

——— Tudományos Diákköri Dolgozat ———

BACSÓ ANDRÁS

***A *Mycobacterium tuberculosis**
IPMDH enzim vizsgálatának első
lépései**

Témavezetők:
Kazinczyné Dr. Vas Mária
Gráczér Éva Laura



——— Eötvös Loránd Tudományegyetem ———
——— Természettudományi Kar ———
—— Budapest, 2011 ——

Tartalomjegyzék

BEVEZETÉS.....	1
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	2
AZ IPMDH TULAJDONSÁGAI	2
<i>Az izopropilmalát dehidrogenáz (IPMDH) szerepe.....</i>	2
<i>Az IPMDH molekula szerkezeti sajátosságai.....</i>	2
<i>A Mycobacterium tuberculosis IPMDH szerkezete</i>	5
A FEHÉRJÉK ÁLTALÁNOS TÉRSZERKEZETI JELLEMZŐI ÉS KIALAKULÁSÁNAK ELVEI	5
A REKOMBINÁNS FEHÉRJETERMELÉS MÓDSZEREI ÉS ANNAK SORÁN FELMERÜLŐ PROBLÉMÁK.....	8
AKTÍV REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK INKLÚZIÓS TESTBŐL VALÓ ELŐÁLLÍTÁSÁNAK MÓDSZEREI	10
CÉLKITŰZÉSEK	12
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	13
ANYAGOK	13
MÓDSZEREK.....	13
I. MYC IPMDH BAKTERIÁLIS EXPRESSZIÓJA (TERMELTETÉSE) ÉS TISZTÍTÁSA	13
<i>Kompetens sejtek gyártása.....</i>	13
<i>Transzformálás</i>	14
<i>A fehérje termelése.....</i>	15
<i>A sejtek feltárása.....</i>	16
<i>Mintavétel a fehérjetermelés ellenőrzésére.....</i>	16
<i>Poliakrilamid gélelektroforézis</i>	17
<i>Renaturálás.....</i>	18
<i>Ni²⁺ affinitás kromatográfia.....</i>	19
<i>Dialízis</i>	20
II. KONCENTRÁCIÓK MEGHATÁROZÁSA	20
<i>Fehérje-koncentráció meghatározása</i>	20
<i>NAD, NADH koncentrációjának meghatározása:.....</i>	20
<i>IPM és NAD koncentráció enzimatis meg határozása</i>	21
<i>Aktivításmérés.....</i>	21
III. ENZIMKINETIKAI ANALÍZIS	21
IV. CD-SPEKTROSKÓPIA	22
V. FLUORESZCENCIA SPEKTROSKÓPIA.....	23
<i>Fehérje fluoreszcencia.....</i>	23
<i>ANS-fluoreszcencia</i>	24
<i>Fluoreszcencia rezonancia transzfer.....</i>	24
VI. A DENATURÁCIÓ ÉS A RENATURÁCIÓ KINETIKÁJÁNAK MÉRÉSE	25
EREDMÉNYEK.....	27
KÜLÖNBÖZŐ BAKTÉRIUMOKBÓL SZÁRMAZÓ IPMDH-K SZEKVENCIÁJÁNAK ÖSSZE HASONLÍTÁSA	27
MYC IPMDH TERMELÉS HAGYOMÁNYOS (RÁZATOTT) KULTÚRÁBAN	28
RENATURÁCIÓ.....	30
A HAGYOMÁNYOS (RÁZATOTT) KULTÚRÁBAN TERMELT FEHÉRJE SZERKEZETI JELLEMZÉSE	32
FERMENTORBAN VÉGZETT TERMELÉS	34
ENZIMKINETIKAI VIZSGÁLATOK	35
FRET KIALAKULÁSA	37
IPM KÖTÖDÉSI ÁLLANDÓ MEGHATÁROZÁSA.....	38
DENATURÁCIÓS VIZSGÁLATOK.....	39
RENATURÁCIÓS VIZSGÁLATOK.....	41
ÖSSZEFOGLALÁS	44
HIVATKOZÁSOK.....	45

Ábrajegyzék

- 2.1. ábra: Az IPMDH alegység sematikus topológiája illetve térszerkezete
- 2.2. ábra: Az IPMDH monomer tetramer komplexének modellezett szerkezete
- 2.3. ábra: Az aktív centrum elhelyezkedése az IPMDH dimerben
- 2.4. ábra: A térszerkezet kialakulását szemléltető tölcserdiagram
- 5.1. ábra: A *Myc* IPMDH első termelési kísérletének ellenőrzése SDS gélelektroforézis segítségével
- 5.2. ábra: A *Myc* IPMDH 30 °C-on történő termelésének ellenőrzése SDS gélelektroforézis segítségével
- 5.3. ábra: A *Myc* IPMDH 16 °C-on történő termelésének ellenőrzése SDS gélelektroforézis segítségével
- 5.4. ábra: A feltárás és a renaturáció során vett minták
- 5.5. ábra: A renaturált *Myc* IPMDH és az ANS kölcsönhatásának vizsgálata
- 5.6. ábra: A renaturált *Myc* IPMDH és a natív *Tt* IPMDH CD spektruma
- 5.7. ábra: A renaturált *Myc* IPMDH szerkezetének ellenőrzése natív gélelektroforézissel
- 5.8. ábra: A *Myc* IPMDH fermentorban történt termelésének főbb szakaszai
- 5.9. ábra: A *Myc* IPMDH és a *Tt* IPMDH szubsztrát telítési görbéinek összehasonlítása
- 5.13. ábra: A 275 nm-es gerjesztés hatása a natív fehérje (fekete) jelének intenzitására
- 5.14. ábra: A natív és a denaturált *Myc* IPMDH spektruma és a különbség spektrum
- 5.15. ábra: A *Myc* IPMDH Trp emissziós csúcsainak ($\lambda_{\max}$) elmozdulása (A) és a *Myc* IPMDH Trp intenzitásának változása (B) IPM-es és IPM nélküli denaturáció során
- 5.16. ábra: A *Myc* IPMDH renaturációjának meghatározása ANS-fluoreszcencia alapján
- 5.17. ábra: A *Myc* IPMDH renaturációjának meghatározása reaktiválódás alapján
- 5.18. ábra: A renaturáció követése FRET mérésével

Táblázatjegyzék

- 5.1. táblázat: A *Myc* IPMDH és más baktériumok által termelt IPMDH-k szekvenciájának összehasonlítása
- 5.2. táblázat: IPMDH szekvenciák páronkénti összehasonlítása
- 5.3. táblázat: A renaturációs kísérleteimet összefoglaló táblázat
- 5.4. táblázat: A *Myc* IPMDH mért kinetikai paraméterei
- 5.5. táblázat: A különböző baktériumokból származó IPMDH-k kinetikai paramétereinek összehasonlítása
- 5.6. táblázat: Az egyes baktériumok által termelt IPMDH-k denaturációs sebességének összehasonlítása

Rövidítések jegyzéke

ANS:	anilin-naftalin-szulfonsav
DTT:	ditiotritol
<i>Ec</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Etilén-diamin-tetraecetsav
GuHCl:	Guanidin-hidroklorid
ICDH:	izocitrát dehidrogenáz
IPM:	3-izopropil-malát
IPMDH:	izopropilmalát-dehidrogenáz
IPTG:	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
LB:	Luria-Bertani tápoldat
MOPS:	3-N-morfolino-propánszulfonsav
<i>Myc</i> :	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAD:	nikotinamid-adenin-dinukleotid
PAGE:	poliakrilamid-gélelektroforézis
SDS:	nátrium-dodecyl-szulfát
<i>Tf</i> :	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
TRIS-HCl:	trihidroximetil-aminometán
TRITON-X:	polioxietilén-octil-fenil-éter
Trp:	triptofán
<i>Tt</i> :	<i>Thermus thermophilus</i>

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni hálámat témavezetőimnek, *Kazinczyné Dr. Vas Mária*-nak és *Grácz Erőva Laurá*-nak a lehetőségért, hogy a laboratóriumban dolgozhattam és elkészíthettem TDK-dolgozatomat. Köszönöm a munkám során nyújtott sokrétű és önzetlen segítséget, útmutatást, a műszerkezelés elsajátításához nélkülözhetetlen tanácsokat, valamint azt, hogy kérdéseimmel mindig bátran fordulhattam hozzájuk.

Köszönettel tartozom *Dr. Závodszky Péter* akadémikus-nak a lehetőségért, hogy az IPMDH enzimmel foglalkozhattam, valamint hogy a DNS szintű munkákat a laboratóriumában végezhettem el.

Hálás vagyok az intézet igazgatójának, *Dr. Buday László* akadémikus-nak, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy kutatómunkámat a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Enzimológiai Intézetében végezhessem el.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy minden tekintetben ideális háttérrel biztosítottak nekem ahhoz, hogy idáig eljussak.

Bevezetés

A tuberkulózis (vagy más néven gümőkór) a történelem során az egyik legtöbb halálesetet okozó betegség volt. Ez egy olyan fertőző betegség, amelyet a *Mycobacterium tuberculosis* baktérium okoz, és leggyakrabban a tüdőt támadja meg, de más fontos szerveket is károsíthat (pl.: központi idegrendszer). Ma már gyógyítható, de még mindig több mint kétmilliárd ember fertőzött a bacilussal, 2006-ban például 1,9 millió ember halt meg miatta. A baktérium hajlamos az antibiotikum-rezisztenciára, emiatt előfordulása az 1980-as évek óta egyre emelkedik. A megoldást a betegség legyőzésére más jellegű, új gyógyszerektől várják.

Az antibiotikumok tehát nem a legmegfelelőbb gyógyszerek, hiszen csak idő kérdése, hogy rezisztens faj alakuljon ki velük szemben. Megoldás lehet viszont a baktérium létfontosságú enzimjeinek gátlása, blokkolása. Ilyen enzim lehet például a 3-izopropilmalát dehidrogenáz (IPMDH), amely a leucin bioszintézisének egyik lépését katalizálja. A leucin fontos aminosav, a fehérjék építőköve, így amennyiben a baktérium nem tudja azt előállítani, akkor elpusztul. Viszont az emlősökben (így az emberben) nem található meg ez az enzim (a leucin a táplálkozásunkban az egyik esszenciális aminosav). Ebből adódóan a bakteriális enzim célzott gátlása alkalmas módszernek ígérkezik a betegség elleni küzdelemben. Ahhoz azonban, hogy az IPMDH-t speciálisan gátló szereket találjunk, az enzim működését kell jobban megismernünk alapkutatás-szintű vizsgálatok során. Az irodalomban fellelhető adatok azonban főként más forrásból származó IPMDH-kra vonatkoznak és csupán a hőmérsékleti adaptáció problémakörére szorítkoznak.

A fentiek alapján diákköri munkám során olyan kutatásba kapcsolódtam be a MTA SZBK Enzimológiai Intézetében, amelynek keretében a *Mycobacterium tuberculosis* baktériumból származó IPMDH enzim szerkezeti és funkcionális vizsgálatát tervezzük.

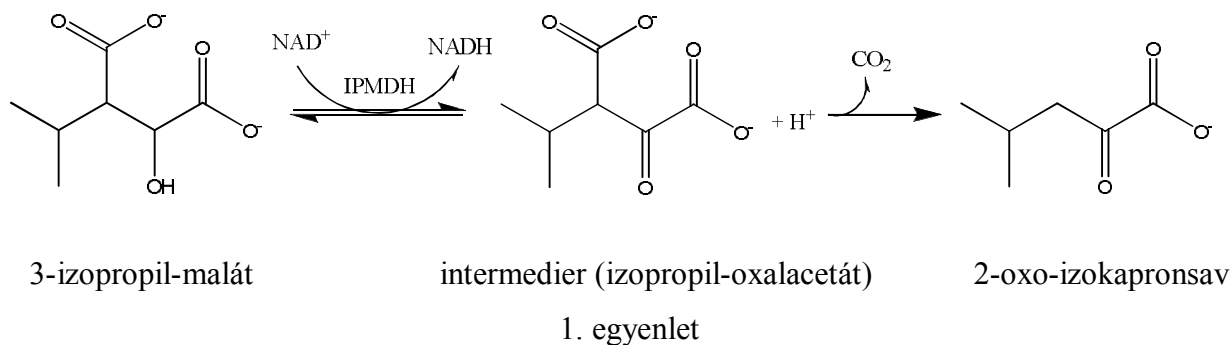
A munka jelenlegi stádiumában a feladatom az volt, hogy a fehérjét tiszta formában, és a kísérletekhez szükséges mennyiségben előállítsam. Jelen esetben a bakteriális expresszió és a tisztítás sem volt egyszerű rutin feladat. Dolgozatomban bemutatom a munka közben felmerült problémákat, és a leküzdésükre tett kísérleteket.

Irodalmi áttekintés

Az IPMDH tulajdonságai

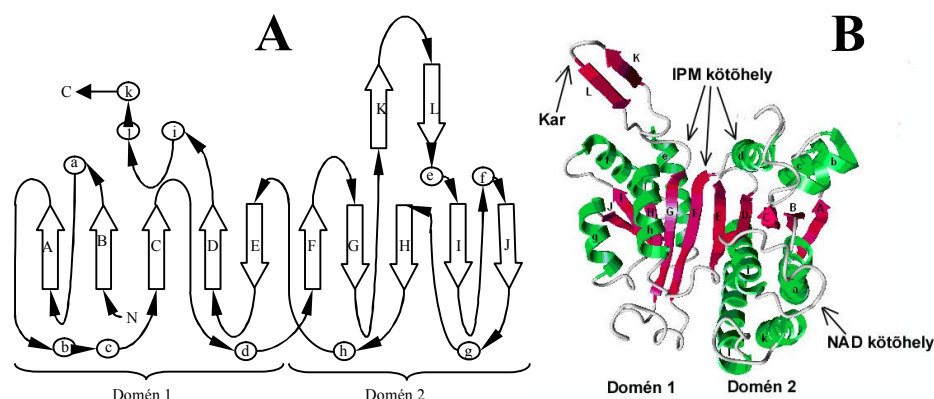
Az izopropilmalát dehidrogenáz (IPMDH) szerepe

A LeuB gén által kódolt 3-izopropilmalát dehidrogenáz enzim (IPMDH, EC 1.1.1.85) a 3-izopropil-malát (IPM) dekarboxileződéssel együttjáró oxidációját katalizálja NAD^+ és Mn^{2+} vagy Mg^{2+} jelenlétében, miközben 2-oxo-izokapronsav keletkezik. A reakció a leucin bioszintézis anyagcsereút egyik lépése.



Az IPMDH molekula szerkezeti sajátosságai

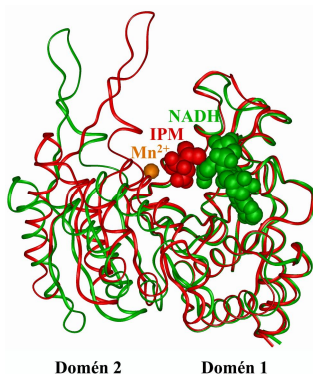
Kristályszerkezeti adatok alapján eddig már 6 féle baktériumból származó IPMDH 3-dimenziós szerkezete ismert nagy felbontásban (*Thermus thermophilus* [1-4], *Thiobacillus ferrooxidans* [5], *Thermotoga maritima* (Joint Center for Structural Genomics, fehérje adatbázisban való elhelyezés: 2004.07.20.), *Salmonella typhimurium* [6], *Escherichia coli* [6] és *Mycobacterium tuberculosis* [7]). Közös jellemzőjük, hogy két azonos szerkezetű és aminosav szekvenciájú alegységből épülnek fel, melyek szimmetrikusan kapcsolódnak a dimerben. Egy alegység 300-400 aminosav-maradékot tartalmaz, és két doménből, azaz két önálló globuláris egységből áll. Egy alegységen belül 10 párhuzamos β -redő alkot hidrofób magot, ebből 5 β -redő az egyik, 5 pedig a másik doménben található (2.1. ábra). Szintén jellemző elem a karrégió, ami az alegység felszínén található és két antiparalell β -redőt (K és L jelű) tartalmaz. A homodimer létrejöttékor a két karrégió összekapcsolódik, ezzel stabilizálva a fehérjekomplexet.



2.1. ábra: Az IPMDH alegység sematikus topológiája (A) és térszerkezete (B)

Az A ábrán a körök az α -héliceket, a nyilak a β -redőket jelképezik. A B ábrán lévő szalagdiagram mutatja a másodlagos szerkezeti elemek térbeli elrendeződését. [1]

A fehérjék flexibilitásának, azaz a szerkezeti egységek egymáshoz viszonyított relatív elmozdulásának sok esetben fontos szerepe van az enzimatikus katalízisben. Röntgendiffrakciós analízisek azt mutatták, hogy a *Tt* IPMDH apoenzim, illetve a Mn^{2+} -nal alkotott komplex hasonló konformációjú, a két domén viszonylag távol van egymáshoz képest, ún. „nyitott” szerkezetűek a fehérjemolekulák [4]. Viszont a MnIPM és MgIPM komplex jelenlétében növesztett *Tt* [4] ill. *Tf* [5] IPMDH kristályok molekuláiban a két domén relatíve közelebb van egymáshoz, ezek ún. „zárt” szerkezetűek. Feltételezhető, hogy oldatfázisban a nyitott és zárt formák egyaránt előfordulnak, dinamikus egyensúly áll fenn közöttük. A szubsztrát Mn- vagy Mg-IPM-mel alkotott komplexben az egyensúly a zárt forma felé tolódik el, és így nagy valószínűséggel a kristályban is ez a forma jelenik meg. A másik szubsztráttal a NAD^+ -dal (illetve NADH-val) kristályosított forma viszont lényegében nyitott [4]. Tehát feltehetően az IPM fémion komplexe felelős a doménzáródásért. Valószínűleg csupán a zárt forma aktív katalitikusan, ugyanis a modellezett zárt turner komplexben a szubsztrátok a reakció végbemeneteléhez már optimális közelségbe kerülnek (2.2. ábra).



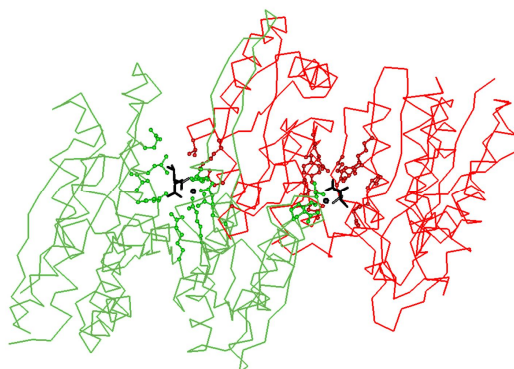
2.2. ábra: Az IPMDH monomer turner komplexének modellezett szerkezete

A Mn^{2+} -t narancssárga, az IPM-et piros, a NADH-t zöld gömbmodell, a MnIPM komplexet kötő polipeptid láncát (zárt) piros, a NADH kötő polipeptid láncát (nyitott) pedig zöld szalag modell jelöli.

Érdekes tulajdonsága az IPMDH-nak a Fluoreszcencia Rezonancia Energia Transzfer (FRET), melynek bekövetkezését először Dean és mti. figyelték meg a *Tt* IPMDH-ban lévő Trp(ok) és a kötött NADH molekula között [8]. A FRET lényege, hogy két megfelelő pozícióban lévő kromofór között energiáttranszfer zajlik le, azaz a gerjesztett állapotban lévő donor molekula (jelen esetben Trp indol-váza) átadja az energiát a hozzá megfelelő pozícióban lévő akceptornak (itt a NADH redukált nikotinamid gyűrűje).

A FRET a natív térszerkezetű IPMDH tulajdonsága. Fontos kritérium még, hogy ez a jelenség csupán az enzim MnIPM illetve MgIPM komplexben következik be, azaz a fémion-IPM szubsztrát kötődése által előidézett konformáció változás, azaz feltehetően a doménzáródás szükséges ahhoz, hogy az enzim Trp oldallánca(i) és a kötött NADH megfelelő relatív pozícióba kerüljön ahhoz, hogy a FRET kialakuljon [9].

A szubsztrátokkal történt röntgendiffrakciós kísérletekből részletes információnk van a szubsztrátok kötődési helyéről és a kötődés módjáról. A szubsztrátkötő aminosavakról kiderült, hogy azok konzervatívák, azaz az adott szekvenciális pozícióban közel minden IPMDH-ban megtalálhatóak. Ez a tény segíti a különböző eredetű IPMDH-k enzim-szubsztrát komplexeinek összehasonlítását. Különleges tulajdonsága az IPMDH-knak, hogy az IPM kötésében mindkét alegység aminosavmaradékai részt vesznek (2.3. ábra), tehát teljes szubsztrátkötő hely csak a dimerben alakul ki, amiből valószínűnek látszik, hogy csak a dimer forma aktív. A feltételezés helyessége mellett szól az a tény, hogy eddig nem sikerült aktív monomert előállítani. A NAD-kötő aminosavak viszont egy alegységen belül, sőt egy doménben (domén 1, lásd 2.2. ábra) találhatóak. A szubsztrátkötő aminosavmaradékok közül még pontosan nem ismerjük, hogy melyek játszhatalnak döntő szerepet a fentebb említett reakció katalízisében.



2.3. ábra: Az aktív centrum elhelyezkedése az IPMDH dimerben

A polipeptidlánc térbeli helyzetét az α -atomokat összekötő vonalak jelzik. Az egyik alegységet piros, a másikat zöld színnel tüntettem fel. Az aktív centrumokban kötődő IPM molekulákat (pálcika modell) fekete szín jelöli. Az aktív centrumokat alkotó oldalláncokat gömb-pálcika modellel ábrázoltam.

A *Mycobacterium tuberculosis* IPMDH szerkezete

A *Myc* IPMDH aminosav szekvenciája csupán 33-44%-os egyezést mutat a többi IPMDH-val. Továbbá polipeptidlánca 336 aminosav-maradékot tartalmaz, azaz valamivel rövidebb, mint a többi IPMDH lánc.

A szubsztrátmentes *Myc* IPMDH enzim szerkezete [7] meglepő módon legjobban a *Thioacillus ferrooxidans* (Tf) illetve a *Thermus thermophilus* (Tt) IPMDH enzimek – zárt konformációjú IPM komplexeihez hasonlít. Az előbbi fejezet alapján az IPMDH-k esetén valószínűnek látszik, hogy csak a szubsztrátok kapcsolódása indít el egy záródási folyamatot, és az enzim konformációja a turner komplex esetében lesz a legzártabb. A *Myc* IPMDH szerkezete tehát látszólag ellentmond ennek a következtetésnek. Feltételezhető, hogy *Myc* IPMDH enzim esetén a különböző mértékű zártági állapotok között kicsi az energiakülönbség, ezért már a környezetbeli hatásokra is könnyen változhat a molekula konformációja (pl. a kristályosodás folyamata alatt). A *Myc* IPMDH-ról azonban ezen a kristályszerkezeten kívül eddig még nincs az irodalomban más közölt adat, sem az enzimreakció kinetikai jellemzésére, sem pedig az oldott enzim fizikai kémiai tulajdonságaira vonatkozólag. A többi IPMDH-ról jelentősen eltérő primer szerkezete (szekvenciája) alapján (lásd Eredmények, 27. oldal) viszont nem zárható ki, hogy léteznek ilyen különbségek.

Mindezek alapján célul tűztem ki a fehérje előállítását olyan mennyiségben, hogy makroszkopikus méretekben vizsgálni lehessen, valamint alapvető enzimkinetikai és fizikai kémiai jellemzését is céloknak tekintettem.

Kontrollként összehasonlító vizsgálatokat terveztem a rendelkezésemre álló *Ec* és *Tt* IPMDH-kkal is, hogy az esetleges faj-specifikus különbségeket felderítsem.

A fehérjék általános térszerkezeti jellemzői és kialakulásának elvei

Az emberi genomban 25-30 ezerre tehető azon gének száma, melyek fehérjét kódolnak. A fehérjék nélkülözhetetlenek az élő szervezet működéséhez. Az abban zajló szakirányú feladat ellátására a fehérjéknek jól meghatározott 3D-s szerkezettel kell rendelkezniük. A fehérjék szerkezete különböző szerveződési szintekre osztható. Az elsődleges szerkezetet maga az aminosav szekvencia határozza meg, mely Anfinsen kísérlete (lásd később) alapján magában hordozza az összes szükséges információt a végső térszerkezet kialakításához. A másodlagos szerkezet a polipeptid váz lokálisan rendezett szerkezeti elemeit foglalja magában. Legismertebb formái az α -hélix és a β -redő. Az ismert

fehérjeszerkezetekben megfigyelhető, hogy a másodlagos szerkezeti elemek bizonyos kombinációi különösen gyakran fordulnak elő. Ezeket a gyakori szerkezeti motívumokat szupermásodlagos elemeknek nevezik. Ilyen motívumokból 30-40-et ismerünk pl. β - α - β motívum, helikális kötegek. A fehérjék harmadlagos szerkezete alatt a teljes polipeptidlánc térbeli szerkezetét értjük, melyet H-kötések, elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatások stabilizálnak. A tapasztalatok azt mutatják, hogy a kb. 100-150 aminosav-maradéknál nagyobb fehérjék több, egymástól többé-kevésbé független, térbelileg elkülönülő szerkezeti egységekre, ún. doménekre bonthatóak. A domének több szempont alapján is meghatározhatóak, elkülöníthetőek, így beszélni lehet szerkezeti doménekről, „folding” doménekről, illetve funkcionális doménekről. Ezek nem feltétlenül azonosak, de adott domén akár mindhárom kritériumnak is megfelelhet.

A több polipeptidláncból (alegységből) álló fehérjék és fehérjekomplexumok esetében negyedleges szerkezetről lehet beszélni, amely alatt az egyes alegységek relatív elhelyezkedése révén létrejövő térbeli struktúra értendő. Az egyes alegységek közötti ún. kontakt-felzínen ugyanolyan kölcsönhatások (H-híd, van der Waals- és ionos kapcsolatok) működnek, mint amelyek a másodlagos és harmadlagos szerkezetet is összetartják. Egyetlen különbség az, hogy az alegységek között nincs kovalens kapcsolat.

Az élő szervezetben a DNS lánc alapján történő fehérjeszintézisnek a befejező lépése a fehérje feltekeredése. Ennek ellentétéről, a denaturálásról 1929-ben Wu [10] ismerte fel, hogy olyan konformáció változás, ami megfelel a térelemek felbomlásának. 1932-ben Northrop [11] és 1934-35-ben Anson és Mirsky [12, 13] publikálták az első sikeres renaturációkat, azaz denaturált fehérjéket (hemoglobin, kimotripszinogén, tripszinogén) újra aktív állapotba hoztak. A renaturáció magyarázatára az első elméletet Kauzmann fogalmazta meg 1959-ben [14], miszerint ebben a hidrofób effektusnak van jelentős szerepe.

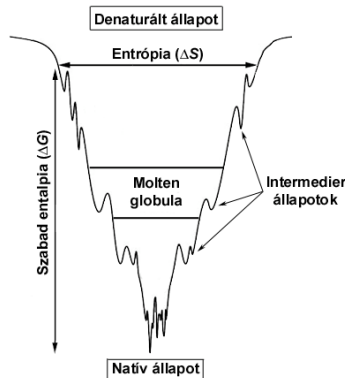
Anfinsen 1937-es elmélete szerint a fehérjék feltekeredése az aminosav-szekvenciában van kódolva. Állítását ribonukleázzal végzett kísérletével igazolta, melyben a denaturált és redukált (diszulfidhidakat felbontották) fehérje a denaturáló- és a redukálószer eltávolítása után visszanyerte natív szerkezetét, és ezzel együtt az aktivitását. A fehérje térszerkezet kialakulás mechanizmusa, a folyamatban szerepet játszó tényezők ekkor azonban még ismeretlenek voltak.

Levinthal a következő gondolkísérletet végezte el: ha egy 100 aminosavból álló fehérje minden aminosava csak két konformációt vehet fel, akkor az egész láncra 2^{100} darab (ez körülbelül 10^{30} -on) konformáció létezik. Ha egy konformációs változás ideje 10^{-11} másodperc és a fehérje a konformációkat véletlenszerűen veszi fel, akkor a natív szerkezet

megtalálásához 10^{11} év kellene. A valóságban a fehérje feltekeredése másodpercekben (esetleg percben) mérhető. Ezt az ellentmondást nevezik Levinthal-paradoxonnak.

A paradoxon feloldására többféle elméletet dolgoztak ki. Először azt figyelték meg, hogy előbb a másodlagos, majd a harmadlagos szerkezet alakul ki, végül az utolsó lépésben az aktív enzim. Eszerint a rövidtávú kölcsönhatások fontosak a feltekeredés kezdetekor. Kiderült, hogy az alegységek egymástól függetlenül is feltekeredhetnek, sőt a láncon belül kialakulhatnak mikrostruktúrák, melyek már natív szerkezetűek. Egyes vizsgálatok szerint a hidrofób „összeomlás” a másodlagos struktúrák kialakulásával egyidőben zajlik, míg újabb technikák alkalmazása esetén azt tapasztalták, hogy valamivel megelőzheti a másodlagos szerkezeti elemek kialakulását. Olyan elmélet is született, mely szerint többféle reakcióút van, azaz több intermediér állapot is létezik.

Az utóbbi 10 évben egy új szemléletmód alakult ki, miszerint a feltekeredés folyamata egy tölcsér alakú energiafelülettel írható le a legjobban, amelyen a tölcsér alja felé haladva a szabadentalpia csökken. A tölcsér peremén találhatóak a denaturált állapotok, az alján pedig a natív fehérje. A reakcióút lefelé vezet a konformációs állapotok sokaságán át, de jól meghatározott és nem minden konformációt érint. A tölcsér falán találhatóak lokális energiaminimumok, melyek az intermediereknek feleltethetőek meg.



2.4. ábra: A térszerkezet kialakulását szemléltető tölcsérdiagram.

Az ábrán látható a „molten globula” nevezetű köztitermék, melyet Ptitsyn [15] írt le először.

Az intermedierek szerkezetére vonatkozólag igen kevés adat áll rendelkezésünkre és létezésüket leginkább kinetikai bizonyítékok támasztják alá. Azonban Ptitsyn és munkatársai leírtak egy speciális intermediert - amit „molten globulának” neveztek el - amelynek létezését kísérletekkel is bizonyították. Erre az jellemző, hogy a másodlagos szerkezeti elemek nagy részben már kialakultak benne, de harmadlagos szerkezettel még nem rendelkezik. Szerkezete kompaktabb, mint a denaturált fehérjéé, de kb. 30 %-kal nagyobb a térfogata a natív

állapotúhoz képest. A „molten globula” felszíne hidrofób jellegű, így könnyen megkötí a szintén hidrofób tulajdonságú anilin-naftalin-szulfonsav (ANS) jellegzetesen fluoreszcens festéket. Így a kötött ANS fluoreszcenciájának mérésével kimutatható az intermedier [16].

A számos elmélet, amely a fehérjék kialakulását magyarázza, egyetért abban, hogy minden fehérje a feltekeredés során egy meghatározott reakcióutat jár be, azaz nem véletlenszerűen alakul ki a natív térszerkezet. Tehát nem kell a fehérjének minden lehetséges konformációs állapotot végigjárnia a natív térszerkezet eléréséhez, ez pedig feloldja a Levinthal paradoxont.

A rekombináns fehérjetermelés módszerei és annak során felmerülő problémák

Rekombináns fehérjetermelés során az előállítani kívánt fehérje génjét tartalmazó vektort juttatják be, leggyakrabban az *Escherichia coli* (*Ec*) sejtekbe melyek könnyen kezelhetők, szaporításuk olcsó és gyors. A fehérje termelés során a termelés maximalizálásához magas sejtkoncentráció elérése szükséges. Mindehhez megfelelő mennyiségű tápanyagra, illetve O_2 -re van szükség. Viszont ha a tápanyag-koncentráció túl magas és a megfelelő O_2 ellátás nem biztosított oxidációs mellékreakciók indulnak be pl.: az *Ec* sejtek esetében ecetsav keletkezik, mely gátolja a sejtek további növekedését, osztódását.

Mindezek alapján az *Ec* sejtek szaporítása, és a fehérje termeltetése történhet a hagyományos rázatott kultúrában, ahol csak a hőmérséklet és a keverés sebessége szabályozható, az O_2 szint viszont nem. Így ezzel a módszerrel csak bizonyos sejtkoncentráció érhető el, melynek következtében kevesebb fehérje fog termelődni [17]. A nagyobb sejtszám, illetve a termelés optimalizálásához olyan eljárásra van szükség, ahol szabályozható az O_2 szint, a pH, és a tápanyag mennyisége is. Ezek a paraméterek az ún. fermentor készülékben – mely egy zárt rendszer – történő termeltetés során már beállíthatóak a kívánt értékre.

A fermentorban történő termeltetésnek két fő típusa különíthető el. A „fed-batch” technika során a tápanyagot folyamatosan, meghatározott sebességgel juttatjuk a rendszerbe, annak elkerülése érdekében, hogy túl nagy koncentrációban legyen jelen és emiatt nagy mennyiségű káros melléktermék keletkezzen. A másik eljárás során az ún. „kemostat” fermentor készülékben a tápanyagot tartalmazó friss médium adagolása szintén folyamatosan történik, de ezenkívül a fermentlevet is folyamatosan elvezetik. A berendezés segítségével ún. egyensúlyi állapot érhető el, ugyanis mind a külső paraméterek (T , pH, oldott O_2 koncentrációja), mind a sejtek növekedésének sebessége valamely állandó szinten

stabilizálódik. Ha kevesebb sejt van, mint aminek a tápanyag elegendő, akkor a sejtek szaporodása is felgyorsul, ha pedig túl sok sejt van jelen, a tápanyaghiány miatt lassul a sejtek szaporodása. A fermentor a tápanyag koncentrációját állandó értéken tartja, így a sejtszám egy állandó érték körül fog kis mértékben ingadozni. Ennek eredményeképpen adott tápanyag-koncentráció mellett, úgy lesz maximális a sejtek száma, hogy nem alakul ki tápanyaghiány [18].

Optimális esetben a fentiekben ismertetett kölcsönhatásokkal rendelkező ún. natív fehérje szerkezete már a fehérjeszintézis során kialakul, azaz a baktériumokkal célzottan végzett fehérjetermelés (bakteriális expresszió) alatt. Ilyen esetekben a kívánt fehérje a sejtek feltárása után egyszerűen kinyerhető az oldatfázisból.

Bizonyos esetekben azonban előfordulhat, hogy a baktériumsejtek által megtermelt és elvileg oldható fehérje mégsem megy oldatba a sejtek feltárása során, hanem az oldhatatlan sejtfrakcióban mutatható ki. A rengeteg külső hatás, például oldószer, esetleges oldott anyagok, levegő oxigénje stb. miatt lehetséges, hogy a fehérje nem képes kialakítani natív térszerkezetét. Az is lehetséges, hogy nem a teljes fehérje, hanem csak egy-egy domén, esetleg alegység szerkezete veszi fel a nem natív formát. *In vivo* körülmények között „dajkafehérjék” (chaperonok, melyek a feltekeredésben segítenek) segítségével a hibás fehérjék képesek natív térszerkezetet kialakítani. *In vitro* környezetben azonban több hibás fehérje molekula nagyobb valószínűséggel kapcsolódik össze, ezáltal aggregátumokat képezhetnek [17].

Általánosságban azért képződnek aggregációk, mert a fehérjetermelődés sebessége nagyobb, mint a feltekeredése (így a feltekeredés és az aggregáció folyamata vetélkedni fog egymással). Ekkor az intermedierek felszínen lévő hidrofób régióik révén könnyen asszociálódhatnak. Az így kialakult asszociátumot inklúziós testnek (inclusion body) nevezzük. Kialakulása nagyon sok környezeti körülménytől függ. Szerkezeti elemei között natívtól a hibásan feltekeredettig minden lehet.

Manapság a fehérjék jelentős részénél a sejtes termelés során inklúziós test képződését tapasztalták. Az inklúziós testből az adott fehérje kivonás, oldatba vitele és natív állapotba hozatala sajnos nem tekinthető szokványos rutin feladatnak. Az oldatba vitelhez detergens, vagy detergens hatású anyagokat kell alkalmaznunk. Mivel a detergensnek egyidejűleg denaturálják is a fehérjét így felmerül a kérdés hogyan lehet az így kinyert fehérjét renaturálni, azaz natív állapotba hozni?

Aktív rekombináns fehérjék inklúziós testből való előállításának módszerei

A rekombináns fehérjéket sokszor inaktív és a közegben nem oldódó formában, azaz inklúziós testekben kapjuk meg. Az inklúziós testek 0,2 – 1,5 mikron átmérőűek, tömörek és enyhén porózusak. Nem hasonlítanak az amorf fehérje precipitátumokra, inkább kristályszerű a szerkezetük. Legkönnyebben félregombolyodott fehérjék aggregátumaként lehet elképzelni, ami akár natív szerkezetű részleteket is tartalmazhat. Az élő sejtekben a dajkafehérjék (chaperonok) következtében nem alakulnak ki ilyen szerkezetek, ugyanis ezek a hibásan feltekeredett fehérjemolekulákkal addig reagálnak, míg az natív térszerkezetűvé nem válik. Ha gazdasejt segítségével történik a fehérje expresszió, akkor a körülmények (elsősorban a hőmérséklet, de fontos a pH és az ozmolaritás is) befolyásolják a feltekeredés sikerességét. Általánosságban elmondható, hogy minél nagyobb a termeltetés sebessége, annál nagyobb az esély a hibás feltekeredésre, így az inklúziós testek kialakulására [17].

Ha az expresszió során a fehérje inklúziós testek formájában termelődött, akkor a feltáráshoz csak speciális módszerek használhatóak, ugyanis ez a fajta aggregáció nagyon ellenálló. A fehérjét tartalmazó oldatot célszerű lehűteni, majd úgy centrifugálni. Ismételt reszuszprenzióval, és újracentrifugálással, akár 90 %-os tisztaság is elérhető. A sejttörmelék mellett membránfehérjék is szennyezhetik az oldatot, ekkor szelektív kémiai extrakcióval (kelátképző (EDTA), vagy detergens (Triton X), esetleg urea szükséges kis koncentrációban) ezeket is el lehet választani.

Az inklúziós testek tehát elkülöníthetőek a sejtmarmadványoktól, a DNS daraboktól és a sejt egyéb fehérjéitől. A következő lépés a termeltetett fehérje oldatba vitele. Ha a fehérje szerkezete nem nagyon különbözik a natívétól, akkor esetleg NaCl oldatban is feloldható. Ha ez nem sikeres, akkor detergenssekkel (sodium-dodecyl-sulphate (SDS), n-lauryl-sarcosine), vagy kaotróp oldószerekkel (guanidin-hidroklorid (GuHCl), urea) esetleg extrém pH-val lehet próbálkozni. A hőmérséklet emelésével is lehet segíteni az oldást.

A fehérje feloldása után célszerű hígítani az oldatot. Túl magas fehérjekoncentráció esetén, ugyanis az oldódást segítő anyag elvonásával az aggregáció kialakulásának esélye megnőne. A hígítást többféle módon lehet elvégezni. A reverz hígítás során az oldószer folyamatos adagolása történik, azonban ekkor a kritikus koncentráció elérésekor (amikor a fehérjemolekulát már nem veszik körül a segédanyag molekulái) még túl magas a fehérjekoncentráció. Gyors hígítás esetén az oldószert egyszerre adjuk a fehérjeoldathoz, ekkor az aggregáció képződés esélye valamelyest lecsökken. A legbiztosabb módszer azonban

a csepphígítás, amikor a nagy mennyiségű oldószerhez cseppenként adjuk a fehérjeoldatot. Léteznek aggregáció-csökkentő puffer adalékok is (pl.: arginin, glicin, polietilén-glikol), valamint ha kémiai negatívvá tesszük az aminosz csoportokat (citronosítás), akkor a keletkező polianion nem képes aggregálódni. A hígítás végén célszerű pihentetni az oldatot.

A ciszteint tartalmazó fehérjék esetében a diszulfidhidaknak is ki kell alakulniuk. Az *Escherichia coli* sejtekben redukáló a közeg, azaz a fehérjetermelés során a diszulfidhidak nem alakulnak ki. Ezek kialakítására a legjobb módszer, ha olyan közeg alkalmazunk, melyben redoxi reakciók könnyen lezajlanak. Ekkor, ha rossz diszulfid híd alakul ki, akkor az könnyen elbomolhat, ha viszont a jó alakul ki, akkor az energiaminimum miatt nehezen bomlik el, vagy ha mégis akkor könnyen visszaalakul. Ezt a jelenséget nevezik angolul "disulfide shuffling"-nak (diszulfidcsere). Az alkalmas közeg könnyen megvalósítható, ha a redukálószer tartalmazó oldatot a levegőn hagyjuk, vagy redox párt alkalmazunk, esetleg olyan enzimet, ami katalizálja a diszulfidcserét (például protein-diszulfid-izomeráz).

Ezt követően kromatográfiás eljárással lehet tisztítani a fehérjét. Ennek célja az oldás során alkalmazott segédanyagok és egyéb, még megmaradt szennyezők eltávolítása, valamint a koncentráció. Az eljárás végén homogén aktív fehérjét tartalmazó oldatot kaphatunk. [19, 20]

A tisztítás folyamatát az aktivitásméréssel lehet követni, valamint krisztallográfiai, esetleg spektroszkópiai módszerekkel ellenőrizhető a termék.

Célkitűzések

Munkám során célul tűztem ki a *Mycobacterium tuberculosis* IPMDH vizsgálatát, melyhez először a fehérjét kellett előállítanom, és kidolgozni a szennyezőktől való elválasztását. A tiszta enzimmel végzett vizsgálataim (lásd alább) segítségével választ vártam arra a kérdésre, hogy a *Myc* IPMDH enzimológiai és fehérje kémiai tulajdonságaiban mennyire hasonlít más fajokból származó IPMDH-k viselkedésére, ezért eredményeimet összevetettem különböző szervezetekből származó IPMDH-k adataival is.

Vizsgálataimhoz a következő kísérleti megközelítéseket használtam:

- Meghatároztam az enzim kinetikai paramétereit (K_M , V_{max} , k_{cat}) a szubsztrát telítési görbék felvételével.
- A FRET jelenség segítségével meghatároztam az IPM kötődésének disszociációs állandóját (K_d).
- A fehérje denaturációjának időfüggését, valamint a szubsztrátok denaturációra gyakorolt hatását Trp fluoreszcencia változás alapján vizsgáltam.
- A fehérje renaturációjának kinetikáját pedig ANS kötődés vizsgálatával, és az aktivitás visszatérésének követésével is meghatároztam.

A *Myc* IPMDH jellemzésével és összehasonlításával céлом volt azon alapok megteremtése, melyek segítségével a későbbiekben meghatározhatóak lesznek a katalízisben és a doménzáródásban fontos oldalláncok, illetve atomi szinten leírható lesz az enzimműködés folyamata. Mindezek pedig hozzásegíthetnek olyan inhibitor molekulák tervezéséhez, melyek az IPMDH gátlásán keresztül megakadályozzák a baktériumok leucin bioszintézisét, mely által azok elpusztulnak, és nem lesznek képesek járványokat okozni.

Anyagok és módszerek

Anyagok

A mérésekhez használt treo-DL-3-izopropil-malát a Wako Chemicals-tól származik. A KCl, a KOH, a MnCl_2 , a NaCl, a NAD, az SDS, és az urea a Sigma, az imidazol a Serva cég gyártmánya. Az IPTG a Fermentas, az EDTA, a KH_2PO_4 , a MgCl_2 , a NADH, és a Na_2HPO_4 a Reanal készítménye. Az összes felhasznált vegyszer analitikai tisztaságú volt.

Bizonyos mérések során szükségem volt olyan oldatokra, melyek nem tartalmazznak kétértékű fémionokat. Ezeket 0,2 g/mL Sigma Chelex® 100 gyantával 2 órán át kevertettem, majd a gyantát ülepitve az oldat tisztáját használtam tovább.

Módszerek

I. Myc IPMDH bakteriális expressziója (termeltetése) és tisztítása

A *Mycobacterium* IPMDH-t tartalmazó gént peT11 vektorba klónozva kaptam meg Závodszky Péter vezette munkacsoportjától. A vektort a fehérjeláncok feltekeredését (azaz a helyes térszerkezet kialakulását) segítő GroEL és GroES chaperont termelő BL21 (DE3) cc3 kompetens sejtbe transzformáltam az alább leírtak szerint, majd a sejteket szaporítottam, és fehérjét termeltettem velük. A fehérjét a sejtek feltárásával nyertem ki, így egy olyan szuszpenziót kaptam, melynek a felülúszójában vártam a *Myc* IPMDH megjelenését, sok egyéb fehérje mellett. Az IPMDH végső tisztítására affinitás kromatográfiai eljárást alkalmaztam.

Kompetens sejtek gyártása

A DNS-t tartalmazó vektor transzformáláshoz kompetens sejtekre volt szükségem. A sejtekhez kétértékű kationokat adtam, ezáltal átjárhatóvá tettem a membránt a plazmid DNS számára.

Egy BL21 (DE3) cc3 *Ec* baktérium telepet oltottam 20 mL Luria-Bertani (LB: 5 g/L NaCl, 10 g/L élesztő kivonat, 16 g/L tripton) tápoldatba, amely spectinomycint (50 µg/mL) és chloramphenicol (17 µg/mL) tartalmazott és 37 °C-on 220 rpm-mel rázatva növesztettem éjszaka. Másnap ebből a „pre” kultúrából 200 µL-t 20 mL LB tápoldatba pipettáztam, majd a következő műveleteket végeztem el:

- 3-4 órán keresztül 37 °C-on 220 rpm-es rázással növesztettem (míg az OD₆₀₀ értéke a kb. 0,8-at elérte)
- jégen hűtöttem
- centrifugáltam 3000 rpm-mel 4 °C-on 5 percig
- a felülúszót leöntve a sejteket 5 ml TfbI oldatban szuszpendáltam
- jégen 45 percig inkubáltam
- centrifugáltam 2000 rpm-mel 4 °C-on 5 percig
- a felülúszót leöntve a sejteket 2 ml TfbII oldatban óvatosan szuszpendáltam
- 100 µL-es részletekben folyékony N₂-ben lefagyasztottam

A sejteket -80 °C-on tároltam.

Transzformálás

100 µL kompetens sejthez 1 µL plazmid DNS-t tartalmazó oldatot adtam. Jégen 20 percig inkubáltam, közben pipettaheggyel néha óvatosan megkevertem.

A következő lépés a hősokk volt. 80 másodpercig 42 °C-on tartottam, majd rögtön jégre tettem. Mikor lehült szobahőmérsékletűre, 800 µL LB oldatot adtam hozzá. Óvatos keverés után 45 percig 37 °C-on inkubáltam. Végül 3000 rpm-mel másfél percig centrifugáltam, a felülúszót pipettával leszívtam, majd a sejteket 200 µL LB-ben szuszpendáltam, majd agaróz-alapú, tápanyagokat tartalmazó LB-lemezre szélesztettem.

A lemezeket használat előtt, egy órán át 37 °C-on inkubáltam. A lemezek egyrészt 50 µg/mL koncentrációban kanamycint – mellyel szemben a transzformált DNS vektorban van egy rezisztencia gén – másrészt 50 µg/mL spectinomycint és 17 µg/mL koncentrációjú chloramphenicol tartalmaztak. Ez utóbbiakra azért volt szükség, hogy csak azok a BL21 (DE3) cc3 sejtek nőjenek fel, melyek a chaperon fehérjét is termelik. Az egyik lemezre 20,

a másikra 180 μL szuszpenziót vittem fel. Egy éjszakán keresztül 37 °C-on tartottam a lemezeket.

A fehérje termelése

A legáltalánosabb módszer az, amikor a sejteket tápoldatba juttatjuk, és a sejtek szaporítása, valamint az azt követő fehérjetermelés rázó gépben történik. A *Thermus thermophilus* IPMDH-t így termeltük. De használhatunk fermentort is, ami által az oxigén-, és a tápanyag-koncentrációt külön-külön szabályozhatjuk. Így a fehérje termelésének sebessége befolyásolható. A *Myc* IPMDH termelését mindkét módszerrel megpróbáltuk.

Fehérje expresszió hagyományos (rázatott) kultúrában

A termelés napját megelőző este egy, a lemezen felnőtt, transzformált telepet 20 mL LB oldatba oltottam, amely kanamycint (50 $\mu\text{g/mL}$) spectinomycint (50 $\mu\text{g/mL}$) és chloramphenicol (17 $\mu\text{g/mL}$) tartalmazott és 37 °C-on 220 rpm-mel rázatva növesztettem éjszaka („starter” kultúra). A LB tápoldatot is elkészítettem és kuktában forralva sterilizáltam. 4 db. 2 L-es Erlenmayer-lombikot hőlégsterilizálóval sterilizáltam.

Másnap reggel a tápoldathoz hozzáadtam az antibiotikumokat (kanamycin 50 $\mu\text{g/mL}$, spectinomycin 50 $\mu\text{g/mL}$ és chloramphenicol 17 $\mu\text{g/mL}$). Egy Erlenmayer-lombikba 500 mL tápoldat került és hozzá 5 mL a starter kultúrából. 37 °C-on 220 rpm-mel rázatva 3-4 óráig szaporítottam a sejteket, míg az $\text{OD}_{600\text{ nm}} = 0,6 - 0,8$ el nem érte. Ekkor 0,4 mM (96 mg/L) IPTG-t adtam a rendszerhez (indukálás), és további 4 órán át inkubáltam az elegyet, hogy a fehérje termelését elősegítsem. Ennek ellenőrzésére termelés során mintát (lásd alább) vettem indukálás előtt és után is.

A termelés végén 4 °C-on 4000 rpm-mel 15 percig centrifugáltam a szuszpenziót. A csapadékot 20 mL lízispufferben (10 mM imidazol, 50 mM Na-foszfát, 300 mM NaCl pH=8,0) szuszpendáltam. A sejteket -80 °C-on tároltam.

Fehérje expresszió fermentorban

A fermentálás előtt a minimál tápoldatot (KH_2PO_4 13,3 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,741 g/L, glicerín 30 g/L, citromsav H_2O 1,86 g/L, H_3BO_3 3 mg/L, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,985 mg/L,

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2,2 mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 17,5 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 114 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mg/L, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 10,87 mg/L, EDTA 8,4 mg/L) az etetőoldatot (87% glicerin 81,25 V/V%, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4,96 g, H_3BO_3 5,1 mg/L, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5,07 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3,74 mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 29,75 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 45,6 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4 mg/L, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 13,59 mg/L, EDTA 14,28 mg/L) és az élesztőkivonatot (320 g/L) sterilizáltam, majd a minimál tápoldatba 400 g/L végkoncentrációban $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -ot adtam. Mindhárom oldathoz kihűlés után antibiotikumokat adtam (50 mg/mL kanamycin 10 mg/mL spectinomycin és 17 mg/mL chloramphenicol).

A „starter” kultúrát az előző leírás alapján készítettem itt is. A berendezés hőmérsékletét 30 °C-ra állítottam. A fermentor elindítása után az oxigénszint csökkenni kezdett, majd megugrott, kb. 17 óra elteltével. Ez jelezte a tápanyag elfogyását a kultúrából. Ezután a glicerines tápoldattal etettem a sejteket egészen addig, míg az oxigénszint 15 % alá csökkent. Ekkor élesztőkivonatot adtam hozzá, majd indukáltam IPTG-vel. 15 percenként újabb élesztőkivonat-adagot adtam a rendszerhez 3 órán keresztül miközben a hőmérséklet 25 °C volt.

A termelés végén 4 °C-on 4000 rpm-mel 15 percig centrifugáltam a szuszpenziót. A csapadékot 20 mL lízispufferben (10 mM imidazol, 50 mM Na-foszfát, 300 mM NaCl pH=8,0) szuszpendáltam. A sejteket -80 °C-on tároltam.

A sejtek feltárása

A feltárás mindkét expressziós módszer esetén a következőképpen történt. A -80 °C-ról kivett sejteket kiolvadás után 20 percen át jégen 25 s-os szünetekkel szonikáltam. Ezután 18000 rpm-mel 4 °C-on 30 percig centrifugáltam, és a felülúszót leöntöttem a kiülepedett csapadékról.

Mintavétel a fehérjetermelés ellenőrzésére

Egyszerű esetben a termelődött fehérje a szonikálás során a felülúszóba kerül, melyet kromatográfiás tisztítás követ. Ha azonban a fehérje inklúziós test formájában a sejttörmelékben marad, akkor a centrifugálás után megmaradt csapadékból a fehérjét csak denaturálószerben lehet feloldani, de ezután még azt renaturálni is kell.

A fehérjetermelés egyes lépéseit, illetve a kromatográfia során kapott frakciók tisztaságát SDS gélelektroforézissel ellenőriztem (lásd alább).

Az indukálás előtti és utáni sejtszuszpenzióból 1 mL mintát vettem és azt 13000 rpm-mel 5 percig centrifugáltam. A csapadékot 100 μ L 25 mM-os MOPS pufferben (pH=7,6 KOH-dal beállítva) szuszpendáltam. A továbbiakban ezt a puffert (melyet röviden MOPS puffernek nevezek) használtam a tisztított fehérjével végzett kísérletekben is. A sejtszuszpenzióból, a szonikálás utáni felülúszóból, a kromatográfia során áteső, valamint az elúciós csúcshoz közeli frakciókból 10-20 μ L mintát vettem, majd μ L-enként 1 μ L mintakotélt (lásd alább) adtam hozzájuk. Az SDS-PAGE gélre 5-10 μ L-t vittem fel.

A szonikálás utáni csapadékot MOPS pufferben szuszpendáltam, és a fentiek szerint szintén SDS gélelektroforézissel analizáltam.

Poliakrilamid gélelektroforézis

A natív állapotú fehérjék poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) segítségével elválaszthatóak egymástól relatív töltésük alapján, mivel az egységnyi tömegre jutó töltésszám más és más. Ráadásul a gél mintegy molekulaszűrőként viselkedik, azaz méret és alak szerint is elkülönülnek a fehérjék. Ugyanis az akrilamid vizes oldatban, megfelelő katalizátorok (ammónium-peroxi-diszulfát, AMPER) és iniciátorok (tetrametil-etilén-diamin, TEMED) jelenlétében gyökös polimerizációra képes. N,N-metilén-bisz-akrilamidot alkalmazva, a polimer láncok között hidak képződnek így térhálós polimer jön létre.

Kísérleteim során az ún. "diszkontinuus" elektroforetikus technikát alkalmaztam, mely során a futtató (azaz szeparáló) gél (10 %-os) fölé egy ún. koncentráló gél (5 %-os) polimerizáltam. Valamint háromféle puffert használtam. Az elválasztó puffer 1,5 M TRIS-HCl-t tartalmazott és pH-ja 8,8 volt. A tömörítő puffer 0,5 M-os volt a TRIS-HCl-re nézve a pH-ja pedig 6,8 volt. A futtató puffer pH-ja 8,3 volt és 25 mM TRIS-HCl-t és 190 mM glicint tartalmazott. A gélben lévőkben kloridion, a tank pufferben pedig glicinát ion volt az anion.

A koncentráló gélben a molekulaszűrő hatás még nem érvényesül, ugyanis a pH értéke 6.5-6.8 közé esik, azaz pufferben lévő glicin ikerionos szerkezetű, így mobilitása lecsökken. Azaz lokálisan csökken a töltéssel rendelkező molekulák száma, ami megnöveli az ellenállást. Ohm törvénye miatt a térerő nő, tehát a fehérjék mozgása felgyorsul. Egészen addig gyorsan haladnak, míg el nem érik a kloridion frontot, ahol kicsi az ellenállás, így a térerő is, azaz a fehérjék sebessége lecsökken, így összetorlódva vékony sávban vándorolnak a futtató gél felszínéig.

A futtató gélben a pH értéke 8.8-9.0 között van, azaz glicinát anionok vannak jelen, nem alakul ki töltéshiány, azaz a fehérjék fajlagos töltésük alapján eltérő sebességgel vándorolnak.

Munkáim során mind a natív, mint az SDS (sodium-dodecyl-sulphate)-, poliakrilamid gélelektroforézist alkalmaztam:

- *Natív PAGE*

A natív gélelektroforézis során nem denaturáltam a fehérjét, és nem kezeltem SDS-sel sem, tehát mind az alak, töltés és molekulaméret alapján történik a fehérjék elválasztása.

- *SDS-PAGE*

Az SDS gélelektroforézis során a fehérjéket egy a diszulfid hidakat bontani képes redukálószerrel (DTT, ditiotritol), illetve SDS-sel kezeltem, mely (erős anionos detergens lévén) apoláris részeivel hozzákötődik és fellazítja a fehérjék belső apoláris régióit, tönkretéve ezzel a natív térszerkezetet. Mindemellett az SDS negatív töltéssel látja el a fehérjéket, melynek mértéke egyenesen arányos a polipeptidlánc hosszával, így a relatív töltése azonos lesz az egyes fehérjéknek. Tehát az SDS gélelektroforézis során a fehérjék töltése és alakja megegyezik, és csupán molekulaméret szerinti elválasztás történik.

A gélre felvitt fehérjemennyiségek fermentlére visszaszámolva egyenlők voltak. A gélek festéséhez Coomassie Brilliant Blue festéket használtam 2-propanolos és ecetsavas oldatban. Előhíváshoz pedig 7,5 %-os ecetsavoldatot használtam.

Renaturálás

A szonikálás után keletkezett csapadékot 15 mL 50mM imidazolt, 300 mM NaCl-ot és 1 % TRITONX-et tartalmazó 50 mM Na-foszfát (pH=8,0) pufferben szuszpendáltam. 3-szor 1 percre szonikáltam, majd 15 percen át 4 °C-on 8000 rpm-mel centrifugáltam. A felülúszóból mintát vettem, a csapadékot pedig TRITONX-mentes pufferben szuszpendáltam.

8000 rpm-mel 15 percen át 4 °C-on centrifugáltam, majd megint szuszpendáltam és hasonlóképpen centrifugáltam. Ezzel a megismételt művelettel lényegében a csapadék felületén tapadó felülúszót kimostam. A csapadékot 15 mL 8,5 M-os ureás pufferben (50mM imidazol, 300 mM NaCl és 50 mM Na-foszfát) szuszpendáltam, mely alatt a csapadék fehérjéinek nagy része denaturálódva oldatba megy.

Újabb centrifugálás után a felülúszót dialízishártyába töltöttem, majd 1 M DTT jelenlétében dializáltam az ureát a fehérjeoldatból úgy, hogy fokozatosan, kétóránként 1 M-rel csökkentettem az urea koncentrációját a dialízislében. A kivett DTT-t is pótoltam. A fehérjeoldatot 13000 rpm-mel 20 percig centrifugáltam. A felülúszóból és csapadékból is mintát vettem.

Ni²⁺ affinitás kromatográfia

A Ni-NTA Superflow affinitás kromatográfia, az elválasztandó molekula egy speciális tulajdonságán alapul. Jelen esetben polipeptidlánc C-terminális végén található 6 db hisztidin aminosav koordinálódik az oszlopon lévő nikkalionokhoz. Ezáltal az IPMDH enzim elkülöníthető a többi fehérjétől és az egyéb szennyezőanyagoktól.

A mosópuffer, melyet az oszlop egyensúlyba hozatalához, valamint a minta bemosásához használtam 50 mM Na-foszfát (pH=8,0) puffer volt, amely 300 mM NaCl-ot és 50 mM imidazolt is tartalmazott. Az elúciós 50 mM Na-foszfát (pH=8,0) puffer magas koncentrációjú imidazolt és 300 mM NaCl-ot tartalmazott. Azért használtam eluensként imidazolt, mert az kiszorítja a hisztidin-láncon keresztül kötött fehérjét a nikkalion mellől, és nikkal-imidazol komplex alakul ki, így a fehérje az állófázisból a mozgóba kerül. A mozgófázis sebessége 1 mL/perc volt.

Először 3-szoros oszloptérfogatú (3 x 9 mL) mosópufferrel egyensúlyba hoztam az oszlopot. A mintát felvittem, majd újra 3-szoros oszloptérfogatú mosópufferrel mosva eltávolítottam az oszlopra nem kötődött szennyező anyagokat. Ezután vagy közvetlenül a 250 mM imidazolt tartalmazó elúciós pufferrel, vagy lineáris gradienst alkalmazva (50 és 250 mM között, 50-50 ml térfogatban) eluáltam a His-tag-n keresztül kötött Myc IPMDH-t. A fehérje mozgófázisban való megjelenését 280 nm-en detektáltam.

Dialízis

A *Myc* IPMDH-t tartalmazó frakciókat összeöntöttem kb. 10-20 mL össztérfogatban , és 1 L 1 mM DTT-t tartalmazó MOPS pufferrel egy éjszakán keresztül dializáltam. Reggel kicseréltem a dialízislevet szintén 1 L friss DTT-s pufferre és még 2 órán keresztül dializáltam.

II. Koncentrációk meghatározása

Fehérje-koncentráció meghatározása

Az IPMDH abszorpciós koefficiensét 280 nm-en az $\epsilon = 5500 \cdot Trp + 1490 \cdot Tyr + 125 \cdot Cys - Cys$ (diszulfid) képlet segítségével [21] határoztam meg. A monomer *Myc* IPMDH esetén: $\epsilon = 15930 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ értéket kaptam. A méréseket Jasco V-550 típusú spektrométerrel végeztem el 260 és 280 nm-en. A 260 nm-en mért adatot a tisztaság ellenőrzésére (nukleotid szennyeződés kimutatására) használtam, a fehérje koncentrációját a 280 nm-en mértből számítottam a Lambert-Beer törvény ($A = \epsilon cl$) alapján.

Bizonyos esetekben a fehérje mg/mL-es egységekben megadott koncentrációjára is szükség volt. Ennek kiszámításához az enzim móltömegét kell ismernünk, amely a His-tag-t tartalmazó alegységre számítva: 38845 D.

NAD, NADH koncentrációjának meghatározása:

A mérés alapja az, hogy a NAD esetében a fényelnyelés maximuma 260 nm-nél van az ultraibolya tartományban. A NADH esetében egy másik elnyelési csúcs is megfigyelhető 340 nm-nél. A fényelnyelést Jasco V-550 típusú spektrométerrel mértem, és a koncentrációt a Lambert-Beer törvény ($A = \epsilon cl$) alapján számoltam. Az ϵ értéke NAD esetén 260 nm-en $18000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, míg a NADH esetén 340 nm-en $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

IPM és NAD koncentráció enzimatis megatározása

Az IPMDH enzimet felhasználtam a szubsztrátja és a kofaktora koncentrációjának meghatározásához. A mérést az aktivitásméréshez (lásd következő pont) hasonlóan végeztem el, az ismeretlen koncentrációjú szubsztrát mellett a többi reagenst (szubsztrátot) telítési koncentrációban alkalmaztam. Ebben az esetben megfelelően magas IPMDH aktivitás esetén az ismeretlen koncentrációjú szubsztrát teljes mennyisége néhány percen belül teljesen átalakul és vele azonos koncentrációjú NADH keletkezik. Az 1. egyenlet alapján képződött NADH okozta abszorbancia változást detektáltam Jasco V-550 típusú spektrométerrel, és ebből a Lambert-Beer törvény alapján számoltam ki a NADH koncentrációját, amely meadta az enzimreakcióban teljesen átalakult IPM vagy NAD koncentrációját.

Aktivitásmérés

Az IPMDH enzim az IPM-et kétértékű fémion jelenlétében dekarboxilezi és oxidálja, közben a NAD-ot redukálja és NADH keletkezik (1. egyenlet). Így a reakció 340 nm-en követhető, ugyanis itt csak a NADH-nak van elnyelése. A reakció kezdeti, közel lineáris szakaszából számolható az 1 perc alatti fényabszorpció változás, amely egyértelműen meadja az 1 perc alatt átalakult szubsztrát koncentrációt, azaz az enzimreakció kezdeti sebességét (v_0).

A méréseket termosztáttal ellátott Jasco V-550 típusú spektrofotométerrel végeztem 20 °C-on MOPS pufferben. A reakcióelegyet úgy állítottam össze, hogy benne az IPM végkoncentrációja 0,2 mM, a NAD-é 1,5 mM, míg a Mn^{2+} ioné szintén 0,4 mM legyen. Ezek az értékek a *Thermus thermophilus* IPMDH kinetikai adatai alapján telítési szubsztrát-koncentrációknak felelnek meg.

III. Enzimkinetikai analízis

Az enzimek legfontosabb kinetika jellemzői a szubsztrát telítési görbe felvételével határozhatóak meg. Az egységnyi enzimkoncentrációnál elérhető maximális reakció-sebesség (k_{cat}) az adott enzimkoncentrációnál meghatározott maximális reakció-sebességből (V_{max}) számítható ki. Mivel spektrofotometriás méréseknél a V_{max} -t gyakran $\Delta A_{max}/idő$ egységekben kapjuk meg, úgy a 2. egyenlet szerint kell azt kiszámítani, azaz osztjuk a termék moláris

abszorpciós együtthatójával (ϵ_{NADH}) és a mérésnél alkalmazott enzimkoncentrációval (c_{enzim}). A reakciósebesség lényegében az időegység alatt átalakított szubsztrát moláris koncentrációja.

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{\epsilon_{\text{NADH}} \cdot c_{\text{enzim}}} \quad 2. \text{ egyenlet}$$

A másik jellemző paraméter a Michaelis állandó (K_M), mely az a szubsztrát koncentráció-érték, ahol a reakciósebesség a V_{max} felét éri el. Ez a konstans az enzim-szubsztrát komplex katalitikus kölcsönhatására jellemző paraméter. Minél kisebb ez az érték, annál specifikusabb a kölcsönhatás. A V_{max} értékeket a szubsztrát telítési görbék végtelen koncentrációra extrapolált értékei adják meg a 3. egyenlet értelmében. A szubsztrát telítési görbe meghatározása során kapott pontokra (adott szubsztrát koncentrációnál ($[S]$) mért kezdeti reakciósebesség (v)) a Michaelis-Menten-egyenlettel (3. egyenlet) leírható görbét illesztve mind a V_{max} mind a K_M értéke meghatározható.

$$v = V_{\text{max}} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad 3. \text{ egyenlet}$$

Gyakran jellemzik még az enzimeket az előbbi két paraméter hányadosával (k_{cat}/K_M), ez az ún. katalitikus hatékonyság mérőszáma.

Mivel az IPMDH többszubsztrátos enzim, ezért az egyes szubsztrátok telítési görbéinek meghatározásakor az enzim aktivitását mértem az adott szubsztrát különböző koncentrációi esetén, míg a többi szubsztrát telítési koncentrációban volt jelen.

IV. CD-spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával a fehérjék másodlagos és harmadlagos szerkezetéről nyerhetünk információt. Ugyanis a fehérjék optikailag aktívak, azaz a polarizált fény síkját elforgatják, és ez az elforgatás különböző mértékű a jobbra és balra cirkulárisan polarizált fény esetén. Ráadásul különböző mértékben nyelik el a kétféle irányban cirkulárisan polarizált fényt. Így elliptikusan polarizált fény jön létre, azaz a térerősség vektorok egy ellipszis mentén váltakoznak. Az abszorpciós koefficiensek különbségére és az ellipticitásra az alábbi összefüggés vonatkozik:

$$\epsilon_{\text{jobbra}} - \epsilon_{\text{balra}} = \Delta\epsilon = (100 \cdot \arctan(b/a)) / (c \cdot l \cdot 3298) \text{ [fok dm}^2 \text{ / mol]}$$

ahol b és a az ellipszis kis és nagytengelye, c a koncentráció l pedig a kűvetta hossza. Az $\arctan(b/a)$ kifejezés az ellipticitás (θ).

A $\Delta\epsilon$ értéke nagyon érzékeny a szerkezetre, ezáltal a pH változást, a denaturációt és esetleg a szubsztrátok kötődését is követni lehet meghatározásával. Távoli UV tartományban (180-260 nm) a másodlagos szerkezetről, közeli UV tartományban (260-320 nm) pedig a harmadlagos szerkezetről nyerhetünk információt.

A méréseket JASCO 720 spekropolariméteren végeztem 20 °C-on (Neslab RTE 111 termosztát) távoli UV tartományban. Az IPMDH koncentráció 1 mg/ml (13,6 μ M), a cellahossz pedig 0,1 mm volt.

V. Fluoreszcencia spektroszkópia

A fluoreszcenciás mérések alapja az, hogy gerjesztés hatására az elektronok egy magasabb energiaszintű pályára jutnak, majd a gerjesztés megszűntével újra alapállapotba kerülnek, miközben kisugározzák a 2 állapot közötti energiakülönbséget. A kisugárzott fényt fluoriméter segítségével adott hullámhosszon vagy hullámhossz tartományban lehet detektálni. Mivel a megvilágító fény intenzitása több nagyságrenddel nagyobb, mint a kisugárzott fluoreszcens fényé, az észlelés iránya nem eshet egybe a megvilágítás irányával, erre alkalmas a kettős monokromátorral ellátott Spex Fluormax 3 spektrofluoriméter.

Fehérje fluoreszcencia

UV gerjesztés hatására a fluorofór csoportot tartalmazó aminosavak (triptofán, tirozin, fenilalanin) saját (belső) fluoreszcenciát mutatnak. A legkevésbé a fenilalanin gerjeszthető, ezért a tirozint és a triptofánt szokták vizsgálni. 275 nm-en a két aminosav-maradék egyszerre gerjeszthető, míg 295 nm-en a triptofán szelektíven sugározható be. A megfigyelhető fluoreszcencia jellemzőit (abszorpciós és emissziós maximum, relatív fluoreszcencia intenzitás) az aminosavak kölcsönhatásai módosíthatják. E kölcsönhatások függenek például az aminosav-maradék fehérje szerkezetében való elhelyezkedésétől, valamint az intramolekuláris fluoreszcencia kioltókkal való kapcsolatától, azaz a molekuláris környezettől.

A fluoreszcencia érzékeny a fehérje térszerkezetére, ezért vizsgálata alkalmas a fehérje denaturációjának és renaturációjának követésére. Ezen folyamatok során az emissziós

maximum, és a relatív intenzitás időbeli változását vizsgáltam Spex Fluoromax-3 spektrofluoriméter segítségével.

ANS-fluoreszcencia

Az ANS hidrofób jellegű fluoreszcens festéket sok esetben használják a fehérjemolekulák felszíni tulajdonságainak jellemzésére, ami változhat pl. a szubsztrátok kötődésekor, de akkor is, amikor a fehérje szerkezete jelentősen megváltozik, pl. denaturálódik. Az ANS-fluoreszcencia során lényegében azt használjuk ki, hogy az ANS nem specifikus módon kötődik a molekulák hidrofób felületéhez, és ezt fluoreszcencia jel változása kíséri. Rendszerint a hidrofób felülettel rendelkező denaturációs intermedierekhez, vagy magához a denaturált fehérjéhez kötődik jól, majd a renaturáció során a kötött ANS kiszorul, ami fluoreszcencia intenzitás csökkenést okoz.

Az ANS-oldat koncentrációját spektrométerrel 350 nm-en határoztam meg ($\epsilon_{350}=4954 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A fluorimetriás kísérletekben az ANS molekulát 350 nm-en gerjesztettem, és a kisugárzott fényt 400 és 600 nm között detektáltam.

Fluoreszcencia rezonancia transzfer

Az IPMDH-nál korábban leírt FRET jelenség [8] lényege, hogy a gerjesztett Trp olyan hullámhosszúságú fényt bocsát ki ($\lambda_{\text{max}}=340 \text{ nm}$), mely gerjeszti a kötött NADH molekulát. Ezáltal a fehérje fluoreszcens intenzitása lecsökken 340 nm-nél, a NADH emissziója pedig megnő 410 nm-nél. A FRET mértékét nagyban befolyásolja a Trp és a NADH távolsága és a gyűrűk orientációja, azaz a fehérje térszerkezete. Ezért a FRET-jel csökkenését követve időben jól követhető a denaturáció.

A FRET azonban a natív enzim tulajdonságainak jellemzésére, például a szubsztrát kötés erősségének jellemzésére is alkalmazható. Mivel az IPMDH-nál a FRET jelensége csak kötött MnIPM jelenlétében detektálható (lásd fent) ezért a FRET mértékének különböző IPM koncentrációnál történő meghatározásával a MnIPM kötődésének disszociációs állandója (K_d) is kiszámítható. Utóbbi mérés azért előnyös, mert nem aktivitáson alapul (ugyanis az 1. egyenlet végterméke, a NADH az egyik kromofór, tehát a mérés során kémiai reakció nem zajlik), így csak a mért szubsztrát koncentrációja változik. A számolás során a 410 nm-en

mért intenzitást (I) az IPM koncentrációjának ($[c_{IPM}]$) függvényében ábrázoltam, és a pontokra a 4. kötődési egyenlet alapján görbét illesztettem.

$$I = I_{\max} \cdot \frac{[IPM]}{[IPM] + K_d} \quad \text{4. egyenlet}$$

A FRET mérése során 48 µg/ml natív *Myc* IPMDH-hoz először 2 mM koncentrációban DTT-t, majd 12 µM NADH-t, 3 mM MgCl₂-ot, végül pedig 0,3 mM IPM-et adtam (a K_d mérése esetén az IPM koncentrációja a 0,001 - 0,7 mM-os tartományba esett). A Trp oldalláncok gerjesztése 295 nm-en történt, az emissziós rések 4-4 nm-esek voltak.

VI. A denaturáció és a renaturáció kinetikájának mérése

A *Myc* IPMDH denaturációjának és renaturációjának időbeli folyamatát a fehérje saját (belső) fluoreszcencia változását meghatározva követtem Spex Fluoromax-3 spektrofluoriméter segítségével, mely termosztált mintatartóval (20°C) rendelkezik. A folyamatokat a natív, illetve a denaturált enzimnek közvetlenül a fluoriméter küvettájában lévő denaturálószer ill. pufferbe való hígításával indítottam el. A *Myc* IPMDH molekulában csak 1 db triptofán van, azaz 295 nm-es gerjesztés esetén harmad akkora jel alakulna ki, mint a *Tt* IPMDH esetén, ezért a gerjesztés 275 nm-en történt, ahol a triptofán mellett a tirozinok is gerjesztődnek, továbbá töményebb fehérje oldatot használtam a vizsgálatokhoz. A folyamatos besugárzás hatását minimalizálva az emittált fény spektrumát 2-, majd 5-percenként vettem fel. Az extinció és emissziós rések nagysága 4-4 nm volt, ami pontatlanabb mérést eredményezett, de növelte a csúcsintenzitást.

A *Myc* IPMDH denaturációjának mérése során a fehérjét 8 M ureát tartalmazó MOPS pufferbe kevertem, 24 µg/mL koncentrációban. A renaturáció mérése előtt egy órán keresztül szobahőmérsékleten 8 M ureát tartalmazó MOPS pufferben denaturáltam a 0,6 mg/ml koncentrációjú enzimet (az időtartamot a denaturációs adatok alapján állapítottam meg). A renaturáció folyamatának indításakor a fehérjét 60 µg/ml koncentrációra hígítottam a küvettában lévő 2 mM DTT-t tartalmazó MOPS pufferben, így az urea koncentrációja 0,8 M lett. A hígítás és az elegy összekeverése 3-5 másodpercet vett igénybe.

A renaturáció időgörbét az enzimaktivitás visszatérésével is meghatároztam, melyhez a 4. II. fejezetben leírt spektrofotométeres módszert alkalmaztam. A denaturált IPMDH renaturációját a spektrofotométer küvettájában előkészített aktivitási elegybe való hígítással

indítottam el és a reaktiválódást folyamatosan regisztráltam 340 nm-nél (a mért abszorbanancia-idő görbe idő szerinti deriválásával aktivitás-idő görbét kaptam).

A renaturáció időbeli lefolyását ANS-fluoreszcenciával, és FRET mérésével is követtem. Előbbi esetén a fentebb leírtak szerint a denaturációs elegyből 6 µg/ml-re hígítottam a fehérjét a küvettában lévő 16 µM ANS-t tartalmazó MOPS pufferben. A gerjesztés 350 nm-en történt, az intenzitást 480 nm-en mértem, 2-4-es extinció és emissziós rések mellett. FRET mérése során 60 µg/ml-re hígítottam a fehérjét, és a küvettában lévő anyagok, valamint a mérési paraméterek pedig a fentebb leírtak szerint alakultak.

A denaturáció folyamán a mérési pontok időgörbéje exponenciális egyenlettel volt leírható. Az 5. egyenlet összeadást tartalmazó formája időben növekvő görbét ad, azaz a Trp emissziós csúcs változásának követésére alkalmas, míg a különbséget tartalmazó forma időben csökkenő görbét ad, azaz a fehérje-fluoreszcencia intenzitásának változását írja le.

$$I = I_0 \pm A \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{5. egyenlet}$$

Ahol I a mért mennyiség, t az idő, I_0 a natív fehérje fluoreszcenciája illetve a Trp emissziós csúcsának maximuma, A pedig a natív és a denaturált fehérje fluoreszcencia-intenzitásának, illetve Trp csúcsaik maximumának különbsége, azaz konstansok, míg k a sebességi együttható, melyből a 6. egyenlet szerint lehet a felezési időt ($t_{\frac{1}{2}}$) kiszámolni.

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{6. egyenlet}$$

A renaturáció folyamata is exponenciális görbével jellemezhető. A reaktiválódási görbe deriváltjának leírására a 7. egyenlet alkalmas, míg az ANS-fluoreszcencia mérés pontjaira illeszkedő görbét a 8. egyenlet írja le.

$$y = a * (1 - e^{-k * t}) \quad \text{7. egyenlet}$$

$$y = b * e^{-k * t} \quad \text{8. egyenlet}$$

A kifejezésekben a és b a fehérjére jellemző konstansok, y a mért mennyiség (aktivitás illetve fluoreszcencia intenzitás), t az idő és k a sebességi együttható.

Eredmények

Különböző baktériumokból származó IPMDH-k szekvenciájának összehasonlítása

Az irodalomban a *Myc* IPMDH-ről kevés adat áll rendelkezésre, viszont néhány, más baktérium által termelt IPMDH-t jobban ismerünk. Kiválasztottam 5 más baktériumból származó IPMDH-t, melynek kristályszerkezete ismert, és annak eldöntésére, hogy milyen fokú hasonlóságot valószínűsíthetünk a *Myc* IPMDH-val, összehasonlítottam az aminosav-szekvenciáikat.

Az egyes baktériumok által termelt IPMDH fehérjék aminosav-szekvenciáját az alábbi oldalról értem el: <http://www.uniprot.org/uniprot>. A szekvenciákat a <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html> oldalon található algoritmussal hasonlítottam össze. A kapott eredményeket táblázatban foglaltam össze.

5.1. táblázat: A *Myc* IPMDH és más baktériumok által termelt IPMDH-k szekvenciájának összehasonlítása. A hasonlóság alatt azokat az azonos helyen lévő aminosavakat érti a program, amelyek vagy azonosak, vagy különböznek ugyan, de kémiai sajátosságaik nagyon hasonlítanak egymásra. Hézagnak pedig azokat a helyeket nevezi a program, ahol a szekvencia illesztés után az egyik szekvenciában lévő aminosavnak a másik szekvenciában nincs megfeleltethető.

<i>Mycobacterium tuberculosis</i> IPMDH (hossz: 336)				
Származás	Hossz	Azonosság	Hasonlóság	Hézagok
<i>Thermus thermophilus</i>	345	146 (40,9 %)	200 (56,0 %)	33 (9,2)
<i>Salmonella typhimurium</i>	363	136 (34,2 %)	200 (54,6 %)	33 (9,0 %)
<i>Escherichia coli</i>	363	136 (37,3 %)	196 (53,7 %)	32 (8,8 %)
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	358	142 (38,9 %)	198 (54,2 %)	36 (9,9 %)
<i>Thermotoga maritima</i>	354	136 (37,5 %)	196 (54,0 %)	36 (9,9 %)

A táblázatból látható, hogy a *Myc* IPMDH csupán 34-41 %-os egyezést mutat a többi IPMDH-val, és legjobban a *Tt* IPMDH-ra hasonlít. Ezért kísérleti vizsgálataimat elsősorban a *Tt* IPMDH esetén végzett vizsgálatokhoz fogom hasonlítani. Emellett érdekessé vált a mezofil

Myc IPMDH-nak a szintén mezofil *Ec* IPMDH-val történő összehasonlítása is, ezért eredményeim között ezt is tárgyalni fogom.

5.2. táblázat: IPMDH szekvenciák páronkénti összehasonlítása. A táblázat a fentiekben leírt módon számított azonossági százalékokat tartalmazza.

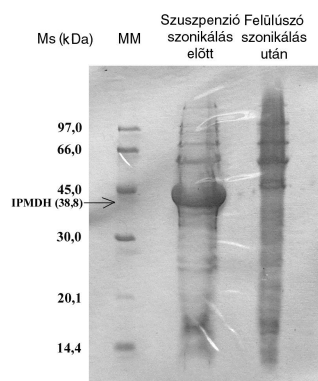
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Thermotoga maritima</i>	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>Thermus thermophilus</i>	40,9 %	53,5 %	52,8 %	48,5 %	47,9 %	100 %
<i>Salmonella typhimurium</i>	34,2 %	55,2 %	48,9 %	94,2 %	100 %	
<i>Escherichia coli</i>	37,3 %	55,5 %	50,7 %	100 %		
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	38,9 %	50,8 %	100 %			
<i>Thermotoga maritima</i>	37,5 %	100 %				
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	100 %					

A különböző szervezetekből származó IPMDH-k szekvenciáját páronként összehasonlítva (lásd 2. táblázat) megállapítottam, hogy a többi IPMDH sokkal jobban hasonlít egymásra, a *Myc* IPMDH esetén azonban lényegesen (átlagosan 10 %-kal) kisebb a hasonlóság.

A fentiek alapján azt vártam, hogy a *Myc* IPMDH-nak nagy valószínűséggel lesznek eltérő tulajdonságai a többi IPMDH-tól. A kérdés az, hogy milyen jellegű és milyen mértékű különbségek lesznek észlelhetők?

***Myc* IPMDH termelés hagyományos (rázatott) kultúrában**

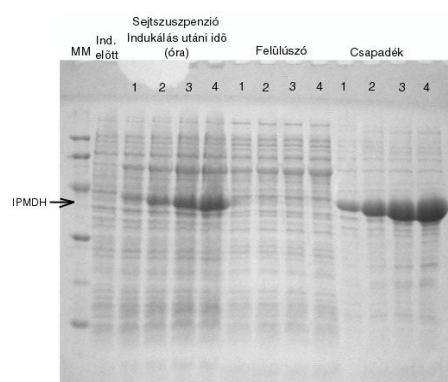
Az Anyagok és módszerek című részben leírt LB-tápoldatban, 37 °C-on, rázatott kultúrában történő termelés esetén a fehérje gyakorlatilag teljes egészében a csapadékban maradt, nem sikerült azt a felülúszóban kimutatnom (5.1. ábra).



5.1. ábra: A *Myc* IPMDH első termelési kísérletének ellenőrzése SDS gélelektroforézis segítségével. Az MM a molekulamarkert jelöli, eszerint fentről a 3. hely közelében van az IPMDH.

A gélképen jól látszik, hogy nagy mennyiségű IPMDH fehérje termelődött, de a felülúszóba szinte semmi sem került, azaz a fehérje csapadékban maradt.

A probléma oka lehetett a gyors fehérjetermelődés. Ezt először úgy próbáltam kiküszöbölni, hogy a termelést alacsonyabb hőmérsékleten (30 °C-on) ismételt meg, így csökkentve a reakciók sebességét. Az indukálás előtt a 37 °C-os rendszert, fél óra alatt 30 °C-ra hűtöttem. Az eljárás során mintát vettem indukálás előtt és indukálás után (1, 2, 3, 4 órával), majd szonikáltam és centrifugáltam ezeket. Azért vettem mintát különböző időpontokban, mert azt reméltem, hogy a fehérje termelés egy korábbi szakaszában, amikor még alacsonyabb a fehérje koncentráció, talán kisebb az esély az aggregációra. Az SDS gélelektroforézissel történt analízisnél magából a sejtsuszpenzióból valamint a szonikálás utáni felülúszóból és a csapadékból vittem fel (5.2. ábra).



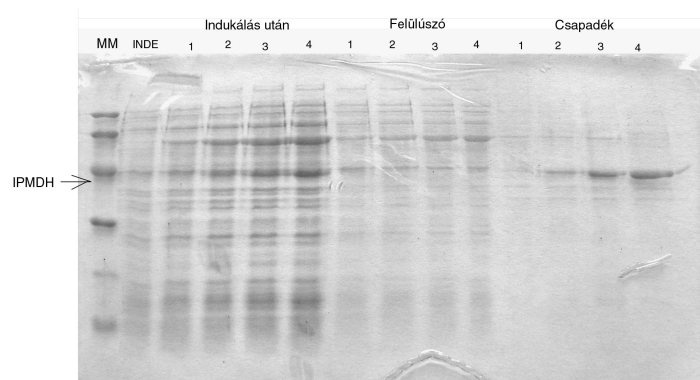
5.2. ábra: A *Myc* IPMDH 30 °C-on történő termelésének ellenőrzése SDS gélelektroforézis segítségével. Az MM a molekulamarkert jelöli, eszerint fentről a 3. hely közelében van az IPMDH. A számok azt jelölik, hogy hány óra elteltével vettem a mintát.

A gélen jól látszik, hogy a mintában és a csapadékban az idő függvényében nő az IPTG indukció hatására keletkező fehérje mennyisége. Azonban a felülúszóban ez nem tapasztalható, még az 1 óra utáni mintánál sem, ahol a legkisebb volt a fehérjekoncentráció. A

gélkép alapján tehát itt is a csapadékban maradt a termék. Tehát kiderült, hogy a termelés hőmérsékletének és idejének változtatása (azaz a keletkező fehérje mennyiségének szabályozása) nincs hatással a felülúszóban lévő fehérje mennyiségére, ugyanis hiába vettünk mintát különböző időpontokban, a felülúszóba egyik esetben sem került fehérje.

Próbatermeléseket végeztem úgy is, hogy különböző OD₆₀₀ értékeknél indukáltam. Az SDS PAGE analízis azonban arányaiban hasonló lett a fentebb bemutatottal, kis eltérést csak az összes fehérje mennyiségében lehetett felfedezni (nincs bemutatva). Az OD₆₀₀ értékek és a gél alapján azt a következtetést vontam le, hogy a sikeres termelést nem segíti elő az OD₆₀₀ változtatása sem, ugyanis a fehérje minden esetben a csapadékban maradt.

A következő próbatermelést lényegesen alacsonyabb hőmérsékleten 16°C-on végeztem, a fent leírtakhoz hasonlóan, itt a különböző OD₆₀₀ értékeknél történő indukálást két szélsőérték esetén vizsgáltam.



5.3. ábra: A *Myc* IPMDH 16 °C-on történő termelésének ellenőrzése SDS gélelektroforézis segítségével. Az MM a molekulamarkert jelöli, eszerint fentről a 3. hely közelében van az IPMDH. A számok azt jelölik, hogy hány óra elteltével vettem a mintát.

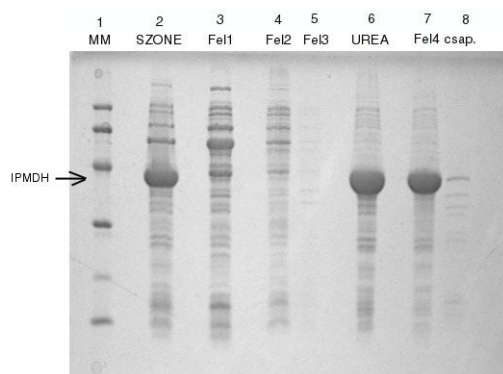
A gélképen látszik, hogy az előzőhöz hasonló képet kaptunk, a felülúszóban ugyanúgy nincs fehérje. Eltérés annyi, hogy 16 °C-on láthatóan kevesebb fehérje termelődött (5.3. ábra).

Összefoglalva a rázatott kultúrában történő termeltetés a *Myc* IPMDH esetében nem bizonyult olyan hatékonynak, mint a *Tt* IPMDH-nál, ahol a szonikálás után a fehérje mennyiségének kb. a fele a felülúszóba került.

Renaturáció

A sejtek feltárása során az IPMDH enzim a csapadékban maradt. A csapadékot tömény (8 M) ureában lehetett oldatba vinni. A művelet során azonban a fehérje denaturálódott. Azért, hogy a fehérjét natív állapotba hozzam, azaz renaturáljam, az urea

koncentrációját az oldatban fokozatosan csökkentettem. Ezt úgy értem el, hogy fokozatosan csökkenő koncentrációjú urea oldattal dializáltam, és ennek többszöri cseréjével tisztítottam meg a fehérjét az ureától. A módszernek az elvi előnye az, hogy kíméletesebb, mint az azonnali urea mentes pufferrel való dialízis, ugyanis így módon kisebb az esély az aggregációra.



5.4. ábra: A feltárás és a renaturáció során vett minták. Az MM a molekulamarkert jelöli, eszerint fentről a 3. hely közelében van az IPMDH. A rövidítések azt jelölik, hogy melyik munkafázisból származik a minta (lásd Módszerek 15. oldal).

Látható, hogy csak az ureás kezelés hatására jelentős mennyiségű fehérje került a felülúszóba. A felülúszót dialízishártyába öntve, és 2 M-lal hígabb urea oldattal szemben kezdtem dializálni. A dialízis 6 lépésben, kb. 2-3 óránként cserélve a dializáló oldatot összesen 12 – 20 órát vett igénybe.

A dialízis során kivett oldattérfogatot renaturációs pufferrel pótoltam, melybe különböző adalékokat tettem. Mivel a *Myc* IPMDH ellentétben a *Tt* IPMDH-val tartalmaz ciszteineket ezért ezek védelmére, illetve az esetleges intermolekuláris diszulfidhidak kialakulásának elkerülése végett DTT-t tettem az oldatba. Próbálkoztam azzal is, hogy a renaturációs pufferbe NAD-ot is tettem, hátha elősegíti a natív térszerkezet kialakulását. A dialízist különböző fehérjekoncentrációk mellett is megpróbáltam. Próbálkoztam azzal is, hogy a dialízis után kapott fehérjeoldathoz szubsztrátokat adtam, és jégen inkubáltam. Az alkalmazott módszerek jellemzőit az 5.3. táblázatban foglaltam össze.

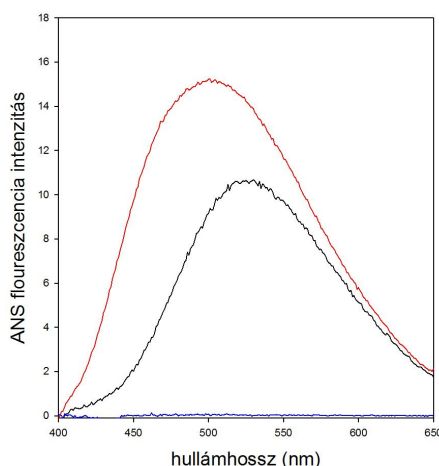
A művelet végére mindig tiszta oldatot kaptam, a fehérje nem csapódott ki a dialízis során. Enzimaktivitást azonban egyik esetben sem kaptam, sőt egyes esetekben az aktivitás mérés során a fehérje kicsapódását tapasztaltam a küvetében. Tehát nem sikerült renaturálni a rázatott kultúrában megtermelt fehérjét.

5.3. táblázat: A renaturációs kísérleteimet összefoglaló táblázat. A szubsztrátok koncentrációja minden esetben telítési volt (0,3 mM IPM; 2 mM NAD; 0,4 mM Mn^{2+}), a DTT-é pedig 2 mM.

Fehérjekoncentráció (mg/L)	Térfogat (mL)	segédanyag	megjegyzés
5	20	DTT	dialízis
0,2	20	DTT	
0,2	20	DTT, NAD	
0,5	10	DTT, Mn^{2+}	A már dializált elegyet próbáltam renaturálni.
0,5	10	DTT, NAD	
0,5	0,3	DTT, IPM, Mn^{2+}	

A hagyományos (rázatott) kultúrában termelt fehérje szerkezeti jellemzése

Elsőként a fehérje és az ANS kölcsönhatását vizsgáltam meg. Az ANS egy fluoreszcenciás festék, melynek emissziós intenzitása akkor nő meg, ha hidrofób, apoláris elemekhez kötődik a fehérjén. Mivel a natív fehérjékben ezek a részek belül vannak, a natív fehérjék ANS-kötő képessége általában csekély. Az IPMDH esetén ez egészen extrém módon jelenik meg, a natív IPMDH egyáltalán nem köti az ANS-t. A teljesen denaturált forma sem köti az ANS-t, mert ekkor nincs hidrofób mag [22]. Tehát az ANS jelének növekedése egyedül az intermedier állapotok (pl.: a molten globula) esetén mutatható ki, mert ekkor a felszín hidrofób részeihez tud kötődni az ANS.

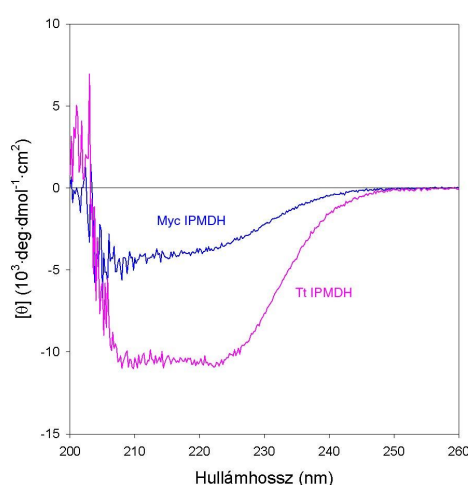


5.5. ábra: A „renaturált” Myc IPMDH és az ANS kölcsönhatásának vizsgálata. A mérés során az ANS koncentrációja $1,69 \cdot 10^{-3}$ M, míg az IPMDH-é 6 $\mu\text{g/mL}$ volt, a gerjesztés 350 nm-en történt, az emissziós rések 4-4 nm-esek voltak.

A grafikonon jól látható intenzitásnövekedés alapján azt lehet állítani, hogy a termelt, és renaturációs eljárással kezelt fehérje nem natív, de nem is denaturált állapotú, hanem intermedier, valószínűleg molten globula-szerű szerkezetű.

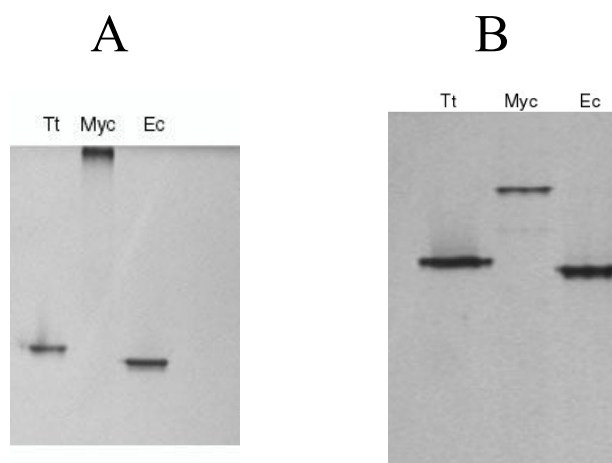
Felvettem a termelt és a renaturációnak alávetett *Myc* IPMDH CD-spektrumát távoli UV-tartományban, ugyanis korábbról ismert, hogy a *Tt*, *Ec* és *Vibrio* IPMDH esetén a másodlagos szerkezet konzervatív volta következtében a spektrum hasonlóan nézett ki. Jelen esetben kontrollnak a *Tt* IPMDH α -hélix tartalmú fehérjékre jellemző spektrumát használtam.

Az 5.6 ábrán látható, hogy a *Myc* IPMDH spektrum alakja hasonlít a natív állapotú *Tt* IPMDH-hoz, azonban intenzitásában sokkal kisebb. Ez arra enged következtetni, hogy a másodlagos szerkezet csak részlegesen alakult ki a vizsgált *Myc* IPMDH enzimben.



5.6. ábra: A renaturált *Myc* IPMDH és a natív *Tt* IPMDH CD spektruma. Mérési körülmények: c (*Tt* IPMDH) = 7,88 μ M, c (*Myc* IPMDH) = 14,24 μ M, 20 mM KH_2PO_4 -KOH (300 mM KCl) pH=7,6 puffer, 20°C-on.

Az enzimet natív gélelektroforézissel is megfuttattam, *Tt* és *Ec* IPMDH-kat használva összehasonlításként.



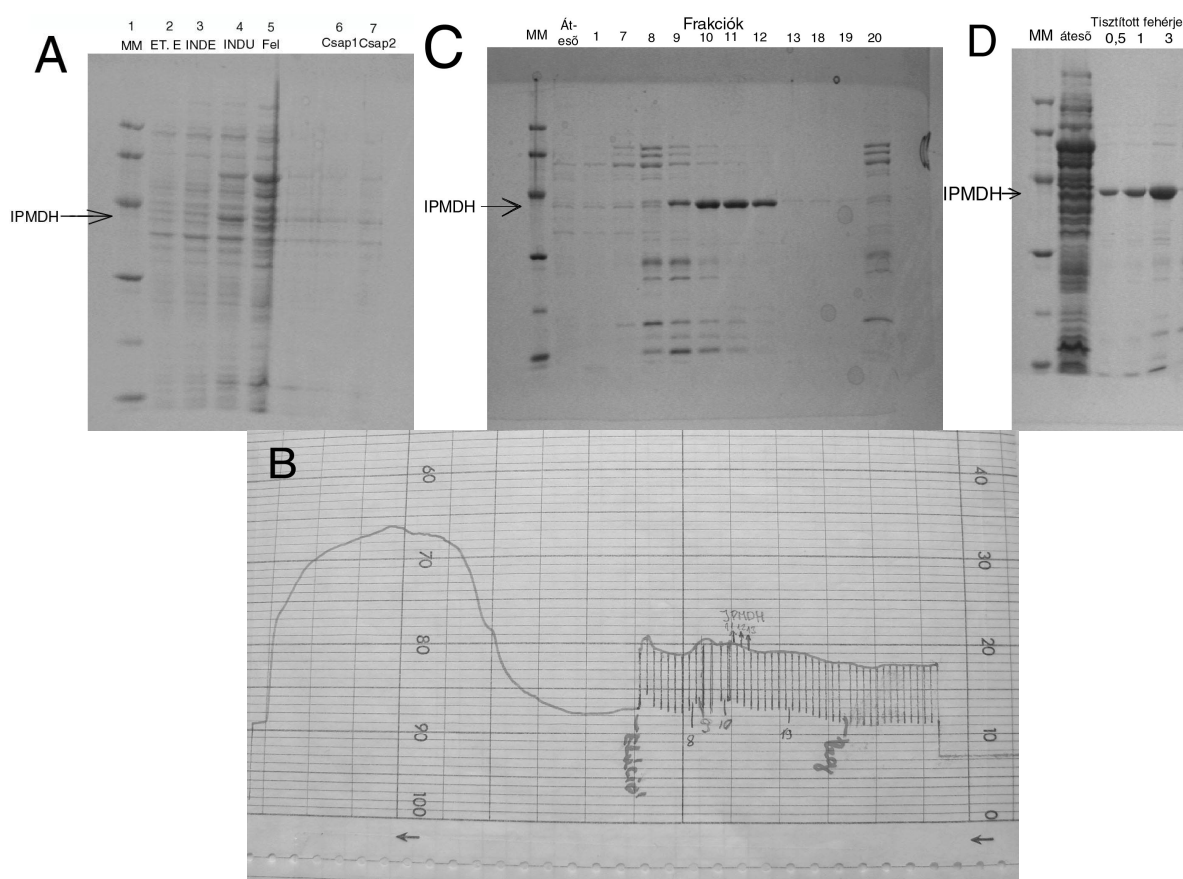
5.7. ábra: A renaturált *Myc* IPMDH szerkezetének ellenőrzése natív gélelektroforézissel. A rövidítések azt jelölik, hogy melyik baktériumból származik az IPMDH. A *Tt* és *Ec* IPMDH-k natív szerkezetűek, az A ábrán lévő *Myc* IPMDH a hagyományos (rázatott) kultúrában, míg a B ábrán lévő fermentorban termelődött (lásd Módszerek c. fejezet).

Az 5.7. A ábrán látható, hogy a *Myc* IPMDH alig mozdult el a startvonalról, tehát nem natív szerkezetű az enzim. Az intermediér állapot fellazult szerkezete, vagy egy esetleges aggregáció okozhatta azt, hogy a fehérje nem indult el elektroforézis hatására.

Összességében kijelenthető, hogy a renaturáció során, az enzim valamilyen intermediér-állapotban maradt, natív szerkezetét csak részlegesen nyerte vissza, azonban enzimaktivitást nem mutatott.

A sikertelen renaturáció alapján arra a következtetésre jutottam, hogy ha a termelési módszert változtatnám, azaz lassabbá, jobban szabályozottá tenném akkor vagy natív, vagy legalább könnyen renaturálható fehérje képződne.

Fermentorban végzett termelés



5.8. ábra: A *Myc* IPMDH fermentorban történt termelésének főbb szakaszai. Az SDS-gélt ábrázoló A, C és D ábrán az MM a molekulamarkert jelöli, az A ábrán a második oszlopon etetés előtt, a harmadikon indukálás előtt, a negyediken indukálás után vett minta látható, az ötödik oszlopon a szonikálás utáni felülúszóból, míg a többi kettőn a csapadékból vett mintát futtattam. A B ábra a Ni-affinitás kromatográfia UV rekorder által rajzolt elúciós képét mutatja. Az Anyagok és Módszerek c. fejezetben részletezett gradiens elúciót alkalmaztam. Az áteső valamint a kromatográfia egyes frakciói a C ábrán láthatóak. A D ábra második oszlopán a kromatográfiás tisztítás során az oszlopon áteső oldatrészből vett minta található, a többin pedig a tisztított fehérjeoldat különböző mennyiségben.

Az Anyagok és módszerek című részben leírtak alapján fermentorban is megpróbáltam a fehérje termeltetését. A gél elektroforetikus kép (5.8. A ábra) alapján látszik, hogy itt a fehérjének nagy mennyisége került a felülúszóba, bár összességében csak kevés termelődött (A ábra). A His-taggal rendelkező fehérje tisztítása Ni-NTA Superflow gyantával töltött oszlopon történt, gradiens elúciót alkalmaztam (5.8. B ábra). Az első csúcsot a nem kötődő, a másodikat pedig egyéb szennyeződések adták, a harmadik csúcs volt a *Myc* IPMDH (5.8. B ábra). A csúcs azért ilyen kicsit, mert a *Myc* IPMDH-ban csak egy triptofán van. A harmadik csúcsot alkotó frakciókból vett mintákat is megfuttattam SDS-gélen. A tisztának bizonyult frakciókat (11, 12) összeöntöttem, dializáltam MOPS pufferben az imidazol eltávolítására, majd gélen megfuttattam. Az 5.8. C ábrán látszik, hogy tiszta fehérjeoldatot kaptam.

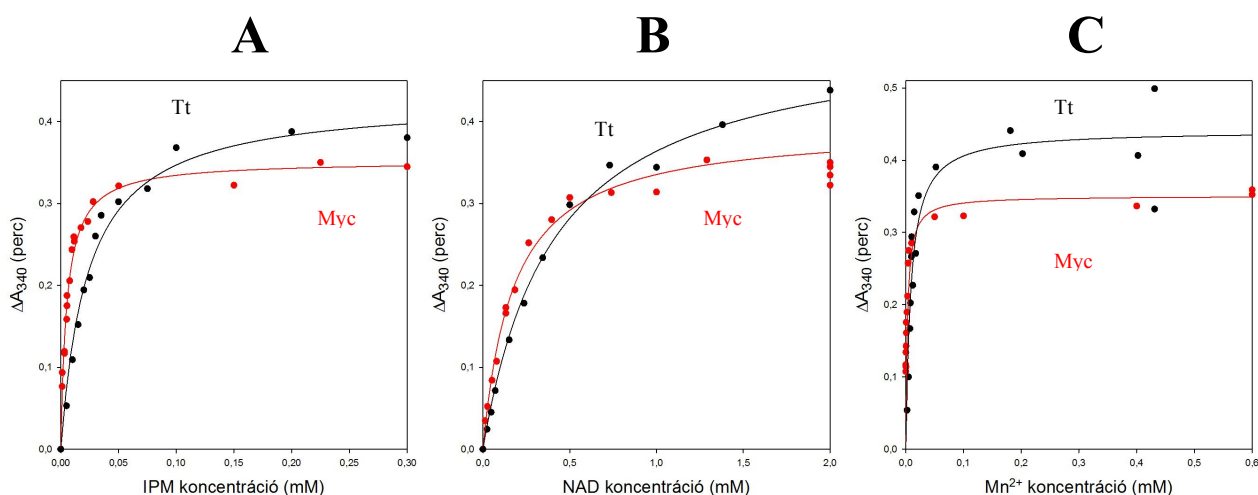
Az oldat 280 nm-en történt abszorbancia mérésével, valamint az $\epsilon = 15930 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (monomerre számolva) alapján meghatároztam a fehérjekoncentrációt, ami $13,52 \mu\text{M}$ -nak adódott. Monomer fehérjével számolva ($M = 38845 \text{ Da}$) a tömegkoncentráció $0,525 \text{ mg/mL}$ -nek adódott. Az oldatot $1,5 \text{ mL}$ -re töményítve, újabb abszorbancia méréssel meghatároztam a koncentrációt, amely ekkor $4,25 \text{ mg/mL}$ volt. Azaz összesen csupán $6,375 \text{ mg}$ oldható *Myc* IPMDH-t eredményezett a termelés. A 280 nm-en és a 260 nm-en mért abszorbanciák aránya $0,757$ volt, ami azt jelenti, hogy az enzimet NAD-mentesen kaptam meg.

Összességében tehát elmondható, hogy a *Myc* IPMDH esetében natív szerkezetű, aktív fehérjét csak fermentorban sikerült termelnem. Ebben különbözik a csoport által eddig vizsgált IPMDH-któl, ugyanis azokat jó hatásfokkal lehetett hagyományos (rázatott) kultúrában termelni. A dolgozat további részében említett *Myc* IPMDH-k ennek megfelelően fermentoros termelés eredményei.

Enzimkinetikai vizsgálatok

Az enzim funkcionális tulajdonságainak meghatározásához elvégeztem a *Myc* IPMDH kinetikai analízisét, és összevettem a kutatócsoport által régebb óta tanulmányozott *Tt* illetve *Ec* IPMDH adataival.

Mindhárom szubsztrát esetén meghatároztam a telítési görbét, azonos, standard körülmények között (5.9. ábra). A görbéket a Michaelis-Menten (3. egyenlet) alapján illesztettem. A kapott kinetikai konstansokat táblázatban foglaltam össze (lásd 5.4. táblázat).



5.9. ábra: A *Myc* IPMDH és a *Tt* IPMDH szubsztrát telítési görbéinek összehasonlítása

A kísérletekben 1,54 μM *Myc* IPMDH-t (piros) és 0,32 μM *Tt* IPMDH-t (fekete) vizsgáltam. Az A az IPM, a B a NAD, míg a C ábrán a Mn^{2+} telítési görbéje látható. A Mn^{2+} telítési görbe mérésekor Sigma Chelex® 100 gyantával mangánmentesített MOPS puffert használtam. A *Myc* IPMDH vizsgálatokor 2 mM DTT is jelen volt a reakcióelegyben.

5.4. táblázat: A *Myc* IPMDH mért kinetikai paramétereit. Az adatokat a monomer enzimre számoltam.

szubsztrát	$V_{\max}$ (mM s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat} (min^{-1})
IPM	$0,3521 \pm 0,0065$	$0,0053 \pm 0,0003$	36,6
NAD	$0,3740 \pm 0,0071$	$0,1555 \pm 0,0121$	38,9
Mn^{2+}	$0,3506 \pm 0,0069$	$0,0029 \pm 0,0002$	36,5

5.5. táblázat: A különböző baktériumokból származó IPMDH-k kinetikai paramétereinek összehasonlítása.

baktérium	K_M (mM)			k_{cat} (min^{-1})	$\frac{k_{\text{cat}}}{K_{M, \text{IPM}}}$ ($\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)
	IPM	NAD	Mn^{2+}		
<i>Myc</i>	0,0053	0,1555	0,0029	37,4	$7,06 \cdot 10^6$
<i>Tt</i>	0,0174	0,2510	0,0130	235,0	$1,35 \cdot 10^7$
<i>Ec</i>	0,0049	0,1589	0,0176	444,8	$9,08 \cdot 10^7$

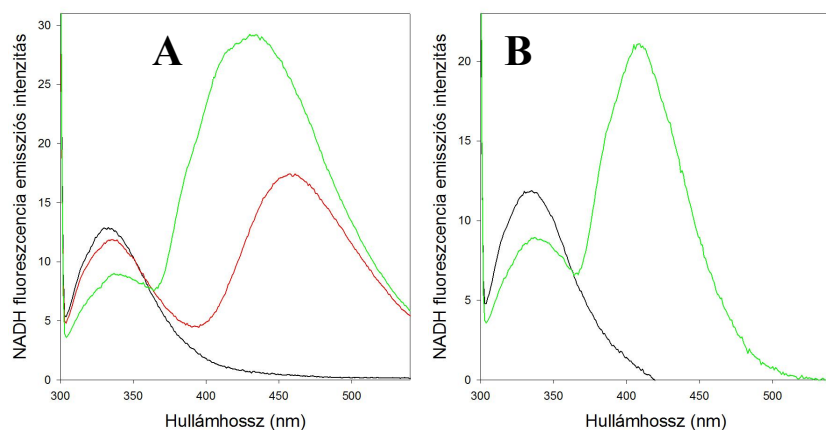
A mérések jól korrelálnak, ugyanis a mért maximális sebességek, és az ebből számolt specifikus aktivitások hibahatáron belül térnek el. A *Tt* IPMDH-nak 240 min^{-1} körül van a specifikus aktivitása, azaz ehhez képest a *Myc* IPMDH jóval gyengébben katalizálja a folyamatot.

Összehasonlítva a három baktérium által termelt IPMDH-t megállapítható, hogy a katalitikus hatékonyságukban egy nagyságrenden belül vannak egymáshoz (lásd 5.5. táblázat). A *Myc* IPMDH k_{cat} értéke a legkisebb, azaz ez az enzim katalizálja legkisebb mértékben a folyamatot. A K_M értékek is a *Myc* IPMDH esetén a legkisebbek, azaz ennél az enzimmél érik el a legkisebb szubsztrát koncentráció mellett a maximális sebesség felét. Ebből

arra lehet következtetni, hogy annak ellenére, hogy a *Myc* IPMDH k_{cat} értéke a legkisebb, a szubsztrátjaival alkotott katalitikus komplexben itt kötődnek a legerősebben a szubsztrátok. Így ez utóbbi tulajdonság javítja valamelyest a *Myc* IPMDH katalitikus hatékonyságát.

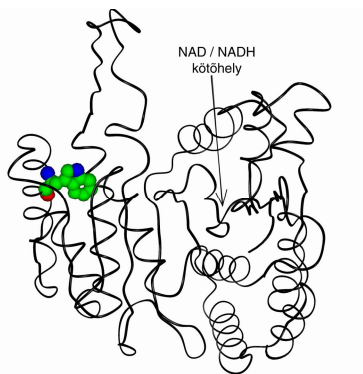
FRET kialakulása

Megfigyelték, hogy az IPMDH esetén tapasztalt a FRET jelenség kialakulásához az IPMDH által kötött NADH mellett a másik szubsztrát jelenléte is szükséges. EDTA-oldatos mérések segítségével laboratóriumunkban kimutatták, azt is, hogy az IPM önmagában nem elég, hanem kell mellé a kétértékű fémion is (Mn^{2+} vagy Mg^{2+}) [23]. Feltehetően az MgIPM komplex által okozott fehérje konformáció változás biztosítja a kötött NADH nikotinamid és a Trp gyűrűk megfelelő orientációját, ami a FRET kialakulását eredményezi (lásd 5.10. ábra).



5.10. ábra: A natív IPMDH-t jellemző FRET jelenség (A) Fluoriméter segítségével rögzített eredeti mérési eredményekből a puffer levonásával kapott diagram. (B) Az eredeti mérési eredményekből már levonásra került a puffer, ill. a NADH jele. A fehérje jelét feketével, a NADH és a fehérje együttes jelét pirossal, míg zölddel az összes szubsztrátot tartalmazó elegyet jelöltem.

Mindkét ábrán jól látszik, hogy a fehérje emissziós csúcsa IPM hatására lecsökkent, míg a NADH emissziós intenzitása megnőtt. Tehát a *Myc* IPMDH esetében is kialakul a FRET jelenség. Azaz az egyetlen Trp aminosav (lásd 5.11. ábra) szterikusan a NADH (a katalízis során NAD) közelében és megfelelő orientációban helyezkedik el. Eme tulajdonság tekintetében tehát nem tér el a *Mycobacterium tuberculosis* által termelt enzim, a többi IPMDH-tól.

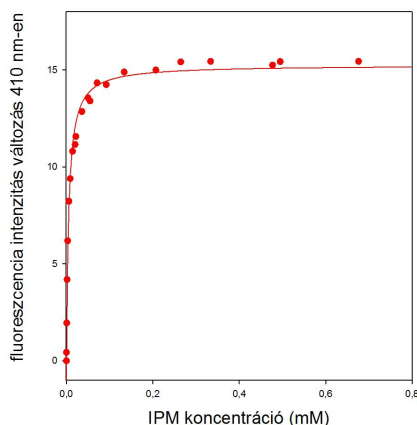


5.11. ábra: A triptofán elhelyezkedése a Myc IPMDH 3D-s szerkezetében.

A Myc IPMDH láncát fekete szalagdiagram jelöli, az atomok szerint színezett aminosav a triptofán.

IPM kötődési állandó meghatározása

Szintén előnyös tulajdonsága a FRET-nek az, hogy mérés közben nem zajlik a reakció, azaz az IPM koncentrációja nem csökken. Tehát ha ábrázoljuk a FRET következtében 410 nm-en kialakult fluoreszcenciaintenzitás-növekedést az IPM koncentrációjának függvényében, akkor egy telítéshez tartó görbét kapunk, amire a 4. egyenlet szerint görbét illesztve ki lehet számolni a kötődési erősséget (K_d). A kötődési erősség az IPM-fehérje kölcsönhatást jellemzi, a tényleges katalízis megtörténte előtt.



5.12. ábra: Az IPM kötődési állandójának meghatározása a natív IPMDH-t jellemző FRET jelenség segítségével A spektrofotométer segítségével rögzített eredeti mérési eredményeket feketével jelöltem. Az eredeti mérési pontokat korrigálva kaptam a pirossal jelzett pontokat, melyekre görbét illesztettem.

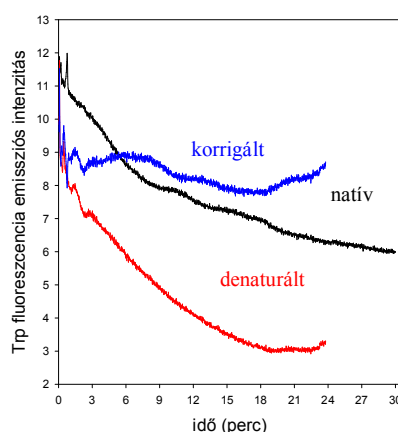
A kötődési erősségre $K_d = 0.0053 \pm 0.0004$ mM adódott (lásd 5.12. ábra). Látható, hogy szinte pontosan ugyanazt az értéket kaptam vissza, mint a K_M esetén. Ebből azt a következtetést lehet levonni, hogy a szubsztrát kötődése gyorsan bekövetkezik a reakció

végbemeneteléséhez képest (gyors előegyensúly). Azaz a kötődés nem a sebesség meghatározó lépés. Ez az eredmény egyezik a többi IPMDH-ról kapottal.

Denaturációs vizsgálatok

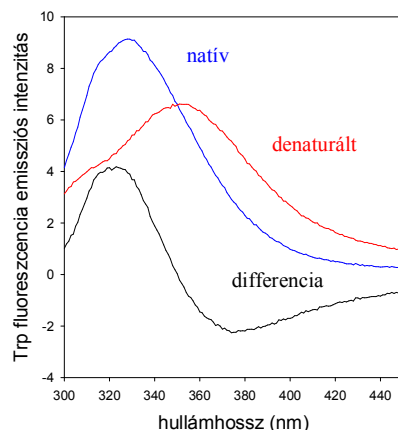
A *Myc* IPMDH denaturációjának vizsgálatához a fehérjét 8 M ureát tartalmazó MOPS pufferben hígítottam. A szerkezet változása során, változik a triptofán oldalláncok helyzete, környezete is, így a denaturációs folyamat követhető a triptofán fluoreszcenciás jelének változásával.

Először kontroll kísérletben a 275 nm-es gerjesztés natív fehérjére gyakorolt hatását vizsgáltam. Ahogy az 5.13. ábrán látszik besugárzás hatására a fehérje fluoreszcenciás intenzitása folyamatosan csökken. Mivel a csökkenés nem szabályos és összehasonlítható mértékű a denaturáció során bekövetkező változással, így korrekcióba vétele pontatlanságot okozna (lásd 5.13. ábra). Azt a következtetést kellett tehát levonnom, hogy a fehérje denaturációjának sebessége folyamatos besugárzással nem határozható meg.



5.13. ábra: A 275 nm-es gerjesztés hatása a natív fehérje (fekete) jelének intenzitására. A fehérjekoncentráció 24 $\mu\text{g/mL}$ volt, a mérést 330 nm-en követtem. Pirossal feltüntettem a nyers denaturációs, valamint késsel a natív csökkenésével korrigált denaturációs kinetikát.

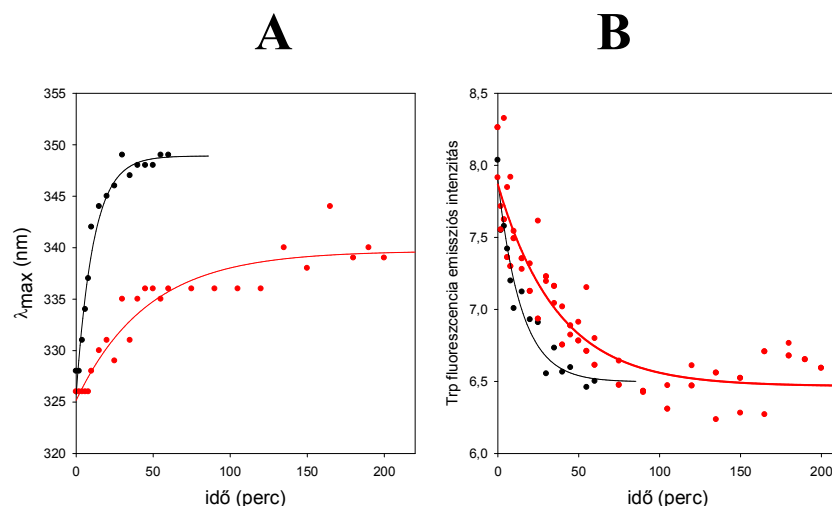
Kb. 3 órás denaturációs folyamat végén a fehérje spektruma jelentősen különbözik a natív fehérje spektrumától (5.11. ábra). Egyrészt a maximális intenzitást adó hullámhossz (λ_{max}) a magasabb hullámhosszak felé tolódott (red shift), másrészt a maximális intenzitás csökkent. Hasonló eredményt közöltek korábban a *Tt* enzim denaturációjánál is [24]. Ez a spektrális változás bizonyítja, hogy a denaturáció valóban megtörtént, annak ellenére, hogy a besugárzás okozta intenzitáscsökkenés miatt, annak időgörbéje nem volt meghatározható.



5.14. ábra : A natív és a denaturált *Myc IPMDH* spektruma és a különbségspektrum. A fehérjekoncentráció 24 $\mu\text{g/mL}$ volt.

A besugárzás hatásának csökkentésére a továbbiakban a denaturáció folyamán csak meghatározott időközönként vettem fel a fehérje spektrumát. Azaz a λ_{max} időbeli változását követem a denaturáció során. A spektrumfelvétel paramétereit úgy állítottam be, hogy minél kevesebb ideig érje sugárzás a fehérjét.

Az eredmény látható az 5.15. A ábrán, a maximális intenzitást adó hullámhossz (λ_{max}) alapján, és az 5.15. B ábrán, ahol egy adott hullámhosszon (itt 330 nm, ahol a legnagyobb a natív és a denaturált fehérje intenzitása közötti különbség) mért fluoreszcenciás intenzitás időbeli változása látható. Ugyanilyen „pontenkénti” mérést végeztem el urea nélküli eleggyel is és az így kapott intenzitás csökkenéssel korrigáltam a denaturációs görbét.



5.15. ábra: A *Myc IPMDH* Trp emissziós csúcsainak (λ_{max}) elmozdulása (A) és a *Myc IPMDH* Trp intenzitásának változása (B) IPM-es és IPM nélküli denaturáció során. A piros adatsor mérésekor az IPM koncentráció 0,6 mM volt.

A mért pontok exponenciális görbével leírható időgörbét adtak. Tehát a denaturáció látszólag egyetlen elsőrendű folyamatként zajlott. A kapott sebességi állandóból pedig meghatároztam a felezési időt (6. egyenlet), azt az időt, ami alatt az oldatban lévő natív

fehérje fele teljesen denaturálódik. A mért adatokat és rendelkezésre álló egyéb IPMDH-k adatait az 5.6-os táblázatban foglaltam össze.

A *Mycobacterium tuberculosis*-hoz hasonlóan mezofil *Escherichia coli* által termelt IPMDH enzimnél megfigyelték, hogy IPM jelenlétében jelentősen lassul a denaturáció sebessége. Ennek oka az IPM hatására kialakuló kompaktabb szerkezet lehet. IPM jelenlétében is meghatároztam a felezési időket és a kapott eredményeket az 5.6. táblázatban tüntettem fel.

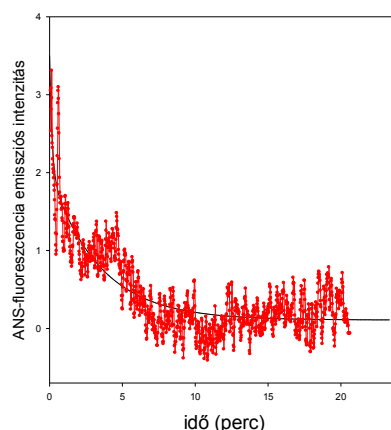
5.6. táblázat: Az egyes baktériumok által termelt IPMDH-k denaturációs sebességének összehasonlítása. A táblázatban felezési idők szerepelnek

Baktérium	Felezési idő IPM nélkül (min)	Felezési idő IPM-mel (min)
Myc	8,7	28,4
Tt	55,3	57,8
Ec	5,0	33,0

A táblázat alapján látszik, hogy ahogy várható volt a *Myc* IPMDH sokkal gyorsabban denaturálódik, mint a *Tt*, de csak valamivel lassabban, mint az *Ec* IPMDH. Az IPM denaturációt lassító hatása a *Myc* IPMDH esetében is megfigyelhető. Tehát a denaturációt tekintve a *Myc* IPMDH inkább a szintén mezofil *Ec* IPMDH-ra hasonlít, és nem a *Tt* IPMDH-ra. Ez az eredmény tehát alátámasztja azt a korábbi megállapítást, hogy a hőstabilitásért főként a kisebb denaturációs sebesség a felelős, nem pedig a gyorsabb renaturáció. [22]

Renaturációs vizsgálatok

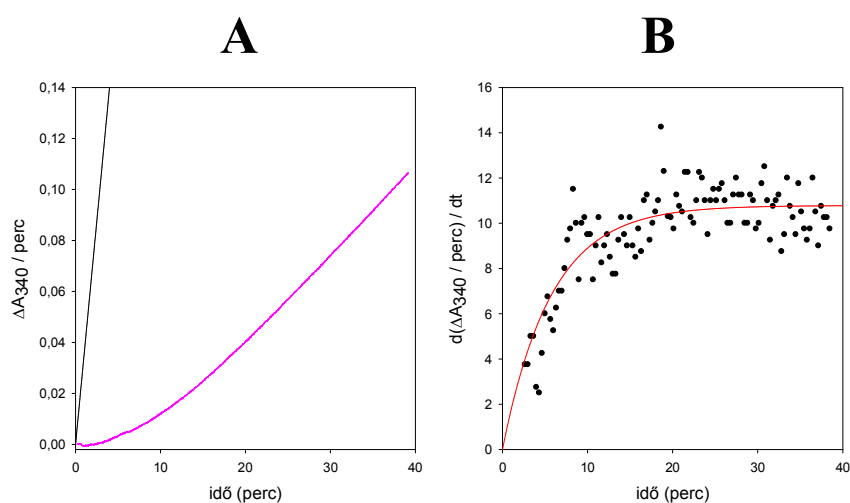
A *Myc* IPMDH renaturációját a Módszerekben leírtak szerint végeztem. ANS-fluoreszcencia segítségével renaturációs görbéhez hasonló eredményt kaptam. A gyorsan képződő intermedier láthatóan kötötte az ANS-t, és ahogy fokozatosan továbbalakult a 480 nm-en tapasztalt intenzitásnövekedés lecsökkent. Az exponenciális illesztést követően a sebességi együttható $k = 0,294 \text{ min}^{-1}$ -nek adódott. A jel azonban a többi IPMDH enzimnél tapasztaltnál képest, meglehetősen kicsi volt, ezért a mérés elég pontatlan (lásd 5.16. ábra).



5.16.ábra: A *Myc* IPMDH renaturációjának meghatározása ANS-fluoreszcencia alapján. Az ábrán pirossal a nyers adatok, feketével a 8. egyenlet szerint illesztett görbe látható.

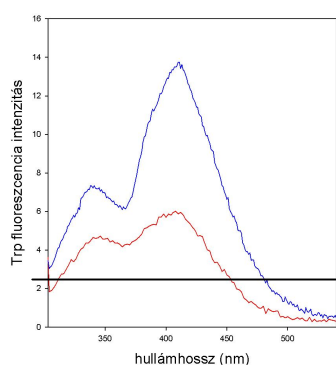
A *Myc* IPMDH reaktiválódását vizsgálva azt tapasztaltam, hogy a natív enzimaktivitásnak csupán maximum 5-10 %-a tért vissza. Az abszorbancia változását 340 nm-en követtem (lásd 5.17. A ábra), a kapott görbét pedig pontonként deriváltam, azaz meghatároztam a pillanatnyi aktivitásokat. Ezeket az idő függvényében ábrázoltam és exponenciális illesztés után kaptam az 5.17. B ábrán látható görbét. A sebességi együttható értékére $k = 0,174 \text{ min}^{-1}$ adódott, ami nagyságrendileg egyezik az ANS segítségével meghatározott renaturációs sebességi együtthatóval. Azonban a mérés a kis aktivitások miatt meglehetősen pontatlan.

Az *Ec* és *Tt* IPMDH enzimek 50-60 %-ban renaturálódnak, sebességi együtthatójuk pedig $k = 0,7 \text{ min}^{-1}$. Tehát a *Myc* IPMDH renaturációjának sebessége nagyságrendileg nem tér el, viszont kevesebb renaturálódik, mint más IPMDH enzimekből.



5.17. ábra: A *Myc* IPMDH renaturációjának meghatározása reaktiválódás alapján. Az A ábrán lilával a renaturálódó, feketével pedig a natív enzimre kapott abszorbancia – idő görbe látható. A B ábrán az A ábrán lévő lila görbe pontonkénti deriváltja látható, pirossal a 7. egyenlet szerint illesztett görbét jelöltem.

A FRET létrejött, a natív enzimre jellemző tulajdonság, így lehetővé tette, hogy későbbi méréseimben, ennek segítségével is megpróbáljam követni a *Myc* IPMDH renaturációját, ugyanis sem a denaturált, sem az intermediér állapotú fehérje nem mutatott FRET-et. De vizsgálatok során hasonlóan a belső fluoreszcencia méréshez, sem FRET méréssel nem sikerült kinetikát kimutatnom. Igaz ugyan, hogy a renaturáció elején mindig tapasztaltam fluoreszcencia intenzitás növekedést, azonban a további növekedés helyett inkább csökkenést figyeltem meg, a besugárzás okozta mellékhatás következtében. FRET esetén maximum 10-20 % intenzitásnövekedést tapasztaltam a referenciaként használt natív FRET-hez képest (5.18. ábra).



5.18. ábra: A renaturáció követése FRET mérésével. Késsel a natív FRET, pirossal pedig a fél, óra utáni FRET látható. A fekete egyenes vonal a FRET 0 pontja.

Összességében megállapítható, hogy a *Myc* IPMDH-t nem lehet teljesen renaturálni, azonban elképzelhető, hogy a renaturáció több lépéses folyamat, és az egyik lépés sebességi együtthatóját sikerült meghatároznom. Ezen eredmények tükrében érthető, hogy a bakteriális expresszió során nem sikerült teljesen a renaturáció, és felértékelődik az a tény, hogy fermentorban sikerült expresszáltatnom az aktív és oldható *Myc* IPMDH-t.

Összefoglalás

A leucin bioszintézisének egyik lépését katalizáló izopropilmalát-dehidrogenáz (IPMDH) enzim megtalálható a tüdőgümőkört okozó *Mycobacterium tuberculosis* baktériumban. Az enzim célzott gátlása új lehetőségeket nyithat a betegség elleni küzdelemben. Mivel eddig még senki sem vizsgálta a *Myc* IPMDH-t, kutatásom célja ezen enzim alapvető szerkezeti és funkcionális tulajdonságainak jellemzése, valamint a már ismert, más baktériumoktól származó IPMDH-kal való összehasonlítása volt.

Munkám során először a fehérje előállítását, valamint a szennyezőktől való tisztítását kellett megoldanom. A jellemzés során egyrészt az internetes adatbázisok alapján hasonlítottam össze a különböző szervezetekből származó IPMDH-k aminosav-szekvenciáját. Másrészt kísérletesen meghatároztam az enzim kinetikai paramétereit (K_m , V_{max} , k_{cat}), továbbá az IPM szubsztrát kötődési állandóját (K_d). Fluorimetriás mérésekkel jellemeztem továbbá a fehérje denaturációs és renaturációs készségét.

Az aminosav-szekvenciák összehasonlításából kiderült, hogy a *Myc* IPMDH jobban különbözik a többi IPMDH-tól, mint azok egymástól. Ezzel összhangban, ellentétben más IPMDH-kal, a hagyományos (rázatott) kultúrában termelődött *Myc* IPMDH-t, csak denaturált formában tudtam kinyerni a sejtekből, ezt viszont nem sikerült aktív enzimmé renaturálnom, valószínűleg a denaturációs intermedierek molten globula-szerű szerkezetben stabilizálódtak. Végül egy bonyolultabb módszerrel, fermentoros termeltetéssel sikerült, limitált mennyiségben, aktív fehérjét nyernem.

Enzimkinetikai vizsgálataimból kiderült, hogy a *Myc* IPMDH katalizálja leggyengébben a folyamatot (k_{cat} értéke a legkisebb), viszont a szubsztrátokat ez a fehérje köti a legerősebben. Így katalitikus hatékonyságban egy nagyságrenden belül van a többi IPMDH-hoz képest. Akárcsak a többi IPMDH esetén az IPM K_d értéke megegyezett a K_M értékkel, azaz a katalízis mechanizmusa azonos. Denaturációjában a szintén mezofil *Ec* IPMDH-hoz hasonlít, mind sebességi együtthatóban, mind pedig abban, hogy az IPM védő hatást gyakorol a fehérjére a kaotróp ágenssel szemben. Az izolált fehérjét csak részlegesen sikerült renaturálni, ami összhangban van a kutatás elején felmerült fehérjetermelési problémákkal.

Hivatkozások

1. Imada K, Sato M, Tanaka N, Katsube Y, Matsuura Y, Oshima T: **Three-dimensional structure of a highly thermostable enzyme, 3-isopropylmalate dehydrogenase of *Thermus thermophilus* at 2.2 Å resolution.** *J Mol Biol* 1991, **222**(3):725-738.
2. Hurley JH, Dean AM: **Structure of 3-isopropylmalate dehydrogenase in complex with NAD⁺: ligand-induced loop closing and mechanism for cofactor specificity.** *Structure* 1994, **2**(11):1007-1016.
3. Kadono S, Sakurai M, Moriyama H, Sato M, Hayashi Y, Oshima T, Tanaka N: **Ligand-induced changes in the conformation of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*.** *J Biochem* 1995, **118**(4):745-752.
4. Gráczér E, Merli A, Singh RK, Karuppasamy M, Zavodszky P, Weiss MS, Vas M: **Atomic level description of the domain closure in a dimeric enzyme: thermus thermophilus 3-isopropylmalate dehydrogenase.** *Mol Biosyst* 2011, **7**(5):1646-1659.
5. Imada K, Inagaki K, Matsunami H, Kawaguchi H, Tanaka H, Tanaka N, Namba K: **Structure of 3-isopropylmalate dehydrogenase in complex with 3-isopropylmalate at 2.0 Å resolution: the role of Glu88 in the unique substrate-recognition mechanism.** *Structure* 1998, **6**(8):971-982.
6. Wallon G, Kryger G, Lovett ST, Oshima T, Ringe D, Petsko GA: **Crystal structures of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* 3-isopropylmalate dehydrogenase and comparison with their thermophilic counterpart from *Thermus thermophilus*.** *J Mol Biol* 1997, **266**(5):1016-1031.
7. Singh RK, Kefala G, Janowski R, Mueller-Dieckmann C, von Kries JP, Weiss MS: **The high-resolution Structure of LeuB (Rv2995c) from *Mycobacterium tuberculosis*.** *J Mol Biol* 2005, **346**(1):1-11.
8. Dean AM, Dvorak L: **The role of glutamate 87 in the kinetic mechanism of *Thermus thermophilus* isopropylmalate dehydrogenase.** *Protein Sci* 1995, **4**(10):2156-2167.
9. Hajdu I, Szilagyi A, Kardos J, Zavodszky P: **A link between hinge-bending domain motions and the temperature dependence of catalysis in 3-isopropylmalate dehydrogenase.** *Biophys J* 2009, **96**(12):5003-5012.
10. Wu H: **The first theory of protein denaturation.** *Am J Physiol* 1929(90):562-563.
11. Northrop JH: **Crystalline Trypsin.** *J Gen Physiol* 1932, **16**(2):267-348.
12. Anson ML, Mirsky AE: **Protein Denaturation.** *J Gen Physiol* 1934, **17**:393-398.
13. Anson ML, Mirsky AE: **The reducing groups of proteins.** *J Gen Physiol* 1935, **18**(2):307.
14. Kauzmann W: **Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation.** *Advances in Protein Chemistry* 1959, **14**:1-63.
15. Ptitsyn O: **How molten is the molten globule?** *Nat Struct Biol* 1996, **3**(6):488-490.
16. Ptitsyn OB, Pain RH, Semisotnov GV, Zerovnik E, Razgulyaev OI: **Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding.** *FEBS Lett* 1990, **262**(1):20-24.
17. de Marco A, Deuerling E, Mogk A, Tomoyasu T, Bukau B: **Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*.** *BMC Biotechnol* 2007, **7**:32.
18. Korz DJ, Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA, Deckwer WD: **Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*.** *J Biotechnol* 1995, **39**(1):59-65.

19. Singh SM, Panda AK: **Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins.** *J Biosci Bioeng* 2005, **99**(4):303-310.
20. Xiao-Yan Dong, Min-Ling Fu, Sun Y: **Refolding of recombinant homodimeric malate dehydrogenase expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies.** *Biochemical Engineering Journal* 2008, **38**:341-348.
21. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T: **How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein.** *Protein Sci* 1995, **4**(11):2411-2423.
22. Gráczér E, Varga A, Melnik B, Semisotnov G, Zavodszky P, Vas M: **Symmetrical refolding of protein domains and subunits: example of the dimeric two-domain 3-isopropylmalate dehydrogenases.** *Biochemistry* 2009, **48**(5):1123-1134.
23. Gráczér É, Konarev PV, Szimler T, Bacsó A, Bodonyi A, Svergun DI, Závodszky P, Vas M: **Essential role of the metal-ion in the IPM-assisted domain closure of 3-isopropylmalate dehydrogenase.** *FEBS Lett* 2011, **585**(20):3297-3302.
24. Gráczér E, Varga A, Hajdu I, Melnik B, Szilagyi A, Semisotnov G, Zavodszky P, Vas M: **Rates of unfolding, rather than refolding, determine thermal stabilities of thermophilic, mesophilic, and psychrotrophic 3-isopropylmalate dehydrogenases.** *Biochemistry* 2007, **46**(41):11536-11549.