

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Represszió - derepresszió elven működő molekuláris kapcsoló karakterizálása *Staphylococcus aureus*-ban

OTDK dolgozat

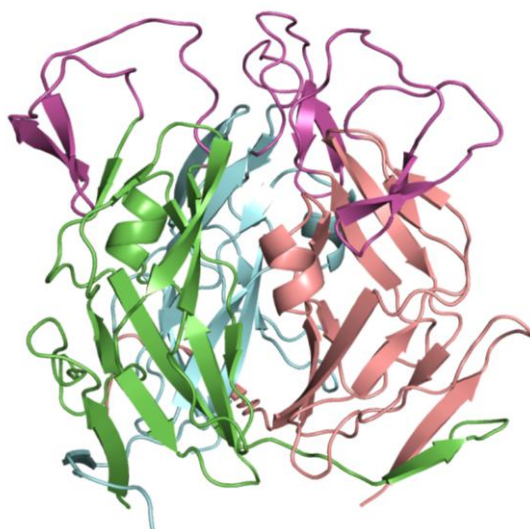
2013

Kádár Veronika

Msc II. évfolyam, biomérnök szakos hallgató

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar

MTA TTK Enzimológiai Intézet



Témavezető: Dr. Németh Veronika

MTA TTK Enzimológiai Intézet

Konzulens: Dr. Vértessy G. Beáta

*BME-VBK Alkalmazott Biotechnológiai és Élelmiszertudományi Tanszék
MTA TTK Enzimológiai Intézet*

A dolgozat bemutatását a TÁMOP - 4.2.2.B-10/1--2010-0009

"Új tehetséggondozó programok és kutatások a Műegyetem tudományos műhelyeiben"
című program támogatta

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés és célkitűzés	3
2	Irodalmi áttekintés	4
2.1	dUTPáz	4
2.1.1	A dUTPáz terápiás jelentősége	5
2.1.2	dUTPáz szerkezete	6
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.3	<i>Staphylococcus aureus</i> patogenicitási szigetek	7
2.4	<i>Staphylococcus aureus</i> $\Phi 11$ fág, a <i>Homo sapiens</i> és <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dUTPáz összehasonlítása	11
3	Anyagok és módszerek	13
3.1	DNS munkák	13
3.1.1	Felhasznált expressziós vektorok előállítása	13
3.1.2	Stl kötő DNS szekvencia tervezése	15
3.1.3	Agaróz gélelektroforézis	16
3.1.4	EMSA	16
3.2	Fehérje munkák	18
3.2.1	Fehérje termelés	18
3.2.2	Fehérjevizsgálat	20
4	Eredmények	23
4.1	A fehérje termelés és tisztítás eredményei	23
4.2	Vad típusú és mutáns $\Phi 11$ DUT katalitikus aktivitásának meghatározása	24
4.3	Az Stl fehérje hatása a dUTPáz aktivitásra	24
4.4	Az Stl gátlási mechanizmusa	26
4.5	$\Phi 11$ dUTPáz Stl és szubsztrát kötésnek vizsgálata fluoreszcens spektroszkópiával	29
4.6	Az Stl fehérje, a dUTPáz és az Stl DNS kötőhely egymással való kölcsönhatásainak vizsgálata EMSA módszerrel	31
4.6.1	A DNS-Stl kötés vizsgálata	31
4.6.2	Kontroll mérések	32
4.6.3	dUTPáz - Stl kötés vizsgálata $\Phi 11$ DUT, mtDUT és hDUT enzimek mellett	33
4.6.4	dUTPáz - Stl kötés vizsgálata $\Phi 11$ DUT ^{E158STOP} és $\Phi 11$ DUT ^{Δinsert} enzimek mellett	34
5	Összefoglalás és értékelés	36
6	Irodalomjegyzék	38
7	Köszönetnyilvánítás	40
8	Függelék: Rövidítések jegyzéke	41

1 Bevezetés és célkitűzés

A *Staphylococcus aureus* veszélyes kórokozó baktérium, terjedésének megállítását számos kutatás tűzte ki célul. A baktérium antibiotikumokra rendkívül hamar ellenállóvá válik. Ezért kiemelten fontos olyan új megközelítések azonosítása, melyek eddig nem alkalmazott mechanizmusokon keresztül teszik ártalmatlanná ezt a kórokozót. Ezen cél hatékony megvalósításához elengedhetetlen a baktérium fertőzőképességét meghatározó genetikai elemek terjedésében és szabályozásában szerepet játszó fehérjék működésének vizsgálata.

Munkám során a *S. aureus* patogenicitási sziget derepressziós mechanizmusát vizsgáltam, ezen belül a $\Phi 11$ helper fág által szabályozott modellt. A Genom Metabolizmus csoport több munkatársával együtt dolgozva célul tűztem ki az Stl és dUTPáz fehérjék kölcsönhatásán alapuló mechanizmus tanulmányozását, munkám során számos különböző molekuláris biológiai, kinetikai, szerkezet vizsgálati módszert alkalmaztunk.

Dolgozatomban a $\Phi 11$ fág dUTPáz és az Stl fehérje tulajdonságait és a közöttük létrejött kölcsönhatás kialakulását vizsgálom számos független módszer (spektrofotometria, fluorimetria, EMSA) felhasználásával. Ezen belül specifikus céljaim:

1. Az Stl fehérje dUTPáz aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata.
2. Specifikus fehérje szegmensek (dUTPáz C-terminális régió és inzert) szerepének vizsgálata a dUTPáz-Stl komplex kialakulásában és a dUTPáz szubsztrát analóg kötésében.
3. A dUTPáz-Stl komplexálódás hatásának vizsgálata az Stl-DNS kötésére.

A SaPI derepresszió modell eddig kevésbé karakterizált, kutatása párhuzamosan több laboratóriumban jelenleg is folyik. Az eddig publikált eredmények számos kérdést felvetnek, amelyek közül néhány aspektust sikerült tisztáznom vizsgálataim során.

2 Irodalmi áttekintés

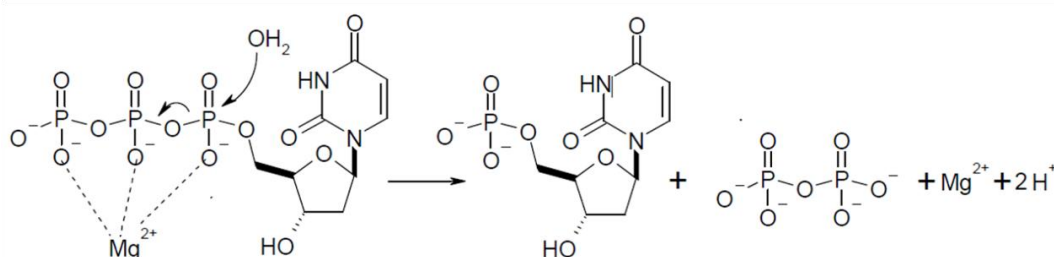
2.1 dUTPáz

A genetikai információ megőrzése, átvitele és kifejeződése az élet fennmaradásához nélkülözhetetlen. A környezeti hatások által kiváltott hibákat számos DNS javító mechanizmus javítja.

A nukleinsavakat alkotó ötféle bázis közül timin általában csak a DNS-ben, uracil pedig az RNS-ben fordul elő. A különbség az 5-metil csoport, amelynek nincs hatása az adeninnel való kölcsönhatásra.

Az uracil DNS-be történő beépülése kétféle mechanizmussal történhet, (i) citozin spontán deaminációja következtében, (ii) timin helyett az adenin párjaként (1).

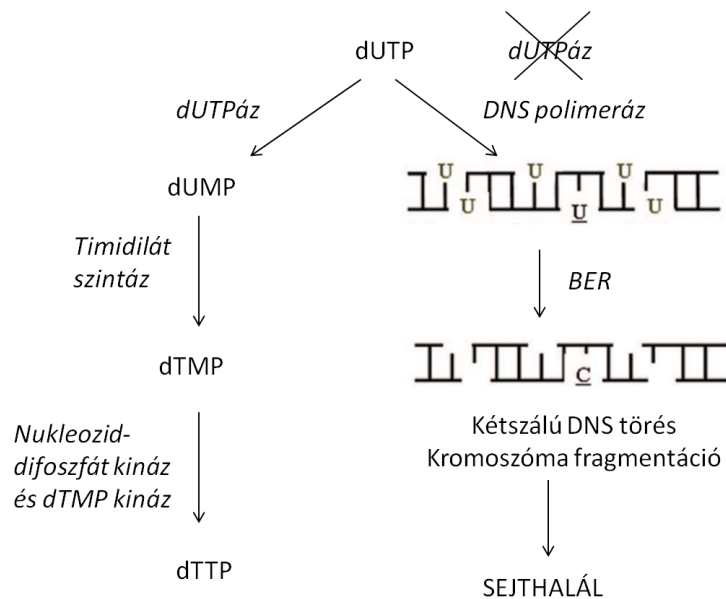
Citozin spontán deaminációja során javítás hiányában stabil pontmutáció következik be, a C:G bázispár U(T):A párrá alakul. A javító mechanizmus első lépésében az uracil-DNS glikozidáz (UDG) elhasítja a dezoxiribóz és az uracil közti glikozidos kötést. Az így bázis nélkül maradt (abázikus) helyen az AP-endonukleáz elhasítja a DNS szálát úgy, hogy a 3'OH marad szabadon. Ezután a DNS polimeráz – endogén foszfodiészteráz hatása révén – eltávolítja a bázis nélküli dezoxiribózt, és a láncvégi 3'OH valamint a megfelelő nukleotid-trifoszfát felhasználásával komplementer bázist épít be. A DNS szálát a ligáz enzim zárja (2).



1. ábra

A dUTPáz által katalizált reakció

Abban az esetben, ha a sejtben lévő dUTP/dTTP arány megnő, az adenin párjaként uracil épül be a DNS-be. A DNS polimerázok általában nem tudnak különbséget tenni a beépítendő dUTP és dTTP közt, így ezen bázisok beépítési aránya az intracelluláris dUTP/dTTP aránytól függ. A dUTPáz (deoxiuridin-trifoszfát-nukleotidhidroláz) képes megakadályozni az uracil DNS-be való beépülését. Az enzim az általa katalizált reakció (1. ábra) – dUTP hidrolízise dUMP-vé és inorganikus pirofoszfáttá – eredményeként egyrészt szabályozza a sejt dUTP szintjét, másrészt biztosítja a dTTP bioszintézis előanyagának, a dUMP-nek a termelését. A dUMP → dTMP átalakítást a timidilát szintáz (TS) enzim katalizálja (2. ábra) (3).



2. ábra
A dUTP sorsa dUTPáz jelenlétében és hiányában (1)

A dUTPáz esszenciális a prokarióta és eukarióta sejtekben egyaránt. Az enzim hiányában kialakuló magas intracelluláris dUTP szint következtében a szintetizálódó DNS szálon gyakori uracil beépülés történik. Az uracil hibát egy hiábavaló javítási ciklus követi, a BER (bázis kivágásos javítás, Base Excision Repair) javító enzimek kijavítják a helytelen bázist, de helyére a magas dUTP/dTTP arány miatt újból uracil épül be. A kétszálú DNS-en törések keletkeznek, amely a timin-mentes sejthalálhoz vezet (2. ábra) (4).

Számos vírus is kódolja genomjában a saját dUTPáz fehérjét. A virális dUTPáz gének nullmutációja csökkent szaporodó és fertőzőképességet eredményez a differenciált sejtekben. Az enzim azon vírusok számára fontos, melyek differenciált sejteket támadnak meg, mivel az ilyen gazdasejtben nincs elegendő dUTPáz (5).

2.1.1 A dUTPáz terápiás jelentősége

A rákellenes terápiák során széles körben alkalmazzák a timidilát bioszintéziséért felelős enzimeket gátló gyógyszereket. Ezek közül a legismertebbek a TS blokkoló fluoropirimidinek és a dihidrofolát-reduktáz (TS regenerációban vesz részt) gátlásáért felelős methotrexát, melyek jelentősen megnövelik a sejtben található dUTP/dTTP szintet (6).

A dUTPáz enzim szigorú sejtciklus szabályozás alatt áll, kifejeződése a gyorsan szaporodó sejtekre (a rákos és vírus fertőzött sejteket is beleértve) korlátozódik. Más metabolikus enzimektől eltérően nagyfokú specificitással rendelkezik a nukleotid szubsztrátra. Specifikus szubsztrát analóg antagonisták vagy dUTPáz inhibitorok alkalmazásával gátolni lehetne az enzim működését, így előidézve a timin-mentes sejthalált. Ez az enzim új célpont lehet az antitumor hatású gyógyszerek tervezésében, emellett a dUTPáz modellrendszer az enzim katalizált nukleotid foszforiláció részletes kutatásához (7,8).

2.1.2 dUTPáz szerkezete

A legtöbb dUTPáz szimmetrikus homotrimer, három aktív kötőhellyel rendelkezik. A homotrimer dUTPázok alegységeinek magját β -redők alkotják. A β -redők hurkokkal kapcsolódnak össze, ún. lekváros tekercsbe (jelly-roll), és egy antiparalell β -lemezt alakítanak ki, amelyben a nyolcadik β -szál nem a saját, hanem a szomszédos alegységből származik. Ez a vázszerkezet nagy stabilitást biztosít a trimernek (9).

A homotrimer dUTPáz három aktív centrumot tartalmaz. Az öt konzervált szekvencia motívumból kialakuló aktív zseb felépítéséhez mindhárom alegység hozzájárul (3). Az aktív centrum kialakítása nagyfokú specificitást biztosít az enzim számára, ezért a dUTPáz egyéb nukleotidok hidrolízisét csak kismértékben (pl. dCTP) vagy egyáltalán nem (pl. dUDP) katalizálja (10). Az ötös motívum, ami az enzim C-terminális végén helyezkedik el (C-terminális kar), fontos a katalitikus funkció betöltésében, de nem játszik szerepet az enzimstruktúra integritásának fenntartásában. Ez a glicin-gazdag régió, mely minden alegységből kinyúlva a szomszédos monomer felé irányul, az aktív hely fölé hajlik, létrehozva ezzel az enzim zárt konformációját. Itt található az a fenilalanin, amely hidrofób kölcsönhatást létesít a szubsztrát uracil gyűrűjével. Ugyanez a szekvencia, másnéven P-hurok motívum, sok nukleotidkötő fehérjében megtalálható, ahol szerepe lehet a szubsztrát kötésben, felismerésben, a katalízis és aktivitás szabályozásában. Ez a C-terminális kar nagymértékű flexibilitásának köszönhetően kristályszerkezetekben általában nem lokalizálható, csak abban az esetben, ha az aktív centrumba a szubsztrát kötődik és a kar rázárul az aktív helyre (11,12).

A Mg^{2+} ion az enzim kofaktora, mivel oldatfázisú kísérletek alapján a fémion elősegíti a ligandum kötődését, és növeli a hidrolízis sebességét (13).

2.2 *Staphylococcus aureus*

A *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus* nemzetségbe tartozó fakultatívan anaerob Gram-pozitív baktérium. A szabályos gömb alakú 0,8-1,0 μm átmérőjű sejtek szilárd táptalajon szőlőfürtszerű telepeket, folyékony tenyészetben kisebb csoportokat vagy láncolatokat alkotnak. Nevüket az általuk termelt sárga vagy aranyszínű staphyloxantin pigmentekről kapták.

A *S. aureus* a leggyakoribb emberi bakteriális kórokozó. Hozzávetőleg az emberiség 20%-a tartósan, 30%-a szakaszosan fertőzött *S. aureussal*. A fertőzés a bőr sérülésekor kerülhet a szervezetbe, borotválkozás, bőrfelszíni sérülés vagy műtét esetén (14).

Az általa okozott betegségek súlyossága széles spektrumon mozog, az enyhébbek közé tartozik például a bőrkíütés, gennyező bőrelváltozás, nyálkahártya gyulladás, húgyúti fertőzések. A *S. aureus* életveszélyes betegségeket is okozhat, mint például a gócos tüdőgyulladás, szívbelhártya-gyulladás, toxikus sokk szindróma, agyhártyagyulladás, vérmérgezés és csontvelőgyulladás.

Minden évben két millióan esnek kórházban szerzett fertőzések áldozatául, közöttük vezető helyen áll a *S. aureus* okozta fertőzés. A kórházi környezetben olyan antibiotikum rezisztens *S. aureus* törzsek alakulnak ki, amelyek a legyengült betegekre fokozottan veszélyesek (15).

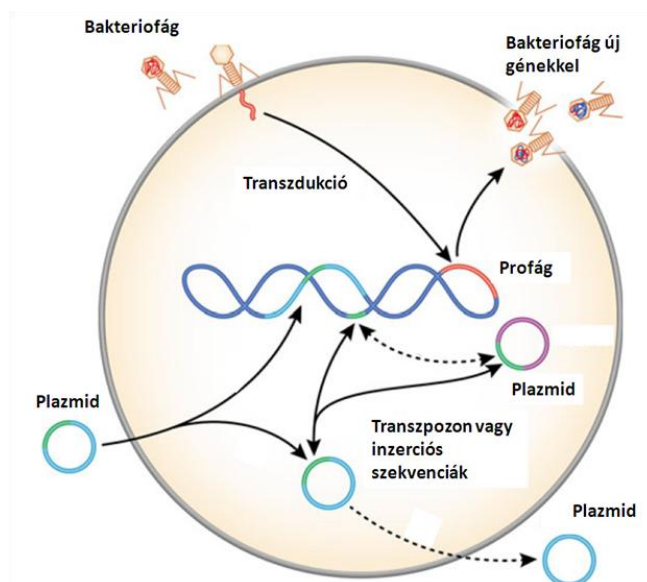
Az antibiotikumok felfedezése előtt nem volt hatékony gyógyszer a *S. aureus* fertőzés kezelésére, a halálozási arány elérte a 90%-ot (16). A baktérium nagyfokú alkalmazkodóképességét bizonyítja, hogy a penicillin 1940-ben való forgalomba kerülése után négy évvel már izoláltak penicillináz enzimet termelő *S. aureus* törzset, ami az 1950-es évekre általánosan elterjedt (17). A methicillin-rezisztens törzs (MRSA) 1960-ban jelent meg (14). A baktérium adaptív rezisztencia kialakulásának példája a közepes mértékben vancomycin-rezisztens törzsek megjelenése 1996-ban, amiket vancomycin kezeléssel átesett betegek véréből izoláltak (18). Ezt követően a teljesen vancomycin-rezisztens törzset 2002-ben izolálták (16).

A multidrog-rezisztens (egyszerre több típusú antibiotikummal szemben ellenálló) törzsek kialakulása komoly akadályt jelent a fertőzések kezelésében. A *S. aureus* okozta fertőzések visszaszorítása érdekében elengedhetetlen új gyógyszer célpontok kifejlesztése.

2.3 *Staphylococcus aureus* patogenicitási szigetek

A horizontális gén transzfer (transzformáció, konjugáció, transzdukció) fontos szerepet játszik a bakteriális evolúció során. Becslések szerint a teljes bakteriális genom 20%-a más fajoktól származik, amelyek hozzávetőleg a fele mozgékony genetikai elemekből (MGE) áll. Az MGE-k szabadon mozognak fajokon belül és fajok közt, sőt néha a nemzetségek közt lévő határokat is átlépik (19).

A fakultatív patogénekben az MGE-k az antibiotikum rezisztencia kialakulásáért és a környezeti adaptációért felelősek, segítik a befogadó sejthez való alkalmazkodást, ami által a sejt patogenitása fokozódik. Az MGE-k közé tartoznak mérsékelt fágok, plazmidok, transzpozonok és más horizontális géntranszfer által szerzett génszakaszok (3. ábra). Az MGE-k kódolják csaknem az összes bakteriális toxint, amelyek toxinózist, azaz toxin által kiváltott betegséget okoznak.



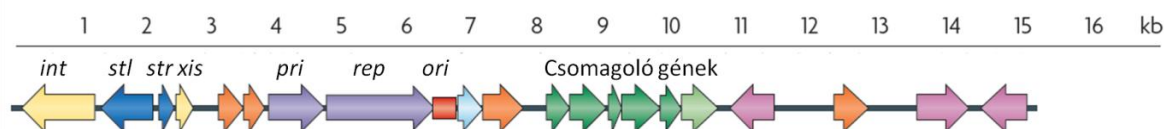
3. ábra

A mozgékony genetikai elemek beépülése *S. aureus* esetében (20)

A bakteriofág által hordozott gének integrálódnak a genomba, majd kivágódva becsomagolódnak a fágreszecskebe. A plazmidon kódolt gének beépülhetnek a genomba, rekombinálandhatnak a genom, vagy más plazmid DNS-el és kikerülhetnek a sejtől.

Az MGE-k egyik típusa, a *S. aureus* patogenicitási szigetek (*Staphylococcus aureus* pathogenicity islands, SaPI), melyek szuperantigén géneket hordozó, a baktérium kromoszómába integrálódott mintegy 15 kilobázis hosszú genetikai egységek (21). A szuperantigének felelősek az ételmérgezés, az íngyulladás és a toxikus sokk szindróma kialakulásáért.

A SaPI-k nem kódolják a horizontális géntranszferhez szükséges fehérjét, a transzdukciójuk megvalósításához helper fágokat használnak. A SaPI elemek génexpressziója gondosan szabályozott, annak érdekében, hogy genetikai tartalmát a fágreszecskek maximális mértékben továbbvigyék.



4. ábra

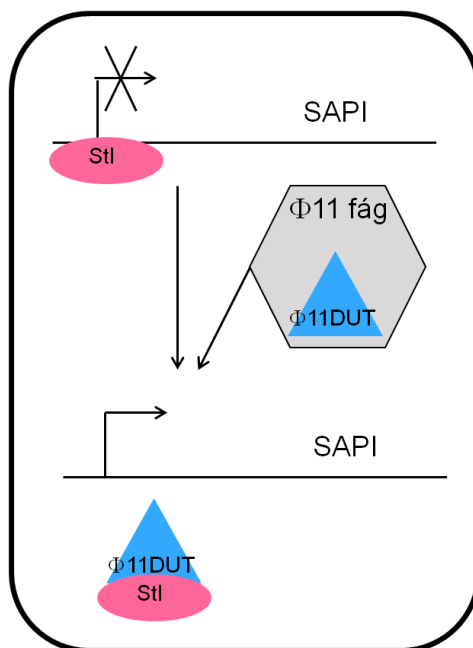
A SaPI bov1 géntérképe, a gének neve és zárójelben az általuk kódolt fehérje vagy funkció:
int (integráz), *stl* (Stl) *str* (ismeretlen), *xis* (kivágást végző enzim), *pri* (primáz),
rep (replikációs iniciátor), *ori* (replikációs origó) és csomagoló gének

A SAPI-k minden esetben rendelkeznek az életciklusukért felelős konzervált génszakasszal, egy Stl fehérjét kódoló génnel, amely a patogenicitási sziget kifejeződését szabályozza, továbbá majdnem mindegyik rendelkezik toxinnal vagy egyéb virulencia faktorral (19). A patogenicitási szigetek mobilitását és változékonyságát támasztja alá az a tény, hogy *S. aureus*-ban közel 20 különböző SAPI-t fedeztek fel (22). Méréseink során a SaPI bov1 génszakaszt használtuk (4. ábra).

Az irodalomban korábban a SAPI szabályozás leírására közöltek egy lehetséges modellt (21). Ebben az esetben az eredményekhez közvetett mérések útján jutottak el, ezért a kutatócsoportunk számos nyitott kérdést azonosított, melyek egy részét munkámban vizsgáltam.

Az irodalomban leírt modell szerint a SaPI kifejeződést a helper fág hiányában egy SAPI-n kódolt represszor, az Stl gátolja, ami a SAPI *str-stl* génszakasz közötti promóter régiójára kötődik (21). Az Stl addig represszálja a SaPI génszakaszt, míg a $\Phi 11$ helper fág megfertőzi a baktérium sejtet, és a lítikus növekedési szakaszba lép. Ekkor kialakul a kölcsönhatás a fág dUTPáz fehérje és az Stl között, a dUTPáz leszorítja az Stl-t a SaPI promóter régióról, így megindul a SaPI elemeinek kifejeződése és replikációja (5. ábra).

Az átíródott fehérje toxinok és szuperantigének a baktériumsejt lízise során kiszabadulnak és ezáltal fejtik ki betegségét előidéző hatásukat. A SaPI DNS átírása elindítja a saját kivágás-replikáció-csomagolás ciklusát. A helper fág génről íródnak át a csomagoló fehérjék, amik kapszid burkot képeznek a replikálódott SaPI DNS köré. Az így képződött fágreszecske a helper fághoz hasonló felépítésű és kizárólag SaPI DNS-t hordoz. A fágreszecske a baktériumsejt lízise során kiszabadul, majd további *S. aureus* sejteket fertőz meg, ezáltal biztosítja a horizontális géntranszfert (6. ábra) (19).



5. ábra
A SaPI derepresszió hipotetikus mechanizmusa

A $\Phi 11$ fág dUTPáz enzim a már ismert dUTP-t hidrolizáló aktivitása mellett a SaPI derepressziós mechanizmusának szabályozásában is részt vehet. Az Stl elsődleges szabályozó szerepét bizonyítja, hogy a represszort kódoló *stl* gén kiütése esetén a SaPI átírása a helper fág hiányában is létrejön (21).

Az Stl szerkezete nem ismert, szerkezeti homológia keresés során azonosítottunk az aminosav szekvencia alapján egy általános DNS kötő szekvenciát, a helix-turn-helix motívumot (23).

A rekombináció irányító faktorok a fehérjék egyik csoportja, amelyek a helyspecifikus rekombinációs reakciókat irányítják, amelyek jelentős hányada a SaPI-n kódolt rekombinációs rendszerek tagja. Az egyik legjobban tanulmányozott rekombináció irányító faktor a λ fág Xis, amely fehérje analógját kódolja a SaPI génszakasz.

Baktérium fágfertőzése során a fágbeépülést a rajta kódolt integráz (Int) irányítja, a rekombináció a fág *att_P* és a baktérium *att_C* génjei között jön létre, amely kialakítja az *att_L*-*att_R* rekombináns átkeresztződést. A kivágódás hasonló módon megy végbe fordított irányban.

Minden SaPI direkt ismétlődő szekvenciákkal határolt (*att_L* és *att_R*) ahol kitüntetett irányultsággal történik az átkeresztződés a SaPI és a specifikus kromoszóma helyek között. A SaPI beépüléséhez a gazda kromoszóma *att_C* helyére szükséges a SaPI-n kódolt *att_S* integrációs hely (6. ábra), mely hasonló a klasszikus bakteriofágokon található *att_P* helyhez. Az Stl szabályozza az Int és Xis expresszióját. A SaPI indukció hiányában az Stl mediált represszió az Int és Xis expresszió blokkolása által stabilizálja a SaPI-kat a kromoszómán (19,24).

2.4 Staphylococcus aureus Φ 11 fág, a Homo sapiens és Mycobacterium tuberculosis dUTPáz összehasonlítása

Dolgozatomban a SaPI kifejeződésében szerepet játszó *Staphylococcus aureus* Φ 11 fág dUTPáz (PH11DUT) vizsgáltam, és hasonlítottam össze a *Homo sapiens* dUTPázzal (hDUT) és *Mycobacterium tuberculosis* dUTPázzal (mtDUT) (7. ábra). Az hDUT és mtDUT fehérjéket részben eltérő katalitikus mechanizmusuk és központi csatornáik eltérő hidrofób-hidrofil tulajdonsága miatt választottuk kontrollnak a méréseink során.

PH11	MTNTLQVRLSENARMPERNHKTDA	GYDIFSAETVVLEPQEKAVIKTDVA	SVIPEGYVGLITS	SGVSSKTHLVIET--	SKIDAGYHG	NLGINIKNDATA	98
HSAP (22)	GGMQLRFARLSEHATAPTRGSA	AGYDLISAYDYTIIPMEKAVVKTDI	QIALPSGCYGRVAF	SGLIAAKHFIDVG--	AGVIDEDYRGNVGVVLFNFGKE		98
MTUB	MSTTLAIVRLDPGLPLPSRAHDGD	AGVDLISAEDVELAPGRRALVRTG	VAVVFGMVGLVHFS	SGLATRVGLSIVNSE	STIDAGYRGEIKVALINLDP		100

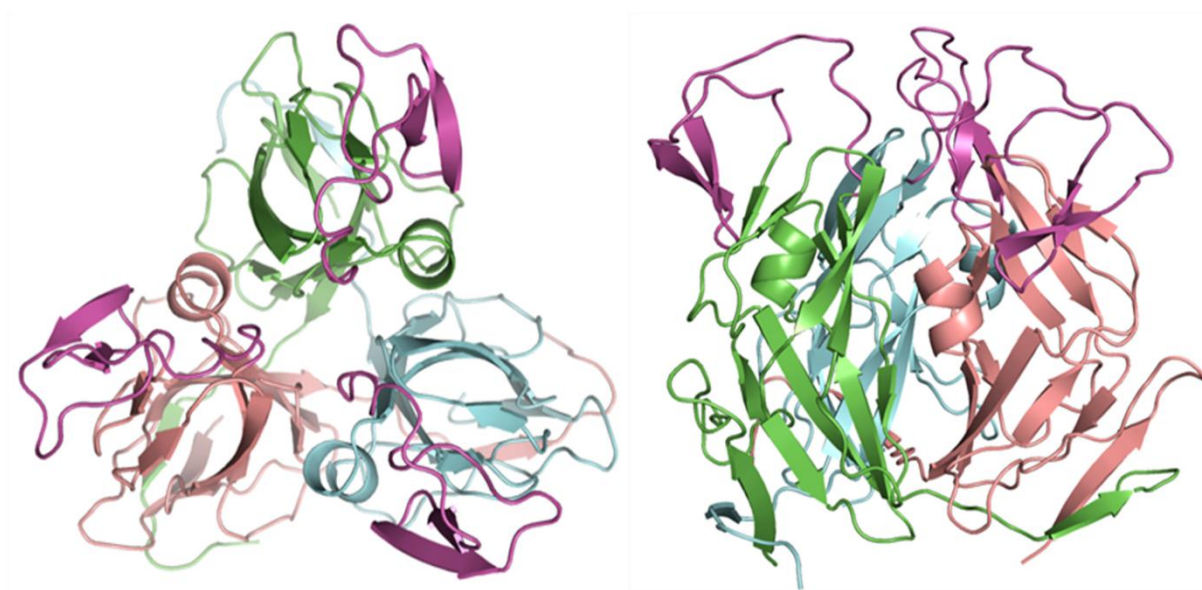
PH11	SN	GYITPGVFDIKGEIDLSDAIRQ	YGT	YQINEGDLAQLVIVPIWTP	PELKQVEEFES----	VSE	RGKGFSSGV----	169
HSAP (22)	K-----	FEVKKGDLIAQLICERIFYPEIEE	VQALDD-----	TERGSGFGSTGKN---				143
MTUB	AP-----	IVVHRGDLIAQLVQVVELVELVEV	SSFDEAGLAST	SRGLGGHGSSGGH	ASL			154

7. ábra

PH11, *Staphylococcus aureus* Φ 11 fág; HSAP, *Homo sapiens*; MTUB, *Mycobacterium tuberculosis* dUTPáz. A fekete keret a konzervált régiókat, a sárga háttér a PH11DUT inzertet, a zöld háttér az mtDUT inzertet (Δ loop) jelöli.

A különböző *Staphylococcus aureus* fág szekvenciák illesztése nagy hasonlóságot mutatott a hozzávetőleg 40 AS hosszú központi divergens régiót kivéve (inzert). Az inzert szerepe nem tisztázott, a feltételezés szerint a SaPI indukcióért felelős (21).

Irodalmi adatok alapján a központi divergens inzert régió deléciója (91 - 128. aminosav között) a PH11DUT-ból inaktiválta mind a dUTPáz aktivitást mind a SaPI indukciót (21). Kutatócsoportunk célul tűzte ki az inzert SaPI derepresszióban betöltött szerepének részletes vizsgálatát. Ezért létrehoztunk egy inzert-hiányos mutánst, amivel a leírtakhoz hasonlóan enzimatis aktivitást és StI kötő képességet vizsgáltunk.



8. ábra

Φ 11 dUTPáz szerkezete. A homotrimer alegységei rózsaszín, zöld és kék, az inzert magenta színnel van jelölve (PDB 4GV8)

A $\Phi 11$ fág dUTPáz szerkezetét a kutatócsoportunk oldotta meg (8. ábra) (PDB 4GV8, 2,1 Å, kézirat folyamatban). A C-terminális kar flexibilitása miatt a kristályszerkezetben nem látható. Azonban a fág specifikus inzert régió a szerkezetben jól lokalizálható β -szálas rendeződést ad. Fontos kiemelni, hogy a szerkezetben látható módon az inzert régió a fehérje egyéb régióival nem lép kölcsönhatásba, hanem a fehérje felszínéről kinyúló β -redős hurkot alkot.

A hDUT enzimnek kétféle izoformája ismert, a különbség egy rövid lokalizációs szignál az amino-terminális régióban. A rövidebb izoforma nukleáris, a hosszabb mitokondriális lokalizációs jelet hordoz (25).

A *M. tuberculosis*-ban a dUTPáznak kulcsszerepe van a dTTP előállításában, mert ez az egyedüli metabolikus útvonal a dTTP bioszintézisben, ami csak a dCTP $\rightarrow$ dUTP $\rightarrow$ dUMP reakció termékeként jöhet létre. A dUTPáz gátlása itt többszörösen ható metabolikus gátlást eredményez (26). Érdekes módon az mtDUT rendelkezik egy konzervált specifikus inzerettel (Δ loop), amelynek funkciója és élettani szerepe nem ismert. A Δ loop deléciója *dut* génen letális fenotípushoz vezetett, amely a specifikus inzert létfontosságú szerepét igazolja (27).

A dUTPáz katalitikus mechanizmusában nyitott és zárt enzimkonformációt lehetett azonosítani. A prokarióta enzimben a nyitott konformációt egy azonnali katalitikus hasítás követi, ezzel segítve a dUMP-t az aktív hely elhagyásában. A humán enzimben a zárt konformáció megmarad a hasítás után, a reakció több lépésből áll, mint amelyet a klasszikus Michaelis-Menten kinetika leír (3).

Jelentős különbség a prokarióta és eukarióta dUTPázok között a három alegység kapcsolódó felületén kialakuló ún. központi csatorna polaritása. A prokarióta dUTPázok esetén a központi csatornát alkotó aminosav oldalláncok hidrofób jellegűek, az alegységek közt az összetartó erőt elsősorban van der Waals kötések biztosítják. A csatorna szoros illeszkedésű, vízmolekulák számára nem hozzáférhető (28). Eukarióta dUTPázok poláris központi csatornával rendelkeznek, ahol a poláris kölcsönhatás a jellemző összetartó erő az alegységek között. A csatorna hidrofíl és a vízmolekulák számára hozzáférhető (2).

3 Anyagok és módszerek

3.1 DNS munkák

3.1.1 Felhasznált expressziós vektorok előállítása

3.1.1.1 Primertervezés

Az aktivitásban résztvevő fehérje szegmensek vizsgálatához különböző $\Phi 11$ dUTPáz mutánsokat készítettünk a QuickChange protokoll alapján, de a PCR hőmérséklet program hőfok paramétereit az általunk használt Finnzyme polimeráz enzimre optimalizáltuk.

A tervezésnél a következő elveket vettük figyelembe: (i) a mutagén primer hossza 30-40, de maximum 45 bázispár, (ii) a kívánt mutáció a primer közepén található, legalább 10-15 bázispárra a primer végétől, (iii) a teljes primer guanin - citozin bázispár tartalma legalább 40%, ami a végeihez közel több mint 50%-os és (iv) a forward és reverse primer olvadáspontja (melting temperature, T_M) egymáshoz közeli. Ez a hőmérséklet a PCR ciklus második fázisa, a primer bekötődés hőmérsékletének meghatározása miatt fontos, amit az alacsonyabb olvadáspontú primer olvadási hőmérsékleténél 2°C -al alacsonyabbnak választottunk. Az olvadáspontot a Finnzyme honlapján található T_M calculator segítségével számoltuk ki.

3.1.1.2 Felhasznált primerek

$\Phi 11\text{DUT}^{\text{F164W}}$ For	5'- GCG AAC GCG GCG AAA AAG GCT GGG GCA GCA GCG GCG TG -3'
$\Phi 11\text{DUT}^{\text{F164W}}$ Rev	5'- CAC GCC GCT GCT GCC CCA GCC TTT TTC GCC GCG TTC GC -3'
$\Phi 11\text{DUT}^{\text{F108W}}$ For	5'- CTATATTACCCCGGGCGTGTGGGATATTAAAGGCGAAATTGATC -3'
$\Phi 11\text{DUT}^{\text{F108W}}$ Rev	5'- GATCAATTTTCGCCTTTAATATCCACACGCCCGGGGTAATATAG -3'
$\Phi 11\text{DUT}^{\text{E158STOP}}$ For	5'- GAATTTGAAAGCGTGAGCTAACGCGGCGAAAAAGGC -3'
$\Phi 11\text{DUT}^{\text{E158STOP}}$ Rev	5'- GCCTTTTTTCGCCGCGTTAGCTCACGCTTTCAAATTC -3'
$\Phi 11\text{DUT}^{\Delta\text{insert}}$ For	5'- GCGATTGCGAGCAACTATGGCACCTATCAGATTAACGAAG -3'
$\Phi 11\text{DUT}^{\Delta\text{insert}}$ Rev	5'- CTTCGTTAATCTGATAGGTGCCATAGTTGCTCGCAATCGC -3'

1. táblázat

A QuickChange protokollhoz használt forward (For) és reverse (Rev) mutáns primerek

A $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F164W}}$ primerekkel a Phe164Trp mutációt vittünk be a C-terminális karba, a $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F108W}}$ primerekkel Phe108Trp mutációt okoztunk, ami az inzert szekvenciába hozott létre triptofán fluoreszcens szenzort. A triptofán jelenléte a fluoreszcens mérésekhez volt szükséges.

A kar hatását az aktivitásra a C-terminális kar motívum deléziós mutánsokkal vizsgáltuk ($\Phi 11\text{DUT}^{\text{E158STOP}}$). Az $\Phi 11\text{DUT}^{\Delta\text{insert}}$ mutáns létrehozására egy olyan primert alkalmaztunk, ami tartalmazta az inzert előtti és mögötti szekvenciával komplementer szakaszt. Így a PCR reakció során a feltapadt primerrel szemben kihurkolódott az inzert szekvencia, a további

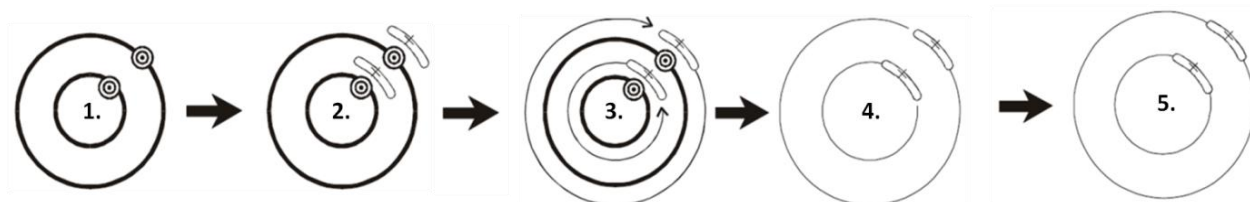
másolások során már az inzertmentes szekvencia szolgált mintául. Így létrehoztunk egy olyan konstruktot, ami nem tartalmazza az enzim 102 - 124. aminosav régiót (1. táblázat).

3.1.1.3 PCR reakció

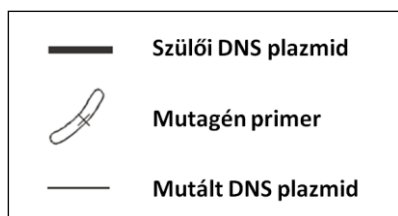
A DNS függő polimeráz reakciót két specifikus oligonukleotid primer jelenlétében többször megismételve az eredeti DNS szekvencia kiválasztott része megsokszorozható. A technika kulcsenzime a magas hőmérsékleten aktív polimeráz enzim, ami lehetővé teszi, hogy a ciklusokat a hőmérséklet változtatásával irányítsuk. A reakció három lépésből áll: (i) a kettős szálú DNS hődenaturálása, (ii) a specifikus oligonukleotid primerek megkötődése a DNS templáton, (iii) új DNS szál szintézise DNS polimerázzal. A ciklus a kívánt DNS koncentráció eléréséig ismételhető, a DNS tartalom a folyamat során exponenciálisan nő. A termékben az eredeti DNS templát mennyisége elhanyagolható lesz a cél szekvencia mennyiségéhez képest.

3.1.1.4 Helyspecifikus mutagenézis létrehozása

A helyspecifikus mutagenézist a QuickChange protokoll szerint végeztem, amelyet pontmutáció és irányított deléciónak alkalmaztam.



9. ábra



A QuickChange mutagenézis protokoll lépései:

- (1) a mutáció helye a kétszálú plazmidon,
- (2) plazmid denaturáció és a szintetikus primer felpadása,
- (3) DNS polimeráz megszintetizálja a DNS-t, de nem zárja a kört,
- (4) az eredeti metilált plazmid emésztése,
- (5) a plazmid transzformálása vektorba, ahol a sejt DNS javító mechanizmusa zárja a plazmidot

Az eljárás során a megváltoztatni kívánt szakaszt tartalmazó, supercoiled, kétszálú DNS vektort és a két a mutációhoz tervezett szintetikus oligonukleotid primert használtam. A PCR reakció során a két primer felpadt a komplementer DNS szakaszra és egy nagy pontosságú polimeráz megszintetizálta az új, mutáns plazmidot. A PCR ciklust követően a terméket *Dpn I* endonukleázzal kezeltem, ami specifikusan emészt az *E. coliban* termelt szülői metilált és hemimetilált DNS-t, így szelektálva a mutáns DNS-re (9. ábra).

A helyspecifikus mutagenézishez használt PCR reakcióelegy 0,25 µl forward és reverse primert, 0,2 mM dNTP keveréket (Fermentas), 0,3 ng/µl Phusion DNS polimerázt (Finnzymes) tartalmazott nukleázmentes dH₂O-val hígított HF pufferben (Finnzymes). A felhasznált PCR ciklusok paramétereit a 2. táblázat tartalmazza.

ciklusszám	hőmérséklet (°C)	idő (sec)
1	95	60
30	95	15
	*	30
	72	10
1	72	600
1	4	∞

2. táblázat

A helyspecifikus mutagenézishez használt PCR ciklusok.

A *-al jelölt primer bekötődési hőmérsékletek rendre:

$\Phi 11DUT^{F164W}$ 67, $\Phi 11DUT^{F108W}$ 60, $\Phi 11DUT^{E158STOP}$ 56, $\Phi 11DUT^{Ainsert}$ 60 °C volt

3.1.1.5 Plazmidok felszaporítása és tisztítása

A plazmidokat előzetesen kompetenssé tett *E. coli XL1 Blue* baktériumtörzsbe transzformáltam, majd szelektív antibiotikumok (carbenicillin) jelenlétében szaporítottam LB (Laurie-Bertani) médiumban. Az LB médium 1000 ml-ben 10 g triptont, 5 g élesztő extraktot, 10 g NaCl-t tartalmaz, pH=7.

A vektor ampicillin-rezisztenciát tartalmazott, én mégis carbenicillint tartalmazó tápoldatba szelektáltam, amely szaporodó sejtenyészetben stabilabb, mint az ampicillin.

A plazmidok tisztítására NucleoSpin Plasmid MiniPrep Kit-et használtam. A baktérium pelletből SDS/alkalikus lízissel vontam ki és vittem oldatba a plazmidot. Az RNS-ektől RNáz hozzáadásával, a fehérjéktől és genomi DNS-től kálium-acetát tartalmú oldattal való kicsapással szabadultam meg. Centrifugálással választottam el a szilárd fázist a plazmidot tartalmazó oldattól, amit a következő lépésben szlikamembránra kötöttem. Alkoholos mosást követően a plazmidot kétszer desztillált vízzel eluáltam.

3.1.2 Stl kötő DNS szekvencia tervezése

Az Stl kötő DNS szakaszra az EMSA vizsgálathoz volt szükségünk, amihez a Tormo-Más és munkatársai által felhasznált Stl-Str közti szakaszt használtuk (21).

Az Stl kötő szakaszt egy pEX-A vektorban rendeltünk meg, ami tartalmazott antibiotikum rezisztenciát – ami a baktérium szelekcióban szükséges – és több restriktációs hasító helyet, amelyekre végül nem volt szükségünk, mert a primerek segítségével a templát alapján specifikusan szaporítottuk fel az Stl kötő DNS szakaszt.

Az Stl kötő helyet PCR technikával sokszorozítottuk. Templátként a pEX-A vektor szolgált, miután XL1 Blue sejtbe transzformáltuk, felszaporítottuk, és belőle plazmidot tisztítottunk. A primereket a kötő hely két végére terveztük (3. táblázat). A reakcióelegyen 18 ng/μl templát, 0,25 μl forward és reverse primer koncentrációt alkalmaztunk.

Stl kötő szakasz For	5' - GAA TTC ATT TCA ACA TTA AAT ATT G -3'
Stl kötő szakasz Rev	5' - GGA TCC TAA ATC CTG TCC TTT CAC -3'

3. táblázat

Stl kötő DNS szakasz felszaporításához használt primerek

A reakciót 2x MyTaq HS Red Mix felhasználással végeztük, ami tartalmazta a Taq polimerázon kívül az összes szükséges további reagenst, a MyTaq puffert, a dNTP-ket, MgCl₂-t és stabilizátorokat.

A PCR reakció ciklusban alkalmazott hőmérsékleteket és időket a 4. táblázat tartalmazza.

ciklusszám	hőmérséklet (°C)	idő (sec)
1	95	60
30	95	15
	55	30
	72	10
1	72	600
1	4	∞

4. táblázat

Az Sfl kötőhely felszaporításához használt PCR ciklus

3.1.3 Agaróz gélelektroforézis

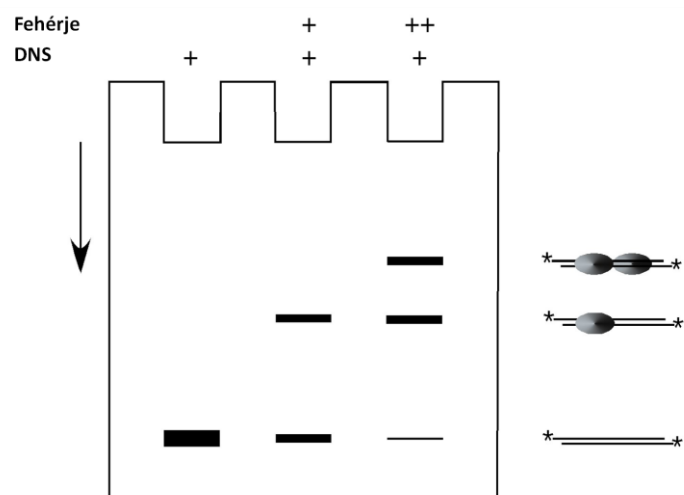
Agaróz gélelektroforézist használtam a DNS minták elválasztására. Mivel a DNS a molekula méretének függvényében egységesen negatívan töltött, a gélelektroforézissel megvalósítható a méret szerinti elválasztás. A viszonylag nagy molekulaméretetek miatt poliakrilamid helyett a nagyobb pórusméretet biztosító agarózt használják a plazmid vagy gén méretű DNS-ek elválasztására. Az elválasztás alapja, hogy a nagyobb fajlagos töltéssel rendelkező kisebb fragmensek gyorsabban haladnak, mint a kisebb fajlagos töltéssel rendelkező nagyobb fragmentumok.

A PCR termékek tisztaságának és minőségének vizsgálatára 1%-os agaróz gélét használtam. 0,15 g agarózt oldottam 22 ml TAE (40 mM Tris/acetát, 1 mM EDTA, pH = 8,5) oldatban, az agaróz teljes oldódásáig melegítettem az oldatot. Ezt követően 50°C-ra hűtve 2 µl GelRed (Biotium) fluoreszcens festéket adtam hozzá, és a gélöntő apparátusban hagytam megdermedni. A gélre a DNS mintákat mintakoktélban („6X Loading dye”, Fermentas) vittem fel. A mintákban található DNS molekulák nagyságát a gélen párhuzamosan futtatott DNS létra (Fermentas) ismert fragmentjeinek méretéhez viszonyítva állapítottam meg.

Az elektroforézist TAE pufferben végzem, 100 mV feszültséggel.

3.1.4 EMSA

Az elektroforetikus mobilitás eltolódás vizsgálat (Electrophoresis mobility shift assay, EMSA) egy gyors és érzékeny módszer a fehérje-nukleinsav kölcsönhatás detektálására. A módszer alapja, hogy a fehérje-nukleinsav komplex elektroforetikus mozgékonyasága kisebb, mint a szabad nukleinsavra jellemző mobilitás (10. ábra). A vizsgálat szemi-quantitatív, a komplex pontos sztöchiometriai, affinitás és kinetikai adatait más módszerek segítségével állapíthatjuk meg.



10. ábra
EMSA modell (31)

Ez a technika számos előnnyel rendelkezik, egyszerű elvégezni, mégis elég robusztus sokféle kötődési körülmény alkalmazására. Széles határok között mozoghat a nukleinsav mérete (néhány oligonukleotidtól a több ezer nukleotidig vagy bázispárig) és szerkezete (egyszálú, kétszálú, kis cirkuláris). Egy gélen tíz vizsgálati sáv van, amelyekbe egymástól független DNS és fehérje koncentrációk mellett figyelhetjük meg a kölcsönhatást. Egy reakció során jelen lehet egy nukleinsav mellett két fehérje, mint ahogy a vizsgálataim nagy részében történt.

Az EMSA legfontosabb limitációja, hogy a reakciópartnerek nincsenek kémiai egyensúlyban az elektroforézis során. A gyors disszociáció megakadályozhatja a komplex detektálását, míg a lassú disszociáció a kötés denzitás alulbecsléséhez vezethet. Másrészről sok komplex stabilabb a gélben, mint szabad oldatban, ezen hatás csökkenthető rövid elektroforézis idő alkalmazásával. További korlát, hogy a fehérje-nukleinsav mobilitása nem pusztán a mérettől függ, így nem ad információt a molekulatömegről (32,33).

A vizsgálataim során a laborban korábban alkalmazott protokollt vettem alapul, amit az általam vizsgált rendszerre optimalizáltam.

Először megöntöttem a poliakrilamid gél, ami annyiban különbözött az SDS-PAGE gélöntéstől (lásd 4.2.2.1.), hogy a reagensek közt nem szerepelt az SDS (5. táblázat). A felületaktív SDS-t azért hagytam el, mivel a nukleinsavval való komplexálódáshoz a fehérje natív konformációjára volt szükségem.

	elválasztó gél	tömörítő gél
ddH ₂ O	2,75 ml	1,63 ml
elválasztó/tömörítő puffer	1,25 ml	625 µl
40% akrilamid	1 ml	244 µ
10% APS	50 µl	25 µ
TEMED	5 µ	5 µ

5. táblázat

EMSA-hoz használt poliakrilamid gélhez felhasznált anyagok 1 db géltre számítva

A gélt előfuttattam 100V-on egy órán keresztül ezzel segítve elő a futtató puffer homogén eloszlását a gélben.

Ezt követően összeállítottam a reakcióelegyeket. Minden minta tartalmazott DNS-t (Stl kötő hely), 0,5 mM EDTA-t (etilén-diamin-tetraecetsav) a nukleáz enzimek gátlására és LD (Loading Dye) puffert amellyel a gélben követni tudtam a reakciópartnerek mozgását. A reakcióelegyekbe a vizsgálatnak megfelelő koncentrációban adagoltam az Stl és a különböző eredetű dUTPáz enzimeket. Az oldat térfogatát minden esetben Stl pufferrel 20 µl-re egészítettem ki.

3.2 Fehérje munkák

3.2.1 Fehérje termelés

3.2.1.1 Kompetens sejtek készítése

A kompetens sejtek, olyan sejtek, amelyeknek sejtfaa átjárható a DNS számára, tehát képesek extracelluláris DNS felvételére. A következő QIAGEN protokoll szerint készítettem a kompetens sejteket.

5 ml LB tápoldatba bemértem 5 µl (törzsoldat: 12,5µg/ml) tetraciklint, majd beoltottam XL1 Blue sejtekkel és rázatás mellett 37°C-on overnight (egy éjszakán át) növesztettem. A felnövesztett előkultúrából 500 µl-t átoltottam 50 ml – 50 µl tetraciklint tartalmazó – LB tápoldatba. A sejteket 37°C-on növesztettem óránkénti mintavétel mellett, míg az OD (optikai denzitás, A_{600nm}) elérte az exponenciális növekedési fázisra jellemző 0,6-os értéket. A denzitás mérést Biochrom WPA CO8000 denzitométeren végeztem. A sejteket 3600 rpm-en centrifugáltam 4°C-on 20 percen át, ezt követően a felülúszót eltávolítottam. A lefugált sejteket 5 ml TFBII-ben (100mM RbCl, 50mM MnCl, 30 mM K-acetát, 10 mM CaCl₂, 15 % glicerín pH 5,8) felfuszpendáltam, majd 20 percre jégre raktam. Ismét egy centrifugálás - felfuszpendálás-jegelés ciklus következett az előzőekhez hasonlóan, de most 1 ml TFBII-ben (10 mM MOPS (3-[N-morfolino]-propánszulfonsav), 10mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % glicerín pH 6,8) szuszpendáltam a sejteket. Végül 15% glicerint adtam a sejtekhez és 100 µl-es adagokban folyékony nitrogénnel lefagyasztva a -80°C-os hűtőben tároltam a következő felhasználásig.

3.2.1.2 Transzformálás

A kompetenssé tett sejtekbe a plazmid DNS bejuttatásához hősokk módszert alkalmaztam. 100 µl kompetens baktériumsejthez 1 µl 1,4 M β-ME-t (2-merkaptóetanol) pipettáztam és 5 percig jégen hagytam. Ezután hozzáadtam 30 ng plazmidot és 30 percig jegeltem a sejteket. A hősokk egy 90 másodperces 42°C-os termosztálás, majd 2 perces jegelés volt. Hozzáadtam 200 µl LB tápoldatot és a sejteket 1 órán át 37°C-on 200 rpm-en rázattam. Ezt követte egy szelekciós lépés, ahol a XL1 Blue szelekciós antibiotikuma mellé a plazmidon kódolt rezisztenciának megfelelő antibiotikumot is tettem az LB tápoldatba.

3.2.1.3 Expresszió

A baktériumsejteket steril, kétféle antibiotikumot tartalmazó LB tápoldatban szaporítottam, 37°C-on, 4 órán át. Így csak a sikeresen transzformált XL1 Blue sejtek szaporodtak.

A sejtkoncentráció változását bizonyos időközönként vett minták optikai denzitásának spektrofotometriás mérésével követtem. A sejteket logaritmikus növekedési fázisuk elején indukáltam IPTG-vel (izopropil-tiogalaktozid).

Az IPTG – ami az allolaktóz stabil analógja – a *lac* promóter ellenőrzése alatt álló T7 DNS-függő RNS polimeráz enzimet kódoló génről megindítja a polimeráz expresszióját. Az így termelődött T7 polimeráz tevékenységét a plazmidra irányítja a nagyon erős T7-specifikus promóter régió, amely a termelni kívánt fehérje gén előtt helyezkedik el a plazmidon. Így az IPTG hozzáadásával a dUTPáz génről történő expressziót tudtam beindítani. Mintegy négy óra hosszat termeltem az enzimet, majd centrifugálás után feltártam a sejteket.

3.2.1.4 Feltárás

A feltárás célja, hogy megbontsuk a sejtfalat, és a plazmában található, oldható fehérjéket sértetlenül oldatba vigyük.

A sejt pelletet 50 ml lízis pufferben felfuszpendáltam. A lízis puffer tartalmazott 20 mM pH 7 TRIS puffert, 500 mM KCl-t, 1 proteáz inhibitor tablettát (Roche), 0,1 mM PMSF-t (fenil-metil-szulfonil-fluorid), 10 mM β -merkaptotanol és 10 μ g/mg RNázt és DNázt.

A sejtfal megbontásával bizonyos proteázok működésbe lépnek, melyeket a lízis pufferbe adagolt proteáz inhibitor tablettával, (metalloproteázokat gátolják), valamint PMSF-el (szerin oldalláncsal működő enzimeket – pl. tripszin, kimotripszin - specifikusan gátolja úgy, hogy velük kovalens komplexet képez) hatástalanítottam.

A β - merkaptotanol redukáló környezetet alakít ki, ami meggátolja a ciszteinek közötti diszulfidhidak kialakulását. A feltárás során a sejteket lízis pufferben homogenizáltam, amelyet egymás után következő gyors folyékony nitrogénbe történő lefagyasztásokkal és vízfürdőn való felolvasztásokkal folytattam. Majd a feltárandó sejtminztát szonikáltam, míg átlátszó, kis viszkozitású oldatot kaptam. Ezután 4°C-on, 11000 rpm-el, 20 percen át centrifugáltam az elegyet. A felülúszóban maradt fehérjéket tisztítottam tovább kromatográfiás módszerekkel.

3.2.1.5 Fehérjetisztítás

3.2.1.5.1 Ioncsere kromatográfia

A különböző típusú dUTPázokat ioncsérés kromatográfiával tisztítottuk. A töltésekkel rendelkező fehérjék az ellentétes előjelű töltéssel rendelkező ioncsereelő fázison adszorbeálódhatnak. A dinamikus egyensúlyt a mozgófázis pH-ja és a sókoncentrációja befolyásolja, ezért a megkötődött komponenseket a sókoncentráció változtatásával (ún.

sógradienssel) lehet lemosni az állófázis felületéről. A mozgó fázisba adagolt sóban található versenyző ionok (pl. NaCl) nem befolyásolják a szelektivitást, de elősegítik a fehérjemolekulák deszorpcióját. Minél nagyobb a fehérje eredő töltése, annál erősebben fog adszorbeálódni, és annál magasabb sókoncentráció szükséges a minta oszlopról való lemosására.

A sógradiens létrehozására két puffert alkalmaztunk: A (20mM TRIS, 100mM NaCl, 0,1 mM PMSF, 10 mM β -merkaptoethanol, pH 8), és B (20mM TRIS, 1 M NaCl, 0,1 mM PMSF, 10 mM β -merkaptoethanol, pH 8).

Az oszlopot a fehérjék megkötése után A pufferrel mostuk, majd 6 oszloptérfogaton át tartó növekvő B puffer koncentráció mellett eluáltuk a fehérjéket. A tisztítást ÄKTA rendszerrel, Q Sepharose oszlopon végeztük.

3.2.1.5.2 HiTrap Heparin

Az Stl fehérje tisztítását HiTrap Heparin HP (5 ml) oszlopon végeztük ÄKTA rendszerrel. A heparin DNS-t mimikáló tulajdonsága miatt ez az oszlop DNS-kötő fehérjék tisztítására kiválóan alkalmas affinitás oszlop. Az Stl szerkezete nem ismert, de DNS kötő fehérje révén rendelkezik egy DNS kötő helix-turn-helix régióval, amit szekvencia becslések alapján feltételeztünk.

A kromatográfia előtt az oszlopot az ioncsere kromatográfiánál használt A pufferrel hoztuk egyensúlyba. A minta felvitele után 3 oszloptérfogatnyi (15 ml) pufferrel mostuk az oszlopot, majd 10 oszloptérfogatnyi (50 ml) 1M NaCl tartalomig vezető gradienssel végeztük az elválasztást.

3.2.2 Fehérjevizsgálat

3.2.2.1 SDS-PAGE

	elválasztó gél	tömörítő gél
ddH ₂ O	2,2 ml	1,63 ml
elválasztó/tömörítő puffer	1,25 ml	625 μ l
40% akrilamid	1 ml	244 μ
SDS (10%)	50 μ l	25 μ l
10% APS	50 μ l	25 μ
TEMED	5 μ	5 μ

6. táblázat

SDS-PAGE gélhez felhasznált anyagok 1 db gélre számítva

Az elválasztás poliakrilamid gélben történt, ami SDS (sodium-dodecil-szulfát) denaturáló ágenst tartalmaz. Ennek hatására a fehérjék elvesztették natív konformációjukat, felületi töltésük a teljes aminosav láncon negatívvá vált. A fehérjék tehát eredeti töltésüktől függetlenül a pozitív töltés felé haladtak, az elválasztást egyedül az egyes proteinek molekulatömege határozta meg. A gél egy vékony a különböző fehérjék koncentrációját

szolgáló tömörítő (6% poliarilamid) és egy elválasztó (12% poliarilamid) rétegből állt (6. táblázat).

A gélelektroforézist poliakrilamid géleken Protean III berendezésben (Bio-Rad) végeztem. A fehérje csíkokat koloidális Coomassie Brilliant Blue festéssel (Biosafe Coomassie stain; Bio-Rad) tettem láthatóvá.

A molekulatömeg meghatározáshoz kétféle DNS-létrát használtam: ProSiere, Quad Color Protein Marker és PageRuler Plus Prestained Protein Ladder.

3.2.2.2 Koncentráció mérés

A fehérjék az aromás aminosav oldalláncok miatt 280 nm-nél, a nukleinsavak az aromás bázisok miatt 260 nm-nél specifikus fényelnyelést mutatnak. Az abszorbancia és koncentráció közti összefüggést a Lambert-Beer törvényt adja meg, segítségével a tiszta fehérjék és nukleinsavak koncentrációja meghatározható.

$$A = c \cdot l \cdot \varepsilon$$

ahol a fehérjékre vonatkozó extinkciós koefficiens (ε , $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) az Expasy ProtParam programjával becsültem meg (7. táblázat). A mérést Nanodrop ND-1000 spektrofotométeren (Thermo Scientific) végeztem.

fehérjék	Molekulatömeg (Da)	ε ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
Stl	34010	1,051
$\Phi 11$ DUT	18350	0,786
$\Phi 11$ DUT ^{F164W}	18389	1,083
$\Phi 11$ DUT ^{F108W}	18389	1,083
$\Phi 11$ DUT ^{E158STOP}	17232	0,841
$\Phi 11$ DUT ^{Δinsert}	15978	0,81
mtDUT	17966	0.166
hDUT	17748	0,51

7. táblázat

A mérések során használt fehérjék az Expasy Prot Param programmal becsült molekulatömege és extinkciós koefficiens értékei

3.2.2.3 Fluoreszcens spektroszkópia

Három fehérjealkotó aminosav viselkedik fluorofórként, a fenilalanin, tirozin és triptofán. A megvilágító fényt egy specifikus tartományban elnyelik, majd kisugározzák. 280 nm-en a tirozin és triptofán egyaránt gerjeszthető, míg 295 nm-en a triptofán szelektíven sugározható be. Méréseink során az utóbbi hullámhosszon gerjesztettem a mintát és a triptofán jelét vizsgáltuk, ami a legerősebb fluoreszcenciát mutató aminosav. A kisugárzott fény spektrumát 320-420 nm közt detektáltam. A mérést FluoroMax-3 spektrofotométeren (HORIBA Jobin Yvon) végeztem, 20 °C-ra termosztált 800 μl pufferben, 1 cm optikai úthosszal mellett.

3.2.2.4 dUTPáz aktivitásmérés

A kinetikai vizsgálatokban a dUTPáz által katalizált $\text{dUTP} \rightarrow \text{dUMP} + \text{PPi}$ reakció lefolyása spektrofotometriásan követhető. A reakció során protonok is szabadulnak fel, és ezek mennyisége egyenesen arányos a képződő termék (dUMP) mennyiségével. A reakciót fenolvörös pufferben végeztem, ami 1mM HEPES-t pH 7,5, 150 mM KCl-t, 5 mM MgCl_2 -t, 40 μM fenolvörös indikátort tartalmazott. A mérés során bekövetkező fenolvörös színváltozást 595 nm-en detektáltam. A kezdeti reakciósebesség (V_0) meghatározáshoz szükséges a dUTPáz koncentráció (E), a dUTP koncentráció (S), a mérési görbe első 10%-ra illesztett egyenes meredeksége (m) és a mérés előtt és után mért adszorbancia különbsége. A V_0 számításhoz az alábbi egyenletet használtam:

$$V_0 = \frac{m}{E \cdot \frac{\Delta A}{S}}$$

A mérés elején hozzáadtam a fenolvörös pufferhez a dUTPáz, megvártam, míg stabilizálódik az abszorbancia jel, majd pillanatszerűen hozzáadtam a dUTP-t és figyeltem a reakció lefutását. A reakció végét az abszorbancia jel állandósulása mutatta.

A relatív aktivitás értéket a kezdeti reakciósebesség értékekből számoltam, a görbék V_0 maximumának értékével elosztottam a mérés V_0 értékeit és az eredményt százalékos formában adtam meg.

A mérést Specord 200 spektrofotométeren (Analytik Jena) végeztem, 1 cm optikai úthosszal.

3.2.2.5 Gélszűrés

A fehérjék oligomerizációjának és molekulatömegének meghatározására, valamint az StI-dUTPáz komplexképzésének meghatározására gélszűrést alkalmaztunk.

A gélszűrés, másnéven gélkromatográfia, a molekulák méretkülönbségén alapuló elválasztási módszer. A gélszűrés során a kromatográfiás oszlop mátrixát jól meghatározott pórusmérettel rendelkező dextransz gyöngyök alkotják. Az olyan kisméretű fehérjék, amelyek beférnek a mátrixot alkotó gyöngyök valamennyi pórusán, a teljes gyöngyökön belüli, valamint a gyöngyök közötti térfogatot bejárják a gélszűrés során, és ezért legutoljára eluálódnak. Ezzel szemben az olyan nagyméretű fehérjék, amelyek nem tudnak bejutni a gyöngyök pórusain, csak a gyöngyök közötti térfogaton haladnak át, így korán eluálódnak. A közepes méretű fehérjék egyes pórusokon beférnek, másokon nem, így ezek a fehérjék bejárják a gyöngyök közötti térfogatot, és részben a gyöngyökön belüli térfogatot is, ezért a „kis” és „nagy” fehérjék közötti frakciókban eluálódnak.

Ismert molekulatömegű makromolekulákkal meghatározható egy kalibrációs egyenlet, amelynek a segítségével az ismeretlen tömegű anyag molekulatömege kiszámolható annak retenciós idejéből.

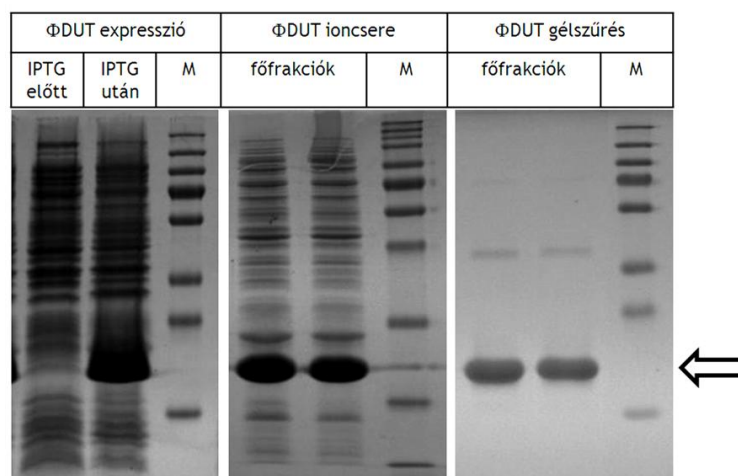
A gélszűrésre a Superdex 200-as oszlopot (GE Healthcare) használtuk az ÄKTA rendszerben. Az elúciós puffer 20mM TRIS pH 7,5 és 400 mM NaCl volt.

4 Eredmények

4.1 A fehérje termelés és tisztítás eredményei

A méréseimhez megfelelő mennyiségű és tisztaságú enzimekre volt szükségem, ezek termelésében és tisztításában Zagyva Imre, Dr. Németh Veronika és Leveles Ibolya voltak a segítségemre.

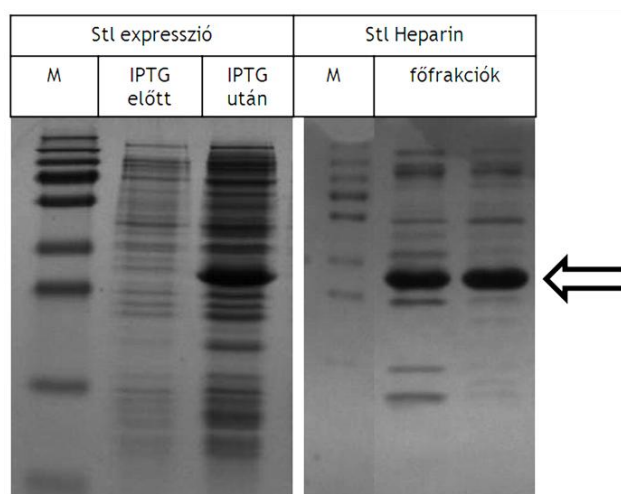
A vad típusú Φ 11DUT tisztítása során alkalmazott ioncserés majd gélkromatográfia eredménye a 11. ábrán látható. A mutáns dUTPázokat hasonló módon tisztítottuk.



11. ábra
 Φ 11DUT tisztítás

Az Stl fehérje tisztításához HiTrap Heparin oszlopot használtunk (12. ábra). Gélkromatográfia módszert ebben az esetben nem alkalmaztunk, mivel az előzetes próbatisztítások során jelentős volt a fehérje veszteség. A heparin oszlopról eluált fehérje frakciót tisztának ítéltük és a továbbiakban ezt használtuk a kísérletek kivitelezéséhez.

A tiszta fehérje frakciókat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és -80°C -on tároltuk.



12. ábra
Stl expresszió és tisztítás Heparin oszlopon

4.2 Vad típusú és mutáns $\Phi 11\text{DUT}$ katalitikus aktivitásának meghatározása

A vad típusú és mutáns dUTPázok katalitikus aktivitásának meghatározását spektrofotometriás módszerrel végeztem. A dUTPáz 80 nM, míg a dUTP 20 μM koncentrációban volt jelen.

	$V_0 \text{ (s}^{-1}\text{)}$
$\Phi 11\text{DUT}^{\text{wt}}$	$5,52 \pm 1,6$
$\Phi 11\text{DUT}^{\text{F108W}}$	$5,3 \pm 1,8$
$\Phi 11\text{DUT}^{\text{F164W}}$	$5,03 \pm 1,2$
$\Phi 11\text{DUT}^{\Delta\text{insert}}$	$4,5 \pm 1$
$\Phi 11\text{DUT}^{\text{E158STOP}}$	$< 0,001$

8. táblázat

A felhasznált $\Phi 11$ DUT enzimek aktivitása

Az mérések eredményei szerint a $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F108W}}$, $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F164W}}$ és $\Phi 11\text{DUT}^{\Delta\text{insert}}$ mutánsok katalitikus aktivitása nem változott nagymértékben a vad típusú dUTPáz aktivitásához képest (8. táblázat). Ez elősegíti ezen mutáns enzimekkel elvégzett vizsgálatok kiértékelését, mivel így kizárhatjuk azt, hogy egy adott kísérlet eredményének oka a mutáns dUTPáz enzim aktivitásának változása. A $\Phi 11\text{DUT}^{\text{E158STOP}}$ várakozásainknak megfelelően nem mutatott aktivitást, mely a korábbi eredményekkel egybehangzóan igazolja, hogy a C-terminális kar jelenléte bizonyítottan fontos a reakcióban (34).

4.3 Az Stl fehérje hatása a dUTPáz aktivitásra

Az Stl dUTPáz aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálatát aktivitásméréssel végeztem, ahol meghatározott enzim és szubsztrát koncentráció mellett alkalmaztam növekvő Stl koncentrációt. A kapott pontokra a dUTPáz és Stl fehérjék között 1:1 sztöchiometriával megvalósuló komplexképződési modellnek megfelelő legegyszerűbb egyenletet (kvadrátikus egyenlet) illesztettem. Az egyes Stl koncentrációkhoz tartozó mérési pontban különböző számú párhuzamos mérést végeztem, jellemzően a görbe érzékeny szakaszában többet, a kevésbé érzékeny tartományban kevesebbet.

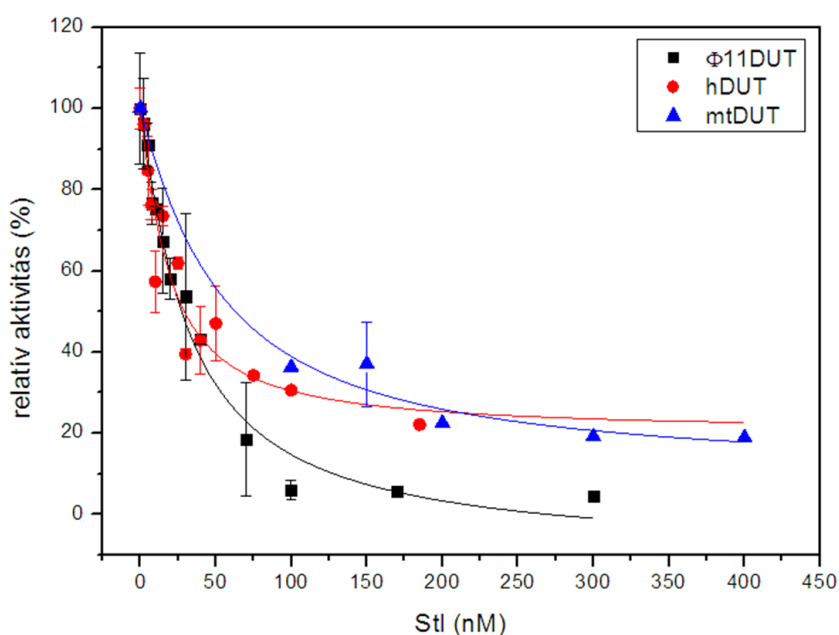
A görbeillesztéskor felhasznált egyenlet a következő:

$$y = S \cdot \frac{A(c + x + K_D) - \sqrt{(c + x + K_D)^2 - 4 \cdot x \cdot c}}{2 \cdot c}$$

ahol x a változó Stl koncentráció, S a gátolatlan enzim aktivitása százalékosan ($y=S$ ha $x=0$), A az Stl nélkül mért aktivitáshoz képest mért változás mértéke az Stl-lel telített végállapot esetén, c a dUTPáz koncentrációja, K_D az Stl-dUTPáz közt kialakuló kötési konstans.

Az egyenletnek négy paramétere van, amelyek közül a dUTPáz koncentrációt választottam változatlanul, a többi paraméter esetén kezdeti értéket adtam meg, amit az iterálás során használt fel a program.

Az Stl gátlás mérésekor a szubsztrát (dUTP) telítési koncentrációban (10 μ M) volt jelen.



13. ábra
A ΦDUT, mtDUT és hDUT Stl gátlási görbéi

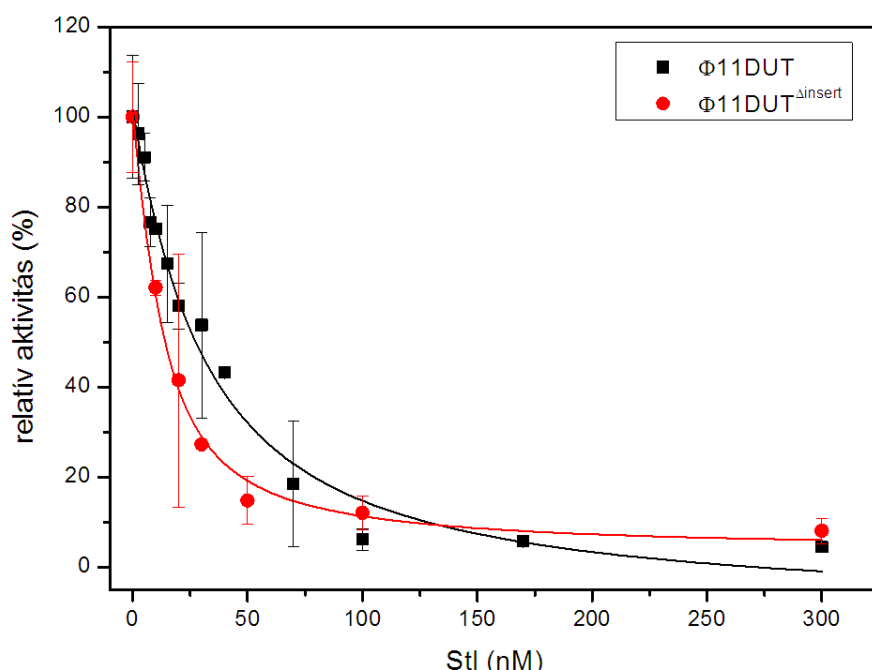
	s (%)	A (%)	c (nM)	K _D (nM)	R ²
Φ11DUT	101 ± 3	-112 ± 5	80	27 ± 5	0,98
hDUT	99 ± 5	-79 ± 8	80	14 ± 7	0,92
mtDUT	100 ± 5	-91 ± 8	80	43 ± 17	0,98

9. táblázat
A ΦDUT, mtDUT és hDUT Stl gátlási pontokra illesztett görbék adatai

A Φ11 DUT, mtDUT és hDUT aktivitása az Stl jelenlétében lecsökken, az illesztett görbék K_D paramétere azonos nagyságrendbe esik (9. táblázat). Az eredmények azt mutatják, hogy az Stl nemcsak a Φ11, hanem a mikobaktérium és humán dUTPázt is gátolja.

A görbék lefutása közt azonban van különbség (13. ábra). Az Stl koncentráció függvényében a Φ11DUT aktivitása csökken a legnagyobb mértékben, 300 nM Stl jelenlétében már a 0-hoz közelít. A hDUT és mtDUT aktivitása nem közelíti a teljes inhibíciót, a relatív aktivitás hozzávetőleg 20% illetve 10%-a megmarad Stl-lel történő telítés esetén is. Az eredmények arra utalnak, hogy az Stl, bár többféle dUTPázt is gátol, a Φ11DUT-nak a leghatékonyabb inhibitora. Az mtDUT görbe pontosabb illesztéséhez további mérési pontok felvétele szükséges.

A fajspecifikus inzertnek a feltételezés szerint szerepe van az Stl kötésben (21), ezt azonban az aktivitásmérési eredményeink nem támasztanak alá (14. ábra). Az inzert-mentes mutáns inhibíciója létrejött Stl jelenlétében, és az inhibíció mértéke a vad típusú Φ11DUT-hoz hasonló volt. A mérési pontokra illesztett kvadratikuss görbe K_D paramétere azonos nagyságrendbe esik, lefutásuk hasonló (10. táblázat).



14. ábra
A Φ DUT és Φ 11DUT $^{\Delta\text{insert}}$ Stl gátlási görbéi.

	s (%)	A (%)	c (nM)	K_D (nM)	R^2
Φ 11DUT	101 ± 3	-112 ± 5	80	27 ± 5	0,98
Φ 11DUT $^{\Delta\text{insert}}$	101 ± 3	-98 ± 3	80	8 ± 1	0,99

10. táblázat
 Φ DUT és Φ 11DUT $^{\Delta\text{insert}}$ Stl gátlási pontokra illesztett görbék adatai

Ez ellentmond a korábban publikált eredményeknek, a különbség oka feltételezhetően a kivágott inzert szekvencia mérete. Tormo-Más és mtsai a specifikus inzert szekvenciánál nagyobb rész delécióját hozták létre, így a konzervált Φ 11DUT szerkezet elveszthette integritását és ezáltal a katalitikus aktivitását is (21). Ezért tehát ez az irodalomban leírt kísérlet nem volt alkalmas a jelenség vizsgálatára. Az általunk kivágott szegmens csak egy rövidebb szekvencia volt (102. - 124 aminosav közt), így a dUTPáz konzervált szerkezete esetünkben nagy valószínűséggel megőrződött.

Az *in vitro* mérési eredmények nem elegendőek az inzert szerepének megítéléséhez. Célunk *in vivo* körülmények között is megvizsgálni az inzert-hiányos mutáns tulajdonságait, mert sejten belül kölcsönható partnerek jelenléte befolyásolhatja, illetve meghatározhatja az inzert szerepét.

4.4 Az Stl gátlási mechanizmusa

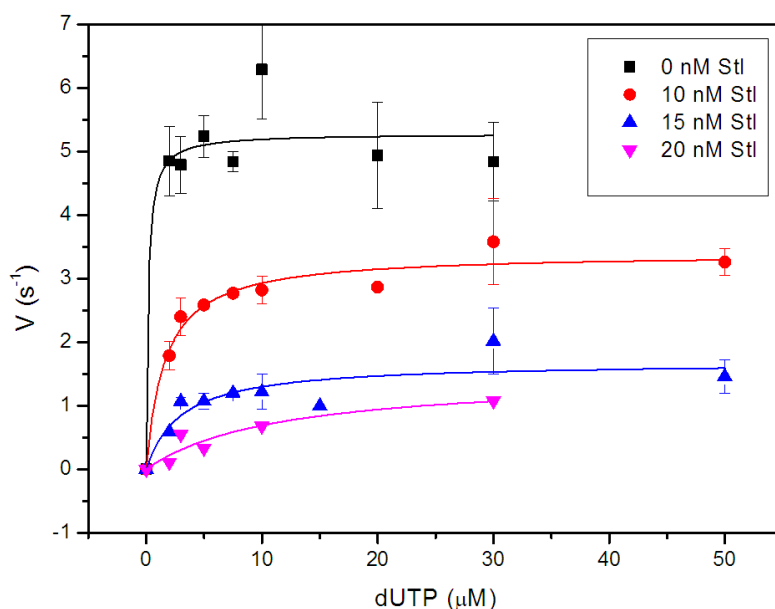
A szubsztrát telítési görbéket állandó dUTPáz (80nM) és Stl (0 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM) koncentráció mellett mértem (15. ábra). Két párhuzamos mérés eredményeit átlagoltam, ami alól kivétel a 20 nM Stl jelenlétében végzett mérés, amelyből időigényes tulajdonsága

miatt jelenleg csak egy sorozatot mértem. A mérés nem volt alkalmas kis dUTP koncentráció ($C_{dUTP} < 2 \mu M$) mellett a reakciósebesség meghatározására, mert az abszorbancia jel változása nagyon kicsi volt a jel/zaj arányhoz képest, amely nem tette lehetővé a pontos illesztést.

A mérés célja az Stl inhibíciós mechanizmusának felderítése és a modell meghatározása volt. A mérési pontokra a Michaelis-Menten egyenlet alapján rektanguláris hiperbolát illesztettem, amelynek egyenlete:

$$v = v_{max} \frac{\frac{S}{K_S}}{1 + \frac{S}{K_S}}$$

ahol S a dUTP koncentráció, v_{max} a maximális reakciósebesség és K_S az enzim-szubsztrát komplex disszociációs állandója. A szubsztrát növekedés függvényében a v_{max} egyre csökken, a K_S egyre nő (11. táblázat), ez a dinamika a kevert típusú inhibícióra jellemző, ahol a kompetitív hatás dominál (K_S nő) (35).

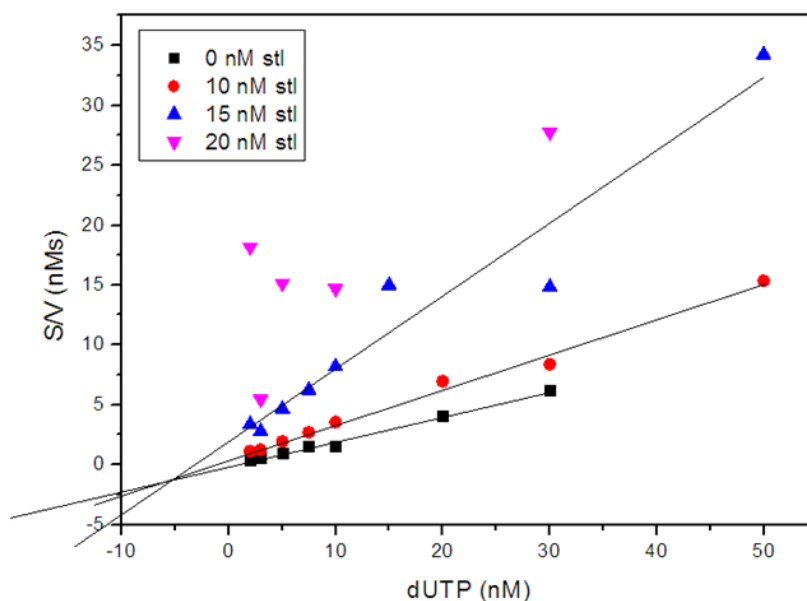


15. ábra
dUTP titrálás különböző Stl koncentrációk mellett

Stl (nM)	v_{max}	$1/K_S$	K_S	R^2
0	5,2817	5,7166	0,174929	0,922
10	3,4012	0,6017	1,661958	0,966
15	1,6866	0,33517	2,983561	0,777
20	1,47633	0,08775	11,39601	0,865

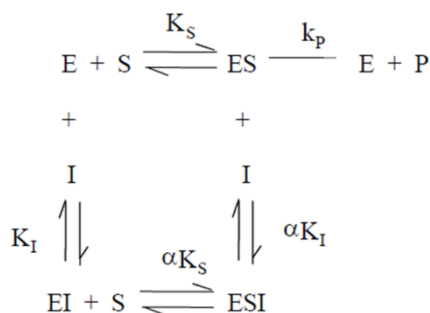
11. táblázat
dUTP titrálásra illesztett görbék adatai

Az inhibíciós típus szemléletes megállapításához a kapott mérési pontokat különböző linearizációs módszerekkel ábrázolhatjuk. Én ezek közül a Hanes - Langmuir ábrázolást választottam (16. ábra).



16. ábra
dUTP titrálás különböző Stl koncentrációk mellett, Hanes - Langmuir-ábrázolás

A Hanes - Langmuir linearizált ábrázolásmód szerint a mérési eredmények kevert típusú inhibícióra utalnak (17. ábra).



17. ábra
A kevert típusú inhibíció sematikus ábrázolása (35)

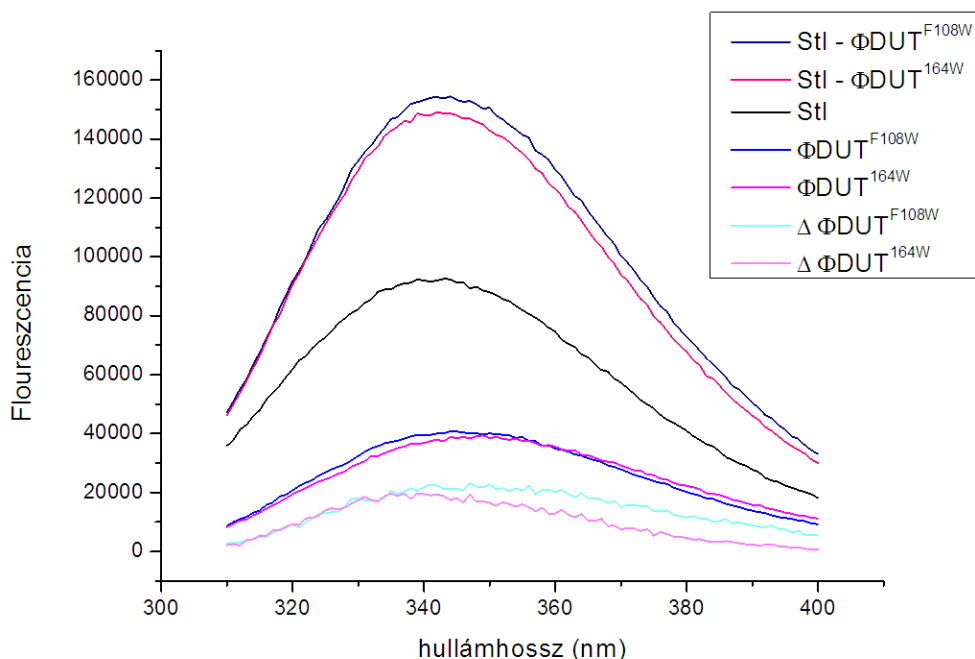
Az egyenesek (12. táblázat) metszéspontja nem esik teljesen egybe, az (-5, -2) koordinátpont közelében találhatóak. A 20 nM Stl koncentráció alkalmazásával végzett mérés pontjai nem voltak alkalmasak a pontos egyenes illesztéshez. Az inhibíciós egyensúlyi állandó (K_I) és az inhibitor kötésre jellemző α konstans meghatározásához pontosabb mérési eredmények szükségesek.

Stl (nM)	a	b	R^2
0	-0,0939	0,20692	0,992
10	0,51104	0,29139	0,9912
15	1,8656	0,6078	0,9259

12. táblázat
A Hanes Langmuir ábrázolásra illesztett egyenesek paraméterei ($y=a+bx$)

4.5 $\Phi 11$ dUTPáz Stl és szubsztrát kötésnek vizsgálata fluoreszcens spektroszkópiával

A molekuláris kölcsönható felületek vizsgálatát fluoreszcens spektroszkópiával vizsgáltam. A mérésekhez $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F164W}}$ és $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F108W}}$ mutáns dUTPázokat használtam, mert célul tűztam ki a C-terminális kar és a fajspecifikus inzert szerepének vizsgálatát az Stl fehérjével és a szubsztráttal való kölcsönhatásban. A $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F164W}}$ mutáns a C-terminális régióban tartalmaz egy Trp oldalláncot, míg a $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F108W}}$ mutáns esetén az inzertben cseréltünk egy Phe aminosavat Trp-re.



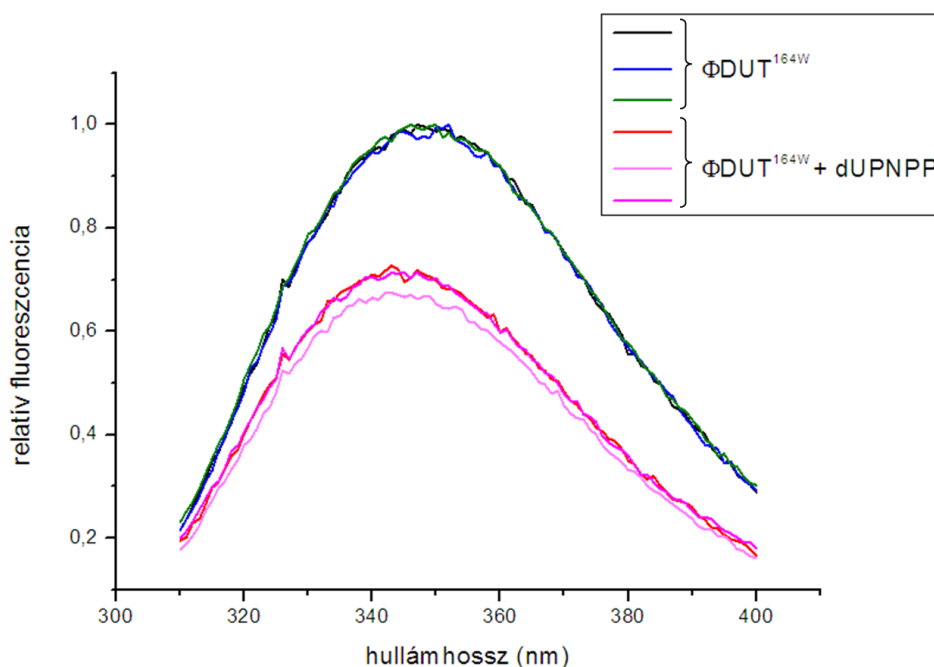
18. ábra

Az Stl, a $\Phi\text{DUT}^{\text{F108W}}$ és $\Phi\text{DUT}^{\text{F164W}}$ és ezek Stl-el alkotott komplexeinek fluoreszcencia spektruma 310 és 400 nm közt. A Δ spektrumok a komplex fluoreszcenciája és a komponenseinek összegzett fluoreszcenciája közti különbséget ábrázolja.

Először a dUTPázok Stl kötő képességét vizsgáltam $5\mu\text{M}$ Stl és $5\mu\text{M}$ $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F164W}}$ vagy $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F108W}}$ jelenlétében. Az Stl nem tartalmaz fluorofór régiót, ennek ellenére fluoreszcens jelet adott, amit a mintát szennyező fluoreszcens komponensek jelenléte okozott. A kapott értékeket minden esetben korrigáltam a puffer alapjelével.

A mérési eredmények azt mutatják, hogy mindkét dUTPáz fluoreszcenciája megnőtt az Stl-el való komplexálódás során szinte teljesen azonos mértékben, bár a $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F108W}}$ -Stl komplex valamivel nagyobb fluoreszcens maximumot mutatott (18. ábra). Annak igazolására, hogy a kötés során bekövetkező konformáció változás fluoreszcencia változással jár – tehát a triptofánnal jelölt szegmenseket is érinti – kiszámoltam a Δ spektrum értékeket úgy, hogy kivontam a komplex jeléből a megfelelő dUTPáz és Stl jelét. A Δ spektrum érték mindkét komplex esetén 0-nál nagyobb értéket adott, tehát a kötés fluoreszcencia változást okoz

vagyis a triptofánnal jelölt részek „látják” az StI-t. A csúcsok maximuma megváltozik a kötés során, a komplexek maximuma az StI maximum hullámhossz (343 nm) felé tolódik.



19. ábra

$\Phi\text{DUT}^{164\text{W}}$ fluoreszcenciája 310 és 400 nm között dUPNPP jelenlétében és hiányában.
Mindkét feltétel mellett három párhuzamos mérést végeztem.

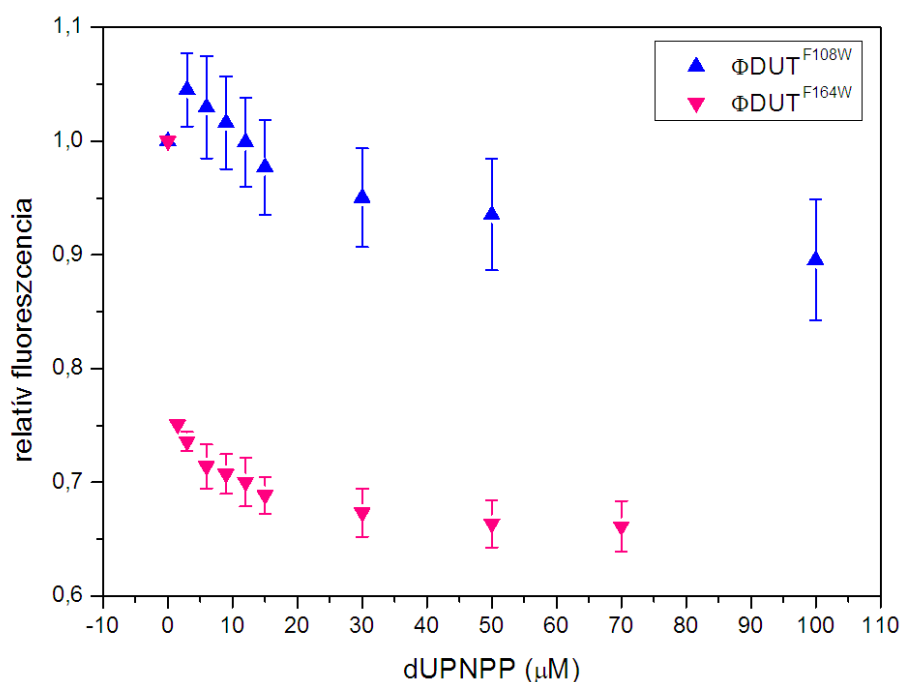
A $\Phi 11\text{DUT}$ szubsztrátkötő tulajdonságának vizsgálatához egy dUTP analógot használtam. A dUPNPP (α,β -imido dUTP) szerkezetileg a dUTP-re hasonlít, de az α - és β -foszfát csoportja között O helyett N szerepel, amely miatt az enzim csak nagyon lassan képes elhidrolizálni (36).

Először ellenőriztem, hogy mérhető-e a fluoreszcencia változás az alábbi fehérje koncentrációkat alkalmazva. Szubsztrát telítési mérések során 5 μM $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F164W}}$ fluoreszcenciáját mértem önmagában és 50 μM szubsztrát jelenlétében (19. ábra). Mindkét állapotban három párhuzamos mérést végeztem.

Az eredmények alapján a 350 nm-es emissziós hullámhossz megfelelő és elégséges a változás detektálásához, mivel hozzávetőleg itt van a szubsztrát hiányában és jelenlétében mért görbék fluoreszcencia maximuma, illetve itt a legnagyobb a köztük mért különbség.

Az 5 μM dUTPáz szubsztráttal való titrálását 0 - 100 μM dUPNPP-vel végeztem (20. ábra). A $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F108W}}$ enzim esetén a legkisebb alkalmazott dUPNPP koncentrációnál a fluoreszcens jel erősebb, mint szubsztrát nélkül, – amely hatás oka számunkra nem ismert – majd a növekvő szubsztrát koncentráció függvényében enyhén csökkenő tendenciát mutat. A fluoreszcencia intenzitása a mért tartományon belül nem változik jelentősen, ami arra utal, hogy az inzert nem vesz részt számottevően a szubsztrát kötésben. A $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F164W}}$ -el végzett vizsgálat azt mutatja a triptofán jele jelentősen lecsökken. A fluoreszcens jel csökkenés arra

utal, hogy a C-terminális karon elhelyezkedő triptofán mikrokörnyezete megváltozik, vagyis a C-terminális kar részt vesz a dUPNPP szubsztrát analóg kötésében.



20. ábra
ΦDUT^{F108W} és ΦDUT^{F164W} relatív fluoreszcencia értékei
a dUPNPP koncentráció függvényében

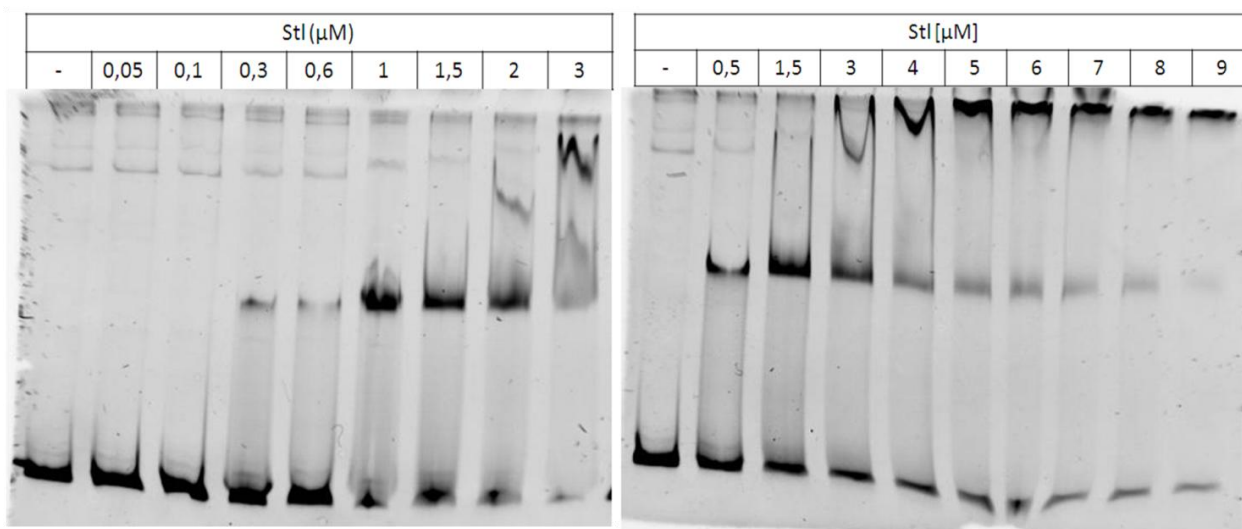
4.6 Az Stl fehérje, a dUTPáz és az Stl DNS kötőhely egymással való kölcsönhatásainak vizsgálata EMSA módszerrel

Az Stl-DNS kötés felderítésére már korábban készültek EMSA vizsgálatok (21). Ezekben a kísérletekben a DNS próba az Stl kötőhely, az *stl-str* közti promóter régió volt. Az eredmények alapján az Stl komplexet alkotott a DNS próbával, ellenben a Φ11DUT nem. Ez arra utalhat, hogy a Φ11DUT nem versenyez az Stl-lel a DNS-hez való kötődésben. A klónozott DNS fragmentum *stl* promótert tartalmazott, így a Φ11DUT nem lehet az Stl represszora. A Φ11DUT dóziszfüggő módon gátolta a DNS-Stl kötést, ami a derepresszió mechanizmust igazolja.

Az EMSA kísérletek lehetőséget adtak nem csupán az Stl-DNS kötés vizsgálatára, hanem a derepresszió komplexebb *in vitro* analízisére.

4.6.1 A DNS-Stl kötés vizsgálata

A DNS-Stl kötéshez olyan DNS koncentrációt választottam, amelynek jele megfelelő intenzitással látszik a gélen. Az Stl koncentrációját először 0,05 μM és 3 μM között változtattam. A gélen jól látszott az Stl kötés következtében a koncentráció növelésével egyre erősebben megjelenő komplex csíkja, amely magasabb koncentrációknál (2-3 μM) feljebb csúszik a nagyobb molekulatömegű régió felé (21. ábra).



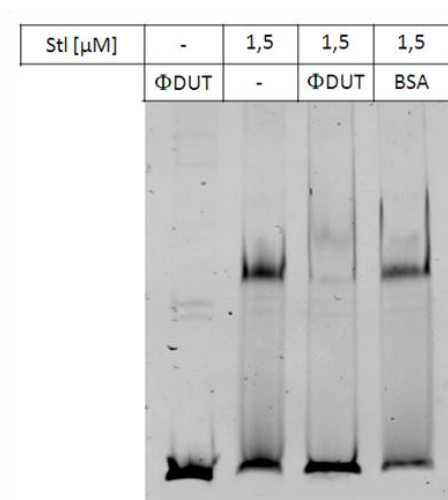
21. ábra

EMSA kísérlet: növekvő Stl koncentráció: 0,05 - 3 μM és 0,5-9 μM Stl, 90nM DNS mellett

Arra következtettem, hogy egy DNS szakasz több Stl fehérjét is megköt. Ennek vizsgálatára végeztem egy következő kísérletet, ahol az Stl koncentrációt 9 μM-ig növeltem. Ez az eredmény is igazolja, hogy nagyobb mennyiségű Stl jelenlétében a DNS csík feljebb tolódik.

4.6.2 Kontroll mérések

Kontroll mérést végeztem annak igazolására, hogy a Φ11DUT nem köti a DNS-t. A kísérlet eredménye egybevágott az irodalomban leírtakkal (21), a dUTPáz nem kötött a DNS próbára. Vizsgálatot végeztem a dUTPáz specifikus Stl leszorító tulajdonságának igazolására, amelyben dUTPáz helyett BSA-t (marhaszérum albumin, Bovine Serum Albumin) alkalmaztam. A BSA nem volt képes az Stl leszorítására (22. ábra).



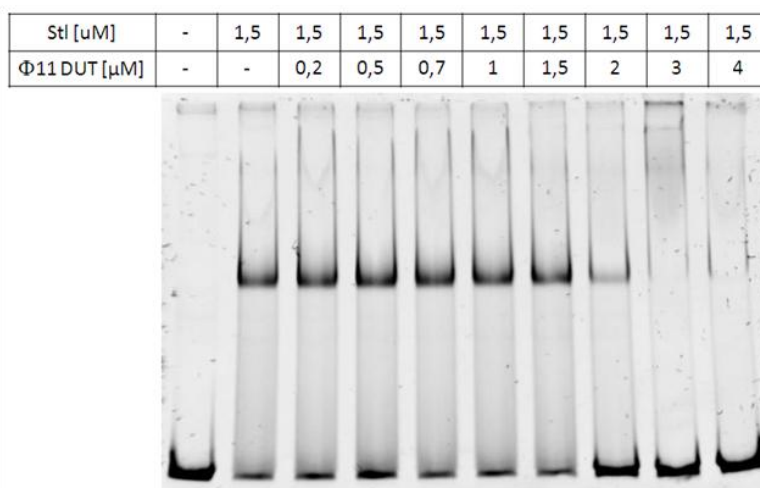
22. ábra

EMSA kísérlet: a 3 μMΦ11DUT és 3 μM BSA 80nM DNS koncentráció mellett

4.6.3 dUTPáz - StI kötés vizsgálata Φ 11DUT, mtDUT és hDUT enzimek mellett

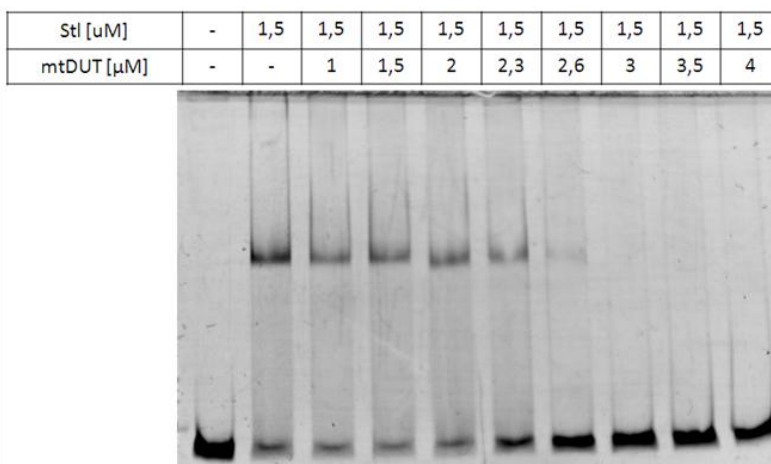
A Φ 11DUT, mtDUT és hDUT StI-DNS komplex megbontó képességét EMSA módszerrel vizsgáltam (23.-25. ábra).

A Φ 11DUT és mtDUT hasonló koncentrációnál szorítja le az StI-t a DNS-ről. A hDUT esetén ez a leszorítás fokozatos és magasabb (5-6 μ M) koncentrációknál sem játszódik le teljesen. Ahogy az aktivitásmérések is igazolták, a hDUT és mtDUT is képes kötetést létrehozni az StI-el, ezen felül az EMSA panelekből kiderül, hogy ez az interakció a Φ 11DUT-hoz hasonlóan az StI-DNS komplex megbontását eredményezi.



23. ábra

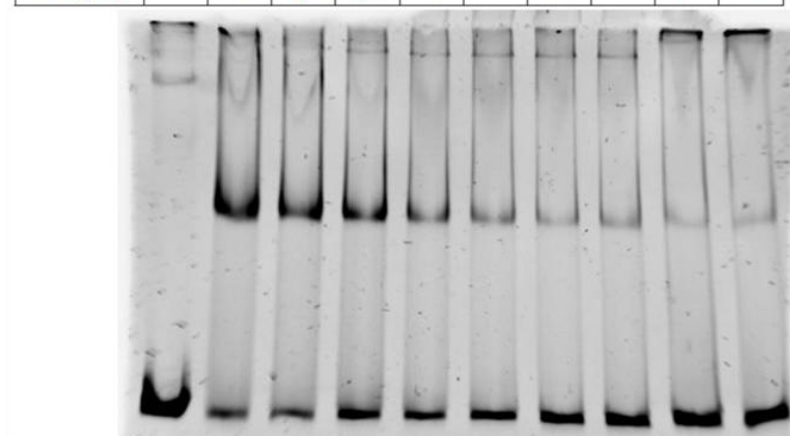
A Φ 11DUT leszorítási panel 80nM DNS koncentráció mellett



24. ábra

Az mtDUT leszorítási panel 80nM DNS koncentráció mellett

Stl [μ M]	-	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
hDUT [μ M]	-	-	0,2	0,5	1	2	3	4	5	6



25. ábra

A hDUT leszorítási panel 80nM DNS koncentráció mellett

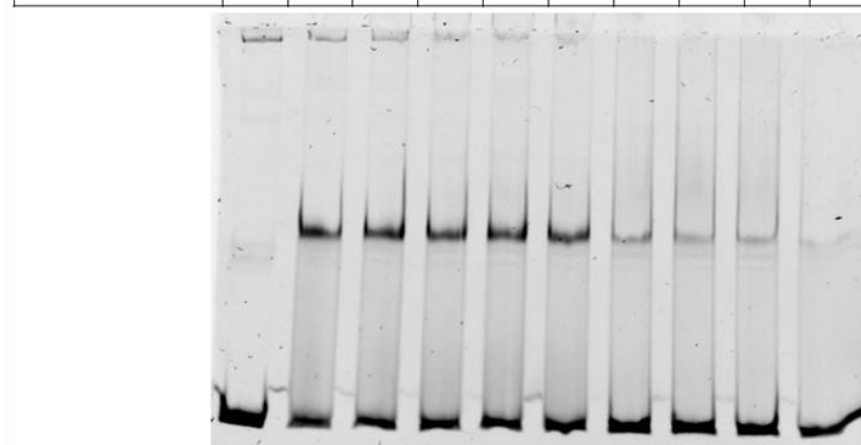
4.6.4 dUTPáz - Stl kötés vizsgálata Φ 11DUT^{E158STOP} és Φ 11DUT^{Δinsert} enzimek mellett

Az EMSA vizsgálatot elvégeztem a kar és inzertmentes Φ 11DUT mutánsokkal ezen szerkezeti elemekre vonatkozó további információszerzés céljából (26., 27. ábra)

A karmentes dUTPáz a vad típusú enzimhez hasonlóan eltávolítja az Stl-t a DNS-ről, bár a leszorítás nem történik meg olyan élesen. Az inzert mentes Φ 11DUT azonban nem képes az Stl teljes mértékű leszorítására a DNS-ről. Ennek lehetséges oka, hogy a Φ 11DUT esetében az inzertnek a DNS-sel való kölcsönhatás során van jelentősége.

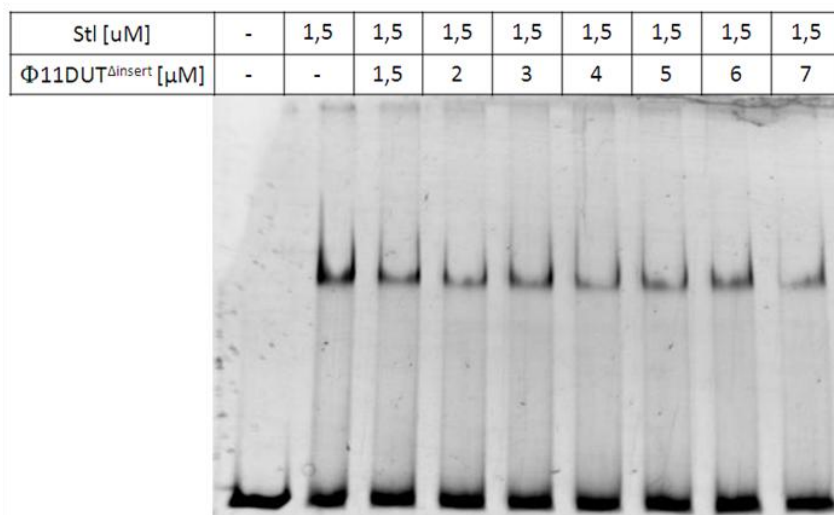
Az eredmények átláthatósága céljából az EMSA gélképeket denzitometriásan értékeltem, ahol összehasonlítható volt a gélen látható csíkok relatív intenzitása (28. ábra).

Stl [μ M]	-	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Φ 11DUT ^{E158STOP} [μ M]	-	-	0,2	0,5	1	1,5	2	3	4	5



26. ábra

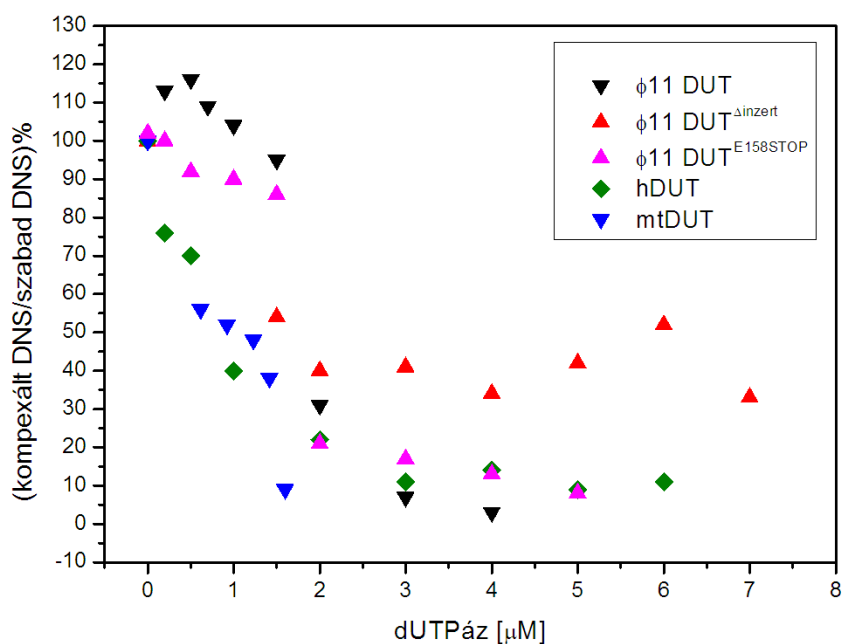
A Φ 11DUT^{E158STOP} leszorítási panel 80nM DNS koncentráció mellett



27. ábra

A $\Phi 11DUT^{\Delta insert}$ leszorítási panel 80nM DNS koncentráció mellett

Az Stl leszorítás a $\Phi 11DUT$, a $\Phi 11DUT^{E158STOP}$, a hDUT és az mtDUT esetben majdnem teljesen megvalósul, meghatározható az enzim koncentráció, amely eléréskor a dUTPáz megbontja az Stl-DNS komplexet. A $\Phi 11DUT^{\Delta insert}$ ellenben nem képes az Stl-t teljes mértékben leszorítani a DNS szakaszról, az Stl-DNS komplex magas dUTPáz koncentrációknál is megmarad.



28. ábra

ΦDUT , $\Phi DUT^{\Delta insert}$, $\Phi DUT^{E158STOP}$, hDUT és mtDUT DNS-Stl komplex csikjainak relatív denzitása a dUTPáz koncentráció függvényében

A $\Phi 11DUT$ insert szekvenciája feltételezhetően az Stl-DNS komplex megbontásában, a DNS-el való kölcsönhatásban játszik szerepet. Az eredendően insert hiányos hDUT és mtDUT ellenben képes volt a komplex közel teljes megbontására.

5 Összefoglalás és értékelés

Munkám során a $\Phi 11$ fág dUTPáz és az Stl fehérje tulajdonságait és a közöttük létrejött kölcsönhatás kialakulását jellemeztem különféle módszerek (spektrofotometria, fluorimetria, EMSA) felhasználásával.

A vad típusú és mutáns dUTPázok katalitikus állandójának meghatározására aktivitásmérést használtam. A mérések eredményei szerint a $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F108W}}$, $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F164W}}$ és $\Phi 11\text{DUT}^{\Delta\text{insert}}$ mutánsok katalitikus aktivitása nem változott nagymértékben a vad típusú dUTPáz aktivitásához képest. Mivel a $\Phi 11\text{DUT}^{\text{E158STOP}}$ mutáns nem mutatott katalitikus aktivitást, ebből arra következtettem, hogy a $\Phi 11\text{DUT}$ C-terminális kar szegmensnek szerepe van a reakció katalízisében.

Az Stl dUTPáz aktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálatát aktivitásméréssel végeztem, ahol meghatározott enzim és szubsztrát koncentráció mellett növekvő Stl koncentrációt alkalmaztam. Az eredmények azt mutatják, hogy az Stl nemcsak a $\Phi 11\text{DUT}$ -ot, hanem hozzá hasonló mértékben a mikobaktérium és humán dUTPáz is gátolja. Ez a kísérleti eredmény kiemelten újszerű és meglepő, mert a hDUT és az mtDUT nem tartalmazza a $\Phi 11\text{DUT}$ -ra jellemző fajspecifikus inzertet. Az Stl kötésben nagy szerepet tulajdonítottak ennek az inzert szekvenciának az irodalomban, amelyet a mérési eredményeim nem támasztanak alá. Annak további bizonyítására, hogy az inzertnek nincs számottevő szerepe az Stl kötésben, elvégeztem az előző vizsgálatot $\Phi 11^{\Delta\text{inzert}}$ enzimmel, amely aktivitása a vad típusú $\Phi 11$ dUTPázhoz hasonló módon lecsökkent az Stl jelenlétében. Ebből azt a következtetést vontam le, hogy az inzert jelenléte illetve hiánya sem az Stl-dUTPáz kötést, sem az Stl-dUTPázra gyakorolt gátló hatását nem befolyásolja.

Az Stl inhibíció típusának meghatározására szubsztrát titrálást végeztem különböző Stl koncentráció mellett. A mérés nem volt elég pontos az inhibíció paramétereinek meghatározására, de a Hanes-Langmuir linearizációs módszerrel való ábrázolás alapján feltételezhetően a $\Phi 11\text{DUT}$ - Stl kölcsönhatás a kevert típusú inhibíció esetének felel meg. Az eredmények pontosításához további mérések szükségesek.

A molekuláris kölcsönható felületek vizsgálatát fluoreszcens spektroszkópiával végeztem. A mérésekhez $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F164W}}$ és $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F108W}}$ mutáns dUTPázokat használtam, mert meg akartam vizsgálni a C-terminális kar és a fajspecifikus inzert szerepét az Stl fehérjével és a szubsztráttal való kölcsönhatásban. Először a triptofán-jelölt mutánsok dUTPázok Stl kötő képességét vizsgáltam, az adatok alapján Stl-el való kötődésben a C-terminális kar és az inzert is részt vesz. A kötés láthatóan fluoreszcencia változást okoz vagyis a triptofánnal jelölt részek „látják” az Stl-t.

Szubsztrátként egy dUTP analógot használtam, a dUPNPP-t (α,β -imido dUTP), amely szerkezetileg a dUTP-re hasonlít, viszont a dUTPáz sokkal lassabban képes elhidrolizálni.

A dUPNPP titrálása során nem vettem fel a teljes hullámhossz tartomány fluoreszcens jelét, a fluoreszcencia jelet csak a triptofán emissziós maximumán detektáltam. Az adatok alapján megállapítható, hogy a szubsztrát kötésben csak a C-terminális kar vett részt, tehát az inzertnek nincs jelentős hatása a szubsztrát kötődésre.

EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) módszerrel végzett kísérletekben a dUTPáz és az Stl kölcsönhatását vizsgáltam a az Stl feltételezett DNS kötőhelyének jelenlétében. Kontroll méréseket végeztem annak igazolására, hogy a $\Phi 11\text{DUT}$ -DNS és Stl-BSA kötések nem jönnek létre. A DNS-Stl komplex vizsgálatát állandó DNS illetve növekvő Stl koncentráció mellett végeztem. Az eredményekből arra következtettem, hogy a DNS szakasz nemcsak egy, hanem több Stl fehérjét is megköthet.

A dUTPáz-Stl komplex stabilitását $\Phi 11\text{DUT}$, a $\Phi 11\text{DUT}^{\text{E158STOP}}$, $\Phi 11\text{DUT}^{\Delta\text{insert}}$, a hDUT és mtDUT enzimek növekvő koncentrációban való alkalmazásával gyengíteni tudtam. A $\Phi 11\text{DUT}^{\Delta\text{insert}}$ kivételével az összes dUTPáz képes volt az Stl leszorítására szinte teljes mértékben. Ezen eredmények alapján a dUTPáz és az Stl kölcsönhatásának kialakulása során az inzert szerepét a DNS jelenléte befolyásolja.

A dUTPáz Stl DNS komplex jellemzéshez további vizsgálatok szükségesek. Céлом az Stl inhibíciós hatásának vizsgálata *in vivo* körülmények közt, amelyhez terveim szerint humán sejtekben fogom az Stl-t expresszálni, és mérni a dUTPázra vonatkozó inhibíciós hatását. Céljaim közt szerepel a $\Phi 11\text{DUT}$ fajspecifikus inzert szerepének további vizsgálata, a DNS-el való kölcsönhatásban betöltött szerepének pontos karakterizálása. Definiálni szeretném, hogy miért viselkedik másképp az inzert mentes $\Phi 11$ dUTPáz, mint az eredendően inzert hiányos hDUT és mtDUT az Stl DNS-ről való leszorítása során. Ezen felül tervezem az Stl pontos kötőhelyét meghatározni az EMSA-hoz használt 183 bázispár hosszú DNS szakaszon. Munkám remélhetőleg hozzájárul a *S. aureus* patogenitásában szerepet játszó fág-mediált mechanizmus mélyebb megértéséhez, illetve az általam vizsgált Stl, mint humán dUTPáz inhibitor alkalmas lehet új megközelítésű rákellenes gyógyszerek fejlesztésére.

6 Irodalomjegyzék

1. Vertessy, B.G. and Toth, J. (2009) Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc Chem Res*, **42**, 97-106.
2. Seeberg, E., Eide, L. and Bjoras, M. (1995) The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci*, **20**, 391-397.
3. Fiser, A. and Vertessy, B.G. (2000) Altered Subunit Communication in Subfamilies of Trimeric dUTPases. *Biochem Biophys Res Commun*, **279**, 534-542.
4. Ahmad, S.I., Kirk, S.H. and Eisenstark, A. (1998) Thymine metabolism and thymineless death in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Microbiol*, **52**, 591-625.
5. Chen, R., Wang, H. and Mansky, L.M. (2002) Roles of uracil-DNA glycosylase and dUTPase in virus replication. *J Gen Virol*, **83**, 2339-2345.
6. Moertel, C.G. (1994) Chemotherapy for colorectal cancer. *N Engl J Med*, **330**, 1136-1142.
7. Ladner, R.D. (2001) The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy. *Current Protein and Peptide Science*, **2**, 361-370.
8. Toth, J., Varga, B., Kovacs, M., Malnasi-Csizmadia, A. and Vertessy, B.G. (2007) Kinetic mechanism of human dUTPase, an essential nucleotide pyrophosphatase enzyme. *J Biol Chem*, **282**, 33572-33582.
9. Prasad, G.S., Stura, E.A., McRee, D.E., Laco, G.S., Hasselkus-Light, C., Elder, J.H. and Stout, C.D. (1996) Crystal structure of dUTP pyrophosphatase from feline immunodeficiency virus. *Protein Sci*, **5**, 2429-2437.
10. Larsson, G., Nyman, P.O. and Kvassman, J.O. (1996) Kinetic characterization of dUTPase from Escherichia coli. *J Biol Chem*, **271**, 24010-24016.
11. Prasad, G.S. (2001) Glycine rich P-loop motif in deoxyuridine pyrophosphatase. *Curr Protein Pept Sci*, **2**, 301-311.
12. Varga, B., Barabas, O., Kovari, J., Toth, J., Hunyadi-Gulyas, E., Klement, E., Medzihradsky, K.F., Tolgyesi, F., Fidy, J. and Vertessy, B.G. (2007) Active site closure facilitates juxtaposition of reactant atoms for initiation of catalysis by human dUTPase. *FEBS Lett*, **581**, 4783-4788.
13. Mustafi, D., Bekesi, A., Vertessy, B.G. and Makinen, M.W. (2003) Catalytic and structural role of the metal ion in dUTP pyrophosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5670-5675.
14. Gordon, R.J. and Lowy, F.D. (2008) Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases*, **46**, S350-359.
15. Rubin, R., Harrington, C.A., Poon, A., Dietrich, K., Greene, J.A. and Moiduddin, A. (1999) The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York city hospitals. *Emerging Infectious Diseases*, **5**, 9-17.
16. http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_bacterial/en/index2.html.
17. Chambers, H.F. (2001) The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging Infectious Diseases*, **7**, 178-182.
18. Longzhu, C., Akira, I., Lian, J.-Q., Neoh, H.-M., Maruyama, T., Horikawa, Y. and Hiramatuso, K. (2005) Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **50**, 428-438.
19. Novick, R.P., Christie, G.E. and Pernandés, J.R. (2010) The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nature reviews, Microbiology*, **8**, 541-551.

20. Malachowa, N. and DeLeo, F.R. (2010) Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**, 3057-3071.
21. Tormo-Mas, M.A., Mir, I., Shrestha, A., Tallent, S.M., Campoy, S., Lasa, I., Barbe, J., Novick, R.P., Christie, G.E. and Penades, J.R. (2010) Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands. *Nature*, **465**, 779-782.
22. Novick, R.P. and Subedi, A. (2007) The SaPIs: mobile pathogenicity islands of staphylococcus. *Chem Immunol Allergy*, **93**, 42-57.
23. Brennan, R.G. and Matthews, B.W. (1989) The helix-turn-helix DNA binding motif. *The Journal of Biological Chemistry*, **264**, 1903-1906.
24. Mir-Sanchis, I., Mattínez-Rubio, R., Martí, M., Chen, J., Lasa, Í., Novick, R.P., Thormo-Más, M.A. and Pernandés, J.R. (2012) Control of *Stapylococcus aureus* pathogenicity island excision *Molecular Microbiology*, **85**, 833-845.
25. Ladner, R.D., McNulty, D.E., Carr, S.A., Roberts, G.D. and Caradonna, S.J. (1996) Characterization of distinct nuclear and mitochondrial forms of human deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase. *J Biol Chem*, **271**, 7745-7751.
26. Helt, S.S., Thymark, M., Harris, P., Aagaard, C., Dietrich, J., Larsen, S. and Willemoes, M. (2008) Mechanism of dTTP inhibition of the bifunctional dCTP deaminase:dUTPase encoded by Mycobacterium tuberculosis. *J Mol Biol*, **376**, 554-569.
27. Pecsí, I., Hirmondo, R., Brown, A.C., Lopata, A., Parish, T., Vertessy, B.G. and Toth, J. (2012) The dUTPase enzyme is essential in Mycobacterium smegmatis. *PLos ONE*, **in press**.
28. Larsson, G., Svensson, L.A. and Nyman, P.O. (1996) Crystal structure of the Escherichia coli dUTPase in complex with a substrate analogue (dUDP). *Nat Struct Biol*, **3**, 532-538.
29. Finnzymes online Tm calculator. http://www.finnzymes.com/tm_determination.html.
30. QuickChange Protocol User Manual.
31. <http://www.igmors.u-psud.fr/enseignement/mcserre/Cours-IPAN/cours-IPAN.html>
32. Hellmann, L.M. and Fried, M.G. (2007) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nature Protocols*, **2**, 1849-1861.
33. Dey, B., Thurkal, S., Krishnan, S., Chakrobarty, M., Gupata, M., Manghani, C. and Rani, V. (2012) DNA-protein interactions: methods for detection and analysis. *Mol Cell Biochem*, **365**, 279-299.
34. Takacs, E., Nagy, G., Leveles, I., Harmat, V., Lopata, A., Toth, J. and Vertessy, B.G. (2010) Direct contacts between conserved motifs of different subunits provide major contribution to active site organization in human and mycobacterial dUTPases. *FEBS Lett*, **584**, 3047-3054.
35. Sevela, B. (2011) Biomérnöki műveletek és folyamatok, egyetemi tananyag.
36. Barabas, O., Pongracz, V., Kovari, J., Wilmanns, M. and Vertessy, B.G. (2004) Structural insights into the catalytic mechanism of phosphate ester hydrolysis by dUTPase. *J Biol Chem*, **279**, 42907-42915.

7 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani konzulensemnek Dr. Vértessy G. Beátának, aki figyelemmel kísérte és irányította a munkámat és lehetővé tette, hogy a kutatócsoportjában dolgozhassak.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Németh Veronikának, hogy szakmai tanácsaival segítette a laboratóriumban végzett méréseimet, ezen felül megtanított a mutagenézis és EMSA módszerekre.

Köszönöm Zagyva Imrének, aki megmutatta a fehérje termelési, tisztítási és vizsgálati módszereket.

Szeretném megköszönni Szabó Judit Eszternek, hogy megtanított az aktivitás és fluorimetriás mérések módjára és kiértékelésére.

Köszönettel tartozom Róna Gergőnek, aki a mutagenézis és PCR módszerek használatához nyújtott segítséget.

Végül köszönöm a kutatócsoport minden tagjának, hogy szükség esetén segítettek és felmerülő kérdéseimre készségesen válaszoltak.

8 Függelék: Rövidítések jegyzéke

APS	ammónium perszulfát
BER	bázis kivágásos javítás, Base Excision Repair
BSA	marhaszérum albumin, Bovine Serum Albumin
β -ME	2-merkaptoetanol
dCTP	dezoxicitidin-trifoszfát
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
dNTP	dezoxi- nukleotid-trifoszfát
dTTP	dezoxitimidin-trifoszfát
dUDP	dezoxiuridin-difoszfát
dUMP	dezoxiuridin-monofoszfát
dUPNPP	α,β -imido-dezoxiuridin-trifoszfát
dUTP	dezoxiuridin-trifoszfát
dUTPáz	(dezoxiuridin-trifoszfát)-nukleotid hidroláz
EDTA	etiléndiamin-NNN'N'-tetraecetsav
EMSA	elektroforetikus mobilitás eltolódás vizsgálat, Electrophoretic mobility shift assay
Φ 11DUT	<i>S. aureus</i> Φ 11 fág dUTPáz
Φ 11DUT ^{E158STOP}	<i>S. aureus</i> Φ 11 fág dUTPáz, C-terminális kar motívum mentes mutáns
Φ 11DUT ^{F108W}	<i>S. aureus</i> Φ 11 fág dUTPáz, Phe108Trp mutáns
Φ 11DUT ^{F164W}	<i>S. aureus</i> Φ 11 fág dUTPáz, Phe164Trp mutáns
Φ 11DUT ^{Δinsert}	<i>S. aureus</i> Φ 11 fág dUTPáz, fajspecifikus inzert mentes mutáns
hDUT	<i>Homo sapiens</i> dUTPáz
HEPES	N-(2-hidroxietyl) piperazin-N'-etánszulfonsav
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktozid
LB	Luria-Bertani
MGE	mozgékony genetikai elemek, Mobile Genetic Elements
MOPS	3-[N-morfolino]-propánszulfonsav
MRSA	methicillin rezisztens <i>S. aureus</i> , Methicillin Resistent <i>S. aureus</i>
mtDUT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> dUTPáz
OD	optikai denzitás
PCR	polimeráz láncreakció, Polymerase Chain Reaction
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
RNáz	ribonukleinsav-hidroláz
RNS	ribonukleinsav
SaPI	<i>S. aureus</i> patogenitás sziget, <i>Staphylococcus aureus</i> Pathogenicity Island
SDS	nátrium-dodecil szulfát
TEMED	NNN'N'-tetra-metil-etilén-diamin
T _M	primer olvadási hőmérséklet, melting temperature
TRIS	trisz-(hidroximetil)-aminometán
TS	timidilát-szintáz

