

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

Matejka Judit

## *Bevezetés*

Kutatómunkám fókuszában a DNS-beli uracil feltérképezése, illetve a sejt-béli uracil szintjét szabályzó dUTPáz enzim működése, biológiai szerepe, valamint fehérje típusú kölcsönható partnerével kialakított interakció tanulmányozása áll.

Egy fág eredetű dUTPáz enzim esetében a közelmúltban kimutatták, hogy a *Staphylococcus aureus* patogenicitási 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. Ezen kölcsönhatás mechanizmusának vizsgálata kiindulópontot jelenthet a toxinokat és rezisztenciát kódoló patogenicitási szigetek terjedésének megakadályozásához, illetve a genomi integritás megőrzésében eszenciális szerepet játszó dUTPáz új fehérje típusú inhibitorainak fejlesztéséhez. Ehhez azonban elengedhetetlen a fehérje-partnerek kölcsönható felszíneinek pontos feltérképezése. Így kísérletet tettem az egyes fehérjék olyan mutánsainak vizsgálatára, melyek az eddigi irodalmi adatok fényében valószínűsíthető módon lényegi új információt szolgáltatnak. Továbbá megkezdtem egy olyan keresztkötésen alapuló kísérletsorozatot, amely tömegspektrometriai értékeléssel összekötte segítheti a kölcsönható felszín azonosítását.

## *1. Irodalmi áttekintés*

### *1.1. A dUTPáz enzim biológiai szerepe*

Minden élő szervezet számára eszenciális a genomi integritás fenntartása. Ennek érdekében a sejt-béli nukleotidszintek szigorúan szabályozottak és különböző

javító mechanizmusok alakultak ki, melyek a DNS károsodás felismerésében, javításában, illetve megelőzésében egyaránt szerepet játszanak.<sup>1</sup>

Különösen fontos a dUTP/dTTP arány pontos beállítása, ugyanis legtöbb DNS polimeráz nem képes különbséget tenni a mindössze egy metilcsoportban 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.<sup>1,2</sup> 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.<sup>2</sup>

A dUTPáz enzim preventíven gátolja a hibás bázisok beépülését úgy, hogy a dUTP/dTTP szintet alacsonyan tartja. 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. A dUTPáz enzimaktivitás eszenciális azoknál a fajoknál, ahol a timin bázis felépüléséhez szükséges dUMP csak ezen a metabolikus útvonalon keletkezik.<sup>1</sup>

A DNS-be került uracil az UDG enzimes család segítségével kivágásra kerül, 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 kettősszálú kromoszómátöréshez vezethet.<sup>3,4</sup> Feltehetően ezen okból a *dut* gén által kódolt dUTPáz funkciójának kiesését számos fajban letálisnak találták.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> VÉRTÉSSY 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.

<sup>2</sup> PEARL LH, SAVVA R, The problem with pyrimidines, *Nat Struct Biol.* 1996;3: 485–487. doi:10.1038/nsb0696-485.

<sup>3</sup> VÉRTÉSSY, 2009;42: 97–106.

<sup>4</sup> PEARL, 1996;3: 485–487.

Az orvostudomány ezt a számos élőlény sejtjei számára eszenciális dUTPáz enzimfehérjét tumorterápiás célpontként alkalmazza.<sup>5</sup>

## 1.2. A trimer dUTPáz-ok szerkezeti jellemzői

A különböző élőlényekből származó dUTPáz-ok eltérő alegység számmal rendelkeznek, leggyakoribb formája három azonos alegység kapcsolódásával jön létre. A homotrimer dUTPáz három, szimmetrikus aktív hellyel rendelkezik, melyek az alegységek öt evolúciósan konzervált motívumából épülnek fel. A trimer dUTPáz-ok esetén a III. motívumban helyet foglaló  $\beta$ hajtókanyar biztosítja az enzim specificitását. Sztérikusán gátolja az adenin-, guanin- és timinnukleotid bázisok, valamint a ribóz bekötődését. Emellett a DNS bázispárosodáshoz hasonlóan hidrogénkötések alakulnak ki a fehérjeatomok és az uracil között, mely által az uracil jelentősen nagyobb affinitással tud bekötődni szubsztrátként a citozinnal ellentétben. A dezoxiribóz és ribóz közti szelektivitást a  $\beta$ -hajtókanyar alján helyet foglaló tirozin látja el. A dUTP foszfát csoportjával az I., II. és IV. motívumokban lévő aminosavak hatnak kölcsön, továbbá az I. motívumban szereplő aszpartát pozicionálja a katalitikus vízmolekulát.<sup>3</sup> A  $Mg^{2+}$  kofaktor és egy arginin aminosav oldallánca által koordinált dUTP ligand a hidrolízist elősegítő „feszített” konformációt vesz fel. A harmadik alegység C-terminálisán található V. motívum aromás oldalláncú fenilalanin-aminosavja az aktív centrumot szubsztrát kötött állapotban lefedi, ezáltal megteremtve a szükséges mikrokörnyezetet.<sup>3,6,7</sup>

## 1.3. A dUTPáz mint molekuláris kapcsoló

A *Staphylococcus aureus* opportunista patogén számos kórházi (nosocomialis) 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

---

<sup>5</sup> PETERS GJ, Therapeutic potential of TAS-102 in the treatment of gastrointestinal malignancies, *Ther Adv Med Oncol*, 2015; doi:10.1177/1758834015603313.

<sup>6</sup> MOL CD, HARRIS JM, McINTOSH EM, TAINER JA, Human dUTPpyrophosphatase: 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.

<sup>7</sup> 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.

szuperantigéneket, toxinokat kódolhatnak, melyek toxikus sokkszindrómát, ételmérgezést váltanak ki.<sup>8</sup>

A patogenicitási szigetek életciklus-szabályozó represszora az S<sub>tl</sub> protein, amely a SaPI DNS-hez kötődve gátolja meg ezen mobilis genetikai elemek kifejeződését. Helperfág fertőzés hatására megszűnik az S<sub>tl</sub> represszió, indukálódik a SaPI génszakasz kivágódása és replikációja.<sup>9</sup> Egyes elméletek szerint a gazdasejtnek a patogenicitási szigetek jelenléte kifejezetten hasznos a *Staphylococcus aureus*-ban, mert ezek akadályozzák bizonyos fágok növekedését és terjedését.<sup>10</sup>

A SaPI<sub>bov1</sub> esetében a derepressziót a Φ11 helperfág *dut* génje által kódolt dUTPáz valósítja meg. Így ez a dUTPáz fehérje nemcsak enzimatikus funkcióját látja el, hanem egy másodlagos (*moonlighting*) funkcióval is rendelkezik. A két fehérje kölcsönhatását kimutatva igazolták, hogy derepresszió során a dUTPáz komplexet képez az S<sub>tl</sub>-lel, így eltávolítva azt a DNS-ről.<sup>9</sup> A képződött komplex nem csak az S<sub>tl</sub> represszáló funkcióját, hanem a dUTPáz enzim aktivitását is gátolja, mivel a kialakult komplex nem hidrolizálja a hozzáadott dUTP szubszt-rátot.<sup>11</sup> A kialakult komplex sztöchiometriája natív tömegspektroszkópiás eredmények alapján egy trimer dUTPáz és két S<sub>tl</sub> molekula kölcsönhatásából áll, ahol az S<sub>tl</sub> molekula lehet két monomer vagy egy dimer.<sup>11,12</sup>

#### 1.4. Fajspecifikus szegmensek

A különböző fajokból származó dUTPáz-ok jó része az öt konzervált motívum mellett specifikus szegmensekkel is rendelkezik. A *Staphylococcus aureus*-t fertőző Φ11 dUTPáz fehérje a III. és IV. konzervált motívum között elhelyezkedő, 30–40 aminosavból álló inszerttel rendelkezik.<sup>12</sup> Egyes kísérletek szerint ennek

<sup>8</sup> LINDSAY JA, HOLDEN MTG, *Staphylococcus aureus*: Superbug, super genome?, *Trends Microbiol*, 2004;12: 378–385. doi:10.1016/j.tim.2004.06.004.

<sup>9</sup> 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.

<sup>10</sup> 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.

<sup>11</sup> 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.

<sup>12</sup> NYÍRI K, PAPP-KÁDÁR V, SZABÓ JE, NÉMETH V, VÉRTÉSSY BG, Exploring the role of the phage-specific insert of bacteriophage Φ11 dUTPase, *Struct Chem*, 2015; doi:10.1007/s11224-015-0652-2.

az inszertnek mind az enzimaktivitásában, mind a SaPIDerepresszálásában 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.<sup>13,14</sup> Vizsgálva a  $\Phi 11DUT^{F108W}$  mutáns enzim aktivitását, ahol a specifikus inszert fenilalaninját fluorofór triptofánra cserélték, nem volt detektálható fluoreszcencia változás a nukleotidszubsztrát bekötődésekor, ami bizonyítja, hogy az inszertnek nincs hatása a fehérje aktivitására. A fág specifikus inszertszerepét az StI-lel való kölcsönhatásban a  $\Phi 11DUT^{\Delta 101G122Q}$  deléciós mutánsal is vizsgálták. Az inszert első hat aminosava nem került kivágásra, ez biztosította az összekötő linker régiót, így a deléció feltehetőleg nem okozott problémát a fehérje feltekeredésében.<sup>13,15</sup> A mutáns a vad típushoz hasonló komplexképződési jelleget mutatott az StI-lel, azonban a derepressziós aktivitása elmaradt, mivel az StI-DNS komplexet, a vad típusal ellentétben, nem tudta felbontani.

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, annak reményében, hogy a fehérje kristályosításával és a kristályok röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálatával magyarázatot találunk a tapasztalt különbségre.

## 1.5. Az StI fehérje szerkezete

Az StI fehérje többségében  $\alpha$ -hélix másodlagos szerkezetet vesz fel. Homológia modellezésekből feltételezhető, hogy az StI két, funkcióban is elkülönült részből áll: N-terminálisból és C-terminálisból. Az N-terminális részen található az úgynevezett hélix-turn-hélix (HTH) motívum, melynek feltehetően a DNS-kötődésben van szerepe. A C-terminális StI fehérjében betöltött szerepét több 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.<sup>16</sup>

---

<sup>13</sup> NYÍRI, 2015.

<sup>14</sup> TORMO-MÁS, 2010;465: 779-782.

<sup>15</sup> 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.

<sup>16</sup> NYÍRI K, KÓHEGYI B, MICSONAI A, KARDOS J, VERTESSY BG, Evidence-based structural model

## 2. Módszerek

### 2.1. Fehérjék előállítás és termelése

Ahhoz, hogy a szükséges fehérjét tanulmányozzam, először elő kellett állítani, majd baktérium típusú expressziós rendszerben termeltetni, majd ezekből a sejtekből feltárni.

#### 2.1.1. Transzformálás

A számomra szükséges fehérje géneit tartalmazó plazmidokat kompetens *E. coli* XL1 Blue sejtekbe transzformáltam. A kompetens sejtek képesek az extracelluláris DNS felvételére, mivel a hozzáadott  $\text{Ca}^{2+}$  ionok leárnnyékolják a membrán töltését, így a negatív töltésű plazmid DNS bejuthat a sejt intracelluláris terébe. A transzformálást hő sokk alkalmazásával végeztem, melynek lényege, hogy a hőmérséklet változtatásával a sejtek membránszerkezetét a plazmid számára átjárhatóvá válik.

#### 2.1.2. Fehérjeexpresszió

A fehérjét kódoló plazmidot tartalmazó *E. coli* BL21 Rozetta-sejtek felszapóritásakor a sejtek exponenciális növekedési szakaszában, amelyet a kultúra optikai denzitásának vizsgálatával állapítottam meg, izopropil- $\beta$ -1 tiogalaktozid (IPTG) indukálószer hozzáadásával serkentettem a kívánt fehérje kifejeződését a plazmidról. Az adott idejű expresszió lejártá után a sejt pelletet összegyűjtöttem, a feltárás kezdetéig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltam.

#### 2.1.3. Sejtfeltárás

Az expresszált fehérjék kinyeréséhez a termelő baktériumot fizikai és kémiai roncsolásnak vettem alá. A feltárás során a fehérje védelmének érdekében a baktériumból felszabaduló fehérje emésztőenzimeket gátló proteázgátló tablettát használtam. Először Potter–Elvehjem-homogenizátorban mechanikailag roncsoltam a baktériumok sejt falát, majd a lízis elősegítésére az elegyet szonikáltam. A preparátum lecentrifugálása után a számomra értékes fehérje a felülúszóban maradt.

## 2.2. Fehérjetisztítási módszerek

A feltárás utáni fehérjeoldat az értékes fehérje mellett a termelő baktérium összes fehérjéjét tartalmazta; a kísérletek valid elvégzéséhez elengedhetetlen volt, hogy kellő tisztaságú fehérjeoldatokat alkalmazzak.

### 2.2.1. Affinitás kromatográfia

Az S<sub>16</sub> fehérjét egy lépésben, affinitás kromatográfiás módszerrel tisztítottam meg. Az alkalmazott eljárás azon az elven alapul, hogy az S<sub>16</sub>-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 (trombin) 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.

### 2.2.2. 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 fázistöltéssel rendelkező csoportjainak kölcsönhatásán alapszik, amely kölcsönhatást az ionerősség változtatásával bontottunk meg.

### 2.2.3. Méretkizárásos kromatográfia

Az előzetesen ioncserés kromatográfiával megtisztított dUTPáz enzimet ÄKTA rendszerbe kötött, méretkiválasztáson alapuló Superose-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. A különböző frakciók tisztaságát denaturáló gélelektroforézis-módszer segítségével állapítottuk meg.

## 2.3. Fehérjevizsgálati módszerek

### 2.3.1. Denaturáló gélelektroforézis (SDS-PAGE)

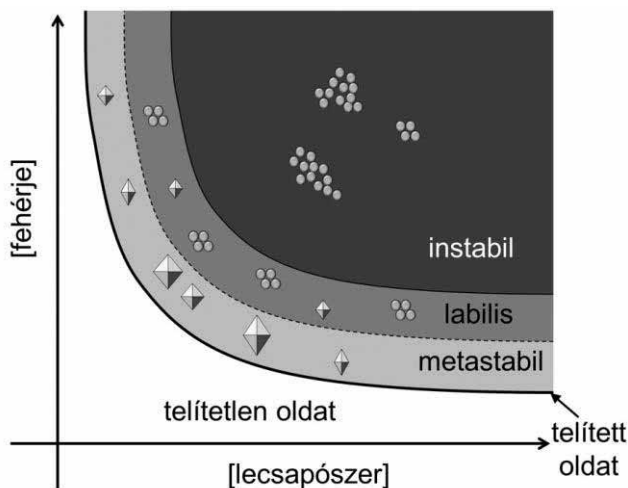
A fehérjék gélben történő haladási sebességét egyenáram során töltése, mérete és alakja egyaránt befolyásolja. Azonban a mintához nátrium-dodecil-szulfát (SDS) felületaktív anyagot adva és azzal melegítve a fehérje kitekeredik,

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 mintákkal megfutatott ismert molekulatömegű fehérjékből álló mintamarker összehasonlításával.

#### 2.4. Fehérjekristályosítás

Ahhoz, hogy a fehérjék szerkezetét röntgendiffrakciós módszerrel vizsgálni tudjunk, nagy tisztaságú, tömény minta- és kristályosító oldatból előállított, rendezett fehérjekristályokra 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, sókoncentrációban, széles pH-tartományt fognak át; sokszor tartalmaznak a fehérjemolekulák hidratáltságát csökkentő, ún. kicsapószerkeket (pl. polietilén-glikol). A *screen* tálcákon lévő lyukakhoz a kristályképződés helyét adó két kis *well* és a körülményt tároló nagy *well* tartozik. 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. 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 (1. ábra). A kristályosító tálcán függőcseppezes módszert alkalmaztam.





1. ábra: Kristályosítási fázisdiagram<sup>17</sup>

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

## 2.5. 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 pedig felépíthető a szóró tárgy képe, mivel a Bragg-törvény szerint az atomok távolsága, a röntgensugár hullámhossza és a sugárelhajlás szöge között összefüggés áll fent. Az optimalizációs tálcán keletkezett kristályok szórási tulajdonságait előzetes méréssel ellenőriztük. A tájékoztató mérés során felvett képek alapján kideríthető, hogy a kristályt valóban fehérje alkotja-e, vagy esetleg szeretlen só, továbbá ha a minta valóban fehérjekristály, akkor milyen mértékű a kristály rendezettsége, illetve valóban egykristály-e.

<sup>17</sup> <http://harmatv.web.elte.hu/Rontgendiffrakcio-jegyzet/Rontgendiffrakc-szerk-vizsg.pdf> (2017-06-04)

## 2.6. Keresztkötött fehérjék előállítása

A monomer és dimer állapotban is előforduló Stl 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 az egyes paraméterek úgy, mint a fehérjekoncentráció, reagens felesleg és reakcióidő körbejárásával megállapíthatóak a kísérlet legkedvezőbb kimeneteléhez szükséges adatok. Várakozásom szerint az eljárás optimalását követően többségében kovalensen kötött dimer Stl, 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 fehérjéjélancon belül, a dimerben és a komplexben.

### 2.6.1. Keresztkötés

A dimetil-formamidban feloldott N-hidroxi-szukcinimid-észter (disuccinimidylsuberate, DSS) keresztkötő reagenst ötszörös moláris feleslegben hozzámértem 40  $\mu\text{M}$ -os Stl, dUTPáz, illetve Stl-t és dUTPáz-t 2:3 molarányban tartalmazó fehérjeoldatokhoz. Inkubálást követően Tris oldattal leállítottam a reakciót, mivel a Tris aminos csoportjai az el nem reagált DSS-sel reakcióba lépnek. Az elkészült keresztkötött mintákat SDS gélen ellenőriztem.

### 2.6.2. A tömegspektroszkópiás méréshez szükséges mintaelőkészítések

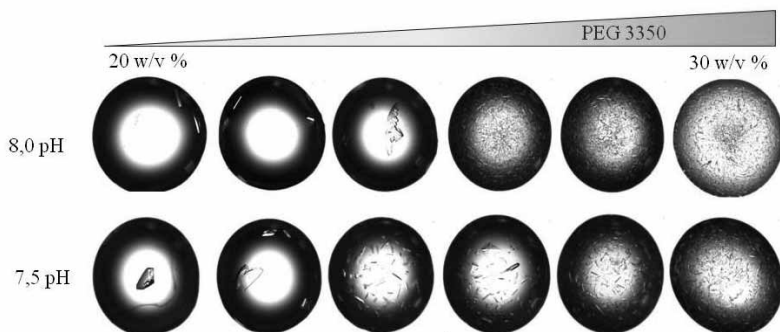
Az Stl és a dUTPáz esetében a keresztkötési reakció során az Stl monomer és dimer, addig a dUTPáz monomer, dimer és trimer állapotban is előfordult, ami a tömegspektroszkópiás mérési eredmények kiértékelését nagyban megnehezíti. Ezen esetekben a fehérjéket SDS-PAGE gélben emésztettem, majd a gélből izolálva nyertem ki az azonos oligomerizációval rendelkező mintákat. A komplex esetében nem tapasztaltuk az egyedi fehérjék bármely oligomer formájának megjelenését az SDS gélen, ezért ezeket oldatban emésztettük el.

### 3. Eredmények és értékelésük

#### 3.1. Kristályosítási kísérletek a $\Phi 11$ dUTPáz-szegmensek kölcsönhatás-ban játszott szerepének felderítésére

##### 3.1.1. $\Phi 11$ dUTPáz dLoop fehérjekristályosítása

A 96-féle oldatkörülmenyt tartalmazó JCSG+ és SG1 *screen*-ekkel végeztem a kristályosító oldatok előzetes szűrését. A JCSG+ *screen*-ben 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 5,1 mg/ml koncentrációjú fehérjeoldatot használtam, amelyekhez előzetesen ötszörös moláris feleslegben az enzim dUPNPP szubsztrátanalógiát adtam, mivel ezt a dUTPáz a dUTP-hez hasonlóan megköti az aktív centrumában, azonban nem képes elhidrolizálni, így megfigyelhető a ligandumkötött állapot. Szubsztrátkötött állapotban a fehérje rendezettebb konformációt vesz fel, így nagyobb eséllyel kristályosodik. Továbbá a dLoop fehérje oldat 5 mM-os végkoncentrációban  $MgCl_2$ -ot tartalmazott. Azok a cseppek, melyben fehérjekristály keletkezett, főként 0,2 M  $MgCl_2$ -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, míg horizontálisan a PEG 3350 (polietilén-glikol) kicsapószer koncentrációját változtattam. A 2. 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 kristályszerkezet, míg a lúgosabb pH-n ez csak nagyobb koncentrációnál következett be.



2. ábra

A dLoop mutáns kristályok különböző puffer pH és kicsapószer-koncentráció mellett.

A röntgendiffrakciós tájékozódó mérés eredményei alapján találtunk igen jól szóródó fehérjekristályokat. Azokat, amelyek nem mutattak a szerekeztanalízist zavaró ikresedést, illetve a diffrakciós képükön 3 Å alatti felbontást tapasztaltunk, a további vizsgálatokon való felhasználás céljából folyékony nitrogénben tároltuk.

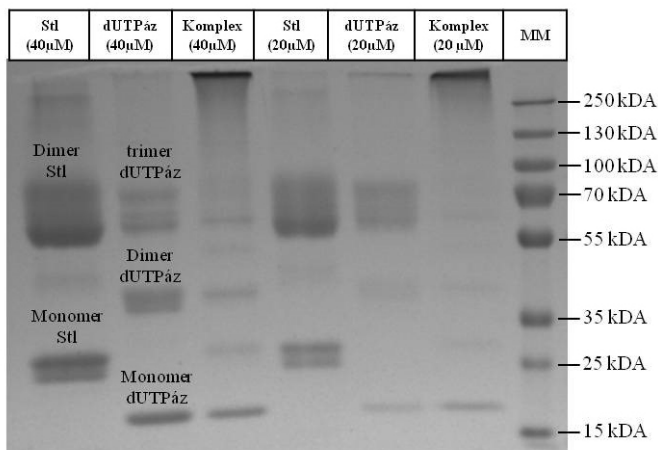
A dLoop kristály tájékozódó mérése alapján kapott cellaparaméterek megközelítőleg egyeznek a vad típusú dUTPáz esetében mért értékekkel. Ez alapján várhatóan a dLoopfehérje kristályainak elemi cellájában is két trimer helyezkedik el. A mutáns fehérje esetében egy teljes adatkészlet gyűjtésére is volt lehetőségünk, a mérési adatok kiértékelése jelenleg is folyamatban van.

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

#### 3.2.2. A kísérlethez szükséges keresztkötött fehérjék előállítása

A keresztkötő reagenssel (DSS) létrehoztam a kovalensen kötött homooligomereket (dUTPáz trimer, Stl dimer), illetve a dUTPáz–Stl komplex kémiai összekapcsolását. A kovalens keresztkötés eredményeképpen az egyébként másodrendű kötésekkel kapcsolódó oligomerek a denaturáció során nem estek szét monomerjeikre az SDS gélen, hanem megjelentek oligomerformáik is. 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 olyan nagyméretű molekulát kaptunk, amely nem tudott a gélbe jutni (3. ábra).



3. ábra

Keresztkötési reakció SDS gélképe 20 és 40 µM-os fehérjekoncentrációval, 30 perces reakcióidővel, ötszörös reagensfeleslegben.  
A gélképen feltüntetve a különböző alegység számmal rendelkező enzimek fajták;  
MM: Mintamarker.

A protokoll optimalizálásának eredményeként az ötszörös moláris feleslegben adagolt reagensmennyiség, a 40 µMfehérjekoncentráció, illetve a 30 perces reakcióidő megfelelőek voltak a kísérlet kivitelezéséhez.

### 3.2.2. 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 megfelelően. A program az egyes találatokhoz egy pontszámot (*decoyscore*-t) rendel, mely felett az elemzés konfidenciaszintje legalább 95 %-os. Egy találatot elfogadtam, amennyiben a találat pontértéke a *decoyscore*

felett volt, az MS<sup>2</sup> spektrumban mind a két keresztkötött peptidészlet bomlási termékei azonosíthatók voltak, valamint az MS<sup>2</sup> spektrum nem tartalmazott a szekvenciárészletből nem következő nagy intenzitású csúcsot.

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. A gélből izolált trimer dUTPáz keresztkötő szekvenciáit a keresztkötött komplex minta adatkészletével is összevettem. Megfigyelhető volt, 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, illetve az alegységek között. Számos esetben a Φ11 dUTPáz keresztkötött aminosavai közötti távolság összeegyeztethető a reagens távtartó hosszával (11,8 Å). Összességében a módszer alkalmasnak tekinthető a fehérjék térközelségének megállapítására, mivel a dUTPáz-ra kapott mérési eredményeket összevetve az enzimről meglévő ismeretekkel nem jutottam ellentmondáshoz.

Következő lépésként a gélből izolált monomer és dimerStl MS<sup>2</sup>méréséből származó eredményeket tanulmányoztam. Látható volt, hogy az Stl C-terminális szegmenséből származó peptideka 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 ezidáig *in silico* predikciós technikák segítségével készített modellje létezik, a keresztkötött aminosavak reaktív csoportjainak távolságát ebben a modellben vizsgáltam meg. Ez a jószolt szerkezeti modell eltérhet az Stl valós térszerkezetétől, továbbá a flexibilitásból is adódhatnak hibák, a távtartó karnál nagyobb távolságok (30 Å) is analizálhatók voltak. 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[QI...TR]183) közötti keresztkötés az alegységek között kialakuló kölcsönhatásból származtatható.

A keresztkötött Stl dimer mintában számos keresztkötött fragmens jelent meg, amely 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.

Az Stl és dUTPáz között talált két megfeleltetés, habár a megengedettnél alacsonyabb *decoyscore*-ral rendelkeztek, a kellő számú spektrumban azonosított bomlási termékek és elfogadható spektrumuk alapján elemezhetőnek tekintettem. A két találat a dUTPáz flexibilis részének 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. 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 dUTPázkar mozgását jelzi a kapott két különböző keresztkötési lehetőség.

#### 4. Összefoglalás

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

A dUTPáz egyes konzervált motívumainak szerepét deléciós mutáns 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.

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 dUTPázdUTPáz interakciók nem mondtak ellent az enzimiről meglévő

tudásunknak. 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.



## Bibliográfia

- 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.
- LINDSAY JA, HOLDEN MTG, *Staphylococcus aureus*: Superbug, super genome?, *Trends Microbiol*, 2004;12: 378–385. doi:10.1016/j.tim.2004.06.004.
- MOL CD, HARRIS JM, MCINTOSH EM, TAINER JA, Human dUTPpyrophosphatase: 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.
- NYÍRI K, KŐHEGYI B, MICSONAI A, KARDOS J, VÉRTÉSSY 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.
- NYÍRI K, PAPP-KÁDÁR V, SZABÓ JE, NÉMETH V, VÉRTÉSSY BG, Exploring the role of the phage-specific insert of bacteriophage  $\Phi$ 11 dUTPase, *Struct Chem*, 2015; doi:10.1007/s11224-015-0652-2.
- PEARL LH, SAVVA R, The problem with pyrimidines, *Nat Struct Biol*, 1996;3: 485–487. doi:10.1038/nsb0696-485.
- PETERS GJ, Therapeutic potential of TAS-102 in the treatment of gastrointestinal malignancies, *Ther Adv Med Oncol*, 2015; doi:10.1177/1758834015603313.
- 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.
- SZABÓ JE, NÉMETH V, PAPP-KÁDÁR V, NYÍRI K, LEVELES I, BENDES ÁÁ 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.
- 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.
- VÉRTÉSSY 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.

<http://harmatv.web.elte.hu/Rontgendiffrakcio-jegyzet/Rontgendiffrakc-szerk-vizsg.pdf>  
(2017-06-04)

