
Egy transzkripciós aktivátor fehérje lehetséges alkalmazása toxikus fémionok szelektív kimutatásában

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

Balogh Ria Katalin, II. Vegyész MSc

Témavezetők:

Dr. Gyurcsik Béla, egyetemi docens

Dr. Jancsó Attila, egyetemi adjunktus



SZTE, TTIK, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Szeged, 2014

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések.....	1
1. Bevezetés.....	2
2. Irodalmi Hátér	3
3. Célkitűzés	9
4. Alkalmazott kísérleti eljárások.....	10
4.1. A polimeráz láncreakció.....	10
4.2. Az új plazmid DNS kialakítása és a baktériumok transzformálása.....	10
4.3. A pMW219-copA-EGFP vektor sikeres kialakításának ellenőrzése.....	11
4.4. Agaróz gélelektroforézis	12
4.5 A CueR és az EGFP fehérjék kifejezése a mikroszkópos vizsgálatokhoz	12
4.6 A CueR fehérje kifejezése tisztítás céljából	13
4.7. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)	13
4.8. Fluoreszcencia mikroszkópia	14
4.9. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)	15
4.9.1. Gélzsűrés (GF)	16
4.9.2. Ioncsere kromatográfia (IEX).....	16
4.9.3. Affinitás kromatográfia (AC).....	17
4.9.4. A CueR fehérje tisztításának módszere	17
4.10. Tömegspektrometria.....	19
4.11. Fehérje koncentrációjának meghatározása UV-látható spektroszkópiával	21
4.12. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia	22
5. Kísérleti eredmények és tárgyalásuk	23
5.1. A copA-EGFP gén előállítása	23
5.2. A CueR transzkripció válaszának tanulmányozása fluoreszcencia mikroszkóppal.....	25
5.3. A CueR fehérje kifejezése és tisztítása, valamint ezek ellenőrzése tömegspektrometriával	27
5.4 A CueR fehérje vizsgálata Cirkuláris Dikroizmus (CD) spektroszkópiával	33
6. Összefoglalás.....	35
7. Felhasznált Irodalom	36
8. Köszönetnyilvánítás	37

RÖVIDÍTÉSEK

AC	(Affinity Chromatography) Affinitás kromatográfia
Amp	Ampicillin
Asp	Aszparaginsav
BamHI	Restrikciós endonuláz, hasítási hely G-GATCC
BL21	<i>E. coli</i> törzs neve
CD	(Circular Dichroism) Cirkuláris Dikroizmus
CueR	(Cu efflux Regulator) Cu-efflux szabályzó fehérje
CV	(Column Volume) Oszloptérfogat
Cys	Cisztein
DAPI	(4',6-diamidino-2-phenylindole) 4',6-diamidino-2-fenilindol
ddNTP	Didezoxiribonukleozid-5-trifoszfát
DH10B	<i>E. coli</i> törzs neve
dNTP	Dezoxiribonukleozid-5-trifoszfát
DTT	Ditio-treitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> baktérium
EcoRI	Restrikciós endonuláz, hasítási hely G-AATTC
EGFP	(Enhanced Green Fluorescent Protein) Módosított zöld fluoreszcens fehérje
ESI	(Electrospray Ionization) Electro-porlasztásos ionizáció
GFP	(Green Fluorescent Protein) Zöld fluoreszcens fehérje
His	Hisztidin
HPLC	(High Performance Liquid Chromatography) Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
IEX	(Ion Exchange) Ioncsere
IPTG	Izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
Kan	Kanamycin
kbp	(Kilo Base Pair) Ezer bázispár
LB	Luria-Bertani tápközeg
MerR	(Mercuric resistance operon regulatory protein) Hg ^{II} -szelektív szabályzó fehérje
MS	(Mass Spectrometry) Tömegspektrometria
OD600	(Optical Density) 600 nm hullámhossznál mért optikai sűrűség
PAGE	Poliakrilamid-Gélelektroforézis
PCR	(Polimerase Chain Reaction) Polimeráz láncreakció
pET21a	DNS plazmid
pI	Izoelektromos pont
pMW219	DNS plazmid
RFP	(Red Fluorescence Protein) Piros fluoreszcens fehérje
rpm	(Revolution Per Minute) Percenkénti fordulatszám
SDS	(Sodium-dodecyl-sulphate) Nátrium-dodecil-szulfát
Ser	Szerin
TOF	(Time of Flight) Repülési idő
YFP	(Yellow Fluorescence Protein) Sárga fluoreszcens fehérje
ZntR	(Zn ^{II} -responsive transcriptional regulator) Zn ^{II} -szelektív szabályzó fehérje

1. BEVEZETÉS

Az élő szervezetek számára számos átmenetifém-ion alapvető jelentőségű, azonban túl nagy mennyiségben már mérgező hatásuk lehet. Emiatt a fémion-háztartás, azaz a fémionok megfelelő szintjét biztosító folyamatok szigorúan szabályozottak a sejtekben. Az átmenetifém-ionok elsősorban a fehérjék és enzimek működésében játszanak szerepet, például megtalálhatók aktív központokban, ko-faktorként katalizálhatnak oxidációs/redukciós és hidrolitikus folyamatokat, vagy a működőképes molekulaszerkezet kialakulását segíthetik elő.

A fémion-háztartás, vagy homeosztázis különböző szállítási (transzport), raktározási, átalakítási és szabályzási folyamatok összessége. Transzportfolyamatok biztosítják, hogy a fémionok megfelelő mennyisége juthasson a környezetből a sejtbe, illetve ott a felhasználás helyére. A sejt számára káros fémion-szint elérésekor a felesleg eltávolítását célzó folyamatok indulnak el. Ellenben, ha a fémion sejten belüli koncentrációja lecsökken, a sejt részben a saját raktárkészleteiből, részben a külső környezetből felvéve pótolja a hiányzó mennyiséget. [1]

A baktériumokban az átmenetifém-ionok koncentrációjának optimális értéken tartásában alapvető szerepet játszanak az úgynevezett fémszabályzó fehérjék. Ezek a molekulák csak egy adott fémionra, vagy a fémionok egy csoportjára szelektívek és érzékenyek. [2] A fémszabályzó fehérjéknek ez a különleges tulajdonsága számos lehetőséget nyújthat fémionok szelektív megkötésére, illetve a jelenlétük jelzésére alkalmas rendszerek létrehozására. Jelen doktori munka témája a CueR (Cu efflux Regulator) fémszabályzó fehérje szelektivitásának tanulmányozása a biológiai válaszreakció módosításával, illetve a fehérje tisztítása és a különböző fémionok szerkezetre gyakorolt hatásának vizsgálata. Reményeink szerint egyszerre fejlesztünk egy, a fémionok jelenlétére szelektív választ adó rendszert, és nyerhetünk információt a CueR fehérje működési mechanizmusáról is.

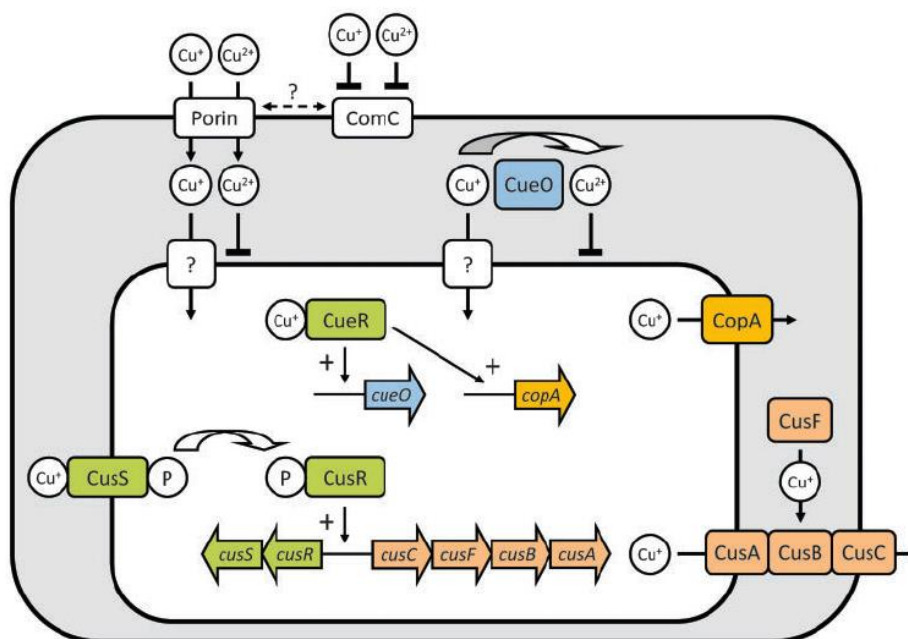
2. IRODALMI HÁTTÉR

A biológiai evolúció kezdetén a réz főként vízben oldhatatlan, az élő szervezetek által nem hasznosítható kémiai formában volt jelen a környezetben. A réz biológiailag csak az oxigén atmoszférában történő megjelenése után vált hozzáférhetővé. Két jellemző oxidációs állapotban, Cu^{I} - és Cu^{II} -ion formában található a sejtekben, és emiatt (is) redoxi enzimek ko-faktora lehet. Számos réztartalmú enzimet ismerünk, melyek különböző szerveződési szinteken, a baktériumoktól egészen az emberi szervezetig előfordulnak (pl.: amin-oxidáz, citokróm c oxidáz, nitrit oxidáz, szuperoxid dizmutáz és tirozináz). Ezek fontos szerepet töltenek be a sejtben belüli metabolikus folyamatokban, beleértve az oxidatív stressz elleni védekezést is.

A szükségesnél nagyobb mennyiségben a réz igen mérgező az élő sejtek számára. Reakcióba lép a fehérjék szabad tiolcsoportjaival, destabilizálja a vas-kén ko-faktorokat, nem réz-kötő fehérjékhez koordinálódik, megakadályozva azok megfelelő működését, illetve reaktív szabadgyökök kialakulását segítheti elő. A rézháztartás felborulása az emberi szervezetben komoly betegségeket okoz, mint például a Wilson vagy a Menkes szindróma. Ezért a sejteknek a rézháztartást szigorúan kell szabályozniuk. [3]

A prokariótákban a fémionok szintjének beállítása leggyakrabban transzkripciós szabályzó mechanizmussal, fehérjék segítségével történik. Ezek a molekulák 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 transzporterek, sejtben belüli kelátorok, ill. oligopeptidek (metallothioneinek, MT), és detoxifikáló enzimek termelődését. [4]

Az *Escherichia coli* (*E. coli*) baktériumban a Cu^{II} -ionok a porin csatornákon keresztül jutnak be a periplazmába, ahonnan csak a Cu^{I} -ion kerülhet át a belső membránon keresztül a citoplazmába. Ez utóbbi folyamat mechanizmusa még nem ismert. A külső membrán ComC fehérjéje csökkenti a membrán átjárhatóságát a réz-ionok számára, valószínűleg a porin csatornákkal való kölcsönhatása révén. A citoplazmából a CopA ATPáz és a sok komponensből álló CusCFBA rendszer segítségével a Cu^{I} -ionok a periplazmába vagy a sejtben kívüli térbe kerülnek. A periplazmában lévő CueO oxidáz a Cu^{I} -ionokat a kevésbé toxikus Cu^{II} -ionokká alakítja át, ezzel megakadályozva annak újbóli bejutását a citoszolba (1. ábra). [3]

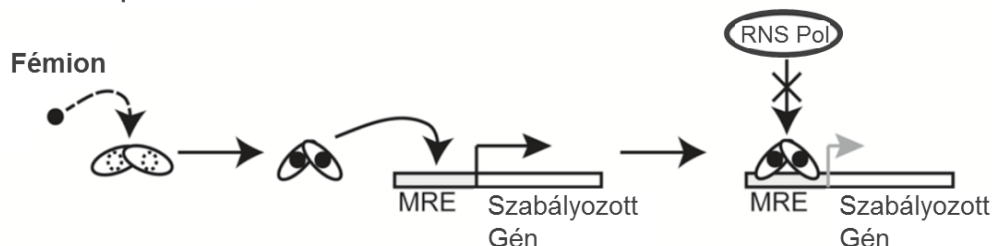


1. ábra: Az *E. coli* baktérium réz homeosztázisának sematikus bemutatása. [3]

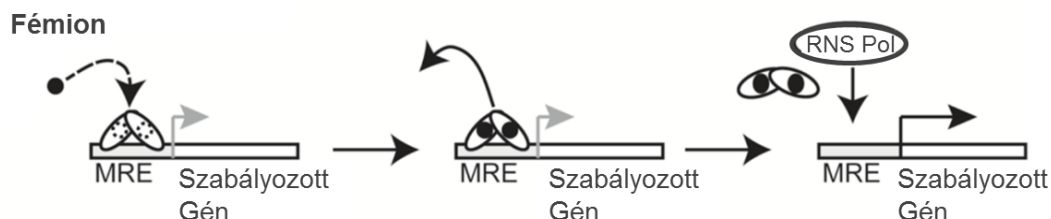
Az előbbieken említett CopA ATPáz és CueO oxidáz termelődését réz-ionok feleslegének megjelenése indukálja a CueR fémszabályzó fehérjén keresztül. A fémion-stressz kialakulásakor ezen szabályzó mechanizmus óvja meg a sejtet a mérgezésről. [2]

A következőekben a fémszabályzó fehérjék működésére térek ki, beleértve a CueR fehérjét is. Ezek a specializálódott fehérjék háromféle mechanizmus szerint szabályozhatnak (2. ábra). Az első az úgynevezett korepresszió (co-repression), amikor a fémion a szenzorfehérjéhez koordinálódik. A kialakult komplexben a fehérje a DNS operátor régiójához kapcsolódik, és a transzkripció szintjén gátolja fémion felvételét elősegítő fehérjék kifejeződését. A második lehetséges szabályzási mechanizmus a derepresszió (derepression), amelynek során a fémion a DNS-hez kötött szenzorfehérjéhez koordinálódik, ami viszont csökkenti a fehérje affinitását a DNS-hez. 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. Ennek során a fémion a DNS-hez kötődő apo-fehérjéhez koordinálódik, aminek hatására konformáció-változások történnek a fehérjében. Ez a DNS szerkezetét oly módon változtatja meg, hogy az RNS polimeráz működésbe léphet és elindul a gének átírása. Az aktiválás során is olyan fehérjék termelődnek, melyek eltávolítják a feleslegben lévő fémionokat. [1]

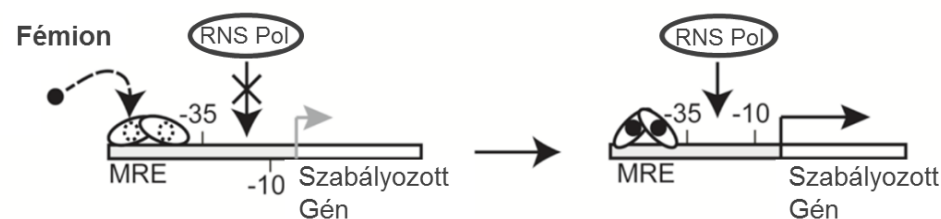
A. Korepresszió



B. Derepresszió

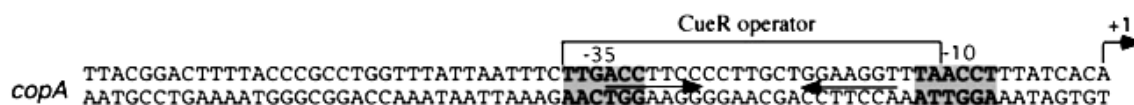


C. Aktiváció



2. ábra: A fémszabályzó fehérjék működésének három ismert mechanizmusa. [5]

A CueR a MerR fehérjecsalád egyik tagja. A MerR fehérjékre jellemző a nagy aminosav-szekvenciabeli és szerkezeti hasonlóság, valamint az, hogy a transzkripciót aktivációs mechanizmussal szabályozzák. [6] A dimer felépítésű fehérjék *N*-terminális, DNS-kötő szakasza egy hélix-kanyar-hélix- β -hajtókanyar motívumot tartalmaz, melyet egy viszonylag hosszú dimerizációs hélix köt össze a molekula *C*-terminális végén található a rendszerint már jelentősebb eltéréseket tartalmazó fémion-kötő doménnel. Ezek a szerkezeti különbségek a *C*-terminális részen lehetővé teszik, hogy a MerR család egyes tagjai különféle fémionokat szelektíven érzékeljenek. [4] A CueR fehérje *N*-terminális vége a DNS operátor régiójához kötődik a -35 és -10 promóter helyek között elhelyezkedő 19 - 20 bázispár hosszúságú szakaszon (3. ábra).



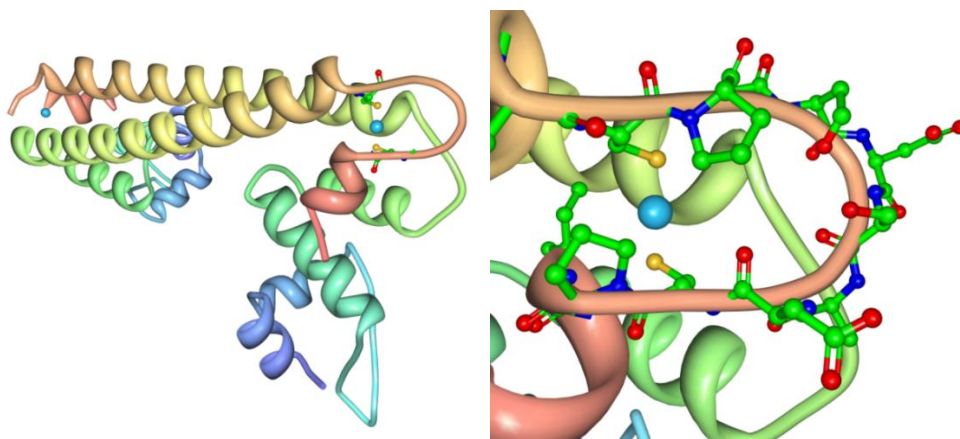
3. ábra: A *copA* promóter szekvenciája, bejelölve rajta a CueR fehérje kötődésének helye.

A fémiont nem kötő, de a DNS-hez kapcsolódó apo-fehérje csak gyenge kölcsönhatást tesz lehetővé az RNS polimeráz és a DNS között. Így a transzkripció nem lehetséges, mert a CueR fehérje gyakorlatilag inhibeálja azt. Ha megfelelő fémion koordinálódik a fehérjéhez, annak konformációja megváltozik, aminek hatására a DNS szerkezete jelentősebben "megtörik", a kettős hélix "kicsavarodik". Ezzel a kötőhely alkalmassá válik az RNS polimeráz megkötődésére, és elindul a transzkripció. [4;6]

Ezek alapján jól látszik, hogy a fémion-háztartás szabályzásának egy kulcsfontosságú lépése a fémion koordinációja a szabályzó fehérjéhez. A két fémkötő hurok a monomer egységek C-terminális végén, a dimerizációs hélix és egy rövidebb helikális szakasz között található, szimmetrikus helyzetben, távol a DNS-kötő helytől. Ez a speciális szerkezet és a – főként a fémkötő hurokban meglevő – szekvenciabeli különbségek lehetővé teszik egy- és kétértékű fémionok szelektív felismerését igen széles skálán. [4] A szoft tulajdonságú d-mezőbeli fémionok (pl. Hg^{II} , Cd^{II} , Ag^{I}) a szoft karakterű kéntartalmú donorcsoportokhoz (pl. Cys) koordinálódnak legnagyobb affinitással. A Co, Ni, Cu vagy Zn ionjai a kén mellett az oxigén- és a nitrogéntartalmú ligandumokkal is (pl. Asp, His oldalláncai) kölcsönhatásba lépnek. A felsorolt fémionok gyakran egymástól eltérő koordinációs geometriát részesítenek előnyben, ami ugyancsak jelentős tényező abban, hogy miként képesek a fehérjék a fémionokat megkülönböztetni. [1]

A MerR családon belül számos példa említhető arra, hogy az eltérő karakterű fémionok markánsan eltérő koordinációs környezetben helyezkednek el az egyes szabályzó fehérjékben, ami a fémion-szelektivitásban is szerepet játszhat. Az egyértékű fémionokra (Cu^{I} , Ag^{I} , Au^{I}) szelektív *E. coli* CueR, illetve a kétértékű fémionokat (elsősorban Zn^{II}) érzékelő ZntR röntgen diffrakciós mérésekkel meghatározott szerkezete között több kulcsfontosságú különbség figyelhető meg. A MerR fehérjékre általánosan jellemző, hogy a dimerizációs hélixek N-terminális végével szemközi helyzetben a másik monomer-egységen található jól megőrzött aminosav kritikus fontosságú a fémion-szelektivitás kialakításában. Az egyértékű fémion érzékelő MerR regulátorokban egy szerin aminosav található itt (a CueR-ben Ser77), míg a kétértékű fémion 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 körül egy védelmet nyújtó hidrofób környezet létrejöttét segíti. Ezzel ellentétben a ZntR-ben a Cys79 közvetlenül koordinálódik a fémkötő szakaszhoz kötődő két Zn^{II} -ion egyikéhez. Így hozzájárul a Zn^{II} számára kedvezőbb

koordinációs szám és geometria kialakulásához. A CueR C-terminális végén elhelyezkedő rövid hélix dipólusa is szerepet játszik a fémkötés stabilizálásában. A kialakuló $S^-Cu^+-S^-$ centrum negatív töltésével szemben a környező aminosavak, illetve a C-terminális α -hélix parciális pozitív töltése jelentős töltés-közömbösítést hoz létre. A Cu^I -ionok lineáris ditiolát típusú koordinációját emellett egyéb hidrogénhidás és elektrosztatikus kölcsönhatások is stabilizálják. [7] Itt fontos megemlíteni, hogy a lineáris koordinációs geometria, azaz a ditiolát jellegű kötés a Hg^{II} számára is nagyon kedvező lenne, de feltehetőleg éppen az említett elektrosztatikus okoknak köszönhetően a CueR fehérjében ez a kötésmód kevésbé előnyös a Hg^{II} -ion számára. [2] In vitro vizsgálatokkal kimutatták, hogy a fehérje egyértékű fémionok (Cu^I , Ag^I , Au^I) jelenlétében transzkripció aktivitást mutat, de ez a válasz kétértékű fémionok (Zn^{II} , Hg^{II}) esetében elmarad. [7] A CueR szerkezete észszerű magyarázatot adhat erre, viszont tisztázatlan, hogy az egyértékű fémionok közül hogyan képes specifikusan „kiválogatni” a Cu^I -ionokat? A Cu^I -, Ag^I - és Au^I -ionokkal nyert CueR kristályszerkezetekről megállapították, hogy azok izomorf sajátosságúak, s a három fémionra adott biológiai válasz is nagyon hasonló. Az $S-Cu-S$ lineáris kötést a Cys112 és Cys120 aminosavak hozzák létre, ahol a $S-Cu$ kötés hossza 2,13 Å, a kötés csaknem lineáris ($\angle_{S-Cu-S} = 176^\circ$) (4. ábra). Az Ag^I -, illetve az Au^I -ionok fehérjekomplexében kis eltérés figyelhető meg, a kötéshosszak logikusan valamivel nagyobbak: az $Ag-S$ távolság 2,35 Å, míg az $Au-S$ kötéshossz 2,32 és 2,39 Å. [4;7]



4. ábra: Az *E. coli* CueR fehérje Cu^I -formájának röntgenszerkezete [PDB kód: 1Q05] (balra), illetve a fémion koordinációs környezetét szemléltető kinagyított fémkötő hurok (jobbra). [7]

A szelektivitás kulcsa a fémion számára kedvező, előre kialakított geometria, a ligandumok által kialakított hely megfelelő mérete, és a környező töltéeloszlás lehet. A

fémkötő-helyek szerkezeti sajátosságai mellett feltétlenül ki kell emelni, hogy az adott szabályzó molekula szelektivitásában alapvető jelentőségű, hogy egy adott fémion megkötődése milyen változásokat okoz a fehérje szerkezetében, hiszen ez jelentősen befolyásolhatja annak DNS-hez való affinitását, s így a funkció betöltését is. [2]

Az élő sejtekben végbemenő folyamatok követése meglehetősen bonyolult feladat. Az egyik legszélesebb körben alkalmazott módszer, mellyel bizonyos molekulák sejten belüli eloszlása/mennyisége monitorozható, a fluoreszcencia jelenségén alapul. A fluoreszcens fehérjék, nevükből adódóan, megfelelő gerjesztés hatására fényt bocsátanak ki, ezáltal kiválóan alkalmazhatók biológiai molekulák vagy folyamatok nyomonkövetésére. A különböző foto-fizikai tulajdonságokkal rendelkező fluoreszcens fehérjéket leginkább mikroszkópiai alkalmazásoknál használják. [8] Ilyen fehérjék segítségével átmenetifém-ionok kimutatására alkalmas fluoreszcens szenzorok hozhatók létre.

Az élő-sejtes bioszenzorok baktériumok és egy jelátalakító berendezés összekapcsolásával hozhatók létre. A jelátalakítók a sejt választ alakítják elektromos jellé. Erre legalkalmasabbak az optikai és elektrokémiai jelátalakítók. Elektrokémiai élő-sejtes bioszenzorok esetében a baktériumokat egy amperometriás vagy potenciometrás elektródon rögzítik. Optikai élő-sejtes bioszenzoroknál pedig a sejtek immobilizációja egy optikai szálon történik, amivel abszorbancia, lumineszcencia vagy fluoreszcencia mérhető. [9] Az első sejt alapú bioszenzorok esetében az analitikai jelet a toxikus anyagok jelenléte miatt megváltozott sejt-légzés termékek adták. Ma azonban a kutatások egyre inkább a sejtek által egy bizonyos komponens jelenlétére adott biológiai válasz megfigyelésére, illetve jelzésére irányulnak. A sejtek ugyanis folyamatosan monitorozzák mikro-környezetüket, és annak valamilyen tulajdonságának megváltozására speciális génekről fehérjék kifejezésével válaszolnak. [9] A sejtek természetes sajátsága, hogy mérgező anyagokkal szemben védekező mechanizmusokkal rendelkeznek. Ha úgy módosítjuk a védekező mechanizmusokat kódoló géneket, hogy a védelmi funkció betöltése közben valamilyen közvetítő anyagot is termeljenek, akkor a toxikus anyag jelenléte a közvetítő molekula megjelenéséhez vezet, amit elektrokémiai vagy optikai jelként detektálhatunk. Ezen az elven már készítették bioszenzorokat toxikus fémionokra, aromás vegyületekre és genotoxinok kimutatására is. [9]

A fluoreszcens szenzorok és a fluoreszcens mikroszkópia együttes alkalmazása, egyéb analitikai módszerekkel kombinálva, segíthet meghatározni a sejtek adott térrészében lévő fémionok mennyiségét, illetve jobban megérteni a sejten belüli fémion-háztartás működését. [10]

3. CÉLKITŰZÉS

Az irodalmi áttekintésből kiderül, hogy még a legalaposabban tanulmányozott fémregulátor fehérjék esetében is számos, a szabályozó mechanizmusukat érintő kérdés maradt megválaszolatlan. Egyebek mellett továbbra sem teljesen tisztázott, hogy mi okozza e fehérjék szelektivitását az adott fémionokra. A CueR fehérje kristályszerkezetét egyértékű fémionokkal (Cu^I , Ag^I , Au^I) már korábban meghatározták. Az eddigi kutatások alapján a CueR csak az egyértékű fémionok jelenlétében ad biológiai választ, azaz indukálja a transzkripció folyamatát, ami a Zn^{II} - illetve Hg^{II} -ionok esetén elmarad. Azonban a röntgenkristallográfiás módszerrel meghatározott fehérjeszerkezet alapján, a fémkötő hurokban kialakuló lineáris koordinációs geometria a Hg^{II} -ionok számára is kedvező.

A Diákköri munkám a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjának toxikus fémionokkal, ezen belül a CueR fémszabályzó fehérjével kapcsolatos kutatásainak részét képezi. Célunk egyrészt olyan detektálási eljárás kidolgozása, aminek segítségével a sejten belül jelezhetjük a külső környezetben megjelenő fémionok hatására lejátszódó szabályzási folyamatokat. Kísérleteinkben a CueR fehérje transzkripciót aktiváló tulajdonságát használjuk ki úgy, hogy a fémion megkötésének hatására a sejten belül egy fluoreszcens fehérje fejeződjön ki. A MerR fehérjék nagy szelektivitása lehetőséget teremt olyan módosított baktériumok kialakítására, melyek a későbbiekben fluoreszcens biológiai szenzorokként is működhetnek.

Ezzel egyidejűleg arra is megpróbálunk választ keresni, hogy miként történik a fémionok felismerése a CueR fehérjében, és a fémionok megkötése hogyan befolyásolja a szabályozási folyamatot. Ezért célul tűztük ki az *E. coli* CueR fehérje előállítását is *E. coli* baktériumsejtekben, ami magába foglalja a fehérje kifejezésének, valamint a tisztítási eljárásnak az optimalizálását is. A megfelelő tisztaságú CueR fehérje szerkezetét és koordinációs sajátságait egy-, illetve kétértékű d^{10} fémionokkal, különböző spektroszkópiai módszerek segítségével tervezzük vizsgálni.

4. ALKALMAZOTT KÍSÉRLETI ELJÁRÁSOK

4.1. A polimeráz láncreakció

A polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction, PCR) ciklikus, polimerizáción alapuló DNS sokszorosítására alkalmas módszer. A reakció során a mintaként (templátként) szolgáló kétszálú DNS szakaszt DNS polimerázzal, a szubsztrátként felhasznált dezoxiribonukleozid-5-trifoszfátokkal (dNTP) és a sokszorosításra kijelölt DNS szakasz két szálának 3'-végén lévő szekvenciával komplementer oligonukleotid primerekkel (indító szekvenciákkal) keverjük el. 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 lehűtés során rövid oligonukleotid primerek hibridizálódnak, kijelölve ezáltal a polimerizáció kezdőpontját
3. polimerizáció (extension): optimális hőmérsékleten az enzim a primert meghosszabbítva előállítja a komplementer láncot 5'→3' irányban

E három lépés ciklikusan ismétlődik, az egyes ciklusokban képződött kétszálú DNS mindkét szála a következő ciklusban templátként működik, ami exponenciális sokszorozást eredményez.

A primerek helyes tervezése fontos az eljárás sikere szempontjából. Általában 17 - 30 nukleotid 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 működéséhez a fentiekén túl Mg^{2+} -ionok és megfelelő puffer szükségesek. Az alkalmazott termofil DNS polimerázok magas hőmérsékleten is stabilisak, aktívak. Ilyen pl. a KOD-plus (Toyobo) polimeráz is, melynek 95 °C-on 12 óra a félélet-ideje, átlagosan 3,4 hiba/100000 bázispár pontossággal működik.

4.2. Az új plazmid DNS kialakítása és a baktériumok transzformálása

Ahhoz, hogy a PCR-ben előállított gént a baktériumba juttathassuk először egy hordozó cirkuláris DNS-be, ún. vektorba (esetünkben pMW219, Novagen) építettük be. Ehhez restriktációs endonukleázokat használtunk. Ezek olyan, baktériumokból izolált enzimek, melyek a DNS specifikus helyen – sokszor ún. palindrom szekvenciáknál – történő hidrolitikus hasítására

képesek. A hasítás során tompa vagy túlnyúló, ún. ragadós vég képződhet. Eltérő ragadós végekkel 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 EcoRI és BamHI enzimeket (Fermentas) választottuk. A kialakított DNS molekulák ragadós végeit ligáz enzimmel kapcsoltunk össze, a DNS szálak 5' foszfát- és 3' hidroxil-csoportjai közötti foszfodiészter kötések kialakításával. A ligáláshoz 2,5 µl ligáz enzimet is tartalmazó Ligation High (Toyobo) oldathoz 2 µl hasított pMW219 plazmidot (59,1 ng/µl), 0,5 µl fragmenst (48,0 ng/µl) és 0,5 µl 10 mM Tris pH 7,9 puffert adtunk, majd 2 órán át inkubáltuk 16 °C-on.

A fentiek szerint kialakított új pMW219-copA-EGFP, illetve a már meglévő, pET21a-CueR vektorokat transzformálás során juttattuk be a baktériumsejtekbe. A vektorokat tartalmazó oldatot kompetens – transzformáláshoz előkészített – sejtekhez adtuk, majd 37 °C-os hő sokkot alkalmaztunk. Ennek hatására a sejtfalon keresztül a vektorok bejutottak a sejtekbe. Végül visszahűtve 4 °C-ra, a sejtfal újra átjárhatatlan lesz a DNS számára. Különböző célokra különböző kompetens *E. coli* sejteket használtunk: a DNS sokszorosításához DH10B, a fehérje termeléséhez BL21 baktériumtörzset. A transzformálás után a baktériumokat 0,1 mg/ml ampicillint és 0,1 mg/ml kanamicint is tartalmazó táptalajra (a továbbiakban: LB+Amp/Kan lemez) kentük ki, ahol csak azok a baktériumok hoztak létre telepeket, melyek mindkét vektort, azaz mindkét antibiotikum rezisztencia génjét hordozták.

4.3. A pMW219-copA-EGFP vektor sikeres kialakításának ellenőrzése

A sejt, vagy „colony” PCR-ben közvetlenül egy-egy baktériumtelepből vett minta szolgáltatja a templát DNS-t, amihez specifikusan tapadó primerek segítségével sokszorozunk a beillesztett génszakaszt. Mivel a plazmidokról sokszorosítható PCR termék 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 bázis szekvenciájának meghatározásával is ellenőriztük a Tsukubai Egyetemen. A vizsgálandó génszakaszt PCR-ben készítettük elő, amelynek során az előbbiekben felsoroltaktól eltérően csak az egyik szálhoz tapadó primert alkalmaztuk, továbbá olyan ddNTP elegyet is hozzáadtunk, melyben a 4 különböző ddNTP-t különböző fluoreszcens festékkel jelölték meg. A dNTP-k helyett véletlenszerűen beépülő ddNTP-k miatt a

polimerizáció leáll, így a reakció végén statisztikusan minden lehetséges hosszúságú DNS szakasz előáll, melyek 3'-végén valamilyen fluoreszcens nukleotid található. E DNS szakaszokat méretük alapján kapilláris gélelektroforézissel elválasztjuk 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 gélelektroforézis a 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 mérete, alakja és az agaróz gél koncentrációja is befolyásolja. Az egyes fragmensek pontos helye a gélben közvetlenül meghatározható egy alkalmas, ismert méretű DNS fragmensek elegyét tartalmazó marker alapján. A DNS-t a kettős szálba beékelődve fluoreszcenciát mutató festékkel, etídium-bromiddal detektáljuk. Szükség esetén a DNS izolálható a gélből és felhasználható további célokra.

4.5 A CueR és az EGFP fehérjék kifejezése a mikroszkópos vizsgálatokhoz

Miután megbizonyosodtunk róla, hogy a megfelelő fehérjét kódoló DNS szakasz található az előállított plazmidban, kifejeztük a fehérjét. Ehhez először a pET21a-CueR és pMW219-copA-EGFP plazmidokat tartalmazó baktériumtelepek tápoldatba történő átoltásával baktériumkultúrát tenyésztettünk $OD_{600} \sim 0,4$ optikai sűrűség eléréséig. Ezután 0,2 mM végső koncentrációjú IPTG (izopropil- β -D-tio-galaktopiranozid) hozzáadásával indukáltuk a CueR 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, jelen esetben CueR termelődik. Az így termelődő CueR a pMW219-copA-EGFP plazmidhoz, a fentiek szerint kialakított copA promóter régióhoz köt, ezzel gátolva a transzkripciót. Az EGFP termelését az IPTG-vel egyidőben hozzáadott $CuSO_4$ -oldattal indukáltuk. A Cu^{II} -ionok a sejtekbe jutva Cu^I -ionokká redukálódnak. Az aktivációs mechanizmusnak köszönhetően ezek az ionok a CueR fehérjéhez koordinálódva indukálják a transzkripciót. A módosított plazmidról azonban nem a CopA fehérje, hanem az EGFP

kifejeződése indul el. Az indukálás után a baktérium-tenyészeteket 20 °C-on inkubáltuk 6 illetve 20 órán át. Ezután a sejteket fluoreszcencia mikroszkóppal vizsgáltuk. A tárgylemezek elkészítéséhez 5 µl baktérium kultúrát és 5 µl 4 %-os para-formaldehid oldatot használtunk. A fixált baktériumokban lévő nukleinsavakat DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) fluoreszcens festékkel tettük láthatóvá. Az interkalált vegyületnek emissziós maximuma 461 nm hullámhosszúságnál van, azaz kék fénnel fluoreszkál. Ennek segítségével a különböző minták esetén sejtek száma és mérete összehasonlítható.

4.6 A CueR fehérje kifejezése tisztítás céljából

A CueR tisztításához a pET21a-CueR plazmidot tartalmazó baktériumokat LB+Amp lemezekre kentük ki, és inkubáltuk 37 °C-on. Előkultúra készítéséhez egy telepet 50 ml LB+Amp tápoldatba oltottunk be, majd inkubáltuk 37 °C-on 250 rpm rázatás mellett az OD₆₀₀ 0,6-1,0 optikai sűrűség eléréséig. A sejteket 10 percig tartó 1800 × g centrifugálással összegyűjtöttük, majd 50 ml frissen készített LB+Amp tápoldatban reszuszpendáltuk. Az így elkészült előkultúrából 6,5 ml-t átoltottunk 650 ml LB+Amp tápoldatokba, 30 °C-on 250 rpm rázatás mellett inkubáltuk. Előzetes vizsgálataink alapján a CueR kifejezéséhez a 20 °C-on, egy éjszakán át tartó indukálás az optimális. Emiatt, amikor a kultúrák optikai sűrűsége elérte a 0,1 értéket, az inkubálást 20 °C-on folytattuk tovább. Egy óra elteltével, mikor a tápoldatok hőmérséklete megfelelően lecsökkent, és az OD₆₀₀ elérte a 0,4-0,6 értéket, 0,1 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk a fehérje kifejezését.

Az indukált sejteket tartalmazó tápoldatokat másnap centrifugáltuk (4 °C, 3000 × g, 15 perc). Az így összegyűjtött sejteket reszuszpendáltuk a megfelelő pufferben (ami általában az első tisztítási lépés puffere), majd újra centrifugáltuk. A puffer leöntése után, az átmosott sejteket -80 °C-on tároltuk a későbbi felhasználásig.

4.7. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

A PAGE során N,N-metilén-bisz-akrilamiddal keresztkötött akrilamid polimerek által létrehozott gélben futtatjuk a mintákat. A polimerizáció szabadgyökök 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 koncentrációjának és arányának változtatásával befolyásolhatunk. A gélben SDS (nátrium-dodecil-szulfát) és merkaptóetanol segítségével denaturált

fehérjemolekulák méretükkel arányos negatív töltésük révén (a hozzájuk kötődő dodecilszulfátionok miatt) egyenáramú elektromos tér hatására azonos irányban vándorolnak, és méretük alapján elválaszthatók egymástól.

Az analízishez 20 µl fehérjemintához 5 µl merkaptóetanolt, SDS-t és festéket tartalmazó puffert adtunk. A mintákat 8 percig 82 °C-on denaturáltuk, majd felvittük az Any kD™ Mini-PROTEAN®TGX™ (Bio-Rad) gélre. Az elektroforézist Bio-Rad készülékkel, 70 percig 100 V feszültség alkalmazásával végeztük. A futtatás befejeztével a gél 30 percig fixáltuk (fixáló oldat: 400 ml 96% Etanol, 100 ml jégecet, 500 ml víz), egy óráig festettük Comassie Brilliant Blue G-250 (Reanal) festék segítségével, majd a fehérjéket előhívó oldattal (100 ml jégecet, 900 ml víz) tettük láthatóvá.

4.8. Fluoreszcencia mikroszkópia

Lumineszcencia jelenségén az anyagok spontán fény emisszióját 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: az átlagos fluoreszcens élettartam ~ 10 ns. Fluoreszcencia mikroszkóp használata egyre elterjedtebb a kémiai és biológiai folyamatok követésére, különböző anyagok jelenlétének kimutatására. Megfelelő szűrők és lencserendszer használatával molekulák megjelenítése is lehetséges. A fluoreszcens mikroszkópok fontos részei a monokromátorok, melyek a fényforrásból érkező inhomogén elektromágneses sugárzás, egy adott hullámhosszúságú komponensét engedi át. A fluoreszcencia mikroszkópia során a gerjesztő fény megfelelő komponensét excitációs szűrő, a mintából(ról) a detektorba érkező fény detektálni kívánt komponensét emissziós szűrő segítségével különítjük el.

A zöld fluoreszcens fehérjét (green fluorescent protein, GFP) az 1960-as években izolálták az *Aequorea victoria* medúzából. Megfigyelték, hogy a sejtben jelenlévő, másik fehérje kékes fény felvillanást hoz létre, ami gerjeszti a GFP-t, mely így zöld fényt emittál. Későbbiekben a GFP-t számos alkalmazási lehetősége tette népszerűvé. Ma már számos módosított típusa érhető el, melyek akár sárga (YFP) vagy piros (RFP) fény kibocsájtásával relaxálnak. Kísérleteinket egy CARL ZEISS LSM700 konfokális lézer-szkennelő mikroszkóppal (Zeiss) végeztük. A fluoreszcens fehérje gerjesztésére külső fényforrást használtunk. Az eredmények kiértékelése a ZEN szoftverrel történt.

4.9. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC)

A HPLC, vagy nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography) vegyületek elválasztására, azonosítására és mennyiségi meghatározására leggyakrabban használt kromatográfias eljárás. Mint minden kromatográfias eljárás, a HPLC is a mérendő komponens egy állófázis és egy azon meghatározott irányban áramló, nem elegyedő mozgó fázis (eluens) közötti megoszlásán alapszik. A mozgó fázisban lévő komponensek az állófázissal kialakuló kölcsönhatások miatt eltérő sebességgel haladnak keresztül az oszlopon, így elválaszthatóak egymástól. Az oszlopot elhagyó oldatban egy detektor jelzi a komponenseket valamilyen kémiai vagy fizikai tulajdonságuk mérésével. A legelterjedtebb a spektrofotometriás (UV-látható) detektor. A mérés egy speciálisan kialakított 10 µl térfogatú és 10 – 40 nm hosszúságú átfolyásos küvettában történik, állandó hullámhossz(ak)on. Az elválasztott komponensek koncentrációjával arányos detektorjel - idő függvényt kromatogramnak nevezünk.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiában a minta komponenseinek elválasztása kétféle módon lehetséges. Az egyik az ún. izokratikus elúció, ahol az eluens összetétele nem változik, a másik az ún. gradiens elúció, melynek során az eluens összetétele egy meghatározott program szerint változik. [11]

A fehérjék tisztításához is egyre gyakrabban használt módszer a HPLC. Az elválasztás mindig a tisztítani kívánt fehérje valamely, a mintában előforduló többi fehérjétől eltérő tulajdonságán alapul. Az ezek alapján használható módszereket a 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat: A fehérje tulajdonságok alapján alkalmazható kromatográfias módszerek. [12]

<i>Fehérje tulajdonság</i>	<i>Módszer</i>
Specifikus ligandum megkötés	Affinitás kromatográfia (AC)
Fémion kötés	Immobilizált fémion affinitás kromatográfia (IMAC)
Töltés	Ioncsere kromatográfia (IEX)
Méret	Gélszűrés (GF)
Hidrofóbicitás	Hidrofób kölcsönhatás kromatográfia (HIC) Fordított fázisú kromatográfia (RPC)
Izoelektromos pont	Kromatográfias fókuszálás

Manapság rekombináns DNS technológia segítségével affinitás-toldalékkal ellátott fehérjék állíthatók elő. Ilyen esetekben a tisztítás egy lépéses, ill. további módszereket csak a kisebb szennyeződések elválasztásához használnak. Az affinitás-toldalékkal nem rendelkező fehérjék tisztításához több eljárás megfelelő sorrendben történő alkalmazása szükséges. Ekkor a nagy kapacitású, de kis szelektivitású módszer alkalmazása célszerű elsőként (pl. IEX), majd ezt követően az egyre kisebb kapacitású, de nagy felbontású módszereké (pl. GF). [12]

4.9.1. Gélszűrés (GF)

A gélszűrés (gel filtration) során a minta összetevőit a molekulák mérete alapján különítjük el. A molekulák nem alakítanak ki erős kölcsönhatást az állófázissal: a kisebb molekulák az oszlop töltetének pórusaiban megrekednek, míg a nagyobbak akadálytalanul jutnak tovább. Ez a módszer a fehérjék tisztítása mellett a mintában lévő sók, illetve puffer eltávolítására, cseréjére is használható. Az izokratikus elúcióhoz különböző puffereket alkalmazhatunk, egyetlen kritérium az alacsony só koncentráció ($c = 25 - 150 \text{ mM NaCl}$). A megfelelő ionerősség megszünteti az összes gyenge elektrosztatikus kölcsönhatást a fehérjék és az oszlop töltete között. A puffer további tulajdonságait az határozza meg, hogy mi a következő tisztítási folyamat, mérés, tárolás. A hatékony elválasztás eléréséhez a mintának kis térfogatúnak, és nagy koncentrációjúnak kell lennie. Ezért a gélszűrést a leggyakrabban az ioncsere, affinitás kromatográfia vagy hidrofób kölcsönhatás kromatográfia után alkalmazzák. [12]

4.9.2. Ioncsere kromatográfia (IEX)

Az ioncsere kromatográfia (ion exchange, IEX) során az eltérő töltéssel rendelkező fehérjék és az állófázis közötti eltérő reverzibilis elektrosztatikus kölcsönhatás biztosítja az elválasztást. Ezzel a módszerrel a célfehérje tisztább, és nagy koncentrációjú formába hozható. Az ioncsere töltetek lehetővé teszik nagy áramlási sebesség használatát, a gyors megkötődés és szerkezeti merevségük révén. Az ioncserélő oszlopok kapacitása jelentős, így nagy térfogatú minták tisztítására alkalmasak.

A fehérjék töltése az oldat pH-jától függ. A fehérjéket az izoelektromos pontjuknál (pI) nagyobb pH-n pozitív töltésű anion cserélő oszlop segítségével tisztíthatjuk. Ugyanakkor a pI -nél kisebb pH-t alkalmazva a fehérjemintát negatív töltésű kation cserélő töltetű oszlopra visszük fel. IEX során növekvő só (leggyakrabban NaCl) vagy pH gradiens elúciót használunk. A folyamatosan változó összetételű elúciós puffer két oldat megfelelő arányban történő

összekeverésével állítható elő. Az egyik az ún. kötő puffer (jelölése: A), mely nem tartalmaz sót; a másik a minta lemosásához használt puffer (jelölése: B), mely általában 1 M-os a sóra nézve. Így a keveréssel 0–1 M között változik a só koncentrációja. Az egyes keverékek összetételét a B oldat százalékaival fejezik ki, mely 0-tól 100%-ig változik. A gradiens meredekségét az elúció időtartalmával, azaz a hozzá szükséges eluens térfogatával adhatjuk meg. Ehhez az alkalmazott oszlop térfogatát (angolul Column Volume, CV) használjuk egységként.

Az ioncsere lépései:

- Egyensúlyba hozás: az oszlop megfelelő pufferrel történő átmosása.
- A mintát tartalmazó tömény oldat rátöltése az oszlopra. Ekkor a töltettel elektrosztatikus kölcsönhatást kialakító fehérjék megkötődnek, a többi távozik az oszlopról.
- „A” pufferrel mosás: a gyengén vagy nem kötődő fehérjék lemosása az oszlopról.
- Eluálás: az oszlopon megkötődött fehérjék eluálása, általában növekvő ionerősséggel.
- „B” pufferrel történő mosás: a legerősebben kötődő fehérjék lemosása az oszlopról.

Regenerálás: az „A” pufferrel történő mosás, ill. a töltet elhelyezése a tároló pufferbe. [12]

4.9.3. Affinitás kromatográfia (AC)

Az affinitás kromatográfia (Affinity chromatography, AC) során a célfehérjét (vagy adott típusú fehérjéket) a köztük és az állófázis specifikus ligandumai között létrejövő reverzibilis kölcsönhatás segítségével választjuk el. Ez a kölcsönhatás lehet biospecifikus, például antitest-antigén kötődés, vagy nem-biospecifikus, mikor hisztidin tartalmú fehérjék kötődnek a fémionokhoz. Az affinitás kromatográfia nagy szelektivitású, és egyben nagy felbontású elválasztási módszer. A megkötődött fehérjék elúciója gyakran igen enyhe körülmények között is lehetséges. Elúcióhoz gyakran használható specifikus, versengő ligandum, ami nagyobb affinitása révén leszorítja a célfehérjét az állófázisról. Nem specifikus elúció is kivitelezhető a pH vagy az ionerősség megváltoztatásával. [12]

4.9.4. A CueR fehérje tisztításának módszere

A CueR különböző fémionokkal kialakított kölcsönhatásának vizsgálatához elengedhetetlen a fehérje megfelelő mennyiségű és tisztaságú előállítás. Tudományos diákköri munkám során kidolgoztunk egy erre alkalmas módszert, illetve optimalizáltuk a lépéseit. A tisztítás folyamatát az 5. ábrán foglaltuk össze.

<u>Célok</u>	<u>Tisztítási lépés</u>	<u>Megjegyzések</u>
Sejtmembrán elroncsolása, a CueR felszabadítása	Szonikálás	Előtte és utána 2 mM Na ₂ S ₂ O ₄ hozzáadása
Sejttörmelékek, oldhatatlan fehérjék elválasztása	Centrifugálás	1200 rpm, 4 °C, 20 perc
Nukleinsav kötő fehérjék közötti kölcsönhatás megszüntetése	DNáz I	8 mM MgCl ₂ és 25 µl/ml DNáz I hozzáadása
Fehérjék elválasztása negatív töltésük alapján	Anioncsere	Oszlop: HiLoad Sepharose FF Q 16/10 Kötő puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5 Elúciós puffer: 20 mM Tris/HCl, 1 M NaCl pH 7,5
Sómentesítés	Ultraszűrés	
Fehérjék elválasztása Heparinhoz való affinitásuk szerint	Affinitás kromatográfia	Oszlop: HiPrep Heparin FF 16/10 Kötő puffer: 20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl pH 7,5 Elúciós puffer: 20 mM Tris/HCl, 1 M NaCl pH 7,5
Puffercsere	Ultraszűrés	Csere 20 mM Tris/HCl pH 7,0 pufferre
Fehérjék elválasztása negatív töltésük alapján	Anioncsere	Oszlop: Source 30 Q 16/13 Kötő puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,0 Elúciós puffer: 20 mM Tris/HCl, 1 M NaCl pH 7,0
Elválasztása méret alapján, előkészítés későbbi mérésekhez	Gélszűrés	Oszlop: Superdex 75 26/60 Puffer: 0,2 M NH ₄ Ac

5. ábra: A CueR fehérje tisztításának lépései, folyamata.

A minta előkészítése során a 4.6 fejezetben leírtak szerint indukált sejteket 40 ml Tris A (20 mM Tris/HCl, pH 7,5) pufferben reszuszpendáltuk. Az oxidáció megakadályozása érdekében 2 mM Na₂S₂O₄-ot adtunk. A sejteket háromszor 30 másodpercig ultrahang segítségével lizáltuk 80 %-os amplitúdóval (LABSONIC® P). A lizátumhoz újra 2 mM Na₂S₂O₄-ot adtunk, majd centrifugáltuk (4 °C, 1800 × g, 20 perc). Az oldhatatlan fehérjék és sejttörmelékek elválasztása után a vízben oldható fehérjéket tartalmazó felülúszóval dolgoztunk tovább.

Korábbi kísérletek során gyakran tapasztaltuk a CueR fehérje kicsapódását. Miután kizártuk az oxidáció lehetőségét, megvizsgáltuk a kicsapódott fehérje összetételét. A csapadék főként a CueR-t és egy *E.coli* elongációs faktort tartalmazott. Ebből arra következtettünk, hogy a mintában jelenlevő nukleinsav segítik elő a nukleinsav-kötő fehérjék összekapcsolódását és kicsapódását. Emiatt a tisztítás első lépése előtt 25 µg/ml DNáz I enzimet és 8 mM MgCl₂-t adtunk a fehérje mintához, és szobahőmérsékleten 1,5 órán keresztül inkubáltuk.

A nukleinsavak emésztése után a mintát 0,45 µm pórusméretű szűrőn átszűrtük, és Tris A pufferrel 2,3 mS/cm vezetőképesség eléréséig hígítottuk, hogy elősegítsük a fehérje megkötődését az állófázison. A szűrt mintát HiLoad Sepharose FastFlow Q 16/10 oszlopra töltöttünk, amely előzetesen 5 CV 5 ml/perc áramlási sebességű Tris A pufferrel egyensúlyba hoztunk. A nem kötődő fehérjéket 2 CV Tris A pufferrel lemostuk az oszlopról, majd a Tris B puffer (20 mM Tris/HCl, 1 M NaCl, pH 7,5) koncentrációját 6 CV alatt 15 %-tól 60 %-ig növelve eluáltuk a kötődő fehérjéket is.

A CueR-t is tartalmazó frakciókat összeöntöttük, és a NaCl mennyiségének csökkentése érdekében a puffer nagy részét PLBC 3000 (Amicon Ultra, Millipore) ultraszűrő membrán használatával eltávolítottuk, majd Tris A pufferrel 7 mS/cm vezetőképesség eléréséig hígítottuk. Ezt a mintát HiPrep Heparin FastFlow 16/10 oszlopra töltöttünk, amelyet előzetesen Tris C pufferrel (20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, pH 7,5) egyensúlyba hoztunk. A nem kötődő fehérjéket 4 CV Tris C pufferrel mostuk le. A kötődő fehérjék elúciójához Tris B puffer mennyiségét 8 CV alatt 0 %-tól 40 %-ig növeltük.

Tisztább minta előállítása céljából egy második anion cserét is végrehajtottunk egy nagyobb felbontású oszlopot, és az eddigiektől eltérő pH-jú puffereket alkalmazva. Ehhez a CueR-t tartalmazó frakciókat ismét összeöntöttük, majd ultraszűrő membrán használatával a puffert Tris D pufferre (20 mM Tris/HCl, pH 7,0) cseréltük. A mintát ezután Source 30 Q oszlopra töltöttük, amelyet már egyensúlyba hoztunk a Tris D pufferrel. A kötődő fehérjéket Tris E puffer (20 mM Tris/HCl, 1 M NaCl, pH 7,0) mennyiségének 6 CV alatt 0 % -tól 40 %-ig történő emelésével.

Végül a második anioncsere megfelelő frakcióit Superdex 75 26/60 oszlopra töltöttük, melyet 0,2 M ammónium-acetát pufferrel hoztunk egyensúlyba. A géliszűréshez szintén az ammónium-acetát puffert használtuk, így előkészítve a fehérjét a későbbi vizsgálatokhoz. A fehérjeoldatokat folyékony nitrogén segítségével fagyasztottuk meg, használatig -80 °C-on tároltuk.

4.10. Tömegspektrometria

Az elmúlt évtizedben a tömegspektrometria (MS) gyors fejlődésen ment keresztül, és mára az egyik legfontosabb analitikai módszer lett a molekuláris kutatásokban. Nagy érzékenysége miatt gyakran használják biokémiai, gyógyszerkémiai, mikrobiológiai tudományterületeken biomolekulák azonosítására. Mindez az elektroporlasztásos ionizációs (ESI) és a mátrix-támogatott lézer deszorpciós ionizációs (MALDI) módszerek kifejlesztésének köszönhető. Ez a két eljárás lehetővé teszi nagyméretű (akár MDa mérettartományban) biomolekulák ionizációját, és gázfázisba juttatását azok fragmentációja nélkül.

Minden tömegspektrométernek négy alapvető része van: mintaadagoló, ionizációs tér, tömeg-analizátor és egy ion-detektor. A molekulák tömegét a tömeg/töltés hányados (m/z) mérésével határozzák meg. A képződő ionok elektrosztatikus erők révén jutnak a tömeg analizátorba, ahol elkülönülnek az m/z értékeiknek megfelelően, majd a detektor érzékeli őket. A

molekula ionizációjának, az ionok elválasztásának és detektálásának eredményeként kapjuk a tömegspektrumot.

A molekulák tömegének meghatározásához ionizálni kell azokat, majd gázfázisba juttatni. Sokféle eljárás alkalmazható a molekulák ionizációjára, melyek lehetnek nagyenergiájúak (ezek a molekulák intenzív fragmentációját okozzák), vagy lágy ionizációs technikák (pl. ESI, MALDI, plazma deszorpció), melyek molekulaionokat hoznak létre. Az utóbbiak alkalmasak a nagyobb biomolekulák tömegének meghatározására, az ESI az elérhető legjobb módszer a fehérjék és nem-kovalens fehérjekomplexek analíziséhez.

Az elektroporlasztásos ionizáció egy atmoszférikus nyomású ionizációs eljárás. A hagyományos elektroporlasztásos technikában az adagoló egy vékony kapilláris, melyen keresztül a híg minta kis áramlási sebességgel ($\mu\text{L}/\text{perc}$) áramlik. A kapillárisra nagy feszültséget (2 - 5 kV) kapcsolnak. A mintától függően a feszültség lehet pozitív és negatív is. Előbbi esetben a pozitív ionok a kapilláris végén, a folyadék felszínen halmozódnak fel, míg a negatívan töltött ionok a pozitív kapilláris-falhoz közel helyezkednek. A kapilláris végén felgyülemlett kationok között taszító hatás lép fel, ami destabilizálja a felületet, és egy kúp alakú forma, az ún. Taylor-kúp alakul ki. Az alkalmazott nagy feszültség hatására a taszító kölcsönhatások erősebbek lesznek, mint a felületi feszültség a kúp hegyénél, aminek hatására elektrosztatikusan töltött cseppekből álló köd képződik. Miközben az oldószer párolog, a cseppek mérete csökken, viszont a töltésük állandó marad. Az azonos töltésű ionok között fellépő taszító hatás olyan mértékűvé nő, hogy a cseppek instabillá válnak, és a felületi feszültséget legyőzve kisebb cseppekre hasadnak szét. Ez a folyamat addig ismétlődik, amíg az átmérő el nem éri a nanométeres mérettartományt, majd egy még nem teljesen tisztázott folyamat során gázfázisú ionok képződnek.

A nano-ESI módszernél a minta egy fémköpennyel ellátott kapillárison (melynek átmérője 1 – 2 μm) halad keresztül kis áramlási sebességgel (20–50 $\mu\text{L}/\text{perc}$). A szükséges minta térfogata 1 – 2 μL . A hagyományos ESI-hoz képest a keletkező cseppek mérete jóval kisebb.

Az ESI alkalmazása során egy fehérjének többféle, eltérő töltésű formája is kialakul, a bázikus csoportok protonálódásának vagy a savas csoportok deprotonálódásának köszönhetően. A tömegspektrumon a molekulák különböző töltésű formáinak relatív mennyisége látható az m/z értékeinek megfelelően. Ha a spektrumokban a szomszédos csúcsok töltései egy egységgel térnek el egymástól, akkor egy egyszerű matematikai algoritmus segítségével számolható ki a vizsgált molekula tömege:

$$m_1 = \frac{M - z_1 M_{H^+}}{z_1}$$

$$m_2 = \frac{M - z_2 M_{H^+}}{z_2} = \frac{M - (z_1 + 1) M_{H^+}}{z_1 + 1}$$

Ahol m_1 és m_2 a spektrumban két szomszédos csúcs m/z értéke, melyeknek töltése z_1 és z_2 , és $z_2 = z_1 + 1$. A molekulatömeg M , a M_{H^+} pedig a proton tömege.

A fehérje tisztítása és tárolása során használt pufferek olyan sókat tartalmaznak, melyek nem illékonyak. Az ESI során ezek zajt okozhatnak, tompíthatják a jelet, vagy adduktokat hozhatnak létre, illetve eltömíthetik a kapillárist. Ezért a legtöbb esetben a fehérje minta pufferét le kell cserélni. A legelterjedtebb illékony puffer a pH = 6 – 8 kémhatású ammónium-acetát oldat, aminek a koncentrációja 100 mM – 1 M között változhat.

A képződő ionok az analizátor régióba kerülnek, ahol a tömeg/töltés arányuknak megfelelően elkülönülnek. Közös tulajdonságuk, hogy statikus vagy dinamikus elektromos vagy mágneses tér hatására történik az ionok elkülönítése. Manapság igen sokféle analizátor elérhető, egyik képviselőjük a time-of-flight (TOF) analizátor, melyet a biomolekulák tanulmányozása során a leggyakrabban használnak. A TOF analizátorok működésük során azt mérik, hogy mennyi ideig tart egy ionnak eljutni az ionfelszíntől a detektorig. Miután az ionok kialakulnak és felgyorsulnak, ugyanazzal a kinetikus energiával rendelkeznek. Amikor az erőtérmentes területre érnek, a sebességük szerint különülnek el, ami az m/z értéktől függ. Azaz az ionok m/z értéke meghatározza, hogy mennyi ideig tart, míg eléri a detektort.

A tömegspektrometriás mérések LCT Premier (Waters) nano-ESI berendezésen repülési idő detektor alkalmazásával történtek. A berendezés kalibrációját 50 % 2-propanolban feloldott 100 mg/ml koncentrációjú CsI-dal, 600-12000 m/z tartományban végeztük. Minden esetben 3 μ l fehérje oldatot, Au/Pd borított boroszilikát üvegkapilláris túból (Prexon) juttattuk a készülékbe. A felvett spektrumokat MassLynxTM v4.1 (Waters) software-rel és MaxEnt1 algoritmus segítségével értékeltük ki.

4.11. Fehérje koncentrációjának meghatározása UV-látható spektroszkópiával

A fehérjeminták koncentrációját UV-látható spektroszkópiával, Nanodrop 1000 (Thermo) készülékkel határoztuk meg. A CueR aromás oldalláncú aminosavai alapján becsülhető extinkciós koefficiens 280 nm hullámhosszon 4470 M⁻¹cm⁻¹ (feltételezve, hogy a ciszteinek redukált formában vannak). A fehérjeminták koncentrációit a 280 nm-en mért abszorbanciából a Lambert-Beer törvény alkalmazásával számoltuk ki.

4.12. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia már az 1960-as évek óta igen jelentős technika a fehérjék, polipeptidek és peptidek szerkezetének meghatározásában. A mérések során felváltva, ugyanolyan intenzitású jobbra, ill. balra cirkulárisan polarizált, adott hullámhosszúságú fénnel sugározzuk be a mintát. A mintában jelenlevő optikailag aktív molekulák a kétféle fénysugarat különböző mértékben nyelik el, illetve a polarizáció síkját is elfordítják. Ezáltal a mintából elliptikusan poláros fény lép ki. A spektrumok felvételekor a kétféle cirkulárisan poláros fény abszorbanciáinak különbségét mérjük a hullámhossz függvényében, melyre az alábbi összefüggés érvényes:

$$\Delta A_{(\lambda)} = A_{B(\lambda)} - A_{J(\lambda)} = (\varepsilon_{B(\lambda)} - \varepsilon_{J(\lambda)})cl = \Delta\varepsilon_{(\lambda)}cl$$

Ahol $A_{B(\lambda)}$ a balra, a $A_{J(\lambda)}$ a jobbra cirkulárisan polarizált fényre adott hullámhosszúságnál vonatkoztatott abszorbancia, ε az extinciókoefficiens, c a koncentráció és l a mintában a fény úthossza.

A fehérjék L-aminosavakból épülnek fel, így minden fehérje optikailag aktív. A különböző másodlagos szerkezetek, mint az α -hélix vagy a β -redő, jellegzetes CD spektrumot eredményeznek. [13]

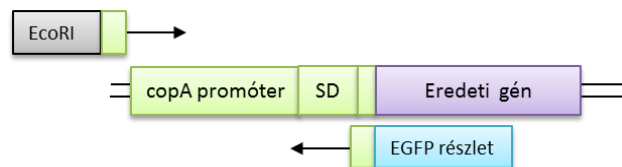
Méréseinket Jasco J-815 készülékkel, 0,2 mm kvarc küvettában végeztük 180-300 nm hullámhossz-tartományban.

5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS TÁRGYALÁSUK

5.1. A copA-EGFP gén előállítás

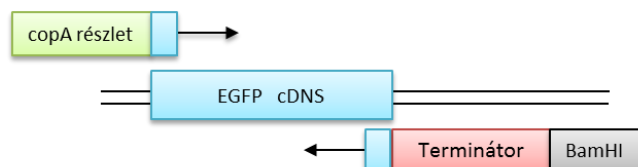
A CueR fehérjéhez történő fémion-koordináció, illetve az ezáltal kiváltott biológiai válasz nyomkövetésére, a CueR szabályzó mechanizmusát kihasználva, terveztünk egy fémionok érzékeny és szelektív kimutatására potenciálisan alkalmas sejtalapú érzékelő rendszert. A transzkripció aktivációs mechanizmus során a fémionok koordinációja a szenzor CueR fehérjéhez olyan fehérjék kifejeződését indukálja, amelyek eltávolítják a felesleges fémionokat a sejtől. Ezt a biológiai választ detektálhatjuk, ha olyan módosított géneket állítunk elő, melyek révén a fémion koordinációja egy fluoreszcens fehérje kifejeződését indukálja. A baktériumokban termelődő fluoreszcens fehérjét fluoreszcens mikroszkóppal detektálhatjuk.

A gén előállításához többlépcsős PCR-t terveztünk. Első lépésként a CueR promóter régióját (copA promóter) és a riboszóma kötőhelyet (Shine-Dalgarno, SD) tartalmazó DNS szakaszt sokszorozítottuk az *E. coli* K12 törzs baktériumainak genomiális DNS-éről (6. ábra). A polimerizációhoz szükséges indító szekvenciákként, az EcoRI/copA/SD primert (5'- GGA ATT CCT CAC CCC GGT G -3'), és az EGFP/copA/SD primert (5'- CGC CCT TGC TCA CCA TAA AAC ACT CCT TTA AGA CAG -3'), használtuk. A DNS szakasz szintézisét KOD plus DNS polimeráz segítségével hajtottuk végre.



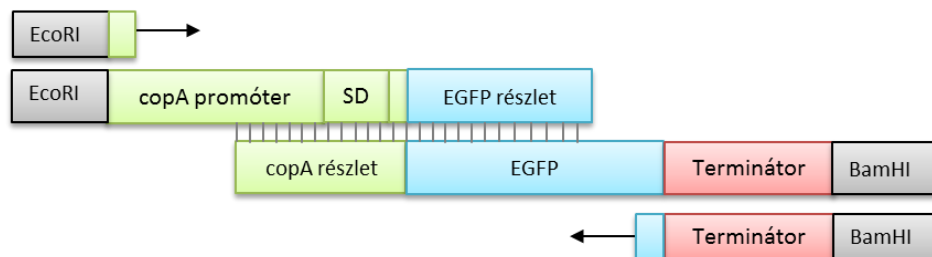
6. ábra: A copA promóter régió sokszorozításának terve.

Második lépésként az EGFP génjét sokszorozítottuk pEGFP-C1 plazmidról (7. ábra). Ehhez a polimerizáció indítoszekvenciájaként a copA/SD/EGFP primert (5'- CTG TCT TAA AGG AGT GTT TTA TGG TGA GCA AGG GCG -3') és a BamHI/Terminal/EGFP primert (5'- CGG GAT CCA TGA AAA AAG CGC CGG TCT TCG GCG CTT GAT TAC TTG TAC AGC TCG TCC A -3') használtuk fel.



7. ábra: Az EGFP gén sokszorozításának terve.

Végül az így előállított két génszakaszt egy harmadik PCR segítségével kapcsoltuk össze (8. ábra). Ebben a reakcióban nem volt szükség templátra, hiszen a primereket úgy terveztük meg, hogy a génszakaszoknak legyen egy megfelelő hosszúságú átfedő részük. A sokszorozításhoz az előbbi EcoRI/copA/SD primert és a BamHI/Terminal/EGFP primert használtuk fel.



8. ábra: A copA promóter és az EGFP gén összekapcsolásának és sokszorozításának terve.

A reakciósor eredményeként egy olyan génszakaszt kaptunk, amiben EcoRI és BamHI restrikciós endonukleázok hasítási helyei között a copA gén promóter régiója, a riboszóma kötőhelye, az EGFP fehérje génje és a terminátor régió található (9. ábra).



9. ábra: A PCR segítségével előállított copA-EGFP gén.

A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel analizáltuk, a megfelelő géneket izoláltuk a gélből, majd fenol-kloroformos extrakcióval és etanolos kicsapással tisztítottuk, továbbiakban ezekkel a DNS mintákkal dolgoztunk tovább. A hordozó vektor kiválasztásánál elsősorban azt vettük figyelembe, hogy a copA-EGFP gént tartalmazó plazmid mellett egy másik, a CueR fehérje genetikai kódját tartalmazó plazmiddal (pET21a-CueR) együtt kell a baktériumokat transzformálni. Ez akkor lehetséges, ha a két plazmid replikációs origója¹ eltérő. Választásunk ennek figyelembevételével a pMW219 hordozó DNS-re esett. Ennek a plazmidnak másik előnye, hogy kanamicin rezisztenciagént hordoz, ellentétben az ampicillin rezisztenciát hordozó pET21a-val. Így azok a baktériumok, melyek mindkét plazmidot tartalmazzák, könnyen kiválogathatók a két antibiotikumot egyszerre tartalmazó táptalaj/tápoldat alkalmazásával.

¹ Replikációs origó: A plazmidnak az a része (szekvenciája) ahol a replikáció elkezdődik.

2. táblázat: A felhasznált plazmidok fontosabb tulajdonságai.

Plazmid	Replikációs Origó	Rezisztencia	Kópiaszám ²
pET21a	ColE1	Ampicillin	500 - 700
pMW219	Psc101	Kanamycin	5

A copA-EGFP gént és a pMW219 vektort BamHI és EcoRI enzimekkel hasítottuk. A hasítást agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A megfelelő méretű DNS fragmenseket izoláltuk a gélből, majd a 4.2 fejezetben leírtak szerint ligáltuk. A pMW219-copA-EGFP génnel *E. Coli* DH10B sejteket transzformáltunk. A DNS szekvenciáját a 4.3 fejezetben leírtak szerint ellenőriztük. Miután megbizonyosodtunk a szekvencia helyességéről, *E. Coli* BL21 sejteket transzformáltunk pET21a-CueR és pMW219-copA-EGFP plazmidokkal, majd a sejteket ampicillint és kanamicint együttesen tartalmazó táptalajra vittük fel.

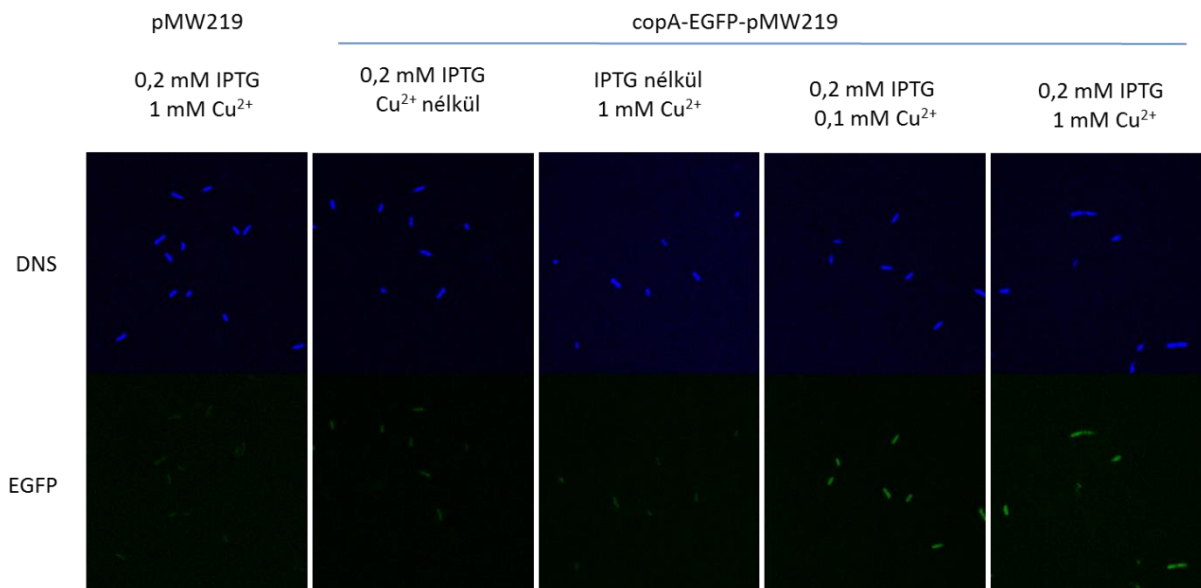
5.2. A CueR transzkripció válaszának tanulmányozása fluoreszcencia mikroszkóppal

A fluoreszcencia-mikroszkóppal történő vizsgálatokhoz a fluoreszcens fehérjét tartalmazó baktériumkultúrákat a 4.5 fejezetben leírtak szerint készítettük el. Az EGFP termelődését 0,1 és 1 mM végső koncentrációban hozzáadott CuSO₄-oldattal indítottuk el. A kísérlet ellenőrzésének érdekében több negatív, összehasonlító reakcióelegyet állítottunk össze. A sejtekben található egyéb aromás oldalláncú aminosavakat tartalmazó fehérjék által okozott háttér megjelenítéséhez olyan baktériumokat állítottunk elő, melyek transzformálása esetében „üres”, copA-EGFP gént nem tartalmazó pMW219 vektort használtunk. Emellett olyan mintákat is vizsgáltunk, melyekhez csak IPTG-t vagy csak Cu^{II}-ionokat adtunk. Ha az általunk tervezett folyamatok játszódna le, akkor IPTG hatására CueR fehérje termelődik, ami a promóter régióhoz köt, ám Cu^{II}-ionok nélkül a szabályzó mechanizmus nem indul el, azaz nem termelődik a fluoreszcens fehérje. Viszont, IPTG nélkül, nem termelődik elegendő CueR ahhoz, hogy a jelenlevő Cu^{II}-ionok hatására megfelelő mennyiségű EGFP képződjön. A sejtek saját DNS-ét kék fluoreszcens festékkel festettük meg azért, hogy a baktériumok helyzete, mérete, száma jól összehasonlítható legyen.

A 10. ábrán bemutatott képeken különbség figyelhető meg a negatív összehasonlító kísérletek (copA-EGFP gént nem tartalmazó vektor, illetve a pMW219-copA-EGFP vektor csak IPTG vagy csak CuSO₄ jelenlétében) és azon minták között, amikhez IPTG-t és Cu^{II}-ionokat is

² Kópiaszám: Azt fejezi ki, hogy hány darab plazmid található egy sejten belül.

adtunk. Az utóbbi esetben ugyanis jól kivehető a baktériumokban jelenlévő EGFP fehérje nagy intenzitású, zöld fluoreszcenciája.



10. ábra: Fluoreszcencia mikroszkóppal készített felvételek. A felső sorban lévő képeken a baktériumokban található kék fluorofórral jelzett DNS, az alsó sorban a zöld fluoreszcens fehérje látható a különböző mintákban.

Ezek alapján, sikeresen kialakítottunk egy, a Cu-ionok sejten belüli megjelenésének, illetve a fémion CueR fehérjéhez történő koordinációjának detektálására alkalmas rendszert. Érdeemes megjegyezni, hogy Zn^{II}-ionok hasonló koncentrációja a tápoldatban nem járt fluoreszcencia megjelenésével a baktériumsejtekben.

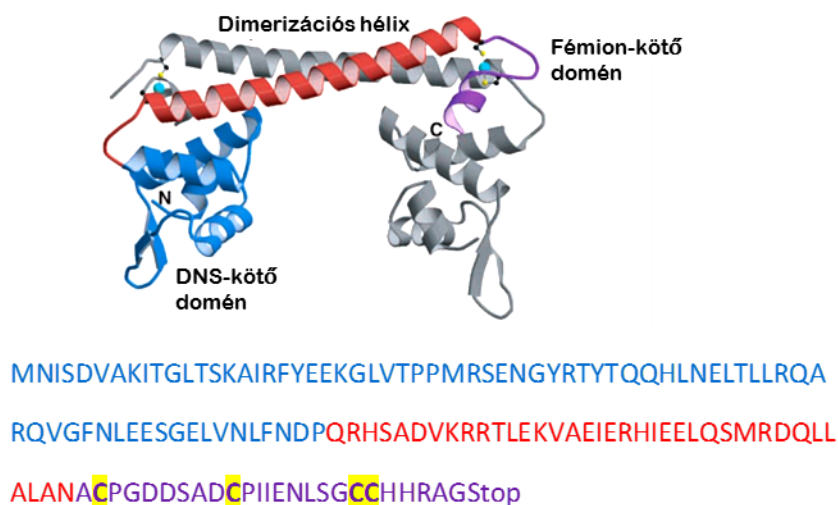
Az, hogy kis mennyiségű fluoreszcens fehérje termelődését tudtuk kimutatni, vélhetően a pMW219 plazmid kis kópiaszámának köszönhető, hiszen minél kevesebb plazmid van a sejtben, annál kevesebb fehérje tud kifejeződni adott idő alatt. Későbbiekben ez a rendszer fejleszthető, másik, megfelelő replikációs origójú, ampicillintől elérő antibiotikum rezisztenciát hordozó, nagyobb kópiaszámú plazmid használatával.

Későbbi terveink között szerepel a CueR mutációja is. A módosított CueR-t termelő baktériumok fentihez hasonló vizsgálata azt is lehetővé teszi, hogy a CueR (fémion-szelektív) biológiai funkciója és a fehérje aminosav-szekvenciájában bizonyos (kicserélt) aminosavak közötti kapcsolatokat feltárhassuk.

5.3. A CueR fehérje kifejezése és tisztítása, valamint ezek ellenőrzése tömegspektrometriával

Az 5.2. fejezetben bemutattuk, hogy a CueR fehérje által szelektíven felismert Cu^{II} -ionok jelenléte sikeresen jelezhető a kétféle plazmidból felépített, összetett rendszer segítségével. Ennek későbbi fejlesztése illetve a CueR egyértékű fémionokra mutatott szelektív szabályzási mechanizmusának jobb megértése, párhuzamos kutatást igényel. A CueR molekulában a fémion-koordináció hatására bekövetkező szerkezetváltozás vizsgálatához a fehérje tisztítása szükséges.

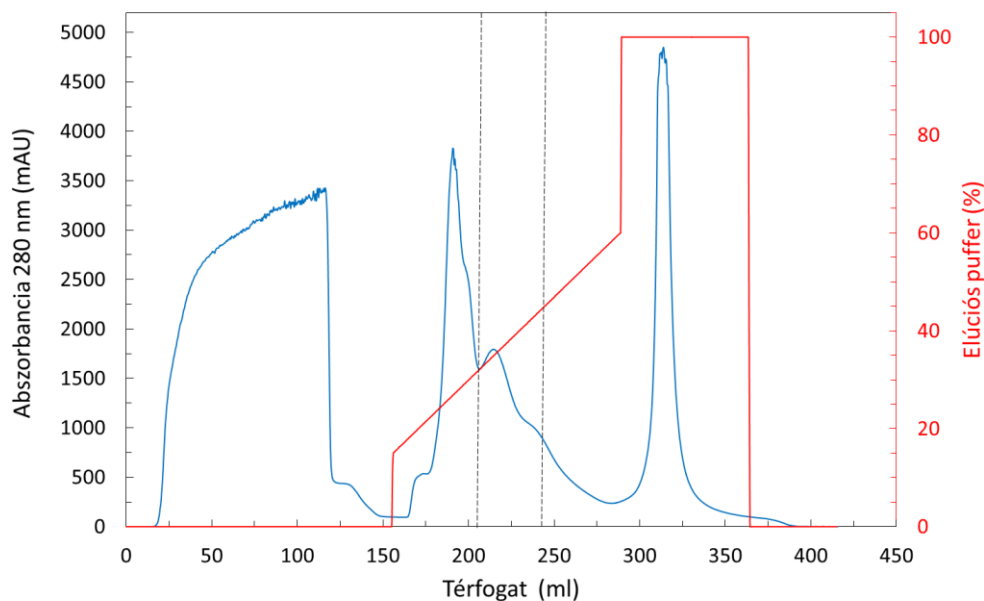
Az *E. coli* sejtekben kifejezett fehérje tisztítása során elsődleges célunk az volt, hogy a fehérjét természetes, módosítatlan állapotában nyerjük ki. Ezért nem alkalmaztunk affinitás toldalékokat, ezek ugyanis potenciálisan zavarhatnák a későbbiekben tervezett vizsgálatokat. A tisztítási eljárás egyes lépéseinek megtervezéséhez figyelembe vettük, hogy a CueR 135 aminosavból épül fel (11. ábra), melyek közül négy cisztein. A monomer apo-fehérje molekulatömege 15235,1 Da és elméleti izoelektromos pontja 5,72.



11. ábra: A CueR fő szerkezeti egységei és aminosav-szekvenciája.

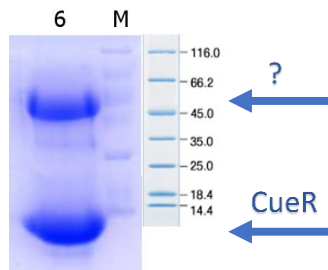
A folyamat első lépéseként kationcserét terveztünk, melynek oka elsősorban az volt, hogy a ciszteinek oxidációját savas közeg alkalmazásával visszaszorítsuk. A pI fentebb megadott értéke alapján $pH = 3,0$ -t választottunk ehhez a művelethez, ám a savanyú közegben a fehérje teljes mennyisége kicsapódott. Feltételeztük, hogy ezt a jelenlevő negatív töltésű DNS és a kationos fehérje kölcsönhatása, aggregációja okozza. Azonban sztreptomycin-szulfát antibiotikum adagolása, azaz a DNS kicsapása után is aggregálódott a fehérjénk.

Emiatt az anioncsere alkalmazása mellett döntöttünk. Továbbra is szem előtt tartva a cisztein oldalláncok oxidációjának kockázatát, a pufferek pH-ját 7,5-re állítottuk be. Ezen a pH-n a fehérje negatív töltésű, ugyanakkor a tiolcsoportok jelentős hányada még protonált formában van jelen ($pK_{a,Cys} \sim 8,37$), ami kedvező az oxidáció gátlása szempontjából. Hogy az említett csoportok nemkívánatos oxidációját visszaszorítsuk, a mintaelőkészítés során $Na_2S_2O_4$ -ot (nátrium-ditionitot) is használtunk.



12. ábra: A CueR anioncserével történő tisztítása során mért jellemző kromatogram. A gradiens elúció során a Tris B puffer mennyisége 15 %-ról 60 %-ra változott. Szaggatott vonallal jelöltük az általunk összegyűjtött, CueR fehérjét tartalmazó frakciókat.

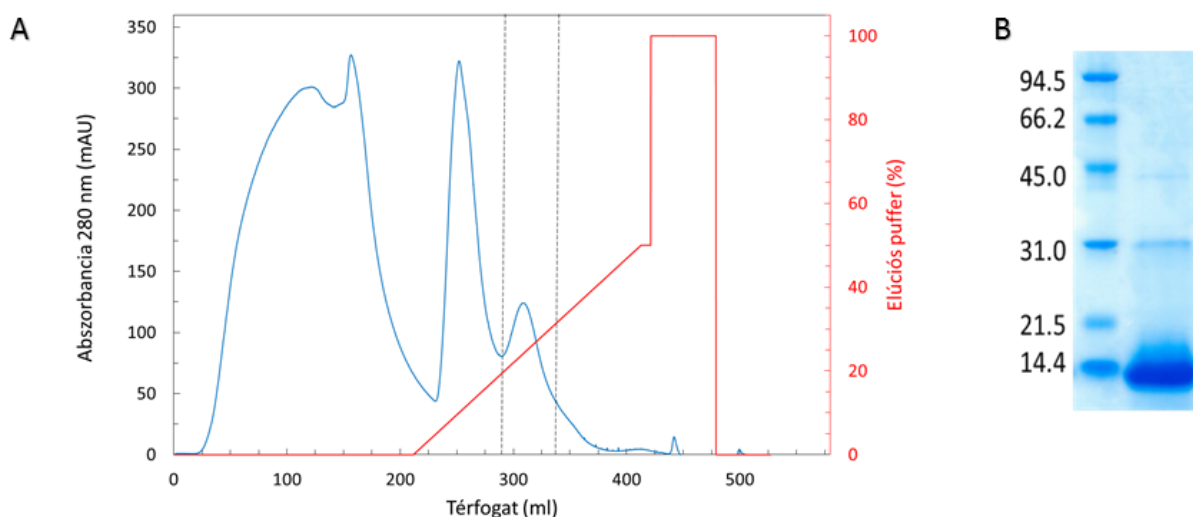
Az anioncsere önmagában nem nyújt elégséges elválasztást, így a tisztítás második lépéseként gélszűrést terveztünk. A gélszűrő oszlopra azonban igen kis térfogatú (13 ml) mintát lehet csak felvinni, ezért a megfelelő frakciókat összeöntöttük és ultraszűréssel koncentráltuk. Az ultraszűrés során azonban minden esetben fehérje kicsapódást észleltünk. Mivel a fehérje oxidációját sejtettük a jelenség hátterében, ezért a kísérletet megismételtük argon gázzal átmosott oldatok és DTT redukálószer használatával is, azonban az eredményen ez nem változtatott. Miután az oxidáció lehetőségét kizártuk, gélelektroforézissel megvizsgáltuk a kicsapódott fehérjét. A gélen láthatóvá vált, hogy a CueR egy ~ 45 kDa méretű fehérjével aggregálódik (13. ábra).



13. ábra: Az ultraszűrés során képződő csapadék SDS-PAGE analízise.

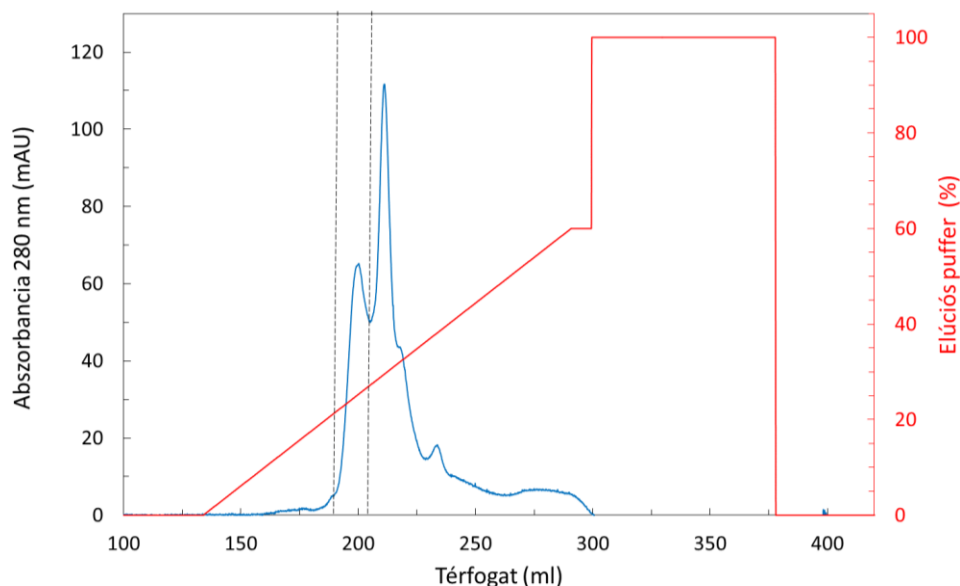
Miután a megfelelő sávokat a gélből kivágtuk, és az MTA Szegedi Biológiai Kutatóintézet kutatói segítségével peptid ujjlenyomat analízissel azonosítottuk a fehérjéket. Megállapítottuk, hogy a ~ 45 kDa méretű szennyező fehérje egy *E. coli* elongációs faktor. Mivel mind a CueR, mind pedig az elongációs faktor nukleinsav kötő tulajdonságú, így valószínűsítettük, hogy az oldatban jelenlévő nukleinsavak által lépnek kölcsönhatásba egymással. Hogy a fehérjék kicsapódását megakadályozzuk, és egyúttal feltételezésünket is ellenőrizzük, a nukleinsavakat DNáz I enzim segítségével emésztettük, majd ezt követően hajtottuk végre az ioncserét és a gélszűrést. A fehérje aggregációja ezáltal megszűnt, ezt a problémát így sikeresen kiküszöböltük.

Az elválasztás azonban még így sem volt megfelelő, ezért az anioncsere után, új lépésként, affinitás kromatográfiát alkalmaztunk (14. A ábra), végül a gélszűréssel fejeztük be a CueR fehérje tisztítását.



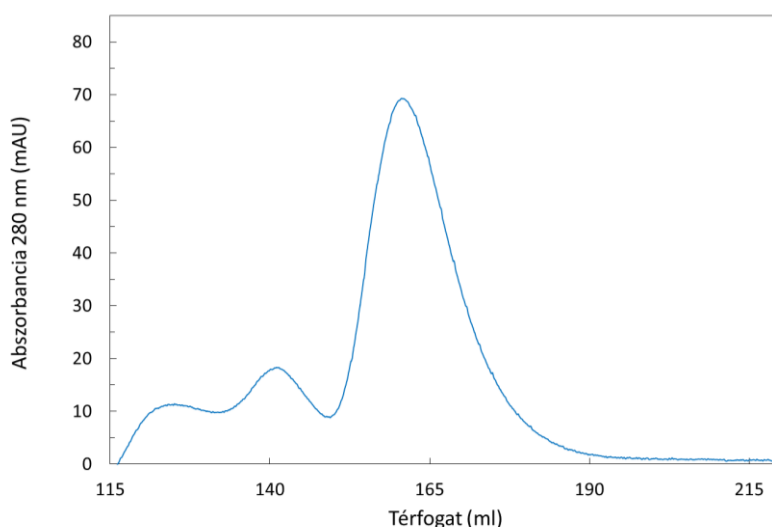
14. ábra: Az anioncserével már tisztított CueR-tartalmú minták egy jellemző, affinitás kromatogramja. A gradiens elúció során a Tris B puffer koncentrációját 8 oszloptérfogat átfolyásának megfelelő idő alatt, 0 %-tól 40 %-ig emeltük. A CueR-t tartalmazó frakciókat szaggatott vonallal jelöltük. B: Az affinitás kromatográfia és a gélszűrés után nyert fehérjeminta SDS-PAGE analízise.

Mindezek ellenére a végső mintában továbbra is jelen volt egy ~31 kDa méretű szennyező fehérje (14. B ábra). A jobb elválasztás érdekében a már viszonylag nagy arányban CueR-t tartalmazó Heparin oszlopról lemosott frakciókat egy újabb anioncserével elválasztottuk. Ehhez egy jobb felbontású oszlopot és az első anioncserétől eltérő pH-jú puffert használtunk (15. ábra).



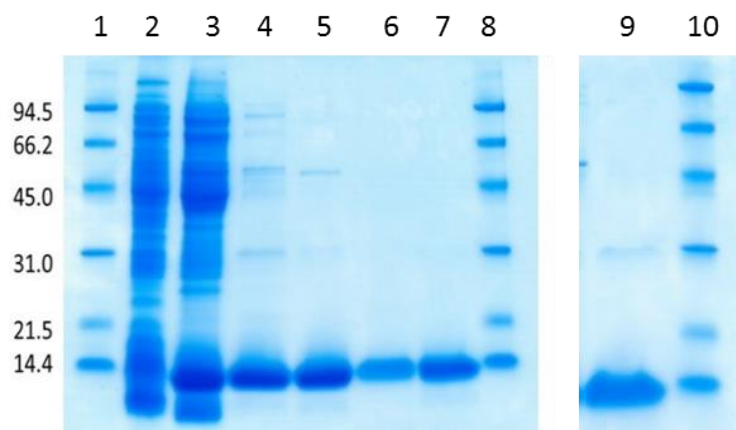
15. ábra: Az affinitás kromatográfia után anioncserélt minta kromatogramja. A gradiens elúció során a Tris E puffer koncentrációja 6 oszlop térfogat idő alatt, 0 %-tól 40 %-ig változott. A művelethez Source 30 Q oszlopot használtunk. A további tisztításhoz felhasznált frakciókat szaggatott vonallal jeleztük.

A második anioncsere után a fehérjét gélszűrő oszlopra vittük fel, hogy a még jelenlevő szennyező fehérjéket eltávolítsuk, illetve a mintát a későbbi mérésekhez előkészítsük (16. ábra).



16. ábra: A gélszűrés kromatogramja. A fehérjék izokratikus elúciója 0,2 M ammónium-acetát pufferrel.

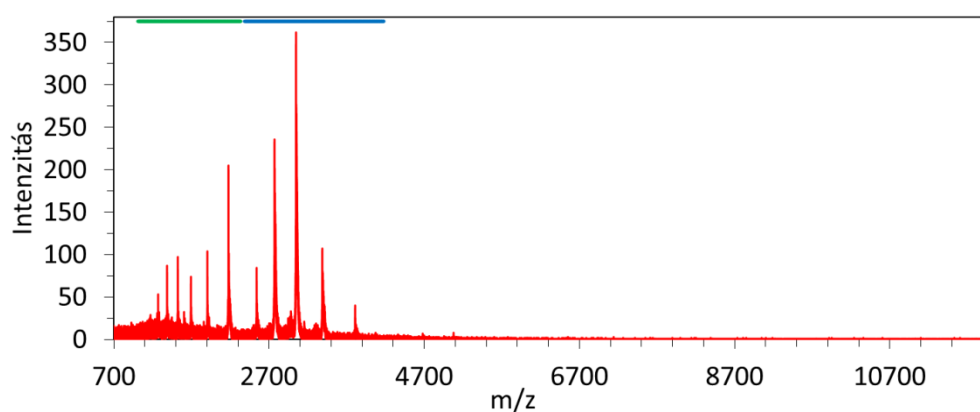
A gélszűréssel alakult ki a tisztítási folyamat 4.9.4 fejezetben leírt formája, amelynek révén megfelelő mennyiségű és tisztaságú mintákat sikerült előállítanunk. Mivel a későbbiekben a fehérje cisztein aminosav egységeinek részvételével megvalósuló fémion-megkötést is tervezzük vizsgálni, ezért fontos volt megbizonyosodnunk a tiolcsoportok redukált állapotáról. Ezt az SDS-PAGE analízis segítségével oly módon ellenőriztük, hogy a minta előkészítéséhez nem használtunk merkaptó-etanol redukálószer, csak SDS-t. Az SDS hatására a fehérje elveszíti szerkezetét, azaz a CueR dimerizációs hélice „kitekeredik”, így a fehérje monomerjének megfelelő méretnél láthatunk sávot a gélen. Ugyanakkor, merkaptó-etanol nélkül, a diszulfid-hidak redukálása nem történik meg, így az ilyen formán összekapcsolódott CueR dimer, trimer, stb., méretének megfelelő sávokat láthatjuk a gélen. Így az oxidálódott fehérje mennyiségéről információt nyertünk.



17. ábra: A CueR tisztításának ellenőrzése SDS-PAGE analízissel. 1: ismert nagyságú fehérjéket tartalmazó marker, 2: a sejtől származó oldható fehérjéket tartalmazó felülúszó fázis, 3: a fehérjeminta az első anioncsere után, 4: a minta az affinitás kromatográfia után, 5: a második anioncserével tisztított minta, 6: a CueR a gélszűrés után, 7: ultraszűréssel koncentrált CueR, 8: marker, 9: a CueR-t tartalmazó minta redukálószer nélkül és végül 10: marker.

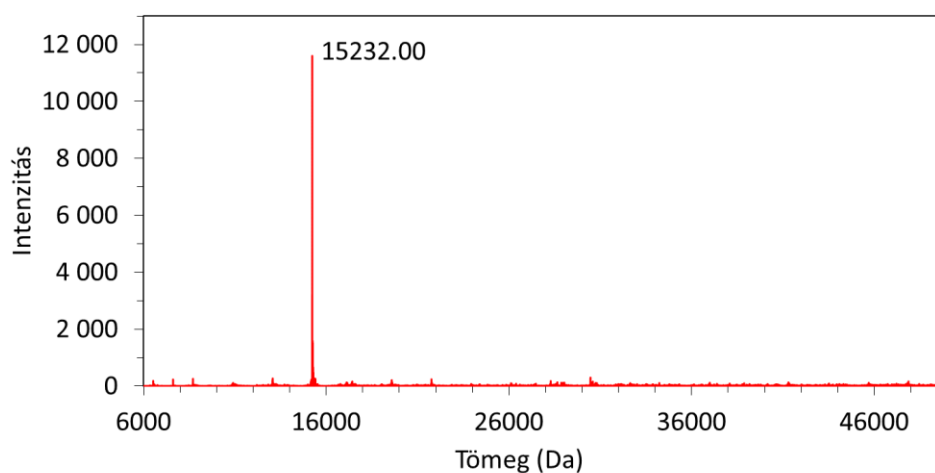
Az SDS-PAGE analízis alapján a CueR előállítása és tisztítása sikeres volt (17. ábra). Emellett, azt is megállapíthattuk, hogy a tiolcsoportok nagy része redukált állapotban van, hiszen csak egy halvány sáv jelenik meg a redukálószer nélküli minta oszlopában (17. ábra). Itt fontos megjegyezni, hogy az így láthatóvá tett ~31 kDa dimer CueR nem azonos az előzőekben említett ~31 kDa szennyező fehérjével.

A fehérje azonosítása nano-ESI-MS módszerrel történt a 4.11 fejezetben leírtak alapján.

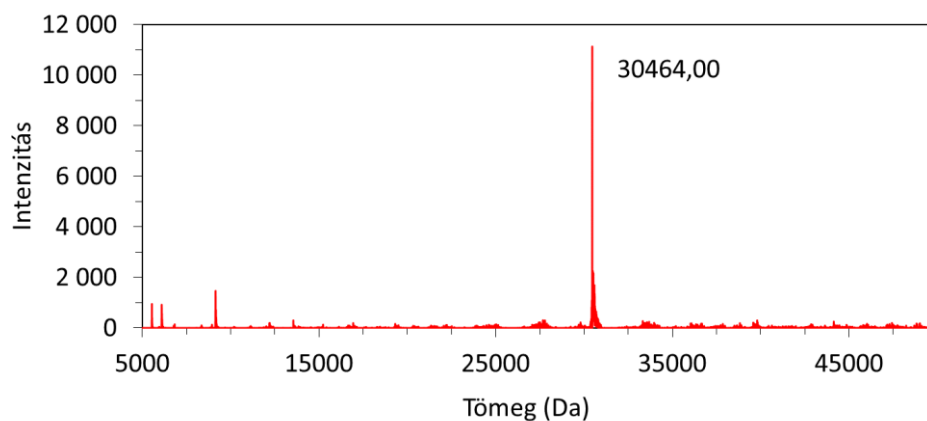


18. ábra: A CueR minta tömegspektruma az m/z értékek függvényében ábrázolva. Zöld sávval jelöltük az 1100-2332 közötti, kékkel pedig a 2384-4176 közötti tartományokat.

A 18. ábrán látható spektrum két tartományából meghatároztuk a megtisztított molekula tömegspektrumát.



19. ábra: Az 1100-2332 tartományból számolt tömegspektrum.

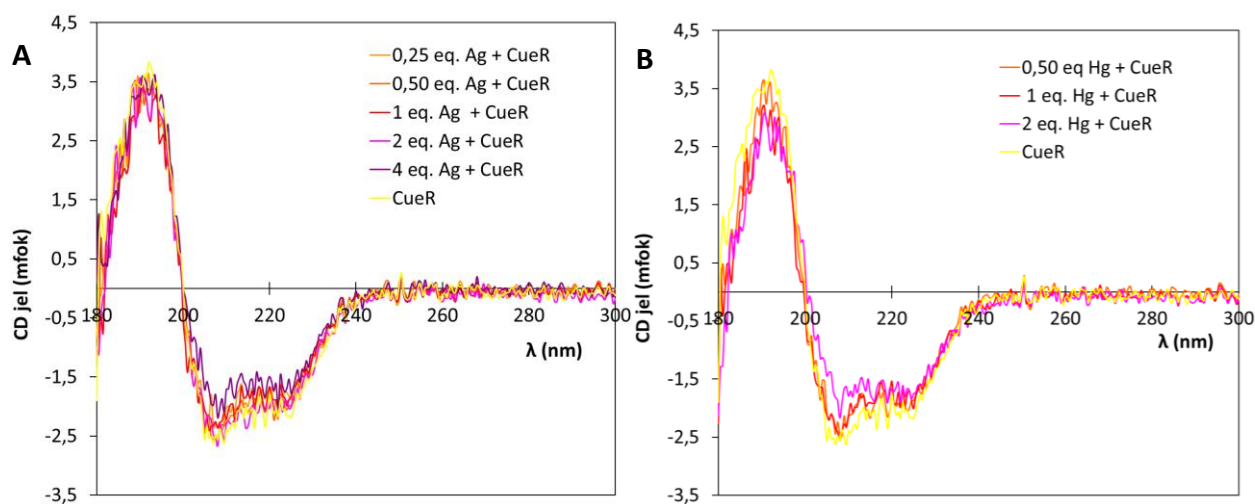


20. ábra: A 2384-4176 tartomány kiértékelése után kapott tömegspektrum.

A spektrumok kiértékelése alapján a kisebb m/z értékek tartományában detektált jelek egy 15232,00 Da tömegű fehérjéhez tartoznak, ami jó egyezést mutat a CueR molekulatömegével (15235,1 Da). A mért és az elméleti értékek közötti különbség az aminosav oldalláncok deprotonálódásából adódhat. A nagyobb 2384-4176 m/z értékeknél detektált jelek pedig egy 30464,00 Da molekulatömegű fehérjéhez tartoznak. A korábbiak alapján ez a CueR dimer formája lehet. A tömegspektrumok alapján azonosítottuk a CueR-t, és ellenőriztük a fehérje kifejezés sikerességét. A korábban bemutatott SDS-PAGE kép alapján tudjuk, hogy a fehérje redukált állapotban van, ami a későbbi fémion-kötés vizsgálatok tervezéséhez és kiértékeléséhez fontos információ.

5.4 A CueR fehérje vizsgálata Cirkuláris Dikroizmus (CD) spektroszkópiával

A CueR szelektivitásának jobb megértése érdekében a fehérje szerkezetét és annak esetleges megváltozását CD spektroszkópiával vizsgáltuk. A mérési körülményeket optimalizáltuk, a minták koncentrációit úgy választottuk meg, hogy az adott 0,2 mm úthossz esetében az abszorbancia elfogadható tartományba essen ($A \leq 1,5$). Először egy olyan spektrumsorozatot vettünk fel, ahol a CueR fehérjéhez monomer egységenként 0,25 – 4 ekvivalens mennyiségben Ag^I - és Hg^{II} -ionok oldatát adagoltuk (21. ábra).

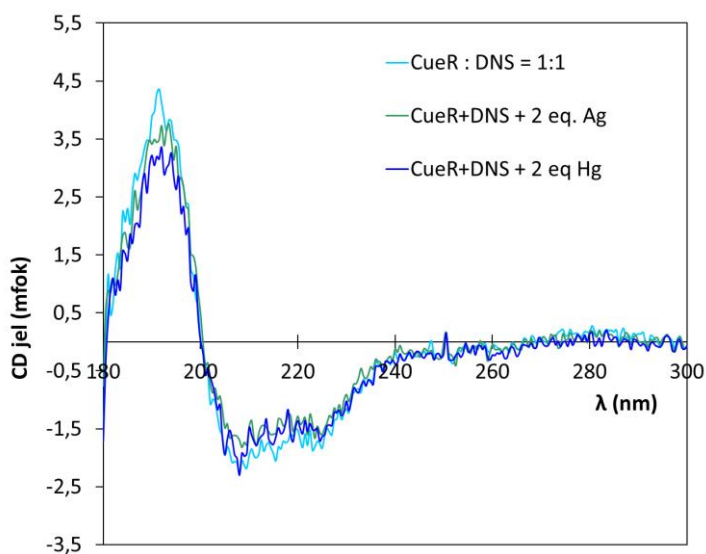


21. ábra: A CueR fehérje cirkuláris dikroizmus spektrumai (A) Ag^I - és (B) Hg^{II} -ionok adagolásának hatására.

A mért spektrumok α -hélixekben gazdag szerkezetre utalnak [14], ami jól egyezik a kristályszerkezet alapján várttal. A fenti ábrák alapján a jel/zaj viszonyt figyelembe véve, azt

mondhatjuk, hogy a fehérje másodlagos szerkezete nem változik meg szignifikáns mértékben egyik fémion jelenlétében sem.

Megvizsgáltuk fémionok hatását a fehérje szerkezetére dimerenként egy ekvivalens DNS jelenlétében is (22. ábra). Ezekre a kísérletekre azért volt szükség, mert a fehérje tulajdonságaiból következően a hozzáadott nukleinsav és a dimer CueR egy fehérje-DNS komplexet hoz létre. A fémszabályzó fehérje működése során ehhez a fehérje-DNS komplexhez köt a fémion, aminek révén bekövetkező szerkezetváltozás indítja el a transzkripciót.



22. ábra: A CueR fehérje-DNS komplex cirkuláris dikroizmus spektrumai, a fehérjéhez vett két ekvivalens Ag^I - és Hg^{II} -ion jelenlétében.

Ebben a kísérletsorozatban sem történt a fehérje másodlagos szerkezetét érintő változás a fémionok hatására.

Összességében, a fémion koordináció nincs számottevő hatással sem a fehérje, sem a fehérje-DNS komplex másodlagos szerkezetére, így a biológiai válasz szelektivitása minden bizonnyal a harmadlagos és/vagy a finomszerkezet változásaival magyarázható. A későbbiekben ezen folyamatok vizsgálatát tervezzük fluoreszcencia spektroszkópia és röntgen diffrakció alkalmazásával.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Tudományos diákköri munkám egyik célja, a CueR fehérje szelektivitásának kihasználásával, olyan baktériumok létrehozása volt, melyekkel jelezhetjük a fémszabályzó mechanizmusok fémionok hatására történő lejátszódását. Ennek érdekében, egy olyan rendszert terveztünk, melyben a CueR által szabályozott folyamatban termelődő ATPázt (CopA) fluoreszcens fehérjére cseréltük. A szükséges pMW219-copA-EGFP gén megtervezése után rekombináns DNS technológia segítségével előállítottuk azt, majd szekvenciájának ellenőrzése után a CueR-t kódoló pET21a-CueR génnel együtt baktériumokba jutattuk be. A CueR kifejeződését IPTG hozzáadásával indukáltuk. A sejtben termelődő CueR a pMW219-copA-EGFP plazmidban kialakított copA promóter régióhoz kötődik. Így a fluoreszcens fehérje termelődéséhez a megfelelő fémionok jelenléte szükséges, az aktivációs szabályzó mechanizmusnak megfelelően. A sikeresen előállított EGFP fehérjét fluoreszcens mikroszkóppal detektáltuk. Az eredmények alapján sikeresen előállítottunk egy, a szabályzás során lejátszódó folyamat nyomonkövetésére alkalmas rendszert, mely akár bioszenzorként történő felhasználásra is továbbfejleszthető.

Ezzel párhuzamosan célul tűztük ki a CueR fehérje előállítását, tisztítását, fémionokkal kialakított kölcsönhatásának vizsgálatát. Ehhez a CueR fehérjét megfelelő mennyiségben *E. coli* baktériumok segítségével fejeztük ki. A fehérje tisztítása során számos problémába ütköztünk, de végül kidolgoztunk egy eljárást, mellyel nagytisztaságú fehérjemintákat sikerült előállítanunk. A tisztításhoz speciális mintaelőkészítést, azaz DNáz I enzimmel történő nukleinsav emésztést, kétféle anioncserét, valamint affinitás kromatográfiát és géliszűrést alkalmaztunk. A tisztítás körülményeinek optimalizálása után nano-ESI-MS segítségével azonosítottuk a CueR fehérjét, és cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával vizsgáltuk annak másodlagos-szerkezetét DNS, Ag^I- és Hg^{II}-ionok jelenlétében. A CD spektrumok alapján a fémion koordináció nem okoz jelentősebb változást a másodlagos szerkezetben.

Emiatt a jövőben tervezzük a fehérje szerkezetének vizsgálatát egyéb módszerekkel, továbbá a fémion-szelektivitás részletes tanulmányozását és célzott mutációkkal történő befolyásolását. E kísérletek reményeink szerint hozzájárulnak majd a CueR fehérje működési mechanizmusának jobb megértéséhez is.

7. FELHASZNÁLT IRODALOM

- [1] Anne O Summers: Damage control: regulating defenses against toxic metals and metalloids; *Curr. Opin. Microbiol.*; 2009; 12: 138–144
- [2] Peng R. Chen; Chuan H. : Selective recognition of metal ions by metalloregulatory proteins; *Curr. Opin. Chem. Biol.*; 2008; 12: 214–221
- [3] C. Rademacher and B. Masepohl, *Copper-responsive gene regulation in bacteria*. Microbiology. **158**. 2451-64. (2012)
- [4] 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
- [5] 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
- [6] Kevin J. Waldron; Nigel J. Robinson: How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal?; *Nature Rev.*; 2009; 6: 25–35
- [7] 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
- [8] Kevin M. D., Amy E. P.: Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging; *Nature Chemical Biology*; 2014;10: 512-52
- [9] Israel Biran, David M. Rissin, Eliora Z. Ron, David R. Walt: Optical imaging fiber-based live bacterial cell array biosensor; *Analytical Biochemistry*; 2003; 315: 106-113
- [10] Kyle P.Carter, Alexandra M. Young, Amy E. Palmer: Fluorescent Sensors for Measuring Metal Ion in Living Organism; *Chemical Reviews*; 2014; 114: 4564-4601
- [11] Burger Kálmán: Az analitikai kémia alapjai; Semmelweis Kiadó; Budapest; 2012
- [12] GE Healthcare Handbook: Strategies for protein purification; http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1336161336168/litdoc28983331_20120505002036.pdf (2013.05.15)
- [13] L. Whitmore, B. A. Wallace: Protein Secondary Structure Analyses from Circular Dichroism Spectroscopy: Methods and Reference Databases; *Biopolymers*; 2008; 89: 392-400
- [14] L. Whitmore, B. Woollett, A. J. Miles, R. W. Janes, B. A. Wallance: The Protein Circular Dichroism Data Bank; *Structures*; 2010; 18: 1267-1269

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönetet mondok Dr. Gyurcsik Béla egyetemi docens és Dr. Jancsó Attila egyetemi adjunktus témavezetőimnek, akik mindvégig támogattak, és segítettek a munkában.

Köszönet illeti Dr. Kohsuke Katot és Dr. Masamitsu Noby Asakat, akik a Tsukubai Egyetem nyári iskolájában fogadtak, kísérleteim során segítettek és hasznos tanácsokkal láttak el.

Hálával tartozom Prof. Hans E. M. Christensennek is, aki két hónapra fogadott laboratóriumában a Dán Műszaki Egyetem Kémiai Intézetében, és szakértelmével segített.

Továbbá köszönöm Dr. Hunyadi-Gulyás Évának az MTA Szegedi Biológiai Központban elvégzett peptid ujjlenyomat fehérje azonosítást.

Tanulmányútjaimhoz az anyagi forrást a Campus Hungary pályázatrendszere biztosította.