



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Tudományos Diákköri Dolgozat

Cinkujj-ATCUN mesterséges nukleázok optimalizálása

KÉSZÍTETTE:

BURÁNSZKI JÓZSEF

Kémia BSc szak, III. évfolyam

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Gyurcsik Béla, egyetemi docens

Hajdu Bálint, tudományos segédmunkatárs

Szeged

2022

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	2
2	Irodalmi áttekintés	3
2.1	Cinkujj fehérjék	3
2.2	Cinkujj fehérjék Zn^{2+} -ion kötőhelyeinek vizsgálata	5
2.3	Cinkujj fehérjék DNS felismerése	6
2.4	ATCUN-motívum és DNS hasítása	7
2.5	ATCUN-motívum kialakítása fehérjékben	9
3	Célkitűzés	11
4	Kísérleti anyagok és módszerek	12
4.1	Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia	12
4.2	Fehérjék kifejezése	13
4.3	Fehérjék tisztítása	13
4.4	Gélelektroforézis.....	14
4.4.1	Agaróz gélelektroforézis	15
4.4.2	Poliakrilamid gélelektroforézis	15
4.5	Tömegspektrometria	16
4.6	Ultraszúrás	17
5	Eredmények.....	19
5.1	1MEY# cinkujj fehérje mutánsok.....	19
5.2	Fehérjék tisztítása	19
5.3	Fehérjék vizsgálata	22
5.3.1	Fehérjék másodlagos szerkezetének vizsgálata	22
5.3.2	Fehérjék szerkezetének helyreállítása.....	23
5.3.3	Másodlagos szerkezeti elemek arányának vizsgálata	24
5.3.4	Tömegspektrometriás mérések eredményei.....	25
5.4	Ni(II)-Cu(II)-csere az ATCUN-motívumban	29
5.5	Nukleáz aktivitási kísérletek.....	31
6	Összefoglalás	33
7	Irodalomjegyzék.....	35
8	Köszönetnyilvánítás	40

1 Bevezetés

A daganatos megbetegedések száma napjainkban is több millióra tehető. Ennek oka visszavezethető génmutációkra, sejtekben kifejeződött fehérjék hiányára, helytelen működésére, vagy teljes inaktivitására. Napjainkban a daganatos betegségek kezelésére elsősorban olyan vegyületeket használnak, amelyek nem specifikusak, és pusztán a rákos és egészséges sejtek eltérő anyagcserefolyamatain alapul szelektivitásuk (ciszplatin). Fejlettebb megoldást jelenthetne a rákos sejtek célzott elpusztítása erre a célra kifejlesztett mesterséges nukleázokkal, ahol olyan DNS szakaszt hasítunk el specifikusan, amely csak a daganatos sejtekben fordul elő. A ma ismert mesterséges nukleázok többsége azonban változó mértékben citotoxikus az élő szervezet számára, ugyanis a fehérje degradációja nemspecifikus DNS-kötődést, ezáltal pedig nemkívánt hasításokat eredményezhet, ami egészséges sejtekben is sejthalálhoz vezet.

A mesterséges nukleázok egy nagy csoportját a cinkujj nukleázok alkotják. A cinkujj fehérjék a Zn^{2+} -ionok hatására kialakított szerkezetüknek köszönhetően specifikus DNS-szakaszokhoz kötődnek. A hasítás funkcióját a cinkujj fehérjékhez kapcsolt nukleáz domén végzi, például FokI vagy Colicin E7. A nukleázok olyan molekulák, melyek a nukleotidok közötti foszfodiészter kötésekkel hasítják el. A kísérleteink során ezzel szemben ATCUN-motívumot alkalmazunk, amely redoxireakció segítségével hasít, így a daganatos sejt önjavító mechanizmusai is nehezebben tudják helyreállítani a DNS szekvenciát.

Ilyen mesterséges nukleázok tervezésénél a legfontosabb szempont a specifitás elérése. A kutatócsoportunk célja egy ilyen szabályozott működésű, nagy katalitikus aktivitású enzim kifejlesztése. Az ATCUN-motívum kialakítása olyan fehérjékben (pl. cinkujj fehérje), melyek egy általunk kiválasztott szakaszon ismerik fel a DNS-t, mesterséges nukleázok tervezésére és vizsgálatára ad lehetőséget. Az így kialakított nukleázokban a cinkujj a specifikus szubsztrát-kötődést, míg az ATCUN-motívum a DNS hasítását biztosítja. Az alkalmazott fehérje aminosav szekvenciájának változtatásával, valamint a fehérjét és a hasításért felelős egységet összekötő linker szakasz hosszának változtatásával lehetőségünk van finomhangolni az enzimek specifitását és aktivitását.

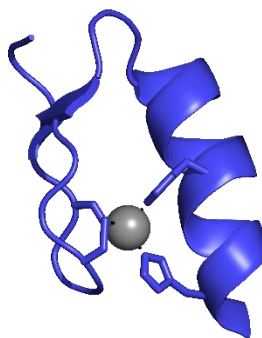
2 Irodalmi áttekintés

2.1 Cinkujj fehérjék

Az élő szervezetben (emlősök, hüllők, kételtűek) előforduló cinkujj fehérjék közül a Cys₂His₂ típusúakat mutatták ki először [1], az afrikai karmosbékák transzkripciósfaktoraiban 1985-ben. A cinkujj fehérjék három vagy több cinkujj-motívum segítségével ismerik fel a DNS célszekvenciájukat. [2] Specifitásuk nagymértékben növelhető, ha az egyes motívumokat egymás után kapcsoljuk, hiszen így hosszabb nukleinsav szakaszokat ismernek fel. [3] A cinkujj fehérjék mesterséges előállítását az teszi lehetővé, hogy a felismerési szekvenciák változtathatók, ez pedig lehetőséget ad a génmódosításra. [4] [5]

A természetes cinkujj fehérjék funkciója sokféle, ahogyan szerkezetük is: mára több eltérő szerkezetet is azonosítottak [6]. Egyvalami azonban mindegyikben azonos volt: Zn²⁺-ion stabilizálta a szerkezetet, és hiányában a fehérjék inaktiválódnak, annak ellenére, hogy nem a Zn²⁺-ion felelős a tényleges funkcióért. A Zn²⁺-ion szerkezetet stabilizáló szerepe azon tulajdonságainak köszönhető, hogy redoxireakciókban nem vesz részt, átmeneti hard-soft sajátságú és tetraéderes geometriában erős koordinatív kötések kialakítására képes [7].

A legelterjedtebb felépítésű cinkujj motívum ma a Cys₂His₂ típus, mely fejlett eukarióta szervezetekben fordul elő. Az első cinkujj motívum felfedezésekor [1] az aminosav-szekvenciában különlegességet véltek felfedezni: egy kilencszeresen ismétlődő aminosav-lánc mintát tartalmazott, amiben meghatározott pozícióban helyezkedtek el cisztein, hisztidin és hidrofób aminosavak. Egy monomer általános aminosav-szekvenciája: Φ-X-Cys-X₂₋₅-Cys-X₃-Φ-X₅-Φ-X₂-His-X₂₋₅-His, ahol X bármilyen aminosav lehet, Φ pedig valamilyen hidrofób aminosav. [8] A két antiparallel β-redő és egy α-hélix által kialakított ujjszerű szerkezetet két-két cisztein és hisztidin oldalláncaihoz kötődő Zn²⁺-ion stabilizálja [9]. A fehérje szerkezete egy ekvivalens Zn²⁺-ion bekötődése előtt rendezetlen, amit cirkuláris dikroizmus és NMR spektroszkópiás mérésekkel igazoltak. [10] [11]



1. ábra: 1MEY PDB kóddal ellátott cinkujj fehérje N-terminális cinkujj alegységének ábrázolása PyMOL programban. A Zn^{2+} -ion a szürke színű gömb.

Az cinkujj fehérjék mesterséges nukleázként történő első alkalmazásakor három cinkujj alegységet kapcsoltak össze a FokI enzim nukleáz doménjével, amely a hasításért volt felelős. [12] A sikernek köszönhetően több génmódosítási kísérlet kezdődött [13], többek között vizsgálták a Hepatitis B vírus DNS-ének mesterséges cinkujj-nukleázokkal történő kölcsönhatását. [14]

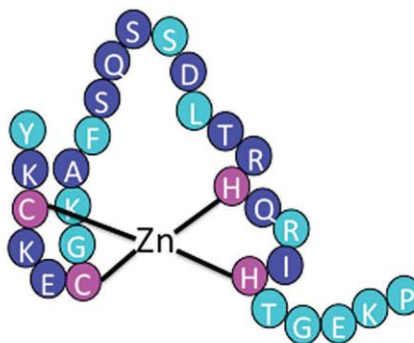
A ma ismert cinkujj motívumokat 8 csoportba sorolták a cink-kötő egységek másodlagos szerkezete alapján. Ezek közül legismertebb a már említett Cys_2His_2 típus, amit több szakirodalom is csak $C2H2$ -ként említ, ez a legtöbbet vizsgált és legjobban karakterizált motívum. Mivel a specifitás jelentős mértékben növelhető több motívum egymás után kapcsolásával, és a lehetőségek száma nagyon nagy, ma is széleskörű figyelem övezi a Cys_2His_2 motívumokat. Zajlottak olyan kutatások, melyekben a cinkujj fehérje domén DNS-kötő specifitását próbálták meghatározni, számításokkal alátámasztva. [15]

A cinkujj-motívumok további csoportjai a következők: Gag-csukló, amit $Cys_2HisCys$ szekvenciának is neveznek. Azonosítása elsőként a HIV vírusban történt. A violinkulcs cinkujj motívumok két Zn^{2+} -iont képesek megkötni. Ezt az N-terminálison található β -hajtókanyar két antiparallel β -redője és a C-terminálison található α -hélix két-két ciszteinje teszi lehetővé. A legtöbb cinkujj fehérjében a cink-szalag motívumok találhatók meg, ezekben a Zn^{2+} -ion kötődéséért a két β -hajtókanyar által kialakított kötőhely felel. A Zn_2/Cys_6 típusban két Zn^{2+} -ion koordinálódik hat cisztein aminosavhoz. A TAZ2-szerű doménekben minden Zn^{2+} -ion két antiparallel futású α -hélix között helyezkedik el. Következő csoport a „rövid cinkkötő hurkok” típusa, melyek főként nagyobb fehérjékben találhatók meg. Közös szerkezeti elem ebben a csoportban, hogy legalább 3 $Zn(II)$ -kötő

ligandum nagyon közel helyezkedik el egymáshoz, és nem rendeződnek egységesen semelyik másodlagos szerkezeti elemnek megfelelő rendszerbe. [6]

2.2 Cinkujj fehérjék Zn^{2+} -ion kötőhelyeinek vizsgálata

Amikor a cinkujj-fehérje kölcsönhatását vizsgáljuk Zn^{2+} -ionokkal, több befolyásoló tényezőt is figyelembe kell vennünk, ilyenek a pH, a hőmérséklet, az ionerősség. Ahhoz, hogy mindezeket vizsgálni tudják, egy modell-peptiddel, a CP-1-gyel (consensus peptide-1) (2. ábra) kísérleteztek, amit több, mint 25 éve terveztek, és használnak, mint a Cys_2His_2 cinkujj fehérje család modellje. A peptid szekvenciáját 2015-ben felülvizsgálták azzal a céllal, hogy pontosan megvizsgálják az aminosav sorrendet és összetételt. Kisebb meglepetésre csak minimális eltérést találtak az 1991-ben leírt szekvenciához képest [16] annak ellenére, hogy a ma ismert cinkujj fehérje szekvenciák száma – amiket a kiértékelés során használhattak – a 10000-t is meghaladta. A peptid tehát, mint modell, megbízhatóan nyújthat információt egy Cys_2His_2 cinkujj részlet fémkötő sajátságairól.



2. ábra: A CP-1 modell-peptid Zn(II) -kötőhelyének egyszerű ábrája. Rózsaszínnel jelölve azok az aminosavak, melyekhez kötődik a Zn^{2+} -ion. [16]

A Zn(II) -affinitás vizsgálatok meglepő eredmény születtek: nagyobb affinitás határozható meg a modell-peptidre, mint a természetben előforduló cinkujj fehérjék egységeire. Számos vizsgálat és számítás azt mutatja, hogy a különböző cinkujj fehérjék Zn(II) -affinitás értékei széles skálán változnak (1. táblázat). Ennek okai közé tartozik az, hogy az egyes részegységeknek (pl. α -hélix és β -redők H-kötései) termodinamikai hozzájárulása még nem feltérképezett. Új cinkujj fehérje tervezése esetén tehát nem hagyatkozhatunk korábbi eredményekre, minden esetben szükséges a termodinamikai sajátságok meghatározása.

1. táblázat: Cinkujj motívum–Zn(II)-kölsönhatásokhoz rendelhető $\lg\beta'$ értékek; DT: spektroszkópiás direkt titrálás; RT: UV-Vis spektroszkópiával követett reverz titrálás; PAR: PAR kompetitor jelenlétében végrehajtott spektroszkópiás titrálás; CDc: Titrálás kompetitorokkal CD-vel követve; ITC: Izoterm kalorimetriás titrálás; cITC: Titrálás kompetitorokkal ITC-vel követve; TRT: három lépéses spektroszkópiás reverz titrálás.

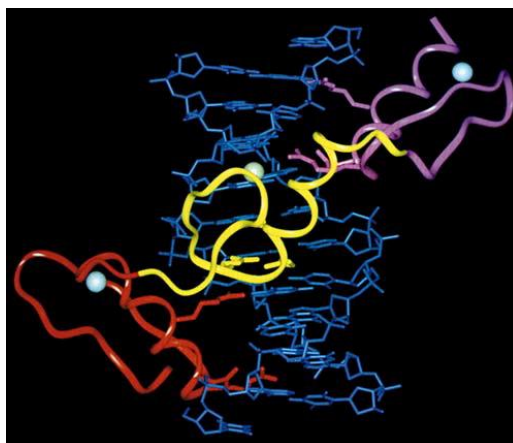
Cinkujj motívum	Körülmények	$\lg\beta'$ pH = 7,4	Hivatkozás
CP1	100 mM HEPES (pH = 7,0); 50 mM NaCl	12,5 (RT)*	[18]
		12,0 (RT)*	[19]
	50 mM MOPS (pH = 7,0); 100 mM KCl	15,7 (CDc)*	[20]
TFIIIA-2	20 mM HEPES (pH = 7,0); 50 mM NaCl	9,4 (RT)*	[21]
MTF1-1	50 mM HEPES (pH = 7,0); 100 mM NaClO ₄	12,4 (CDc)*	[22]
	50 mM HEPES (pH = 7,4); 100 mM NaClO ₄	11,4 (PAR)	[23]
	100 mM HEPES (pH = 7,0); 50 mM NaCl	11,3 (RT)	[24]
WT1-3	50 mM HEPES-HCl (pH = 6,5)	10,5 (ITC)*	[25]
WT1-4	20 mM MES (pH = 5,3); 100 mM KCl	8,9 (DT)*	[26]
Sp1-3	50 mM HEPES (pH = 7,4); 100 mM NaClO ₄	12,7 (CDc)	[22]
	50 mM HEPES (pH = 7,0) 100 mM NaCl	10,0 (RT)*	[27]
	500 mM Tris (pH = 7,4)	7,6 (ITC)	[28]
		8,2 (rITC)	[28]
	50 mM Tris (pH = 7,0)	10,4 (RT)*	[28]
ZF133-11	50 mM HEPES (pH = 7,4); 100 mM NaClO ₄	12,5 (CDc)	[22]
	100 mM KNO ₃	12,5 (Pot)	[22]
ZF278-1	50 mM HEPES (pH = 7,4); 100 mM NaClO ₄	13,0 (TRT)	[22]

* pH = 7,4-re átszámolva Kluska és mtsai. [29]

Továbbá ezek a Zn(II)-megkötő helyek néhány toxikus fémnek célpontot jelentenek: a Zn²⁺-ion kiszorításával felboríthatják a fehérje szerkezetét, esetleg elhasíthatják azt, ezáltal megakadályozhatják a génexpressziót. [17]

2.3 Cinkujj fehérjék DNS felismerése

A cinkujj fehérjék (főként a Cys₂His₂ típusúak) az egyik leggyakrabban előforduló DNS-kötő motívumok az eukariótákban. A DNS-szekvenciák nagyon széles skáláját ismerik fel, specifikitásuk nagymértékben növelhető. A felismerés/DNS-kötődés megértéséhez, ami csak Zn(II)-vel telített formában valósul meg, elsősorban a Zif268 cinkujj fehérje-DNS komplex vizsgálata járult hozzá nagymértékben. A kutatások során megállapították, hogy a Zif268 cinkujj fehérje mindegyik cinkujj alegysége egy három bázispárból álló oldalon alakít ki specifikus kölcsönhatást a DNS nagyárcában. (3. ábra) [30]



3. ábra: A Zif268-DNS komplex szerkezete. A peptid első cinkujj motívuma pirossal, a második sárgával, a harmadik lilával jelölve. A DNS kék színű, a Zn^{2+} -ionok világoskék gömbök. [31]

Több cinkujj alegység egymás után kapcsolásával a második alegység a következő bázishármaszt ismeri fel. Elméletben bármely bázishármas felismertetése megcélozható a cinkujj motívumban megtalálható aminosavak változtatásával, azonban ehhez még nem áll rendelkezésre az összes cinkujj alegység ismerete. Ha ez az azonosítás megtörténne, a fehérje működése még nem garantált: a specifikitáshoz legalább három cinkujj alegység összekapcsolására van szükség. Ezek az alegységek rendszerint peptid linkerekkel vannak összekötve. A linker egységek hosszával és a felépítő aminosavak minőségével is tudjuk befolyásolni a DNS-kötés erősségét. [32] [33] [34] A cinkujj alegységek leghatékonyabban az 5'-GNNGNNGNN-3' nukleotid szekvenciát ismerik fel, ahol N tetszőleges nukleotidot jelöl, ideális esetben guanint.

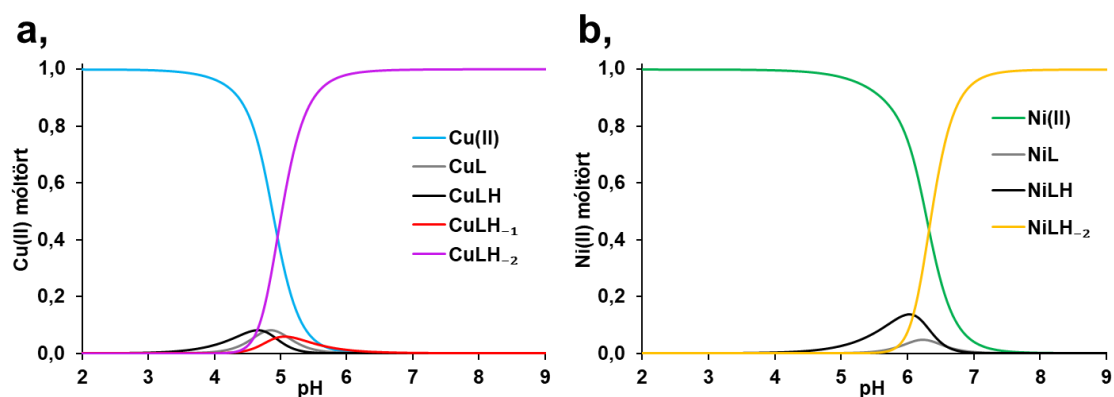
2.4 ATCUN-motívum és DNS hasítása

Az ATCUN-motívum (Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding) több, mint 50 éve bioszervetlen- és biokémiai kutatások fontos tárgya. Először albuminban azonosították a motívumot. Lévéen, hogy két, gyakran vizsgált és a szervezetben is előforduló fémiont képes nagy stabilitással megkötni, napjainkban is tanulmányozzák ezek tulajdonságait, valamint keresnek olyan fehérjéket, amelyekben előfordulhatnak ilyen motívumok. A Cu(II) transzportjáért felelős albumin köti meg a szervezetben előforduló Cu(II) 5-10 %-át, míg a többi ceruloplazminhoz, vagy hisztidin-tartalmú peptidekhez kötődve van jelen. [35] Ellenben a Ni(II) 95 %-a albuminhoz kötődve fordul elő, és csak a maradék 5 % található meg hisztidin-komplexben. [36] Ezalatt az 50 év alatt az ATCUN-motívumot több eukarióta szervezet fehérjeiben megtalálták, többek között az emberében is. Bebizonyították, hogy linker segítségével fehérjéhez kapcsolva, nem specifikus DNS-hasítási képessége van (ez a

nem specifikus hasítási képesség akkor is fennáll, ha az ATCUN-motívumot nem kapcsoljuk fehérjéhez). Mérsékelt specifitás érhető el, ha DNS-felismerő egységgel, például cinkujj fehérjével kapcsoljuk össze az ATCUN-motívumot, ami ATCUN-motívumot tartalmazó mesterséges nukleázok fejlesztésére ad lehetőséget. [37]

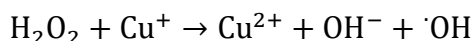
Ahhoz, hogy ATCUN-motívum létrejöhessen, a következő feltételeknek kell teljesülniük: (i) szabad aminos csoport az N-terminális végen, (ii) az N-terminálistól számított harmadik pozícióban hisztidin aminosav és (iii) két közbelső, deprotonálható peptid-nitrogén. [38] Olyan fajok albuminfehérjéiben, melyekben nem található meg az N-terminális végtől harmadik pozícióban hisztidin, nem alakul ki a motívum. Az ATCUN-motívum Cu(II)-t és Ni(II)-t specifikusan köt meg, de alkalmas ligandumok jelenléte mellett a fémionok felszabadulhatnak, ez magyarázza az albuminokban betöltött transzport szerepét. [38]

Az ATCUN-motívum szerkezetét többek között NMR, UV-Vis spektroszkópiás [39] és röntgen kristallográfiás [40] mérések is bizonyították: a Ni(II) és Cu(II) jelenlétében síknégyszetes szerkezetű komplex alakul ki. Az ATCUN-motívum Ni(II) és Cu(II) kötése erőssége nagymértékben függ a pH-tól. A Cu(II)-GlyGlyHis rendszerben először a CuLH komplex jelenik meg pH = 3 körül. [41] Ebben a Cu(II) a hisztidin imidazol oldalláncához koordinálódik. pH = 6 körül már közel teljes egészében a síknégyszetes geometriájú CuLH₂-forma van jelen, amit az erre a komplexre jellemző UV-Vis csúcs intenzitásának pH = 6-nál meglévő maximuma jelöl. A köztes állapotok csak kis százalékban fordulnak elő. Ha a rendszert Ni(II)-vel vizsgáljuk, a NiLH-forma kialakulása pH = 4 körül kezdődik meg, míg a NiLH₂ komplex közel 100 %-ban pH = 8 körül alakul ki. (4. ábra)



4. ábra: **a,** Cu(II) és **b,** Ni(II) GlyGlyHis komplexek eloszlási diagrammja. { $c(\text{Cu(II)}) = 1 \text{ mM}$; $c(\text{Ni(II)}) = 1 \text{ mM}$; $c(\text{GlyGlyHis=L}) = 1 \text{ mM}$ } [41]

Az ATCUN-motívum fémkomplexei redoxi reakciókat képesek katalizálni, amikben reaktív hidroxilgyökök képződnek, melyek bizonyítottan roncsolják a DNS-t. Az aszkorbát-Cu(II) rendszer hatékony gyökképző, nem specifikusan roncsolja a DNS-t. Az aszkorbát-Cu(II) rendszer gyökképzése a következő mechanizmus szerint történik:



A nikkel oxidációs száma ATCUN-motívumhoz kötődve +2 és +3 között változik, a Ni(I) nem kedvezményezett. Aszkorbát jelenlétében nem történik DNS hasítás, azonban oxidálószer hatására már képződhetnek gyökök. Leggyakrabban használt vegyület a kálium-hidrogénperoxo-monoszulfát (KHSO_5), de lejátszódik a gyökképzés -így a hasítás- H_2O_2 jelenlétében is. Az eltérő oxidálószer eltérő sebességű reaktivitást eredményeznek. Az alkalmazott reagens minőségétől függetlenül a reakcióút minden esetben azonos: az oxidálószer hatására a komplexben jelenlévő Ni(III) megköt egy hidroxilgyököt vagy egy oxidiont, ekkor az eredetileg síknégyszetes geometria oktaéderessé alakul. Ezután az aktivált metallopeptid a dezoxiribóz negyedik szénatomjáról egy hidrogént hasít le. A mechanizmus zárásaként két út valósulhat meg. [42]

2.5 ATCUN-motívum kialakítása fehérjékben

A fémionok legnagyobb része elengedhetetlen az emberi szervezet számára, de vannak olyan fémionok, melyeknek eddig csak toxikus hatása ismert (Hg(II)). A nikkel és vegyületei is kifejthetnek toxikus hatást. Az ATCUN-motívum Ni(II)-kötő tulajdonságainak felismerése után több kutatás irányult olyan fehérjékre, melyek tartalmaznak ilyen szekvenciát.

Több peptid vizsgálatával kimutatták továbbá, hogy az Naa-(Ser/Thr)-Xaa-His-Zaa-Baa aminosav-szekvenciát a Ni^{2+} -ion hidrolitikusan képes elhasítani a Naa és Ser/Thr aminosavak között. (Baa bármilyen aminosav, Naa és Xaa prolit kivéve bármilyen aminosav, Zaa cisztein kivételével bármilyen aminosav.) [43] Megállapították, hogy amennyiben a Baa, Xaa és Zaa helyeken hidrofób oldalláncokkal rendelkező aminosavak vannak, azok növelik a reakciósebességet. Ugyanilyen kedvező hatást mutat a hőmérséklet és a pH növelése is. A reakció mechanizmusa ($\text{S}_{\text{N}}2$) a következő: a Ni^{2+} -peptid komplex kialakulása után már $\text{pH} = 4$ körül NiHL összetételű forma jön létre. $\text{pH} = 8$ felett a síknégyszetes NiH_2L komplex a kedvezményezett. A mechanizmus Cu^{2+} -ionokkal is hasonló, de itt a hidrolízishez szükséges komplex már kisebb pH-n kialakul. Az első

lépésben az Naa-(Ser/Thr) peptidkötés nitrogénatomja és a (Ser/Thr) hidroxilcsoportja között N-O acilvándorlás megy végbe. Az instabil észter köztitermék ezután két peptidre esik szét. [44] A kétlépéses reakció sztöchiometrikus, irreverzibilis. Megfelelő aminosav szekvencia megléte esetén a végtermék egy ATCUN-motívumot tartalmazó peptid. Ezt kihasználva a Ser/Thr-Xaa-His szekvenciát specifikus DNS-felismerő fehérjékbe (pl. cinkujj fehérje) mesterséges nukleázok tervezésére és vizsgálatára nyílik út. [45]

3 Célkitűzés

Kutatócsoportunkban az elmúlt években *in-vitro* fehérje-DNS kölcsönhatás vizsgálatot folytattak egy 1MEY-alapú cinkujjakból, melyek egy mesterséges DNS-szakaszt ismertek fel: 5' –GAGGCAGAA–3'. Az 1MEY# cinkujj fehérje N-terminális végén egy ATCUN motívum volt felelős a potenciális nukleáz aktivitásért, és ezzel a fehérjével sikerült detektálni DNS hasítást, de a fehérje szelektivitása és aktivitása nem volt kimagasló.

TDK dolgozatomban célul tűztem ki:

- 1) A korábban vizsgált 1MEY# cinkujj fehérje olyan módosított verzióit állítom elő, amelyekben a DNS-felismerő és a nukleáz domén közti linker szakasz hosszát és összetételét változtatom.
- 2) Az előállított fehérjék elsődleges, másodlagos szerkezetét, illetve a cinkujj alegységek és az ATCUN motívum fémkötésének jellemzését.
- 3) A korábbi 1MEY# fehérjével végzett vizsgálatokat alapul véve alaposabban körbejárom az N-terminális ATCUN-motívumban található Ni^{2+} -ion Cu^{2+} -ionra történő cseréjének lehetőségét, a Cu(II)-komplex stabilitását.
- 4) Megkezdem az előállított fehérjék Ni(II) és Cu(II) komplexének nukleáz aktivitás vizsgálatát. Tanulmányozom, a fehérjék kölcsönhatását DNS-sel, oxidáló/redukálószer jelenlétében is, illetve a reakció pH és az ionerősség függését.

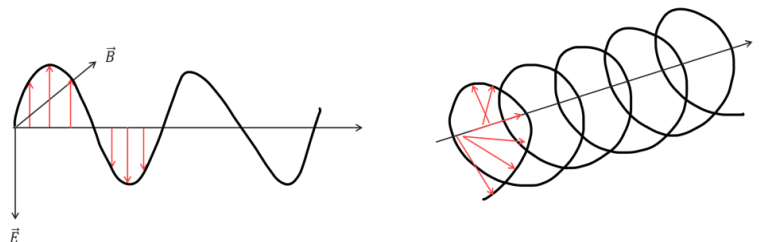
4 Kísérleti anyagok és módszerek

4.1 Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

A fehérjék szinte valamennyi biológia/biokémiai folyamatban kulcsszerepet játszanak. Ezt a sokszínűségüket nagyon változatos térszerkezetük teszi lehetővé. Ahhoz, hogy megértsük az egyes, minőségükben eltérő fehérjék változatos funkcióját, elengedhetetlen a térszerkezetük alapos ismerete. Vizsgálatukra számos fizikai-kémiai módszer használható. Röntgen-diffrakcióval a pontos háromdimenziós szerkezet határozható meg, ehhez azonban szilárd mintára van szükség. NMR-rel ugyan vizsgálhatók oldatban a fehérjék, de a módszer csak viszonylag kis méretű fehérjékre alkalmazható, a mérés pedig nagyon időigényes.

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiával híg oldatokból is könnyen meghatározható a fehérjék szerkezete: távoli UV-tartományban (180-260 nm) történő vizsgálattal a másodlagos szerkezeti elemek (α -hélix, β -szerkezet, rendezetlen szakasz) meglétéről és arányairól, míg közeli UV-tartományban (260-320 nm) a harmadlagos szerkezetről kaphatunk információt.

Két olyan síkban polarizált sugár, amelyek amplitúdója és energiája egyenlő, de polarizációs irányuk egymásra merőleges és fáziskülönbségük 90° , egy cirkulárisan polarizált sugárrá kombinálódik. A síkban polarizált fény is felbontható két azonos intenzitású, ellentétesen cirkulárisan polarizált sugárra. Ha ez a fénysugár optikailag aktív közegen halad át, különböző mértékben nyelődik el a két alkotó. Ekkor az áthaladt fény amplitúdója különbözni fog a belépőtől, ez a cirkuláris dikroizmus jelensége. Az amplitúdók között fellépő különbség elliptikus polarizációhoz vezet, az ellipszis alakját az ellipticitással (θ) jellemezhetjük: $\theta = \arctan b/a$, ahol a az ellipszis nagy, b a kis tengelye. Az elsődlegesen mért érték a balra és jobbra cirkulárisan polarizált fénysugarak abszorbanciájának különbsége: $\Delta A = A_L - A_R$. A két mértékegység közötti átváltás az alábbi összefüggés alapján történik: $\theta = 32,98 \times \Delta A$ [46]



5. ábra: Síkban polarizált (balra) és cirkulárisan polarizált (jobbra) fény.

A mért CD-spektrumokból ellenőrizhetjük a másodlagos szerkezeti elemek meglétét, és számítógépes programokkal meghatározhatjuk azok arányát. Ehhez gyakran át kell váltunk az ellipticitást delta epszilonba ($\Delta\epsilon$). Ez a következő képlet segítségével lehetséges:

$$\Delta\epsilon = \frac{\theta[mfok]}{32982 \cdot \frac{c_{fehérje}[mfok]}{1000000} \cdot n \cdot l[cm]}$$

, ahol n a fehérjét felépítő aminosavak száma, l a kúvetta hossza.

4.2 Fehérjék kifejezése

A fehérjék előállításához a gének már rendelkezésünkre álltak (a kutatócsoportunk tagjai állították elő korábbiakban), „glycerol stock” formájában, ennek köszönhetően a transzformálás lépése kimaradt, egyszerűen a stock kikenése következett petricsészére.

A sejtek szaporítása standard LB-táptalajon történt, melyek 50 µg/ml koncentrációjú kanamycin antibiotikumot tartalmaztak. Ezzel a szelektivitást értük el, ugyanis az általunk sokszorosítani kívánt plazmidok olyan régióval rendelkeznek, amely kódolja az tartalmazott antibiotikum rezisztenciát biztosító fehérjék. Ebben az esetben azok a baktériumok, amelyek ezt nem tartalmazzák, elpusztulnak. Egy éjszakán át, 37°C-on inkubáltuk a sejt kultúrákat, majd egy baktériumtelepet kiválasztva, átoltottuk azt egy 5 mL-es kanamycint tartalmazó LB-táptalajba. 8 órán keresztül, 37°C-on, 150 rpm-en ráztuk (OD₆₀₀ ~1,0 érték eléréséig). Ezt elérve 25-25 µL baktérium tenyészetet átoltottunk 250-250 mL kanamycin tartalmazó friss LB-táptalajba. 32°C-on, 250 rpm-en, egy éjszakán át (16 óra) inkubáltuk (OD₆₀₀ ~2,0 érték eléréséig).

A fehérje túltermelését 200 mg/mL koncentrációjú IPTG hozzáadásával (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid) indukáltuk (1 mM végkoncentráció), 7 óra, 25°C-os inkubálás mellett. Az IPTG allolaktózt utánozó kémiai reagens, amely eltávolítja a represszort a lac operonból, ezáltal indukálva az expressziót. Amennyiben nincs IPTG a táptalajban, a represszor a promóterhez kötődik, és a transzkripció nem indul el. IPTG hozzáadásával az a represszorhoz köt, felszabadítja azt a lac operonból, helyet adva az RNS polimeráz kötődésének. Így lejátszódhat a transzkripció, majd a fehérje termelődés.

4.3 Fehérjék tisztítása

A sejteket 4000×g-n, 4°C-on, 30 perc centrifugálással üleptettük. A 250 mL táptalajból átlagosan ~1,5 g nedves tömegű sejtet nyertünk ki. A sejtek felszuszpendálása 5 mM imidazol, 0,1% Triton X-100 detergens, 500 mM NaCl, 100 mM HEPES (pH = 8,2) tartalmú, ún. 'Binding Buffer'-rel történt. Ehhez még 10 µM végkoncentrációjú Zn(ClO₄)₂

oldatot adtunk annak érdekében, hogy a fehérjék cink-kötő helyei telítődjenek, ezzel megakadályozva a ciszteinek lehetséges oxidációját cisztinné.

A sejtek feltárása szonikálással történt, 50% amplitúdóval, 10×30 másodperc ciklusokban. A teljes sejt kultúra (12,5 mL) 4000×g-n, 4°C-on történő 35 perces centrifugálásával elválasztottuk az oldható fázist a sejt törmeléktől. Ez utóbbi újrassuszpendálása 12,5 mL 'Binding Buffer'-rel történt.

A fehérjét Ni(II)-NTA affinitás gyanta (His-Bind Novagen) segítségével tisztítottuk. 1 órán át 4°C-on történő lassú rotálást 2 perces, 4°C-on történő 3000 rpm-es centrifugálás követett, ezzel választottuk el a gyantát a felülúszótól. A gyantát 3×4 gyantatérfogat 50 mM imidazolt (a nonspecifikusan kötődő fehérjék eltávolítása céljából), 500 mM NaCl-t, 100 mM HEPES-t (pH = 8,2) tartalmazó ún. 'Wash Buffer 1' pufferrel mostuk. 3000 rpm-en, 2 percig, 4°C-on történő centrifugálással választottuk el a gyantát a felülúszótól, majd 3×4 gyantatérfogat 60 mM imidazolt, 150 mM NaCl-t, 100 mM HEPES-t (pH = 8,2) tartalmazó 'Wash Buffer 2' pufferrel mostuk. A gyanta elválasztása a felülúszótól 3000 rpm-en, 2 percig, 4°C-on történő centrifugálással történt.

A desumolizáció a fehérjetisztítás közben valósult meg. A gyantára kötött cinkujj fehérje és a proteáz (ULP1) összekeverésre került, majd egy éjszakán át (~12 óra) 16 °C-on rotáltuk az elegyet 20 µM végkoncentrációjú $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ jelenlétében. A Zn(II) a szabad cinkujj alegységek biztos telítődése miatt volt szükséges, ezzel védve a ciszteineket az esetleges oxidációtól. A hasítás után a szuszpenziót 4× gyantatérfogatra hígítottuk 100 mM pH = 7,4 HEPES pufferrel, ezzel az imidazol koncentrációját 15 mM-ra csökkentettük. Ezután az elegyet 16 °C-on 1 óráig rotáltuk, ezzel biztosítva, hogy a HIS-SUMO-1MEY# hidrolízise során felszabaduló C-terminális holo-1MEY# a felülúszóba kerüljön, míg az N-terminális His-SUMO fragmens, valamint az ULP1 proteáz a gyantához kötődve maradjon.

4.4 Gélelektroforézis

Azt a jelenséget, mikor töltött részecskék (ionok, felületi töltéssel bíró részecskék) elektromos erőter hatására vándorolnak egy olyan közegben, amelyben elválaszthatók egymástól, elektroforézisnek nevezzük. Amennyiben az elválasztó közeg gél (agaróz, poliakrilamid), gélelektroforézisről beszélünk. A módszert makromolekulák, elsősorban fehérje vagy DNS molekulák elválasztására használják. Az elektroforézis során a pozitív töltésű ionok a katód, a negatív töltésűek az anód felé vándorolnak. Vándorlási sebességüket a gél sűrűsége, az alkalmazott feszültség, az elválasztandó makromolekulák

töltéssűrűsége, alakja, mérete befolyásolja. A nagy töltéssűrűséggel rendelkező, kis méretű és gömb alakú (cirkuláris) molekulák vándorolnak leggyorsabban a gélben.

4.4.1 Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz gélelektroforézis a DNS-fragmensek elválasztására, azonosítására és tisztítására legáltalánosabban használt módszer. A technika egyszerű, gyors, kevés mintát igényel. A DNS-molekulák a foszfodiészter csoportjaikon negatív töltést hordoznak, ezért az anód felé vándorolnak. Haladási sebességük fordítottan arányos molekulatömegük tízes alapú logaritmusával.

Szerkezetük alapján a plazmid DNS-ek három formáját különböztetjük meg: a lineáris, a cirkuláris és a szuperhelikális formát. Ez utóbbi egy feltekeredett cirkuláris DNS; a plazmid DNS-ek leggyakrabban ebben a kompakt formában fordulnak elő, a gélben a legkönnyebben képesek haladni. A szuperhelikális forma egyszálú hasítása cirkuláris, kétszálú hasítása lineáris DNS-t eredményez.

A DNS a gélben fluoreszcens jelölő molekulával (etídium-bromid) tehető láthatóvá, amely interkalálódik a kettős hélix szerkezetbe. Ez UV-fény hatására látható fénnel lumineszkál.

Munkánk során 1 m/V %-os agaróz gélét használtunk. A gél készítése a következőképp történt: 1,2 g agarózt oldottunk 70 mL MilliQ-vízben, majd addig melegítettük a keveréket, míg a teljes agaróz mennyiség fel nem oldódott. 50 mL MilliQ-víz hozzáadása után megvártuk, míg az oldat 50 °C alá hűlt. Ezután 2,4 mL 50× TAE puffert (Tris-jégecet-EDTA), végül 120 µL etídium-bromidot adtunk az oldathoz. Formába öntés után a zsebek kialakításához fésűket használtunk; a gél 20 perc után használható volt.

A gélre az 5 µL felvitt DNS minta mellé 1 µL festékkoldatot (6x Loading Dye) adtunk. Ez könnyű mintafelvételt biztosít, valamint a festék segítségével nyomon tudtuk követni az elektroforézis előrehaladását. A mintákkal párhuzamosan markert (ismert méretű DNS-ek elegye) is vittünk fel, melyek segítségével a DNS-ek mérete becsülhető. A futtatásokat horizontális elrendezésű Cleaver Scientific futtatókádban 100 V-on 45 percig végeztük, a DNS sávokat UV átvilágító segítségével tettük láthatóvá.

4.4.2 Poliakrilamid gélelektroforézis

Az akrilamid vizes oldatban, megfelelő iniciátor (ammónium-peroxo-monoszulfát) és katalizátor (N, N, N', N'-tetrametil-etilén-diamin) jelenlétében hajlamos gyökös polimerizációra, a reakció során poliakrilamid keletkezik. A polimerizáció során akrilamid

és bisz-akrilamid 19:1 arányú elegyével dolgoztunk. A bisz-akrilamidra azért volt szükség, mert biztosította a poliakrilamid láncok közötti „hidak” létrejöttét, ezzel a térhálós szerkezet kialakulását. Ez alkalmas fehérjék, valamint kisebb méretű DNS-ek elválasztására. Különbséget teszünk natív poliakrilamid és nátrium-dodecil-szulfátos (SDS) poliakrilamid gélek között.

Amennyiben a fehérjéket natív körülmények között vizsgáljuk, általában az izoelektromos pontnál magasabb pH-n dolgozunk. Ekkor a fehérjék negatív töltésűek, tehát az anód felé vándorolnak. Natív gélben a fehérje előrehaladása az alaktól is függ az oldalláncainak töltése mellett.

Az SDS egy anionos detergens, amellyel a fehérjét kezelve, megfelelő redukálószer jelenléte mellett (β -merkaptoetanol), azok denaturálódnak, azaz szerkezetük felbomlik. Az SDS mintegy kitekeri a fehérjéket, azok egységes „szivar” alakot vesznek fel. Az így kezelt fehérjék relatív töltése közel azonos lesz, ugyanis az aminosavak oldalláncaihoz koordinálódó SDS mennyisége a lánc hosszával, vagyis a fehérjék molekulatömegével lesz arányos. Mivel a szeparálást a relatív töltés, alak és a méret befolyásolja, esetünkben az első kettő minden fehérjénél azonos, végső soron az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis során méret szerinti elválasztás történik. A makromolekulák tömege pedig arányos a méretükkel, tehát a végeredményünk molekulatömeg alapján történő szeparáció.

A vizsgált mintákkal párhuzamosan ismert molekulatömegű fehérjék elegyét (marker) futtatva a gélen, becsülhetjük a vizsgált makromolekuláink tömegét. Kutatásunk során Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker-t használtunk. A gél megfestéssel tettük láthatóvá: erre a célra a Coomassie Brilliant Blue festéket használtuk, ami csak a fehérjéhez kötődik a gélben, így feleslege az ún. „Unstaining Solution”-nel eltávolítható.

4.5 Tömegspektrometria

A tömegspektrometria szerves és szervetlen anyagok minőségi (kvalitatív) és mennyiségi (kvantitatív) elemzésére egyaránt alkalmas. A módszer azon alapszik, hogy a gázállapotú ionizált molekulák és fragmenseik elektromágneses tér hatására m/z (tömeg/töltés) hányadosuk alapján eltérő idő alatt érik el a detektort. Az analitikai eljárások között az egyik legáltalánosabban használható módszer, nagyon jó kimutatási képességekkel bír (10^{-16} g) és specifikus. Alkalmazásának korlátja, hogy csak olyan vegyületek mérhetők vele, amelyek gázhalmazállapotúak vagy a műszerben azzá alakíthatók. Előnye, hogy

elválasztástechnikai módszerekkel kombinálható: gázkromatográfiával (GC-MS), folyadékkromatográfiával (HPLC-MS).

A tömegspektrometriás mérés a következőképpen történik: a vizsgálandó vegyület gázállapotba hozása, majd ionizációja/fragmentációja. A legismertebb ionizáló módszerek közé tartozik az elektronütköztetési ionizáció, a kémiai ionizáció, valamint a kutatásunk során használt elektrospray ionizáció. Következő lépés a keletkezett ionok felgyorsítása elektromos tér segítségével, végül az elektromágneses térben megtörténik a tömeg/töltés szerinti szeparáció. A detektor leggyakrabban elektronsokszorozó. A spektrumokat számítógépes programok segítségével (pl. FreeStyle) értékeljük ki.

Az elektrospray ionizáció (ESI) technika az elmúlt évtizedekben terjedt el. Az ionizáció ezen formáját -lévén, hogy lágyionizációs technikáról van szó- főként érzékeny szerves makromolekulák ionizációjára használják. A vizsgálandó vegyületet illékony oldószerben oldják, majd ezt a mintaoldatot nagyfeszültségű kapillárison keresztül juttatják a légterbe. Az elektrosztatikus tér hatására töltéstöbblet keletkezik a kapilláris végén lévő folyadék felszínén, így az kúpszerűen kicsúcsosodik, majd erről a csúcsról töltéssel rendelkező folyadékcseppek szakadnak le.

Méréseink során egy Orbitrap EliteTM (Thermo Scientific) Hybrid Ion Trap-Orbitrap Tömegspektrométert használtunk, TriVersa NanoMate (Advion) chip-alapú elektrospray ionforrással (ESI) pozitív módban mérve MH^+ részecskéket detektálva. A fragmentációs (MS-MS) méréseket ütközés indukált disszociációs technikával (CID) valósítottuk meg.

4.6 Ultraszűrés

Az ultraszűrés a membránszeparáció egy változata, melyben az elválasztás (esetenként tisztítás) egy féligáteresztő membrán segítségével történik. A szilárd és a nagy molekulatömegű anyagok a felülúszóban maradnak vissza, míg a kis molekulatömegű oldott anyagok áthaladnak a membránon és a szűrletben telítődnek. Az eljárást az iparban és kutatásban használják makromolekulás oldatok (10^3 - 10^6 Da), főként fehérjeoldatok tisztítására.

Munkánk során 0,5 ml-es 3K Amicon ultraszűrőket használtunk, melyek 3 kDa-nál nagyobb fehérjék visszatartására alkalmasak. Használat előtt kétszer a puffercsere során alkalmazott pufferrel (általában 10 mM HEPES, pH = 7,4) mostuk a szűrőket, ugyanis glicerinnel vannak átitatva a tartósításuk érdekében. A puffercsere művelete a következőképpen zajlott: a szűréshez használt csöveket egyensúlyoztuk (eltérés maximum $\pm 20 \mu\text{L}$) a puffer segítségével, majd 5 percen keresztül 15 °C-on, 14000 g-n centrifugáltuk,

majd az új pufferrel újra feltöltöttük. Az átfolyó leöntése után a műveletet mindaddig ismételtük, amíg a puffercsere meg nem történt és a kívánt koncentrációt el nem értük. A minta kinyeréséhez a szűrőt fejjel lefelé egy tiszta Eppendorf-csőbe helyeztük és 1000 g-n centrifugáltuk.

5 Eredmények

5.1 1MEY# cinkujj fehérje mutánsok

Az 1MEY# cinkujj fehérjében 15 aminosav hosszúságú peptidszekvencia („linker”) kapcsolja össze az N-terminális ATCUN motívumot és az első cinkujj motívumot. Mivel felmerült az igény, hogy tanulmányozzuk a „linker” fehérje-DNS kölcsönhatásokra gyakorolt szerepét, kutatócsoportunk több módosított cinkujj fehérje génjét tervezte meg (2. táblázat). Az egyes verziók a linker hosszában és a pozitív oldalláncot tartalmazó aminosavak számában térnek el. A dolgozatban a továbbiakban az eredeti 1MEY# cinkujj fehérjét 1MEY#.1-nek jelölöm.

2. Táblázat: A kutatócsoportunk által megtervezett 1MEY# mutánsok aminosavszekvenciája. A linker szakaszt aláhúzás jelöli. Pozitív töltésű oldallánccal rendelkező aminosavakat pirossal, a negatívakat kékkel jelöltük. A Zn(II)-hez koordinálódó ciszteinek sárga, a hisztidinek világoskék hátterűek. AA: Fehérjéket alkotó aminosavak száma

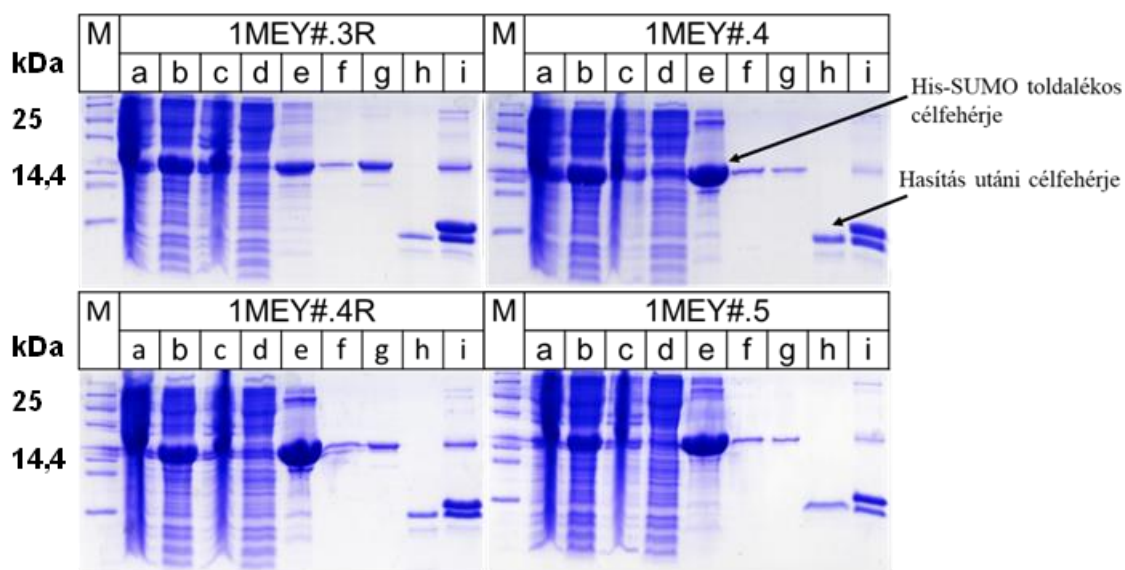
	AA	Szekvencia
1MEY#.1	101	<u>SGHIEGRHMLEPGEKPYKCPECGK</u> SFSQSSNLQKHQRTHTGEKPYK...QRTHTGKKTS
1MEY#.2	96	<u>SGHILEPGEKPYKCPECGK</u> SFSQSSNLQKHQRTHTGEKPYK...QRTHTGKKTS
1MEY#.2R	96	<u>SRHILEPGEKPYKCPECGK</u> SFSQSSNLQKHQRTHTGEKPYK...QRTHTGKKTS
1MEY#.2RK	96	<u>SRHILKPEGEKPYKCPECGK</u> SFSQSSNLQKHQRTHTGEKPYK...QRTHTGKKTS
1MEY#.3	90	<u>SGHKPYKCPECGK</u> SFSQSSNLQKHQRTHTGEKPYK...QRTHTGKKTS
1MEY#.3R	90	<u>SRHKPYKCPECGK</u> SFSQSSNLQKHQRTHTGEKPYK...QRTHTGKKTS
1MEY#.4	91	<u>SGHKKPYKCPECGK</u> SFSQSSNLQKHQRTHTGEKPYK...QRTHTGKKTS
1MEY#.4R	91	<u>SRHKKPYKCPECGK</u> SFSQSSNLQKHQRTHTGEKPYK...QRTHTGKKTS
1MEY#.5	91	<u>SGHEKPYKCPECGK</u> SFSQSSNLQKHQRTHTGEKPYK...QRTHTGKKTS
1MEY#.5R	91	<u>SRHEKPYKCPECGK</u> SFSQSSNLQKHQRTHTGEKPYK...QRTHTGKKTS
1MEY#.6E	92	<u>SGHGEKPYKCPECGK</u> SFSQSSNLQKHQRTHTGEKPYK...QRTHTGKKTS

5.2 Fehérjék tisztítása

A fehérjék előállítása során a korábbi 1MEY#.1 fehérjére alkalmazott eljárások szerint jártunk el. Részletesen csak a 2. táblázatban szereplő fehérjék közül az 1MEY#.3R, 1MEY#.4, 1MEY#.4R 1MEY#.5 előállítását mutatom be BL21, – fehérjekifejezésre optimalizált – *E.coli* baktériumsejteket felhasználva. A gének pETM11 bakteriális hordozókban voltak, ami lehetőséget biztosított arra, hogy IPTG segítségével túltermeltethető legyen a fehérje (lásd kísérleti módszerek 4.2. fejezete). A túltermelés jól látható a 6. ábrán, ahol a fehérjetisztítás egyes részlépéseiből vett minták fehérjetartalmát poliakrilamid gélelektroforézis segítségével méret szerint szeparáltuk. A baktériumok feltárását („lízis”) követően a sejttörmelék rengeteg fehérjét tartalmazott, továbbá számos

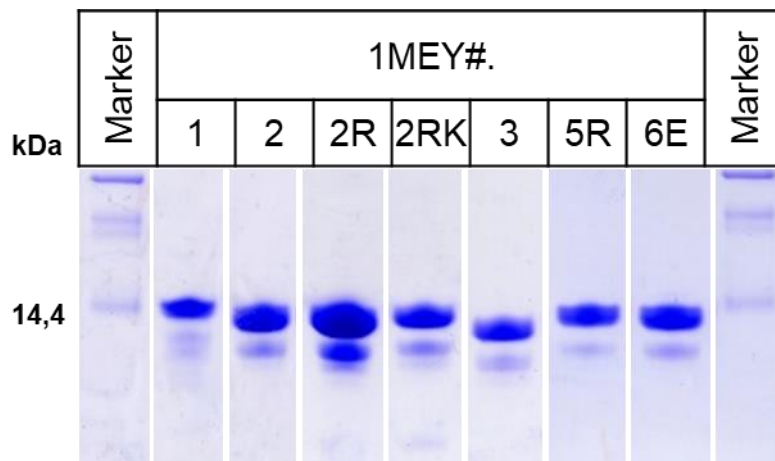
oldhatatlan komponenst, aminek következtében elmosódások is láthatók (6. ábra a.). A minták lecentrifugálása után vett „oldható fehérjefrakciókban” már jól megfigyelhető a baktériumban megtalálható számos fehérje sávja mellett, jóval nagyobb intenzitással a célfehérjénk (6. ábra b,) azonban nem a cinkujj fehérjének megfelelő ~ 10 kDa-os tömegtartományban. Erre az a magyarázat, hogy a célfehérjék nem önmagukban fejeződtek ki, a gének kialakításának köszönhetően a fehérjék N-terminális végeihez egy hexahisztidin és egy SUMO toldalék is kapcsolódott. Az egymás mellett elhelyezkedő hisztidinek révén lehetőség volt a fehérjék Ni(II)-affinitás tisztítására. Az agaróz-gyantán immobilizált nitrilotriacetát (NTA) ligandumok a Ni(II) koordinációs szféráját nem telítik teljes mértékben, a szabad helyekre a fehérjéhez kapcsolt hexahisztidin toldalék képes koordinálódni, így a célfehérjék a gyantára kötve elválaszthatók a sejt többi komponensétől. Ez a jelenség is jól látható a tisztításokhoz tartozó gélképeken, ahol a gyantára kötést követően a felülúszóból vett frakcióból eltűntek a célfehérjékhez tartozó sávok (6. ábra d), míg a Ni(II)-NTA gyantából vett mintában egy nagy intenzitású sáv figyelhető meg a célfehérje mérettartományában (6. ábra e). Habár jóval kisebb intenzitással, de további sávok is megfigyelhetők a gyanta frakciójában. Ennek az a magyarázata, hogy a baktérium eredeti fehérjei is tartalmaznak hisztidineket, ezek szintén képesek koordinálódni változó mértékben a Ni(II)-NTA gyantához. Annak érdekében, hogy ezektől a fehérjéktől is szeparáljuk a célfehérjénket, kihasználhatjuk a keláteffektust. [47] Mivel az affinitástoldalékunkban egymás mellett található több hisztidin, ezek többfogú ligandumokként nagyobb stabilitású komplexeket képeznek a gyantához kötött Ni(II)-vel, mint a sejt egyéb fehérjei, amelyekben statisztikusan nagyon kicsi a valószínűsége, hogy egymás mellett több hisztidin helyezkedjen el a fehérje felszínén. A megfelelő mosási lépést követően látható, (6. ábra f, g) hogy minden fehérjefrakciót eltávolítottunk, amely nem a mi célfehérjénk. Az ULP1 proteázzal történő hasítás után a felülúszót mintavételezve már csak a célfehérjénk sávja jelent meg a gélen (6. ábra h). Látható, hogy a gyantán is maradt a célfehérjéből (6. ábra i), de ezen kísérletünk célja a tiszta, szennyeződésmentes fehérje előállítása volt. Továbbá láthatók kis intenzitású sávok is, melyek a hasítás során keletkeztek, és szintén megtalálható a gélen a lehasított His-SUMO toldalék is valamint az ULP1 proteáz, mindkettő a gyantához kötődve.

Ezt követően a mintákon 100 mM HEPES-sel (pH = 7,4) puffercserét hajtottunk végre, míg az imidazol-koncentráció ~ 1 μ M alá nem csökkent (kísérleti módszerek 4.6. fejezete).



6. ábra: 1MEY# mutánsok tisztításának vizsgálata 16,5 % (m/v) Tricin-SDS-Poliakrilamid gélen. a: teljes fehérjefrakció; b: oldható fehérjefrakció; c: oldhatatlan fehérjefrakció; d: felülúszó a Ni(II)-NTA gyantához való kötődés után; e: gyanta fehérjekötés után; f: felülúszó 1. mosási lépést követően; g: felülúszó 4. mosási lépést követően ; h: felülúszó ULP1-gyel történő hasítás után; i: gyanta ULP1-gyel történő hasítás után; Marker: 5 μ l Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker

Az 1MEY#.3R, 4, 4R és 5 fehérjék mellett az 1MEY#.2, 2R, 2RK, 3, 5R és 6E verziók előállítás is sikeres volt a Tricin-SDS-Poliakrilamid gélek alapján (7. ábra).

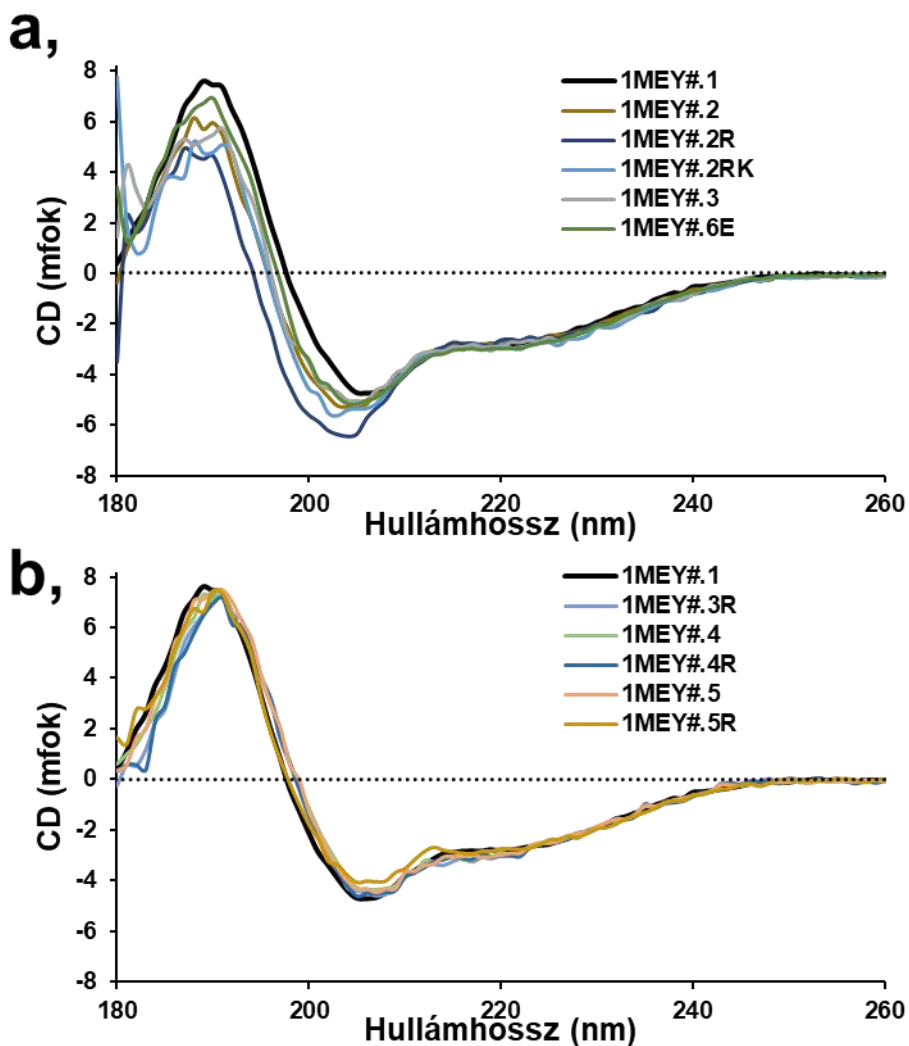


7. ábra: További 1MEY# mutánsok tisztítását követően 16,5 % (m/v) Tricin-SDS-Poliakrilamid gélen. Marker: 5 μ l Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker

5.3 Fehérjék vizsgálata

5.3.1 Fehérjék másodlagos szerkezetének vizsgálata

Miután az előző alfejezetben igazoltuk, hogy SDS-PAGE alapján sikerült előállítani és kitisztítani az 1MEY#.1 cinkujj fehérje módosított verzióit, megvizsgáltuk ezek másodlagos szerkezetét CD-spektroszkópiával.



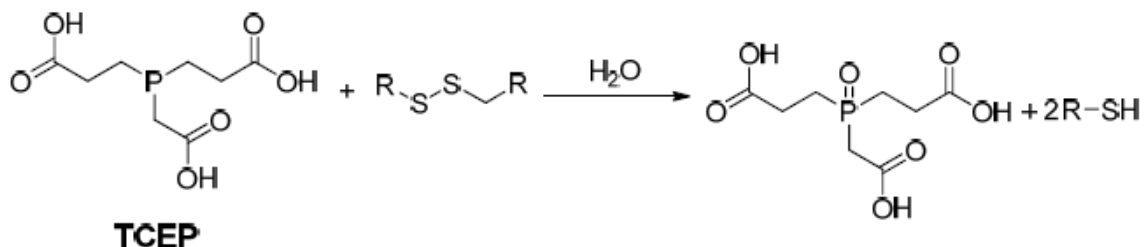
8. ábra: Módosított 1MEY# fehérjék CD-spektrumai előállítást követően összehasonlítva az eredeti 1MEY#.1 cinkujj fehérje CD spektrumával. **a**, feltehetően oxidálódott fehérjék; **b**, ép szerkezetű fehérjék CD spektrumai. A mérések 18,8 μ M fehérjekoncentrációra normáltak $l = 0,02$ cm (10 mM HEPES pH = 7,4).

Az 1MEY#.1 fehérje spektrumának X-tengelymetszete 197-198 nm-nél van, ami kutatócsoportunk előzetes ismeretei alapján ép szerkezetű fehérjére utal. A 2, 2R, 2RK, 3, valamint 6E mutánsok X-tengelymetszete 195-196 nm-nél látható, alakjuk jelentősen eltér 210 nm-alatt a referencia 1MEY#.1 fehérje CD spektrumától (8. ábra a.). Ez a fehérjék szerkezetének nem teljes épségére utalhat, feltehetően néhány cisztein cisztinné való

oxidálását jelzi a tisztítás során. A 3R, 4, 4R, 5, 5R verziók X-tengelymetszete 198 nm-nél magasabb hullámhossztartományba tolódott el, míg a CD spektrum alakja hasonló a kiindulási 1MEY#.1 fehérjéhez (8. ábra b.). Ez az eltérés már jobban magyarázható, mivel a mutánsok kialakításakor az N-terminális végen elhelyezkedő rendezetlen szerkezetű linker szakasz hosszát rövidítettük, ezzel pedig százalékosan növeltük a cinkujj fehérje rendezett részeinek arányát. A C2H2 típusú cinkujj fehérjékre β -redő és α -hélix másodlagos szerkezeti elemek jellemzőek, amelyek X-tengelymetszete a szakirodalmi adatok alapján 210 és 200 nm környékén található, míg a rendezetlen szerkezeti elemek ~ 210 nm alatt a negatív tartomány felé tolják a jelintenzitást [48].

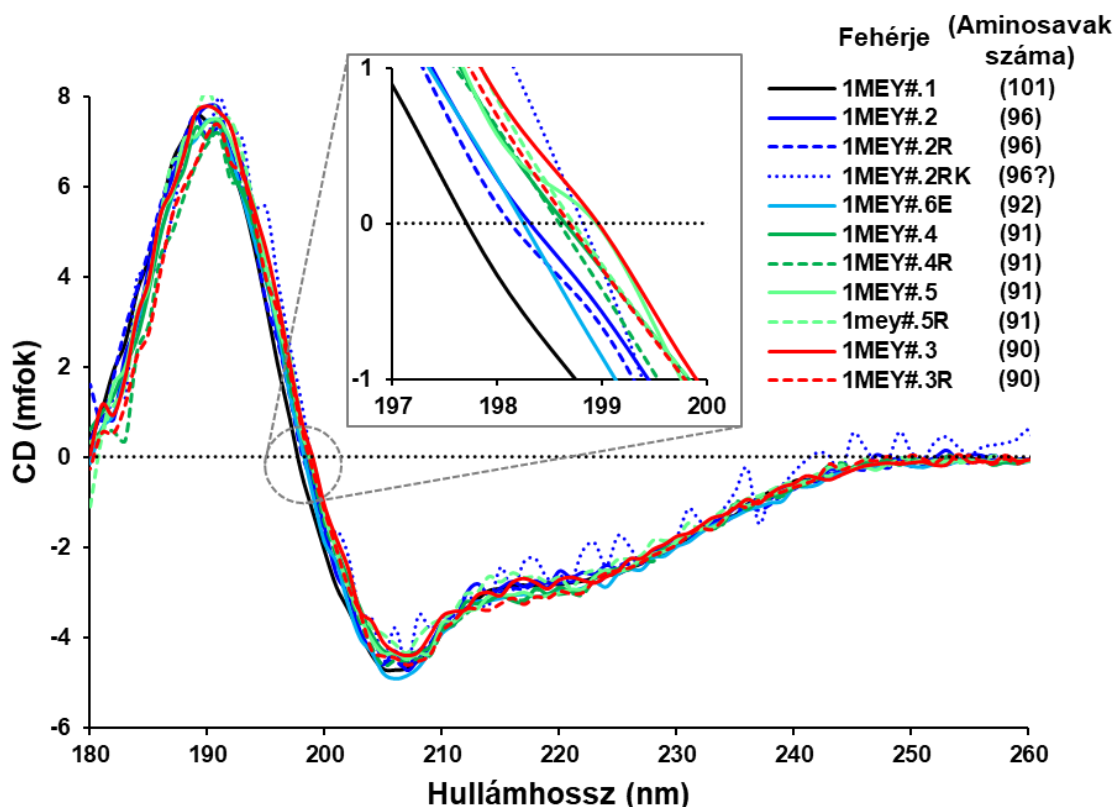
5.3.2 Fehérjék szerkezetének helyreállítása

Azoknak a mutánsoknak (2, 2R, 2RK, 3, 6E) a szerkezetét, amelyek CD-spektruma alapján cisztein $\rightarrow$ cisztin oxidációt feltételeztünk, helyre kellett állítanunk a további kísérletekhez. Ezt TCEP (tris(2-karboxietil)foszfin) redukálószerrel végeztük el (9. ábra). A TCEP-t fehérjékben, peptidekben lévő diszulfidkötések redukciójára használják. Előnye, hogy széles pH-tartományban alkalmazható, stabil, nem illékony, valamint egyéb funkciós csoportokkal nem reagál [49].



9. ábra: A TCEP-vel történő redukció reakcióegyenlete. ~ 120 μ L fehérjemintákat 900 μ M végkoncentrációjú TCEP-vel kezeltünk 1,5 órán át szobahőmérsékleten 100 μ M Zn(II) jelenlétében 10 mM HEPES pH = 7.4 pufferben.

A fehérjemintákat 100 μ M extra Zn(II) jelenlétében kezeltük 900 μ M TCEP-vel, hogy telítsük a redukálódott ciszteineket Zn(II)-vel és a diszulfid hidak ne alakulhassanak ki újból. A mintákat 1,5 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten annak érdekében, hogy a redukció biztosan végbemenjen. Ezt követően ultraszűrés során (kísérleti módszerek 4.6. fejezet alapján) a TCEP koncentrációt ~ 2 μ M alá csökkentettük 10 mM HEPES-sel (pH = 7,4). Erre azért volt szükség, mert mind a CD-mérésnél, mind a tömegspektrometriás analízisnél a TCEP túl nagy intenzitással jelent volna meg, így zavarta volna a méréseket.



10. ábra: Redukált és Zn(II)-vel telített 1MEY# cinkujj fehérje verziók CD-spektrumai. A kinagyított részlet az egyes fehérjespektrumok X-tengelymetszetét mutatja. Az ábrafeliratok mögött az egyes fehérjék aminosavszekvenciájának hossza zárójelben található. A spektrumokat 18,8 μM fehérjekoncentrációra normáltuk $l = 0,02$ cm (10 mM HEPES pH = 7,4).

Ahogy a 10. ábrán látható, a fehérjék szerkezetét sikerült helyreállítani a redukálással. A spektrumok alakja nagymértékben hasonlít az eredeti 1MEY#.1 fehérje CD spektrumához. A 197-201 nm hullámhossztartományt kinagyítva az X-tengelymetszet mindegyik esetben a nagyobb hullámhosszak felé tolódott el a várakozásoknak megfelelően. Habár a spektrumok zajszintje attól függően változik, hogy az intenzitás normálást megelőzően mekkora volt a fehérjék koncentrációja, mégis megfigyelhető egy tendencia, hogy minél rövidebb egy fehérje, és ezzel együtt az N-terminális végen elhelyezkedő rendezetlen szerkezetű szakasz, annál nagyobb hullámhosszaknál van az X-tengelymetszet. A tendenciától csupán az 1MEY#.2RK fehérje tér el, ám amint az ábrán is látható ez a spektrum kifejezetten zajos.

5.3.3 Másodlagos szerkezeti elemek arányának vizsgálata

A CD-spektrumok alapján megkíséreltük megbecsülni a fehérjék másodlagos szerkezeti elemeinek összetételét. A spektrumok kiértékeléséhez a BeStSel (Beta Structure

Selection) programot használtuk, amely a másodlagos szerkezeti elemek százalékos arányát adja meg a fehérjékben. A spektrumok szoftveres kiértékeléséből nem sikerült egyértelműen megállapítani, hogy lenne összefüggés a fehérjék hossza és azok rendezettsége között (3. táblázat). Habár a program alapján a fehérjék szerkezeti összetétele hasonló (ami elvárható), azonban csak a másodlagos szerkezeti elemek 50-56%-át képes egyértelműen hozzárendelni α -hélixekhez, β -redőkhöz, illetve β -kanyarokhoz.

3. táblázat: Cinkujj-fehérje mutánsok másodlagos szerkezeti elemeinek százalékos összetétele BeStSel programban szimulálva a CD spektrumok 185-250 nm-es tartományait felhasználva [50].

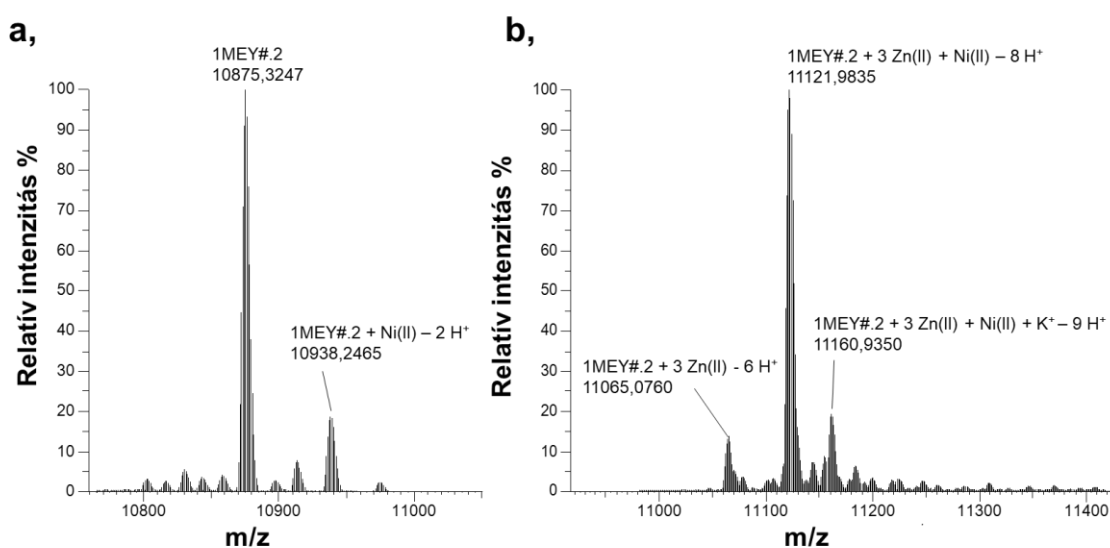
	Aminosavak száma	α -hélix	β -redő	β -kanyar	Egyéb
1MEY#.1	101	15%	26%	15%	44%
1MEY#.2	96	14%	25%	15%	46%
1MEY#.2R	96	13%	26%	16%	45%
1MEY#.2RK	96	17%	25%	13%	45%
1MEY#.3	90	16%	24%	14%	45%
1MEY#.3R	90	14%	22%	15%	50%
1MEY#.4	91	13%	25%	15%	47%
1MEY#.4R	91	15%	20%	16%	49%
1MEY#.5	91	14%	25%	14%	46%
1MEY#.5R	91	16%	26%	14%	44%
1MEY#.6E	92	14%	20%	18%	49%

5.3.4 Tömegspektrometriás mérések eredményei

A CD-ben követett másodlagos szerkezeti vizsgálatok alapján a fehérjékben található ciszteinek redukált formában vannak és Zn(II)-t kötnek. Ám erről egyéb módszerrel is meg akartunk bizonyosodni, így ESI-MS méréseket hajtottunk végre. Egy MS vizsgálattal emellett információt nyerhetünk a fehérjeszekvencia épségéről, amennyiben vannak fragmentumok, azok milyen arányban vannak jelen az ép fehérjéhez viszonyítva. A fehérje fémjelítettségét is igazolhatjuk, továbbá azt, hogy valóban a megtervezett fehérjeszekvenciát sikerült-e előállítanunk.

Mivel az MS méréseket zavarja a nagy sókoncentráció, így első lépésben 50 mM NH_4HCO_3 pH = 7,8 pufferre cseréltük a korábbi 10 mM pH = 7,4 Hepest ultraszűrés segítségével (kísérleti módszer 4. 6.fejezet) A fehérjeminták mindegyikét kétféleképpen vizsgáltuk a tömegspektrometriás módszerrel: első lépésben a mintákat 0,1 %-os hangyasav-oldattal kezeltük, ezzel a cinkujj-alegységekben kötött Zn^{2+} -ionok eltávolítása volt a cél. Így ellenőriztük a fehérjeszekvencia épségét. A másik mérés során a mintákat sav hozzáadása nélkül vizsgáltuk. Ebben az esetben a Zn^{2+} - és Ni^{2+} -fémionok a fehérjéhez koordinálódva maradnak. A 11. ábra az 1MEY#.2 fehérje fémmentes és fémkötött formájának

dekonvolúció után nyert tömegspektrumát mutatja be. Amint az látható, a fehérjéhez rendelhető legintenzívebb csúcs ~7,8-as pH-n a három Zn(II)-t és egy Ni(II)-t kötő forma, emellett detektálható ~20%-os intenzitással egy K^+ -addukt is, illetve 10-15%-ban Ni(II)-mentes forma. Így egy esetleges nukleáz aktivitás vizsgálatot megelőzően a fehérjét extra Ni(II) hozzáadásával telíteni kell (11. ábra b.). A mintában savas körülmények között a fémeket nem tartalmazó 1MEY#.2 fehérje csúcsa van jelen a legnagyobb intenzitással, amely mellett megfigyelhető kis intenzitással csak Ni(II)-kötött forma is (11. ábra a.). Azt, hogy a Ni(II)-t nehéz eltávolítani az ATCUN motívumból kutatócsoportunk tagjai már korábban is megfigyeltek az eredeti 1MEY#.1 fehérjét tanulmányozva, mivel a Ni(II)-ATCUN komplex nagy termodinamikai stabilitása mellett kinetikailag is inert [51].



11. ábra: a, apo-1MEY#.2; b, holo-1MEY#.2 fehérje ESI-MS-ben vizsgálva. $c(1MEY\#.2) = 2 \mu M$; 8,2 mM ABC (pH = 7,8). A tömegspektrumok dekonvolált MH^+ értékek. A dekonvolúciót a FreeStyle 1.6 (Thermo Scientific) programban hajtottuk végre.

A további fehérjék tömegspektrumait nem tüntettük fel külön, csupán a fő detektált csúcsokat gyűjtöttük ki (4. táblázat) Savas kezeléssel minden esetben sikerült eltávolítani a kötött Zn^{2+} -ionokat. A maximum eltérések a szimulált és mért átlagos tömegek között (2 fehérje kivételével) 2 Da alatt mozognak. Az 1-2 Da eltérések a fehérjetömegekben a ciszteinek oxidációjára utalhatnak, ennek azonban ellentmond, hogy a savval nem kezelt fehérjék esetén szinte kivétel nélkül tökéletes egyezést tapasztaltunk a mért és szimulált tömegek közt, megfelelő mennyiségben kötöttek Zn(II)-t is. Ebből adódóan feltételezhetjük, hogy a fehérjeminták épek, de mivel egyszerre történt az összes fehérjeminta savas kezelése mérést megelőzően, így a később sorra kerülő fehérjékben már megindulhatott a részleges

cisztein oxidáció savas közegben. Ettől függetlenül, ahol a fém-et-kötő forma tömege jónak bizonyult azt a mintát elfogadtuk helyes szekvenciájú, redukált ciszteinek tartalmazó fehérjének tekintettük.

4. táblázat Tömegspektrometriás mérési eredmények összefoglalása (A: szimulált legintenzívebb MH⁺ csúchhoz rendelhető tömeg (Da); B: mért legintenzívebb MH⁺ csúchhoz rendelhető tömeg (Da)) Zöld háttér: 0,5 Da-nál; sötétzöld háttér: 1 Da-nál; narancssárga háttér: 2 Da-nál kisebb eltérés a mért és szimulált tömeg között. Piros háttér 2 Da-nál nagyobb eltérés van a mért és szimulált tömeg között. A szimulációt a FreeStyle 1.6 (Thermo Scientific) program segítségével hajtottuk végre.

	Apo fehérje forma			3 Zn(II)-es forma			3 Zn(II) 1 Ni(II)-es forma		
	összegképlet	A	B	összegképlet	A	B	összegképlet	A	B
1MEY#.1	C ₄₈₅ H ₇₆₇ N ₁₅₇ O ₁₅₄ S ₇	11486,53	11486,57	C ₄₈₅ H ₇₆₁ N ₁₅₇ O ₁₅₄ S ₇ Zn ₃	11676,26	11676,35	C ₄₈₅ H ₇₅₉ N ₁₅₇ O ₁₅₄ S ₇ Zn ₃ Ni ₁	11733,18	11733,27
1MEY#.2	C ₄₆₁ H ₇₂₉ N ₁₄₇ O ₁₄₇ S ₆	10875,26	10875,32	C ₄₆₁ H ₇₂₃ N ₁₄₇ O ₁₄₇ S ₆ Zn ₃	11065,00	11065,08	C ₄₆₁ H ₇₂₁ N ₁₄₇ O ₁₄₇ S ₆ Zn ₃ Ni ₁	11122,92	11121,98
1MEY#.2R	C ₄₆₅ H ₇₃₈ N ₁₅₀ O ₁₄₇ S ₆	10974,34	10974,41	C ₄₆₅ H ₇₃₂ N ₁₅₀ O ₁₄₇ S ₆ Zn ₃	11165,08	11165,15	C ₄₆₅ H ₇₃₀ N ₁₅₀ O ₁₄₇ S ₆ Zn ₃ Ni ₁	11222,00	11222,04
1MEY#.2RK	C ₄₆₆ H ₇₄₃ N ₁₅₁ O ₁₄₅ S ₆	10973,40	10970,41	C ₄₆₆ H ₇₃₇ N ₁₅₁ O ₁₄₅ S ₆ Zn ₃	11164,13	---	C ₄₆₆ H ₇₃₅ N ₁₅₁ O ₁₄₅ S ₆ Zn ₃ Ni ₁	11220,05	11218,12
1MEY#.3	C ₄₃₂ H ₆₈₃ N ₁₄₁ O ₁₃₇ S ₆	10236,94	10235,99	C ₄₃₂ H ₆₇₇ N ₁₄₁ O ₁₃₇ S ₆ Zn ₃	11426,67	11425,75	C ₄₃₂ H ₆₇₅ N ₁₄₁ O ₁₃₇ S ₆ Zn ₃ Ni ₁	10483,59	10483,66
1MEY#.3R	C ₄₃₆ H ₆₉₂ N ₁₄₄ O ₁₃₇ S ₆	10336,01	10336,05	C ₄₃₆ H ₆₈₆ N ₁₄₄ O ₁₃₇ S ₆ Zn ₃	10525,75	10525,82	C ₄₃₆ H ₆₈₄ N ₁₄₄ O ₁₃₇ S ₆ Zn ₃ Ni ₁	10582,67	10582,72
1MEY#.4	C ₄₃₈ H ₆₉₅ N ₁₄₃ O ₁₃₈ S ₆	10365,03	10359,07	C ₄₃₈ H ₆₈₉ N ₁₄₃ O ₁₃₈ S ₆ Zn ₃	10554,77	nem detektált	C ₄₃₈ H ₆₈₇ N ₁₄₃ O ₁₃₈ S ₆ Zn ₃ Ni ₁	10611,68	10611,74
1MEY#.4R	C ₄₄₂ H ₇₀₄ N ₁₄₆ O ₁₃₈ S ₆	10464,11	10463,19	C ₄₄₂ H ₆₉₈ N ₁₄₆ O ₁₃₈ S ₆ Zn ₃	10653,85	nem detektált	C ₄₄₂ H ₆₉₆ N ₁₄₆ O ₁₃₈ S ₆ Zn ₃ Ni ₁	10710,76	10710,83
1MEY#.5	C ₄₃₇ H ₆₉₀ N ₁₄₂ O ₁₄₀ S ₆	10365,98	10364,01	C ₄₃₇ H ₆₈₄ N ₁₄₂ O ₁₄₀ S ₆ Zn ₃	10555,71	nem detektált	C ₄₃₇ H ₆₈₂ N ₁₄₂ O ₁₄₀ S ₆ Zn ₃ Ni ₁	10612,63	10612,68
1MEY#.5R	C ₄₄₁ H ₆₉₉ N ₁₄₅ O ₁₄₀ S ₆	10465,06	10463,10	C ₄₄₁ H ₆₉₃ N ₁₄₅ O ₁₄₀ S ₆ Zn ₃	10654,79	10654,88	C ₄₄₁ H ₆₉₁ N ₁₄₅ O ₁₄₀ S ₆ Zn ₃ Ni ₁	10711,71	10711,79
1MEY#.6E	C ₄₃₉ H ₆₉₃ N ₁₄₃ O ₁₄₁ S ₆	10423,00	10422,02	C ₄₃₉ H ₆₈₇ N ₁₄₃ O ₁₄₁ S ₆ Zn ₃	10612,73	10612,81	C ₄₃₉ H ₆₈₅ N ₁₄₃ O ₁₄₁ S ₆ Zn ₃ Ni ₁	10669,65	10669,72

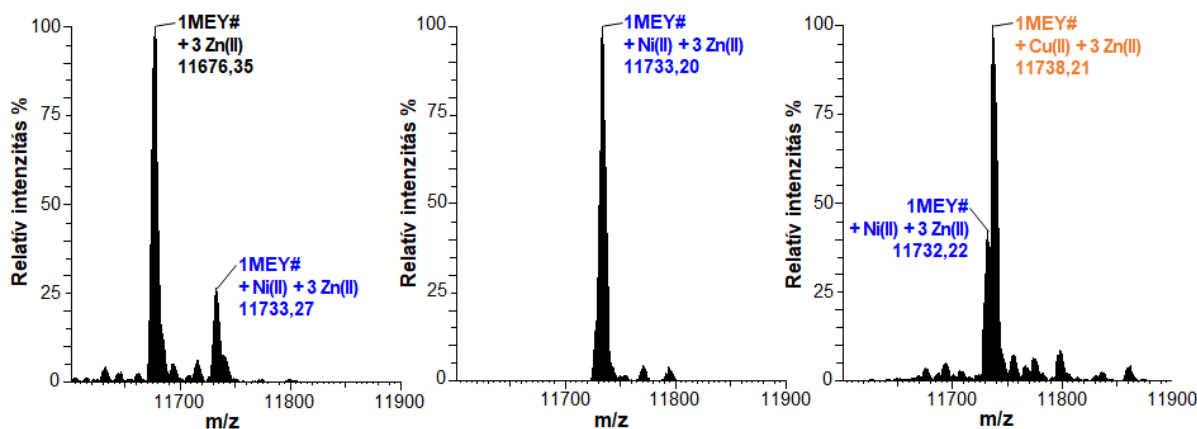
A legtöbb fehérje ATCUN-motívuma Ni(II)-vel volt telítve. Két fehérje-mutáns, az 1MEY#.2R és 1MEY#.3R esetében azt tapasztaltuk, hogy jól detektálható Ni(II)-mentes fehérjecsúcs jelent meg, így ezeknél a fehérjéknél további Ni(II) szükséges a teljes telítéshez.

Az 1MEY#.2RK verzió esetében az apo (fémmentes) és fém-et kötő formában is 2 Da-nál nagyobb eltérés mutatott a mért és szimulált tömegek között. Itt az értékelést bonyolítja, hogy a fémkötő formában több csúcs is található egymástól 6 Da távolságra (11224,11 Da és 11218,12 Da). Ezt nem lehet a ciszteinek oxidációjával magyarázni. Amennyiben egy cisztin alakul ki a fémeket is kötő formában, detektálnunk kellett volna csak 2 Zn(II)-t kötő formát, ehelyett azonban a holo 1MEY#.2RK fehérje tömege úgy tért el szisztematikusan hogy három Zn(II) és egy Ni(II) is kötve volt.

5.4 Ni(II)-Cu(II)-csere az ATCUN-motívumban

A DNS-hasítási kísérletekhez meg kellett vizsgálnunk, hogy a fehérje képes-e stabil komplex kialakítására úgy, hogy az ATCUN-motívum Ni^{2+} -ionját Cu^{2+} -ionra cseréljük miközben a cinkujj alegységek sértetlenek maradnak és továbbra is Zn(II) -t kötnek meg. Ehhez először meg kellett győződnünk, hogy a komplex egyáltalán ki tud-e alakulni.

Először az 1MEY#.1 fehérje ATCUN-motívumából $100 \times$ EDTA felesleggel (1 mM végkoncentráció) távolítottuk el a Ni^{2+} -iont. Mivel ezzel együtt a fehérje Zn^{2+} -ionjai is EDTA-komplexbbe kerültek, így a kezelés során 100 μM TCEP redukálószer is jelen volt, hogy a szabad ciszteineket megvédjük az esetleges oxidációtól [52]. A fehérjét 10 mM, pH = 8,2 HEPES-pufferben 210 percig 50 °C-on inkubáltuk. A hosszú inkubációs időt az tette szükségessé, hogy az ATCUN motívumban kötött Ni(II) nagy stabilitása mellett kinetikailag is inert, amint azt az előző alfejezetben már láthattuk. Ezt követően ultraszűrőssel az EDTA koncentrációját 1 μM -ra csökkentettük 10 mM HEPES puffer (pH = 7,4) segítségével, miközben folyamatosan Zn^{2+} -ionokkal telítettük a fehérjék Zn(II) -kötőhelyeit. Ennek eredményeként a puffercsere végére Zn(II) -telített és majdnem Ni(II)-mentes fehérjéket kaptunk.



13. ábra: a) EDTA-val kezelt, majd Zn(II) -vel telített 1MEY#.1 fehérje- b) Ni^{2+} -ionnal telített 1MEY#.1 fehérje- c) Cu^{2+} -ionnal telített 1MEY#.1 fehérje tömegspektrumai

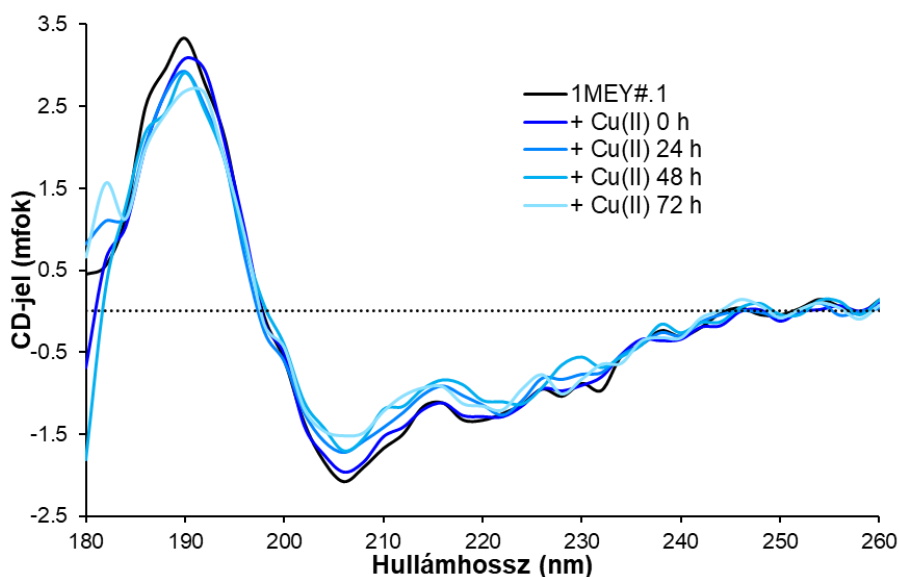
A 13. ábra alapján megállapítható, hogy az EDTA-val kezelt fehérjéből nem teljesen sikerült eltávolítani a Ni(II)-t a kezelés végére (a)). Jól látható egy viszonylag nagy intenzitású csúcs, amely ugyancsak megerősíti, hogy az ATCUN-motívum Ni(II)-komplexe kinetikailag inert. Amennyiben további Ni^{2+} -iont adunk a fehérjéhez csak egy csúcs figyelhető meg, ahol újra 100%-ban kialakult az ATCUN-motívum Ni(II)-komplexe, míg a cinkujjakban kötött Zn^{2+} -ionok sértetlenek maradtak (13. ábra b)).

A Cu(II)-telítés során a már EDTA-val kezelt majd Zn(II)-vel telített 1MEY#.1 fehérjéhez 0,8 ekvivalens Cu(II)-oldatot adva sikerült előállítanunk a cinkujj fehérje-Cu(II) komplexét (13. ábra c)). A tömegspektrum legintenzívebb csúcsa ehhez rendelhető. Emellett azonban továbbra is megfigyelhető a mintában kis mennyiségű a Ni(II) fehérje-komplex. Mivel az elsődleges célunk az volt, hogy bizonyítsuk a Cu(II) komplex kialakíthatóságát, így ebből a szempontból a részben jelenlévő Ni(II)-kötött forma nem okoz gondot, de a későbbiekben hosszabb inkubációra vagy nagyobb EDTA feleslegre lehet szükség, hogy 100%-ban eltávolítsuk a Ni(II)-t egy nukleáz aktivitási vizsgálatot megelőzően.

5. táblázat: Az 1MEY#.1 fehérje verzió különböző fémekkel telített módosulatainak MS-eredményei.

	Összegképlet	Szimulált átlagos tömeg	Mért átlagos tömeg
1MEY#.1 (fémmentes)	$C_{485}H_{767}N_{157}O_{154}S_7$	11486,53	11486,57
3 Zn(II)-es forma	$C_{485}H_{761}N_{157}O_{154}S_7Zn_3$	11676,26	11676,35
3 Zn(II) 1 Ni(II)-es forma	$C_{485}H_{759}N_{157}O_{154}S_7Zn_3Ni_1$	11733,18	11733,27
3 Zn(II) 1 Cu(II)-es forma	$C_{485}H_{759}N_{157}O_{154}S_7Zn_3Cu_1$	11738,18	11738,21

Ahhoz, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a komplex használható lesz a DNS-hasítási kísérletekben, meg kellett győződnünk annak intenzitásáról. Ezt CD-spektrószkópiával ellenőriztük. A mintát 72 órán át inkubáltuk 37 °C-on, 24 óránkénti mintavételezéssel.

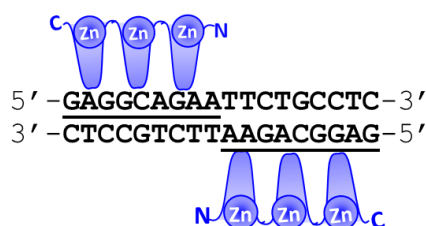


14. ábra: Az 1MEY#.1-Cu(II) ($c_{\text{fehérje}} = 10 \mu\text{M}$) komplex CD-spektrumai (puffer: 50 mM ABC pH: ~7,8)

Kutatócsoportunk korábbi mérései alapján amennyiben szabad Cu(II) kerül kölcsönhatásba a cinkujj fehérjével, akkor pillanatszerűen összeomlik a fehérje másodlagos szerkezete miközben a Zn(II) kiszorul a kötőhelyéről és a fehérjékben található ciszteinek cisztinné oxidálódnak Cu(II)-hatására. Az 14. ábrán látható, a fehérje CD spektrumában egy kis mértékű intenzitáscsökkenés, de annak alakja a mérés zajszintje mellett állandónak tekinthető, az X-tengelymetszet sem változik, így kijelenthetjük, hogy a fehérje szerkezete nem omlott össze 72 óra inkubálás után sem. Idővel a mi esetünkben is számítani lehet a szerkezet összeomlására, mivel az ATCUN motívum Cu(II)-komplexének nagy stabilitása ellenére szabad Cu(II) kis mennyiségben mindig jelen van az oldatban, és ennek redoxi reakciója a ciszteinekkel eltolja az egyensúlyt az ATCUN-Cu(II) komplex szétesésének irányába, de eredményeink alapján ez jelen mérési körülmények között 72 óra alatt nem számottevő, így felhasználható a cinkujj fehérje Cu(II)-komplexe is a nukleáz aktivitási vizsgálatok során, ahol a tipikus inkubálási idők nem tartanak 3 napnál tovább.

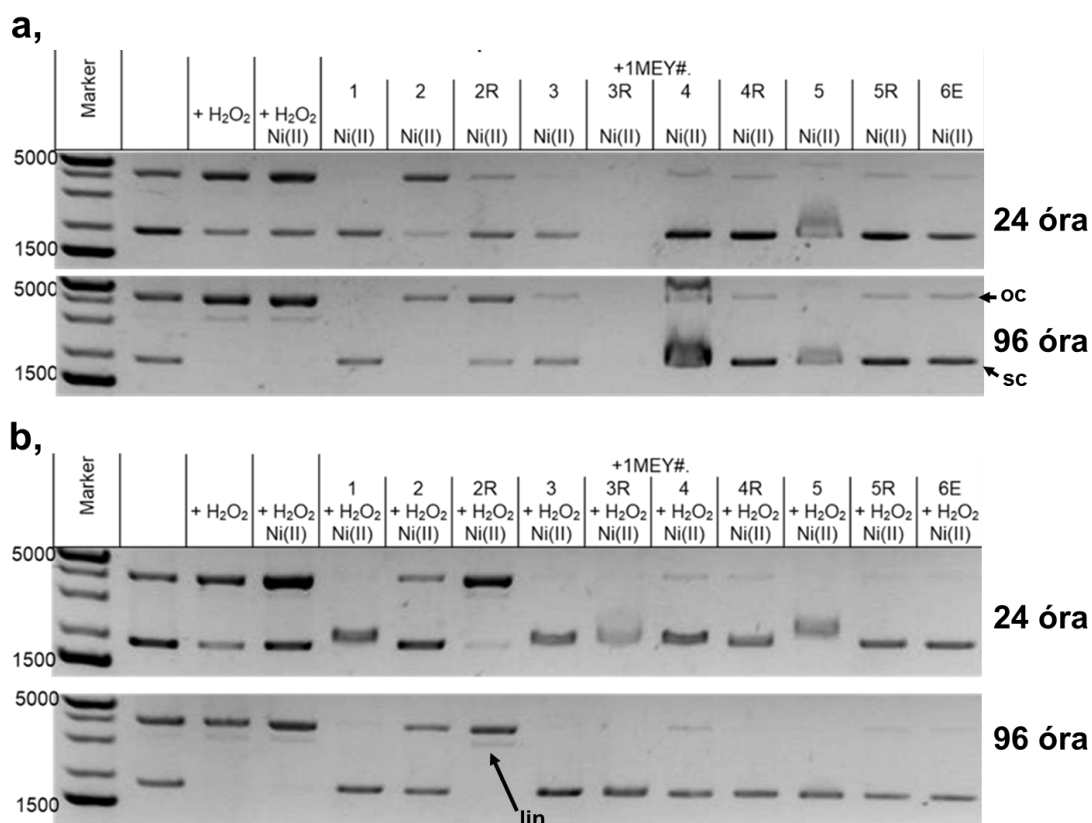
5.5 Nukleáz aktivitási kísérletek

Ezt követően megkezdjük a nukleáz aktivitási vizsgálatokat, elsőként a Ni(II)-komplexekkel.



15. ábra: A pUC119ΔH+N-N0 körkörös DNS hordozóba épített 1MEY# felismerési hely szekvenciája, és a hozzá kötődő cinkujj fehérjék sematikus ábrázolása.

Egy olyan pUC19-alapú bakteriális DNS hordozót alkalmaztunk a kísérletek során, amelybe kutatócsoportunk tagjai beépítették az 1MEY-cinkujj fehérjék DNS-felismerési helyét: 5'-GAGGCAGAA-3', egymás után kétszer palindrom módon (15. ábra).



16. ábra 1MEY# mutánsok nukleáz aktivitási tesztje 1 m/V % agaróz gélen vizsgálva a, hozzáadott oxidálószer nélkül; b: H₂O₂ jelenlétében. 100 ng/μl pUC119ΔH+N-N0; 100 μM H₂O₂; 5 μM NiCl₂; 5 μM 1MEY#.X 32 mM HEPES 150 mM NaCl pH = 8,2; 37 °C 24, 96 óra. Marker: 1 kb Gene Ruler Plus. oc: nyílt cirkuláris, sc: szuperhelikális, lin: lineáris DNS konformáció.

Az eredmények alapján 150 mM NaCl-tartalmú pufferben nem sikerült DNS hasítást detektálnunk H₂O₂ segédreagens jelenlétében és hiányában sem. A cinkujj fehérjét is tartalmazó reakcióelegyekben szinte kivétel nélkül csak a teljesen sértetlen szuperhelikális DNS konformáció jelenik meg 4 napos inkubálást követően, míg a kontrollként alkalmazott csak hidrogén peroxidot és Ni(II)-t tartalmazó mintákban az egyszálú hasítás hatására kialakult cirkuláris és kétszálú hasítás utáni lineáris konformáció is jelen van (16. ábra). Ez feltehetően annak tudható be, hogy nagy ionerősség mellett az ATCUN motívumok nukleáz aktivitása lecsökken, amint arra a szakirodalomban is találtunk példát [53], így a jövőben a kísérleteket kisebb ionerősség mellett folytatjuk.

6 Összefoglalás

Tudományos diákköri kutatásaim során fő feladatomb volt a kutatócsoportunk által megtervezett 1MEY# fehérje módosított verzióinak előállítás, tisztítása, és DNS-sel kialakított kölcsönhatásának vizsgálata.

Először a linker szakasz hosszában és az aminosav-szekvencia összetételében eltérő 1MEY# módosulatok előállítását végeztem el. Ehhez már rendelkezésre álltak a fehérjék génjei pETM11 DNS hordozóba építve. A fehérjék hexahisztidin-SUMO-toldalékkal fejeződtek ki fehérjetermelésre optimalizált *E.coli* sejtekben, amit IPTG segítségével indukáltam. A fehérjéket Ni(II)-affinitás alapú tisztítással választottam el a sejt többi fehérjétől. A tisztítás különböző fázisaiban vett mintákban SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztem a célfehérje jelenlétét, a fehérjetisztítás sikerességét. A gélképek alapján sikerrel állítottam elő tíz módosított 1MEY# verziót, de a cirkuláris dikroizmus spektroszkópiás mérések alapján a tisztított fehérjék egy részénél feltehetően részlegesen oxidálódtak a cinkujj alegységek ciszteinjei. Ennek elkerülése érdekében módosítottuk a fehérjetisztítási eljárást, a jövőben a sejtek feltárását Zn(II)-tartalmú pufferrel hajtjuk végre. Az oxidált cinkujj fehérjéket TCEP segítségével redukáltam. Az ismételt CD mérések alapján az oxidálódott fehérjék szerkezetét sikerrel állítottuk helyre, a spektrumok alakja hasonlóknak bizonyult a kiindulási 1MEY#.1 fehérje spektrumához. A módosított fehérjék CD spektrumának X tengelymetszete a 197-198 nm-es tartományban a nagyobb hullámhosszak felé tolódott, ebből arra következtettem, hogy a cinkujj alegységeket az ATCUN motívummal összekötő aminosavszekvencia szerkezete rendezetlen, így ezt a szakaszt rövidítve a fehérje rendezettsége nő.

Az előállított fehérje módosulatokban a cinkujj alegységek Zn(II)- és az ATCUN-motívum Ni(II)-telítettségét elektrospray-ionizációs tömespektrometriás mérésekkel igazoltam. A mért és számított tömegek jó egyezést mutattak a legtöbb esetben. Emellett a mintákat savanyítva eltávolítottam a fémionokat a fehérjékből, majd szintén ESI-MS méréssel ellenőriztem a fehérjék elsődleges szerkezetét. Egyetlen verzió kivételével (1MEY#.2RK) megállapítottam, hogy a módosított fehérjék elsődleges szerkezete megegyezik az elvárásainkkal. Az 1MEY#.2RK fehérjét megpróbáltam MS-MS technikával fragmentálni, hogy azonosítsam az elméleti és mért tömegek között megfigyelt több Da eltérés okát. Mivel sikerült a fehérje N- és C-terminális végéből származó olyan fragmenseket azonosítani, amelyek tömege megegyezett az elméleti értékekkel, így feltehetően a fehérje cinkujj alegységeinek szekvenciájában következhetett be mutáció. Ezt

a fehérjét a további kísérletekben nem használhattuk fel, a jövőben újra kell ellenőrizni a fehérjét kódoló gén DNS szekvenciáját.

Az 1MEY#.1 fehérje ATCUN-motívumából EDTA kelátor segítségével eltávolítottam a Ni^{2+} -iont, majd sikeresen kicseréltem Cu^{2+} -ionra, miközben a cinkujj alegységek szerkezete sértetlen maradt, ezt tömegspektrometriás méréssel igazoltam. CD-spektroszkópiával vizsgáltam fehérje Cu(II)-komplexének intenzitását és megállapítottam, hogy minimális intenzitáscsökkenés ugyan bekövetkezik a fehérje CD-spektrumában, de szerkezete nem omlik össze 72 órás inkubáció során. Így használható DNS-hasítási kísérletekhez a potenciális nukleázok Cu(II)-komplexe is.

Megkezdtem a fehérje-DNS kölcsönhatások vizsgálatát, amit agaróz gélelektroforézissel követtem. Az első eredmények alapján 150 mM NaCl jelenlétében nem sikerült nukleáz aktivitást kimutatnunk a Ni(II)-komplexeket felhasználva. A továbbiakban főként DNS-hasítási kísérletekre, a körülmények optimalizására fogok fókuszálni, kisebb ionerősségnél tervezem megismételni a kísérleteket, valamint megkezdem a méréseket a cinkujj fehérjék Cu(II)-komplexeivel is aszkorbinsav segédreagens jelenlétében.

7 Irodalomjegyzék

- [1] A. Klug, „The Discovery of Zinc Fingers and Their Applications in Gene Regulation and Genome Manipulation,” *Annual Review of Biochemistry*, 216., 2010.
- [2] I. Junji és L. Yaakov, „Speed-stability paradox in DNA-scanning by zinc-finger proteins,” *Transcription*, 410, 2013.
- [3] P. Carl O., E. Peisach és R. A. Grant, „Design and Selection of Novel Cys2His2 Zinc Finger Proteins,” *Annual Review of Biochemistry*, 313-340, 2001.
- [4] S. Tan, D. Guschin, A. Davalos, Y.-L. Lee, +18 és P. D. Gregory, „Zinc-finger protein-targeted gene regulation: Genomewide single-gene specificity,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 11997–12002, 2003.
- [5] D. P. Siderovski, S. Blum, R. E. Forsdyke és D. R. Forsdyke, „A Set of Human Putative Lymphocyte G0/G1 Switch Genes Includes Genes Homologous to Rodent Cytokine and Zinc Finger Protein-Encoding Genes,” *DNA and Cell Biology*, 579-587, 1990.
- [6] K. S. Sri, M. Indraneel és G. Nick V., „Structural classification of zinc fingers: SURVEY AND SUMMARY,” *Nucleic Acids Research*, 532-550, 2003.
- [7] L. Yu-Ming és L. Carmay, „Physical basis of structural and catalytic Zn-binding sites in proteins,” *J Mol Biol.*, 545-553, 2008.
- [8] A. Klug és J. W. R. Schwabe, „Protein motifs 5. Zinc fingers,” *The FASEB Journal*, 597-604, 1995.
- [9] S. V. Razin, V. V. Borunova, O. G. Maksimenko és O. L. Kantidze, „Cys2His2 Zinc Finger Protein Family: Classification, Functions, and Major Members,” *Biochemistry*, 217-226, 2012.
- [10] M. Lee, G. Gippert, K. Soman, D. Case és P. Wright, „Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain,” *Science*, 635-657, 1989.
- [11] M. J. Lachenmann, J. E. Ladbury, X. Qian, K. Huang, R. Singh és M. A. Weiss, „Solvation and the hidden thermodynamics of a zinc finger probed by nonstandard repair of a protein crevice,” *Prot. Sci.*, 3115-3126, 2009.
- [12] Y. Kim, J. Cha és S. Chandrasegaran, „Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1156-60, 1996.
- [13] D. Carroll, „Genome Engineering With Zinc-Finger Nucleases,” *Genetics*, 773–782, 2011.

- [14] T. J. Cradick, K. Keck, S. Bradshaw, A. C. Jamieson és A. P. McCaffrey, „Zinc-finger Nucleases as a Novel Therapeutic Strategy for Targeting Hepatitis B Virus DNAs,” *Molecular Therapy*, 947-954, 2010.
- [15] A. V. Persikov és M. Singh, „De novo prediction of DNA-binding specificities for Cys2His2 zinc finger proteins,” *Nucleic Acids Research*, 97–108, 2014.
- [16] A. N. Besold, L. Widger, F. Namuswe, J. L. Michalek, S. L. J. Michel és D. P. Goldberg, „Revisiting and re-engineering the classical zinc finger peptide: consensus peptide-1 (CP-1),” *Molecular BioSystems*, 1183-1193, 2016.
- [17] A. M. Rich, E. Bombarda, A. D. Schenk, P. E. Lee, E. H. Cox, A. M. Spuches és D. E. Wilcox, „Thermodynamics of Zn²⁺ Binding to Cys2His2 and Cys2HisCys Zinc Fingers and a Cys4 Transcription Factor Site,” *Journal of the American Chemical Society*, 10405-10418, 2012.
- [18] B. A. Krizek, B. T. Amann, V. J. Kilfoil, D. L. Merkle és J. M. Berg, „A consensus zinc finger peptide: design, high-affinity metal binding, a pH-dependent structure, and a His to Cys sequence variant,” *J. Am. Chem. Soc.*, 4518–4523, 1991.
- [19] B. A. Krizek, D. L. Merkle és J. M. Berg, „Ligand variation and metal ion binding specificity in zinc finger peptides,” *Inorg. Chem.*, 937-940., 1993.
- [20] O. Sénèque és J.-M. Latour, „Coordination Properties of Zinc Finger Peptides Revisited: Ligand Competition Studies Reveal Higher Affinities for Zinc and Cobalt,” *J. Am. Chem. Soc.*, 17760-17774., 2010.
- [21] J. M. Berg és D. L. Merkle, „On the metal ion specificity of zinc finger proteins,” *J. Am. Chem. Soc.*, 3759-3761., 1989.
- [22] M. Anna és A. Krężel, „Metal binding properties of the zinc finger metallome-insights into variations in stability,” *Metallomics*, 2015-2024., 2014.
- [23] A. Kocyla, A. Pomorski és A. Krężel, „Molar absorption coefficients and stability constants of metal complexes of 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR): Revisiting common chelating probe for the study of metalloproteins,” *J. Inorg. Biochem.*, 82-92, 2015.
- [24] A. L. Guerrerio és J. . M. Berg, „Metal Ion Affinities of the Zinc Finger Domains of the Metal Responsive Element-Binding Transcription Factor-1 (MTF1),” *Biochemistry*, 5437–5444, 2004.
- [25] M. J. Lachenmann, J. E. Ladbury, X. Qian, K. Huang, R. Singh és M. A. Weiss, „Solvation and the hidden thermodynamics of a zinc finger probed by nonstandard repair of a protein crevice,” *Prot. Sci.*, 3115-3126., 2009.
- [26] K. L. Chan, I. Bakman, A. R. Marts, Y. Batir, T. L. Dowd, D. L. Tierney és B. R. Gibney, „Characterization of the Zn(II) Binding Properties of the Human Wilms’

Tumor Suppressor Protein C-terminal Zinc Finger Peptide,” *Inorg. Chem.*, 6309-6320., 2014.

- [27] M. C. Posewitz és D. E. Wilcox, „Properties of the Sp1 Zinc Finger 3 Peptide: Coordination Chemistry, Redox Reactions, and Metal Binding Competition with Metallothionein,” *Chem. Res. Toxicol.*, 1020-1028., 1995.
- [28] A. M. Rich, E. Bombarda, A. D. Schenk, P. E. Lee, E. H. Cox, A. M. Spuches, L. D. Hudson, B. Kieffer és D. E. Wilcox, „Thermodynamics of Zn²⁺ Binding to Cys2His2 and Cys2HisCys Zinc Fingers and a Cys4 Transcription Factor Site,” *J. Am. Chem. Soc.*, 10405-10418, 2012.
- [29] K. Kluska, J. Adamczyk és A. Krężel, „Metal binding properties, stability and reactivity of zinc fingers,” *Coord.Chem.Rev.*, 67., 18-64., 2018.
- [30] M. Elrod-Erickson, M. A. Rould, L. Nekludova és C. O. Pabo, „Zif268 protein–DNA complex refined at 1.6Å: a model system for understanding zinc finger–DNA interactions,” *Structure*, 1171-1180, 1996.
- [31] M. Elrod-Erickson és C. O. Pabo, „CONTRIBUTION OF INDIVIDUAL SIDE CHAINS TO BINDING AFFINITY AND SPECIFICITY IN THE Zif268 ZINC FINGER-DNA COMPLEX,” *Journal of Biological Chemistry*, 19281-19285, 1999..
- [32] S. A. Wolfe, E. I. Ramm és C. O. Pabo, „Combining structure-based design with phage display to create new Cys2His2 zinc finger dimers,” *Structure*, 739-750, 2000.
- [33] R. F. Ryan és M. K. Darby, „The role of zinc finger linkers in p43 and TFIIIA binding to 5S rRNA and DNA,” *Nucleic Acids Research*, 703-709, 1998.
- [34] H. C. van Leeuwen, M. J. Strating, M. Rensen, W. de Laat és P. C. van der Vliet, „Linker length and composition influence the flexibility of Oct-1 DNA binding,” *The EMBO Journal*, 2043-2053, 1997.
- [35] S.-J. Lau, T. P. A. Kruck és B. Sarkar, „A Peptide Molecule Mimicking the Copper(II) Transport Site of Human Serum Albumin: A COMPARATIVE STUDY BETWEEN THE SYNTHETIC SITE AND ALBUMIN,” *Journal of Biological Chemistry*, 5878-5884, 1974.
- [36] M. Lucassen és B. Sarkar, „Nickel(II)-binding constituents of human blood serum,” *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 897-905, 1979.
- [37] C. Harford, S. Narindrasorasak és B. Sarkar, „The Designed Protein M(II)-Gly-Lys-His-Fos(138–211) Specifically Cleaves the AP-1 Binding Site Containing DNA,” *Biochemistry*, 4271-4278, 1996.
- [38] C. Harford és B. Sarkar, „Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-Binding (ATCUN) Motif of Proteins and Peptides: Metal Binding, DNA Cleavage, and Other Properties,” *Acc. Chem. Res.*, 123-130, 1997.

- [39] N. Camerman, A. Camerman és B. Sarkar, „Molecular design to mimic the copper(II) transport site of human albumin. The crystal and molecular structure of copper(II) – glycyglycyl-L-histidine-N-methyl amide monoaquo complex,” Canadian Journal of Chemistry, 1309-1316, 1976.
- [40] H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba és T. Kowalik-Jankowska, „Specific structure–stability relations in metallopeptides,” Coordination Chemistry Reviews, 319-346, 1999.
- [41] R. Hay, M. Hassan és C. You-Quan, „Kinetic and thermodynamic studies of the copper (II) and nickel(II) complexes of glycyglycyl-L-histidine,” J Inorg Biochem., 17-25, 1993.
- [42] Q. Liang, D. C. Ananias és E. C. Long, „Ni(II)-Xaa-Xaa-His Induced DNA Cleavage: Deoxyribose Modification by a Common “Activated” Intermediate Derived from KHSO₅, MMPP, or H₂O₂,” J. Am. Chem. Soc., 248-257, 1998.
- [43] E. Podobas, A. Bonna, A. Polkowska-Nowakowska és W. Bal, „Dual catalytic role of the metal ion in nickel-assisted peptide bond hydrolysis,” J Inorg Biochem., 107-114., 2014.
- [44] R. A. Cox, „A greatly Under-Appreciated Fundamental Principle of Physical Organic Chemistry,” International Journal of Molecular Sciences, 8316-8332, 2011..
- [45] H. Bálint, „(S/T)XH motívum – egy lehetőség metallonukleázok kialakítására fehérjék hasításán keresztül,” 2016.
- [46] S. Kelly, T. Jess és N. Price, „How to study proteins by circular dichroism,” Biochim Biophys Acta, 119-139, 2005.
- [47] A. E. Martell, „The Chelate Effect,” Advances in Chemistry, 272-294, 1967.
- [48] N. Greenfield, „Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure,” Nature Protocols, 2876-2890, 2006.
- [49] A. Krezel, R. Latajka, G. D. Bujacz és W. Bal, „Coordination Properties of Tris(2-carboxyethyl)phosphine, a Newly Introduced Thiol Reductant, and Its Oxide,” Inorg. Chem., 1994-2003, 2003.
- [50] A. Micsonai, É. Moussong, F. Wien, E. Boros, H. Vadász, N. Murvai, Y.-H. Lee, T. Molnár, M. Réfrégiers, Y. Goto, Á. Tantos és J. Kardos, „BeStSel: webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy,” Nucleic Acids Res, 90-98, 2022.
- [51] A. Belczyk-Ciesielska, B. Csipak, B. Hajdu, A. Sparavier, M. N. Asaka, K. Nagata, B. Gyurcsik és W. Bal, „Nickel(II)-promoted specific hydrolysis of zinc finger proteins,” Metallomics, 1089-1098, 2018.

- [52] K. A. Webster, H. Prentice és N. H. Bishopric, „Oxidation of Zinc Finger Transcription Factors: Physiological Consequences,” *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, 535-548, 2001.
- [53] Y. Jin, M. A. Lewis, N. H. Gokhale, E. C. Long és J. A. Cowan, „Influence of Stereochemistry and Redox Potentials on the Single- and Double-Strand DNA cleavage Efficiency of Cu(II)- and Ni(II)-Lys-Gly-His-Derived ATCUN Metallopeptides,” *Journal of American Chemical Society*, 8353-8361, 2007.

8 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Enyedy Éva Anna, tanszékvezető egyetemi docensnek, aki lehetővé tette, hogy a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken végezzem a kutatómunkát.

Köszönettel tartozom Dr. Gyuresik Bélának a lehetőségért, hogy TDK-dolgozatomban a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport tagjaként írjam meg.

Köszönöm Hunyadi-Gulyás Évának, aki lehetővé tette, hogy a tömegspektrometriás méréseket a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban végezzem el.

Köszönöm továbbá a kutatócsoport és a tanszék összes dolgozójának és PhD hallgatójának a kutatásom során nyújtott segítségét.

Köszönet illeti Dömét, Kristófot, Palit és Jácintot, akik minden pillanatban inspiráltak a dolgozatomban megírásában.

Hálával tartozom Hajdu Bálintnak, aki idejét és energiáját nem sajnálva tartotta bennem a lelket a legnehezebb időkben. Köszönöm a szakmai segítségnyújtását, tanácsait, amik nélkül a dolgozat nem készülhetett volna el. Köszönöm türelmét és segítségét a kísérletek elvégzésében.