

Charakterystyka białka opiekuńczego ClpB (Hsp100) pochodzącego z patogennej bakterii *Leptospira interrogans*, czynnika etiologicznego leptospirozy

Joanna Krajewska¹, Zbigniew Arent², Anna Modrak-Wójcik³, Daniel Więckowski¹, Agnieszka Bzowska³, Sabina Kędziarska-Mieszkowska¹

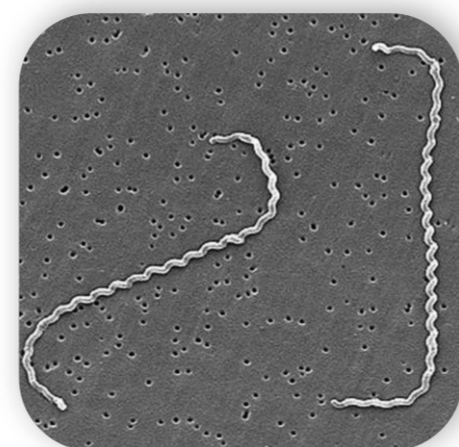
¹Katedra Biochemii Ogólnej i Medycznej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, 80-308 Gdańsk

²Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, 31-120 Kraków

³Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski, 02-089 Warszawa

Wstęp

Leptospira interrogans jest bakterią Gram-ujemną, należącą do gromady krętków, cechującą się dużą ruchliwością, dzięki dwóm periplazmatycznym wiciom (Ko i wsp., 2009). Leptospiroza, jest chorobą odzwierzęcą, wywoływaną przez te bakterie. Głównym źródłem zakażenia są chore zwierzęta (także nosiciele), które wydają z moczem leptospiry. W krajach klimatu umiarkowanego także środowisko (zanieczyszczona woda i gleba) może pośredniczyć w szczyrzeniu się zakażeń. Do zakażenia ludzi dochodzi m.in. poprzez uszkodzoną skórę, błony śluzowe czy spojówki. Ostra faza tej choroby charakteryzuje się ciężkimi uszkodzeniami nerek, płuc, wątroby. Każdego roku na ciężką postać leptospirozy zapada ponad 1 mln ludzi, z czego nawet 20% stanowią przypadki śmiertelne (Adler i wsp., 2011). Z powodu leptospirozy dochodzi również do dużych strat ekonomicznych w hodowlach zwierząt. Pomimo zagrożeń, jakie stwarzają patogenne gatunki *Leptospira*, molekularne mechanizmy patogenezy leptospirozy są słabo poznane.



Ryc. 1 *Leptospira interrogans* – zdjęcie z mikroskopu skaningowego (Ko i wsp., 2009).

Białko ClpB, należące do rodziny białek opiekuńczych Hsp100, wraz z systemem DnaK/DnaJ (Hsp70/Hsp40) uczestniczy w reaktywacji zagregowanych białek. Białko ClpB, podobnie jak inni przedstawiciele rodziny Hsp100, posiada strukturę przypominającą heksameryczny pierścień w środku, którego znajduje się centralny kanał, przez który przeciągany jest zagregowany substrat białkowy. Stosunkowo niedawno wykazano, że brak funkcjonalnego białka ClpB w komórkach *Leptospira* jest przyczyną zahamowania wzrostu bakterii w warunkach stresu i całkowitej utraty wirulencji (Lourdault i wsp., 2011).

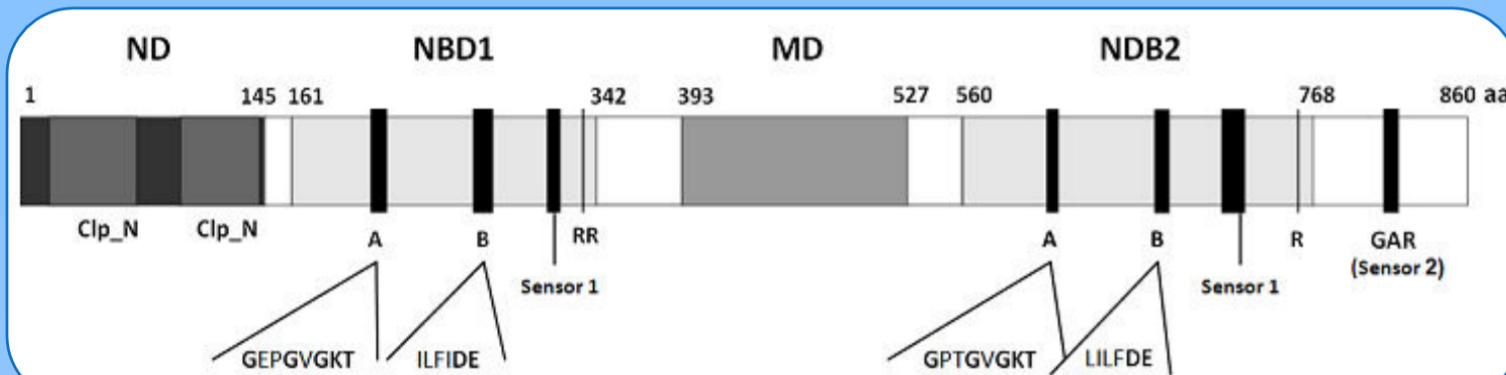
Postuluje się, że ClpB odgrywa istotną rolę podczas infekcji, wywołanych przez bakteryjne patogeny w tym *Leptospira*, ze względu na swoją funkcję białka opiekuńczego.

Celem naszych badań było zgłębienie wiedzy na temat roli białka ClpB w bakteriach *Leptospira* (ClpB_{Li}), a przede wszystkim poznanie jego biochemicznych i immunogenności właściwości.

Wyniki

I. Analiza bioinformatyczna sekwencji aminokwasowej ClpB_{Li}

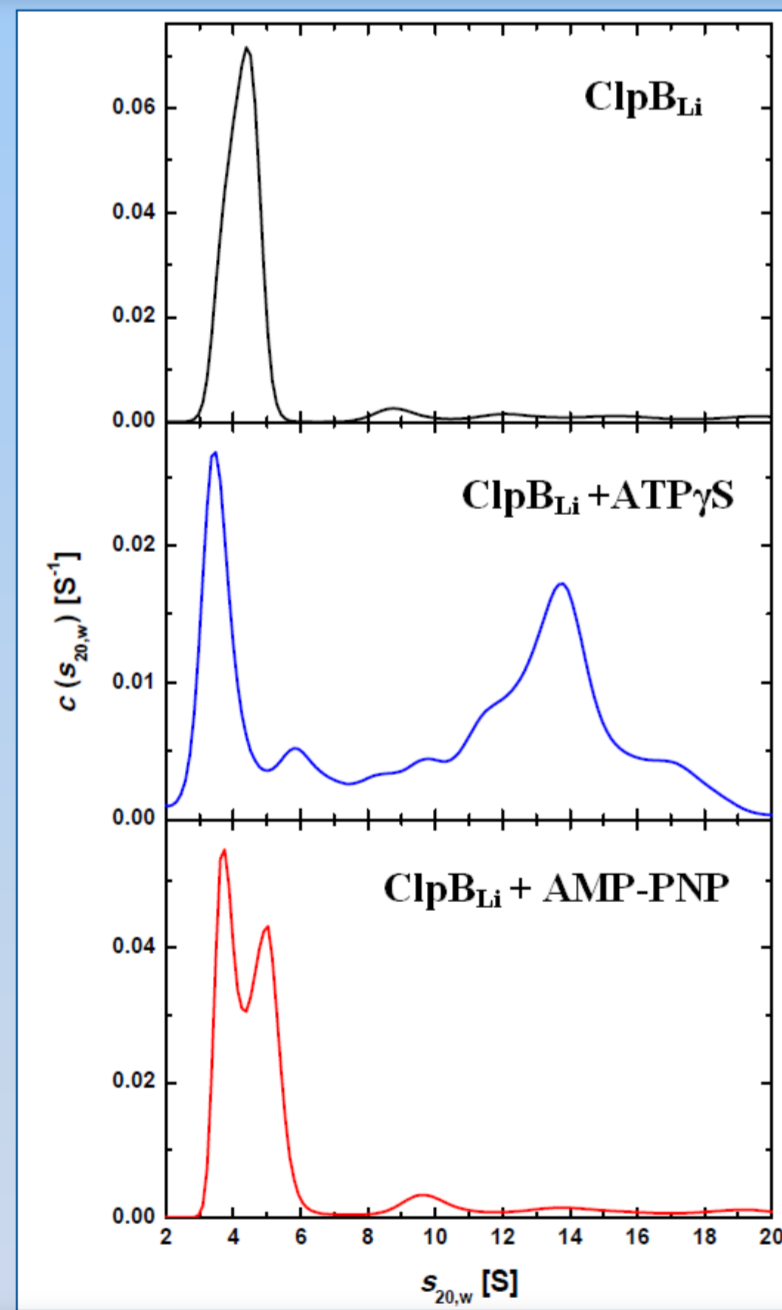
Białko ClpB_{Li} wykazuje organizację multidomenową podobną do białka ClpB z *E. coli*. ClpB_{Li} posiada domenę N-terminalną (ND_{1-145aa}), dwie domeny wiążące nukleotydy (NBD1_{161-342aa}, NBD2_{560-768aa}) oraz domenę środkową (MD_{343-550aa}). Porównanie sekwencji aminokwasowych białek ClpB_{Li} i ClpB_{Ec} wykonano przy użyciu programu Clustal X. Na tej podstawie stwierdzono, że identyczność reszt aminokwasowych w obrębie pełnej sekwencji białek ClpB wynosi tylko 52%.



Ryc. 2. Struktura domenowa białka ClpB_{Li}. Domena N-terminalna (ND), domena wiążąca nukleotydy 1 (NBD1), domena środkowa (MD) oraz domena wiążąca nukleotydy 2 (NBD2). Na schemacie zostały również zaznaczone charakterystyczne motywy, tj.: Walker A (A), Walker B (B), sensor 1, sensor 2 (GAR) oraz reszty argininy (R) biorące udział w wiązaniu ATP oraz jego hydrolizie.

II. Biofizyczne i biochemiczne właściwości białka ClpB_{Li}

ATPγS indukuję powstawanie heksamerów ClpB_{Li}

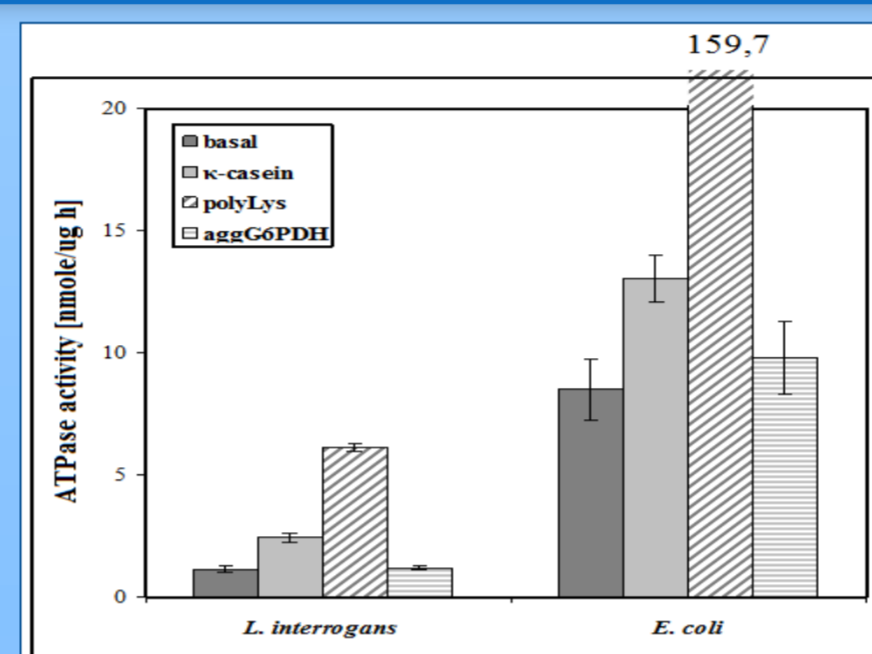


Ryc. 3. Analiza prędkości sedymentacji ClpB_{Li}. Przedstawiono rozkład współczynnika sedymentacji (S) dla białka ClpB_{Li} o stężeniu 0,7 mg/ml w obecności nukleotydu (1,9 mM ATPγS lub AMP-PNP) lub bez udziału nukleotydu. Wirowanie zostało przeprowadzone w temp. 20 °C przy prędkości 50 000 obr./min, w buforze zawierającym: 50 mM Tris-HCl (pH= 7,5); 0,2M KCl; 20 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 2 mM β-merkaptopoetanol oraz 5% glicerol.

Bibliografia:

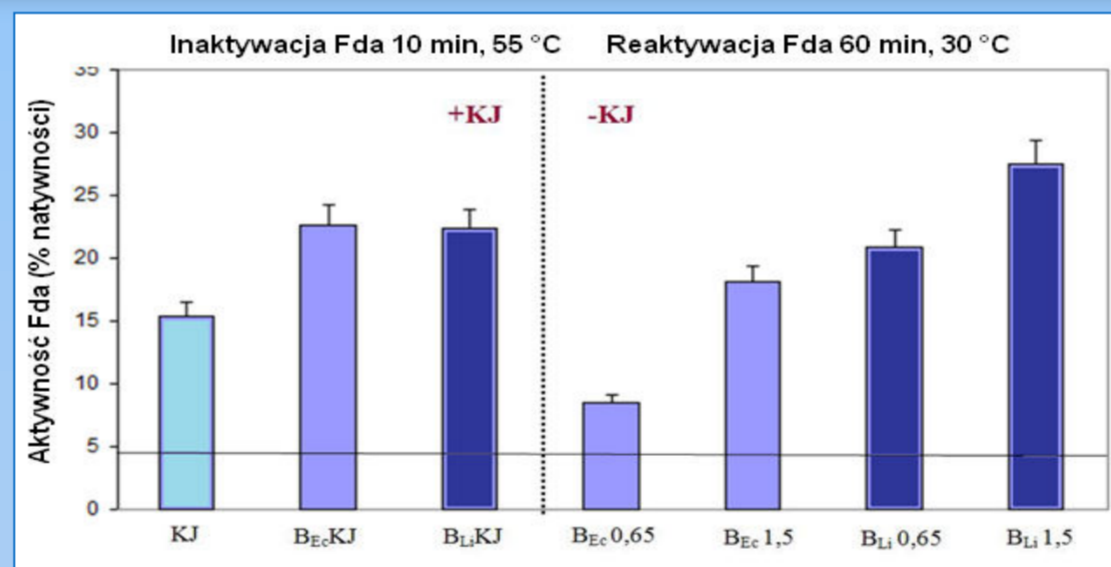
- Adler B., Lo M., Seemann T., Murray G.L. (2011) Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Vet Microbiol* 153: 73-81;
- Kędziarska S. (2005) Rola białek opiekuńczych *Escherichia coli* w ochronie komórki bakteryjnej przed nieodwracalną agregacją białek indukowaną termicznie. *Postępy Biochemii* 51: 146-153;
- Ko A. I., Goarant C., Picardeau M. (2009) *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7 (10): 736-747.
- Lourdault K., Cerqueira G. M., Wunder E. A. Jr, Picardeau M. (2011) Inactivation of *clpB* in the pathogen *Leptospira interrogans* reduces virulence and resistance to stress conditions. *Infect Immun* 79 (9): 3711-17.
- Miller J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

ClpB_{Li} wykazuje słabą aktywność ATPazy stymulowaną przez pseudo-substraty



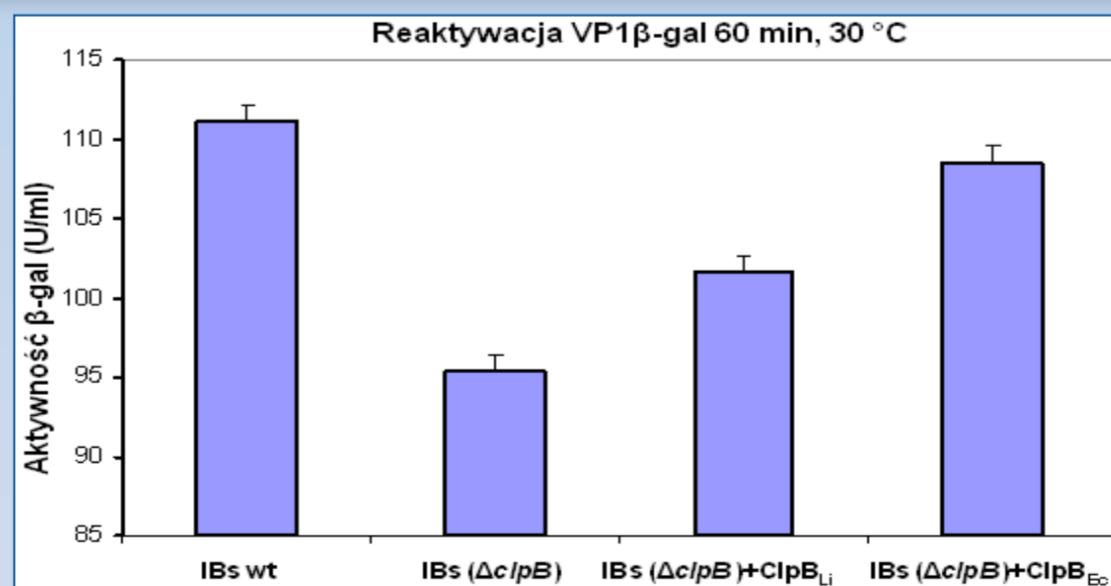
Ryc. 4. Aktywność ATPazowa ClpB_{Li} i ClpB z *E. coli*. Pomiar uwolnionych fosforanów podczas reakcji hydrolizy ATP katalizowanej przez ClpB (0,05 mg/ml) był określany w temp. 37 °C bez aktywatorów (aktywność podstawowa) lub w ich obecności: κ-kazeiny (0,1 mg/ml), polilizyny (0,04 mg/ml) oraz zagregowanego substratu, G6PDH (2 μM). Otrzymane wyniki są wartościami średnimi z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów wraz z odchyleniami standardowymi.

ClpB_{Li} wykazuje aktywność opiekuńczą niezależną od systemu Hsp70/40



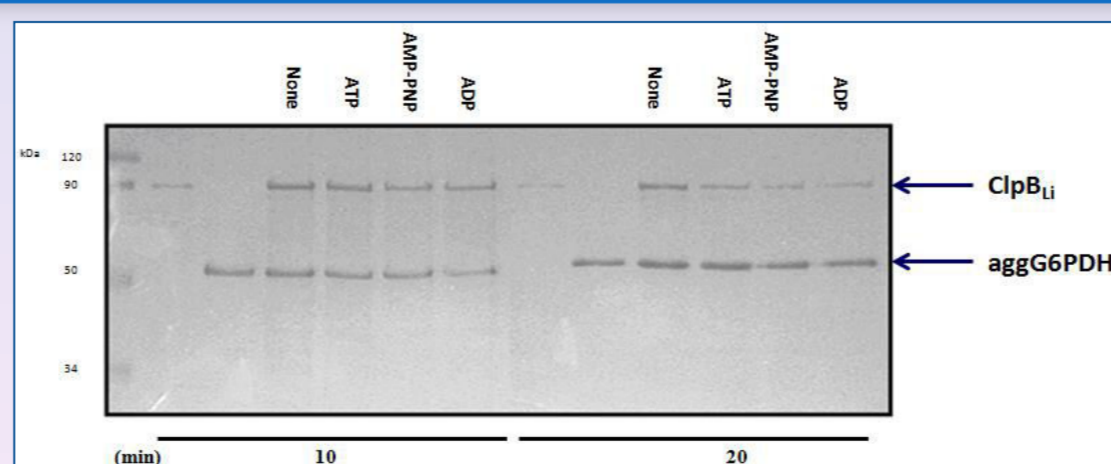
Ryc. 5. Reaktywacja Fda w obecności ClpB_{Li} oraz systemu białek opiekuńczych DnaK/DnaJ pochodzących z *E. coli*. Fda (aldolaza fruktozo-1,6-difosforanu) była denaturowana w buforze Tris-HCl (pH=7,5) w temp. 55 °C przez 20 min, po czym dodawano MgCl₂ (10 mM), ZnCl₂ (0,3 mM), białka opiekuńcze i ATP (2 mM). W celu reaktywacji Fda próby inkubowano w temp. 30 °C przez 1 h, potem oznaczano aktywność enzymu. Aktywność Fda mierzona przed termiczną denaturacją enzymu przyjęto jako 100 %. Aktywność Fda (ok. 5%) wykrywana po termicznej inaktywacji enzymu zaznaczono na wykresie ciągłą linią. Otrzymane wyniki są wartościami średnimi z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów wraz z odchyleniami standardowymi. Symbole: EcKJ- DnaK/DnaJ z *E. coli*; EcB- ClpB z *E. coli*; LiB- ClpB z *L. interrogans*.

Białko ClpB_{Li} reaktywuje β-galaktozydazę uwięzioną w ciałach inkluzyjnych



Ryc. 6. Reaktywacja β-galaktozydazy agregującej w bakteriach *E. coli* w postaci ciał inkluzyjnych. Ciała inkluzyjne β-galaktozydazy (β-gal) wyizolowano z komórek *E. coli* MC4100 WT [pVP1LAC] oraz *E. coli* MC4100.Δ*clpB*[pVP1LAC] wykorzystując odczynnik B-PER (Pierce). Oczyszczone ciała inkluzyjne β-gal rozpuszczono w równej objętości odczynnika B-PER oraz buforu Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β-merkaptopoetanol, pH= 7,0) i inkubowano przez 60 min w temp. 30 °C w obecności ClpB_{Li} lub ClpB z *E. coli*, oraz 6 mM ATP. Aktywność β-galaktozydazy oznaczano w oparciu o metodę Millera przy użyciu o-nitrofenylgaktopyranozylu (ONPG). Otrzymane wyniki są wartościami średnimi z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów wraz z odchyleniami standardowymi.

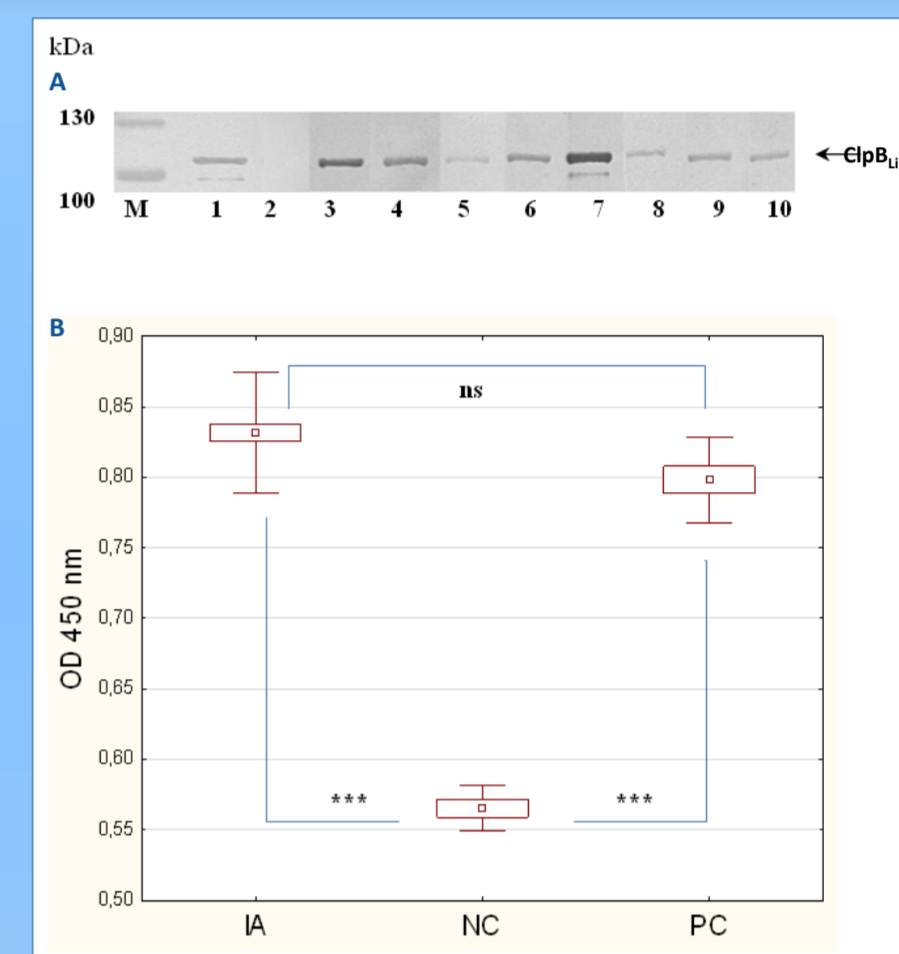
Wiązanie nukleotydu zmienia powinowactwo ClpB_{Li} do substratu



Ryc. 7. Oddziaływanie białka ClpB_{Li} z agregatami G6PDH w obecności nukleotydu lub bez udziału nukleotydu. ClpB_{Li} (0,65 μM) inkubowano z 1,6 μM roztworem agregatów G6PDH (dehydrogenaza glukozy-6fosforanowa z *Leuconostoc mesenteroides*) w obecności nukleotydu (6 mM ATP, ADP lub AMP-PNP) lub bez udziału nukleotydu. Mieszankę inkubowano w temp. 30 °C z wytrąceniem przez 10 lub 20 min, a następnie naniesiono na filtry (Millipore Ultrafree-MC Centrifugal Filter Unit) o średnicy 0,1 μm. Otrzymane frakcje rozdzielono w żelu SDS-PAGE i wybarwiono roztworem Coomassie.

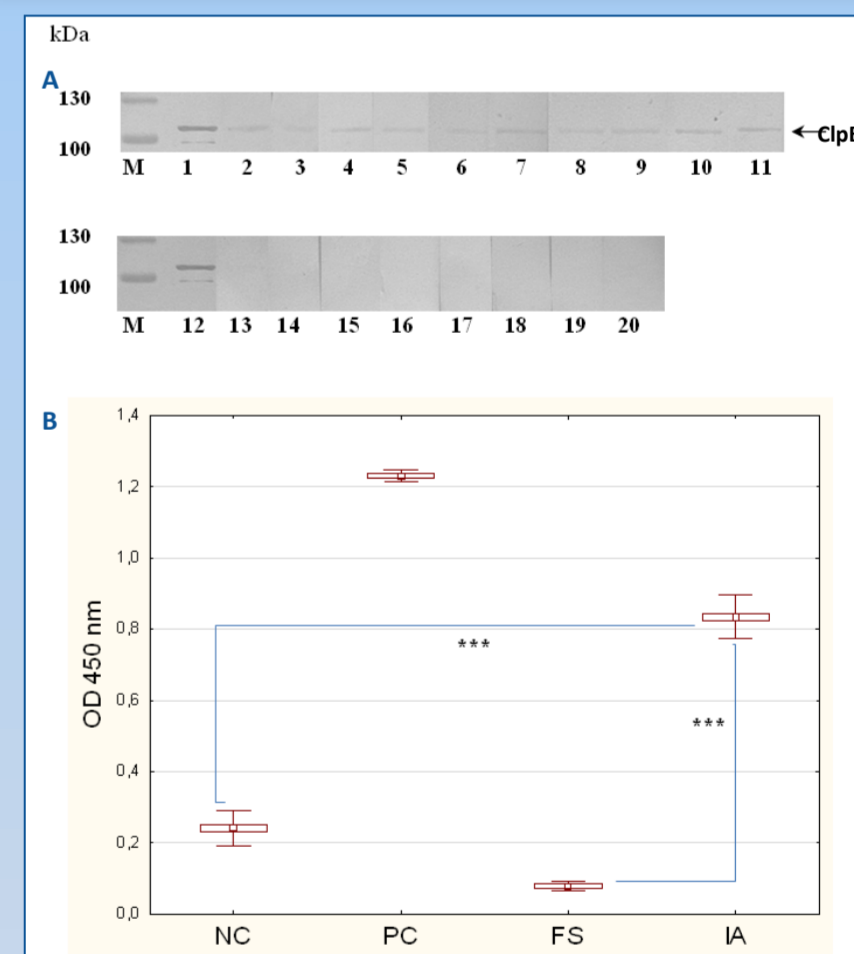
III. Immunogenne właściwości ClpB_{Li}

Immunoreaktywność ClpB_{Li} z surowicą króliczą



Ryc. 8. Immunoreaktywność ClpB_{Li} z surowicą króliczą. (A) Oczyszczone białko ClpB_{Li} (250 ng) rozdzielono w żelu SDS-PAGE, przeprowadzono Western blotting z zastosowaniem: przeciwciał anti-ClpB_{Li} (ścieżka 1), negatywnej surowicy kontrolnej (ścieżki 2), lub poliklonalnych przeciwciał króliczych przeciw: *L. borgpetersenii* serowariant Hardjo (ścieżki 3, 4); *L. interrogans* serowariant Hardjo (ścieżka 5); *L. interrogans* serowariant Icterohaemorrhagiae (ścieżki 6, 7); *L. interrogans* serowariant Canicola (ścieżka 8); *L. borgpetersenii* serowariant Javanica (ścieżka 9); *L. interrogans* serowariant Hardjo (ścieżka 10). (B) Test ELISA z wykorzystaniem białka ClpB_{Li} jako antygenu opłaszczającego i wyżej wymienionych surowic króliczych: IA, zwierzęta zainfekowane bakteriami *Leptospira*; NC (negatywna kontrola), niezainfekowane zwierzęta; PC (pozytywna kontrola) przeciwciała anti-ClpB_{Li}. Dane analizowano z zastosowaniem analizy wariancji ANOVA w programie Statistica. (***) oznacza P<0,001; ns, różnice nieistotne statystycznie.

Immunoreaktywność ClpB_{Li} z surowicą bydlęcą



Ryc. 9. Immunoreaktywność ClpB_{Li} z surowicą bydlęcą. (A) Oczyszczone białko ClpB_{Li} (250 ng) rozdzielono w żelu SDS-PAGE i przeprowadzono Western blotting z zastosowaniem: przeciwciał anti-ClpB_{Li} (ścieżki 1 i 12), poliklonalnych przeciwciał bydlęcych przeciw: *L. borgpetersenii* serowariant Hardjo (ścieżki 2-11), oraz surowicami pochodzącymi od niezainfekowanego bydła (ścieżki 13-20). (B) Test ELISA z wykorzystaniem białka ClpB_{Li} jako antygenu opłaszczającego i wyżej wymienionych surowic bydlęcych: NC (negatywna kontrola), niezainfekowane zwierzęta; PC (pozytywna kontrola), przeciwciała anti-ClpB_{Li}; FS, bydlęca surowica płodowa; IA, zwierzęta zainfekowane bakteriami *Leptospira*. Dane analizowano z zastosowaniem analizy wariancji ANOVA w programie Statistica. (***) oznacza P<0,001.

Znacząco podwyższony poziom przeciwciał anti-ClpB_{Li} w surowicach zwierząt zakażonych *Leptospira* w porównaniu z grupą kontrolną świadczy, że ClpB_{Li} może aktywować układ immunologiczny gospodarza.

Wnioski

- Białko ClpB_{Li} w obecności ATPγS przejawia zdolność do samoasocjacji, tj. tworzy heksamery.
- ClpB_{Li} wykazuje słabą aktywność ATPazy w porównaniu z ClpB z *E. coli*, która jest stymulowana przez pseudo-substraty: κ-kazeinę oraz polilizynę.
- ClpB_{Li} wykazuje aktywność opiekuńczą niezależną od systemu białek opiekuńczych DnaK/DnaJ z *E. coli*.
- Wiązanie nukleotydu zmienia powinowactwo ClpB_{Li} do zagregowanego substratu.
- ClpB_{Li} wykazuje właściwości immunogenne podczas infekcji wywołanych przez *Leptospira*, co wskazuje na jego udział w wirulencji *Leptospira*.