



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

TDK dolgozat

**Allosztérikus kölcsönhatások jelentősége a HNH
motívum szerkezetének kialakításában**

KÉSZÍTETTE:

Schilli Gabriella Krisztina

II. Vegyész MSc szak

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Gyurcsik Béla egyetemi docens

Dr. Körtvélyesi Tamás egyetemi docens

Németh Eszter PhD hallgató

Szeged

2014

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	3
2.	Irodalmi összefoglaló	4
2.1	Nukleáz enzimek	4
2.2	Génterápia céljaira tervezett cinkujj-nukleázok	4
2.3	A colicin E7 fehérje nukleáz doménje	6
2.3.1	A colicin E7 bakteriális toxin	6
2.3.2	Az NColE7 szerkezete	7
2.3.3	Az NColE7 immunitásfehérjével alkotott komplexe.....	8
2.3.4	Az NColE7 kölcsönhatása a szubsztrát DNS molekulával.....	9
2.3.5	Feltételezett reakciómechanizmus cinkion jelenlétében.....	9
2.4	A Zn^{2+} -ion szerepe az NColE7 nukleázban	11
2.5	Irodalomban közölt kristályszerkezetek.....	11
2.6	Előzmények kutatócsoportunk vizsgálatai alapján	13
2.6.1	Allosztérikus szabályozás kialakításának lehetősége az NColE7-ben	13
2.6.2	Mutációkat tartalmazó gének előállítása	13
2.6.3	A TKW mutáns vizsgálata.....	14
3.	Célkitűzés	15
4.	Kísérleti módszerek.....	16
4.1	Agaróz gélelektroforézis	16
4.2	Poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)	17
4.3	A fehérjék kifejezése baktériumsejtekben.....	17
4.4	Fehérjék tisztítása HPLC-vel	18

4.5	Izotermális mikrokolorimetriás titrálások	19
4.5.1	Mintaelőkészítés ITC mérésekhez	20
4.5.2	Az ITC mérések kivitelezése	21
4.5.3	Az ITC mérési eredmények kiértékelése	22
4.6	CD spektroszkópia	22
5.	Számítási módszerek	23
5.1	PDB fájlok előkészítése	23
5.2	Molekuladinamika.....	23
5.2.1	A Gromacs programcsomag molekuladinamikai algoritmus.....	23
6.	Eredmények és tárgyalásuk.....	26
6.1	A fehérjék előállítása.....	26
6.2	A fehérjék tisztítása.....	27
6.3	A mutáns fehérjék oldatszerkezeti tulajdonságai	30
6.4	A mutáns fehérjék Zn^{2+} -kötő tulajdonságai	30
6.5	A W mutáns szerkezetének stabilizálása az Im7 fehérjével.....	33
6.6	Szerkezeti változások tanulmányozása molekuladinamikával.....	35
7.	Összefoglalás.....	37
8.	Hivatkozások.....	38

1. Bevezetés

Géntechnológia számára nagy kihívást jelent a DNS molekula kiválasztott szekvenciánál történő hasítása. Ezért kutatócsoportunk célja egy biztonságos szabályozási mechanizmussal rendelkező mesterséges cinkujj nukleáz előállítása. A cinkiont tartalmazó Colicin E7 nukleáz doménje (NColE7) alapját képezheti egy ilyen mesterséges nukleáznak, ugyanis a C- és N-terminális részek megfelelő közel kell elhelyezkedjenek ahhoz, hogy az enzim aktív legyen.

Eddigi munkánk során három aminosavat alaninra cseréltük (454T, 458K és a 464W) az NColE7 N-terminális részén elhelyezkedő hurokban, hogy vizsgáljuk ennek a szakasznak a szerepét az aktivitáshoz szükséges szerkezet kialakításában. A CD spektroszkópiai vizsgálatok és izotermális mikroklorimetriás titrálások (ITC) mérések során azt tapasztaltuk, hogy a C-terminális részen elhelyezkedő HNH motívum szerkezete jelentősen változik a mutációk hatására, ezzel megszüntetve a preorganizált fémkötőhelyet.

TDK munkám elsődleges célja annak meghatározása, hogy mely oldalláncok hiánya okozhat ilyen jelentős szerkezeti változásokat. A treonin és lizin hidrofíli kölcsönhatásokat alakíthat ki, míg a triptofán egy hidrofób zsebben helyezkedik el. Ezek alapján sejtekben kifejeztem a TK TW és W mutánsokat (Mutációk jelölései: T: T454A, K: K458A, W: W464A) majd HPLC-vel tisztítottam a fehérjéket. Ahhoz hogy meghatározhassuk, mely aminosavak okozzák ezeket a jelentős szerkezeti változásokat, vizsgáltuk ITC-vel a cinkion affinitásukat és CD spektroszkópiával a fehérjék oldatszerkezetét.

Az immunitásfehérje az NColE7 szubsztrátkötő régiójával alakít ki komplex kölcsönhatásokat ezzel megszüntetve a nukleáz aktivitását. CD spektroszkópiával és ITC mérésekkel vizsgáltuk az immunitásfehérje szerkezetre gyakorolt hatását. A három mutáció hatására bekövetkező szerkezeti változások vizsgálatára molekuladinamikai számításokat végeztem.

2. Irodalmi összefoglaló

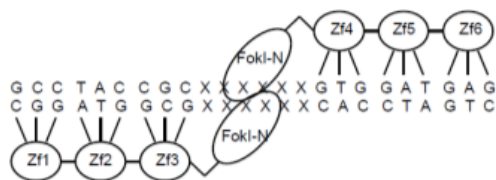
2.1 Nukleáz enzimek

A nukleázok olyan enzimek, amelyek a DNS-ben és/vagy az RNS-ben a nukleotid egységek közötti foszfodiészter kötések hidrolitikus hasítását katalizálják. Az exonukleázok a terminális, míg az endonukleázok a láncközi kötések hidrolizálják. Ismerünk nem-specifikus és specifikus nukleázokat is. Utóbbiak csak adott DNS-szekvencia hasítására képesek, ilyenek pl. a restriktációs endonukleázok. A nukleázok számos sejtfolyamatban vesznek részt, mint a DNS-javítás, replikáció, restrikció, rekombináció [1]. A katalízis mechanizmusa sokféle lehet, de a legtöbb esetben fémion szükséges hozzá. Leggyakrabban kétvegyértékű fémionok, pl. Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} vesznek részt. A fémion a következő feladatokat láthatja el:

- 1) aktiválhat egy vízmolekulát, amely így általános bázisként a hasadó foszfát nukleofil támadásáért felelős;
- 2) szerepet játszhat a szubsztrát megkötésében és annak elektrosztatikus aktiválásában;
- 3) Lewis savként stabilizálhatja az ötértékű negatívan töltött foszforán átmeneti állapotot;
- 4) a fémion által kötött vízmolekula általános savként viselkedve protonálhatja a távozó csoportot [2].

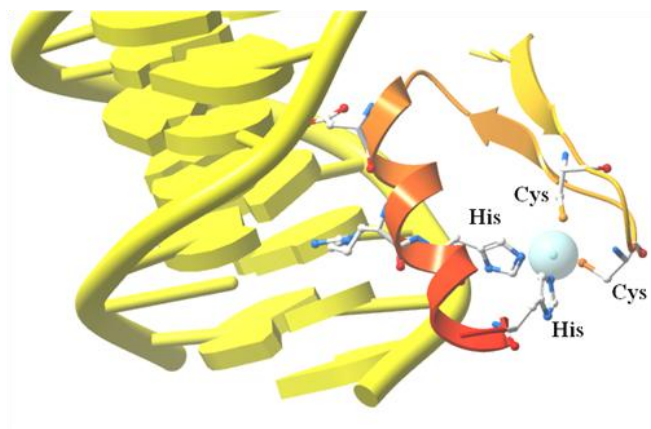
2.2 Génterápia céljaira tervezett cinkujj-nukleázok

A cinkujj-nukleázok olyan mesterséges fehérjék, melyek egy nem-specifikusan hasító nukleáz, és általában három – a DNS célszekvencia felismerésére tervezett – cinkujj doménből állnak. Egy ilyen fehérje specifikusan hasítja a DNS-t az általunk kiválasztott helyen. A sejtekben a DNS ilyen sérülése a javítómechanizmusok működését indukálja. Amennyiben a hasítás egy genetikai hiba közelében történt és megfelelő szekvenciájú DNS templát áll rendelkezésre, az ún. homológ rekombináció révén a hiba korrigálható. Többek között ilyen célra fejlesztették ki a FokI tartalmú cinkujj nukleázokat (2.1. ábra).



2.1. ábra. A DNS molekulához specifikusan kötődő cinkujjakkal összekapcsolt FokI nukleáz dimerként hasítja a DNS-t.

A cinkujjak olyan $\beta\beta\alpha$ fehérjedomének, melyek szerkezetét egy cinkion stabilizálja. Általános szekvenciájuk: (Tyr, Phe)-X-Cys- X_{2-4} -Cys- X_3 -Phe- X_5 -Leu- X_2 -His- X_{3-5} -His. A fémion a két-két megőrzött cisztein és hisztidin oldalláncához koordinálódik.



2.2. ábra. Egy cinkujj-motívum DNS molekulával kialakított komplexe. A specifikus DNS-kötést biztosító oldalláncok az α -hélixről irányulnak a DNS nukleobázisai felé (PDB kód: 1MEY, [3]).

Az α -hélix a DNS nagyárkában kötődik meg specifikusan. Egy cinkujj általában három egymás utáni nukleobázissal alakít ki kölcsönhatást. A DNS szekvenciát, amelyhez a fehérje kötődik, az α -hélix kezdetétől számított -1, 1, 2, 3, 5 és 6 helyzetben lévő hat aminosav határozza meg [4]. Ezen aminosavak változtatásával, valamint a cinkujj-motívumok sorbakapcsolásával tetszőleges DNS szekvenciához felismerésére alkalmas cinkujj-fehérje állítható elő.

A FokI egy restrikciós enzim, ami negatív szabályozás alatt áll. A specifikus DNS-kötő rész hiányában képes a DNS nem-specifikus hasítására, és ezt használják ki a cinkujj-nukleázokban.[5] 2.2. ábrán látható dimerként működő cinkujj nukleáz a DNS kettős szálát

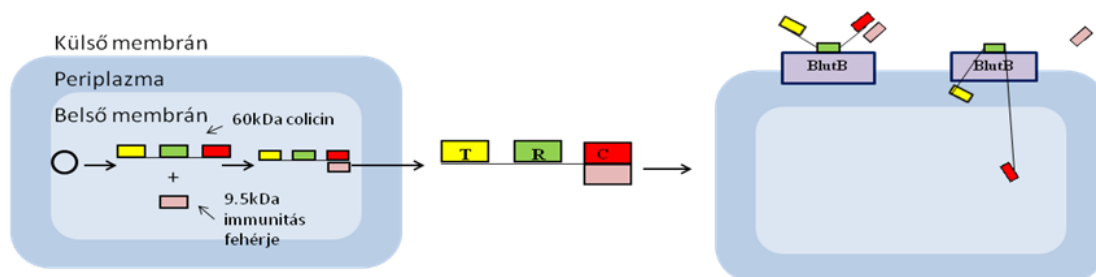
egyszerre hasítja el. Ez a fehérje azonban citotoxikus, aminek egyik oka lehet, hogy ha a sejtben a fehérje megsérül, nem-specifikus módon is megkötődhet a DNS-en. Amennyiben az aktivitását a sérülés okozta változások ellenére sem veszíti el, a kromoszomális DNS-t több, nem kívánt helyen is elhasíthatja. Feltételezzük, hogy ennél biztonságosabb mesterséges nukleáz állítható elő a FokI helyett egy módosított, allosztérikus szabályozás alatt működő colicin E7 nukleáz domén felhasználásával.

2.3 A colicin E7 fehérje nukleáz doménje

2.3.1 A colicin E7 bakteriális toxin

Az *Escherichia Coli* baktérium colicin fehérjét termel az idegen baktériumsejtekkel szembeni védekezés céljából. Ezek a fehérjék membránkötő, membrán transzlokációs és citotoxikus doménekből állnak [6]. Az egyes colicinek különböző módon fejtik ki citotoxikus hatásukat. Egyes típusaik DNáz vagy RNáz funkcióval rendelkeznek, mások ionofórok. A DNáz típusú colicinek közé a ColE2 [7], ColE7 [8], ColE8 [9], ColE9 [10] tartoznak. Ezek a sejtbe jutva nem-specifikus hasításokat végeznek a kromoszomális DNS-en. A gazdasejtek úgy védekeznek a nukleáz hatás ellen, hogy egyidejűleg egy ún. immunitásfehérjét is kifejeznek, amely gátolja a nukleáz működését. A különböző colicinek nukleáz doménjében a C-terminális rész szekvenciájának 80%-a megegyezik, míg az immunitásfehérjék szekvenciájának 50%-a azonos [11].

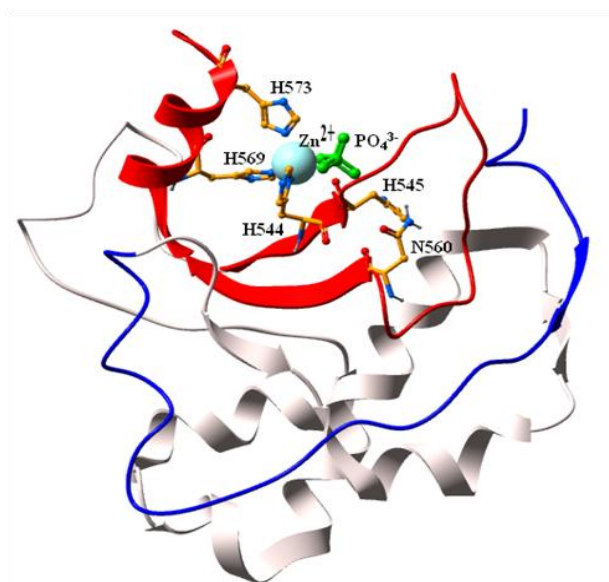
A colicin E7 nem-specifikus DNáz és RNáz aktivitással rendelkező fehérje [12]. A gazdasejtől kijutva az idegen baktériumsejt külső membránján lévő BtuB-receptoron kötődik meg, és a transzlokációs domén segítségével, egy proteáz által lehasítva, a nukleáz domén (NColE7) bejut a sejtbe (2.3. ábra.).



2.3. ábra. A colicin E7 működésének sematikus ábrája. Sárga szín a transzlokációs, zöld a receptorkötő, a piros a nukleáz domént jelöli [13]. A célsejtbe csak a nukleáz domén jut be.

2.3.2 Az NColE7 szerkezete

Az irodalomban található információk és kutatócsoportunk korábbi eredményei [14] alapján a colicin E7 nukleáz doménje (2.4. ábra) alkalmasnak tűnik egy biztonságos szabályozási mechanizmussal rendelkező mesterséges nukleáz kialakítására. A nukleáz domén C-terminális részén egy HNH-motívum található [11], amely az EXHHX₁₄NX₈HX₃H konszenzus szekvenciával, és két antiparalell β -redőből, valamint egy α -hélixből álló szerkezettel jellemezhető [2]. Fiziológiás körülmények között valószínűleg egy cinkion koordinálódik a fentiek közül három hisztidinhez (H573, H569, H544) torzult tetraédes szerkezetben [15] [16]. A fémion negyedik koordinációs helyét betöltheti egy vízmolekula, egy foszfát- vagy szulfátion, vagy a DNS hasadó foszfátja.



446 - KRNKPGKATGKGKPV
NNKWLNNAGKDLGSPVPD
RIANKLRDKEFKSFDDFRK
KFWEEVSKDPELSKQFSR
NNNDRMetKVGKAPKTRTQ
DVSGKRTSFELHHEKPISQ
NGGVYD**Met**DNISVVTPKR
HIDIHRGK – 577

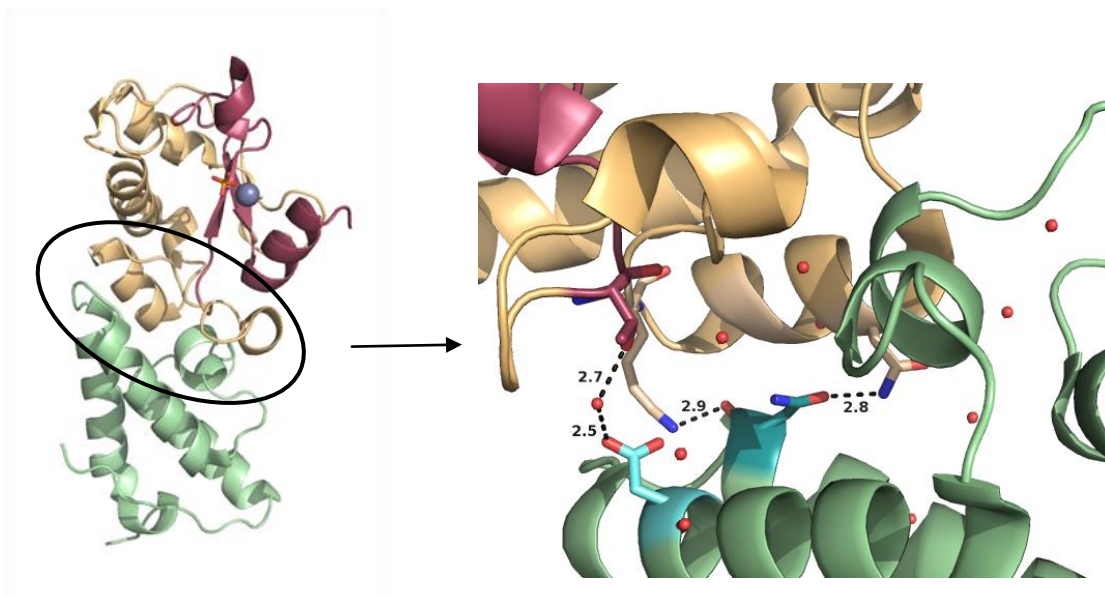
2.4. ábra. Az NColE7 szerkezete (PDB kód: 1M08, [11]) és aminosav-szekvenciája. Kékkel az N-terminális, míg piros színnel a C-terminális szakaszt jelöltük. A világoskék gömb a cinkiont és a zöld szín a foszfátcsoportot jelöli. Az aminosav-szekvencia számozása megegyezik az NColE7 számozásával

Az N-terminális részen lévő 25 aminosavból álló részlet második helyén egy arginin (R447) található, aminek az oldallánca az aktív központ irányába mutat. Az N-terminális négy aminosav (446K, 447R, 448N, 449K) eltávolítása a fehérje aktivitásának megszűnéséhez vezetett annak ellenére, hogy a HNH-motívum ettől távol, a C-terminális végen található. A

fehérje működéséhez tehát elengedhetetlenek az aminosav-szekvenciában távoli részek kölcsönhatásai. Ez a tulajdonság használható ki egy intramolekuláris allosztérikus aktiválás kialakítására.

2.3.3 Az NColE7 immunitásfehérjével alkotott komplexe

Az immunitásfehérje (Im7) az NColE7 szubsztrátkötő helyéhez kapcsolódik [17]. Az Im7 szerkezete stabilis, négy α -hélixből áll, amit 3 hurok köt össze. A NColE7/Im7 komplex kialakulásakor egyik fehérje szerkezete sem változik jelentősen. A kristályszerkezet képe a 2.5. ábrán látható.

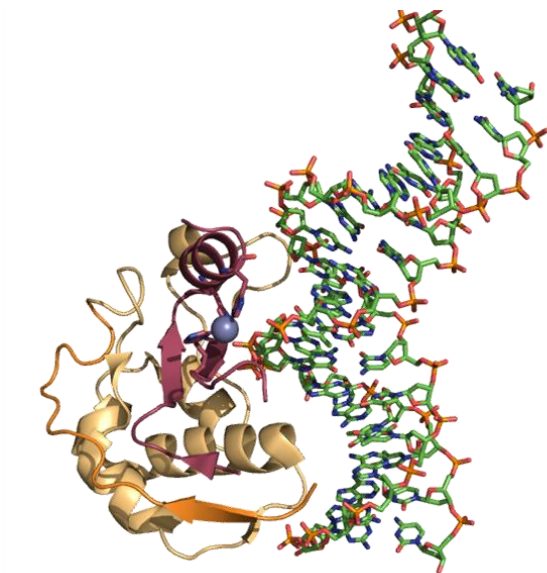


2.5. ábra. Az NColE7/Im7 komplex szerkezete (balra) és a kölcsönhatási felület részlete (jobbra, pdb kód:1MZ8 [2]). Zöld színnel az Im7, barnával az NColE7 fehérjét, míg lilával az NColE7 aktív központját jelöltem. A hidrogénkötéseket szaggatott vonal jelzi, a mellettük elhelyezkedő szám a kötések hosszát mutatja Å-ben. Piros gömbök a vízmolekulákat szemléltetik.

A két fehérje között nagy számú kölcsönhatás alakul ki: 16 közvetlen hidrogénkötés, 6 sóhíd és 11 vízmolekulák által közvetített hidrogénkötés. A két fehérje között lévő vízmolekulák közül 8 teljesen megközelíthetetlen az oldószer számára, így ezek is részt vehetnek a komplementer szerkezet kialakításában [11].

2.3.4 Az NColE7 kölcsönhatása a szubsztrát DNS molekulával

Az NColE7 nem-specifikus módon kötődik a DNS molekulához az α -hélix részek révén a nagyárokban, míg a HNH-motívum a DNS molekula kisárkába kerül (2.6. ábra) [12].

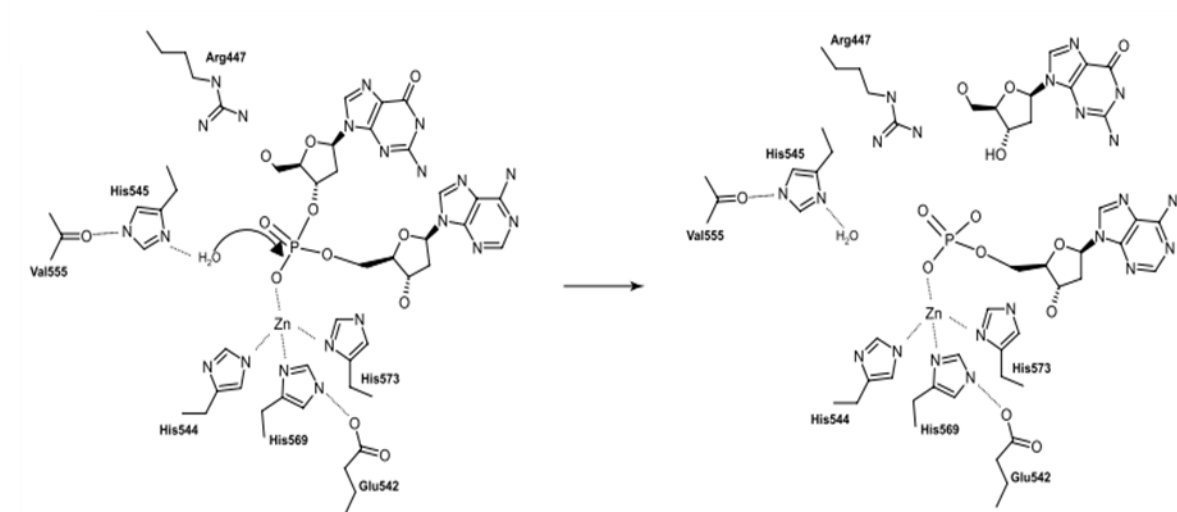


2.6. ábra. NColE7 DNS molekulával alkotott komplexe (PDB kód: 2IVH [18])

A DNS-NColE7 komplex kialakulása során a DNS elhajlik és a nagyárok kiszélesedik, azaz a fehérje a DNS konformációjának megváltozását okozza. Ez a szerkezeti változás elősegíti a DNS hasítást. NColE7 szerkezete nem változik jelentősen a komplex kialakulása során. Egy 8 bázispáros DNS és az NColE7 között 14 hidrogénkötés és három Van der Waals kölcsönhatás alakul ki. Ezek közül a legtöbb kölcsönhatás aminosav oldalláncok és a foszfátgerinc között jön létre. A NColE7 kevés kölcsönhatást alakít ki a DNS bázisaival, ami magyarázza a nem-specifikus hasítást [12]. Az irodalomban az NColE7 bázisspecifikusságának vizsgálata során kiderült, hogy kismértékű szekvencia-preferencia tapasztalható az NColE7 esetében. A hasítás legnagyobb valószínűséggel a 3'O oldalon (41,2%-ban) timin után történik meg [19]. Ennek oka az lehet, hogy a DNS könnyebben deformálható az A-T bázispárok mentén, mint a G-C pároknál.

2.3.5 Feltételezett reakciómechanizmus cinkion jelenlétében

Az NColE7 molekula hidrolitikusan hasítja a DNS foszfodiészter kötéseit. A feltételezett reakciómechanizmus a 2.7. ábrán látható [20].



2.7. ábra. Az NCoIE7 feltételezett működési mechanizmusa [20]

Első lépésben a H545 általános bázisként elősegíti egy vízmolekula deprotonálódását. Az így képződő hidroxidion nukleofil támadást indít a hasadó foszfodiészter-csoportra. A Zn^{2+} -ion ez utóbbi csoporthoz kötődve azt elektrosztatikusan aktiválja, valamint stabilizálja a reakció átmeneti állapotában létrejövő pentakovalens foszforvegyületet. A hidrolitikus reakciókban szükség van még egy általános savra, amely protont szolgáltat a távozó csoport 3'-oxigénjének. A Mg^{2+} -tartalmú nukleázoknál ezt a funkciót a hat koordinációs hellyel rendelkező fémionhoz kötődő vízmolekula látja el. Azonban ebben a fehérjében a Zn^{2+} -ion tetraéderes koordinációs szférával rendelkezik: három hisztidin és szubsztrát koordinálódik hozzá. Emiatt a mechanizmus ezen a ponton még bizonytalan. Több lehetőség is kínálkozik arra vonatkozóan, hogy mi látja el az általános sav szerepét. (i) A Zn^{2+} -ionhoz az ötödik koordinációs helyen [2] kötődhet egy vízmolekula [12]. (ii) Feltételezték egy protoncsatorna kialakulását az R538, E542 és H569 aminosavak részvételével a colicin E9 analógiájára [21]. (iii) Egy további lehetőség, hogy a HNH-motívum közelében megjelenő megőrződött R447 oldallánca szerepel protonszállító reaktánsként.

2.4 A Zn^{2+} -ion szerepe az NColE7 nukleázban

Az NColE7 aktív központjában természetes körülmények között Zn^{2+} -ion található [16], ami a DNS kötéshez nem, de a katalitikus aktivitás kifejtéséhez szükséges [22]. A fémkötőhely valószínűleg preorganizált, a fehérjén belüli kölcsönhatások stabilizálják a szerkezetét. Erre utal, hogy a fémkötő HNH motívum önmagában csak nagyon gyengén köti a Zn^{2+} -iont [23]. Az NColE7 DNS-sel alkotott komplexéből a Zn^{2+} -iont a kristályosítás során EDTA-hozzáadásával eltávolítva a fehérje szerkezete nem változott jelentősen. A három fémkötő hisztidin közül kettő megőrizte eredeti konformációját a Zn^{2+} -ion távollétében is. Mindössze a harmadik oldallánc orientációja változott meg [11].

Az katalitikus folyamat lejátékozásának feltétele a HNH nukleázokban egy kétvegyértékű fémion jelenléte az aktív központban [12], [22]. EDTA jelenlétében az aktivitás megszűnik. A Zn^{2+} -ion mellett Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} és Co^{2+} is elősegíthetik a katalitikus folyamatot, az eredmények azonban ellentmondásosak az irodalomban. A fenti fémionok közül a Zn^{2+} -ion kötődik legerősebben az NColE7 aktív központjában. Ugyanakkor az enzim Ni^{2+} -ion jelenlétében a legaktívabb, míg a Mn^{2+} -ionok csökkentik az aktivitást [16]. A Zn^{2+} és a Cu^{2+} -tartalmú enzim a legkevésbé aktív, és ezek az ionok csak a DNS molekula szuperhelikális formából nyílt-cirkuláris formába történő átalakulását segítik elő [22]. Mg^{2+} -ion jelenlétében a fehérje aktivitása a Mn^{2+} -NColE7 aktivitásához hasonló, annak ellenére, hogy a Mg^{2+} -ion *hard* jellege miatt feltehetőleg nem kötődik meg a hisztidin oldalláncok által kialakított aktív központban. Mg^{2+} [22] és Mn^{2+} -ionok [2] csak nagy feleslegben adagolva, a néhány mM koncentráció-tartományban növelték az NColE7 aktivitását. Ezek alapján azt feltételezték, hogy az NColE7 tartalmazhat egy második fémkötő helyet a Mg^{2+} -ion számára, amely csak DNS jelenlétében kötődik meg [2]. Közvetlen bizonyítékot azonban erre nézve nem mutattak be.

2.5 Irodalomban közölt kristályszerkezetek

A protein adatbank (Protein Data Bank - PDB) adatbázisban [25] eddig 13 kristályszerkezetet közöltek az NColE7 molekuláról (2.1. táblázat). Ezek legtöbbje mutációt

tartalmaz a C-terminális aktív központban, és az immunitásfehérjével vagy a DNS-el alakít ki komplexet.

2.1. táblázat. Irodalomban közölt NColE7 kristályszerkezetek [14]

PDB kód	NColE7	kation	anion	DNS	Im7	Inaktivitás oka
1M08 [17]	K446M	Zn ²⁺	PO ₄ ³⁻	-	-	-
1MZ8[2]	-	Zn ²⁺	PO ₄ ³⁻	-	+	-
1PT3[12]	-	-	-	8bp	-	Fémion hiány
1ZNS [16]	K443M/H545E	Zn ²⁺	-	12bp	-	mutáció
1ZNV[16]	K443M/H545E	Ni ²⁺	PO ₄ ³⁻	-	+	-
7CEI[11]	-	Zn ²⁺	-	-	+	-
2IVH[18]	H545Q	Zn ²⁺	-	18bp	-	mutáció
2JAZ[26]	N560D	Zn ²⁺	PO ₄ ³⁻	-	+	-
2JB0[26]	H573A	Zn ²⁺	-	-	+	-
2JBG[26]	N560A	Zn ²⁺	SO ₄ ²⁻	-	+	-
3GJN [27]	H545A	Zn ²⁺	-	-	mutáns	-
3GKL [27]	H545A	Zn ²⁺	-	-	mutáns	-
3FBD[28]	D493Q	-	-	18bp	-	Fémion hiány

*Az összes fehérjét immunitásfehérje jelenlétében fejezték ki. A 446-576 közötti aminosavak általános szekvenciája az itt felsorolt NColE7 krisztályszerkezetekben MLDKES a 7CEI kivételével, amelyben egy hexahisztidin tag (MRGSHHHHHGSES) kapcsolódik a 446-576-os szekvenciához.

DNS vagy immunitásfehérje nélkül csak egyetlen, NColE7 kristályszerkezet jelent meg az irodalomban, amelynek a PDB kódja 1M08 [17]. Ennek az N-terminális végen elhelyezkedő aminosav mutációjának nincs jelentős szerkezet befolyásoló hatása. A következő fejezetekben a releváns szerkezeteket részletesebben is tárgyaljuk. Ezek alapján részletes információt kapunk arról, hogy mi az egyes mutált oldalláncok szerkezete az NColE7/DNS/Zn²⁺ vagy NColE7/Im7/Zn²⁺ komplexekben, azonban nem kapunk információt arról, hogy ezek milyen hatással lennének a C-terminális rész szerkezetére a szabad fehérjében.

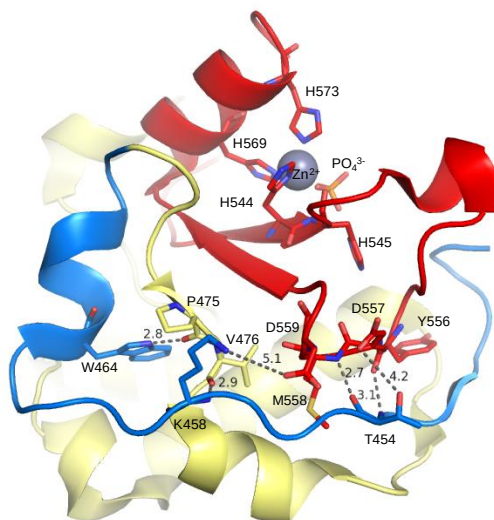
2.6 Előzmények kutatócsoportunk vizsgálatai alapján

2.6.1 Allosztérikus szabályozás kialakításának lehetősége az NColE7-ben

Kutatócsoportunk mutációanalízissel kimutatta, hogy az NColE7 C-terminális részén levő aktív központ, valamint az N-terminális részen lévő pozitív töltésű aminosavak (446-KR NK-449 szekvenciárészlet) együttes jelenléte elengedhetetlen a fehérje aktivitásához[14]. Ezek közül az argininnek (R447) fontos szerepet tulajdonítanak a hasadó foszfátcsoport megkötésében az erős elektrosztatikus kölcsönhatások révén [29]. Mivel azonban a fenti négy aminosav egy mozgékony hurok része, felmerül a kérdés, hogy milyen kölcsönhatások teszik lehetővé, hogy a C-terminális rész közelébe kerülhessenek.

2.6.2 Mutációkat tartalmazó gének előállítása

Előző TDK munkám során a tervezett pontmutációk helyének kiválasztása egyrészt az irodalomban közölt Röntgen-diffrakciós szerkezetek alapján feltételezhető kölcsönhatások (2.8. ábra), másrészt a tanszéken korábban elvégzett kvantumkémiai számítások alapján történt. Három aminosavat választottunk ki. A 454-es treonint, a 458-as lizint és a 464-es triptofánt. A kiválasztott aminosavak alaninra történő cseréjét különböző kombinációkban valósítottuk meg. Összesen hét fehérje génjét állítottunk elő: T, K, W, TK, TW, KW, TKW, ahol az elnevezésekben: T = T454A, K = K458A és W = W464A.

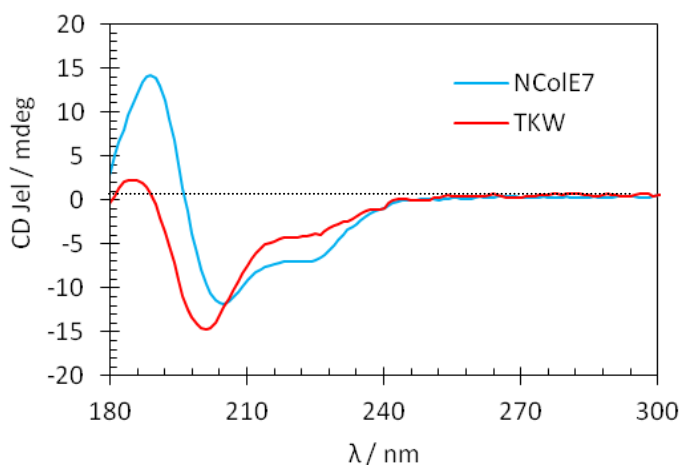


2.8. ábra. A mutáció-analízishez kiválasztott T454, K458 és W 464 aminosavak kölcsönhatásai a természetes NColE7 fehérjében

Az egyszeres mutációt tartalmazó fehérjék génjének előállítása során kiderült, hogy a mutációt tartalmazó fehérjék citotoxikusak. Mivel a gének klónozására felhasznált pGEX-6P-1 vektorról az *E.coli* DH10B sejtekben kismértékű fehérjekifejeződés történik, a nukleáz hatású enzim elpusztítja azokat. Ezért a géneket a továbbiakban az Im7 immunitásfehérje génjével együtt építettük be vektorba.

2.6.3 A TKW mutáns vizsgálata

Kutatócsoportunk elsőként a háromszoros mutációt tartalmazó (TKW) fehérjét tanulmányozta. Oldatbeli szerkezetét cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiával, Zn^{2+} -kötését pedig mikroklorimetriás titrálások segítségével. A TKW és az NColE7 szerkezete oldatban jelentősen eltér (2.9 ábra).



2.9. ábra. Az NColE7 (kék) és TKW (piros) CD spektruma.

A mikroklorimetriás (Isothermal Titration Calorimetry - ITC) mérések során a TKW esetében jelentős mértékben csökkent Zn^{2+} -affinitást tapasztaltunk az NColE7-hez képest. Ezek alapján azt mondhatjuk, hogy a mutációk hatására az NColE7 aktív központjának szerkezete is módosult. DNS hasítási vizsgálatok során a TKW csökkent aktivitást mutatott az NColE7-hez képest, azonban nem vesztette el teljesen a katalitikus hatását. CD spektroszkópiai vizsgálatok során kiderült, hogy az ekvimoláris TKW/DNS rendszer spektruma megegyezik az NColE7/DNS hasonló elegyének spektrumával. Ebből arra következtettünk, hogy a DNS stabilizálja a fehérje aktív konformációját.

3. Célkitűzés

Az NColE7 egy nem-specifikus DNS-hasító enzim, amelynek aktív központja egy HNH-motívum. Tanulmányozták a HNH motívumában lévő aminosav oldalláncok szerepét a katalitikus folyamatban, a fémkötésben és a funkcionális szerkezet kialakításában. Ezek azonban nem terjedtek ki az N-terminális hurokban található aminosavakra. Kutatócsoportunk eddigi eredményei alapján a következő kérdésekre kerestem válaszokat:

- Mely mutáció(k) okozzák a TKW mutáns meglepő tulajdonságait?
- Lehetséges-e, hogy az N-terminális szekvencia és a HNH-motívum közötti kölcsönhatások stabilizálnak egy preorganizált fémionkötő szerkezetet?
- Vissza lehet-e állítani az eredeti fehérjétől eltérő szerkezetű mutánsok működőképes feltekeredési mintázatát?

Ezek alapján a következőket tűztem ki célul:

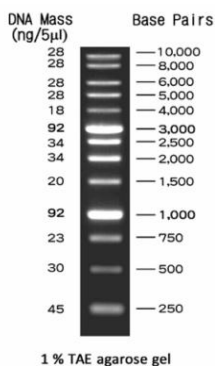
- TW, W és TK mutáns kifejezése és tisztítása kromatográfiás módszerekkel.
- A fehérjék szerkezetének CD spektroszkópiai vizsgálata Zn^{2+} -ion jelenlétében és anélkül.
- Az immunitásfehérje hatásának vizsgálata a mutációkat tartalmazó fehérjék szerkezetére CD spektroszkópiával és izotermális kalorimetriás titrálással.
- A mutánsok nukleáz aktivitásának vizsgálata.
- A szerkezeti változások tanulmányozása molekuladinamikai számításokkal.

4. Kísérleti módszerek

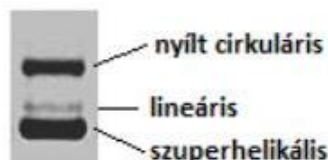
4.1 Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz gélelektroforézis DNS fragmensek tisztítására, hosszának és formájának (szuperhelikális, lineáris, nyílt cirkuláris) vizsgálatára szolgáló módszer. Elektromos térben a DNS molekula a negatív töltéseinek köszönhetően a pozitív pólus felé vándorol. A gél üregeiben az áramlás sebessége fordítottan arányos a DNS méretével. Az elválasztáshoz agaróz gélét használunk, amely egy agarobióz diszacharid egységekből felépülő poliszacharid. Meleg TAE (tris, ecetsav és EDTA-tartalmú) pufferoldatban feloldva, majd megfelelő formába öntve megszilárdul, és egy üreges gél alakul ki. Általában 1 g/100 ml koncentrációjú gél állítunk elő. Az agaróz koncentrációjának növelésével a gél üregeinek mérete csökken, ami lassítja a benne áramló DNS molekulákat. Így alkalmas koncentráció megválasztásával elérhető a vizsgálni kívánt DNS molekulák méret szerinti elválása. A gélben a DNS pl. fluoreszcens jelölő molekulával (etídium-bromid) tehető láthatóvá, melynek a kétszálú DNS molekulába interkalálódott formája UV fénnel gerjeszthető, és a látható fény tartományában emittál. A minta mellé felvitt ún. marker DNS különböző, ismert hosszúságú lineáris DNS molekulákat tartalmaz. A sávok helyét összevetve a marker sávjaival becsülhető a minta DNS mérete (4.1.a. ábra). A plazmid DNS különböző konformációjú formái eltérő sebességgel vándorolnak a gélben (4.b. ábra).

a.)



b.)



4.1. ábra. a) A DNS minták agaróz gélelektroforézis alapján történő méretbecsléséhez használt marker, és **b)** példa a DNS térszerkezetének hatására történő elkülönítésre.

4.2 Poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

Az SDS-PAGE (nátrium-dodecil-szulfátos poliakrilamid gélelektroforézis) a fehérjék méret-szerinti elválasztására alkalmas módszer. A nátrium-dodecil-szulfát (SDS), mint felületaktív anyag a fehérjemolekulát denaturálja (a nemkovalens kötések megszüntetése a natív szerkezet felbomlását idézi elő), és a polipeptidláncok felületét a méretükkel arányos mennyiségű negatív töltéssel körbevonja. Így a fehérjék egyenáramú elektromos feszültség hatására egységesen a pozitív pólus felé vándorolnak, aminek sebességét a molekula mérete szabja meg: a kisebb méretű fehérjék gyorsabban haladnak. A gél a következő komponensekből áll: akrilamid, bisz-akrilamid, nátrium-dodecil-szulfát, trisz(hidroximetil)-aminometán, HCl, ammónium-peroxo-diszulfát (APS) és N,N,N,N-tetrametil-etiléndiamin (TEMED). Az APS és a TEMED a vinil addíciós polimerizációs folyamatok megindításáért felelősek. A bisz-akrilamid és az akrilamid molekulák között keresztkötések jönnek létre, aminek fontos szerepe van a pórusszerkezet kialakulásában. A fehérjék megjelenítése festékekkel történhet. Különböző, de ismert méretű fehérjéket tartalmazó marker egyidejű futtatásával, a vizsgált fehérje hozzávetőleges molekulatömege meghatározható.

4.3 A fehérjék kifejezése baktériumsejtekben

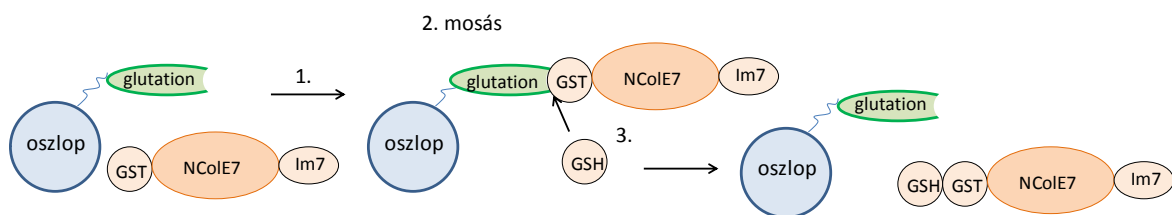
Az *E.Coli* BL21 (DE3) sejtek alkalmasak fehérje kifejezésére. Ezekbe a sejtekbe transzformálással juttatjuk be a vizsgálni kívánt fehérje génjét tartalmazó plazmid DNS-t. A baktériumokat előzőleg CaCl_2 -al kezeljük. Hő sokk hatására a sejtfal a cirkuláris DNS számára könnyen átjárhatóvá válik. A transzformált baktériumok antibiotikumot tartalmazó táptalajra kikenve szelektíven szaporíthatók. Az antibiotikum rezisztenciáért felelős gént a vektor tartalmazza, így csak azok a sejtek maradnak életben, melyekbe a vektro bejutott. Egy éjszakán át 37°C -on inkubálva a táptalajon baktériumtelepek nőnek.

Ezt követően egy telepről sejteket oltunk át ampicillin tartalmú LB-táptalajba, amit 25°C -on inkubálunk. Megfelelő számú baktériumsejt elérése után IPTG-vel (isopropil- β -D-tiogalaktopiranozid, végkoncentráció 0,1 mM) indukáljuk a fehérje termelést. A sejtek számát a 600 nm-en mért transzmittancia, - amely az OD_{600} -as értékkel jellemezhető - alapján becsüljük. Optimálisan $\sim \text{OD}_{600} = 0,6$ -nál indukálható a fehérjetermelés.

Az általunk használt pGEX-6P-1 vektor tartalmazza a lac operon szenkevenciáját, amelyhez a lac-represszor fehérje hozzákapcsolódva gátolja az mRNA átírást és ezzel a fehérje termelést. IPTG jelenlétében a lac-represszor leválik a plazmidról és ezzel megkezdődik az RNS, majd fehérje termelés. A fehérjekifejezést optimalizált körülmények (hőmérséklet, időtartam) közötti inkubálással folytattuk, majd a mintát centrifugáltuk, összegyűjtve a sejteket. A sejtek reszuszpendálása és ultrahangos roncsolása során a sejtfal felhasad, így hozzáférhetővé válik a fehérje.

4.4 Fehérjék tisztítása HPLC-vel

A nagynyomású, illetve nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás eljárás (HPLC) lehetőséget biztosít fehérjék elválasztására és tisztítására különböző tulajdonságuk (pl.: töltéskülönbség, szubsztrát-ligandum kölcsönhatás) alapján. A pGEX-6P-1 vektor tartalmazza a Glutation-S-transzferáz fehérje (GST) kódját, ezért a termékben a GST toldalék a vizsgálni kívánt fehérje N-terminális végéhez fűződik. A GSTrap oszlop töltete glutationt (a GST szubsztrátja) tartalmaz, ami a fúziós célfehérje affinitás alapú tisztítását teszi lehetővé. Az eljárás főbb lépéseit a 4.2. sematikus ábrán mutatjuk be. A minta felvitele során a GST toldalékot tartalmazó fehérje a töltethez kötődik. Többszöri mosással a sejt egyéb fehérjéi eltávolíthatók.



4.2. ábra. GST oszlopon történő tisztítás fő lépései. 1. A mintafelvétel során a GST hozzákapcsolódik a szilárd hordozón rögzített szubsztrátjához. 2. Mosással eltávolítjuk a sejt egyéb fehérjéit. 3. Az elúció során GSH kötődik a GST-hez, aminek következtében a fúziós fehérje a mozgófázisba jut.

A GST-tartalmú fehérjék elúciója redukált glutationt (GSH) tartalmazó oldat adagolásával történik. Az így kapott oldat GST fúziós fehérjét tartalmaz, melyről a toldalékot a GST-3C *PreScission* proteáz segítségével hasítjuk le. A 2.6.2 fejezetben említettem, hogy az általunk vizsgált fehérjéket csak az Im7 fehérjével együtt tudjuk kifejezni, így az oldatban

ez a fehérje is jelen van. Ahhoz, hogy a későbbiekben a célfehérje nukleáz aktivitását vizsgálni tudjuk, az Im7 fehérjétől is meg kell szabadulnunk.

Az első tisztítási lépés után tehát az NColE7, a GST, az Im7 és a GST-3C proteáz, illetve az esetlegesen hasítatlan GST-NColE7 együtt lesz egy redukált glutationt tartalmazó oldatban. Ezért egy második ioncsere kromatográfiás tisztítást végeztünk. Itt az állófázis szemcséin lévő ionos csoportokhoz az ellentétes töltésű fehérjemolekulák elektrosztatikus kölcsönhatásokkal kötődnek. A célfehérje az alkalmazott pH-n pozitív töltésű ($pI = 10.0$), ezért kationcserélő oszlopon tisztítottuk, amelynek töltetén $R-SO^{3-}$ csoportok találhatóak. A tisztítás három fő lépése: 1. A mintafeltöltés során a pozitív töltéssel rendelkező fehérjék reverzibilisen megkötődnek a töltet felületén. 2. Az oszlopot pufferrel mossuk, amely során eltávolítjuk a nem kötődő fehérjéket és a szennyeződések. 3. A gradiens elúció során fokozatosan növeljük a NaCl koncentrációját az eluensben, így azok fokozatosan leszorítják a töltéssel rendelkező fehérjéket.

Az NColE7/Im7 kölcsönhatás a legerősebb fehérje-fehérje kölcsönhatások egyike, ezért az elválasztás során ezt a két fehérjét csak együtt tudnánk tisztítani. A pH alkalmas megválasztásával azonban lehetőség van a kölcsönhatás megszüntetésére. A kationcserét ezért 20 mM Gly/HCl pufferben ($pH = 3.0$) végeztük. A tisztított fehérjét tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük, majd UFC900308 AMICON ULTRA 15ml 3K molekulaszűrő segítségével töményítést, illetve puffercserét hajtottunk végre. A puffert 7.7 pH értékű 20 mM HEPES-re cseréltük, hogy a fehérjék a tárolás során ne sérüljenek.

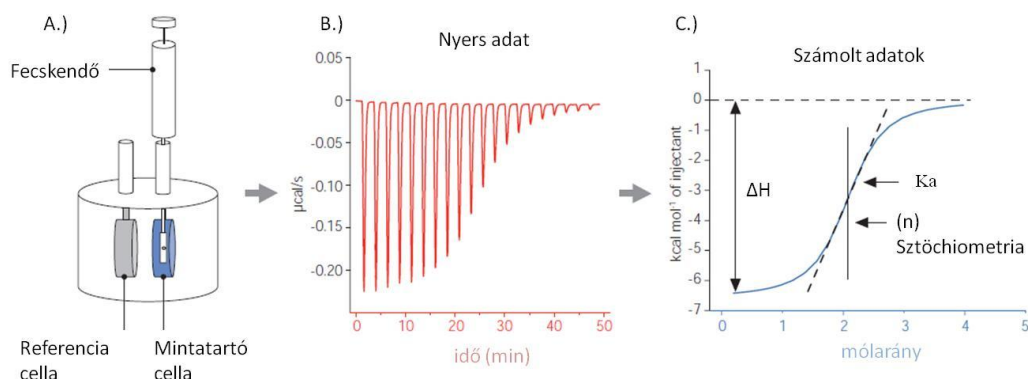
4.5 Izotermális mikroklorimetriás titrálások

Fizikai vagy kémiai folyamatok hőeffektuson alapuló követését kalorimetriának nevezzük. A kalorimetriás méréseknél alkalmazott műszereknek három típusa van:

- Hőmérséklet változás mérésén alapuló (adiabatikus vagy izoperibolikus)
- Hővezetés mérésén alapuló
- Izotermális

Az izotermális mikroklorimetriás titrálás (ITC; isothermal titration calorimetry) alkalmazásával lehetőség nyílik fehérje-ligandum kölcsönhatásra vonatkozó termodinamikai

paraméterek és disszociációs állandó meghatározására, állandó hőmérsékleten és nyomáson. A 4.3.A ábrán egy izotermális kalorimetriás titrálóberendezés látható.



4.3. ábra Az ITC mérések folyamata. A.) Egy ITC mérés során alkalmazott mérőberendezés sematikus ábrája. B.) Az ITC görbe közvetlenül a mért hőváltozásokat ábrázolja idő függvényében. C.) A B.) adatsorból számított hőmennyiség változás.

Az izotermális kalorimetriás titrálásokban a mérőcellában lévő oldatot titráljuk a ligandumot tartalmazó oldattal, a műszerbe épített mikrofecskendő segítségével. Az injektáló berendezés automatikus, a fecskendő a lapátszerűen kiképzett végével biztosítja az injektálás során a komponensek gyors keveredését. A ligandum hígulása és a fehérje ligandum kölcsönhatás kialakulása során reakcióhő szabadul fel vagy nyelődik el. A mintatartó hőmérséklet szabályzója a referencia cellában lévő oldat hőmérsékletéhez viszonyítva kompenzálja ezt a hőváltozást, ezzel biztosítva a minta állandó hőmérsékletét miközben méri a kompenzációhoz szükséges munkát. Mivel izoterm körülmények között dolgozunk ez a munka egyenlő a hőelnyeléssel, illetve a hőfejlődéssel.

4.5.1 Mintaelőkészítés ITC mérésekhez

Fontos, hogy a titrálandó oldat és a titrálóoldatban az oldószer azonos legyen, a szolvatációs effektusok elkerülése érdekében. Ezért célszerű a teljes méréssorozathoz elegendő pufferoldatot egyszerre elkészíteni. A fehérjemolekula oldalláncainak töltöttsége, és így a koordinációs képességük jelentősen függ az oldat pH-jától. Az oldószer pH-jának beállításához pH érzékeny üvegelektrodát alkalmaztunk. A fehérjék esetében az oldószer

cseréje dialízissal történt, amely során a fehérjeoldat adott pórusmérettel rendelkező membránon keresztül érintkezik az új pufferoldattal, esetünkben az 7 kDa-nál könnyebb fehérjék számára volt átjárható a membrán (a TKW fehérje molekulatömege kb. 16 kDa) . A makromolekulák méretükből kifolyólag nem jutnak át ezeken a pórusokon, ellentétben a kisméretű oldószermolekulákkal. A membrán visszatartó képességét jellemző érték a molekulatömeg metszet az úgy nevezett MWCO (molecular weight cut-off). Ennek az értéke megadja azt legkisebb molekula tömeget az oldott anyagra daltonban, amely 90%-át a membrán visszatartja. A minta előkészítése során fontos figyelembe venni, hogy a kiértékeléshez szükséges a ligandum és a makromolekula pontos koncentrációja. A mérési eredmények kellő pontosságú kiértékeléséhez szükséges, hogy megfelelő fehérjekoncentrációt alkalmazzunk, ami a következő egyenlet alapján becsülhető:

$$10 < K_a \times C < 50$$

Ahol a K_a a fehérje/ligandum komplex asszociációs állandója, C pedig a mintatartóban lévő fehérje koncentrációja.

4.5.2 Az ITC mérések kivitelezése

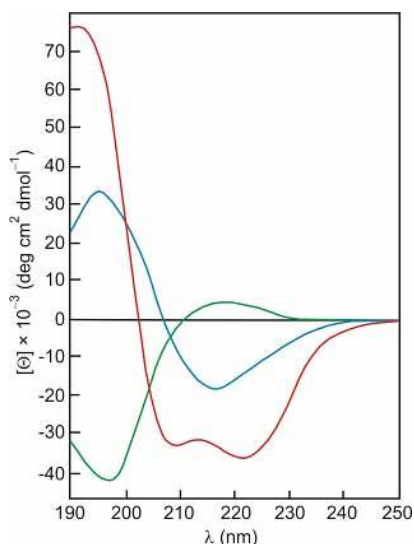
A méréseket MicroCal Auto-iTC200 mikrokaloriméterrel végeztem Prágában az IOCB (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry) kutatóközpontban Dr. Milan Kožíšek segítségével. A mérések során a mérőoldatot a műszer adott időközönként, jelen esetben 240 másodpercenként adagolja a titrálandó oldathoz. A hőváltozás hatására éles csúcs jelenik meg a $\Delta H - n_{Zn^{2+}}/n_{fehérje}$ görbén. Fontos, hogy két adagolás közötti idő úgy kell beállítani, hogy elég hosszú legyen ahhoz, hogy a görbe visszatérjen az alapvonalhoz, különben a görbe értelmezhetetlenné válik. A mérőoldatban a ligandum koncentrációja ~ 12 -szer nagyobb, mint a titrálandó oldatban a fehérjekoncentráció. A titrálás során a ligandum hígul, ami hőváltozással jár. Ezért minden mérésnél párhuzamosan titráljuk a ligandumot tartalmazó mérőoldattal magát a pufferoldatot is, és ezt a titrálási görbét kivonjuk a ligandum/fehérje rendszer titrálási görbéjéből. Emellett fontos, hogy túltitráljuk az oldatot, hogy a szabad koordinációs helyek elfogyjanak, és így a titrálás során a mért hőváltozás megegyezzen a ligandum hígulásából származó hőváltozással, azaz telítést kapjunk.

4.5.3 Az ITC mérési eredmények kiértékelése

A mérési adatok kiértékelését a MicroCal Origin 7.0 szoftverrel végeztük. Az előzetes mérések alapján tudjuk, hogy a fehérje : Zn^{2+} arány 1:1, ezért a „one site” kötődési modellt alkalmaztuk. Az 4.3.C ábrán látható egy ITC titrálási görbe integrált alakja. A szaggatott vonal meredekségéből leolvasható a K_a (asszociációs állandó), a görbe inflexiós pontja pedig megadja a fehérjéhez kapcsolódó ligandumok számát (n). A görbéről a kölcsönhatás ΔH értéke is leolvasható. A ligandum és a fehérje koncentrációjának megadását követően nemlineáris regresszió segítségével határoztuk meg K_a értékeket.

4.6 CD spektroszkópia

Bármely lineárisan poláros fény felbontható egy jobbra és egy balra cirkulárisan poláros fény összegére. Cirkuláris dikroizmusnak (CD) nevezzük azt a jelenséget amely során e kétféle cirkulárisan poláros fénysugár királis mintán áthaladva eltérő mértékben nyelődik el. A CD spektroszkópiában ezt az elnyeléskülönbséget mérjük. A fehérjék rendelkeznek olyan királis szerkezeti egységekkel (α -hélix, β -redő), melyek lehetőséget nyújtanak a CD spektroszkópia alkalmazására. A távoli UV-tartományban (180-260 nm) a másodlagos szerkezetről (4.4. ábra), míg közeli UV tartományban (260-310) a fehérjék harmadlagos, esetleg negyedleges szerkezetéről kaphatunk információt.



α-hélix: egy pozitív csúcs ~190 nm-nél és két negatív csúcs ~208 és ~222nm-nél.
β-redő: egy pozitív csúcs ~195 nm-nél és egy negatív csúcs 218 nm-nél
Egyéb: egy negatív csúcs ~196 nm-nél, és egy pozitív ~218 nm-nél.

4.4. ábra. A fehérjék másodlagos szerkezeti elemeire jellemző CD spektrumok . A piros görbe az α -hélix, a kék a β -redő a konformációjú peptidlánc, míg a zöld görbe az egyéb konformációjú peptidlánc CD spektrumát szemlélteti.

5. Számítási módszerek

5.1 PDB fájlok előkészítése

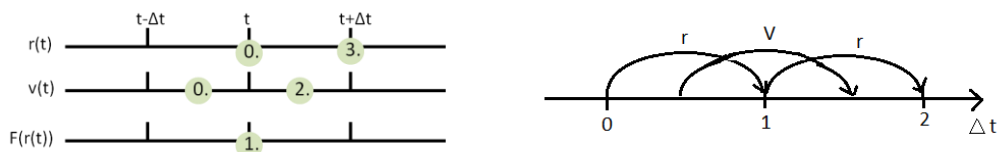
A fehérje kiindulási geometriáját a fehérje adatbankból (Protein Data Bank) töltöttem le pdb fájlformátumban. Ez tartalmazza a 3D szerkezet koordinátáit, a szerkezet meghatározásának módját és a szerzőket. A szerkezetet leggyakrabban Röntgen-diffrakcióval vagy NMR mérésekkel határozzák meg. A szerkezet megjelenítésére a Pymol [30] és a VegaZZ [31] programokat használtam. A Pymol segítségével több molekula is egymásra helyezhető, és nagy felbontású kép készíthető. A VegaZZ szoftverben módosítottam az aminosavakat a kísérleti mutációknak megfelelően, és számítottam a molekulák töltését, valamint kialakítottam a számításokhoz alkalmas modellt ionokkal és vízmolekulákkal körülvéve. A hidrogénatomok elhelyezése során, figyelembe kell venni az aminosav oldalláncok pK_a értékeit. A pK_a értékek számolására a PROPKA programot használtam [13].

5.2 Molekuladinamika

Molekuladinamika segítségével makromolekulák oldatbeli viselkedését modellezhetjük. A módszer lehetővé teszi a molekulák mozgásának követését, figyelembe véve a kötéshosszak, kötésszögek és diéderes szögek változásait. Az eljárás lényege a Newton-féle mozgási egyenletek megoldása N kölcsönható atomra egy paraméter halmaz segítségével.

5.2.1 A Gromacs programcsomag molekuladinamikai algoritmusa

A számításokhoz meg kell adni a kezdő feltételeket: a potenciális kölcsönhatásokat, helykoordinátákat és a kezdő sebességet. A topológia és az erők statikusak, ezeket nem módosítjuk a számítások alatt. A doboz méretét, a koordinátákat és a sebességet minden részecskére meg kell adni a kiinduláskor. A mozgási egyenletekhez az ún. *leap-frog* (ugró-béka) algoritmust használtunk, amely Δt időintervallumonként frissíti a koordinátákat. A szimuláció elindítása érdekében a Boltzmann-eloszlás alapján generálunk egy kiindulási sebességet minden atomra.



5.1. ábra. A Gromacs programcsomag integrátora a „leap Frog” algoritmus.

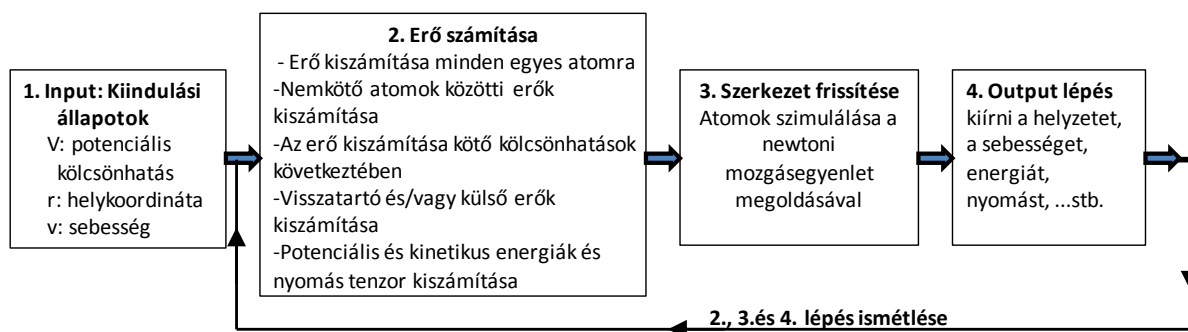
Ezután a program kiszámítja az erőket minden egyes atomra, valamint a nemkötő atomok közötti kölcsönhatásokra jellemző kinetikus és potenciális energiákat. A következő lépés során a mozgás newtoni egyenletét megoldja N-kölcsönható atomra:

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = F_i, \quad i = 1 \dots N$$

A potenciál függvény negatív deriváltja az erő:

$$F_i = -\frac{\partial V}{\partial r_i}$$

Az e számolás eredményként kapott paramétereket a program kezdőfeltételként felhasználva újabb iterációkat hajt végre az általunk megadott t ideig. Végeredményként az atomok helyzetét, sebességét és a nyomást kapjuk meg. A 5.2. ábrán a teljes molekuladinamikai algoritmust mutatjuk be sematikus.



5.2. ábra. A teljes molekuladinamikai algoritmus

Általunk használt feltételek

Az első lépésben előkészítjük a bemenő fájlokat, amihez az AMBER99-AMBER94 erőtereket használtuk. A koordináta és topológiai fájlok megszerkesztését követően kijelöljük

a megfelelő méretű dobozt és a vízmolekulákat hozzáadjuk (jelen esetben TIP3P vízmolekulákat) és a rendszert minimalizáljuk. A jelen dolgozatban bemutatott számítások során a fehérje-DNS komplexet tartalmazó kocka alakú doboz éle $10,81 \times 10,81$ nm volt.

A második lépésben a rendszert ellenionokkal semlegesítjük egy gyors erőter számítás alkalmazásával, majd egy rögzített minimalizálást hajtunk végre, amelyben csak a könnyű hidrogénatomok és az oldószermolekulák, ionok mozoghatnak. Ahhoz, hogy semlegesítsük a fehérje-DNS komplex töltését $25 K^+$ és $4 Cl^-$ iont helyeztünk el a dobozban (5.1. táblázat).

A harmadik lépésben az előkészített molekulát egy ún. korlátozott dinamikának vetjük alá. Ennek során a nehézatomokat rögzítjük, miközben a hidrogénatomok szabadon mozoghatnak és eligazodhatnak. Az atomok kiindulási sebessége a Maxwell-Boltzmann eloszlás szerint kerül kiosztásra. Ezeket az értékeket véletlenszám generálással kapjuk meg. Az NPV dinamika (állandó anyagmennyiség, nyomás és térfogat) során szolvatáljuk a fehérjét és a ligandumot, valamint a vízmolekula-klaszterek közötti inhomogenitásokat szüntetjük meg.

A negyedik lépésben a „produktív dinamikai” rész következik, mely során NPT sokaságot használtunk. Az a távolság, amelyen belül a Van der Waals kölcsönhatásokat még számítottuk $1,4 \text{ \AA}$ volt, az ennél távolabb lévő atomok közötti párpotenciált elhanyagoltuk. Az elektrosztatikus kölcsönhatásokat a Coulomb törvény alapján számítottuk az $1,4 \text{ \AA}$ -nél közelebbi atomok között, míg ha a két atom közötti távolság meghaladta ezt az értéket a Particle Mesh Ewald összefüggést [32] használtuk a nagytávolságú elektrosztatikus kölcsönhatások számítására. A hőmérséklet 300 K volt. Az első 200 ps ún. egyensúlyi beállási periódust nem vettük figyelembe a kiértékelés során.

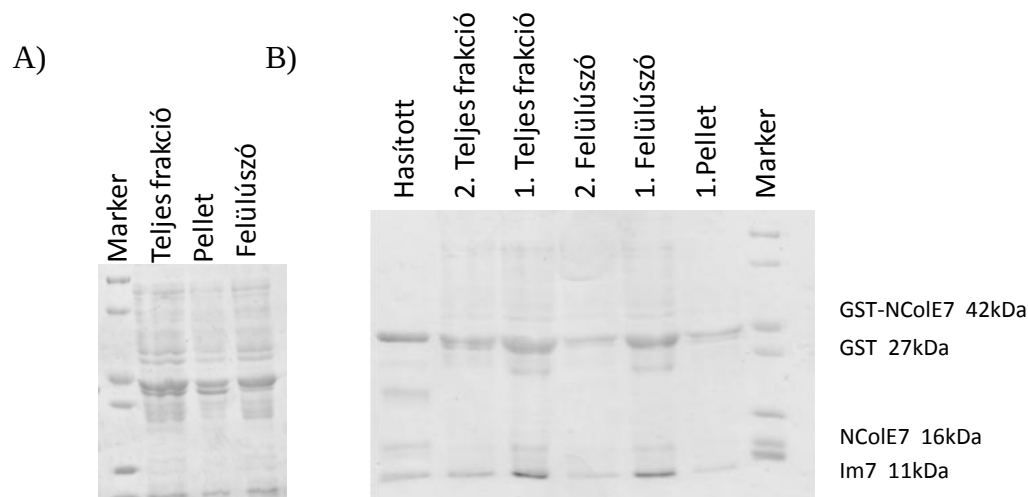
5.1. táblázat. Az egyes fehérjék esetében használt vízmolekulák száma, doboz mérete és az ionok száma

Molekula	Vízmolekulák	Doboz éle	Ionok száma
DNS	41562 db	10.806 nm	$38 K^+, 4 Cl^-$
TKW	35055 db	10,252 nm	$8 K^+, 24 Cl^-$
TKW+DNS komplex	34207 db	10,282 nm	$25 K^+, 7 Cl^-$

6. Eredmények és tárgyalásuk

6.1 A fehérjék előállítása

Munkám során három NColE7 mutáns fehérjét fejeztem ki BL21-es sejtekben majd tisztítottam meg: a TK, TW és W mutánsokat. Ezenkívül az Im7 fehérjére, valamint a GST-3C proteázra is szükségünk volt kísérleteink során. Mivel a kísérletek meglehetősen nagymennyiségű fehérjét igényeltek, számos lépés optimalizálásáról kellett gondoskodnunk. Elsőként egy liter LB tápoldatban az IPTG hozzáadása után 37°C-on 4 óra inkubálást alkalmaztunk. 4×15 s szonikálást követően a fehérje nagy része az oldhatatlan frakcióban maradt (6.1. A ábra). Így a tisztítás körülményes lett volna. Második alkalommal 30 °C-on, 4 órán át inkubáltuk a sejteket az IPTG hozzáadását követően. 8×15 másodpercig szonikáltuk, majd a csapadékot újra felfuszpendáltuk és további 4×15 másodpercig szonikáltuk. Ennek során a fehérjék sérültek. Ez jól látszik a 6.1.B ábrán, ahol már az első 8×15 másodpercig tartó szonikálást követően a megjelentek a géliképen új sávok, feltehetőleg a fehérje roncsolódása miatt (1. Teljes frakció). Jól látszik azonban, hogy a hőmérséklet csökkentésével a vizsgálni kívánt fehérjét a felülúszó jóval nagyobb mennyiségben tartalmazza, mint a csapadék.

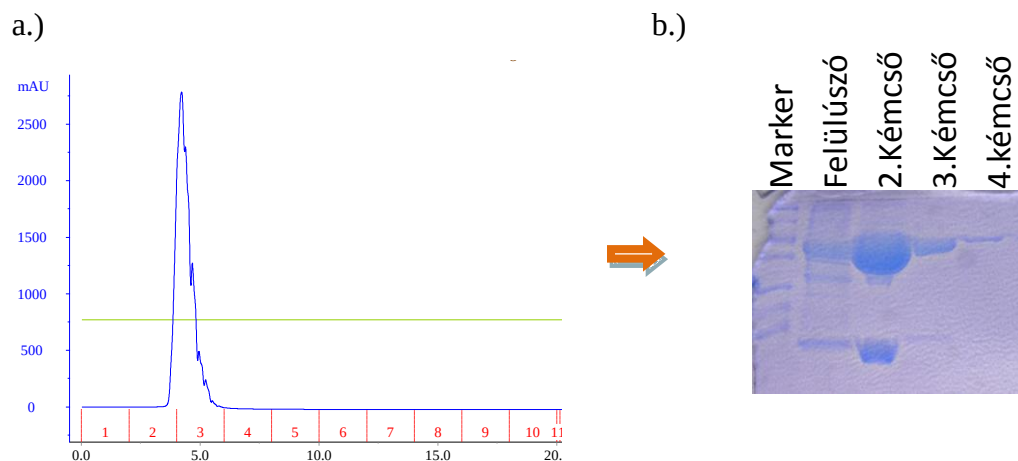


6.1. ábra. A mutációt tartalmazó fehérje kifejezés és aggregáció ellenőrzése SDS-PAGE módszerrel. A) 37°C, 4 óra indukálás. B) 30°C, 4 óra indukálás. A B.) ábra tartalmazza a hasítás ellenőrzését is. (hasított)

A továbbiakban két liter LB tápoldatból indultunk ki, és az IPTG hozzáadása után 25°C-on inkubáltuk a sejteket egy éjszakán át (16 óra). Ezt követően lecentrifugáltuk, a felülúszót dekantáltuk és PBS pufferben felfuszpendáltuk a sejteket majd 4×15 másodpercig szonikáltuk és ismét centrifugáltuk. A felülúszó tartalmazza a nagymennyiségben kifejezett fehérjéket. Ezzel a módszerrel sikerült a további kísérletekhez elegendő mennyiségű fehérjét kifejezni, és elkerülni a szonikálás roncsoló hatását.

6.2 A fehérjék tisztítása

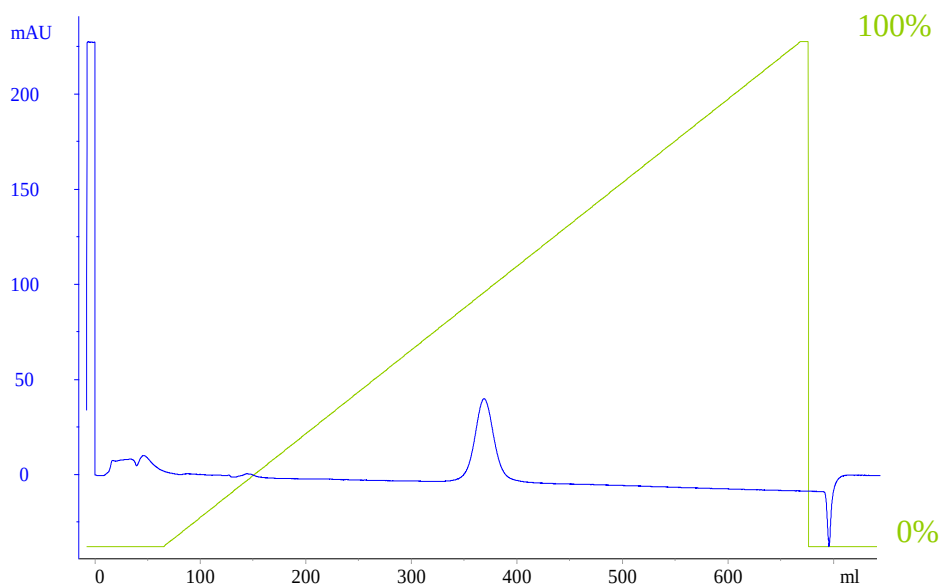
A fehérjetisztítás első lépésében GSTrap oszlopon elválasztottuk a mutációkat tartalmazó fehérjéket a sejt saját fehérjéitől. SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük az elválasztás sikerességét (6.2. ábra).



6.2. ábra. GSTrap oszlopon történő elválasztás és ellenőrzése SDS-PAGE kísérlettel. A) Kromatogram, amelyen a minta 280 nm-en mért elnyelése látható. A piros számok az egyes frakciók sorszámát jelentik. B) Az egyes frakciókhoz tartozó gélkép.

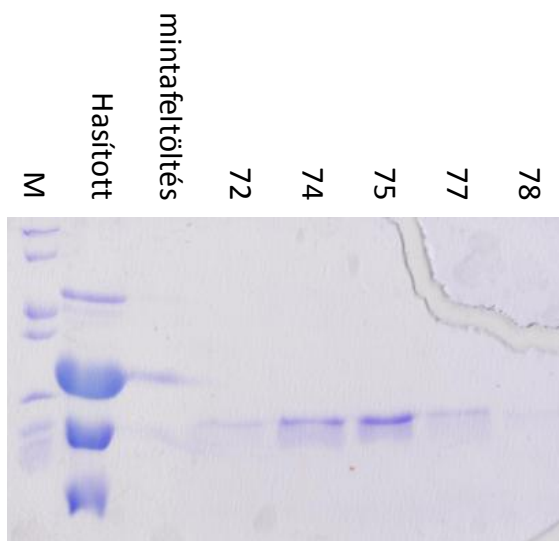
Az így megtisztított oldatok tartalmazzák a GST fúziós fehérjét, és az immunitásfehérjét. Ezzel a módszerrel kifejeztük és tisztítottuk a GST HRV 3C proteázt, majd hozzáadtunk a tisztított mutáns fehérjék oldatához, és 12 órás 4°C-on történő inkubáltuk. A reakció során a GST-toldalék lehasadt a célfehérjéről. A hasítás sikerességét SDS-PAGE kísérlettel ellenőriztük (6.1. ábra B.).

A tisztítás eredményeként egy keveréket kaptunk, ami a glutation tartalmú eluensben tartalmazta a mutáns NColE7-et, a lehasított GST fehérjét, a GST-3C proteázt. Ahhoz, hogy elválasszuk a mutációkat tartalmazó fehérjéket a többi komponenstől, tovább tisztítottuk kationcserélő oszlopon pH = 3,0-on. A savas közeg hatására az Im7 és a mutációt tartalmazó NColE7 aminosav oldalláncai protonálódnak, így az Im7 és a célfehérje közötti kölcsönhatás megszűnik. A kationcserélő oszlopon történő elválasztás kromatogramja a 6.3. ábrán látható. A kísérlet során gradiens elúciót alkalmaztunk az eluens ionkoncentrációját (NaCl) folyamatosan növelve 0,0 M és 2,0 M között.



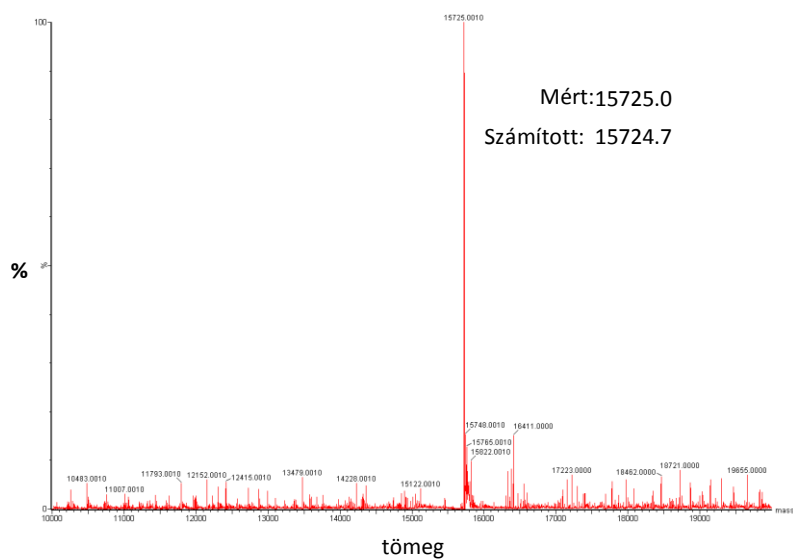
6.3. ábra. A kationcserélő oszlopon történő elválasztás kromatogramja. A 280 nm-en mért abszorbanáciát a kék, a NaCl-gradienst a zöld görbe mutatja.

A mintánk ~ 1,0 M koncentrációjú NaCl oldatnak megfelelő csúchoz tartozó frakciókban jelent meg. Az Im7 fehérje az oszlop 1×PBS-el történő mosásakor távozott az oszlopról ~ 50 ml térfogatban, ami megfelel az irodalmi adatoknak [11]: az Im7 pH ~ 7,0 körül eluálható. Ezt követően a célfehérjét tartalmazó frakciókat összegyűjtve molekulaszűrőn töményítettük, és SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük a minta tisztaságát (6.4. ábra).



6.4. ábra. A hasítás és a kationcserélő oszlopont történő elválasztás ellenőrzése SDS-page kísérlettel

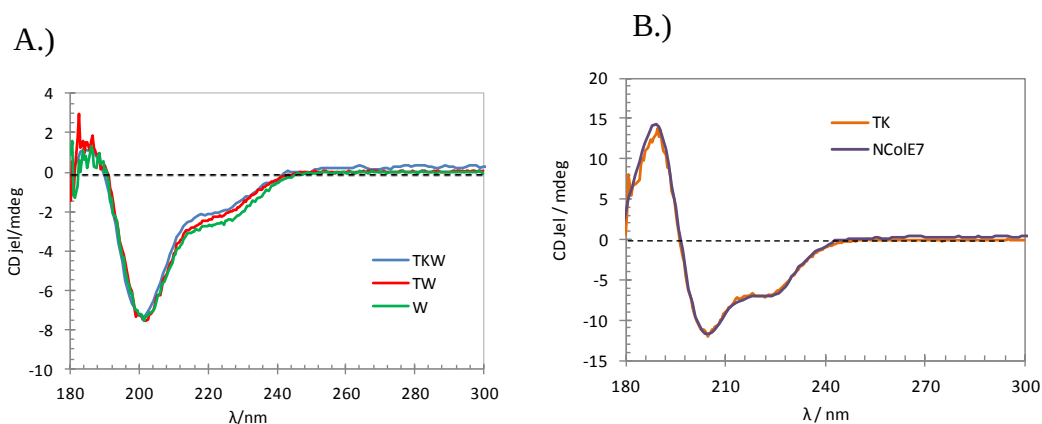
A fenti eljárással sikeresen tisztítottuk a TK, TW és W mutánsokat. Elektrospray-ionizációs tömegspektrometriával kimutattuk, hogy a megfelelő méretű fehérjéket kaptuk meg. A 6.5. ábrán látható a TK mutáns tömegspektruma.



6.5. ábra. TK mutáns tömegspektruma

6.3 A mutáns fehérjék oldatszerkezeti tulajdonságai

A mutációk szerkezetre gyakorolt hatását CD spektroszkópiával tanulmányoztuk. Kíváncsiak voltunk, mely aminosav(ak) felelősek a C-terminális rész szerkezeti változásaiért. Vizsgálataink során kiderült, hogy a W464A mutációt tartalmazó TW és W fehérje CD spektruma a TKW fehérje spektrumához nagyon hasonló (6.6.A ábra)



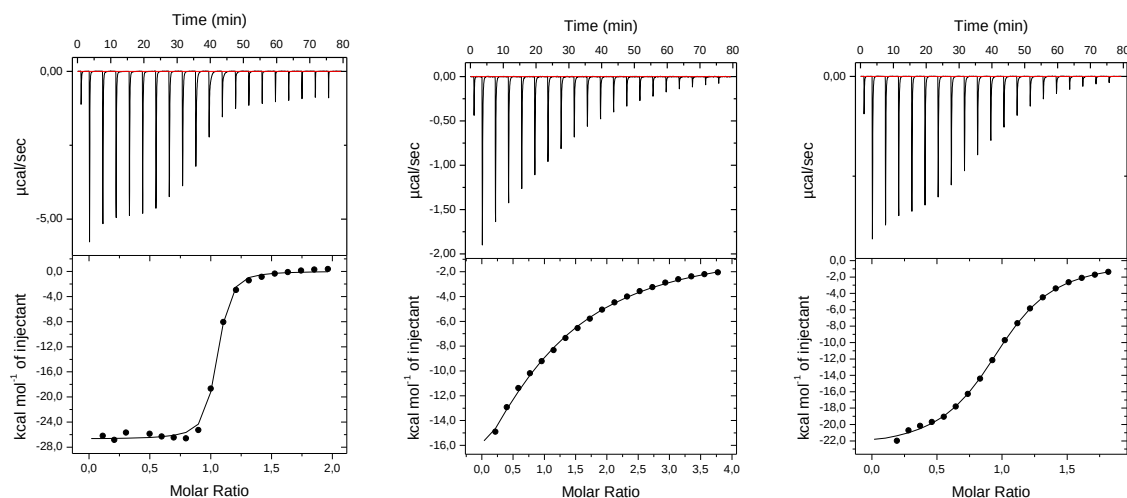
6.6. ábra. A) A 8μM –os TKW, TW, W mutáns fehérjék és B) a 16μM TK és NColE7 CD spektruma

Ugyanakkor a TK fehérje CD spektruma az NColE7 spektrumához hasonló (6.6. B. ábra). Ezek alapján egyértelműen kijelenthető, hogy a W464 aminosavnak kitüntetett szerepe van a fehérje szerkezetének kialakításában. Az irodalomból ismerjük a triptofán szerkezetstabilizáló hatását, fehérjékben. Az NColE7-ben a 464-es triptofán oldallánca egy hidrofób zsebben helyezkedik el. Emellett az aromás gyűrűjében lévő nitrogén atomjával hidrogén kötést alakíthat egy C-terminális résszel kölcsönhatásban lévő prolinnal.

6.4 A mutáns fehérjék Zn^{2+} -kötő tulajdonságai

A fehérjék Zn^{2+} -kötő képességét izotermális mikrokalorimetriás titrálással határoztuk meg, $ZnCl_2$ oldattal titrálva az NColE7, TKW, TK, TW, W fehérjéket (6.7. ábra). A fehérje- Zn^{2+} -ion disszociációs állandók a 6.1. táblázatban találhatóak. Az NColE7 és a TKW fehérjék esetén sikerült jól reprodukálni korábbi eredményeinket. Ezek szerint a TKW mutáns három nagyságrenddel gyengébben köti a Zn^{2+} -iont, mint az NColE7. A CD spektroszkópiai vizsgálatok szerint a TKW spektruma jelentősen eltér az NColE7 spektrumától, ami a

szerkezet szignifikáns megváltozására utal. A csökkent fémion-affinitás valószínűleg ennek tulajdonítható.



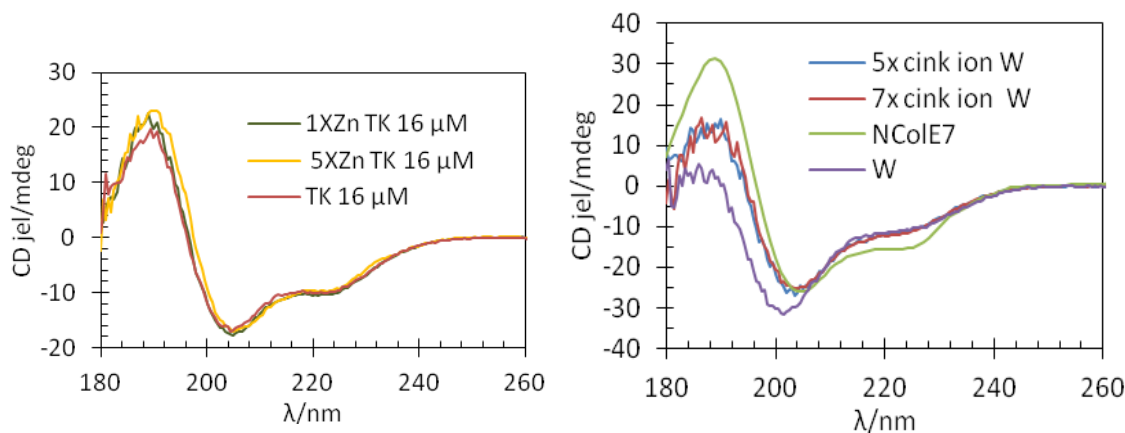
6.7. ábra. A TK, TW és W mutánsok izotermális kalorimetriás titrálása Zn^{2+} -ionnal.

6.1. táblázat. Az ITC mérések alapján meghatározott fehérje- Zn^{2+} -komplexek disszociációs állandói.

fehérjék	K_d
NColE7	$17 \pm 4 \text{ nM}$
TKW	$11 \pm 1 \text{ } \mu\text{M}$
TK	$230 \pm 40 \text{ nM}$
TW	$64 \pm 5 \text{ } \mu\text{M}$
W	$5.6 \pm 0.3 \text{ } \mu\text{M}$

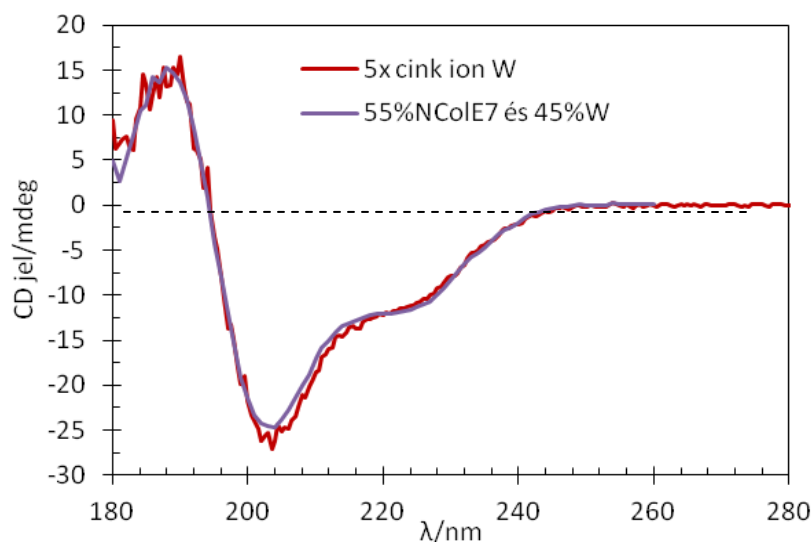
A TW és W mutáns cinkionnal történő titrálás során kapott disszociációs állandó értéke kb. három nagyságrenddel tér el az NColE7 esetében kapott értéktől. Ezek alapján azt mondhatjuk, hogy a W464A távoli mutáció önmagában is jelentősen módosítja a HNH motívum szerkezetét és jelentősen csökkenti a cinkion affinitást.

A TK, TW és W mutánsok fémionkötő képességét CD spektroszkópiával is tanulmányoztuk. A Zn^{2+} -ion jelenlétében mért spektrumokat a 6.8. ábra mutatja.



6.8. ábra. A TK (balra) és a 32μM W (jobbra) CD spektrumának változása Zn^{2+} -ion adagolásának hatására.

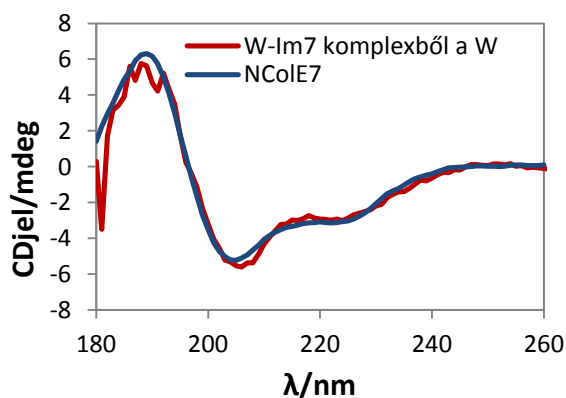
A Zn^{2+} -ion hatására a TK CD spektrumában az NColE7 esetében mérthez hasonló, kismértékű eltolódás figyelhető meg. A W mutáns spektruma a Zn^{2+} -ion hozzáadásra nagyobb mértékű változást mutat. A CD jel alakja Zn^{2+} -ion jelenlétében jobban hasonlít az NColE7 spektrumához, mint az apo fehérje CD spektruma. Az ITC mérések során kapott K_d értékek alapján, tudjuk, hogy a W mutáns kevésbé köti a Zn^{2+} -iont. A kötődisszociációs állandók alapján 1-5× Zn^{2+} -ion jelenlétében a fehérjének csak egy része van disszociált formában. Azaz a CD mérés során egy kevert spektrumot kapunk, amely tartalmazza a Zn^{2+} -ionhoz kötődő fehérje és a Zn^{2+} -ion nélküli fehérje CD spektrumát. Az apo W és az NColE7 spektrumokat megfelelő konstanssal szorozva (rendre 0,55 és 0,45 az NColE7 és W esetén) a lineáris kombinációjuk kiadja a Zn^{2+} -ion mellett mért W spektrumát (6.9. ábra). Ez azt jelentheti, hogy a Zn^{2+} -ion jelentős szerkezeti változásokat okoz a mutáns fehérjében, stabilizálni képes annak szerkezetét.



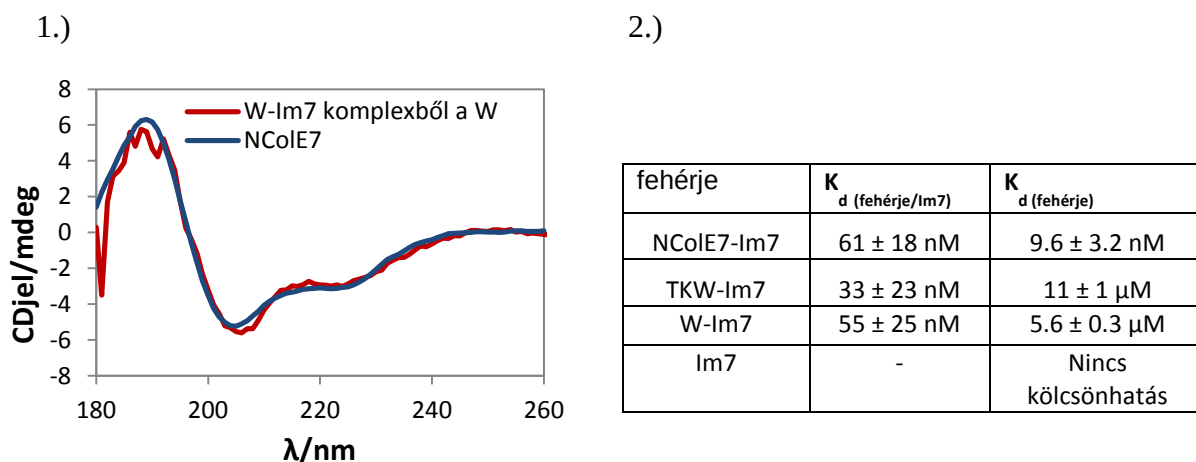
6.9. ábra. A W fehérje 5× mennyiségű Zn^{2+} -ion jelenlétében mért CD spektruma az apo W fehérje és az NColE7 spektrumának lineáris kombinációjaként számítható.

6.5 A W mutáns szerkezetének stabilizálása az Im7 fehérjével

A CD mérések eredményei alapján felmerült, hogy a TKW, TW, W mutánsok megváltozott szerkezete megváltozott szerkezete helyrehozható. Pl. a Zn^{2+} -ion láthatóan részlegesen megjavítva a funkcionális fehérje funkcionális fehérje irányába módosította a szerkezetet. Az Im7 fehérje az NColE7 természetes komplexképző természetes komplexképző inhibitora, amely a szubsztrátkötő hely elfedése révén akadályozza meg a nukleáz akadályozza meg a nukleáz aktivitást, úgy, hogy a nukleázzal erős kölcsönhatást alakít ki. A W/Im7 komplex CD W/Im7 komplex CD spektrumának rögzítése után kivontuk belőle az Im7 spektrumát. A 6.10



6.. ábrán jól látszik, hogy visszakaptuk az NColE7 spektrumát. Mivel feltételezhetjük, hogy az Im7 szerkezete nem változik a kötődés során (ezt az irodalomban közölt kristályszerkezetek igazolják), ez azt jelenti, hogy a W mutáns konformációja a komplexben hasonló az NColE7 spektrumához. Azaz az immunitásfehérje kötődése indukálja a W funkcionális másodlagos és harmadlagos szerkezetének kialakulását.



6.10. ábra. Balra: A W/Im7 komplex és az Im7 CD spektrumainak különbsége összehasonlítva az NColE7 CD spektrumával. Jobbra: A Zn^{2+} -ionnal történő izotermális kalorimetriás titrálásokból számított fémion-affinitásra vonatkozó K_d értékek a fehérjék, illetve a fehérje/Im7 komplexek esetében.

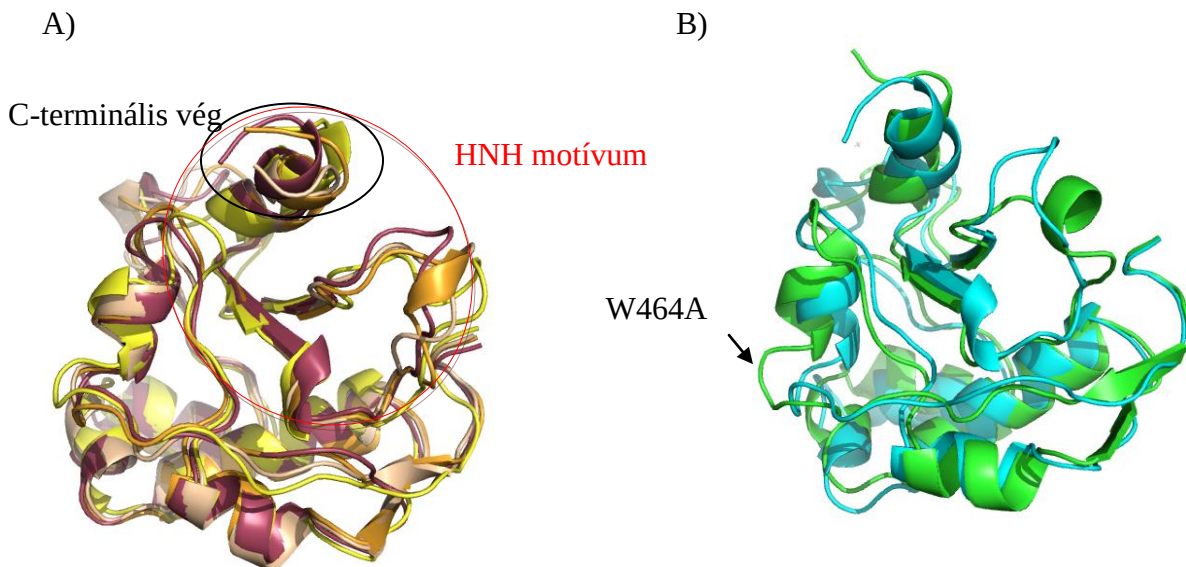
Az ITC mérések alapján a fehérjék fémion-affinitására számított K_d értékek az Im7 jelenlétében azonos nagyságrendűek az NColE7, illetve a W464 mutációt tartalmazó fehérjék esetében, míg az Im7 fehérje távollétében ez a mutáció mintegy három nagyságrendnyi növekedést okozott a disszociációs állandóban. Ezek megerősítik, hogy az Im7 stabilizálni képes a fehérje szerkezetét, és ezzel egy preorganizált fémkötőhely kialakulását idézi elő. A fentiek egyértelműen bizonyítják, hogy az N-terminális láncban bevezetett W464A mutáció hatással van a fémkötő hely, azaz a HNH-motívum szerkezetére annak ellenére, hogy a szekvenciában attól távol található.

Eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy a fehérjemolekulák szerkezetében egyetlen mutáció is jelentős változást okozhat. Számos mutáns NColE7 szerkezetet közöltek pl. az Im7 fehérjével vagy DNS-molekulával komplexben (6.10. 2. ábra). Ezen mutánsok

szerkezete megegyezett a szabad NColE7 szerkezetével. Felmerül azonban a kérdés, hogy a szerkezeti egyezés az Im7 molekulával történő kölcsönhatás eredménye-e, vagy a szabad fehérje is megtartja a helyes szerkezetet? Az ilyen kérdések megválaszolására a szabad fehérje kristályosítása mellett a CD-spektroszkópia alkalmas és egyszerű módszer.

6.6 Szerkezeti változások tanulmányozása molekuladinamikával

A fehérjék dinamikus szerkezeti tulajdonságainak további tanulmányozása érdekében molekuladinamikai szimulációkkal tanulmányoztuk a TKW szerkezetét DNS jelenlétében és anélkül. Ennek során azt kaptuk, hogy a 15-20 ns idő elteltével a HNH motívum szerkezete jelentősen változik (6.11.A ábra) a szabad TKW-fehérjében.



6.11. ábra. A) A TKW szerkezete 10 (fehér), 15 (narancssárga) és 20 ns számítás után (lila) és a kristályszerkezeti kép (sárga). B) A TKW szerkezet DNS molekulával komplexben (kék) és anélkül (zöld) 20ns számítás után.

A számítások során azt kaptuk, hogy DNS jelenlétében a szerkezet jelentősen változik, legnagyobb mértékben a W464A mutációnál és a HNH motívumban. Összehasonlítottuk az NColE7 kristályszerkezeti képével a TKW szimulációjából kapott 20 ns-nál vett szerkezetet. Mivel a szabad TKW szerkezetét az NColE7 szerkezet alapján kezdtük számítani, szerkezetük hasonló maradt, azonban már a szimulációk rövid, 20 ns-os időskáláján is

megindulnak a változások, amelyek feltehetőleg a szerkezet elvesztéséhez vezetnének (6.11. A ábra). A DNS molekula jelenlétében azonban (6.11. B ábra) ezek a változások nem kezdődnek el, a HNH motívum szerkezete sokkal stabilabb. Ez arra utal, hogy az immunitásfehérjéhez hasonlóan a DNS szubsztrát megkötése is stabilizálhatja a fehérje szerkezetét.

7. Összefoglalás

Munkám során a TK, TW, W mutáns NColE7 fehérjék előállításával és vizsgálatával foglalkoztam. Arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a korábban vizsgált TKW fehérjéből, mely aminosav(ak) okozzák a fehérje jelentős szerkezeti változásait. Az irodalomban több, a C-terminális részen mutációkat tartalmazó NColE7 kristályszerkezeti ábrája megtalálható, azonban ezeket mindig Im7 vagy DNS jelenlétében kristályosították. Így nem kapunk információt a mutációk szerkezetre gyakorolt hatásáról.

A TK, TW és W előállítását és HPLC módszerrel történő tisztítását követően CD spektroszkópiai és ITC méréseket végeztem. A TKW, TW és W fehérjék szerkezete és fémion-kötő tulajdonságai hasonlóak voltak, míg a TK inkább a természetes NColE7-re hasonlít. Ezek alapján megállapítható, a W464 aminosavnak jelentős szerepe van a fehérje, és ezen belül C-terminális rész szerkezeti stabilizálásában. A triptofán aromás oldallánca révén a fehérje hidrofób magjának fontos része, így ezen egyetlen oldallánc hiánya jelentősen befolyásolta a fehérje konformációját. Méréseink alapján bebizonyosodott, hogy ez a változás érinti az aktív központot, a HNH-motívumot is, amely a természetes enzimben egy Zn^{2+} -ion számára biztosít preorganizált kötőhelyet.

Az Im7 fehérje hozzáadása révén sikerült stabilizálni a W fehérje szerkezetét, melynek eredményeképp a Zn^{2+} -affinitás is megnőtt az NColE7-hez hasonló mértékűre. CD spektroszkópiai mérések alapján a W mutáns eredetileg torzult szerkezete az Im7 jelenlétében az NColE7-hez hasonlóvá alakult át. Molekuladinamikai szimulációink arra utalnak, hogy a DNS-szubsztrát jelenléte is stabilizálhatja a fehérjék szerkezetét. További terveim között szerepel ennek kísérleti igazolása CD-spektroszkópia segítségével.

Az NColE7 fehérje N-terminális lánc távol esik az aktív központtól. Ennek ellenére eredményeink alapján jelentős szerepet játszik a fehérje szerkezetének stabilizálásában, elősegítve a nukleáz aktivitást is. Sikerült olyan változásokat létrehozunk mutációk révén, amelyek a szerkezet megváltozásához vezettek, de a hibás szerkezetet fémion, immunitásfehérje vagy feltehetőleg akár a szubsztrát jelenlétében részben vagy egészében tudjuk stabilizálni. Ezen dinamikus folyamatok megértése alapján olyan fontos információkhoz jutottunk, amelyek elősegíthetik egy intramolekuláris allosztérikus módon szabályozott nukleáz tervezését. Ennek során az NColE7 azon tulajdonságát szeretnénk kihasználni, hogy aktív központja a C-terminális végen található, azonban az N-terminális vég jelenléte szükséges a nukleáz funkció kialakulásához.

8. Hivatkozások

- [1] N. C. Mishra, "Nucleases-molecular biology and applications," *John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey*, 2002.
- [2] M.-J. Sui et al., "Metal ions and phosphate binding in the H-N-H motif: crystal structures of the nuclease domain of ColE7/Im7 in complex with a phosphate ion and different divalent metal ions.," *Protein science*, vol. 11, no. 12, pp. 2947-57, Dec. 2002.
- [3] C. A. Kim and J. M. Berg, "A 2.2 Å resolution crystal structure of a designed zinc finger protein bound to DNA," *Nat Struct Mol Biol*, vol. 3, no. 11, pp. 940-945, Nov. 1996.
- [4] M. T. Shiraishi Y, Imanishi M and S. Y, "Swapping of the b-hairpin region between Sp1 and GLI zinc fingers: significant role of the b-hairpin region in DNA binding properties of C2H2-type zinc finger peptides.," *Biochemistry*, no. 44, pp. 2523–2528, 2005.
- [5] S. Wah DA, Hirsch JA, Dorner LF and A. A. I, "Structure of the multimodular endonuclease FokI bound to DNA.," *Nature*, no. 388, pp. 97–100, 1997.
- [6] R. James, C. Kleanthous, and G. R. Moore, "The biology of E colicins : paradigms and paradoxes," *Microbiology*, no. 1 & 996, pp. 1569-1580, 1996.
- [7] P. A. Cole ST, Saint-Joanis B, "Molecular characterisation of the colicin E2 operon and identification of its products.," *Mol Gen Genet.*, pp. 198(3):465-72., 1985.
- [8] K. F. Chak, W. S. Kuo, F. M. Lu, and R. James, "Cloning and characterization of the ColE7 plasmid.," *Journal of general microbiology*, vol. 137, no. 1, pp. 91-100, Jan. 1991.
- [9] O. T. Toba M, Masaki H, "Colicin E8, a DNase which indicates an evolutionary relationship between colicins E2 and E3.," *J Bacteriol.*, pp. 170(7):3237-42., 1988.
- [10] T. Eaton and R. James, "Complete nucleotide sequence of the colicin E9 (cei) gene," *Nucleic Acids Research*, vol. 17, no. 4, p. 3242, 1989.
- [11] T.-P. Ko, C.-C. Liao, W.-Y. Ku, K.-F. Chak, and H. S. Yuan, "The crystal structure of the DNase domain of colicin E7 in complex with its inhibitor Im7 protein," *Structure*, vol. 7, no. 1, pp. 91-102, Jan. 1999.
- [12] K.-C. Hsia, K.-F. Chak, P.-H. Liang, Y.-S. Cheng, W.-Y. Ku, and H. S. Yuan, "DNA binding and degradation by the HNH protein ColE7.," *Structure (1993)*, vol. 12, no. 2, pp. 205-14, Feb. 2004.

- [13] C. Kleanthous and D. Walker, "Immunity proteins : enzyme inhibitors that avoid the active site," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 26, no. 10, pp. 624-631, 2001.
- [14] A. Czene et al., "The role of the N-terminal loop in the function of the colicin E7 nuclease domain.," *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 18, no. 3, pp. 309-21, Mar. 2013.
- [15] C. K. Pommer, A.J., U.C. Kühlmann, A. Cooper, A.M. Hemmings, G.R. Moore, R. James, "Homing in on the Role of Transition Metals in the HNH Motif of Colicin Endonucleases.," *Biological Chemistry*, pp. 274(38): 27153–27160., 1999.
- [16] L. G. Doudeva et al., "Crystal structural analysis and metal-dependent stability and activity studies of the ColE7 endonuclease domain in complex with DNA/Zn²⁺ or inhibitor/Ni²⁺.," *Protein science : a publication of the Protein Society*, vol. 15, no. 2, pp. 269-80, Feb. 2006.
- [17] Y.-sheng Cheng, K.-chiang Hsia, L. G. Doudeva, K.-fu Chak, and H. S. Yuan, "The Crystal Structure of the Nuclease Domain of Colicin E7 Suggests a Mechanism for Binding to Double-stranded DNA by the H – N – H Endonucleases," *Journal of Molecular Biology*, vol. 2836, no. 2, pp. 227-236, 2002.
- [18] Y.-T. Wang, W.-J. Yang, C.-L. Li, L. G. Doudeva, and H. S. Yuan, "Structural basis for sequence-dependent DNA cleavage by nonspecific endonucleases.," *Nucleic Acids Research*, vol. 35, no. 2, pp. 584-94, Jan. 2007.
- [19] Y.-ting Wang, W.-jen Yang, C.-lung Li, L. G. Doudeva, and H. S. Yuan, "Structural basis for sequence-dependent DNA cleavage by nonspecific endonucleases," *Access*, vol. 35, no. 2, pp. 584-594, 2007.
- [20] K.-C. Hsia, C.-L. Li, and H. S. Yuan, "Structural and functional insight into sugar-nonspecific nucleases in host defense," *Current Opinion in Structural Biology*, pp. 126-134, 2005.
- [21] A. J. Pommer et al., "Mechanism and cleavage specificity of the H-N-H endonuclease colicin E9.," *Journal of molecular biology*, vol. 314, no. 4, pp. 735-49, Dec. 2001.
- [22] W. Ku et al., "The zinc ion in the HNH motif of the endonuclease domain of colicin E7 is not required for DNA binding but is essential for DNA hydrolysis," *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 7, pp. 1670-1678, 2002.
- [23] B. Gyurcsik et al., "Cloning, purification and metal binding of the HNH motif from colicin E7.," *Protein expression and purification*, vol. 89, no. 2, pp. 210-8, Jun. 2013.
- [24] K.-C. Hsia, K.-F. Chak, P.-H. Liang, Y.-S. Cheng, W.-Y. Ku, and H. S. Yuan, "DNA binding and degradation by the HNH protein ColE7.," *Structure (1993)*, vol. 12, no. 2, pp. 205-14, Feb. 2004.

- [25] T. S. Diego and S. D. Supercomputer Center, "Protein Data Bank," *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*. .
- [26] H. Huang and H. S. Yuan, "The conserved asparagine in the HNH motif serves an important structural role in metal finger endonucleases.," *Journal of molecular biology*, vol. 368, no. 3, pp. 812-821, May 2007.
- [27] K. B. Levin et al., "Following evolutionary paths to protein-protein interactions with high affinity and selectivity.," *Nature structural & molecular biology*, vol. 16, no. 10, pp. 1049-55, Oct. 2009.
- [28] C. Y. Wu, Y. C. Chen, and C. Lim, "A structural-alphabet-based strategy for finding structural motifs across protein families.," *Nucleic acids research*, vol. 38, no. 14, p. e150, Aug. 2010.
- [29] Z. Shi, K.-F. Chak, and H. S. Yuan, "Identification of an essential cleavage site in ColE7 required for import and killing of cells.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 26, pp. 24663-8, Jul. 2005.
- [30] I. Schrödinger, "No Title." [Online]. Available: www.pymol.org.
- [31] "Vegazz." [Online]. Available: http://nova.disfarm.unimi.it/cms/index.php?Software_projects:VEGA_ZZ.
- [32] L. G. Essmann, U. L. Perera, M.L., Berkowitz, T., Darden, Lee, H., and Pedersen, "A smooth particle mesh ewald potential," *Journal of Chemical Physics*, vol. 103, pp. 8577–8592, 1995.