



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar

Az onkogén KRas fehérjék kölcsönhatásainak vizsgálata

OTDK pályamunka

Szerző:

Emődi Nikolett

Biotechnológia MSc., 2. évfolyam

Témavezető:

Dr. Nyíri Kinga

Egyetemi adjunktus

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészsmérnöki és
Biomérnöki Kar, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Lezárva: 2024.05.26.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Vértessy G. Beátának, hogy lehetőséget biztosított arra, hogy bekapcsolódhassak a kutatócsoportjában működő projektbe.

Külön köszönettel tartozom Dr. Nyíri Kinga témavezetőmnek, aki útmutatásával a végig segítette szakmai fejlődésem. Hálával tartozok hasznos tanácsaiért és ösztönző szavaiért, amelyek végig kísérték kutatómunkám során.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Rosta Edina és Berta Dénes felé, akik eredményeikkel hozzájárultak a kutatás előrehaladásához.

Végül szeretném megköszönni kutatócsoportom tagjainak a sok segítséget, tanácsot és támogatást.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. A Ras szupercsalád kis G-fehérjei.....	5
2.1.1. A kis-G fehérjék szerkezete és működése	6
2.2. A szupercsalád Ras ága	7
2.2.1. A Ras fehérjék regulátorai.....	8
2.2.2. A Ras fehérjék a jelátviteli útvonalban.....	9
2.2.3. A Ras fehérjék izoformái	11
2.3. GTP hidrolízis menete.....	14
2.3.1. Intrinzik GTP hidrolízis	14
2.3.2. GAP katalizálta hidrolízis	15
2.3.3. Mutáció hatása a hidrolízisre	17
2.4. Mutációk a Ras fehérjékben.....	18
2.5. A mutáció helyreállításának módjai.....	20
2.5.1. Inhibitor molekulákkal való kezelés	21
2.6. Egy új GAP fehérje felemelkedése	21
3. Célkitűzés.....	24
4. Kísérletek és módszerek	26
4.1. Kompetens sejtek készítése.....	26
4.2. Vizsgálni kívánt fehérjék előállítása	27
4.3. Hisztidin-taggal rendelkező fehérjék előállítása és tisztítása	28
4.3.1. Plazmid transzformálása kompetens sejtekbe	28
4.3.2. A fehérjék expressziója	28
4.3.3. Az expresszált fehérjék izolálása a baktériumsejtekből	29
4.3.4. Fehérjék tisztítása nikkel affinitás kromatográfiával (Ni-NTA).....	29
4.3.5. A fehérjék dialízise.....	30
4.4. AviTag-es fehérjekonstruktok előállítása.....	31
4.4.1. Primerek megtervezése	31
4.4.2. Mutagenézis PCR	31
4.4.3. A PCR termék analízise	32
4.4.4. A PCR termék kezelése	32
4.4.5. PCR termék transzformálása kompetens sejtekbe.....	32
4.4.6. Plazmidizolálás	33
4.4.7. Nukleinsav koncentráció ellenőrzése	33
4.4.8. AviTag-es fehérjék termelése és biotinálása.....	33

4.5. Fehérje analitikai módszerek	34
4.5.1. Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)	34
4.5.2. Fehérjekoncentráció meghatározása	35
4.6. Méretkizárásos kromatográfia	36
4.7. MESG-PNP foszfát esszé.....	37
4.7.1. MESG-PNP foszfát esszé mérésének menete	38
4.8. Bioréteg interferometria	39
4.8.1. Bioréteg interferometriás mérés menete	40
4.9. Termofluorimetria	42
4.9.1. Termofluorimetriás mérés menete.....	42
4.10. Fehérjekristályosítás	43
4.10.1. Fehérjekristályosítás menete	43
5. Eredmények és kiértékelésük.....	45
5.1. Fehérjék expressziójának és tisztításának eredménye	45
5.2. AviTag-RGS3-cryst fehérjét kódoló plazmid létrehozása	48
5.3. Termofluorimetriás mérés eredménye.....	52
5.4. MESG-PNP foszfát esszé.....	53
5.4.1. Kalibrációs görbe.....	53
5.4.2. A vad típusú GAP kölcsönhatása különböző KRas fehérjékkel	55
5.3.3. KRas G12D fehérje GAP variánsokkal való kölcsönhatásának vizsgálata	56
5.3.4. Az RGS3 fehérje hatása a KRas G12D GTP hidrolízisére	58
5.5. Bioréteg interferometria (BLI).....	59
5.5.1. Biotinálás sikerességének ellenőrzése.....	59
5.5.2. KRas G12C-avi és RGS3 fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata	59
5.4.3. AviTag-RGS3-cryst és KRas G12D fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata.....	61
5.6. Fehérjekristályosítás eredménye.....	63
6. Összefoglalás.....	64
Függelék.....	66
Felhasznált oldatok összetétele.....	66
Szekvenciák.....	67
További gélképek.....	70
Irodalomjegyzék.....	72

1. Bevezetés

Kutatómunkámat 2021-ben kezdtem meg a Természettudományi Kutatóközpontban, a Prof. Dr. Vértessy Beáta által vezetett Genom Metabolizmus kutatócsoportban. Itt kapcsolódtam be a humán daganatos megbetegedéseket kiváltó KRas fehérjemutációk vizsgálatába.

A KRas fehérje központi szerepet tölt be a jelátviteli útvonalak szabályozásában, ezáltal hatással van a sejtbiológiai folyamatok döntő többségére, főként a sejtek proliferációs és osztódásos folyamatainak irányítására. Ez a szigorúan szabályozott szignalizáció azonban könnyen felborulhat, ha mutáció következik be a KRas fehérje aktív centrumában. Emiatt egyetlen aminosav megváltozása is kiválthatja a sejtek kontrollálatlan osztódását, daganatos megbetegedések kialakulását.

Az első humán Ras onkogén felfedezése közel negyven éve történt. Ezzel megkezdődött a fehérjék biológiai és biokémiai funkcióinak feltérképezése, a mutációk helyreállítását célzó daganatterápiás stratégiák kidolgozása. Meghatározó szerepet tölt be ezekben a vizsgálatokban a KRas mutációinak megismerése, mivel ez a rákos megbetegedések több, mint 14%-ának kiváltó oka. A mutáció típusától függően az egyes variánsok funkcióvesztésének helyreállítására már dolgoztak ki forgalomban lévő gyógyszermolekulákat, azonban a leggyakoribb, KRas G12D mutációra még nem találtak gyógymódot.

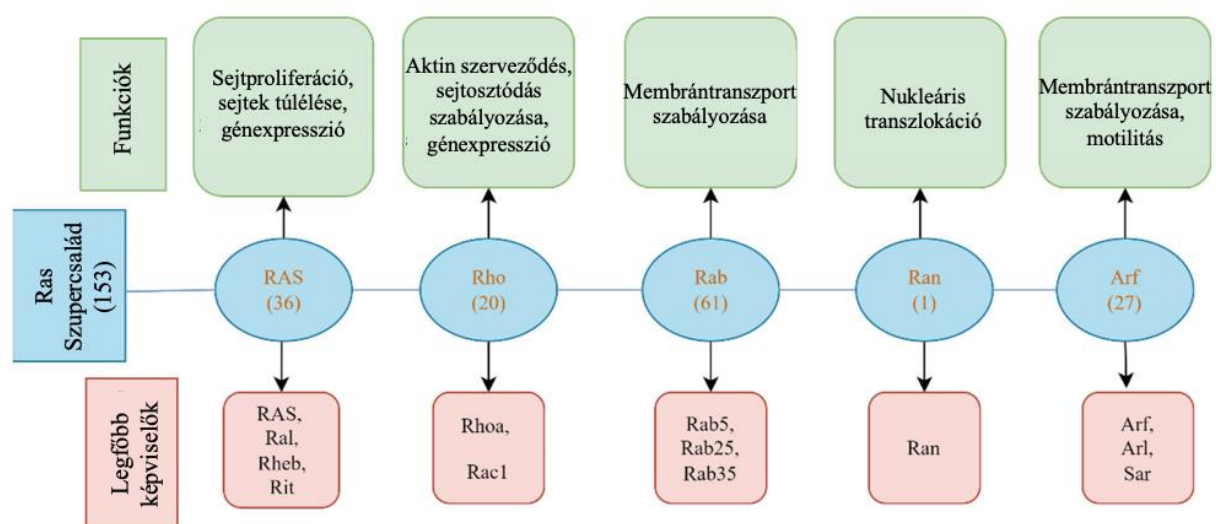
Kutatásunk célja, hogy kibővítsük a KRas fehérjék kölcsönhatásairól való ismereteket, valamint új megoldásokat találjunk a KRas mutációk, főként a KRas G12D aminosavcsere által kiváltott onkogén elváltozások helyreállítására.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A Ras szupercsalád kis G-fehérjéi

A guanin-nukleotid kötő guanozin-trifoszfátázok (GTPáz-ok), vagy más néven G-fehérjék a sejtszociológia szinte minden aspektusában részt vesznek. A G-fehérjék családjába tartoznak a kis GTPáz fehérjék, melyek precízen szabályozott molekuláris kapcsolóként a jelátviteli útvonalakban központi szerepet töltenek be. [1]

Az első Ras GTPáz enzimet rákos sejtekben azonosították. További, több évtizedet átfogó kutatás során még több kis GTPáz-t fedeztek fel, melyek térszerkezete hasonló a Ras fehérjéhez. Azóta már több mint 150 darab fehérjét azonosítottak humán sejtekben, melyet a Ras szupercsaládként foglaltak össze. Ebben öt fő családot különböztettek meg azok szekvenciája és funkcionálisuk alapján: Ras, Rho, Rab, Arf és Ran (1. ábra). [2] A Ras fehérjék családjára jellemzően a génexpresszióért, a citoplazmában történő jelátvitelért, a sejtek proliferációért és túléléseért felel. A Rho fehérjék feladata a sejtváza átfarmálása (aktin szerveződés), a sejtosztódási folyamatok szabályozása, emellett szintén részt vesznek a sejtosztódás szabályozásában. A Rab és az Arf család feladatai átfednek egymással, a membránforgalmat és a sejtproliferációt szabályozzák, hatással vannak a motilitásra és a differenciálódásra is. Az egyetlen Ran fehérje pedig a nukleáris transzlokációért és a sejtciklus előrehaladásának biztosításáért felel. [3, 4]



1. ábra. A Ras szupercsalád felépítése. Az öt fő család, főbb funkcióik és képviselőik. [3]

Működésük alapja azonos, bináris kapcsolóként szabályozzák a jelátviteli útvonalakat. A GTP megkötésével a fehérjék aktív állapotba kerülnek, ezáltal képesek a jel továbbítására, a

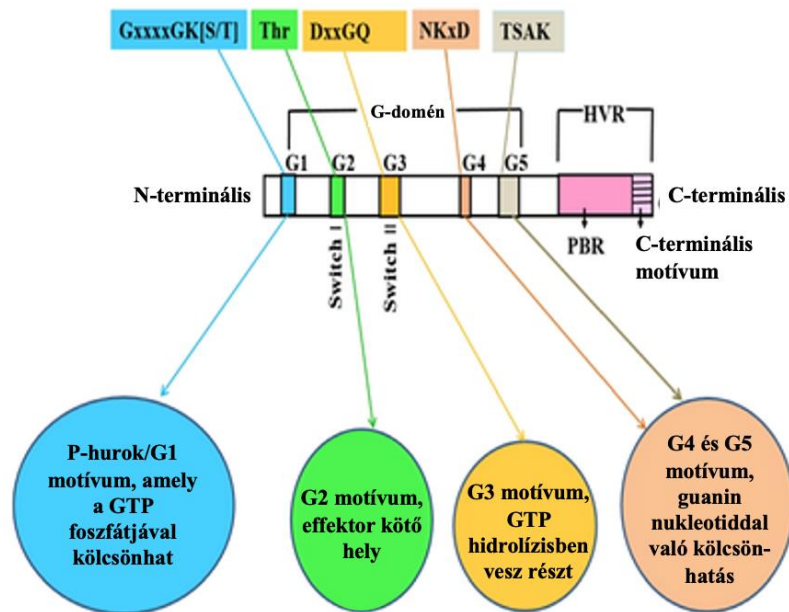
GTP-t GDP-vé hidrolizálva pedig inaktívvá válnak. A nukleotidok kicserélődésének folyamatát pedig a fehérjék konformációs változása is végigkíséri. [2]

2.1.1. A kis-G fehérjék szerkezete és működése

Szerkezetüket tekintve a heterotrimer G-fehérjéket három alegység (α , β , és γ) építi fel. A ~20-40 kDa nagyságú kis G-fehérjék szerkezete megegyezik az α alegységgel, amely egy konzervált G-doménnel rendelkezik, ami a transzmembrán jelátvitel közvetítése érdekében kölcsönhatásba lép a G-fehérje-kapcsolt receptorokkal. Így az egy doménből álló kis G-fehérjék képesek a sejtfiziológia egyes aspektusait szabályozni.

A kis GTPázok aminosav szekvenciája magasan konzervált az élesztőtől kezdve egészen az emberig, a különböző fajokat tekintve a hasonlóság 30-55% közé esik. A G-domént öt α -hélix ($\alpha 1$ - $\alpha 5$) és hat β -redő ($\beta 1$ - $\beta 6$) alkotja, melyeken megtalálható az öt konzervált szekvencia motívum (G1-G5, 2. ábra) (. Ezek, a szakaszok, melyet G-doboznak is neveznek felelősek a guanin-nukleotid megkötéséért és hidrolizálásáért. A G1 motívum szekvenciája a GxxxxGK[S/T] (ahol x egy tetszőleges aminosav), amit P-hurokként tartanak számon. Feladata, hogy a nukleotidok β -foszfátját és a jelenlévő Mg^{2+} iont felismerje. A xTx szekvencia a G2 motívumot jelöli, a nukleotid γ -foszfátjával és a Mg^{2+} ionnal létesít kapcsolatot. A DxxGQ, vagyis G3 motívum glutaminja közrejátszik a GTP hidrolízisében. A G4 (NKxD) és G5 (TSAK) motívumok a guanin bázissal létesítenek speciális kapcsolatot, ezáltal különbséget téve a többi jelenlévő nukleotidtól.

A GTP-GDP nukleotid csere során a G-domén Switch I. ($\alpha 1/\beta 2$ hurok) és Switch II. ($\beta 3/\alpha 2$ hurok, $\alpha 2$ és $\alpha 2/\beta 4$ hurok) régiójában jelentős konformációs változások mennek végbe. A G2 motívum a Switch I. régió része, feladata a nukleotid megkötése. A G3 motívum a Switch II. régióba tartozik, ezáltal az képes a megkötött nukleotid hidrolízisére. Mindkét régió rendezett konformációt vesz fel GTP-kötött, aktív állapotban, azonban ez rendezetlenné válik GDP-kötött, inaktív állapotban. [5-7]

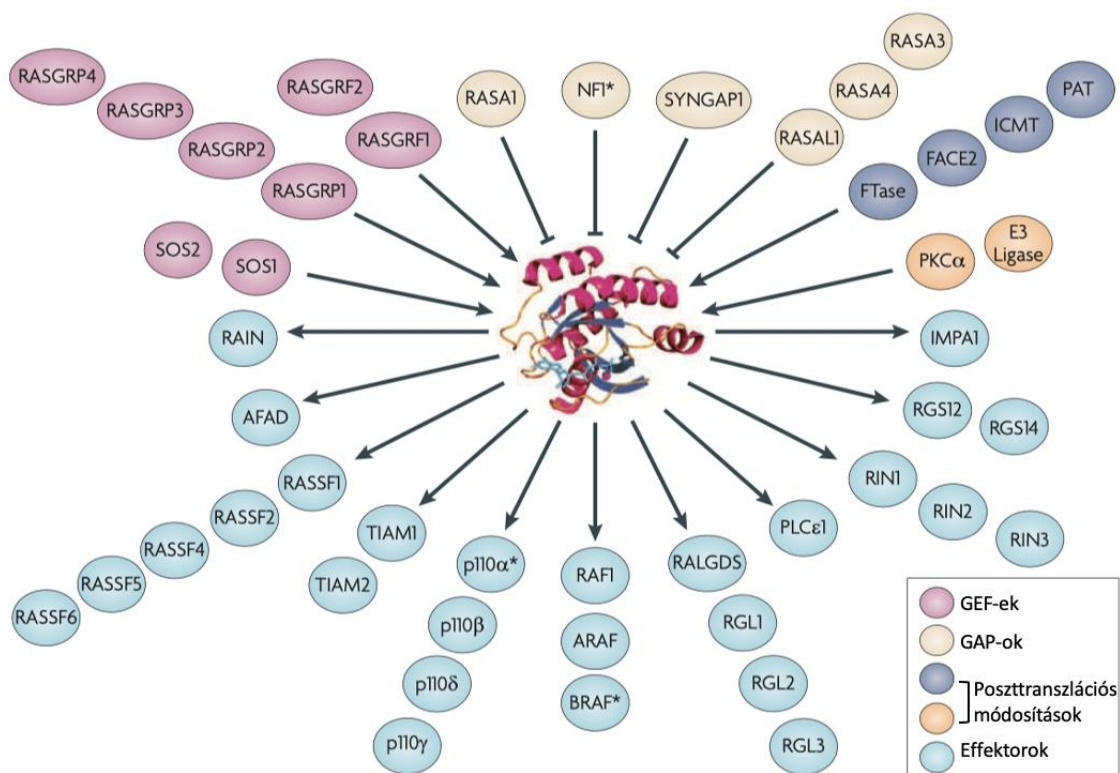


2. ábra. A kis G-fehérjék szekvenciamotívumai. [7]

2.2. A szupercsalád Ras ága

A Ras fehérjecsalád kiemelkedő alcsoportjai közé tartozik a Ras, Rap, Ral, Rit és a Rheb, melyek összesen 36 darab fehérjét foglalnak magukba. Közülük a legtöbbet kutatott fehérjék a Ras-ok, mivel funkcióvesztéssel járó mutációjuk a humán daganatos megbetegedések kialakulásának egy vezető oka. [4, 25] Ahhoz, hogy megértsük, hogy a Ras fehérjék miként vesznek részt a jelátviteli útvonalak szabályozásában érdemes megismerni azok főbb kölcsönható partnereit.

A kölcsönható partnereket attól függően, hogy a Ras fehérjék működésének melyik aspektusában vesznek részt több nagyobb csoportra lehet osztani (3. ábra). Elsőként a Ras fehérjéknek poszttranszlációs módosulásokon kell átesniük, hogy a sejtben a megfelelő helyen és formában tudják ellátni feladatukat. Ebben a CAAX peptidmintázatot felismerő, és az ubiquitinációért felelős fehérjék játszanak szerepet. A Ras fehérjék aktivitását a hozzájuk kötődő GEF (guanine exchange factor) és GAP (GTPase activating protein) szabályozzák. Végül az aktivált Ras fehérje számos downstream effektor útvonal részét képezi. [14] Ezeknek a csoportoknak a főbb képviselőit dolgozatomban részletesebben is bemutatom.

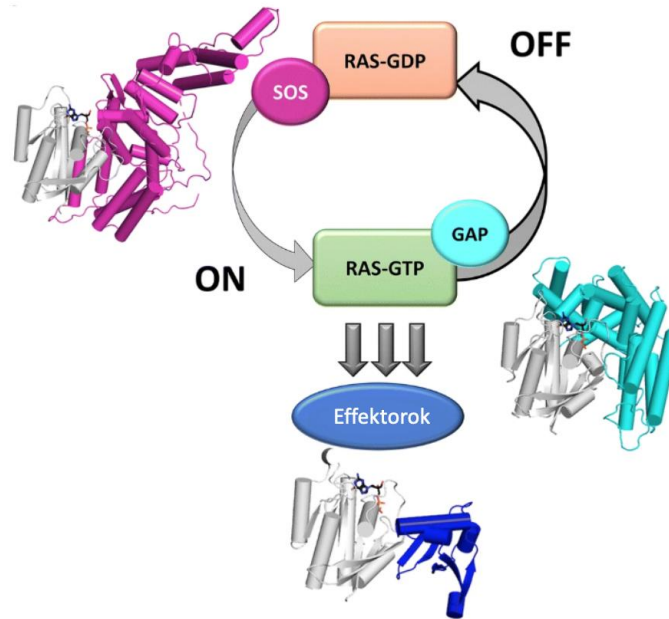


3. ábra. Ras fehérjék kölcsönható partnerei.¹

2.2.1. A Ras fehérjék regulátorai

Amint már volt róla szó, a kis G-fehérjék, ezáltal a Ras fehérjék is GTP-kötött állapotukban aktívan képesek a jeltovábbításra, míg GDP kötött állapotukban inaktívak. A kis GTPáz fehérjék intrinzik GTP hidrolízise azonban egy lassú folyamat, átviteli számuk (turnover number, k_{cat}), amely az 1 másodperc alatt átalakított szubsztrátok számát adja meg 10^{-3} - 10^{-6} s⁻¹ nagyságú, a Ras esetén 10^{-4} s⁻¹. Emellett a disszociációs állandójuk (K_D), amely a kötődés erősségét jellemző mutató is alacsony, nanomólos vagy pikomólos nagyságrendű, ami azt jelenti, hogy a fehérjék majdnem mindig nukleotid-kötött állapotban vannak jelen a sejtben. Azonban ezek a számadatok önmagukban nem felelnek meg a sejtekben megfigyelt Ras-aktiváció kinetikájának. Ez arra engedte következtetni a kutatókat, hogy a sejtben regulátorok (segédfehérjék) is jelen vannak, melyek a Ras fehérjékhez kapcsolódva segítik a hidrolízist, illetve a nukleotid kicserélődést (4.ábra). [6, 8]

¹ <https://dash.harvard.edu/handle/1/40050098>



4. ábra. A Ras fehérjék regulátorjainak működése. [27]

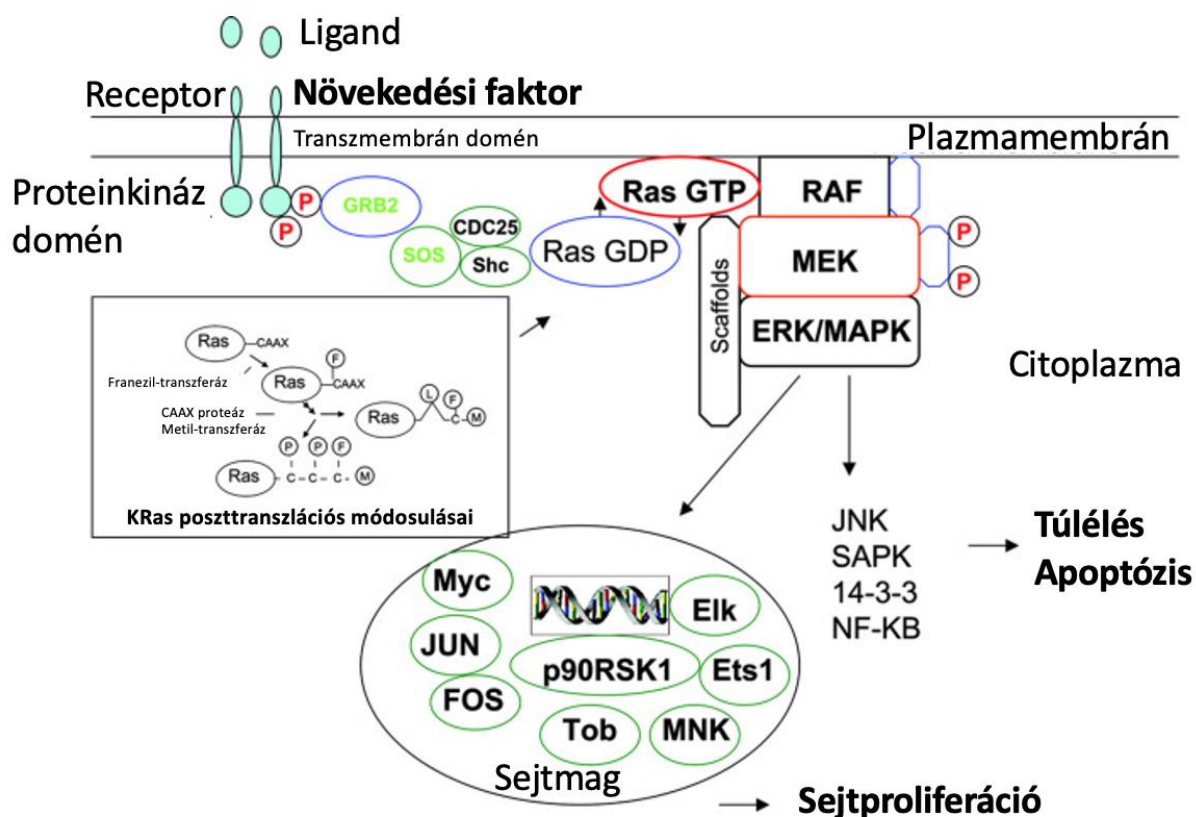
A GDP lassú kicserélődése biztosítja, hogy a Ras fehérjék inaktív állapotban maradjanak, amíg a hozzájuk érkező szignálok ki nem váltják a GDP-GTP kicserélődést. Aktiválás esetén, hogy a nukleotid csere kellő gyorsasággal megtörténjen GEF (guanine exchange factor) fehérjék segítik a Ras munkáját. A GEF Ras-hoz való kötődése a Switch régiókban és a P-hurokban olyan konformációs változást eredményez, amely csökkenti a Ras GDP affinitását, ami így a GDP felszabadulásához és cseréjéhez vezet. Mivel a sejtekben a szabad GTP koncentrációja tízszerese a GDP-nek, így nagyobb a valószínűsége annak, hogy GTP kötődik vissza a Ras-hoz, ami a fehérje aktivációját fogja eredményezni. [9]

A megkötött GTP hidrolízisét GAP (GTPase activating protein) fehérjék segítik, amelynek folyamatát dolgozatomban később részletesebben is bemutatom. A GAP kulcsfontosságú szerepe két lépésnél jelenik meg. A Ras-hoz kötődve koordinálja a katalitikus vízmolekulát, illetve a fehérje aktív centrumával kölcsönhatásba lépve optimális környezetet alakít ki a GTP γ -foszfátjának lehasításához. [9] Ezáltal a hidrolízis sebességét annak százezerszeresére (10^5) is képes megnövelni. [10]

2.2.2. A Ras fehérjék a jelátviteli útvonalban

A sejteknek több kulcsfontosságú túlélési mechanizmusa van, melyekben a Ras fehérjecsalád tagjai központi szerepet töltenek be. Az egyik a mitogén-aktivált proeinkináz (MAPK), a másik pedig a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K) szignálút. [11]

A Ras/Raf/MAPK útvonal a sejtbiológia egyik legtöbbet elemzett jelátviteli útvonala (5.ábra). Feladata, hogy az extracelluláris térből jelet továbbítson a sejtmagba, ahol specifikus gének aktiválódnak a sejtnövekedés, osztódás és differenciálódás érdekében.



5. ábra. A Ras szignalizációs útvonalban betöltött szerepe. [12]

A szignalizáció első lépése, hogy egy ligand kötődik a tirozin-kináz receptorhoz (RTK). A legismertebb receptorok az epidermikus növekedési faktor receptor (EGFR) és a vérlemezke-eredetű növekedési faktor receptor (PDGFR). A ligandum bekötődése az EGFR receptor dimerizációját és foszforilációját indukálja, ami aztán a citoplazmában elhelyezkedő katalitikus domének egymás melletti összerendeződését fogja eredményezni. A jelenlévő 'adaptor' Grb2 fehérje így képes lesz felismerni az Shc fehérje SH2 (Src-homology 2) doménjét, amely a membrán közelébe orientálja a GEF fehérjéket. A legismertebb nukleotid-kicserélő faktorok a SOS1 (son of sevenless) és a CDC25, melyek képesek lesznek interakcióba lépni a plazmamembránhoz kötött Ras fehérjével és indukálni azok GDP-GTP kicserélődését.

A Ras-ban történt nukleotid kicserélődés több downstream effektor útvonalat indíthat el. Központi szerepben a Raf/MEK/Erk kaszkád áll. A Raf (rapidly accelerated fibroblastoma) a szerin/treonin kinázok családjának tagja, a legjobban jellemzett Ras-effektor. Az aktív Ras

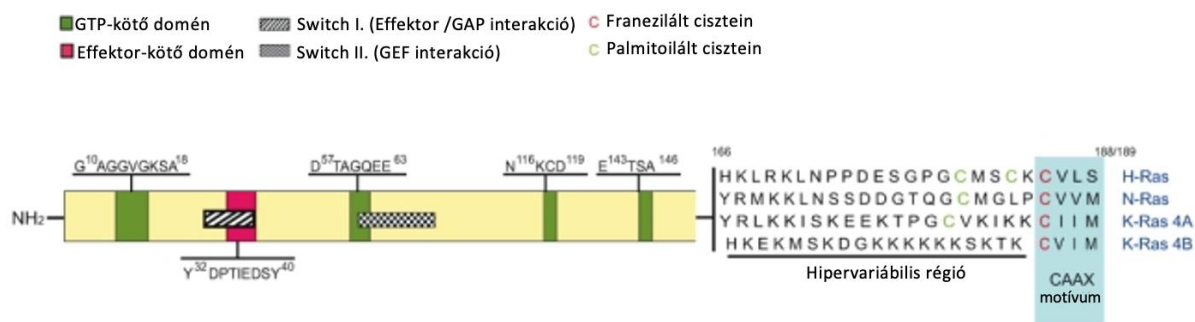
képes magához kötni a Raf fehérjét, amik ezáltal dimerizálódnak és szerin/treonin kináz aktivitásuknak köszönhetően foszforilálják a MEK (mitogen-activated protein kinase kinase, vagy MAPKK) fehérjét. A MEK ezt követően az ERK1 vagy ERK2 (extracellular-signal-regulated kinases) fehérjét fogja foszforilálni, amik aztán transzport fehérjék segítségével képesek lesznek a sejtmagba transzlokálódni, ahol főként transzkripciósfaktorokkal lépnek kölcsönhatásba. [12, 13]

A kaszkád aktivitásának megszüntetésében a GAP fehérjék segítenek, melyek a GTP-hidrolízis segítségével megszüntetik a Ras-Raf közti kölcsönhatást.

2.2.3. A Ras fehérjék izoformái

A Ras fehérjék felfedezéséhez vezető legkorábbi tanulmányok az 1960-as évekig nyúlnak vissza. Közel húsz évvel az első humán Ras onkogén azonosítása és izolálása előtt Jenny Harvey 1964-ben, Werner Kirsten és munkatársai pedig 1967-ben olyan retrovírusokat (Harvey-Ras és Kirsten-Ras) izoláltak leukémiás patkányokból, amelyek képesek voltak szarkómát előidézni a velük megfertőzött rágszálókban. A Ras fehérjék, és az őket kódoló gének neve is ezekből a felfedezésekből eredt (*rat sarcoma*). A legközelebbi előrelépés a daganatos betegségek megértésében az 1980-as években történt, amikor azonosították és klónozták az első humán onkogént (HRas), amely a korábbról megismert vírusos Harvey-Ras gén homológja volt. Hasonló megközelítéssel a Kirsten-Ras onkogén humán homológját (KRas) és a Ras géncsalád egy harmadik tagját az NRas-t is izolálták neuroblasztóma-sejtvonalból, azonban ennek már nem volt rokon virális onkogénje. A további karakterizációs vizsgálatok megerősítették a transzfekciós próbákkal kimutatott humán Ras onkogének egyediségét, illetve géntérképezés segítségével azt is megállapították, hogy az izoformák génjei melyik kromoszómán helyezkednek el (HRas a 11., KRas a 12. és az NRas az 1. kromoszómán található). [15]

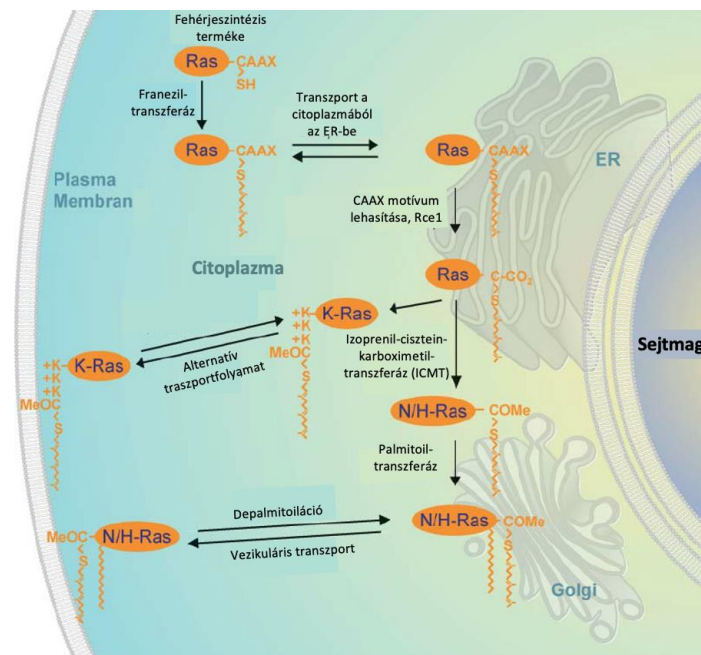
A humán sejtekben három Ras gén (HRas: Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog, KRas: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog és NRas: neuroblasztóma rat sarcoma viral oncogene homolog) négy különböző Ras izoformát kódol (6. ábra). Ez annak köszönhető, hogy a KRas génről alternatív splicing segítségével két különböző variáns, a KRas4A és a KRas4B is kifejeződik, melyek 4. exonjukban különböznek. [9]



6. ábra. A Ras izoformák elsődleges szerkezete.

Szerkezetüket tekintve mind rendelkeznek a kis GTPázoknál megismert G-doménnel. A G-domén N-terminális felől vizsgált szekvenciájának első fele, melyhez a downstream effektorok kapcsolódnak az izoformák között megegyeznek, második felük 82%-os eltérést mutat a variánsok között. További különbség a fehérjék C-terminális végén található, az utolsó ~20 aminosavban mutatkozik meg, amit emiatt hipervariábilis régió (HVR) is neveznek. Eltérő szekvenciájukat tekintve kézenfekvő, hogy az egyes izoformák más biológiai folyamatokban vesznek részt, ezáltal sejtbéli expressziós szintjük is eltérő. A fehérjék sejten belüli eltérő lokalizációjának kiváltó oka azonban a poszttranszlációs módosulásokban rejlik.

Fontos kiemelni a HVR végén található konszenzus szekvenciát. A CAAX motívum (cisztein-alanin-alanin-x(tetszőleges aminosav)) ciszteinje a fehérjeszintézis után három fő enzimatis lépésen keresztül módosul (farneziláció, proteolízis és metiláció) (7.ábra). Először a farnezil-transzferáz (FTáz) enzim felismeri a CAAX motívumot és kovalensen egy 15-szénatomos farnezil-izoprenoid kapcsol hozzá. Bizonyos Ras-okhoz a FTáz nem tud hozzáférni, így alternatívan a geranil-geranil-transzferáz 1 (GGTáz1) egy 20-szénatomos geranil-geranil izoprenoidot köt kovalensen a ciszteinhez. Ezt a lépést prenilációnak is nevezik. A lipidek kapcsolódását követően az endoplazmás retikulum (ER) Ras-converting CAAX endopeptidáz 1 (Rce1) enzime katalizálja az utolsó három aminosav (-AAX) lehasadását. Végül az izoprenil-cisztein-karboximetil-transzferáz (ICMT) egy metil-csoportot kapcsol az újonnan keletkezett véghez, ezzel hidrofóbbá téve a fehérjét, ami segíti annak a későbbi, sejtmembránokba való illeszkedését. [15-17]



7. ábra. A Ras izoformák poszttranszlációs változásainak útvonala.²

A Ras-izoforoma típusától függően a fehérje további módosulásokon mehet keresztül. A HRas és az NRas fehérjék a prenilációt követően vezikuláris transzporttal az ER-ből a Golgi-készülékbe jutnak, ahol a palmitoil-aciltranszferáz (PAT) fehérjekomplex egy 16-szénatomos palmitoil-csoportot kapcsol a ciszteinhez. HRas esetén ez a C181 és C184 aminosavakat érinti, NRas esetén csak a 181. cisztein aminosavat. Ez a lépés a Ras-fehérjék membránhoz való affinitását 100-szorosára is képes megnövelni. A KRas4A 181. ciszteinje egy ismeretlen PAT enzim segítségével palmitoilálódik, elkerüli a Golgi-készüléket és egyből a plazmamembránhoz vándorol. A KRas4B nem palmitoilálódik, mivel a kis G-fehérjékre jellemző poli-bázikus régióval (PBR) rendelkezik. Ebben lizint tartalmazó motívumok ismétlődnek, amely egy pozitív töltét kölcsönöz a HVR-nak. Ezáltal a fehérje kölcsön tud hatni a foszfolipid membrán negatív töltésű részével, így egy erős membránkapcsolatot létrehozni, elkerülve a Golgi-készülékbe jutást. [15-17]

Összegzésként elmondható, hogy a HRas, NRas és KRas fehérjék kifejeződése a legtöbb emberi sejten jelen van, azonban mennyiségi és minőségi eltérések vannak a vizsgált szövet vagy fejlődési szakasz függvényében. Ezen fehérjék vizsgálata rávilágít arra, hogy az eltérő izoformák más és más szerepet töltenek be a sejtszobiológiai folyamatokban, illetve mutációjuk a daganatos megbetegedésekben eltérő jelentőségű lehet. [18]

² Wright, L. P., & Philips, M. R. (2006). *Journal of lipid research*, 47(5), 883–891. <https://doi.org/10.1194/jlr.R600004-JLR200>

2.3. GTP hidrolízis menete

Általánosságban elmondható, hogy a kémiai reakcióknak le kell küzdeniük az aktiválási gátat a szubsztrátból termékké történő átalakulás során. Az enzimek katalitikus képessége abban rejlik, hogy az aktivitási energia csökkentésével meggyorsítják a lejátszódó kémiai reakciót. Nincs ez másképp az enzim katalizálta GTP hidrolízis esetében sem.

2.3.1. Intrinzik GTP hidrolízis

A kis G-fehérjék szerkezeti bemutatásánál már volt arról szó, hogy a Ras G-doménjének egyes szakaszai miként segítik a GTP γ -foszfátjának lehasítását. Ennek a folyamatnak az alapmechanizmusa a mai napig sem tisztázott. Alapesetben az aktív centrum központjában szükség van egy bázisra, amely elvonja a protonokat a nukleofil vízmolekuláról, ezzel elősegítve a kötés kialakulását a vízmolekula és a GTP γ -foszfátja között. A megválaszolatlan kérdést a hidrolízishez szükséges, aktív centrumban jelenlévő bázis feltételes hiánya okozza.

A kezdeti megközelítések ennek a bázisnak a definiálásával foglalkoztak. Először azt feltételezték, hogy a Switch II. régióban található a G3 motívumban konzervált 61. glutamin tölti be a bázis szerepét. Azonban kísérleti és elméleti tanulmányok is megcáfolták ezt a modellt. Az egyik ilyen kísérlet során a Gln61-et egy nem-természetes glutamin-nitro-analógra (NGln) cserélték. Azt várták, hogy a kevésbé bázikus aminosavszármazék nem tudja megfelelően ellátni a Ras intrinzik hidrolízisében betöltött szerepét. Az elvárásokkal ellentétben az NGln-t tartalmazó fehérje hidrolitikus aktivitása nem csökkent. Emellett a számítógépes lineáris szabadentalpia-összefüggés (LFER) modellezés is alátámasztotta, hogy nem az aktív centrumban jelenlévő glutamin a szabad bázis.

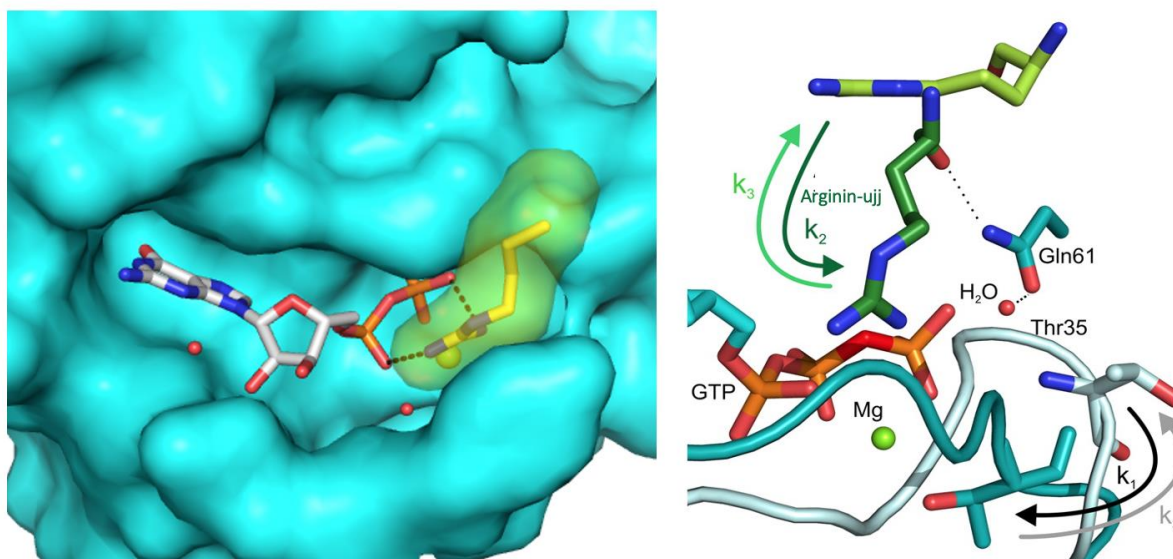
Az újabb bázismodellek arra engedtek következtetni, hogy maga a szubsztrát GTP, pontosabban annak a γ -foszfátja szolgál bázisként önmaga hidrolízisében. Ezt a feltételezést szintén kísérletes és szimulációs módszerekkel próbálták alátámasztani, azonban a mechanizmus működőképességét a rezgési spektroszkópiai mérések megkérdőjelezték.

Más modellek a megoldást a GTPáz aktív helyének tulajdonságaiban keresték. A Ras-ban a nukleotid-kötő zseb pozitív töltéseket és hidrogén-kötés donorokat tartalmaznak, amik a megkötött Mg^{2+} ion-ból, a 16. lizin aminosavból, valamint a P-hurok gerincében található többi amidcsoportból (Val14, Gly15 és Lys16) származnak. Ebben az esetben a Gln61 aminosav egy stabilizáló szerepet tölt be, ami segíti, hogy a GTP γ -foszfátját a nukleofil vízmolekula támadni tudja. [19, 20]

2.3.2. GAP katalizálta hidrolízis

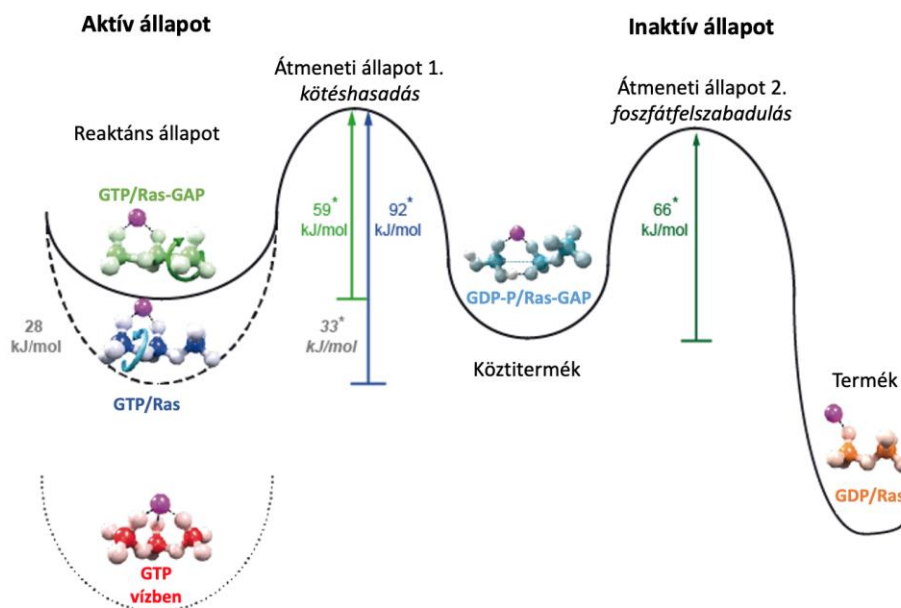
A GAP, azaz GTPáz aktiváló fehérjék, nevükből eredően a Ras aktiválta GTP hidrolízis sebességét nagyságrendekkel képesek megnövelni. [10] A folyamat megértésére a kölcsönhatást, röntgen krisztallográfiával, mágneses magrezonancia spektroszkópiával (NMR), Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiával (FTIR) és *in silico* modellezéssel is vizsgálták. [19, 21]

Ezáltal felfedezték, hogy a Ras-GAP típusú fehérjék egy konzervált arginin aminosavval (pl. Arg789) rendelkeznek melyet később arginin-ujjnak neveztek el. Ez az egység képes benyúlni a Ras-fehérjék aktív centrumába, ezáltal a hidrolízis során több fontos feladatot is ellátni (8. ábra). Ez a bázikus aminosav kölcsönhatásba lép a GTP γ -foszfátjával, valamint a β - és γ -foszfátokat összekötő oxigénatommal. Ezáltal nemcsak a molekulák megfelelő orientációját biztosítja és az így kialakult szerkezetet stabilizálja, hanem a hidrolízis során kialakuló negatív töltést is semlegesíti. A hidrolízis folyamatában az arginin-ujj karbonil-vázának is fontos szerepe van. Segíti a Switch II. régióban konzervált 61. glutamin és a nukleofil vízmolekula pozícionálását, ezzel tovább stabilizálva az átmeneti állapotot. [21]



8. ábra. Bal oldalon az arginin-ujj bekötődése az aktív centrumba (PDB: 1WQ1), illetve jobb oldalon a benne megfigyelt folyamatok illusztrációja. [21]

Ezek a kölcsönhatások az aktív centrumban együttesen hozzájárulnak az aktivációs energia csökkentéséhez, ezáltal növelik a hidrolízis sebességét (9. ábra).



9. ábra. A GTP hidrolízis enegriadiagramjának sematikus ábrája, a Ras, illetve a Ras-GAP katalizálta folyamat esetén.³

A Rho fehérjék családjába tartozó GTPázok krisztallográfiás vizsgálatánál azt is felfedezték, hogy a Rho-GAP fehérjék arginin-ujja csak a hidrolízis átmeneti állapota során veszi fel a rá jellemző katalitikus szerkezetet, ami arra utal, hogy a GTPáz-GAP komplexeknek konformációs változásokon kell keresztülmennie ahhoz, hogy az arginin-ujj a katalízishez aktív központba kerüljön.

Továbbá fontos azt is megemlíteni, hogy a Ras fehérjecsalád tagjaihoz tartozó GAP-ok eltérő szerkezettel rendelkeznek, ezáltal a GTP hidrolízis folyamatát is más úton katalizálják. A fenti példából látható, hogy a Ras és a Rho fehérjékhez tartozó GAP-ok rendelkeznek a katalitikus argininnel, és az arginin-ujj jelenlétével stabilizálják az aktív centrumban jelenlévő molekulákat. Ezzel szemben a Ran és Arf GAP-jai pusztán a Switch régiók stabilizálásával növelik a reakciósebességet. A Rap fehérjék GAP-jai pedig nem arginint, hanem egy katalitikus aszparagint használnak a nukleofil vízmolekula pozícionálására. A GTPázok α -alegységére ható, RGS (regulator of G protein signaling) fehérjék szintén nem rendelkeznek katalitikus argininnel, de mégis képesek a Switch II. régió glutaminjának stabilizálására és a nukleofil vízmolekula helyes pozícionálására. [19]

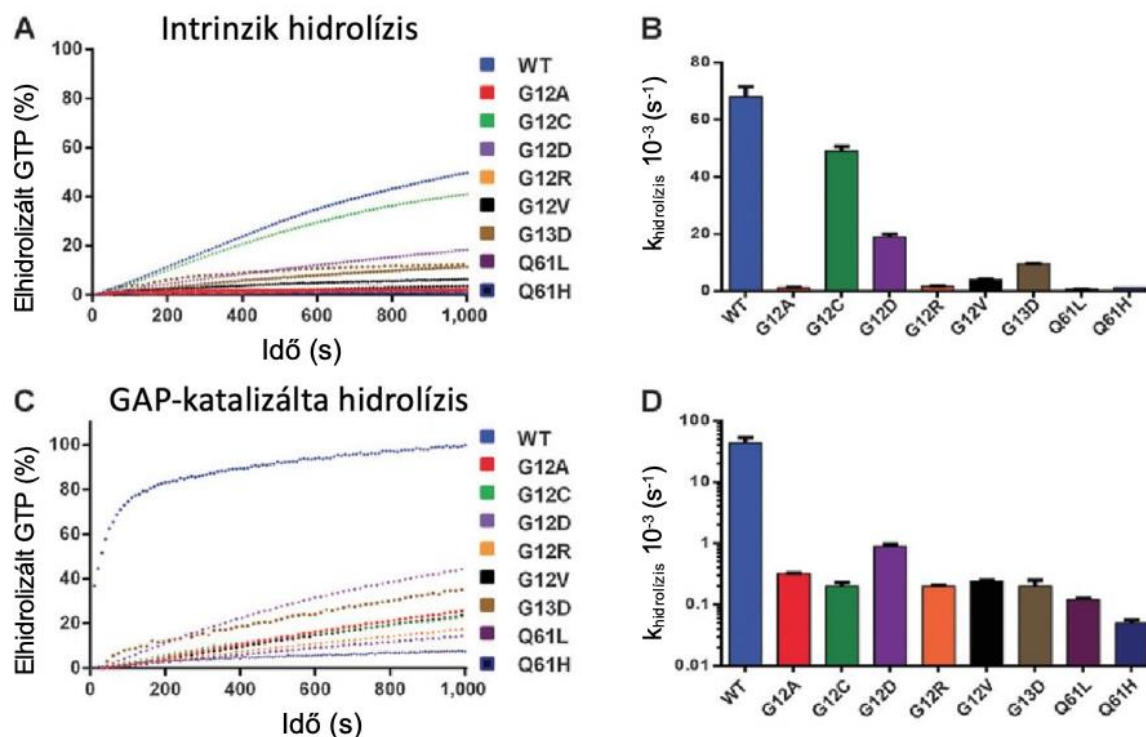
³ https://www.ruhr-uni-bochum.de/biocomp/index_smallGTPases.html

2.3.3. Mutáció hatása a hidrolízisre

A Ras fehérjék mutációja legnagyobb gyakorisággal a 12. glicin, a 13. glicin és a 61. glutamin aminosavakat érinti. Humán daganatos megbetegedésekben a KRas izoformát érintik legnagyobb gyakorisággal ezek az elváltozások [25], emiatt dolgozatomban a KRas fehérjemutációk hidrolízisre gyakorolt hatását fogom bemutatni.

Attól függően, hogy a KRas fehérje melyik aminosavját érinti a mutáció, az a hidrolízis fokára eltérő hatással lehet. A legjellemzőbb mutációk esetén a 12. és 13. glicin bármilyen más aminosavra való kicserélődése erősen csökkenti a hidrolízis sebességét. Ez annak köszönhető, hogy más aminosavak allosztérikus gátlást váltanak ki az aktív centrumban, amely megakadályozza a GAP-ok bekötődését. Emellett a mutáció a KRas intrinzik hidrolízisét is akadályozza. A 61. glutamin más aminosavra való kicserélődése pedig az aktív centrum elektrosztatikus környezetét változtatja meg. [22]

A mutációk hidrolízisre gyakorolt hatását enzimaktivitást mérő módszerek segítségével is igazolták. Hunter és társai méréseiket MESG-PNP foszfát esszé segítségével végezték. Ezáltal információt kaptak arról, hogy a KRas fehérjék intrinzik GTP hidrolízisét miként befolyásolja a GAP fehérjék jelenléte. Emellett belátást nyertek abba is, hogy az egyes mutációk mennyire rontják a GTP hidrolízis sebességét a vad típusú KRas reakciójához képest (10. ábra). [23]



10. ábra. A mutációk, illetve a GAP-ok jelenlétének hatása a KRas GTP hidrolízisére. [23]

2.4. Mutációk a Ras fehérjékben

A Ras fehérjék mutációja a rákos megbetegedések gyakori kiváltó oka. Az szakirodalomban azonban még nem született konszenzus a mutáció gyakoriságát illetően, az idézett értékek 20-30% között változnak. Az eltérő számadatok különböző, nyilvánosan hozzáférhető rákmutációs adatbázisból származnak (GENIE, COSMIC, TCGA, MSKCC és ICGC), melyek összevetésével egy közelebbi képet kaphatunk az egyes daganatok kialakulásának valószínűségéről. [24, 25]

A Ras mutáción alapuló onkogenezis kialakulását és progresszióját három fő tényező közti kölcsönhatás határozza meg. Ezek egymásra való hatása befolyásolja, hogy miért társulnak specifikus Ras izoformák és mutációik különböző ráktípusokhoz.

Az első a 'Ras-dózis', melyet a fehérje expressziós szintje, illetve annak relatív aktivációs állapota határoz meg. Az izoformák kifejeződésének mértéke jelentős különbséget mutat az egyes szövetek között. Azonban az elmondható, hogy a GTP-hez kötött, aktív állapotban lévő, Ras-populáció aránya 30-90% között változik a mutáció típusától függően. A jelátvitel kapacitása emiatt szélsőséges értékeket vehet fel, egyre kisebb esélyt hagyva az optimális Ras-szignalizálás fenntartására. A jelátviteli kapacitás szűk határai idővel megváltozhatnak, ami elősegítheti a tumor progresszióját, illetve az alkalmazott terápiákkal szembeni rezisztenciáját.

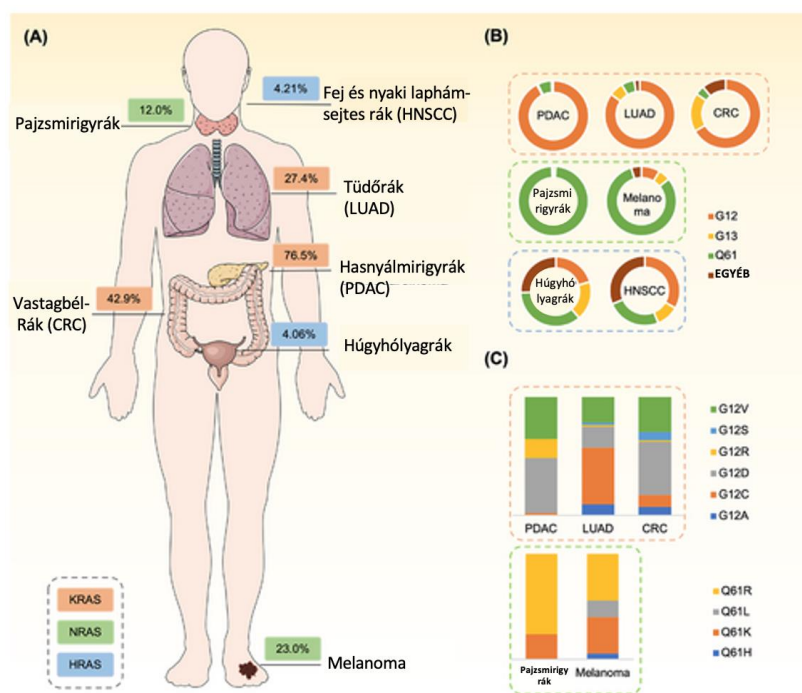
A második faktor jelátviteli útvonalak specifikussága. *In vivo* kísérletek azt bizonyították, hogy a Ras izoformák nem tudják teljesen reprodukálni egymás funkcióit. Ez az izoforma-specifikus szignalizáció az intracelluláris lokalizációnak tudható be, ami a specifikus útvonalakhoz kapcsolja az egyes izoformákat. Ras-Raf kölcsönhatásokat vizsgáló *in vitro* kísérletekben igazolták, hogy a BRAf fehérje kötődése erősen szelektív a KRas-ra, míg a CRAf a HRas fehérjét preferálja a MAPK jelátviteli útvonalban.

A harmadik ok a sejt- és szöveti környezet, amely hozzájárul a genetikai, epigenetikai és proteomikai aspektusokhoz, melyben a Ras-hálózatok jelen vannak. Az így létrejött heterogenitás eltérő proliferációs potenciált eredményezhet, attól függően, hogy az onkogén hatása mekkora az effektor útvonalra.

Ezen tényezők egymásra hatása nemcsak a daganat típusára és progressziójára van hatással, a tumorterápiás technológiák működésére és hatékonyságára is. Az összefüggések megismerése elengedhetetlen a hatékony gyógyszeres kezelés kifejlesztésére. [24]

Az eddigiekben ismertettem, a Ras fehérjecsalád Ras fehérjéinek szerkezetét, enzimátikus működésük folyamatát, a velük kölcsönható fehérjék szerepét és azt, hogy ezáltal miként képesek részt venni a jeltovábbításban, ezzel biztosítani a sejt főbb életfunkcióinak fenntartását. Ez az összetett és jól szabályozott rendszer azonban könnyen felborulhat, ha mutáció éri a fehérjék aktív centrumát.

Az, hogy a mutáció melyik izoforma melyik aminosavját érinti a szövet típusától függ (11. ábra). Az izoforma-variabilitást tekintve a KRas mutációk a rosszindulatú daganatok 14,3%-ában vannak jelen, az NRas mutációk a daganatok 2,5%-ában és legkisebb gyakorisággal a HRas mutációk, az esetek 0,8%-ában. A szervek, amelyeket a leggyakrabban érintenek ezek az elváltozások a hasnyálmirigy, a vastagbél és a tüdő. Ennek ellenére a mutációk hólyagrák, fej-nyakrák és bőrrák formájában is megjelenhetnek. [25]



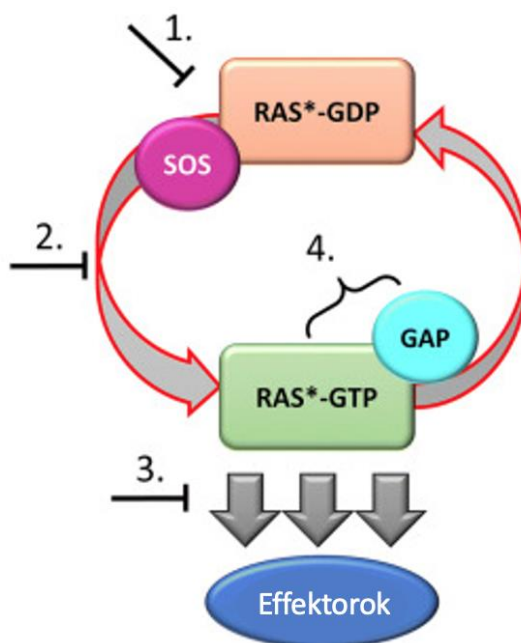
11. ábra. A Ras izoformák mutációjának előfordulása és gyakorisága. [25]

A fehérjék a legnagyobb variabilitást mutató pozíciója a KRas esetén ~78,3%-ban a Gly12, NRas és HRas esetén 58,2%-ban és 29,1%-ban a Gln61 aminosav. KRas mutációja esetén az aminosav glicin helyett leggyakrabban aszparaginsavra (G12D) cserélődik, ezzel gyakran előfordul a hasnyálmirigy duktális adenokarcinómában (PDAC). A glicin ciszteinre (G12C) való kicserélődése a nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC) egyik fő okozója. [25, 26]

2.5. A mutáció helyreállításának módjai

Közel negyven éve fedezték fel a Ras onkogének családját. A fehérjék intenzív biológiai és biokémiai funkcióinak megismerésével elkezdődött az olyan terápiás stratégiák kidolgozása melyek a Ras-okban történt onkogén mutációk helyreállítását célozzák. Központba a KRas leggyakoribb mutációinak (G12D és G12C) helyreállítása került.

A KRas jelátviteli útvonalban betöltött szerepét és a vele kölcsönható fehérjék mechanizmusát figyelembe véve több megközelítés is született a szignalizáció helyreállításának érdekében (12. ábra). Az egyik a GEF-ek (pl. SOS1 fehérje) KRas-hoz való kötődésének akadályozása. Ezáltal a GDP-GTP kicserélődés nem tud végbe menni, így a KRas inaktív, GDP-kötött állapotban marad. A másik lehetőség, hogy a KRas GDP-hez való affinitását megnövelik kovalens inhibitorok segítségével. A bekötődött inhibitorok ezáltal GDP-kötött állapotban rögzítik a KRas-t. Harmadik megközelítés, hogy a downstream effektorok kötődését akadályozzák meg, így gátolva a további jelátvitelt. Végül megoldást jelenthet, ha a GAP fehérjék mutáns KRas-ok való kötődését megnövelik, ezáltal a GAP-ok KRas-hoz való affinitását helyreállítják. [27]



12. ábra. KRas mutáció helyreállításának módjai. [27]

Az *in silico* modellezések, mint például a QM/MM (quantum mechanics/molecular mechanics) módszer segítheti olyan GAP variánsok tervezését, melyek képesek helyreállítani a mutáns KRas fehérjékhez való affinitás erősségét. Egy frissen megjelent publikációban a KRas G12D és G12C mutánsok újra-aktiválásával foglalkoztak, amelynek keretében a

GAP fehérje 190 darab különböző, egy aminosavat érintő mutációját vizsgálták. A QM/MM modellezés révén nemcsak a GAP-katalizálta hidrolízis mechanizmusának egy új megközelítését elemezték, hanem azonosították a csökkent enzimaktivitást helyreállítani képes legígéretesebb GAP mutánsokat is (R903E, L902D, R903D, L902E, T785D). [33]

2.5.1. Inhibitor molekulákkal való kezelés

Az első inhibitor molekulák fejlesztése a KRas G12C mutánsokat célozta meg. A gyógyszerfejlesztést lehetővé tette, hogy a szintetizált kismolekulák irreverzibilis, kovalens kötés kialakítására képesek a mutációban jelen lévő cisztein aminosavval. Jelenleg két ilyen hatásmechanizmusú amerikai és európai uniós gyógyszerészeti hivatal (FDA és EMEA) által engedélyezett készítmény létezik (Adagrasib és Sotorasib). [28]

Napjainkban is nehézséget okoz azonban a G12D és G12V mutánsok megcélzása, mivel azok az aktív centrumban kevésbé reaktív csoportokat tartalmaznak, amiktől a gyógyszermolekulák specifikus kötődése is nehezen megoldhatóvá válik. Ezért egy alternatív megközelítés szükséges. Az újonnan fejlesztett MRTX1133 gyógyszerjelölt például nem-kovalens módon képes a KRas Switch II. régiójához kapcsolódni, ezzel megakadályozva a nukleotid-kicserélődést és a Raf effektor kapcsolódását főként a G12D mutáns KRas fehérje esetében. Több ilyen elven működő KRas G12D mutáció specifikus inhibitor is elérte a klinikai vizsgálatok stádiumát. [26, 30]

Érdemes lenne azonban egy olyan szelektív inhibitor kifejlesztése, amely a KRas mutációk teljes spektrumát célozza, miközben a normál sejtekben megóvjá a jelátvitelt, emellett kedvező terápiás indexszel is rendelkezik. Egy ilyen panKRas-szelektív inhibitor a BI-2865 és analógja a BI-2493, melyet már *in vivo* tanulmányokban is vizsgáltak. A BI-2865 a KRas mutánsok jelentős részére hatással van, közülük kiemelve a G12D, G12V és G12C mutánsokat. A mutáció-specifikus gátlószerekkel szemben rezisztencia alakulhat ki a daganatos sejtekben, ami miatt a másodlagos KRas mutációk kialakulásának is megnő az esélye. Ezzel szemben a panKRas inhibitorokban ez a jelenség még nem volt tapasztalható. Érdemes azonban megjegyezni, hogy a panKRas inhibitorok vad típusú KRas-ra gyakorolt inhibíciós hatásának terápiás következménye jelenleg még ismeretlen. [26]

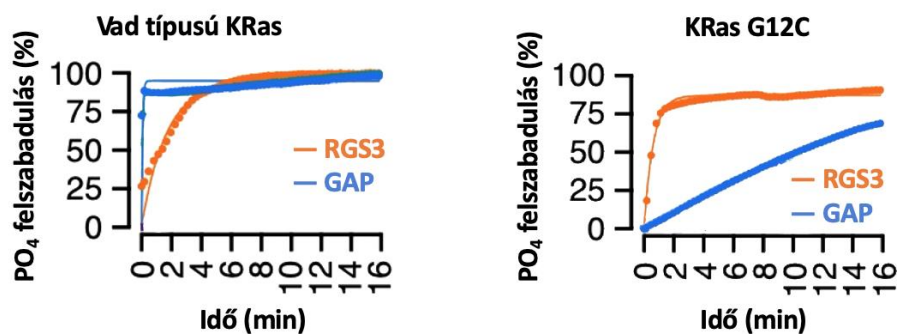
2.6. Egy új GAP fehérje felemelkedése

Az RGS (regulator of G protein signaling protein) fehérjék szerepe a kis GTPáz-ok által szabályozott jelátvitel gyors leállításában van. Az RGS fehérjék felfedezésével megkezdődött

azok karakterizálása, amivel fény derült a fő molekuláris mechanizmusra, ami az RGS és a G-domén között lejátszódik. Jelenleg már több, mint húsz különböző RGS fehérjét izoláltak és vannak arra utaló jelek is, hogy specifikus RGS fehérjék specifikus G-fehérje kapcsolt receptor útvonalakat szabályoznak.

A fehérjék felfedezése egy 130 aminosavat tartalmazó homológ domén azonosításával indult, melyet több fehérjében közel egy időben definiáltak. A G-fehérje kapcsolt receptor útvonalakra való hatását az RGS1, RGS2, RGS3 és RGS4 fehérjéknél figyelték meg, miszerint ezek képesek voltak kompenzálni a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) interleukin 8 (IL-8) általi aktiválódását. [31]

Az RGS3 fehérje GAP-jellegű természetére egy KRas G12C inhibitorokat vizsgáló tanulmány során is fény derült. A kutatásban mutáns G12C szelektív gátlószereket vizsgáltak, melyek GDP-kötött állapotban kötődnek a KRas-hoz. Azt várták, hogy a gyógyszeres kezelés hatása lassan fog érvényesülni, mivel a KRas G12C mutációja gátolja a GAP-ok általi aktivációt, ami azt jelenti, hogy a γ -foszfát lehasításának sebessége és ezáltal a KRas GDP-kötött állapotának kialakulása a KRas intrinzik hidrolízisének sebességéhez lesz közeli. Azonban a kovalens inhibitorok tesztelésénél a várt, intrinzik hidrolízis sebességénél gyorsabb reakciót figyeltek meg. Ez arra engedte következtetni a kutatókat, hogy a GAP-ok mellett más fehérjék is jelen vannak a sejtben, melyek képesek voltak javítani a mutáns KRas enzimaktivitását. Annak érdekében, hogy megismerjék ezt a fehérjét méretkizárásos és anioncserélő kromatográfiát, valamint tömegspektrometriás lépéseket alkalmaztak. A KRas G12C mutációt hordozó sejtekből elválasztották a fehérjét majd megvizsgálták, hogy melyek képesek kölcsönhatásba lépni a KRas G12C fehérjével és aktiválni annak hidrolitikus hatását. Azonosították, hogy a hatásért az RGS3 fehérje felelős, amely a Ras-GAP-okkal ellentétben nem rendelkezik a katalitikus arginin-ujjal, hanem egy aszparagin felelős a hidrolízis aktivációjáért. A fehérje két RGS-GAP domént tartalmazó izoformáját vizsgálták, egy nagyobb, 75 kDa nagyságú (p75) és egy kisebb, 25 kDa nagyságú (p25) variánst. Azt találták, hogy ezek a leggyakrabban előforduló G12 mutáns a KRas fehérjék esetében (G12C, D és V) jelentős aktivációra képesek a Ras-GAP-okhoz képest (13. ábra), azonban hatékonyságuk vad típusú KRas esetében néhány nagyságrenddel elmarad a Ras-GAPokétól. [32]



13. ábra. A vad típusú és a G12C mutáns KRas-ok hidrolízisének változása különböző GAP-ok és az RGS3 fehérje jelenlétében.

Összefoglalásként elmondható, hogy a Ras fehérjék optimális működése elengedhetetlen a megfelelő sejtbioológiai folyamatok fenntartásához. Habár egy több évtizede kutatott téma, a Ras, és főként a KRas mutációira potenciális rákterápiás módszert még nem sikerült kidolgozni. Annak érdekében, hogy a daganatos megbetegedéseket kezelni tudjuk elengedhetetlen a mutációk közelebbi megismerése, valamint a kölcsönható partnerek hidrolitikus mechanizmusainak feltárása. Ezek az ismeretek inspirálhatják új gyógyszerek kifejlesztését, új megközelítések születését, ezzel egy alkalmas módszert biztosítva az onkogén KRas mutációk kezelésére.

3. Célkritizálás

A humán daganatos megbetegedések több, mint 20%-ának kiváltó oka a Ras gén funkcióvesztéssel járó mutációja. [25] A Ras fehérjecsald tagjai a KRas fehérjék, amelyek GTPáz aktivitásuknak köszönhetően képesek a jelátviteli útvonalak szabályozására, ezáltal részt vesznek a sejtek proliferációs és osztódási folyamatainak irányításában. A fehérje GTP-kötött állapotában aktívan képes a jelátvitelre, a nukleotid hidrolizálásával pedig GDP-kötött, inaktív formába kerül. Ezt a folyamatot segítik a GAP (GTPase activating protein) fehérjék, melyek nagyságrendekkel képesek megnövelni a GTP GDP-vé történő átalakítását. A KRas fehérjék aktív centrumában történt mutáció esetén azonban a KRas-GAP közti kölcsönhatás legyengül, ami gátolja a sejtprogramok megfelelő működését, így az kontrollálatlan sejtosztódáshoz és daganatos megbetegedések kialakulásához vezet. [4] Ezen elváltozások gyógyítása napjainkban is kihívást jelent az orvostudomány számára. A közelmúltban felfedezték, hogy az RGS3 fehérje képes a mutáns KRas fehérjékhez is kötődni és a GAP-nál nagyobb mértékben aktiválni azokat, azonban fiziológiai működést ez sem képes visszaállítani. [32]

A KRas jelátvitel helyreállítására már több megközelítéssel is törekednek, az inaktív GDP-kötött állapotot rögzítő kismolekulás terápiát már alkalmazzák is az orvosi gyakorlatban. Azonban a kezdeti tapasztalatok azt mutatják, hogy ezen kezelés hatására viszonylag gyorsan rezisztencia alakul ki a daganatokban. [26, 28] Ezért a KRas mutációt hordozó sejtek működésének helyreállításához további kutatások és új megközelítések szükségesek. A KRas mutánsok és a GAP, illetve RGS3 fehérjék kölcsönhatásának vizsgálatával új hatásmechanizmusú KRas jelátvitelt szabályozó molekulák fejleszthetők. Kutatásom során célom ezeknek a kölcsönhatásoknak a vizsgálata.

Kulcsfontosságú szerepe ellenére a KRas GAP katalizálta hidrolízisének mechanizmusa még jelenleg sem tisztázott. Egy kollaboráció keretén belül munkatársaim *in silico* QM/MM szimulációkkal felállítottak egy modellt, amelynek segítségével szisztematikusan olyan GAP mutánsokat terveztek, amik képesek voltak aktiválni a leggyakrabban előforduló KRas mutánsokat (G12C és G12D). Annak érdekében, hogy ezt a modellt a gyakorlatban is próbára tegyem bakteriális expresszióval előállítottam a KRas G12D fehérjét, illetve a szimulációval kapott legígéretebb GAP variánsokat (L902E, L902Q, R903A és R903Q).

A segédfehérjék hidroláz aktivitásra gyakorolt hatását MESG-PNP enzimaktivitásmérő esszé segítségével követtem nyomon.

Kutatásom részét képezte az RGS3, GAP-jellegű fehérje KRas G12D-re gyakorolt hatásának vizsgálata. Ehhez az RGS3 fehérje egy rövidebb doménját bakteriális expresszióval termeltettem, majd a fehérje KRas általi hidrolízisére gyakorolt hatását foszfát-esszével követtem nyomon. Emellett kölcsönhatásukat is megvizsgáltam bioréteg interferometriával, valamint egy új mérési elrendezést is létrehoztam. Ehhez a szükséges RGS3 konstruktot előállítottam, majd a gyakorlatban is teszteltem. Végül kísérletet tettem a KRas-RGS3 fehérje komplex kristályosítására.

4. Kísérletek és módszerek

4.1. Kompetens sejtek készítése

A kompetens baktériumsejtek jellegzetes tulajdonsága, hogy képesek idegen DNS-t, például plazmidokat felvenni környezetükből. Némely baktériumok természetesen rendelkeznek ezzel a tulajdonsággal, azonban kompetens sejteket mesterségesen is létre lehet hozni. Ez megtörténhet elektroporézis vagy kémiai kezelés útján. Mindkét megközelítés lényege, hogy a sejtfalon apró nyílások keletkezzenek, amin később az extra-kromoszómális DNS be tud jutni a sejt belsejébe, anélkül, hogy ez a folyamat elpusztítaná a sejtet.

Érdemes aszerint megválasztani a kompetens sejtet, hogy azt később milyen célra szeretnénk felhasználni. A laboratóriumi gyakorlatban leggyakrabban az *Escherichia coli* törzsek valamelyikét alkalmazzák. Klónozáshoz alkalmas az *E. coli* XL1 Blue törzs, mivel nagy hozamban képes jó minőségű plazmid DNS előállítására. Előnye, hogy endonukleáz (endA) hiánya miatt a DNS izolálása során azt nem károsítja, valamint rekombinááz (recA) hiányában javítja a plazmid DNS stabilitását. Emellett a hsdR mutációja megakadályozza a klónozott DNS hasítását az EcoK endonukleáz rendszer gátlásával. Az XL1 Blue tetraciklin rezisztenciával rendelkezik, amely biztosítja, hogy a tápközegben csak tetraciklin szelekciós markerrel rendelkező baktériumok szaporodjanak el. Fehérjeexpresszió esetén érdemes az *E. coli* BL21 (DE3) vagy a belőle kialakított Rosetta (DE3) törzs használata. A Rosetta a BL21 törzsből származik, arra tervezték, hogy képes legyen az *E. coli*-ban ritkán használt kodonokat tartalmazó eukarióta fehérjék expressziójának fokozására. A BL21 sejtek nem hordoznak antibiotikum rezisztencia gént, míg a Rosetta sejtek klóramfenikol rezisztenciával rendelkeznek.

A kompetens sejtek készítésének protokollja a használt szelekciós antibiotikumot leszámítva ugyanaz a különböző *E. coli* törzseknél, ezért az előállítás módját az XL1 Blue sejtek példáján mutatom be.

Steril körülmények között az XL1 Blue törzsből előkultúrát készítettem, amihez 5 ml LB (Luria-Bertani) tápoldathoz hozzáadtam 5 µl (12,5 mg/ml) tetraciklint és a baktériumsejteket. Ezt egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltam rázatás mellett 175 rpm-en. A méretnöveléshez 50 ml LB tápoldathoz hozzáadtam 50 µl (12,5 mg/ml) tetraciklint, valamint az előkultúra 500 µl-ét. Ezt minimum 2 órán keresztül addig inkubáltam 37 °C-on, 175 rpm-es rázatás mellett, amíg a sejtek optikai denzitása 600 nm-en (OD₆₀₀) el nem érte a 0,3-0,6 közötti értéket. A sejtes oldatot ezt követően egy steril centrifuga csőben leülepítettem 3600 rpm-en, 4 °C-on, 20 perc alatt. A sejtekről a felülúszót leöntöttem és a centrifugálás után keletkezett

sejtsapadékat 10 ml TBF I. oldatban (100 mM RbCl, 50 mM MnCl, 10 mM CaCl₂, 30 mM KOAc, 15% glicerín, pH=5,8) felszuszpendáltam. A TBF I. oldatban jelenlévő sók biztosítják, hogy a DNS és a foszfolipid kettősréteg negatív töltései neutralizálódjanak, ezzel segítve a membrán és a DNS összetapadását. A sejtsuszpenziót ezután jégen inkubáltam 20 percen át, majd ismét lecentrifugáltam 3600 rpm-en, 4 °C-on, 20 perc alatt. A felülúszót eltávolítottam és a sejteket felszuszpendáltam 1 ml TBF II. oldatban (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂ és 15% glicerín, pH=6,8). Ezt a szuszpenziót 20 percig jégen inkubáltam.

A kompetenssé tett sejteket nem szükséges azonnal felhasználni, alikvotokban szétosztva hosszabb távon is tárolhatóak -80 °C-on. Ehhez az 1 ml térfogatú sejtsuszpenzióhoz 350 µl 50%-os glicerint adtam, majd ezt óvatosan homogenizáltam. Végül a sejteket 80-100 µl-es térfogatra szétosztottam és folyékony nitrogénben lefagyasztottam.

4.2. Vizsgálni kívánt fehérjék előállítása

Kutatásom során a vizsgálni kívánt fehérjéket bakteriális expresszió felhasználásával állítottam elő és affinitás kromatográfiás módszer segítségével tisztítottam. Emellett mutagenézis felhasználásával egy új DNS konstruktot is létrehoztam, melyet szintén termeltem és tisztítottam. Ezen fehérjék összegzése az alábbi táblázatban látható.

	KRas fehérjék	GAP fehérjék	RGS3 fehérjék
Expresszált és tisztított fehérjék	wt KRas, KRas G12C, KRas G12D, wt KRas-AviTag, KRas G12C-AviTag, KRas G12D-AviTag	wt GAP, GAP R903A, GAP R903Q, GAP L902D, GAP L902E, GAP L902Q	RGS3-cryst
Fehérjét kódoló plazmid előállítása, a fehérje termelése és tisztítása	-	-	AviTag-RGS3-cryst

1. táblázat. Az általam előállított fehérjék összegzése.

4.3. Hisztidin-taggal rendelkező fehérjék előállítása és tisztítása

4.3.1. Plazmid transzformálása kompetens sejtekbe

A mutagenézissel és klónozással megelőzően előállított DNS konstruktokat pET-15b bakteriális expressziós vektor segítségével juttattam be kétféle fehérjetermelő *Escherichia coli* törzsbe, a Rosetta (DE3)-ba és a BL21 (DE3)-ba.

A transzformálást azzal kezdtem, hogy a jégen inkubált 70 µl kompetens sejthez hozzáadtam 1 µl-t a megfelelő plazmid oldatból. Ezután folytattam a jégen történő inkubálást 30 percen keresztül. Ezt egy 42 °C-os, 1 percig tartó hősokk követte és a minták ismét visszakerültek jégre, 2 percig. Ezt követően a sejtekhez 200 µl LB tápoldatot adtam, majd rázatógépben 175 rpm-en, 37 °C-on 1 órán át inkubáltam. Az így létrejött sejtuszpenziót a termelő törzsnek, valamint a plazmidnak (5 µl, 50 mg/ml karbenicillin) megfelelő szelekciós antibiotikumokkal ellátott 5 ml-es LB tápoldatba pipettáztam és ezt egy éjszakán át inkubáltam 37 °C-on, 175 rpm-es rázás mellett.

A felszaporodott sejtek 1 ml-ét 250 µl 80%-os glicerinnel felszuszpendáltam és nitrogénben lefagyasztottam, hogy később ebből előbb el tudjam indítani a fehérjetermelést.

4.3.2. A fehérjék expressziója

A transzformálással létrehozott előkultúra 1-1 ml-ét hozzáadtam 2 db 0,5 literes LB tápoldathoz és rázatógépben 175 rpm-en 37 °C-on kevertettem őket. A sejtszaporulat nyomon követésére óránként mintát vettem a sejt kultúrából és megnéztem annak optikai denzitását 600 nm-en (OD_{600}), mivel ez az érték arányos a sejtek mennyiségével az oldatban. Amikor az OD_{600} eléri a 0,4-0,6 értéket, az az exponenciális növekedési fázis egy optimális szakaszát jelöli, ekkor a sejtek mennyisége egy generációs idő leteltével duplázódik, mivel ebben a fázisban elegendő hely és szubsztrát is rendelkezésre áll a növekedésre. Az indukciót is érdemes ebben a fázisban végezni a megfelelő fehérjehozam elérése érdekében. Az exponenciális fázis a végén egy sűrű sejt populáció fog keletkezni, amelyben a sejtek a rendelkezésre álló hely- és szubsztrátlimitáció miatt képtelenek lesznek a további szaporodásra, hanyatló fázisba lépnek, ahol egy részük elpusztul. Ekkor a már a megfelelő mennyiségű és minőségű fehérje termelésére sem lesznek képesek. Az exponenciális fázist megelőző időszakban pedig túl kevés sejt van jelen ahhoz, hogy elegendő mennyiségű fehérje termelésére legyenek képesek.

A termelni kívánt fehérjét kódoló gének pET expressziós vektorba lettek elhelyezve. Ez a vektor tartalmaz egy *lac* operátort és egy T7 promótert is. Alap esetben az operátor

régióhoz egy represszor kapcsolódik, amely megakadályozza az RNS-polimeráz kapcsolódását, így gátolja a fehérje átíródását. Azonban az enzimek által nem emészthető laktóz analóg hozzáadásával az sejtbe jutva megváltoztatja a represszor fehérje szerkezetét, ami ezáltal disszociál a plazmidról. Így a DNS-hez már hozzá tud kötődni a T7 RNS polimeráz, ami képes lesz nagy mennyiségű fehérje termelésére. Az indukcióhoz 250 µl 1 M-os izopropil-β-D-tiogalaktozidot (IPTG) adtam a sejt kultúrához és ezt 18 °C-on 175 rpm-es rázatás mellett inkubáltam egy éjszakán keresztül.

Az indukció előtt és az indukciót követő napon is mintát vettem a sejtsuszpenzióból, hogy azt később fel tudjam használni az SDS-PAGE gélelektroforézis során.

4.3.3. Az expresszált fehérjék izolálása a baktériumsejtekből

Az inkubáció után a sejtsuszpenziót 4000 rpm-en, 4 °C-on, 40 perc alatt centrifugában leülepítettem, majd az így elválasztott felülúszót leöntöttem a leülepített sejtekről. Ezeket a sejteket aztán 40 ml sejteltávolító pufferben (200 mM NaCl, 50 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, pH=7,5) szuszpendáltam vissza. A szuszpenzióhoz adtam még 1 db elporított proteáz-gátló tablettát is, annak érdekében, hogy a sejteltávolítás során jelenlévő proteázok ne károsítsák a célfehérjét. Ezt Potter Elvehjem eszköz segítségével homogenizáltam, emellett az eszközben létrejövő nyíróerő hatására a sejtek lízisét is megkezdtem. A homogén elegyet 6×1 percig szonikáltam, aminek hatására a sejtfal és a membrán roncsolódott, így az intracellulárisan termelődött fehérjék az oldatba kerültek.

4.3.4. Fehérjék tisztítása nikkel affinitás kromatográfiával (Ni-NTA)

A sejteltávolítás során keletkezett lizátumot ismét lecentrifugáltam 10000 rpm-en, 4 °C-on, 40 percen keresztül, majd a létrejött felülúszóval dolgoztam tovább. Az affinitáskromatográfiához 3 ml-es nikkel-nitrilotriecetsav (Ni-NTA) oszlopot használtam. A tisztítani kívánt fehérjék mind polihisztidin-taggal (6xHis-tag) voltak ellátva, amely biztosította a specifikus elválasztást, mivel a hisztidin imidazol gyűrűi képesek voltak komplexet képezni az immobilizált nitrilotriecetsavhoz kötődő Ni²⁺ ionokkal. Ezt követően a gyantáról történő elúciót egyre növekvő imidazol-koncentrációjú oldatokkal végeztem. Ennek hatására a pufferben lévő imidazol leszorította a gyantán megkötődött fehérjéket.

A gyantát használat előtt ekvilibrálni kellett, amihez először desztillált vízzel, majd a fehérje feltáráshoz használt pufferrel mostam az oszlopot. Ezután óvatosan, kis mennyiségekben felvittem a fehérjét tartalmazó felülúszót az oszlopra. A gyantát ismét 15 ml

sejtfeltáró pufferrel mostam, majd 15 ml, 25 mM imidazolt tartalmazó feltáró pufferrel. Ezeknek a lépéseknek a célja az volt, hogy a gyantán aspecifikusan megkötődött szennyeződések és fehérjéket eltávolítsam. Az elúció két lépésben történt, mindkét esetben 10-10 ml, 250 mM imidazolt tartalmazó feltáró pufferrel. Végül, kb. 15 ml, 1 M-os imidazollal tisztítottam az oszlopot, hogy az esetlegesen a gyantán maradt összes szennyeződést el tudjam távolítani. A gyantát a következő használatig 20%-os etanol oldatban, hűtőben tároltam.

A tisztítás során a gyantán áthaladt oldatok fehérjetartalmát Bradford-módszerrel ellenőriztem. A fehérjetartalom nyomon követésének alapja, hogy a Bradford-reagensben található Coomassie festék fehérje jelenlétében kék színreakciót ad. A gyanta tisztítását addig folytattam, amíg az oszlopról távozó folyadék már képtelen volt elszínezni a reagenst. A reakcióhoz a feltáró pufferrel 5×-re hígított Bradford reagens 20 µl-éhez 5 µl-t adtam az oszlopról származó oldatból.

Az oszlopon áthaladt oldatokat mosási lépésenként külön gyűjtöttem. Ezeket a mintákat később SDS-PAGE gélen megfuttattam, így a vizsgálat eredményéből meg tudtam határozni, hogy melyik minta tartalmazta a legnagyobb mennyiségben a célfehérjét. Ezt az oldatot dializáltam a következő lépésben.

4.3.5. A fehérjék dialízise

Az elúció során kapott, tisztított fehérjét tartalmazó oldatot ezt követően dializálni kellett, hogy a fehérje mellől a kismolekulás szennyeződések eltávolodjanak. Legfőképpen az affinitás kromatográfiánál felhasznált imidazol eltávolítása volt a célom, mivel az hosszú távon az oldatban maradvá káros a fehérje számára.

Ehhez összeállítottam a dialíziszsákot, majd a dialízismembránba beletöltöttem a célfehérjét tartalmazó elúciós oldatot. Emellett elkészítettem a dialízis puffert is, amelynek végtérfogata 2 liter volt és szintén a sejtfeltáró puffert tartalmazta. A dialíziszsákot ezután óvatosan beletettem a puffert tartalmazó mérőedénybe, majd a puffert 4 °C-on egy éjszakán át folyamatosan mágneses keverő segítségével kevertettem. Másnap a dializált oldat koncentrációját Nanodrop eszköz segítségével ellenőriztem, a fehérjemintákat 1-1,5 ml-es porciókban Eppendorf csövekbe szétosztottam és további felhasználásig -80 °C-on tároltam.

4.4. AviTag-es fehérjekonstruktok előállítása

A fehérjét kódoló géneket pET-15b vektor tartalmazták, az affinitás kromatográfiás elválasztás érdekében C-terminális végükön polihisztidin-taggel rendelkeztek. Azonban, hogy a fehérjéket később fel tudjam használni bioréteg interferometriás vizsgálatok során szükséges volt azok biotinálása. Annak érdekében, hogy a biotin molekulákat hozzá tudjam kötni a fehérjékhez, azok N-terminális végéhez egy AviTag-et kapcsoltam, inzerciós mutagenézis segítségével.

4.4.1. Primerek megtervezése

A primereket a NEBaseChanger program segítségével terveztem meg. Ehhez megadtam a fehérje szekvenciáját, majd azt, hogy milyen mutációt szeretnék rajta végrehajtani. Mivel az AviTag szekvenciáját (GLNDIFEAQKIEWHE) szerettem volna bevinni a plazmidba, így a szubsztitúciót választottam. A program ezután megadta a forward és reverse primerek szekvenciáját, az olvadási (T_m) és az annelációs (T_a) hőmérsékletüket. Ennek eredményét a SnapGene programban ellenőriztem, illetve grafikusan is megjelenítettem.

4.4.2. Mutagenézis PCR

Ahhoz, hogy a primerek segítségével be tudjam vinni az AviTag szekvenciáját a fehérje szekvenciájába PCR reakciót használtam. Ehhez először a PCR mix-et kellett elkészítenem. Ez tartalmazott 25 μ l Q5[®] Master Mixet, 18 μ l nukleáz mentes vizet, 2,5-2,5 μ l-t a 100 μ M koncentrációjú primerekből, valamint a 30 ng/ μ l-es templát DNS 2 μ l-ét. Az 50 μ l végtérfogatú oldatot ezt követően 10 μ l-ként szétosztottam és behelyeztem a PCR készülékbe, amely képes volt gradiens PCR elvégzésére is, ezáltal öt különböző annelációs hőmérséklettel tudtam lejátszani a reakciót.

A PCR reakció paraméterei:

Ciklusok száma	Hőfok (°C)	Időtartam (s)	Lépés
1×	98	30	Iniciáció
25×	98	10	Denaturáció
	gradiens (61-69 °C)	20	Anneláció
	72	160	Polimerizáció
1×	72	120	Végső extenzió
-	4	-	Minta tárolása

2. táblázat. A PCR reakció paraméterei.

4.4.3. A PCR termék analízise

A PCR reakció termékeit ezt követően 1%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. Az agaróz gél 15 ml TAE puffert (0,4 M TRIS-acetát, 0,01 M EDTA, pH=8,3), 112,5 mg agarózt tartalmazott. Ezt az oldatot mikrohullámú sütőben addig melegítettem óvatosan, amíg az agaróz teljesen fel nem oldódott benne. Az elpárolgott puffert pótoltam, majd hideg víz alatt kézmelegre hűtöttem. Ezt követően 1,5 µl GelRed DNS festéket adtam az oldathoz és ismét elkevertem. A festék molekulái képesek interkalálódni a nukleinsav szálai közé és fluoreszcens jelet adnak UV fényvel való megvilágítás hatására. A sűrűn folyó folyadékot egy fésűvel ellátott formába töltöttem, ügyelve arra, hogy az vízszintes felületen legyen és kb. 20 perc alatt hagytam a gél megcsilárdulni. A megcsilárdult gélből a fésűt óvatosan eltávolítottam, majd felvittem bele az előkészített mintákat.

A PCR-rel nyert minták 5-5 µl-hez 1 µl 6× hígított Loading Dye-t adtam, hogy a minták előrehaladását követni tudjam a gélen. Markerként a minták mellett 3 µl GRS ladder 1kb-t is futtattam, aminek ismert nagyságú fragmentumai segítettek beazonosítani a PCR termék összetételét. Az elektroforézis 100 V-on kb. 60 percen keresztül történt, TAE futtatópufferben.

A gélen látható eredményt UV fényben hívtam elő, így meg tudtam állapítani, hogy melyik mintában zajlott le megfelelően a reakció és melyik tartalmazta a legkevesebb mellékterméket. A legígéretesebb mintával folytattam a munkát.

4.4.4. A PCR termék kezelése

A legjobbnak tűnő PCR terméket KLD enzim-mixszel kezeltem. Ez kiváltotta az egymást követő foszfatázos kezelést, ligálást és a templát emésztését, ezzel lerövidítve a folyamatot. Az enzim-mix kinázt, ligázt és Dpn1-et tartalmazott.

5 µl KLD reakció pufferhez (2×) hozzáadtam 3 µl nukleáz mentes vizet, 1 µl-t a PCR termékből és végül 1 µl-t a KLD mix-ből. Az oldatot óvatosan felfuszpendáltam, majd szobahőmérsékleten inkubáltam 10 percen keresztül.

4.4.5. PCR termék transzformálása kompetens sejtekbe

A KLD mix-es kezelést követően a plazmidot *E. coli* XL1Blue kompetens sejtbe transzformáltam a fent ismertetett módon. Azonban az 1 órás, 37 °C-on történő inkubáció után a sejteket nem 5 ml-es tápoldatba oltottam át, hanem agarózt tartalmazó LB-tápközegen szélesztettem.

Ehhez először az előre elkészített és sterilizált 50 ml-es tápközeget mikrohullámú sütőben felmelegítettem, majd hideg folyóvíz alatt kézmelegre hűtöttem, ezután hozzáadtam a megfelelő szelekciós antibiotikumokat. A tápoldatot kb. 3 mm vastagon steril Petri-csészékbe osztottam szét, majd hagytam őket megszilárdulni. Az inkubáció során felnőtt sejt kultúrát steril szélesztőgyöngyök segítségével eloszlatam az táplemez felületén és egy éjszakán át 37 °C-on növesztettem.

4.4.6. Plazmidizolálás

A táplemezen felnőtt telepek közül 2-3 darabot kiválasztottam és azokat külön-külön a megfelelő antibiotikumot tartalmazó 5 ml-es LB tápoldatba juttattam. A sejteket 175 rpm-es rázatás mellett egy éjszakán át 37 °C-on növesztettem.

A felszaporodott sejtek DNS-ét Nucleo Spin Plasmid Kit felhasználásával izoláltam. A plazmid koncentrációt NanoDrop készülék segítségével ellenőriztem, valamint a létrehozott plazmid szekvenciáját a MicroSynth cégnél ellenőriztettem. A megfelelő plazmidok alkalmasak voltak arra, hogy Rosetta és BL21 törzsekbe transzformáljam őket. A transzformálás folyamata megegyezik a fent bemutatott lépésekkel.

4.4.7. Nukleinsav koncentráció ellenőrzése

Az izolált plazmid koncentrációját NanoDrop készülék segítségével határoztam meg. A műszer használatának előnye, hogy kis térfogatú (1-10 µl) mintából is képes a DNS, RNS, valamint fehérje koncentráció megállapítására. A szerkezet maga egy spektrofotométer, amely különböző hullámhosszon képes vizsgálni a minták elnyelését. Nukleinsavak koncentrációjának megmérése esetén 260 nm-es hullámhossz használata a javasolt, mivel a purin- és pirimidingyűrűknek az elnyelési maximuma ott van. A készülék emellett meghatároz egy A_{260}/A_{280} arányt is, amely azt mutatja, hogy a fehérjék mennyire szennyezték be az oldatot, valamint egy A_{260}/A_{230} arányt is, amely a kismolekulás szennyezésre utal. Ha az A_{260}/A_{280} érték 1,8-2 között van, a A_{260}/A_{230} pedig 1,4-2 között, akkor az izolátum tisztasága megfelelő.

4.4.8. AviTag-es fehérjék termelése és biotinálása

A biotinálásra több lehetséges módszer is létezik. Abban az esetben, ha a fehérjét kódoló plazmid rendelkezik a biotin ligáz fehérje génjével, akkor nemcsak a célfehérje, hanem a ligáz is kifejeződik a termelés során, így a tápoldathoz adott biotinnal a folyamat lejátszódik.

Egy másik módszer a biotinálásra, hogy a célfehérjét, illetve a biotin ligáz fehérjét külön termelő törzsekben expresszáljuk. Ekkor a sejtek együttes feltárásával a fehérjék képesek kölcsönhatásba lépni egymással, és a lízis pufferhez adott biotin képes lesz kapcsolódni az AviTag-hez. A laboratóriumi munkám során is ezt a megoldást alkalmaztam. Az *E. coli* AVB101 törzs *birA* génje IPTG-vel való indukálás hatására képes a biotin ligáz fehérjét overexpresszálni, így alkalmas a ligálás elvégzésére.

Az AviTag-es, illetve a ligáz fehérjék termelésének folyamata a fent ismertetett módon zajlott. A feltárás során a két baktériumtörzsből származó sejtpelletet összeszuszpendáltam 50 ml feltáró pufferben, amihez ezúttal nemcsak proteáz-gátló tablettát, hanem 50 μ M biotint is adtam. A sejtek lízise, valamint a fehérjetisztítás lépései ezt követően megegyeztek a már bemutatott módszerekkel.

4.5. Fehérje analitikai módszerek

4.5.1. Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A fehérjetermelés, illetve a fehérjetisztítás során vett minták minőségi és mennyiségi analízisét nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) végeztem. A módszer alapja, hogy a denaturált fehérjéket tömegük alapján képes elválasztani. A denaturálás szerepe, hogy a fehérje alakja és töltése ne befolyásolja a szeparációt. Ehhez a fehérjemintákat nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) és ditriotreitolt (DTT) tartalmazó oldattal kezeltem. Az SDS a fehérjékhez aspecifikusan kötődik, kitekeri azokat és ionos tulajdonsága miatt egy közel egységes negatív töltést biztosít a fehérjéknek. A DTT redukálószerként szolgál az oldatban, amely segítette a diszulfid hidak felbontását, ezáltal a lánc letekeredését. A linearizációt segíti emellett a minták hőkezelése is. Az előkészített mintákat ezután felvittem a poliakrilamid gélre, melyben egyenáram hatására a negatív töltésű fehérjék a gél pozitív pólusa felé haladnak. Ennek sebességét a fehérjemolekulák mérete fogja meghatározni, a kisebb molekulák gyorsabban áthaladnak a poliakrilamid térhálós szerkezetén, mint a nagyobb tömegűek. A futtatás befejezésével a gélen elválasztott mintákat a fehérjemolekulákhoz kötő festékkel lehet láthatóvá tenni. A célfehérjék beazonosítását segíti a minták mellett futtatott marker, mivel a benne található fehérjék méretének ismeretében meghatározható a mintákban lévő fehérjék mérete.

A fehérje expressziója és tisztítása során 20 μ l-es mintákat vettem az oldatokból. Ezekhez hozzáadtam 5-5 μ l-t az SDS mintakotélból (62,5 mM TRIS, 25% glicerin, 2% SDS, 0,01% brómfenolkék, 350 mM DTT, pH=6,8) és homogenizáltam őket. Ezután a mintákat

5 percig 95 °C-on inkubáltam. Ezt követően a mintákat, illetve 3 µl-t a GRS Protein Marker MultiColour (Plus) fehérjemarkerből felvittem az akrilamid gél zsebeibe. A gél felül egy 4%-os tömörítő gél tartalmazott, ami arra szolgált, hogy a futtatásnál a fehérjék ugyanabból a távolságból ugyanabban az időben kezdjék a 12%-os szeparáló gélben történő elválasztást. Az elektroforézis puffer szintén tartalmazott SDS-t, ami megakadályozta, hogy a lineáris fehérjék szerkezete visszaalakuljon. Az elválasztás 200 V-on, 40 percig zajlott, ezután a gélből desztillált vízben kiáztattam a benne maradt mintakotélt, majd a gél minimum 20 percig Coomassie Brilliant Blue festékbe áztattam, ami a fehérjék bázikus aminosavaihoz képes kötődni. A felesleges mennyiségű festéket ezt követően ismét kiáztattam desztillált vízben a gélből. Végül a gél Biorad Gel Doc XR+ gëldokumentációs rendszerrel beolvastam.

4.5.2. Fehérjekoncentráció meghatározása

Az oldatban lévő fehérjék koncentrációjának meghatározására alkalmas a NanoDrop készülék. Ez a spektrofotométer kis mennyiségű, néhány mikroliteres mintából is képes meghatározni annak fehérjetartalmát. A fehérjék amiatt válnak detektálhatóvá spektrofotometriásan, mivel bennük az aromás aminosavaknak (tirozin, fenilalanin és triptofán) abszorpciós maximumuk van 280 nm-en. A műszer emellett 260 nm-en is megméri a minták abszorbanciáját, annak érdekében, hogy meg tudjuk állapítani a fehérjeoldat tisztaságát. Annak az esetben, ha a A_{260}/A_{280} arány 0,6 körüli értéket vesz fel, a tisztaság ideális, azonban magasabb értékeknél a nukleinsavakkal való szennyezettség jelentős.

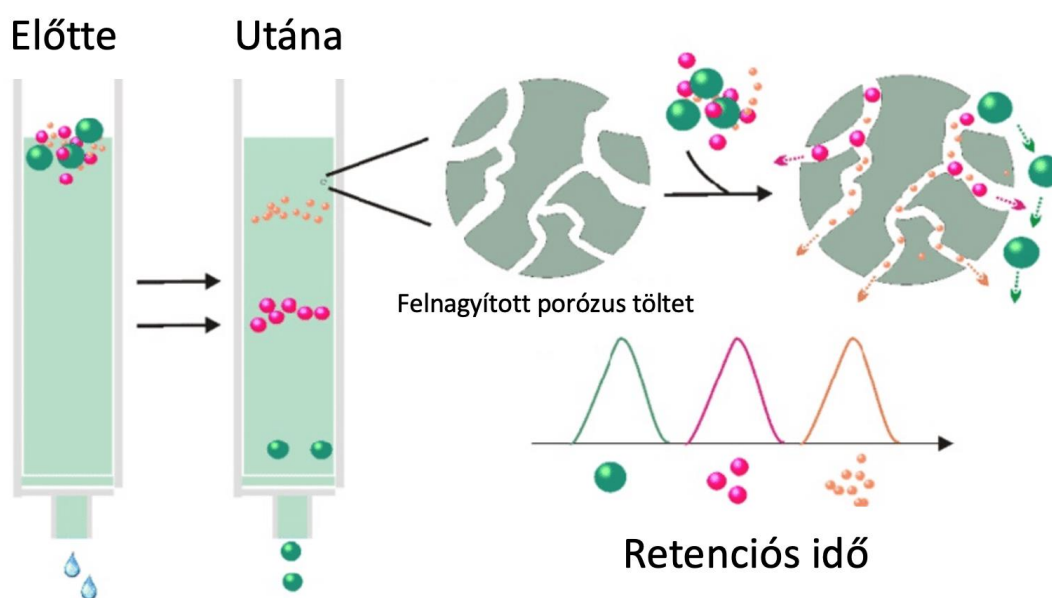
A méréshez beállítottam a fehérjekoncentrációra vonatkozó mérési programot (Protein 280). Először letisztítottam a mérési felületet desztillált vízzel, majd a fehérje saját pufferével felvettem a háttérre. A pufferrel ezután megismételtem a mérést, hogy ellenőrizsem az alapvonalat, van-e torzítás a felvett háttérben. Ha ez megfelelő volt 3 µl-t felvittem a vizsgálni kívánt oldatból és a műszer kiadta annak abszorbancia-értékét. A vizsgált fehérjékre jellemző moláris extinkciós koefficiens ismeretében annak koncentrációja kiszámítható volt.

A NanoDrop méréssel kapott eredményből a fehérjekoncentrációt Bouguer-Lambert-Beer törvény alapján számítottam ki. Az összefüggésben a mért abszorbancia (A) megegyezik a koncentráció (c), az optikai úthossz (l), illetve a vizsgált anyagra jellemző extinkciós koefficiens (ε) szorzatával.

$$A [-] = c \left[\frac{\text{mol}}{\text{dm}^3} \right] \cdot l [\text{cm}] \cdot \varepsilon \left[\frac{\text{dm}^3}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$$

4.6. Méretkizárásos kromatográfia

A méretkizárásos kromatográfia (SEC: Size Exclusion Chromatography) a molekulákat azok méretbeli különbsége szerint választja el, előnye, hogy az elválasztás valós időben követhető. Az elválasztáshoz egy olyan oszlopot használunk, melynek állófázisában porózus gyöngyök találhatók, melyek többféle pórusátmérővel rendelkeznek. Ezen az oszlopon áthaladó kisebb molekulák hosszabb utat tesznek meg, mivel képesek behatolni a kisebb résekbe is, míg a nagyobb molekulák csak a nagyobb pórusátmérőjű útvonalon tudnak haladni. Ez alapján az elválasztás során először a nagyobb molekulák eluálódnak, a kisebb molekulák pedig hosszabb időt töltenek el az állófázis között (14. ábra).



14. ábra. Méretkizárásos kromatográfia elve.⁴

Gélszűrést abban az esetben érdemes alkalmazni affinitás kromatográfias fehérjetisztítás után, ha célfehérjét tartalmazó elúciós oldat még tele van különböző fehérje, nukleinsav és kismolekulás szennyeződésekkel.

A gélszűrés előtt a fehérjeoldatot egy 0,5 ml-es, 10 kDa visszatartó képességű töményítőoszlopon (Amicon Ultra 0,5 ml 10k Centrifugal Filter) bekonzcentráltam. Ezzel egy kisebb térfogatú, töményebb fehérjemintát tudtam később felvinni az oszlopra, így a fehérjék diffúziója csökkent, ami segítette a precízebb elválasztást. A kromatográfia mozgó fázisához a feltárás és fehérjetisztítás során használt puffert alkalmaztam. Annak érdekében, hogy az oszlop

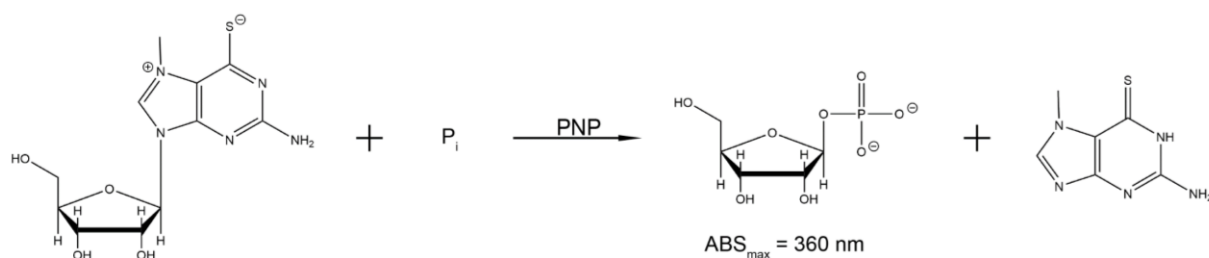
⁴ Yang, Dongbin et al. (2020). Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - Efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*. 10. 3684-3707. 10.7150/thno.41580.

ne károsodjon nem kerülhettek levegőbuborékok a felvitt oldatokba. Ehhez az oszlop tisztításához használt desztillált vizet és a mozgófázis pufferét gázmentesítettem. Egyszerre maximum 0,5 ml térfogatú mintát vittem fel az oszlopra, ügyelve arra, hogy a mintával együtt ne szívjak fel levegőt is a mintaadagoláshoz használt fecskendőbe.

Az oszlopot használatok között desztillált vízben tároltam, így az első lépés az volt, hogy a pufferrel ekvilibráltam azt. Ez azt is segítette, hogy az előzőleg esetlegesen az oszlopon maradt szennyezők eltávolodjanak az oszlopról. Az elválasztás során az áramlási sebesség 0,8 ml/perc volt, a detektálás 280 nm-en és 260 nm-en zajlott, így valós időben követni lehetett a detektoron áthaladó oldat abszorbanciáját. Ez alapján képes voltam frakcionálásos mintaszedéssel külön gyűjteni az ígéretesnek tűnő frakciókat. Ezeket aztán SDS-PAGE gélelektroforézissel ellenőriztem, így ki tudtam választani azokat a mintákat melyek a célfehérjét tartalmazták. Később ezekkel az oldatokkal dolgoztam tovább.

4.7. MESG-PNP foszfát esszé

A GTP enzimkatalizált hidrolízisének vizsgálatára alkalmas az EnzCheck™ Phosphate Assay módszere (15. ábra). Az összeállított készlet egy gyors, érzékeny és valós időben nyomon követhető spektrofotometriás eljárást biztosít. Ennek segítségével nemcsak a KRas fehérje intrinzik hidrolízise vizsgálható, hanem a vele kölcsönható fehérjék enzimaktivitására gyakorolt hatása is. Az esszé további előnye, hogy a kapott aktivitási görbékre függvény illeszthető, így a különböző kinetikai állandók (K_{on} , K_{off}) kiszámíthatók, valamint a kapott eredmények összemérhetőek egymással.



15. ábra. A foszfát esszé során lejátszódó enzimatis reakció.⁵

A módszer alapja, hogy a KRas enzimreakciója során egy inorganikus foszfát (P_i) hidrolizál a GTP molekuláról. Ez az inorganikus foszfátot 2-amino-6-merkapto-7-metil-purin-ribozid (MESG) szubsztrát jelenlétében a purin-nukleozid-foszforiláz (PNP) ribóz-1-foszfáttá

⁵ <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp06646.pdf>

és 2-amino-6-merkaptó-7-metil-purinná alakítja. Az enzimatis úton történő átalakulás hatására a MESG szubsztrát 330 nm-en mérhető abszorbanciája megváltozik, a keletkezett terméknek 360 nm-en lesz abszorpciós maximuma. Ezáltal a 360 nm-en termék felszabadulása spektrofotometriásan időben követhetővé válik, ami pedig egy közvetett összefüggést biztosít a felszabaduló inorganikus foszfát mennyiségével.

4.7.1. MESG-PNP foszfát esszé mérésének menete

A gyártó leírása szerint a megbízható mérés érzékenységi tartománya 2-150 μM felszabaduló foszfát közé esik, a mérés optimális pH tartománya 6,5-8,5 közé, a megfelelő kontrollok mellett.

A fehérjekölcsönhatások le méréséhez minden alkalommal hozzá tartozott a foszfátkalibráció elvégzése. Ennek segítségével a foszfátkoncentráció és a mért jel nagysága között egy lineáris összefüggés határozható meg. A kalibrációhoz az általam készített inorganikus foszfát standardot használtam, melynek összetétele azonos volt a gyári foszfát standarddal. Ebből egy 500 μM -os törzsoldatot készítettem, amiből egy mikrotiter lemezre 20 μl végtérfogóban 0, 5, 10, 20, 25, 50, 75, 100, 125 és 150 μM -os végkoncentrációjú oldatokat vittem fel. Ezek a minták szintén tartalmazták a gyári MESG-t és PNP-t, a kölcsönhatásvizsgálathoz is használt koncentrációban.

A méréseket EnSpire® mikrotiterlemez-fotométerrel (platereader) végeztem, a minták abszorbanciáját 360 nm-es hullámhosszon mértem, 25 °C-on. Az egyes mérések hossza 20-30 percig tartott, a jel detektálása 6-10 másodperceként történt. Ez alatt ellenőriztem, hogy nem történik váratlan jelnövekedés az egyes mintákban az idő letelte során. Illetve azt is ellenőriztem, hogy a készülék képes-e tartani ez idő alatt a beállított hőfokot.

A fehérjekölcsönhatások méréséhez a KRas fehérjék nukleotid-kötő zsebét GTP-vel feltöltöttem, hogy később a GTP GDP-vé történő hidrolízisét, ezáltal a felszabaduló foszfát elreagálásából adódó jelet mérni tudjam. Az ismert koncentrációjú fehérjeoldathoz 25× feleslegben adtam hozzá a GTP-t. Emellett 10 mM EDTA-t is adtam a fehérjeoldathoz. Ez arra szolgált, hogy a GTP hidrolízis során szükséges, oldatban lévő magnézium ionokat komplexbe vigye, ezzel lelassítva a reakció idő előtti lejátszódását. Az összemért oldatot több, mint 1 órán át inkubáltam, hogy a betöltődés végbe menjen.

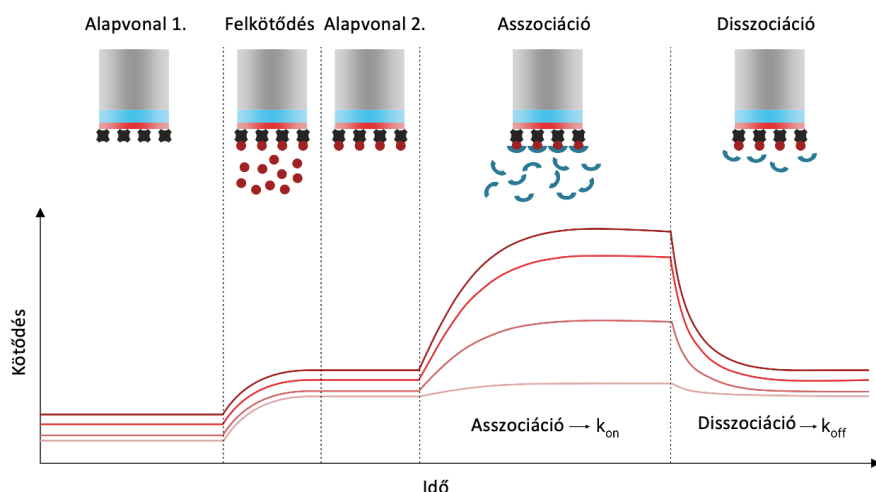
Az aktivitásméréshez 384 lyukú mikrotiterlemezt használtam, melynek egy-egy zsebébe 20 μl térfogatú minta került. A minták összetétele a következő volt: 2 U/ml PNP, 200 μM MESG, 5 mM MgCl_2 , 100 mM KRas és 100 mM GAP fehérje. A MESG, MgCl_2 és PNP

oldatokból előre elkészítettem egy master mix-et akkora térfogatban, hogy az elegendő legyen az aznapi összes párhuzamos mérésre, illetve 10% ráhagyással is számoltam az elkészítés során. A fehérjéket szükség esetén Amicon Ultra 0,5 ml 10k Centrifugal Filter használatával betöményítettem, majd az így keletkezett oldatokat használtam fel arra, hogy 100 mM végkoncentrációjú mintákat készítsék belőlük. Végül, hogy az összes minta térfogata egyezzen a fehérjék saját pufferével egészítettem ki a well-eket. Negatív kontrollként olyan mintákat is készítettem, melyek nem tartalmazták a KRas-t, a GAP-ot, vagy mindkét fehérjét. Helyettük szintén puffert használtam.

A plate-en való összemérést a master mix bemérésével kezdtem. Ezt követte az előre kiszámított mennyiségű pufferrel való kiegészítése a well-eknek. Ezután bemértem a GAP fehérjéket. A KRas fehérjéket mértem be utoljára a mikrotiter lemezre, ügyelve arra, hogy ne kerüljön levegő buborék a mintákba, majd gyorsan behelyeztem a már előre beállított műszerbe. A detektálás szintén 360 nm-en és 25 °C-on történt, kb. 30-60 perc hosszan, 8-10 másodpercenként mérve a jelintenzitást.

4.8. Bioréteg interferometria

A bioréteg interferometriát (BLI) felhasználó Octet[®] rendszerek széleskörűen elterjedtek a biomolekulák kölcsönhatásának vizsgálata során. A BLI egy olyan optikai analitikai technika, amely alkalmas a fénysugarak interferenciájának mérésére. A bennük használt bioszenzoron két fényvisszaverő réteg található. Az egyik az optikai réteg, amely belső referenciaként szolgál, a másik a biokompatibilis réteg, amely a molekulák megkötésére képes. A készülék fehér fényt sugároz a bioszenzorba, ami mindkét rétegről vissza fog verődni. Attól függően, hogy a hullámhosszok között milyen kapcsolat van megkülönböztethetünk konstruktív interferenciát (ahol a hullám jelek erősítik egymást) és destruktív interferenciát (ahol a hullám jelek kioltják egymást) valamint részleges konstitutív interferenciát. A készülék az így kapott interferencia mintázatot képes detektálni. Abban az esetben, ha a biokompatibilis réteghez kapcsolódó molekulákhoz különböző más molekulák kapcsolódnak megváltozik a réteg vastagsága, aminek hatására eltolódik a kapott interferencia mintázat (16. ábra). A valós időben mérő technika így alkalmas lehet a fehérjék kölcsönhatásait jellemző konstansok (K_{on} , K_{off} , K_D) meghatározására.



16. ábra. Bioréteg interferometriás mérés lépései.⁶

A mérés az alapvonal felvételével indul, amikor a szenzor először csak pufferbe merül. Ezt követi a fehérjék felkötődése, amikor a megfelelő taggal rendelkező fehérjék (ligand) képesek lesznek kapcsolódni a szenzorhoz. Ezután ismét egy alapvonal felvétele következik, majd a szenzorhoz rögzített fehérje kölcsönható-partnerének oldatába merül a szenzor, ami az asszociáció lépése. Miután ez megtörtént a szenzor ismét puffer oldatba merül, ahol az analit disszociál a szenzorról.

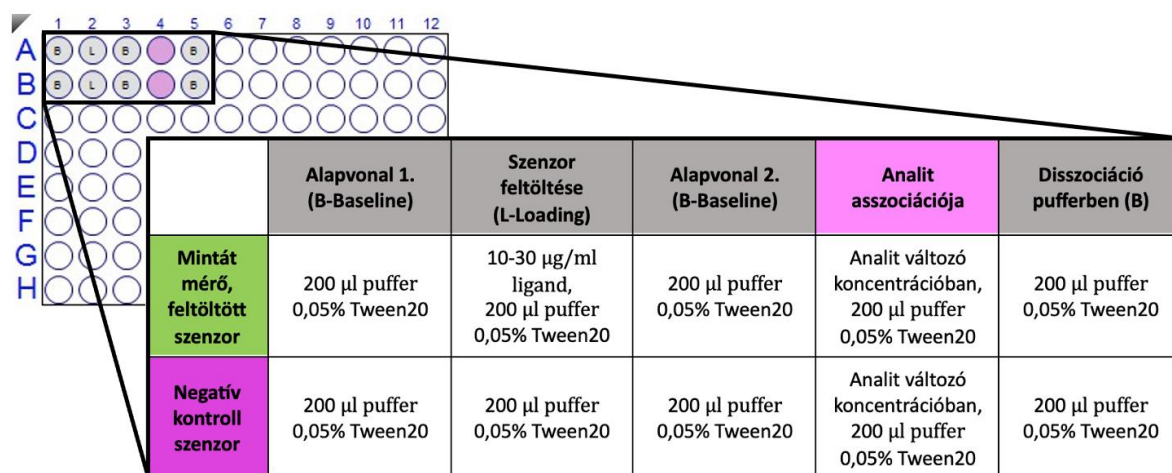
4.8.1. Bioréteg interferometriás mérés menete

Annak érdekében, hogy az előállított fehérjék kölcsönhatását vizsgálni tudjam a KRas fehérje nukleotid-kötő zsebét ebben az esetben is be kellett tölteni GTP-vel, mivel ez biztosította, hogy a GAP variánsok képesek legyenek kötődni hozzá. Azonban, ha GTP-vel tölteném fel a KRas-t, akkor az elhidrolizálná GDP-vé, amihez a GAP-ok már képtelenek lennének kötődni. Ezért egy olyan GTP analógot választottam a mérések során, melyet a KRas képtelen elhidrolizálni, ez a molekula a GppNHp (guanozin-5'-[β,γ -imido]trifoszfát). Ezt szintén 25 $\times$ feleslegben alkalmaztam, valamint 10 mM végkoncentrációban EDTA-t is adtam az oldathoz. A betöltődés egy minimum 1 órás inkubációt jelentett.

⁶ <https://2bind.com/bli/>

A méréshez két csatornás Octet® K2 BLI rendszert és Octet® SAX (Sartorius) bioszenzort használtam. Ennek felülete sztreptavidin fehérjével van bevonva, melyhez a biotinált fehérjék kiemelkedően tudnak kapcsolódni magas affinitásuk miatt. Ez tette lehetővé, hogy az expresszált és AviTag-en biotinált fehérjéket fel tudjam használni a bioréteg interferometriás mérés során.

A mérést azzal kezdtem, hogy a használni kívánt szenzorokat beáztattam a fehérjék saját pufferébe (minimum 10 perc). Ezalatt a méréshez használt 96-lyukú plate-en összeállítottam a mintákat, melyek végtérfogata 200 µl volt. Egy általános mérési elrendezés a 17. ábrán látható.



17. ábra. Egy általános bioréteg interferometriás mérés elrendezése.

A készülék saját szoftverében megadtam a mérési szekvenciát, az egyes minták helyét, a használt szenzorok típusát és elhelyezkedését. Egy méréshez általánosan két darab szenzort használtam fel. A kettő közti különbség abból adódott, hogy az egyik szenzort nem töltöttem fel fehérjével az asszociációs lépés során, az üres puffer oldatba merült. Ez lehetővé tette azt, hogy az analit szenzorhoz való esetleges aspecifikus kötődését nyomon tudjam követni.

A mérés kezdetén a szenzorok 0,05%-os Tween20 puffer oldatba merültek. Ez arra szolgált, hogy fel tudjam venni az alapvonalat. A Tween20 hozzáadása a mintákhoz segítette, hogy az aspecifikus kötődések száma csökkenjen. A szenzor ezután a ligandot tartalmazó oldatba merült. Ez szintén tartalmazott 0,05%-os Tween20-at. A feltöltődésnél ügyelnem kellett arra, hogy a szenzorokhoz ne kötődjön túl nagy mennyiségű fehérje. Abban az esetben, ha a szenzor túltöltődik sztérikus gátlás alakulhat ki a fehérjék között, ami rontja az analittal való későbbi kölcsönhatásukat. Emiatt 10 µg/ml koncentrációjú AviTag-es fehérjeoldattal dolgoztam. Ezután a szenzorok ismét 0,05%-os Tween20 puffer oldatba kerültek, amely egy másodlagos

alapvonal felvételét biztosította. Ezt követte az asszociációs lépés, amikor az analit oldatába merültek a szenzorok. Az analit minták összeállításánál figyelembe kellett venni, hogy koncentrációjuk a K_D értékének $0,1-100\times$ között legyen. Ezek a minták szintén tartalmaztak 0,05%-os Tween20-at. Végül a szenzor 0,05%-os Tween20 puffer oldatba került, ahol megtörtént az analitok disszociációja a ligandról. A mérés kiértékelése szintén az Octet® rendszer saját szoftverében történt. A rendszer a mért asszociációs és disszociációs eredményekre görbét illeszt és a megadott kölcsönhatás módja alapján kiszámítja a hozzájuk tartozó állandókat (asszociációs állandó: K_{on} , disszociációs állandó: K_{off} és kötődési állandó: K_D).

4.9. Termofluorimetria

A termofluorimetria vagy más néven differenciális pásztázó fluorimetria a fehérjék hőstabilitását vizsgáló módszer, fehérjék olvadási hőmérséklete határozható meg vele. A valós időben követhető vizsgálat során a mintákat elkezdjük felfűteni, aminek hatására a fehérjék szerkezete megváltozik, mivel az aminosavak közti nem kovalens kémiai kötések felszakadnak. Azt a hőmérsékletet, ahol a fehérjék 50%-a már elvesztette jellegzetes térszerkezetét, olvadási hőmérsékletnek nevezzük. Annak érdekében, hogy ezt a folyamatot közvetetten követni tudjuk SYPRO® Orange fluoreszcens festéket adunk a mintákhoz. Ez a fehérje apoláris oldalláncaihoz kapcsolódva fluoreszcens jelet ad. A hőmérséklet növekedésével a fehérje 'letekeredik', ami miatt egyre több apoláris oldallánc kerül a felszínre, amihez aztán a festék képes kapcsolódni. A fluoreszcencia intenzitásának növekedése ezáltal arányos lesz a fehérjék denaturációjának előrehaladottságával. A fehérjék melegítésével egy időben a festékmolekulákat megfelelő hullámhosszon gerjesszük és detektáljuk az emittált fény intenzitását a hőmérséklet függvényében.

A módszer emellett alkalmas fehérjék kölcsönhatásainak vizsgálatára is. Abban az esetben, ha egy fehérje kölcsönhat egy másik anyaggal az növelni fogja a stabilitását, emiatt magasabb hőmérséklet lesz szükséges a denaturációhoz. Így a szabad fehérje olvadási hőmérséklete és a vele kölcsönható molekulákkal képzett komplex olvadási hőmérséklete összevethető lesz egymással.

4.9.1. Termofluorimetriás mérés menete

Először a SYPRO® Orange festéket hígítottam ki. Ehhez az eredeti oldat 1 µl-ét feloldottam 49 µl a feltárás és fehérjetisztítás során is használt pufferrel. Az oldatok

összeszuszpendálása után 5 µl-t adtam ebből a vizsgált fehérje 95 µl térfogatú oldatához. Ezt ismét felsuszpendáltam, majd 25 µl térfogatban felvittem őket egy 96-lyukú PCR tálcára. Ezt egy átlátszó hőálló fóliával fedtem le, ügyelve arra, hogy ez a lap mindenhol teljesen rásimuljon a plate felületére. Ebben az esetben is fontos volt, hogy ne maradjanak buborékok az oldatban, mivel azok befolyásolják a detektálás eredményét. Ezért a tálcát használat előtt 1-2 percre Plate Spinner asztali centrifugába helyeztem, az oldatokat a zsebek aljára ülepítettem. A mérés során a mintákat BioRad CFX Touch qPCR készülékbe helyeztem, a melegítést 25 °C-ról kezdtem el, 1,5 °C/perc sebességgel egészen 85 °C-ig. A fluoreszcencia detektálása a műszerben 0,5 °C-ként történt. A gerjesztési csatornának FAM (450-490 nm), a detektálási csatornának HEX (560-580 nm) paramétereit állítottam be, mivel a SYPRO® Orange abszorpciós maximuma 470 nm-en, az emissziós maximuma pedig 570 nm-en van.

4.10. Fehérjekristályosítás

A fehérjék szerkezetének megismerésének jelentős szerepe van abban, hogy a fehérjeműködést pontosabban megértsük. A szerkezetvizsgálattal megtudhatjuk az egyes szerkezeti elemek szerepét, a fehérjekölcsönhatásokkor lejátszódó reakció folyamat egyes állapotait és azt is megismerhetjük, hogy a mutációk milyen hatással vannak a térszerkezetre, valamint a lejátszódó kölcsönhatásokra más molekulák jelenlétében.

A fehérjekrisztallográfia röntgendiffrakciós módszert használ. A vizsgálat alapja, hogy az előállított kristályokról a röntgensugárok meghatározott irányba szóródnak. Ezek a hullámok tériránytól függően erősíthetők és gyengíthetők is egymást. Az így létrejött diffraktált sugarak szögének és intenzitásának mérésével a kristályon belüli elektronsűrűségről egy 3D-s kép készíthető. A feltérképezett elektronsűrűségből visszavezethető a kristályban lévő atomok fajtája, átlagos helyzete, az egymás között kialakuló kötések és még számos más információ. Ez bizonyítja, hogy a módszer alkalmas biomolekulák (fehérjék, vitaminok, nukleinsavak, gyógyszerek) szerkezetének és működésének megismerésére. Kutatásom során én a KRas mutánsok és az RGS3 fehérje közti kölcsönhatások mivoltát szerettem volna feltérképezni.

4.10.1. Fehérjekristályosítás menete

Ahhoz, hogy a kristályok formálódjanak a kristályosító oldatnak magas koncentrációban kell tartalmaznia a vizsgált fehérjét. Ehhez először a KRas G12C és RGS3-cryst fehérjeoldatokat Amicon Ultra 0,5 ml 10k Centrifugal Filter töményítő oszlopon

bekoncentráltam. Annak érdekében, hogy a két fehérje közt a kölcsönhatás ki tudjon alakulni a KRas nukleotid-kötő zsebét be kellett tölteni. Annak érdekében, hogy a betöltött nukleotid ne hidrolizáljon el, annak egy analógját, a GppNHp-t (guanozin-5'-[β,γ -imido]trifoszfát) használtam fel. A fehérjéhez ezt 5 $\times$ feleslegben adtam, majd több, mint egy órán át hagytam inkubálódni. Eközben egy 96-lyukú kristályosító lemezre felvittem 70 μ l-t a ProPlex™ által készített oldatokból. Ez 96 különböző körülményt biztosít a kristályosításhoz. A tálca így 66 darab polietilén-glikol (PEG), 24 darab szervetlen só és 6 darab szerves oldat alapú körülménnyel rendelkezett. Ezek összevetésével meghatározható, hogy melyik az az oldat, melyben a fehérjekomplexek létrejöhetnek. Az 1 mM-os fehérjemintákat Mosquito pipettázó robot segítségével vittem a plate-re, melynek egy zsebébe 100 nl térfogatú oldat került. A kristályosító lemezt ezt követően egy átlátszó műanyag filmréteggel lefedtem, ügyelve arra, hogy a fólia légmentesen záródjon a plate-hez. Ezután a kristályosító lemezt a Formulatrix® által gyártott készülékbe helyeztem, melyben 20 °C-on tároltam a mintáimat 60 napon keresztül. Annak ellenőrzésére, hogy képződtek-e kristályok Olympus SZX16 sztereomikroszkópot használtam.

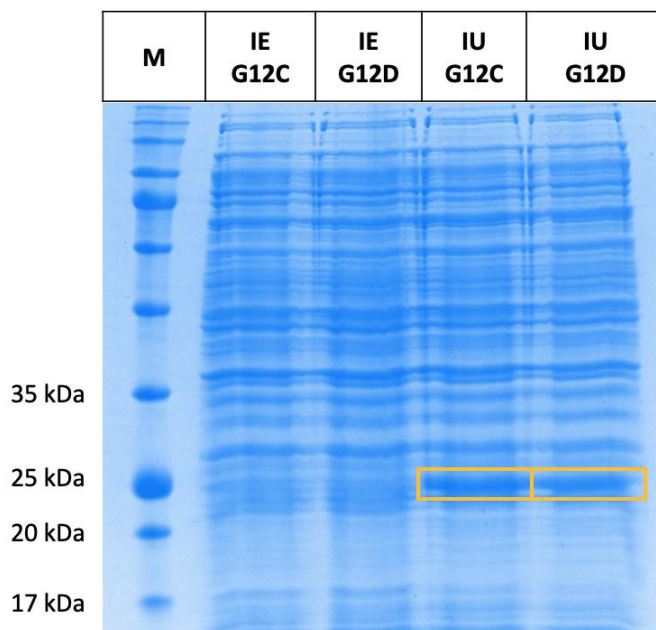
5. Eredmények és kiértékelésük

5.1. Fehérjék expressziójának és tisztításának eredménye

A KRas és GAP fehérjék kölcsönhatásának vizsgálatához a vad típusú fehérjéket, illetve azok mutánsait bakteriális expresszió segítségével állítottam elő. Ehhez a mutagenézissel és klónozással megelőzőleg előállított plazmidokat kétféle fehérjetermelő *Escherichia coli* törzsbe (Rosetta (DE3) és BL21 (DE3)) transzformáltam. Minden fehérje termelése és tisztítása során a Kísérletek és módszerek fejezetben bemutatott protokoll szerint jártam el. Ennek eredményét szeretném a továbbiakban bemutatni.

Annak érdekében, hogy ellenőrizni tudjam, hogy a plazmid bekerült a termelő sejtekbe és róla a fehérjeexpresszió az IPTG-vel való indukálás hatására végbement SDS-PAGE gélelektroforézist használtam. Ehhez mintát vettem indukció előtt a sejtuszuspenzióból, majd az indukálás másnapján ismét mintát vettem, melyeket aztán a gélen megfuttattam.

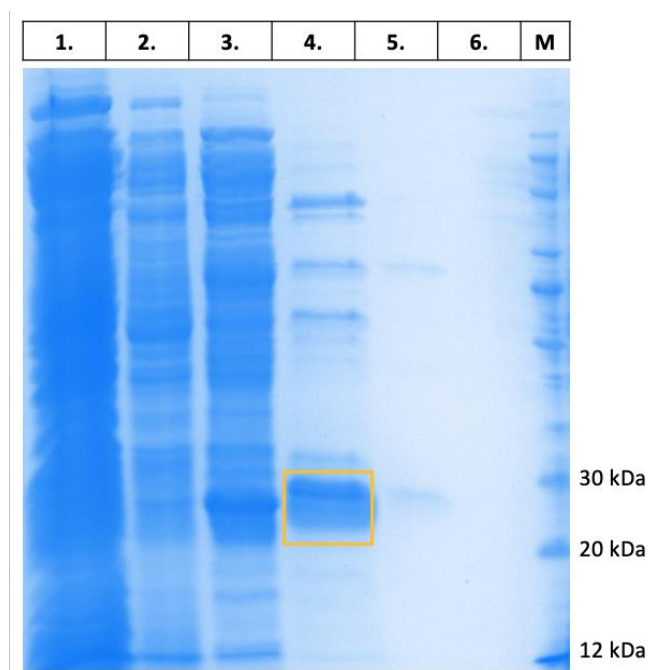
A mintákban jelenlévő fehérjék azonosítását a felvitt marker (GRS Protein Marker MultiColour vagy GRS Unstained Protein Marker) segítette. A termelt fehérjék molekulatömegének ismeretében pedig a célfehérje koncentrációjának növekedését a két mintavétel között nyomon lehetett követni a gélképen.



18. ábra. A KRas G12C és G12D mutánsok termelésének SDS-PAGE gélképe.
M: marker, IE: indukció előtti minta, IU: indukció utáni minta. Bal oldalon a marker beosztásai láthatók, sárgával bekeretezve a termelődött fehérjék.

Az 18. ábrán a KRas G12C és G12D fehérje expressziójának gélképe látható. A KRas G12C fehérje molekulatömege 21853 Da, a KRas G12D fehérjéé pedig 21865 Da. A fehérjék megnövekedett mennyisége a 20 kDa és 25 kDa közti tartományban szembetűnő, amely azt jelentette, hogy a fehérjetermelés sikeres volt.

A sikeres fehérjetermelés után a sejteket lecentrifugáltam, feltártam, majd affinitás kromatográfiával elválasztottam. A fehérjetisztítás során az oszlopon áthaladt oldatokat külön gyűjtöttem, belőlük mintát vettem, amit aztán szintén SDS-PAGE gélen ellenőriztem.



19. ábra. A KRas G12D fehérje tisztításának SDS-PAGE gélképe.

M: marker; 1-6.: a fehérjetisztítás egyes lépéseiből származó frakciók. 1. áteső, 2. pufferes mosás, 3. 25 mM imidazol oldatos mosás, 4. elúció 1. (250 mM imidazol), 5. elúció 2. (250 mM imidazol), 6. 1 M imidazol oldatos mosás. Sárgával bekeretezve az elválasztott célfehérje látható.

A 19. ábrán bemutatott gélképen láthatóvá vált, hogy a nikkel-gyantán történő elválasztással a fehérjék milyen sorrendben haladtak át az oszlopon. Az átesőben (1.) a fehérjekoncentráció magas volt, mivel ez a sejtfeltárással az oldatfázisba került közel összes fehérjét tartalmazta. A pufferes mosás (2.) és a 25 mM imidazolt tartalmazó pufferes mosás (3.) a gyantán aspecifikusan megkötött fehérjék eltávolítását eredményezte. Ezáltal az első elúciós lépésre (4.) már csak a gyantához specifikusan kötődő, hisztidin-taget tartalmazó fehérjék maradtak az oszlopon, illetve kevés nagyobb molekulatömegű fehérjeszennyeződés. Az elúciós oldatok koncentrációjának és térfogatának megfelelő beállításával, illetve az elválasztás Bradford-módszerrel történő folyamatos követésének köszönhetően a célfehérjét egy frakcióba, más fehérjéktől közel teljesen mentesen sikerült összegyűjtenem. A második elúciós lépés (5.)

még szorított le kis mennyiségű fehérjét az oldatról, azonban a végső, 1 M-os tisztítási lépésre (6.) már nem maradt specifikusan és aspecifikusan kötött fehérje sem az oszlopon.

A sikeres elválasztás után a fehérjék koncentrációját NanoDrop készülék segítségével megmértem, majd a célfehérjét tartalmazó elúciós frakciót feltettem dializálni egy éjszakára. Másnap az oldat koncentrációját ismét ellenőriztem. Ekkor a fehérjekoncentráció csökkenését figyeltem meg, ami az oldatból távozó imidazol eltűnésének tudható be.

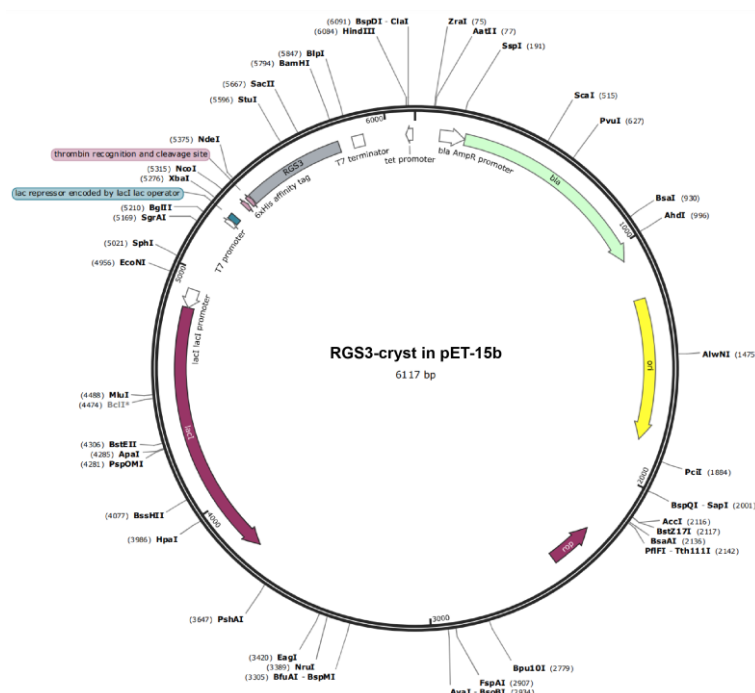
Az expresszált és tisztított fehérjéket, azok térfogatát és spektrofotometriásan mért abszorbanciájukat az alábbi táblázatban (3. táblázat) foglaltam össze. A fehérjékre jellemző molekulatömeg, valamint moláris extinkciós koefficiens (lásd: Függelék) ismeretében azok koncentrációját is meg tudtam határozni.

Fehérje	Térfogat [ml]	Abszorbancia [-]	Koncentráció [μ M]
wt KRas-AviTag	8	0,47	25
KRas G12C	1,5	2,45	183
KRas G12C-AviTag	10	0,60	32
KRas G12D	10	0,79	59
KRas G12D-AviTag	8	5,50	291
wt GAP	10	1,10	69
GAP L902D	8	2,00	126
GAP L902E	8	2,00	126
GAP L902Q	8	2,20	138
GAP R903A	9	0,47	30
GAP R903Q	9	1,16	73
RGS3-cryst	11	7,72	418
AviTag-RGS3-cryst	10	1,58	66

3. táblázat. Az expresszált és tisztított fehérjék összegzése, valamint az egyes oldatok térfogata, abszorbanciája és koncentrációja.

5.2. AviTag-RGS3-cryst fehérjét kódoló plazmid létrehozása

Annak érdekében, hogy a bioréteg interferometriás kölcsönhatásvizsgálatnál több mérési elrendezést is tesztelni tudjak szükség volt az AviTag-gel rendelkező jól termelhető RGS3 fehérjét kódoló plazmid létrehozására (20. ábra).



20. ábra. A pET-15b vektorban lévő RGS3-cryst konstruktt plazmidtérképe SnapGene-ben megjelenítve.

A konstrukt megtervezéséhez az RGS3 kristályszerkezetben (PDB ID 2OJ4) található szekvenciából indultam ki (RGS3-cryst). Ez a fehérje tartalmazza az RGS3 p75 és p25 izoformájánál megismert GAP-jellegű domént, azonban KRasra való hatása ismeretlen. Az AviTag-et (GLNDIFEAQKIEWHE) kódoló DNS szakaszt inzerációs mutagenézissel vittem be a plazmidba. Ehhez az első lépés a primerek megtervezése volt, melyhez a NEBaseChanger programot használtam. Ez megadta a forward és reverse primerek szekvenciáját (21. ábra), az olvadási (T_m) és az annellációs (T_a) hőmérsékletet is (4. táblázat). Ezen információk segítségével a gradiens PCR reakciót is el tudtam végezni.

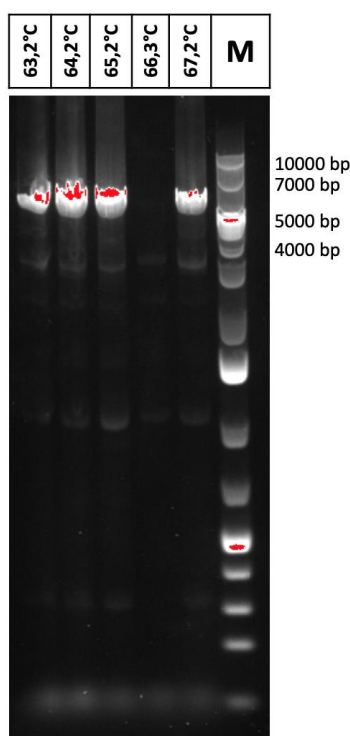


21. ábra. A forward és reverse primerek kitapadása SnapGene-ben ábrázolva.

Primer	Hossz [db]	GC %	T _m [°C]	T _a [°C]	Szekvencia (5'-3')
Forward	42	48	64	65	ctcagaaaatcgaatggcacgaa-TAAGGATCCGGCTGCTAAC
Reverse	44	55	67		cctcgaagatgtcgttcaggcc-CAGCGGCGGACTCATTTTTTTC
Inzert	45	-			ggcctgaacgacatcttcgaggctcagaaaatcgaatggcacgaa

4. táblázat. A forward és reverse primerek szekvenciája és paraméterei, valamint az AviTag inzert szekvenciája. Hossz: a szekvenciákat alkotó nukleotidok száma. GC %: a guanin-citozin tartalma a szekvenciának, T_m: olvadási hőmérséklet, T_a: annellációs hőmérséklet. A szekvencia nagy betűvel jelölt része a kitapadó szakaszt jelöli.

A polimerizációs reakciót gradiens PCR-rel végeztem el. Ez a módszer lehetővé tette, hogy egyszerre több annellációs hőmérsékleten végezzem a reakciót, ami annak optimalizálására szolgált. Mivel a program számítása a 65 °C-t adta meg optimális körülménynek, így a hőmérsékletprofil eköré állítottam be. Az annellációs hőmérsékletek a következők voltak: 63,2; 64,2; 65,2; 66,3 és 67,2 °C. A PCR reakció lezajlása után a termékeket 1%-os agaróz gélen megfuttattam és az eredményt Biorad Gel Doc XR+ géldokumentációs rendszer segítségével előhívtam (22. ábra).

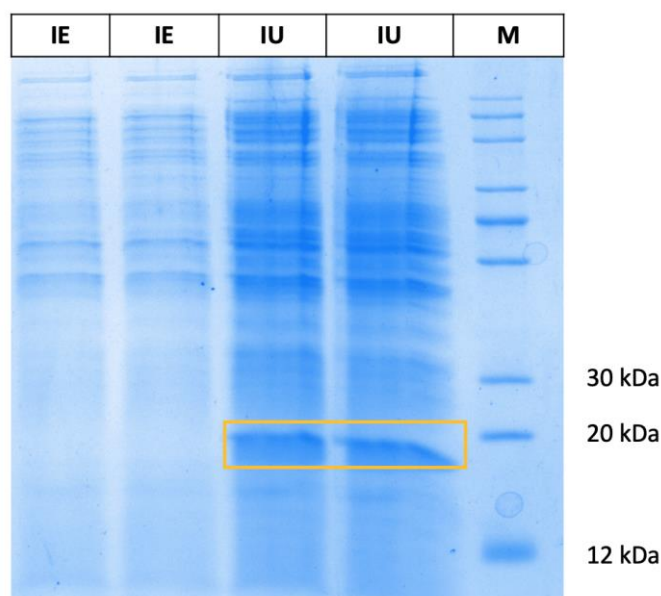


22. ábra. Az 1 %-os agaróz gélen megfuttatott gradiens PCR termékek.
M: marker; 63,2-67,2 °C: különböző annellációs hőmérsékletekkel keletkezett termékek.

A mintákban jelenlévő DNS fragmentumok méretük szerint elváltak egymástól a futtatás során a gélen, így a minták mellett felvitt GRS Ladder 1kb DNS marker beosztásainak ismeretében be tudtam azonosítani, hogy a gradiens PCR során melyik hőmérsékleten volt a legmegfelelőbb a polimerizációs reakció. A termék nagysága 6162 bp volt. DNS fragmentumok a mintákban nagy mértékben a marker 7000 bp-os beosztása alatt jelentek meg. Ez alapján arra következtettem, hogy a reakció sikeres volt. A legnagyobb jel a 64,2 °C-os és 65,2 °C-os mintákban volt, így ezekkel folytattam a további munkát.

A PCR termék kezelése után az AviTag-RGS3-cryst konstruktot tartalmazó plazmidot *E. coli* XL1Blue sejtekbe transzformáltam, hogy a plazmid mennyiségét megsokszorozzam. Ezeket a plazmidokat Nucleo Spin Plasmid Kit felhasználásával izoláltam a sejtekből, majd az így létrejött oldat DNS koncentrációját NanoDrop műszer segítségével lemértem. A DNS koncentrációja 30 ng/μl lett, amely elmaradt az izoláló készlet protokollja szerint megszokott hozamtól (≥ 100 ng/μl). Azonban a MicroSynth cég által végzett szekvenálás visszaigazolta, hogy az izolált plazmid tartalmazza az AviTag-RGS3-cryst szekvenciáját. Ennek tudatában folytattam a célfehérje termelését és tisztítását.

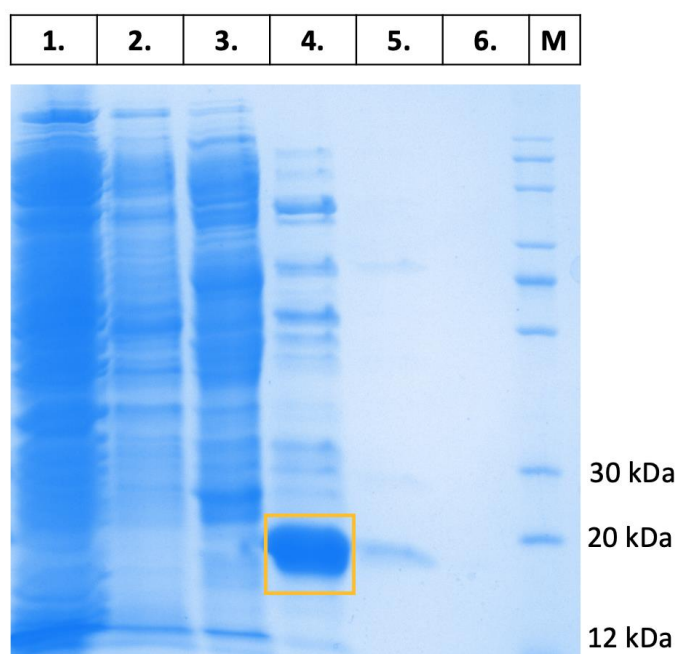
A fehérje termelése a már ismertetett módon zajlott, a mintavétel az indukció előtt és után is megtörtént, mely megfelelőségét SDS-PAGE gélelektroforézissel ellenőriztem (23. ábra).



23. ábra. Az AviTag-RGS3-cryst fehérje expressziójának nyomon követése SDS-PAGE gélelektroforézis segítségével. IE: indukció előtti minták, IU: indukció utáni minták, M: marker. A gélképen a célfehérjét a sárga keret jelöli.

Az AviTag-RGS3-cryst fehérje főbb fizikai és kémiai paramétereit az ExPASy program ProtParam alkalmazásával ismertem meg. Eszerint a fehérje molekulatömege 20137,0 Da. A gélképen megjelenő sáv közel egy magasságban van a marker 20 kDa-t jelző beosztásához, ami azt jelentette, hogy a konstrukt előállítása és vele a fehérje expressziója sikeres volt.

Annak érdekében, hogy a bioréteg interferometriás mérésnél használt sztreptavidinnel bevont szenzorhoz a fehérjék kötődni tudjanak a ligandot, jelen esetben az AviTag-RGS3-cryst-t biotinálni kellett. Ehhez a biotin ligáz termelő AVB101 sejtekkel együtt végeztem a feltárást, valamint a szuszpenzióhoz 50 μ M biotint is adtam. Ezt követően a fehérjetisztítást szintén nikkel-gyantán végeztem, a frakciókból mintát vettem és azokat gélelektroforézissel vizsgáltam (24. ábra).



24. ábra. Az RGS3-cryst fehérje tisztításának SDS-PAGE gélképe.

M: marker, 1-6.: a fehérjetisztítás egyes lépéseiből származó frakciók. 1. áteső, 2. pufferes mosás, 3. 25 mM imidazol oldatos mosás, 4. elúció 1. (250 mM imidazol), 5. elúció 2. (250 mM imidazol), 6. 1 M imidazol oldatos mosás. Sárgával bekeretezve az elválasztott célfehérje látható.

Ebben az esetben is az első, 250 mM imidazolt tartalmazó elúcióban jelent meg a célfehérje. Az elúciós oldatot ezt követően dializáltam, majd az így kapott 10 ml térfogatú fehérjeoldat abszorbanciáját ($A=1,58$), majd koncentrációját ($c=65,6 \mu$ M) is megadtam. Az AviTag-RGS3-cryst fehérje mennyisége elegendő volt ahhoz, hogy a későbbi kölcsönhatásvizsgálat során fel tudjam használni.

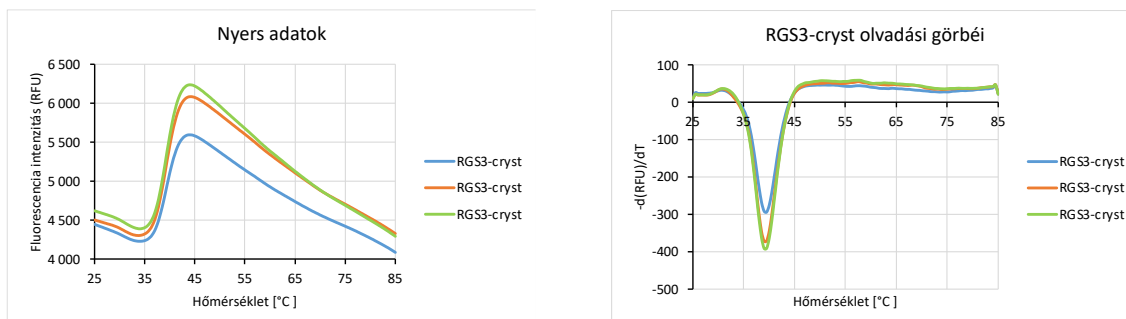
5.3. Termofluorimetriás mérés eredménye

Termofluorimetriával az RGS3-cryst fehérje olvadási hőmérsékletét határoztam meg. Ez a módszer alkalmas arra, hogy valós időben követni lehessen a fehérje denaturálását. A fehérje belsejében lévő apoláris oldalláncok a hő hatására a letekeredő fehérje felszínére kerülnek, ezáltal a mintákhoz adott SYPRO® Orange fluoreszcens kötődni tud hozzájuk. A festék az apoláros oldalláncokhoz kötődve fluoreszcens jelet ad, így egy valós időben nyomon követhető módszert biztosít az olvadási hőmérséklet meghatározására.

A módszer emellett arra is alkalmas, hogy a szintézis során a fehérje megfelelő feltekeredését ellenőrizni lehessen. Abban az esetben, ha a fehérje az expresszió során felveszi a rá jellemző térszerkezetet, ami a további tisztítási lépések során sem sérül, az jó indikátora lehet annak, hogy a kinyert fehérje rendelkezik a rá jellemző aktivitással. Ha termofluorimetriás mérés görbéinek lefutása megfelel az elvártnak, illetve belőle olvadási hőmérséklet is számítható, az azt jelenti, hogy a célfehérje alkalmas lehet további enzimaktivitás- és kölcsönhatásvizsgálati módszerek elvégzésére. A célom az volt, hogy erről az RGS3-cryst fehérje esetén meggyőződjek.

Három párhuzamos mérést végeztem melynek összeállítását a Kísérletek és módszerek fejezetben bemutattam. A Bio-Rad CFX Touch qPCR készülékben végeztem el a mérést, melynek paramétereit a műszerhez tartozó szoftverben állítottam be.

A mért fluoreszcencia-intenzitást a 25. ábrán jelenítettem meg. A görbék inflexiós pontja megadta meg az RGS3-cryst olvadási hőmérsékletét. Ennek a pontnak a megadásához a kiértékelő program meghatározta az intenzitás–hőmérséklet görbe, hőmérséklet szerinti első deriváltjának (-1)-szeresét. A görbék minimumpontja pedig megadta az olvadási hőmérsékletet (25. ábra).



25. ábra. Bal oldalon a termofluorimetriás mérés fluoreszcencia intenzitás–hőmérséklet függése. Jobb oldalon a deriválással kapott görbék.

Az RGS3-cryst fehérje olvadási hőmérséklete a bemutatott kiértékelés alapján 39,2 °C. Ez azt jelentette, hogy a fehérje fel tudta venni a rá jellemző térszerkezetet, így aktív formájában alkalmas lehet a kölcsönhatásvizsgálatoknál és enzimaktivitás mérésénél.

Ennek a sikeres meghatározása további lehetőségeket rejt magában. Mivel a módszer alkalmas fehérjék kölcsönhatásának vizsgálatára is, így önmagukban nemcsak a KRas, GAP vagy RGS3 fehérjék vizsgálhatóak, hanem egymás közti interakciójuk is. Kutatásom további célja, hogy ezeket a méréseket is elvégezzem.

5.4. MESH-PNP foszfát esszé

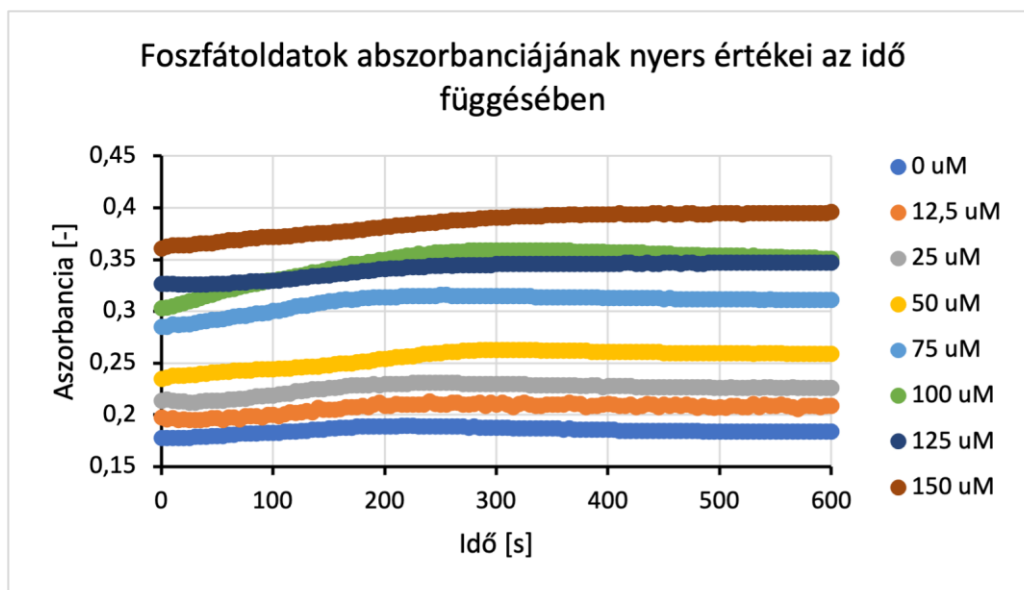
5.4.1. Kalibrációs görbe

Annak érdekében, hogy a KRas fehérjék GAP katalizálta hidrolízisének aktivitását vizsgálni tudjam MESH-PNP foszfát esszét használtam, amivel valós időben tudtam nyomon követni a GTP hidrolíziséből származó foszfát felszabadulást.

Az esszé készlet tartalmazta a reakciópuffert, purin-nukleotid-foszforiláz (PNP) enzimet, a MESH szubsztrátot és a kalibrációhoz szükséges inorganikus foszfátot. A méréseket a fehérjék saját pufferével végeztem el, ebből saját magam készítettem a gyárral azonos összetételű inorganikus foszfát oldatot is.

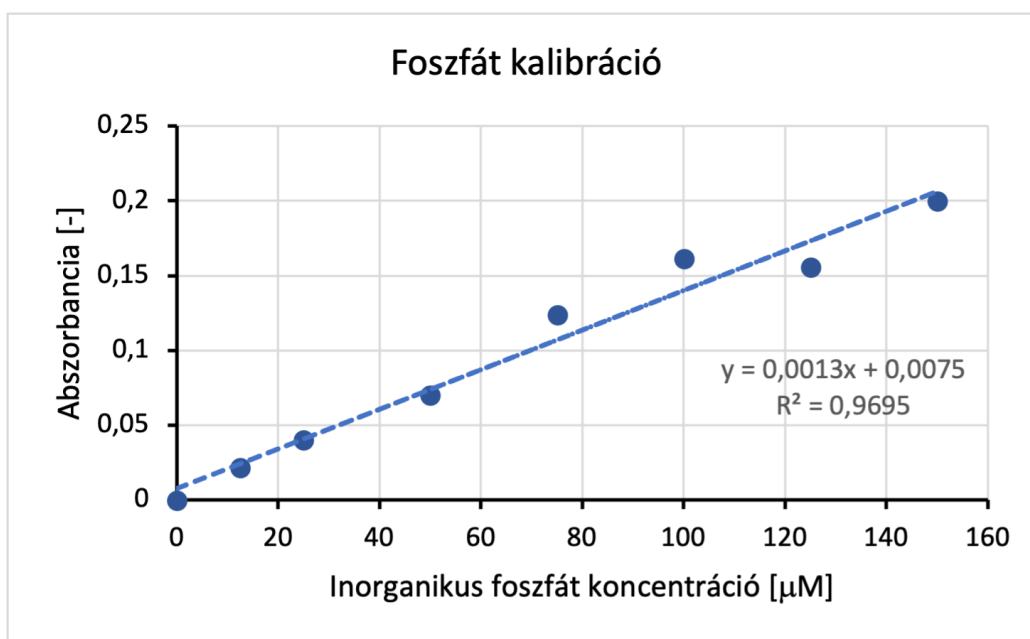
A méréseket minden esetben az inorganikus foszfáttal készített kalibrációval kezdtem. Ezzel ellenőrizni tudtam, hogy az idő előrehaladtával történik-e jelváltozás a mintákban, illetve azt is, hogy az EnSpire® mikrotiterlemez-fotométer (platereader) képes-e a beállított hőmérséklet tartására. A kalibráció a 0-150 μM -os foszfát koncentráció és a jelintenzitás összefüggését vizsgálta, hogy ezen a mérési tartományon belül az aktivitásmérés eredményei megbízhatónak tekinthetők legyenek.

A 26. ábrán bemutatott eredményekből látható, hogy az abszorbancia az idő előrehaladtával csak kis mértékben változott. Ezt okozhatta, hogy a platereader nem tudta végig tartani a beállított hőmérsékletet, vagy előfordulhatott, hogy a készletben biztosított anyagok idővel veszítettek a minőségükből. Ezt követően a kapott értékeket átlagoltam és kivontam belőlük a 0 μM -os mérés átlagértékét és az így kapott értékeket grafikonon a koncentráció függésében ábrázoltam.



26. ábra. A foszfátkalibrációhoz készített oldatok abszorbanciájának változása az idő függvényében.

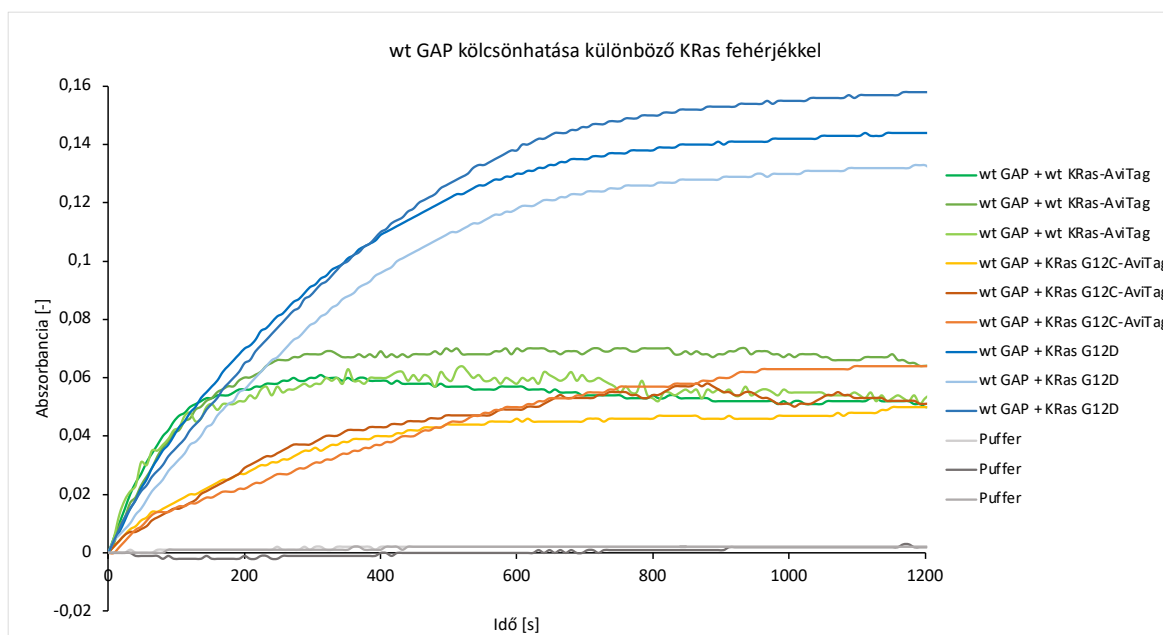
Egy adott időpont mérés pontjaira egyenest illesztettem, amely megadta a foszfát koncentráció és jelintenzitás közti lineáris összefüggést (27. ábra).



27. ábra. Foszfát kalibráció görbéje.

5.4.2. A vad típusú GAP kölcsönhatása különböző KRas fehérjékkel

Először azt vizsgáltam meg, hogy a KRas fehérje mutációja miként hat a vad típusú GAP katalizálta hidrolízis sebességére. Mivel a KRas aktív centrumban történt mutációja gátolja GAP megfelelő bekötődését és működését, így azt vártam, hogy az egyes mutánsok esetén a hidrolitikus aktivitás csökkenni fog a vad típusú fehérjéhez képest.



28. ábra. A wt GAP fehérje kölcsönhatásának MESG-PNP esszéje vad típusú és mutáns KRas fehérjékkel.

A nyers abszorbancia értékekből mintánként levontam a nulladik időpillanatban mért értékeket, majd az így kapott eredményeket grafikonon ábrázoltam. A görbék lefutásánál azt vettem figyelembe, hogy mikor érik el a telítést. Amikor egy minta eléri ezt a pontot az azt jelenti, hogy az oldatban lévő összes KRas-GTP fehérje elreagált. Mivel nukleotid kicserélő faktorok (GEF-ek) nincsenek jelen az oldatban, ezért a hidrolízis után a KRas GDP-kötött állapotban marad a nukleotidhoz való magas affinitása miatt. Közben az összes lehetségesen felszabaduló foszfátot a PNP enzim detektálható termékké alakítja.

Ahogy az a 28. ábrán is szembejövő először a vad típusú fehérjék érték el a telítést. Ezt követte a KRas G12C majd a G12D mutáns, ami azt jelentette, hogy a mutáció a hidrolízis sebességére negatív hatással van, valamint a funkcióvesztéssel járó mutáció a KRas G12D esetén gátolja a leginkább a GTP hidrolízist.

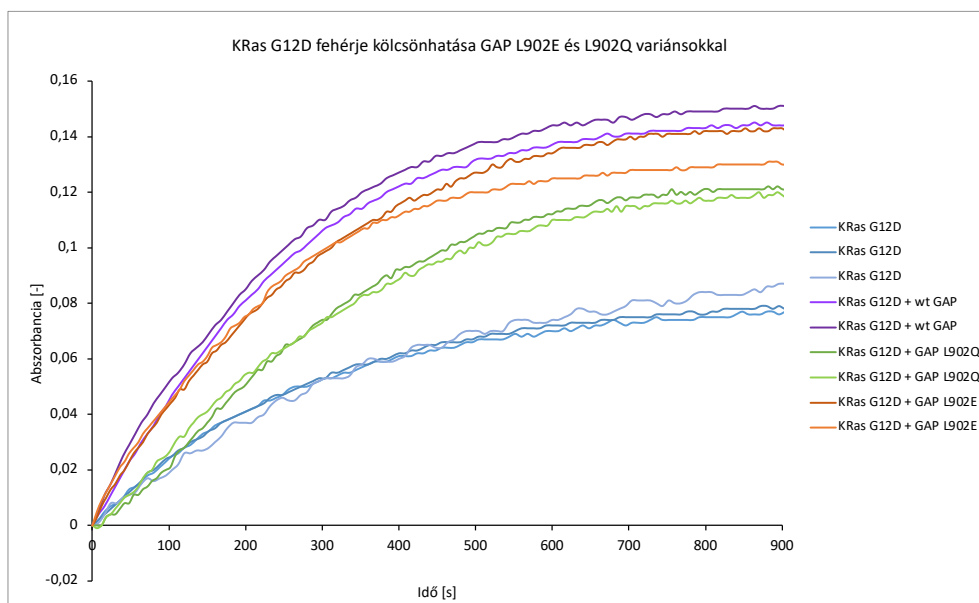
5.3.3. KRas G12D fehérje GAP variánsokkal való kölcsönhatásának vizsgálata

Kollaborátorainkkal közösen azt a célt tűztük ki magunk elé, hogy olyan GAP mutánsokat tervezünk és állítunk elő, amelyek képesek helyreállítani a KRas mutációja okozta hidrolízis gyengülését. Az emberi szervezetben az egyik leggyakrabban előforduló KRas mutáció a G12D, melyben a 12. glicin aszparaginsavra cserélődik. Kollaborátoraink *in silico* QM/MM modellezéssel ennek a mutációnak a helyreállítására terveztek GAP variánsokat.

A 902. lizin aminosav megváltoztatása

Először azokat a mutánsokat teszteltem, melyekben az lizin aminosav lett glutaminsavra (L902E) vagy glutaminra (L902) cserélve. A mérési összeállításban azt vizsgáltam, hogy a KRas G12D intrinzik és wt GAP katalizált hidrolíziséhez képest a GAP L902E és L902Q variánsok miként viselkednek. A felállított modell alapján azt vártam, hogy a GAP mutánsok a KRas G12D-t jobban fogják aktiválni, mint a vad típusú GAP.

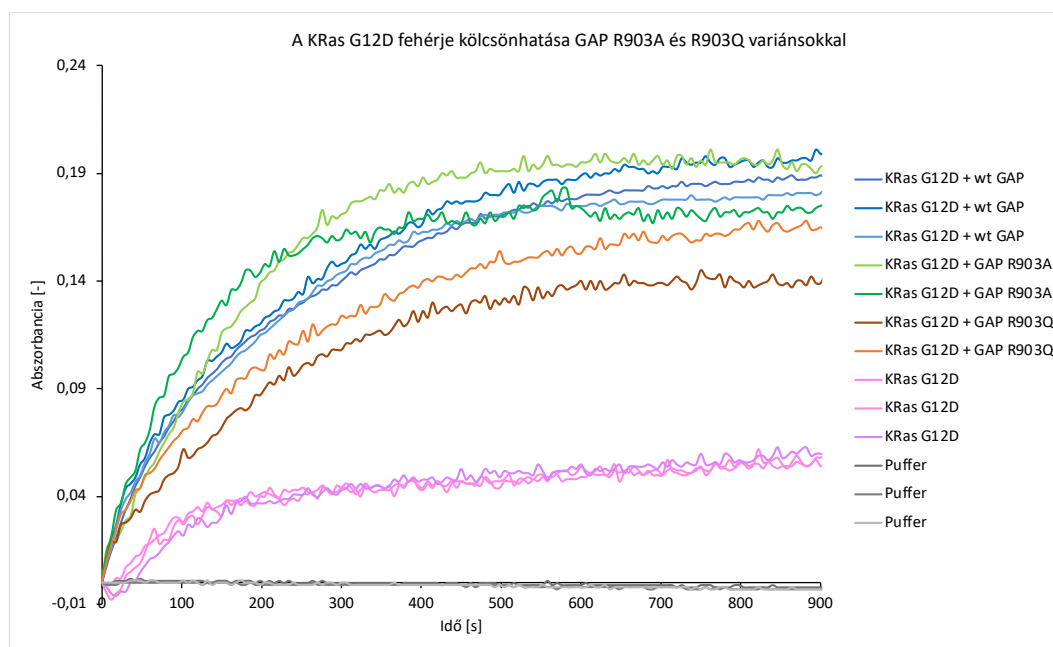
Az aktivitásmérés eredménye a 29. ábrán látható. Ellenőrzésképp olyan párhuzamos mintákat is készítettem, melyek csak a KRas G12D fehérjét tartalmazták, amivel az intrinzik hidrolízis sebességét tudtam követni. Ez a sebesség elmaradt a GAP-okat tartalmazó mintákhoz képest, így beigazolta a KRas fehérjék, főként a KRas mutánsok saját, GTP hidrolizáló képességének gyengeségét. A GAP L902E és L902Q mutánsok javítani tudtak a KRas G12D hidrolízisének sebességén. A GAP L902E közel akkora aktiválást eredményezett, mint a vad típusú GAP, azonban még elmaradt a nála jobb aktiválóképességtől.



29. ábra. A KRas G12D fehérje és a GAP L902E és L902Q variánsok kölcsönhatásának hidrolízisre gyakorolt hatása MESG-PNP foszfát esszével mérve.

A 903. arginin aminosav megváltoztatása

A következő variánsok a GAP R903A és R903Q voltak, melyekben a 903. arginin aminosav alaninra és glutaminra cserélődött. Ebben az esetben szintén arra vártam, hogy a szimulációval tervezett mutánsok jobban aktiválják a KRas G12D hidrolízisét, mint a wt GAP.



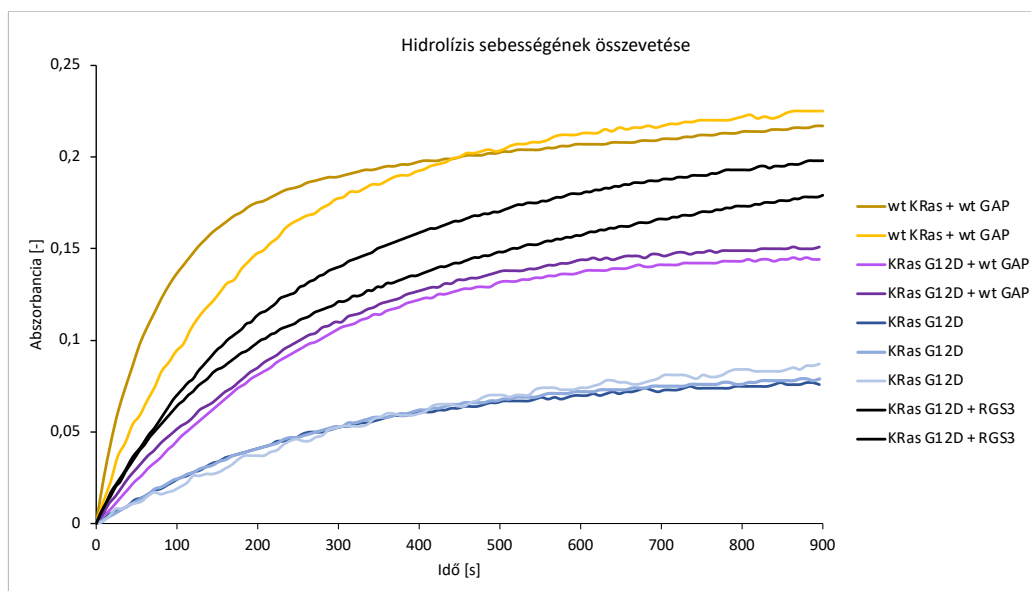
30. ábra. A KRas G12D fehérje és a GAP L902E és L902Q variánsok kölcsönhatásának hidrolízisre gyakorolt hatása MESG-PNP foszfát esszével mérve.

A MESG-PNP foszfát esszé eredményéből (30. ábra) szintén látszik, hogy a puffer háttérértéke elhanyagolható volt, valamint az is, hogy a KRas G12D intrinzik hidrolízise ebben az esetben is lassan játszódott le, nem érte el a telítést még akkor sem amikor a GAP fehérjékkel ellátott oldatokban a reakció már teljesen lezajlott. A GAP R903A és R903Q variánsait összevetve a vad típusú GAP aktiváló hatásával azt figyeltem meg, hogy a fehérjék hatása közel azonos volt. A GAP R903Q esetén a hidrolízis sebessége elmaradt egy kis mértékben a wt GAP-pal katalizálttól, azonban a GAP R903A mutáns kis mértékben javítani tudott a vad típusához képest a hidrolízisen.

Ez az eredmény azt sugallja, hogy a QM/MM modellel alkotott GAP variánsok alkalmasak lehetnek a KRas mutánsok hidrolízisének helyreállítására. További mérések elvégzésével ezek az eredmények még inkább pontosíthatóak, így a mérési pontokra illesztett görbékből az enzimreakciót leíró paraméterek, mint például az átviteli szám (k_{cat}) meghatározhatóak lesznek. Valamint a modell további finomításával új GAP variánsok tervezhetőek, melyek még inkább alkalmasak lehetnek a mutáció helyreállítására.

5.3.4. Az RGS3 fehérje hatása a KRas G12D GTP hidrolízisére

Egy további vizsgálatban az RGS3 egy rövidebb doménjének hidrolízisre gyakorolt hatását vizsgáltam. Ehhez összevettem, hogy a KRas G12D mutánst az RGS3 milyen mértékben képes aktiválni a vad típusú GAP-hoz képest. Megnéztem továbbá, hogy a KRas G12D RGS3 általi aktiválása milyen a vad típusú KRas-GAP kölcsönhatáshoz képest (31. ábra).



31. ábra. A MESG-PNP foszfát esszével mért eredmények különböző KRas és GAP fehérjék kölcsönhatása esetén.

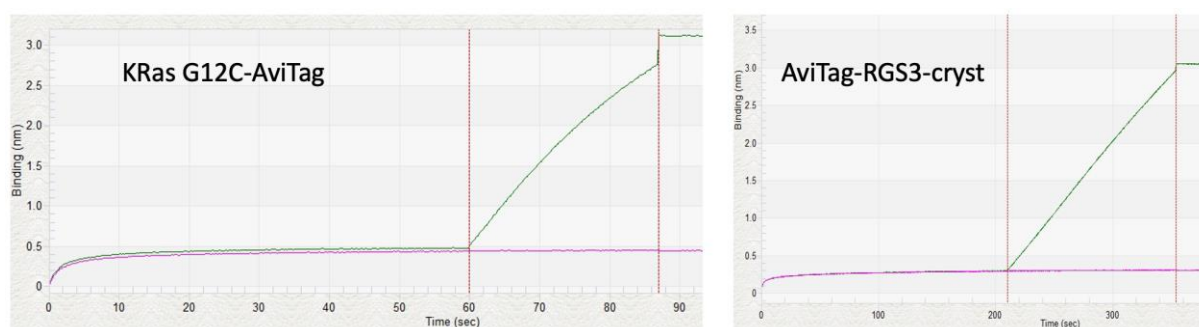
Ennek a mérésorozatnak az eredménye szintén megerősítette, hogy a vad típusú KRas-GAP kölcsönhatás a legkedvezőbb a hidrolízis szempontjából. Ehhez képest a wt GAP katalizálta KRas G12D hidrolízisének sebessége csökkent, de nem annyira, mint ami a KRas G12D intrinzik hidrolízisének volt tapasztalható. Az RGS3 KRas G12D-vel való kölcsönhatása gyengébb aktiválást eredményezett a vad típusú GAP-nál, azonban előbb elérte a telítési állapotot, mint az intrinzik KRas G12D mutáns. Ez az eredmény szintén rámutat arra, hogy az RGS3 katalizálta mechanizmus közelebbi megismerésével a KRas mutánsok hidrolízisének helyreállítási folyamata tovább fejleszthető.

5.5. Bioréteg interferometria (BLI)

5.5.1. Biotinálás sikerességének ellenőrzése

Az AviTag-el ellátott fehérjék termelésének sikerességét SDS-PAGE gélelektroforézis segítségével bizonyítani lehet. Azonban ez a módszer nem elegendő ahhoz, hogy a biotinálás sikerességéről is meggyőződjünk. Biotin-kötés hiányában az AviTag-es fehérje nem tud specifikusan kapcsolódni a BLI műszer sztreptavidinnel bevont szenzorához, így alkalmatlanná válik a kölcsönhatási vizsgálatok elvégzésére.

Az interferometriás mérés során a szenzorok először egy pufferoldatba merültek, amely az alapvonal felvételére szolgált. Ezután a szenzorok átkerültek a biotinált AviTag-et tartalmazó ligand (KRas G12C-AviTag vagy AviTag-RGS3-cryst) oldatába. A három fehérje felkötődési görbéje az 32. ábrán látható. Minden esetben a szenzor feltöltődött a megfelelő fehérjével, ami azt bizonyította, hogy a biotinálást sikeresen elvégeztem.



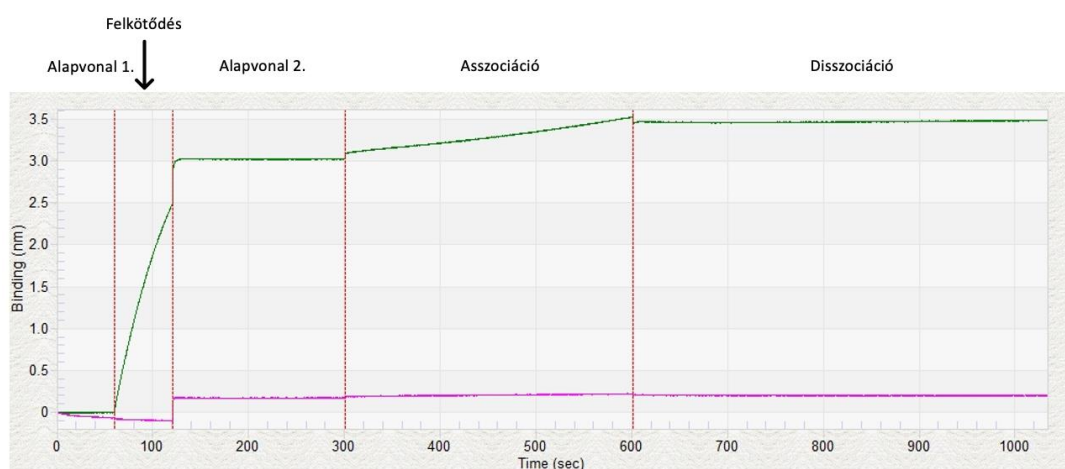
32. ábra. Bal oldalon a KRas G12C-AviTag, jobb oldalon az AviTag-RGS3-cryst sikeres biotinálásának ellenőrzése bioréteg interferometriás vizsgálat segítségével. Zöld: a szenzorok, melyek a ligand oldatába merülve feltöltődtek a fehérjével, Rózsaszín: kontroll szenzorok, melyek a ligandok fehérjeoldatai helyett pufferbe merültek.

5.5.2. KRas G12C-avi és RGS3 fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata

Ebben a mérésben KRas G12C-t rögzítettem a szenzorhoz, amelyhez aztán RGS3-cryst fehérjét asszociáltattam. Mielőtt több különböző RGS3 koncentrációban elvégeztem volna a mérést először egy darab KRas G12C-vel feltöltött szenzorral (zöld görbe) és a negatív kontroll párjával (rózsaszín görbe) próbamérést csináltam, 30 μ M RGS3 analit felhasználásával.

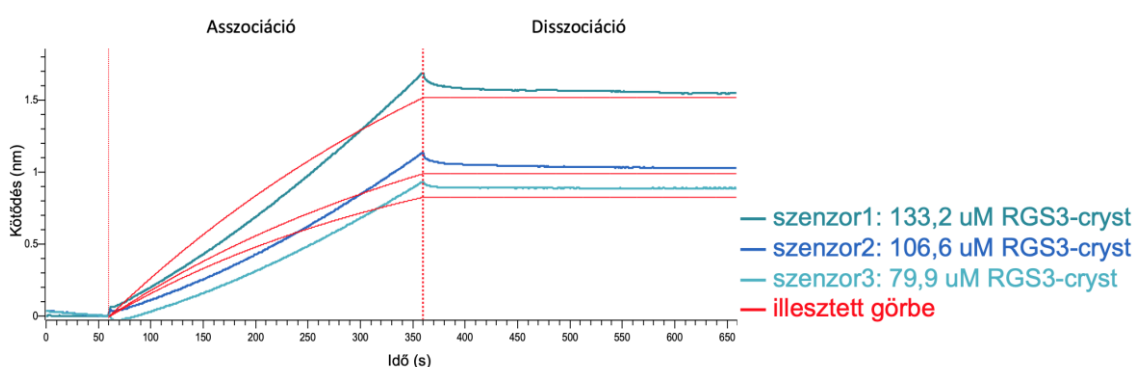
A 33. ábrán látható, hogy a KRas G12C felkötése a szenzorhoz ismét sikeresen megtörtént. Továbbá a negatív kontroll azt mutatta, hogy nem történt aspecifikus felkötődés, amikor a szenzor az analit oldatába merült. Az asszociációs és disszociációs lépések lefutása is megfelelt, ami azt jelentette, hogy a mérési összeállítás alkalmas arra, hogy több különböző

RGS3 koncentrációban is elvégezzem a kísérletet, annak érdekében, hogy a kötési állandót (K_D) meg tudjam határozni.



33. ábra. A KRas G12C-avi és az RGS3-cryst fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata BLI-vel.

A következő mérési összeállításban 0; 53,3; 79,9; 106,6 és 133,2 μM -os RGS3-cryst oldatokat vizsgáltam, emellett minden méréshez tartozott egy negatív kontroll is. A mérés elvégzése után az eredményeket az Octet® rendszer saját szoftverében értékeltem ki. Ennek során a nyers adatokat korrigáltam a felvett alapvonalak, illetve a 0 μM -os mérés eredményével. A mérési tartományon kívül eső adatokat elhanyagoltam, majd a megmaradt pontokra görbét illesztettem (34. ábra).



34. ábra. A BLI méréssel kapott korrigált eredmények és a rájuk illesztett 1:1 kötődést feltételező görbe. A figyelembe vett RGS3-cryst koncentrációk: 79,9; 106,6 és 133,2 μM és a rájuk illesztett görbék.

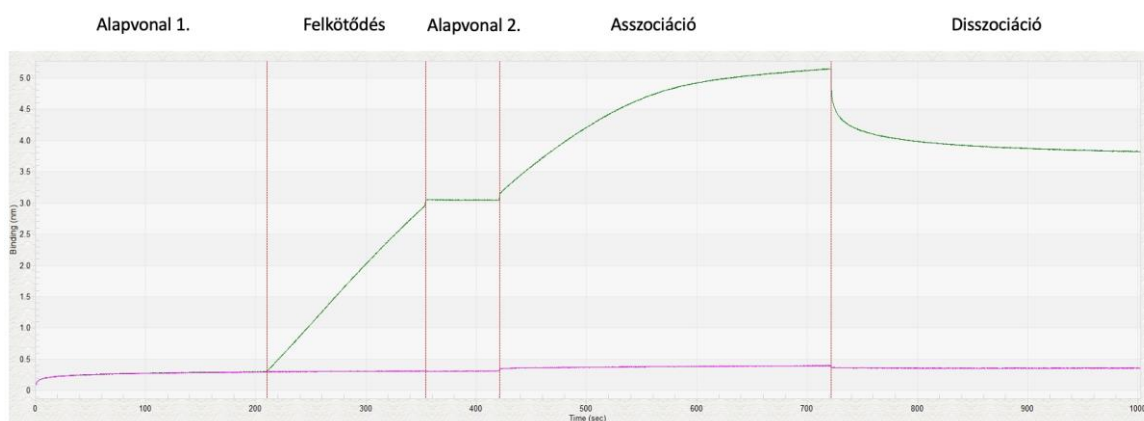
A görbeillesztés során több kötődési modellt is kipróbáltam. 1:1-es kötődés esetén egy ligand molekula egy analit molekulával hat kölcsön, heterogén kötődés esetén pedig egy ligandhoz több analit molekula is kötődhet. Azonban egyik kötődési mintázat sem írta le

megfelelően a mért reakciót (34. ábra). Ezt feltételezésünk szerint az okozhatta, hogy a nukleotid is disszociált a szenzorról az RGS3 asszociációja és disszociációja közben is. Ennek megelőzésére GNP-t kellene adagolni a mintákhoz, ami azonban annyira drága, hogy ez a megoldás nem kivitelezhető.

5.4.3. AviTag-RGS3-cryst és KRas G12D fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata

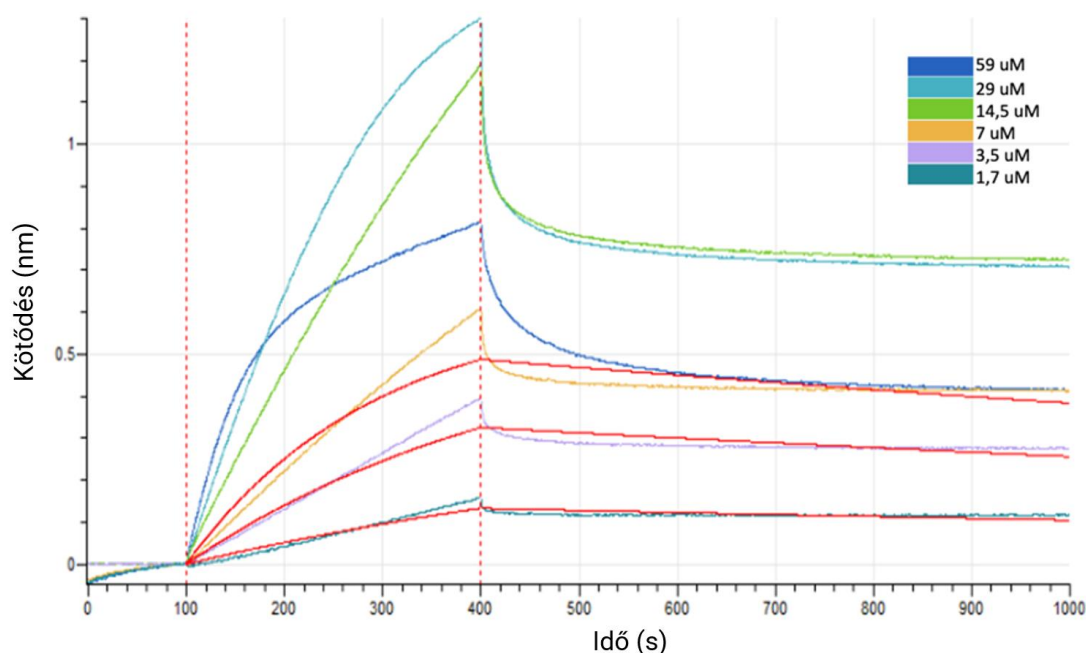
Annak érdekében, hogy fényt derítsek az RGS3 és a KRas mutánsok közti kölcsönhatás mivoltára egy új mérési elrendezést is kipróbáltam. Ehhez az RGS3-cryst-et asszociáltattam a szenzorhoz. Ezért létrehoztam egy AviTag-gel rendelkező RGS3-cryst fehérjekonstruktot, amit aztán a sejtfeltárás során biotináltam is. Az analit oldata pedig KRas G12D fehérjét tartalmazott.

Ebben az esetben is két szenzor (35. ábra zöld görbe: AviTAG-RGS3-cryst-tel töltött szenzor, rózsaszín görbe: negatív kontroll) felhasználásával ellenőriztem, hogy a biotinálás sikeres volt-e, illetve azt is, hogy az asszociációs és disszociációs lépések megfelelően lejátszódnak-e. Ennek eredménye a 34. ábrán látható.



35. ábra. Az AviTag-RGS3-cryst és a KRas G12D fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata BLI-vel.

A sikeres próbamérés után összeállítottam az eltérő töménységű KRas G12D-t vizsgáló mérést. Ehhez a ligand oldata 10 µg/ml AviTAG-RGS3-cryst fehérjét tartalmazott, az analit oldatok pedig 0; 0; 1,7; 3,5; 7; 14,5; 29 és 59 µM koncentrációban tartalmazták a KRas G12D fehérjét.



36. ábra. Az AviTag-RGS3-cryst és a KRas G12D fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata, különböző KRas G12D koncentrációk esetében. Az ábra jobb oldalán az egyes KRas G12D koncentrációk nagysága látható (1,7; 3,5; 7; 14,5; 29 és 59 μM), pirossal

A nyers adatokat ezt követően a felvett alapvonalak, illetve a 0 μM KRas G12D-t tartalmazó minták mérési eredményével korrigáltam. Ezt követően az 1,7; 3,5 és 7 μM -os minták görbéjére 1:1 kölcsönhatás szerinti függvényt illesztettem a programban, így megkaptam, hogy a kötődési állandó (K_D) értéke közelítőleg 0,58 μM ($\chi^2 = 7$) (36. ábra).

Ez az eredmény azt bizonyította, hogy a felállított mérési elrendezés megfelelően működött. További mérésekkel, illetve azok optimalizálásával a KRas G12D és RGS3-cryst fehérje közti kölcsönhatás állandói pontosabban meghatározhatóak.

A későbbiekben a mérések ezen az elven történő felállítása megválaszolhatja, hogy milyen paraméterek jellemzik a mutáns KRas és GAP fehérjék között létrejövő kölcsönhatást. Ehhez az kell, hogy a QM/MM modellezéssel megtervezett GAP variánsokra a fehérjekonstruktszekvenciájára a tervezésénél AviTag is kerüljön, így később a biotinált fehérje alkalmas lehet a bioréteg interferometriával történő kölcsönhatásvizsgálatra.

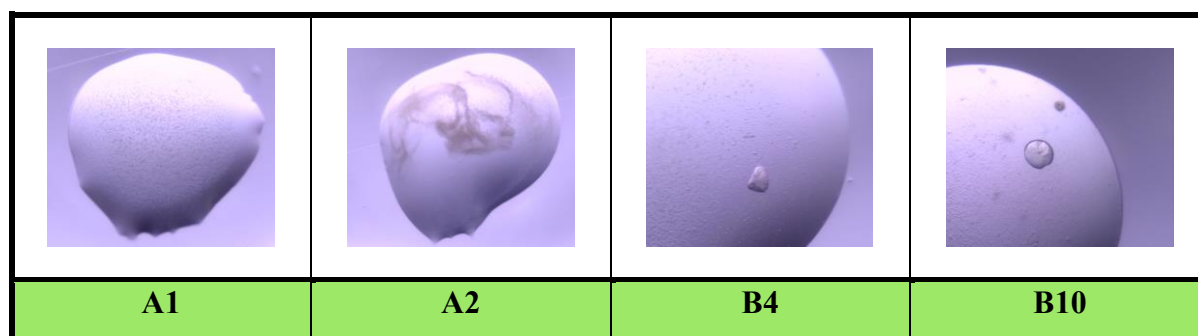
További célom, hogy a jelenlegi méréseket optimalizáljam, valamint új fehérjekonstruktok előállításával ellenőrizsem a QM/MM modellezéssel tervezett GAP fehérjéket, melyek képesek lehetnek a mutálódott KRas-ok hidrolízisét javítani.

5.6. Fehérjekristályosítás eredménye

A célom az volt, hogy a KRas G12C fehérjét és az RGS3-cryst fehérjét komplex formájában kikristályosítsam, hogy ezáltal egy közelebbi képet kapjak a fehérje aktív centrumában létrejövő kötésekről.

A két fehérje kölcsönhatásának létrejöttéhez egy nem-hidrolizálható nukleotid-analógot adtam (GppNHp t (guanozin-5'-[β,γ -imido]trifoszfát)) 5× feleslegben. Az eltérő kristályosító környezet kialakításához a ProPlex™ által összeállított oldatokat használtam, melyek kifejezetten fehérjekomplexek kikristályosítására lettek kifejlesztve. Ezáltal a 96-lyukú kristályosító tálcán 66 darab polietilén-glikol (PEG), 24 darab szervetlen só és 6 darab szerves oldat alapú körülményt tudtam létrehozni. A kristályosító lemezt ezt követően 20 °C-on tároltam 60 napon keresztül. Ennek leteltével Olympus SZX16 sztereomikroszkóppal megvizsgáltam, hogy keletkeztek-e kristályok az egyes well-ekben. A fehérjeszerkezet meghatározásához elengedhetetlen megfelelő nagyságú fehérjék képződése, hogy azokat aztán később röntgenkristallográfiával vizsgálni lehessen.

A mikroszkópos vizsgálat során nyilvánvalóvá vált, hogy a tálca legtöbb zsebében a fehérjék kicsapódtak. A kicsapódás többféle formában is megjelent a plate-en, valamikor a csepp zavarosságát (A1), máskor a fehérjék barnás elszíneződését (A2) eredményezte (37. ábra). Két esetben is (B4, B10) kis gömb alakú klaszterek keletkeztek, azokban ezek sem voltak még megfelelőek a további vizsgálatokhoz. A B4 oldat összetétele 0,2 M NaCl, 0,1 M MES (2-etánszulfonsav), 10 w/v% PEG4000, pH=6,5, a B7 oldat összetétele pedig 0,15 M ammónium-szulfát, 0,1 M MES, 15 w/v% PEG4000, pH=6 volt. Mindkettő zseb összetétele hasonló volt, melyekben a gömb alakú klaszterek keletkeztek. Ez arra enged következtetni, hogy az elkövetkező kristályosításnál ezekből a körülményekből kiindulva érdemes végezni a további optimalizálást.



37. ábra. A kristályosítás során a kristályosító tálca egyes zsebeiben létrejött minták.

6. Összefoglalás

Kutatómunkám során a KRas és GAP, illetve RGS3 fehérjék kölcsönhatásait vizsgáltam. Ehhez bakteriális expresszióval előállítottam a vad típusú KRas fehérjét, illetve a humán daganatos megbetegedésekben előforduló két leggyakoribb mutánst (KRas G12C és KRas G12D). Emellett előállítottam olyan GAP variánsokat, melyek kutatócsoportom kollaborátorainak *in silico* QM/MM modellezései alapján újból aktiválni tudják a mutáns KRas fehérjék GTP hidrolízisét. A vad típusú GAP mellett a termelt és tisztított mutánsok a következők voltak: L902D, L902E, L902Q, R903A és R903Q.

Az RGS3 fehérje egy rövidebb, a GAP-jellegű domént tartalmazó szekvenciáját is expresszáltam, valamint tisztítottam. Termofluorimetriás méréssel azt is ellenőriztem, hogy a fehérje sikeresen felvette a rá jellemző megfelelő térszerkezetet.

MESG-PNP foszfát esszé segítségével enzimaktivitásmérő vizsgálatokat végeztem. Először azt elemeztem, hogy a különböző KRas mutációk miként hatnak a vad típusú GAP katalizálta GTP hidrolízisre. Vad típusú fehérjék esetén a reakció gyorsan lezajlott, azonban az aktív centrumban mutálódott KRas fehérjék esetén a hidrolízis sebessége jóval csökkent.

Ezt követően megvizsgáltam, hogy a GAP-ok 902. lizin aminosavat érintő mutációja (L902E és L902Q) miként hat a KRas G12D GTPáz aktivitására. Az eredményeket összevetettem a vad típusú GAP (wt GAP) katalizálta reakcióval. Az elvárásokkal szemben a GAP variánsok nem tudtak gyorsabb hidrolízist eredményezni, mint a wt GAP, azonban az L902E mutáns aktiváló képessége megközelítette a vad típusét. A 903. arginin aminosav megváltoztatásának (R903A és R903Q) eredményét is megvizsgáltam. Ebben az esetben úgy tűnt, hogy az R903A mutáns kis mértékben javítani tudta az aktivitást.

Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a QM/MM modellel alkotott GAP variánsok alkalmasak lehetnek a KRas mutánsok hidrolízisének helyreállítására. További célom, hogy még több GAP variánst termeljek, valamint a foszfát esszé optimalizálásával, emellett más enzimaktivitásmérő módszerek (stopped-flow) alkalmazásával a reakciók átviteli számát (k_{cat}) is meghatározzam.

Bioréteg interferometriás módszerrel a KRas mutánsok és az RGS3 fehérje közti kölcsönhatást vizsgáltam. Ehhez először előállítottam az AviTag-es fehérjéket és azokat AVB101, biotin ligáz termelő sejtek együttes feltárásával sikeresen biotináltam.

Az első mérési elrendezésben AviTag-KRas G12C fehérjét asszociáltattam a szenzorhoz és analitként az RGS3-cryst oldatát használtam. A felkötődés sikeresen lezajlott, az asszociáció során aspecifikus kötődések nem alakultak ki, azonban a kapott eredménynek alkalmatlanok

voltak a további görbeillesztésre. Ezt feltételezhetően az okozhatta, hogy a nukleotid is disszociált a szenzorról az RGS3 asszociációja és disszociációja közben is.

Emiatt egy új mérési elrendezést alkalmaztam. Az RGS3-cryst fehérjekonstruktot egy AviTag-gel láttam el, majd a termelés után szintén AVB101 sejtekkel együtt tártam fel. A konstruktt előállítás és a biotinálás is sikeres volt, ami azt jelentette, hogy a fehérje alkalmas ligand lehet a bioréteg interferometriás mérésekben. Ebben az esetben az AviTag-RGS3-cryst fehérjét kötöttem a szenzorhoz és az analit oldata KRas G12D-t tartalmazott. Több KRas G12D koncentráció mellett is elvégeztem a mérést, aminek eredményére 1:1 kölcsönhatás szerint görbét is illesztettem, amivel megkaptam a kötődési állandó közelítőleges értékét, $K_D \approx 0,58 \mu\text{M}$ ($\chi^2 = 7$). Ez az eredmény azt mutatta, hogy a mérési elrendezés megfelelően működött.

További célom, hogy a méréseket optimalizáljam, valamint új fehérjekonstruktok előállításával ellenőrizsem a QM/MM modellezéssel tervezett GAP fehérjék KRas mutánsokkal alkotott kölcsönhatását.

Annak érdekében, hogy közelebbi képet kapjak a KRas mutánsok aktív centrumában létrejövő kötésekről a KRas G12C és RGS3-cryst fehérjét komplex formájában szándékoztam kristályosítani. A röntgenkristallográfiás módszer elvégzéséhez megfelelő kristályokat nem sikerült előállítani, azonban a jelenlegi eredmények irányt mutathatnak a további optimalizálási lépések felé.

Eddigi kutatásom előremutató eredményeket szolgáltak. Kutatómunkám folytatásával szeretnék további fehérjéket bevonni a vizsgálatokba, valamint még több módszerrel megvizsgálni a fehérjék közti kölcsönhatás egyes aspektusait. Remélem, hogy munkámmal hozzá tudok járulni a KRas mutáns daganatok elleni küzdelemhez.

Függelék

Felhasznált oldatok összetétele

Luria-Bertani tápoldat (1 liter)

- 10 g tripton
- 5 g élesztő
- 10 g NaCl
- pH=7,0

Sejtfeltárási puffer (fehérjék saját oldata)

- 200 mM NaCl
- 50 mM HEPES
- 5 mM MgCl₂
- pH=7,5

TAE puffer (TRIS-acetát-EDTA)

- 0,4 M TRIS-acetát
- 0,01 M EDTA

SDS mintakotél

- 62,5 mM TRIS
- 25 % glicerol
- 2 % SDS
- 0,01 % brómfenolkék
- 350 mM DTT
- pH=6,5

SDS-PAGE puffer

- 25 mM TRIS
- 192 mM glicerol
- 0,1 %
- pH=7,5

Szekvenciák

A vizsgált fehérjék aminosav szekvenciáit az alábbi táblázatok tartalmazzák. Az egyes fehérjékhez tartozó molekulatömeget és extinkciós koefficienszt az ExPASy ProtParam programmal határoztam meg. A szekvenciákban kék színnel a hisztidin-taget, zöld színnel az AviTag-et jelöltem, valamint a mutációkat piros színnel emeltem ki.

KRas fehérjék			
Típus	Molekulatömeg [Da]	$\varepsilon^* \left[\frac{\text{ml}}{\text{mg} \cdot \text{cm}} \right]$	Szekvencia
wt KRas	21807,45	0,615	MGSSHHHHHHSSGRENLYFQGHMTEYKLVVV GAGGVGKSALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSY RKQVVIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQY MRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKR VKDSEDVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDL ARSYGIPFIETSAKTRQGVDDAFYTLVREIR KHKEK
wt KRas AviTag	23618,43	0,801	MGSSHHHHHHSSGRENLYFQGHMTEYKLVVV GAGGVGKSALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSY RKQVVIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQY MRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKR VKDSEDVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDL ARSYGIPFIETSAKTRQGVDDAFYTLVREIR KHKEKGLNDIFEAQKIEWHE
KRas G12C	21853,53	0,614	MGSSHHHHHHSSGRENLYFQGHMTEYKLVVV GACGVGKSALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSY RKQVVIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQY MRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKR VKDSEDVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDL ARSYGIPFIETSAKTRQGVDDAFYTLVREIR KHKEK
KRas G12C AviTag	23664,52	0,799	MGSSHHHHHHSSGRENLYFQGHMTEYKLVVV GACGVGKSALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSY RKQVVIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQY MRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKR VKDSEDVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDL ARSYGIPFIETSAKTRQGVDDAFYTLVREIR KHKEKGLNDIFEAQKIEWHE
KRas G12D	21865,48	0,613	MGSSHHHHHHSSGRENLYFQGHMTEYKLVVV GADGVGKSALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSY RKQVVIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQY MRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKR VKDSEDVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDL ARSYGIPFIETSAKTRQGVDDAFYTLVREIR KHKEK
KRas G12D AviTag	23676,47	0,799	MGSSHHHHHHSSGRENLYFQGHMTEYKLVVV GADGVGKSALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSY RKQVVIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQY MRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKR VKDSEDVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDL ARSYGIPFIETSAKTRQGVDDAFYTLVREIR KHKEKGLNDIFEAQKIEWHE

F1. táblázat. A vizsgált KRas fehérjék aminosav szekvenciája, molekulatömege és extinkciós koefficiense.

GAP fehérjék			
Típus	Molekulatömeg [Da]	$\varepsilon^* \left[\frac{\text{ml}}{\text{mg} \cdot \text{cm}} \right]$	Szekvencia
wt GAP	40293,61	0,395	MEKIMPEEEYSEFKELILQKELHVYALSHVCGQDRTL LASILLRIFLHEKLESLLLCTLNDREISMEDEATTLFR ATTLASTLMEQYMKATATQFVHHALKDSILKIMESKQS CELSPSKLEKNEDVNTNLTHLLNILSELVEKIFMASEI LPPTLRYYIGCLQKSVQHKWPTNTTMRTRVVS GFVFLR LICPAILNPRMFNIISDSPSPIAARTLILVAKSVQNLA NLVEFGAKEPYMEGVNPFIKSNKHRMIMFLDELGNVPE LPDTTEHSRTDLSRDLAALHEICVAHSDELRTLSNERG AQQHVLKLLAITELLQKQKQYTKTNDVRSSGLVPRG SAAALEHHHHHH
GAP L902D	40279,58	0,395	MEKIMPEEEYSEFKELILQKELHVYALSHVCGQDRTL LASILLRIFLHEKLESLLLCTLNDREISMEDEATTLFR ATTLASTLMEQYMKATATQFVHHALKDSILKIMESKQS CELSPSKLEKNEDVNTNLTHLLNILSELVEKIFMASEI LPPTLRYYIGCLQKSVQHKWPTNTTMRTRVVS GFVFR LICPAILNPRMFNIISDSPSPIAARTLILVAKSVQNLA NLVEFGAKEPYMEGVNPFIKSNKHRMIMFLDELGNVPE LPDTTEHSRTDLSRDLAALHEICVAHSDELRTLSNERG AQQHVLKLLAITELLQKQKQYTKTNDVRSSGLVPRG SAAALEHHHHHH
GAP L902E	40309,56	0,395	MEKIMPEEEYSEFKELILQKELHVYALSHVCGQDRTL LASILLRIFLHEKLESLLLCTLNDREISMEDEATTLFR ATTLASTLMEQYMKATATQFVHHALKDSILKIMESKQS CELSPSKLEKNEDVNTNLTHLLNILSELVEKIFMASEI LPPTLRYYIGCLQKSVQHKWPTNTTMRTRVVS GFVFER LICPAILNPRMFNIISDSPSPIAARTLILVAKSVQNLA NLVEFGAKEPYMEGVNPFIKSNKHRMIMFLDELGNVPE LPDTTEHSRTDLSRDLAALHEICVAHSDELRTLSNERG AQQHVLKLLAITELLQKQKQYTKTNDVRSSGLVPRG SAAALEHHHHHH
GAP L902Q	40308,58	0,395	MEKIMPEEEYSEFKELILQKELHVYALSHVCGQDRTL LASILLRIFLHEKLESLLLCTLNDREISMEDEATTLFR ATTLASTLMEQYMKATATQFVHHALKDSILKIMESKQS CELSPSKLEKNEDVNTNLTHLLNILSELVEKIFMASEI LPPTLRYYIGCLQKSVQHKWPTNTTMRTRVVS GFVFR LICPAILNPRMFNIISDSPSPIAARTLILVAKSVQNLA NLVEFGAKEPYMEGVNPFIKSNKHRMIMFLDELGNVPE LPDTTEHSRTDLSRDLAALHEICVAHSDELRTLSNERG AQQHVLKLLAITELLQKQKQYTKTNDVRSSGLVPRG SAAALEHHHHHH
GAP R903A	40208,50	0,396	MEKIMPEEEYSEFKELILQKELHVYALSHVCGQDRTL LASILLRIFLHEKLESLLLCTLNDREISMEDEATTLFR ATTLASTLMEQYMKATATQFVHHALKDSILKIMESKQS CELSPSKLEKNEDVNTNLTHLLNILSELVEKIFMASEI LPPTLRYYIGCLQKSVQHKWPTNTTMRTRVVS GFVFLA LICPAILNPRMFNIISDSPSPIAARTLILVAKSVQNLA NLVEFGAKEPYMEGVNPFIKSNKHRMIMFLDELGNVPE LPDTTEHSRTDLSRDLAALHEICVAHSDELRTLSNERG AQQHVLKLLAITELLQKQKQYTKTNDVRSSGLVPRG SAAALEHHHHHH
GAP R903Q	40265,55	0,396	MEKIMPEEEYSEFKELILQKELHVYALSHVCGQDRTL LASILLRIFLHEKLESLLLCTLNDREISMEDEATTLFR ATTLASTLMEQYMKATATQFVHHALKDSILKIMESKQS CELSPSKLEKNEDVNTNLTHLLNILSELVEKIFMASEI LPPTLRYYIGCLQKSVQHKWPTNTTMRTRVVS GFVFLQ LICPAILNPRMFNIISDSPSPIAARTLILVAKSVQNLA

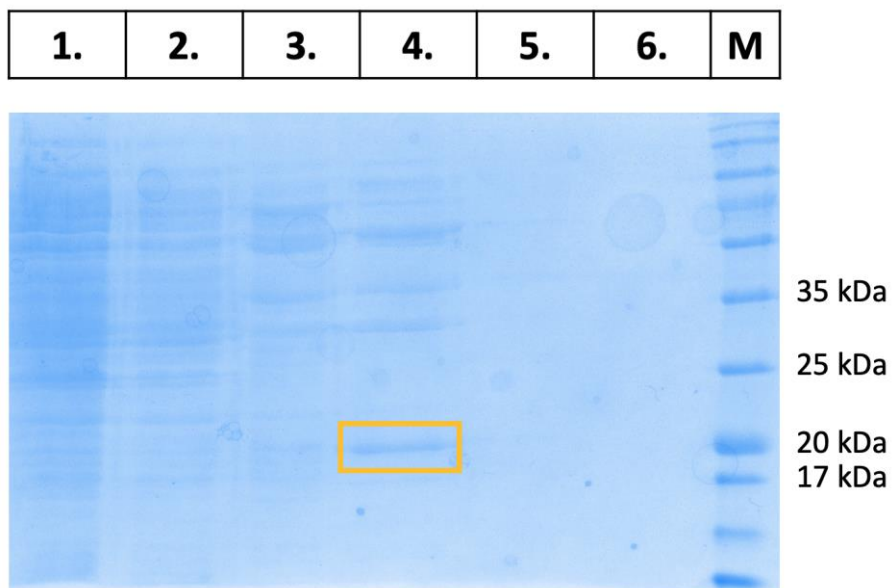
			NLVEFGAKEPYMEGVNPFIKSNKHRMIMFLDELGNVPE LPDTTEHSRTDLSRDLAALHEICVAHSDELRTLSNERG AQQHVLKKLLAITELLQKQKQYTKTNDVRSSGLVPRG SAAALEHHHHHH
--	--	--	---

F2. táblázat. A vizsgált GAP fehérjék aminosav szekvenciája, molekulatömege és extinkciós koefficiense.

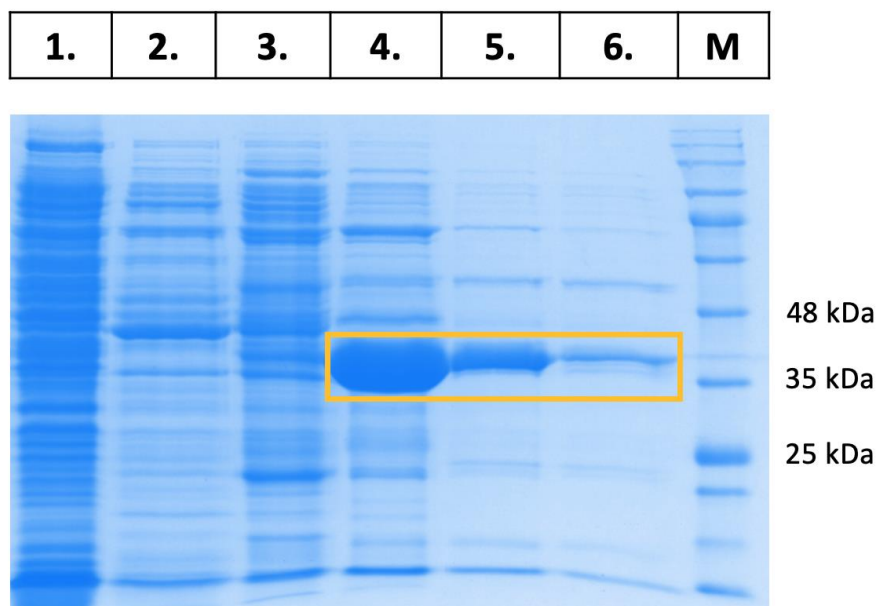
KRas fehérjék			
Típus	Molekulatömeg [Da]	$\epsilon^* \left[\frac{\text{ml}}{\text{mg} \cdot \text{cm}} \right]$	Szekvencia
RGS3-cryst	18326,01	1,007	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMFTSEEAL KWGESLEKLLVHKYGLAVFQAFLRTEFS EENLEFWLACEDFKKVKSQSKMASKAKK IFAEYIAIQACKEVNLDSTREHTKDNL QSVTRGCFDLAQKRIFGLMEKDSYPRFL RSDLYLDLINQKKMSPPL
AviTag- RGS3-cryst	20137,00	1,189	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMFTSEEAL KWGESLEKLLVHKYGLAVFQAFLRTEFS EENLEFWLACEDFKKVKSQSKMASKAKK IFAEYIAIQACKEVNLDSTREHTKDNL QSVTRGCFDLAQKRIFGLMEKDSYPRFL RSDLYLDLINQKKMSPPLGLNDIFEAQK IEWHE

F3. táblázat. A vizsgált RGS3 fehérjék aminosav szekvenciája, molekulatömege és extinkciós koefficiense.

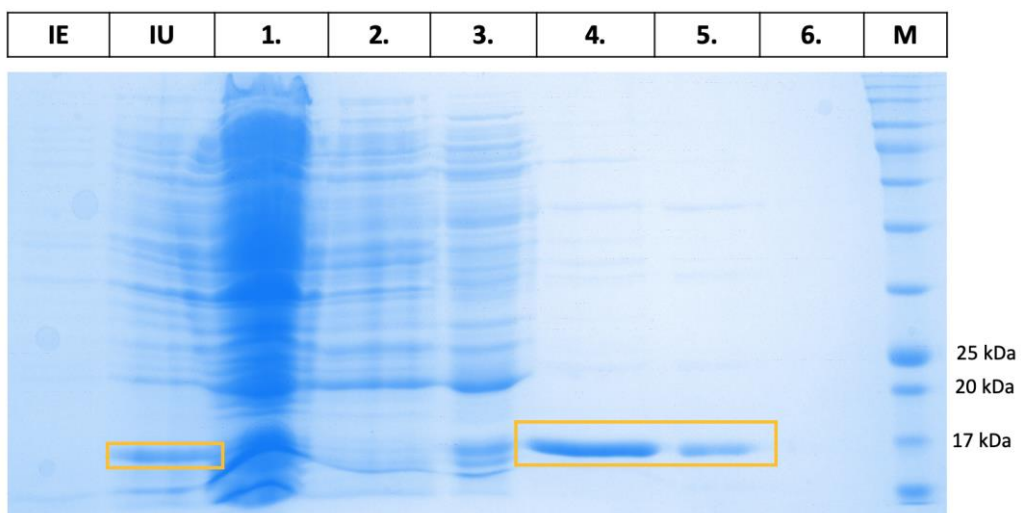
További gélképek



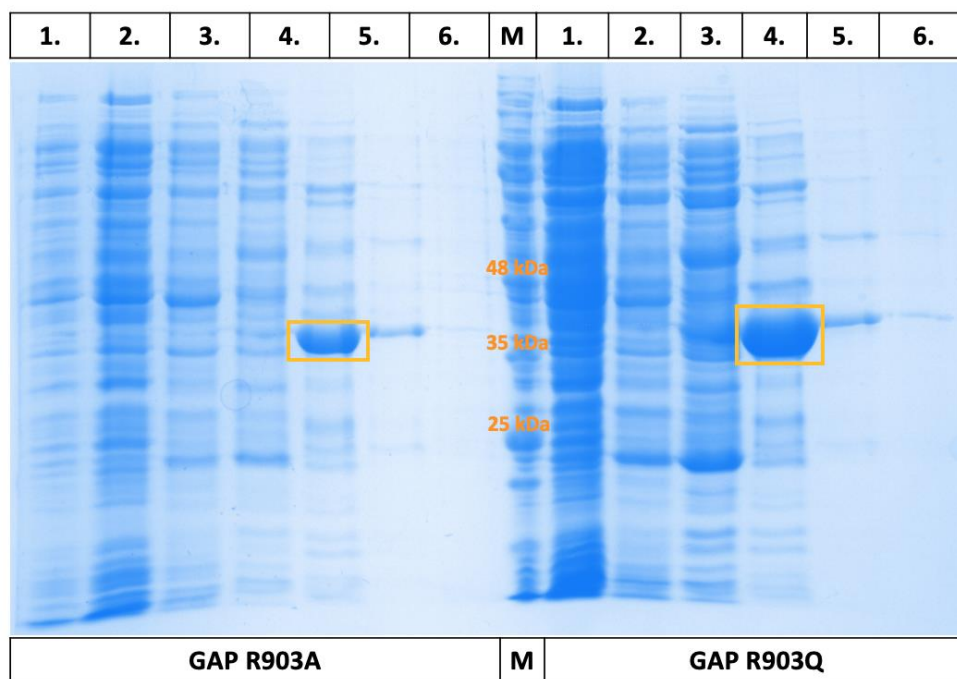
F1. ábra. A KRas G12C-AviTag fehérje tisztításának gélképe.



F2. ábra. A wt GAP fehérje tisztításának gélképe.



F3. Az RGS3-cryst fehérje termelése és tisztítása során vett minták gélképe.



F4. ábra. A GAP R903A és R90Q fehérjék tisztításának gélképe.

Irodalomjegyzék

- [1] Reiner DJ, Lundquist EA. Small GTPases. In: WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology [Internet]. Pasadena (CA): WormBook; 2005-2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19741/>
- [2] Song, S., Cong, W., Zhou, S., Shi, Y., Dai, W., Zhang, H., Wang, X., He, B., & Zhang, Q. (2019). Small GTPases: Structure, biological function and its interaction with nanoparticles. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 14(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.06.004>
- [3] Shetu, S. A., & Bandyopadhyay, D. (2022). Small-Molecule RAS Inhibitor as Anticancer Agents: Discovery, Development, and Mechanistic Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3706. <https://doi.org/10.3390/ijms23073706>
- [4] Hodge, R. G., Schaefer, A., Howard, S. V., & Der, C. J. (2020). RAS and RHO family GTPase mutations in cancer: twin sons of different mothers?. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 55(4), 386–407. <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1810622>
- [5] Toma-Fukai, S., & Shimizu, T. (2019). Structural Insights into the Regulation Mechanism of Small GTPases by GEFs. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(18), 3308. <https://doi.org/10.3390/molecules24183308>
- [6] Mishra, A. K., & Lambright, D. G. (2016). Invited review: Small GTPases and their GAPs. *Biopolymers*, 105(8), 431–448. doi:10.1002/bip.22833
- [7] Ganotra, J., Sharma, B., Biswal, B. et al. Emerging role of small GTPases and their interactome in plants to combat abiotic and biotic stress. *Protoplasma* 260, 1007–1029 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00709-022-01830-6>
- [8] Hennig, A., Markwart, R., Esparza-Franco, M. A., Ladds, G., & Rubio, I. (2015). Ras activation revisited: role of GEF and GAP systems. *Biological chemistry*, 396(8), 831–848. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0257>
- [9] Simanshu, D. K., Nissley, D. V., & McCormick, F. (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, 170(1), 17–33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.009>
- [10] Ahmadian, M. R., Stege, P., Scheffzek, K., & Wittinghofer, A. (1997). Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nature structural biology*, 4(9), 686–689. <https://doi.org/10.1038/nsb0997-686>

- [11] Zenonos, K., & Kyprianou, K. (2013). RAS signaling pathways, mutations and their role in colorectal cancer. *World journal of gastrointestinal oncology*, 5(5), 97–101. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v5.i5.97>
- [12] Molina, J. R., & Adjei, A. A. (2006). The Ras/Raf/MAPK pathway. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 1(1), 7–9. [https://doi.org/10.1016/S1556-0864\(15\)31506-9](https://doi.org/10.1016/S1556-0864(15)31506-9)
- [13] Mendoza, M. C., Er, E. E., & Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in biochemical sciences*, 36(6), 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006>
- [14] Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy?. *Nature reviews. Cancer*, 10(12), 842–857. <https://doi.org/10.1038/nrc2960>
- [15] Fernández-Medarde, A., De Las Rivas, J., & Santos, E. (2021). 40 Years of RAS—A Historic Overview. *Genes*, 12(5), 681. <https://doi.org/10.3390/genes12050681>
- [16] Rajasekharan, Satish Kumar & Thiagarajan, Raman. (2013). Ras and Ras mutations in cancer. *Central European Journal of Biology*. 8. 609-624. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0158-5>.
- [17] Garcia-Torres, Desiree. (2019). Investigating the Regulation of Ras Protein Prenylation. https://www.researchgate.net/publication/353619744_Investigating_the_Regulation_of_Ras_Protein_Prenylation
- [18] Castellano, E., & Santos, E. (2011). Functional specificity of ras isoforms: so similar but so different. *Genes & cancer*, 2(3), 216–231. <https://doi.org/10.1177/1947601911408081>
- [19] Li, G., & Zhang, X. C. (2004). GTP hydrolysis mechanism of Ras-like GTPases. *Journal of molecular biology*, 340(5), 921–932. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.06.007>
- [20] Calixto, A. R., Moreira, C., Pabis, A., Kötting, C., Gerwert, K., Rudack, T., & Kamerlin, S. C. L. (2019). GTP Hydrolysis Without an Active Site Base: A Unifying Mechanism for Ras and Related GTPases. *Journal of the American Chemical Society*, 141(27), 10684–10701. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b03193>
- [21] Kötting, C., Kallenbach, A., Suveyzdis, Y., Wittinghofer, A., & Gerwert, K. (2008). The GAP arginine finger movement into the catalytic site of Ras increases the activation entropy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(17), 6260–6265. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712095105>

- [22] Johnson, C., Burkhart, D. L., & Haigis, K. M. (2022). Classification of KRAS-Activating Mutations and the Implications for Therapeutic Intervention. *Cancer discovery*, 12(4), 913–923. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-22-0035>
- [23] Hunter, J. C., Manandhar, A., Carrasco, M. A., Gurbani, D., Gondi, S., & Westover, K. D. (2015). Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations. *Molecular cancer research : MCR*, 13(9), 1325–1335. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0203>
- [24] Ian A. Prior, Fiona E. Hood, James L. Hartley; The Frequency of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res* 15 July 2020; 80 (14): 2969–2974. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-3682>
- [25] Yang, H, Zhou, X, Fu, D, Le, C, Wang, J, Zhou, Q, et al. Targeting RAS mutants in malignancies: successes, failures, and reasons for hope. *Cancer Commun.* 2023; 43: 42–74. <https://doi.org/10.1002/cac2.12377>
- [26] Zeissig, M. N., Ashwood, L. M., Kondrashova, O., Sutherland, K. D. (2023) Next batter up! Targeting cancers with KRAS-G12D mutations. *Cell Press*. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2023.07.010>
- [27] Nyíri, K., Koppány, G., & Vértessy, B. G. (2020). Structure-based inhibitor design of mutant RAS proteins-a paradigm shift. *Cancer metastasis reviews*, 39(4), 1091–1105. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09914-6>
- [28] Rathod, L. S., Dabhade, P. S., & Mokale, S. N. (2023). Recent progress in targeting KRAS mutant cancers with covalent G12C-specific inhibitors. *Drug discovery today*, 28(5), 103557. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103557>
- [29] Corcoran R. B. (2023). A single inhibitor for all KRAS mutations. *Nature cancer*, 4(8), 1060–1062. <https://doi.org/10.1038/s43018-023-00615-x>
- [30] Mullard A. (2023). The KRAS crowd targets its next cancer mutations. *Nature reviews. Drug discovery*, 22(3), 167–171. <https://doi.org/10.1038/d41573-023-00015-x>
- [31] De Vries, L., Zheng, B., Fischer, T., Elenko, E., & Farquhar, M. G. (2000). The regulator of G protein signaling family. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 40, 235–271. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.235>
- [32] Li, C., Vides, A., Kim, D., Xue, J. Y., Zhao, Y., & Lito, P. (2021). The G protein signaling regulator RGS3 enhances the GTPase activity of KRAS. *Science (New York, N.Y.)*, 374(6564), 197–201. <https://doi.org/10.1126/science.abf1730>

[33] Berta, D., Gehrke, S., Nyíri, K., Vértessy, B. G., & Rosta, E. (2023). Mechanism-Based Redesign of GAP to Activate Oncogenic Ras. *Journal of the American Chemical Society*, 145(37), 20302–20310. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c04330>