

XXXII. ORSZÁGOS TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI
KONFERENCIA

***Staphylococcus aureus* transzkripciós faktor
Mycobacterium tuberculosis dUTPáz-ra gyakorolt gátló
hatásának mechanizmusa**

Dobrotka Paula

Biomérnök MSc szak

Témavezető: Dr. Vértessy G. Beáta

Konzulens: Szabó Judit Eszter

BME VBK Alkalmazott Biotechnológiai és Élelmiszertudományi Tanszék
MTA TTK Enzimológiai Intézet

2014

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. A dUTPáz enzim	6
2.2. A dUTPáz enzim szerkezete, aktív centruma és kinetikai mechanizmusa	7
2.3. Fág eredetű dUTPáz eddig ismeretlen szerepe a <i>Staphylococcus aureus</i> patogenitási szigetek életciklusában	9
2.4. A dUTPáz gátlásának lehetősége – az Stl.....	10
2.5. Lassú és erős kötődésen keresztül megvalósuló inhibíció mechanizmusának vizsgálata enzimkinetikai módszerekkel.....	12
2.5.1. Stacionárius, vagy steady-state kinetika	12
2.5.2. A lassú és erős kötődésen keresztül megvalósuló enzimgátlás	14
2.5.3. Tranziens kinetika.....	14
3. Célkitűzések.....	15
4. Anyagok és módszerek.....	16
4.1. Fehérje termelés	16
4.1.1. Kompetens sejt előállítása.....	16
4.1.2. Transzformálás	16
4.1.3. Expresszió	17
4.1.4. Feltárás.....	17
4.1.5. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dUTPáz tisztítása	18
4.1.6. Az Stl tisztítása.....	18
4.2. Fehérjevizsgálat.....	20
4.2.1. SDS poliakrilamid gélelektroforézis.....	20
4.2.2. Koncentráció mérés	20
4.2.3. Fotometriás mérések.....	21
4.2.3.1. A fehérjék steady-state aktivitásának meghatározása	21

4.2.3.2. Steady-state enzim aktivitás fotometriás meghatározása erős kötődésen keresztül megvalósuló inhibíció esetén	22
4.2.3.3. Szubsztrát telítési görbék meghatározása	23
4.2.3.4. Az MTB dUTPáz aktivitásmérés Stl jelenlétében fotometriás módszerrel	24
4.2.4. Stopped-flow mérések	24
4.2.4.1. dUTP kötés	25
4.2.4.2. Aktív hely titrálás	25
4.2.4.3. A dUTPáz:Stl komplex disszociációs állandójának meghatározása	26
4.2.5. Fluorimetriás mérések	27
4.2.5.1. Disszociációs állandó mérése fluorimetriás titrálással	27
4.2.5.2. dUPNPP H145W MTB dUTPáz:Stl komplexhez való kötődésének vizsgálata fluorimetriás módszerrel	28
5. Eredmények és megvitatásuk	29
5.1. MTB dUTPáz fehérjék expressziója és tisztítása	29
5.1.1. MTB dUTPáz-ok expressziója és tisztítása	29
5.1.2. Stl fehérje tisztítása	31
5.2. MTB dUTPáz-ok aktivitásának meghatározása	32
5.3. Az Stl gátlási mechanizmusának steady-state vizsgálata: a gátlás Stl-koncentráció függése	36
5.4. A H145W MTB dUTPáz szubsztrát- és termékkötési mechanizmusa	41
5.4.1. A H145W MTB dUTPáz szubsztrát kötésének vizsgálata	41
5.4.2. A H145W MTB dUTPáz termék kötésének mechanizmusa	44
5.5. A H145W MTB dUTPáz és az Stl komplexképződésének vizsgálata	48
5.6. dUPNPP H145W MTB dUTPáz:Stl komplexhez való kötődésének vizsgálata fluorimetriás módszerrel	51
6. Az eredmények összefoglalása, diszkusszió	58
7. Irodalomjegyzék	61
8. Köszönetnyilvánítás	63

Rövidítések jegyzéke

APS	ammónium perszulfát
β -ME	2-merkaptóetanol
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
dTTP	dezoxitimidin-trifoszfát
dUMP	dezoxiuridin-monofoszfát
dUPNPP	α,β -imido-dezoxiuridin-trifoszfát
dUTP	dezoxiuridin-trifoszfát
dUTPáz	(dezoxiuridin-trifoszfát)-nukleotid hidroláz
EDTA	etiléndiamin-NNN'N'-tetraecetsav
GST	glutation-S-transzferáz
H145W	145. számú hisztidin aminosav cseréje triptofánra
HEPES	N-(2-hidroxietil) piperazin-N'-etánszulfonsav
HS	magas sótartalmú – high salt
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktozid
LB	Luria-Bertani
LS	alacsony sótartalmú – low salt
MOPS	3-[N-morfolino]-propánszulfonsav
MTB dUTPáz	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> dUTPáz
Ni-NTA	nikkel nitrilotriacetát – nickel nitrilotriacetic acid
OD	optikai denzitás
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis – polyacrylamide gel electrophoresis
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PP _i	inorganikus pirofoszfát
RNáz	ribonukleinsav-hidroláz
RNS	ribonukleinsav
SaPI	<i>S. aureus</i> patogenitás sziget – <i>Staphylococcus aureus</i> Pathogenicity Island
SDS	nátrium-dodecil szulfát - sodium dodecyl sulfate
TEMED	NNN'N'-tetra-metil-etilén-diamin
TRIS	trisz-(hidroximetil)-aminometán
UGI	uracil-glikoziláz inhibitor
UNG	uracil-N-glikoziláz
WT	vad típus – wild type

1. Bevezetés

A genom integritás szabályozásában résztvevő fehérjék gyakori célpontként szolgálnak a különböző megbetegedések kezelésére alkalmazott gyógyszerek tervezésében. Ilyen célpont lehet a dUTPáz enzim is, mely a dUTP (dezoxi-uridin-trifoszfát) hidrolízisével csökkenti az uracil DNS-be történő beépülésének valószínűségét, ezzel elősegítve a genetikai információ pontos továbbadását.

Specifikus szubsztrát analóg antagonisták vagy dUTPáz inhibitorok alkalmazásával gátolni lehetne az enzim működését. Ez nagy jelentőséggel bírna a kórokozók által okozott betegségek terápiája során, hiszen ezen esszenciális enzim gátlása a mutációs ráta növekedéséhez és genom instabilitáshoz vezethet, amely a sejt életképességének csökkenését eredményezheti. Annak ellenére, hogy a dUTPáz már régóta kutatott gyógyszer célpont, egyelőre specifikus, a gazdaszervezet és a kórokozó dUTPáz között különbséget tevő gyógyszerjelölt molekulák csak kevés kórokozó esetében állnak rendelkezésre (pl. malária).

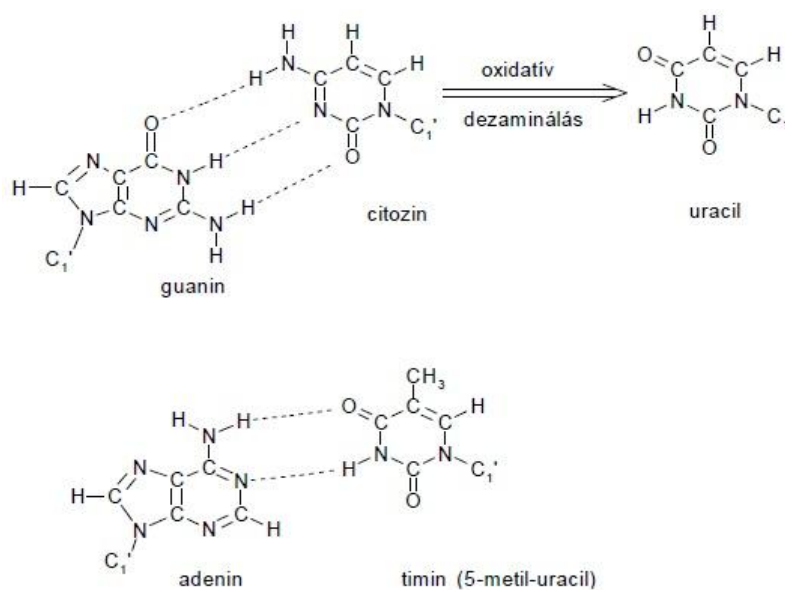
Az MTA TTK Enzimológia Intézet Genom Metabolizmus és DNS Hibajavítás Kutatócsoport látókörébe került egy olyan fehérje (Stl), mely hatékony, a bakteriális és a humán fehérjéket eltérő módon és mértékben befolyásoló dUTPáz inhibitornak tűnik. Ezen inhibitor gátlási mechanizmusának mélyreható vizsgálatával nyert információk nagyban hozzájárulhatnak az Stl fehérje alapú dUTPáz inhibitorként történő alkalmazásához.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A dUTPáz enzim

Az élő szervezetekben az egyik legfontosabb feladat a sejtekben megtalálható örökítő anyag épségének megőrzése. A dUTPáz enzim működése egyike a genetikai állományban előforduló hibák megjelenésének megelőzését célzó mechanizmusoknak.

A DNS-ben négyféle bázis található: adenin, guanin, citozin és timin. Utóbbit az RNS-ben uracil helyettesíti. Az uracil és timin bázisokat csupán egy 5-metil csoport különbözteti meg (1. ábra).

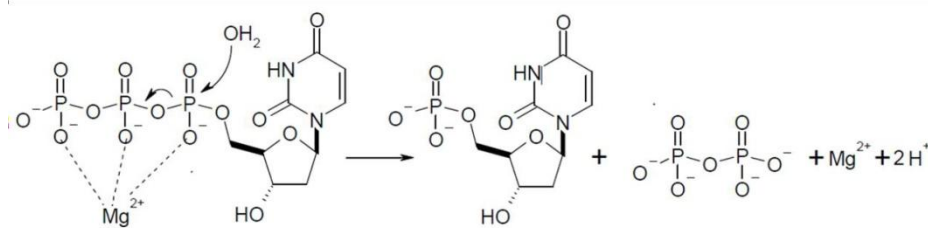


1. ábra: A Watson-Crick bázispárosodás

Fent: az oxidatív dezaminálás során a guaninnal szemben mutagén uracil lesz

Lent: az adeninnel szembeni timint helyettesítő uracil nem mutagén [2]

Ez a csekély különbség az oka annak, hogy a legtöbb DNS polimeráz nem képes különbséget tenni a két bázist tartalmazó dNTP (dezoxi-nukleotid-trifoszfát), a dUTP (dezoxi-uridin-trifoszfát) és a dTTP (dezoxi-timidin-trifoszfát) között. Ezért a két nukleotid DNS-be való beépülésének valószínűsége kizárólag a sejtben lévő dUTP/dTTP aránytól függ. Ennek az aránynak a megfelelően alacsony értéken tartásában játszik szerepet a dUTPáz, mely a dUTP hidrolízisével a dTTP bioszintéziséhez szükséges prekursor molekulát, azaz dUMP-t állít elő (2. ábra) [1].



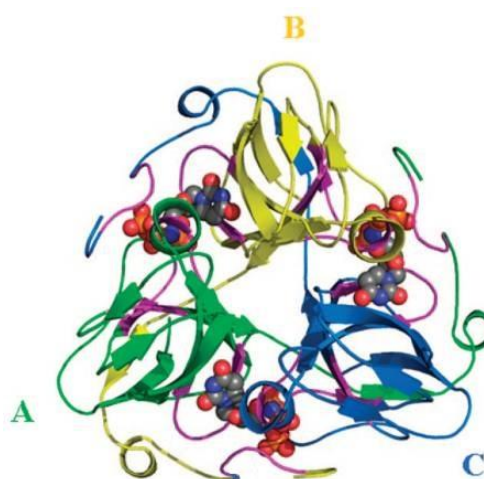
2. ábra: A dUTPáz által katalizált reakció [1]

Az uracil DNS-be való beépülése kétféle módon történhet: i) a DNS polimeráz timin helyett uracilt épít be ii) a citozin spontán oxidatív dezaminálása során uracil jön létre (1. ábra). Az előbbi uracil nem mutagén, mivel nem okoz bázispárosodási hibát. Utóbbi esetben azonban pontmutáció jön létre, ugyanis a következő replikációs ciklus során az uracillal szemben adenin fog beépülni guanin helyett. A hibajavító rendszer nem különbözteti meg a DNS-be kétféleképpen kerülő uracilt. A báziskivágó hibajavító rendszer minden uracilt eltávolít a DNS-ből [1].

dUTPáz hiányában tehát megemelkedik a sejtbeli dUTP/dTTP arány, melynek köszönhetően megemelkedik az uracil DNS-be való beépülésének valószínűsége. A báziskivágási mechanizmus így nem lehet eredményes, mivel a kivágott uracil helyére újabb uracil épülhet be. Ez a hibajavító mechanizmus túlműködéséhez vezet, mely genom instabilitást, DNS kettősszál töréseket és a sejt életképességének csökkenését okozhatja [1].

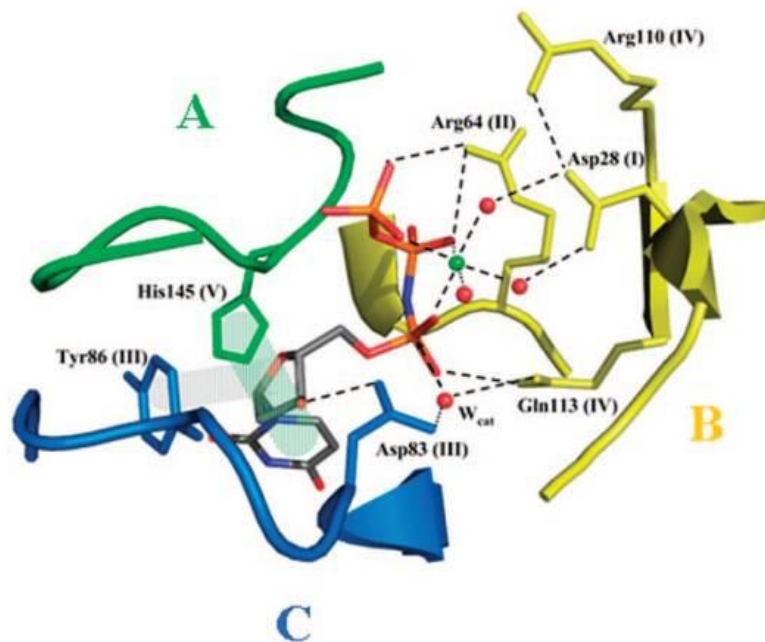
2.2. A dUTPáz enzim szerkezete, aktív centruma és kinetikai mechanizmusa

A legtöbb dUTPáz enzim homotrimer szerkezetű, melyben az alegységek ún. „lekváros tekercs” (jolly-roll) módon tekerednek fel β -lemezzé (3. ábra). Az egyes alegységek 5 darab konzervált motívumból épülnek fel. Az enzim három aktív hellyel rendelkezik, melyeket a három alegység együttesen hoz létre (3. ábra). Az első alegység az 1., 2., és a 4., a második a 3., az utolsó pedig az 5. motívummal járul hozzá az aktív hely kialakításához [3, 4].



3. ábra: Homotrimer *Mycobacterium tuberculosis* dUTPáz szerkezete (PDB: 2PY4) [1]. Az aktív helyeket a térkitöltő ábrázolással megjelenített nukleotidok emelik ki.

Az 1., 2. és a 4. motívumok felelősek a nukleotid:Mg²⁺ komplexben található Mg²⁺ ion, valamint a nukleotid foszfát láncának koordinálásáért (4. ábra). A Mg²⁺ jelenléte elősegíti a nukleotid kötődését és növeli a hidrolízis sebességét [5]. A 3. motívumban található torzult β -hajtű biztosítja az uracil megkötését (4. ábra). Ez a hidrogén-hidaknak és a sztérikus kölcsönhatásoknak köszönhetően nagyon specifikus, így a dUTPáz hatékonyan képes megkülönböztetni a dUTP-t a többi nukleotidtól [6]. Ebben a motívumban helyezkedik el egy szigorúan konzervált aszpartát aminosav is, amely a hidrolízis során lejátszódó nukleofil támadáshoz szükséges vízmolekulát hidrogénkötésen keresztül koordinálja (4. ábra, Asp83). A harmadik alegységben található flexibilis C-terminális régió tartalmazza az 5. szekvencia motívumot. Ez a glicin-gazdag C-terminális kar a szomszédos aktív hely fölé nyúlik (3. ábra), ezzel biztosítva az aktív hely zárt konformációját [7].

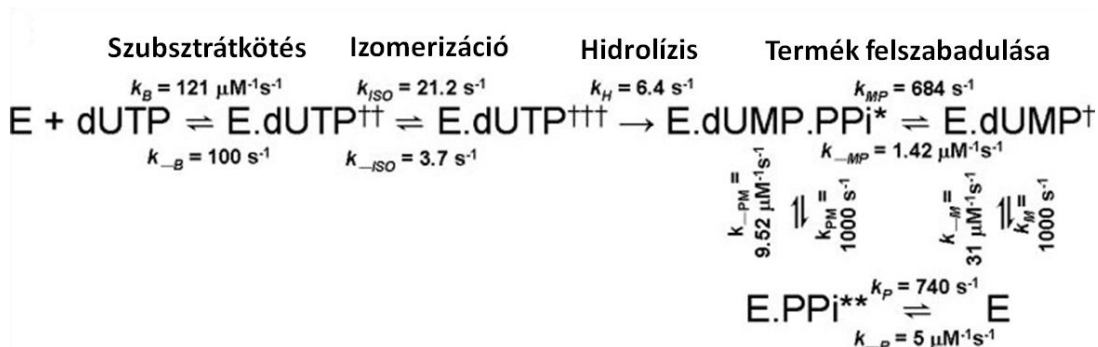


4. ábra: A *Mycobacterium tuberculosis* aktív helyének felépítése, a szubsztrátot koordináló aminosavak kiemelésével (PDB: 2PY4). A római számok a konzervált motívumok számát jelölik. ---: H-híd, piros gömb: hidrogén, zöld gömb: Mg²⁺ [1]

Az 5. szekvencia motívumban található egy konzervált aromás aminosav, ami átlapol a szubsztrát uracil bázisával (4. ábra, His145). Az uracil bázis és az átlapoló aromás aminosav között π - π kölcsönhatás jön létre, ami elősegíti a hatékony hidrolízist [8]. Az 5. motívum konzervált aromás aminosava triptofán aminosavra cserélhető az enzim működési tulajdonságainak megváltozása nélkül [7, 8, 9]. A ligand és a triptofán között létrejövő π - π kölcsönhatás következtében a ligand bekötődése a fluoreszcencia

csökkenésével, míg felszabadulása a fluoreszcencia növekedésével jár. Így ez a triptofán mutáció lehetővé teszi a fehérje nukleotid hidrolízisének fluoreszcens vizsgálatát [9].

A humán dUTPáz esetében részletesen tanulmányozták az enzim kinetikai mechanizmusát [9]. Ennek során a következő modellt javasolták a dUTPáz enzimátikus ciklusára (5. ábra):



5. ábra: A humán dUTPáz enzimátikus ciklusa [9]. A keresztek és a csillagok a fluoreszcencia csökkenését/növekedését mutatják. A nyilak felett az adott lépésre jellemző sebességi állandók láthatók.

A dUTPáz enzimátikus ciklusa négy lépésből áll. Első lépés a szubsztrát, azaz a dUTP megkötése. Ezt az aktív helyen egy konformáció-változás követi, mely elősegíti az aktív zsebben történő hidrolízist. A hidrolízis, melynek során dUMP és pirofoszfát keletkezik, a folyamat sebesség-meghatározó lépése. Legvégül a termékek gyors felszabadulása történik [9].

2.3. Fág eredetű dUTPáz eddig ismeretlen szerepe a *Staphylococcus aureus* patogenitási szigetek életciklusában

A *Staphylococcus aureus* a legintenzívebben kutatott baktériumok közé tartozik. A leggyakoribb emberi bakteriális kórokozók egyike, hozzávetőleg az emberiség 20 %-a tartósan, 30 %-a szakaszosan kolonizált ezzel a baktériummal [10]. A *S. aureus* fertőzőképessége a patogenitási szigeteinek (*Staphylococcus aureus* pathogenicity islands, SaPI) köszönhető, melyek olyan, a genomba integrálódott, mobilis genetikai elemek, amelyek a kórokozó virulenciáját növelő géneket tartalmaznak, például toxinok, adhézión és antibiotikum rezisztencia faktorok génjeit.

A SaPI-k nem kódolják a horizontális géntranszferhez szükséges fehérjét, a transzdukciójuk megvalósításához helper fágokat használnak [11]. A SaPI kifejeződését helper fágok hiányában egy SaPI-n kódolt represszor, az Stl gátolja. Helper fág fertőzés vagy profág aktiváció hatására azonban megszűnik az Stl gátló hatása és a SaPI

aktiválásért felelős gének kifejeződnek. Ezek a gének a SaPI genomból való kivágásáért felelős fehérjéket kódolnak. A SaPI kivágódása után replikálódik, majd fág részecskébe csomagolódik. A baktérium sejt lízise után a SaPI DNS-t tartalmazó fág részecskék újabb sejteket képesek fertőzni [11].

Kimutatták, hogy az Stl gátló hatásának megszűnéséért néhány SaPI esetén (pl. SaPI_{bov1}) a Φ 11 fág dUTPáz felelős. A Φ 11 dUTPáz megbontja az Stl és a DNS között kialakult kölcsönhatást, ezzel lehetővé téve a SaPI aktivációját [12, 13]. Nagyon meglepő, hogy a dUTPáz, mely eddigi ismereteink szerint a pirimidin bioszintézis és a genom integritás megőrzéséért felelős esszenciális enzim, szerepet játszik egyes mobilis genetikai elemek expressziójának szabályozásában.

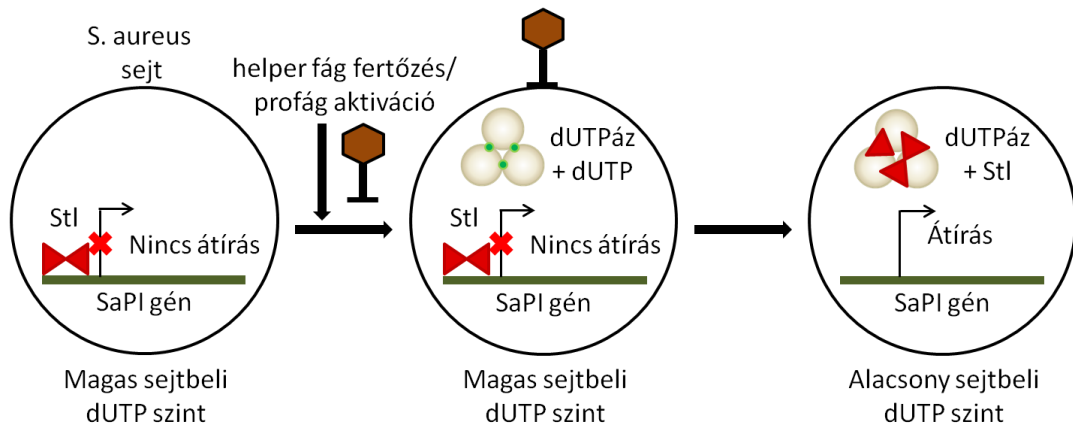
2.4. A dUTPáz gátlásának lehetősége – az Stl

Csoportunk a dUTPáz és az Stl között kialakuló kölcsönhatást több szempontból is érdekesnek találta, ezért a Φ 11 dUTPáz és az Stl kölcsönhatásának részletes *in vitro* vizsgálatába kezdett. Már az első kísérletek során kiderült, hogy nem csak a Φ 11 dUTPáz gátolja a SaPI represszorának működését, hanem ez fordítva is igaz.

Laboratóriumunkban kimutatták, hogy a SaPI_{bov1}Stl (továbbiakban röviden Stl) közel 100 %-osan képes gátolni a Φ 11 dUTPáz aktivitását. A gátlás már alacsony Stl koncentráció esetén fellépett, mely a dUTPáz-al való erős kölcsönhatására utal. Azt is megfigyelték, hogy gátlás csak abban az esetben volt jól kimutatható, ha a méréseket a dUTPáz és az Stl együttes előinkubálása előzte meg, és szubsztrát csak ezt követően került a reakcióelegybe. Ha azonban az Stl-t és a dUTP-t egymással egy időben adták a dUTPáz-hoz, nem volt számottevő csökkenés a dUTPáz aktivitásában. Ez arra utal, hogy az Stl sokkal lassabban képes a dUTPáz-hoz kötődni, mint saját szubsztrátja, a dUTP. Ez alapján az Stl egy lassú, de erős inhibíciós mechanizmussal képes gátolni a Φ 11 dUTPáz-t [13]. A vizsgálatokból az is kiderült, hogy az Stl és a dUTP nem képesek egyidejűleg kötni a Φ 11 dUTPáz-hoz, azaz az inhibíció kompetíción keresztül valósul meg.

A Φ 11 dUTPáz és az Stl kölcsönhatásának *in vitro* vizsgálata mellett javasoltak egy esetleges modellt a dUTPáz expresszió szabályozásában betöltött szerepének molekuláris mechanizmusára. Az *S. aureus* törzsek nem rendelkeznek saját dUTPáz enzimmel, mely feltehetőleg magas sejtbeli dUTP szintet eredményez. Kimutatták azt is, hogy Stl és dUTP együttes jelenlétében a dUTPáz dUTP kötése és hidrolízise

gyorsabb, mint az Stl megkötése. Emiatt fágfertőzés esetén a fág dUTPáz csak a sejtben található dUTP hidrolízise után tud kölcsön hatni az Stl fehérjével. A dUTPáz és az Stl között kialakuló kölcsönhatás következtében megszűnik az Stl SaPI DNS átíródására kifejtett gátló hatása. Így megindulhat a SaPI-n kódolt gének kivágása és replikációja immár egy dUTP-mentes környezetben, mely lehetővé teszi a mobilis genetikai elemek hibátlan átírását [13] (6. ábra).



6. ábra: $\Phi 11$ dUTPáz szerepe *S. aureus*-ban [13]

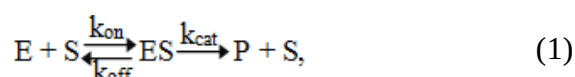
Fontos megemlíteni, hogy az Stl lehet az első fehérje jellegű dUTPáz inhibitor. Érdekes, hogy az uracil N-glikoziláz (UNG) esetében – mely szintén egy, a DNS uracil tartalmának szabályozásában résztvevő enzim, akárcsak a dUTPáz – is létezik egy fág eredetű inhibitor, az UGI (Uracil glikoziláz inhibitor), mely hasonlóan az Stl-hez, erős kötéseken keresztül gátolja az uracil N-glikozilázt [14]. Ezen tulajdonságának köszönhetően széles körben alkalmazzák, mint UNG enzim inhibitor.

2.5. Lassú és erős kötődésen keresztül megvalósuló inhibíció mechanizmusának vizsgálata enzimkinetikai módszerekkel

Ahogy korábban bemutattam, az Stl a $\Phi 11$ dUTPáz-nak egy lassan és erősen kötődő inhibitora. A lassú és erős kötődésen keresztül megvalósuló inhibíció a gátlási mechanizmusok egy speciális csoportjába tartozik. Az ilyen kölcsönhatásokon alapuló reakciók megértéséhez azonban rendelkezünk kell a klasszikus enzimkinetikai módszereken alapuló mérés technikák elméleti és gyakorlati ismereteivel.

2.5.1. Stacionárius, vagy steady-state kinetika

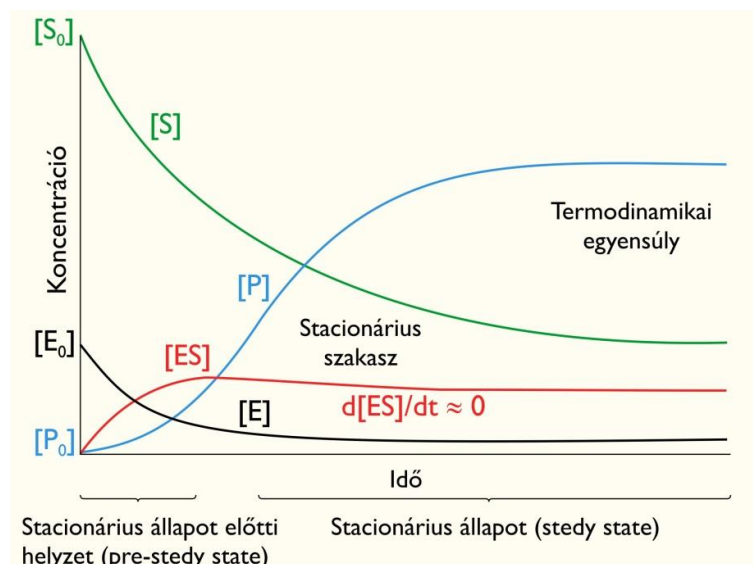
A klasszikus steady-state kinetika első általánosan elfogadott leírása Leonor Michaelis és Maud Menten nevéhez fűződik. A Michaelis-Menten modell szerint az enzim reakció a következőképpen játszódik le (1):



ahol E az enzimet, az S a szubsztrátot, az ES az enzim:szubsztrát komplexet, a P a terméket jelöli.

A reakció sebességét mindig steady-state, vagy más néven stacionárius állapotában vizsgáljuk. A stacionárius állapot azt jelenti, hogy az ES komplex koncentrációja állandó (7. bár). Azt feltételezzük, hogy ez a stacionárius állapot pillanatszerű gyorsasággal áll be. Ez a feltételezés akkor teljesül, ha a szubsztrát kötése a reakciónál sokkal gyorsabb. A szubsztrát kötése sebességi állandóival ez a modell nem foglalkozik.

A Michaelis-Menten modell további feltételezése, hogy a teljes szubsztrát koncentráció és a szabad szubsztrát koncentráció megegyezik. Ez akkor valósulhat meg, ha a szubsztrát koncentrációjához képest az enzim koncentrációja elhanyagolható ($[E] \ll [S]$). Ebben az esetben, ha a reakció kezdeti szakaszát vizsgáljuk (ahol még a szubsztrát kevesebb, mint 10%-a alakult át) elmondható, hogy a teljes szubsztrát koncentráció és a szabad szubsztrát koncentráció megegyezik, mivel az ES komplexben lévő szubsztrát mennyisége az alacsony enzimkoncentráció miatt elhanyagolható.



7. ábra: A stacionárius állapot [15]

Ha a Michaelis-Menten modell feltételei teljesülnek, az enzímreakció sebessége a szubsztrát koncentrációjának függvényében az alábbi egyenlet szerint változik:

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

Tehát a reakció sebessége egy maximum érték felé tart, amit V_{max} -nak nevezünk. Ha a szubsztrát koncentrációja nagyon magas, a reakció sebessége eléri a maximális sebességet. A V_{max} értékét az enzim koncentráció és a katalízis sebességi állandójának (k_{cat}) szorzata adja meg.

A Michaelis-Menten modellben az enzímreakció a V_{max} mellett egy második állandóval, a Michaelis-Menten konstanssal (K_M) is jellemezhető. A K_M formálisan a maximális reakciósebesség feléhez eső szubsztrát koncentráció. A K_M definiálható az egyenletben (3) szereplő sebességi állandókkal:

$$K_M = \frac{k_{off} + k_{cat}}{k_{on}} \quad (3)$$

Amennyiben a k_{cat} állandó elhanyagolhatóan kicsi a szubsztrát disszociációs sebességi állandójához képest, akkor:

$$K_M = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (4)$$

azaz a $K_M = K_D$ disszociációs állandóval [15].

A Michaelis-Menten modell feltételeinek természetesen teljesülniük kell inhibitor jelenlétében is, tehát: i) az enzim koncentrációjának elhanyagolhatóan kicsinek

kell lennie az inhibitor koncentrációjához képest, ii) a reakciót stacionárius állapotban vizsgáljuk, ahol az EI (enzim:inhibitor komplex) valamint az ES koncentrációja állandó, iii) a stacionárius állapot pillanatszerű gyorsasággal áll be.

2.5.2. A lassú és erős kötődésen keresztül megvalósuló enzimgátlás

Ahogy azt láthattuk, a Michaelis-Menten modell számos megkötetést alkalmaz. A lassú és erős kötődésen keresztül megvalósuló inhibíciós mechanizmus azonban jellegéből adódóan a legtöbb feltételnek nem felel meg.

Azon inhibitorok, melyek erős kölcsönhatáson keresztül kötődnek az enzimhez, rendkívül alacsony disszociációs állandóval rendelkeznek. Méréstechnikai okokból ezért nem megoldható, hogy az enzim koncentrációja elhanyagolhatóan kicsi legyen az inhibitor koncentrációjához képest. Így az a feltételezés, hogy a szabad és teljes inhibitor koncentrációk megegyeznek, nem teljesül [16]. Emellett, ha az inhibitor enzimhez való kötődése lassan megy végbe, akkor az inhibitor:enzim komplex nem pillanatszerűen gyorsan jön létre. Így az a feltétel sem teljesül, hogy a reakciót egy gyors előegyensúly kialakulása előzi meg [17].

Az ilyen mechanizmuson keresztül megvalósuló gátlás esetében azon az időskálán, ahol a gátolatlan enzimreakció vizsgálható, nem csak a steady-state enzimreakciónak megfelelő lineáris szubsztrát átalakítást látjuk, hanem az inhibitor kötődéséből adódó, pre-steady-state szakaszra jellemző tranziens folyamatokat is. A körülményeket tovább nehezítheti, ha az inhibíció több lépésen keresztül megy végbe, pl.: ha az inhibitor enzimhez történő kötődését egy izomerizációs lépés követi. Az ilyen bonyolult, soklépéses folyamatok jellemzése csak tranziens kinetikai módszerekkel lehetséges.

2.5.3. Tranziens kinetika

A tranziens kinetika vagy más néven pre-steady-state kinetika a reakció azon szakaszát vizsgálja, ahol még nem alakult ki a termodinamikai egyensúly. Segítségével megfelelő körülmények között az elemi lépések egyenként tanulmányozhatók, és az így kapott elemi információk felhasználásával felállíthatunk egy, a teljes reakciót leíró modellt. A steady-state közelítésre jellemző, hogy általuk csak közvetett információk nyerhetők az enzim működési mechanizmusáról, míg a tranziens kinetikai módszerek segítségével a vizsgálni kívánt lépést szelektíven tudjuk követni, így segítségével közvetlen információt kapunk a vizsgált reakcióról.

3. Célkitűzések

Az MTA TTK Enzimológia Intézet Genom Metabolizmus és DNS Hibajavítás Kutatócsoport munkájába bekapcsolódva lehetőségem nyílt az Stl fehérje, mint dUTPáz inhibitor tanulmányozására.

Megfigyelték, hogy az Stl a humán és a mikobakteriális dUTPáz-okat is képes gátolni, ám eltérő mértékben, mely a gátlás fajspecifikus voltára utal. A humán dUTPáz aktivitását 50 %, míg a mikobakteriális dUTPáz-ét 80 %-osan gátolja. A *Mycobacterium tuberculosis* a tuberkulózis megbetegedés egyik kórokozója, melynek kezelésében nagy gondot okoz a többszörösen gyógyszer rezisztens törzsek megjelenése. Így nem meglepő, hogy a mikobakteriális dUTPáz-t, mint potenciális gyógyszer-célpontot vizsgálják. Ezen dUTPáz Stl gátlási mechanizmusának *in vitro* vizsgálatával megérthetjük, mi okozza az Stl gátlás mértékének különbözőségét a különböző fajokból származó dUTPáz-ok esetén. Emellett ezek a vizsgálatok megalapozhatják az Stl fehérjealapú dUTPáz inhibitoroként történő *in vivo* alkalmazását. Ezért munkám során célul tűztem ki az Stl és a *Mycobacterium tuberculosis* dUTPáz (MTB dUTPáz) között kialakuló kölcsönhatás *in vitro* módszerekkel történő jellemzését.

Első lépésként a vizsgálataimhoz szükséges Stl, vad típusú és aktív helyén triptofán pontmutációt tartalmazó mikobakteriális dUTPáz fehérjék előállítását kívántam véghezvinni. Azt, hogy a két dUTPáz variáns aktivitásában, valamint Stl-el kialakított kölcsönhatásában van-e eltérés, steady-state és tranziens kinetikai módszerekkel terveztem megállapítani. Céлом volt az Stl gátlási mechanizmusának feltárása, valamint a gátló hatás mértékének meghatározása.

Fluoreszcencián alapuló mérés technikák alkalmazása mellett szerettem volna megállapítani az Stl és a dUTPáz között kialakuló kölcsönhatásra jellemző kinetikai paramétereket, valamint vizsgálni kívántam az Stl jelenlétének hatását a dUTPáz szubsztrátkötésére.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Fehérje termelés

4.1.1. Kompetens sejt előállítása

A kompetens sejteket a QIAGEN protokollja alapján állítottam elő.

5 ml LB tápoldatba 5 μ l (0,03 mg/ml) klóramfenikolt mértem, beoltottam *Escherichia coli* BL21 Rosetta sejtekkel, majd rázatás mellett 37 °C-on egy éjszakán át növesztettem. A felnövesztett előkultúrából 500 μ l-t átoltottam 50 ml 50 μ l klóramfenikolt tartalmazó LB tápoldatba. A sejteket 37 °C-on növesztettem óránkénti mintavétel mellett, míg az optikai denzitás (OD, A_{600nm}) elérte az exponenciális növekedési fázisra jellemző 0,6-os értéket. A denzitás mérést Biochrom WPA CO8000 denzitométeren végeztem. A sejteket 3600 rpm-en centrifugáltam 4 °C-on 20 percen át, ezt követően a felülúszót eltávolítottam. A lefugált sejteket 5 ml transzformáló-puffer I-ben (100 mM RbCl, 50 mM MnCl, 30 mM K-acetát, 10 mM CaCl₂, 15 % glicerín pH = 5,8) felfuszpendáltam, majd 20 percre jégre raktam. Ismételt centrifugálást, felfuszpendálást és jegelést követően 1 ml transzformáló-puffer II-ben (10 mM MOPS (3-[N-morfolino]-propánszulfonsav), 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % glicerín pH = 6,8) szuszpendáltam a sejteket. Végül 15 % glicerint adtam a sejtekhez és 100 μ l-es adagokban folyékony nitrogénnel lefagyasztottam. A kompetens sejteket -80°C-os hűtőben tároltam a következő felhasználásig.

4.1.2. Transzformálás

Az MTB dUTPáz-t tartalmazó pet19b plazmid (expressziós plazmid) DNS kompetenssé tett sejtekbe való bejuttatáshoz hősokk módszert alkalmaztam. 100 μ l kompetens baktériumsejthez 1 μ l 10 $\times$ híg 1,4 M β -ME-t (2-merkaptóetanol) pipettáztam és 5 percig jégen hagytam. Ezután hozzáadtam 30 ng plazmidot és 30 percig jegeltem a sejteket. A hősokk egy 90 másodperces 42 °C-os termosztálást követő 2 perces jegelésből állt. Hozzáadtam 200 μ l LB tápoldatot és a sejteket 1 órán át 37 °C-on 200 rpm-en ráztam. Ezt követte egy szelekciós lépés, ahol a BL21 Rosetta szelekciós antibiotikuma mellé a plazmidon kódolt ampicillin rezisztenciának megfelelő antibiotikumot (carbenicillint) is tettem az LB tápoldatba. Így csak a sikeresen transzformált BL21 Rosetta sejtek szaporodtak. Végül carbenicillint és klóramfenikolt

tartalmazó táptalajra szélesztettem 50 µl mintát, majd 37 °C-on növesztettem a sejteket 12-16 órán át.

4.1.3. Expresszió

Az expressziós plazmiddal transzformált, majd egy éjszakán át növesztett sejt kultúrát átoltottam 0,5 l steril, klóramfenikol és carbenicillin antibiotikumokat tartalmazó LB tápoldatba, majd a sejteket 37 °C-on szaporítottam.

A sejtkoncentráció változását bizonyos időközönként vett minták optikai denzitásának spektrofotometriás mérésével követtem. A sejteket logaritmikus növekedési fázisuk elején 500 µl 0,5 M IPTG-vel (izopropil-tiogalaktozid) indukáltam.

Az IPTG – ami az allolaktóz stabil analógja – a *lac* promóter ellenőrzése alatt álló T7 DNS-függő RNS polimeráz enzimet kódoló génről megindítja a polimeráz expresszióját. Az így termelődött T7 polimeráz tevékenységét a plazmidra irányítja a nagyon erős T7-specifikus promóter régió, amely a termelni kívánt fehérje gén előtt helyezkedik el a plazmidon. Így az IPTG hozzáadásával a dUTPáz génről történő expressziót tudtam beindítani. Három órán keresztül termeltem az enzimet, közben óránként 200 µl mintát vettem, melyek felhasználásával SDS-PAGE-el utólag ellenőriztem az expresszió sikerességét. Ezt követően 20 percig centrifugáltam a sejteket 4000 rpm-en, eltávolítottam a felülúszót, a sejteket felvettem 20 ml dH₂O-ben, majd megismételtem a centrifugálást. Végül a sejteket -80°C-os hűtőben tároltam a következő felhasználásig.

4.1.4. Feltárás

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

A sejt pelletet 50 ml lízis pufferben (50 mM TRIS HCl, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 10 mM β-ME, 0,1 % Triton X-100, 1 mM PMSF (fenil-metil-szulfonil-fluorid), 5 mM benzamidin, 1x Complete, EDTA-free proteáz gátló tabletta, 0,1 mg/ml DNáz, 0,001 mg/ml RNáz A, pH = 8) vettem fel.

A feltárás során a sejteket Potter-cső segítségével homogenizáltam, majd a feltárandó sejt mintát szonikáltam, 4×30 másodperces szonikálási programot használva. A felmelegedés elkerülése érdekében a feltárás során a sejt mintát jéggel hűtöttem, a ciklusok között fél perc hűtési időt alkalmaztam. Végül a sejtfalmaradványokat és a

feltáratlan sejteket centrifugálással távolítottam el (4 °C, 11000 rpm, 30 perc). A felülúszóban maradt fehérjéket kromatográfiás módszerrel tisztítottam.

4.1.5. *Mycobacterium tuberculosis* dUTPáz tisztítása

A feltárt fehérjét affinitás kromatográfiával tisztítottam Ni-NTA (Novagen) töltetű oszlopon. A fehérje N-terminálisán lévő hatszoros hisztidin címke a nitrilotriecetsav által kötött nikkel ionokkal kelátkomplexet képez, és ezáltal immobilizálódik.

A tisztítás megkezdése előtt az etanolban tárolt oszlopot desztillált vízzel mostam, majd ekvilibráltam egy fehérjéket nem tartalmazó, alacsony NaCl-tartalmú pufferrel (LS (low salt) puffer: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM β -ME, 5mM $MgCl_2$, pH = 7,5). A fehérjéket tartalmazó felülúszó mintát felvittem az oszlopra. Az oszlopon nem specifikusan megkötődött szennyező molekulákat alacsony és magas NaCl-tartalmú (HS (high salt) puffer: 20 mM HEPES, 300 mM NaCl, 10 mM β -ME, 5mM $MgCl_2$, pH = 7,5) oldatos mosásokkal távolítottam el. Ezután 75 mM-os imidazollal lemostam a nikkel ionnal szintén kelátkomplexet képző aromás szennyező anyagokat. Végül 0,5 M imidazolt tartalmazó elúciós oldattal (LS puffer, 0,5 M imidazol, 10 mM β -ME, 0,1 mM PMSF, 5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM benzamidin, pH = 7,5) mostam le a megtisztított fehérjét, amiből körülbelül 500 ml-enként mintát véve, majd Bradford reagenshez pipetázva követtem az oszlopról lejövvő oldat fehérjetartalmát. A tisztítás eredményességét SDS-PAGE gélen elektroforetikusan ellenőriztem. A megtisztított fehérje oldatot 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM β -ME, 0,5 mM benzamidin tartalmú dialízis pufferben dializáltam 16-18 órán át, melynek célja az imidazol eltávolítása volt.

A tisztítási folyamat befejeztével az oszlopot 1 M imidazollal, majd desztillált vízzel mostam. Ezután az oszlopot etanollal feltöltve tároltam tovább 4 °C-on.

4.1.6. Az Stl tisztítása

Ebben az esetben az Stl-GST fúziós fehérje génjét tartalmazó pGEX-4T-1 vektorral transzformált *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS expresszált sejtek a rendelkezésemre álltak. Az 500 ml baktérium kultúrából származó sejt pelletet 25 ml feltárási pufferből (50 mM TRIS HCl, 1 M NaCl, pH = 7,5) készített lízis pufferben (10 mM β -ME, 0,1 % Triton X-100, 1x Complete, EDTA-free proteáz gátló tabletta,

0,1 mg/ml DNáz, 0,001 mg/ml RNáz A, pH = 8) vettem fel. A feltárást a továbbiakban a már korábban ismertetett módon fejeztem be.

A fehérje tisztításához használt glutation-agaróz affinitás kromatográfiás oszlopot 30 ml vízzel és 30 ml feltáró pufferrel ekvibráltam, majd a centrifugálás során nyert felülúszóval 18 °C-on 30 percig inkubáltam. Ezt követően az áteső frakciót gyűjtöttem, majd az oszlopot 30 ml feltáró pufferrel mostam, mellyel eltávolítottam az aspecifikusan kötődött szennyező molekulákat. Ahhoz, hogy az Stl-t lehasítsam a glutation-S-transzferáizról, az oszlopot 80 U (Calbiochem) trombint tartalmazó feltáró pufferrel inkubáltam 18 °C-on egy éjszakán át. Az emésztést követően a fehérjét tartalmazó oldatot gyűjtöttem, majd az oszlopot 2×2 ml feltáró pufferrel mostam. Az oszlopra felkötődött GST-t 2×5 ml elúciós oldattal (50 mM TRIS-HCl, 100 mM redukált glutation, pH = 8) távolítottam el.

A tisztítási folyamatot követően szükség volt az oszlop regenerálására. Ehhez először 10 ml regeneráló oldat A-val (0,1 M Na-acetát, 0,5 M NaCl, pH = 4,5) mostam át az oszlopot, majd ezt újabb 10 ml regeneráló oldat B (0,1 M Na-acetát, 0,5 M NaCl, pH = 8,5) követte. Ezt háromszor ismételt meg. Utolsó lépésként 30 ml PBS oldatot (200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH = 7,3) engedtem át az oszlopon, végül 20 % etanolban 4 °C-os hűtőben tároltam.

4.2. Fehérjevizsgálat

4.2.1. SDS poliakrilamid gélelektroforézis

Az elválasztást poliakrilamid gélben végeztem, ami SDS (sodium-dodecilszulfát) denaturáló ágenst tartalmazott. Ennek hatására a fehérjék elvesztették natív konformációjukat, felületi töltésük a teljes aminosav láncon negatívvá vált. A fehérjék tehát eredeti töltésüktől függetlenül a pozitív töltés felé haladtak, az elválasztást egyedül az egyes proteinek mérete határozta meg, mely arányos a molekulatömeggel. A gél egy vékony, a különböző fehérjék koncentrációját szolgáló tömörítő (6 % poliakrilamid) és egy elválasztó (12 % poliakrilamid) rétegből állt.

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

A molekulatömeg meghatározáshoz PageRuler Plus Prestained Protein Ladder létrát használtam.

A gél elválasztó és tömörítő rétegének összetétele a következő volt:

Elválasztó gél: 2,2 ml ddH₂O, 1,25 ml elválasztó puffer, 1 ml 40 % akrilamid, 50 µl 10 % SDS, 50 µl 10 % APS (ammónium-perszulfát), 5 µl TEMED (N, N, N', N'-tetrametil-etiléndiamin)

Tömörítő gél: 1,63 ml ddH₂O, 625 µl tömörítő puffer, 244 µl 40 % akrilamid, 25 µl 10 % SDS, 25 µl 10 % APS, 5 µl TEMED

4.2.2. Koncentráció mérés

A fehérjék az aromás aminosav oldalláncok miatt 280 nm-nél specifikus fényelnyelést mutatnak. Az abszorbancia és koncentráció közti összefüggést a Lambert-Beer törvényt (5) adja meg, segítségével a tiszta fehérjék koncentrációja meghatározható:

$$A = c \cdot l \cdot \varepsilon \quad (5)$$

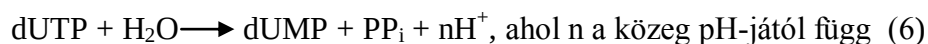
ahol a fehérjékre vonatkozó extinkciós koefficiens (ε , $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) az Expasy ProtParam programjával becsültem meg a fehérjék szekvenciája alapján (1. táblázat). A mérést Nanodrop ND-2000 spektrofotométeren (Thermo Scientific) végeztem.

	Molekulatömeg (Da)	ϵ (mg·ml ⁻¹ ·cm ⁻¹)
WT MTB dUTPáz	17966	0,166
H145W MTB dUTPáz	17966	0,471
Std	34029	1,083

1. táblázat: A mérések során használt fehérjék Expasy Prot Param programmal becsült molekulatömege és extinkciós koefficiens értékei

4.2.3. Fotometriás mérések

A vad típusú valamint a fehérje aktív helyén triptofán pontmutációt tartalmazó dUTPáz-ok aktivitásának mérését spektrofotometriásan, 20 °C-ra termosztálva végeztem a JASCO-550 UV/VIS spektrofotométerrel. A méréshez használt oldat 1 mM HEPES-t, 150 mM KCl-ot, 5 mM MgCl₂-ot és 40 μ M fenolvörös sav-bázis indikátort tartalmazott (pH = 7,5). A dUTPáz által katalizált reakció során protonok szabadulnak fel, amelyek mennyisége egyenesen arányos az elhidrolizált dUTP mennyiségével. Mivel az oldat gyengén pufferolt, a dUTP hidrolíziséből felszabaduló protonok detektálható mértékben savanyítják a közeget, amit a fenolvörös sav-bázis indikátor színváltozásának 559 nm-es hullámhosszon való abszorbancia mérésével tudtam követni.



A méréseket minden esetben 50 nM dUTPáz-al végeztem, a reakciót a dUTP hozzáadásával indítottam.

4.2.3.1. A fehérjék steady-state aktivitásának meghatározása

A dUTPáz variánsok steady-state aktivitásának mérése során kapott reakció görbék első 10 %-ára illesztett egyenes meredekségéből meghatároztam a kezdeti reakciósebességet. Az adott szubsztrát koncentrációhoz tartozó kezdeti sebességet (V_0) az alábbi egyenlet alapján számoltam ki:

$$V_0 = \frac{m}{[E] \frac{\Delta A}{[S]}} \quad (7)$$

ahol V_0 a kezdeti sebesség, m az illesztett egyenes meredeksége, $[S]$ a szubsztrát (dUTP) koncentrációja, $[E]$ az enzim koncentrációja, ΔA a reakció kezdeti- és végpontja közötti abszorbancia különbség.

4.2.3.2. Steady-state enzim aktivitás fotometriás meghatározása erős kötődésen keresztül megvalósuló inhibíció esetén

Az Stl feltételezhetően egy lassú, de erős kötődésen keresztül megvalósuló inhibíciós mechanizmussal gátolja a $\Phi 11$ dUTPáz enzimet. Erre a típusú mérésre jellemző, hogy az inhibitor lassú kötődése, valamint disszociációja miatt azon az időskálán, ahol a gátolatlan reakció steady-state körülmények között vizsgálható, még nem áll be a stacionárius állapot. Ebben a meghosszabbodott pre-steady-state szakaszban exponenciális lefutású tranziensek jelennek meg. A lassú és erős kötődéssel jellemezhető inhibitorok gátlási mechanizmusának vizsgálata kétféleképpen lehetséges: i) a szubsztrátot és az inhibitor egy időben adjuk az enzimhez, ii) a szubsztrát adagolását az enzim és az inhibitor együttes előinkubálása előzi meg. Előbbi módszer esetén a megjelenő tranziens folyamatok vizsgálatával az inhibitor asszociációs és disszociációs sebességi állandójáról kaphatunk információt. A második módszer használatával a gyorsan kötő szubsztrátot már csak akkor adjuk az enzimhez és inhibitorhoz, amikor az enzim:inhibitor komplex már kialakult. Így a szubsztrát hozzáadása után a gátolt enzim steady-state aktivitását reprezentáló lineáris szakaszt figyelhetünk meg. Bizonyos inhibíciós mechanizmusok esetében (pl. kompetitív inhibíció) az előinkubációs módszert alkalmazva is megjelenhetnek a reakció kezdeti szakaszán tranziens folyamatok. Ebben az esetben ezek a tranziensek az inhibitor disszociációjáról szolgáltatnak információt.

Mivel az Stl dUTPáz-hoz való kötődését más mérés technika alkalmazásával is lehetőségem volt vizsgálni, az inhibitor jelenlétében történő fotometriás aktivitásmérés során csak a valódi steady-state szakaszt kívántam kiértékelni. Ehhez, az egyszerűbb kivitelezés és kiértékelés miatt az előinkubációs módszert választottam. Az Stl-t és a dUTPáz-t a mérés megkezdése előtt 5 percig együttesen előinkubáltam, majd a reakció görbe lineáris szakaszára egyenest illesztettem. Itt fontos megjegyezni, hogy a reakció görbék vége, feltételezhetően termék gátlás és szubsztrát fogyásának következtében már nem volt lineáris. Ezt a részt szintén kihagytam az illesztésből.

A reakció görbékre illesztett egyenesek meredekségéből a (7) egyenlet segítségével kiszámoltam a reakció steady-state sebességét (V_{ss}). A kapott sebesség

értékeket az Stl koncentráció függvényében ábrázoltam, majd a pontokra a dUTPáz és Stl fehérjék között 1:1 sztöchiometriával, erős kötődésen keresztül megvalósuló komplexképződési modellnek megfelelő egyenletet (kvadratikus egyenlet) illesztettem (8). A görbeillesztéskor felhasznált egyenlet a következő:

$$y = S + \frac{A(c+x+K_i) - \sqrt{(c+x+K_i)^2 - 4 \cdot x \cdot c}}{2 \cdot c} \quad (8)$$

ahol x a változó Stl koncentráció, S a gátolatlan enzim aktivitása ($y=S$ ha $x=0$), A az Stl nélkül mért aktivitáshoz képest mért változás mértéke az Stl-el telített végállapot esetén, c a dUTPáz koncentrációja, K_i az Stl-re vonatkozó disszociációs állandó.

Az egyenletnek négy paramétere van, amelyek közül az illesztés során a dUTPáz koncentrációt választottam változatlanul, a többi paraméter esetén kezdeti értéket adtam meg, amit az Origin Lab 8.5 program az iterálás során használt fel.

4.2.3.3. Szubsztrát telítési görbék meghatározása

A reakciósebességek szubsztrát koncentráció függvényében való ábrázolásával kapott pontokra a Michaelis-Menten modellnek megfelelően hiperbolát illesztettem, amelynek egyenlete:

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

ahol v a mért kezdeti sebesség (gátolatlan reakció esetén), vagy a mért steady-state sebesség (gátolt reakció esetén), S a dUTP koncentráció, V_{max} a maximális reakciósebesség és K_M a Michaelis-Menten állandó.

A gátolt reakció szubsztrát telítési görbéjének meghatározásához a reakció görbéket az 4.2.3.2. fejezetben leírtaknak megfelelően értékeltem ki. Ehhez a méréshez állandó Stl koncentrációt alkalmaztam (150 nM) és az Stl-t a dUTPáz-al a korábbiakhoz hasonlóan 5 percig előinkubáltam. Az Stl esetében a 150 nM-t telítési koncentrációnak vettem, ugyanis a korábbi mérések alapján további Stl hozzáadása már nem csökkentette a dUTPáz aktivitását.

4.2.3.4. Az MTB dUTPáz aktivitásmérés Stl jelenlétében fotometriás módszerrel

Azokban az esetekben, amikor Stl jelenlétben felvett reakciógörbék elején megfigyelhető tranziens folyamatokat is ki kívántam értékelni, a reakció görbékre az alábbi egyenletet illesztettem, mely egy exponenciális és egy lineáris tagból tevődik össze:

$$y = A(1 - e^{-kt}) + mt + c \quad (9)$$

ahol A az exponenciális taghoz tartozó abszorbancia változás, k a sebességi állandó, t az idő, m az exponenciális fázist követő lineáris szakasz meredeksége, c pedig a görbe végpontjának abszorbancia értéke. Az egyenes meredekségéből a reakció sebességet a korábbiakhoz hasonlóan számoltam.

4.2.4. Stopped-flow mérések

A stopped-flow (megállított áramlás) módszer a tranziens kinetikai mérések egyik eszköze, amellyel a reakció milliszekundumos skálán tanulmányozható. A műszer a reakció kiindulási reagenseit nagy sebességgel összekeveri egy küvettában. A küvettába áramló keverék az előzőleg ott tartózkodó folyadékot kimossa. Ezt követően a műszer az áramlást szinte azonnal megállítja. A küvettában tartózkodó folyadékból származó spektroszkópai jelet a műszer már az összekeverés pillanatától méri. A mért jel viszont csak akkor lesz értelmes, ha az áramlás megállítódik. Az összekeverés és a megállítás pillanata között eltelt idő a holtidő.

A méréseket 20 °C-ra termosztálva az Applied Photophysics SX-20 stopped-flow műszeren mértem, melynek holtideje 2 ms. A mérés során a fluoreszcens jelet követtem, amelyet az enzim aktív helyére mutációval beépített triptofán tett lehetővé. A triptofán fluoreszcenciát 295 nm hullámhosszú fénnel gerjesztettem, majd a jelet 320 nm hullámhossz felett egy 320LP szűrő segítségével mértem.

4.2.4.1. dUTP kötés

A H145W MTB dUTPáz dUTP kötésének vizsgálatát pszeudo-elsőrendű körülmények között végeztem ($[E] \ll [S]$). Így a látszólagos sebességi állandó értéke csak a dUTP koncentrációjától függött.

A mérés során 1 μM enzimet (küvetta koncentráció) és változó koncentrációjú dUTP-t használtam (5-30 μM). A dUTPáz-t és a dUTP-t a dialízis pufferben hígítottam. A kapott görbék az alábbi dupla exponenciális egyenlettel voltak jellemezhetőek:

$$y = \left((y_{0_1} - y_{0_2}) - A_2 \right) e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} + y_{0_2} \quad (10)$$

ahol A_2 a második exponenciális tagokhoz tartozó fluoreszcencia változás, k_x az adott dUTP koncentráció mellett mérhető látszólagos sebességi állandó, t az idő, y_{0_1} a görbe kezdőpontjának fluoreszcencia értéke, melyet lefixáltam a puffer értékére, y_{0_2} pedig a görbe végpontjának fluoreszcencia értéke. Az y_{0_1} és az y_{0_2} érték különbsége megadja a teljes fluoreszcencia változást, míg az $((y_{0_1} - y_{0_2}) - A_2)$ kifejezés első exponenciális taghoz tartozó fluoreszcencia változás (A_1) értékével egyenlő.

A dUTP kötésre vonatkozó látszólagos sebességi állandókat a szubsztrát koncentráció függvényében ábrázoltam. A pontokra illesztett egyenes meredeksége a k_{on} (asszociációs sebességi állandó), az y tengely metszéspontja a k_{off} (disszociációs sebességi állandó) sebességi állandókat reprezentálják, melyekből az alábbi összefüggés alapján a K_D disszociációs állandó meghatározható:

$$K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad (11)$$

4.2.4.2. Aktív hely titrálás

Az aktív hely titrálás során olyan szubsztrát koncentrációkat alkalmazunk, melyek az egyszeri és a többszörös átviteli reakciót is lefedik, így láthatóvá válik az átmenet. Egyszeri átviteli körülményeket úgy hozhatunk létre, hogy az enzim koncentrációjánál alacsonyabb szubsztrát koncentrációt alkalmazunk ($[dUTP] \leq [dUTPáz]$). Így a szubsztrát épp annyira elegendő, hogy a dUTPáz egy enzimatis ciklusa lejátsszódjon. Ha az enzim koncentrációja alacsonyabb, mint a szubsztrát koncentrációja, többszörös átviteli körülményről beszélünk, mely során már beáll a steady-state állapot az enzimatis reakcióban. A H145W MTB dUTPáz aktív hely titrálásához 15 μM enzimet (küvetta koncentráció) és változó dUTP koncentrációt

használtam. Az enzimet és a szubsztrátot a dUTPáz dialízis pufferében hígítottam. Az egyszeri átviteli körülmények között felvett fluoreszcencia görbékre háromszoros exponenciális görbét illesztettem (12). Az illesztett exponenciális görbék hatványkitevőiben szereplő k együtthatók megadták az adott folyamatra jellemző sebességi állandókat.

$$y = A_1(1 - e^{-k_1 t}) + A_2(1 - e^{-k_2 t}) + A_3(1 - e^{-k_3 t}) + c \quad (12)$$

ahol A_x az exponenciális tagokhoz tartozó fluoreszcencia változás, k_x a sebességi állandó, t az idő, c pedig a görbe végpontjának fluoreszcencia értéke.

A vad típusú MTB dUTPáz esetében, mivel az nem tartalmaz triptofán jelölést, az aktív hely titrálást a fotometriás mérés mintájára fenolvörös indikátorban végeztem. A méréshez használt puffer 40 μM helyett 100 μM fenolvörös indikátort tartalmazott, mellyel megnöveltem az indikátor protonfelvételre vonatkozó kapacitását. A fehérjét a fenolvörös indikátor oldatban 2×1 órán keresztül dializáltam, a dUTP szubsztrátot a dialízis pufferben hígítottam, mellyel elértem, hogy az enzim és a szubsztrát azonos pufferben legyenek. A méréseket 20 °C-ra termosztálva, 30 μM dUTPáz koncentráció (küvetára vonatkoztatva) mellett végeztem. A sav-bázis indikátor színváltozását 559 nm-es hullámhosszon követtem. Az idő függvényében kapott reakció görbékre egyszeres exponenciális görbét illesztettem:

$$y = A(1 - e^{-kt}) + c \quad (13)$$

ahol A a kezdő- és a végpont közötti abszorbancia változás, k a sebességi állandó, t az idő, c pedig a görbe végpontjának abszorbancia értéke.

4.2.4.3. A dUTPáz:Stl komplex disszociációs állandójának meghatározása

A dUTPáz:Stl komplex disszociációs állandóját is stopped-flow segítségével, pszeudo-elsőrendű körülmények között ($[\text{Stl}] \ll [\text{dUTPáz}]$) határoztam meg. A mérést állandó, 1 μM Stl koncentráció (küvetára vonatkoztatva) és változó H145W MTB dUTPáz koncentráció mellett hajtottam végre. A fehérjék hígításához azt a puffert használtam, melyben korábban a dUTPáz dialízisét végeztem. A mérés során kapott görbékre egyszeres exponenciális görbét illesztettem (13), melyben az A a kezdő- és a végpont közötti fluoreszcencia változás, k a látszólagos sebességi állandó, t az idő, c

pedig a görbe végpontjának fluoreszcencia értéke. Az így kapott látszólagos sebességi állandókat a dUTPáz koncentráció függvényében ábrázoltam.

A pontokra illesztett egyenes meredeksége a k_{on} (asszociációs sebességi állandó), az y tengely metszéspontja a k_{off} (disszociációs sebességi állandó) sebességi állandókat reprezentálják, melyekből a (11) összefüggés alapján a K_D disszociációs állandó meghatározható.

4.2.5. Fluorimetriás mérések

A H145W MTB dUTPáz fluorimetrias vizsgálatát az tette lehetővé, hogy az aktív helyen található triptofán miatt a szubsztrátok (dUTP, dUPNPP) valamint a termékek (dUMP, PP_i) megkötése fluoreszcencia változással jár. A méréseket a JOBIN YVON Fluoromax-3 spektrofluoriméterrel, 20 °C-ra termosztálva végeztem el. A mintát 295 nm hullámhosszú fénnel gerjesztettem, majd a fluoreszcenciát a maximális intenzitásnak megfelelő hullámhossz értékeken, a szabad dUTPáz esetében 355 nm-en, a dUTPáz:Stl komplex esetében 340 nm-en detektáltam. A különbség abból adódik, hogy az Stl kötődése valamelyest eltolja a dUTPáz-ból eredő maximális intenzitásnak megfelelő csúcsot. A mérésekhez 3 μM dUTPáz-t és 6 μM Stl-t használtam, melyek hígítását a dialízis pufferben végeztem.

A dUTPáz:Stl komplexszel végzett vizsgálatok során a méréseket a dUTPáz valamint az Stl együttes előinkubálása előzte meg. Az előinkubálással és az Stl feleslegben való alkalmazásával elértem, hogy az összes dUTPáz telítve legyen a hozzáadott inhibitorral.

4.2.5.1. Disszociációs állandó mérése fluorimetriás titrálással

A H145W MTB dUTPáz termékekre (dUMP, PP_i) vonatkoztatott disszociációs állandóját fluorimetriás titrálással határoztam meg. A méréseket addig végeztem, amíg további termék hozzáadására már nem változott az enzim fluoreszcenciája.

A mérés során kapott nyers adatokat a puffer jelével valamint a hígulással korrigáltam, majd a dUTPáz-ban található triptofánból eredő maximális intenzitás értékhez relativizáltam. A kapott pontokra az 1:1 sztöchiometriával megvalósuló komplexképződési modellnek megfelelő egyenletet (kvadratikusan) illesztettem:

$$y = S + \frac{A(c+x+K_D) - \sqrt{(c+x+K_D)^2 - 4 \cdot x \cdot c}}{2 \cdot c} \quad (14)$$

ahol x a változó szubsztrát/termék koncentráció, S a görbe kezdőpontjának relatív fluoreszcencia értéke, A a kezdő- és végpont közötti relatív fluoreszcencia különbség, a változás amplitúdója, c a dUTPáz koncentrációja, K_D az enzim:ligandum disszociációs állandója.

Az egyenletnek négy paramétere van, amelyek közül a dUTPáz koncentrációt választottam változatlanul, a többi paraméter esetén kezdeti értéket adtam meg, amit az Origin Lab 8.5 program az iterálás során használt fel.

4.2.5.2. dUPNPP H145W MTB dUTPáz:Stl komplexhez való kötődésének vizsgálata fluorimetriás módszerrel

A mérésekhez 3 μM H145W MTB dUTPáz-t és 6 μM Stl-t használtam. A mérés során kapott reakció görbékre dupla exponenciális görbét illesztettem.

$$y = A_1(1 - e^{-k_1 t}) + A_2(1 - e^{-k_2 t}) + c \quad (15)$$

ahol A_x az exponenciális tagokhoz tartozó fluoreszcencia változás, k_x a sebességi állandó, t az idő, c pedig a görbe végpontjának fluoreszcencia értéke.

Az exponenciális tagokhoz tartozó fluoreszcencia változás értékeket, azaz az amplitúdókat a dUPNPP koncentrációjának függvényében ábrázoltam, majd a kapott pontokra hiperbolikus egyenletet illesztettem:

$$v = \frac{A_{\max} [S]}{K_D + [S]} \quad (16)$$

ahol v a mért kezdeti sebesség, S a dUPNPP koncentráció, $A_{\max}$ a maximális amplitúdó és K_D a disszociációs állandó.

5. Eredmények és megvitatásuk

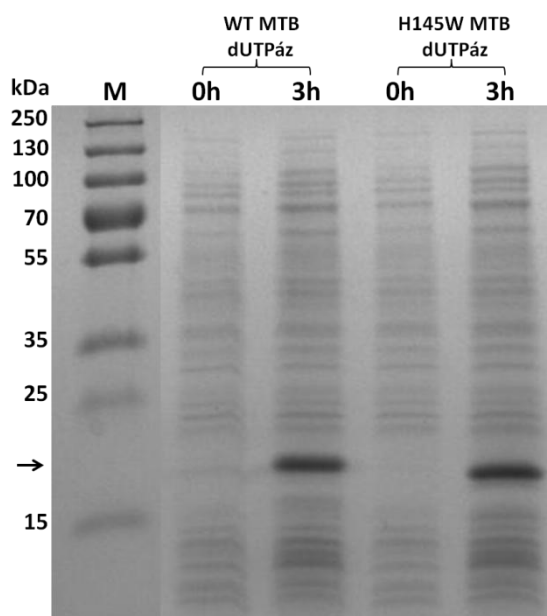
5.1. MTB dUTPáz fehérjék expressziója és tisztítása

A munkám megkezdéséhez első lépésként szükségem volt a vizsgálni kívánt fehérjék megfelelő mennyiségben és tisztaságban történő előállítására.

A kísérleteimhez három különböző fehérjére volt szükségem: az StI-re, a vad típusú *M. tuberculosis* dUTPáz-ra (WT MTB dUTPáz, WT: wild type) illetve egy, az aktív helyén triptofán pontmutációt tartalmazó *M. tuberculosis* dUTPáz-ra (H145W MTB dUTPáz). Utóbbit fluoreszcencián alapuló mérés technikák alkalmazása mellett kívántam felhasználni.

5.1.1. MTB dUTPáz-ok expressziója és tisztítása

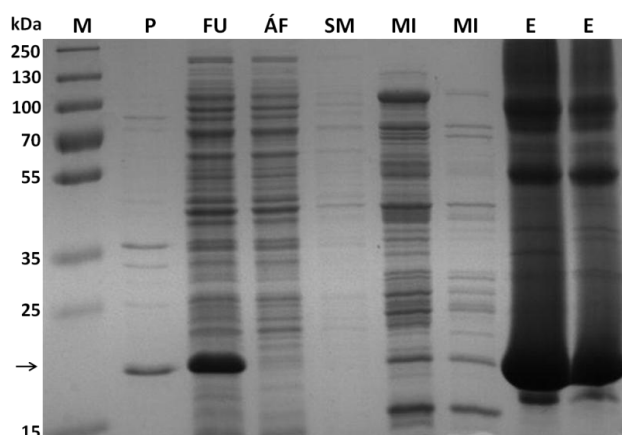
Első lépésként a vad típusú valamint a H145W MTB dUTPáz enzimek expresszióját végeztem el, melyet BL21 Rosetta sejtek IPTG-vel való indukciójával valósítottam meg. Az expressziók eredményét a 8. ábra mutatja, melyen jól láthatók a MTB dUTPáz fehérjéknek megfelelő 18 kDa-os sávok.



8. ábra: A kétféle MTB dUTPáz expressziójának eredménye

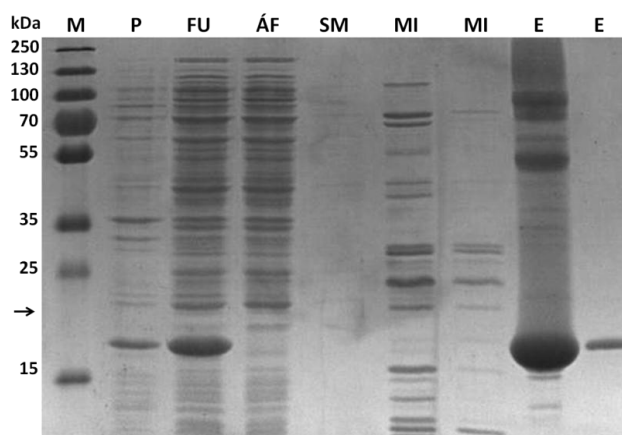
M: marker, 0h, 3h: IPTG-vel való indukció időtartama

Az expresszió után elvégeztem a fehérjék Ni-NTA töltetű oszlopon történő tisztítását. Ehhez az indukált sejtek feltárását követő centrifugálás során nyert felülúszót használtam. A tisztítás eredményességét SDS poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztem (9. és 10. ábra). 500 ml kultúrából 12 mg WT MTB dUTPáz-t valamint 13,5 mg H145W MTB dUTPáz-t sikerült tisztítanom.



9. ábra: WT MTB dUTPáz tisztításának eredménye

M: marker, P: pellet, FU: felülúszó, ÁF: átfolyó, SM: sós mosás, MI: 75 mM imidazolos mosásból származó, E: elúciós frakciók



10. ábra: H145W MTB dUTPáz tisztításának eredménye

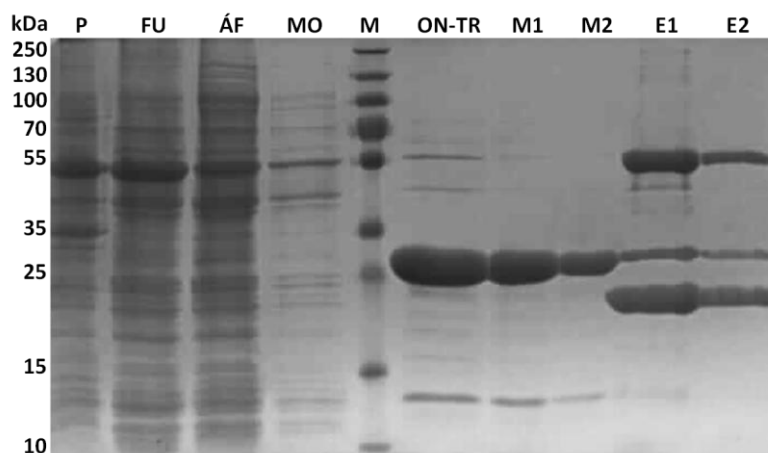
M: marker, P: pellet, FU: felülúszó, ÁF: átfolyó, SM: sós mosás, MI: 75 mM imidazolos mosásból származó, E: elúciós frakciók

A fehérjesávok összehasonlíthatósága érdekében mindegyik frakcióból azonos mennyiségű mintát készítettem, melyekből az elúciós frakciók kivételével 10 µl-t vittem fel a gélre. Az elúciós frakciók esetében csak 5 µl mintát használtam a magas fehérjetartamuk miatt, azonban még így is túl töménynek bizonyultak. Ennek

következtében erősen látszanak a szennyezők is, bár azok koncentrációja a dUTPáz-ok koncentrációjához képest alacsony. Ezt támasztja alá az is, hogy kevésbé koncentrált minta esetén (10. ábra második elúciós minta) a dUTPáz-nak megfelelő sáv még jól látszik, a szennyezők viszont eltűnnek.

5.1.2. Stl fehérje tisztítása

Következő lépésként az Stl tisztítását végeztem el. Ebben az esetben az expresszált sejtek a rendelkezésemre álltak, így a sejtek növesztését követően a GST-vel fuzionáltatott Stl fehérje tisztítását glutation-agaróz affinitás kromatográfiás oszlop felhasználásával oldottam meg. A folyamat során nyert frakciókat SDS poliakrilamid gélen futtattam meg, hogy megállapítsam a fehérjetisztítás eredményességét (11. ábra). 500 ml kultúrából 1,9 mg Stl-t tisztítottam.



11. ábra: Az Stl tisztításának eredménye

P: pellet, FU: felülúszó, ÁF: átfolyó, M: marker, MO: mosó frakció, ON-TR: trombinnal történő hasítás után áteső frakció, M1; M2: trombinnal történő hasítás utáni mosó frakciók, E1; E2: elúciós frakciók

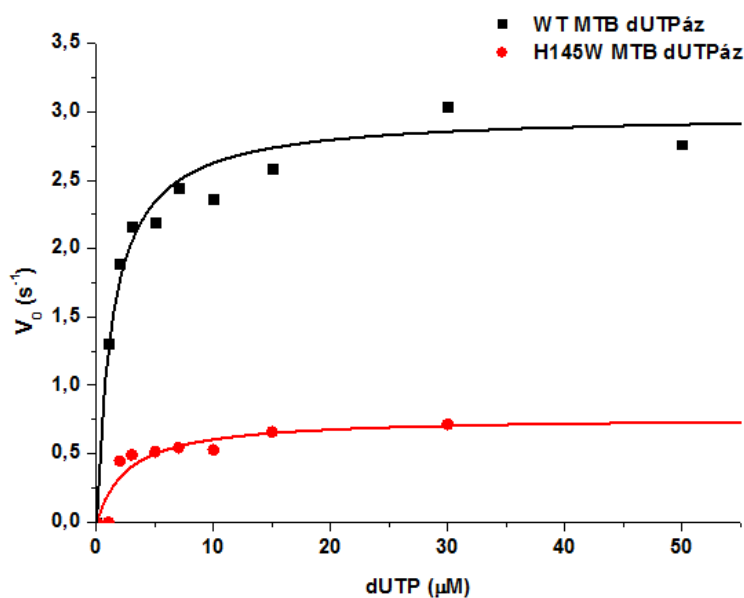
A gélképen 34 kDa-nál jól láthatók az Stl-nek megfelelő fehérje sávok mind a trombinnal történő hasítást követő mintavétel során nyert áteső (ON-TR), mind a mosó (M1, M2) frakciókban, melyek az oszlopon még fennmaradt fehérjét tartalmazzák. Az elúciós mintákban (E1, E2) – melyekben az oszlopon fennmaradt glutation-S-transzferázt gyűjtöttem – jól látható a 26 kDa-os GST, egy kevés szabad Stl, továbbá, mivel az Stl hasítása nem volt 100 %-osan hatékony, 60 kDa-nál látható egy kis mennyiségű GST:Stl komplex is. Ettől eltekintve az Stl tisztítást eredményesnek ítéltam meg. A továbbiakban az ON-TR frakcióval dolgoztam, mivel ez tartalmazta a legtöbb Stl fehérjét.

5.2. MTB dUTPáz-ok aktivitásának meghatározása

Mivel a későbbiekben a H145W MTB dUTPáz-t a fluoreszcenciás mérések során, mint kvázi vad típusú dUTPáz-t kívántam vizsgálni, meg kellett határoznom, hogy nincs-e számottevő különbség a vad típusú, illetve a H145W MTB dUTPáz és az StI kölcsönhatása között.

A H145W MTB dUTPáz mutáns esetében már végeztek steady-state aktivitás vizsgálatokat annak megállapítására, van-e bármi hatása a triptofán megjelenésének az enzim aktív helyén. Ennek során a WT és a H145W MTB dUTPáz aktivitásában nem mutattak ki különbséget [7]. Én azonban a továbbiakban vizsgálni kívántam azt is, hogy az StI, mint inhibitor a mutáció ellenére hasonlóan képes-e gátolni a két dUTPáz variánst. Ehhez első lépésként meg kellett bizonyosodnom arról, hogy az általam tisztított fehérjék valóban hasonló aktivitással rendelkeznek.

Először a dUTPáz-ok Michaelis-Menten szubsztrát telítési görbéit vettem fel, mely információt szolgáltat a dUTPáz-ok maximális reakciósebességéről, valamint a K_M értékről. A méréshez 50 nM MTB dUTPáz-t és változó koncentrációjú dUTP-t használtam, 1-50 μM tartományban. A kapott katalitikus állandókat a szubsztrát koncentráció függvényében ábrázoltam (12. ábra). A mérést háromszor ismételt meg.



12. ábra: Az MTB dUTPáz-ok szubsztrát telítési görbéi

A görbék adatai: WT MTB dUTPáz V_{max} : $3,0 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$, $K_M = 1,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$

H145W MTB dUTPáz V_{max} : $0,7 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$, $K_M = 1,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$

Az alábbi táblázat (2. táblázat) tartalmazza a három mérés során kapott kinetikai paraméterek átlagait:

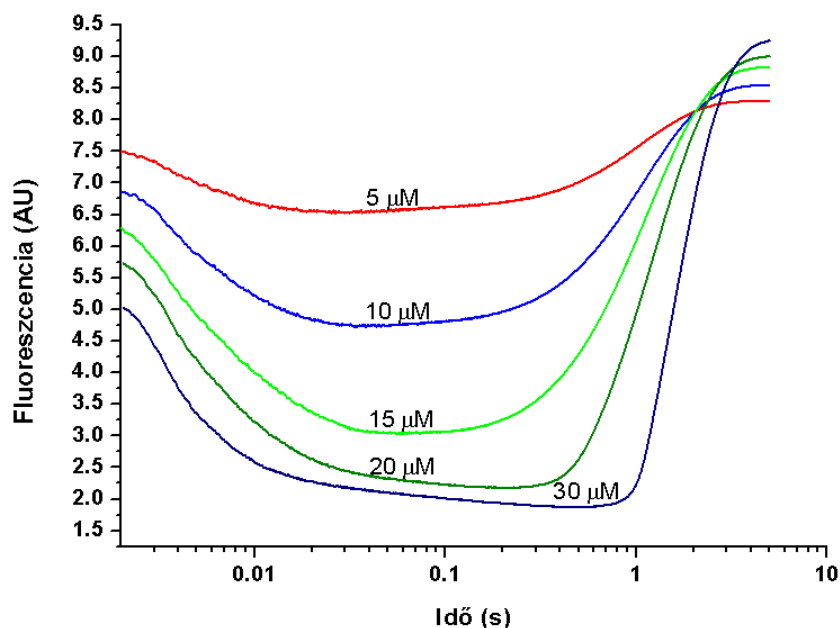
	$V_{\max}$ (s^{-1})	K_M (μM)
WT MTB dUTPáz	$2,6 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,1$
H145W MTB dUTPáz	$0,8 \pm 0,2$	$1,6 \pm 1,2$

2. táblázat: A mérés során kapott görbék adatai

A WT MTB dUTPáz maximális reakciósebessége $2,6 s^{-1}$ -nek, míg a H145W MTB dUTPáz maximális sebessége $0,8 s^{-1}$ -nek adódott. Ezen eredmények összhangban vannak a korábbi eredményekkel, miszerint a vad típusú dUTPáz aktivitása $1,2-5,8 s^{-1}$ között [7, 8, 18], a triptofán mutációt tartalmazó dUTPáz katalitikus aktivitása $1,2-2,4 s^{-1}$ [2, 18] között mozog.

A steady-state kísérletekben a két MTB dUTPáz variáns aktivitás között viszonylag nagy különbséget találtam. A különbség eredhet a két fehérje katalitikus állandója közötti valódi különbségből, vagy a fehérje preparátumok minősége közötti különbségből is. Ennek eldöntésére tranziens kinetikai módszerrel megállapítottam a fehérjék egyszeri átviteli (single turnover) aktivitását.

A H145W MTB dUTPáz esetében a triptofán fluoreszcencia tette lehetővé, hogy stopped-flow segítségével tanulmányozhassuk a dUTPáz enzimátikus reakciójának lépéseit (13. ábra). A mérést egyszeri átviteli körülmények között végeztem, mely során nem törekszünk a steady-state állapot elérésére, éppen ellenkezőleg: a mérés során az enzim koncentrációja magasabb, mint a szubsztrát koncentrációja, vagy egyenlő vele. Így a szubsztrát épp annyira elegendő, hogy a dUTPáz egy enzimátikus ciklusa lejátszódjon. Az aktív hely titrálás kezdetén olyan koncentrációkat alkalmazunk, ahol még biztosan teljesülnek az egyszeri átvitel feltételei, majd a koncentrációt addig emeljük, míg el nem érjük a többszöri átviteli körülményeket.



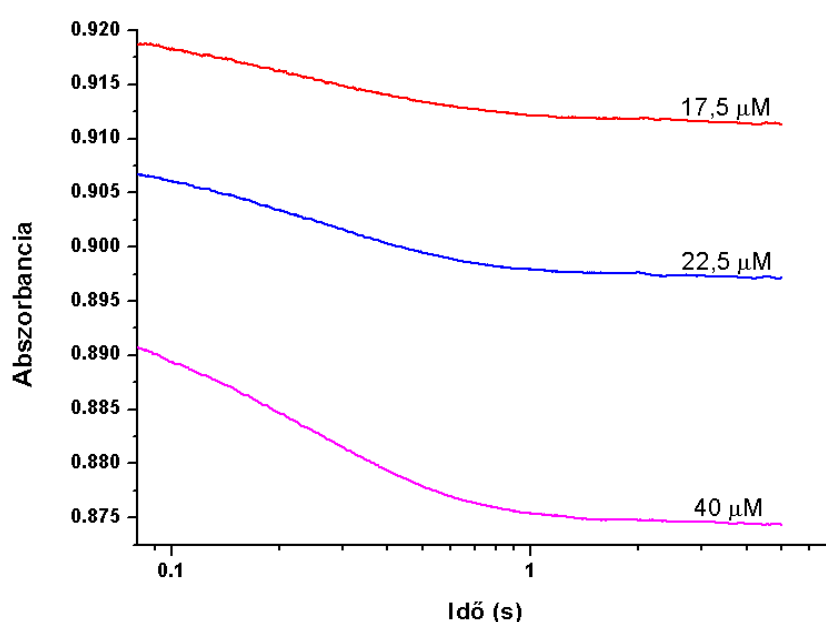
13. ábra: A H145W MTB dUTPáz mutánsal mért aktív hely titrálás eredménye
A koncentrációk a dUTP küvettában lévő koncentrációjára vonatkoznak

A szubsztrát megkötése fluoreszcencia csökkenéssel, míg a termékek – dUMP és PP_i – elengedése fluoreszcencia növekedéssel jár, nem csak a szubsztrát kötött állapothoz, de a szabad enzim fluoreszcenciájához képest is. A hidrolízis lépés nem jár fluoreszcencia változással [8, 9]. A termék elengedés sebessége a hidrolízis sebességének felel meg, hiszen ezen sebesség-meghatározó lépés limitálja a termék felszabadulásának sebességét [9]. Abban az esetben, ha a reakció során valóban csak egyszeri átvitel történik, a reakció görbékre tripla exponenciális illeszthető (12). A görbe első két szakasza a dUTP kötést jellemzi, míg a harmadik fázis exponenciális koefficiense megadja a hidrolízis katalitikus sebességét [8, 9]. Abban az esetben, ha adott koncentráció viszonyok között már nem érvényesülnek az egyszeri átviteli körülmények, a reakciógörbére nem illeszthető tripla exponenciális.

A H145W MTB dUTPáz esetében az egyszeri átviteli sebesség $1,7 \text{ s}^{-1}$, mely ugyancsak jó összhangban van a korábban már publikált adatokkal [18]. A mérés arról is információt ad, hogy a fehérje minta hány százaléka aktív. A bemutatott mérés során $15 \mu\text{M}$ dUTPáz-t alkalmaztam, tehát ha az enzim 100 %-a aktív, akkor az egyszeres átvitel $15 \mu\text{M}$ dUTP hozzáadásánál még megfigyelhető lenne. Az 5 és $10 \mu\text{M}$ dUTP jelenlétében mért reakciógörbékre még tudtam tripla exponenciális egyenletet illeszteni, a $15 \mu\text{M}$ dUTP-vel mért görbére azonban már nem. Ez alapján az aktív fehérjék aránya a mintában legalább 75 %, de biztosan kisebb, mint 100 %. A többszörös átviteli körülmények között ($[\text{S}] > [\text{E}]$) mért görbéken jól megfigyelhető egy alacsony

fluoreszcenciával jellemezhető vízszintes fázis. Ez megfeleltethető a steady-state állapotnak, amikor az enzim folyamatosan a spektroszkópiailag csendes hidrolízis állapotában van.

A vad típusú MTB dUTPáz esetében is vizsgáltam a fehérje egyszeri átviteli aktivitását. Itt azonban nem volt lehetőségem fluoreszcencia alapú meghatározásra, ezért a mérést fenolvörös indikátor oldatban végeztem, és az abszorbancia változáson keresztül tanulmányoztam a reakciót (14. ábra). A mérés során 30 μM WT MTB dUTPáz-t alkalmaztam. Ebben az esetben azt várjuk, hogy egyszeri átviteli körülmények között a reakció görbe egy egyszeres exponenciálissal lesz leírható.



14. ábra: A WT MTB dUTPáz-al mért aktív hely titrálás eredménye

Ennél a típusú mérésnél nem lehet egyértelműen leolvasni, pontosan mely dUTP koncentrációnál jelenik meg az egyszeri átvitel, mivel az egyszeres exponenciálisról való szignifikáns eltérést sokkal nehezebb detektálni, így a mérés alapján a mintában található aktív fehérje aránya is nehezebben meghatározható. A hidrolízis sebességének megadásához azokat a görbéket elemeztem, amelyek esetében biztosan fenn áll az egyszeri átviteli körülmény ($[E] < [S]$ (50 %)). A hidrolízis sebessége a vad típusú dUTPáz esetében $3,5 \text{ s}^{-1}$ -nak adódott.

Az alábbi táblázat (3. táblázat) összefoglalja a különböző aktivitásmérések során kapott sebesség értékeket:

	$k_{\text{steady-state}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{single turnover}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
WT MTB dUTPáz	$2,6 \pm 0,6$	$3,50 \pm 0,02$
H145W MTB dUTPáz	$0,8 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$

3. táblázat: A két MTB dUTPáz variánsra jellemző aktivitás értékek

Az egyszeri átviteli aktivitásmérések során valamivel magasabb értékeket kaptam, melynek oka, hogy ennél a mérésnél a fehérje minta aktív hányadára vonatkoztatva kapjuk meg az eredményt, míg a fotometriás méréseknél nem tudjuk, hogy a reakcióelegyhez adott fehérje mennyiség pontosan hány százaléka aktív.

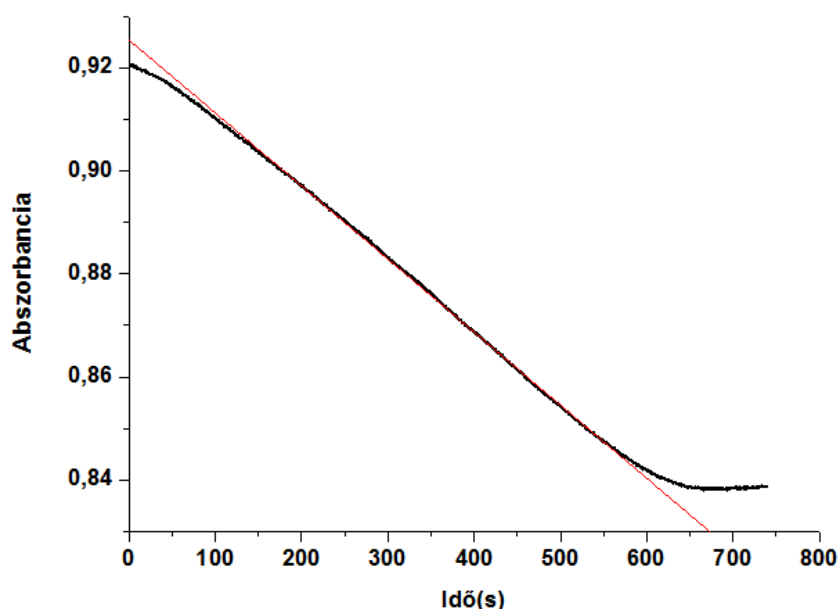
A mérések alapján elmondható, hogy a H145W MTB dUTPáz aktivitása valamivel alacsonyabb, mint a WT MTB dUTPáz aktivitása. A K_M értéke azonban változatlan a WT MTB dUTPáz-hoz képest. A humán dUTPáz kinetikai mechanizmusának részletes vizsgálata során kimutatták, hogy nincs különbség a vad típusú és a triptofán mutációt tartalmazó dUTPáz-ok reakció mechanizmusa között [9]. Emellett azt is megállapították, hogy a két dUTPáz variáns kristályszerkezetében nincs jelentős eltérés [7]. A fentiek alapján feltételezhető, hogy a WT és a H145W MTB dUTPáz által katalizált reakció mechanizmusában nincs különbség, annak ellenére, hogy a katalitikus lépés hatékonysága eltérő.

5.3. Az Stl gátlási mechanizmusának steady-state vizsgálata: a gátlás Stl-koncentráció függése

Az Stl WT MTB dUTPáz és H145W MTB dUTPáz aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálatát fotometriás mérés technikával végeztem, ahol meghatározott enzim és szubsztrát koncentráció mellett alkalmaztam növekvő Stl koncentrációt. A mérés célja az volt, hogy megállapítsam, hogy az Stl milyen mértékben és milyen inhibíciós állandóval képes gátolni az MTB dUTPáz variánsokat.

A $\Phi 11$ dUTPáz esetében leírták, hogy az enzim és az Stl között egy lassú kinetikájú, szoros kölcsönhatás jön létre, illetve, hogy az Stl és a szubsztrát nem képesek egyszerre kötni az enzimhez [13]. A lassú és szoros kötődésen keresztül megvalósuló inhibíció esetében nem teljesülnek a steady-state feltételek, ahogyan azt a bevezetőben is bemutattam. Az anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint, minden mérést a két fehérje 5 perces előinkubálását követően indítottam, mely időtartam elegendő időt biztosított az Stl számára a dUTPáz-hoz való kötődésre.

Az Stl gátlás mérésekor a szubsztrát (dUTP) magas koncentrációban (30 μ M) volt jelen, ami a gátolatlan reakció esetén már elegendő volt a maximális steady-state sebesség eléréséhez. Exponenciális szakaszokat csak magas inhibitor koncentráció alkalmazásakor, a reakció görbe kezdeti szakaszán figyeltem meg. Ezen szakasz mélyrehatóbb vizsgálata tranziens kinetikai módszerrel lehetséges, melynek elvégzése későbbi terveim között szerepelt. A kezdeti exponenciális szakaszt egy lineáris fázis követte. Ez a lineáris fázis azonban ténylegesen a gátolt dUTPáz steady-state aktivitását jellemzi [19], ezért minden esetben erre a szakaszra illesztettem. Az alábbi ábra szemléltet egy reakció görbét, ahol a WT MTB dUTPáz 50 nM, az Stl 150 nM koncentrációban voltak jelen (15. ábra).

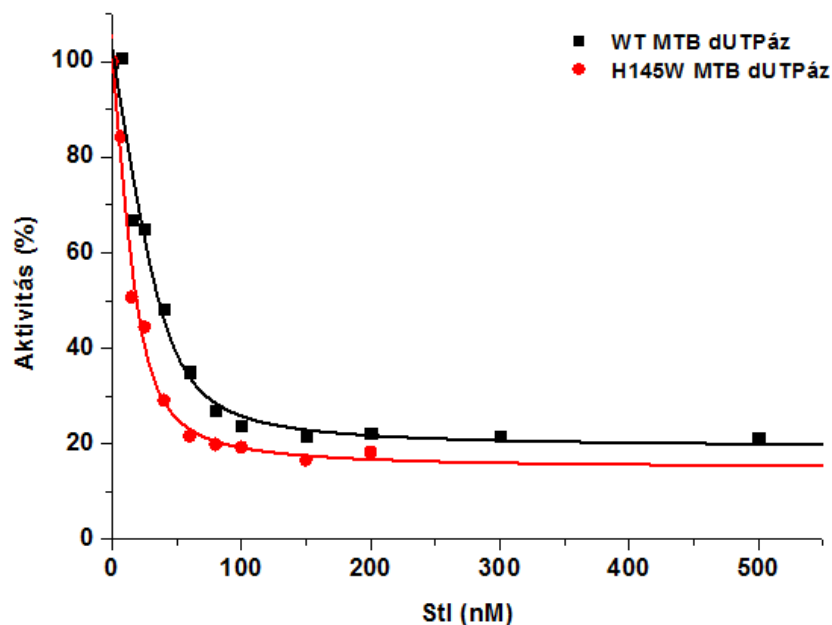


15. ábra: WT MTB dUTPáz steady-state reakció görbéje Stl jelenlétében

fekete: reakció görbe, piros: lineáris illesztés

Megfigyelhető, hogy a reakció eleje és a reakció vége nem lineáris lefutású. Ennek oka a reakció elején feltételezhetően az inhibitor disszociációja (ld. később). A reakció végén a reakció lassulása a szubsztrát fogyásából és a felgyülemelő termékek által okozott gátlásból adódhat.

Az Stl dUTPáz variánsok aktivitására gyakorolt hatását az Stl koncentráció függvényében vizsgáltam. A mérést háromszor végeztem el. Az egyes mérések során kapott pontokra a (8) számú egyenletet illesztettem. Az illesztésekből kapott paraméterek átlagát és szórását a 4. táblázat tartalmazza. Az alábbi ábra szemléltet egy-egy általam választott sorozatra illesztett gátlási görbét (16. ábra).



16. ábra: A dUTPáz-ok gátlási görbéi

A reprezentatív görbék adatai: WT MTB dUTPáz: $K_i = 5,5 \pm 4,6$ nM, Gátlás: $83,8 \pm 6,7$ %

H145W MTB dUTPáz: $K_i = 4,4 \pm 2,8$ nM, Gátlás: $87,1 \pm 5,8$ %

Mivel a két dUTPáz variáns gátolatlan steady-state aktivitása eltérő volt, az eredményeket az összehasonlíthatóság érdekében százalékosan ábrázoltam.

	K_i (nM)	Gátlás (%)
WT MTB dUTPáz	$6,8 \pm 4,4$	$81,1 \pm 10,2$
H145W MTB dUTPáz	$4,2 \pm 0,8$	$85,2 \pm 1,5$

4. táblázat: A mérések során nyert görbék adatainak átlaga

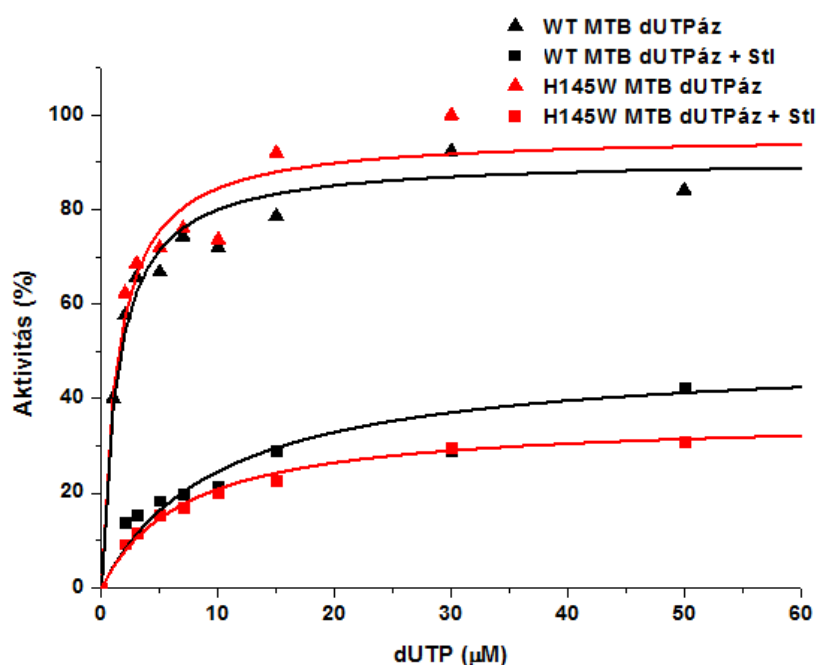
Az eredmények szerint nem tapasztalható teljes inhibíció, a vizsgált dUTPáz-ok aktivitásában hozzávetőleg ~ 80 %-os csökkenés mutatható ki. A $\Phi 11$ dUTPáz esetében ez az érték csaknem 100 % [13]. Az, hogy Stl-el való telítés esetén is megmarad a mikobakteriális dUTPáz-ok aktivitásának 20 %-a arra utalhat, hogy az enzim:inhibitor komplex is képes a dUTP szubsztrát megkötésére valamint hidrolízisére.

A gátlási mechanizmus további jellemzéséhez szubsztrát telítési görbéket kívántam felvenni Stl jelenlétében. Ehhez a méréshez állandó dUTPáz (50 nM) és Stl (150 nM) koncentrációt alkalmaztam. Utóbbit a korábbi mérés alapján telítési koncentrációnak vettem, mivel további Stl hozzáadása nem csökkentette a dUTPáz-ok aktivitását. A méréseket megelőzően a korábbiakhoz hasonlóan 5 perces előinkubálási időt alkalmaztam.

A korábbi kísérlet eredményei arra utaltak, hogy az Stl kevert típusú inhibíciós mechanizmussal gátolja a mikobakteriális dUTPáz-okat, tehát a folyamat során létrejöhet egy EIS komplex is. Ennél a típusú inhibíciónál a gátlószer jelenléte az enzim maximális reakciósebességének ($V_{\max}$) csökkenését és a látszólagos K_M értékének növekedését okozza. Ezért ettől a méréstől a kinetikai paraméterek ilyen jellegű változását vártam.

A reakció görbék kiértékelése során – hasonlóan a korábbi méréshez – az illesztést a valódi steady-state kinetikát reprezentáló lineáris szakaszra végeztem.

Az WT MTB dUTPáz esetében kettő, míg a H145W MTB dUTPáz esetében három párhuzamos mérést végeztem. Egy-egy görbét az alábbi ábra szemléltet (17. ábra), a mérési eredmények átlagait az 5. táblázat tartalmazza.



17. ábra: Gátolatlan és Stl gátolt szubsztrát telítési görbék

Az összehasonlíthatóság érdekében az aktivitásokat százalékosan ábrázoltam és az ábrán feltüntettem a 12. ábrán már bemutatott, Stl hiányában mért szubsztrát telítési görbéket is.

A görbék adatai: WT MTB dUTPáz gátolatlan: $V_{\max} = 90,9 \pm 03,2 \%$, $K_M = 1,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$,

gátolt: $V_{\max} = 49,6 \pm 3,7 \%$, $K_M = 10,2 \pm 2,5 \mu\text{M}$

H145W MTB dUTPáz gátolatlan: $V_{\max} = 95,8 \pm 5,5 \%$, $K_M = 1,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$,

gátolt: $V_{\max} = 36,0 \pm 0,7 \%$, $K_M = 7,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$

		$V_{\max} (s^{-1})$	$V_{\max} (\%)$	$K_M (\mu M)$
WT MTB dUTPáz	gátolatlan	$2,6 \pm 0,6$	$94,0 \pm 4,3$	$1,4 \pm 0,1$
	gátolt	$1,4 \pm 0,4$	$49,2 \pm 5,4$	$10,1 \pm 4,8$
H145W MTB dUTPáz	gátolatlan	$0,8 \pm 0,2$	$97,1 \pm 1,0$	$1,6 \pm 1,2$
	gátolt	$0,30 \pm 0,04$	$36,6 \pm 4,4$	$6,33 \pm 1,03$

5. táblázat: A mérések során nyert görbék adatai

A dUTPáz Stl-el való gátlásának következtében a vártan megfelelően a $V_{\max}$ értéke csökkent, míg a látszólagos K_M értéke nőtt. Ezen eredmények alátámasztják azt a feltételezést, miszerint az Stl kevert típusú inhibíciós mechanizmuson keresztül gátolja mind a WT MTB dUTPáz, mind a H145W MTB dUTPáz enzimeket.

Fontos megjegyezni, hogy a dUTPáz-ok homotrimer enzimek, tehát három aktív hellyel rendelkeznek. A $\Phi 11$ dUTPáz esetében kimutatták, hogy az Stl monomer valamint dimer formában is képes kötni az enzimhez [13]. Ezt figyelembe véve a fennmaradó 20 % aktivitás kétféleképpen magyarázható: i) a dUTPáz mindhárom aktív helye Stl kötött állapotban van, így az Stl-el telített dUTPáz is képes dUTP-t kötni és hidrolizálni, de alacsonyabb hatékonysággal ii) a dUTPáz-nak marad szabad aktív helye Stl-el telített állapotban is, és a dUTP hidrolízis a szabad aktív helyen történik. Amennyiben az i) eset áll fenn, az eredmények arra utalnak, hogy a szubsztrát és az inhibitor nem versengenek a dUTPáz szabad aktív helyeiért (kompetitív gátlás), azaz nem csak enzim:inhibitor (EI) vagy enzim:szubsztrát (ES) komplexek keletkeznek, hanem enzim:inhibitor:szubsztrát (EIS) komplex is létrejöhet, mely a kevert típusú inhibíció során figyelhető meg. Amennyiben az ii) eset áll fenn a dUTPáz egészére, tehát a homotrimer enzimre nézve szintén kevert inhibíció jön létre. Ebben az esetben arról, hogy az egyes aktív helyekre vonatkozóan milyen inhibíciós mechanizmus valósul meg, ezek a mérések még nem adnak információt.

Fontos kiemelni azt is, hogy a $\Phi 11$ dUTPáz esetében 100 %-os gátlás volt megfigyelhető [13]. A steady-state gátlási tulajdonságokban tapasztalt eltérések fajspecifikus különbségekre utalnak az Stl és a két különböző fajból származó dUTPáz közötti kölcsönhatás természetében.

A mérésekből az is kiderült, hogy az Stl hasonló módon és mértékben képes gátolni a vad típusú és a triptofán mutációt tartalmazó dUTPáz-okat. Ezen megállapítás lehetővé tette, hogy a későbbiekben tervezett fluoreszcenciás valamint fluorimetriás mérések során a H145W MTB dUTPáz-t, mint kvázi vad típusú dUTPáz-t tanulmányozhassam.

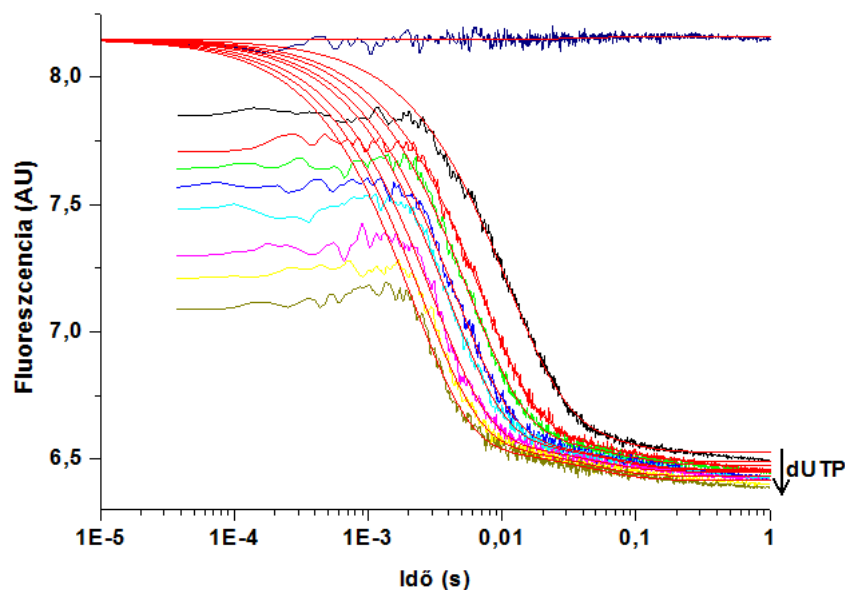
5.4. A H145W MTB dUTPáz szubsztrát- és termékkötési mechanizmusa

Ahhoz, hogy pontos képet kapjunk az Stl gátlási mechanizmusának részleteiről, fluoreszcens tranziens kinetikai méréseket kívántam végezni. Ahhoz, hogy egy olyan összetett folyamatot, mint az Stl gátlás értelmezni tudjunk, tisztában kell lennünk az egyes részfolyamatok által okozott fluoreszcencia változásokkal is. Ehhez első lépésként fluoreszcens mérés technikák alkalmazása mellett a gátolatlan H145W MTB dUTPáz szubsztrát- és termékkötési tulajdonságait vizsgáltam meg. Az így kapott eredmények összehasonlítási alapként szolgáltak a későbbi mérések során, ahol Stl jelenlétében kívántam vizsgálni a dUTPáz és a szubsztrát illetve a dUTPáz és a termékek viszonyát.

5.4.1. A H145W MTB dUTPáz szubsztrát kötésének vizsgálata

A H145W MTB dUTPáz dUTP kötésének tanulmányozását stopped-flow segítségével végeztem. A humán dUTPáz szubsztrátkötési mechanizmusának részletes vizsgálata során kiderült, hogy a reakció két lépésből áll: az első lépés a szubsztrát megkötése, melynek sebessége függ a hozzáadott szubsztrát mennyiségétől; a második lépés pedig egy izomerizációs lépés, amelynek sebessége a vizsgálható szubsztrát koncentráció tartományban független a szubsztrát koncentrációjától (vö. 5. ábra) [9]. Ezzel ellentétben a $\Phi 11$ fág dUTPáz esetében a dUTP kötése során csak egy lépést figyeltek meg, mely arra utal, hogy ebben az esetben vagy nem történik konformáció-változás, vagy ha mégis, nem detektálható.

A H145W MTB dUTPáz dUTP kötésének mérése során kapott reakció görbéket az alábbi ábra szemlélteti (18. ábra):



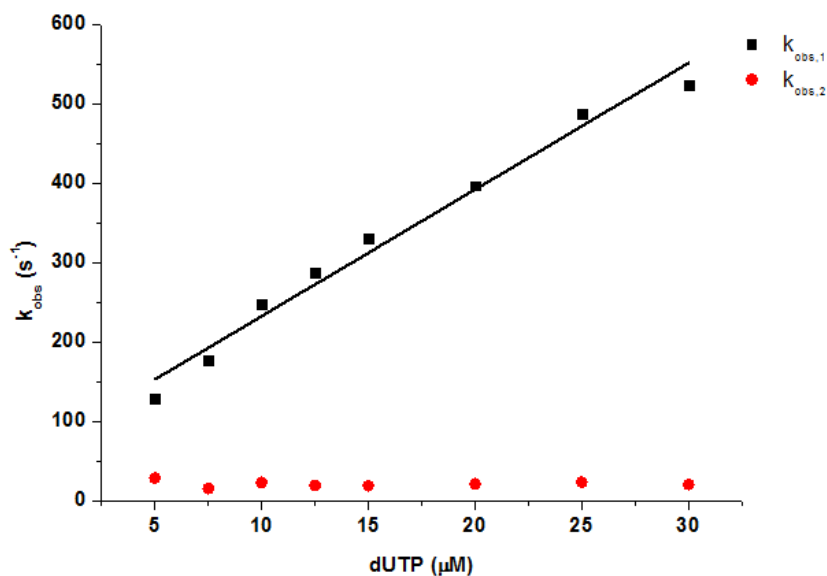
18. ábra: A H145W MTB dUTPáz szubsztrátkötése különböző dUTP koncentrációk mellett

Az egyenes piros vonal a dupla exponenciális illesztést jelöli.

A nyíl a növekvő dUTP koncentráció irányába mutat.

A reakció görbék kiértékelését dupla exponenciális egyenlet illesztésével (10) tudtam megvalósítani, mely arra utal, hogy a H145W MTB dUTPáz dUTP kötése, akárcsak a humán dUTPáz esetében, két lépésből áll.

Az illesztésből nyert látszólagos sebességi állandókat ($k_{obs,1}$ és $k_{obs,2}$) a szubsztrát koncentráció függvényében ábrázoltam (19. ábra). A mérést háromszor végeztem el, az alábbi ábra egy mérést mutat be.



19. ábra: A látszólagos sebességi állandók ábrázolása a dUTP koncentráció függvényében

Az egyenesek adatai: $k_{obs,1} \rightarrow k_{on} = 16,0 \pm 0,9 \mu M^{-1} s^{-1}$, $k_{off} = 73,3 \pm 15,9 s^{-1}$, $k_{obs,2} \rightarrow 8,2 \pm 1,9 s^{-1}$

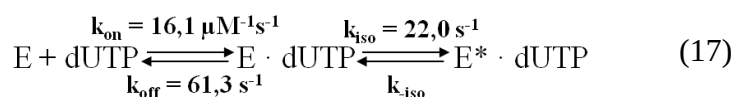
Az ábra jól mutatja, hogy az első lépés egy koncentráció-függő folyamat, míg a második lépés látszólagos sebességi állandója a vizsgált szubsztrát koncentráció tartományban nem függ a szubsztrát mennyiségétől.

A $k_{obs,1}$ értékekre illesztett egyenes meredekségéből és y tengely metszéspontjából megadható a dUTP bekötődésének (k_{on}) és felszabadulásának (k_{off}) sebességi állandója. A három mérés eredményeire illesztett egyenesből kapott k_{on} és k_{off} értékek átlagát az alábbi táblázat tartalmazza (6. táblázat).

	$k_{on} (\mu M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$
H145W MTB dUTPáz	$16,1 \pm 1,3$	$61,3 \pm 23,3$

6. táblázat: A H145W MTB dUTPáz dUTP kötésének sebességi állandói

A (11) számú összefüggés alapján kiszámítható a dUTP H145W MTB dUTPáz-ra vonatkoztatott disszociációs állandója (K_D), mely $3,8 \mu M$ -nak adódott. Ez az érték egy nagyságrendbe esik a humán dUTPáz dUTP-re vonatkoztatott disszociációs állandójával, mely $1,2 \mu M$ [9], míg a $\Phi 11$ fág dUTPáz esetében a K_D valamivel alacsonyabb, $0,8 \mu M$ [20]. A második lépés feltételezhetően megfelel a humán dUTPáz-nál is látott izomerizációs lépésnek. Ez alapján a kötés a következő módon játszódik le:



Ebben az esetben az izomerizációs lépés szubsztrát koncentráció-függését az alábbi hiperbola adja meg (18) [21].

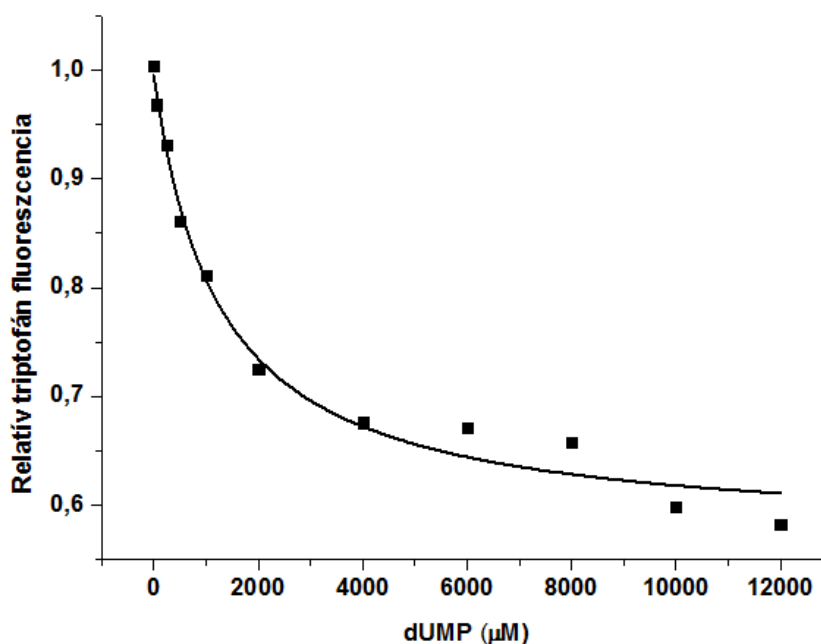
$$k_{obs2} = k_{-iso} + \frac{k_{iso} S}{K_D + S} \quad (18)$$

Adott mérési körülmények között már a hiperbola telítési szakaszában vagyunk. A kapott $k_{obs,2}$ értékek nagyjából megfeleltethetők az izomerizációs lépés előre haladó sebességi állandójának (k_{iso}). Az általunk használt módszerekkel azt a koncentráció tartományt, ahol az izomerizációs lépés visszaalakulási sebességi állandója (k_{-iso}) is meghatározható lenne, sajnos nem tudjuk vizsgálni. Az Stl gátlás értelmezéséhez azonban így is elegendő információt nyertünk a dUTP kötésről.

5.4.2. A H145W MTB dUTPáz termék kötésének mechanizmusa

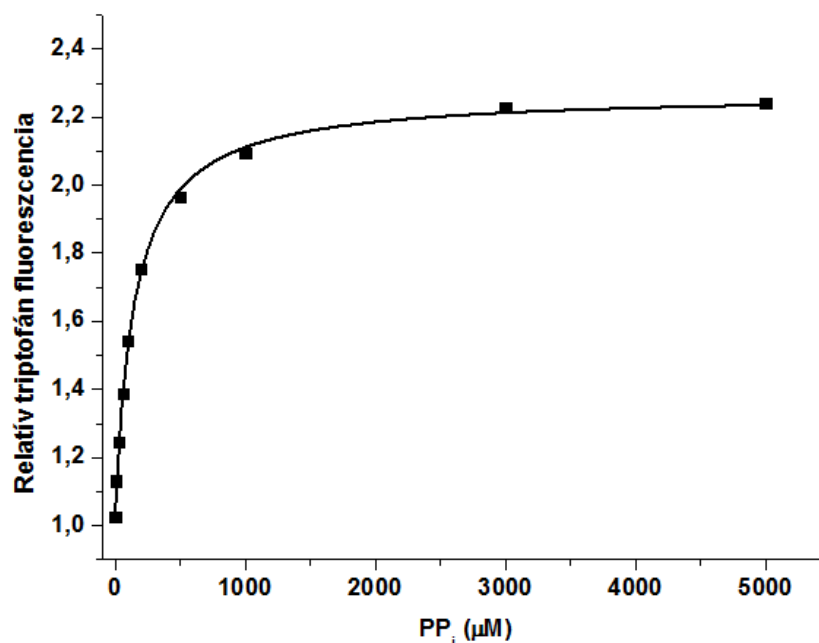
A dUTPáz enzimatis reakciójának vizsgálata során figyelembe kell venni, hogy a dUTP hidrolízisével keletkező termékek, a dUMP és a PP_i is képesek kötődni az enzimhez. Ezért fontos meghatározni a felszabaduló termékek enzimre vonatkoztatott disszociációs állandóit, mely eredmények információt szolgáltatnak az esetlegesen kialakuló termék inhibíció mértékéről.

A vizsgálatot a H145W MTB dUTPáz fluorimetriás titrálásával végeztem. A dUMP kötődése az aktív helyen található triptofán fluoreszcenciájának csökkenésével, míg a PP_i kötődése a fluoreszcencia intenzitásának növekedésével járt. A relatív triptofán fluoreszcencia értékeket a növekvő termék koncentráció függvényében ábrázoltam, a mérést háromszor ismételt meg. A vizsgálatot dUMP esetében 60-12000 μM , a PP_i esetében 10-5000 μM koncentráció-tartományban végeztem. Egy-egy méréséből kapott pontokat és a pontokra illesztett görbét az alábbi ábra szemléltet (20., 21. ábra).



20. ábra: A H145W MTB dUTPáz fluorimetriás titrálása dUMP-vel

A görbe adatai: $K_D = 1259,2 \pm 252,8 \mu\text{M}$

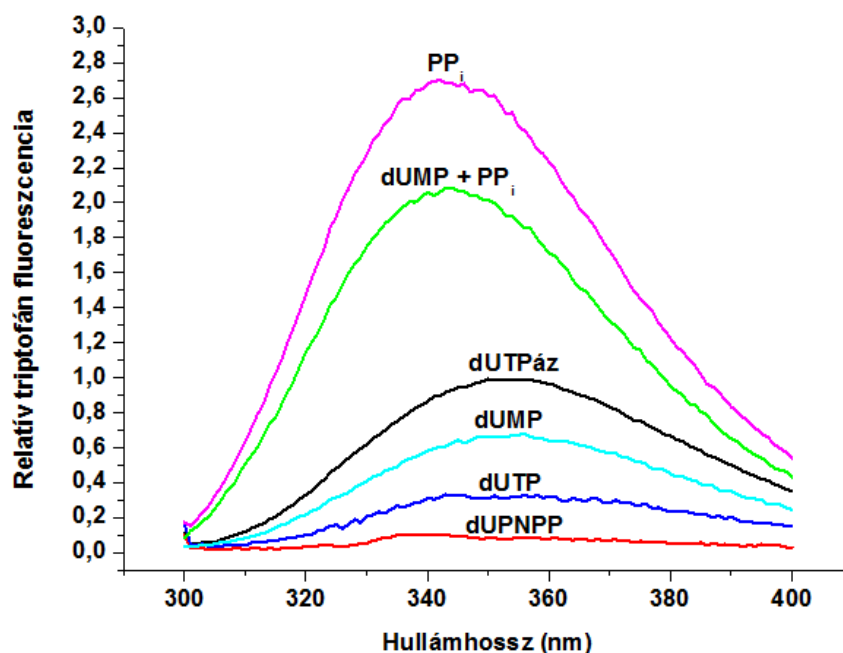


21. ábra: A H145W MTB dUTPáz fluorimetriás titrálása PP_i-al

A görbe adatai: $K_D = 148,6 \pm 6,8 \mu\text{M}$

A kapott pontokra az 1:1 sztöchiometriával megvalósuló komplexképződési modellnek megfelelő egyenletet (kvadratikus egyenlet (14)) illesztettem, melyből a megkaptam a termékekre vonatkozó disszociációs állandókat, mely három mérés alapján a dUMP esetében $1406,2 \mu\text{M}$ -nak, a PP_i esetében $191,1 \mu\text{M}$ -nak adódott. Ez azt jelenti, hogy a humán dUTPáz-hoz hasonlóan, a termékek a szubsztrátnál jóval gyengébben kötődnek. A gyenge kötődés általában gyors disszociációval jár együtt, tehát valószínűleg a termékek a hidrolízist követően nagy sebességgel képesek disszociálni az enzimről, ahogy azt a Michaelis-Menten modell alkalmazása során, illetve az aktív hely titrálás esetében alkalmazott egyszeri átviteli körülmények felállításánál is feltételeztük.

Az alábbi összefoglaló ábra szemlélteti, hogyan változik a H145W MTB dUTPáz fluoreszcencia intenzitása szubsztrát- illetve termékkötés esetén (22. ábra). A spektrumokat 300-400 nm hullámhossz tartományban vizsgáltam.



22. ábra: A H145W MTB dUTPáz spektrumai szubsztrát- és termékkötést követően

Az ábrán jól látható, hogyan változik a dUTPáz aktív helyén található triptofán fluoreszcenciájának intenzitása különböző szubsztrát illetve termék jelenlétében. A dUMP, dUTP és a dUPNPP (α - β -imido dUTP) kötődése esetén a fluoreszcencia csökken. Utóbbi egy dUTP szubsztrát analóg, melynek α - és β -foszfát csoportja között O helyett N található, melynek köszönhetően a dUTPáz csak nagyon lassan képes elhidrolizálni [22]. PP_i valamint dUMP és PP_i együttes adagolása esetén fluoreszcencia növekedés tapasztalható. Az alábbi táblázat tartalmazza a H145W MTB dUTPáz fluoreszcencia intenzitásának változását szubsztrát- és termékkötés esetén (7. táblázat).

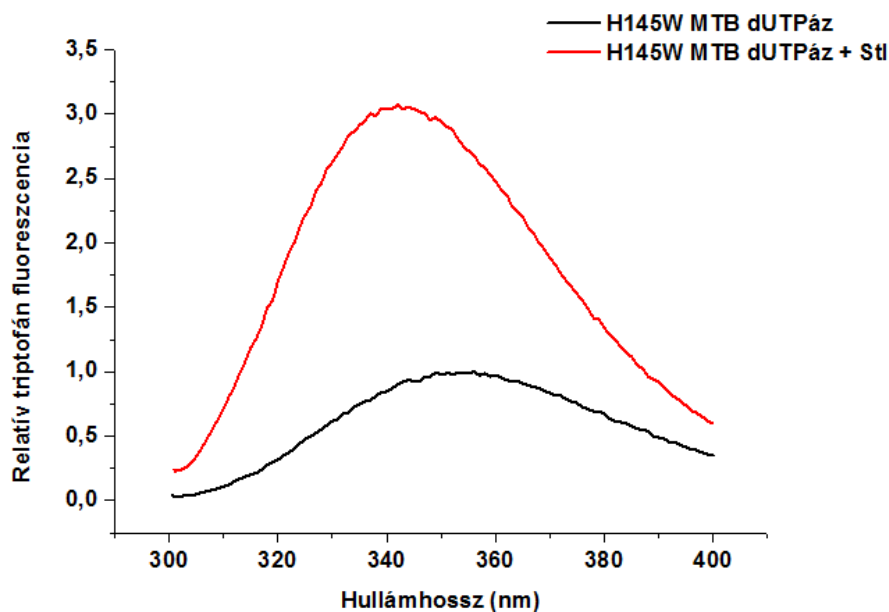
	H145W MTB dUTPáz		+ szubsztrát/termék	
	Hullámhossz (nm)	Intenzitás	Hullámhossz (nm)	Intenzitás
dUPNPP	355	1	343	0,108026
dUTP	355	1	343	0,333259
dUMP	355	1	356	0,681160
PP_i	355	1	342	2,700794
dUMP+PP_i	355	1	344	2,086375

7. táblázat: A H145W MTB dUTPáz intenzitásának változása szubsztrát és termék hozzáadása esetén. Az értékeket a dUTPáz maximális intenzitás értékéhez relativizáltam.

A szubsztrát-, illetve termékkötés esetén várható teljes relatív fluoreszcencia változások meghatározása nagy segítségünkre lesz az összetett fluoreszcenciás görbék értelmezésében. Emellett a két termék disszociációs állandójának ismerete segít annak eldöntésében, hogy mi az a szubsztrát koncentráció, ahol a reakció során keletkező termékek dUTPáz-hoz való kötődése már nem elhanyagolható.

5.5. A H145W MTB dUTPáz és az Stl komplexképződésének vizsgálata

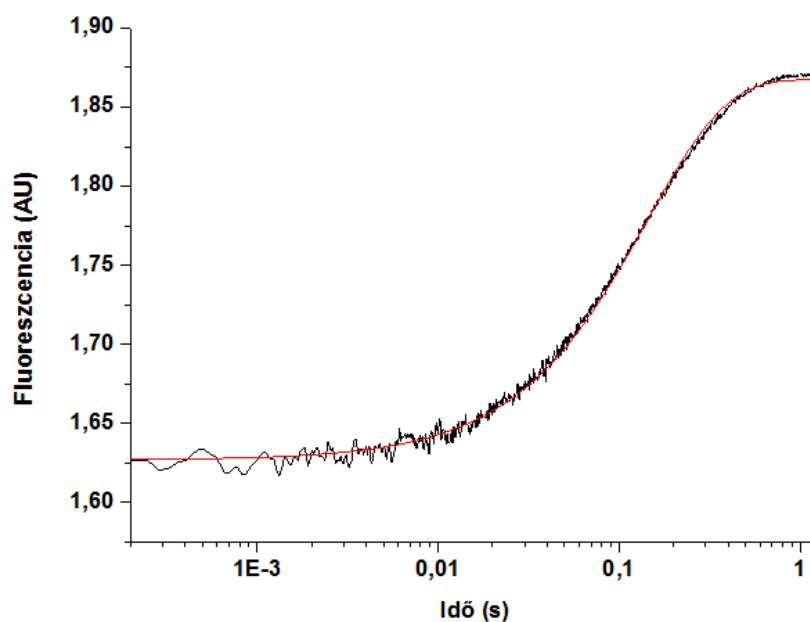
A $\Phi 11$ fág dUTPáz aktív helyén triptofánt tartalmazó variánsa esetében azt láttuk, hogy Stl kötés hatására a triptofán fluoreszcencia növekszik. Fluoreszcens vizsgálat segítségével megerősítettem, hogy ez H145W MTB dUTPáz esetében is hasonlóan történik (23. ábra).



23. ábra: A H145W MTB dUTPáz és a H145W MTB dUTPáz:Stl komplex spektruma

A mérés során a dUTPáz és az Stl koncentrációja 3, illetve 6 μM volt.

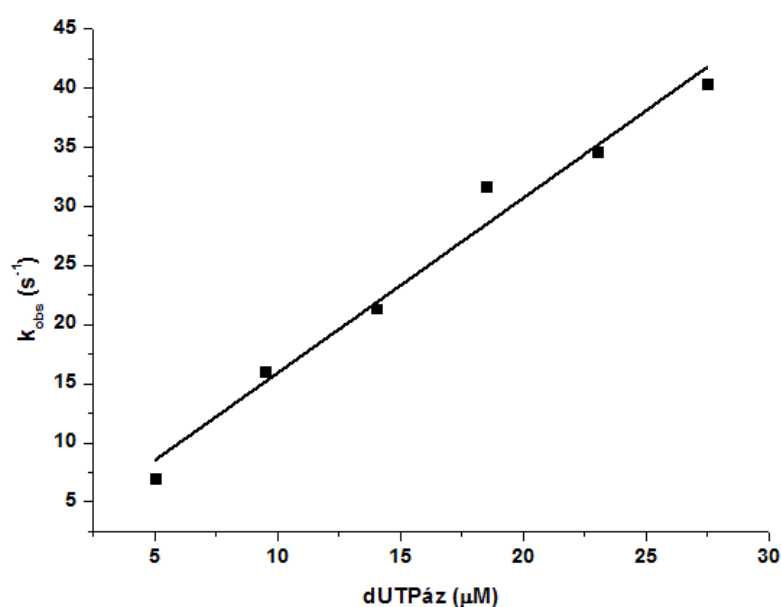
Következő lépésként stopped-flow alkalmazása mellett vizsgáltam az Stl és a dUTPáz között kialakuló kölcsönhatásra jellemző kinetikai paramétereket. Ezt állandó Stl és változó dUTPáz koncentráció mellett végeztem. Az alábbi ábra szemléltet egy általam választott reakciógörbét, melyet 1 μM Stl és 5 μM dUTPáz felhasználása mellett vettem fel (24. ábra).



24. ábra: A H145W MTB dUTPáz Stl kötése stopped-flow-ban

A piros vonal az egyszeres exponenciális illesztést jelöli.

A görbéket egyszeres exponenciális egyenlet (13) illesztésével tudtam kiértékelni, mely arra utal, hogy a mikobakteriális dUTPáz szubsztrátkötésével szemben az Stl kötése nem jár fluoreszcencia változást okozó konformáció-változással. A mérést kétszer végeztem el, az illesztésekből nyert látszólagos sebességi állandókat (k_{obs}) a dUTPáz koncentrációjának függvényében ábrázoltam (25. ábra).



25. ábra: A látszólagos sebességi állandók ábrázolása a dUTPáz koncentrációjának függvényében

A reprezentatív mérésre illesztett egyenes adatai: $k_{\text{on}} = 1,48 \pm 0,14 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 1,13 \pm 1,9 \text{ s}^{-1}$

A pontokra illesztett egyenes meredekségéből a k_{on} asszociációs sebességi állandót, az y tengely metszéspontjából a k_{off} disszociációs sebességi állandót kaptam. Az értékeket az alábbi táblázatban foglaltam össze (8. táblázat):

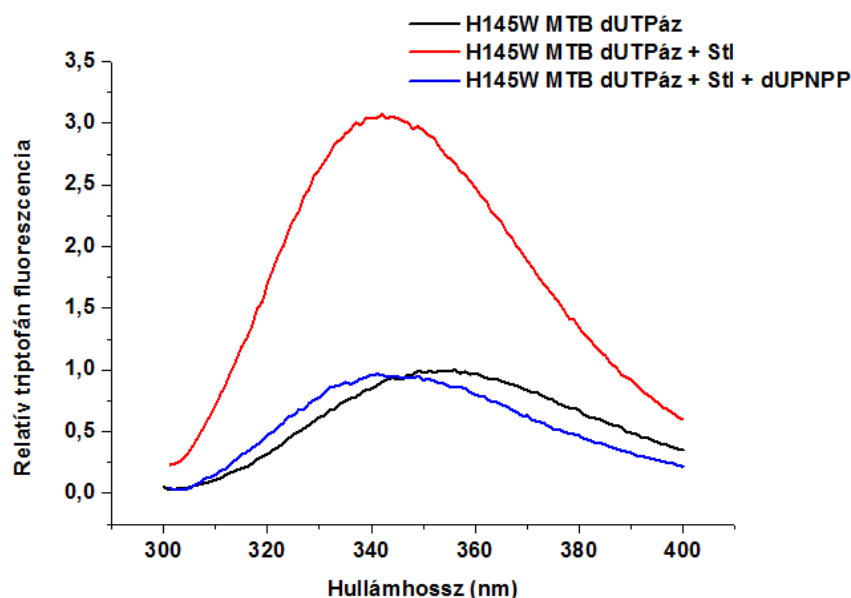
	$k_{on} (\mu M^{-1}s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$
H145W MTB dUTPáz	$1,5 \pm 0,1$	$1,2 \pm 3,2$

8. táblázat: H145W MTB dUTPáz Stl kötésének sebességi állandói

Az eredmények alapján az Stl H145W MTB dUTPáz enzimhez való kötődésének sebessége (k_{on}) egy nagyságrenddel kisebb, mint a dUTP esetében, ahol a k_{on} asszociációs sebességi állandó $16,1 \mu M^{-1}s^{-1}$ -nek adódott. A disszociációs sebességi állandó a dUTP-re vonatkozóan $61,3 s^{-1}$. Ez az állandó az Stl esetében ugyancsak alacsonyabbnak bizonyult. Ez az eredmény egybevágh azzal a feltételezéssel, hogy az Stl a szubsztráthoz képest lassan kötődik az MTB dUTPáz-hoz. Mivel egyenes illesztés esetén az y tengelymetszet hibája általánosságban nagymértékű, kis k_{off} értékek esetén a disszociáció sebességi állandója nem határozható meg pontosan. Ezekben az esetekben az eredmények legfeljebb becslésre adnak lehetőséget. Az Stl esetében is azt látjuk, hogy a k_{off} értékének hibája túlságosan nagymértékű a sebességi állandó (és ezáltal a K_D disszociációs állandó) meghatározásához. Ezen érték pontos meghatározásához további vizsgálatok szükségesek.

5.6. dUPNPP H145W MTB dUTPáz:Stl komplexhez való kötődésének vizsgálata fluorimetriás módszerrel

Az MTB dUTPáz-ok steady-state aktivitásának vizsgálata során kiderült, hogy az Stl gátlási mechanizmusa eltér a $\Phi 11$ fág dUTPáz-nál tapasztaltaktól. Ebben az esetben ugyanis nem volt megfigyelhető teljes inhibíció, a mikobakteriális dUTPáz-ok aktivitásának 20 %-a megmaradt, illetve az eredmények kevert típusú inhibícióra utaltak a $\Phi 11$ fág dUTPáz kompetitív inhibíciójával szemben. Mind kompetitív, mind kevert típusú inhibíció esetén előfordulhat, hogy az enzim szubsztrátkötési tulajdonságai az inhibitor jelenlétében módosulnak. Ezért fluorimetriás módszerrel vizsgáltam a szubsztrát H145W MTB dUTPáz:Stl komplexhez való kötődését. A méréseket dUTP szubsztrát analóggal, dUPNPP-vel végeztem. Ez lehetővé tette, hogy ezzel is kizárjam a dUTP hidrolízisével járó befolyásoló körülményeket (szubsztrát koncentráció csökkenése a hidrolízis következtében, termékek kötődése az enzimhez nagy szubsztrát koncentrációk esetén). Mindenekelőtt megvizsgáltam, hogy a dUPNPP hozzáadása hogyan befolyásolja az MTB dUTPáz:Stl komplex spektrumát, melynek eredménye az alábbi ábrán látható. A mérést 5000 μM dUPNPP jelenlétében végeztem (26. ábra).

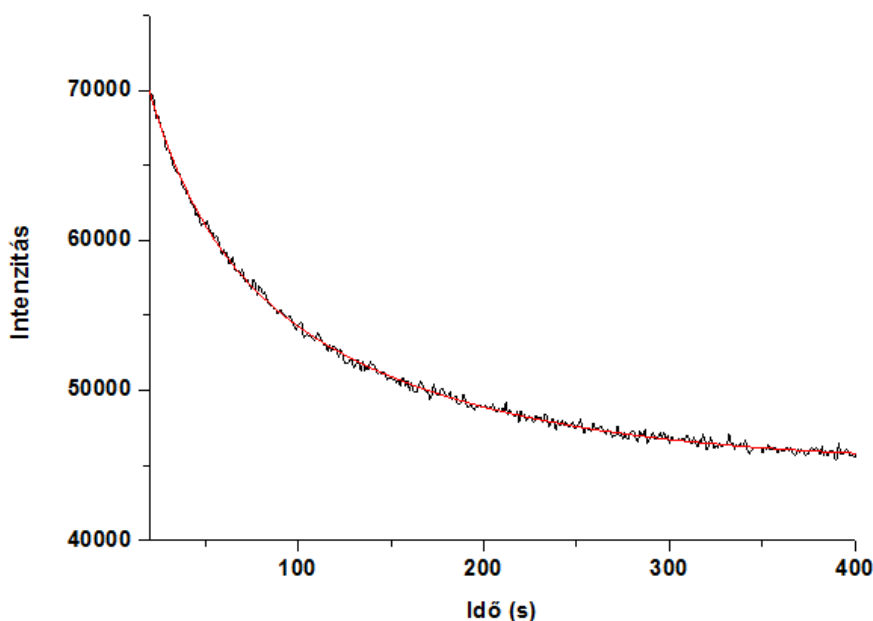


26. ábra: A H145W MTB dUTPáz:Stl komplex fluoreszcens spektruma dUPNPP jelenlétében
A mérés során a dUTPáz és az Stl koncentrációja 3, illetve 6 μM volt.

Látható, hogy 5000 μM dUPNPP hozzáadása nagymértékben csökkentette a fehérje komplex fluoreszcenciáját. A fluoreszcencia csökkenés több folyamatból is eredhet. Egyrészt lehetséges, hogy a dUPNPP kötődése a H145W MTB dUTPáz és Stl

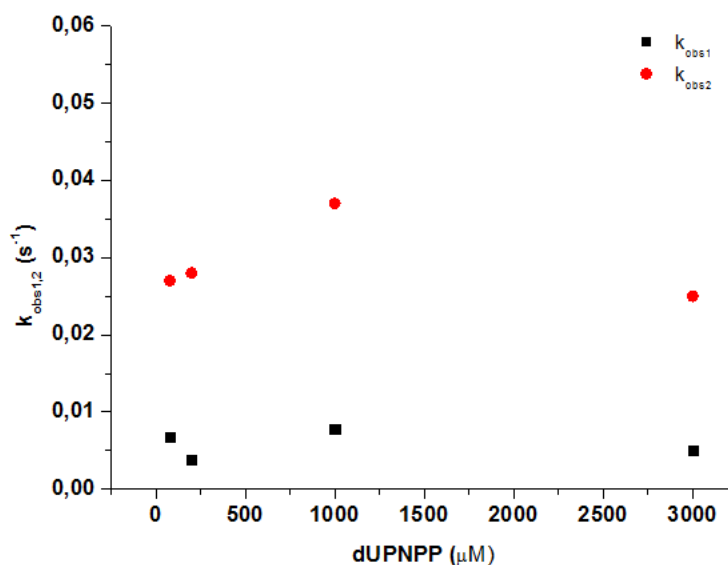
komplexéhez fluoreszcencia csökkenéssel jár. Másrészt lehetséges az is, hogy az egyes aktív helyekre vonatkoztatott inhibíció mechanizmusa kompetitív. Ebben az esetben a fluoreszcencia csökkenést eredményezheti az Stl disszociáció és az ezt követő dUPNPP kötés együttes folyamata.

Ezt követően 80, 200, 1000 és 3000 μM dUPNPP koncentrációk mellett időben követtem a reakció lefutását. Egy általam választott reakció görbe az alábbi ábrán látható (27. ábra).



27. ábra: A H145W MTB dUTPáz:Stl komplex dUPNPP kötése 3000 μM esetén
A piros vonal a dupla exponenciális illesztést mutatja.

A görbék kiértékelése dupla exponenciális egyenlet (15) illesztésével vált lehetővé, tehát a görbék egy két lépésből álló folyamatot reprezentálnak. Ennek megfelelően két látszólagos sebességi állandót kaptam, melyeket a dUPNPP koncentrációjának függvényében ábrázoltam (28. ábra).

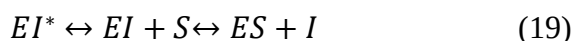


28. ábra: A fluorimetriás mérés során kapott látszólagos sebességi állandók ábrázolása a dUPNPP koncentráció függvényében

A látszólagos sebességi állandók ábrázolásából kiderült, hogy a két fázis közül egyik sebessége sem függ a szubsztrát koncentrációjától. Ez bizonyosan kijelenthető, ugyanis az alkalmazott dUPNPP koncentráció-tartomány megfelelően széles volt ahhoz, hogy az esetleges koncentráció-függés észlelhető legyen.

Abban az esetben, ha a dUPNPP az Stl-el telített dUTPáz-hoz kötne az inhibitor disszociációja nélkül, akkor egy szubsztrát koncentráció-függő folyamatot látnánk. A koncentráció függés hiánya arra utal, hogy az Stl és a dUPNPP versengenek egymással a H145W MTB dUTPáz-hoz való kötés során, valamint arra, hogy ennek következtében a dUPNPP dUTPáz-hoz való kötődését egy lassú, koncentráció-független folyamat korlátozza.

Két olyan folyamatot ismerünk, melyek sebessége nem függ a szubsztrát koncentrációjától, ezek a disszociáció és a konformáció-változás. Ez alapján a fenti eredmények kétféleképpen magyarázhatók. Az egyik lehetőség szerint az Stl disszociációja egy konformáció-változáson keresztül valósul meg, az alábbi egyenlet szerint:

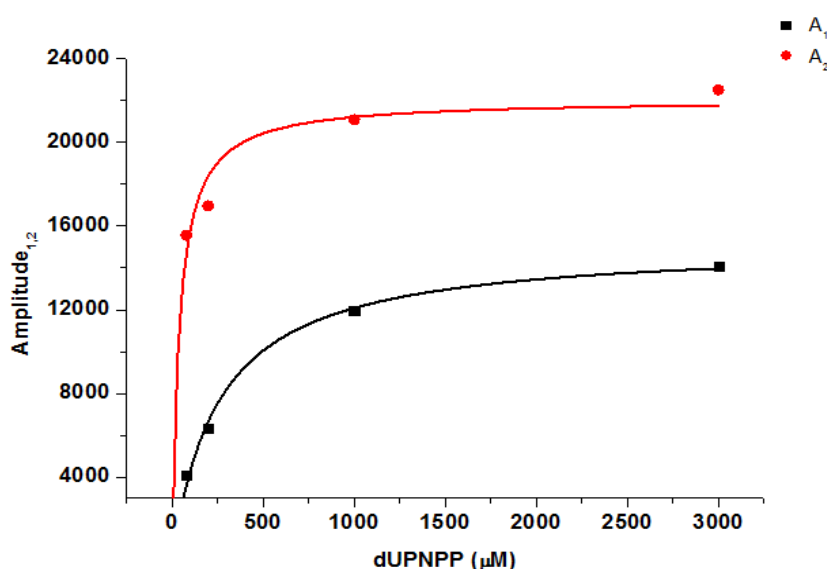


ahol a csillag az eltérő konformációjú állapotot jelöli. Ebben az esetben csak akkor látnánk két fázist a fluoreszcencia csökkenésében, ha a két eltérő konformációjú enzim:inhibitor komplex fluoreszcenciája eltérő lenne. A két konformációs állapot

azonos fluoreszcenciája esetén a két lépésen keresztül történő disszociációból csak a lassabb lépést látnánk. Korábban a stopped-flow-al végzett kísérlet során nem láttunk fluoreszcencia változással járó konformáció változást (vö. 5.5. fejezet). A fentiek alapján az elképzelés, miszerint a megfigyelt két lépésből álló folyamat konformáció változáson keresztül történő disszociációnak feleltethető meg, nem állja meg a helyét.

A másik lehetőség szerint kétféle dUTPáz:Stl komplex egymástól független, eltérő sebességi állandóval történő disszociációját látjuk. Mivel a stopped-flow-al végzett mérések során csak egy lépést látunk, feltételezhető, hogy a kétféle komplex kialakulásának asszociációs állandójában nincs számottevő különbség.

A látszólagos sebességi állandók kiértékelése mellett vizsgáltam a két lépésre jellemző fluoreszcencia-változás értékeket is a dUPNPP koncentrációjának függvényében (29. ábra). A két lépés fluoreszcencia-változás értékei a dUPNPP koncentráció függvényében hiperbolikus telítést mutatnak, ezért a pontokra a (16) egyenletet illesztettem.



29. ábra: dUPNPP telítési görbék

Az alábbi táblázat (9. táblázat) tartalmazza a mérés során nyert adatokat:

$k_{obs,1} (s^{-1})$	$k_{obs,2} (s^{-1})$	$K_{D app,1} (\mu M)$	$K_{D app,2} (\mu M)$
$0,006 \pm 0,002$	$0,029 \pm 0,005$	255 ± 31	40 ± 11

9. táblázat: A dUPNPP dUTPáz:Stl komplexhez való kötődésének adatai

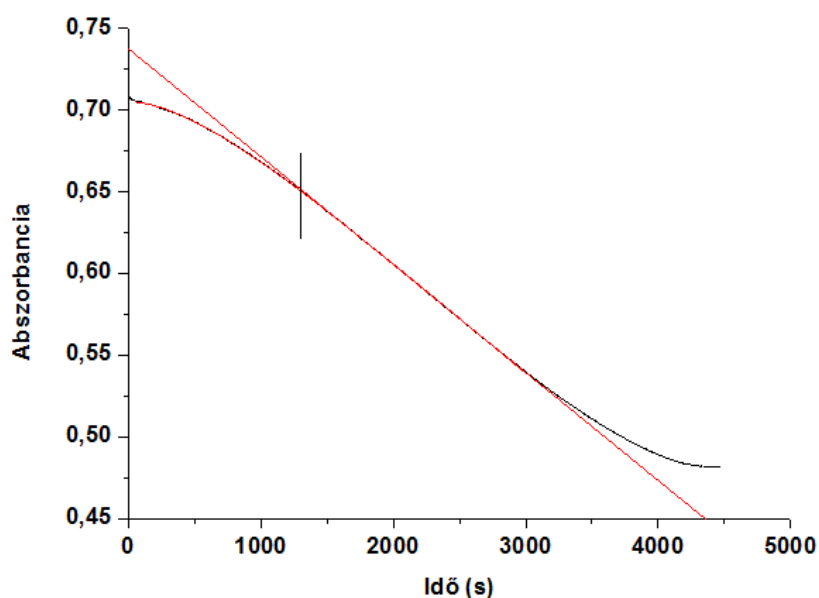
A pontokra történő illesztésből megadható a látszólagos dUPNPP kötési disszociációs állandó ($K_{D\text{ app}}$ (app: apparent = látszólagos)). A vizsgált esetben a $K_{D\text{ app}}$ értékek arról adnak információt, hogy adott H145W MTB dUTPáz és Stl koncentráció jelenlétében a dUPNPP milyen hatékonysággal képes kötődni a H145W MTB dUTPáz-hoz. Az, hogy a dUPNPP kötődése adott Stl koncentráció mellett kétféle látszólagos disszociációs állandóval jellemezhető, megerősíti azt a feltételezést, hogy kétféle disszociációs sebességi állandóval és egyensúlyi disszociációs állandóval jellemezhető dUTPáz:Stl komplexszel van dolgunk. A két látszólagos dUPNPP kötési disszociációs állandó között közel hatszoros különbség van, ami arra utal, hogy a kétféle Stl komplex kötési állandója között is megközelítőleg ilyen mértékű különbség áll fenn. Ahogy korábban említettem, a két komplex asszociációs sebességi állandója (k_{on}) valószínűleg csak kis mértékben tér el egymástól. Ez alapján a kétféle Stl komplex K_D állandói között lévő különbségnek nagyrészt a disszociációs sebességi állandóból (k_{off}) kell származnia. Ennek jól megfelel a kapott disszociációs sebességi állandók közötti nagyjából ötszörös különbség.

Mivel az Stl a $\Phi 11$ fág dUTPáz-hoz dimer és monomer formában is képes kötni, logikus azt feltételezni, hogy az MTB dUTPáz esetén is hasonló folyamatok játszódnak le. A 29. ábrán megfigyelhető, hogy a fluoreszcencia változások, azaz az amplitúdók 1/3:2/3 arányban oszlanak meg a teljes fluoreszcencia-változáshoz képest. Ez a megfigyelés ugyancsak alátámasztja azt a feltételezést, miszerint az Stl egy monomer és egy dimer formájában kötődik a H145W MTB dUTPáz-hoz. A monomer disszociációja a fluoreszcencia-változás 1/3-áért, a dimer disszociációja a fluoreszcencia-változás 2/3-áért felelős.

Fontos megjegyezni, hogy ahhoz, hogy kísérletesen két komplexképződési folyamat egymástól elkülöníthető legyen, a két komplex kötési erőssége között legalább egy nagyságrend különbség szükséges. Az aktivitásmérés során egy-egy arányú kötődést feltételezve az adatok nagyon szépen illeszthetőek voltak. A fentiek ismeretében azonban valószínűsíthető, hogy az ott kapott K_i érték mindkét komplexképződési folyamatot magába foglalja. Feltételezhető, hogy a korábbi aktivitásmérések során alacsony koncentrációban alkalmazott dUTP (17. ábra, 1-50 μM dUTP) csak a gyengébben kötődő komplex disszociációját tette lehetővé. Ennek lehet köszönhető, hogy alacsony dUTP koncentrációknál nem, vagy csak kis mértékben jelentek meg exponenciális fázisok a reakció görbe kezdeti szakaszában, mivel itt a disszociációból eredő jelváltozás aránya túlságosan alacsony volt a lineáris fázishoz

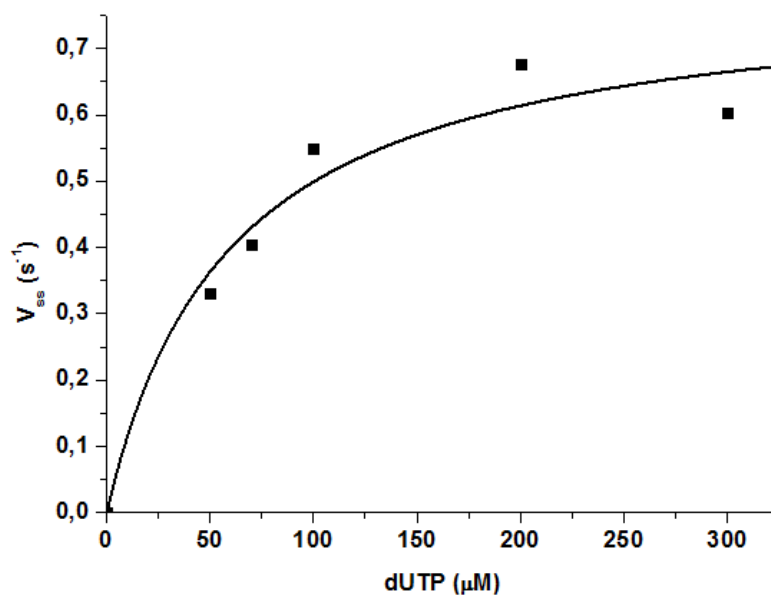
képest. A Michaelis-Menten szubsztrát telítési görbék felvétele során Stl jelenlétében a dUTP K_M értékére $5\text{ }\mu\text{M}$ -t kaptam. Ez alapján a második Stl komplex disszociációjához tartozó látszólagos K_M érték $30\text{ }\mu\text{M}$. Ahhoz, hogy ez az állandó mérhető legyen, és hogy lássuk a második Stl komplex disszociációját is, az aktivitásmérést a korábbiaknál magasabb dUTP koncentráció tartományban kell végezni.

Ezért magasabb dUTP koncentrációk mellett is elvégeztem a H145W MTB dUTPáz aktivitásának mérését Stl jelenlétében. A dUTPáz koncentrációja 50 nM , míg az Stl koncentrációja 150 nM volt, a dUTP-ből 50 , 70 , 100 , 200 és $300\text{ }\mu\text{M}$ -t használtam. A reakció görbék kezdeti szakasza a mérések során exponenciális lefutást mutatott, melyet egy lineáris fázis követett (30. ábra). A reakció görbéket az exponenciális és lineáris tagot is tartalmazó (9) egyenlet illesztésével vizsgáltam.



30. ábra: A H145W MTB dUTPáz reakció görbéje Stl jelenlétében, magas, $100\text{ }\mu\text{M}$ dUTP koncentráció mellett

A lineáris fázis meredekségéből számolt steady-state sebességeket a szubsztrát koncentráció függvényében ábrázolva az alábbi görbéhez jutottam (31. ábra).

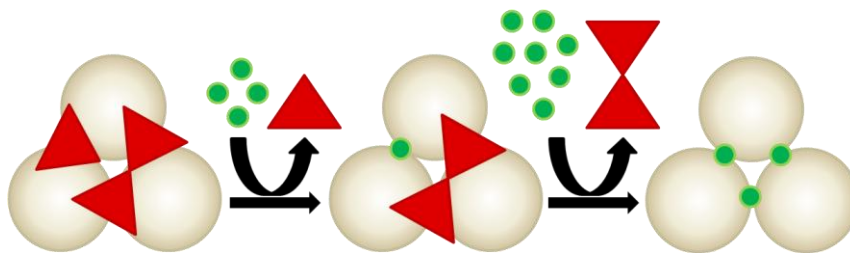


31. ábra: H145W MTB dUTPáz dUTP telítési görbéje Stl jelenlétében

A maximális reakciósebesség $0,8 \text{ s}^{-1}$ -nek adódott, mely érték a korábbi mérések alapján megfelel a gátolatlan H145W MTB dUTPáz maximális aktivitásának. Ezen eredmény alátámasztja azt a feltételezést, miszerint az erősebben kötődő Stl komplex dUTPáz-ról történő disszociációjához a dUTP magas koncentrációban való alkalmazása szükséges. A látszólagos K_M -re $60 \mu\text{M}$ -os értéket kaptam, mely egy nagyságrendbe esik a korábban feltételezett, második Stl komplexre jellemző látszólagos K_M értékkel.

Az illesztett egyenletek exponenciálisoefficiense ($k = 0,002 \text{ s}^{-1}$) a vártak megfelelően független volt a dUTP koncentrációtól és egy nagyságrendbe esett a fluorimetriás mérések során tapasztalt lassabb fázis sebességi állandójával. Ez szintén megerősíti azt a feltételezést, hogy a folyamat megfeleltethető a szorosabban kötődő Stl forma disszociációjának.

Ezen információk felhasználásával az alábbi sematikus ábra (32. ábra) szemlélteti az Stl általam felállított gátlási modelljét:



32. ábra: Az Stl disszociációjának lehetséges mechanizmusa

Jelölések: zöld kör: dUTP, piros háromszög: Stl monomer, fehér kör: dUTPáz monomer

6. Az eredmények összefoglalása, diszkusszió

A vizsgálataimhoz szükséges fehérjék előállítását követően vizsgáltam a WT MTB dUTPáz és a H145W MTB dUTPáz aktivitását mind steady-state, mind egyszeri átviteli körülmények között. Ennek során megállapítottam, hogy a H145W MTB dUTPáz aktivitása valamivel alacsonyabb, de K_M értéke változatlan a vad típusú dUTPáz-hoz képest.

Steady-state aktivitásmérés segítségével megállapítottam, hogy az Stl általi dUTPáz gátlás nM-os inhibíciós állandóval jellemezhető. 30 μ M szubsztrát és 50 nM enzim jelenlétében az MTB dUTPáz-ok aktivitásában kb. 80 %-os csökkenés volt kimutatható. Ez a 80 %-os gátlás már 150 nM Stl jelenlétében megfigyelhető volt. Az Stl koncentráció további növelése (500 nM-ig) nem eredményezett további aktivitás csökkenést. Az, hogy Stl-el való telítés esetén is megmaradt az MTB dUTPáz-ok aktivitásának 20 %-a, arra utalt, hogy az enzim:inhibitor komplex is képes a dUTP szubsztrát megkötésére valamint hidrolízisére.

A gátlási mechanizmus további jellemzésére szubsztrát telítési görbéket vettem fel. A V_{max} és K_M értékek változása a korábbi mérés eredményeihez hasonlóan kevert típusú inhibícióra utalt. A kevert típusú inhibíció egy trimer enzim esetében kétféle módon jöhet létre: i) az inhibitor minden egyes aktív helyet kevert inhibíciós mechanizmussal gátol ii) az inhibitor a trimer enzimen belül csak az aktív helyek egy részéhez köt, míg a többi aktív hely szabadon működik.

A steady-state mérések segítségével megmutattam azt is, hogy az Stl hasonló módon és mértékben képes gátolni a WT MTB dUTPáz-t és a H145W MTB dUTPáz-t. Ez alapján H145W MTB dUTPáz-t, mint kvázi vad típusú enzimet használtam a fluoreszcens alapú mérésekhez.

A gátlási mechanizmus részletesebb megértéséhez tranziens kinetikai módszereket alkalmaztam. Első lépésként fluoreszcens technikák segítségével jellemeztem a következő folyamatokat: szubsztrátkötés, egyensúlyi termékkötés, Stl-kötés. A szubsztrát- és a termékkötési tulajdonságok a humán dUTPáz esetén leírtakhoz hasonlóak voltak. A dUTPáz dUTP kötésének vizsgálata során két lépést figyeltem meg: a szubsztrát megkötését, valamint egy koncentráció-független, feltételezhetően izomerizációs lépést. Megállapítottam, hogy a dUTP hidrolízisével keletkező termékek (dUMP, PP_i) a dUTP-nél jóval gyengébben kötődnek a dUTPáz-hoz.

Stopped-flow-al végzett kísérletek alapján az Stl H145W MTB dUTPáz-hoz való kötődése egyetlen lépésen keresztül valósul meg. Az Stl dUTPáz-hoz való kötése a dUTP kötés mindkét lépésénél lassabb folyamatnak bizonyult. Az Stl kötés közvetlen vizsgálata tehát megerősítette azt a feltételezést, hogy az dUTPáz:Stl komplex a dUTPáz:szubsztrát komplexhez képest lassan alakul ki.

Az egyes komponensek kötési tulajdonságainak jellemzése után fluoreszcens módszerrel megvizsgáltam a dUPNPP szubsztrát analóg H145W MTB dUTPáz-hoz való kötődését Stl jelenlétében. Azt találtam, hogy a dUPNPP kötődését két, egymástól független, lassú disszociációs folyamat limitálja. Ez egyrészt arra utal, hogy az Stl és a szubsztrát között kompetíció van, tehát nem képesek egyszerre kötődni a dUTPáz egyes aktív helyeihez. Az eredmények másrészt indikálják azt is, hogy az Stl-nek két, különböző disszociációs állandóval jellemezhető formája képes a dUTPáz-hoz kötni. Ha figyelembe vesszük, hogy a dUTPáz egy homotrimer enzim, valamint azt, hogy az Stl a $\Phi 11$ dUTPáz esetében monomer valamint dimer formában is képes kölcsönhatást kialakítani az enzimmel, feltételezhető, hogy a két disszociációs lépés megfeleltethető a dimer és a monomer Stl disszociációjának. A két Stl forma disszociációs állandója között az eredmények alapján kb. 5-6-szoros különbség van.

A steady-state mérések során adott koncentráció viszonyok között a dUTPáz aktivitás kb. 80 %-os csökkenése volt megfigyelhető. Ez alapján, illetve a fluoreszcens mérések eredménye alapján feltételezhető volt, hogy a 80 %-os csökkenésért a dimer Stl dUTPáz-hoz való kötődése felelős. Feltételezhető volt továbbá az is, hogy a 20 % maradék aktivitás annak az eredménye, hogy a mérésben alkalmazott dUTP koncentráció mellett az Stl monomer formája disszociál a dUTPáz-ról, az így szabadon maradt aktív hely képes a szubsztrát megkötésére, valamint hidrolízisére. Ebből a feltételezésből következik, hogy a gyenge kölcsönhatást a monomer Stl, míg az erősebb kölcsönhatást a dimer Stl alakítja ki az MTB dUTPáz-al.

Ezen feltételezéseket követően hipotéziseim igazolására megvizsgáltam a H145W MTB dUTPáz Stl jelenlétében mért steady-state aktivitását magasabb szubsztrát koncentráció mellett is. A mérés során azt láttam, hogy a várakozásnak megfelelően, a nagyobb dUTP koncentrációk már elegendőek voltak a dimer Stl leszorításához. Ezekben a mérésekben a legnagyobb dUTP koncentrációk esetén, a kompetitív inhibíciónak megfelelően az enzim aktivitás megközelítette az inhibitor nélkül mért enzim aktivitást.

Összegezve tehát azt találtam, hogy a trimer MTB dUTPáz enzimhez egy dimer Stl molekula és egy monomer Stl molekula képes kötődni (32. ábra). Az eredmények azt mutatják, hogy mindkét Stl forma kompetál a szubsztráttal. Ezek az eredmények megegyeznek a Φ 11 fág dUTPáz esetében tapasztaltakkal [13]. Azonban míg a Φ 11 fág dUTPáz esetében a két Stl forma kötési tulajdonságai között a különbség nem volt kimutatható, addig az MTB dUTPáz esetében a két forma disszociációs állandója között kb. 5-6 szoros különbséget figyeltem meg. Ez a különbség már elegendő ahhoz, hogy a gyengébben kötődő monomer forma dUTP-val szembeni kompetícióját jelentősen gyengítse.

Munkám megalapozta, hogy az Stl segítségével *in vivo*, *Mycobacterium smegmatis*-ban is vizsgálni tudjuk a dUTPáz gátlás hatását a DNS anyagcserére és a DNS uracil tartalmára.

További terveim között szerepel a jelen munka alapján felállított gátlási modell további tesztelése illetve annak szerkezeti vizsgálata, hogy mi okozhatja azt, hogy az Stl dimer és monomer formája a Φ 11 fág dUTPáz-tól eltérő módon köt az MTB dUTPáz-hoz.

7. Irodalomjegyzék

1. Vertessy, B.G. and J. Toth, Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc Chem Res*, 2009. **42**(1): p. 97-106.
2. Lopata Anna Diplomamunka (2012) A Mycobacterium tuberculosis dUTPáz szubsztrát bekötődési útvonalának elméleti és kísérletes vizsgálata
3. Larsson, G., L.A. Svensson, and P.O. Nyman, Crystal structure of the Escherichia coli dUTPase in complex with a substrate analogue (dUDP). *Nat Struct Biol*, 1996. **3**(6): p. 532-8.
4. Vertessy, B.G., Flexible glycine rich motif of Escherichia coli deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase is important for functional but not for structural integrity of the enzyme. *Proteins*, 1997. **28**(4): p. 568-79.
5. Mustafi, D., et al., Catalytic and structural role of the metal ion in dUTP pyrophosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(10): p. 5670-5.
6. Mol, C. D., Harris, J. M., McIntosh, E. M., and Tainer, J. A. (1996) Human dUTP pyrophosphatase: uracil recognition by a beta hairpin and active sites formed by three separate subunits, *Structure* **4**, 1077-1092.
7. Varga, B., Barabas, O., Takacs, E., Nagy, N., Nagy, P., and Vertessy, B. G. (2008) Active site of mycobacterial dUTPase: structural characteristics and a built-in sensor, *Biochem Biophys Res Commun* **373**, 8-13.
8. Pecsí I, Leveles I, Harmat V, Vertessy BG, Toth J (2010) Aromatic stacking between nucleobase and enzyme promotes phosphate ester hydrolysis in dUTPase. *Nucleic Acids Res* **38**:7179-86.
9. Tóth, J., Varga, B., Kovács, M., Málnási-Csizmadia, A. and Vértessy, B.G. (2007) Kinetic mechanism of human dUTPase, an essential nucleotide pyrophosphatase enzyme. *J. Biol. Chem.*, **282**, 33572–82.
10. Gordon, R.J. and F.D. Lowy, *Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection*. *Clinical Infectious Diseases*, 2008. **46**: p. S350-9.
11. Novick, R.P., Christie, G.E. and Penadés, J.R. (2010) The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 541–51.
12. Tormo-Mas, M.A., et al., (2010) Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands. *Nature*,. **465**(7299): p. 779-82.
13. J. E. Szabó, V. Németh, V. Papp-Kádár, K. Nyíri, I. Leveles, Á. Á. Bendes, I. Zagyva, G. Róna, H. L. Pálkás, B. Besztercei, O. Ozohanics, K. Vékey, K. Liliom, J. Tóth, and B. G. Vértessy (2014) Highly potent dUTPase inhibition by a bacterial repressor protein reveals a novel mechanism for gene expression control *Nucleic Acids Res.* gku882v1-gku882.

14. Wang, Z. and Mosbaugh, D.W. (1989) Uracil-DNA glycosylase inhibitor gene of bacteriophage PBS2 encodes a binding protein specific for uracil-DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.*, 264, 1163–71.
15. Hegyi György, Kardos József, Kovács Mihály, Málnási-Czizmadia András, Micsonai András, Nyitray László, Pál Gábor, Radnai László, Reményi Attila, Venekei István (2013) Bevezetés a biokémiába gyakorlati jegyzet, 115-122
16. Morrison JF. Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. (1969) *Biochim Biophys Acta*. 185(2):269–286.
17. Cha S. Tight-binding inhibitors--III. A new approach for the determination of competition between tight-binding inhibitors and substrates--inhibition of adenosine deaminase by coformycin. (1976) *Biochem Pharmacol*. Dec 15;25(24):2695-702.
18. Takacs, E., Nagy, G., Leveles, I., Harmat, V., Lopata, A., Toth, J., and Vertessy, B. G. Direct contacts between conserved motifs of different subunits provide major contribution to active site organization in human and mycobacterial dUTPases, (2010) *FEBS Lett* 584, 3047-3054.
19. Szedlacsek SE and Duggleby RG (1995) Kinetics of slow and tight-binding inhibition. *Methods in Enzymology* 249: 144–180
20. Leveles, I., Németh, V., Szabó, J.E., Harmat, V., Nyíri, K., Bendes, Á.Á., Papp-Kádár, V., Zagyva, I., Róna, G., Ozohanics, O., et al. (2013) Structure and enzymatic mechanism of a moonlighting dUTPase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 69, 2298–308.
21. Vladi V. Heredia, Thomas J. Carlson, Erin Garcia and Shaoxian Sun, (2006) Biochemical basis of glucokinase activation and the regulation by glucokinase regulatory protein in naturally occurring mutations *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 40201-40207.
22. Barabas, O., et al., Structural insights into the catalytic mechanism of phosphate ester hydrolysis by dUTPase. *J Biol Chem*, 2004. 279(41): p. 42907-15.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Vértessy G. Beátának**, hogy lehetővé tette számomra az MTA TTK Enzimológia Intézetben végzett munkámat. Külön köszönettel tartozom konzulensemnek, **Szabó Judit Eszternek** munkám során nyújtott útmutatásaiért és segítségéért, mindennapos fáradozásáért, határtalan türelméért.

Továbbá köszönöm a Csoport minden egyes Tagjának, hogy mindig bizalommal fordulhattam Hozzájuk kérdéseimmel.