt szerezzünk a vírus partikulumok mechanikai stabilitásáról, fáradás méréseket végeztünk az átlagos (7 nN) törési erőnél alacsonyabb 1.5 nN maximális erőt

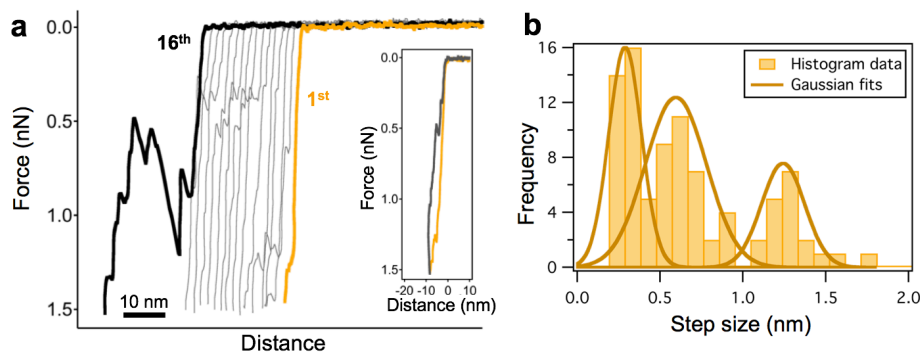
alkalmazva. Ez a terhelési erő 10 nm körüli maximális benyomódást okozott, ami elegendően alacsony ahhoz hogy ne törje be a kapszidot első nyomásra, de kellően magas ahhoz, hogy néhány nyomási ciklus után előidézzé azt. A mechanikailag terhelt partikulumok körülbelül ötödénél az erőgörbék számos diszkrét lépcsőszerű átmenetet tartalmaztak (**5. ábra**).



5. ábra A T7 kapszid lépcsőszerű átmenetei és mechanikai fáradása. **(a)** A kapszid benyomása során rögzített reprezentatív erő-elmozdulás görbe. A lépcsőméret a fűrészfogszerű csúchoz tartozó erőnél mért távolság különbségnek felel meg. **(b)** Szobahőmérsékleten, egyetlen kapszidon mért 97 egymást követő indentációs görbe. Az egymásutáni görbék az tengely mentén egymástól 2 nm-rel elcsúsztatva a jobb láthatóságért. **(c)** Gauss görbékkel illesztett lépcsőtávolságok eloszlása. Az illesztett görbék csúcsai: $0.58 (\pm 0.21)$, $1.26 (\pm 0.24)$, $1.99 (\pm 0.25)$, $2.47 (\pm 0.09)$ és $2.92 (\pm 0.19)$ nm.

Az átmenetek tipikusan fűrészfogszerű csúcsok sorozatából álltak, melyeket egy hirtelen erővisszaesés követett. Az egymást követő görbék száma gyakran elérte a 100-at a kapszid betörését megelőzően, továbbá szisztematikusan tartalmazták a fűrészfogszerű átmeneteket (**5.b ábra**). A lépcső-átmenetek méret eloszlás analízise 0.6 nm (0.58 ± 0.21 nm, S.D) egész számú többszörösénél mutatott csúcsokat. Ez arra utal, hogy egyetlen átmenet megfeleltethető a kapszid szerkezetében bekövetkezett 0.6 nm-es eltolódásnak, amely feltehetőleg szorosan összefügg a kapszomerekben végbement diszkrét szerkezeti változással.

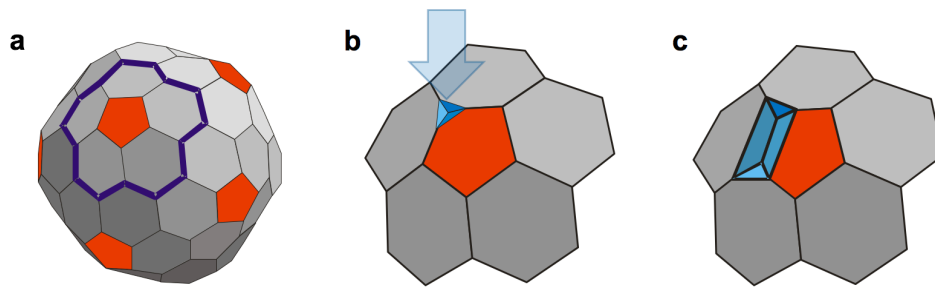
Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a DNS szerepét a lépcsőszerű átmenetek kialakításában, fáradás méréseket végeztünk 65°C -os hőkezeléssel kiürített partikulumokon. Ebben az esetben is ismétlődően hasonló erő-elmozdulás görbéket kaptunk, de a törést megelőző egymásutáni görbék száma jelentősen alacsonyabb volt mint a szobahőmérsékletű minta esetén (**6. ábra**). Mindez arra enged következtetni, hogy a DNS jelenléte valóban hozzájárul a fágok mechanikai stabilitásának a kialakításához és növeli az ellenállóképességet a kapszidburkolat mechanikai fáradását illetően.



6. ábra 65 °C-on kezelt T7 bakteriofágok diszkrét nanoindentációs lépcsői. **(a)** Egyetlen kapszidon 16 egymásutáni indentációval mért erő-elmozdulás görbe. **(b)** Lépcsőtávolságok eloszlása. **(c)** A kumulatív lépcsőméret adatsorra illesztett Gauss görbék csúcsai: 0.29 (± 0.09), 0.59 (± 0.19) és 1.24 (± 0.13) nm.

A 65 °C-on kezelt mintákon mért lépcső-átmenetek méret eloszlás analízise csúcsokat mutatott 0.59 nm (± 0.37 nm) és 1.24 nm (± 0.26 nm) távolságoknál, melyek a 0.6 nm egész számú többszöröse és megfeleltethetőek a szobahőmérsékleten mért első és második csúcsnak. A hőkezelés hatására azonban egy plusz csúcs is megjelent 0.29 nm (± 0.19 nm) körül, ami az egység-lépcső méret felének felel meg. Azt feltételezzük, hogy ez a szerkezeti változás a pentamerekkel kapcsolatos a következők miatt: (a) az erő-elmozdulás görbékben az átmenetek megjelenésének valószínűsége 0.2, mely megegyezik a kapszidburkolatot felépítő pentamerek (12) és a hexamerek (60) előfordulási arányával, (b) a lépcsőszerű átmenetek maximális száma görbénként 5 és (c) a pentamerek kitettek a mechanikai horpadásnak, mivel a T7 kapszid ikozaéderes felépítése miatt kiemelkednek a felszínből

Valószínűsíthető, hogy az átmenetek akkor figyelhetők meg, ha a T7 kapszid egyik pentamerje felfelé néz. Amennyiben öt szerkezeti hiba összegződik egy pentamernél, a kapszid fala nem képes további terhelésnek ellenállni és az AFM túlszakítja. Tehát azt feltételezzük, hogy a lépcsőszerű átmenetek a pentamerek fokozatos behorpadásához köthetők. Annak érdekében, hogy a behorpadás alap egységét, a 0.6 nm-es lépcsőméretet megfeleltessük a kapszidfal egy szerkezeti elemének, készítettünk egy egyszerű geometriai modellt (**7. ábra**).

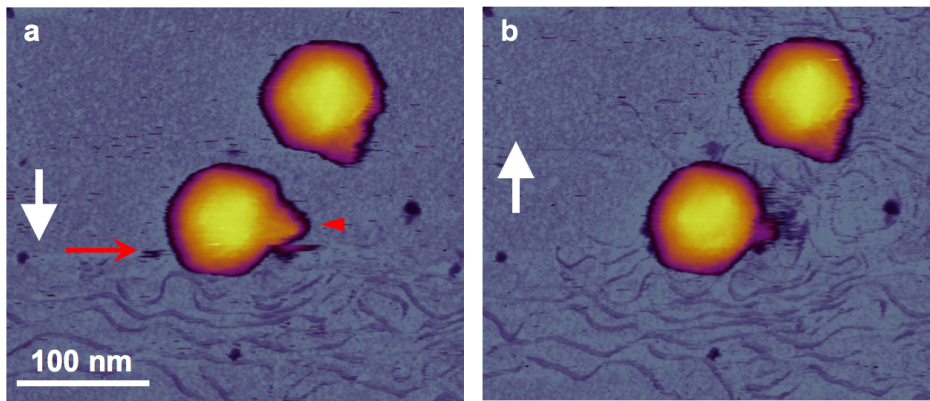


7. ábra A T7 kapszid mechanikailag indukált lépcsőszerű horpadásainak fenomenológiai modellje. **(a)** A T7 kapszid sematikus ábrája a horpadásban részvevő kapszomereket kiemelve (egy pentamer a körülötte levő hexamerekkel, vastag kék vonal). **(b)** Az AFM rugólapka indentációja (kék nyíl) által kiváltott első horpadási lépcső. **(c)** A horpadás progressziója a kapszid felülete mentén.

A T7 bakteriofág mechanikailag-indukált DNS kilökődése

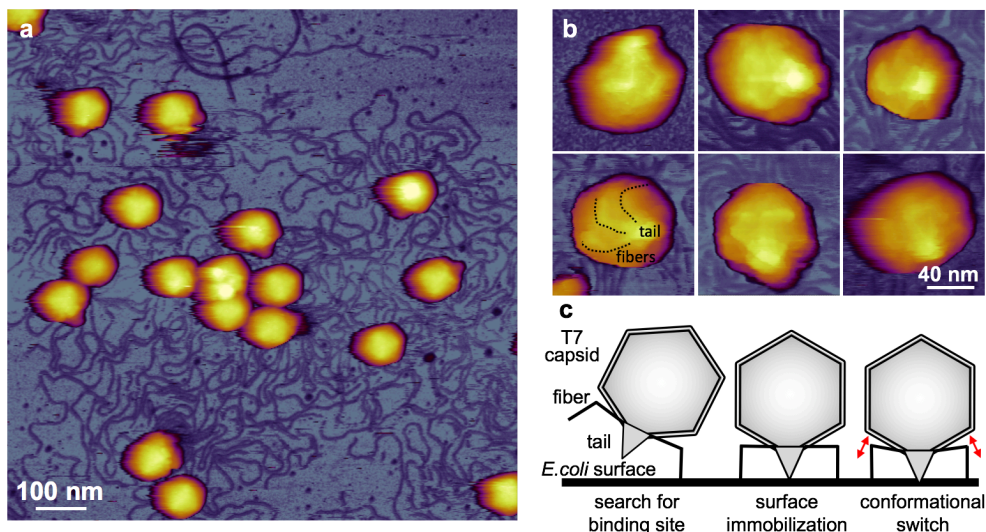
A mechanikai erőnek a DNS kilökődés előidézésében betöltött szerepének vizsgálatához vizualizáltuk a vírus partikulumok mechanikailag indukált szerkezeti változásait. A felszínhez kötött kapszidokat sorozatosan pásztáztuk és rögzítettük a rugólapka mechanikai tapogatásának hatására bekövetkező DNS kilökődést az idő függvényében (**8. ábra**). A képek analízise lehetővé tette a mechanikailag-indukált DNS kilökődés legfontosabb jellemzőinek azonosítását:

- A kilökődött és felszínhez kötődött DNS csak egy része a teljes T7 genomnak, kinetikus csapdázott esett szerkezeti állapotban. A hipotézisünk megerősítése érdekében összehasonlítottuk a képeken látható kiszabadult DNS által beterített csillámfelület méretét azzal amit a felszínre egyensúlyba rendeződött és a felszínre kilökődött teljes genom hosszából számoltunk.
- A DNS kilökődés láthatóan a fark régió keresztül történt (**8. ábra**), mely arra utal, hogy a folyamat a természetes útvonalán ment végbe. Annak érdekében, hogy eldöntsük, hogy a DNS kiszabadulását a rugólapka túje általi farki régió letörés okozta-e, kiegészítő méréseket végeztünk. Ezen mérések során a DNS kilökődést úgy idéztük elő, hogy csak a kapszid felületet pásztáztuk a farki régiót kikerülve.
- A DNS kilökődés a farki régió keresztül történt egy a T7 fágra jellemző sebességgel. Ezt a sebességet az egymás után pásztázott képek analíziséből becsültük meg.
- A fark régiótól távol eső mechanikai terhelés olyan perturbációt okozott, mely továbbterjedt a DNS-sel töltött kapszid összenyomható közegén és végül a DNS kilökődését eredményezte. Becsléseink szerint a DNS kilökődését előidéző belső nyomásnövekedést a rugólapka rezgése váltotta ki.



8. ábra A T7 bakteriofág DNS kilökődésének *in situ* AFM vizsgálata. A DNS kilökődés közben (a) és után (b) rögzített AFM magasságképek. A két kép rögzítése között eltelt idő 7 perc. A fehér nyíl az AFM pásztázás irányát, a piros nyíl pedig azt a pásztázási vonalat jelöli, amikor a DNS hirtelen megjelent. A piros nyílhegy a farki régiót és azt a területet mutatja, ami telítette vált a DNS kilökődést követően.

A DNS hirtelen kilökődését okozó lehetséges mechanizmusok feltárása céljából, a felszínhez kötött partikulumokat pásztázás előtt glutáraldehiddel kémiaiailag fixáltuk (9. ábra).



9. ábra A T7 partikulumok kémiai fixálása. (a) A glutáraldehiddel fixált felszínhez rögzített T7 fágok AFM képe. (b) Azon T7 partikulumok AFM képei, melyek farkok régiója a felszínhez képest felfelé mutat. A szaggatott vonalak a bal alsó képen a kapszid felületére rögzített “lábakat” jelölik. (c) A T7 fág *E. coli* baktériumra való lehorgonyzásának és a DNS kilökődését megelőző kapcsolási lépésének sematikus ábrája. A piros nyilak a feltételezett konformáció-függő kapcsolót jelzik, melyek a “lábak” (“fiber”) elrendeződésének változásához köthetők.

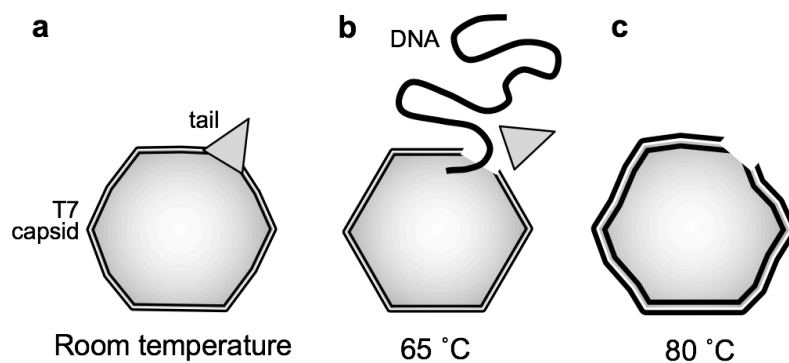
Az AFM képeken a kapszid felszínén láthatóvá váltak a T7 fág “lábai” (fiber), továbbá a csillám felszín már DNS borította a képalkotás idejére. Elképzelhető, hogy a lábak rögzülése olyan konformációs változást okozott mely a mechanikai erőhöz hasonlóan előidézte a DNS kilökődését. Bár a konformáció-függő kapcsolási mechanizmus részletei egyelőre nem

ismertek, a folyamat része lehet a lábak emelő szerű mozgása, ami végül a fark komplex konformáció-változását eredményezi.

KONKLÚZIÓ

A T7 bakteriofág hőkezelés-indukálta szerkezeti változásai

Méréseink megmutatták, hogy a T7 partikulumok 65 °C-os hőkezelése a farki régió leválása révén a DNS kiszabadulásához vezet (**10.b ábra**). A DNS elvesztése a kapszid-szerkezet fellazulását eredményezi, melyet a rugóálló és töréshez szükséges erő csökkenése kísér. A hőmérséklet további 80 °C-ra történő emelése pedig a kapszidfal szerkezeti átrendeződését okozza a gp10A fehérjék denaturációja miatt (10.c ábra). Bár a DNS kiszabadulása destabilizálja a kapszidot, az mégis meglepően ellenálló a magas hőmérsékleten történt kezelésnek és megőrzi az ép gömbszerű szerkezetét. Feltehetőleg a kapszomer fehérjék részleges denaturációjának van egy a kapszid globális szerkezeti struktúráját stabilizáló hatása.



10. ábra A T7 bakteriofág hőkezelés indukálta változásainak sematikus modellje. (a) Szobahőmérsékleten a kapszid a belső DNS nyomás következtében kissé duzzadt. (b) 65 °C-os hőkezelés hatására a farki régió letörik, ami a DNS kilökődését okozza. A belső nyomás csökkenése miatt a kapszid felszínén az ikozaéderez élek jobban kivehetők. (c) 80 °C-os hőkezelés hatására a kapszid megduzzad és a felszíne egyenetlenné válik.

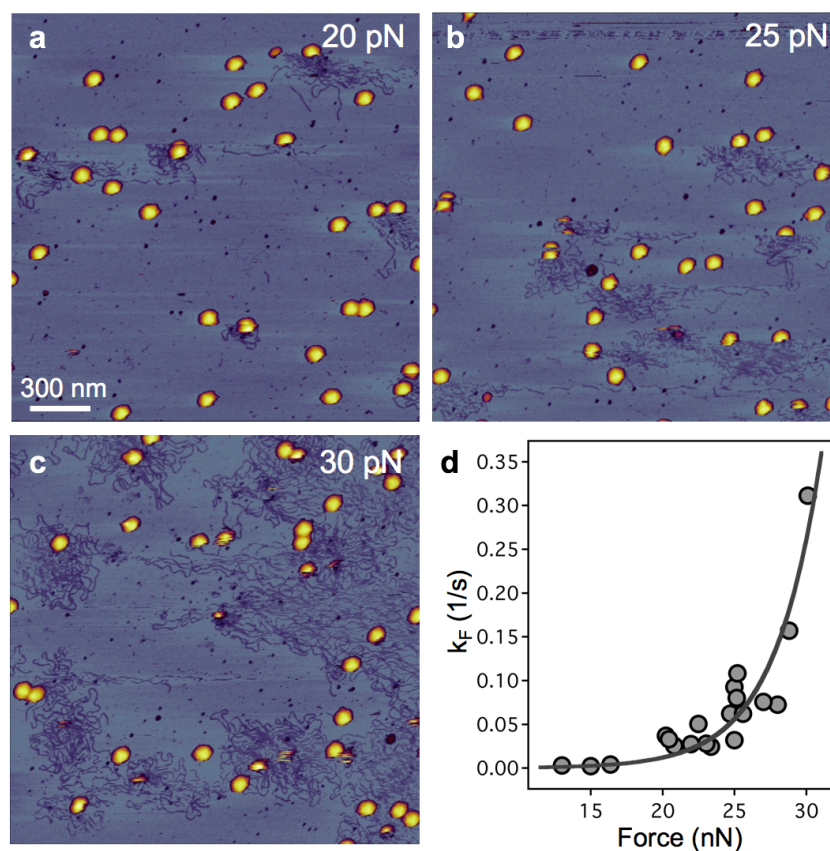
A T7 bakteriofág lépcsőszerű reverzibilis horpadásai

A fáradás mérések feltárták, hogy a nanoindentációs erő-görbék rugalmas tartománya diszkrét, lépcsőszerű átmeneteket tartalmaz, melyek mérete 0.6 nm egész számú többszörösei. Ezek az átmenetek a kapszid horpadásaihoz (“buckling”) köthetők, reverzibilisek és a rugólapka távolodásakor hozzájárulnak a kapszid gyors szerkezeti visszaalakulásához. Az átmenetek a DNS hőkezeléssel történt eltávolítása után is jelen voltak, ami arra utal, hogy a kapszomer fehérjék dinamikus szerkezeti változásaihoz kapcsolatosak. A dinamikus erőspektroszkópiai méréseink pedig azt mutatták, hogy a termikusan aktivált visszaalakulás mintegy 10⁺-szer

gyorsabban megy végbe mint a spontán horpadás. Ez arra utal, hogy a kapszid stabilitása erős dinamikus kontroll alatt áll, valamint hogy a kapszid szerkezeti dinamikája jelentős szerepet tölt be a DNS külső környezeti körülmények elleni védelmében.

Mechanikai erőre érzékeny kapcsoló vezérelte DNS kilökődés

Képkalkotással közvetlenül megmutattuk, hogy a kapszidfal oszcilláló AFM tűvel történő pásztázása DNS kilökődést indukál a farki régió keresztül. Azt találtuk, hogy a kilökődés sebességállandója exponenciálisan növekszik az erő függvényében (**11.d ábra**). Az átmenetiállapot-elméletnek megfelelően a spontán triggerjel aktivációs energiája 23 kcal/mol és a távolság a rendszer kezdeti és átmeneti állapota között 1.2 nm a reakciókoordináta mentén.



11. ábra A mechanikai terhelés növelésének hatása a DNS kilökődés sebességére. $2 \times 2 \mu\text{m}$ -es AFM képek, ahol a minta (a) 20 pN, (b) 25 pN, (c) 30 pN mechanikai terhelésnek volt kitéve. (d) A DNS kilökődés sebességi állandója az erő függvényében.

A kiszabadult DNS molekulák konformációjából arra következtettünk, hogy a DNS propulzív erőnek volt kitéve. A kapszidban lévő többletnyomásból származó erő hozzájárul a kilökődési folyamat elindításához, majd a DNS kapszid falon túlra való juttatásához. A lábak kémiai rögzülése, immobilizálódása hasonlóan fokozott DNS kiszabadulással járt. Ez arra utal, hogy a folyamat előidézéséhez egy konformáció érzékeny kapcsoló is szerepet játszik, ami mind külső mechanikai erő, mind a farki régió és a hozzá kapcsolódó lábak által aktiválható.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- I. 65 °C hőkezelés hatására a farki régió elvesztésének következtében a DNS kiszabadul, ami a kapszid szerkezet destabilizálódásához vezet. A hőmérséklet további 80 °C-ra történő emelése a kapszid mechanikai stabilitásának növekedését eredményezi a kapszomer fehérjék részleges denaturációjának következtében, a globális szerkezeti struktúrát megtartva.
- II. A nanoindentációs erőgörbék elasztikus régiója diszkrét, lépcsőszerű átmeneteket tartalmaz, amelyek a kapszid behorpadásaihoz (buckling) köthetők. Az átmenetek reverzibilisek, a kapszid fehérjékkel kapcsolatosak és hozzájárulnak a kapszid gyors szerkezeti visszarendeződéséhez. A kapszid szerkezet igen gyorsan fluktuál ép és behorpadt állapotok között. Erő hatására az egyensúly a behorpadt, erő hiányában az ép állapot felé tolódik.
- III. A kapszidfal oszcilláló AFM tűvel történő pásztázása elősegíti a DNS kiszabadulását a farki régión keresztül. A mechanikai terhelés exponenciálisan növeli a DNS kilökődést előidéző szerkezeti változás sebességi állandóját. Mindez arra utal, hogy a DNS kilökődést egy mechanikai erőre is érzékeny kapcsoló vezérli.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Vörös Z, Csík G, Herényi L, Kellermayer MSZ. (2017) Stepwise reversible nanomechanical buckling in a viral capsid. *Nanoscale* **9**: 1136–1143.

Kellermayer MSZ, Vörös Z, Csík G, Herényi L. (2018) Forced phage uncorking: viral DNA ejection triggered by a mechanically sensitive switch. *Nanoscale* **10**: 1898–1904.

Vörös, Z., Csík, G., Herényi, L. & Kellermayer, M. S. Z. Temperature-dependent nanomechanics and topography of bacteriophage T7. *Under review*

A disszertációtól független közlemények

Vörös Z, Yan Y, Kovari DT, Finzi L, Dunlap D. (2017) Proteins mediating DNA loops effectively block transcription. *Protein Sci.* **26**: 1427–1438.

Reinemann DN, Sturgill EG, Das DK, Degen MS, Vörös Z, Hwang W, Ohi R, Lang MJ. (2017) Collective Force Regulation in Anti-parallel Microtubule Gliding by Dimeric Kif15 Kinesin Motors. *Curr. Biol.* **27**: 2810–2820.