



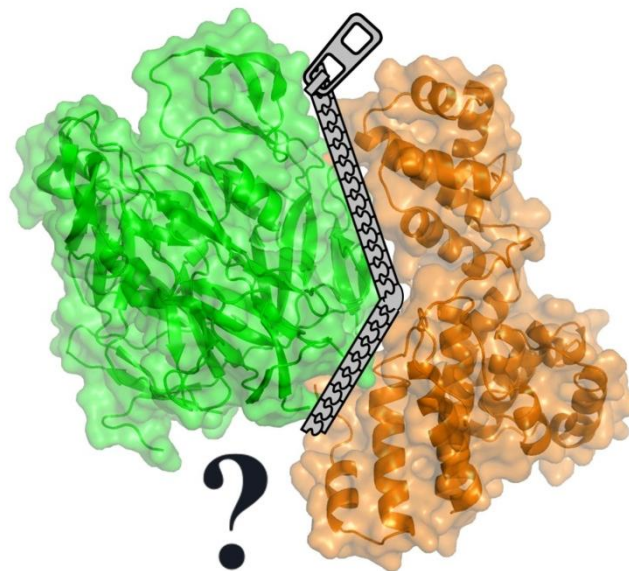
**BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM**

**Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar**

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

**Kölcsönható szerkezeti elemek és kölcsönhatási felszín azonosítása  
egy fehérje-fehérje interakción alapuló molekuláris kapcsoló  
esetén**

TDK dolgozat



- Készítette:** Matejka Judit  
BSc IV. évfolyam, biomérnök szakos hallgató
- Témavezető:** Dr. Vértessy G. Beáta  
egyetemi tanár
- Konzulens:** Nyíri Kinga  
tudományos segédmunkatárs

**Budapest, 2015.**

## **Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Vértessy G. Beátának, aki lehetővé tette számomra, hogy kutatócsoportjában dolgozhassak és szakértelmével segítette munkámat.

Köszönettel tartozom konzulensemnek, Nyíri Kingának, aki határtalan lelkesedésével erősítette a téma iránti érdeklődésemet és kitartó tanításával, biztatásával előrelendítette kutatásomat.

Köszönet illeti Kőhegyi Biankát számos technika bemutatásáért, a felmerülő problémák együttes megoldásáért.

Köszönöm dr. Ozohanics Olivérnek a keresztkötési kísérletekhez kapcsolódó tömegspektroszkópiás mérések szakértő kivitelezését, az eredmények kiértékeléséhez adott iránymutatást.

Végül szeretném megköszönni a kutatócsoport összes tagjának kedvességét, figyelmességét, munkám során nyújtott segítségét.

## Tartalomjegyzék

<b>Rövidítések és idegen kifejezések jegyzéke .....</b>	<b>3</b>
<b>Bevezetés .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>6</b>
1.1. A dUTPáz enzim biológiai szerepe .....	6
1.2. A trimer dUTPáz-ok szerkezeti jellemzői.....	9
1.3. A dUTPáz, mint molekuláris kapcsoló .....	12
1.4. Fajspecifikus szegmensek .....	14
1.5. Az Stl fehérje szerkezete .....	16
<b>2. Célkitűzés .....</b>	<b>18</b>
<b>3. Módszerek .....</b>	<b>19</b>
3.1. Fehérjék előállítása és termelése .....	19
3.1.1. Kompetens sejtek előállítása .....	19
3.1.2. Transzformálás .....	19
3.1.3. Fehérje expresszió .....	20
3.1.4. Sejtfeltárás .....	21
3.2. Fehérje tisztítási módszerek .....	21
3.2.1. Affinitás kromatográfia .....	21
3.2.2. Ioncserés kromatográfia .....	22
3.2.3. Méretkizárásos kromatográfia.....	23
3.3. Fehérjevizsgálati módszerek .....	23
3.3.1. Koncentrációmérés.....	23
3.3.2. Gélöntés.....	24
3.3.3. Denaturáló gélelektroforézis (SDS-PAGE) .....	24
3.3.4. Elektroforetikus mobilitás eltolódás vizsgálat - EMSA.....	25

3.3.5. Natív gélelektroforézis .....	25
3.4. Fehérjekristályosítás.....	26
3.5. Röntgendiffrakciós szerkezetanalízis .....	28
3.6. Keresztkötött fehérjék előállítása .....	29
3.6.1. Keresztkötés .....	30
3.6.2. A fehérje SDS-PAGE gélben történő emésztése, izolálása.....	30
3.6.3. Oldatban lévő fehérje emésztése .....	31
3.6.4. A tömegspektrometriás mérés körülményei.....	31
<b>4. Eredmények és értékelésük .....</b>	<b>33</b>
4.1. Kristályosítási kísérletek a $\Phi$ 11 dUTPáz szegmensek kölcsönhatásban játszott szerepének felderítésére .....	33
4.1.1. $\Phi$ 11 dUTPáz dKar és dLoop fehérjék tisztítása .....	33
4.1.2. $\Phi$ 11 dUTPáz dKar és dLoop fehérjék kristályosítása .....	34
4.2. Stl fehérje kölcsönható felszínének vizsgálata az N-terminális részre beültetett triptofán szenzorral .....	40
4.3. A két fehérje kölcsönható felszínének keresése keresztkötési módszerrel .....	46
4.3.1. A kísérlethez szükséges fehérjék előállítása .....	46
4.3.2. A tömegspektrometriás kísérleti eredmények kiértékelése .....	50
<b>5. Összefoglalás .....</b>	<b>56</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>58</b>
<b>7. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>60</b>
<b>8. Függelék .....</b>	<b>64</b>
8.1. Poliakrilamid gelek összetétele .....	64
8.2. Méretkizárásos kromatográfiás tisztítás gélképei .....	65
8.3. Keresztkötési kísérletek gélképe .....	66
8.4. Fehérje szekvenciák .....	67

## Rövidítések és idegen kifejezések jegyzéke

5-FU	5-fluorouracil
AP endonukleáz	apurin/apirimidin-endonukleáz
APS	ammónium-perszulfát
C-terminális	a fehérje karboxi-terminális vége
derepresszió	génexpresszió gátlásának feloldása
dKar dUTPáz	V. konzervált motívumot nem tartalmazó dUTPáz fehérje
dLoop dUTPáz	fágspecifikus inszertet nem tartalmazó dUTPáz fehérje
Dnáz	deoxiribonukleáz
DSS	diszukcinimidil- szuberát
DTT	DL-ditiotreitol
EMSA	Elektroforetikus mobilitás eltolódás vizsgálat
dTTP	dezoxitimidin-trifoszfát
dUMP	dezoxiuridin-monofoszfát
dUDP	dezoxiuridin-difoszfát
dUTP	dezoxiuridin-trifoszfát
dUTPáz/DUT	dezoxiuridin-trifoszfát-nukleotido-hidroláz
GST	glutation S-transzferáz fehérje
HTH	hélix-turn-hélix motívum
IPTG	izopropil- $\beta$ -tiogalaktozid
KO	knock out, itt: génkiütés
konstrukció	baktériumokban mesterségesen termeltetett más organizmusból származó fehérje
körülmény	kristályosítási oldat
LB	Luria-Bertrani tápoldat
LD	poliakrilamid, illetve agaróz gélelektrofotézis során a DNS minta felvitelét és haladásának követését segítő festékoldat
mintakotél	poliakrilamid gélelektrofotézis során a fehérje minta felvitelét és haladásának követését segítő festékoldat
moonlighting funkció	másodlagos funkció
MOPS	3-(N-morfolino)-propánszulfonsav
N-terminális	a fehérje amino-terminális vége
overnight/ON	egész éjszakán át (16 óra)
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
RNáz	ribonukleáz
SaPI	<i>Staphylococcus aureus</i> patogenicitási sziget

SaUGI	<i>Staphylococcus aureus</i> uracil-DNS glikoziláz inhibitor
screen	változatos összetételű oldatkészlet
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
TEMED	NNN'N'-tetra-metil-etilén-diamin
TS	timidilát-szintáz
UDE	U-DNS degradáló faktor
UDG	uracil-DNS glikoziláz
UNG	uracil-N-glikoziláz
well	kristályosítási tálcán a kristályosító oldatot tartalmazó edényke

## Bevezetés

Kutatómunkámat 2015 januárjában kezdtem meg a Dr. Vértessy Beáta által vezetett Genom Metabolizmus Kutatócsoportban az MTA Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézetében. A csoport kutatásainak fókusza a DNS-beli uracil feltérképezése illetve a sejtbeli uracil szintjét szabályzó dUTPáz enzim működésének és biológiai szerepének tanulmányozása. Jelenleg többek között a dUTPáz enzim kölcsönható partnereinek felderítése áll a csoport tudományos érdeklődésének középpontjában.

Egy fág eredetű dUTPáz enzim esetében a közelmúltban kimutatták, hogy a *Staphylococcus aureus* patogénitási szigetek (SaPI) életciklusát szabályozó StI fehérjével kölcsönhatásba lép és ennek hatására ezek a mobilis genetikai elemek – a SaPI-k – kifejeződnek. Emellett a képződött fehérje-fehérje komplexben a dUTPáz enzimaktivitása gátolt.

Ezt követően csoportunk megkezdte a kölcsönhatás karakterizálását *in vitro* és *in vivo* módszerekkel. A kölcsönhatás mechanizmusának vizsgálata kiinduló pontot jelenthet a toxinokat és rezisztenciát kódoló patogénitási szigetek terjedésének megakadályozásához; illetve a genomi integritás megőrzésében esszenciális szerepet játszó dUTPáz új fehérje típusú inhibitorainak fejlesztéséhez. Ehhez azonban elengedhetetlen a fehérjepartnerek kölcsönható felszíneinek pontos feltérképezése.

Munkám során lehetőségem nyílt a szerkezeti elemek azonosítását több oldalról megközelítő projektek feladataiban résztvenni. A kísérletsorozatok folyamán a szükséges fehérjék termelését és tisztítását követően a vizsgálatokat olyan korszerű módszerek használatával valósíthattam meg, melyeket az egyetemi stúdióban nem, vagy csak érintőlegesen tanultam.

Kísérletet tettem a szerkezet meghatározásra alkalmas röntgenkristallográfiás mérésekhez szükséges fehérjekristályok előállítására. Vizsgáltam az StI fehérje amino-terminális szegmensének szerepét a kölcsönhatásban, egy beépített triptofán szenzor segítségével. Emellett keresztkötési kísérleteket végeztem a fehérje-fehérje komplex illetve az StI fehérje oligomerizációs felszínek megállapítására.

# 1. Irodalmi áttekintés

## 1.1. A dUTPáz enzim biológiai szerepe

Minden élő szervezet számára esszenciális a genomi integritás fenntartása. Ennek érdekében a sejtbeli nukleotidszintek szigorúan szabályozottak és különböző javító mechanizmusok alakultak ki, melyek a DNS károsodás felismerésében, javításában, illetve megelőzésében egyaránt szerepet játszanak [1–3].

Különösen fontos a dUTP/dTTP arány pontos beállítása, ugyanis a legtöbb DNS polimeráz<sup>1</sup> nem képes különbséget tenni a mindössze egy metil csoportban különböző dUTP illetve dTTP bázisok között, így ezen nukleotidok sejtbeli aránya jelentősen befolyásolja a DNS-be beépülő uracil mennyiségét. A timint helyettesítő uracil önmagában nem lenne káros, azonban nem ez az egyetlen módja annak, hogy ez a nukleobázis előforduljon az örökítőanyagban. Az endogén DNS károsodások egyik gyakori formája ugyanis a citozin spontán dezaminációja. Ekkor ez a bázis uracillá alakul, ami ha nem kerül javításra, akkor az a Watson-Crick szabály értelmében az adeninnel fog egy bázispárt alkotni a citozinnal eredetileg párt alkotó guanin helyett. Ez a következő osztódáskor stabil pontmutáció kialakulásához vezet. Ezen spontán hiba kialakulása miatt nem lehet az uracil DNS alkotó bázis [1,4,5]. Ha a DNS-ben az egyik pirimidin bázis uracil, a másik pedig citozin lenne, akkor a hibajavító enzimek nem tudnának különbséget tenni a mutációt okozó, illetve az „ártatlan”, timint helyettesítő uracil között [4]. Az uracil specifikus korrigálása a bázis kivágó hibajavító mechanizmus során történik, melynek első lépését az uracil-DNS glikozidáz enzimcsalád (UDG) katalizálja<sup>2</sup>.

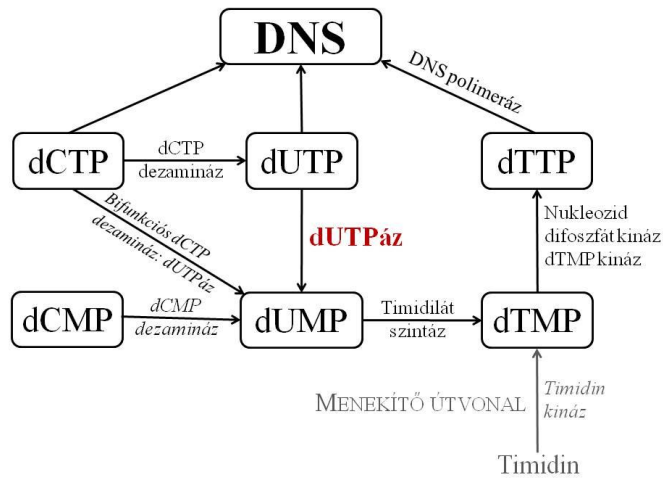
Emellett a dUTPáz enzim preventíven gátolja a hibás bázisok beépülését úgy, hogy a dUTP/dTTP szintet alacsonyan tartja [1,4,6]. Egyrészt azért, hogy katalizálja a dUTP hasítását dUMP-vé és inorganikus foszfáttá, másrészt a csökkenő dUTP szint mellett megnövekszik a dUMP mennyisége, ami a *de novo* pirimidin szintézis prekurzora (1. ábra).

<sup>1</sup> Bizonyos Archea polimerázok képesek felismerni a templát DNS szálban a nem javított uracilt. Ekkor a polimerizáció leáll, meggátolva ezzel a pontmutáció kialakulását [46]. Azonban magas uracil szint esetén ez a megoldás a szaporodással összeegyeztethetetlen.

<sup>2</sup> 2015-ben a kémiai Nobel-díjat 1/3-ad részben a 2. ábrán is bemutatott bázis kivágó javító mechanizmus felderítésére adták.



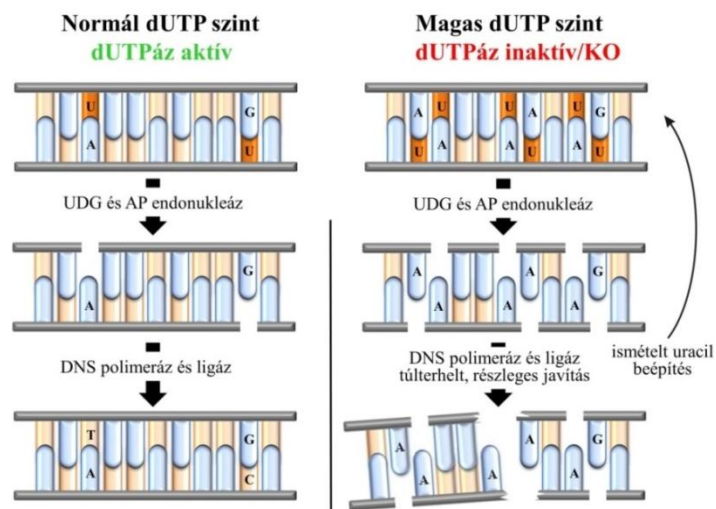
A dUTPáz enzimaktivitás esszenciális azoknál a fajknál, ahol a timin bázis felépüléséhez szükséges dUMP csak ezen a metabolikus útvonalon keletkezik [1] (1. ábra).



**1. ábra: dTTP de novo szintézisének útvonala [1] alapján**

Dőlten azok az enzimek, amelyek nem minden élőlényben fordulnak elő. Szürkével jelölve a dUMP hiányát menekítő útvonalhoz tartozó kiindulási anyag és enzim

A DNS-be került uracilt az UDG enzimesalád érzékeli és kivágja a szálból, azonban a dUTPáz hiányában továbbra is magas dUTP/dTTP arány miatt nagy valószínűséggel a DNS polimeráz ismét uracilt fog beépíteni. A javító enzimek működése következtében helyek keletkeznek, mely során egyes száltörés alakul ki, ami a javítási folyamat további lépéseinek túlterheltsége miatt kettősszalú kromoszómatöréshez vezethet [1,4] (2. ábra). Feltehetően ezen okból a *dut* gén által kódolt dUTPáz funkciójának kiesését számos fajban letálisnak találták [1,7–9].



**2. ábra: DNS-be épült uracil bázisok javításának folyamata**

A dUTPáz funkció csendesítése, illetve megszüntetése kompenzálható az *ung* gén kiütésével *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* (péklesztő) és *Caenorhabditis elegans* (fonálféreg) esetén, mivel a fenti folyamat nem megy végbe az UNG – UDG enzimsalád legfontosabb képviselője – hiánya miatt [9–11]. Azonban több esetben egy idő után a dupla génmutáció is letálisnak bizonyult, mivel egyes transzkripciós faktorok nem kötődnek az uracil tartalmú DNS-hez [12].

A *Staphylococcus aureus* bár rendelkezik UDG enzimmal, mégsem kódolja genomjában a dUTPáz fehérjét, habár sok esetben a kromoszómába épült profág hordozza a *dut* gént [13]. Azonban érdekes módon – a feltehetőleg magas uracil szint ellenére – a profágmentes, dUTPáz hiányos baktériumok is életképesek. Ennek egyik lehetséges magyarázata a nemrégiben felfedezett SaUGI (*Staphylococcus aureus* uracil-DNS glikoziláz inhibitor) fehérje létezése. Ez a *Staphylococcus aureus* UDG fehérjének DNS kötőhelyéhez kapcsolódva gátolja meg az uracil kivágását [14]. Léteznek azonban más dUTPáz hiányos baktériumok is, melyek nem kódolnak UDG inhibitorra [15]. Ezek túlélésének lehetséges magyarázatai, hogy (I) alacsony bennük az UDG fehérjék szintje, vagy (II) más kevésbé specifikus pirofoszfátáz, esetleg egy fág eredetű dUTPáz bontja le ezekben a dUTP-t, illetve (III) olyan DNS polimerázzal rendelkeznek, melyek diszkriminatívak a dTTP/dUTP között. Ennek a kérdésnek a tisztázása még további kutatások tárgyát képezi [15].

Egyes magasabb rendű szervezetekben úgy, mint a *Drosophila melanogaster*-ben, hiányzik az *ung* gén. Lárvális szövetekben a dUTPáz enzim sincs jelen, ami megnövekedett uracil tartalmat okoz a genomban. A harmadik lárva állapotban egy U-DNS degradáló faktor (UDE) fejeződik ki, amely kromoszóma töréseket okozva beindítja a teljes átalakuláshoz szükséges apoptotikus folyamatokat. Az imaginális diszkuszokban, melyek a felnőtt egyed testtájainak döntő részét kialakítják, expresszálódik a dUTPáz, ezáltal ezek nem degradálódnak, ezekből a részekből fejlődik ki a felnőtt egyed [16].

Az orvostudomány ezt, a számos élőlény sejtjei számára esszenciális dUTPáz enzimfehérjét tumor terápiás célpontként alkalmazza. A kezeléseknél gyakran használt orális 5-fluorouracil antimetabolit (5-FU, pl.: S-1, tegafur-uracil) a timidilát szintáz (TS) működését irreverzibilisen gátolja, mivel kovalensen kötődik az enzim aktív centrumához, így az nem képes dTTP-t szintetizálni, aminek következtében timinmentes sejthalál lép fel (2. ábra). A fenti terápiára rezisztens sejtvonalak kezelésére újabb többfunkciós TS inhibitorokat fejlesztenek, melyek az enzimgátlás mellett a DNS-be is képesek beépülni [17]. Kevésbé

érzékenyek a TS gátlására a dUTPáz-t túltermelő sejtek, mivel ez az enzim dUMP-t, a timidilát szintáz szubsztrátját termeli, mely az 5-FU inhibitorral verseng az enzimhez való kötésben. Azonban a timidilát szintáz inhibitorokat kismolekulás humán dUTPáz gátlószerekkel (TAS-114) használva hatékony tumorellenes terápiát értek el [18]. A dUTPáz inhibíció mellett egy másik lehetőség az enzim kifejeződésének szabályozása. Az oxaliplatin platina alapú kemoterápiás szer gátolja a dUTPáz enzim expresszióját, ezáltal hozzájárulva az 5-FU terápia hatékonyságához [19].

Fontos megemlíteni, hogy az uracil megjelenése a humán DNS-ben funkcionalitással bír az antitestek érési folyamatainál, az osztályváltó rekombinációnál (CSR) és a szomatikus hipermutációnál (SHM). Ezen két folyamat beindításában az Aktiváció-Indukált Citidin Deamináz (AID) enzimnek van szerepe azáltal, hogy az egyszálú DNS-ben a citozint uracillá alakítja, amely bázisok hasításra kerülnek az UNG által. Az AP endonukleáz a cukor-foszfát gerinc hasításával mind a CSR-hoz, mind a SHM-hoz szükséges DNS töréseket hoz létre [20].

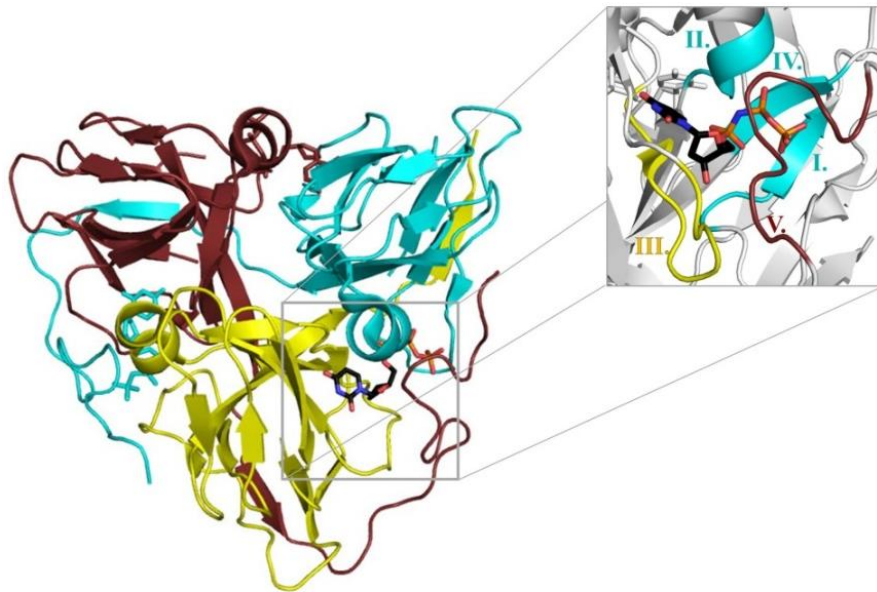
## 1.2. A trimer dUTPáz-ok szerkezeti jellemzői

A különböző élőlényekből származó dUTPáz-ok eltérő alegység számmal rendelkeznek. Az enzim lehet monomer, homodimer illetve a leggyakoribb formája három azonos alegység kapcsolódásával jön létre [21], melyek úgynevezett jelly-roll (lekváros tekercs)  $\beta$ -lemezes oligomer struktúrát alakítanak ki. Az így kialakult szerkezet nagy stabilitással bír azáltal, hogy az egyes alegységek C-terminálisán lévő  $\beta$ -szál belesimul a szomszédos alegységbe [1,22–24].

A homotrimer dUTPáz három, szimmetrikus aktív hellyel rendelkezik, melyek az alegységek öt evolúciósan konzervált motívumából épülnek fel. Egy aktív hely kialakításában az egyik alegység III., a másik alegység I., II. és IV., míg a harmadik alegység V. motívuma vesz részt [1] (3. ábra).

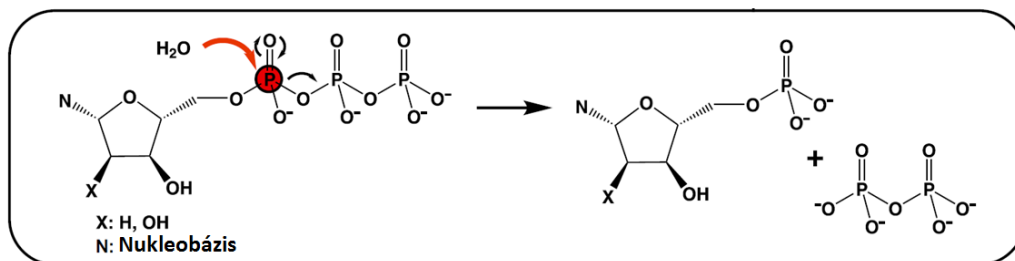
A monomer dUTPáz forma a herpeszvírusokban fordul elő. Kétszer olyan hosszú, mint a trimer egy alegysége. Ezek esetében is megfigyelhető az öt konzervált régió, azonban a motívumok nem a trimereknél tapasztalt sorrendben helyezkednek el a peptidláncban. A kétféle dUTPáz aktív centrumának kialakítása hasonló, mely alátámasztja azt a feltevést, hogy a monomer dUTPáz a trimert kódoló génből fejeződhetett ki. A homodimer dUTPáz-ok  $\alpha$ -helikális fehérjék, aktív centrumuk öt konzervált motívumból áll, azonban ez nem hasonlít a trimer fehérjék szubsztrátkötő zsebéhez. Katalitikus aktivitását tekintve nemcsak a dUTP,

hanem a dUDP hidrolizálására is képes [25]. Munkám során a trimer dUTPáz-okat vizsgáltam, így a továbbiakban ezeket mutatom be részletesebben.



3. ábra: A trimer humán dUTPáz szerkezeti modellje (PDB ID: 2HQU)

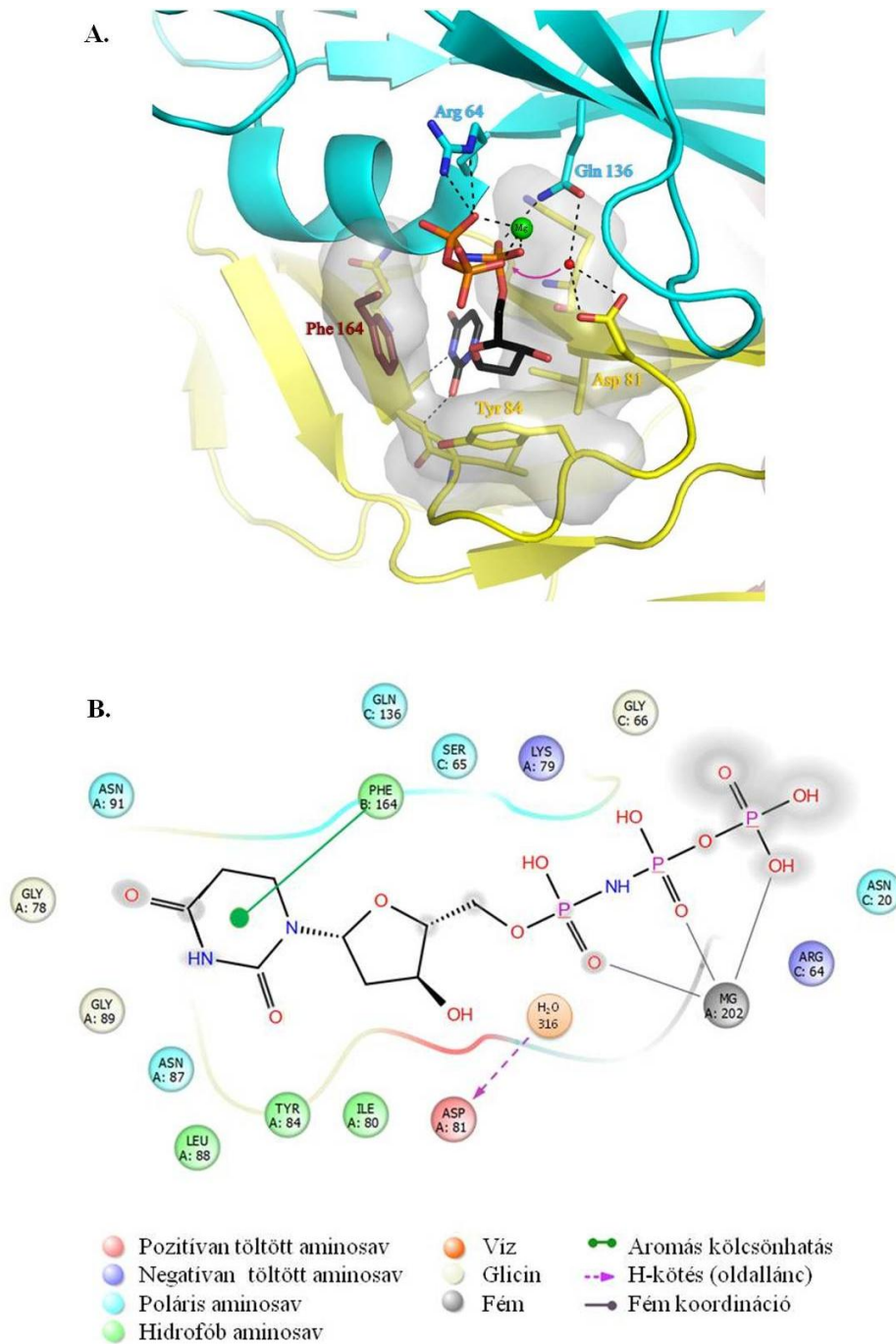
A dUTP enzimatisz lebontásának indító lépése során egy katalitikus vízmolekula a foszfátlánc  $\alpha$ -foszforatomjára nukleofil támadást indít, ezután bekövetkezik a hidrolízis (4. ábra) [26,27].



4. ábra: A víz nukleofil támadásával iníciált dUTP hidrolízis mechanizmusa [27]

A trimer dUTPáz-ok esetén a III. motívumban helyet foglaló  $\beta$ -hajtúkanyar biztosítja az enzim specificitását. Sztérikusan gátolja az adenin, guanin és timin nukleotidbázisok, valamint a ribóz bekötődését. Emellett, a DNS bázispárosodáshoz hasonlóan, hidrogénkötések alakulnak ki a fehérje atomok és az uracil között, mely által az uracil jelentősen nagyobb affinitással tud bekötődni szubsztrátként a citozinnal ellentétben [1,22,28]. A dezoxiribóz és ribóz közti szelektivitást a  $\beta$ -hajtúkanyar alján helyet foglaló tirozin látja el (5. ábra, Tyr 84). A dUTP foszfát csoportjával az I., II., és IV. motívumokban lévő aminosavak hatnak kölcsön, továbbá az I. motívumban szereplő aszpartát pozicionálja a katalitikus vízmolekulát (5. ábra; Asp 81) [1]. A  $Mg^{2+}$  kofaktor és egy arginin aminosav oldallánca (5. ábra; Arg 64)

által koordinált dUTP ligand a hidrolízist elősegítő „feszített” konformációt vesz fel. A harmadik alegység C-terminálisán található V. motívum aromás oldalláncú fenilalanin (5. ábra, Phe164) aminosavja az aktív centrumot szubsztrát kötött állapotban lefedi, ezáltal megteremtve a szükséges mikrokörnyezetet [1,22,28]



**5. ábra: A dUTP szubsztrát és aminosavak között kialakuló kölcsönhatások térbeli (A) és sematikus (B) bemutatása**

### 1.3. A dUTPáz, mint molekuláris kapcsoló

A *Staphylococcus aureus* opportunista patogén számos kórházi (nosocomiális) fertőzés forrása. Genomja sokszor tartalmaz mozgó genetikai elemeket (*Staphylococcus aureus* patogenicitási szigetek, SaPI-k), melyek horizontális géntranszferrel terjednek a sejtvonalak között. A SaPI-k többek között szuperantigéneket, toxinokat kódolhatnak, melyek toxikus sokk szindrómát, ételmérgezést váltanak ki [29].

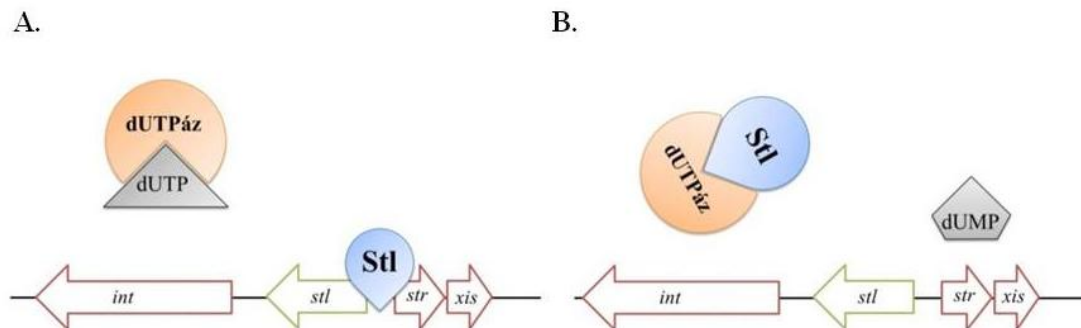
A patogenicitási szigetek életciklus szabályozó represszora az Stl protein, amely a SaPI DNS *stl* és *str* transzkripciók promóterek közötti génszakaszhoz kötődve gátolja meg ezen mobilis genetikai elemek kifejeződését [30]. (Emellett csoportunk meghatározott egy másik Stl kötőhelyet is az *str* és a *xis* közötti régióban<sup>3</sup>.) Az Stl fehérje represszálja a *xis* régió kifejeződését, a kivágó enzim képződésének gátlásával blokkolja a SaPI replikációt. Emellett represszálja még az *int* és *str* géneket is, miközben saját génjének kifejeződését pedig aktiválja [31]. Helper fág fertőzés hatására megszűnik az Stl represszió, indukálódik a SaPI génszakasz kivágódása és replikációja [32]. Egyes elméletek szerint a gazdasejtnek a patogenicitási szigetek jelenléte kifejezetten hasznos, mert a *Staphylococcus aureus*-ban igen ritkán kifejeződő CRISPR-ek helyett – melyek más baktériumokban lehetővé teszik egyes bakteriofágok genetikai állományának degradálását – ebben a fajban a SaPI-k akadályozzák bizonyos fágok növekedését és terjedését [33]. Így a mobilis genetikai elemek horizontális géntranszferével ezen védekező mechanizmus terjedése is megvalósul.

A SaPI<sub>bov1</sub> esetében a derepressziót a  $\Phi$ 11 helper fág *dut* génje által kódolt dUTPáz valósítja meg [30]. Így ez a dUTPáz fehérje nem csak enzimátikus funkcióját látja el, hanem egy másodlagos (moonlighting) funkcióval is rendelkezik. Ezt bizonyítja a katalitikusan inaktív  $\Phi$ 11DUT<sup>D81A</sup> mutáns SaPI<sub>bov1</sub> indukciós képessége is. Itt az enzimaktivitáshoz elengedhetetlen 81-es helyen lévő aszpartát aminosavát alaninnal helyettesítették, ezáltal a fehérje enzimátikusan inaktív, azonban az indukcióra továbbra is képes. Ez alátámasztja, hogy a derepresszió a dUTPáz valódi másodlagos funkciója [30].

Míg az Stl a DNS-hez kötve gátolja a patogenicitási szigetek kifejeződését, addig a dUTPáz nem hat kölcsön a SaPI genommal, így az Stl és a dUTPáz nem versenyzik egymással a DNS kötőhelyért. Mivel a genom tartalmazza az Stl-t kifejező gént, az is

<sup>3</sup> Eredmények publikálás alatt.

belátható, hogy a dUTPáz nem az Stl expressziót gátolja. A két fehérje kölcsönhatását kimutatva igazolták, hogy derepresszió során a dUTPáz komplexet képez az Stl-lel, így eltávolítva azt a DNS-ről [30] (6. ábra).



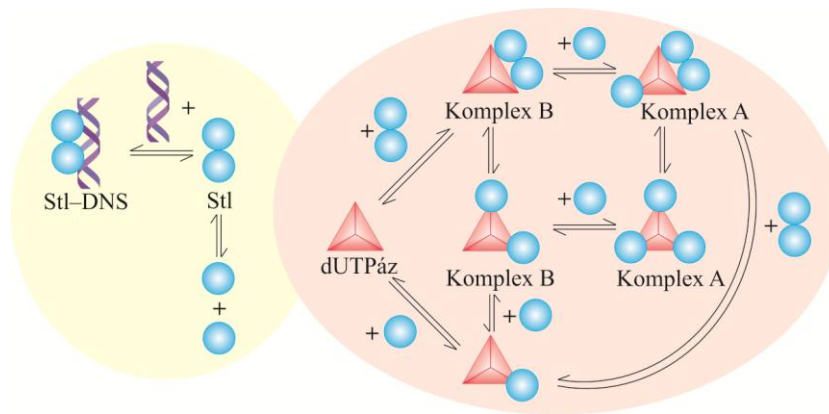
**6. ábra: dUTP hatása a SaPI kifejeződésre**

A.) dUTP gyorsan köt a dUTPázhoz, magas dUTP szint mellett a dUTPáz Stl kölcsönhatás nem jön létre.  
 B.) Alacsony dUTP szint esetén a dUTPáz az Stl-hez kötődik, a SaPI génszakasz kivágódhat és átíródhat.

A képződött komplex nem csak az Stl represszáló funkcióját, hanem a dUTPáz enzimaktivitását is gátolja, mivel a kialakult komplex nem hidrolizálja a hozzáadott dUTP szubsztrátot. Abban az esetben, ha a dUTP-t és Stl-t egyszerre adjuk az enzimhez, a dUTP:dUTPáz komplex nagyobb asszociációs sebességi állandója miatt előbb kialakul. Amíg a dUTPáz szubsztrát kötött állapotban van, addig nem tud kapcsolódni az Stl-lel, a dUTP jelenléte gátolja a derepressziós aktivitást [13] (6. ábra).

Ezen kinetikai mérések és a dUTPáz-ok általános enzimkinetikai viselkedése alapján a molekuláris kapcsoló működésére javasolt G-fehérje kapcsolt mechanizmus, mely szerint a dUTP kötődése szükséges a derepresszióhoz, elvethető [13,34].

Az Stl monomer és dimer formája között van egyensúlyban, míg a dUTPáz nagy részben trimer, a kialakult komplex ezen formák összeállásával jön létre. Natív tömegspektroszkópiás eredmények alapján a komplex egy trimer dUTPáz és két Stl molekula kölcsönhatásából áll, ahol az Stl molekula lehet két monomer, vagy egy dimer. Valószínűsíthető a komplex egy másik formája is, mely natív gélen vált láthatóvá, ahol a  $\Phi 11DUT_3Stl_2$  komplexet jelentő sáv felett egy másik is megjelent, ami a trimer dUTPáz és három Stl molekula kölcsönhatását mutathatja [13,35] (7. ábra).

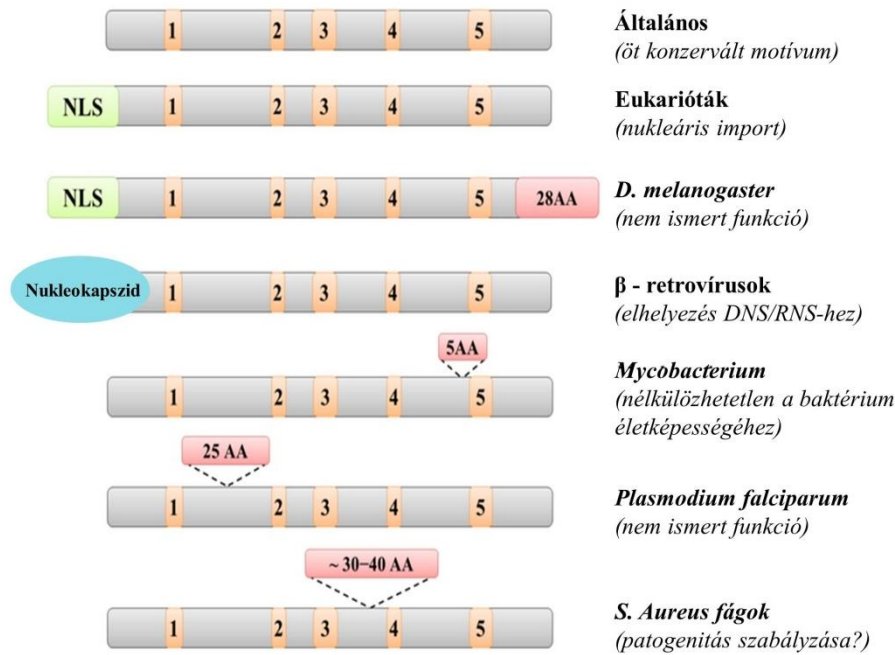


7. ábra: Az Stl és dUTPáz közötti komplexképződés lehetőségei [35]

#### 1.4. Fajspecifikus szegmensek

A különböző fajokból származó dUTPáz-ok jó része az öt konzervált motívum mellett, specifikus szegmensekkel is rendelkezik [35] (8. ábra). Az eukarióták N-terminálisukon nukleáris lokalizációs szignált tartalmaznak, melyek az importin receptorhoz való kötődést és ezen keresztül a fehérje sejtmagba juttatását teszik lehetővé [36,37]. A *Drosophila melanogaster* dUTPáz C-terminálisát egy 28 aminosavból álló szegmens zárja, amelynek deléciója nem okoz a fehérjében katalitikus aktivitás csökkenést. Feltételezések szerint, szerepe lehet a celluláris kölcsönható partnerek felismerésében [38]. A  $\beta$ -retrovírus dUTPáz N-terminálisán nukleokapsziddal fuzionált, amely hozzájárulhat a dUTPáz reverz transzkripció helyekre történő lehorgonyzásához. Itt a fúziós fehérje csökkenti a lokális dUTP szintet, ezzel segítve a pontos átíródást [1,35,39]. A Mikobaktériumok esetében a C-terminálison egy 5 aminosavból álló szegmenst azonosítottak. Ez, habár az aktív helyhez közel esik, nincs jelentős hatással a katalitikus funkcióra, azonban bizonyított, hogy elengedhetetlen a baktérium életképességéhez [30]. A fehérje felületéről való kinyúlása miatt kölcsönható felszín biztosíthat még nem ismert protein partnereknek, ligandoknak [40]. A *Plasmodium falciparum* 25 aminosavból álló szegmensének funkciója egyelőre ismeretlen, egyes feltételezések szerint inváziókor védelmet nyújthat a gazdasejt immunválasza ellen [41,42].





8. ábra Fajspecifikus szegmensek bemutatása feltüntetve a funkciójukkal [35].

A *Staphylococcus aureus*-t fertőző fágok dUTPáz fehérjéi a III. és IV. konzervált motívum között elhelyezkedő, 30-40 aminosavból álló inszerttel rendelkeznek [35,43] (8. ábra). A  $\Phi$ 11 dUTPáz esetében ez az inszert négy rövid  $\beta$ -szálból áll, melyek egymással párban, antiparallel elrendezésben állnak. A  $\beta$ 2-szál egy konzervált dUTPáz régióhoz kapcsolódik, feltehetően ez segíti a mini-domén orientálódását [43]. A kristályszerkezet alapján hasonló szerkezetet vesz fel a  $80\alpha$  dUTPáz inszert régiója is, ami azonban 12 aminosavval hosszabb, így valamivel kiterjedtebb a flexibilis hurok régiója. A  $\Phi$ 11 dUTPáz trimer enzim mindhárom alegység inszertjének N-terminális részén elhelyezkedő első aminosav, az aszpartát (Asp95) részt vesz egy, a dUTPáz trimer centrális csatornájában lokalizált  $Mg^{2+}$  koordinálásában. A  $Mg^{2+}$  komplexképződési tulajdonságainak megfelelően hexagonális szerkezet alakul ki, úgy hogy a három Asp95 karboxil csoportja mellett három víz molekula is interakcióba lép a fém ionnal. Mivel a  $Mg^{2+}$  az inszert első aminosavjához kapcsolódik, ezért valószínűsíthető, hogy a fémkötés stabilizálja ezt a flexibilis szegmenst és ezáltal szerepet játszik az inszert régió specifikus működésben [43].

Egyes kísérletek szerint, ennek az inszertnek mind az enzimaktivításban, mind a SaPI derepresszáálásában szerepe van. Ezeket a konklúziókat a  $\Phi$ 11DUT $^{\Delta 96A-134L}$  mutáns vizsgálata alapján vonták le, ahol az inszert mellett a negyedik motívumba tartozó aminosavak is törlése kerültek, ami szintén magyarázhatja a funkciók kiesését [30,35].

Vizsgálva a  $\Phi 11\text{DUT}^{\text{F108W}}$  mutáns enzimaktivitását, ahol a specifikus inszert fenilalaninját fluorofór triptofánra cserélték, nem volt detektálható fluoreszcencia változás a nukleotid szubsztrát bekötődésekor, ami bizonyítja, hogy az inszertnek nincs hatása a fehérje aktivitására. A fág specifikus inszert szerepét az Stl-lel való kölcsönhatásban a  $\Phi 11\text{DUT}^{\Delta 101\text{G}-122\text{Q}}$  deléciós mutánsal vizsgálták. Az inszert első hat aminosava nem került kivágásra, ez biztosította az összekötő linker régiót, így a deléción feltehetőleg nem okozott problémát a fehérje feltekeredésében [35,43]. A mutáns a vad típushoz hasonló komplexképződési jelleget mutatott az Stl-lel, azonban a derepressziós aktivitása elmaradt, mivel az Stl-DNS komplexet, a vad típussal ellentétben, nem tudta felbontani. Az inszerttel nem rendelkező *Mycobacterium tuberculosis* dUTPáz képes az Stl-DNS komplex megbontására, ami arra engedett következtetni, hogy a Stl-DNS interakció felbontásához az inszert jelenléte csak a  $\Phi 11$  dUTPáz esetében szükséges [35].

A mutáns szerkezetének vizsgálatával feltehetőleg közelebbi képet kaphatnánk arról, mi az oka a derepressziós aktivitás megszűnésének. Ennek érdekében kristályosítási kíséretekbe kezdtünk az inszertmentes (dLoop) dUTPáz mutánsal.

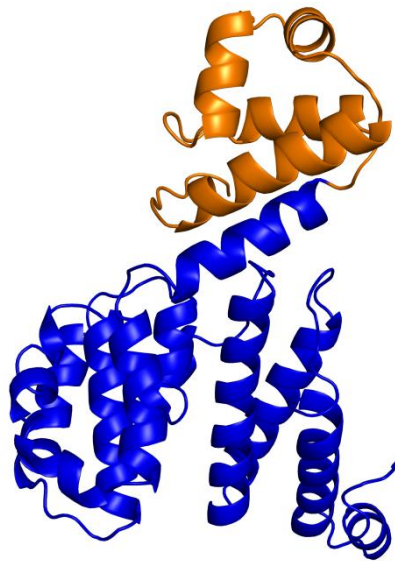
## 1.5. Az Stl fehérje szerkezete

Az Stl fehérje többségében  $\alpha$ -hélix másodlagos szerkezetet vesz fel (9. ábra). Homológia modellezésekből, illetve az eddig ismert hasonló represszorokat alapul véve feltételezhető, hogy az Stl két funkcióban is elkülönült részből áll: N-terminálisból és C-terminálisból. Az N-terminális részen található az úgy nevezett hélix-turn-hélix (HTH) motívum, melynek feltehetően a DNS kötődésben van szerepe, míg a C-terminális a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában vehet részt [44].

Ezen szegmensek feltételezett funkciójának bizonyítására csoportunk mutáns fehérjéket állított elő. Az Stl szekvencia 84. aminosavjáig tartó N-terminális mutáns nem expresszáldott, vélhetően feltekeredése nem volt független a másik szegmenstől. A C-terminális domént (84–263. aminosav) viszont megfelelő tisztaságban sikerült előállítani [44].

A C-terminális Stl fehérjében betöltött szerepét több - többek között EMSA, natív poliakrilamid gélelektroforézis, enzimaktivitás-mérés - kísérlettel is sikerült megerősíteni. DNS-sel nem mutatott interakciót, míg a dUTPáz enzimmel kölcsönhatást alakított ki,

azonban míg a teljes hosszúságú fehérje az enzim aktivitását teljes mértékben megszüntette, addig a C-terminális csak részben (40%-kal) csökkentette azt [44].



**9. ábra: Stl fehérje szerkezeti modellje**  
Kékkel a C-terminális, narancssárgával az N-terminális jelölve.

Az Stl C-terminális részével végzett kísérletek alapján az N-terminális szegmens esszenciális a DNS kötésében. Az N-terminális önmagában történő az expressziójának sikertelensége miatt a DNS-kötő motívum pontos helyét a predikciós programok által javasolt HTH motívumban kialakított mutációkkal vizsgálták. A mutáció helyének kialakításakor hasonló HTH motívummal rendelkező represszor fehérjék szerkezetanalízis eredményeit vették figyelembe. Ezek alapján az Stl fehérjében a nukleotidbázisokkal való specifikus hidrogénkötés kialakításáért feltehetően felelős Q40 és N41 aminosavak helyén két alanint tartalmazó konstrukciót (Stl<sup>AA</sup>) hoztak létre helyspecifikus mutagenézissel. Az Stl<sup>AA</sup> mutáns a vad típusú fehérjéhez képest nagyságrendekkel kevésbé kötődött a DNS-hez, míg a dUTPáz-zal való kölcsönhatásában nem történt változás. Tehát a mutációt valóban arra a helyre sikerült beépíteni, amely a DNS-kötő felszint biztosítja [44].

## 2. Célkitűzés

Kutatásaim távlati célja az Stl és a dUTPáz közötti kölcsönható felszínek és ezáltal a patogenicitási szigetek szabályozásában fontos szerepet játszó szerkezeti elemek azonosítása. Ennek alapján a jövőben lehetőség nyílhat a mozgó genetikai elemek által hordozott virulencia faktorok különböző *Staphylococcus aureus* törzsek közötti terjedésének megakadályozására. Ehhez a távlati célhoz a jelen dolgozatomban az egyes fehérjék olyan mutánsait vizsgáltam, melyek az eddigi irodalmi adatok fényében valószínűsíthető módon lényegi új információt szolgáltatnak. Továbbá, megkezdtem egy olyan keresztkötésen alapuló kísérletsorozatot, amely tömegspektrometriai értékeléssel összekötve segítheti a kölcsönható felszín azonosítását.

Elsőként olyan dUTPáz fehérjéket vizsgáltam, melyekből egyes szerkezeti motívumok törlésre kerültek: az egyik a fágokra jellemző specifikus inszertet (dLoop), a másik a vad típusú fehérje flexibilis C-terminális karján található V. konzervált motívumot nem tartalmazta (dKar). Korábbi vizsgálatok alapján mindkettő kötődik az Stl-hez, azonban a dLoop mutáns fehérje a dKar fehérjével ellentétben nem mutat a vad típusal megegyező viselkedést. A két fehérje kristályosításával és a kristályok röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálatával szeretnék magyarázatot találni a tapasztalt különbségre.

Továbbá az Stl DNS kötő motívumának a környezetébe épített triptofán szenzorral szerettem volna vizsgálni az Stl-DNS valamint az Stl-dUTPáz kölcsönhatást. Ezzel, csoportunk korábbi eredményeit kívántam megerősíteni, miszerint az Stl N-terminális szakaszának fontos szerepe van a DNS kötésben, de emellett feltehetően a protein kölcsönhatás kialakításában is részt vehet.

Emellett a fehérje-fehérje kölcsönható felszín azonosítása érdekében keresztkötési kísérleteket végeztem, melyek a monomer és dimer állapotban is előforduló Stl fehérje oligomerizációban résztvevő, illetve a dUTPáz enzimmel kölcsönható felszínéről is információt nyújthatnak.

## 3. Módszerek

### 3.1. Fehérjék előállítása és termelése

#### 3.1.1. Kompetens sejtek előállítása

A kompetens sejtek képesek az extracelluláris DNS felvételére, mivel a hozzáadott  $\text{Ca}^{2+}$  ionok leárnycoklják a membrán töltését, így a negatív töltésű plazmid DNS bejuthat a sejt intracelluláris terébe.

A kompetens sejtek készítéséhez 5 ml Luria-Bertrani (LB) tápoldatban, amely 12,5  $\mu\text{g/ml}$  végkoncentrációban bemért tetraciklint tartalmazott a baktériumszelekció biztosítása végett, szaporítottam egész éjszakán át (overnight) az előkultúrát, mellyel az előbbi aránynak megfelelő tetraciklint tartalmazó 50 ml LB tápoldatot oltottam be. A sejtuszuspenziót 37°C-on 2 órán keresztül inkubáltam, majd 4°C-on 20 perc alatt 3600 RPM-en lecentrifugáltam. A sejtcsapadékot 10 ml TFB I. pufferben (100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM kálium-acetát, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % glicerín) felsuszpendáltam, majd 20 perc jeges hűtés után ismét lecentrifugáltam az előzővel egyező módon. A leülepedett pelletet 1 ml TFB II. pufferben (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % glicerín) eloszlattam, 20 perc jégen tárolás után steril szűrt glicerint mértem hozzá 15 %-os végkoncentrációban, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottam, felhasználásukig -80°C-on tároltam a kompetens sejteket.

#### 3.1.2. Transzformálás

A számomra szükséges fehérje génjeit tartalmazó plazmidokat kompetens *E. coli* XL1 Blue sejtekbe transzformáltam és a sejteket növesztve megsokszoroztam azokat. A transzformálást hősokk alkalmazásával végeztem, melynek lényege, hogy a hőmérséklet változtatásával a sejtek membránszerkezete a plazmid számára átjárhatóvá válik.

Az előzetesen kompetensé tett 100  $\mu\text{l}$  *E. coli* XL1 Blue sejtuszuspenzióhoz 1  $\mu\text{l}$  1,423 M  $\beta$ -merkaptóetanolt adtam és 5 percig jégen tartottam. Ezután a plazmid preparátumból 5  $\mu\text{l}$ -t tettem hozzá és 30 percig jégen tartottam, majd 1 percig 42°C-on, 2 percig ismét jégen termosztáltam. Ezt követően az anyagot 200  $\mu\text{l}$  steril LB tápoldatban 1 órán keresztül 37°C-on 200 RPM-en rázattam. A kapott sejteket agaróz táptalajon üvegyöngyök segítségével szélesztettem. Az ehhez szükséges plate-eket 50 ml 12,5  $\mu\text{g/ml}$  tetraciklin és 50  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációjú karbenicillin antibiotikumokat tartalmazó LB tápoldatból készítettem el

(3-4 plate). (Az alkalmazott antibiotikumok közül a tetraciklin a baktérium törzs szelekciójára alkalmas, míg a karbenicillinnel a plazmidot nem tartalmazó sejtek eliminálhatók.) A kikent sejteket 37°C-on overnight növesztettem. Az egyedülálló kolóniákból 200 µl-es steril pipettahegy segítségével 5 ml tetraciklint és karbenicillint tartalmazó LB tápoldatot oltottam be, amit overnight rázatás (200 RPM) közben 37°C-on inkubáltam. (Az antibiotikumok végkoncentrációja a fentebb írt adagolással megegyezik). A sejtekből NukleoSpin<sup>®</sup> (NoLid) kithoz mellékelt protokoll követésével izoláltam a plazmidterméket<sup>4</sup>. A minták koncentrációját NanoDrop UV-VIS spektrofotométerrel 260 nm hullámhosszon történő abszorbanciamérés alapján határoztam meg. Az így kapott preparátumot szekvenáltattuk, hogy megbizonyosodjunk a termelt plazmid bázissorrendjének helyességéről. A helyes plazmidszekvenciát tartalmazó preparátumot ezután a fent leírt módon 100 µl előzetesen kompetensé tett *E. coli* BL21 Rozetta sejtszuszpenzióba transzformáltam a fehérje termeltetéséhez.

### 3.1.3. Fehérje expresszió

A fehérjét kódoló plazmidot tartalmazó *E. coli* BL21 Rozetta sejteket LB tápoldatban szaporítottam, majd a sejtek exponenciális növekedési szakaszában, amelyet a kultúra optikai denzitásának vizsgálatával állapítottam meg, izopropil-β-1-tiogalaktozid (IPTG) indukálószer hozzáadásával serkentettem a kívánt fehérje kifejeződését a plazmidról.

A transzformálás után kapott 100 µl *E. coli* BL21 Rozetta sejteket tartalmazó oldattal 5 ml 34 µg/ml klóramfenikolt és 50 µg/ml végkoncentrációjú karbenicillint tartalmazó LB tápoldatot indukáltam, majd 37°C-on, 200 RPM-en overnight rázattam. Ezzel az előkultúrával 500 ml LB tápoldatot beoltottam, majd 37°C-on, 200 RPM-es rázatás közben növesztettem azt, amíg abban a sejtek a számomra szükséges mennyiségben fel nem szaporodtak. Ezt a sejtszuszpenzió optikai denzitásának 600 nm-en történő mérésével ellenőriztem. Mikor ez elérte a 0,4-0,6 értéket 250 µl 1 M-os IPTG-t adtam hozzá, majd további 4 órán át inkubáltam a kultúrát Stl esetében 30, dUTPáz termelésekor 37°C-on. Végül 20 perc alatt 4°C-os hőmérsékleten 4000 RPM-en centrifugáltam a tápoldatot. A pelletet Stl esetében 20 ml 50 mM Hepes pH=7,5, 200 mM NaCl puffer (A puffer) oldatban, míg a dUTPáz-t 20 mM Hepes pH=7,5, 100 mM NaCl puffer, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM β-merkaptóetanol pufferben

<sup>4</sup> [http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM\\_pDNA\\_NS.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NS.pdf)

(B puffer) szuszpendáltam fel. A centrifugálást megismételtem 10000 RPM-en 20 percen át, a leülepedett pelletet folyékony nitrogén segítségével lefagyasztottam, a további felhasználásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltam.

Az indukció előtt és után 1 ml mintát vettem, 15 perc alatt 10000 RPM-en lefugáltam, 200 mL A/B pufferben (Stl/dUTPáz) visszaszuszpendáltam és SDS gélen megfutattam, hogy ellenőrizzem a szükséges fehérje jelenlétét. (ld.: SDS-PAGE)

### 3.1.4. Sejtfeltárás

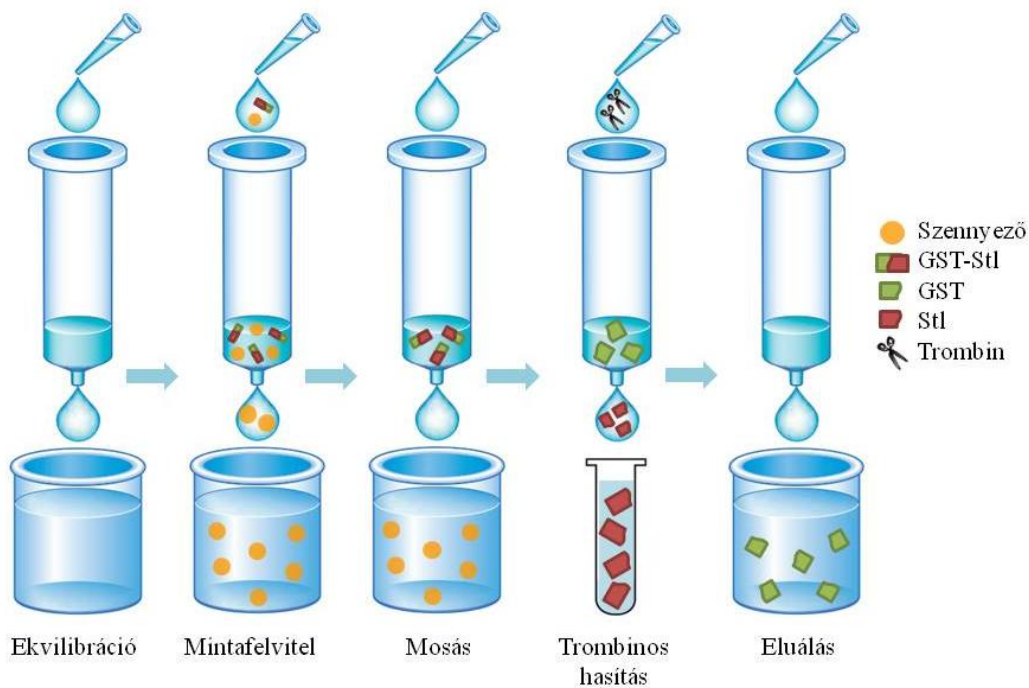
Az expresszált fehérjék kinyeréséhez a termelő baktériumot fizikai és kémiai roncsolásnak vettem alá.

A sejtfeltáráshoz használt fehérjétől függő A/B pufferben (Stl/dUTPáz) feloldottam a baktériumból felszabaduló fehérje emésztőenzimeket gátló Complete Ultra Tablet proteázgátló tablettát, hozzámértem az RNS és DNS makromolekulákat elimináló 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNáz-t és DNáz-t, illetve az oxidáció ellen védő 2 mM-os DL-ditiotreitol (DTT) redukálószer, valamint 150  $\mu\text{l}$  Triton-X feltárást segítő felületaktív anyagot. A feloldott pallethez adtam az előzőleg összemért oldatot és Potter-Elvehjem homogenizátorban mechanikailag roncsoltam a baktériumok sejtfalát. A lízis elősegítésére az elegyet 4x1 percig szonikáltam, melyet a fehérjék védelme miatt jégen hűtve végeztem, majd 10000 RPM-en 30 perc alatt lecentrifugáltam a preparátumot, a számomra értékes fehérje a felülúszóban maradt.

## 3.2. Fehérje tisztítási módszerek

### 3.2.1. Affinitás kromatográfia

Az Stl fehérjét egy lépésben, affinitás kromatográfias módszerrel tisztítottam meg. Az alkalmazott eljárás azon az elven alapul, hogy az Stl-hez fuzionált glutation-S-transzferáz (GST) fehérje, az oszlophoz rögzített glutationnal kölcsönhatást alakít ki, így a szennyezők az oszlopot mosva eltávolíthatók, míg az értékes fehérje kötve marad. Ezt követően specifikus proteáz általi hasítással a kívánt fehérje nagy tisztasággal nyerhető ki, míg a GST címke nem válik le az oszloptöltetről. Ez, az oszlop újbóli felhasználása érdekében, redukált glutationt tartalmazó elúciós pufferrel eltávolítható a mátrixról (10. ábra).



10. ábra: Affinitás kromatográfiás tisztítás folyamatábrája

A sejtfeltárás során keletkezett felülúszót rávittem az oszlopra, majd 4°C-on fél óráig forgattam, ezalatt a GST-Stl<sup>5</sup> célfehérje kapcsolódott a rögzített glutationhoz. Ezt követően az oszlopon lévő folyadékot leeresztettem, A pufferrel mostam, majd 4 ml A puffer és 80 unit trombin mennyiséggel 4°C-on overnight emésztettem folyamatos rázatás közben. Az áteső fázis tartalmazta a kívánt fehérjét, ennek leeresztését követően a szemcsék között maradt fehérje kinyerése végett még kétszer 4 ml A puffert engedtem át az oszlopon. A töltet regenerálását 2x7,5 ml elúciós pufferrel (50 mM Tris, 100 mM glutation; pH=8,0) végeztem 30 percen át 4°C-on történő rázatás közben.

### 3.2.2. Ioncserés kromatográfia

A feltárt dUTPáz fehérjék nagyfokú tisztaságának elérése érdekében több folyadék kromatográfiás rendszeren vezettük át a mintát tartalmazó oldatot. Először ioncserés kromatográfiát alkalmaztunk, amely technika az álló és mozgó fázis töltéssel rendelkező csoportjainak kölcsönhatásán alapszik, amely kölcsönhatást az ionerősség változtatásával bontottunk meg.

<sup>5</sup> A GST fúziós fehérje az Stl fehérje N-terminális szakaszán található, mivel így jobban segíti a célfehérje feltekerését, hiszen a fehérje transzláció N→C terminális irányban történik.



A folyamat kezdetén a tisztításhoz használt, etanolban tárolt ÄKTA pumparendszert és a hozzákötött 5 ml-es Q Sepharose oszlopot átmostuk vízzel, majd a nagy ionerősségű, 20 mM Hepes, 1 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-merkaptóetanol, 0,1 mM PMSF tartalmú puffer oldattal (**C** puffer), hogy az esetlegesen fennmaradt szennyeződésekeltávolítsuk. A minta felvitele előtt, a fehérjék adszorpciójának biztosításához a rendszert kis ionerősségű 20 mM Hepes, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-merkaptóetanol, 0,1 mM PMSF tartalmú pufferrel (**D** puffer) mostuk át, így a negatív töltésű ionok, köztük az értékes fehérje is, megtapadt az oszlopon. A mintafelvétel után a **D** puffer folyamatos átáramoltatásával az oszlophoz nem kötődő szennyeződést eltávolítottuk, melyet kromatogramon az alapvonal visszaállásával ellenőriztünk. Az oszlopon megkötött anyagot az ionerősség lineáris növelésével, melyet a **D** – és **C** puffer arányos adagolásának beállításával valósítottunk meg, 30 ml átfolyótérfogatban eluáltuk különböző, töltés szerinti frakciókra. A frakciószedés befejezésével a berendezést regeneráltuk ötszörös oszloptérfogatnyi mennyiségű **D** puffer, **C** puffer és végül desztillált víz átengedésével. A rendszert a következő használatig 20 %-os etanolban tároltuk.

### 3.2.3. Méretkizárásos kromatográfia

Az előzetesen ioncserés kromatográfiával megtisztított dUTPáz enzimet ÄKTA rendszerbe kötött, méret kiválasztáson alapuló Superose 10/300 GL (24 ml) oszlopon engedték át. A módszer alapja, hogy a minta különböző molekulatömegű komponensei az álló fázis porózus töltete között eltérő sebességgel vándorolnak. Míg a nagyobb molekulák kizáródnak a kisebb pórusokból, így elúciójuk gyorsabb, addig a kisebb részecskék lassabban haladnak végig, mivel több helyre képesek bediffundálni.

Az elúció során 300 mM NaCl, 20 mM Hepes, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-merkaptóetanol összetételű puffert használtunk, a különböző frakciók tisztaságát denaturáló gélelektroforézis módszer segítségével (ld.: 3.3.3) állapítottuk meg.

## 3.3. Fehérjevizsgálati módszerek

### 3.3.1. Koncentrációmérés

A fehérje és a DNS minták koncentrációját Thermo Scientific Nanodrop 2000 UV-VIS spektrofotométerrel végzett fényelnyelés mérésével határoztam meg. A fehérje esetében az aromás oldalláncok következtében 280 nm-en, míg a nukleinsavak aromás bázisai miatt

260-nm-en maximális az abszorbancia. Az anyagok koncentrációja a Lambert-Beer törvény felhasználásával számítható (1. egyenlet). Ehhez a fehérjék extinkciós koefficiense szekvenciájuk alapján becsülhető (Expasy ProtParam), az egyes fehérjék extinkciós koefficienseit a függelék F1. táblázata tartalmazza. A DNS tömegegységre vonatkoztatott abszorpciós koefficiense kevésbé szekvencia függő, ezért minden mintára a fotométer szoftverébe épített átlagértéket használtam ( $20 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ).

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Ahol:

A	abszorbancia
$\varepsilon$	extinkciós koefficiens
l	optikai úthossz
c	koncentráció

#### **1. egyenlet: Lambert-Beer törvény**

### **3.3.2. Gélöntés**

A fehérje vizsgálatok előkészítéseként géllapokat öntöttem, amelyek segítségével a fehérje-DNS illetve fehérje-fehérje kötéseket vizsgáltam.

A 8.1. fejezetben részletezett gélhez szükséges alkotókat összemértem ügyelve arra, hogy a polimerizáció iniciálásért felelős gyök donor ammónium-perszulfátot (APS) és a katalizátorként funkcionáló tetra-metil-etiléndiamint (TEMED) öntés előtt pipettázam az elegybe. Az egyfázisú gélnél Pasteur pipetta segítségével töltöttem fel a két üveglap közötti térfogatot, majd behelyeztem a minta zsebeket kialakító fésűt. A kétfázisú gél elkészítése abban különbözött az előbb leírttól, hogy az elválasztó gél oldatát a fésűfog aljától számítva 0,5 cm magasságig töltöttem, melynek egyenes felületét izopropanol réteggel biztosítottam, amit az elválasztó gél megszilárdulása után szűrőpapírral itattam fel. Ezután a tömörítő géllal feltöltöttem az üveglemezek közötti rést, végül beletettem a fésűt.

### **3.3.3. Denaturáló gélelektroforézis (SDS-PAGE)**

A fehérjék gélben történő haladási sebességét egyenáram során töltése, mérete és alakja egyaránt befolyásolja. Azonban a mintához nátrium-dodecil-szulfát felületaktív anyagot adva és azzal melegítve, a fehérje kitekeredik, a hozzáadott vegyület a molekula méretével arányos

töltést biztosít. Ezáltal lehetőség nyílik arra, hogy a fehérjét egyetlen paramétere, mégpedig a mérete alapján válasszuk el, mely alapján a fehérjekomponens azonosítható.

A mintákhoz hozzáadtam a 62,5 mM Tris pH=6,8, 25 % glicerin, 2 % SDS, 0,01 % brómfenolkék, 350 mM DTT anyagokat tartalmazó mintakotélt, úgy hogy az ötszörös hígításban legyen, majd 98°C-on 4 percig termosztáltam. Az elektroforézist 12 %-os SDS gélben, elektroforézis puffer (3,03 g/l Tris pH=8,3, 14,4 g/l glicin, 1,0 g/l SDS) környezetében 200 V-on 45 percig végeztem. Mintamarkerként különböző ismert molekulatömegű fehérjékből álló létrát (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder) futattam meg. A futási frontot jelző festéket vízben kiáztattam és ezt követően Coomassie Brilliant Blue festékkel előhívtam a fehérjéket jelentő sávokat.

### **3.3.4. Elektroforetikus mobilitás eltolódás vizsgálat - EMSA**

A fehérje és DNS közötti kölcsönhatást elektroforetikus mobilitás eltolódás vizsgálat (Electrophoretic Mobility Shift Assay - EMSA) segítségével mutattam ki. A módszer elve, hogy a GelRed festékkel UV alatt láthatóvá tehető DNS önmagában feszültség hatására nagyobb utat tesz meg a gélben, mint a fehérjével komplexet alkotva.

Az egyfázisú 12%-os poliakrilamid gélt, 100 V egyenáramú feszültségen 1x TBE pufferben (89 mM Tris bázis, 89 mM bórsav, 2 mM Na<sub>4</sub>EDTA, pH=8,3) 1 órán keresztül előfuttattam. Ezalatt összemértem a tervezett koncentrációnak megfelelő mennyiségű DNS-t, fehérjét, EDTA-t és a feltárás során használt puffert, majd hozzáadtam a Loading Dye (LD) festéket, úgy hogy az hatszoros hígításban legyen. A mintákat Hamilton-fecskendő segítségével felvittem a gélre, majd az elektroforézist 70 percig 150 V-on végeztem. A kész gélből a Loading Dye-t desztillált vízben áztattam ki, majd 15 percre 50 ml, 15 µl GelRed-et tartalmazó 100 mM-os NaCl oldatba tettem. Az előhívást Uvi-Tec gélbeolvasó készülékkel végeztem.

### **3.3.5. Natív gélelektroforézis**

A dUTPáz és StI fehérjék közötti komplex kialakulását natív poliakrilamid gélelektroforézis módszerrel vizsgáltam. A módszer során a fehérjék eredeti térszerkezetükben vándorolnak a gélben, így a közöttük kialakuló kölcsönhatás megléte ellenőrizhető, alapul véve az egyes komponensek futási távolságát.

A mintáimhoz hozzáadtam a natív mintakoktélt (62,5 mM Tris pH=6,8, 25 % glicerin, 0,01 % brómfenolkék, 350 mM DTT), úgy hogy az ötszörös hígításban legyen. A natív gélt 1 óra alatt, 100 V-on natív gélelektroforézis pufferben (3,03 g/l Tris, 14,4 g/l glicin, pH=8,7) előfuttattam jeges hűtés alatt, majd az előkészített minták felvitele után az elektroforézist 150V-on 2 órán keresztül hűtés közben végeztem, mivel ennek hiányában a futtatás során felszabaduló hő hatására a fehérjék elveszíthetnék natív szerkezetüket. A fehérjesávok előhívása a 3.3.3. pontban leírtak szerint történt.

### 3.4. Fehérjekristályosítás

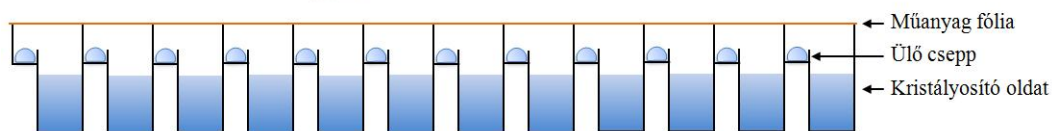
Ahhoz, hogy a fehérjék szerkezetét röntgendiffrakciós módszerrel vizsgálni tudjuk, nagy tisztaságú, tömény minta- és kristályosító oldatból előállított rendezett fehérje kristályokra van szükség.

Mivel a fehérje kristályosodását sok tényező befolyásolja, ezért a körülményekre először előzetes szűrést végeztem egymástól eltérő kristályosító oldatok felhasználásával. Ezek az oldatkészletek különböznek összetételben, só koncentrációban, széles pH tartományt fognak át, sokszor tartalmaznak a fehérjemolekulák hidratáltságát csökkentő, ún. kicsapószerkeket (pl.: polietilén glikol).

Két 96 lyukú tálcára, ahol egy lyukhoz a kristályképződés helyét adó két kis well és a körülményt tároló nagy well tartozik, 8 csatornás pipettával 70  $\mu$ l JSCG+<sup>6</sup> illetve SG1<sup>7</sup> kristályosítási körülményt adagoltam a nagy well-be (11. ábra). Ezután egy pipettázó robot (Mosquito) segítségével mind a fehérjéből, mind a körülményből 100-100 nl-t mérettem össze a kristályképződés helyére, majd műanyag fóliával fedtem le a tálcákat. Ezzel a technikával a nagyobb térfogatú tároló oldat kapcsolatban marad a fehérjét tartalmazó cseppel a gőztéren keresztül. Egy idő után a két oldat fölötti gőznyomás kiegyenlítődik, azáltal, hogy a cseppben lévő kristályosítási oldat átdiffundál a tároló oldatba, így a cseppben lévő fehérje koncentrációja folyamatosan növekszik, mely optimális esetben a kristályok képződéséhez vezet.

<sup>6</sup> A screen oldatok összetétele elérhető a <http://www.moleculardimensions.com/applications/upload/MD1-40.pdf> weboldalon.

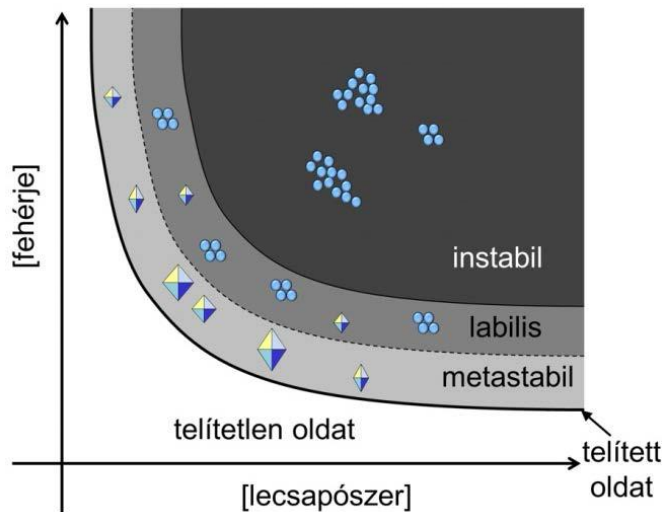
<sup>7</sup> A screen oldatok összetétele elérhető a <http://www.moleculardimensions.com/applications/upload/MD1-88%20SG1%20Screen.pdf> weboldalon.



**11. ábra: 96 lyukú kristályosító tálca [45] alapján**

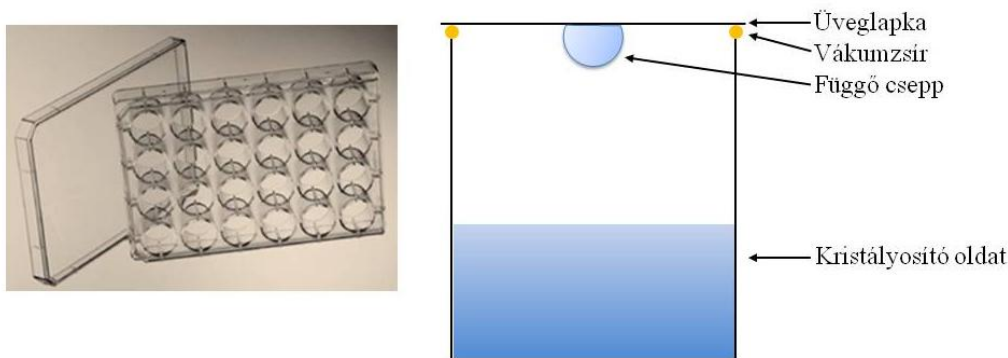
A kép felső részében a teljes tálca fényképe, alsó részében egy sor keresztmetszeti képe látható

A kristályt eredményező körülményeket optimalizálásnak vettem alá, mely során az egyes paramétereket (pH, kicsapószer koncentráció) finoman változtatva próbáltam megtalálni a legideálisabb kristályosítási oldatot, feltérképezni a fázisdiagramot (12. ábra). 24 lyukú tálcán függőcseppes módszert alkalmaztam, ahol a cseppet, melyet 1-1  $\mu\text{l}$  fehérje és a kristályosító oldat elegye alkotta, üveglapkára mértem ki, majd ezt csipesz segítségével a kizsírozott well peremére helyeztem, melybe előzetesen 400  $\mu\text{l}$  kristályosító oldatot pipettáztam (13. ábra).



**12. ábra: Kristályosítási fázisdiagram [45]**

Telítetlen oldatban nem nőnek kristályok; telített oldatban a kristályok egyensúlyban vannak az oldattal; metastabil régióban kinetikai okok miatt nincs gócképződés, csak gócnövekedés; labilis tartományban gócképződés és gócnövekedés egyaránt lehetséges; instabil tartományban a fehérje kicsapódik.



13. ábra: Optimalizációs tálca és egy well-jének keresztmetszete [45] alapján.

### 3.5. Röntgendiffrakciós szerkezetanalízis

A molekulák szerkezetéről információt adó röntgendiffrakciós szerkezetanalízis alapja a röntgensugárzás fehérjekristályon való szóródása. Az egykristályt monokromatikus röntgensugárral megvilágítva, melynek hullámhossza kisebb vagy egyenlő az atomok távolságával, megkapjuk a kristály diffrakciós mintázatát. A kristály által szórt sugárnyalábokból felépíthető a szóró tárgy képe, mivel a Bragg-törvény szerint az atomok távolsága, a röntgensugár hullámhossza és a sugárelhajlás szöge között összefüggés áll fent (2. egyenlet). Azonban, a mérés során csak a sugarak intenzitásáról és az eltérülés irányáról kapunk információt, a hullám fázisáról nem, ezért ezek értékére különböző módszerekkel végzett közelítő becslés alkalmazható. Ezek után már meghatározható a molekula valószínűsített elektronsűrűsége, melyből felépíthető a fehérje szerkezeti modellje. A kezdeti modell alapján a fázisbecslés és a modell iteratív úton finomítható.

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin\theta$$

Ahol:

- n      egész szám
- $\lambda$     röntgensugár hullámhossza
- d      atomok távolsága
- $\theta$     sugárelhajlási szög

**2. egyenlet: Bragg-törvény**

Az optimalizációs tálcán keletkezett kristályok szórási tulajdonságait előzetes méréssel ellenőriztük egy forgóanódos röntgen sugárcsővel (Cu  $K_{\alpha}$ ) és Eos CCD detektorral felszerelt röntgendiffrakciós mérőműszerrel (Agilent, SuperNova). A tájékozódó mérés során felvett képek alapján kideríthető, hogy a kristályt valóban fehérje alkotja-e vagy esetleg szeretlen só. Továbbá, ha a minta valóban fehérje kristály, akkor milyen mértékű a kristály

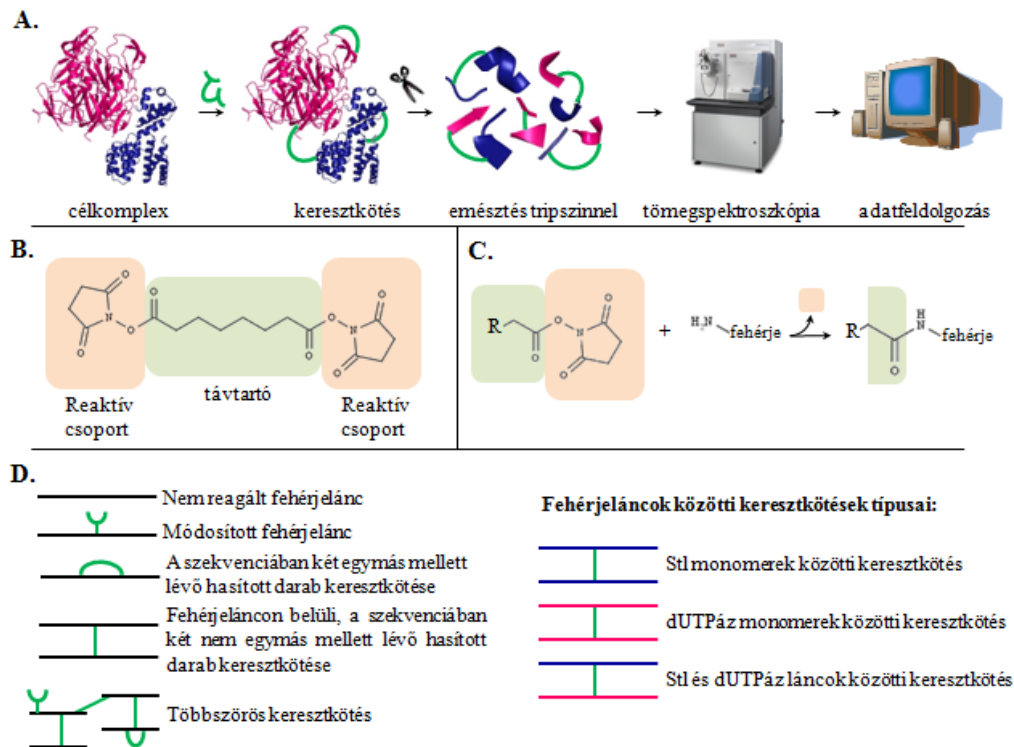
rendezettsége, illetve valóban egykristály-e. Ha egy kristály megfelelt az előzetes elvárásainknak a fenti szempontok alapján, akkor nagyobb expozíciós időt beállítva teszteltük a felbontóképesség növelésének lehetőségét. A mérés során beállított paramétereket az 1. táblázat mutatja. Ahhoz, hogy a végleges mérés helyes legyen, a kristályosítási oldat fagyási tulajdonságait meg kell vizsgálni, mivel ha annak kristályos és nem amorf a szilárd halmazállapota, akkor a mérést torzítja. Amennyiben a kristályosítási körülmény nem a méréshez megfelelően fagyott meg, akkor a kristályosító oldathoz glicerint adagolva kerestük meg azt a legkisebb adalékkoncentrációt, mely már teljesíti a fenti kritériumot. A kristályt ebbe az oldatba átmostuk és ezt követően tettük be a mérőkészülékbe.

	<b>dKar</b>	<b>dLoop</b>
expozíciós idő	60''	200''
detektor távolság	50 mm	45 mm
oszcillációs szög	0,5°	0,5°
forogási szög	45°,120°	45°,120°

**1. táblázat: A tájékozódó mérés beállításának adatai**

### 3.6. Keresztkötött fehérjék előállítása

A monomer és dimer állapotban is előforduló StI fehérje oligomerizációban résztvevő, illetve a dUTPáz enzimmel kölcsönható felszínének vizsgálatához egy olyan szerves észter keresztkötő reagenst használtam, amely lizinekkal képes reakcióba lépni. A keresztkötések létrehozásához a reagens gyártója által javasolt kiindulási protokoll finomítása szükséges. A leiratban szereplő egyes paraméterek úgy, mint a fehérjekoncentráció, reagens felesleg és reakcióidő körbejárásával megállapíthatóak a kísérlet legkedvezőbb kimeneteléhez szükséges adatok. Várakozásom szerint az eljárás optimálását követően többségében kovalensen kötött dimer StI, trimer dUTPáz - melyet a már ismert szerkezete miatt módszerünk ellenőrzésére, kontrollként használtunk - és komplex termékek képződnek. Az így kezelt fehérjék tripszinnel történő hasítását követően, tömegspektroszkópiás (MS) mérési eredményekből meghatározható, hogy mely lizin aminosavak vannak egymással térközelségben a fehérjeláncon belül, a dimerben és a komplexben (14. ábra).



**14. ábra: A keresztkötési kísérlet magyarázó ábrásora**

A.) keresztkötési kísérlet folyamata; B.) a keresztkötő reagens képlete; C.) a keresztkötő reagens és az aminosav közötti reakciómechanizmus; D.) a keresztkötő reagens kapcsolódási lehetőségei [http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3043253\\_gr1&req=4](http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3043253_gr1&req=4) forrás alapján saját készítés

### 3.6.1. Keresztkötés

A dimetil-formamidban feloldott N-hidroxi-szukcinimid-észter (disuccinimidyl suberate, DSS) keresztkötő reagenst ötszörös moláris feleslegben hozzámértem 100  $\mu$ l 40  $\mu$ M-os Stl, dUTPáz, illetve Stl-t és dUTPáz-t 2:3 molarányban tartalmazó fehérje oldatokhoz. Majd rázatás közben, 30 percig 18°C-on inkubáltam, ezt követően Tris oldattal leállítottam a reakciót, mivel a Tris aminos csoportjai az el nem reagált DSS-sel reakcióba lépnek. A mintákhoz 10  $\mu$ l 50 mM-os pH=7,5-ös Tris oldatot adtam. Az elkészült keresztkötött mintákat SDS gélen ellenőriztem.

### 3.6.2. A fehérje SDS-PAGE gélben történő emésztése, izolálása

Az Stl és a dUTPáz esetében a keresztkötési reakció során az SDS gélkép alapján nem kaptunk többségében azonos alegység számú keresztkötött oligomert tartalmazó fehérjeoldatot. Míg az Stl monomer és dimer, addig a dUTPáz monomer, dimer és trimer állapotban is előfordult, ami a tömegspektroszkópiás mérési eredmények kiértékelését nagyban megnehezíti. Azonban ezen esetekben a SDS-gélből izolálva kinyerhetők az azonos oligomerizációval rendelkező fehérjék.



A vizsgálni kívánt anyagot a gélből kivágtam, majd nagyjából 1 mm<sup>2</sup>-es alapterületű négyzetekre daraboltam. Eppendorf csőben 50 µl MilliQ vízzel rázattam 15 percen keresztül, majd a felesleges folyadékot leszívtam. Ezt a mosási lépést MilliQ víz és acetonitril 1:1 arányú elegyével illetve acetonitrillel is megismételtem. A folyadék eltávolítása után vákuumbepárló készülékben 45°C-on 30 perc alatt beszárítottam. Enyhe rázatás mellett 56°C-on 45 percig 10 mM DTT oldattal redukáltam, melyet 100 mM ammónium-hidrogén-karbonátban oldottam fel. Néhány perces szobahőmérsékletre való hűtés után, ugyancsak 100 mM-os ammónium-hidrogén-karbonátban oldott 54 mM-os jódacetamiddal 30 percen át sötétben alkiláltam a fehérjéket. Ezután ismét a protokoll elején leírt módon mosási fázis következett 100 mM ammónium-hidrogén-karbonát oldattal és acetonitrillel, majd vákuumbepárló készülékben 45 perces 45°C-on történő szárítás. 20 µl 5 pmol/µl-es tripszin enzimmel 30 percen át inkubáltam a mintákat 4°C-on, majd a felesleges enzim eltávolítása után 37°C-on overnight. Többszörös extrakciós lépésekkel nyertem ki a vizsgálni kívánt fehérjét. Rendre 50 µl 1%-os hangyasavval, 25%-os acetonitril és 0,1%-os hangyasav elegyével majd acetonitrillel 0,5-0,5 óra intenzív rázatás mellett extraháltam a mintát. Majd ezt a lépést megismételtem 20 µl acetonitrillel is. A kész terméket liofilizáltam és azt a tömegspektroszkópiás mérésig -20°C-on tároltam.

### 3.6.3. Oldatban lévő fehérje emésztése

A komplex esetében nem tapasztaltuk az egyedi fehérjék bármely oligomer formájának megjelenését az SDS gélen, ezért ezeket oldatból készítettük elő.

25 µl 0,04 µmol/ml koncentrációjú fehérjéhez 1 µl tömény metanolt adtam, majd 60°C-on 5 µl 0,5%-os Rapigesttel és 2 µl 10 mM-os DTT-vel inkubáltam 30 percen keresztül. Miután a mintákat szobahőmérsékletre hűtöttem, 5 µl 200 mM ammónium-hidrogén-karbonáttal és 2,5 µl 200 mM jódacetamiddal 25°C-on inkubáltam sötétben 30 percig. Majd 1 µl 40 pmol/µl-es tripszin enzimmel további 3 órán keresztül 37°C-on történő termosztálást követően, 1,5 µl tömény hangyasavat adtam a mintához, amivel szintén 37°C-on 30 percig reagáltattam. Végül 30 perc, 13500 RPM sebességű centrifugálás után a felülúszóban megkaptam a kívánt terméket, melyet a tömegspektroszkópiás mérésig -20°C-on tartottam.

### 3.6.4. A tömegspektrometriás mérés körülményei

A HPLC-MS méréseket egy Bruker Maxis II ETD típusú kvadrupol – repülési idő analizátorokkal és elektropray ionforással ellátott hibrid tandem tömegspektrométeren

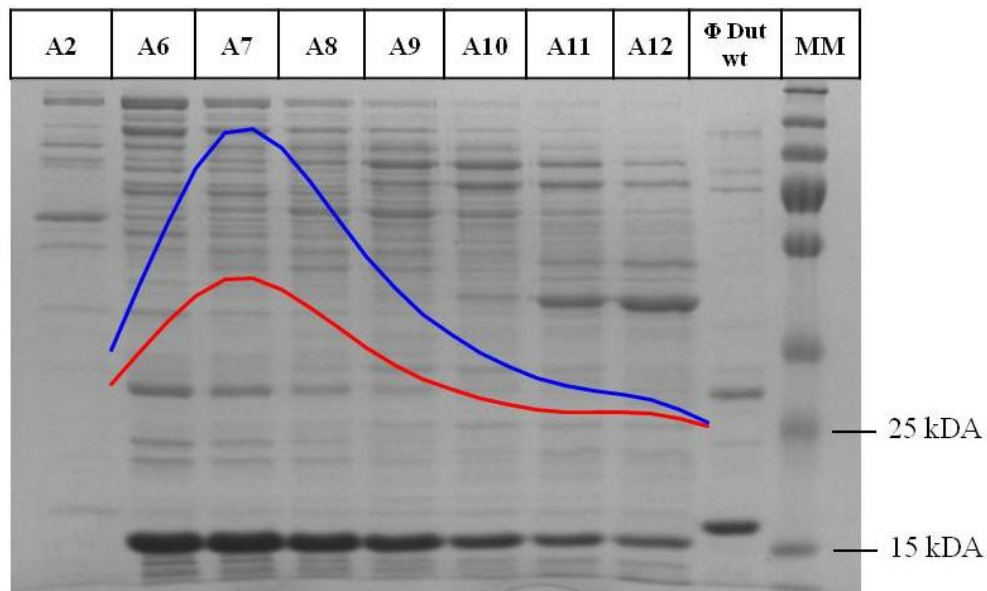
dr. Ozohánics Olivér végezte el. A minták egy Dionex Ultimate 3000 nanoRSLC folyadékkromatográfiás készülékkel Pepmap C18 RSLC 75 $\mu$ m x 150 mm oszlopon történő kromatográfiás elválasztást követően kerültek analízisre. A kromatográfiás rendszerben alkalmazott gradiens elúció során az eluens (0.1% hangyasav vizes oldata) acetonitril tartalmát lineárisan növeltük 2%-ról 45%-ra.

## 4. Eredmények és értékelésük

### 4.1. Kristályosítási kísérletek a $\Phi$ 11 dUTPáz szegmensek kölcsönhatásban játszott szerepének felderítésére

#### 4.1.1. $\Phi$ 11 dUTPáz dKar és dLoop fehérjék tisztítása

Kutatócsoportunk által elkészített, ioncserés kromatográfiával tisztított dKar mutáns fehérjét (a szekvencia 158. helyén lévő glutaminsavja helyett stop kodon került beépítésre), a kristályosításhoz szükséges fehérjetisztaság elérése érdekében Nyíri Kinga vezetésével gélszűrtem (15. ábra)<sup>8</sup>. Az elúciós térfogat, mely az injektálástól a kromatogram csúcsáig átfolyt oldatmennyiséget jelenti, 10,9 ml volt.



**15. ábra: dKar fehérje gélszűrése során szedett frakciók (A2, A6-A12) SDS gélképe, rajta a tisztítás során felvett kromatogrammal**

A frakciók mellett kontrollként futtatva a vad típusú  $\Phi$ 11 dUTPáz; MM: mintamarker  
A kék görbe a 280 nm-en mért abszorbancia, mellyel a fehérjét követtük nyomon, míg a piros kromatogram a DNS-t jelentő 260 nm-en mért abszorbancia



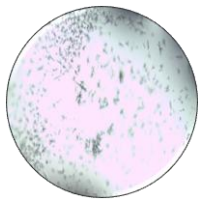
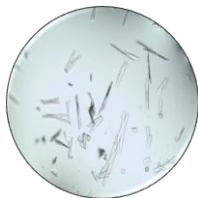

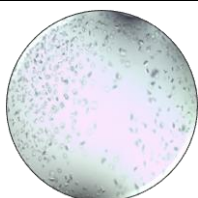
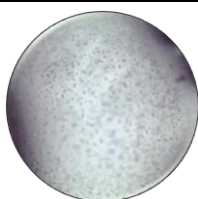
A gélszűrt dLoop mutáns ( $\Phi$ 11DUT <sup>$\Delta$ 101G-122Q</sup>) frakciót, mellyel további kísérleteket végeztem, készen kaptam.

<sup>8</sup> A dKar dUTPáz fehérjét három részletben tisztítottuk meg. A 15° reprezentációt szolgáló ábra mellett a másik két injektálásról készült SDS gélkép a függelékben megtalálható (35. ábra).

#### 4.1.2. Φ11 dUTPáz dKar és dLoop fehérjék kristályosítása

A 96-féle odatkörülmenyt tartalmazó JCSG+ és SG1 screen-ekkel végeztem a kristályosító oldatok előzetes szűrését. A JCSG+ screen csoportunk korábbi munkái során hatékonyan működött egyéb fehérjék kristályosításakor, a benne lévő körülmények tág intervallumon mozognak az anyagösszetétel szempontjából, míg az SG1 tálca a publikációs adatok szerinti leghatékonyabb kristályosító oldatokat tartalmazza. A screen tálcák elkészítésekor a dLoop mutáns esetében 5,1 mg/ml, míg a dKar fehérjénél 6,89 mg/ml koncentrációjú fehérjeoldatot használtam, amelyekhez előzetesen ötszörös moláris feleslegben az enzim dUPNPP szubsztrátanalógját adtam, mivel ezt a dUTPáz a dUTP-hez hasonlóan megköti az aktív centrumában, azonban nem képes elhidrolizálni, így megfigyelhető a ligandum kötött állapot. Szubsztrát kötött állapotban a fehérje rendezettebb konformációt vesz fel, (lásd: 1.2 fejezet) így nagyobb eséllyel kristályosodik. Továbbá a dLoop fehérje oldat 5 mM-os végkoncentrációban  $MgCl_2$ -ot tartalmazott.

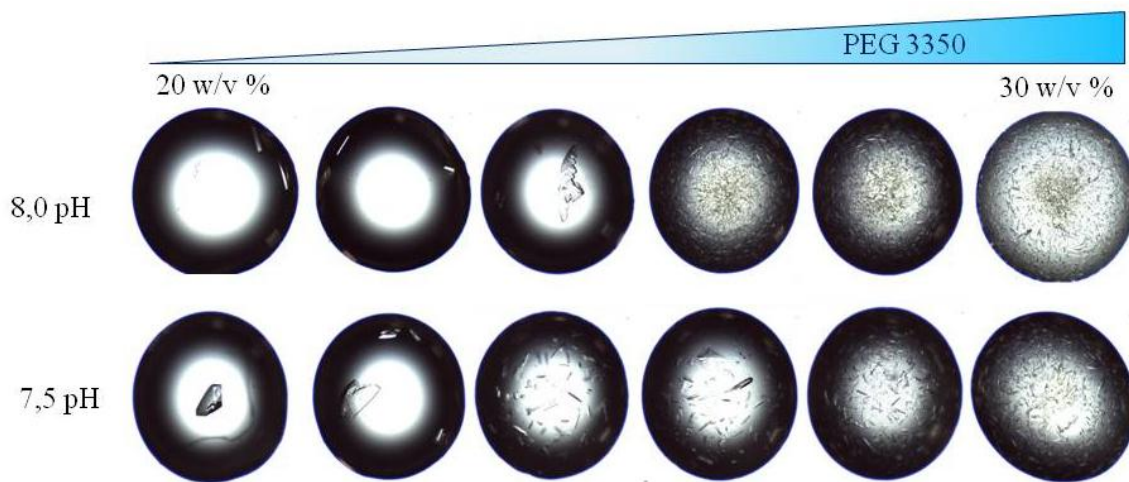
Mind a dLoop (2. táblázat) és dKar (3. táblázat) esetében találtam olyan cseppeket, melyben fehérjekristály keletkezett. Ezen körülmények között hasonlóságokat keresve állapítottam meg egynéhány olyan oldatösszetételt, melyet az optimalizálás során pH és sókoncentráció változtatásával körüljártam.

találat helye (tálca, well)	körülmény			fénykép
	só (koncentráció)	puffer (konc., pH)	kicsapószer (koncentráció)	
SG1, F10	magnézium- acetát 0,2 M	-	PEG 3350 20 w/v %	
SG1, A1	magnézium- klorid 0,2 M	Tris 0,1 M; pH = 8,5	PEG 4000 30 w/v %	
SG1, C9	magnézium- klorid 0,2 M	Tris 0,1 M; pH = 8,5	PEG 3350 25 w/v %	
SG1, C10	magnézium- klorid 0,2 M	Na-HEPES 0,1 M; pH = 7,5	PEG 3350 25 w/v %	
SG1, E7	magnézium- klorid 0,2 M	-	PEG 3350 20 w/v %	
SG1, G8	magnézium- klorid 0,2 M	Tris 0,1 M; pH = 8,5	PEG 8000 20 w/v %	
JCSG+, D6	magnézium- klorid 0,2 M	Tris 0,1 M; pH = 8,5	PEG 8000 20 w/v %	

2. táblázat: dLoop fehérje találatok a 96 lyukú kristályosítási oldat tálcán

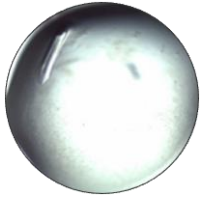
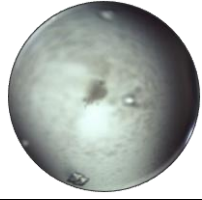
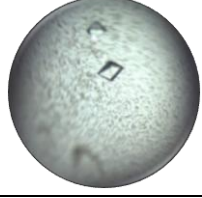



A dLoop mutáns esetében a körülmények többsége 0,2 M MgCl<sub>2</sub>-t tartalmazó különböző pH-jú Tris-puffer volt, előfordult azonban puffert nem tartalmazó körülmény is.

Ez alapján az optimalizációs tálca vertikális irányában a Tris-puffer pH-ját (fentről lefelé haladva: nincs puffer, pH=8,0, pH=7,5, pH=7,0) míg horizontálisan a PEG 3350 (polietilén-glikol) kicsapószer koncentrációját változtattam (balról kezdve rendre 20, 22, 24, 26, 28, 30 w/w%). A 16. ábrán látható, hogy a kicsapószer koncentrációjának növelésével egyre több kisméretű kristály jelent meg, mivel több, a kristályképződés indulásához szükséges gócpont alakult ki. A kisebb PEG 3350 koncentrációjú oldatokban, a kevés gócpont miatt, a növekedésnek indult kristályok nagyobb méretűek. A semlegeshez közelebbi pH-n a fehérjék már kisebb PEG 3350 koncentrációnál kialakították a kristályszerkezetet, míg a lúgosabb pH-n ez csak nagyobb koncentrációnál következett be.



16. ábra: dLoop mutáns kristályok különböző puffer pH és kicsapószer koncentráció mellett

A dKar esetében a screen-en talált körülmények összetétele nagy változatosságot mutatott. Az optimalizálásra szánt körülmények kiválasztásánál, mivel több alkalmas jelölt is volt, elvetettük azt, amelyik nátrium-dimetilarzenátot tartalmazott, mivel ez az adalék mérgező. Elhagytuk továbbá a foszfátot tartalmazó körülményt, mivel a magnézium foszfát oldhatósága is viszonylag alacsony, így nagy a valószínűsége a szervesetlen kristályok képződésének, ami összetéveszthető a fehérjekristályokkal. A többi körülmény alapján elkészített 24 lyukú optimalizációs tálca kristályosító oldatainak összetételét a 4. táblázat mutatja.

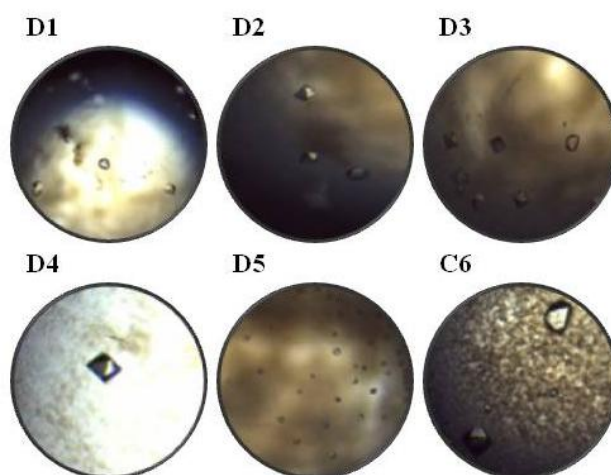
találat helye (tálca, well)	körülmény			fénykép
	só (koncentráció)	puffer (konc., pH)	kicsapószer (koncentráció)	
JCSG+, A9	ammónium- klorid 0,2 M	-	PEG 3350 20 w/v %	
JCSG+, B7	-	nátrium-acetát 0,1 M; pH = 4,6	PEG 4000 8 w/v %	
SG1, D11	-	nátrium-acetát 0,1 M; pH = 4,6	PEG 4000 8 w/v %	
SG1, F3	ammónium-szulfát 0,2 M	-	PEG 3350 20 w/v %	
JCSG+, E11	kalcium-acetát 0,16 M nátrium- dimetilarzenát 0,08 M	-	14w/w% PEG 8000	
JCSG+, A11	ammónium- hidrogén-foszfát 0,2 M	0,1 M Tris pH = 8,5	50 V/V% MPD	

**3. táblázat: dKar konstrukció találatok a 96 lyukú kristályosító tálcán megvastagítva az optimalizáció során figyelembe vett körülmények helye**

	1	2	3	4	5	6
A	PEG 3350 16%; 0,2 M ammónium-szulfát	PEG 3350 18%; 0,2 M ammónium-szulfát	PEG 3350 20%; 0,2 M ammónium-szulfát	PEG 3350 21%; 0,2 M ammónium-szulfát	PEG 3350 22%; 0,2 M ammónium-szulfát	PEG 3350 24%; 0,2 M ammónium-szulfát
B	PEG 3350 16%; 0,2 M ammónium-klorid	PEG 3350 18%; 0,2 M ammónium-klorid	PEG 3350 20%; 0,2 M ammónium-klorid	PEG 3350 21%; 0,2 M ammónium-klorid	PEG 3350 22%; 0,2 M ammónium-klorid	PEG 3350 24%; 0,2 M ammónium-klorid
C	PEG 4000 6%; 0,1 M nátrium-acetát; 4,2 pH	PEG 4000 8%; 0,1 M nátrium-acetát; 4,2 pH	PEG 4000 10%; 0,1 M nátrium-acetát; 4,2 pH	PEG 4000 6%; 0,1 M nátrium-acetát; 5,0 pH	PEG 4000 8%; 0,1 M nátrium-acetát; 5,0 pH	PEG 4000 10%; 0,1 M nátrium-acetát; 5,0 pH
D	PEG 4000 6%; 0,1 M nátrium-acetát; 4,6 pH	PEG 4000 7%; 0,1 M nátrium-acetát; 4,6 pH	PEG 4000 8%; 0,1 M nátrium-acetát; 4,6 pH	PEG 4000 9%; 0,1 M nátrium-acetát; 4,6 pH	PEG 4000 10%; 0,1 M nátrium-acetát; 4,6 pH	PEG 4000 11%; 0,1 M nátrium-acetát; 4,6 pH

4. táblázat: dKar mutáns optimalizációs körülményei

A dKar mutáns optimalizációs tálca változatos körülményei révén nem volt megfigyelhető a dLoop fehérje kristályképződésénél tapasztalt növekedési sor a kicsapószer függvényében, azonban az egyes cseppekben voltak pozitív eredmények (17. ábra).



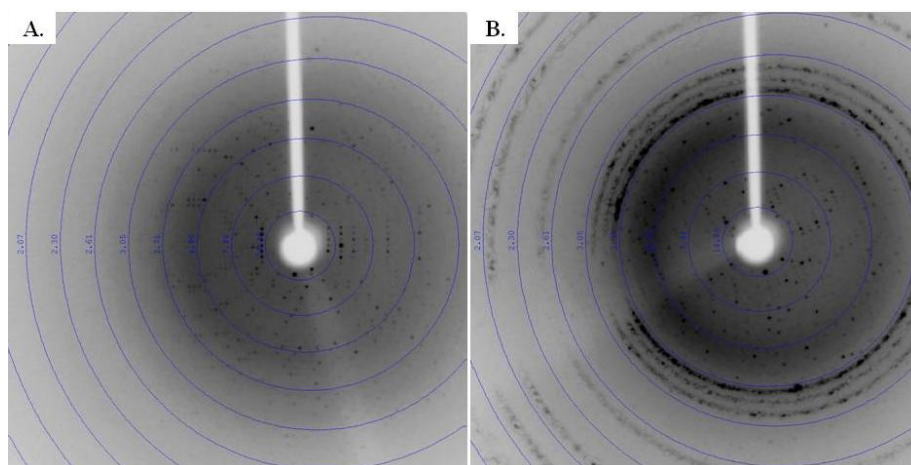
17. ábra: Az optimalizációs tálcán nőtt dKar kristályok fényképei

A röntgendiffrakciós tájékozódó mérés eredményei alapján találtunk igen jól szóródó fehérjekristályokat. Azokat, amelyek nem mutattak a szerkezetanalízist zavaró ikresedést,



illetve a diffrakciós képükön 3 Å alatti felbontást tapasztaltunk, a további vizsgálatokon való felhasználás céljából folyékony nitrogénben tároltuk.

A dLoop kristály tájékozódó mérése alapján 89, 98, 100, 90°, 90°, 90°; a dKar esetén 107, 107, 165; 90°, 90°, 90° cellaparamétereket sikerült meghatározni, ami a vad típushoz hasonlóan szintén tetragonális rácsra utal. A mutáns fehérjékre kapott cellaparaméterek megközelítőleg egyeznek a vad típusú dUTPáz esetében mért értékekkel (109,66; 109,66, 109,66; 90°, 90°, 90°). Ez alapján várhatóan a dLoop és dKar fehérjék kristályainak elemi cellájában is két trimer helyezkedik el. A dLoop fehérje esetében egy teljes adatkészlet gyűjtésére is volt lehetőségünk, a diffrakciós képsorozat videófelvétele online megtekinthető, ([https://www.youtube.com/watch?v=AIPA\\_uRSMWI](https://www.youtube.com/watch?v=AIPA_uRSMWI)), a mérési adatok kiértékelése jelenleg is folyamatban van. A 18. ábrán a méréssorozat két reprezentatív képét mutatom be, a „B” képen megjelenő sötét sávok jegesedésre utalnak. Ez azért következhet be, mert a mérés során a kristály környezetében lévő vízgőz a sugárkárosodás ellen alkalmazott hideg nitrogénáramba kerülve ráfagy a tartó tűre, illetve a kristályra. Ennek kiküszöbölésére a készülékben a hideg nitrogénáramhoz képest egy külső körön meleg nitrogén áramlik, azonban ha ennek iránya nem megfelelő, vagy maga a meleg nitrogén nedves, akkor jégkristályok képződnek. Ebben az esetben a jégdarabkát megpróbáltuk eltávolítani, a hurkot tartó kar 360°-os forgatásával a jég egy része leesett, a fent maradt jégkristályt, egy hajszálat óvatosan végighúzva a tűn, sikeresen eltávolítottuk.



**18. ábra: dLoop fehérje különböző oldalról felvett diffrakciós képei**  
A.) megfelelő szóródási kép; B.) feljegesedett kristályról készített felvétel

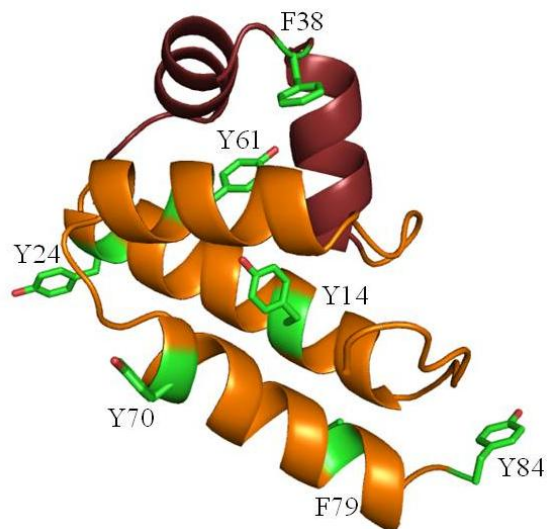
## 4.2. Stl fehérje kölcsönható felszínének vizsgálata az N-terminális részre beültetett triptofán szenzorral

Az N-terminális szegmens kölcsönhatásban való részvételét triptofán fluoreszcencia változásának nyomonkövetésével szerettem volna vizsgálni. Az 1.5. fejezetben leírt korábbi kísérletek alapján az N-terminális felelős a DNS megkötésért, de feltehetően szerepe van a dUTPáz-zal való kötődés kialakításában is, mivel a C-terminális önmagában nem szüntette meg a teljes enzimaktivitást. A triptofán mutáció helyének eldöntése több megfontolás figyelembevételével történt. Egyrészt a triptofánt célszerű nagy térkitöltésű aromás aminosav (tirozin vagy fenilalanin) helyére beépíteni, mert várhatóan ez okozza a legkisebb szerkezeti torzulást. Másrészt a fehérje mutációt, a 3 dimenziós szerkezeti modell alapján, a hélix-turn-hélix motívum térközelségében érdemes kialakítani, így a beépített triptofán aminosav fluoreszcenciája az N-terminális szegmens bármely részével kialakított interakció esetén változni fog. Ez alapján a hat lehetséges mutációs helyet a 19. és 20. ábra mutatja.

10	20	30	40	50	60
MEGAGQMAEL	PTHYGTIIKT	LRKYM <del>KL</del> TQS	KL <del>S</del> ERTGFSQ	NTISNHENGN	RNIGVNEIEI
70	80	90	100	110	120
YGKGLGIPSY	ILHRISDEFK	EKGYSPTLND	FGKFDKMYSY	VNKAYYNDGD	IYYSSYDLYD
130	140	150	160	170	180
ETIKLLELLK	ESKINVNDID	YDYVLKLYKQ	ILSTDTEKSI	INYETLANTR	KSSDKKREVT
190	200	210	220	230	240
IEEIGEFHEK	YKLLFTNLE	THNDRKKALA	EIEKLKEESI	YLGEKLRLVP	NHHYDAIKGK
250	260				
PMYKLYLYEY	PDRLEHQKKI	I <del>L</del> EKDTN			

**19. ábra: Az Stl szekvenciája**

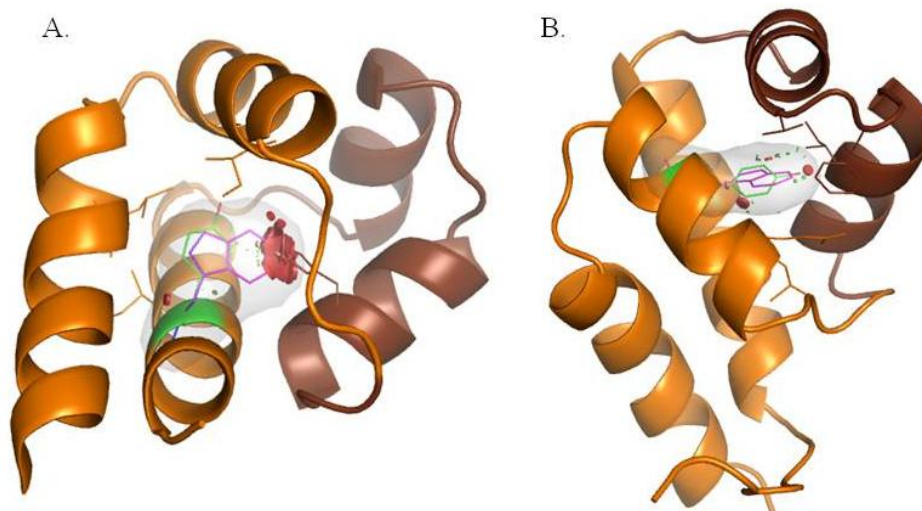
A lehetséges tirozin mutációs helyek pirossal, a fenilalanin mutációs helyek késsel jelölve. Aláhúzással kiemelve a HTH motívum.



**20. ábra: Az Stl N-terminálisában létrehozott mutáció lehetséges helyei**

Csokoládébarnával színezve a HTH motívum. Zölddel kirajzolva a mutációs hely lehetőségek.

Alapos megfontolás alapján a hélix-turn-hélix motívumban szereplő Phe 38 és a térben messze eső Tyr 70, Phe 78, Tyr 84 lehetőségek elvetésre kerültek. A további szóba jöhető mutációs helyek közül a Tyr 24 a modell alapján víznek kitett felszínen helyezkedik el, ezáltal kevés hidrofób kölcsönható partnerrel rendelkezik, így ez sem mondható alkalmas helynek. A két megfelelőnek tűnő aminosav (Tyr 14, Tyr 61) esetében a PyMOL program mutagenézis moduljának felhasználásával megvizsgálható, hogy a beépíteni szándékozott triptofán ütközik-e a többi aminosavval a fehérje 3D modelljében. A Tyr 14 esetében nem mutatkozott olyan triptofán konformáció, mely ütközés nélkül illeszkedett volna a szerkezetbe (A 21. ábra „A” része egy reprezentatív konformert mutat, a piros korongok a sztérikus ütközést jelölik). Ezzel szemben a Tyr 61 esetében létezik olyan konformer, bár alacsony valószínűséggel<sup>9</sup>, mely a fenti kritériumot teljesítette<sup>10</sup> (21/B. ábra), így ez a hely tűnt a legmegfelelőbbnek a szenzor beépítésére.



**21. ábra: Stl fehérjében feltüntetett két lehetséges helyen történő mutáció predikciós ábrája**

A.) Az Stl<sup>Y14W</sup> mutáció; B.) Az Stl<sup>Y61W</sup> mutáció.

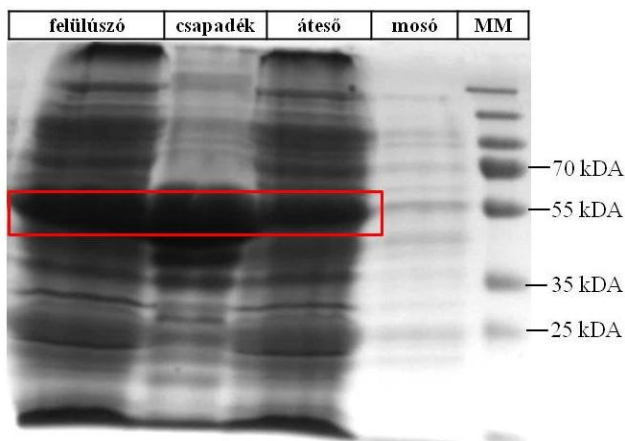
Az ábrán látható piros korongok a sztérikus ütközést mutatják.

Munkám során az Stl<sup>Y61W</sup> mutáns fehérjével dolgoztam, amelynek már megtörtént az *E. coli* BL21 Rosetta sejtekben történő termelése, én a fehérje feltárásától kezdve kapcsolódtam be a kísérletsorozatba.

<sup>9</sup> A program az eddig közölt fehérjeszerkezetek alapján valószínűségi értékeket is megad egy adott konformáció előfordulására.

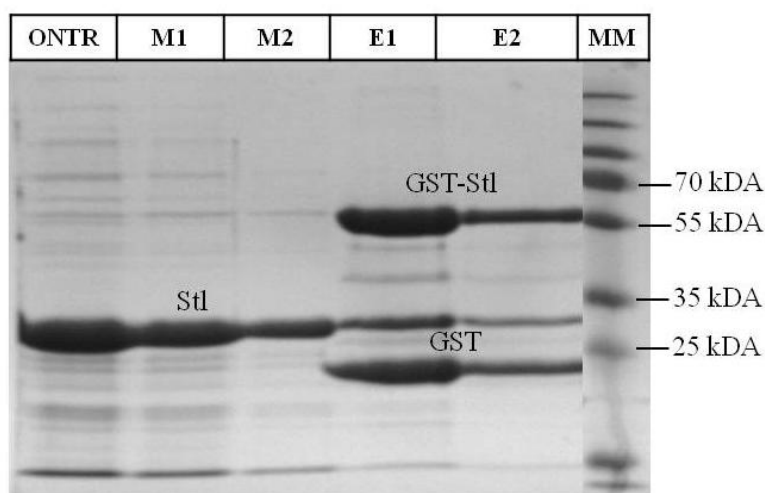
<sup>10</sup> Ebben az esetben csak kismértékű sztérikus ütközést mutat a program, azonban elképzelhető, hogy ez a feltekeredés során nem okoz problémát, mivel az ütközés a flexibilis oldalláncok kisebb elmozdulásával elkerülhető.

A sejtfeltárás során keletkezett csapadékot és felülúszót, valamint a tisztítás során az oszlopon áteső és mosófolyadékából vett mintát SDS géltre vittem fel. Így ellenőriztem a minták mellett futtatott marker segítségével, hogy a számomra szükséges fehérje benne van-e, illetve az egyes mintákban milyen mennyiségben. A gélen (22. ábra) látható, hogy a feltárás jól sikerült, mivel a felülúszóban megjelent a GST-Stl<sup>Y61W</sup> fúziós fehérje (55 kDa), melynek jó része az oszlopon megkötődött (áteső fázisban a mennyisége csökkent). Így érdemes volt tovább folytatni a tisztítást az oszlopra kötött fehérje trombinos emésztésével.



**22. ábra: Stl<sup>Y61W</sup> fehérje meglétének ellenőrzése SDS gélen**  
A GST-Stl<sup>Y61W</sup> fehérje 55 kDa-nál pirossal bekeretezve.

Overnight trombinos emésztés után a felülúszót (ONTR), az első (M1) és a második mosó folyadékot (M2), valamint a két elúciós frakciót (E1, E2) ismét megfuttattam SDS gélen (23. ábra). Jól látható, hogy mind a három szedőfrakció tartalmazta a gélen 33 kDa méret körül megjelenő Stl<sup>Y61W</sup>-t, ezért a koncentrációmérést követően a további kísérletekhez 100, 200 és 500 µl-es porciókban lefagyasztottam a tisztított preparátumot (5. táblázat).



**23. ábra: Stl<sup>Y61W</sup> fehérje meglétének ellenőrzése SDS gélen ONTR után a komponens megnevezése az adott sáv felett feltüntetve**

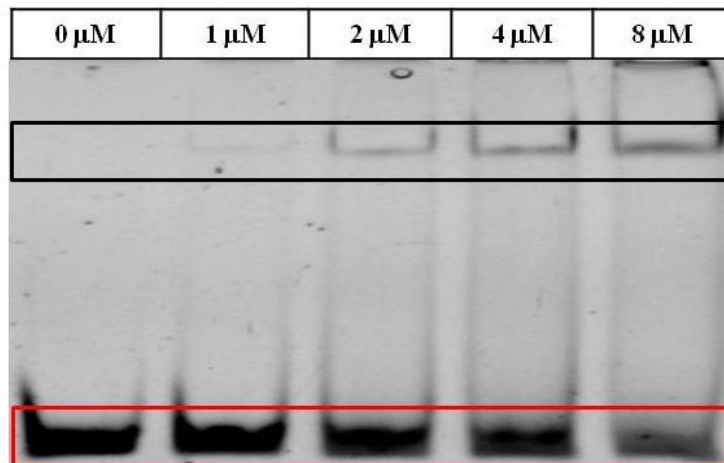
<b>ONTR</b>	3,0 mg/ml
<b>M1</b>	1,6 mg/ml
<b>M2</b>	0,6 mg/ml

**5. táblázat: Az affinitás kromatográfiával megtisztított Stl<sup>Y61W</sup> fehérje koncentrációja az egyes frakciókban**

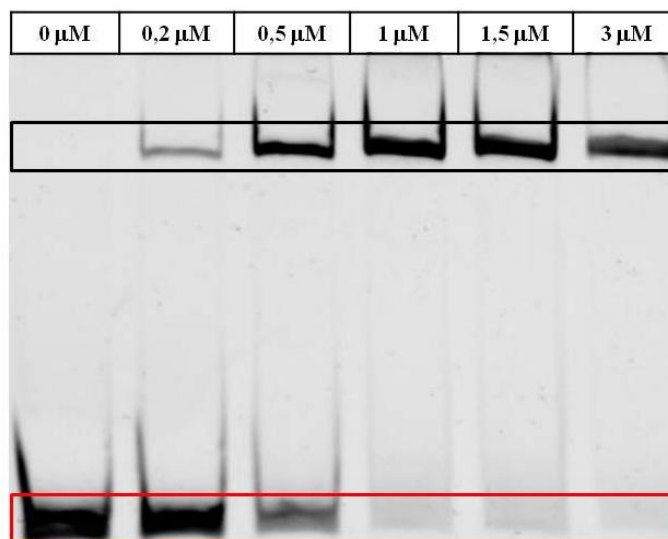
Mivel a fehérje expresszáldott és a tisztítás során nem csapódott ki, így feltételezhető, hogy megfelelően feltekeredett. Ez azonban nem zárja ki, hogy a mutáció következtében olyan szerkezeti változás következett be, mely a fehérje valamely funkcióját befolyásolja. Ennek tisztázása érdekében először a tisztított Stl<sup>Y61W</sup> fehérje DNS kötő képességét EMSA módszerrel vizsgáltam. Az EMSA géltre felvitt minták összetételét a 6. táblázat mutatja. Az első oszlop fehérjét nem tartalmazott csak DNS-t, így az teljes mennyiségében a DNS-re jellemző távolságra futott a géliben. Amennyiben a fehérje komplexet képez a DNS-sel, akkor a komplex nagyobb mérete révén, a szabad DNS-t jelentő sávhoz képest magasabb pozícióban jelenik meg. A fehérje koncentrációját növelve a fehérje-DNS kölcsönhatást jelentő vonalak egyre vastagabbak, míg a szabad DNS egyre kevesebb, hiszen az már egyre inkább komplex formában van jelen. Ezt az esetet a 25. ábra mutatja, melyen a vad típusú Stl és DNS különböző összetételű keverékei lettek felvíve EMSA géltre. (Ezt a kísérletet Nyíri Kinga végezte el.) Az Stl<sup>Y61W</sup> esetében csak elhanyagolható mértékben tapasztaltam az eltolódást, valószínűsíthető, hogy a mutáns fehérje és DNS között nem alakul ki a vad típusúhoz hasonló kötődés (24. ábra).

	1 zseb	2 zseb	3 zseb	4 zseb	5 zseb
Fehérje (17,2 $\mu\text{M}$ )	0	1,2	2,3	4,6	9,3
200 mM NaCl puffer	16,0	14,8	13,7	11,4	6,7
DNS (25ng/ $\mu\text{l}$ )	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
EDTA	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
LD (6x)	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3

6. táblázat: EMSA géltre felvitt minták összetétele Stl<sup>Y61W</sup> fehérje esetén



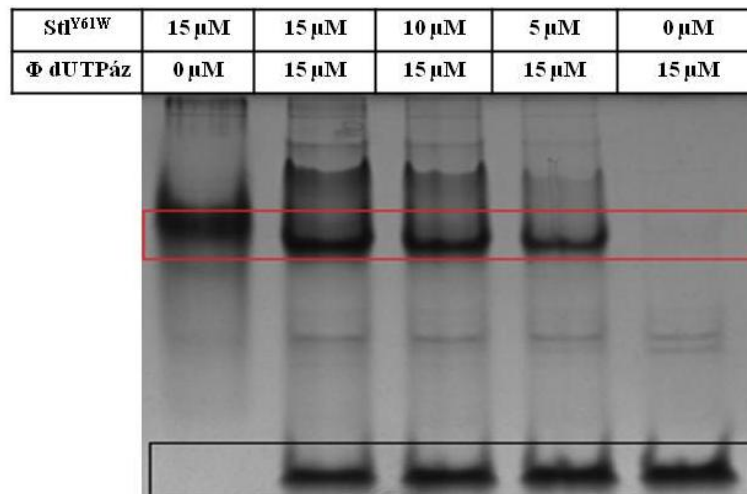
24. ábra: Stl<sup>Y61W</sup> fehérje és DNS kötésének vizsgálata EMSA gélen  
a komplex sáv fekete, a szabad DNS sáv piros keretben



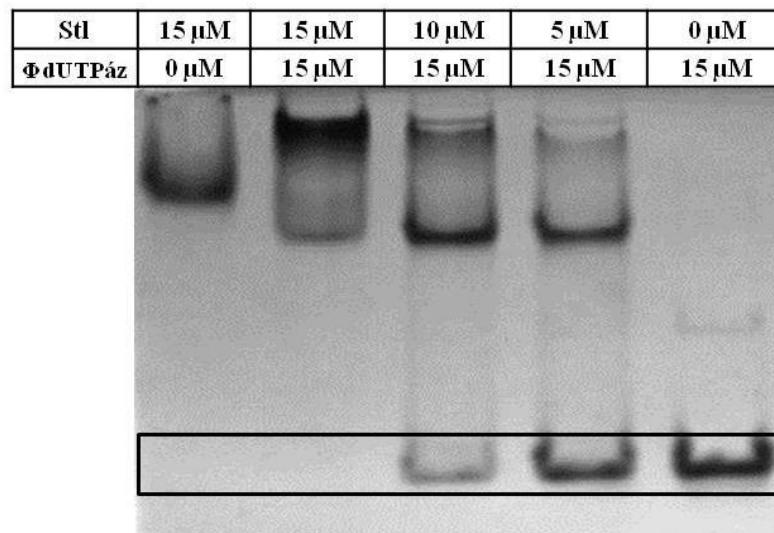
25. ábra: Vad típusú Stl és DNS kötődése EMSA gélen  
a komplex sáv fekete, a szabad DNS sáv piros keretben  
(Nyíri Kinga által elvégzett kísérlet)

Az Stl<sup>Y61W</sup> dUTPáz enzimmel való kötődését natív gélen figyeltem meg. A natív gél két szélére vittem fel önmagában a fehérjét, míg a közti zsebekben lévő minták a dUTPáz-ból állandó, míg az Stl<sup>Y61W</sup> fehérjéből különböző koncentrációkat tartalmaztak a 26. ábra fejléce

szerint. Látható, hogy a szabad dUTPáz mennyisége állandó volt a hozzáadott Stl<sup>Y61W</sup> mutáns fehérje mennyiségétől függetlenül, habár kismértékű komplex képződés bekövetkezhetett, mert dUTPáz jelenléte esetén az Stl felett is megjelent egy halvány sáv. Összehasonlításként látható a 27. ábrán [13] az Stl és dUTPáz közötti kölcsönhatás igazolása, ahol a szabad dUTPáz mennyisége az Stl koncentráció növekedésével csökken.



26. ábra: Stl<sup>Y61W</sup> és Φ dUTPáz kölcsönhatás vizsgálata natív gélen  
Stl<sup>Y61W</sup> fehérje sáv pirossal, Φ dUTPáz sáv feketével keretezve



27. ábra: Stl<sup>wt</sup> és Φ dUTPáz kölcsönhatás vizsgálata natív gélen  
Φ dUTPáz futási frontja feketével keretezve

Az elvégzett kísérletek eredményei - a DNS kötés elmaradása, valamint a nem jelentős mennyiségű komplex képződése - alapján lehetséges, hogy a pontmutáció az Stl fehérje feltekeredését zavarta, de az is megeshet, hogy a triptofán aminosavat a kölcsönhatáshoz nélkülözhetetlen területre sikerült beépíteni. A kérdés megválaszolásához további kísérletek

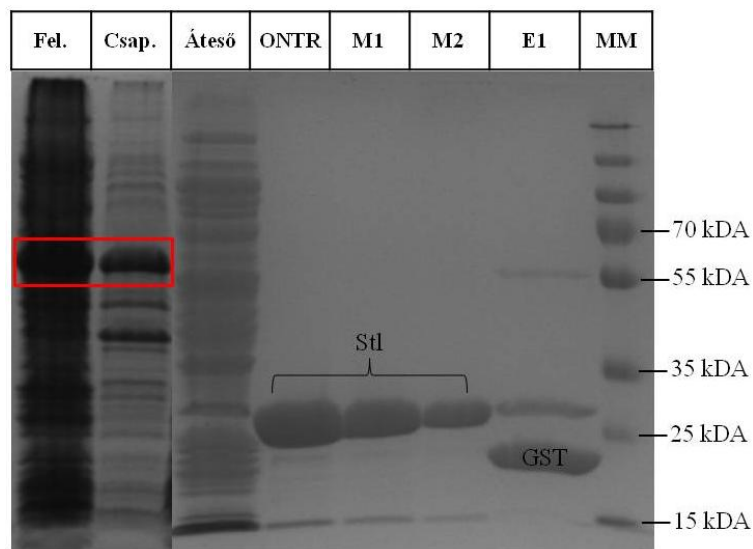
szükségesek. Terveim szerint a későbbiekben megpróbálkozom majd a szekvencia más részére helyezett triptofán szenzort tartalmazó fehérjét is vizsgálni, hogy a vad típushoz hasonló viselkedést nyomon tudjam követni.

### 4.3. A két fehérje kölcsönható felszínének keresése keresztkötési módszerrel

#### 4.3.1. A kísérlethez szükséges fehérjék előállítása

Az Stl és dUTPáz fehérje előállításához a megfelelő plazmid vektorok *E. coli* Rosetta sejtekbe történő transzformálását követően (ld.: 3.1.2 fejezet) a 3.1.3. fejezetben leírt expressziós protokollt követtem, majd a sejteket a 3.1.4. pont szerint feltártam.

Az Stl fehérjét affinitás kromatográfiával (ld.: 3.2.1) tisztítottam meg, amely során a keletkezett termékeket, illetve a feltárásnál centrifugálással szétválasztott felülúszót és a leülepedett csapadékot – melyet a feltáró pufferben, a feltárással megegyező térfogatban oldottam fel – SDS-gélen megfutattam, a kívánt termék jelenlétének követésére. Látható, hogy a fehérjét nagy mennyiségben és tisztaságban sikerült kinyernem a folyamat során (28. ábra) (7. táblázat).



**28. ábra: Stl SDS gélképe affinitás kromatográfiás tisztítás során**

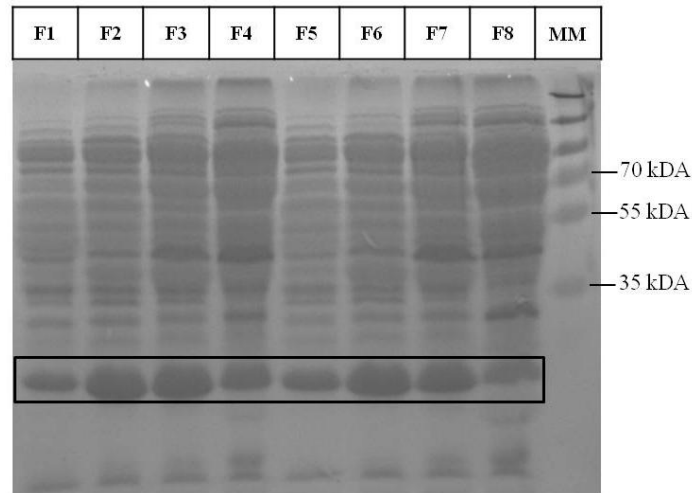
jelölésmagyarázat: Fel: felülúszó, Csap.: csapadék; ONTR: overnight trombinnal emésztett frakció; M1: 1. mosópuffer; M2: 2. mosópuffer; E1: 1. elúció; E2: 2. elúció; pirossal keretezve a GST-Stl fehérje

<b>ONTR</b>	2,09 mg/ml
<b>M1</b>	1,10 mg/ml
<b>M2</b>	0,56 mg/ml

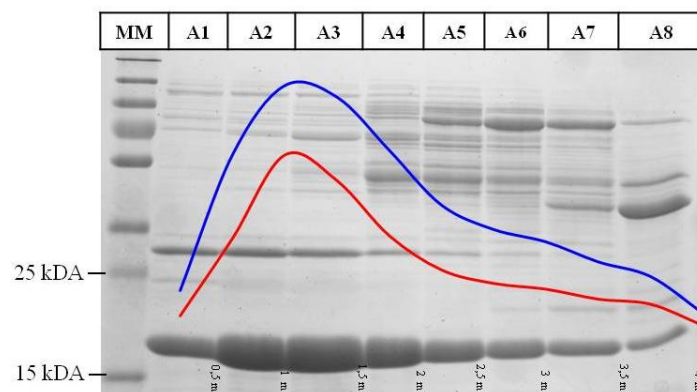
**7. táblázat: Stl-t tartalmazó frakciók koncentrációi**



A termelősejtekből feltárt dUTPáz enzimet először ioncserés kromatográfiával (ld.: 3.2.2), majd a keletkezett frakciókat gélszűréssel (ld.: 3.2.3) tisztítottuk meg. A gélképeken jól látszik, hogy míg az ioncsere egy előzetes dúsítási lépés, a gélszűrés<sup>11</sup> után az A1-A4 frakciókban nagy tisztaságú (A1-A4 > 95%) fehérjét kaptunk (29. ábra, 30. ábra).



**29. ábra: dUTPáz ioncserés kromatográfiás tisztításának SDS gélképe**  
A szedett frakciók F1-F8; MM: mintamarker, bekeretezve a dUTPáz

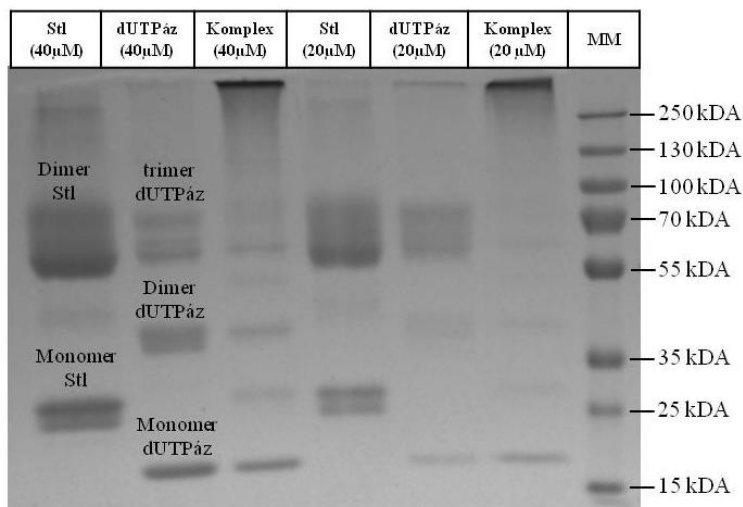


**30. ábra: dUTPáz méretkizárásos kromatográfiás tisztításának SDS gélképe**  
A szedett frakciók A1-A8; MM: mintamarker

A 3.6.1 fejezetben leírtak szerint a keresztkötő reagenssel (DSS) létrehoztam a kovalensen kötött homooligomereket (dUTPáz trimer, StI dimer), illetve a dUTPáz-StI komplex kémiai összekapcsolását is ezen protokoll alapján végeztem. A kovalens keresztkötés eredményeképpen az egyébként másodrendű kötésekkel kapcsolódó oligomerek a denaturáció

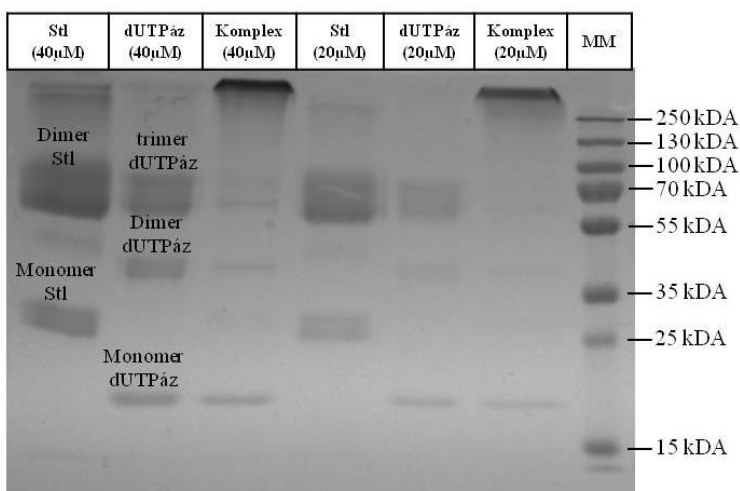
<sup>11</sup> A dUTPáz fehérjét négy részletben vittük fel a gélszűrő oszlopra. A 30. reprezentációt szolgáló ábra mellett a másik három injektálásról készült SDS gélkép a függelékben található (36. ábra).

során nem estek szét monomerjeikre az SDS gélen, hanem megjelentek oligomer formáik is (31. ábra, 32. ábra).



**31. ábra: Keresztkötési reakció SDS gélképe 20 és 40 µM-os fehérjekoncentrációval, 30 perces reakcióidővel, ötszörös reagensfeleslegben.**

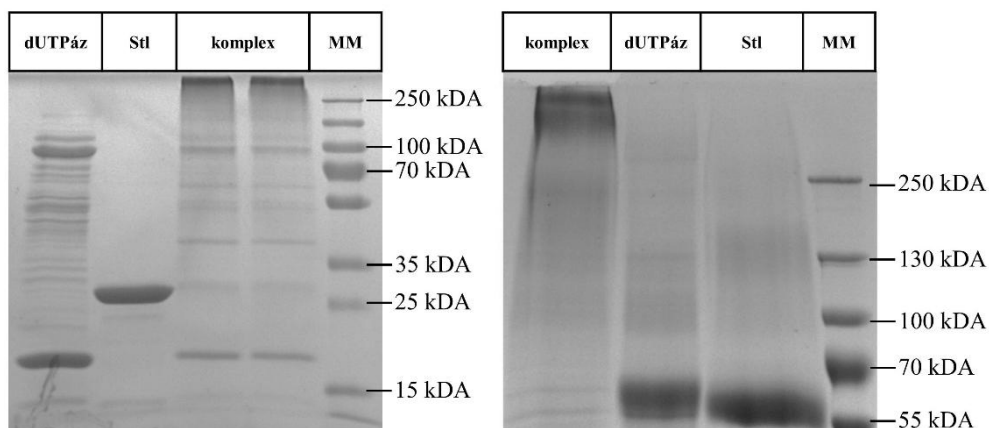
A gélképen feltüntetve a különböző aleggységsszámmal rendelkező enzimfajták; MM: Mintamarker



**32. ábra: Keresztkötési reakció SDS gélképe 20 és 40 µM-os fehérjekoncentrációval, 60 perces reakcióidővel, ötszörös reagensfeleslegben**

a gélképen feltüntetve a különböző aleggységsszámmal rendelkező enzimfajták; MM: Mintamarker

A keresztkötött dUTPáz-Stl komplexet tartalmazó minta futtatásakor, a komplexnek egyértelműen megfeleltethető sávot nem láttunk, mivel azonban sem a dUTPáz-nak sem az Stl-nek megfelelő sáv nem jelent meg, feltételeztük, hogy a keresztkötés eredményeképpen feltehetően olyan nagyméretű molekulát kaptunk, amely nem tudott a gélbe jutni. A komplex mintát kisebb akrilamid koncentrációjú gélben is megfuttattuk, azonban ebben az esetben is az előbbihez hasonló eredményt kaptunk (33. ábra).



**33. ábra: Keresztkötött komplex 12 és 6 %-os gélképe**

A protokoll optimalizálása során különböző fehérjekoncentrációkat használtam, változtattam a reagens mennyiségét illetve a reakció idejét is. A reagens mennyiségét tekintve a kiindulási pontként szolgáló protokoll húszszoros felesleget javasolt, azonban ennél az adagolási aránynál véleményem szerint, magasabb az aspecifikus keresztkötések keletkezésének valószínűsége, ezért a reagenst tízszeres és ötszörös moláris feleslegben adtam a fehérjékhez. A 31. és 32. gélképen jól látszik, hogy az ötszörös felesleg is elegendő volt a keresztkötések kialakításához, mivel mind az Stl és mind a dUTPáz fehérjék esetében megjelentek az oligomer formák. A 20  $\mu\text{M}$ -os fehérjekoncentráció nem bizonyult megfelelőnek, mivel az SDS gélen keletkező sávok halványak, a kapott alacsony termékmennyiség a gélből való izolálásnál és a további kísérletek esetében is problémát okozhatna. Ezzel szemben 40  $\mu\text{M}$ -os mintakoncentrációnál megfelelően látszódnak az egyes fehérjék sávjai, illetve a komplex esetében a nem kötődött fehérjekomponensek mennyisége sem volt számottevő (31. ábra, 32. ábra), ezért a további kísérletekben ezt a koncentrációt alkalmaztam. Először 1 órás és overnight reakcióidőt állítottam be, e kettő között nem tapasztaltam különbséget, ezért feltételeztem, hogy a reakció gyorsan játszódik le. A következő kísérletet ezért 30 és 60 perces inkubálási idővel is elvégeztem, amikor is szintén nem volt érzékelhető különbség a kapott eredmények között, ezért a továbbiakban 30 perces reakcióidővel dolgoztam (31. ábra, 32. ábra).

Összefoglalásképpen elmondható, hogy a keresztkötési kísérlet eredményeként előállítottam a homooligomer dimer Stl-t valamint a trimer dUTPáz-t. Ez alapján bár a keresztkötött komplex mérete meglepően nagy volt, a keresztkötő reagens valószínűsíthetően az oldatbeli formának megfelelő oligomert eredményezett a komplex esetében is. Ezt a hipotézist támasztja alá az is, hogy független SAXS mérések alapján az Stl:dUTPáz komplex

nagyobb méretű is lehet (kb. 460 kDa), az eddigi kísérleteink alapján tapasztalt sztöchiometrikus kapcsolódásnál (118 kDa) (1.3 fejezet).

#### 4.3.2. A tömegspektrometriás kísérleti eredmények kiértékelése

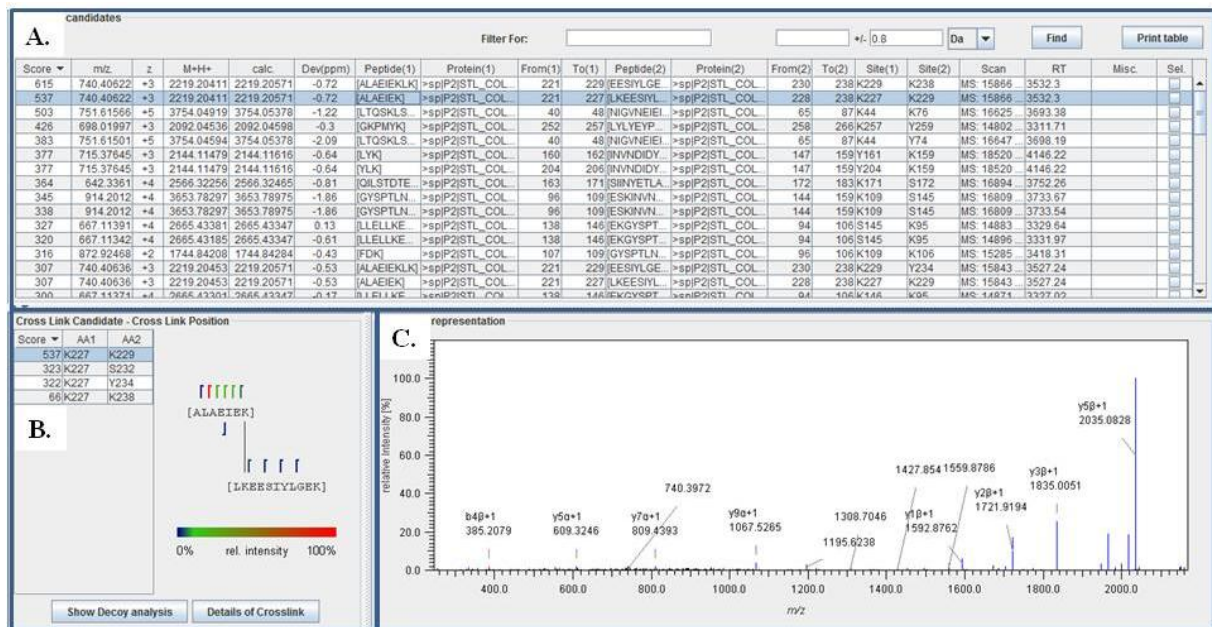
A tömegspektroszkópiás mérést dr. Ozohanics Olivér, az MTA TTK MS Proteomika Kutatócsoportjának munkatársa végezte el számomra, illetve tanácsai és irányítása alapján dolgoztam fel az eredményeket a Stavrox nevű program segítségével. Ez az MS által felvett adatokat a szoftverbe behívott fehérjeszekvenciával képes összevetni és a hasított darabokat a szekvencia egyes részleteinek megfeleltetni. A program az egyes találatokhoz egy pontszámot rendel, mely annál magasabb, minél inkább azonosíthatók egy pontos tömegmérés alapján feltételezett keresztkötött peptid hasadási termékei (fragmensei) az MS<sup>2</sup> spektrumban. Az MS-ben alkalmazott ütközés-indukált fragmentáció során főleg peptid kötések hasadnak; ez lehetővé teszi az eredeti peptid szekvencia meghatározását.

A szoftver az egyes kísérletekhez úgynevezett „decoy score-t” rendel, mellyel a fenti pontszám alapján az elemzés megbízhatósága becsülhető. Ehhez a fehérje szekvencia inverzét használva végzi el a mérési eredmények analízisét. Az így kapott fals pozitív adatkészletet összevetve valós pozitív találatokkal definiálja azt a pontszámot, mely felett az elemzés konfidenciaszintje legalább 95 %-os. Az így megállapított minimum pontszámot el nem érő találatok nagy részben elhanyagolhatóak a magas hibalehetőség miatt.

Egy találatot elfogadtam amennyiben: (I) a találat pontértéke a decoy score felett volt, (II) az MS<sup>2</sup> spektrumban mind a két keresztkötött peptidészlet bomlási termékei azonosíthatók voltak, (III) valamint az MS<sup>2</sup> spektrum nem tartalmazott a szekvenciárészletből nem következő nagy intenzitású csúcsot. Továbbá a keresztkötő reagens a specifikus Lys-Lys kölcsönhatások kialakítása mellett kisebb hatásfokkal képes a hidroxil oldalláncokkal (tirozin, szerin, treonin) is reakcióba lépni, így az értékelés során ezeket a lehetőségeket is számításba vettem.

A 34. ábrán az értékelőprogram kezelőfelülete látható. Az „A” panel az adatkészletből azonosított összes találatot tartalmazza. A „B” panel a keresztkötő reagens lehetséges kötődési pontjait mutatja be. A bal oldali ablakrészben pontszám szerinti csökkenő sorrendben foglalja össze az adott keresztkötött peptid esetében lehetséges kapcsolódási helyeket. A jobb oldali ablakrészben a spektrumban azonosított fragmensek alapján a hasadási pontokat vonal jelöli, melynek színe a csúcs spektrumban tapasztalt relatív intenzitását

reprezentálja. A „C” panel egy adott (A panelben kijelölt) keresztkötött szekvenciadarab MS<sup>2</sup> spektrumát mutatja. A színeljelt csúcsok megfeleltethetők az analizált szekvenciadarab fragmenseinek.



34. ábra: A Stavrox program felépítését magyarázó ábra.

A.) Adatkészletről azonosított összes találatot tartalmazó panel. B.) A keresztkötő reagens lehetséges kötődési pontjait bemutató panel. C.) Adott keresztkötött szekvenciadarab MS<sup>2</sup> spektrumát prezentáló panel.

A mérés kiértékelését a már ismert 3 dimenziós szerkezettel rendelkező dUTPáz enzimmel kezdtem, vizsgáltam mind a gélből izolált trimer dUTPáz, mind a komplex keresztkötése alatt kialakult DUT-DUT interakciókat (8. táblázat). A gélből izolált trimer dUTPáz decoy score értéke 15.

pont- szám	m/z	z	szekvenciárészlet (1)	szekvenciárészlet (2)	keresztkötött aminosavak <sup>#</sup>	távolság (Å)		típus (14. ábra)
						A-A	A-X	
321 <sup>1</sup>	916.45149	3	20[NHK]22	23[TD...EK]42	K22-T23	4,4	30,2	
210	815.45959	3	43[AVIK]46	47[TD...SR]64	K46-T47	7,4	31,5	
260 <sup>2</sup>	566.98081	3	65[SGVSSK]70	71[TH...GK]79	K70-T71	7,8	25,8	
285	913.9463	4	160[GE...GV]170	20[NH...EK]42	S167-K22	37,8	13,4	
323	1026.0409	4	160[GE...GV]170	134[LA...ER]159	K162-S157	24,7	30,1	
323	1026.0409	4	134[LA...LK]148	149[QV...GV]170	K148-S146	28,2	27,2	
398	1026.0409	4	163[GF...GV]170	134[LA...EK]162	S167-K148	25,0	30,5	
188	960.12132	5	65[SG...GK]79	122[QY...LK]148	S68-K133	16,3	24,3	
143	1045.2982	4	160[GE...GV]170	122[QY...LK]148	K162-Y123	44,5	30,4	

<sup>#</sup> A szekvenciadarabokon belül az a két aminosav feltüntetve, amelyek közé a legnagyobb valószínűséggel épül be a keresztkötő reagens.

<sup>1,2</sup> A táblázatban szereplő adatok a gélből izolált dUTPáz találatokra érvényes. A komplex mintában szereplő adatok az 1) esetén 128 pont; m/z: 916,452; töltés: 3, míg a 2) esetén 166 pont; m/z: 566,981; töltés: 3.

#### 8. táblázat: A gélből izolált keresztkötött trimer dUTPáz-ban azonsítható interakciók

A távolságértékek a keresztkötött aminosavak reaktív csoportjainak távolságait jelölik a 3D szerkezetben. Az A-A jelölés az alegységen belüli, az A-X jelölés pedig az alegységek közötti rövidebb lehetséges kapcsolódást jelöli. A keresztkötő reagens távtartó hosszával összeegyeztethető távolságok vastagítással kiemelve. Dólttel jelölve a flexibilis C-terminális kar által kialakított kölcsönhatások, a távolságértékek itt csak modell alapján becsülhetők. A piros színek az Stl-dUTPáz komplex mintában is megtalálható találatokat jelzi.

A gélből izolált trimer dUTPáz keresztkötő szekvenciáit a keresztkötött komplex minta adatkészletével is összevettem (A mindkét helyen megjelenő találatokat a 8. táblázat pirossal jelölt részei mutatják). Megfigyelhető, hogy számos keresztkötött darab nem található meg a komplex spektrumban, például a flexibilis kar esetében egyik keresztkötött peptid sem fordult elő. Elképzelhető, hogy a komplex mintánál elmaradt kötések az Stl reaktív csoportjaival való kompetíció következtében nem alakultak ki. Azonban az is előfordulhat, hogy az Stl térközelségbe kerülése akadályozza meg az interakciót, azaz ez alapján elképzelhető, hogy a dUTPáz C-terminális szegmense a komplexben kölcsönhatásba lép az Stl fehérjével.

Megvizsgáltam a keresztkötött aminosavak reaktív csoportjainak távolságát a dUTPáz szerkezetben egy alegységen belül (A-A) illetve az alegységek között (A-X), ez utóbbi esetében a rövidebb távolságot vettem figyelembe az eredmények értelmezése során (8. táblázat). Azokban az esetekben, ahol az egyik szekvenciadarab a 3 dimenziós szerkezetben nem ismert flexibilis részből származott, a távolságot  $\Phi 11$  dUTPáz szerkezetéhez illesztett  $80\alpha$  dUTPáz azonos aminosav-sorrendű V. motívumával becsültem, mivel ennek a térbeli elhelyezkedése ismert (PDB ID: 3ZEZ).

Számos esetben a  $\Phi 11$  dUTPáz keresztkötött aminosavai közötti távolság összeegyeztethető a reagens távtartó hosszával (11,8 Å), mivel az ennél rövidebb

keresztkötések a reagens meghajlásával létrejöhetnek, illetve a S68-K133 között mért 16,3 Å távolság a Lys hosszú oldalláncának flexibilitása miatt elfogadható érték. A flexibilis kart tartalmazó keresztkötött hasított darabok között mért nagy távolságértékek a motívum mozgékonyságával magyarázhatók. (Továbbá az sem vethető el, hogy a 80 $\alpha$  dUTPáz-ból illesztett V. motívum nem teljesen felel meg a  $\Phi$ 11 dUTPáz enzim ezen részletének térbeli orientálódásával.)

Összességében a módszer alkalmasnak tekinthető a fehérjék térközelségének megállapítására, mivel a dUTPáz-ra kapott mérési eredményeket összevetve az enzimről meglévő ismeretekkel nem jutottam ellentmondáshoz. Így várhatóan releváns eredmények nyerhetők ki az ismeretlen térszerkezetű Stl és komplex minták esetében is.

Következő lépésként a gélből izolált monomer és dimer Stl MS<sup>2</sup> méréséből származó eredményeket tanulmányoztam. Az ehhez tartozó adatokat a 9. táblázat foglalja össze. Decoy score-nak a monomerhez 62, a dimerhez 67 pontszám adódott. Látható, hogy az Stl C-terminális szegmenséből (150-260-as aminosavak) származó peptidek (a 9. táblázatban dőlttel jelölve) a monomer eredményekben nem, csak a dimer mintában voltak megtalálhatók. Ez a megállapítás felveti annak a lehetőségét, hogy ezek a részletek szerepet játszanak a dimerizációs felszín kialakításában.

Mivel az Stl fehérjének ez idáig *in silico* predikciós technikák segítségével készített modellje létezik, a keresztkötött aminosavak reaktív csoportjainak távolságát ebben a modellben vizsgáltam meg. Ez a jóslott szerkezeti modell eltérhet az Stl valós térszerkezetétől, továbbá a flexibilitásból is adódhatnak hibák, a távtartó karnál nagyobb távolságok (30 Å) is analizálhatók.

Megfigyelhető egy olyan eset is, ahol a modellben mért távolság jóval nagyobb (51,2 Å) a két keresztkötött aminosav között, ez esetben nagyobb a valószínűsége annak, hogy a két peptid (40[LT...ER]48 és 163[QL...TR]183) közötti keresztkötés az alegységek között kialakuló kölcsönhatásából származtatható.

A 9. táblázatban kézzel jelölt sorok a keresztkötött komplex minta spektrumából hiányzó Stl C-terminálisából származó szegmenseket tartalmazza. Ez utalhat arra, hogy ez a szegmens részt vesz a dUTPáz-zal való kölcsönhatásban, ami egybecseng csoportunk korábbi eredményeivel. A fenti feltételezés alapján ez a szegmens szerepet játszik az Stl dimerizációs

felszínének kialakításában, ez megerősítheti az oligomerizáció és a komplexképződés közötti kompetíció jelenlétét (7. ábra).

pont- szám	m/z	z	szekvenciárészlet (1)	szekvenciárészlet (2)	keresztkötött aminosavak <sup>#</sup>	távolság (Å)	típus (14. ábra)
						A-A	

#### MONOMER

476 <sup>1</sup>	872.92478	2	107[FDK]109	96[GY...GK]106	K109-K106	6,8	
81	609.33998	2	45[LSER]48	40[LTQSK]44	S46-K44	11,5	
291	667.11393	4	138[LL...SK]146	94[EK...GK]106	K146-K95	19,9	

#### DIMER

503	751.61566	5	40[LT...ER]48	65[NI...HR]87	K44-K76	18,8	
73	722.58579	5	40[LT...ER]48	163[QL...TR]183	K44-T169	51,2	
345	914.2012	4	96[GY...DK]109	144[ES...LK]159	K109-S145	11,3	
121	589.99405	3	36[KYMK]39	40[LT...ER]48	Y37-K44	17,8	
280	904.49593	3	77[GL...HR]87	65[NI...GK]76	Y83-K76	11,4	
316 <sup>2</sup>	872.92468	2	107[FDK]109	96[GY...GK]106	K109-K106	7,4	
327	667.11391	4	138[LL...SK]146	94[EK...GK]106	S145-K95	22,4	
377	715.37645	3	160[LYK]162	147[IN...LK]159	Y161-K159	7,9	
256	707.36461	3	160[LYK]162	191[EV...EK]203	K162-K203	31,1	
170	572.66455	3	184[KSSDK]188	221[AL...LK]229	S185-K229	22,2	
377	715.37645	3	204[YLK]206	147[IN...LK]159	Y204-K159	27,2	
364	642.3361	4	163[QL...EK]171	172[SI...TR]183	K171-S172	10,8	
537	740.40622	3	221[AL...EK]227	228[LK...EK]238	K227-K229	14,7	
615	740.40622	3	221[AL...LK]229	230[EE...EK]238	K229-K238	18,5	
426	703.35114	3	252[GK...YK]257	258[LY...DR]266	K253-Y259	16,2	

#### CSAK A KOMPLEX KERESZTKÖTÉSNEK LÉTREJÖVŐ STL-STL KÖTÉSEK

252	777.719	3	88[IS...EK]95	96[GY...GK]106	K95-Y97	-	-
248	777.719	3	88[IS...FK]93	94[EK...GK]106	K93-K95		
230	877.421	3	96[GY...GK]106	107[FD...NK]116	K106-K109		

<sup>#</sup> A szekvenciadarabokon belül az a két aminosav feltüntetve, amelyek közé a legnagyobb valószínűséggel épül be a keresztköti reagens.

<sup>1,2</sup> A táblázatban szereplő adatok a gélből izolált Stl találatokra érvényesek. A komplex mintában szereplő pont 361; m/z: 872,926, töltés: 2

#### 9. táblázat: A gélből izolált keresztköti monomer és dimer Stl-ben azonosítható interakciók

Dölt betűvel jelölve a monomerben és a dimerben is megtalálható szekvenciárészletek. Pirossal kiemelve a komplex mintában is annotált keresztköti kötések. Kék betűszínnel szedve a keresztköti komplex minta spektrumából hiányzó Stl C-terminálisából származó szegmensek.

Az Stl és dUTPáz között talált két megfeleltetés, habár a megengedettnél (64) alacsonyabb decoy score-ral rendelkeznek, a kellő számú spektrumban azonosított bomlási termékek és elfogadható spektrumuk alapján elemezhetőnek tekintetem (12. táblázat).



pontszám	m/z	z	szekvenciárészlet (Stl-ből)	szekvenciárészlet (dUTPáz-ből)	keresztkötött aminosavak <sup>#</sup>
41	786.043	3	160[GE...GV]170	40[LT...ER]48	K162-K44
22	708.372	3	160[GE...GV]170	107[FD...NK]116	K162-K109

<sup>#</sup> A szekvenciadarabokon belül az a két aminosav feltüntetve, amelyek közé a legnagyobb valószínűséggel épül be a keresztkötő reagens.

#### 10. táblázat: Stl és dUTPáz között létrejövő keresztkötési lehetőségek

Látható, hogy a két találat a dUTPáz flexibilis részének a keresztkötését mutatja az Stl N- és C-terminálisával is. Korábbi eredmények ezt a lehetőséget alátámasztják, mivel csoportunk kimutatta, hogy a C-terminális mellett az N-terminális is szerepet játszhat a kölcsönhatás kialakulásában (1.5 fejezet) (10 táblázat). Mivel mindkét esetben a dUTPáz flexibilis C-terminális karja köt az Stl-hez elképzelhető, hogy egy monomer Stl két dUTPáz alegységgel is kapcsolatban áll. Nem kizárható azonban, hogy a komplex képződése után továbbra is flexibilis dUTPáz kar mozgását jelzi a kapott két különböző keresztkötési lehetőség.

Összefoglalásként elmondható, hogy a módszerrel nem kaptam a korábbi tapasztalatokkal ellentétes eredményeket, aspecifikus keresztkötött darabokat, melyből következik az eljárás alkalmazásának érvényessége. Sikerült, több lehetséges kölcsönható környezetet felismerni, melyet a modell alapján mért távolságok, illetve az eddig publikált kutatások alátámasztanak. A kiértékelés során azt tapasztaltuk, hogy az oldatban történő emésztés (komplex minta) kevesebb találatot eredményezett a gélben történő tripszines kezeléshez képest. Ezért a jövőbeli kísérleteknél a komplex mintát a jelenleg alkalmazott 3 órás inkubálási idő helyett 18 órán át tervezem végrehajtani. Továbbá a mérésvezető dr. Ozohanics Olivér az MS mérés során nagyobb ütközési energiát tervez beállítani, hogy a szekvenciárészlet MS<sup>2</sup> fragmentumjainak száma növekedjen. A módszer teljes optimalizálásával valószínűleg tovább növelhetjük az eredményekből levonható következtetések megbízhatóságát és a fenti hipotéziseket állításként fogalmazhatjuk meg.

## 5. Összefoglalás

Távlati céljaim között szerepel a *Staphylococcus aureus* patogenicitási szigetek kifejeződését szabályozó represszor (Stl) és derepresszor (dUTPáz) fehérjék kölcsönhatási felszínének feltérképezése. Munkám során több megközelítésből kiindulva szerettem volna közelebb kerülni ezen fehérjék kölcsönható felszíneiknek megismeréséhez.

A dUTPáz egyes konzervált motívumainak szerepét deléciós mutánsok szerkezetanalízisével szerettem volna tanulmányozni. Ehhez a kristályképződéshez megfelelő oldatösszetételek felderítését követően, a röntgendiffrakciós méréshez szükséges mikrokristályokat előállítottam. A képződött kristályokat tájékozódó mérésnek vetettük alá, ahol megbizonyosodtunk arról, hogy valóban fehérjéket tartalmaznak. A dLoop mutáns esetében egy teljes adatkészletet is rögzítettünk, melynek szerkezetfejtése folyamatban van, emellett több ígéretes diffrakciós képet mutató kristályt további mérések céljából folyékony nitrogénben tároltunk el.

Továbbá az Stl N-terminális szegmensének dUTPázzal való kölcsönhatásában játszott szerepét egy beépített triptofán szenzor fluoreszcencia változásának nyomonkövetésével szerettem volna vizsgálni. A triptofán mutációt tartalmazó Stl fehérjével elvégzett kísérletek eredményei – a DNS kötés elmaradása, valamint a nem jelentős mennyiségű komplex képződése – alapján lehetséges, hogy a pontmutáció olyan helyen került kialakításra, ami a fehérjeinterakcióhoz nélkülözhetetlen egységeket tartalmazza, azonban az sem kizárható, hogy a pontmutáció az Stl fehérje feltekeredését zavarta.

Emellett megkezdtem egy olyan keresztkötésen alapuló kísérletsorozatot, amely tömegspektrometriai értékeléssel összekötve segítheti az Stl fehérje oligomerizációban résztvevő, illetve a dUTPáz enzimmel kölcsönható felszínének azonosítását. A protokoll optimalizálása során sikerült előállítanom a keresztkötött homooligomer dimer Stl-t, valamint a trimer dUTPáz-t. Összességében a kísérlet alkalmasnak tekinthető a fehérjék térközelségben lévő aminosavainak azonosítására, mivel a módszer helyességét ellenőrző annotált dUTPáz-dUTPáz interakciók nem mondtak ellent az enzimről meglévő tudásunkkal. Az Stl keresztkötéséből származtatott eredmények megerősítik a fehérje C-terminálisának szerepét a dUTPáz kötődésben. Továbbá sikerült az Stl mintában olyan keresztkötött aminosavpárt találni, melyek a predikciós modellben mért távolság alapján származhatnak a még nem ismert dimerizációs felszínről. A komplex kölcsönhatási felszín detektálására tett kísérlet

mérési eredményeiből előállt két találat, amely a dUTPáz flexibilis részének a keresztkötését mutatja az Stl N- illetve C-terminális szegmensével.

A dolgozatomban szereplő nyitott kérdéseket a jövőben további kísérletek alapján szeretném megválaszolni. A későbbiekben megpróbálkozom majd az Stl szekvencia más részére helyezett triptofán szenzort tartalmazó fehérjét is vizsgálni, hogy a vad típushoz hasonló viselkedést nyomon tudjam követni. Továbbá meg fogom ismételni a keresztkötési kísérleteket a tapasztalataink alapján módosított paraméterekkel. A módszer részlépéseinek finomhangolásával várhatóan nagyobb számú megbízhatóan annotált szekvenciadarab kinyerése válik lehetővé. Emellett a dLoop mutáns szerkezetfejtése, illetve a lefagyasztott kristályok mérése is terveim között szerepel.

## 6. Summary

In this study we have investigated the interacting structural elements of proteins regulating of a specific *Staphylococcus aureus* pathogenicity island, namely Stl and a phage-related dUTPase. Replication of the pathogenicity islands is repressed by the Stl protein, which is bound to DNA, dUTPase acts as a derepressor and disrupts this Stl-DNA interaction through complex formation with Stl.

Our aim was to identify the binding surfaces between Stl and dUTPase proteins and structural elements, which are involved in the regulation of the patogenicity island. Based on this knowledge, the spread of the virulence factors carried by mobile genetic elements among the different *Staphylococcal* strains may be interfered.

Towards this end our group created several mutant dUTPase protein constructs, in which some of the structural motifs had been deleted. One of these does not contain the phage specific flexible insert (dLoop), while the other construct lacks the fifth conserved dUTPase motif, which is in the C-terminal of the wild type protein (dArm). According to our earlier studies, both of these mutant dUTPase proteins bind to the Stl, however the dLoop mutant, in contrast to the dArm, did not show similar derepression activity compared to the wild-type protein. To explain the experienced difference we set out to determine the 3D structure of these mutant proteins. Several crystallization plates were set up with various conditions, and then the first hits were optimized to obtain macroscopic protein crystals. X-ray diffraction pattern of some of these crystals have been recorded and some of those will also be measured at a synchrotron facility.

We also tried to explore the Stl-dUTPase interaction with a tryptophan sensor, which has been built in within the Stl protein with site-directed mutagenesis. Based on our experimental results, the mutant protein was defective in both dUTPase and DNA binding. Thus we concluded that the position of the sensor have to be fine-tuned.

In addition, interaction surface of the protein-protein complex was investigated by applying chemical crosslinking. This method may provide information about which residues are situated at the dimerization surface of Stl and at the interface of the protein complex. In case of the individual proteins the crosslinking reaction resulted covalently bound dimer Stl and trimer dUTPase, latter was used as a control since the structure of dUTPase is already

known. When the crosslinker was added to the mixture of the two proteins covalently linked complex product was formed. The crosslinked proteins were digested with trypsin, and the resulting peptides were analyzed by mass spectrometry. Based on the spectrum we were able to identify residues that are spatially close to each other in the Stl-dimer and in the Stl-dUTPase complex.

## 7. Irodalomjegyzék

1. Vértessy BG, Tóth J. Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc Chem Res.* 2009;42: 97–106. doi:10.1021/ar800114w
2. Langerak P, Russell P. Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2011;366: 3562–3571. doi:10.1098/rstb.2011.0070
3. Rouse J, Jackson SP. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science.* 2002;297: 547–551. doi:10.1126/science.1074740
4. Pearl LH, Savva R. The problem with pyrimidines. *Nat Struct Biol.* 1996;3: 485–487. doi:10.1038/nsb0696-485
5. Krokan HE, Drabløs F, Slupphaug G. Uracil in DNA--occurrence, consequences and repair. *Oncogene.* 2002;21: 8935–8948. doi:10.1038/sj.onc.1205996
6. Tye BK, Lehman IR. Excision repair of uracil incorporated in DNA as a result of a defect in dUTPase. *J Mol Biol.* 1977;117: 293–306. doi:10.1016/0022-2836(77)90128-0
7. Muha V, Horváth A, Békési A, Pukáncsik M, Hodoscsek B, Merényi G, et al. Uracil-containing DNA in *Drosophila*: Stability, stage-specific accumulation, and developmental involvement. *PLoS Genet.* 2012;8. doi:10.1371/journal.pgen.1002738
8. El-Hajj HH, Zhang H, Weiss B. Lethality of a dut (deoxyuridine triphosphatase) mutation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1988;170: 1069–1075.
9. Dengg M, Garcia-Muse T, Gill SG, Ashcroft N, Boulton SJ, Nilsen H. Abrogation of the CLK-2 checkpoint leads to tolerance to base-excision repair intermediates. *EMBO Rep.* 2006;7: 1046–1051. doi:10.1038/sj.embor.7400782
10. Lari SU, Chen CY, Vértessy BG, Morré J, Bennett SE. Quantitative determination of uracil residues in *Escherichia coli* DNA: Contribution of ung, dug, and dut genes to uracil avoidance. *DNA Repair (Amst).* 2006;5: 1407–1420. doi:10.1016/j.dnarep.2006.06.009
11. Guillet M, Van Der Kemp PA, Boiteux S. dUTPase activity is critical to maintain genetic stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 2006;34: 2056–2066. doi:10.1093/nar/gkl139
12. Gadsden MH, McIntosh EM, Game JC, Wilson PJ, Haynes RH. dUTP pyrophosphatase is an essential enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 1993;12: 4425–4431.

13. Szabó JE, Németh V, Papp-Kádár V, Nyíri K, Leveles I, Bendes AÁ, et al. Highly potent dUTPase inhibition by a bacterial repressor protein reveals a novel mechanism for gene expression control. *Nucleic Acids Res.* 2014;42: 11912–20. doi:10.1093/nar/gku882
14. Wang H, Hsu K, Yang J, Wu M, Ko T, Lin S, et al. *Staphylococcus aureus* protein SAUGI acts as a uracil-DNA glycosylase inhibitor. 2014;42: 1354–1364. doi:10.1093/nar/gkt964
15. Kerepesi C, Szabó JE, Grolmusz V, Vértessy BG. Life without dUTPase. <http://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/1509/150904850.pdf>. 2015;
16. Békési A, Zagyva I, Hunyadi-Gulyás É, Pongrácz V, Kovári J, Nagy Á, et al. Developmental regulation of dUTPase in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem.* 2004;279: 22362–22370. doi:10.1074/jbc.M313647200
17. Peters GJ. Therapeutic potential of TAS-102 in the treatment of gastrointestinal malignancies. *Ther Adv Med Oncol.* 2015; doi:10.1177/1758834015603313
18. Saito K, Nagashima H, Noguchi K. First - in - human, phase I dose - escalation study of single and multiple doses of a first - in - class enhancer of fluoropyrimidines, a dUTPase inhibitor (TAS - 114) in healthy male volunteers. 2014; 577–583. doi:10.1007/s00280-014-2383-2
19. Kiyonari S, Iimori M, Matsuoka K, Watanabe S, Morikawa-Ichinose T, Miura D, et al. The 1,2-diaminocyclohexane carrier ligand in oxaliplatin induces p53-dependent transcriptional repression of factors involved in thymidylate biosynthesis. *Mol Cancer Ther.* 2015; doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0748
20. Durandy A. Activation-induced cytidine deaminase: A dual role in class-switch recombination and somatic hypermutation. *European Journal of Immunology.* 2003. pp. 2069–2073. doi:10.1002/eji.200324133
21. Larsson G, Svensson LA, Nyman PO. Crystal structure of the *Escherichia coli* dUTPase in complex with a substrate analogue (dUDP). *Nat Struct Biol.* 1996;3: 532–538. doi:10.1038/nsb0696-532
22. Mol CD, Harris JM, McIntosh EM, Tainer JA. Human dUTP pyrophosphatase: Uracil recognition by a beta hairpin and active sites formed by three separate subunits. *Structure.* 1996;4: 1077–1092. doi:10.1016/S0969-2126(96)00114-1
23. Dauter Z, Persson R, Rosengren AM, Nyman PO, Wilson KS, Cedergren-Zeppezauer ES. Crystal structure of dUTPase from equine infectious anaemia virus; active site metal binding in a substrate analogue complex. *J Mol Biol.* 1999;285: 655–673. doi:10.1006/jmbi.1998.2332
24. Takács E, Barabás O, Petoukhov M V., Svergun DI, Vértessy BG. Molecular shape and prominent role of  $\beta$ -strand swapping in organization of dUTPase oligomers. *FEBS Lett.* 2009;583: 865–871. doi:10.1016/j.febslet.2009.02.011

25. Penadés JR, Donderis J, García-Caballer M, Tormo-Más MÁ, Marina A. DUTPases, the unexplored family of signalling molecules. *Curr Opin Microbiol.* 2013;16: 163–170. doi:10.1016/j.mib.2013.02.005
26. Mustafi D, Bekesi A, Vertessy BG, Makinen MW. Catalytic and structural role of the metal ion in dUTP pyrophosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100: 5670–5675. doi:10.1073/pnas.1031504100
27. Nagy GN, Leveles I, Vértessy BG. Preventive DNA repair by sanitizing the cellular (deoxy)nucleoside triphosphate pool. *FEBS J.* 2014;281: 4207–4223. doi:10.1111/febs.12941
28. Persson R, Cedergren-Zeppezauer ES, Wilson KS. Homotrimeric dUTPases; structural solutions for specific recognition and hydrolysis of dUTP. *Curr Protein Pept Sci.* 2001;2: 287–300. doi:10.2174/1389203013381035
29. Lindsay JA, Holden MTG. *Staphylococcus aureus*: Superbug, super genome? *Trends Microbiol.* 2004;12: 378–385. doi:10.1016/j.tim.2004.06.004
30. Tormo-Más MÁ, Mir-Sanchis I, Shrestha A, Tallent SM, Campoy S, Lasa Í, et al. Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands. *Nature.* 2010;465: 779–782. doi:10.1038/nature09065
31. Mir-Sanchis I, Martínez-Rubio R, Martí M, Chen J, Lasa Í, Novick RP, et al. Control of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island excision. *Mol Microbiol.* 2012;85: 833–845. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08145.x
32. Novick RP, Christie GE, Penadés JR. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8: 541–551. doi:10.1038/nrmicro2393
33. Ram G, Chen J, Ross HF, Novick RP. Precisely modulated pathogenicity island interference with late phage gene transcription. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111: 14536–14541. doi:10.1073/pnas.1406749111
34. Tormo-Más MÁ, Donderis J, García-Caballer M, Alt A, Mir-Sanchis I, Marina A, et al. Phage dUTPases Control Transfer of Virulence Genes by a Proto-Oncogenic G Protein-like Mechanism. *Mol Cell.* 2013;49: 947–958. doi:10.1016/j.molcel.2012.12.013
35. Kinga Nyíri, Veronika Papp-Kádár, Judit E. Szabó, Veronika Németh BGV. Exploring the role of the phage-specific insert of bacteriophage  $\Phi$ 11 dUTPase. *Struct Chem.* 2015; doi:10.1007/s11224-015-0652-2
36. Muha V, Zagyva I, Venkei Z, Szabad J, Vértessy BG. Nuclear localization signal-dependent and -independent movements of *Drosophila melanogaster* dUTPase isoforms during nuclear cleavage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;381: 271–275. doi:10.1016/j.bbrc.2009.02.036



37. Merényi G, Kónya E, Vértessy BG. *Drosophila* proteins involved in metabolism of uracil-DNA possess different types of nuclear localization signals. *FEBS J.* 2010;277: 2142–2156. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07630.x
38. Kovári J, Barabás O, Takács E, Békési A, Dubrovay Z, Pongrácz V, et al. Altered active site flexibility and a structural metal-binding site in eukaryotic dUTPase: Kinetic characterization, folding, and crystallographic studies of the homotrimeric *Drosophila* enzyme. *J Biol Chem.* 2004;279: 17932–17944. doi:10.1074/jbc.M313643200
39. Németh-Pongrácz V, Barabás O, Fuxreiter M, Simon I, Pichová I, Rumlová M, et al. Flexible segments modulate co-folding of dUTPase and nucleocapsid proteins. *Nucleic Acids Res.* 2007;35: 495–505. doi:10.1093/nar/gkl1074
40. Pecsí I, Hirmondo R, Brown AC, Lopata A, Parish T, Vertessy BG, et al. The dUTPase enzyme is essential in *Mycobacterium smegmatis*. *PLoS One.* 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0037461
41. Whittingham JL, Leal I, Nguyen C, Kasinathan G, Bell E, Jones AF, et al. dUTPase as a platform for antimalarial drug design: Structural basis for the selectivity of a class of nucleoside inhibitors. *Structure.* 2005;13: 329–338. doi:10.1016/j.str.2004.11.015
42. Brocchieri L. Low-complexity regions in *Plasmodium* proteins: In search of a function. *Genome Res.* 2001;11: 195–197. doi:10.1101/gr.176401
43. Leveles I, Németh V, Szabó JE, Harmat V, Nyíri K, Bendes ÁÁ, et al. Structure and enzymatic mechanism of a moonlighting dUTPase. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr.* 2013;69: 2298–2308. doi:10.1107/S0907444913021136
44. Nyíri K, Kőhegyi B, Micsonai A, Kardos J, Vertessy BG. Evidence-based structural model of the *Staphylococcal* repressor protein: separation of functions into different domains. *PLoS One.* 2015; doi:10.1371/journal.pone.0139086
45. Harmat, Veronika; Bényei A. Röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat, Egyetemi jegyzet Available: <http://harmatv.web.elte.hu/Rontgendiffrakcio-jegyzet/Rontgendiffrakc-szerk-vizsg.pdf>
46. Fogg MJ, Pearl LH, Connolly BA. letters Structural basis for uracil recognition by archaeal family B DNA polymerases. 2002;9. doi:10.1038/nsb867

## 8. Függelék

### 8.1. Poliakrilamid gelek összetétele

#### Egy fázisú 12%-os poliakrilamid gél

dH <sub>2</sub> O	4,5 ml
TBE (10X)	0,75 ml
40% akrilamid	2,25 ml
10% APS	50 µl
TEMED	5 µl

TBE 10X: 890 mM Tris bázis, 890 mM borát, 20 mM Na<sub>4</sub>EDTA

#### Natív poliakrilamid gél:

elválasztó gél		tömörítő gél	
dH <sub>2</sub> O	2,75 ml	dH <sub>2</sub> O	1,63 ml
elválasztó puffer	1,25 ml	tömörítő puffer	0,625 ml
40% akrilamid	1 ml	40% akrilamid	0,25 ml
10% APS	50 µl	10% APS	25 µl
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl

Elválasztó puffer: 375 mM Tris/HCl, pH = 8,8

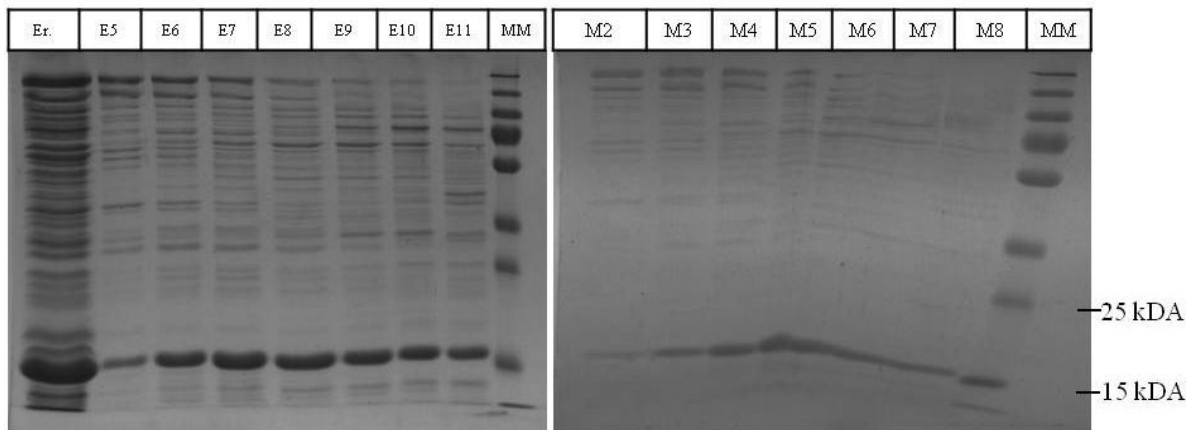
Tömörítő puffer: 125 mM TRIS/HCl pH = 6,8

#### 12 %-os SDS poliakrilamid gél

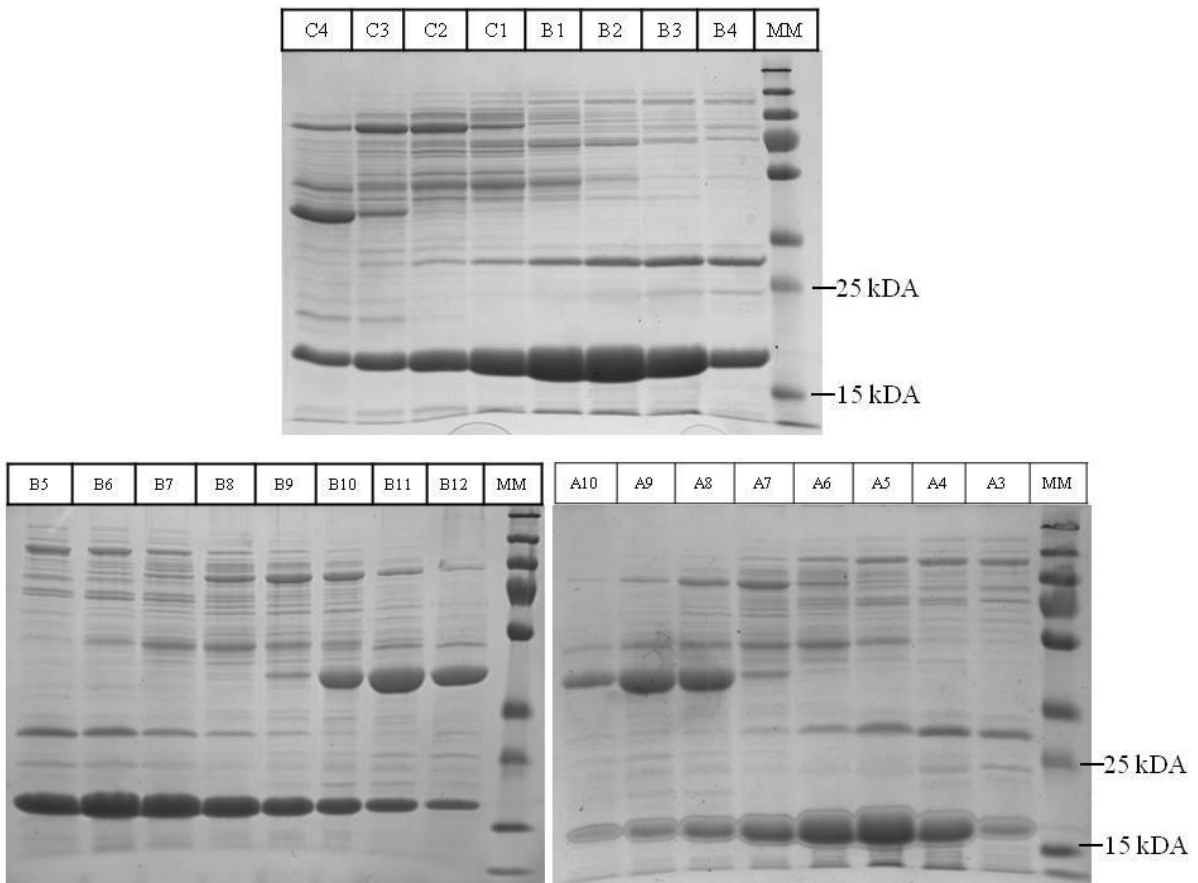
elválasztó gél		tömörítő gél	
dH <sub>2</sub> O	2,2 ml	dH <sub>2</sub> O	1,61 ml
elválasztó puffer	1,25 ml	tömörítő puffer	0,625 ml
10% SDS	50 µl	10 % SDS	25 µl
40% akrilamid	1,5 ml	40% akrilamid	0,245 ml
10% APS	25 µl	10% APS	12,5 µl
TEMED	2,5 µl	TEMED	2,5 µl

Elválasztó puffer: 375 mM Tris/HCl, pH = 8,8

## 8.2. Méretkizárásos kromatográfiás tisztítás gélképei

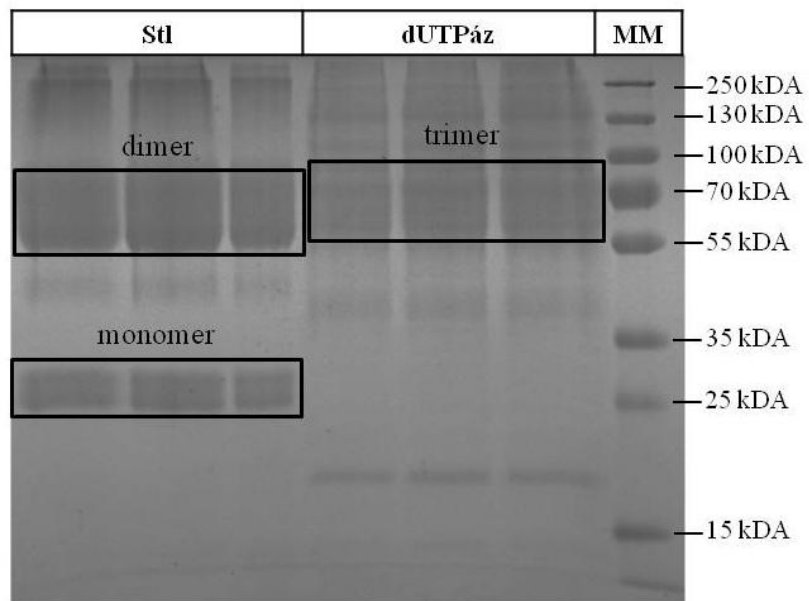


**35. ábra: dKar dUTPáz fehérje géliszűrés során szedett frakciók SDS gélképe**  
jelölésmagyarázat: Er: Eredeti minta; E5-E11, M2-M8: szedett frakciók; MM: Mintamarker



**36. ábra: dUTPáz fehérje géliszűrés során szedett frakciók SDS gélképe**  
jelölésmagyarázat: C4-B4, B5-B12, A10-A3: szedett frakciók; MM: Mintamarker

### 8.3. Keresztkötési kísérletek gélképe



37. ábra: A tömegspektroszkópiával mért izolált Stl és dUTPáz gélképe  
Bekeretezve a kivágott komponensek.

## 8.4. Fehérje szekvenciák

Az alábbi táblázatban a dolgozatban használt fehérjék szekvenciáját és az ez alapján az ExPasy Protparammal (<http://web.expasy.org/protparam/>) számított moláris tömegét, valamint a becült extinkciós koefficienseket gyűjtöttem össze.

Fehérje neve	Szekvencia	MW (kDa)	Extinkciós koefficiens ( $\text{g}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$ )
$\Phi 11$ dUTPáz vad típus	MTNTLQVRLLENARMPELNHKTDAGYDIFSAETVVLEPQEKAVIKTDVAVSIPEGYVGLLTSRSGVSSKTHLV IETGKIDAGYHGNLGINIKNDAIASNGYITPGVFDIKGEIDLSDAIRQYGTQINEGDKLAQLVIVPIWTPELK QVEEFESVSE RGEKGFSSGV	18,37	0,786
$\Phi 11$ dUTPáz dKar	MTNTLQVRLLENARMPELNHKTDAGYDIFSAETVVLEPQEKAVIKTDVAVSIPEGYVGLLTSRSGVSSKTHLV IETGKIDAGYHGNLGINIKNDAIASNGYITPGVFDIKGEIDLSDAIRQYGTQINEGDKLAQLVIVPIWTPELK QVEEFESVS	17,18	0,841
$\Phi 11$ dUTPáz dLoop	MTNTLQVRLLENARMPELNHKTDAGYDIFSAETVVLEPQEKAVIKTDVAVSIPEGYVGLLTSRSGVSSKTHLV IETGKIDAGYHGNLGINIKNDAIASNGYITPGVFDIKGEIDLSDAIRQYGTQINEGDKLAQLVIVPIWTPELKQVEEFESVSE RGEKGFSSGV	15,98	0,810
StI	MEGAGQMAELPHTYGTIIKTLRKYMKLTQSKLSERTGFSQNTISNHENGRNIGVNEIEIYGKGLGIPSYILHR ISDEFKEKGYSPTLNDFGKFDKMSYVKNKAYNDGDIYSSYDLYDETIKLELLKESKINVNDIDYDYLKLY KQILSTDTEKSIINYEYTLANTRKSSDKKREVTIEEIGEFHEKYLKLLFTNLETHNDRKKALAEIEKLKEESIYL GEKLRVLPNHHYDAIKGKPMYKLYLYEYPDRLEHQKKIILEKDTN	31,41	1,138
StI <sup>Y61W</sup>	MEGAGQMAELPHTYGTIIKTLRKYMKLTQSKLSERTGFSQNTISNHENGRNIGVNEIEIYGKGLGIPSYILHR ISDEFKEKGYSPTLNDFGKFDKMSYVKNKAYNDGDIYSSYDLYDETIKLELLKESKINVNDIDYDYLKLY KQILSTDTEKSIINYEYTLANTRKSSDKKREVTIEEIGEFHEKYLKLLFTNLETHNDRKKALAEIEKLKEESIYL GEKLRVLPNHHYDAIKGKPMYKLYLYEYPDRLEHQKKIILEKDTN	31,43	1,265

### F1. táblázat

#### Jelölésjegyzék:

Sárgával színezve az öt konzervált motívum (A motívumok számozása a szekvencia helyének megfelelően.)  
Késsel kiemelve a fág specifikus inszert, azon belül aláhúzva a dLoop dUTPáz mutánsnál kivágott szekvenciareészlet.  
Szürkével jelölve az StI fehérje N-terminális része. Zöld háttérrel mutatva a pontmutáció helye.