

A CueR fémszabályzó fehérje és variánsainak előállítás, valamint kölcsönhatása "szoft" fémionokkal

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

Balogh Ria Katalin, III. Kémia BSc

Témavezetők:

Dr. Gyurcsik Béla, egyetemi adjunktus

Dr. Jancsó Attila, egyetemi adjunktus



SZTE, TTIK, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Szeged, 2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	2
3. Célkitűzés	11
4. Alkalmazott kísérleti eljárások	12
4.1. A polimeráz láncreakció (PCR - Polymerase Chain Reaction)	12
4.2. A gén bejuttatása a baktériumokba	13
4.3. A pET-21a-CueRX vektorok sikeres kialakításának ellenőrzése	13
4.4. Agaróz gélelektroforézis	14
4.5. A fehérjék kifejezése	14
4.6. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)	15
4.7. Fluoreszcencia spektroszkópia	17
4.8. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia	17
5. Kísérleti eredmények és tárgyalásuk	18
5.1. A CueR gén	18
5.2. Mutációk kialakítása a CueR génben	22
5.3. Fehérjék szintézise baktériumok segítségével	28
5.4. A fémion-kötés tanulmányozása fluorimetriás módszerrel	29
6. Összefoglalás	37
7. Felhasznált szakirodalom	38
Köszönetnyilvánítás	40

1. Bevezetés

Az átmenetifém-ionok, vagyis a d-mező fémionjai, a vas, a kobalt, a nikkel, a réz, a molibdén, a cink és a vanádium esszenciálisak a biológiai rendszerek számára. Legnagyobb részben a fehérjék és enzimek működésében játszanak szerepet, például megtalálhatók aktív centrumokban, ko-faktorként katalizálhatnak oxidációs, redukciós és hidrolitikus folyamatokat, a megfelelő molekulaszervezet létrejöttét segíthetik elő. Ám ezek a fémionok sok kárt is okozhatnak: nagyobb mennyiségben toxikusak minden sejtre. Ezért minden szervezetben igen érzékeny fémion-szabályozás alakult ki.

A sejtek működéséhez szükséges, biológiailag felhasználható fémion-koncentráció viszonylag állandó a citoszolban. Az optimális koncentráció fenntartását nevezzük a fémionok homeosztázisának. A stacionárius állapot kialakulása a fémion felvételével, sejten belüli tárolásával, illetve a sejten kívüli térbe juttatásával érhető el. Rendkívül fontos, hogy a szabályozás szelektív és érzékeny legyen, hogy a megfelelő fémion a jó makromolekulához kötődjön a megfelelő időpillanatban, már egy kisebb eltérés is a fenti állapottól stresszt okozhat. Ha megnő egy adott fémion koncentrációja, akkor annak az eltávolítása indul el. Ellenkező esetben pedig minimalizálódik az adott fémion felhasználása, egyes metalloenzimek, metalloproteinek működése visszaszorul, vagy a sejten belül tárolt fémionok szabadulnak fel. Ha mindez nem elég, a sejt energia-felhasználás révén juttatja a megfelelő mennyiségű fémiont a citoszolba.

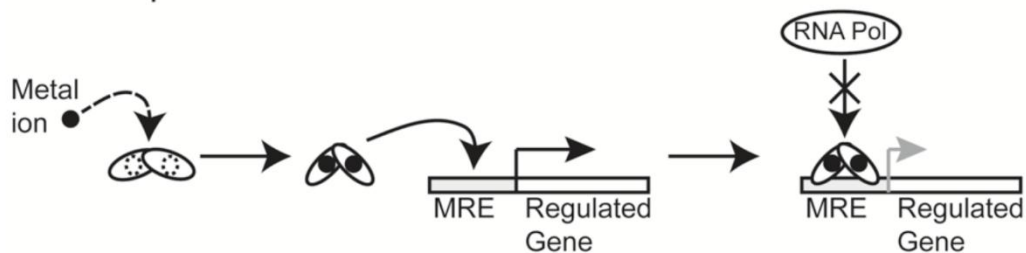
A töltéssel rendelkező, hidrofíl fémionokat a sejt többféle módon is átjuttathatja a hidrofób membránon. Kis molekulatömegű ligandumok, ún. ionofórok viszonylag erősen, és szelektíven képesek a fémionok megkötésére. Az ionofórok körülölelik a fémiont és egy hidrofób burkot hoznak létre. Ez a komplex már képes passzív transzport során átjutni a foszfolipid-kettősrétegen. Egy másik lehetőség, hogy a sejtmembránban lévő ioncsatornán keresztül jut a fémion a sejtbe, vagy jut ki a sejtől. Az ioncsatornákat olyan integráns fehérjék vagy polipeptid molekulák alakítják ki, melyek egy hidrofíl csatornát hoznak létre a membrán két oldala között. A megfelelő fémion-koncentráció biztosításához az is nagyon fontos, hogy a sejtek el tudják raktározni az esetlegesen feleslegben lévő fémion mennyiséget, ugyanakkor a fémionok hiánya esetén minél hamarabb mobilizálni tudja a megfelelő mennyiséget.

A fentiekben leírt szabályozás meglehetősen bonyolult, többlépcsős folyamatokat foglal magában, melyek megértése a bioszervetlen kutatások egy érdekes területe. TDK munkám során egy ilyen kutatási projektbe kapcsolódtam be.

2. Irodalmi áttekintés

A biológiai rendszerekben nagyon fontos, hogy a szabad fémion koncentrációja ne haladja meg a sejt számára toxikus szintet. A prokarióták sokféle transzkripció szabályozó fehérjét, úgynevezett fémszenzor vagy fémregulátor fehérjét tartalmaznak. Ezek a citoszolbeli fémion-koncentráció túlzott növekedésére (fémion stressz), vagy csökkenésére (fémion hiány) adott válaszként befolyásolják a fémion homeosztázist fenntartó fehérjék, mint például a membránhoz kötődő fémion transzporter fehérjék, sejten belüli kelátorok, ill. oligopeptidek (metallothioneinek, MT), és detoxifikáló enzimek termelődését. [1] A fémion stressz esetén ezen szabályzó mechanizmusok óvják meg a sejtet a mérgezésről. A megfelelő szabályozáshoz azonban rendkívül fontos, hogy ezek a fehérjék az egyes fémionokra szelektívek és érzékenyek is legyenek. [2]

A. Co-repression



B. De-repression



C. Activation



1. ábra: A fémszabályzó fehérjék működésének három ismert mechanizmusa [3]

Ezek a specializálódott, allosztérikusan kontrollált fehérjék háromféle mechanizmus szerint szabályozhatnak (1. ábra). Az első az úgynevezett korepresszió (co-repression), amikor a fémion a szenzorfehérjéhez koordinálódik, és ennek következtében a fehérje a DNS operátor régiójához kapcsolódik, mellyel gátolja fémion felvételét elősegítő fehérjék génexpresszióját. A második lehetséges szabályzás a derepresszió (derepression) aminek során a fémion a DNS-hez kötött szenzorfehérjéhez koordinálódik, ami viszont csökkenti a fehérje DNS-hez való affinitását, s így az leválik a DNS-ről, teret adva az RNS polimeráznak, amely elindítja a transzkripciót. A transzkripció során efflux-fehérjék szintetizálódnak, melyek elősegítik a fémion sejten belüli mennyiségének csökkenését. A harmadik, az előbbivel rokon mechanizmus az úgynevezett aktiválás, amikor a DNS-hez kötődő apofehérjéhez koordinálódik a fémion, melynek hatására konformáció változások történnek a fehérjében, ill. a DNS-ben is, és a változások hatására válik lehetségessé a génexpresszió.[4]

A transzkripciós fémszabályzó fehérjéknek hét jelentősebb, szerkezeti alapon megkülönböztethető családja ismert. [5] (2. ábra) Ezek a fehérjék különböző evolúciós úton alakultak ki, vagy alakultak át egymásból. Az evolúciós folyamatok során a fémion megkötésében szerepet játszó aminosavak módosultak, kisebb csoportok hozzáadódtak vagy eltűntek, esetleg új aminosavak ékelődtek be, vagy tűntek el, és így változott a fémion-kötés specifikussága. [6] Példaként a Cu^I specifikus P-típusú ATPáz pumpa nagy szekvencia-hasonlóságot mutat a CueR (*E. coli*) fehérjével és a CopY (*E. hirae*) fehérjével, ami magyarázhatja a hasonló működési mechanizmusait. [1,7]

A derepressziós mechanizmussal szabályzó fehérjecsaládok legjobban tanulmányozott első tagja az ArsR/SmtB. Nevét az ArsR (*E. coli*) $\text{As}^{III}/\text{Sb}^{III}$ -szenzor fehérjéről, illetve a PCC7942 Zn^{II} (*Synechococcus*) szenzorról kapta. Ez az egyik legbővebb család, a fémionok széles körét, akár esszenciális (pl. Zn^{II} , Ni^{II}), vagy toxikus (pl., Cd^{II} , Pd^{II} , As^{III}) ionokat érzékelő fehérjék tartoznak ide.

A CsoR/RcnR fehérjecsalád talán a szerkezetileg legjobban feltérképezett. Nevét a CsoR (*M. tuberculosis*) Cu^I -szenzorról, és a RcnR (*E. coli*) $\text{Ni}^{II}/\text{Co}^{III}$ -szenzorról kapta. Ezekre a fehérjékre tipikusan jellemző egy ujjenyomatként is emlegetett aminosav szekvencia, mely a CsoR esetében a X-Cys-His-Cys (X bármilyen aminosavat jelenthet), míg a RcnR-nél a His-Cys-His-His.

A CopY család főleg réz-specifikus fémszabályzó fehérjéket foglal magába. A CopY fehérjét *E. hirae* baktériumból azonosították először, és a MecI/BlaI család egyik tagjának tekintik. Ennek oka az N-terminális DNS-kötő doménekben meglévő nagy

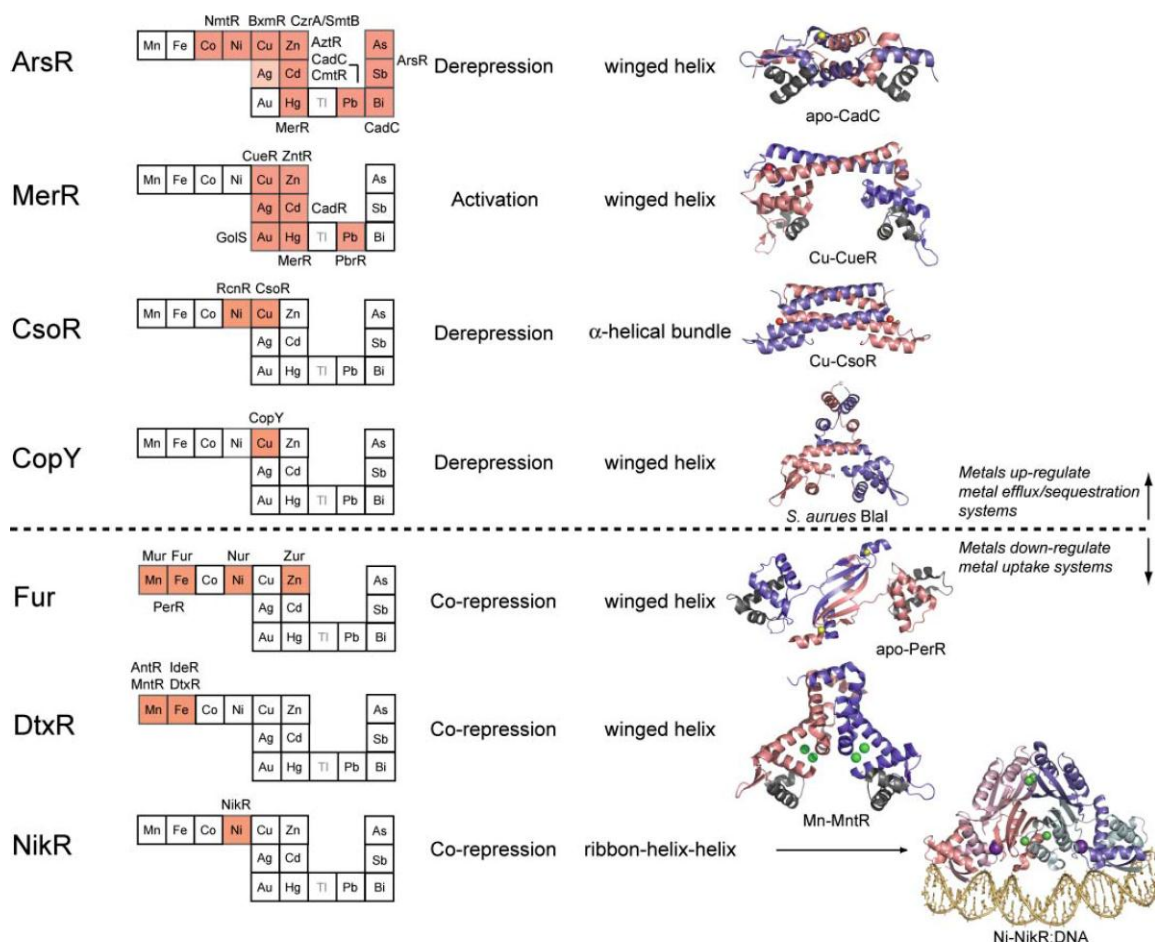
szekvencia hasonlóság mellett főként az, hogy a CopY és a MecI/BlaI azonos DNS szekvenciát ismer fel. Minden CopY fehérje C-terminális végének közelében egy jól megőrzött CXCXXXCXC motívumot tartalmaz. Spektroszkópai eredmények alapján a dimer CopY mindkét monomerje két-két Cu^{I} -ion megkötésére képes, ezzel erősen lumineszkáló kétmagvú Cu_2S_4 klasztereket alakítva ki. A CopY (*E. hirae*) a *copYZBA* DNS szakasz (operon) transzkripcióját szabályozza, mely két réz-specifikus, feltehetőleg a réz felvételben és eltávolításban résztvevő P-típusú ATP-ázt (CopA és CopB), illetve a réz-chaperon CopZ-t kódolja. Alaphelyzetben a Zn^{II} -kötött CopY a *copYZBA* operon operátor-promóter régiójához kapcsolódik, és ezáltal gátolja a transzkripciót. A CopZ a Cu^{I} -ionokat a Zn^{II} -CopY-hoz szállítja, ami fémiont cserél, azaz átalakul Cu^{I} -CopY komplexszé, ami leválik a DNS-ről, helyet adva az RNS polimeráz számára.

A korepressziós mechanizmussal működő családok közül elsőként a Fur család említhető, ami az *E. coli* baktériumban található Fe-szabályzott felvétel gátlóról, a Fur fehérjéről kapta a nevét. Az *E. coli*-ban a Fur egy globális transzkripciós regulátor, hiszen több mint 90 gén expresszióját szabályozza, melyek fehérjét és RNS-t egyaránt kódolnak. Vannak olyan tagok, amik nem a vas homeosztázisában játszanak szerepet. Ilyen pl. a Zn^{II} -szenzor Zur, a $\text{Mn}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ -szenzor Mur vagy a Ni^{II} -szenzor Nur. Szerkezetükről általánosan elmondható, hogy az N-terminális helikális DNS kötő domén egy flexibilis összekötő szakaszon keresztül kapcsolódik a C-terminális dimerizációs doménhez.

A DtxR család két főbb csoportra osztható, a Fe^{II} - és a Mn^{II} -szenzorokra. A DtxR (*C. diptheriae*) az előbbi alcsalád tagja, nevét a funkciójáról kapta, miszerint a diphteria toxin expresszióját szabályozza, ami nagyban függ a sejt Fe^{II} -tartalmától. A Mn^{II} -szenzorok közül az MntR (*B. subtilis*) a legismertebb szabályzó fehérje. A DtxR fehérjék különlegessége, hogy két különböző fémkötő helyet azonosítottak bennük, melyeket megkülönböztetésük céljából elneveztek elsődleges és másodlagos fémkötő helynek. A másodlagos helyen kötődő fémion a szerkezet stabilizálásában vesz részt, amíg az elsődleges fémkötő helyhez koordinálódó fémion indukálja a szabályzást.

A NikR család a NikR (*E. coli*) transzkripciós regulátorról kapta a nevét, ami nikkelt felvételéért felelős fehérjék és a működésükhöz nikkelt igénylő enzimek expresszióját szabályozza. Mind a Ni^{II} -iont kötő NikR fehérje (*E. coli*), mind a Ni^{II} -NikR-DNS komplex kristályszerkezetét meghatározták. A tetramer szerkezetű (dimerek dimerje) molekulában 4-4 elsődleges, nagy affinitású, ill. másodlagos, kis

affinitású fémkötő hely található. A Ni^{II} -ionok koordinációja az elsődleges helyeken allosztérikusan aktiválja a *nik* operátor-promoter szakaszához való kötődést, míg a másodlagos kötőhelyek betöltése feltehetőleg a DNS-kötő domének konformációját irányítja, mely tovább növeli a tetramer fehérje DNS-hez való affinitását.



2. ábra: A fémszabályzó fehérjék szerkezeti családjai egy-egy konkrét példával, és a szabályozás mechanizmusának megjelölésével [8]

A transzkripció aktivátor MerR fehérjecs család ugyancsak egyik tagjáról, a MerR fehérjéről kapta a nevét. Valójában a MerR tekinthető a fémszabályzó fehérjék "prototípusának", melyről eredetileg a "fémszabályzó" kifejezést is megalkották. [1] Ezek a regulátorok nagyon sok baktériumtörzsben megtalálhatók, viszont az ősbaktériumokban és az eukariótákban nem. A család 312 tagjának DNS kódja, 156 bakteriális genomon fordul elő, melynek 5%-a maga a MerR fehérje, 44%-a pedig a többi fémszabályzó fehérje. Sok baktériumban egynél több MerR családból származó fehérje is megtalálható. [6] Számos fémionra specializálódtak, mint például a Cd^{II}

(CadR), Zn^{II} (ZntR), Cu^{I} (CueR), Ag^{I} , Au^{I} (GolS), Hg^{II} (MerR), Pb^{II} (PbrR). [2] A MerR család jelentős hányadát kitevő fémszabályzó fehérjék mellett ide sorolhatók az oxidatív stresszt érzékelő $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ klasztert tartalmazó SoxR, illetve a BmrR és Mtn, melyek kisebb mérgező molekulák elleni védekezésben vesznek részt.[1,9]

A MerR fehérjékre jellemző a nagy aminosav-szekvenciabeli és szerkezeti hasonlóság, valamint a génexpressziót is hasonló módon aktiválják. [5] Általánosan elmondható róluk, hogy a fehérjék N-terminális, DNS-kötő végén egy hélix-kanyar-hélix- β -hajtűkanyar motívumot tartalmazó helikális rész található. Ezt követi egy viszonylag hosszú dimerizációs hélix, majd egy, rendszerint már jelentősebb eltéréseket tartalmazó, fémion-kötő domén a C-terminális végen. Ez a szerkezeti eltérés a C-terminális részen lehetővé teszi, hogy a MerR család egyes tagjai különféle fémionokat érzékeljenek, és specifikusak legyenek az adott effektorra. [1] A MerR N-terminális vége a DNS operátor régiójához kötődik a -35 és -10 promóter helyek között elhelyezkedő 19-20 bázispár hosszúságú toldalék szakaszon. A fémiont nem kötő, de DNS-hez kapcsolódó apofehérje csak gyenge kölcsönhatást tesz lehetővé az RNS polimeráz és a DNS között. Így a transzkripció nem lehetséges, mert a fehérje gyakorlatilag inhibálja azt. Ha azonban a megfelelő fémion koordinálódik a fehérjéhez, annak konformációja megváltozik, aminek hatására a DNS szerkezete jelentősebben "megtörik", a kettős szál "kicsavarodik", és ezzel a kötőhely alkalmassá válik az RNS polimeráz számára, így a transzkripció elindul. [1,5] A hét ismert fémszabályzó fehérjecsaládból egyedül a MerR családnak vannak olyan tagjai, melyek az indukátor fémion jelenlétében vagy hiányában is az operátorukhoz kötötten maradnak. [4] A MerR fehérje esetében ha a sejtben a fémion koncentrációja visszaáll az optimális mértékre, akkor a Hg^{II} -MerR₂ komplex disszociál a DNS-ről és a helyére egy másik, fémiont nem tartalmazó MerR₂ dimer fehérje kötődik. Ennek az az oka, hogy a MerR₂-nek nagyobb az affinitása a DNS-hez, mint a Hg^{II} -MerR₂ komplexnek.

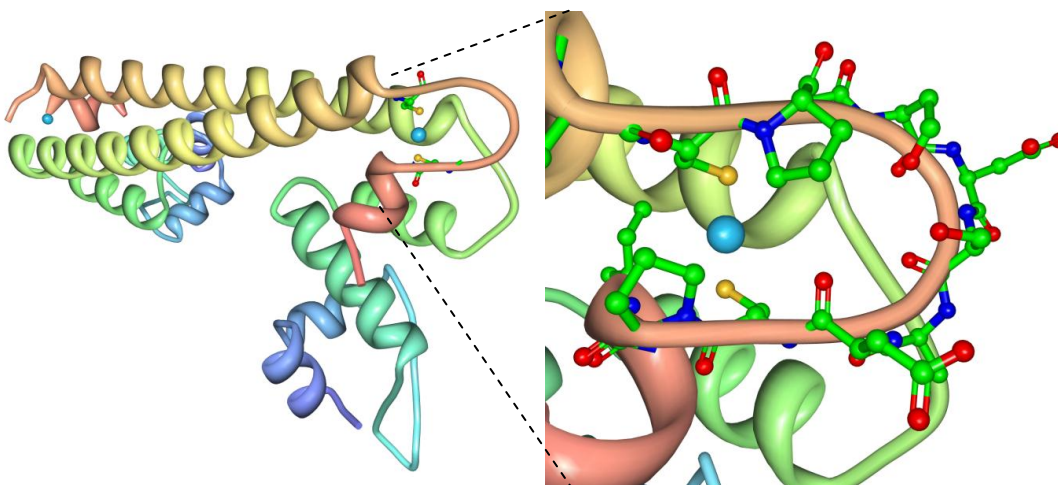
A MerR regulátorok koordinációs kémiáját legelőször magán a MerR fehérjén vizsgálták. ¹⁹⁹Hg NMR spektroszkópiával és helyspecifikus mutációval mutatták ki a Hg^{II} számára síkháromszög geometriát biztosító három ciszteint. A fémkötő hely a C-terminális végen található, a dimerizációs hélix és egy rövidebb helikális szakasz között. A két fémkötő hurok a dimer külső részén helyezkedik el szimmetrikusan, távol a DNS-kötő helytől. Ez a szerkezet egyedüli a fémkötő fehérjék között, lehetővé teszi egy- és kétvegyértékű fémionok specifikus felismerését igen széles skálán. [1] A szoft tulajdonságú d-mezőbeli fémek (pl. Hg, Cd, Ag) a szoft karakterű kéntartalmú

donorcsoportokhoz (pl. Cys) koordinálnának legszívesebben. A Co, Ni, Cu vagy Zn a kén mellett az oxigén- és a nitrogéntartalmú ligandumokat is kedvelik (pl. Asp, His oldalláncai). Emellett ezek a fémionok gyakran egymástól eltérő koordinációs geometriát részesítenek előnyben, ami jelentős tényező abban, hogy miként képesek a fehérjék a fémionokat megkülönböztetni, illetve szelektív megkötésüket biztosítani. [4]

A MerR családon belül számos különböző példát találhatunk a fémionok szelektív megkötésére. Röntgen-diffrakció útján meghatározott kristályszerkezetek alapján érdemes megvizsgálni, hogy miben különbözik az egy- és a kétvegyértékű fémionokat megkötő fehérjék szerkezete. Például az *E. coli* CueR tipikusan az egyvegyértékű fémionokra (Cu^I , Ag^I , Au^I) specifikus, míg a ZntR a kétvegyértékű Zn^{II} -re. A *S. typhimurium*ban megtalálható GolS fehérjével végzett legújabb vizsgálatok pedig jó példát szolgáltatnak arra, hogy miként alakul át lassan egy fehérje oly módon, hogy mind jobban megkülönböztesse az Au^I és Cu^I egyvegyértékű fémionokat. [10]

A CueR és a ZntR szerkezete között megfigyelhető néhány kulcsfontosságú különbség, melyek az előbb említett fémion szelektivitást eredményezik. A MerR fehérjék dimerizációs hélixének N-terminális végén, a szemközti egységen egy jól megőrzött aminosav kritikus fontosságú a specifikusság kialakításában. Az egyvegyértékű fémiont érzékelő MerR regulátorokban egy szerin található ebben a pozícióban (a CueR-ben Ser77), míg a kétvegyértékű fémiont érzékelő fehérjékben egy cisztein (a ZntR-ben Cys79). A CueR-ben ez a Ser77 egység stabilizálja a fémkötő hurkot azáltal, hogy a Cu^I -ion számára egy védelmet nyújtó hidrofób karakterű környezet kialakítását segíti. Ezzel ellentétben a ZntR-ben a Cys79 közvetlenül koordinálódik a fémkötő szakaszokhoz kötött két Zn^{II} -ion egyikéhez, ezzel segítve a megfelelő geometria kialakulását, és a magasabb koordinációs számot a Zn^{II} -ion számára. A CueR esetében a C-terminális végen elhelyezkedő rövid hélix parciális pozitív töltésű dipólusa is szerepet játszik a fémkötés stabilizálásában [11]. A kialakuló $\text{S}^- - \text{Cu}^+ - \text{S}^-$ centrum negatív töltésével szemben a környező aminosavak, illetve a C-terminális α -hélix parciális pozitív töltése jelentős töltés közömbösítést hoz létre. A lineáris ditiolát típusú Cu^I -koordinációt emellett egyéb hidrogénhidás és elektrosztatikus kölcsönhatások is stabilizálják. [11] Itt fontos megemlíteni, hogy a lineáris koordinációs geometria, azaz a ditiolát kötés a Hg^{II} számára is nagyon kedvező lenne, de feltehetőleg éppen az említett elektrosztatikus okoknak köszönhetően a CueR-ben ez a kötés kevésbé előnyös a Hg^{II} -ion számára. [2] Kimutatták, hogy főként versengő ligandumok jelenlétében a CueR csak kismértékben képes megkötni a Hg^{II} - és Zn^{II} -ionokat, azonban

biológiai választ, azaz transzkripció aktivitást egyik fémion esetében sem tapasztaltak. [11] A CueR szerkezete észszerű magyarázatot adhat arra, hogy a fehérje hogyan különbözteti meg az egyvegyértékű fémionokat a kétvegyértékűektől, viszont az egyvegyértékű fémionok közül nehezen válogatja ki a Cu^{I} -ionokat. A Cu^{I} -, Ag^{I} - és Au^{I} -iont kötő CueR kristályszerkezeteket megvizsgálva láthatjuk, hogy azok izomorfak, s biológiai válaszukban is nagyon hasonlóak (ld. példaként a Cu^{I} -iont kötő fehérje szerkezetét a 3. ábrán). Az S-Cu-S lineáris kötést a Cys112 és Cys 120 aminosavak hozzák létre, ahol a S-Cu kötés hossza 2,13 Å, a kötés csaknem lineáris ($\angle_{\text{S-Cu-S}} = 176^\circ$). Az Ag^{I} -ion és Au^{I} -ion esetében egy kis eltérés figyelhető meg, a kötéshossz valamivel nagyobb, az Ag-S távolság pedig 2,35 Å, míg az Au-S 2,32 és 2,39 Å. [1,11]

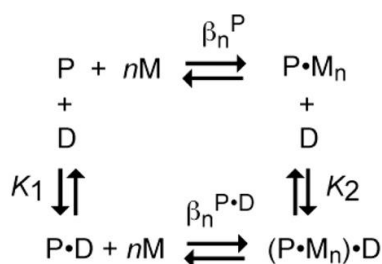


3. ábra: Az *E. coli* CueR fehérje Cu^{I} -formájának röntgenszerkezete [PDB kód: 1Q05] (balra), illetve a fémion koordinációs környezetét szemléltető kinagyított fémkötő hurok (jobbra) [11]

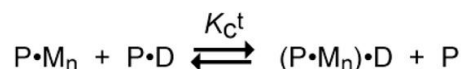
Összefoglalva, a szelektivitás kulcsa a fémion számára kedvező geometria előre megteremtett lehetősége, a ligandumok által kialakított hely megfelelő mérete, és környező töltéseloszlás. Ezenfelül a fémionok a solvatációs energiák eltérő mértéke alapján is megkülönböztethetők egymástól. A szelektivitást végül befolyásolhatja, hogy bizonyos esetekben csak a megfelelő fémion megkötődése okozhat olyan szerkezeti változásokat, amely elengedhetetlen a fehérje funkciójának betöltéséhez. [2]

Végezetül érdemes beszélni arról, hogy milyen módon valósul meg az allosztérikus szabályozás a fémszabályzó fehérjékben. Az allosztéria fogalma azt takarja, hogy egy ligandum (ion/molekula) megkötődése a fehérje egy adott kötőhelyén befolyásolhatja ugyanazon vagy egy másik ligandum megkötődését/kémiai reaktivitását

egy eltérő, gyakran távoli kötőhelyen. [7,8,12] Az alábbiakban bemutatott termodinamikai körfolyamat tartalmazza mind a négy lehetséges állapotot, melyet egy dimer fémszabályzó fehérje felvehet, miközben a kettősszálú DNS operátorával és megfelelő fémionnal zárt egyensúlyi rendszert alkot. A termodinamikai körben P a dimer apofehérjét, D a DNS operátort, nM pedig az n számú fémiont jelöli, a négy állapot pedig maga az apofehérje (P), az n darab fémiont kötő fehérje ($P \cdot M_n$), a DNS operátorához kötődő fehérje ($P \cdot D$) és végül a terner fémion-fehérje-DNS komplex ($(P \cdot M_n) \cdot D$).



A modellben a P dimer természetesen egyensúlyban áll a monomer formával is, ami egy K_{dimer} egyensúlyi állandóval jellemezhető. A termodinamikai körben ez nincs feltüntetve, mert a monomer fehérjének elhanyagolható az affinitása a DNS-hez. A fehérje allosztérikus válasza a $P \cdot D$ és a $P \cdot M_n$ állapotok P és $(P \cdot M_n) \cdot D$ állapotokhoz viszonyított stabilitásától függ, ezt a K_c^t állandóval definiáljuk:



Termodinamikailag ez felfogható a $P \cdot D$ és a P állapotok fémionhoz való affinitása közötti, illetve a P és a $P \cdot M_n$ állapotok DNS-hez való kötődésében meglevő affinitásbeli eltérésként is. Így K_1 és K_2 , vagy β_n^P és $\beta_n^{P \cdot D}$ megmérése lehetővé teszi K_c^t dimenziómentes "diszproporcionálódási" egyensúlyi állandó kvantitatív meghatározását.

$$K_c^t = \beta_n^{P \cdot D} / \beta_n^P = K_2 / K_1$$

Ebből pedig, az ismert termodinamikai összefüggés segítségével, könnyen kiszámítható a folyamatra jellemző szabadentalpia változás is.

$$\Delta G_c = -RT \ln K_c^t$$

Abban az esetben, ha a fémion megkötődése a regulátor fehérje disszociációját okozza a DNS-ről, a $(P \cdot M_n) \cdot D$ állapot jelentősen destabilizálódik a $P \cdot M_n$ és a D állapotokhoz képest. Ekkor a $K_1 > K_2$, illetve $\beta_n^P > \beta_n^{P \cdot D}$ és $\Delta G_c > 0$. Azaz, a ligandumcsere-reakció

nem kedvező, így a két biológiailag megfelelő végállapot a $P \cdot M_n$ és a $P \cdot D$. A másik esetben, amikor $K_1 < K_2$, illetve $\beta_n^P < \beta_n^{P \cdot D}$, és így $\Delta G_c < 0$, a két biológiailag megfelelő végállapot a szabad P és a $(P \cdot M_n) \cdot D$ komplex. [7]

3. Célkitűzés

Az irodalmi áttekintésből kiderül, hogy a fémregulátor fehérjék szerkezetével, a fémionok megkötésének termodinamikájával és a szabályozó mechanizmusuk feltárásával kapcsolatos kiterjedt vizsgálatok ellenére is számos megválaszolandó kérdés maradt. Egyebek mellett továbbra sem teljesen világos, hogy miként történik pontosan a fémionok felismerése a MerR család fehérjeiben, és hogy a fémionok megkötésének erőssége milyen mértékben befolyásolja a szabályozási folyamat beindulását. Diákköri munkám során a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjának toxikus fémionok és a CueR fémszabályzó fehérjék, illetve az azok alapján tervezett oligopeptidek kölcsönhatásával kapcsolatos kutatásaiba kapcsolódtam be. A CueR fehérje kristályszerkezetét egyvegyértékű átmenetifém-ionok jelenlétében (Cu^I , Ag^I , Au^I) már korábban meghatározták. Hosszabb távú feladatom az volt, hogy tanulmányozzam az *E. coli* CueR fehérje kétvegyértékű fémionokkal (Cd^{II} , Hg^{II} , illetve Zn^{II}) történő kölcsönhatásának erősségét, illetve az említett fémionok kötésének módját. Az eddigi kutatások alapján a CueR csak az egyvegyértékű fémionok esetén ad biológiai választ, azaz indukálja a transzkripció folyamatát, ami azonban a Zn^{II} - illetve Hg^{II} -ionok esetén elmarad.

Munkám során célul tűztük ki az *E. coli* CueR fehérje előállítását *E. coli* baktériumban, mely magába foglalja a fehérje kifejezésének és tisztítási folyamatainak optimalizálását. További célunk volt olyan mutáns fehérjék előállítása is, melyekben a fémkötő hely szerkezetét nem befolyásoló, de ahhoz közel eső pozíciókban egyes aminosavakat a fémionok megkötődésének vizsgálatát jelentősen elősegítő fluorofór triptofán egységekre cseréltük. Az így előállított fehérjék viselkedését egy-, illetve kétvegyértékű d^{10} fémionokkal terveztük tanulmányozni. A végső célunk annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy a kétvegyértékű fémionokkal kialakuló komplexek kisebb stabilitása (az egyvegyértékű fémionok komplexeihez képest), vagy a kölcsönhatás során a fehérje konformációjában kialakuló különbség okozza-e a fehérje (in)aktivitását d^{10} fémionok jelenlétében?

4. Alkalmazott kísérleti eljárások

4.1. A polimeráz láncreakció (PCR - Polymerase Chain Reaction)

A tanulmányozni kívánt fehérjék génjét PCR segítségével állítjuk elő. A PCR ciklikus, polimerizáción alapuló DNS sokszorosítására alkalmas módszer. A reakció során a mintaként (templátként) szolgáló kettős szálú DNS szakaszt egy DNS polimerázzal, a szubsztrátként felhasznált dezoxiribonukleozid-5-trifoszfátokkal (dNTP) és a polimerizáció kiindulási pontjait megszabó, a minta DNS egyik, ill. másik szálával komplementer szekvenciájú oligonukleotid primerekkel hozzuk össze. A folyamat egy ciklusa különböző hőmérsékleteken lezajló, diszkrét lépésekből tevődik össze:

1. denaturálás: a kétszálú DNS szálainak szétválása hőkezelés hatására (a természetes DNS olvadáspontja 85-95 °C körül van)
2. hibridizálás (annealing): az egyszálú DNS-hez a lehűlés során rövid oligonukleotid primerek hibridizálódnak, kijelölve ezáltal a polimerizáció kezdőpontját
3. polimerizáció (extension): az enzim a primertől kiindulva előállítja a komplementer láncot 5'→3' irányban

Ez három lépés ciklikusan ismétlődik, az egyes ciklusokban képződött kétszálú DNS mindkét szála a következő ciklusban már templátként fog működni. A PCR lényeges elemei a hőstabilis polimeráz, dNTP-szubsztrátok, PCR puffer, templát, primerek.

A primerek helyes megválasztása nagyon fontos az eljárás sikere szempontjából. Általában 17-30 tagszámú primerek használatosak, melyek olvadáspontja 50-60 °C, a G+C nukleotidok részaránya 50% körül van, továbbá, ha lehetőség van rá, kerülni kell a primerek közötti komplementaritást.

A DNS polimerázok a DNS szintézisét végző enzimek, melyek az ehhez szükséges indító, primer szálat 5'→3' irányban hosszabbítják meg. A működésükhöz ezenfelül Mg^{2+} -ionok szükségesek. Egy csoportjuk, a termofil DNS polimerázok használatosak a PCR során, mert magas hőmérsékleten is stabilisak, aktívak. Ilyen pl. a Taq polimeráz is, melynek 90 °C-on 40 perc a félélet-ideje, átlagosan 1 hiba/10000 bázispár pontossággal működik.

4.2. A gén bejuttatása a baktériumokba

Ahhoz, hogy a PCR-ben előállított gént a baktériumba juttathassuk először egy hordozó cirkuláris DNS-be – vektorba (esetünkben pET-21a, Novagen) – építettük be. Ehhez restriktációs endonukleázokat használtunk. Ezek olyan, baktériumokból izolált enzimek, melyek a DNS kettős-spirál specifikus helyen – sokszor ún. palindrom szekvenciáknál – történő hidrolitikus hasítására képesek. A hasítás során tompa vagy túlnyúló, ún. ragadós vég képződhet. Ez utóbbi esetben a DNS szakaszok összekapcsolása egyszerűbb, és az inzert DNS szakasz fordított irányú beépülése is könnyen kiküszöbölhető. A restriktációs endonukleázokat a vektor klónozó helyének térképe alapján választjuk. Fontos, hogy ezek az enzimek mind a vektort, mind pedig a beépítendő génszakaszt csak a kívánt helyen hasítsák el. Munkánkhoz ezek alapján az NdeI és BamHI enzimeket (Fermentas) választottuk. Így alakítottuk ki a DNS molekulák ragadós végeit, melyeket ligáz enzimmal kapcsoltunk össze. A ligázok olyan enzimek, melyek a poli- és oligonukleotidok 5' foszfát- és 3' hidroxilcsoportjai közötti foszfodiészter kötések kialakulását katalizálják. Kiválóan alkalmazhatóak a vektor és a fragmens összekapcsolására tompa és ragadós végek esetén is. A ligáláshoz 15 µl steril vízhez 1 µl ligáz enzimet, 1 µl hasított pET-21 plazmidot, 1 µl fragmenst és 2 µl 10× töménységű ligázpuffert adtunk, majd 2 órán át inkubáltuk 16 °C-on.

A fentiek szerint kialakított új plazmid vektorokat a transzformálás során juttattuk be a baktériumsejtekbe. Az eljárás során a vektort tartalmazó oldatot hozzáadtuk a kompetens – transzformáláshoz előkészített – sejtekhez, majd 37 °C-os hőshockot alkalmaztunk. Ennek hatására a sejtfalon keresztül a vektor bejut a sejtbe. Végül visszahűtve 4 °C-ra, a sejtfal újra átjárhatatlan lesz a DNS számára. Különböző célokra különböző kompetens sejteket használunk, a DNS sokszorosításához *E. coli* DH10B, a fehérje termeléséhez BL21 baktériumtörzset. A transzformálás után a baktériumokat ampicillin-tartalmú táptalajra (továbbiakban LB(Amp⁺) lemez) kentük ki, ahol csak azok a baktériumok maradtak életben és hoztak létre telepeket, melyek tartalmazták a vektort, azaz tartalmazták az antibiotikum rezisztencia gént.

4.3. A pET-21a-CueRX vektorok sikeres kialakításának ellenőrzése

A telep vagy „colony” PCR-ben közvetlenül egy-egy baktériumtelepből veszünk mintát, és a bejuttatott vektorhoz specifikusan tapadó primerek segítségével sokszorozunk DNS-t. Mivel a PCR termékének méretét pontosan ismerjük, ezzel a

módszerrel könnyen ellenőrizhetjük, hogy a transzformálás során a baktériumba a cél-DNS fragmenst tartalmazó plazmid épült-e be, vagy maga a kiindulási vektor.

A klónozás sikerességét végül a DNS szekvenálásával is ellenőriztük, amit a szegedi BayGen Intézetben végeztek el. Ehhez a beépített DNS szakasról újabb PCR-t készítettünk, hogy a szekvenálandó szakasz sokszorozásával elérjük a szükséges koncentrációt. A DNS szekvenálása során annak bázissorrendjét határozzák meg. A meghatározás során szintén megtöbbszörözik a DNS-t, de az elegyhez olyan ddNTP elegyet is hozzáadnak, melyben a 4 különböző ddNTP-t különböző fluoreszcens festékkel jelölték meg. A 3'-vég felől beépülő ddNTP-k miatt a polimerizáció leáll. A szekvenáló PCR végén statisztikusan minden lehetséges hosszúságú DNS szakasz előáll, melyek végein fluoreszcens nukleotid található. Ezeket méretük alapján kapilláris gélelektroforézissel elválasztják egymástól fluorimetriás detektálás mellett. Az így nyert elektroferogramról egyértelműen leolvasható a DNS bázissorrendje, így kiszűrhetők a klónozás folyamán esetlegesen létrejövő mutációk.

4.4. Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz gélelektroforézissel DNS fragmensek elválasztásának, azonosításának és izolálásának alapvető módszere. 0,2-50 kbp tartományban különíthetők el a DNS molekulák, az agaróz koncentrációjától függően. Elektromos térbe helyezve a gél, a DNS, mivel semleges közegben (pH ~ 7,0 körül) negatív töltésekkel bír, az anód felé vándorol. A DNS mozgási sebességét a DNS mérete, alakja és az agaróz gél koncentrációja is befolyásolja. Az egyes fragmensek pontos helye a gélben közvetlenül meghatározható egy, a DNS kettős szálába beékelődve fluoreszcenciát mutató festéket, etídium-bromidot alkalmazva. A méret becsléséhez ismert DNS fragmensek elegyét tartalmazó markert futtatunk mintánkkal párhuzamosan. Szükség esetén a DNS izolálható a gélből és felhasználható további célokra.

4.5 A fehérjék kifejezése

Miután megbizonyosodtunk róla, hogy a megfelelő fehérjét kódoló DNS szakasz található meg az előállított plazmidban, kifejeztük a fehérjét. Ehhez először a megfelelő telep tápoldatba történő átoltásával baktérium-kultúrát tenyésztettünk OD 600 ~ 0,6 optikai sűrűség eléréséig. Ezután IPTG (izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid) hozzáadásával indukáltuk a célfehérje termelését. Az IPTG kölcsönhatásba lép a vektor klónozó régiójának operátor régiójához kötődő, a fehérje-transzkripciót gátló

molekulával. Ez a gátlást okozó molekula disszociációját okozza a DNS-ről, ami a fehérje-kifejezés elindulásához vezet. A baktériumban ezután annak saját fehérjei rovására a célfehérje termelődik. Indukálás után két órával a sejteket ultrahang segítségével elroncsoltuk, majd elválasztottuk a vízben oldható fehérjék frakcióját a vízben oldhatatlan, denaturálódott fehérjék és sejtörmelékek frakciójától. Az indukálás során nagyon fontos a körülmények optimalizálása, hiszen a magas hőmérséklet, az indukálás idejének hosszúsága, vagy az IPTG nagy koncentrációja a fehérjék gyors kifejeződését és denaturációját okozhatják. Ez történt esetünkben is a 2 órás inkubáció során 37 °C-on. Emiatt a fehérjekifejezést a továbbiakban 20 °C-on végeztük egy éjszakán át. Sikeres kifejezés esetén a célfehérje a vízdoldható fázisban marad, a többi fehérjéhez képest nagy koncentrációban.

Az indukálási periódus lejárta után a sejteket lecentrifugáltuk 13500 rpm fordulatszámmal 1,5 percig. A sejtek roncsolását 300 µl jéghideg PBS oldatban (10× PBS: 1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄, pH 7,3) ultrahanggal végeztük. Ekkor az elegyben az összes fehérje és sejtörmék megtalálható. Újabb centrifugálással (10 perc, 13500 rpm, 4 °C) a vízben oldható és vízben oldhatatlan frakciót elválasztottuk. Az oldhatatlan frakciót 200 µl PBS-oldatban szonikálással újraszuszpendáltuk.

4.6. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

A PAGE során N,N-metilén-bisz-akrilamiddal keresztkötött akrilamid polimerek által létrehozott gélben futtatjuk a mintákat. A gél készítése során polimerizáció szabaddiókok jelenlétében zajlik le, melyeket ammónium-perszulfát (APS) szolgáltat, és tetrametil-etilén-diamin (TEMED) stabilizál. A gél pórusméretét a polimerek hossza és a keresztkötések száma határozza meg, amit az akrilamid és bisz-akrilamid arányának változtatásával befolyásolhatunk. A gélben SDS (nátrium-dodecil-szulfát) és merkaptóetanol segítségével denaturált fehérjemolekulák méretükkel arányos negatív töltésük révén (a hozzájuk kötődő dodecil-szulfátionok miatt), egyenáramú elektromos tér hatására azonos irányban vándorolnak, méretük alapján elválaszthatók egymástól. Azonban a kisméretű fehérjék azonosítása a szokásos gélekben nehézkes. Kísérleteinkben egy erre a célra optimalizált eljárást alkalmaztunk. [13]

Szükséges oldatok:

Gél puffer (3x): 100 mL-hez:

- Tris: 36,3 g (3,0 M)
- SDS: 0,3 g (0,3 m/v%)
- 37%-os HCl-oldat: 8,28 mL (1,0 M)
- pH = 8,45

Anód puffer (10x): 0,5 L-hez:

- Tris: 60,6 g (1,0 M)
- 37%-os HCl-oldat: 9,33 mL (0,225 M)
- pH = 8,90

Katód puffer(10x): 0,5 L-hez:

- Tris: 60,6 g (1,0 M)
- Tricin: 89,6 g (1,0 M)
- SDS: 5,0 g (1,0 m/v%)
- pH = 8,25

A-oldat:

- 29 m/v% akrilamid
- 1 m/v% N,N'-metilén-biszakrilamid

A gélek készítése az alábbi táblázat szerint történt:

	<i>Alsó gél (16%) 2db</i>	<i>Felső gél (4%) 2db</i>
A-oldat (ml)	7,75	0,80
<i>Gél puffer (3x) (ml)</i>	<i>5,00</i>	<i>1,50</i>
Glicerol (g)	1,5	---
Desztillált vízzel kiegészíteni (ml-re)	15,0	6,0
APS (μl)	50	50
TEMED (μl)	5	5

9 μl fehérjemintához 3 μl merkaptóetanolt és festéket tartalmazó puffert adtunk és az így összekészített mintát 3 percig 100°C-on tartottuk, majd felvittük a gélre. Az elektroforézist egy Biorad készülék segítségével végeztük. A felső, koncentráció gélben 30 majd az alsó, szeparáló gélben 60 mA áramerősséget alkalmaztunk. A futtatás

befejeztével a fehérjéket Comassie Brilliant Blue R250 (Reanal) festék segítségével tettük láthatóvá.

4.7. Fluoreszcencia spektroszkópia

A molekuláris tudományokban az elmúlt 20 évben jelentősen megnövekedett a fluoreszcencián alapuló mérések használata. Lumineszcencia jelenségén az anyagok spontán fényemisszióját értjük, aminek két fajtáját különböztetjük meg, a fluoreszcenciát és a foszforeszcenciát, a gerjesztett állapottól függően. Fluoreszcencia esetében a gerjesztett és az alapállapot is szingulett, így a relaxáció során bekövetkező átmenet megengedett. Fluoreszcencia során a gerjesztő fény megszűnése után az emisszió viszonylag rövid ideig tart, egy átlagos fluoreszcens élettartam 10 ns körül van. A fluorofórok általában olyan anyagok, melyek többszörösen konjugált kettőskötéseket tartalmaznak, vagy aromás szerkezetűek. Minden fluorofór anyagra jellemző a gerjesztési és emissziós hullámhossz. A fluoreszcencia spektroszkópia emiatt igen szelektív és érzékeny analitikai módszer. Emellett tanulmányozhatjuk a fluorofór környezetének megváltozását is, pl. fémion-koordináció hatására. Méréseinket szobahőmérsékleten, 1×1 cm méretű kvarcküvettában, Hitachi F-4500 fluoriméterrel végeztük. Annak eldöntésére, hogy milyen hullámhosszú gerjesztő fényt alkalmazzunk a gerjesztési és emissziós hullámhosszakat 200 – 400 nm tartományban változtattuk a háromdimenziós mérések során. Ezek alapján a továbbiakban 290 nm hullámhosszú gerjesztés mellett mértük az emissziót.

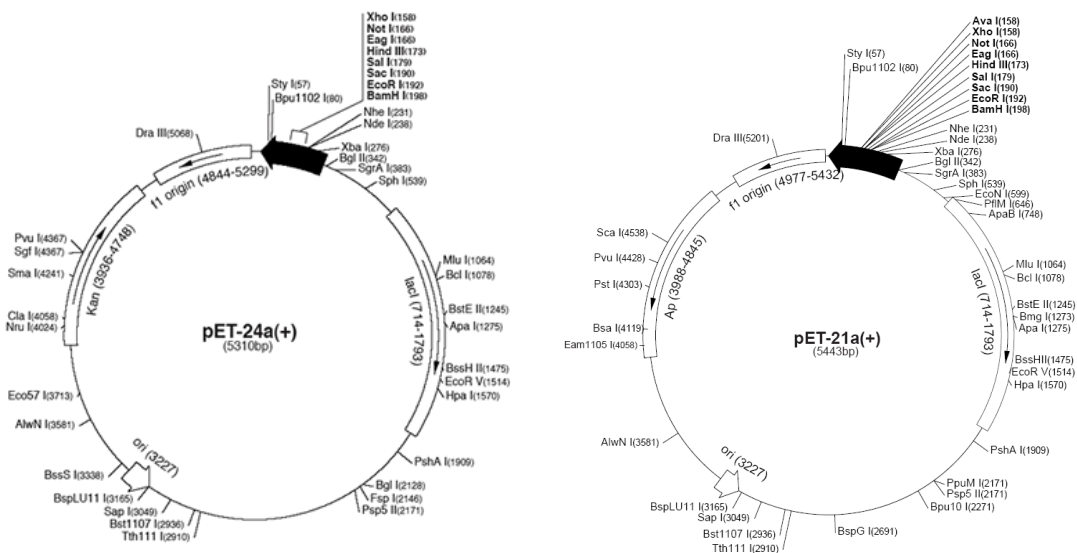
4.8. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

A fehérje tisztításhoz nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias módszert szeretnénk alkalmazni. Számunkra az ioncserés eljárás elérhető, ezen belül a kationcseréhez rendelkezünk megfelelő kolonnával. A CueR izoelektromos pontja 5,72, ezért a kromatográfias elválasztás 3,0-as pH-n tervezzük. A többlépéses tisztításhoz elsőként FastFlow kolonnát fogunk alkalmazni. Ez egy szefaróz töltetű kolonna, melyet az irodalom kifejezetten első lépésként javasol. Nagy mennyiségű minta gyors, viszonylag durva elválasztását teszi lehetővé. Ennek a használata során optimalizáljuk a körülményeket, mint például a pufferek, elúciós oldat ionerőssége, minta felvitele és elúciója, esetleg az alkalmazott pH. A mintákat ezután egy sokkal finomabb elválasztásra lehetőséget adó Source kolonnát fogunk használni. A Source töltete poliszitirén/divinil-benzén gyöngyök, megfelelő ionos szubsztituensekkel.

5. Kísérleti eredmények és tárgyalásuk

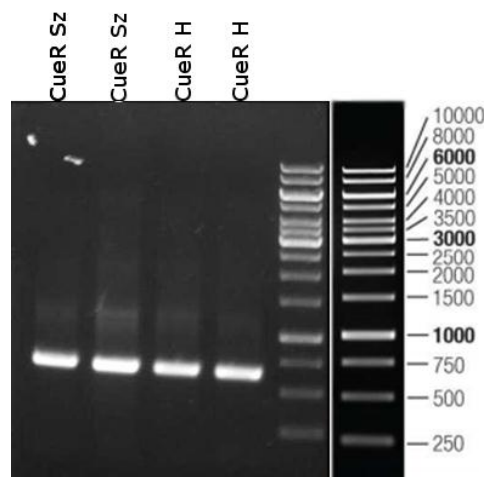
5.1. A CueR gén

Mint azt már a fentiekben megfogalmaztam céljaink között szerepelt az *E. coli* CueR fehérje, illetve annak célzott mutánsainak előállítása. A CueR fehérjét kódoló génszakaszt [14] egy pET-24a nevű plazmidban kaptuk meg Thomas V. O'Halloran professzor kutatócsoportjától (Department of Chemistry, Northwestern University, Evanston, Illinois, USA). Ez a vektor kanamycin antibiotikum rezisztenciát hordoz (4. ábra).



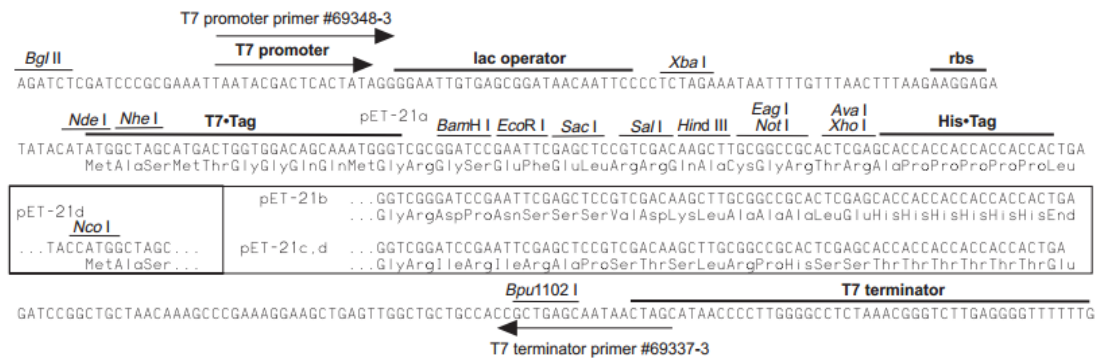
4. ábra: A pET-24a és a pET-21a vektorok sematikus térképe [Novagen]

A laboratóriumunkban alkalmazott eljárások ampicillin antibiotikum alapúak. A munkánkhoz szükséges eljárások optimalizálása az új antibiotikumra hosszadalmas feladat lett volna, így azt az utat választottuk, hogy a megfelelő génszakaszt kihasítjuk ebből a vektorból, és átklónozzuk pET-21a vektorba, mely már az ampicillin rezisztenciát eredményező gént tartalmazza (4. ábra). Az átklónozás első lépéseként pET-24a-CueR DNS-ről egy PCR-ben a T7-es primereket (a szekvenciákat később, a 12. ábrán tüntettük fel) felhasználva egy, a CueR gént is tartalmazó DNS szakaszt sokszorozítottunk. A PCR sikerességét gélelektroforézissel ellenőriztük: a gélen a várt 600 bázispár (bp) méretű DNS szakaszt láttuk (5. ábra).



5. ábra: A pET-24a-CueR DNS-ről készített PCR ellenőrzése agaróz-gélelektroforézissel

A sokszorosított fragmenseket és a pET-21a vektort restriktációs enzimekkel hasítottuk, a ragadós végek kialakítása céljából. Két különböző enzim alkalmazásával kiküszöbölhetjük, hogy az inzert DNS fordítva épüljön be a vektorba a ligálás során.



pET-21a-d(+) cloning/expression region

6. ábra: A pET-21a vektor klónozó régiójának szekvenciája a restriktációs hasítási helyek megjelölésével [Novagen]

A klónozó helyek vizsgálata alapján (a pET-24a és a pET-21a (6. ábra) klónozó régióiban a restriktációs helyek hasonló elrendeződést mutatnak) két enzimet választottunk: az NdeI-et és a BamHI-et, melyeknek a hasítási helyei a következők:

NdeI hasítási helye:



BamHI hasítási helye:



Az NdeI enzim hasítási helye tartalmazza a fehérjekifejezés indításához szükséges ATG kódot is. A két enzim együttes alkalmazásához két Fermentas-puffer is megfelelőnek tűnt, ezek a „Tango” és a „Piros” pufferek. A „Piros” puffer esetében a BamHI hibákat véthet. Ezért pufferként a mindkét enzim számára megfelelő Tango (Fermentas) puffert választottuk. Az NdeI enzimről azonban tudni kell, hogy a hasítás hatékonysága általában kisebb, mint a BamHI, így az NdeI enzimmal történő hasítást egy éjszakán át végeztük, és a BamHI enzimet késleltetve adtuk hozzá:

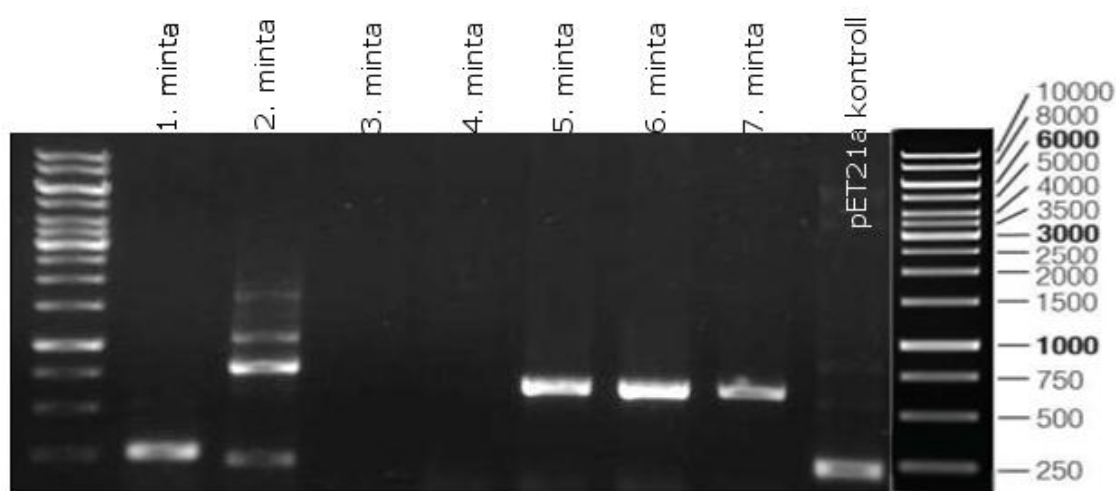
- 5 µl NdeI puffer – Tango puffer
- 2 µl NdeI enzim
- 41 µl steril víz
- 10-15 másodperc vortex
- inkubálás 37 °C-on egy éjszakán át.

Másnap a BamHI enzimmal történő hasítást végeztük el, de ezzel csak egy órán át inkubáltuk az elegyet:

- 2 µl BamHI enzim
- inkubálás 37 °C-on egy óráig

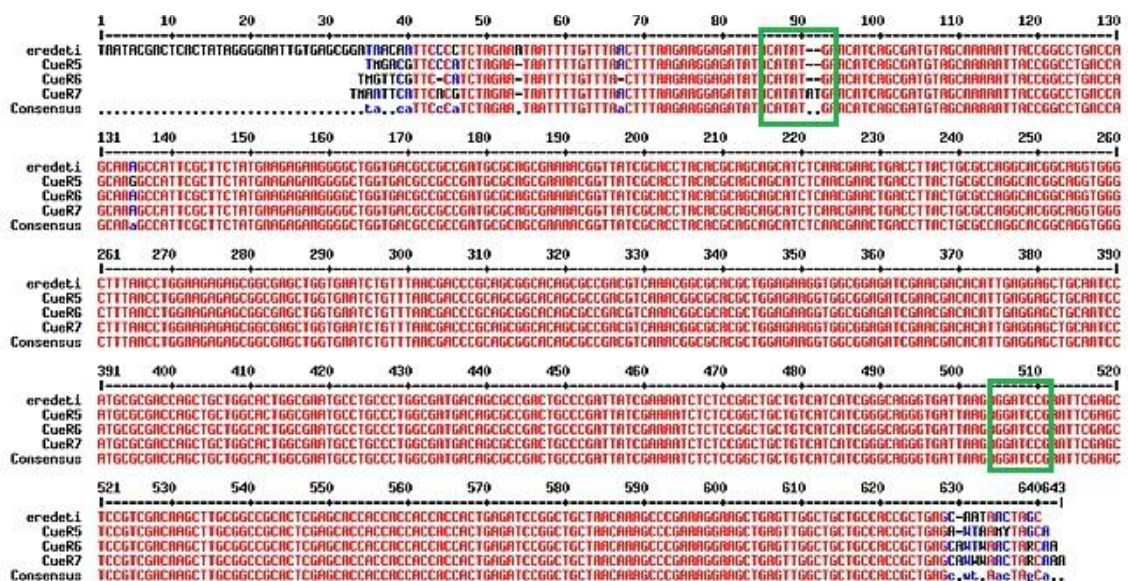
A hasítás után a mintákat fenol-kloroform eleggyel extraháltuk a fehérjék eltávolítása céljából, majd etanol segítségével kicsaptuk a DNS-t, szárítottuk, és feloldás után agaróz gélelektroforézist végeztünk. A megfelelő méretű (416 bp) DNS-t tartalmazó géldarabot kivágtuk, majd a Toyobo cég mágneses kittjével tisztítottuk a gyártó leírása alapján.

A ligálás során keletkezett plazmidokat DH10B sejtekbe transzformáltuk. A sejteket ezek után ampicillin-tartalmú táptalajokra (LB(Amp⁺)) kentük ki. Csak azok a baktériumok maradtak így életben, amelyek a plazmid DNS-t, azaz a sikeresen ligált pET-21a-CueR vektort tartalmazták. „Colony” PCR-rel ellenőriztük, hogy a fragmens beépült-e a vektorba. Abban az esetben, ha nem, a T7-es primerek segítségével egy 250 bp-os DNS szakasz, ha igen, úgy egy 600 bp-os szakasz sokszorozódik. Hét mintából háromnál láttuk a 600 bp-os szakaszt (7. ábra), így ezekkel dolgoztunk tovább.



7. ábra: A „colony” PCR eredményének ellenőrzése gélelektroforézissel.

Az átklónozás során a DNS könnyen mutálódhat, emiatt nagyon fontos a DNS szekvencia pontos meghatározása, hogy a későbbi munka során biztosan a jó fehérje fejeződjön ki. Ezért a továbbiakban elsőként ehhez készítettünk mintát. A folyamat során a bízható eredményt mutató baktériumokat 5 ml LB (Luria-Bertani-féle) tápoldatban tovább szaporítottuk, majd a lecentrifugált baktériumsejtekből kinyertük a sokszorozódott plazmid DNS-t egy Quiagen DNS tisztító kitta segítségével a gyártó leírása alapján. Ezután a plazmidról T7-es primerek segítségével PCR terméket sokszoroztunk, amit tisztítás és spektrofotometriás koncentráció-meghatározás után a szegedi Baygen intézetbe küldtünk el vizsgálat céljából. A szekvenálásból kiderült, hogy az elküldött minták egyike, a CueR6 (8. ábra) a várt szekvenciával azonos, míg a másik kettő gén, a CueR5 és CueR7, mutálódott (8. ábra). A CueR5 esetén egy pontmutáció jött létre, mely nem változtatta meg a fehérje aminosav szekvenciáját. A CueR7-ben a kezdő metionint kódoló ATG bázishármas módosult ATATG szekvenciára, s mivel ez az első aminosavnál jelentkezett, itt nem tolódik el a DNS olvasási keret (a bázishármasok alapján leolvasható aminosav szekvencia), azaz erről a plazmidról is a várt fehérje termelődik. A későbbiekben a hibátlan CueR6 mintával dolgoztunk tovább.



8. ábra: A szekvenálási reakciók eredménye, összehasonlítva a natív CueR várt szekvenciájával. Kékkel kiemelték az eltéréseket, zöld kerettel pedig az NdeI és BamHI restikciós enzimek hasítási helyeit jeleztük.

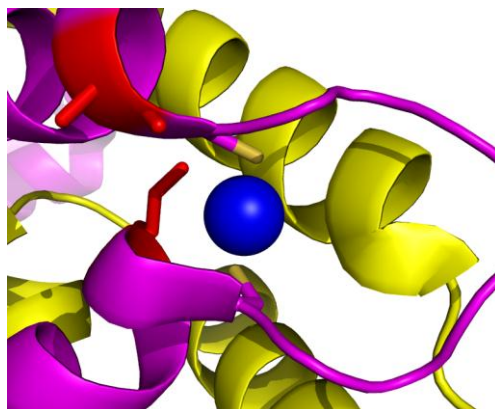
5.2. Mutációk kialakítása a CueR génben

A CueR fehérje mutánsainak előállításához szintén a rekombináns DNS technológia eszközeit használtuk fel. A módosítás célja az volt, hogy a fémionok koordinációját, illetve ezen folyamatok során bekövetkező szerkezeti változásokat követni tudjuk. A koordinatív kötést kialakító ciszteinekhez közeli aminosavak cseréje triptofánra alkalmasnak tűnt erre a feladatra. A triptofán aromás csoportot tartalmazó oldallánca ugyanis fluoreszcencia mérésére ad lehetőséget.

atgaacatcagc gatgtagcaaaaattaccggcctgaccagcaaaagccattcgctttcta
M N I S D V A K I T G L T S K A I R F Y
tgaagagaaggggctgggtgacgccgccgatgcgcagcgaaaacggttatcgcacctaca
E E K G L V T P P M R S E N G Y R T Y
cgcagcagcatctcaacgaactgaccttactgcgccaggcacggcaggtgggcttttaac
T Q Q H L N E L T L L R Q A R Q V G F N
ctggaagagagcggcgagctgggtgaatctgttttaacgaccgcagcggcacagcgccga
L E E S G E L V N L F N D P Q R H S A D
cgtcaaacggcgcacgctggagaaggtggcggagatcgaacgacacattgaggagctgc
V K R R T L E K V A E I E R H I E E L
aatccatgcgcgaccagctgctggcactggcgaatgcctgacctggcgatgacagcgcc
Q S M R D Q L L A L A N A C P G D D S A
gactgcccgaattatcgaaaatctctccggctgctgtcatcatcgggcaggggtga
D C P I I E N L S G C C H H R A G Stop

9. ábra: A CueR fehérje aminosav szekvenciája és az azt kódoló DNS szekvencia

A 9. ábrán a fémkötő hurkot alkotó aminosavak zöld kiemelést kaptak. Az átalakításhoz elsőként a CueR fehérjében lévő fémkötő hurok szerkezetét vizsgáltuk meg (10. ábra). A kristályszerkezet [PDB kód: 1Q05, 11] alapján a legcélravezetőbbnek az alanin és az izoleucin (9. és 10. ábrán piros kiemeléssel) módosítása tűnt. Mindkét aminosav apoláris oldalláncú, így várhatóan a lecserélésük nem változtatja meg jelentősen a fémion koordináció jellemzőit, és a triptofán eléggé közel kerül a fémkötő helyhez, így a fluoreszcencia megváltozása révén követhetjük a kölcsönhatást. Ezenfelül ez a két aminosav térben elég közel van egymáshoz, ami későbbiekben tervezett fluoreszcencia rezonancia-transzfer (FRET) mérésekhez is előnyt jelenthet kettős mutáció esetén.



10. ábra: A CueR fehérjében lévő fémkötő hurok (ciklámen) kristályszerkezete réz(I)ion (kék gömb) jelenlétében. Pirossal a módosítandó aminosavakat jelöltük. [PDB kód: 1Q05, 11]

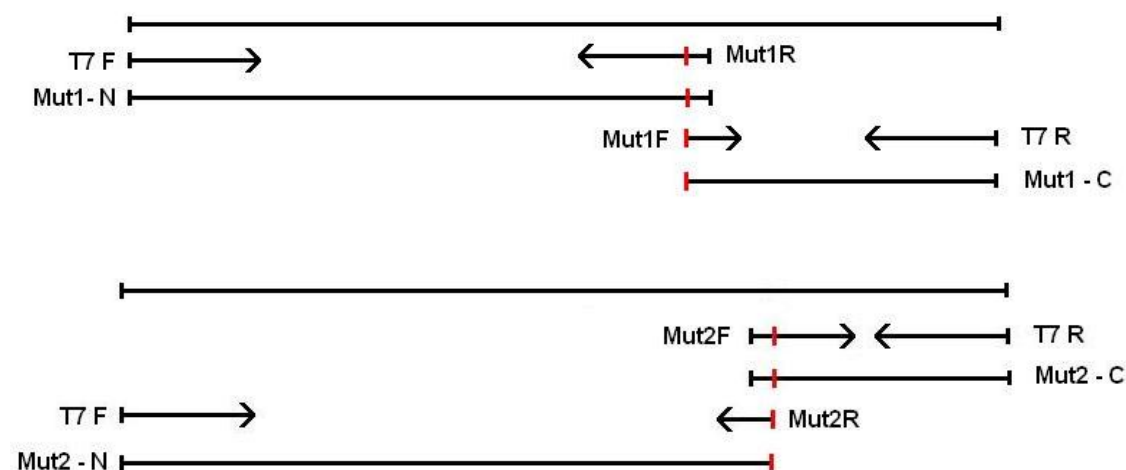
A mutáns fehérjék előállításához az azokat kódoló DNS-ek szekvenciáit kellett módosítani. A tervezett módosításokat a DNS, illetve a fehérje-szekvenciában az 11. ábra mutatja.

```
atgaacatcagcgatgtagcaaaaattaccggcctgaccagcaaagccattcgcttcta
M N I S D V A K I T G L T S K A I R F Y
tgaagagaaggggctggtgacgccgccgatgcgagcgaaaacggttatcgcacctaca
E E K G L V T P P M R S E N G Y R T Y
cgcagcagcatctcaacgaactgaccttactgcccaggcacggcaggtgggctttaac
T Q Q H L N E L T L L R Q A R Q V G F N
ctggaagagagcggcgagctggtgaatctgtttaacgacccgcagcggcacagcgccga
L E E S G E L V N L F N D P Q R H S A D
cgtcaaacggcgcacgctggagaaggtggcggagatcgaacgacacattgaggagctgc
V K R R T L E K V A E I E R H I E E L
```

aatccatgcgcgaccagctgctggcactggcgaat**tggt**gcccctggcgatgacagcgcc
 Q S M R D Q L L A L A N **W** C P G D D S A
 gactgccc**g****tggt**atcgaaaatctctccggctgctgtcatcatcgggcaggggtga
 D C P **W** I E N L S G C C H H R A G Stop

11. ábra: A CueR fehérje aminosav-szekvenciája és az azt kódoló DNS-szekvencia a tervezett módosításokkal.

A DNS módosításához PCR-t használtunk. Elsőként az egy mutációt tartalmazó DNS szakaszokat állítottuk elő. A mutációkat két lépésben valósítottuk meg (12-13. ábra). Az első lépésben mindkét mutáció esetében kialakítottunk két olyan (Mutx-N, ill. Mutx-C – az elnevezések a kódolt fehérjerészletnek felelnek meg, x = 1 vagy 2) fragmenst melyek már tartalmazták a kívánt módosítást (12. ábra), és majd a következő PCR-ben egymással is összetapadhattak (13. ábra).



A felhasznált primerek szekvenciái:

Mut1F: 5'-tggtgcccctggcgatgacag-3'

Mut1R: 5'-catcgccagggcaccaattcgccagtgccagc-3'

Mut2F: 5'-ccgactgcccgtggatcgaaaatctctccggct-3'

Mut2R: 5'-ccacgggcagtcggcg-3'

T7F: 5'-taatacgactcactataggg-3'

T7R: 5'-gctagttattgctcagcgg-3'

12. ábra: Az egyszeres mutációk kialakítása céljából végzett első PCR-ekben használt primerek szekvenciái és a reakciók vázlatos rajza. A Mut1F és -R primerekkel (F, ill. R a „forward”, illetve „reverz” jelölések rövidítései) az A/W, míg a Mut2F és -R primerekkel az I/W mutációt alakítottuk ki a megfelelő Mutx-N, ill. Mutx-C (x = 1 vagy 2) fragmensekben.

A PCR elegyet a következő módon állítottuk össze:

Komponensek	Mut1-N	Mut1-C	Mut2-N	Mut2-C
10×PCR puffer, Taq	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
dNTPk	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
MgCl ₂	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Steril víz	32 µl	32 µl	32 µl	32 µl
Primer T7F	2 µl		2 µl	
Primer T7R		2 µl		2 µl
Primer Mut1F		2 µl		
Primer Mut1R	2 µl			
Primer Mut2F				2 µl
Primer Mut2R			2 µl	
Templát DNS: CueR	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Taq-DNS polimeráz	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Végtérfogat	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

A PCR során az alábbi programot állítottuk be:

(Első lépés a kezdeti denaturáció: 94 °C, 2 perc)

I. Denaturálás: 94 °C, 15 másodperc

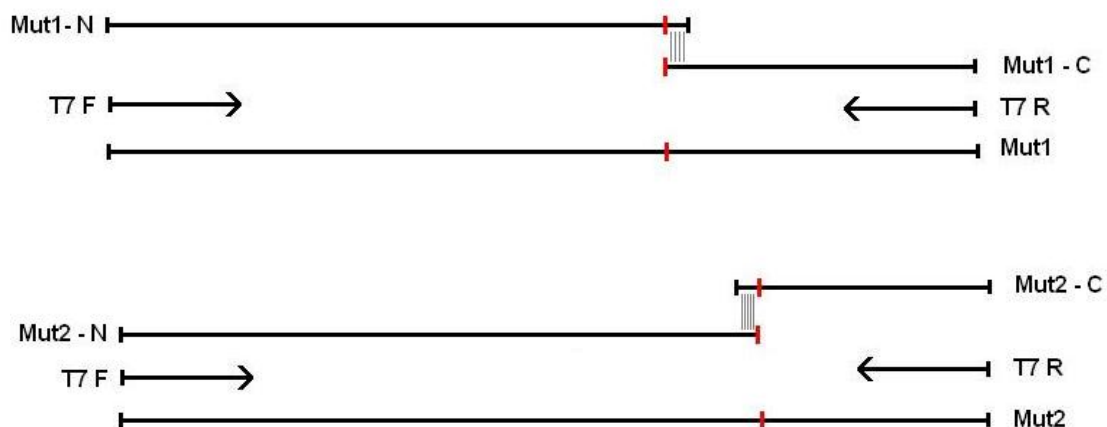
II. Hibridizálás: 53 °C, 1 perc

III. Polimerizáció: 72 °C, 1,5 perc

30 ciklus

(Az utolsó meghosszabbítást követően: 68 °C, 4 perc és ezután lehűtés 10 °C-ra.)

A PCR sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Az elektroforézis után a mutációkat tartalmazó MutxN és MutxC DNS szakaszokat méret szerint azonosítottuk, majd kivágtuk a gélből és tisztítottuk. A következő PCR-ben elsőként csak a megfelelő MutxN és MutxC párokat tettük a reakcióelegybe. A reakció során a két-két DNS szakaszt kapcsoltuk össze, és hosszabbítottuk meg, hogy kialakulhassanak a teljes hosszúságú Mut1, ill. Mut2 szakaszok, amelyek a T7-es primerek hozzáadása után templátként szolgálhattak a PCR során (13. ábra).



13. ábra: A Mut1, ill. Mut2 termékeket eredményező második PCR-ekben lejátszódó reakciók vázlatos rajza.

A PCR elegyet a következő módon állítottuk össze:

Komponensek	Mut1	Mut2
10×PCR puffer, Taq	5 µl	5 µl
dNTPk	5 µl	5 µl
MgCl ₂	2 µl	2 µl
Steril víz	29 µl	29 µl
Primer T7F *	2 µl	2 µl
Primer T7R *	2 µl	2 µl
Templát Mut1-C –GP	2 µl	
Templát Mut1-N –GP	2 µl	
Templát Mut2-C –GP		2 µl
Templát Mut2-N –GP		2 µl
Taq DNS polimeráz	1 µl	1 µl
Végtérfogat	50 µl	50 µl

1. PCR program:

- 94 °C-on denaturáció, 2 perc
- I: 94 °C, 20 másodperc
- II. 53 °C, 0,5 perc
- III. 72 °C, 1,5 perc
- 5 ciklus
- végül 72 °C, 4 perc, majd lehűtés 10 °C-ra

2. PCR program:

- 94 °C-on denaturáció, 2 perc
- I: 94 °C, 15 másodperc

- II. 54 °C, 0,5 perc
- III. 72 °C, 2 perc
- 30 ciklus
- végül 72 °C, 4 perc, majd lehűtés 10 °C-ra

A termékek képződését gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk. A sikeres reakciókban képződött megfelelő méretű DNS szakaszokat a PCR elegyből kitisztítottuk.

```

taatacgaactcactataggggaattgtgagcggataacaattcccctctagaaataatt
ttgtttaactttaagaaggagatatacatatgaacatcagcgaatgtagcaaaaattacc
ggcctgaccagcaaagccattcgcttctatgaagagaaggggctggtgacgccgccgat
gcgcagcgaacggttatcgcacctacacgcagcagcatctcaacgaactgaccttac
tgccgagggcagcggcaggtgggctttaacctggaagagagcggcgagctggtgaatctg
ttaacgacccgcagcggcacagcggcagcgtcaaacggcgacgctggagaaggtggc
ggagatcgaacgacacattgaggagctgcaatccatgcgcgaccagctgctggcactgg
cgaatgccctggcgatgacagcggcactgcccgaattatcgaaaatctctccggc
tgctgtcatcatcgggcagggtgatgaaggatccgaattcgagctccgtcgacaagc
ttgcggccgcactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaagcc
cgaaaggaagctgagttggctgctgccaacgctgagcaataactagc

```

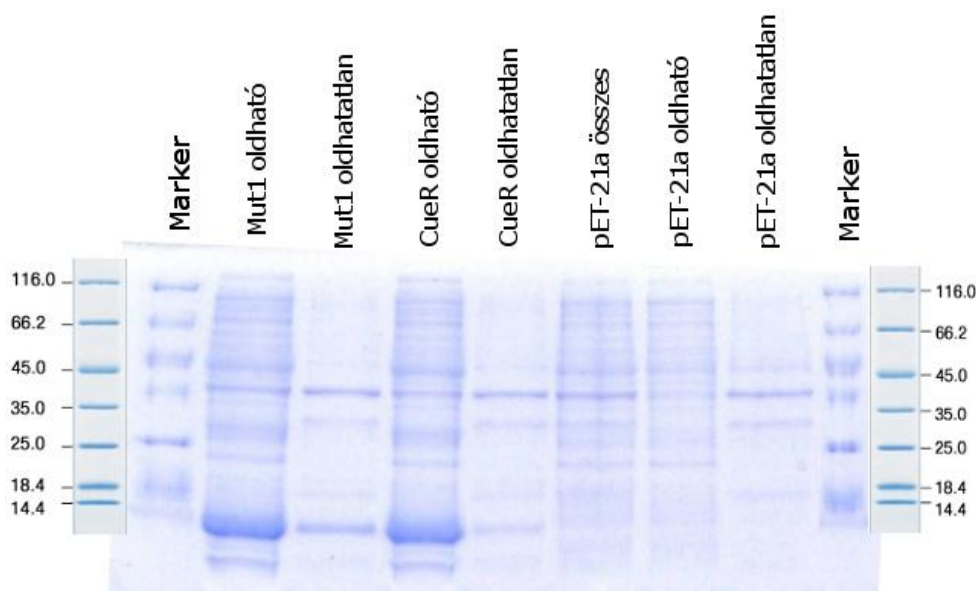
14. ábra: A T7-es primerek által sokszorosított DNS szakaszok szekvenciája (hosszuk 637 bázispár)

A DNS-t a tisztítás után a CueR génnél leírtak alapján NdeI és BamHI restriktációs endonukleázokkal hasítottuk, majd az előbbieken használt enzimekkel hasított pET-21a vektorba ligáltuk. A ligált, fragmenst tartalmazó plazmidot a következő lépésben kompetens sejtekbe juttattuk. A transzformálás után a baktériumokat táptalajt tartalmazó lemezre kikenve, 37 °C-on inkubálva másnapra baktériumtelepek nőttek. Azt, hogy a vektor tartalmazza-e a beépíteni kívánt fragmensünket colony PCR-rel ellenőriztük. A megfelelő hosszúságú (637 bp) PCR termék megjelenését gélelektroforézissel ellenőriztük. A sokszorosított szakaszt szekvenáltattuk. A szekvenálás eredménye azt mutatta, hogy a mutációkat sikerült megvalósítanunk.

A kétszeres mutáció kialakítása során a fent leírtaknak megfelelően járunk el, de templátként az egy mutációt már tartalmazó DNS mintából indulunk ki. Ezt a reakciót a közeljövőben tervezzük megvalósítani.

5.3. Fehérjék szintézise baktériumok segítségével

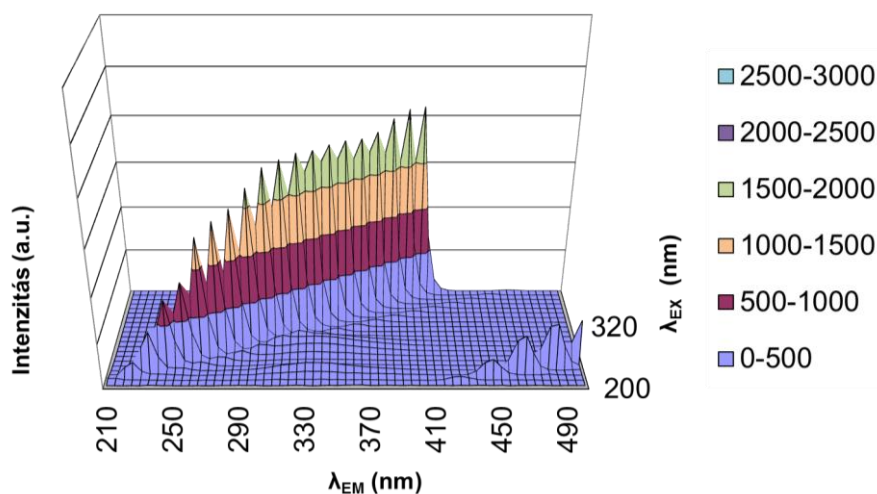
A sikeres átklónozás és módosítás után a plazmidokat (pET-21a-CueR, pET-21a-Mut1, pET-21a-Mut2), BL21 sejtekbe transzformáltuk úgy, hogy 3 µl plazmidot adtunk 30 µl baktériumszuszpenzióhoz. A transzformálás után a baktériumokat kikentük ampicillint tartalmazó táptalajokra, egy éjszakán át inkubáltuk 37 °C-on. A fehérjék kifejezéséhez a baktériumtelepeket 5 ml ampicillint tartalmazó tápoldatba oltottuk át, majd 37 °C-on inkubáltuk $OD_{600} \sim 0,6$ optikai sűrűség értékig. A megfelelően felszaporodott kultúrát IPTG hozzáadásával indukáltuk változó körülmények között. Az indukálás után a sejteket a kísérleti részben leírtaknak megfelelően feldolgoztuk, majd az összes fehérjét, valamint az oldható és vízben oldhatatlan frakciókat Tricin-SDS-PAGE-t alkalmazva vizsgáltuk. Az irodalomban megadott 37 °C-on 2 órán át tartó inkubáció során [14,15] a célfehérjék nagy része az oldhatatlan frakcióban került. Ezért a továbbiakban az indukálás után 20 °C-on egy éjszakán át tartó inkubálást alkalmaztunk. Az SDS-gélkép alapján (15. ábra) a fehérje kifejezése sikeres volt: az oldható fázisban viszonylag intenzív sáv látható a kis molekulaméretűek tartományában, ami a negatív összehasonlítóként felvitt pET-21a-t tartalmazó baktériumokból nyert fehérjék között nem figyelhető meg.



15. ábra: A pET-21a-Mut1, pET-21a-CueR és pET-21a plazmidokat tartalmazó baktériumtenyészetekből nyert fehérjék SDS-gélképe.

5.4. A fémion-kötés tanulmányozása fluorimetriás módszerrel

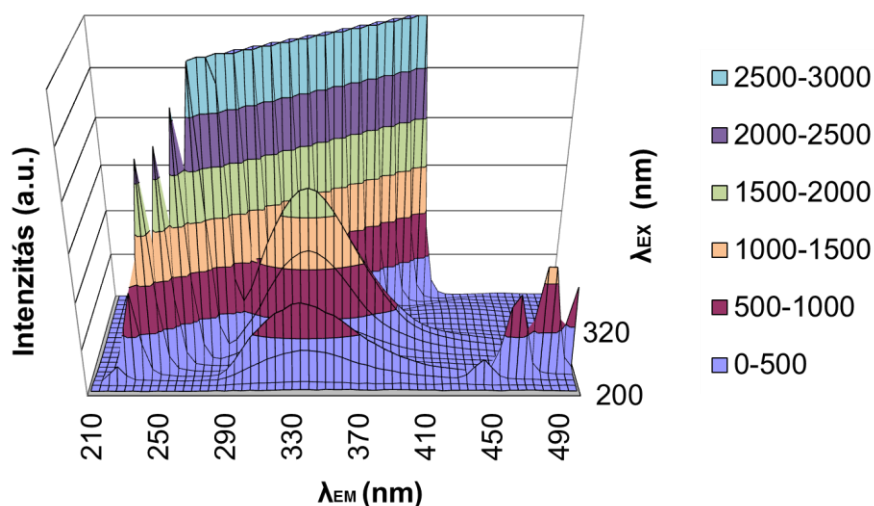
Mivel a fehérjék tisztítása hosszadalmas folyamat, ill. az SDS gélek alapján elmondható, hogy a sejtekben a túltermeltetett fehérjék vannak a legnagyobb koncentrációban jelen, így előzetes kísérleteket végeztünk arra nézve, hogy fluorimetriás mérések során látható-e különbség a CueR fehérje, illetve a mutánsok viselkedése között, valamint, hogy történik-e változás fémionok jelenlétében. A fentiekből kiindulva a mért jel jelentős részét várhatóan a túltermeltetett fehérjék okozzák. A sejtfeltárás során a fehérjét 300 μ l PBS pufferben oldottuk, a mérésekhez ezekből az oldatokból 50 μ l-t vettünk ki, és szintén PBS-oldattal hígítottunk 1,5 ml-re. A PBS-oldat nem mutatott jelentős fluoreszcenciát (16. ábra), jele a 0-500 intenzitás-tartományba esik. (Ezen, és a további 3D ábrákon is a $\lambda_{EX} = \lambda_{EM}$ értékeknél mért nagy intenzitások a gerjesztési fény szóródásából adódnak, vagyis a gerjesztő fény kivédhetetlenül bejut a detektorba, így annak a jelét láthatjuk.)



16. ábra: A PBS oldat 3D fluorimetriás mérésének szintvonalas ábrázolása (λ_{EX} 200 nm $\rightarrow$ 400 nm, λ_{EM} 200 nm $\rightarrow$ 400 nm).

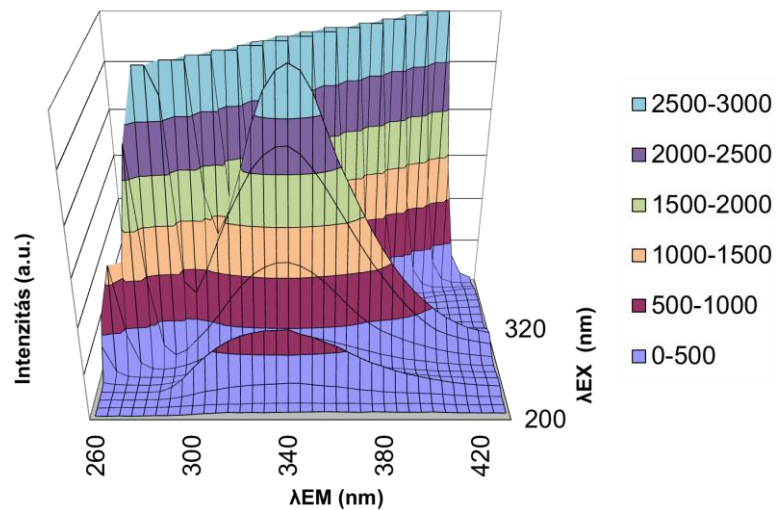
A fehérjekifejezés során azonban nem csak a kívánt fehérjék termelődnek a sejtekben, hanem a pET-21a vektor valamint a baktérium saját DNS-e által kódolt többi fehérje is. Hogy ezek fluoreszcenciáját megvizsgáljuk, megmértük a sejtek vízzoldható fehérjéinek frakcióját IPTG hozzáadása nélkül is (17. ábra). Az fluoreszcencia intenzitás maximumát 290 nm-en történő gerjesztés mellett 340 nm-en mértük, ami az 1500-2000 intervallumban található.

A célfehérje termelésének indukálása a sejtekben azok saját fehérjéinek csökkent szintű termelését eredményezi. Indukálás nélkül tehát több saját fehérje képződik ugyanakkora térfogatú baktériumtenyészetben. A CueR és mutánsai esetében tehát a mátrixban várhatóan kevesebb van a baktérium fehérjéiből, mint az IPTG nélküli mintában, azaz feltételezhető, hogy az imént tárgyalt háttér-fluoreszcencia is valamivel kisebb lesz.

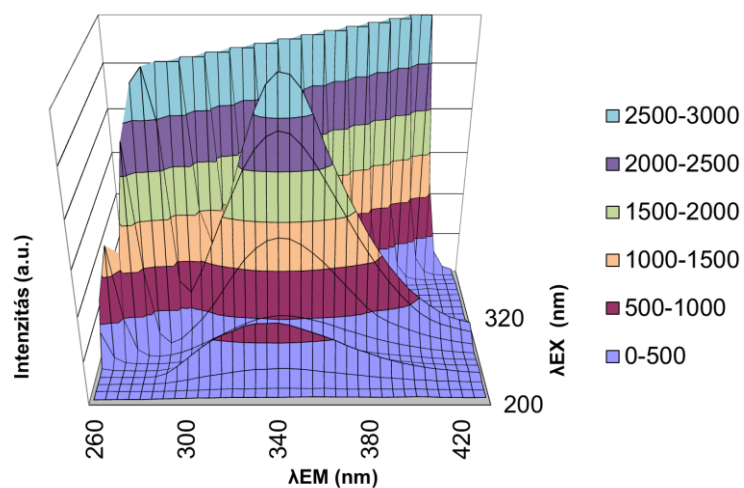


17. ábra: Az pET-21a vektor jelenlétében indukálás nélkül termelődött vízdoldható fehérjék fluoreszcenciája 3D szintvonalas ábrázolásban (λ_{EX} 200 nm $\rightarrow$ 400 nm, λ_{EM} 200 nm $\rightarrow$ 400 nm).

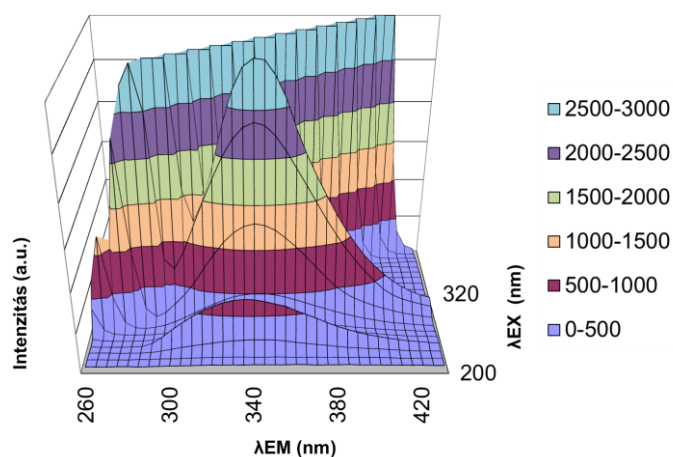
Mindhárom fehérjében (CueR, Mut1, Mut2) található 3 db tirozin és a mutánsokban ezeken felül 1-1 triptofán is. Az irodalmi adatok szerint a tirozin 280nm-en, a triptofán 295nm-en gerjeszthető, viszonylag kis különbség van a kettő között. [16]



18. ábra: A CueR fehérje fluoreszcenciája 3D szintvonalas ábrázolásban (λ_{EX} 200 nm $\rightarrow$ 400 nm, λ_{EM} 200 nm $\rightarrow$ 400 nm).



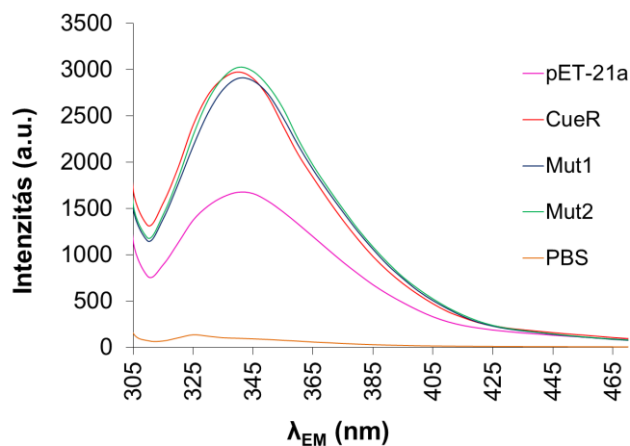
19. ábra: A Mut1 fehérje fluoreszcenciája 3D szintvonalas ábrázolásban (λ_{EX} 200 nm $\rightarrow$ 400 nm, λ_{EM} 200 nm $\rightarrow$ 400nm)



20. ábra: A Mut2 fehérje fluoreszcenciája 3D szintvonalas ábrázolásban (λ_{EX} 200 nm $\rightarrow$ 400 nm, λ_{EM} 200 nm $\rightarrow$ 400 nm)

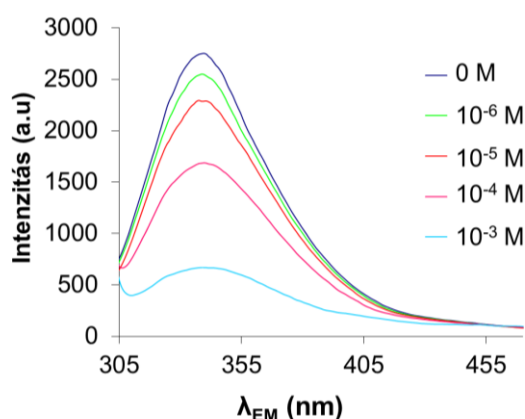
A célfehérjék koncentrációja az SDS PAGE alapján hasonlóknak tűnik, és a 16-18. ábrákon bemutatott 3D fluoreszcenciás képek között sincs jelentős különbség. Emiatt azt mondhatjuk, hogy a 3 tirozin intenzív jelét a mutánsokban jelenlevő egy triptofán nem módosítja lényegesen. A célfehérjéket is tartalmazó minták fluoreszcenciáját összehasonlítva a nem indukált sejtenyészetből származó mintával (21. ábra) elmondható, hogy a mért jel egyértelműen a túltermeltetett fehérjékhez köthető. A CueR, Mut1, Mut2 fehérjék fluoreszcenciája a legnagyobb, és egymáshoz hasonló értéket mutatnak. A nagyobb koncentrációban lévő pET-21 fehérjék intenzitása viszont feleakkora, a PBS jele elhanyagolhatóan kicsi.

A továbbiakban a fémionok jelenlétében már csak 290 nm hullámhosszú gerjesztő fénnel végeztünk méréseket, mert mindhárom fehérjemintát vizsgálva itt mutatkozott maximális intenzitás az emisszióban.

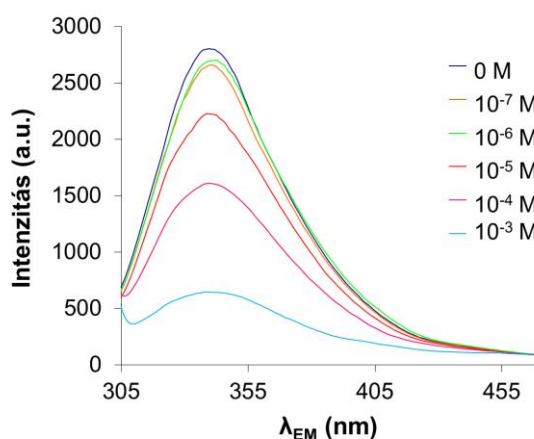


21. ábra: A kiválasztott 290 nm hullámhosszúságú fénnel gerjesztett fehérje- és PBS-oldatok fluoreszcenciája.

Azért, hogy az egy- és kétvegyértékű fémionok koordinációjának a fluoreszcenciára gyakorolt hatását is megvizsgáljuk Ag^{I} - és Cd^{II} -ionok oldataival titráltuk meg a fehérjét tartalmazó mintákat oly módon, hogy a fémionok végső koncentrációja a $c = 10^{-7} \text{ M}$ és 10^{-3} M közötti tartományban nagyságrendenként növekedjen, és az oldatok hígulása elhanyagolható legyen.

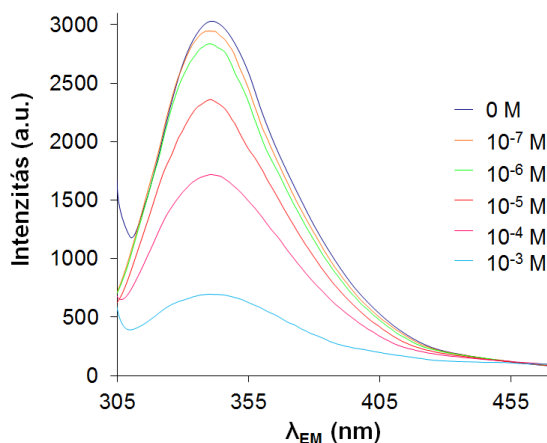


22. ábra: A fluoreszcencia változása a CueR fehérje Ag^{I} -ionokkal történő titrálása során.



23. ábra: A fluoreszcencia változása a Mut1 fehérje Ag^{I} -ionokkal történő titrálása során.

A fémionok hozzáadásának hatására a fluoreszcencia intenzitása fokozatosan csökken. A kisebb fémion koncentrációknál (zöld, narancs) a mért intenzitás csökkenése nem nagy, azaz nem olyan egyenletesen változó, mint a CueR esetében.

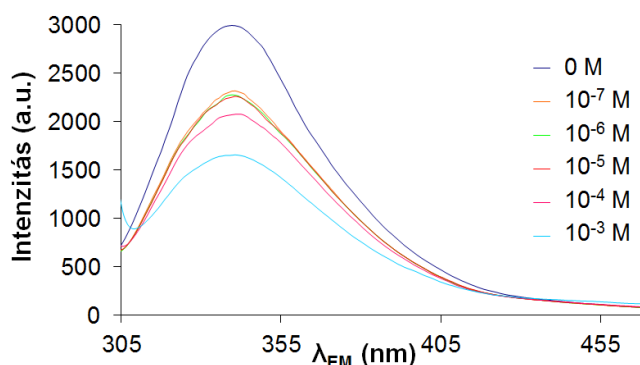


24. ábra: A fluoreszcencia változása a Mut2 fehérje Ag^{I} -ionokkal történő titrálása során.

A fémionok hozzáadására a mért fluoreszcens intenzitás a legtöbb esetben csökkent. Ennek sokféle oka lehet. A csökkenést kioltásnak (quenching) nevezzük. Kioltó molekulák között szerepelhetnek pl. az oxigén, a halogének vagy elektronhiányos molekulák, ionok. A fehérjékben háromféle aminosav gerjeszthető: a tirozin ($\lambda_{\text{EX}} = 280 \text{ nm}$), a triptofán ($\lambda_{\text{EX}} = 295 \text{ nm}$) és a fenilalanin ($\lambda_{\text{EX}} = 258 \text{ nm}$). A triptofán fluoreszcens intenzitása nagyon érzékeny a lokális környezetében végbemenő változásokra. Az emissziós spektrumban változás figyelhető meg, ha a konformáció módosul, ha oldószercsere játszódik le, vagy ha szubsztrát (ligandum, komplex) kötődik meg az aminosav közelében. [16] A 22-24. ábrán bemutatott változások arra utalnak, hogy az Ag^{I} -ionok koordinációja következtében mind a CueR, mind a Mut1 és Mut2 fehérjék konformációja megváltozik, mely a fluorofór csoportok fluoreszcenciájának csökkenését, illetve nagy koncentrációknál annak kioltását eredményezi. A sorozatok közötti hasonlóság részben igazolhatja, hogy a fémion-koordináció mindhárom esetben bekövetkezik, azaz a beépített triptofán aminosavak nem változtatják meg lényegesen a CueR viselkedését Ag^{I} -ionokkal szemben. Az Ag^{I} -koncentráció függvényébe mért változások a három tirozin fluoreszcenciájára gyakorolt hatásként értelmezhetők, ugyanakkor meglepő, hogy az 1-1 triptofán jelenléte a két mutánsban ilyen kis mértékű

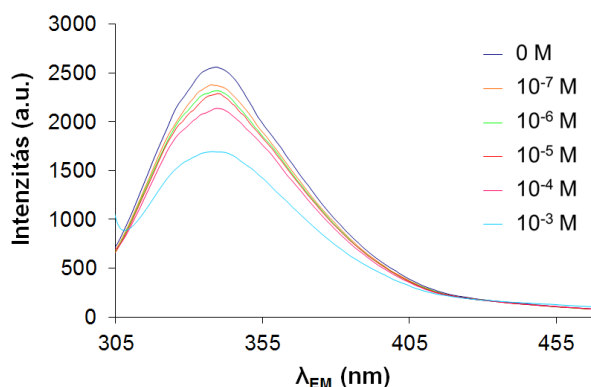
különbséget okoz csak a mérhető fluoreszcencia-intenzitásban a módosíthatlan fehérjéhez képest. Reményeink szerint a két triptofánt tartalmazó fehérjék fluoreszcencia spektroszkópiás vizsgálata lehetővé teszi majd a kötőhely egyértelmű igazolását is.

A fentiekben leírt titrálásokat elvégeztük Cd^{II} -ionokkal is, szintén 290 nm gerjesztő hullámhosszat alkalmazva.

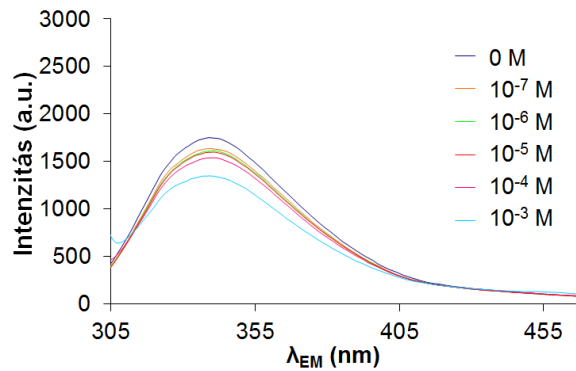


25. ábra: A fluoreszcencia változása a Mut2 fehérje Cd^{II} -ionokkal történő titrálása során.

Jól látható, hogy a Mut2 fehérjénél már nagyon kis koncentrációban jelenlévő Cd^{II} ionok hatására viszonylag nagy intenzitás-csökkenés jelentkezik, ami szintén valamilyen változásra utal a triptofán közelében (25. ábra). Ilyen jelentős változás ugyanis a CueR, illetve az IPTG hozzáadása nélkül képződő fehérjék oldataiban nem mutatkozik (26-27. ábra).



26. ábra: A fluoreszcencia változása a CueR fehérje Cd^{II} -ionokkal történő titrálása során.



27. ábra: A fluoreszcencia változása a pET-21a és a baktérium fehérjéinek Cd^{II} -ionokkal történő titrálása során.

Eddigi méréseink alapján nehéz eldönteni, hogy milyen szerkezeti/affinitásbeli különbség mutatkozik a lineáris koordinációs geometriával jellemezhető $\text{Ag}(\text{I})$ -, illetve a tetraéderes geometriát kedvelő $\text{Cd}(\text{II})$ -ionok CueR és mutáns fehérjéivel alkotott komplexeiben. Ennek eldöntésére, és az adatok kvantitatív kezeléséhez mindenképpen tisztított fehérjék kellenek. Az eddig eredményeink azonban biztatóak abból a szempontból, hogy a vizsgált fehérjék természetes fluorofor csoportjai, valamint a kialakított mutációk segítségével fluoreszcenciás módszerrel a fémionok komplexálódását igen kis koncentrációk alkalmazása mellett is követni tudjuk.

6. Összefoglalás

Munkánk során a CueR fehérje előállítását tűztük ki célul, illetve annak fémionokkal kialakított kölcsönhatásainak vizsgálatát. A fémionok koordinációja során bekövetkező szerkezetváltozások jobb kimutathatóságáért, mérhetőségért módosításokat terveztünk és hoztunk létre a fehérje szekvenciájában. A fémion-koordináció hatását vizsgálendő fluoreszcencia spektroszkópiai méréseket terveztünk.

A fehérjéket baktériumok segítségével szintetizáltuk, ehhez a rekombináns DNS technológia eszközeit használtuk fel. A CueR fehérjét kódoló génszakaszt először átklónoztuk pET-21a vektorba, a későbbi munka egyszerűsítésének kedvéért. Az átklónozás sikerességéről a beépített DNS-szakasz szekvenálásával győződünk meg. A CueR fehérje módosításához az azt kódoló DNS szekvenciájában hoztunk létre mutációkat. Ezeket a CueR fehérje krsitálszerkezetének ismeretében úgy terveztük meg, hogy a fémion-kötőhely közelében apoláros oldallánccal rendelkező aminosavakat cseréltünk triptofánra, mint fluoreszcens markerre. A szekvenálás eredményei alapján itt is megbizonyosodtunk arról, hogy az elvégzett műveletek sikeresen zajlottak le. A vektorokat *E. coli* baktériumokba jutattuk be, és a megfelelő körülményeket megkeresve, kifejeztük a fehérjéket. A CueR fehérje kis mérete miatt a kimutatásához egy, a hagyományostól eltérő, Tricin-SDS-PAGE protokolt alkalmaztunk.

A még meg nem tisztított fehérjékkel fluorimetriás méréseket végeztünk. A vizsgálni kívánt fehérjék mellett jelenlévő zavaró hatásokat is figyelembe vettük. Egyelőre kvantitatív megállapításokat nem tehettünk, de a fluorimetriás mérések alapján a fémionok koordinációja által okozott szerkezet-változásokat a későbbiekben követni tudjuk. A fehérje tisztításának optimalizálása után (lásd: 4.8 fejezet), már lehetőségünk lesz annak koncentrációját meghatározni, és mennyiségi értékeléseket végezni.

7. Felhasznált szakirodalom

- [1] Zhen M.; Faith E. Jacobsen; David P. Giedroc: Metal Transporters and Metal Sensors: How Coordination Chemistry Controls Bacterial Metal Homeostasis; *Chem Rev.*; 2009; 109: 4644–4681
- [2] Peng R. Chen; Chuan He: Selective recognition of metal ions by metalloregulatory proteins; *Curr. Opin. Chem. Biol.*; 2008; 12: 214–221
- [3.] David P. Giedroc: Metal Sensor Proteins: Uncovering Allosteric Linkage Relationships (Elucidating Structural and Thermodynamic Determinants of Allostery in Metalloregulatory Proteins: Practical Considerations; 5th International IMBG Meeting, on Metal Homeostasis, September 17-21, 2012, Autrans, France
- [4] Anne O Summers: Damage control: regulating defenses against toxic metals and metalloids; *Curr. Opin. Microbiol.*; 2009; 12: 138–144
- [5] Kevin J. Waldron; Nigel J. Robinson: How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal?; *Nature Rev.*; 2009; 6: 25–35
- [6] Nigel L. Brown; Jivko V. Stoyanov; Stephen P. Kidd; Jon L. Hobman: The MerR family of transcriptional regulators; *FEMS Microbiol. Rev.*; 2003; 27: 145–163
- [7] Alfredo J. Guerra; David P. Giedroc: Metal site occupancy and allosteric switching in bacterial metal sensor proteins; *Arch. Biochem. Biophys.*; 2012; 519: 210–222
- [8] David P. Giedroc; Alphonse I. Arunkumara: Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches; *Dalton Trans.*; 2007; 3107–3120
- [9] Mario A. Pennella; David P. Giedroc: Structural Determinants of Metal Selectivity in Prokaryotic Metal-responsive Transcriptional Regulators; *Biometals*; 2005; 18: 413–428
- [10] Susana K. Checa; Fernando C. Soncini: Bacterial gold sensing and resistance; *Biometals*; 2011; 24: 419–427
- [11] Anita Changela; Kui Chen; Yi Xue; Jackie Holschen; Caryn E. Outten; Thomas V. O'Halloran; Alfonso Mondrago: Molecular Basis of Metal-Ion Selectivity and Zeptomolar Sensitivity by CueR; *Science*; 2003; 301: 1383–1387
- [12] Hermes Reyes-Caballero; Gregory C. Campanello; David P. Giedroc: Metalloregulatory proteins: Metal selectivity and allosteric switching; *Biophys. Chem.*; 2011; 156: 103–114

- [13]** Hermann Schagger: Tricine–SDS–PAGE; *Nature Protocols*; 2006; 1: 16–22
- [14]** F. Wayne Outten, Caryn E. Outten, Jeremy Hale, Thomas V. O’Halloran: Transcriptional Activation of an Escherichia coli Copper Efflux Regulon by the Chromosomal MerR Homologue, CueR; *J. Biol. Chem.*; 2000; 275: 31024–31029
- [15]** Caryn E. Outten, F. Wayne Outten, Thomas V. O’Halloran: DNA Distortion Mechanism for Transcriptional Activation by ZntR, a Zn(II)-responsive MerR Homologue in Escherichia coli; *J. Biol. Chem.*; 1999; 274: 37517–37524
- [16]** Joseph R. Lakowicz: Principles of Fluorescence Spectroscopy; Plenum Press; New York; 1983

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Kiss Tamás tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette számomra, hogy Tudományos Diákköri dolgozatomat a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken készítsem el.

Köszönetet mondok Dr. Gyurcsik Béla és Dr. Jancsó Attila, egyetemi adjunktus témavezetőimnek, akik mindvégig sokat segítettek a kísérleti munkában.

Köszönet illeti továbbá Szunyogh Dániel PhD hallgatót, aki kísérleteim során segített és hasznos tanácsokkal látott el.