

A CUER FÉMSZABÁLYZÓ FEHÉRJÉK FÉMKÖTŐ-DOMÉNJÉT UTÁNZÓ PEPTIDEK KÖLCSÖNHATÁSA ÁTMENETIFÉM-IONOKKAL

Jancsó Attila,^{1,2} Szokolai Hajnalka,¹ Szunyogh Dániel,¹ Gyurcsik Béla,^{1,2} Balogh Ría,¹ Hemmingsen Lars,³ Stachura Monika,⁴ Thulstrup Peter Waaben,³ Larsen Flemming Hoffmann,³ Christensen Niels Johan⁵

I. BEVEZETÉS, A MUNKA IRODALMI HÁTTERE ÉS CÉLJA

A fémionok egy jelentős része szerepet játszik az élő szervezetekben lejátszódó számos biokémiai folyamatban, illetve befolyásolja ezek végbemenetelét. Az említett fémionok egy része kulcsfontosságú az élő szervezetek számára, míg mások kevésbé fontosak, vagy adott esetben toxikusak. A sejtek számára tehát alapvető jelentőségű a fémionok közel állandó szintjének biztosítása, illetve olyan védekező mechanizmusok működtetése, melyek a toxikus fémionok ártalmatlanításáért felelősek. Ezek a feladatok és funkciók a rendkívül összetett fémion-homeosztázis révén valósulnak meg. A fémion-homeosztázis a hozzáférhető optimális fémion-koncentráció biztosítását jelenti mindazon szabályzó, szállítási, átalakítási és tárolási folyamatok egyensúlyban tartásával, amelyek lehetővé teszik, hogy a megfelelő fémion a megfelelő időben a megfelelő helyre kerüljön. (MA Zhen, JACOBSEN Faith E., GIEDROC David P.: *Metal Transporters and Metal Sensors: How Coordination Chemistry Controls Bacterial Metal Homeostasis*, Chemical Reviews, 2009, 109, 4644-4681.) A baktériumok fémion-homeosztázisában kulcsszerepet játszó fémion-érzékelő fehérjék, ún. transzkripciós faktorok reagálnak egy adott fémion koncentrációjának megváltozására. Ezek a molekulák a kérdéses fémion optimális szintjének biztosításában résztvevő fehérjék képződésére hatnak oly módon, hogy aktiválják vagy gátolják az említett fehérjéket kódoló gének átírását (transzkripcióját). Az ún. fémszabályzó fehérjéknek három fontosabb működési mechanizmusa ismert (korepresszió, derepresszió és aktiváció), melyek közül az aktivációs

¹ MTA-SZTE Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport

² Szegedi Tudományegyetem

³ University of Copenhagen, Dánia

⁴ CERN, Genf, Svájc

⁵ Technical University of Denmark, Dánia

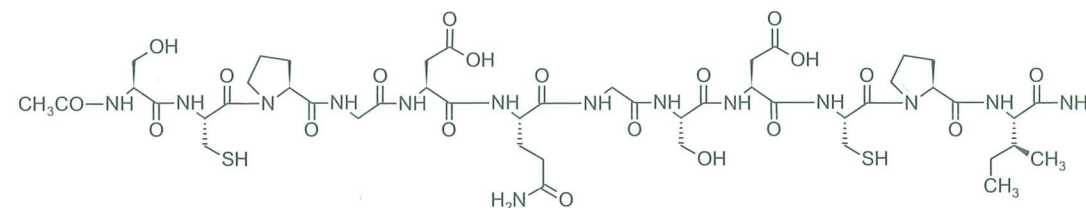
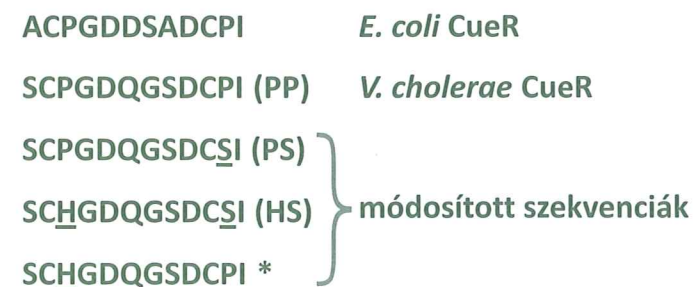
típusban a fémszabályzó fehérje állandóan kötődik a DNS egy adott szakaszához. A megfelelő fémion koordinációja a DNS-hez kötött fehérjéhez a DNS konformációjának torzulását eredményezi, amely lehetővé teszi az RNS-polimeráz enzim kapcsolódását a DNS-hez és a genetikai kód átírásának (transzkripció) megindulását. (BROWN Nigel L., STOYANOV Jivko V., KIDD Stephen P., HOBMAN Jon L.: *The MerR Family of Transcriptional Regulators*, FEMS Microbiology Reviews, 2003, 27, 145-163.) Ez leggyakrabban a fémion-effluxban résztvevő fehérjék termelődéséhez vezet. A fémszabályzó fehérjék MerR családjába tartozó molekulák is ilyen mechanizmus szerint működnek, és ebben alapvető fontosságú a fehérjék C-terminális végéhez közel eső rövid fémkötő hurok, mely legalább két cisztein egységet tartalmaz. (CHANGELA Anita, CHEN Kui, XUE Yi, HOLSCHEEN Jackie, OUTTEN Caryn E., O'HALLORAN Thomas V., MONDRAGÓN Alfonso: *Molecular Basis of Metal-Ion Selectivity and Zeptomolar Sensitivity by CueR*, Science, 2003, 301, 1383-1387.) A fémkötő hurok szekvenciája és szerkezete lényeges a fémion-felismerés szempontjából, de hogy az egyes molekulák szelektív válasza bizonyos fémionokra hogyan is valósul meg, máig nem teljesen tisztázott. A csoportunk érdeklődésének középpontjában álló CueR réz-efflux regulátor fehérje jelentős szelektivitással ad transzkripció választ réz(I)-, ezüst(I)- és arany(I) ionokra, de inaktív pl. higany(II)- vagy cink(II) ionok jelenlétében. (CHANGELA, 2003, 1383.) A dimer szerkezetű molekula fémkötő szakaszának két végén elhelyezkedő ciszteinek lineáris koordinációs módba kényszerítik a kötődő fémiont, de emellett további feltételezett hidrogén-hidas és töltéskompensációs kölcsönhatások is hozzájárulhatnak az egyértékű fémionok kiválasztásához. (CHANGELA, 2003, 1383.)

Kutatásaink egyik fő célja annak megértése, hogy milyen módon befolyásolja a fémion-koordináció a szabályzási folyamat beindulását. Vajon a különböző fémionok eltérő affinitása a fémkötő-helyhez, illetve a megkötött fémionok potenciálisan különböző koordinációs környezete/geometriája hozzájárul-e közvetlenül a fémionok megkülönböztetéséhez, vagy a szelekció kizárólag a fehérje konformáció megfelelő megváltozásának következménye?

2. VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A kutatásaink középpontjában álló CueR fehérjék fémion-koordinációs tulajdonságainak jobb megértéséhez előállítottuk különböző típusú bakteriális CueR fehérjék fémkötő oligopeptid szakaszait, illetve

azok variánsait (I. ábra), majd a vegyületek kölcsönhatását elsősorban kétértékű fémionokkal (cink(II), kadmium(II), higany(II)), illetve ezüst(I) ionnal tanulmányoztuk. A natív fehérjékre jellemző szekvenciák módosításaival a peptidek flexibilitását igyekeztünk befolyásolni, illetve olyan aminosav cseréket hajtottunk végre, melyek a peptideket egyéb MerR fehérjék fémkötő szakaszaihoz teszik hasonlatossá, ami természetesen megváltoztathatja a molekulák fémion-koordinációs sajátosságait is. A fémionokkal történő kölcsönhatás vizsgálatához pH-potenciometriás titrálásokat, UV-, SRCD- (szinkrotron-radiációs cirkuláris dikroizmus), ¹H-NMR-, és perturbált γ - γ szögkorrelációs (PAC) spektroszkópiát, valamint tömegspektrometriai módszereket (ESI-MS) alkalmaztunk.



V. cholerae CueR: Ac-Ser-Cys-Pro-Gly-Asp-Gln-Gly-Ser-Asp-Cys-Pro-Ile-NH₂ (PP)

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

pH-potenciometriás titrálások (cink(II)- és kadmium(II) ionok), valamint ligandum-kompetíciós vizsgálatok (higany(II) ion) segítségével meghatároztuk három oligopeptid (PP, PS, HS) fémionokhoz való affinitását, és jellemeztük a részecskék speciációját pH~2–11 tartományban. (JANCSÓ Attila, SZUNYOGH Dániel, LARSEN Flemming Hoffmann, THULSTRUP Peter Waaben, CHRISTENSEN Niels Johan, GYURCSIK Béla, HEMMINGSEN Lars: *Towards the Role of Metal Ions in the Structural Variability of Proteins: Cd^{II} Speciation of a Metal Ion Binding Loop Motif*,

1. ábra: CueR fehérjék fémion-kötő szakaszai, valamint az előállított oligopeptidek aminosav-szekvenciái, és egy kiválasztott ligandum sematikus szerkezete. (*A megjelölt ligandumot még nem állítottuk elő.)

Metallomics, 2011, 3, 1331-1339.; JANCSÓ Attila, GYURCSIK Béla, MESTERHÁZY Edit, BERKECZ Róbert: *Competition of Zinc(II) with Cadmium(II) or Mercury(II) in Binding to a 12-mer Peptide*, Journal of Inorganic Biochemistry, 2013, 126, 96-103.)

Az I. táblázat a vizsgált peptidek cink(II)- és kadmium(II)-affinitását jellemző látszólagos stabilitási állandókat ($\lg K_{app}$) foglalja össze két különböző pH-n (M^{2+} : fémion, L: ligandum):

$$\lg K_{app} = \lg \frac{\Sigma[M^{2+}]_{kötött}}{[M^{2+}]_{szabad} \times \Sigma[L]_{szabad}}$$

Mindhárom ligandum a két cisztein aminosav mellett potenciális fémkötő-helyként két aszparaginsavat tartalmaz. A PS peptidben a PP ligandum egyik prolinját szerinre cseréltük, míg a HS-ben a másik prolin is hiányzik, helyette egy hisztidint építettünk be, amely ugyancsak szerepet játszhat a fémionok koordinációjában. A három ligandum szekvenciájának különbözősége ellenére a pH-potenciometriás vizsgálatokkal meghatározott stabilitási állandók a peptidek rendkívül hasonló affinitását mutatják mind kadmium(II)-, mind cink(II)ionhoz. Ez arra utal, hogy a fémionok koordinációjában meghatározó szerepe van a cisztein egységeknek, amelyhez képest a többi potenciális donorcsoport hatása vagy nem túl jelentős, vagy mindhárom ligandum esetében hasonló mértékben járulnak hozzá a komplexek stabilitásához. Csak a cink(II) – HS rendszerben figyelhető meg egy kis mértékű stabilitás-növekedés a másik két (hisztidint nem tartalmazó) ligandumhoz képest, amely egyértelműen arra utal, hogy a hisztidin nagyobb szerepet játszik a cink(II)ion megkötésében, összevetve a kadmium(II)ionnal.

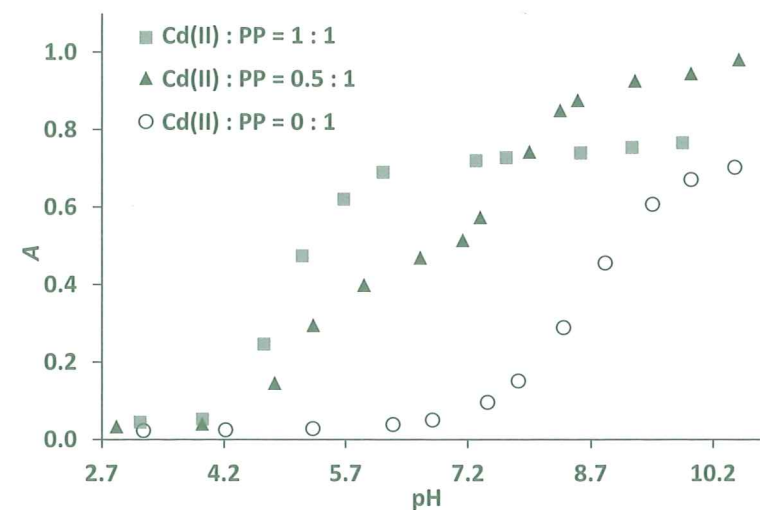
I. táblázat: A különböző peptidek affinitása kadmium(II)- és cink(II)ionokhoz. ($c_{lig.} = 0,001 \text{ M}$, $I = 0,1 \text{ M NaClO}_4$, $\lg K_{app}$: az adott pH-ra számolt látszólagos stabilitási állandók logaritmusai)

Peptid	Cd^{2+} , $\lg K_{app}$		Zn^{2+} , $\lg K_{app}$		Javasolt koordinációs mód
	pH = 7	pH = 8	pH = 7	pH = 8	
PP	8,27	10,09	6,48	8,29	$2 \times S^-, COO^-, (H_2O, COO^-)$
PS	8,24	10,08	6,53	8,39	$2 \times S^-, COO^-, (H_2O, COO^-)$
HS	8,26	10,11	7,02	9,06	$2 \times S^-, N_{im}, (COO^-, H_2O)$

Az azonos ligandumok cink(II)- és kadmium(II)komplexeinek stabilitása közötti különbség a kadmium(II) szoftabb karakterével és a tiolátcsoportokhoz való erősebb affinitásával magyarázható. A higany(II)ionokat mindhárom peptid olyan erősséggel koordinálja, hogy már egészen savas oldatban is ($pH \ll 2$) a fémionok teljes mennyisége kötött állapotban van. A PS ligandum Hg(II)-kötésére vonatkozóan pH = 2-nél jodidionok segítségével kompetíciós vizsgálatok révén ugyancsak meghatároztunk látszólagos stabilitási állandót:

$$\lg K_d^{HgPS} = \lg \frac{[HgPS]}{[Hg^{2+}]_{szabad} \times [PS]_{szabad}} = 25,73$$

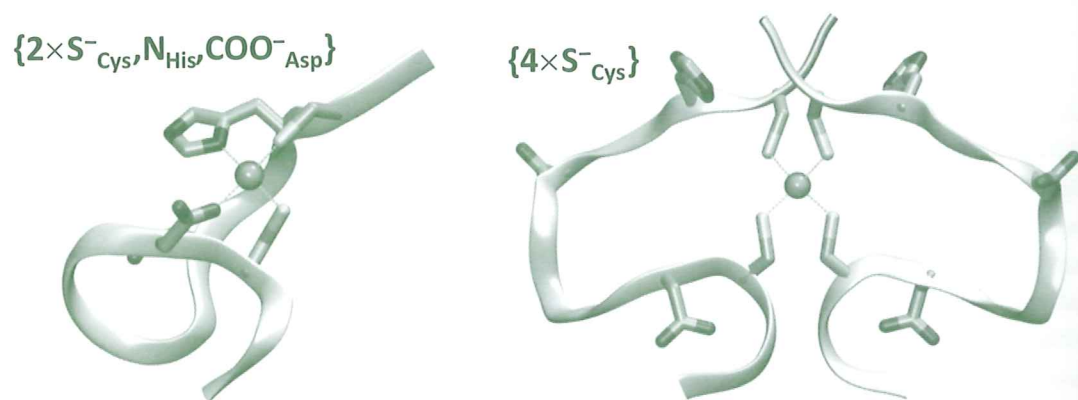
Az egyenletben $[HgPS]$ a fémionhoz kötött, míg $[PS]_{szabad}$ a nemkötött ligandum koncentrációját jelöli függetlenül annak protonáltsági állapotától. Az így meghatározott érték több, mint 28 nagyságrenddel nagyobb, mint amit a kadmium(II)-PS rendszerben azonos pH-ra extrapolálhatunk. Ez a ligandum rendkívül nagy szelektivitását tükrözi a higany(II) irányában.



2. ábra: A kadmium(II) – PP rendszerben $\lambda = 245 \text{ nm-cm}$ mért abszorbanciák változása a pH függvényében, különböző fémion-ligandum arány esetén ($c_{PP} = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$).

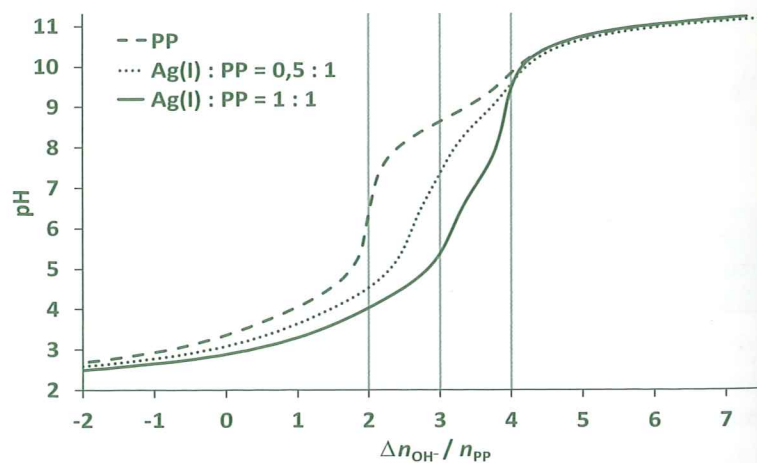
A tanulmányozott rendszerekben képződő domináns komplexekben a fémionok koordinációs módjára többféle szerkezetvizsgáló módszer alkalmazása révén tettünk javaslatot (I. táblázat). UV-titrálásokkal követtük a fémion-tiolát töltésátviteli sávok kialakulását, mellyel a koordinálódó tiolátcsoportok számára, és bizonyos esetekben biszkomplexek képződésére is nyertünk információt. Ennek megfelelően a kadmium(II)-PP 1:1 összetételű rendszerben ~ 6 -os pH-t elérve

a ligandum mindkét ciszteinje koordinálódik a fémionhoz (2. ábra), ligandum felesleg jelenlétében pedig a pH ~ 7,2 – 8,6 között megfigyelhető abszorbanca növekedés a bisz-komplex(ek) képződését eredményező további kadmium(II)-tiolát kötések létrejöttét jelzi. $^1\text{H-NMR}$ mérésekkel további donorcsoportok, így a His és Asp egységek koordinációját (lásd 3. ábra) is tudtuk igazolni. Perturbált gamma-gamma szögkorrelációs mérésekkel ($^{199\text{m}}\text{Hg PAC}$) pedig a higany(II) komplexek ditiolát típusú $\{\text{HgS}_2\}$ kötémódját bizonyítottuk.



3. ábra: A kadmium(II) – HS rendszerben képződő két jellemző törzskomplex molekula modellezéssel generált feltételezett szerkezete (CdL – balra és CdL_2 – jobbra).

Legújabb vizsgálataink az egyértékű ezüst(I)ionnal meglepő, nem várt eredményekhez vezettek. Azt tapasztaltuk, hogy a fémion és a ligandum ekvimoláris rendszerében ~ 6-os pH-ig a ligandum egyik tiolcsoportja még protonált formában van, és a deprotonálódás csak pH ~ 8-ra megy végbe. Az $\text{Ag(I)} - \text{PP}$ 1:1 összetételű minta normált titrálási görbéjén a 3-4 ekvivalensnyi mérőoldat-fogyás tartományában megjelenő lépcső felel meg az említett deprotonálódási folyamatnak



4. ábra: A PP peptid és a különböző összetételű $\text{Ag(I)} : \text{PP}$ rendszerek ligandum anyagmennyiségre normált titrálási görbéi ($c_{\text{PP}} = 0,001 \text{ M}$, $I = 0,1 \text{ M NaClO}_4$, $T = 298 \text{ K}$).

(4. ábra). Mindez jelentős eltérés a kétértékű fémionokhoz képest, melyeknél pH 6 környékén már a ligandum összes potenciális donorcsoportja disszociált.

A fehérje fémion-szelektív viselkedésének jobb megértéséhez a natív *E. coli* CueR fehérje molekuláris biológiai módszerekkel történő előállításán és tisztításán dolgozunk. Elővizsgálataink során ESI-MS tömegspektrometriás mérésekkel igazoltuk a CueR fehérje előállításának sikerességét, azonban a tisztítási folyamatában komoly feladatnak ígérkezik a molekula elválasztása a termeltetéshez használt *E. coli* gazda-baktérium egy saját fehérjéjétől.

A fehérje előállítása után lehetőségünk lesz a makromolekula, illetve a fehérje fémionkötő oligopeptid fragmensének fémion-kötő sajátosságait összehasonlítani eltérő típusú fémionokat alkalmazva, amelynek révén közelebb juthatunk a CueR fémion-szelektív működésének molekuláris szintű megértéséhez.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:

MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (JA), HURO/1001/232/2.2.2-METCAP, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012, ISOLDE/CERN: beam time grants IS448 and IS488 (LH).