

XXXI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia

Bendes Ábris Ádám

**Virális gének expressziós szabályozásában résztvevő fehérje komplexek
szerkezeti és funkcionális analízise *Staphylococcus aureus*-ban**



Témavezetők: Dr. Vértessy G. Beáta
BME-VBK Alkalmazott Biotechnológiai és Élelmiszertudományi Tanszék
MTA TTK Enzimológiai Intézet

Leveles Ibolya
Zagyva Imre
MTA TTK Enzimológiai Intézet

**OTDK dolgozat
Eger, 2013**

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	5
Rövidítések jegyzéke	6
1 Bevezetés és irodalmi áttekintés.....	7
1.1 A <i>Staphylococcus aureus</i> és egészségügyi jelentősége	7
1.2 Szuperantigén-hordozó patogenitás szigetek	8
1.3 A SaPI gének expressziós szabályozása; az Stl és a dUTPáz	10
1.4 A dUTPázok katalitikus funkciója	12
1.5 A dUTPázok szerkezete	14
1.6 Φ11 dUTPáz és az Stl SaPIbov1, avagy a derepressziós specificitás	17
2 Célkitűzések	19
3 Anyagok és módszerek.....	20
3.1 Fehérje termelés és tisztítás	20
3.1.1 Konstruktok előállítása	20
3.1.1.1 Plazmidok felszaporítása és tisztítása	22
3.1.1.2 Restrikciós emésztés és ligálás	23
3.1.1.3 PCR alapú klónozás	23
3.1.1.4 Agaróz gélelektroforézis	26
3.1.2 Kompetens sejt készítés és transzformáció.....	26
3.1.3 Fehérje expresszió és feltárás	27
3.1.4 Kromatográfiás fehérjetisztítás	29
3.1.4.1 HisTrap affinitás kromatográfia.....	29
3.1.4.2 Ioncsere kromatográfia	30
3.1.4.3 Méretkizárásos kromatográfia	31
3.2 Fehérjevizsgálati módszerek	32
3.2.1 SDS-PAGE	32
3.2.2 Koncentrációmérés	32
3.2.2.1 Fehérje koncentrációmérés Bradford reagenssel	32
3.2.2.2 Fehérje és DNS koncentrációmérés UV spektroszkópiával	33
3.2.3 Termofluorimetria.....	33
3.2.4 Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia	34
3.2.5 Fluoreszcens spektroszkópia	35

3.2.6	dUTPáz aktivitásmérés	35
3.3	Krisztallográfia.....	36
3.3.1	Kristályosítás	36
3.3.2	Adatkészlet felvétele.....	37
3.3.3	Szerkezet megoldása diffrakciós mintázatból	37
3.4	<i>In silico</i> eljárások	38
3.4.1	Homológia modellezés	38
3.4.2	Filogenetikai vizsgálatok	38
4	Kísérleti eredmények és értékelésük	39
4.1	Fehérje termelés és tisztítás.....	39
4.1.1	A konstruktok létrehozása	39
4.1.2	Fehérje termelés.....	41
4.1.3	Fehérje tisztítás és a hipotézis bizonyítása	41
4.2	Hőstabilitás és annak változása.....	44
4.3	Másodlagos szerkezeti elemek vizsgálata.....	50
4.4	Aktivitásmérés.....	51
4.5	Fluorimetria.....	52
4.6	Homológia modellezés.....	53
4.7	Filogenetikai vizsgálatok	54
4.8	Kristályosítás.....	57
5	Összefoglalás és értékelés	59
6	Irodalomjegyzék.....	62

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Vértessy G. Beátának, aki bevezetett a kutatói világba, megismertetett a téma alapjaival és lehetővé tette számomra, hogy a kutatócsoportjában dolgozhassak.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Leveles Ibolyának, hogy megtanított a fehérjekrisztallográfia rejtelseire, segített az ÄKTA rendszer kezelésében és felügyelte a munkámat.

Köszönöm Zagyva Imrének, aki megmutatta a sejtek termelésére, feltárására, a fehérjék tisztítására alkalmas módszereket, és tőle tanultam meg sok fehérjevizsgálati módszert is.

Szeretném megköszönni Róna Gergelynek, hogy segített a plazmidok klónozásánál és megtanított a PCR használatára.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni a kutatócsoport minden tagjának, hogy a munkám során felmerülő kérdéseimre mindig készségesen válaszoltak és támogattak a munkámban.

Rövidítések jegyzéke

APS	ammónium perszulfát
BER	báziskivágásos javítás, Base Excision Repair
BME	2-merkaptoetanol
BSA	marhaszérum albumin, Bovine Serum Albumin
CD	cirkuláris dikroizmus
DR	Direkt Repeat
dTMP	dezoxitimidin-monofoszfát
DTT	ditio-treitol
dTTP	dezoxitimidin-trifoszfát
dUMP	dezoxiuridin-monofoszfát
dUPNPP	α,β -imido-dezoxiuridin-trifoszfát
dUTP	dezoxiuridin-trifoszfát
dUTPáz	(dezoxiuridin-trifoszfát)-nukleotid hidroláz
EDTA	etiléndiamin-NNN'-tetraecetsav
ERP	kivágás-replikáció-beccsomagolódás, Excision-Replication-Packaging
HEPES	N-(2-hidroxietyl)piperazin-N'-etánszulfonsav
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktozid
IR	Inverted Repeat
LB	Luria-Bertani
MCS	Multiple Cloning Site
MOPS	3-[N-morfolino]-propánszulfonsav
MRSA	methicillin rezisztens <i>S. aureus</i> , Methicillin Resistent <i>Staphylococcus aureus</i>
NLS	magi lokalizációs szignál, Nuclear Localisation Signal
OD	optikai denzitás, Optical Density
ON	egy éjszakán át, Overnight
ORF	nyitott leolvasási keret, Open Reading Frame
PPi	inorganikus pirofoszfát
SaPI	<i>S. aureus</i> patogenitás sziget, <i>Staphylococcus aureus</i> Pathogenicity Island
SDS	nátrium-dodecil szulfát
TEMED	NNN'-tetra-metil-etilén-diamin
TRIS	trisz-(hidroximetil)-aminometán
TSS	toxikus sokk szindróma, Toxic Shock Syndrome
UDG	uracil-DNS glikoziláz

1 Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1 A *Staphylococcus aureus* és egészségügyi jelentősége

A *Staphylococcus aureus* egy fakultatív anaerob Gram-pozitív baktérium, melynek karakterizálásában jelentős szerepet játszik az általa termelt aranyszínű karotenoid staphyloxantin pigment és a jellegzetes fürt-mintázata. A *S. aureus* a normál bőrflóra komponenseként gyakran megjelenik, ezáltal az emberiség 20%-a hosszú távú hordozója ennek a mikroorganizmusnak.

A *S. aureus* számos betegség kórokozója lehet, egészen a kisebb jelentőségű bőrfertőzésektől, mint például bőrkütyések, ótvar, cellulitis, Ritter szindróma, egészen az életveszélyes lefolyású betegségekig, mint a tüdőgyulladás, TSS (Toxikus sokk szindróma), agyhártyagyulladás, csontvelőgyulladás vagy vérmérgezés. A *S. aureus* felelős az endocarditis (szívbelhártya-gyulladás) esetek 25-35%-ért [1].

A *S. aureus* által okozott fertőzések kiindulási pontja meglehetősen széles. Elsődlegesen a bőr, nyálkahártyák, légutak, ízületek és nyílt sebfelszínek a leggyakoribb előfordulási helyei a fertőzéseknek. Világszerte a kórházakban a betegek fokozottan ki vannak téve a veszélynek, mivel legyengült immunrendszerrel, friss műtéti hegekkel sokkal nagyobb a fertőzésveszély, mint normális esetekben. Minden ötödik nosocomialis (kórházban szerzett) fertőzés a *S. aureus*-nak tudható be, ezért nagy egészségügyi jelentősége van az ellene folytatott küzdelemnek. A MRSA (ld. lejjebb) által okozott fertőzések 85%-a kórházban szerzett és csak az Egyesült Államokban több mint tízezeren halnak bele évente [2]. A '40-es évek előtt, amikor még nem léteztek az antimikrobiális szerek, az invazív *S. aureus* fertőzések halálozási aránya 90% körül volt, mely még manapság is egyes fertőzéseknél elérheti a 30%-ot [3]. Az antibiotikumok megjelenését követően hamarosan felbukkant először egy penicillin [4], majd utána egy methicillin rezisztens törzs (MRSA) [5], és nem régen, 2002-ben megjelent egy vancomycin rezisztens törzs is [4]. A MRSA törzs izolátumok az esetek nagy részében multidrog rezisztensek (több, másféle antibiotikum is hatástalan ellenük), mely komoly akadályt jelent a fertőzések kezelésében. Latin-Amerika nyugati partjánál fekvő egyes országokban a kórházakban izolált *S. aureus* törzsek több mint 50%-a methicillin rezisztens [6]. A sztafilokokkuszok ilyen mértékű hajlama az

antibiotikum rezisztencia kialakítására nagy ösztönzést jelent az ellenük folytatott harcban használt ellenszerek további fejlesztésében és az esetleges más megközelítési pontok kutatásában, új módszerek kifejlesztésében.

1.2 Szuperantigén-hordozó patogenitás szigetek

A bakteriális genomban gyakran megjelennek jellemzően disztinkt, nagy (10 kbp – 2 Mbp) részletek, melyek különböznek az eredeti bakteriális genom összetételtől. Ez az eltérés a szigetek eltérő G+C arányában, sok ismétlődő struktúra vagy mozgó genetikai elem tartalmában jelenik meg [7].

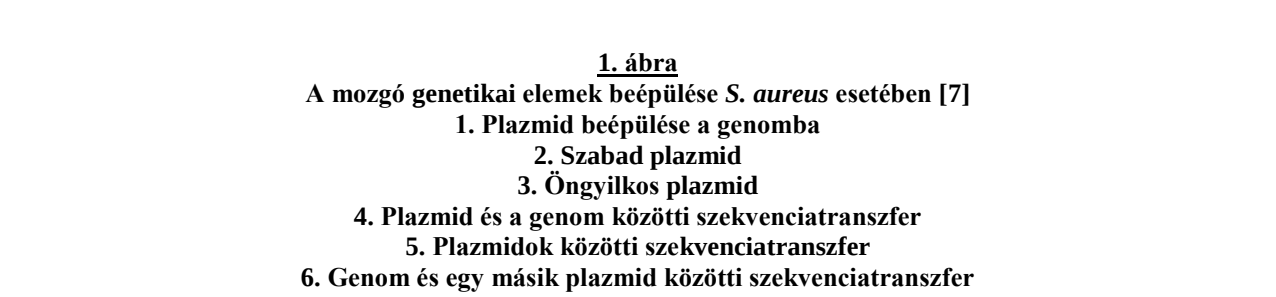
Ezek a genom szigetek horizontális transzfer során kerültek be a gazdaszervezetbe (transzformáció, konjugáció, transzdukció) és gyakran tartalmaznak virulencia géneket, adaptációs faktorokat, vagy toxinokat kódoló géneket. Emiatt nevezzük ezt a fajta genom részleteket patogenitás szigeteknek. Gyakran hordoznak funkcionális géneket, mint például transzpozáz, integráz. Ezek segítségével gyakran önmagától kivágódik, replikálódik és akár fág mediáltan átjuthat más baktériumokba, ahol a genomba beépülve gerjesztheti annak virulenciáját, olyan esetben is, amikor a gazdaszervezet eredetileg jóindulatú is volt.

Ez a jelenség fokozottan fontos a *S. aureus* esetében, mivel ez a mikroba normál bőrflóra tag és egyben opportunistá patogén is, tehát majdnem minden ember érintett az esetleges virulencia kialakulásában. A *S. aureus* törzsek heterogenitásában szerepet játszik az interakciójuk az emlős gazdaszervezettel, és emiatt többféle virulencia faktorok, vagy rezisztencia markerek alakulhatnak ki. A *S. aureus* más szervezetek patogenitás szigeteinek génjeit többnyire plazmidon kódolva kapja meg [7] (1. ábra). Ezeket a szigeteket jelen esetben *Staphylococcus aureus* szuperantigén-hordozó patogenitás szigeteknek nevezzük (*Staphylococcus aureus* Pathogenicity Island; SaPI), a dolgozatomban így is fogok hivatkozni rájuk. A *S. aureus*-ban legalább 16 megkülönböztetett SaPI-t fedeztek fel, és majdnem mindegyik rendelkezik kódolt toxinnal, vagy egyéb virulencia faktorral, méretük 10-20 kbp-ig változhat. Ezek a szigetek egy összetartozó családot alkotnak, erősen konzervált központi, magi génekkel (2. ábra). A SaPI-k a *S. aureus* genomjának több specifikus helye közül egy kitüntetett helyre (*att_S*) integrálódnak és mindig ugyanazzal az orientációval rendelkeznek. Ezen a helyeket (*att* helyek) specifikusan

The diagram illustrates the mechanisms of horizontal gene transfer within a bacterial cell. It shows a circular bacterial chromosome and several plasmids (small circular DNA molecules). The processes are numbered 1 through 6:

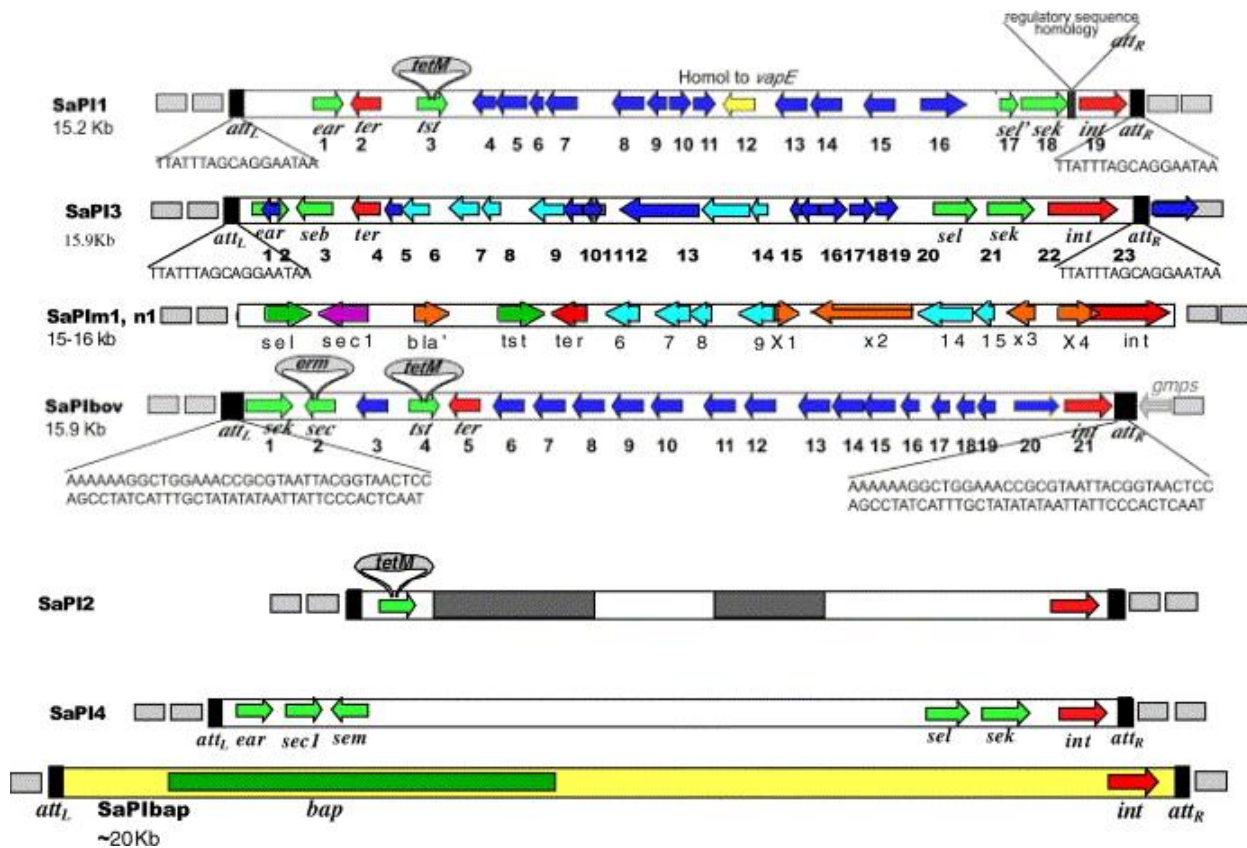
- 1:** A plasmid is integrated into the bacterial chromosome.
- 2:** A plasmid is excised from the chromosome, creating a loop of chromosomal DNA (transposon or insertion sequence).
- 3:** The excised loop is transferred to another plasmid.
- 4:** A plasmid is integrated into the bacterial chromosome.
- 5:** A plasmid is excised from the chromosome.
- 6:** A plasmid is integrated into the bacterial chromosome.

Labels in the diagram include: **Bakteriofág** (Bacteriophage), **Bakteriofág új génekkel** (Bacteriophage with new genes), **Transzdukció / bakteriofág** (Transduction / bacteriophage), **Profág** (Prophage), **Plazmid** (Plasmid), and **Transzpozon vagy inzerációs szekvenciák** (Transposon or insertion sequences).



A SaPI-k és az esetlegesen előforduló mozgó genetikai elemek, amelyek más fajokból is származhatnak, az önmagukban kódolt integráz segítségével kivágódhatnak a genomból és specifikus helper fágokba [9] csomagolódva átjuthatnak más *S. aureus* törzsekbe. A szigetek magas mobilitása ellenére a géntranszfer nagyon ritka esemény nem-*aureus* sztafilokokkuszok között [11]. Ha a transzdukció megtörténik, akkor a recipiens baktérium megszerzi mindazokat a tulajdonságokat, amelyekkel a donor rendelkezett, azon felül, melyek már azelőtt is megtalálhatóak voltak a genomjában. Így, ha az átkerült genomrészlet tartalmazott rezisztencia géneket is, egy virulens, mindemellett rezisztens új törzs alakulhat ki. Bizonyítottan így alakult ki

a legújabb vancomycin rezisztens törzs is, mely egy *Enterococcus*-tól laterális géntranszferrel nyerte a rezisztenciáért felelős gént [7, 12].



2. ábra

7 különböző SaPI szekvencia összehasonlítása [8]

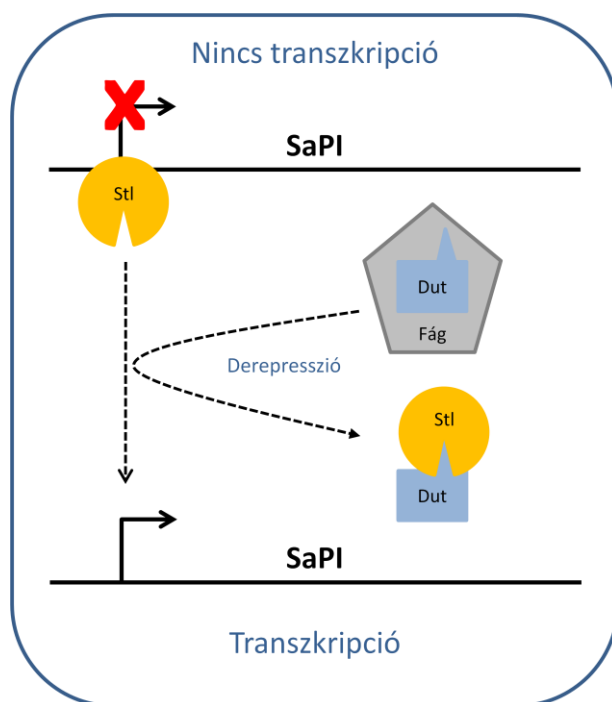
Piros nyilak a fági géneket, a zöld a patogenezisben szerepet játszó géneket, a világoskék a konzervált géneket, míg a sötétkék az ismeretlen, nem konzervált géneket jelöli
A szigeteket határoló kromoszómaszekvenciákat a világosszürke dobozok mutatják

1.3 A SaPI gén expressziós szabályozása; az Stl és a dUTPáz

Legújabb kutatások szerint a szigetek szabályozása meglehetősen érdekes módon történik. A SaPI-n kódolódik egy globális represszor fehérje (Stl fehérje), mely a kódoló szigeten található két divergens promóter közé köt be, ezáltal gátolva a legtöbb SaPI gén másolásának inicializációját. Ha a specifikus Stl-DNS kölcsönhatás fennáll, akkor a gének nagy része nem íródik át, és a sziget egy profág-szerű állapotban marad [10, 13]. Ezek az Stl fehérjék specifikusan az őket kódoló SaPI-kat represszálják, habár ezen a fehérje homológok egymás között alacsony konzerváltsággal rendelkeznek [13].

A derepresszió *S. aureus* helper fágok segítségével történik. A represszor fehérjét kódoló *stl* gén kiütése esetén megtörténik a SaPI régiók kivágása és replikációja, még a helper fágok távollétében is. Ez a jelenség a fágok elsődleges Stl repressziós szabályozási funkciójára utal [13]. Specifikus fág felülfertőzése során a represszió megbomlik és a SaPI-k kivágódnak, többszöröződnek és a fági indukció miatt az érés során beburkolódnak egy virális fehérje kapszidba, majd kiszabadulva további *S. aureus* törzseket fertőzhetnek meg [14].

Az irodalomban vizsgált 80α fág bizonyos törzsei képtelenek voltak megszüntetni ezt a transzkripció gátlást [13]. Kimutatták, hogy a fág több pontmutációt is tartalmazott a 32-es nyitott kiolvasási szegmensében (Open Reading Frame, ORF), aminek fehérje átirata homológ a többi fág által kódolt *dut* gén dUTPáz enzimjével. A fág dUTPázát missense és nonsense mutációkkal kiiktatva rávilágítottak, hogy ez a fág számára nem-esszenciális enzim felelős az Stl-blokk feloldásáért. Ezen eredmények egy olyan hipotézis felállítását tették lehetővé, mely szerint, a két fehérje kölcsönhatása olyan konformáció változást indukál az Stl fehérjében, mely megszünteti a DNS kötő képességét, és ezáltal leválik a SaPI-ról (3. ábra). A fágok által kódolt dUTPáz különlegessége, hogy a derepresszió nem érinti a fő katalitikus funkcióját [13]. Dolgozatomban ezen hipotézis vizsgálata felé indultam el.

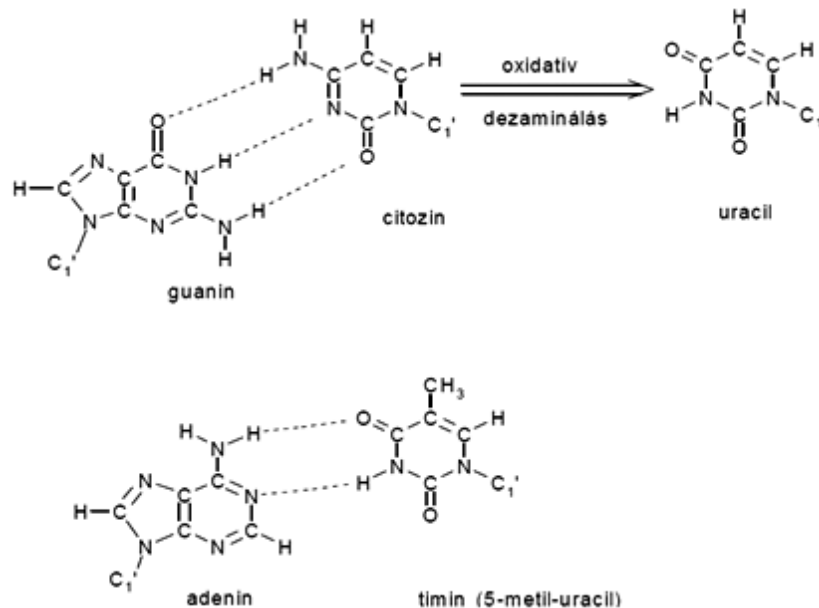
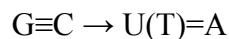


3. ábra
A fág mediált derepresszió mechanizmusa

1.4 A dUTPázok katalitikus funkciója

Minden élő szervezet fontos feladata a genetikai információjának megőrzése. Az RNS és a DNS között az egyik fontos különbség, hogy míg az RNS-ben uracil (U) található, addig a DNS-be ennek a megfelelője, timin (T) épül be. Bizonyos esetekben előfordulhat, hogy a DNS-be T helyett U épül be. A két bázis Watson-Crick párja ugyanaz, mégis hibának számít, és fontos a DNS-be inkorporálódott uracil kivágása és kijavítása.

Két módon kerülhet be az uracil a DNS-be; citozin spontán oxidatív dezaminálódása során, vagy timin helyetti hibás beépüléssel. Az utóbbi nem jelent nagy problémát replikáció során, de a dezamináció során keletkező uracil bázispárosa eltér a citozinétól, ezáltal egy stabil pontmutáció jön létre az újonnan szintetizált DNS szálon [15] (4. ábra).

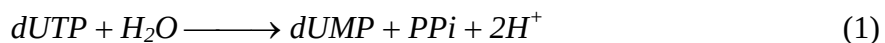
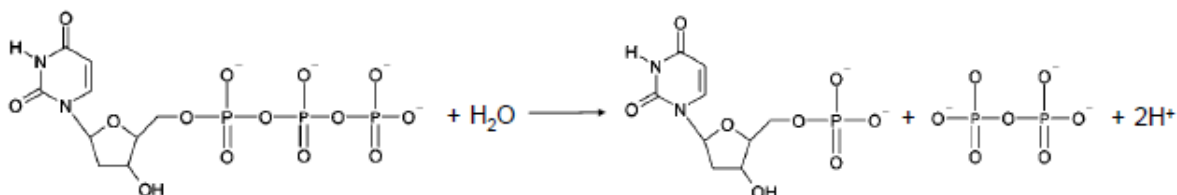


4. ábra

A citozin dezaminációja és a hibás Watson-Crick párok

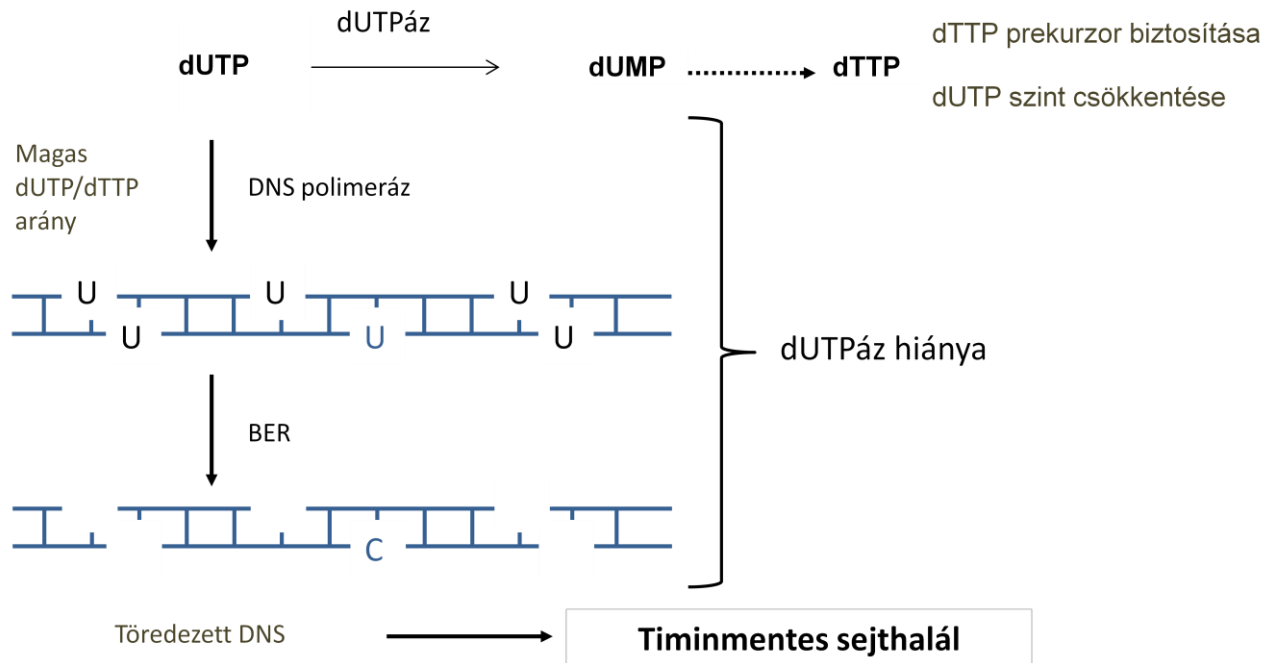
A dezamináció során keletkezett, vagy a hibásan beépült uracil báziskivágásos javítását (Base Excision Repair; BER) az uracil-DNS glikoziláz (UDG) enzim kezdi el, és abázisos (apurin/apirimidines) endonukleáz, DNS polimeráz és ligáz fejezi be [16]. Az uracil hibás beépülésének megelőzésére a dUTPáz és a timidilát szintáz enzimek szolgálnak.

Az eukarióta és bakteriális DNS polimerázok nem tudnak különbséget tenni a dUTP és a dTTP között, mivel azok csak egy metilcsoportban különböznek. Ezáltal a beépült uracil bázisok számát egyedül a relatív intracelluláris dUTP/dTTP szint fogja meghatározni [16, 17]. Ennek a szintnek az alacsonyan tartásában játszik szerepet a dUTPáz. Ez az enzim az alábbi reakciót katalizálja:



A dUMP a timidilát szintáz enzim szubsztrátja, amely a dUMP-ből dTMP-t készít. Ezután a dTMP foszforilálódva dTTP lesz, bekerülve újra a körforgásba, ezáltal csökkentve a dUTP/dTTP arányt [15].

Ha a dUTPáz hiányzik a szervezetből valamilyen oknál fogva, akkor más dUTP szintcsökkentő mechanizmusok híján, a DNS szintézis során nagy valószínűséggel uracil fog beépülni. Ilyenkor életbe lépnek a BER javító enzimek és kivágják a hibás bázist. A magas dUTP szint miatt, a lyukat befoltozó DNS polimeráz újfent nagy eséllyel megint uracilt fog beépíteni a kivágott helyébe, ami a folyamat újraindulását eredményezi. Ez a hiábavaló javítási ciklus túlpörgeti a sejt metabolizmusát, és végül annak apoptózisához, avagy a timin-mentes sejthalálához vezet [15, 18, 19] (5. ábra). Ez az enzim esszenciális mind az eukarióta, mind a prokarióta szervezetekben, és emellett sok vírus is kódolja az örökítő anyagában, mint például a jelen esetben is [20].

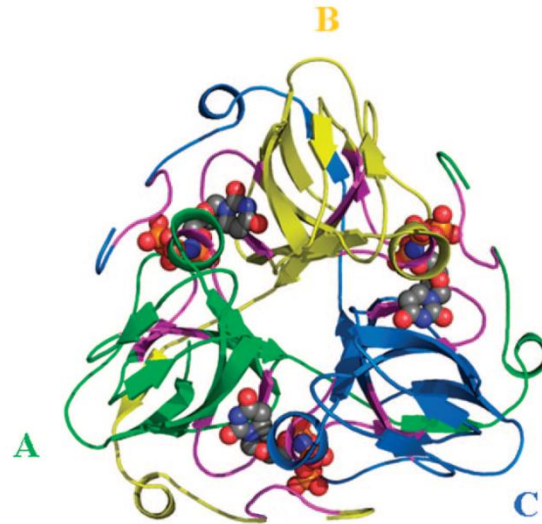


5. ábra
dUTPáz hiányának hatása a sejtben [15]

1.5 A dUTPázok szerkezete

Az élőlények által kódolt dUTPáz legtöbb esetben 3 alegység interakciójával létrehozott homotrimer formában fordul elő (6. ábra), de léteznek homodimer és monomer szerveződésű dUTPázok is [15, 21, 22], melyekkel ebben a dolgozatban nem foglalkozunk. A homotrimeres dUTPázok szekvenciái nagyon eltérőek, mégis mindig tartalmaznak 5 erősen konzervált motívumot [15, 22] (7. ábra).

A trimert felépítő alegységek β -szálai úgy tekerednek fel, hogy egy ún. jelly-roll („lekváros tekercs”) antiparalell elrendeződésű β -lemezt alkotnak [15, 21-24]. Ebbe épül bele a szomszédos alegység C-terminális szálán lévő β -szála, ami jelentősen megnöveli a trimer stabilitását [23]. Az aktív centrumokat a három alegység közösen építi fel, az egyik alegység szolgáltatja az 1., 2., 4. motívumot, a másik a 3. motívumot, míg az utolsó alegység az 5. motívumot adja [23]. Emiatt a dUTPáz adekvát katalitikus hatásának eléréséhez mind a három alegységnek együtt kooperálva kell létrehoznia az oligomert [21, 25].

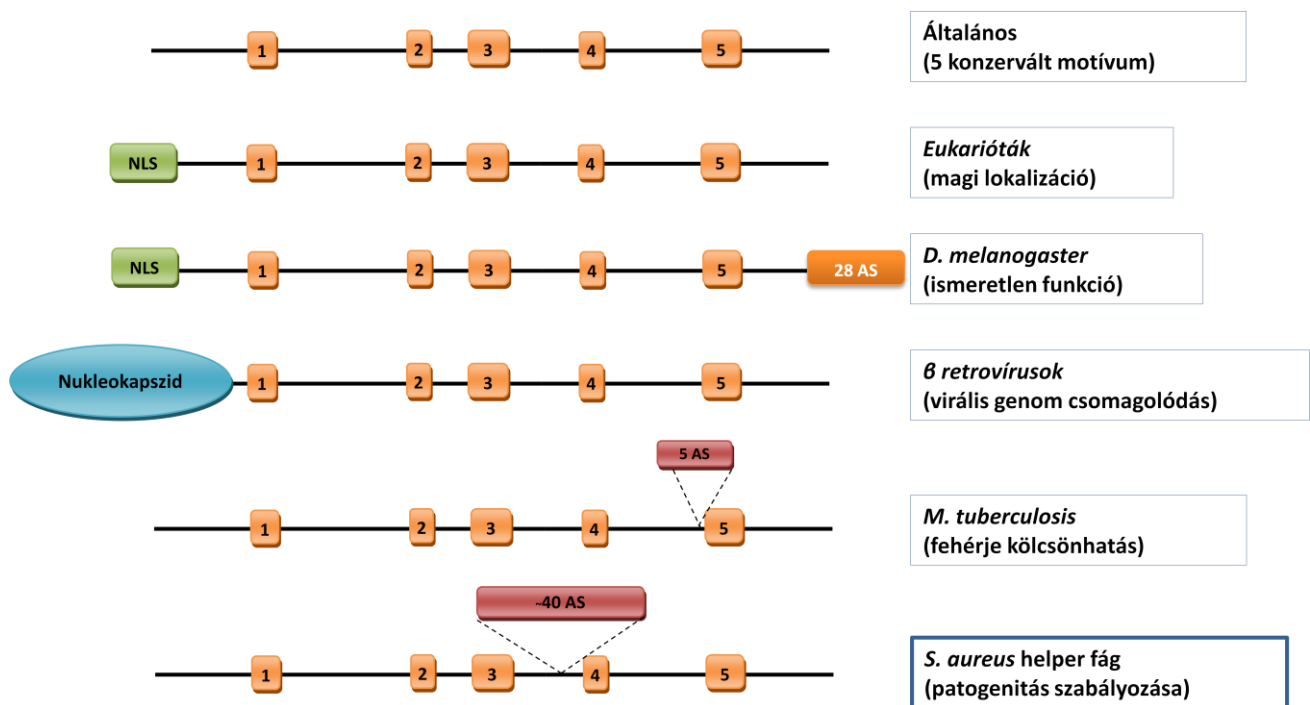


6. ábra
A *Mycobacterium tuberculosis* trimer dUTPázának szerkezete [15]

	Motif 1	Motif 2	Motif 3
DMEL (15)	KIDTCVLRFAKLTENALEPVRGSAKAAGVDLRS--AYDVVPARGKAIVKTDLQVQVPEG-SYGRVAPRSGLA	VKNFIDVG--AGVVD	EDYRGNLGVVLFNHS-
HSAP (18)	EVGGMQLRFARLSEHATAPTRGSARAAGYDLYS--AYDYTIIPMEKAVVKTDIQIALPSG-CYGRVAPRSGLA	AKHFIDVG--AGVIDE	DYRGNVGVVLFNFG-
RNOR (58)	AEDDASLRFVRLSEHATAPTRGSARAAGYDLYS--AYDYTIIPMEKALVKTDIQAIVPSG-CYGRVAPRSGLA	VKNFIDVG--AGVIDE	DYRGNVGVVLFNFG-
LESC (25)	NGNVFFFRVKLSENAVLPSRASLAAGYDLSS--AAETKVPARGKALVPTDLIAVPSG-TYARIAPRSGLA	WKYSIDVG--AGVIDA	DYRGNVGVVLFNHS-
CELE	-----KSNDNAQMPTYGSAAEAGADLYS--AEDVTVPARGKLCVSTGIQMALPIG-YYGRVAPRSGLA	AKHFIDVG--AGVIDS	DYRGNVGVVLFNFG-
CALB (12)	LESTQSLKVVYLRSPKGVPTKGSALAAGYDLYS--AEAATIPAHGQGLVSTDISIIVPIG-TYGRVAPRSGLA	VKNHISTG--AGVIDA	DYRGNVGVVLFNHS-
SCER (2)	ATSDKVLNIQLRSASATVPTKGSATAAGYDIYA--SQDITIPAMGQGMVSTDISFTVPVG-TYGRVAPRSGLA	VKNGIQTG--AGVVD	RDYTGKVVVLFNHS-
MTUB	--MSTTLAIVRLDPGLPLPSRAHDGDAGVDLYS--AEDVELAPGRRALVRTGVAVAVPFG-MVGLVHPRSGLA	TRVGLSIVNSP	GTIDAGYRGEIKVALINLDP
MLEP (40)	GPVSTSLAVVRLDPGLPLPSRAHDGDAGVDLYS--VEDVKLAPGQRALVRTGLAVAI PFG-MVGLIHPRSGLA	VRVGLSIVNSP	GTVDAGYRGEIKVALINLDP
ECOL (1)	KKIDVKILDPRVKEFPLPTYATSGSAGLDPRACLNDAVELAPGDTTLVPTGLAIHIADPSLAAMMLPRSGLA	GKHGIVLGNLV	GLIDSDYQGQLMISVMWNRG-
HINF (1)	KKIDVKILDSRIGNEFPLPTYATEGSAGLDLRALIDESFEIQPGETKLITGLSIYIADPNLAAVILPRSGLA	GKHGIVLGNLV	GLIDSDYQGQLMISVMWNRG-
ORFV (2)	FCHTETLQVRLSQNATIPARGSPGAAGLDLCS--AYDCVIPSHCSRVTDLIKPPSG-CYGRVAPRSGLA	VKNHIDVG--AGVIDE	DYRGNVGVVLFNFG-
AVAD (15)	DLPEPKLYFVRLSPHAVPPVRATHGAAGYDLFS--AYDIKVPARGRALVPTDLVQFPPG-CYGRVAPRSGLA	AKHFIDVG--AGVIDP	DYRGNVGVVLFNFS-
VACV (3)	MNINSPVRFVKETNRAKSPTRQSPYAAGYDLYS--AYDYTIIPGERQLIKTDISMSMPKF-CYGRVAPRSGLA	SLKG-IDIG--GVIDE	DYRGNVGVVLFNFG-
CPOX (3)	MNINSPVRFVKETNRAKSPTRQSPYAAGYDLYS--AYDYTIIPGERQLIKTDISMSMPKF-CYGRVAPRSGLA	SLKG-IDIG--GVIDE	DYRGNVGVVLFNFG-
EIAV	-----MLAYQGTQIKEKRDEAGFDLCVP--YDIMIPVSDTKIIPDVKIQVPPN-SFGWVTCKSSMAKQGLLING---	GTIDEGYTG	GEIQVICTNIG-
1FIV	-----MIIEGDGLDKRSEDAGYDLAA--KEIHLLPGEVKVIPTGVKMLMPKG-YWGLIICKSSFGSKGLDVLG---	GVIDE	YRGNVGVVLFNFS-
VISV (24)	EEIDRYISEIFLAKEGRGILQKRAEDAGYDLICP--QEISIPAGQVKRIATDLKINLKKD-QWAMIGTKSSFANKGVFVQG---	GTIDSGYQGT	IQVVIYNSN-
MPMV (12)	SLWGSQCLSSQQKQIPISKLTRATPGSAGLDLCS--TSHTVLTPEMGQALSTGIYGLPPN-TFGLILGRSSITMKGLQVYP---	GVIDNDYT	GEIKIMAKAVN-
	Motif 4	Motif 5	
DMEL	DVDFEVKKGDRIAQLICERIF--YPQLVMVDKLEDT----	ERGEAGFGSTG	VKDLPAAKAQNGNGEKAAPPEGAA 182
HSAP	KEKFEVKKGDRIAQLICERIF--YPEIEEVQALDDT----	ERSGGGFGSTGKN	----- 163
RNOR	KEKFEVKKGDRIAQLICERIL--YPDLEEVQTLDNLT----	ERSGGGFGSTGKN	----- 203
LESC	EVDFEVKGDRIAQLIVQKIIVT--PEVEQVDDLDST----	VRSGGGFGSTGV	----- 169
CELE	ENDFEVKKGDRIAQLVCEQIA--LCTYSKVESLEVT----	ERAGGGFGSTGQY	----- 135
CALB	EKDFEIKEGDRIAQLVLEQIVNADIKEISLEELDNLT----	EREGGGFGSTGKN	----- 159
SCER	QRDFAIKKGDRIAQLILEKIV--DDAQIVVVDLSLEES----	ARGAGFGSTGN	----- 147
MTUB	AAPIVHVRGDRIAQLLVQVVE--LVELVEVSSFDEAGLASTSRGDGGHGS	SGSHASL	----- 154
MLEP	VEPLVHVRGDRIAQLLVQVVE--LVELVEVSSFDEAGLAETSRGDGGHGS	SGSHASL	----- 196
ECOL	QDSFTIQPGBRIAQMIFVPVV--QAEFNLVEDFDAT----	DRGEGGFHSGRQ	----- 151
HINF	NEPFIKIEVGDRIAQLVFPVV--QAEFNIVEDFQQT----	ERGEGGFHSGKQ	----- 151
ORFV	NSDFEVKKGDRIAQLICERIS--CPAQVEVNCLDNLT----	DRGDSGFGSTG	SGACGGRDTAWYIS----- 159
AVAD	ESSFNIRRGDRIAQLILIRIM--VPELSELTQLGET----	DRGASGFGSTGM	GAVDNRQSVLEWLTPGSR---- 178
VACV	KCTFNVNVTGDRIAQLIYQRIY--YPELEEVQSLDST----	NRGQGGFGSTGLR	----- 147
CPOX	KCTFNVNVTGDRIAQLIYQRIY--YPELEEVQSLDST----	DRGAQGGFGSTGLR	----- 147
EIAV	KGNIKLIEGQKFAQLIILQHHS--NSRPQWDENKIS----	QRGDKGFGSTGVF	----- 134
1FIV	RKSIITLMERQKFAQLIILPCKH--EVLEQGGVVMDS----	ERGDNGYSGTGVF	----- 133
VISV	NKEVVIPOGRKFAQLIILMPLIH--EELFPWGETRKT----	ERGEQGGFGSTGMY	----- 168
MPMV	-NIVTVSQGNRIAQLILLPLI--ETDNKVQQP----	YRQGSFGSSDIY	----- 152

7. ábra
Eukarióták és prokarióták konzervált dUTPáz motívumai (fekete alapon fehér szekvenciariészletek) [15]

A trimer szerveződésű dUTPázok az 5 konzervált motívumon kívül változatos szekvenciárészekkel rendelkezhetnek. A legtöbb képviselőjüknek az 5. motívum után csak egy-két aminosav található, ami azzal magyarázható, hogy ezt a motívumot tartalmazó glicingazdag, mozgékony szál, avagy P-hurok motívum szerepet játszik a dUTPáz aktivitásában [26]. Ennek ellenére mégis akad egy-két kivétel, például a *Drosophila melanogaster* dUTPázának ezután még következik egy 28 aminosavnyi toldalékja [27]. Az enzim N-terminális vége ezzel ellentétben nagyobb változatosságot mutat, itt találhatóak az esetleges lokalizációs szignálok. A szekvenciában toldalékok is előfordulhatnak, melyek specifikus fehérje kölcsönhatásokért lehetnek felelősek, ilyen például a jelen eset is, ahol egy kb. 40 aminosav hosszúságú linker régió található a *S. aureus* helper fágok dUTPázában [13] (8. ábra).



8. ábra
dUTPázokban előforduló nem-kanonikus elemek [13, 27-30]

1.6 Φ 11 dUTPáz és az Stl SaPIbov1, avagy a derepressziós specificitás

Ezen dolgozatomban a *S. aureus* Φ 11 helper fág által termelt dUTPáz (ezentúl Φ 11 dUTPáz) és a *S. aureus* SaPIbov1 patogenitás szigetén kódolt Stl fehérjével (ezentúl Stl SaPIbov1) és azok szerkezeti, illetve funkcionális analízisével foglalkoztam.

A SaPIbov1 szigetet először egy szarvasmarha mastitis-t (emlőgyulladás) okozó RF122 *S. aureus* törzsből izolálták [31]. Érdekes megemlíteni, hogy a hozzá közelálló SaPIbov2-vel [32] mindketten a sztafilokokkális kromoszóma *attC* II-es helyére integrálódnak be, ahova semelyik másik sziget sem épül be. A SaPIbov1 kódolja a TSST-1-et (TSS toxin 1) az ORF4-en (*tst*), és emellett még két enterotoxint is, az első kettő ORF-en (*sec* és *sel*) (9. ábra). A maradék 17 gén a kivágásos-replikációs-csomagolódasos (Excision-Replication-Packaging; ERP) folyamatokban vesz részt.



9. ábra
A SaPIbov1 géntérképe [10]

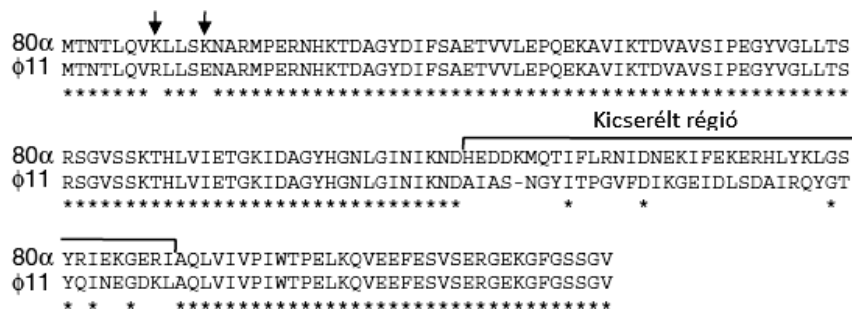
Minden ismert SaPI-n kódolva van két divergens ORF, amely meghatározza a sziget transzkripció szerveződését. Az ORF19 jobb irányú (SaPI transcription rightward; *str*), míg az ORF20 baloldali irányultságú (SaPI transcription leftward; *stl*). Mindkettő ORF prediktált fehérje terméke tartalmaz egy specifikus helix-turn-helix régiót, ami jellemző a transzkripció regulátor fehérjékre. Az ORF19 in-frame deléció kiiktatása nem befolyásolta a SaPIbov1 fág indukált replikációját [10], feltehetőleg nincs jelentősebb szerepe az ERP ciklus szabályozásában. Mivel az ORF20 által kódolt fehérje (Stl SaPIbov1) bizonyítottan betölti a globális átírási represszor szerepét [10, 13], ezért ezt a fehérjét választottam vizsgálataim egyik tárgyává.

S. aureus helper fágok által kódolt dUTPázok Stl derepresszálo képessége eltérő. A 80 α helper fág által kódolt dUTPáz képes megszüntetni akár öt féle Stl represszióját, és mobilizálni az őket kódoló SaPI-kat (SaPI1, SaPI2, SaPIbov1, SaPIbov2 és SaPIin1) [13, 14]. A 80-as helper fág

a SaPI2-t és a SaPIbov1-et egyaránt képes mozgósítani [14], míg a Φ 11 fág dUTPáz kizárólag a SaPIbov1 szigetet tudja derepresszálni [13].

Kutatások kimutatták, hogy bizonyos 80 α fág törzsek nem voltak képesek megszüntetni a SaPI1 vagy a SaPIbov2 blokkját. Ezek a törzsek mutációkat tartalmaztak a fág ORF22 (ezen túl *sri*-ként hivatkozva), illetve ORF15 régióiban. A *sri* egy DnsI kötő-, míg az ORF15 pedig egy ismeretlen fehérjét kódol, egyik géntermék sem esszenciális a fág számára. A Φ 11 fág génkészletéből mindkét gén hiányzik. A 80-as fágban megtalálható a *sri* gén, de a terméke csak 53%-ban azonos a 80 α -éval, és a gén terméke nem képes a SaPI1-et mobilizálni [14]. Plazmidról expresszált 80 α ORF15 viszont lehetővé tette a Φ 11 fág számára a SaPIbov2 derepresszióját, ami arra utal, hogy az indukció hiányát a Φ 11 genomban a 80 α ORF15 távolléte okozza [13]. Nem történtek ilyen irányú kísérletek az ORF22-vel, mivel a *Sri* fehérje túltermelése a *S. aureus*-ra toxikus.

Mind három fág által kódolt dUTPáz enzim a trimeres szerveződésű *S. aureus* helper fág dUTPázok családjába tartozik (ld. 3.4.2 fejezet), melyek jellemzője, hogy egy körülbelül 40 aminosav hosszú, ún. linker régió kívül szinte teljesen azonos szekvenciával rendelkeznek. Ez a magas fokú konzerváltság az enzimen belül leszűkíti az StI-el való kölcsönhatásért felelős részt a linker régióra. Ezt a hipotézist bizonyította továbbá a következő kísérlet. A 80 α és a Φ 11 fágok összehasonlítása során eltérések voltak a SaPIbov1 mozgósítási képességükben. Ha az N-terminálison lévő 2 nem konzervált aminosavat kicserélték (10. ábra), nem volt tapasztalható változás a derepressziós hatásfokukban, de ha a linker régiót cserélték meg, akkor a Φ 11 erősebb mobilizálási képessége átadódott a 80 α dUTPáz mutánsra [13]. Munkám során a Φ 11 dUTPázzal dolgoztam tovább, mivel nagyfokú StI kötő specificitása egyértelmű válaszokat adhat a kölcsönható régiót azonosító kísérletekben.



10. ábra

A Φ 11 és a 80 α dUTPáz összehasonlítása és a kicserélt aminosavak [13]

2 Célkitűzések

A *S. aureus* mai napig is jelentős egészségügyi problémát jelent a társadalom számára. Ha sikerül mélyebb belátást szerezni ezen opportunist baktérium virulenciájának és antibiotikum rezisztencia terjedésének mechanizmusába, akkor nagyobb esélyünk lesz egy hatékony módszert kidolgozni ezen tulajdonságok további terjedésének meggátolására, regulációjára.

Munkám első lépése az irodalomban felvett hipotézis [13] bizonyítása, miszerint a *S. aureus* patogenitás szigeteinek represszor fehérjéje egy virális eredetű dUTPáz nem-kanonikus kölcsönható partnere.

Fő célom megállapítani mind a komplexnek, mind a résztvevőknek a pontos szerkezetét, ezáltal belátást biztosítani a kölcsönhatás általános mechanizmusába és annak struktúrájába. A vizsgálatokhoz szükség volt a $\Phi 11$ dUTPáz és az Stl SaPIbov1 fehérjék előállítására és tisztítására, ezért ezek voltak elsődleges céljaim.

Elsődleges módszer a háromdimenziós szerkezet meghatározására a röntgenkrisztallográfia. A komplexet és a különálló fehérjéket széles spektrumú kristályosító screeneknek vettem alá, majd a pozitív találatokat optimalizáltam és az optimalizált körülményekből nyert kristályokkal röntgendiffrakciós méréseket végeztem.

Másodlagos szerkezeteknek és a fehérjék hőstabilitás-változásának megállapítására cirkuláris dikroizmus spektroszkópiai és termofluorimetriás méréseket végeztem. A kölcsönható felszín azonosítása is egy fontos része a munkámnak. Ehhez a dUTPáz aktivitásának vagy fluoreszcenciájának változását mértem, és az eredmények alapján kizárásos módszerrel próbáltam esetlegesen szűkíteni az Stl SaPIbov1 lehetséges kölcsönhatási pontjait.

Szerkezetüket tekintve trimer és dimer dUTPázok is kódolva vannak a helper fágokon. Annak megértésére, hogy miért alakult ki két fajta dUTPáz a fágokban, illetve, hogy a trimer dUTPázok Stl derepressziós specificitása miért különbözik ennyire, filogenetikai vizsgálatokat végeztem, melyek jelenleg is folyamatban vannak. A vizsgálatokhoz több mint 60 helper fág dUTPáz szekvenciáját egymáshoz illesztettem, és csoportosítottam.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Fehérje termelés és tisztítás

3.1.1 Konstruktok előállítása

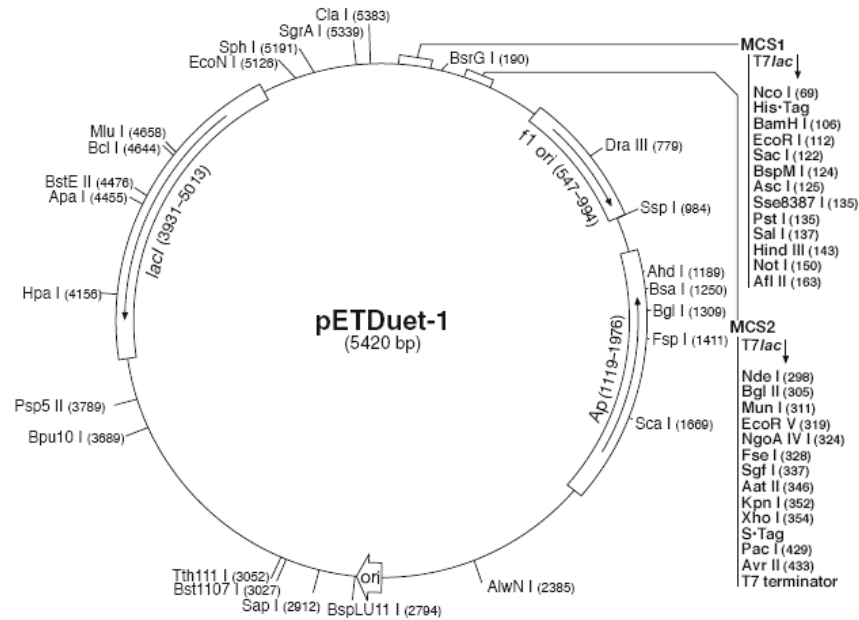
Az irodalomban szereplő [13] fehérjék szekvenciáinak optimalizálását, rendelését, és vektorba klónozását munkatársam, Róna Gergő végezte. További DNS-manipuláló munkáimban is ő nyújtott segítséget.

Az eredeti szekvenciák (*S. aureus* SaPIbov1 ORF20, Φ 11 helper fág *dut*) kodon-optimalizációnak vetettük alá (EnCor Biotechnology Inc.). A kodonoptimalizáció alapja a genetikai szótár degeneráltsága, mely szerint egy aminosavat több triplet is kódolhat, a szervezetek (emlős, baktérium) pedig egy aminosavra más-más kodont preferálhatnak. Ez expresszió során problémát okozhat, ezért ezen kodonok célirányú kicserélése, természetesen a primer szerkezeten nem változtatva, növeli a fehérjetermelés hatékonyságát.

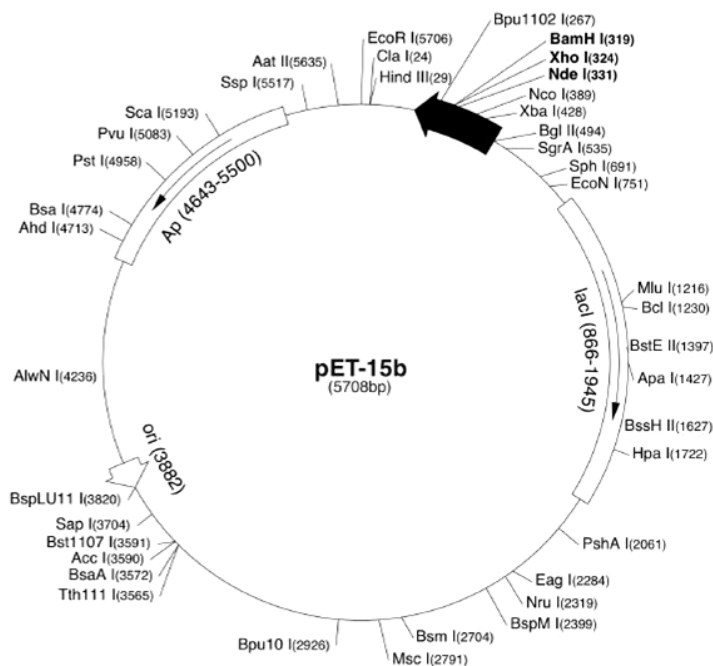
Az irodalomban szereplő StI SaPIbov1 konstrukton változtattunk, a fehérje előtti TEV hasító helyet trombin hasító helyre cseréltük le, de a HisTag-et (ld. 3.1.4.1 fejezet) meghagytuk. A Φ 11 dUTPáz konstrukttal szemben szándékosan nem tartalmazott HisTag-et. A hipotézis bizonyításához egy kettős expressziós vektort, a pETDuet-1 rendszert használtunk (11. ábra). Ezt a plazmidot két fehérje szimultán termelésére tervezték, e miatt két MCS-t (Multiple Cloning Site) és ezeket megelőzően két *T7lac* promótert, illetve riboszóma kötőhelyet tartalmaz. Az StI SaPIbov1 az EcoRI és a NotI restrikciós helyek közé, a Φ 11 dUTPáz pedig az NdeI és az XhoI vágási helyek közé lett beklónozva. A plazmidba előre beklónozott módosított szekvenciákat az MWG Biotech-től rendeltük.

A fehérjék önálló expressziójához a pETDuet-1 rendszerből különálló vektorokba klónoztuk át a géneket. Célvektorként a pET-15b (12. ábra) vektort használtuk, mivel az ugyanúgy *T7lac* promóterrel rendelkezik és beépített HisTag-et tartalmaz, ami egy leolvasási keretbe esve a fehérjével, annak N-terminális részén megjelenik. A natív (HisTag és trombin hasítóhely-mentes) StI SaPIbov1-et határoló NdeI és NotI helyek restrikciós emésztéses átklónozáshoz nem volt megfelelő célvektor, ezért polimeráz láncreakció (Polymerase Chain

Reaction; PCR) alapú módszerrel (ld. 3.1.1.3 fejezet) klónoztuk át a pET-15b rendszerbe. A Φ 11 dUTPázt NdeI és XhoI helyen hasítottuk ki restrikciós enzimekkel (ld. 3.1.1.2 fejezet), és helyeztük át.



11. ábra
A pETDuet-1 vektor géntérképe



12. ábra
A pET-15b vektor géntérképe

A klónozás sikerességének ellenőrzésére, a frissen transzformált és termelt sejtek több különálló telepeiből is kitisztítottuk a klónozott plazmidot, szekvenáltattuk (MWG Eurofins Operon) és a megfelelő enzimekkel újra restrikciós módon emésztettük, agaróz gélen (ld. 3.1.1.4 fejezet) azonosítva a termékek méretét.

3.1.1.1 Plazmidok felszaporítása és tisztítása

A klónozáshoz megfelelő mennyiségű plazmidot kell előállítani. Ehhez az *Escherichia coli* XL1 Blue törzsét használtuk. A plazmidokat (pET-15b, pETDuet-1) az előzetesen kompetenssé tett sejtekbe transzformáltuk (ld. 3.1.2 fejezet), és a szelektív antibiotikumok mellett felszaporítottuk LB (Luria-Bertani) médiumban (ld. 3.1.3 fejezet).

A sejtek által termelt plazmid kinyerésére NucleoSpin Plasmid MiniPrep vagy Promega PureYield MidiPrep (attól függően, hogy milyen térfogatban expresszáltattuk a sejteket) protokollt és Kit-et használtunk. A művelet során a sejteket alkalikusan feltártuk, a fehérjéket és a hozzájuk tapadó nagyméretű kromoszómális DNS-t nátrium-dodecil-szulfáttal (Sodium Dodecil Sulphate; SDS) kitekertük és oldatba vittük. Az RNS-eket RNáz hozzáadásával kis fragmentekre emésztettük. K-acetát tartalmú oldattal, az SDS káliummal képzett oldhatatlan sója miatt, kicsaptuk a fehérjéket és a kromoszómális DNS-t, miközben a plazmidunk oldott állapotban maradt. Centrifugálással megszabadultunk a szilárd fázistól és a csak a mi plazmidunkat tartalmazó felülúszót átengedve egy szilikamembránon, alacsony pH-n (≤ 7.5) és magas kaotropikus ionkoncentráció mellett, kikötöttük a membránra. Alkoholos mosással megszabadultunk az esetleges szennyezésektől, és a tiszta plazmidunkat alacsony ionerősségű, nukleáz-mentes dH₂O-val eluáltuk.

Agaróz gélen megfuttatott DNS tisztítására QIAGEN Gel Extraction Kit-et és protokollt használtuk. A gélből kivágott csíkokat QG pufferben feloldottuk, 10 percig 50°C-on termosztáltuk és az oldatot átengedve egy szilikamembránon, a fent tárgyalt körülmények között kikötöttük. A membránt QC és etanol tartalmú PE pufferrel mostuk és nukleáz-mentes dH₂O-val eluáltuk.

PCR-el amplifikált szekvenciák tisztítására QIAGEN PCR Cleanup Kit-et és protokollt használtunk, miután meggyőződünk agaróz gélen a termék 100%-os tisztaságáról. A szekvenciánkat tartalmazó PCR elegyet PB oldattal pufferáltuk, mely elősegíti a 100 bp-nál

nagyobb ss-, vagy dsDNS-ek kikötődését, de eltávolítja a kisebb méretű oligonukleotidokat (primereket). A membránt PE oldattal mostuk, és a PCR terméket nukleáz-mentes dH₂O-val leluáltuk.

3.1.1.2 Restriktációs emésztés és ligálás

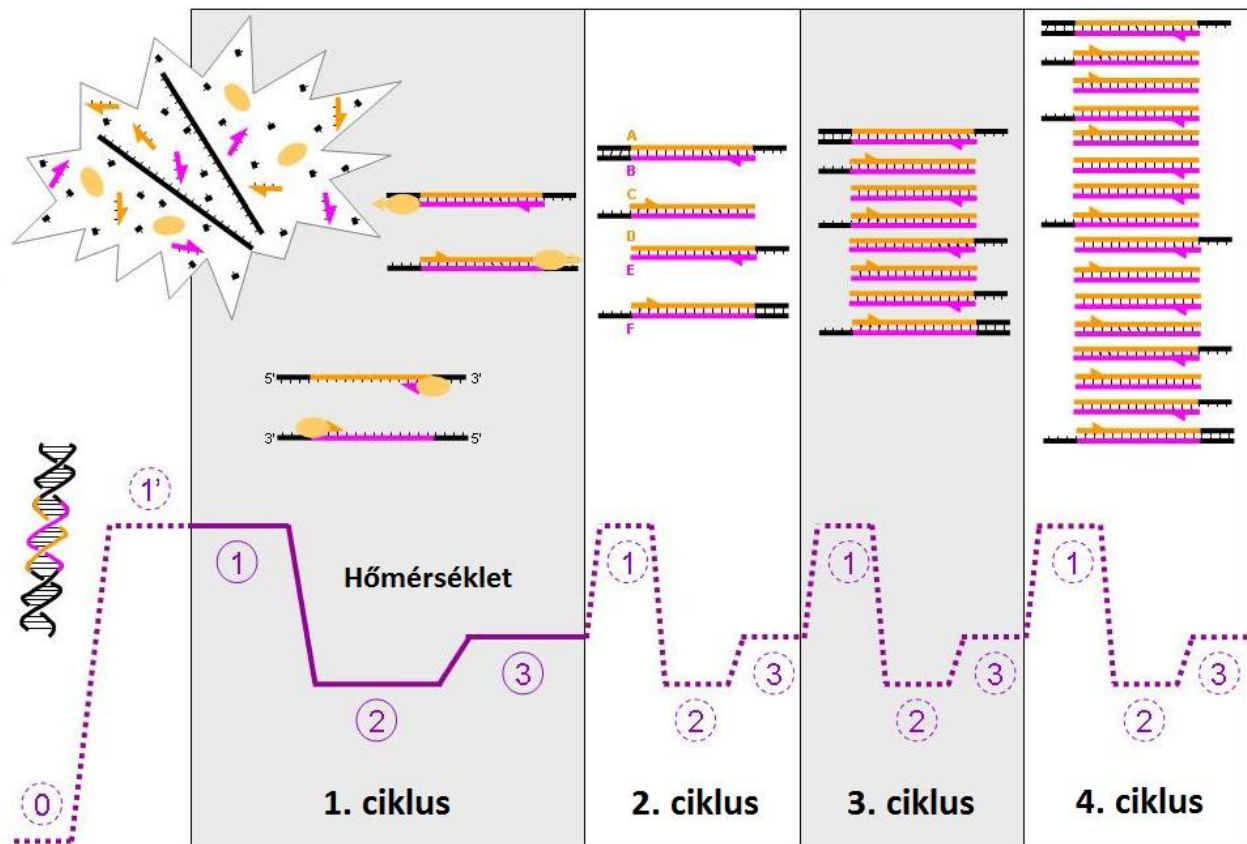
A plazmidok linearizására, a gének kivágására, a PCR termék ragadós végeinek előállítására restriktációs emésztést alkalmaztunk. Restriktációs enzimek olyan endonukleázok, melyek a dsDNS-t specifikus helyeken hasítják csak.

Első lépésként kiválasztottuk az enzimeket, azok vágási pontjai és a célszekvencia alapján (Φ11 dUTPáz és pET-15b: NdeI és XhoI). Kiválasztottuk a kettős emésztés körülményeit az NEB Double Digest Finder programja segítségével (NdeI és XhoI: NEBuffer 4, 100 µg/ml marhaszérum albumin (Bovine Serum Albumin; BSA)). Az emésztést 50 µl reakcióelegyben végeztük 0.4 U/µl restriktációs enzim-koncentráció mellett, 37°C-on és 8 órán keresztül. Az emésztés után az enzimeket 20 percig 65°C-on történő termosztálással hőinaktiváltuk. A restriktációs termékeket agaróz gélen megfuttattuk, és a megfelelő csíkokból izoláltuk a DNS-t. Az emésztett, majd tisztított plazmidot és a beklónozni kívánt gént elegyítettük úgy, hogy az inzerció legalább ötszörös moláris feleslegben legyen. 5 percig 65°C-on termosztáltuk, majd 2 percig 0°C-on, jégen tartottuk. A ligálást 10 µl reakcióelegyben T4 DNS ligázzal (NEB), a gyári T4 ligáz pufferben végeztük 16°C-on, ON (Overnight; egy egész éjszakán át). A ligált plazmiddal már közvetlenül transzformáltuk a sejteket.

3.1.1.3 PCR alapú klónozás

Stl SaPIbov1 átklónozásához polimeráz láncreakciós módszert használtunk. A PCR elve azon alapul, hogy DNS-ből, specifikusan letapadó primerekkel és hőrezisztens polimeráz segítségével felszaporíthatunk egy részletet. A PCR több lépésből áll, először magas hőfokon denaturáljuk a kettősszálú DNS-t, majd lehűtjük annyira, hogy az elegybe belekevert primerek képesek legyenek kitapadni az előre meghatározott helyükre. Ezután következik az átírási fázis, amely során a primerekhez köt a DNS polimeráz és átírja a down-stream szakaszt, mely e lépésnél még túllóg az ellentétes (forward↔reverse) primeren. A következő ciklusban, viszont ha az újonnan termelt DNS szálhoz köt az ellentétes primer, akkor az átírás csak a primer által kijelölt start pontig tart, tehát megkapjuk a célszekvenciát. További denaturációs és extenziós

ciklussal ezt a szekvenciát exponenciálisan felszaporítjuk, míg az eredeti DNS mennyisége elhanyagolható lesz (13. ábra).



13. ábra
A PCR lépései
1. Denaturáció
2. Primer anelláció
3. Extenzió

Az SstI fehérjekonstruktt elején HisTag és egy trombin hasító hely is szerepelt, ezeket kihagytam az amplifikálás során, mivel a pET-15b plazmidon már szerepel HisTag. A következő primereket terveztem (1. táblázat), figyelembe véve, hogy a pETDuet-1 NdeI és NotI restrikciós helyek között lévő gént a pET-15b NdeI és XhoI hasítási helyei (piros szín) közé akarjuk beklónozni. Lila színnel jelöltem a restrikciós enzimek optimális hatékonyságú vágásához szükséges toldalék nukleotidokat. A primereket az Eurofins DNA-tól rendeltük.

	Szekvencia	Beépített hasító hely
Forward primer	ATATTACATATGGAAGGCGCGGGCC	NdeI
Reverse primer	CAGAAAAAATTATTCTGGAAAAGATACCAACTAACTCGAGGACC	XhoI

1. táblázat
Stl SaPIbov1-hez tervezett primerek

A T_M kalkulátor (Finnzymes) szerint a forward és a reverse primer annealációs hőmérséklete jelentősen eltér (59.32°C, illetve 64.54°C), ezért egy előzetes gradiens PCR-t terveztem. 50 µl reakcióelegy, a bemérés sorrendjében, nukleáz-mentes dH₂O-val hígított HF puffert (Finnzymes), 0.25 µM forward és 0.25 µM reverse primert, 0.2 mM dNTP keveréket (Fermentas), 0.3 ng/µl templátot, 0.02 U/µl Phusion DNS polimerázt (Finnzymes) tartalmazott. A PCR programot a 2. táblázat tartalmazza.

Ciklusszám	Folyamat	Időtartam (mp)	Hőmérséklet (°C)
1	Hőaktiváció	30	98
15	Denaturáció	15	98
	Anelláció	30	58-68
	Extenzió	30	72
15	Denaturáció	15	98
	Extenzió	45	72
1	Hosszabbítás	600	72

2. táblázat
Gradiens PCR ciklusai

A gradiens során 5 különböző anellációs hőmérsékletet próbáltunk ki, és a legjobb eredményt mutató hőmérséklettel (67°C) végeztük el a PCR-es kiklónozást. A 100 µl reakcióelegy a gradiens PCR-nél alkalmazott koncentrációkat tartalmazta és ugyanazt a

ciklusprogramot is használtuk a folyamat során. A PCR terméket ellenőriztük agaróz gélen és PCR Cleanup Kit-el tisztítottuk. Az amplifikáció során kapott tompa végű szekvenciát restriktósan emésztettük NdeI és XhoI restriktós enzimekkel, majd a kapott ragadós végű DNS-t gélből izoláltuk. A tiszta inzertet összeligáltuk az előzetesen hasított és tisztított pET-15b vektorral, majd a transzformált sejtek plazmidjait vizsgáltuk a klónozás sikerességének szempontjából.

3.1.1.4 Agaróz gélelektroforézis

A DNS minták elválasztására agaróz gélelektroforézist alkalmaztam. A nukleinsavak a cukor-foszfát gerincük miatt egyenletes negatív töltéssel rendelkeznek, és egyenáramú elektromos térben a pozitív pólus felé vándorolnak. Nagy molekulaméretük miatt, a poliakrilamidnál nagyobb pórusméretű agarózt használják. Az elválasztás során a legnagyobb fajlagos töltéssel (legkisebb fragmensek) rendelkező nukleinsavak vándorolnak a leggyorsabban, míg a zárt konformációjú, jobban feltekeredett, nagy DNS-ek a leglassabban.

A PCR és az emésztések során kapott termékek elválasztására 1%-os agaróz gélét használtam. Az agarózt felmelegített TAE (40 mM TRIS/acetát pH 8.5, 1 mM EDTA (etiléndiamin-tetraecetsav)) pufferben oldottam fel, és a gél kiöntése előtt 10000-szeres hígításban GelRed (Biotium) fluoreszcens festéket adtam. A mintákat 6-szoros hígítású mintakóktélban (6X Loading Dye, Fermentas) a már megdermedt gélre vittem, és TAE pufferben futtattam 100 V egyenáramú feszültséggel. A vizsgált nukleinsavak méretének meghatározásához a mintáimmal párhuzamosan DNS létrát (Fermentas) futtattam, mely ismert méretű DNS fragmenteket tartalmaz.

3.1.2 Kompetens sejt készítés és transzformáció

Ahhoz, hogy a sejt felvegye az extracelluláris DNS-t, kompetenssé, azaz átjárhatóbbá kell tenni a DNS számára a sejtfalat és a sejtmembránt. Erre többféle elektromos és kémiai módszer is létezik. Mi a QIAGEN kémiai módszert alkalmaztuk.

Két oldatot használ a protokoll, TFB I (100 mM RbCl, 50 mM MnCl, 30 mM K-acetát, 10 mM CaCl₂, 15 % glicerint, pH 5.8) és TFB II (10 mM MOPS (3-[N-morfolino]-propánszulfonsav), 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % glicerint, pH 6.8). Az LB médium 1000 ml-ként 10 g triptont, 5 g élesztő extraktot, 10 g NaCl-t tartalmaz, pH 7-re állítva.

A célpont sejteket steril körülmények között beoltottam 5 ml LB-be, mely már tartalmazta a megfelelő szelektáló antibiotikumokat (XL1 Blue; 12,5 µg/ml tetraciklin, BL21 Rosetta; 34 µg/ml chloramfenikol) és ON növesztettem a baktériumokat 37°C-on, 220 rpm rázatás mellett. Az így felnövesztett előkultúrából 500 µl-t átoltottam, a megfelelő antibiotikumot tartalmazó, 50 ml LB-be. A sejteket addig növesztettem, amíg el nem érték az exponenciális növekedési szakaszt, ami OD = 0.6 körül van (Optikai Densitás; A_{600 nm}). A sejt denzitás mérést Biochrom WPA CO8000 denzitométeren végeztem. A felnőtt sejteket lecentrifugáltam (4°C, 3600 rpm, 20 perc) és a pelletet (lefugált, felülúszó-mentes sejteket) felszuszpendáltam 5 ml TFB I-ben. 20 perc jégen tartás után újra megismételtem a centrifugálást, és a pelletet újra felszuszpendáltam 1 ml TFB II-ben. Egy újabb 20 percnyi jegeléses fázis után 15% glicerint adtam a sejtekhez, és 100 µl-ként szétporciózva lefagyasztottam -80°C-ra, ott tárolva a legközelebbi felhasználásig.

Transzformálásnál, a sejt extracelluláris DNS felvételének indukálásához, a hősokk módszert alkalmaztuk. 100 µl kompetens baktériumsejthez 1 µl 1.4 M β-ME-t (2-merkaptotanol) pipettáztam és 5 percig jégen hagytam. Ezután hozzáadtam 30 ng plazmidot a transzformálni kívánt konstruktból, és 30 percig jegeltem a sejteket. Ez után következett a hősokk, mely során a sejteket 42°C-on termosztáltam 90 másodpercig és utána 2 percig jégre raktam. 200 µl LB hozzáadása után, vízszintes helyzetben tartva a csöveket, 1 óráig rázattam (37°C, 200 rpm). Az inkubálás után 100 µl-el indítottam el az 5 ml-es előkultúrát az expresszióhoz. Ehhez az előkultúrához a sejszelekciós antibiotikum mellett már a plazmidon kódolt marker rezisztencia antibiotikumát is hozzáadtam (pETDuet-1 és pET-15b; 50 µg/ml karbenicillin). Agaróz plate-re oltás esetén a frissen transzformált sejtekből 300 µl-t kíméletesen lecentrifugáltam, 150 µl sejtmentes felülúszót eltávolítottam, és a maradék LB tápoldatban a sejteket felszuszpendáltam, és a szelektáló antibiotikumot tartalmazó plate-re kikentem, majd 37°C-on inkubáltam.

3.1.3 Fehérje expresszió és feltárás

A lefagyasztott, vagy frissen transzformált sejtekből ON előkultúrát indítottam (ld. 3.1.2 fejezet). A felnőtt sejtekből, steril körülmények között, átoltottam 1.5 ml-t 500 ml antibiotikum-mentes LB tápközegbe. A sejteket addig növesztettem rázó termosztátban (37°C, 220 rpm), amíg el nem érték a növekedésük log-fázisát (OD = 0.6). Ekkor 0.5 mM IPTG (izopropil-β-D-1-tiogalakto-piranozid) hozzáadásával indukáltam a fehérje expressziót. Mivel a fehérjéket kódoló gének a vektorokon található *lac* operon T7 promótere után helyezkednek el, ezért az allolaktóz

analóg IPTG indukálja a transzkripciót. A sejt számára az IPTG a tioéter kötése miatt nem-hidrolizálható, így az indukció az expresszió során végig fennmarad. Munkám során több expressziós körülményt is kipróbáltam (20 vagy 25°C, ON; 30 vagy 37°C, 4 óra), és mindegyik vektornál a 37°C-on való expresszió adódott a leghatékonyabbnak. A kísérletekhez használt $\Phi 11$ dUTPázt a pETDuet-1 vektorban, az Stl SaPIbov1-et pET-15b vektorban termeltem, mivel ezeknek a rendszereknek a tisztítását tudtam optimalizálni. Az expresszió után a sejteket lecentrifugáltam (4°C, 5000 rpm, 15 perc), és a pelleteket a feltárásiig -80°C-on tároltam. A fehérjetermelés hatékonyságáról poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis; SDS-PAGE) győződtem meg (ld. 3.2.1 fejezet).

A fehérjék kinyeréséhez a sejtek membránjait szét kell roncsolni. Erre fagyasztásos és szonikáló eljárást alkalmaztam. Fagyasztás és felengedés során a keletkező jégkristályok felszakítják a sejtfalat, míg szonikálásnál az ultrahangos kezelés során keletkező kavitációk végzik a sejtmembránok destrukcióját.

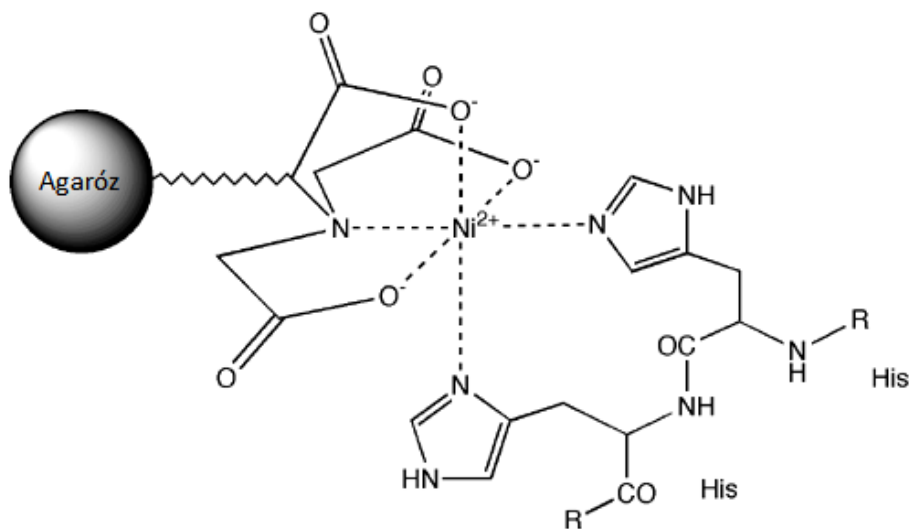
A sejt pelleteket felfuszpendáltam 50 ml lízis pufferben (20 mM TRIS (tris-(hidroximetil)-aminometán) pH 7.5, 500 mM KCl, 1 tabletta proteáz inhibitor koktél (Roche), 0.1 mM PMSF (fenilmetánszulfonil-fluorid), 10 mM β -ME, 10 μ g/ml RNáz A). A sejt szétesésekor proteázok szabadulnak fel, melyek degradálnák az általam frissen termelt fehérjét is. Ennek megelőzésére kell leállítani ezeket az enzimeket. Az inhibitor tabletta széles spektrumban hat, míg a PMSF a szerin proteázokat gátolja. A β -ME egy redukáló környezetet alakít ki, ami meggátolja a ciszteinek közötti diszulfid hidak kialakulását.

A felfuszpendált sejteket Potter-Elvehjem homogenizátorral csomómentesítettem, miközben a sejtek a potterezés hatására roncsolódtak, majd folyékony nitrogénbe helyezve gyorsfagyasztottam. A fagyott pelletet meleg vízfürdőn felolvasztottam, és megismételtem az eddigi lépéseket még egyszer. Ezután a sejtek feltárást szonikálással folytattam tovább addig, amíg egy átlátszóbb, kisebb viszkozitású szuszpenziót nem kaptam. Centrifugálással (4°C, 11000 rpm, 20 perc) kiülepítettem a sejtfal és a sejtorganellumok törmelékét, míg a felülúszóban maradtak a sejt fehérjéi. Ezt a törmelékmentes oldatot tisztítottam tovább kromatográfiás módszerekkel.

3.1.4 Kromatográfiás fehérjetisztítás

3.1.4.1 HisTrap affinitás kromatográfia

A hisztidin az aromás szerkezetéből adódóan képes kelátképző ionokkal, például nikkellel, komplexet képezni. Ezt használjuk ki a fehérjék affinitás kromatográfiás tisztításánál. Olyan gyantát használtam, amelynél a nikkell ionokat nitrilo-triacetsavval komplexálták, amit egy keresztkötött agaróz gyantára kötnek kovalensen (Ni-NTA, 14. ábra).



14. ábra
A Ni-NTA rendszer

A tisztítani kívánt fehérje N-terminálisára rekombináns módszerekkel HisTag-et kapcsoltunk. Ez a címke hat, tandem elhelyezkedésű hisztidinből áll, melynek a nikkell ionokkal képzett kelátkomplexe elég stabilis ahhoz, hogy kitapadjon a Ni-NTA gyantára. A kötést magas koncentrációjú imidazol elúcióval szüntetjük meg, ami leszorítja az oszlopról a kikötött fehérjéket. Tisztításra kétféle módszert használtam, egy benchtop („asztali”) és egy automatizált ÄKTA rendszert alkalmazó eljárást.

Az első módszer során előkészítettem az oszlopot, úgy, hogy a 30%-os etanolban tárolt, 50%-os Ni-NTA gyantából (QIAGEN) annyit vittem fel az oszlopra, hogy az oldat átfolyása után megfelelő mennyiségű gyanta maradjon. Az oszlopot dH₂O-es mosással megszabadítottam az etanoltól, és ekvilibráltam sós pufferrel. A hipotézist bizonyító pETDuet-1 rendszer tisztításához alacsony sótartalmú (Low Salt; LS) puffert (50 mM HEPES (N-(2-hidroxietyl)piperazin-N’-

etánszulfonsav) pH 7.5, 10 mM KCl) használtam, hogy a Φ 11 dUTPáz - Stl SaPIbov1 komplex ionos kötéseit ne bontsa meg a magas ionerősség. A további pETDuet-1 és pET-15b tisztításoknál magas sótartalmú (High Salt; HS) puffert (20 mM TRIS pH 7.5, 500 mM KCl) használtam. Ezután a feltárás fehérjetartalmú felülúszóját óvatosan felvittem a gyantára, és miközben az oldat átesett, a tisztítani kívánt fehérje mellett a maradék fehérje egy része is kikötődött. Az aspecifikus fehérjék eltávolítására az oszlopot sós pufferrel mostam, majd a maradék nem kívánt fehérjét egy alacsony koncentrációjú imidazollal mostam. A koncentráció a kísérlettől függően 10, illetve 100 mM imidazol volt az adott sós pufferben hígítva. A mosás végét Bradford reagenssel (Bio-Rad) állapítottam meg, mely eredeti barna színe fehérjék jelenlétében mélykékre vált. Az elúciót mindkét esetben 500 mM imidazollal végeztem, mely leszorította az összes specifikusan kikötött fehérjét. A tisztítás eredményességét SDS-PAGE-el ellenőriztem.

Az automatizált ÄKTA kromatográfias rendszerrel (GE Healthcare) végzett tisztításnál Leveles Ibolya segített nekem. A pETDuet-1 tisztításához előre töltött Ni-NTA oszlopot (GE Healthcare) használtunk. Az oszlopot desztillált vízzel és HS-el (50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM KCl) mostuk. Sós mosás után 200, illetve 300 mM imidazollal mostunk, majd ezt egy 300-900 mM gradiens, 900 mM mosás és végül egy 900-1000 mM imidazol gradiens következett. A tisztítás előrehaladtát 220, 260 és 280 nm-en spektroszkópiásan követtük.

A tisztítás után, az imidazolos közeg eltávolítása érdekében, a fehérjéket dialízis pufferbe (20 mM TRIS pH 7.5, 700 mM KCl, 0.1 mM PMSF, 10 mM β -ME) dializáltam át. A műveletet 10 kDa retenciójú membránnal ON végeztem, 4°C-on.

3.1.4.2 Ioncsere kromatográfia

Munkám későbbi fázisaiban a fehérjéket ioncsere kromatográfiával tisztítottuk. Ez az eljárás azon alapul, hogy a szilárd fázis (anion, vagy kationcserélő gyanta) felületén olyan funkciós csoportok találhatók, melyek specifikusan kölcsönhatnak a fehérje töltéssel rendelkező felszínével, kikötve azt. Ezt az ionos kötést elúció során megbontjuk a pH, vagy az ionerősség változtatásával.

Az előzetes batch kísérletet Zagyva Imre végezte el, a pETDuet-1 rendszerben termelt Φ 11 dUTPázzal és a pET-15b vektorban termelt Stl SaPIbov1-el. 5.5 és 8 pH-jú körülmények

mellett Q Sepharose anion-, és SP Sepharose kationcserélő gyantára kötötte ki a fehérjéket, 10 mM HEPES, 10 mM KCl tartalmú pufferben. Elúció ugyanezzel a pufferrel és pH-val történt, 1 M NaCl-al.

Az ÄKTA pumparendszerrel és Leveles Ibolya közreműködésével automatizáltuk a tisztítást. Két puffert használtunk, A (20 mM TRIS pH 7.5 (Φ11 dUTPáz) vagy 8.5 (Stl SaPIbov1), 50 mM NaCl) és B (20 mM TRIS pH 7.5/8.5, 1 M NaCl). Az A pufferrel ekvibrált oszlopot (GE Healthcare) átmostuk A pufferrel, majd eluáltuk egy 6 oszloptérfogaton át tartó 100% B puffer végkoncentrációjú gradienssel. A Φ11 dUTPáznál Q Sepharose oszlopot használtunk, az Stl SaPIbov1-nél tandem tisztítottuk Q, majd SP Sepharose oszlopon.

3.1.4.3 Méretkizárásos kromatográfia

A fehérjék tisztaságának további növelésére és azok esetleges spontán oligomerizációjának és molekulatömegének meghatározására gélszűrést alkalmaztunk. A módszer azon alapul, hogy az oszlop töltetét alkotó keresztkötött dextrán-mátrix porózus szemcséibe a molekulák a méterük szerint tudnak belediffundálni. Elúció során a nagy molekulatömegű alkotók nem képesek belediffundálni a hidratált szemcsékbe, az elúciós puffer gyorsabban végigviszi őket az oszlopon, míg a kisebb molekulákat, amelyek a porózus járatokba mélyebben be tudnak diffundálni. Ismert molekulatömegű makromolekulákkal fel lehet venni egy kalibrációs függvényt, aminek a segítségével az ismeretlen tömegű anyag molekulatömege kiszámolható annak retenciós idejéből.

Fehérjetisztításnál az ÄKTA rendszeren a Superdex 200-as oszlopot (GE Healthcare) használtuk. Az elúció során használt puffer: 20 mM TRIS pH 7.5, 400 mM NaCl. A frakciók tisztaságáról SDS-PAGE-el győződünk meg.

3.2 Fehérjevizsgálati módszerek

3.2.1 SDS-PAGE

Fehérjék és nukleinsavak vizsgálatára egyaránt alkalmas ez a módszer, de jelen esetben csak a fehérjékre használtam. Az elválasztás elve ugyanaz, mint az agaróz gélelektroforézisnél, de itt egy kisebb pórusméretű mátrixot használunk, és a fehérjéket SDS-el kitekerjük, és az eredetileg pozitív és negatív részekkel rendelkező felületi töltését elmaszkírozzuk egy egyen negatív töltéssel, így a töltéstől függetlenül fognak a fehérjék a pozitív pólus felé vándorolni, és így az elválasztás egyedül a molekulatömegtől függ.

A gél két részt tartalmazott, egy tömörítő fázist, ahol a felvitt minták egy vonalba rendeződnek, hogy a következő elválasztó gélben egyszerre induljanak. A tömörítő gél összetétele: 3.9 % poliakrilamid, 0.1 % SDS, 125 mM TRIS/HCl pH 6.8, míg az elválasztó fázis: 12 % poliakrilamid, 0.1 % SDS, 375 mM TRIS/HCl, pH = 8.8. A polimerizáció inicializálásához gyök donornak APS-t (ammónium-perszulfát, Bio-Rad), katalizátornak TEMED-et (NNN'N'-tetrametil-etilén-diamin, Bio-Rad) adtam. A mintákat mintakoktélban (62.5 mM TRIS/HCl pH 6.8, 25 % glicerin, 2 % SDS, 0.01 % brómfenolkék, 350 mM DTT (ditio-treitol)) 5 percig 100°C-on termosztáltam, hogy az SDS ki tudja tekerni a fehérjéket, és a DTT megszüntesse az esetleges diszulfid hidakat. A gél-öntés során kialakított zsebekbe felvittem a mintákat, és futtató pufferben (3.03 g/l bázikus TRIS pH 8.3, 14.4 g/l glicin, 1.0 g/l SDS) 200 V egyenáramú feszültségen futtattam. Az elválasztás után a gélből a felesleges mintakoktélt dH₂O-val kiáztattam, és a fehérje csíkokat kolloidális Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad) festékkel megfestettem. A sávokhoz tartozó molekulatömeg meghatározására, a mintákkal együtt egy ismert molekulatömegű fehérjéket tartalmazó fehérje létrát (Fermentas) futtattam.

3.2.2 Koncentrációmérés

3.2.2.1 Fehérje koncentrációmérés Bradford reagenssel

A Bradford (Bio-Rad) reagens fehérjék jelenlétében történő színváltozását kvantitatívan követni lehet 595 nm-en mért abszorbancia változásával. A fehérjét 800 µl végtérfogatra hígítottam desztillált vízzel, majd 200 µl reagenst adtam hozzá, és vortex-el homogenizáltam. Fél perc állási idő után mértem az abszorbanciát egy kétutas Specord 200 típusú spektrofotométeren

(Analytik Jena), 1 cm optikai úthossz mellett. A kalibrációs egyenest ismert koncentrációjú BSA hígítási sorral vettem fel, és az ismeretlen minta koncentrációját interpolációval állapítottam meg.

3.2.2.2 Fehérje és DNS koncentrációmérés UV spektroszkópiával

A fehérjék az aromás aminosav oldalláncok miatt 280 nm-nél, a nukleinsavak az aromás bázisok miatt 260 nm-nél specifikus elnyelést mutatnak. Abszorbanciát mérve és a többi paramétert meghatározva, a koncentráció kiszámítható. A számításhoz a Lambert-Beer törvényt használtam fel, miszerint:

$$A = c \cdot l \cdot \varepsilon \quad (2)$$

Ahol a fehérjékre vonatkozó extinkciós koefficiens (ε , $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) az Expasy ProtParam programjával becsültem meg. A (2) egyenletet felhasználva a tiszta fehérjék, illetve nukleinsavak koncentrációja pontosan meghatározható. A mérést Nanodrop ND-1000 spektrofotométeren (Thermo Scientific) végeztem el.

3.2.3 Termofluorimetria

A vizsgált fehérjék és a komplexük olvadási pontjának meghatározására és annak változásának követésére termofluorimetriás spektroszkópiát végeztem. A mérés során a fehérjénket egy speciális festék mellett fokozatosan felmelegítjük. A festék vizes közegben alacsony fluoreszcens jelet ad, de a hő hatására kitekeredő fehérjék belső, apoláris régióihoz tapadva, a jel intenzitása jelentősen megnő. Kiértékelésnél a hőmérséklet-fluoreszcencia görbe negatív deriváltjának a globális minimumának helyét tekintjük a fehérje olvadási pontjának (T_M). A méréseket Mx3000P Thermal Cycler (Stratagene) készülékkel végeztem.

A 25 μl végtérfogatú elegyeket 96-lyukú plate-ekben mértem és mérés előtt a mintatálcát egy speciális hőálló fóliával fedtem le. Mérésekhez SYPRO Orange (Invitrogen) fluorofórt használtam 1000-szeresen hígításban. A fehérjék koncentrációja kísérlettől függően 5-76 μM között változott és a nehezen hidrolizálható dUTP-analóg dUPNPP (α,β -imido-dezoxiuridin-trifoszfát) koncentrációja 500 μM volt. A hígításokhoz dialízis puffert használtam és minden körülményből több párhuzamos mérést végeztem. Mérés során a műszer 25°C-ról 95°C-ig melegítette fel a well-eket, miközben minden egyes mintának a fluoreszcens jelét 0.3°C lépésenként megmérte.

3.2.4 Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

A krisztallográfiás szerkezetvizsgálatot kiegészítően a fehérjékkel CD méréseket végeztem, mely során azok másodlagos szerkezetének összetételét állapítottam meg.

A jobb és bal helicitású cirkulárisan polarizált fénysugár moláris abszorpciós koefficiens különbségének hullámhosszfüggését nevezzük cirkuláris dikroizmusnak. Minden lineárisan polarizált fénysugár felbontható két ellentétes irányultságú cirkulárisan poláros sugár összegére. Ha egy cirkuláris dikroizmussal rendelkező közegen átengedve a lineárisan poláros fényt, az a jobb és a bal irányultságú extinkciós koefficiensek különbsége miatt elliptikusan polarizált lesz. Hullámhossz függvényében mérve ezen együtthatók különbségét (történelmi okokból átváltva moláris ellipticitásra), kapjuk meg a vizsgált közegre jellemző CD spektrumot. Jelen esetben használt törőközeg maga a vizsgált fehérje. Az aminosavak, a glicin kivételével, mind királisak, de ezzel ellentétben, a kromofór csoportok, a peptidkötések és az aromás oldalláncok nem, tehát önmagukban nem mutatnak cirkuláris dikroizmust. Viszont a fehérje feltekeredéséből kifolyólag az akirális részek aszimmetrikus környezete okozhat kiralitást, tehát kromofór csoportok esetén cirkuláris dikroizmus lép fel. Ebből a jelenségből kiindulva, a kapott CD spektrum alakjából következtethetünk a fehérjét felépítő másodlagos szerkezetek összetétel-arányára. A méréseket távoli UV tartományban végezzük (< 230 nm), mivel a fehérjék ismétlődő kromofór csoportja, az amid kötés, itt mutat specifikus elnyelést.

A mérést JASCO 720 spektropolariméteren végeztem, a CD spektrumot 190 és 260 nm között vettem fel, 1 mm optikai úthossz mellett. A méréseket 20°C-ra termosztált 200 μ l végtérfogatban végeztem. A fehérjéket 5.88 és 2.94 μ M koncentrációban használtam, és a mérést pirofoszfát pufferrel (10 mM Na-pirofoszfát pH 7.5) hígított dialízis pufferben (ld. 3.1.4.1 fejezet) végeztem, úgy, hogy a végső-sókoncentráció 40.8 mM, illetve 370 mM KCl legyen. A só és a TRIS magas koncentrációja zavarja a mérést, ezért ezeket megpróbáltam minél alacsonyabb szinten tartani. A magas só és TRIS tartalmat a mérés során mért HT érték (dinóda feszültség) gyorsabb növekedése mutatja, mely, ha átlépi a 600 V-t, akkor az utána mért CD spektrum megbízhatósága jelentősen lecsökken.

3.2.5 Fluoreszcens spektroszkópia

A fehérjéket felépítő aromás oldalláncú aminosavak kromofórként viselkednek. Az őket megvilágító fényt elnyelik, majd egy másik hullámhosszon kisugározzák azt. Minden fluoreszcenciát mutató csoportnak van specifikus hullámhossza, ahol a legintenzívebb jelet adja, és a mérés során ezt használjuk ki. A fehérjékben a legerősebb fluoreszcenciát mutató aminosav a triptofán (W), aminek gerjesztési maximuma 295 nm-en van. Mérés során is ezen a hullámhosszon gerjesztettem a vizsgált mintát, és a kisugárzott fény spektrumát 320-420 nm között detektáltam.

A vizsgált fehérjék között egyedül a $\Phi 11$ dUTPáz tartalmazott triptofánt, a C-terminálisán. A mérés során állandó 3 μM koncentrációjú $\Phi 11$ dUTPázal dolgoztam, melyet 1-13 μM Stl SaPIbov1 hozzáadásával titráltam, és vizsgáltam a felvett spektrum változását. A mérést FluoroMax-3 spektrofotométeren (HORIBA Jobin Yvon) végeztem, 20°C-ra termosztált 300 μl dialízis pufferben (ld. 3.1.4.1 fejezet), 1 cm optikai úthossz mellett.

3.2.6 dUTPáz aktivitásmérés

A dUTPázok által katalizált hidrolízis (1) során keletkező protonok megváltoztatják a közeg pH-ját. Ezt használjuk ki egy érzékeny indikátorrendszer segítségével. Ehhez megfelelően pufferált fenolvörös indikátort használunk, melynek a közeg pH változására adott színváltozása 595 nm-en detektálható. A kvantitatív méréshez ismernünk kell a rendszerben található enzim (E, μM) és szubsztrát (S, μM) pontos mennyiségét és a mérési görbe első 10%-ra illesztett egyenes meredekségét (m , $\Delta A \cdot s^{-1}$) és a mérés előtt és után mért abszorbancia különbséget (ΔA , 1). Az enzimreakció kezdeti sebességet jellemző reakciósebességi állandó (k , s^{-1}) kiszámításához az alábbi egyenletet használtam:

$$k = \frac{m}{E \cdot \frac{\Delta A}{S}} \quad (3)$$

A mérés során megvártam, míg az 1 ml térfogatú fenolvörös puffer (1 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 40 μM fenolvörös indikátor, 40 μM dUTP) abszorbanciája stabilizálódik, majd hirtelen hozzáadtam $\Phi 11$ dUTPázal és figyeltem az abszorbanciaváltozást. Ha stabilizálódott a rendszer (elhidrolizálódott az összes dUTP), akkor a két végállapotból

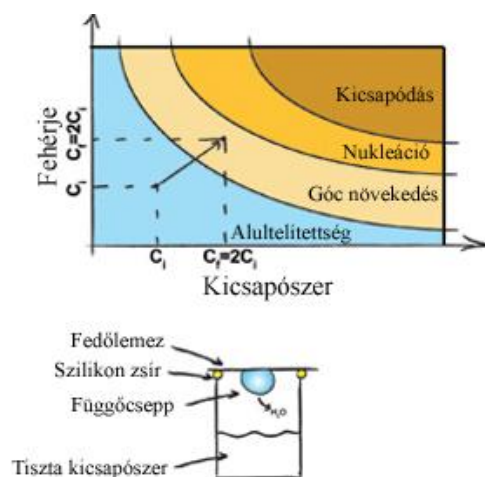
számoltam a ΔA -t. Mérések során 0.238, illetve 0.475 μM $\Phi 11$ dUTPáz-t mértem önmagában, majd ekvimoláris mennyiségű Stl SaPIbov1 hozzáadásával. A mérést Specord 200 spektrofotométeren (Analytik Jena) végeztem, 1 cm optikai úthosszal.

3.3 Krisztallográfia

3.3.1 Kristályosítás

Ahhoz, hogy a vizsgálni kívánt fehérjét röntgendiffrakciós mérésnek vessük alá, először egy stabil, rendezett állapotot kell létrehozni, azaz ki kell kristályosítani. A fehérjék kristályosításának első feltétele, hogy magas tisztaságú (>90%) oldattal dolgozzunk. Utána következik a megfelelő kicsapó körülmény megkeresése, amely első körben széles spektrumú screen-ekkel történik. Ha egyes körülményekből nőttek kristályok, melyekről megbizonyosodtunk, hogy nem hamis pozitív eredmények (nem a körülményt alkotó komponensekből képződött kristály), akkor azokat a körülményeket optimalizáljuk. Ez a művelet annyit tesz, hogy az oldat alkotóelem-koncentrációinak változtatásával egy újabb körülménysorozatot veszünk fel, mely során képződött kristályok már jobban alkalmasak szerkezet-meghatározásra.

A vizsgált fehérjék kristályosítására a függő-, illetve ülőcseppes módszert (15. ábra) használtuk. A magas tisztaságú fehérje oldatot ~ 6 mg/ml koncentrációra betöményítve használtuk, és a kristályosító oldattal 1:1 arányban kevertük össze, 2 μl végtérfogatban. A körülmények vizsgálatát 24 lyukú tálcákön végeztük, 18°C-on, JCSG-*plus* és Structure Screen (Molecular Dimensions) screen segítségével. Ezek mindegyike 96 különböző körülmény kipróbálását tette lehetővé. A $\Phi 11$ dUTPáz minták 2.3 mM dUPNPP-t és 5 mM MgCl_2 -t (a fém kofaktora az enzimnek) tartalmaztak a szerkezet stabilizálása végett.



15. ábra
A függőcsepp módszer

3.3.2 Adatkészlet felvétele

Fehérjék térszerkezetének meghatározásához a diffrakciót a réz anód CuK_α csúcsánál vesszük fel, mivel ez a hullámhossz esik a szén-szén kötéstávolságok tartományába. Adatfelvételnél a kristályokat fagyásálló védőközegben (például olaj), folyékony nitrogén hűtés közben mérjük a diffraktométerben. A fókuszált röntgensugár a Bragg törvény alapján diffraktálódik a kristályrácsokon, és a szórt sugarakat detektálva kapjuk a diffrakciós képet. A diffrakciós mintázatból a szoftver prediktálja a kristályt alkotó elemi cella paramétereit és eszerint mérési stratégiát javasol. Ennek függvényében történik a további adatkészlet felvétel, amely során a kristályt elforgatva (például 0.5° -ként, 90° -ot) jól meghatározott oszcillációs szögértékkel újra felvesszük a diffrakciós képeket. A kristályszimmetriától függően a felvett képeknek a hiteles adatfeldolgozás érdekében ki kell elégíteniük a komplettesség feltételét.

A körülményekből nőtt kristályok tesztelését házi sugárforrásokon végeztük (Rigaku, ELTE és SuperNova, Biostruct, BME). A $\Phi 11$ dUTPáz teljes adatkészlete a grenoble-i ESRF szinkrotron ID14-1-es mérőállomásnál lett lemerve.

3.3.3 Szerkezet megoldása diffrakciós mintázatból

A diffrakciós képből csak a pontok intenzitását és helyzetét tudjuk meghatározni, de a diffraktált sugarak fázisát nem. A szerkezet meghatározásához ezt ismernünk kell, és erre több módszer is létezik. Ha a fázisproblémát megoldottuk, akkor a felvett adatkészlet intenzitásait kielemezve, bonyolult algoritmusokat használó programok alkalmazásával egy elektronsűrűségi térképet kapunk. Ebbe a térképbe illesztjük bele a fehérjénk aminosav szekvenciáit, és iterációs műveletek során finomítjuk az oldalláncok hozzárendelését az elektronsűrűséghez, míg végül a felbontástól függően illeszthető teljes háromdimenziós térszerkezetet meg nem kapjuk.

A $\Phi 11$ dUTPáz esetében a fázisproblémát egy ismert szerkezetű, és 32%-ban homológ dUTPáz térszerkezet fázisával kíséreltük meg megoldani, és a kapott elektronsűrűségi térképbe próbáltuk meg beilleszteni a fehérjénk szekvenciáját. A teljes szerkezetmegoldás folyamatban van.

3.4 *In silico* eljárások

3.4.1 Homológia modellezés

Témavezetőim, Zagya Imre és Leveles Ibolya homológia modellezéseket végzett a $\Phi 11$ dUTPáz linker régiójának és az Stl SaPIbov1 helix-turn-helix rendeződésű részének szerkezetének megbecslésére.

A számításokat a SwissModell programmal végezték. A modellezés során ki kell választani egy ismert homológ fehérjét, melynek a térszerkezete már ismert. Minél nagyobb a szekvencia azonosság, annál pontosabb a modellezés (30%-nál magasabb azonosság szükséges). A program a művelet során az ismert és az ismeretlen térszerkezetű szekvenciákat egymásra illeszti, majd a vizsgált szekvencia megfelelő atomjait az ismert pozíciójú atomok helyére állítja. Ha a két szekvencia nem teljesen azonos, de ha a két peptidláncot alkotó atomok között mégis van egy egyértelmű megfeleltetés, akkor a program képes energiaminimum számításra alapuló modellezésre. Mivel az egyes eltérő aminosavak oldalláncainak a pozíciója nem meghatározható, ezért a program ezekre az atomokra több rotációs izomer állapotot definiál, figyelembe véve a flexibilitási kritériumokat, kötőszöveget és kötéstávolságokat. Az összes aminosav térszerkezetének összes lehetséges állapotára modellt épít, majd mindegyik lehetséges állapotra energiaszámításokat végez, és a legalacsonyabb értékű modellt fogadja el végül.

3.4.2 Filogenetikai vizsgálatok

Róna Gergő *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis* és *E. coli* dUTPáz szekvenciákkal tBLASTn (NCBI) kereséseket végzett az NCBI *Staphylococcus* nemzetség gén-adatbázisában, majd kiválasztva az eredmények közül egy *S. aureus* törzsbe integrálódott fág dUTPáz szekvenciáját, újabb tBLASTn kereséseket végzett a *Bacillales* rendben. A kapott eredményekkel szekvencia-illesztéseket végzett.

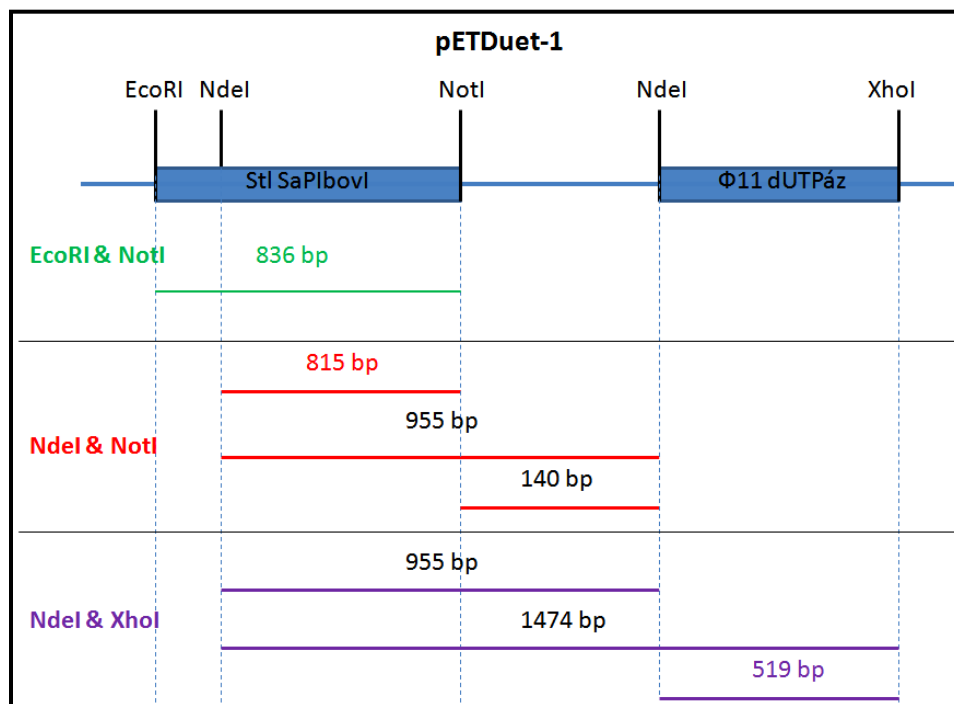
Irodalom alapján [33] kikerestem a PubMed adatbázisból 61 *S. aureus* fág dUTPáz kódoló szekvenciáit. ClustalW2 (EMBL-EBI) programmal, módosított beállítások mellett, összeillesztettem a szekvenciákat, és szekvencia homológia alapján szétbontottam csoportokra. Az azonosított trimer szerveződésű *S. aureus* helper fág dUTPáz csoportot a linker régiók alapján egy filogenetikai fába rendeztem TreeDyn (GEMI Bioinformatics) program segítségével.

4 Kísérleti eredmények és értékelésük

4.1 Fehérje termelés és tisztítás

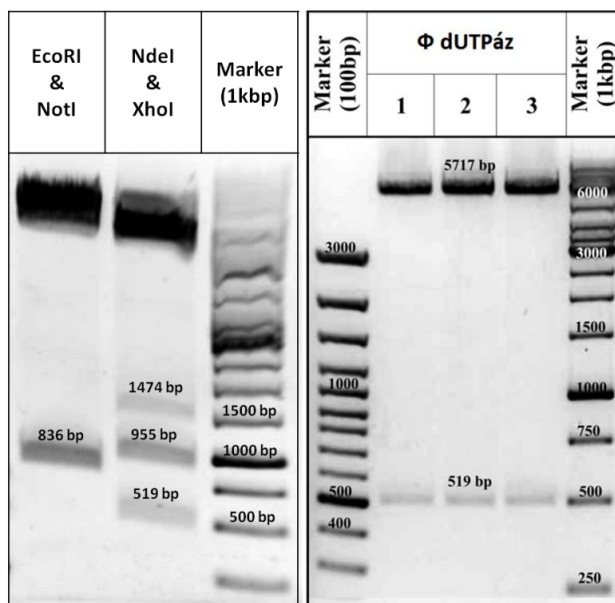
4.1.1 A konstruktok létrehozása

Az MWG-től rendelt pETDuet-1 rendszert restrikciós emésztéssel ellenőriztük, hogy megfelelő-e, és a restrikciós termékek méretéből (16. ábra) megállapítottuk, hogy a konstruktunk megfelelő (17. ábra). A pETDuet-1 vektorból a $\Phi 11$ dUTPáz gént sikeresen kiemésztettük, tisztítottuk és beligáltuk a pET-15b vektor NdeI és XhoI restrikciós helyei közé, és a sikerességéről a transzformált sejtekben termelt plazmidot emésztettük NdeI és XhoI enzimekkel. A kapott 519 bázispár hosszú fragmens a sikeresen beligált, intakt génünket jelzi (17. ábra).



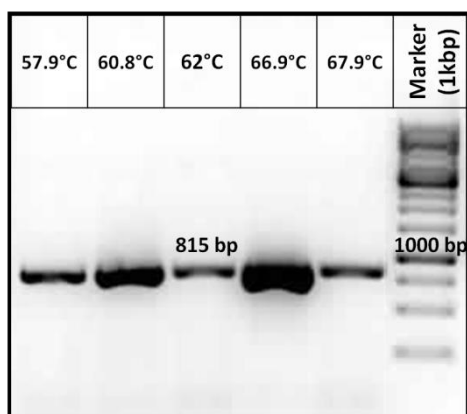
16. ábra

A pETDuet-1 rendszer várt emésztési fragmensei

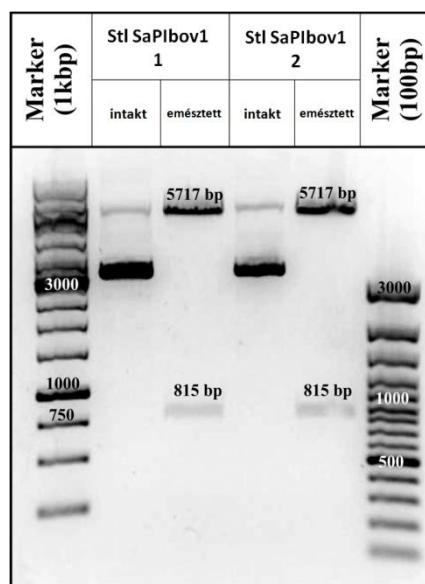


17. ábra
pETDuet-1 (bal) és a Φ11 dUTPáz-pET-15b (jobb) ellenőrzése
A kapott csíkok megfelelnek a 16. ábrán várt méreteknek

A *Stl SaPIbov1* gradiens PCR-es felszaporítása során mindegyik anellációs hőmérsékleten működött a reakció, legnagyobb mennyiségű terméket 67°C-on kaptam (18. ábra), ezért a PCR-es felszaporítást ezzel a hőmérséklettel végeztem. A gént a pET-15b *NdeI* és *XhoI* restrikciós helyei közé ligáltuk be, majd a klónozás sikerességéről is ezekkel az enzimekkel való emésztéssel győződünk meg (18. ábra).

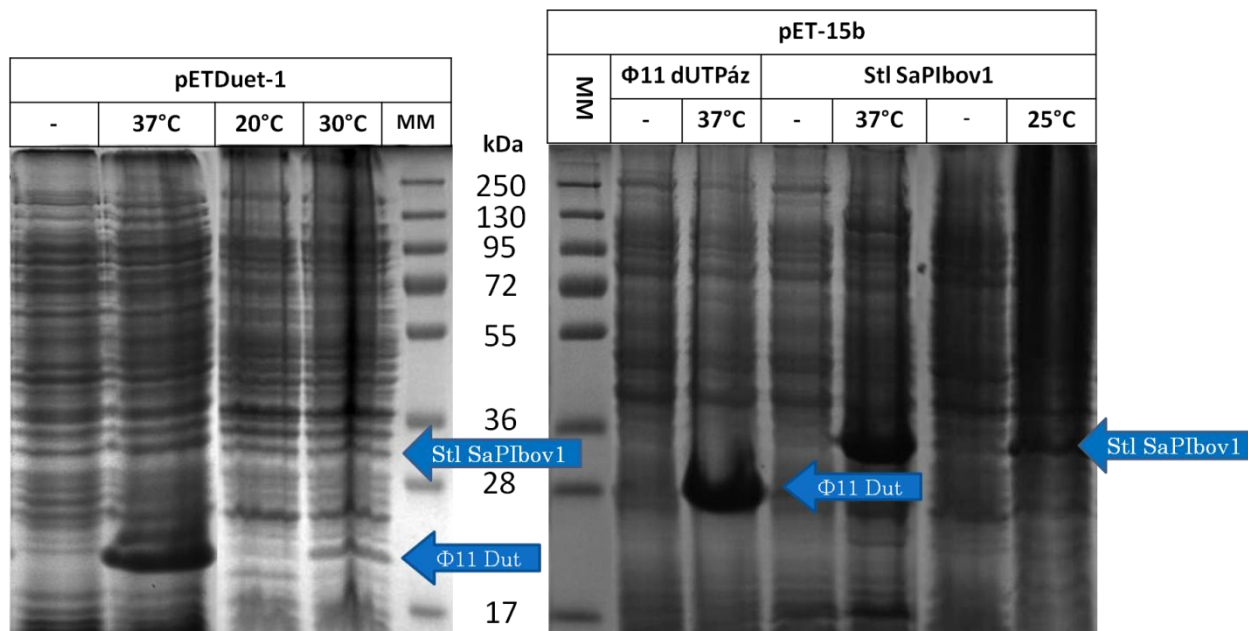


18. ábra
Gradiens PCR (fönt)
***Stl SaPIbov1* klónozás eredménye (jobbra)**
A 815 bp hosszú fragmens az intakt *stl* gént jelöli



4.1.2 Fehérje termelés

A fehérjetermelés során több körülményt is kipróbáltam (19. ábra), de mindegyik rendszernél a 4 órán át tartó 37°C-os expresszió volt a leghatékonyabb. A termelt fehérjék az SDS-PAGE elválasztásnál a molekulatömegüknek megfelelő pozícióban voltak detektálhatóak ($\Phi 11$ dUTPáz: 18.35 kDa, Stl SaPIbov1: 34.01 kDa). A 37°C-on pET-15b-ben expresszált $\Phi 11$ dUTPáz a várhatónál magasabban sávban volt látható, de ez nem jelentett szerkezeti és funkcionális eltérést, amit a további vizsgálatok is megerősítettek. A pETDuet-1 rendszer Stl SaPIbov1 expressziója alacsony, ezért a munkám során a pET-15b rendszerben termeltem inkább. A $\Phi 11$ dUTPáz tisztítása a pET-15b rendszerben nehézségekbe ütközött, ezért a már optimalizált pETDuet-1 rendszerből tisztítva nyertem ki a későbbi vizsgálataimhoz.

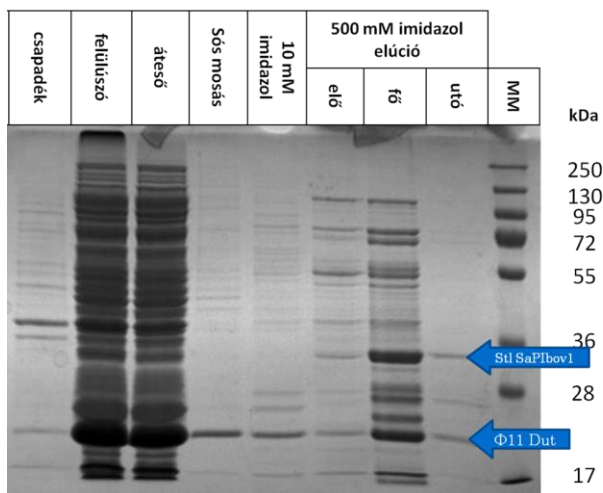


19. ábra
Expresszió eredménye több hőmérsékleten
a (-) az indukció előtti állapotot jelöli

4.1.3 Fehérje tisztítás és a hipotézis bizonyítása

Az irodalomban felállított hipotézis [13] bizonyítására a pETDuet-1 rendszerben termelt két fehérjét együtt tisztítottam benchtop HisTrap affinitás kromatográfiával. Az általam használt $\Phi 11$ dUTPáz konstrukt nem tartalmazott HisTag-et, ezért csak aspecifikusan tudott kikötődni a gyantához. Ezzel összhangban a dUTPáz nagy mennyiségben jelent meg az áteső frakcióban. Az

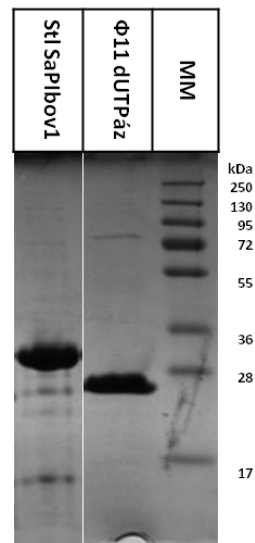
aspecifikusan kikötött fehérjéket sós-, illetve alacsony koncentrációjú imidazolos mosással távolítottam el. Elúció során a HisTag-el kikötött Stl SaPIbov1-et leluáltam, és amint a gélen látszik (20. ábra), együtt eluálódott vele a hozzá komplexálódott $\Phi 11$ dUTPáz is, hozzávetőlegesen hasonló mennyiségben, ami egyértelműen bizonyítja a specifikus kapcsolat jelenlétét. A gélen látható további csíkok *E. coli* endogén fehérjéket jelölnek, melyek a jelen esetben nem szignifikánsak.



20. ábra

A fehérje kölcsönhatás bizonyítására használt kromatográfiás eljárás frakciói

A pETDuet-1 rendszer ÄKTA pumparendszer alapú automatizált nikkelgyantás tisztítását nem sikerült optimalizálni, az alkalmazott imidazol gradiens során lejövő frakciók túlságosan szennyezettek és elkenődöttek voltak. Ez esetlegesen betudható annak, hogy a rendszerben uralkodó sokkal magasabb nyomás hatására, és az előre töltött oszlopnak, a benchtop módszernél alkalmazottól való eltéréséből kifolyólag egyes fehérjék erősebben tudtak kikötödni. A pET-15b rendszerek benchtop nikkelgyantás kromatográfiája magas fokú tisztaságot eredményezett (21. ábra). Sajnos az ilyen módszerrel kapott tiszta fehérjék nagyon hajlamosak voltak a kicsapódásra; dialízis, vagy töményítés során a fehérjék 90%-a kicsapódott. Ennek egyik oka feltehetőleg a magas imidazol koncentráció, vagy az esetlegesen használt szobahőmérsékletű pufferek által okozott hősök. A frissen kicsapódott fehérjékhez 4 M NaCl oldatot adva a

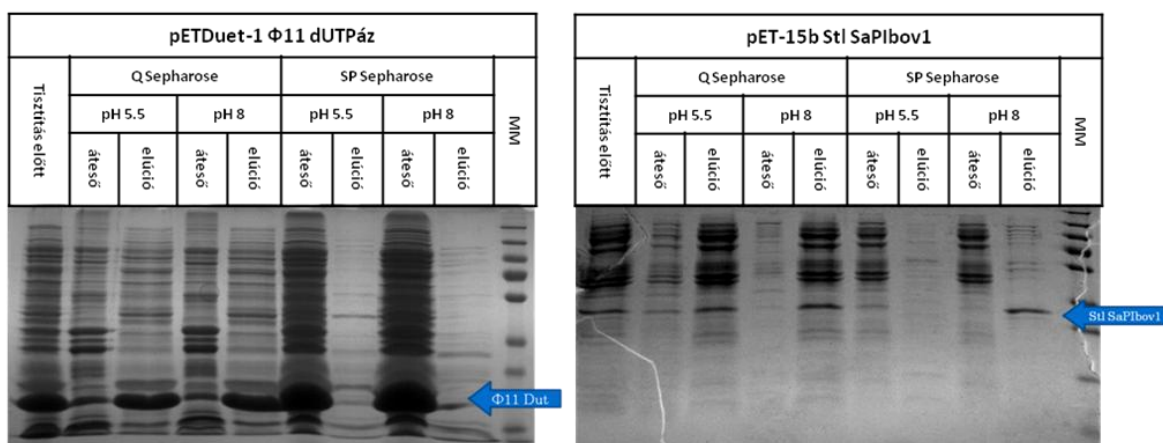


21. ábra

Benchtop HisTrap tisztítás elúciói

fehérjék rezolubilizálódtak, ezáltal a további kísérletek során, a kicsapódás lehetőlegesen elkerülése végett, megnöveltem a pufferek só koncentrációját. Mivel ha a fehérjék egyszer kicsapódtak, akkor még újra oldat fázisba vitelük esetén sem a natív szerkezetükbe tekerednek vissza, ezáltal a vizsgálatok során hamis információt szolgáltatnak. Az imidazol okozta kicsapódás elkerülése miatt egy újabb tisztítási módszert választottam, az ioncserés kromatográfiát.

Az új tisztítási módszer előzetes benchtop kísérletét Zagyva Imre végezte el, 1.5 ml-es Eppendorf csövekben, 1 ml végtérfogatban. $\Phi 11$ dUTPáz-t a pETDuet-1, az Stl SaPIbov1-et a pET-15b rendszerből tisztítottuk. (22. ábra, a fehérjék aminosav összetétel alapján becsült izoelektromos pontja $pI_{\Phi 11 \text{ dUTPáz}} = 4.88$, $pI_{\text{Stl SaPIbov1}} = 6.74$). Ezen előzetes eredmények alapján a $\Phi 11$ dUTPáz-t anioncserő kromatográfiával jól lehet tisztítani, míg az Stl SaPIbov1 esetén az eredmények valószínűleg arra utalnak, hogy egyes körülmények között ez a fehérje (az irodalomban leírt élettani funkciójának megfelelően) DNS-t köt, így az adott pH értékek mellett a töltése a DNS-el való komplexálódás révén változhat.



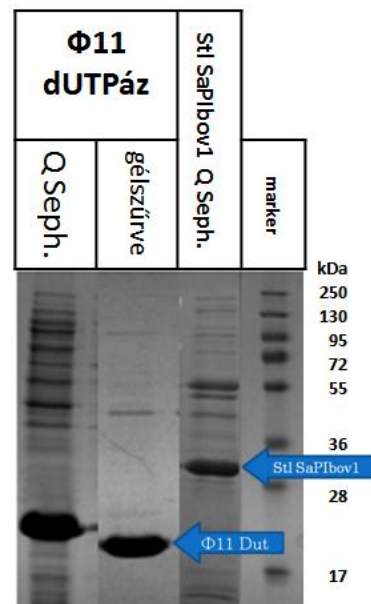
22. ábra
Előzetes benchtop ioncserés kromatográfia frakciói

Az ÄKTA rendszeren automatizált ioncserés kromatográfia jó hatásfokkal tisztította ki a fehérjét, miközben azok, feltehetőleg az imidazol távolléte miatt, nem csapódtak ki. A $\Phi 11$ dUTPáznál az optimális eredményt Q Sepharose anioncserélő gyantával, pH 7.5-nél értük el. Stl SaPIbov1 tisztítását ugyanezen a gyantán, pH 8.5-nél történő elúció során értük el (23. ábra). Ennél a fehérjénél kipróbáltunk egy olyan tisztítási módszert, ahol tandem egymás után mind a

Q, mind az SP Sepharose gélen eluáljuk. Ennél az eljárásnál pH 8.0 pufferekkel dolgoztunk, ami miatt a tisztítás nem adott kielégítő tisztaságú fehérjét (23. ábra), ezért a további munkám során optimalizálnom kell ezt a módszert, főleg a pH-t kell beállítanom, mivel az okozhatta a kisebb hatékonyságot.

A kapott fehérje oldatok tisztaságának további növelésére géliszűrést végeztünk. A $\Phi 11$ dUTPáznál sikerült >90%-os tisztaságot elérnünk (23. ábra), míg Stl SaPIbov1-nél a fehérje alacsony tisztasággal, több frakcióban elosztva eluálódott le az oszlopról. A géliszűrő oszlopot ismert tömegű fehérjékkel kalibrálva, a géliszűrés során a $\Phi 11$ dUTPáz 51.8 kDa natív molekulatömegnél detektáltuk, mely megfelel a dUTPázok jellegzetes trimer szerveződésének.

További vizsgálataimhoz a Q Sepharose gélen tisztított és géliszűrt $\Phi 11$ dUTPázt és a csak a Q Sepharose gélen eluált Stl SaPIbov1-et használtam.



23. ábra
Fehérjék ioncserés
és azt követő géliszűrési
tisztítása

4.2 Hőstabilitás és annak változása

Az általam vizsgált fehérjék és az általuk alkotott komplex hőstabilitását termofluorimetriás kísérletekkel határoztam meg. Elsődleges célom volt megállapítani az egyes alkotók olvadáspontjának változását, amelyből azoknak a stabilitás változására lehet következtetni. A $\Phi 11$ dUTPázt mértem magában, majd a lassan hidrolizáló szubsztrát analógjának, dUPNPP-nek jelenlétében is. Ugyanezt megmértem úgy, hogy egy állandó koncentrációban tartott Stl SaPIbov1-hez $\Phi 11$ dUTPázt adtam többféle koncentrációban és figyeltem a stabilitás változását a koncentráció függvényében. Ezt a kísérletet elvégeztem dUPNPP jelenlétében is. Minden egyes kísérletemnél 3 párhuzamos mérést végeztem, és mindegyik párhuzamos méréshez készítettem vakmintát is, háttérmérésnek (24 μ l puffer, 1 μ l festék, vagy 23.5 μ l puffer, 0.5 μ l dUPNPP, 1 μ l festék, kísérlettől függően).

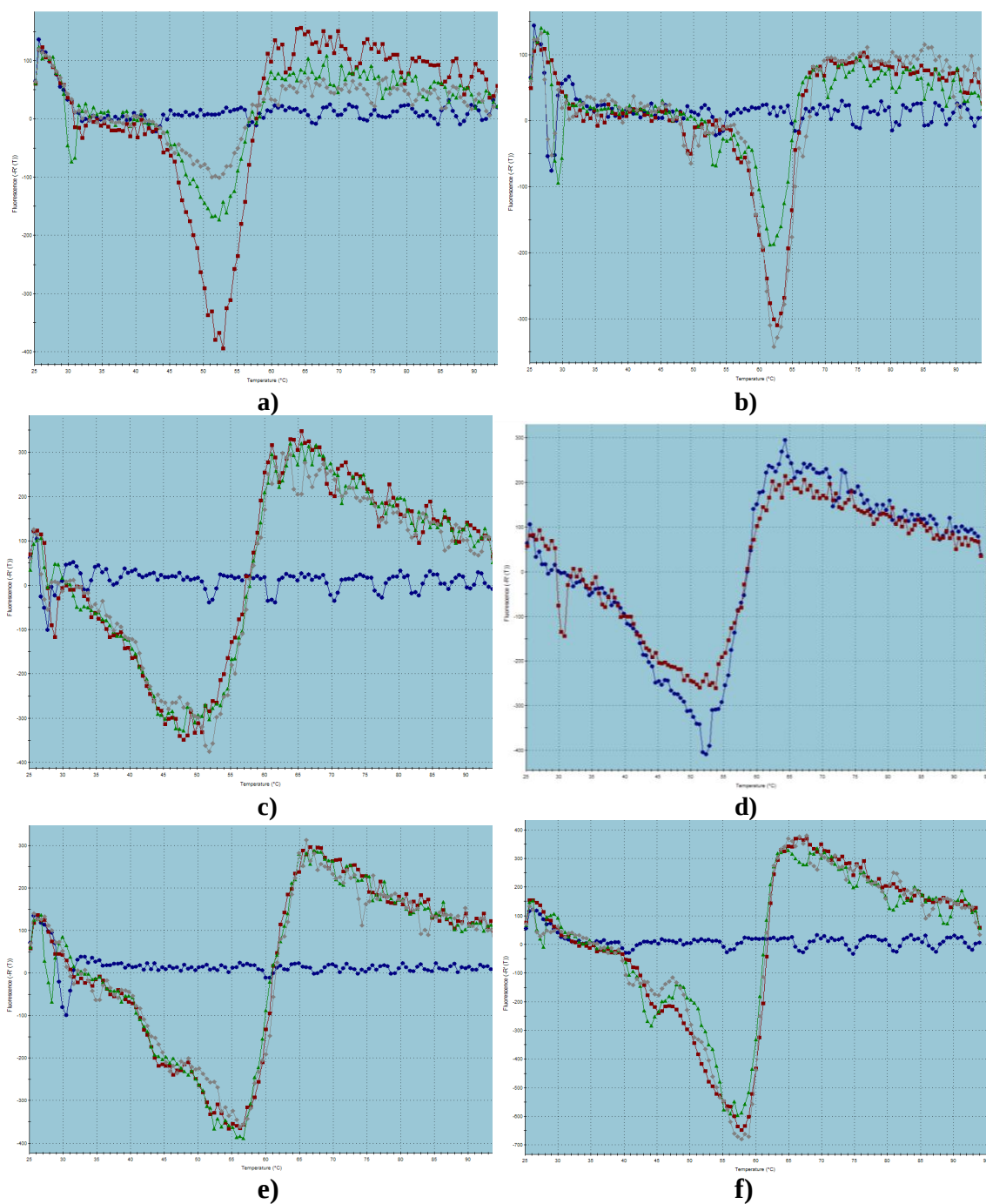
Több koncentrációt lemérve megállapítottam, hogy 0.25 mg/ml-es (13.62 μ M) $\Phi 11$ dUTPáz koncentráció az egyik legalacsonyabb, de még jól mérhető koncentráció, így ezzel a

koncentrációval dolgoztam tovább. A $\Phi 11$ dUTPáz olvadáspontja 52°C volt, mely dUPNPP mellett 62.5°C -ra növekedett (24. ábra). Ez a jelentős T_M növekedés arra utal, hogy az enzim a szubsztrátanalóg ligandot kötve egy stabilabb konformációs állapotot vesz fel, melynek kitekeredéséhez egy magasabb hőmérséklet szükséges. Ezzel szemben az Stl SaPIbov1 nem rendelkezett egy egyértelműen meghatározható disztinkt olvadási ponttal, sokkal inkább egy 45 - 52°C -ig terjedő hőmérséklet intervallumon belül történt meg a hőátmenet. A mért T_M sáv nem változott dUPNPP hatására, ami azt indikálja, hogy az Stl SaPIbov1 szerkezete nem változik meg a kölcsönható partnere szubsztrátanalóg ligandumának jelenlétében (24. ábra).

Ha a két fehérjét ekvimoláris mennyiségben komplexálva mértem, akkor az eredmény egy két T_M -el is rendelkező görbe lett. Az olvadási pontok dUPNPP távolléte mellett 45 és 58°C , míg dUPNPP-vel 46 és 55°C (24. ábra). Ez a jelenség sok kérdést vet fel, melyekre további méréseim során megpróbáltam válaszolni. A megjelenő több olvadási pont a komplex tulajdonsága, vagy megfeleltethető az egyes alkotóelemek önálló kitekeredési pontjának? Szignifikánsnak tekinthető-e a komplex elegyben mért magasabb olvadási hőmérséklet 58°C -ról 55°C -ra való csökkenése? A fehérje-fehérje kölcsönhatás megakadályozza a dUTPáz szubsztrátkötését, vagy esetlegesen a stabilabb állapotba való feltekeredését? Ezen kérdések megválaszolására titrálási kísérletsorozatot terveztem.

$\Phi 11$ dUTPáz koncentráció gradienst (5 , 10 , 13.62 , 20 , 40 , 60 , $76\ \mu\text{M}$) mértem dUPNPP jelenlétében, és nélküle. Ugyanezt a kísérletet elvégeztem úgy, hogy $13.62\ \mu\text{M}$ Stl SaPIbov1-et adtam hozzá a rendszerhez (25. ábra). A görbék vizsgálata során a két olvadáspont mellett egy vállat is észrevettem, a második negatív csúcs baloldalán, 52°C -nál. Mivel az olvadáspontok hőmérsékletei megfeleltethetőek a komplexet alkotó fehérjéknek ezért a következő hipotézist állítottam fel: az első csúcs az Stl SaPIbov1 részleges kitekeredését jelzi, a váll a rendszerben feleslegben lévő $\Phi 11$ dUTPáz megolvadását indikálja. Ha dUPNPP is van a rendszerben, akkor a váll, a dUTPáz stabilitásának megnövekedése miatt, feltehetőleg belesimul a második csúcsba. Az 56 - 58°C -nál lévő minimum a komplex jele, melyet a részlegesen kitekeredett, de még kölcsönhatásra képes, Stl SaPIbov1 és a $\Phi 11$ dUTPáz ad, mely a komplexálás hatására stabilabb szerkezetet vesz fel, ezért nem tekeredik ki alacsonyabb hőmérsékleten, mint a többi, feleslegben lévő $\Phi 11$ dUTPáz. A kapott olvadásgörbét felépítő hipotetikus görbéket a 25. ábra mutatja. A koncentráció, és a burkoló görbe megfeleltethető csúcsterülete között lineáris az összefüggés (26.

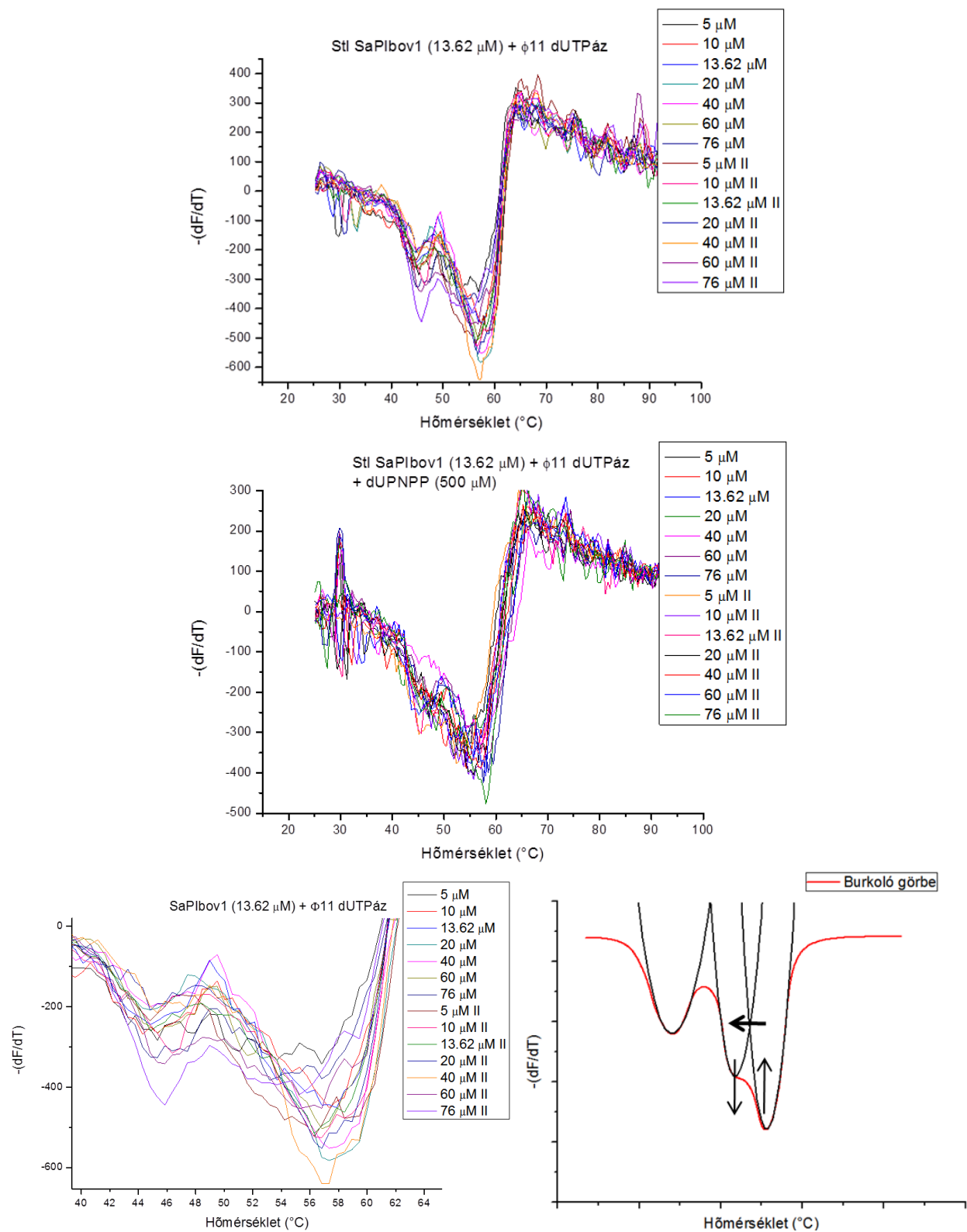
ábra), ezáltal egy dekonvolúciós eljárást alkalmazó fél-kvantitatív kiértékelési módszer fejlesztése most is folyamatban van.



24. ábra

Előzetes termofluor kísérletek

- a) és b) $\Phi 11$ dUTPáz $\pm$ dUPNPP (szürke, zöld és piros vonal a mérés, a kék vonal a puffer)
c) StI SaPIbov1, d) StI SaPIbov1 (piros vonal) + dUPNPP (kék vonal)
e) és f) Ekvimoláris komplex $\pm$ dUPNPP (szürke, zöld és piros vonal a mérés, a kék vonal a puffer)



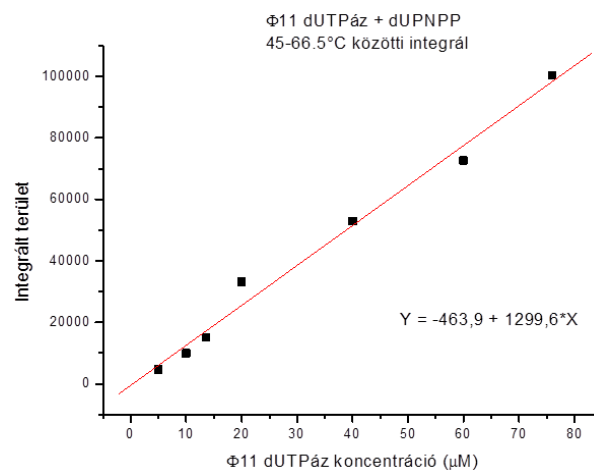
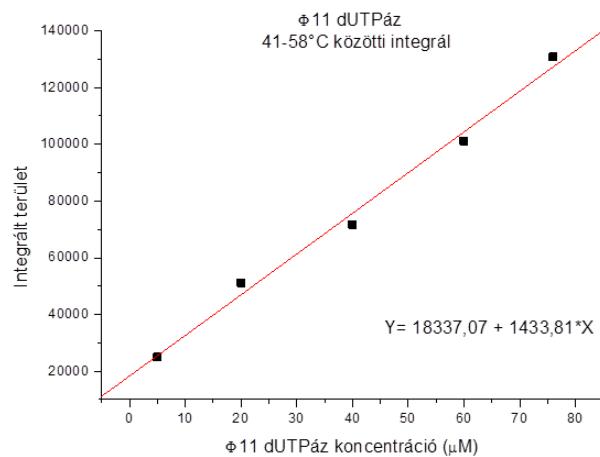
25. ábra
A komplex olvadási görbéje dUPNPP nélkül és dUPNPP-vel
és az olvadáspontokat okozó feltételezett elemek

Kiértékelés során a megjelenő olvadáspontok $\Phi 11$ dUTPáz koncentrációfüggésére hegyeztem ki a hangsúlyt. Az egyes koncentrációkhoz tartozó görbéket átlagoltam, majd Savitzky-Golay algoritmussal kisimítottam az esetleges kiugró adatpontokat.

Az olvadáspontokat ábrázolva a koncentráció függvényében észrevehető, hogy az első csúcs nem változik jelentősen, míg a második kb. 40 μM -ig nő, utána a dUPNPP nélküli rendszerrel újra elkezd esni (27. ábra). Ez magyarázható azzal, hogy a rendszerhez adott dUPNPP felesleg magasabb hőmérsékleten is tudja esetlegesen stabilizálni a dUTPáz, ezáltal a komplexet.

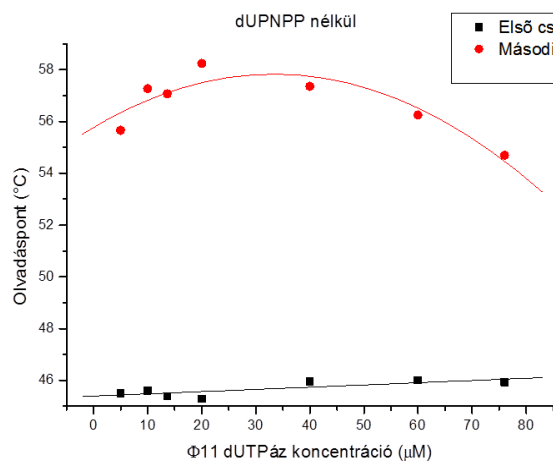
Érdekes jelenség, hogy a csúcsok minimum értéke is (és ez által a területük) változik a koncentráció szerint (27. ábra). Az Stl SaPIbov1 csúcsa mindkét kísérletnél ugyanolyan karakterisztikát mutat. Ennek az oka feltehetőleg az, hogy 30-40 μM $\Phi 11$ dUTPáz koncentrációnál van annyi enzim jelen a rendszerben, hogy az összes Stl fehérje komplexált állapotban legyen. Az alatt a szabad Stl SaPIbov1 okozza az csúcsnövekedést, felette meg a feleslegben lévő $\Phi 11$ dUTPáz zavarhatja meg a komplex stabilitását. Ezt a hipotézist támogatja a dUPNPP-mentes rendszer is, ahol a legnagyobb csúcsértéket, tehát a legtöbb komplexet, 30-40 μM koncentrációnál érjük el. E koncentráció fölött azért csökken az érték, mert a feleslegben lévő dUTPáz jele által okozott váll egyre nagyobb lesz, „elfedi” a komplex által okozott jelet. Ha a szabad $\Phi 11$ dUTPázokat dUPNPP-vel stabilizáljuk, akkor ez a váll nem jelenik meg, nem lép fel ilyen jelentős intenzitásváltozás.

A fehérje komplex olvadási görbéje különleges eset, melynek pontos kiértékelése nehézségekbe ütközik. Ezért egy szemi-kvantitatív értékelési módszer kidolgozása jelentős mértékben megnövelné az hasonló esetek kiértékelését is. Az eddigi adatok alapján a rendszer megolvadása nem egy lépésben történik, hanem az alkotók először részlegesen kitekerednek, mielőtt szétesne az egész rendszer. Ez egy gyengébb általános komplex-stabilitást indikál, de a kölcsönható felszínen létrejövő kapcsolat elég stabil ahhoz, hogy az egész komplex csak később denaturálódjon teljesen.

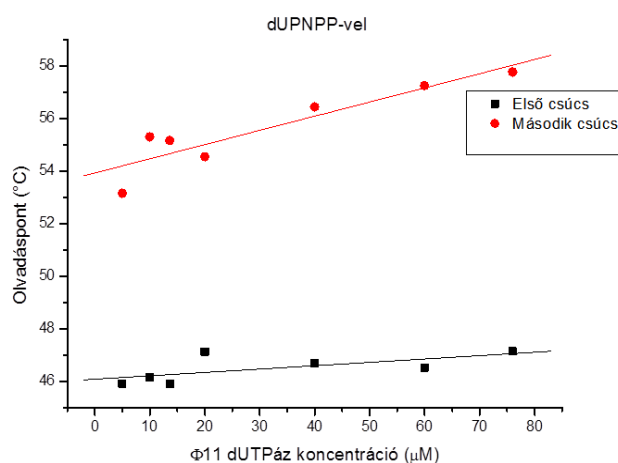


26. ábra

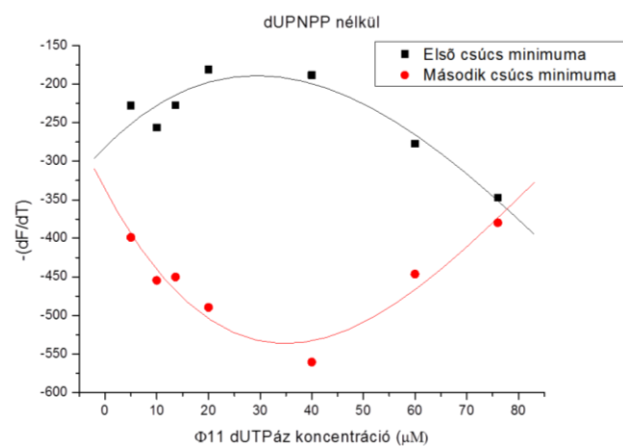
A koncentráció és terület közti lineáris összefüggés



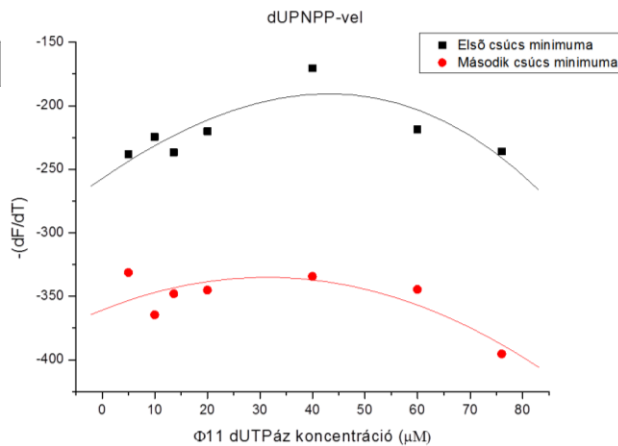
a)



b)



c)



d)

27. ábra

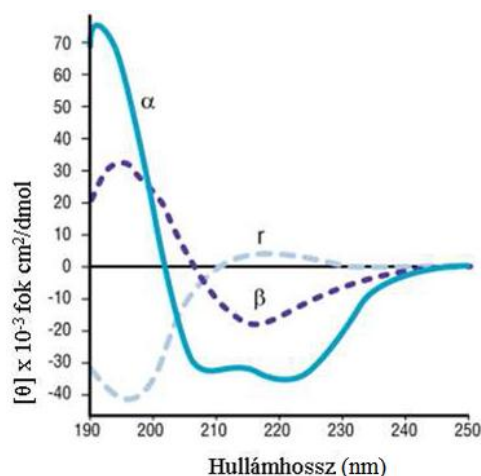
a) és b) a csúcsok olvadáspontjának változása a koncentráció függvényében
c) és d) a csúcsok minimum értékeinek változása a koncentráció függvényében

4.3 Másodlagos szerkezeti elemek vizsgálata

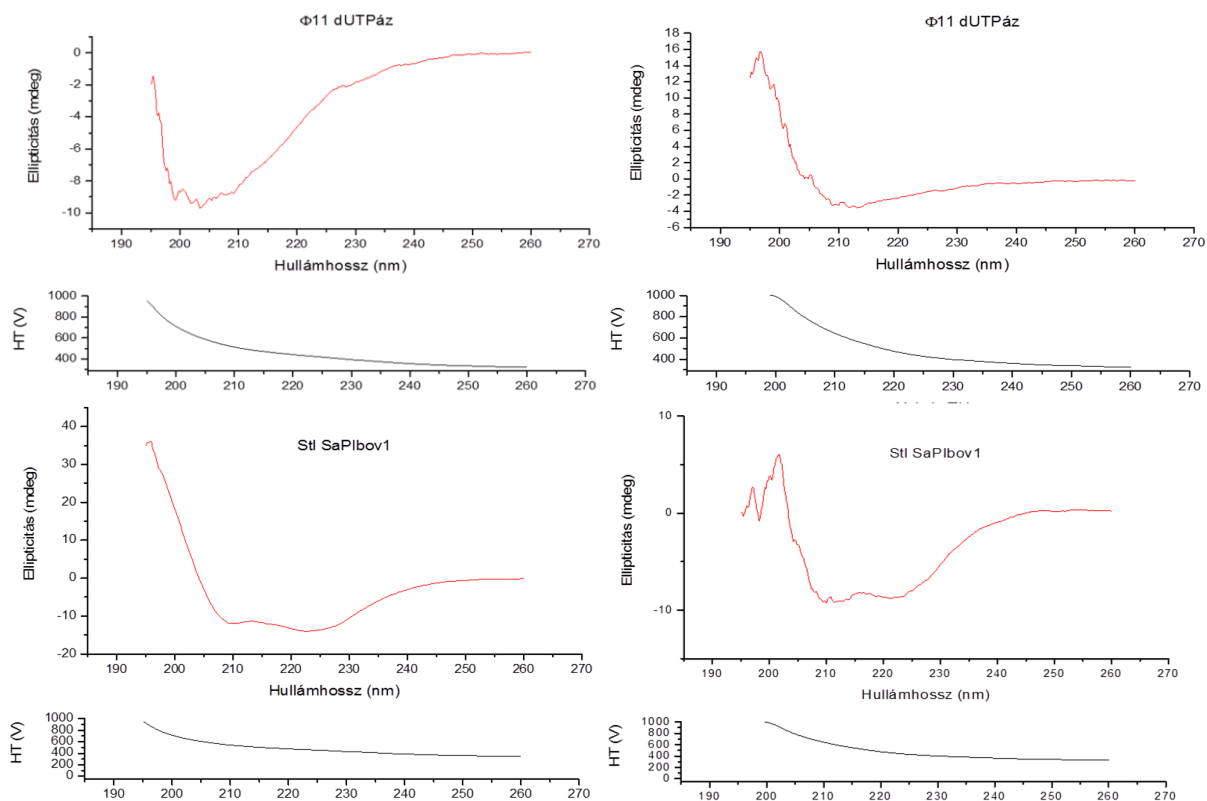
Mindkét általam vizsgált fehérjével CD spektroszkópiás méréseket végeztem. A végleges spektrumokat 6 konszekutív mérésből átlagolva kaptam meg. Első mérés során 5.88 μM koncentrációjú fehérjéket mértem 40.8 mM KCl sótartalom mellett. Már a fehérje tisztítások során is kiderült, hogy a fehérjék csak magas só koncentráció (>500 mM) mellett maradnak oldott állapotban, ezért egy részük a pirofoszfátos hígítás során kicsapódott. Ha a só koncentrációt 370 mM KCl-re növeltem, fele akkora fehérje koncentráció mellett, akkor a kicsapódás mértéke visszaszorult, de nem szűnt meg. Magas só és TRIS koncentráció viszont magas háttérzajt

adott mérés során, a HT hamar elérte a 600 voltos határt, ezért a mérés bizonytalan spektrumot adott, mely nehezen kiértékelhető. Az 5.88 μM fehérjekoncentrációval végzett kísérletek kiértékelését az ingyenes K2D2 programmal végeztem, miután a puffer háttérjelét kivontam a mérési eredményekből. A komplexált fehérjék a magas fokú kicsapódás miatt értelmezhetetlen jelet adtak.

Az Stl SaPIbov1 szerkezetét α -helikális (80%) struktúrák építik fel, míg a $\Phi 11$ dUTPázban a β -redők dominálnak. A kicsapódás miatt a kísérletet újra el kell végeznem olyan körülmények között, amely mellett a fehérjék oldatban maradnak és a puffer összetétele sem zavarja a mérést, de ez az előzetes mérés is sok információt szolgáltat, melyeket a többi mérés felhasználhat.



28. ábra
A másodlagos szerkezetek jellegzetes spektrumai
(α : α -helikális, β : β -redős, r: rendezetlen)



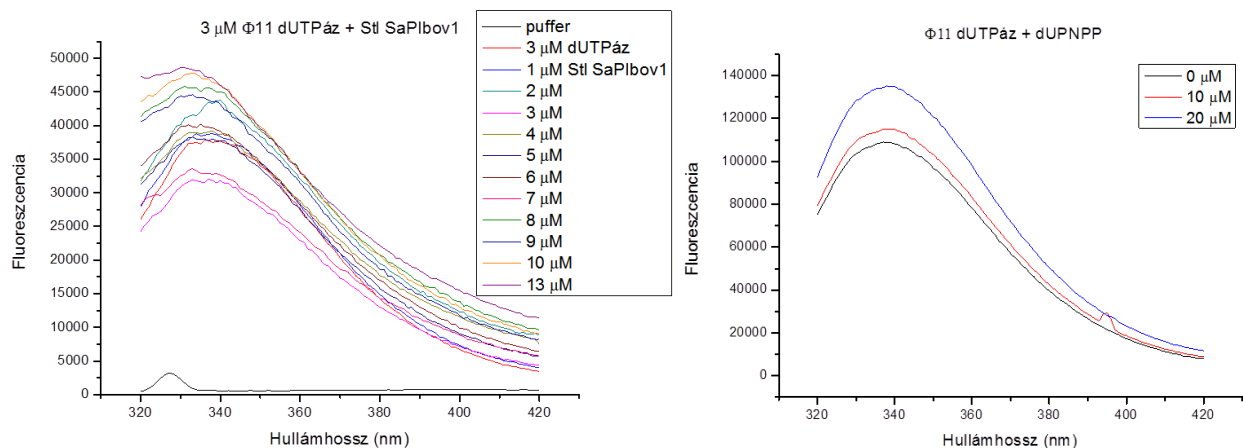
29. ábra
CD spektrumok 5.88 μM (baloldalt) és 2.94 μM fehérjével (jobbaldalt)
A mérésekhez tartozó HT értékeket a spektrumok alatti görbék jelentik

4.4 Aktivitásmérés

Annak megállapítására, hogy a $\Phi 11$ dUTPáz megtartja-e az eredeti enzimatisz aktivitását Stl SaPIbov1-el, aktivitásméréseket végeztem. Irodalom alapján [13] az aktivitás változatlan marad Stl fehérjével való komplexálás esetén is. Előzetes méréseket végeztem, hogy a kapott enzimaktivitásból meg tudjam tervezni a következő mérések során alkalmazandó dUTPáz koncentrációt.

4.5 Fluorimetria

A kölcsönható felszín vizsgálatára a fehérjékkel fluorimetriás titrálást végeztem. Az állandó 3 μM koncentrációjú dUTPázhoz változó koncentrációjú (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13 μM) Stl SaPIbov1-et adtam (30. ábra). Az Stl fehérje nem tartalmaz triptofánt, ezért az önálló jele elhanyagolható. A kapott spektrumokat 3-3 párhuzamos mérésből átlagolom, és a puffer jelével korrigálom az alapvonalat. A titrálás során a spektrum maximuma 340 nm környékén volt, és a koncentráció növelésének hatására sem változott. Ha elmozdult volna a maximumhely, akkor az a fluorofór mikrokörnyezetének megváltozását jelezte volna, vagyis az esetleges kölcsönható felületet az Stl SaPIbov1-el. Mivel nem történt shift ezért a kölcsönható felület feltételezhetően nem a triptofán környékén található (31. ábra). A mérést elvégeztem úgy, hogy 3 μM dUTPázhoz különböző koncentrációban dUPNPP-t adtam (30. ábra). A maximumhely ebben a kísérletben sem mozdult el a 340 nm környékéről, ami azt bizonyítja, hogy a triptofánt tartalmazó szegmens nem vesz részt az aktív centrum kialakításában sem.



30. ábra
A dUTPáz fluoreszcens titrálása Stl SaPIbov1-el és dUPNPP-vel



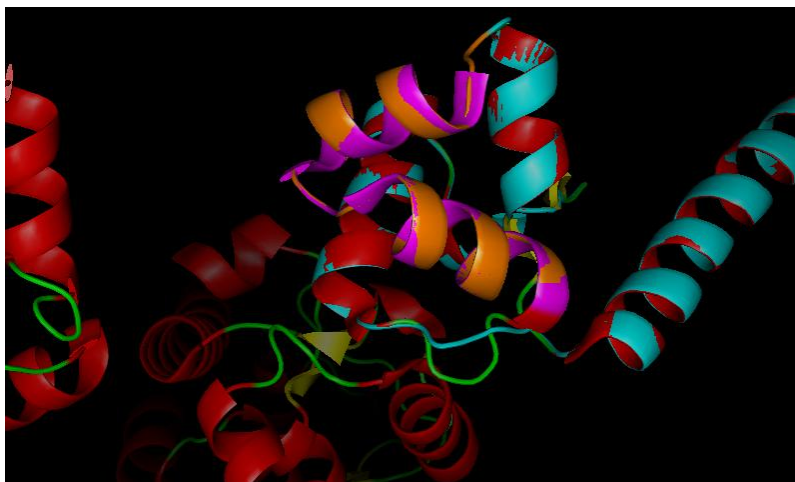
31. ábra

A Φ 11 dUTPáz homológiamodellezéssel kapott monomer szerkezetét a sárga szín
 A modellként használt dUTPáz trimert a zöld szín
 A triptofánt a sötétkék szín
 Az aktív centrumban résztvevő ligandumokat a világoskék szín
 A fág dUTPáz fajspecifikus régióját a piros szín jelöli

4.6 Homológia modellezés

Leveles Ibolya a SwissModell programmal a Φ 11 dUTPáz monomerjének szekvenciáját ráillesztette a *M. tuberculosis* dUTPáz H145W mutánsának már ismert trimer szerkezetére (PDB kód: 3HZA). A szekvenciák hasonlóságán alapulva a program elvégezte az iterációs közelítéseket, és meghatározta az energiaminimumhoz tartozó szerkezetet (31. ábra).

Az Stl SaPIbov1 helix-turn-helix régiójának szerkezet-meghatározásához Zagyva Imre fehérje specifikus loop régiójából egy virtuális kimérát készített, azaz áthelyezte a szekvencia részletet egy már ismert szerkezetű XRE családba tartozó fehérje megfelelő helix-turn-helix régiójának helyére. Ezután lefuttatva SwissModell-el a szerkezet közelítéseket, megkapta a prediktált szerkezetet (32. ábra).



32. ábra

A loop régiót tartalmazó virtuális kiméra
A helix-turn-helix szegmenst a lila-narancssárga színek jelzik

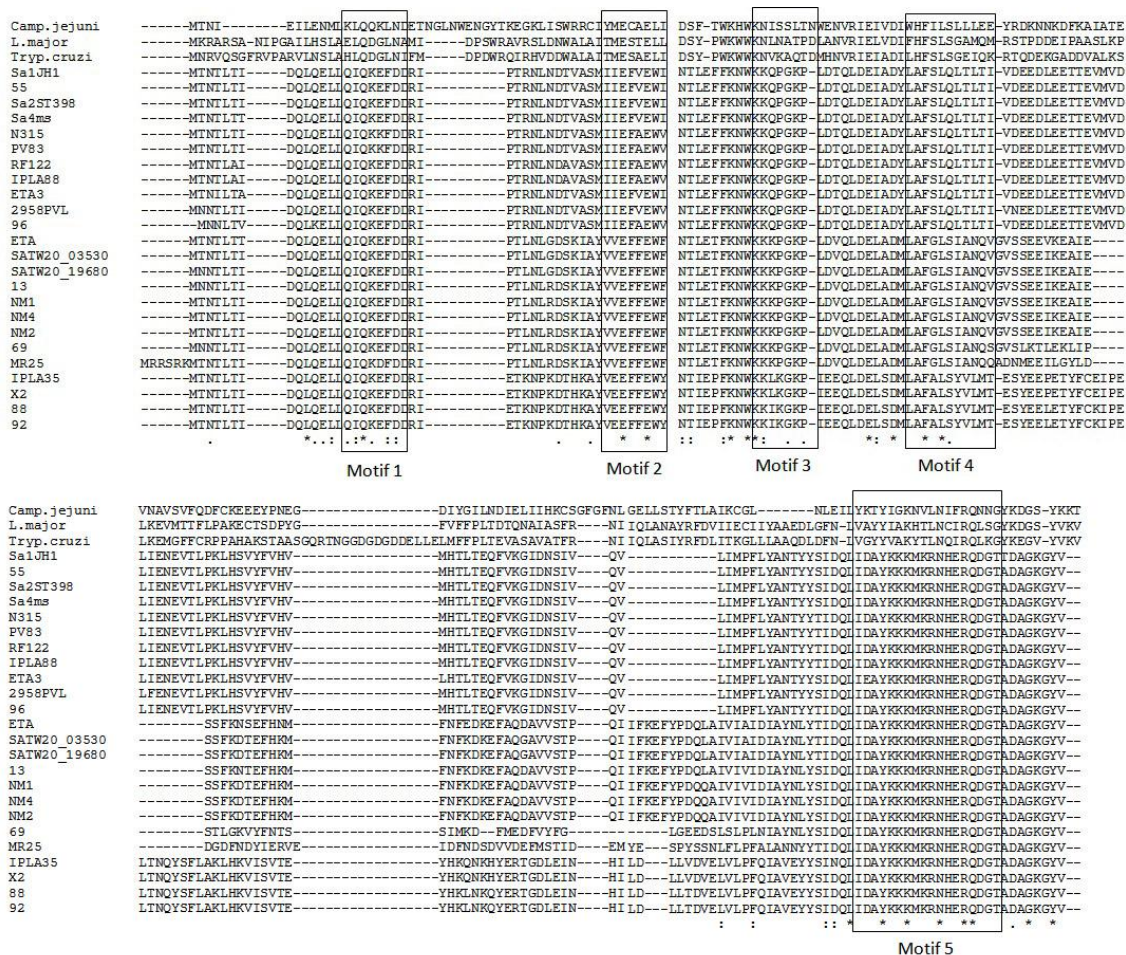
4.7 Filogenetikai vizsgálatok

Róna Gergő tBLASTn keresései során mind az *E. coli*, mind a mikobakteriális dUTPáz aminosav szekvenciáival keresve a *Staphylococcaceae* génjei között, egy *S. carnosus* dUTPáz kivételével mindegyik találat *S. aureus* dUTPáz volt. Ez azt jelenti, hogy a *S. aureus* dUTPázok egymás között erősen konzerváltak, és nagy hasonlóságot mutatnak az *E. coli*, illetve a mikobakteriális dUTPázokkal, ami esetlegesen egy egyedfejlődés során lejátszódott laterális dUTPáz géncserére utalhat.

Az általam végzett szekvencia illesztések során a 61 *S. aureus* fág dUTPáz szekvenciát a homológia és az irodalom alapján [15, 21, 22] két nagy dUTPáz családra osztottam. Mivel a fágok között megtalálható mind a trimer szerveződésű, béta típusú, mind a dimer, alfa típusú dUTPázok, ezért valószínűleg létezett egy olyan *S. aureus* törzs, amely endogén módon kódolta az alfa típusú dUTPázt. Ez a gén később fágok közvetítésével kerülhetett át más törzsekbe, és épülhetett be a genomba.

Az alfa típusú dUTPázokat már ismert dimer szerveződésű dUTPáz szekvenciákkal (*Campylobacter jejuni*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*) összeillesztve azonosítottam az alfa dUTPáz családra jellemző 5 konzervált motívumot [34] (33. ábra). A csoportot további 3, egymás között viszont erősen konzervált, alcsoportra bontottam.

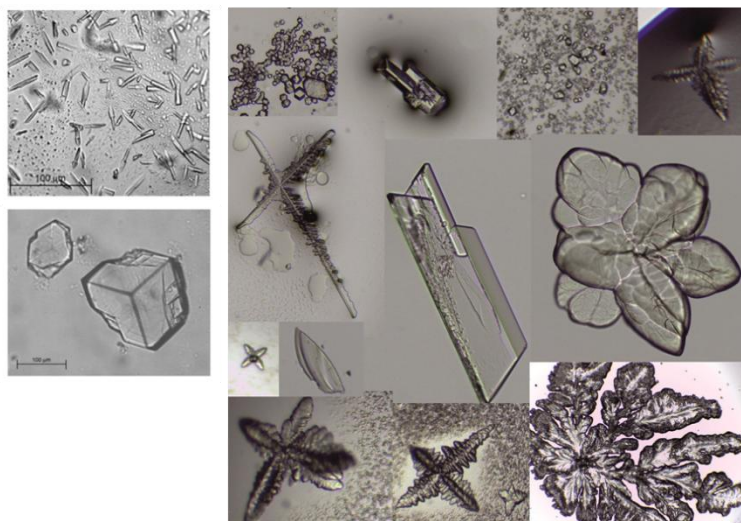
A trimer szerveződésű dUTPázok között magas konzerváltságot fedeztem fel (34. ábra). Az egyetlen különböző szegmens a feltehetően az Stl fehérje kötéseért felelős linker régió [13], amely alapján 7 konzervált alcsoportba osztottam tovább a családot. A teljes szekvenciákban azonosítottam a trimer dUTPázokra jellemző 5 motívumot (7. ábra) [15]. A linker régiók szekvenciáival TreeDyn programmal elkészítettem azok feltételezett törzsfáját (35. ábra). A Φ11 dUTPáz linker régiója egy nagyobb csoportba tartozik, melyek között 100%-os a konzerváltság. Feltételezhető, hogy ezek a fági dUTPázok is képesek az Stl SaPIbov1-et mozgósítani. A Φ11 csoportjához filogenetikailag két csoport is közel áll (barna és kék színnel jelölve), melyeknek az Stl fehérje mobilizáló tulajdonságairól egyelőre még nem tudunk semmit.



33. ábra
Alfa típusú dUTPázok illesztése

4.8 Kristályosítás

A kristályosítás során kipróbált JCSG-*plus* screen körülményeiből több $\Phi 11$ dUTPáz kristály is nőtt (36. ábra). Eddig az Stl SaPIbov1-ből egy kristály nőtt, ami tesztelés során kismolekulának bizonyult. Az Stl fehérje nehéz kristályosodása betudható a magas α -hélix tartalmának (ld. 4.3 fejezet), mivel azok magas fokú flexibilitása miatt nehezebben vesz fel egy könnyen kristályosodó, stabil szerkezetet.



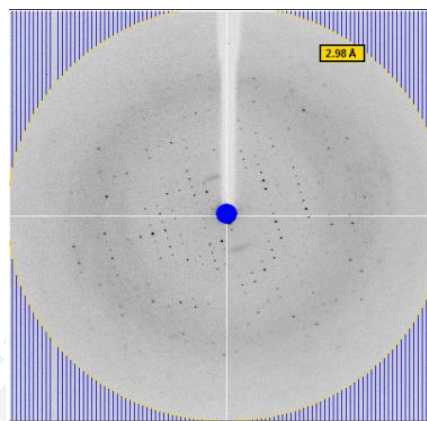
36. ábra

A JCSG+ screenből nyert $\Phi 11$ dUTPáz kristályok

Szinkrotron sugárforrásnál mért kristály (36. ábra, bal alsó) a JCSG-*plus* 2.42-es körülményéből (0.1 M ammónium-acetát, 0.1 M TRIS pH 5.5, 17% (w/v) PEG (polietilén-glikol) 10 000) nőtt. A mérés előtt az ikres kristály szét lett törve, és annak egy monokristály darabjával készült az adatkészlet felvétel, 2.98 Å felbontással.

Az adatokat Leveles Ibolya iMosflm és Scala (CCP4 szoftvercsomagból) programokkal dolgozta fel. A fázisprobléma megoldására a molekuláris helyettesítés módszerét használta (3HZA PDB kódú modellt használva). Az iteratív finomítás Refmac segítségével, a molekulaépítés Coot programmal történik. A szerkezetmegoldás folyamatban van és az eddigi eredmények publikálva lettek [35] (37. ábra).

$\Phi 11$ dUTPase	
Space group	I23
Resolution (Å)	40.07-2.98 (3.14-2.98)
Unit-cell parameters	$a=98.16$ Å, $\alpha=\beta=\gamma=90.00^\circ$
Total reflections	18394 (2571)
Unique reflections	3337 (490)
Completeness (%)	99.7 (99.6)
R_{merge}^a	0.096 (0.474)
I/ σ I	11.2 (3.5)



37. ábra

A $\Phi 11$ dUTPáz elemi cellájának és adatkészletének paraméterei és a diffrakciós képe

További kristályosítási kísérletek folyamatban vannak, és a kinőtt kristályok tesztelése a BME Biostruct laborban található Agilent SuperNova házi sugárforráson folyamatosan zajlik. A Mosquito kristályosító robot segítségével hatékonyabban rakunk fel screen tálcákat mind az egyedüli fehérjével, mind a komplexben lévővel.

5 Összefoglalás és értékelés

Munkám során sikeresen optimalizáltam a $\Phi 11$ dUTPáz és az Stl SaPIbov1 expresszióját és tisztítását, mely előfeltétele volt a további vizsgálataimnak. Nikkelgyantás tisztítás során bebizonyítottam, hogy a két fehérje között létezik ez bizonyos kölcsönhatás, melynek elég erős ahhoz, hogy tisztítás során a dUTPáz ne mosódjon le az oszlopról, hanem együtt eluálódjon az Stl SaPIbov1-el. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával megállapítottam, hogy a $\Phi 11$ dUTPáz főleg β -redők építik fel, amik jellegzetesek a *S. aureus* helper fágok trimer szerveződésű dUTPáz családjára. Az Stl SaPIbov1 szerkezete ezzel ellentétben 80%-ban α -helikális. Eddig még senki nem karakterizálta ennek az Stl-nek a szerkezetét, ezért ez az információ újdonsággal hat. A szerkezet magasfokú α -hélix tartalma magyarázhatja azt a tényt, hogy a fehérje nehezen kristályosodik, a hélixek flexibilitása miatt a fehérje láncai folyamatosan elmozdulhatnak, ami a stabil szerkezetet megkívánó kristályok kialakulásának kevésbé kedvez. A $\Phi 11$ dUTPáz sikeresen kristályosítottuk, és egy monokristály fragmensből 2.98 Å felbontással egy teljes adatkészlet lett felvéve és az eredményeket sikeresen publikáltuk. Az enzim szerkezetmegoldása folyamatban van. Az Stl SaPIbov1 és a dUTPázal alkotott komplexének kikristályosítására irányuló kísérletek is folyamatosan zajlanak.

A kölcsönható felület vizsgálatára fluoreszcens spektroszkópia méréseket végeztem, mértem a $\Phi 11$ dUTPáz C terminális régióján lévő egyetlen triptofán fluoreszcens jelének változását. Stl SaPIbov1-el való komplexbe hozás és dUPNPP hozzáadása során sem történt változás a spektrum maximumpontjának helyében, mely a fluoreszcenciát okozó fluorofór, jelen esetben a triptofán, környezetében történő változásra utalna. Ebből azt a következtetést vontam le, hogy ez a C terminális régió nem játszik szerepet sem a komplexképzésben, sem az aktív centrum kialakításában. További munkám során, a kölcsönható felszín további szűkítésére, különböző dUTPáz mutánsokat hozok létre, amelyek a felszínére több különböző helyre triptofánt építek be, és egyenként vizsgálom a triptofánok jelének változását az Stl fehérje hatására. Háromdimenziós térszerkezet híján a triptofán helyzetét a dUTPáz feltételezett szerkezetében homológia modellezéssel állapítottuk meg, mely a további mutációs kísérlet során hasznos eszköznek fog bizonyulni.

A fehérjék, és az alkotott komplexük hőstabilitásának vizsgálatára termofluorimetriás kísérleteket végeztem. A méréseim során megállapítottam, hogy a $\Phi 11$ dUTPáz szerkezetében jelentős stabilitásnövekedést okoz a szubsztrátkötése, ezzel szemben az Stl SaPIbov1 elnyújtott olvadáspontjában nem történik változás dUPNPP hatására. A két fehérjét együtt mérve megváltozik az olvadási görbe karakterisztikája. Az általános egy disztinkt olvadáspont helyett ezen rendszerben két különálló olvadási pont, és egy görbe-váll jelenik meg. A T_M -ek helyzete megfeleltethető a rendszert alkotó fehérjék különálló, és a komplexük denaturációs hőmérsékletének. A dUPNPP hatására a detektált váll eltűnt, amiből arra következtetek, hogy a stabilitás növekedése miatt egybeolvadt a komplex által mutatott görbével, így normális megközelítési módszerekkel kiértékelhetetlenné vált. A dUTPáz koncentrációtól függően a kapott görbék értékei változtak, ennek megmagyarázására hipotéziseket állítottam fel. A hőmérséklet növekedése során először az Stl SaPIbov1 tekeredik ki részlegesen, de még képes a dUTPázal való kölcsönhatásra. Magasabb hőmérsékleten a nem komplexált állapotban lévő dUTPázok denaturációja adja a váll jelét, majd utána az egész komplex szétesése következik. Ebből azt a következtetést vontam le, hogy a kölcsönhatás által okozott stabilitásváltozás csak a kölcsönható felszínre terjed ki. A fehérjék olyan oldalláncai, melyek nem vesznek részt a komplex kialakításában könnyen kitekerednek, úgy, mintha önmagában denaturáltak volna a fehérjét. A két fehérje még kitekeredve is komplexben marad, ami csak magasabb hőmérsékleten esik szét. Ez az eredmény a kölcsönható felszínen létrejövő, nagymértékű lokális stabilitásnövekedést indikál, melyet az előzetes nikkelgyantás tisztítás is alátámaszt.

Filogenetikai vizsgálataim során több fág dUTPázát csoportosítottam, a fág dUTPázok között mind az alfa, mind a béta típusú család képviselteti magát. Mivel a trimer szerveződésű dUTPáz jellemzi a *S. aureus* törzseket, ezért létezhetett egy olyan törzs, ami ezzel ellentétben a dimer változatot kódolta, és ebből a törzsből terjedhetett el fág mediálan az alfa típusú dUTPáz. A trimer dUTPázokat vizsgálva azok szekvenciája csak a linker régióban különbözik. Ezekre a szekvenciákra egy filogenetikai törzsfát generáltam, mely megmutatja az egyes csoportok közötti evolúciós kapcsolatot. A csoportok között alacsony a hasonlóság, mely a fágok eltérő Stl fehérje mozgósító képességében jelenik meg. A linker régió kívüli szekvencia az egyedfejlődés során változatlan maradt, amiből azt a következtetést lehet levonni, hogy a dUTPázok fő funkciójának nincs kihatása a derepressziós mechanizmusra, ezért nem volt szükség arra, hogy idomuljon a gazdaszervezethez. Ezzel ellentétben, a feltételezett kölcsönható linker régió az evolúció során

többször is megváltozott, feltehetőleg azért, hogy a fág, az esetleges gazdaszervezet SaPI-jait hatékonyabban tudja indukálni.

További célom a komplex és az alkotóelemeinek pontos háromdimenziós térszerkezetének meghatározása, izotermális kalorimetriás méréssel a komplex disszociációs állandójának kiszámítása, és a termofluor görbék dekonvolúciós kiértékelési módszerének kifejlesztése. Munkám remélhetőleg mélyebb belátást fog biztosítani a *S. aureus* patogenitásának és annak fág mediált terjedésének szabályozási mechanizmusába, és az esetleges okozott fertőzések kezelési módjainak egy teljesen új irányú megközelítésébe.

6 Irodalomjegyzék

1. Frank, A.L., et al., *Increase in community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in children*. Clin Infect Dis, 1999. **29**(4): p. 935-6.
2. <http://www.healthcommunities.com/mrsa-infection/incidence.shtml>.
3. http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_bacterial/en/index2.html.
4. Chambers, H.F., *The changing epidemiology of Staphylococcus aureus?* Emerg Infect Dis, 2001. **7**(2): p. 178-82.
5. Gorak, E.J., S.M. Yamada, and J.D. Brown, *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in hospitalized adults and children without known risk factors*. Clin Infect Dis, 1999. **29**(4): p. 797-800.
6. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>.
7. Malachowa, N. and F.R. DeLeo, *Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(18): p. 3057-71.
8. Novick, R.P., *Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of Staphylococcus aureus*. Plasmid, 2003. **49**(2): p. 93-105.
9. Novick, R.P. and A. Subedi, *The SaPIs: mobile pathogenicity islands of Staphylococcus*. Chem Immunol Allergy, 2007. **93**: p. 42-57.
10. Ubeda, C., et al., *SaPI mutations affecting replication and transfer and enabling autonomous replication in the absence of helper phage*. Mol Microbiol, 2008. **67**(3): p. 493-503.
11. Chen, J. and R.P. Novick, *Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes*. Science, 2009. **323**(5910): p. 139-41.
12. Weigel, L.M., et al., *Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of Staphylococcus aureus*. Science, 2003. **302**(5650): p. 1569-71.
13. Tormo-Mas, M.A., et al., *Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands*. Nature, 2010. **465**(7299): p. 779-82.
14. Christie, G.E., et al., *The complete genomes of Staphylococcus aureus bacteriophages 80 and 80alpha--implications for the specificity of SaPI mobilization*. Virology, 2010. **407**(2): p. 381-90.
15. Vertessy, B.G. and J. Toth, *Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases*. Acc Chem Res, 2009. **42**(1): p. 97-106.
16. Mosbaugh, D.W., *Purification and characterization of porcine liver DNA polymerase gamma: utilization of dUTP and dTTP during in vitro DNA synthesis*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(12): p. 5645-59.
17. Tye, B.K. and I.R. Lehman, *Excision repair of uracil incorporated in DNA as a result of a defect in dUTPase*. J Mol Biol, 1977. **117**(2): p. 293-306.
18. Ahmad, S.I., S.H. Kirk, and A. Eisenstark, *Thymine metabolism and thymineless death in prokaryotes and eukaryotes*. Annu Rev Microbiol, 1998. **52**: p. 591-625.
19. Goulian, M., et al., *Mechanism of thymineless death*. Adv Exp Med Biol, 1986. **195 Pt B**: p. 89-95.
20. Grasser, F.A., et al., *dUTPase in human neoplastic cells as a potential target for therapeutic intervention*. Curr Protein Pept Sci, 2001. **2**(4): p. 349-60.
21. Takacs, E., et al., *Molecular shape and prominent role of beta-strand swapping in organization of dUTPase oligomers*. FEBS Lett, 2009. **583**(5): p. 865-71.

22. Persson, R., E.S. Cedergren-Zeppezauer, and K.S. Wilson, *Homotrimeric dUTPases; structural solutions for specific recognition and hydrolysis of dUTP*. Curr Protein Pept Sci, 2001. **2**(4): p. 287-300.
23. Mol, C.D., et al., *Human dUTP pyrophosphatase: uracil recognition by a beta hairpin and active sites formed by three separate subunits*. Structure, 1996. **4**(9): p. 1077-92.
24. Prasad, G.S., et al., *Crystal structure of dUTP pyrophosphatase from feline immunodeficiency virus*. Protein Sci, 1996. **5**(12): p. 2429-37.
25. Takacs, E., et al., *Direct contacts between conserved motifs of different subunits provide major contribution to active site organization in human and mycobacterial dUTPases*. FEBS Lett, 2010. **584**(14): p. 3047-54.
26. Vertessy, B.G., *Flexible glycine rich motif of Escherichia coli deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase is important for functional but not for structural integrity of the enzyme*. Proteins, 1997. **28**(4): p. 568-79.
27. Fiser, A. and B.G. Vertessy, *Altered subunit communication in subfamilies of trimeric dUTPases*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **279**(2): p. 534-42.
28. Bozoky, Z., et al., *Calpain-catalyzed proteolysis of human dUTPase specifically removes the nuclear localization signal peptide*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19546.
29. Nemeth-Pongracz, V., et al., *Interacting partners of M-PMV nucleocapsid-dUTPase*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2006. **25**(9-11): p. 1197-200.
30. Varga, B., et al., *Active site of mycobacterial dUTPase: structural characteristics and a built-in sensor*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **373**(1): p. 8-13.
31. Fitzgerald, J.R., et al., *Evolutionary genomics of Staphylococcus aureus: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8821-6.
32. Fitzgerald, J.R., et al., *Characterization of a putative pathogenicity island from bovine Staphylococcus aureus encoding multiple superantigens*. J Bacteriol, 2001. **183**(1): p. 63-70.
33. Kahankova, J., et al., *Multilocus PCR typing strategy for differentiation of Staphylococcus aureus siphoviruses reflecting their modular genome structure*. Environ Microbiol, 2010. **12**(9): p. 2527-38.
34. Hidalgo-Zarco, F. and D. Gonzalez-Pazanowska, *Trypanosomal dUTPases as potential targets for drug design*. Curr Protein Pept Sci, 2001. **2**(4): p. 389-97.
35. Ibolya Leveles, Gergely Róna, Imre Zagyva, Ábris Bendes, Veronika Harmat and Beáta G. Vértessy, *Crystallization and preliminary crystallographic analysis of dUTPase from the Φ11 helper phage of Staphylococcus aureus*. Acta Crystallographica Section F, 2011. **F67**: p. 1411-1413.