



Doktori értekezés

Cinkujj fehérjék fémion-, és DNS-kötésének vizsgálata, módosításuk Ni(II)-indukált peptidhidrolízis segítségével

KÉSZÍTETTE:

Hajdu Bálint

TÉMAVEZETŐ:

**Dr. Gyurcsik Béla,
egyetemi docens**

Szeged

2023

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Tartalomjegyzék

Rövidítések.....	4
1 Bevezetés.....	6
2 Irodalmi áttekintés.....	8
2.1 Cinkujj fehérjék.....	8
2.1.1 Cinkujj motívumok jellemzése.....	8
2.1.2 Cinkujj fehérjék DNS felismerése.....	9
2.1.3 Cinkujj fehérjék kölcsönhatása fémionokkal.....	11
2.2 Az ATCUN motívum.....	17
2.2.1 ATCUN motívum kialakítása fehérjékben.....	19
2.2.2 Az ATCUN komplexek DNS hasító tulajdonsága.....	21
2.3 A kolicin E7 nukleáz domén.....	23
2.4 Cinkujj fehérje-alapú mesterséges metallonukleázok tervezése.....	25
3 Célkitűzés.....	28
4 Kísérleti rész.....	31
4.1 Rekombináns DNS technológia.....	31
4.1.1 DNS hasítás.....	31
4.1.2 DNS ligálás.....	31
4.1.3 DNS foszforilálás-defoszforilálás.....	32
4.1.4 Transzformálás.....	33
4.1.5 Polimeráz láncreakció.....	34
4.2 DNS hordozó sokszorosítás, tisztítási módszerek.....	35
4.3 Gélelektroforézis.....	36
4.3.1 Agaróz gélelektroforézis.....	37
4.3.2 Poliakrilamid gélelektroforézis.....	38
4.3.3 Gélelektroforézis sáveltolódás vizsgálat.....	39
4.4 Spektroszkópiás vizsgálati módszerek.....	40
4.4.1 UV-Vis spektroszkópia.....	40
4.4.2 Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia.....	41

4.4.3	Spektrofluorimetria.....	42
4.4.4	Fluoreszcencia anizotrópia	44
4.5	Tömegspektrometria	44
4.6	Izotermális kalorimetria	46
4.6.1	ITC adatok értékelése	48
4.7	Egyensúlyi számolások.....	49
5	Eredmények.....	51
5.1	Ni(II)-indukált hidrolízis megvalósítása cinkujj fehérjékben.....	51
5.1.1	Gének tervezése, fehérjetisztítás.....	51
5.1.2	Ni(II)-indukált hidrolízis és desumoiláció összehasonlítása	52
5.1.3	ATCUN motívum és cinkujj alegységek függetlenségének vizsgálata.....	54
5.1.4	Cu(II)-Ni(II) csere a hidrolizált cinkujj fehérjében	54
5.2	Az előállított cinkujj fehérje Zn(II)-, és DNS affinitása.....	57
5.2.1	Cinkujj fehérjék Zn(II)-affinitása	57
5.2.2	Cinkujj fehérjék DNS-felismerése.....	63
5.2.3	Versengés EDTA-val.....	66
5.3	Az előállított cinkujj fehérje kölcsönhatása "soft" fémionokkal	68
5.3.1	Ag(I) hatása a cinkujj fehérjére	68
5.3.2	Cd(II) hatása a cinkujj fehérjére	72
5.3.3	Hg(II) hatása a cinkujj fehérjére.....	79
5.4	Alkalmazás: fehérjetisztítási módszer	84
5.4.1	Gének tervezése, fehérjetisztítás.....	84
5.4.2	Hidrolízis oldatban és Ni-NTA gyantán.....	85
5.5	Alkalmazás: allosztérikus szabályozás	88
5.5.1	Gének tervezése, sejtbeli kísérletek.....	88
5.5.2	Ni(II)-indukált hidrolízis hatása a nukleáz aktivitásra	89
5.5.3	Az affinitástoldalék szerepének vizsgálata.....	90
5.6	Alkalmazás: metallonukleáz kialakítása	92

5.6.1	A linker szakasz módosítása az ATCUN motívum és a cinkujj fehérje között	94
5.6.2	<i>In vitro</i> nukleáz aktivitási vizsgálat	97
6	Összefoglalás	99
7	Summary	102
8	Irodalomjegyzék	105
9	Köszönetnyilvánítás	117
10	Közlemények listája	118
F1.	Függelék	F1
F1.1.	A cinkujj fehérjék génjeinek tervezése	F2
F1.2.	Fehérjék kifejezése, tisztítása	F3
F1.3.	Entalpia értékek korrekciója	F8
F1.4.	Statisztikus tényezők figyelembevétele stabilitási állandók számításánál	F9
F1.4.1.	Zn(II)-1MEY#-DNS-EDTA rendszer jellemzése	F10
F1.4.2.	ESI-MS-ben követett kompetíciós titrálások jellemzése	F10
F1.5.	Cd(II)-Zn(II) csere az 1MEY# fehérjében	F14
F1.6.	FluoZin-3 kölcsönhatásának tanulmányozása Cd(II)-vel és Hg(II)-vel	F15
F1.7.	Módosított fehérjék génjeinek tervezése	F19

Rövidítések

CD: Cirkuláris dikroizmus

EMSA: (Electrophoretic Mobility Shift Assay) gélelektroforézis sáveltolódás vizsgálat

MS: Tömegspektrometria

ESI: Elektrospray ionizáció, lágy ionizációs technika tömegspektrometriában

HPLC: Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia

NMR: Magmágneses magrezonancia spektroszkópia

ITC: Izotermális titrálós kalorimetria

bp: DNS bázispár

Da: Atomi tömeg egység

ATCUN: Amino terminális Cu(II) és Ni(II) megkötésére képes tripeptid

GGH: GlyGlyHis, Glicil-glicil-hisztidin tripeptid

KQ: Ac-Lys-His-Pro-His-Pro-His-Gln-NH₂ heptapeptid

HSA, BSA, RSA: humán, szarvasmarha és patkány szérum albumin

H2A: Egyike az eukariótákban előforduló hisztonfehérjéknek

HP2: Humán protamin 2, az örökítő anyag védelmét szolgáló fehérje

CP1: Konszenzus peptid 1, modell cinkujj motívum.

1MEY: DNS és az azt specifikusan felismerő cinkujj fehérje kristályszerkezetének PDB kódja, a dolgozatban csak a cinkujj fehérje értendő alatta [1]

1MEY#: Kutatócsoportunk által módosított 1MEY fehérje

TFIIIA, Sp1, MTF1, WT1, Zif268, EGR1, YY1, Rad87: különböző cinkujj fehérjék

ColE7: A kolicin E7, *Eschericia coli* baktériumban termelődő nemspecifikus endonukleáz

NColE7: A kolicin E7 nukleáz doménja

FokI, BamHI, NheI, NcoI, EcoRI, HindIII, NdeI, XhoI: restriktív endonukleázok

MMPP: Magnézium-monoperoxifalát

SDS: Nátrium-dodecil-szulfát

EDTA: Etilén-diamin-tetraecetsav, illetve annak dinátrium sója

EGTA: Etilén-glikol-tetraecetsav

DTT: Ditionitrit

TCEP: Trisz(2-karboxietil)-foszfín redukálószer

TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin

APS: Ammónium-peroxo-diszulfát

dI-dC: poli-dezoxiinozin-dezoxicitidin sav

HEPES: 4-(2-hidroxi-1-piperazin-etánszulfonsav

Tris: Trisz(hidroxi-metil)-aminometán

MOPS: 3-morfolino-1-propánszulfonsav

ABC: Ammónium-hidrogén-karbonát

Tricin: N-(2-hidroxi-1,1-bisz(hidroxi-metil)-etil)-glicin

PCR: Polimeráz lánreakció - eljárás DNS exponenciális sokszorosításra *in vitro*

BeStSel: Fehérje másodlagos szerkezetet CD spektrum alapján becsülő program [2]
ImageJ: Képfeldolgozó program [3]
PSEQUAD: Stabilitási állandók, moláris spektrumok számolására, titrálási görbék szimulálására alkalmas program [4]
PDB: „Protein Data Bank” fehérjék térszerkezeteit tartalmazó online adatbázis
UGENE: DNS és fehérjeszekvenciák vizsgálatára, szerkesztésére alkalmas program [5]
pET21a, pGEX-6P-1, pETM11, pUC19: bakteriális eredetű cirkuláris DNS hordozók (plazmid)
DH5 α , BL21: *E. coli* baktériumtörzsek
Ni-NTA: Ni(II)-nitrilotriacetát agaróz gyöngyökön immobilizálva
SUMO: (Small ubiquitin-like modifier) ubiquitin-szerű poszttranszlációs fehérjetoldalék
ULP1: SUMO tooldalékot specifikusan a fehérjéről lehasító proteáz
PAR: 4-(2-piridilazo)rezorcin, kromogén kelátor kétértékű fémionok tanulmányozására
FluoZin-3: Na;2-[2-[2-[2-[bisz(karboxil metil)amino]-5-metoxi-fenoxi]etoxi]-4-(2,7-difluor-3-oxido-6-oxo-4a,9a-dihidroxantén-9-il)anilino]acetát, Zn(II)-szelektív fluoreszcens indikátor

1 Bevezetés

Az élő szervezetek működésében meghatározó szerepet töltenek be a fémionok például a vázképzésben, információátvitelben, enzimatikus folyamatokban, elektrontranszportban. A cink az egyik legnagyobb mennyiségben jelenlévő esszenciális nyomelem, egy átlagos felnőtt szervezetében 2-3 g található [6]. A Zn(II) telített d alhéjának köszönhetően nem jelentkezik ligandumtér stabilizációs energia, így változatos koordinációs számú és geometriájú komplexeket képez. Átmeneti hard-soft tulajdonsága révén kén- (cisztein) oxigén- (glutamát, aszpartát) illetve nitrogén-donor (hisztidin) ligandumokkal is kölcsönhathat [7]. Ezek alapján nem meglepő, hogy bioinformatikai kutatások szerint a humán genom ~10%-a kódol Zn(II)-kötő fehérjéket [8-9]. Ezek a fehérjék főként szerkezeti vagy katalitikus cink-kötőhellyel rendelkeznek [10], habár akadnak további kategóriák is a szakirodalomban pl.: szenzor, transzporter, inhibitor [7,11].

Egy katalitikus cink-kötőhely (**ld. 2.3 fejezet**) esetén a koordinációs szám 4-6 között változhat, és hard donoratomokat tartalmazó ligandumokkal alakulhat ki, ahol a kötések megnyúltak, a molekuladinamikai programokkal és adatbázisok alapján jóslatokhoz képest [12-13]. Arra, hogy a komplex enzimatikus folyamat katalizátora lehessen a Zn(II)-vegyületekre jellemző gyors ligandumcsere reakciók adnak lehetőséget. Továbbá a Zn(II) erős Lewis sav, és redoxi szempontból inert, ami lehetővé teszi, hogy nukleofil hidroxido részecskét generáljon, amennyiben a fehérje donorcsoportjain felül koordinálódott víz is jelen van [14]. A Lewis savasságot fokozza, hogy a koordinálódó ligandumok legtöbb esetben imidazol nitrogének, így a központi fémion pozitív töltése, csak kis mértékben árnyékolódik [15].

A szerkezeti cink-kötőhelyek esetében (**ld. 2.1 fejezet**) a kötéshosszak megegyeznek az elméleti értékekkel és a tetraédes geometria a kedvezményezett. Ez azzal magyarázható, hogy az ilyen kötőhelyek minimum két ciszteint tartalmaznak, amelyek negatív töltésük révén csökkentik a komplex nettó töltését, valamint a Zn(II) savasságát. Egyes magyarázatok szerint a kisebb kötéshosszak és a ciszteinek oldalláncainak szterikus hatása is szerepet játszik abban, hogy nem képes az ötödik ligandum bekötődni a fémion koordinációs szférájába, ezzel gátolva az esetleges vízbelépések okozta katalitikus aktivitást [15]. Cisztein mellett az ilyen komplexekben hisztidinek fordulhatnak elő az alábbi összetételekben: Cys₄, Cys₃His, Cys₂His₂ [7]. Többek között a cinkujj fehérjék is ebbe a csoportba sorolhatók, amelyek napjainkban is fontos kutatási területet képeznek [16-20].

A szervezetben számos egyéb endogén és exogén fémion is kölcsönhathat Zn(II)-kötő fehérjékkel. Ezek a kölcsönhatások csökkenthetik, megszüntethetik, vagy akár módosíthatják a fehérjék eredeti funkcióját, így bármilyen újonnan előállított fémtartalmú fehérje esetében fontos lehet tanulmányozni a kompetíciós reakciókat is [21].

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Cinkujj fehérjék

A cinkujj fehérjék alkotják a specifikus DNS-felismerő fehérjék legnépesebb családját [22]. Ezek voltak az első olyan fehérjék, amelyek alkalmasak lehetnek a DNS felismerő domén szerepére egy mesterséges metallonukleázban. 1985-ben Aaron Klug kutatócsoportjában azonosították Cys₂His₂ típusukat afrikai karmosbékákban. Ezt követően számos élő szervezetben igazolták jelenlétüket (kétéltűek, hüllők, emlősök), a jelenlegi becslések alapján a humán genom által kódolt fehérjék 1-3%-át teszik ki [23-26]. Transzkripció aktivátorokként funkcionálnak, azaz az RNS molekulák átíródásán keresztül fehérjék kifejeződését szabályozzák a sejtekben, úgy, hogy adott kódoló DNS szekvenciák előtt elhelyezkedő ún. promóter régiókhoz kötődnek. Biotechnológiai jelentőségüket az adja, hogy egy cinkujj motívum/egység három nukleobázist ismer fel, de több egység is összekapcsolható, azaz a specifitás többszörösére növelhető. Az első mesterséges cinkujj nukleázban három cinkujj motívumot kapcsoltak össze, a DNS hasításért pedig a FokI nukleáz domén volt felelős [27]. A későbbiekben számos ilyen típusú nukleázzal végeztek génmódosítási kísérleteket [28-34].

Több eltérő szerkezeti felépítésű cinkujj fehérjét azonosítottak az elmúlt évtizedekben, melyek az élő szervezetekben változatos feladatokban vehetnek részt: transzkripció, transláció, hibajavítás, anyagcsere, ingerületgenerálás, sejtosztódás, valamint sejthalál, így nem csupán DNS-sel, de más fehérjékkel és kismolekulákkal is kölcsönhatnak [35-36]. Közös jellemzőjük, hogy a tetraédes geometriában koordinálódó Zn(II) és az aromás oldalláncok által alkotott hidrofób mag szerkezetstabilizáló szerepet tölt be [37-44].

2.1.1 Cinkujj motívumok jellemzése

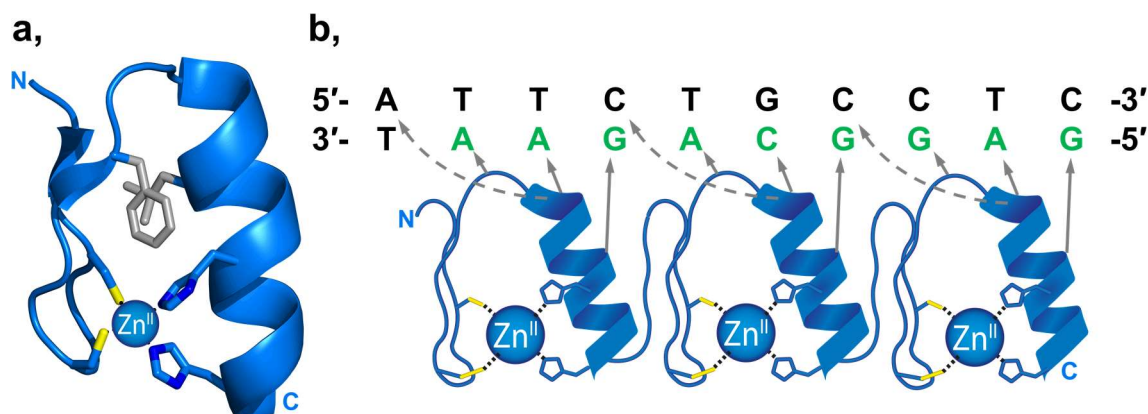
A cinkujj fehérjék csoportosíthatók funkciójuk, a cink-kötő egységek másodlagos szerkezete és a cinkhez koordinálódó ligandumok alapján [35,45]. Utóbbi esetben megkülönböztetünk Cys₂His₂, Cys₃His, illetve Cys₄ típusokat [21,44,46]. Mivel kutatásaim során a klasszikus Cys₂His₂ típusú cinkujj fehérjékkel dolgoztam, így a továbbiakban csak ezek szakirodalmára fókuszálok.

A Cys₂His₂ motívumok transzkripció aktivátor és DNS-kötő fehérjékben fordulnak elő a fejlett eukarióta szervezetekben: Krüppel-szerű faktorok, Specifikus fehérje 1 (Sp1), KRAB, SCAN, BTB [47-48]. Felfedezésük óta nagy figyelem övezi őket, mivel nemcsak

specifikusan képesek nukleinsav bázishármasok felismerésére, de több egység egymás után kapcsolása is lehetséges, amivel a DNS-felismerő specifitás tovább fokozható. Egy Cys₂His₂ monomer általános aminosav szekvenciája: X-Cys-X_{2/4}-Cys-X₃-Phe-X₅-Leu-X₂-His-X_{3/5}-His, ahol X bármilyen aminosav lehet. A monomer egységek átlagosan 25 aminosav hosszúságúak, amelyeket 5 aminosavból álló linkerek kapcsolnak össze [49-50]. Az ujszerű szerkezet a két antiparallel β-redő ciszteinjeihez és az α-hélix két hisztidinjehez koordinálódó Zn(II) hatására jön létre (1. ábra a,) [51-52], a szerkezetet az aromás oldalláncok által alkotott hidrofób mag, pedig tovább stabilizálja [53]. Egy ekvivalens Zn(II) bekötődését megelőzően a fehérje rendezetlen szerkezetet mutat, amint azt cirkuláris dikroizmus (CD) és mágneses magrezonancia spektroszkópiás (NMR) mérések igazolták [43,54].

2.1.2 Cinkujj fehérjék DNS felismerése

A Cys₂His₂ motívumon alapuló cinkujj fehérjék Zn(II)-komplex formában képesek specifikusan felismerni DNS célszekvenciákat. Ennek mechanizmusát a ZIF268 cinkujj fehérje-DNS komplex kristályszerkezetének tanulmányozásával sikerült felderíteni [56]. A cinkujj motívumok három egymással szomszédos nukleobázissal alakítanak ki kölcsönhatást a DNS nagyárcában hidrogénkötések segítségével. A folyamat befolyásolja a DNS másodlagos szerkezetét, a helikális csavarodás mértéke csökken. Ha több cinkujj motívum kapcsolódik össze, akkor a második cinkujj alegység a soron következő bázishármas ismeri fel 3'→5' irányban (1. ábra b,).



1. ábra: a, Cys₂His₂ cinkujj motívum szerkezete. A Zn(II) kék, a két antiparallel β-redő és az α-hélix kék, a Zn(II) koordinált tiolátcsoportok sárgák, az imidazol nitrogének sötétkék. A szintén szerkezetet stabilizáló fenil-alanin és leucin aminosavak oldalláncai szürke színűek (PDB: 1MEY második cinkujj alegysége PyMOL programban ábrázolva [55]); **b,** A cinkujj fehérje-DNS kölcsönhatások sematikus ábrázolása az 1MEY cinkujj esetén. 1MEY cinkujj fehérje specifikus DNS célszekvenciája 5'-GAGGCAGAA-3' (zöld).

A szekvencia-specifikus kötődésért az α-hélix kezdetétől számított –1, 3. és 6. aminosavak felelősek. Emellett a fehérjében az α-hélix kezdetétől számított második

aminosav kölcsönhatásba lép a komplementer DNS szál negyedik nukleotidjával is (**1. ábra b.**) [57]. További cinkujj fehérje-DNS kristályszerkezeteket megvizsgálva az α -hélix -1, 1, 2, 3, 5. és 6. aminosavai felelősek az adott DNS szekvencia specifikus felismeréséért, de egyes esetekben a β -kanyarban található aminosavak is befolyásolhatják a kölcsönhatást [58].

Egy cinkujj motívumon belül az aminosavak változtatásával elméletben bármely bázishármas megcélozható, de a lehetséges 64 bázishármas kombináció lefedéséhez jelenleg nem áll rendelkezésre szabadon elérhető cinkujj könyvtár. Továbbá egy cinkujj motívum nem képes kellően nagy affinitással megkötni DNS célszekvenciáját, így legalább két motívumot kell összekapcsolni, míg a specifitás eléréséhez legalább három újra van szükség. Az egyes alegységeket általában 5 aminosavból álló peptid linkerekkel kötik össze, a linker hossza és aminosav összetétele is befolyásolhatja a DNS-kötés erősségét [59-61].

A Cys₂His₂ szerkezetű fehérjék a guaninban gazdag (5'-GNN-3') DNS szekvenciákat ismerik fel leghatékonyabban (N bármely nukleotid lehet), különösen az első pozícióban elhelyezkedő guanin fontos a kellően nagy affinitás eléréséhez. Ebből következik, hogy egy 64 bázispár (4³) hosszúságú DNS szekvenciában átlagosan csupán egy olyan 5'-GNNNGNN-3' típusú kötőhely van, amihez lehetséges kellően nagy affinitással és specifitással kötődő háromtagú cinkujj fehérjét tervezni. A gyakorlatban számos nukleáz csak dimerként képes funkcióját ellátni (**ld. 2.4 fejezet**), azaz a szelektivitás nő [27]. Ez azonban azt is jelenti, hogy átlagosan 4096 (4⁶) bázispár hosszúságú szakaszban lesz egyetlen guaninban gazdag célszekvencia. Ha három helyett négytagú cinkujj fehérjéket alkalmazunk, amelyek szelektivitása jobb a vizsgálatok alapján, akkor 65536 = 4⁸ bp hosszú DNS szakaszban fordul elő, egyetlen guaninban gazdag célszekvencia [62]. A fentiek miatt kromoszomális DNS célzott felismerése cinkujjak révén gyakran nem elég hatékony. Négynél több cinkujj egység összekapcsolásakor a szerkezeti feszültségek már számottevő negatív hatást fejtenek ki a DNS-felismerésre, így ilyen fehérjéket csak nem folytonos DNS szakaszok felismerésére alkalmaznak általában két hármas egységre tagolva egy hosszabb linker közbeiktatásával.

Új cinkujj fehérjék tervezése lehetséges egy meglévő nagy specifitással rendelkező fehérje fokozatos módosítása révén, fág-könyvtárak felhasználásával. Manapság számos program áll rendelkezésre, ami a meglévő kísérleti eredmények alapján igen jó becslést tud nyújtani, az eredményeket pedig molekuladinamikai, szemiempirikus számításokkal is kiegészítik pl.: Zinc Finger Tools, ZiFiT [63-64].

2.1.3 Cinkujj fehérjék kölcsönhatása fémionokkal

A cinkujj fehérje-fémion komplexek stabilitásának meghatározását számos tényező befolyásolja. A kötőhely ciszteinjei fokozzák a komplexek érzékenységét a pH, a hőmérséklet és az ionerősség változásaira. A Cys₂His₂ cinkujj fehérje család modelljeként számos vizsgálatot végeztek egy 1991-ben tervezett CP1 (consensus peptide 1) peptiddel, melynek szekvenciáját az addig ismert 131 cinkujj fehérje leginkább megőrzött aminosavaiból állították össze [65]. E peptid 2015-ös felülvizsgálata során az aminosav sorrend és összetétel alig változott annak ellenére, hogy ekkor már 13457 cinkujj fehérje szekvenciáját használhatták fel az értékelés során [66]. Így az elképzelések alapján ez a peptid jó közelítést nyújthat egy átlagos Cys₂His₂ cinkujj részlet fémmegkötő sajátságainak vizsgálatakor. Ugyanakkor meglepő módon a tapasztalatok azt mutatják, hogy rendre nagyobb Zn(II)-affinitás határozható meg ezen peptidre, mint a természetben előforduló cinkujj fehérjék egységeire [65,67-68] (**1. táblázat**). Az irodalomban különböző fehérjék Zn(II)-affinitás értékei közötti nagy eltérés azt sugallja, hogy új cinkujj fehérje tervezése esetén elengedhetetlen annak termodinamikai sajátságait meghatározni, nem alapozhatunk a korábbi értékekre.

A sejten belül számos további fémion fordul elő, és ezek hatására megtörténhet a Zn(II) szubsztitúciója, vegyes komplex kialakulása, részleges komplexképződés és/vagy a ciszteinek oxidációja, ami a fehérje szerkezetének, funkciójának módosulásához vezethet [42,69-71]. Továbbá toxikus fémionok is bekerülhetnek a szerkezetbe, melyek reagálhatnak cinkujj fehérjékkel, amit szintén szükséges vizsgálni. A fémionok bekötődésének szempontjából is az előbb bevezetett Cys₂His₂, Cys₃His és Cys₄ taglalást célszerű alkalmazni. A cinkujj fehérjék koordinációs kémiai és biofizikai sajátságai és reaktivitásuk terén a mai napig sok ellentmondás és kérdőjel van a szakirodalomban [21].

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

Cinkujj motívum	Körülmények	$\lg\beta'$ pH 7,4	Hivatkozás
CP1	100 mM HEPES (pH 7,0); 50 mM NaCl	12,5 (RT)*	[65]
		12,0 (RT)*	[72]
	50 mM MOPS (pH 7,0); 100 mM KCl	15,7 (CDc)*	[68]
	20 mM Tris (pH 7,4); 100 mM NaCl	14,49 (CDc)	[73]
CP1-Δ8	50 mM MOPS (pH 7,0); 100 mM KCl	11,4 (CDc)*	[68]
CP1 (2015)	20 mM Tris (pH 7,4); 100 mM NaCl	12,3 (CDc)	[73]
CP1 K/S	20 mM Tris (pH 7,4); 100 mM NaCl	14,0 (CDc)	[73]
TFIIIA-2	20 mM HEPES (pH 7,0); 50 mM NaCl	9,4 (RT)*	[74]
MTF1-1	50 mM HEPES (pH 7,0); 100 mM NaClO ₄	12,4 (CDc)*	[67]
	50 mM HEPES (pH 7,4); 100 mM NaClO ₄	11,4 (PAR)	[75]
	100 mM HEPES (pH 7,0); 50 mM NaCl	11,3 (RT)	[76]
	10 mM HEPES (pH 7,4); 100 mM NaClO ₄	8,9 (PAR)	[77]
MTF1-2	10 mM HEPES (pH 7,4); 100 mM NaClO ₄	9,9 (PAR)	[77]
MTF1-3	10 mM HEPES (pH 7,4); 100 mM NaClO ₄	9,3 (PAR)	[77]
MTF1-4	10 mM HEPES (pH 7,4); 100 mM NaClO ₄	9,4 (PAR)	[77]
MTF1-5	10 mM HEPES (pH 7,4); 100 mM NaClO ₄	9,8 (PAR)	[77]
MTF1-6	10 mM HEPES (pH 7,4); 100 mM NaClO ₄	9,3 (PAR)	[77]
WT1-3	50 mM HEPES-HCl (pH 6,5)	10,5 (ITC)*	[78]
WT1-4	20 mM MES (pH 5,3); 100 mM KCl	8,9 (DT)*	[79]
Sp1-3	50 mM HEPES (pH 7,4); 100 mM NaClO ₄	12,7 (CDc)	[67]
	50 mM HEPES (pH 7,0); 100 mM NaCl	10,0 (RT)*	[80]
	500 mM Tris (pH 7,4)	7,6 (ITC)	[81]
		8,2 (rITC)	[81]
	50 mM Tris (pH 7,0)	10,4 (RT)*	[81]
Zn-F10	50 mM HEPES (pH 6,5)	8,3 (ITC)*	[78]
ZF133-11	50 mM HEPES (pH 7,4); 100 mM NaClO ₄	12,5 (CDc)	[67]
	100 mM KNO ₃	12,5 (Pot)	[67]
ZF278-1	50 mM HEPES (pH 7,4); 100 mM NaClO ₄	13,0 (TRT)	[67]

* pH 7,4-re átszámolva Kluska és mtsai. által [21]

Co(II)-vel elsősorban azért vizsgálták behatóan a cinkujj fehérjék kölcsönhatását, mert a Zn(II)-vel ellentétben a Co(II) d alhéja telítetlen, és d-d átmenetei miatt vizsgálható a látható fény hullámhossz tartományában. Ez lehetőséget ad a komplexképződés nyomon követésére UV-Vis abszorpciós spektroszkópia segítségével, miközben ugyancsak tetraédres geometriát vesz fel és Lewis savassága hasonló a cinkéhez, azaz jól modellezi annak komplexképzését. Ezen felül a legtöbb cinkujj fehérje Zn(II)-affinitását is Co(II) reverz UV-Vis spektroszkópiás titrálással határozták meg, mivel a nM nagyságrendbe eső K_d értékek nem adtak lehetőséget a közvetlen titrálásokra azon módszerek esetén, ahol nagy koncentráció szükséges a mérésekhez [69]. Ilyenkor az apo peptidet először Co(II)-vel

titrálják meg, majd a Co(II)-komplexet titrálják Zn(II)-vel. Az eddigi ismereteket összegezve elmondható, hogy a Co(II) négy nagyságrenddel gyengébb kölcsönhatást alakít ki a cinkujj szekvenciákkal, mint a Zn(II) [54,65,68]. Ez az eltérés a ciszteinek számától és az alkalmazott módszertől függetlenül fennáll.

A Co(III) oxidációs állapotban kis-spinű oktaéderes koordinációt részesít előnyben, és kinetikailag rendkívül inert. Így vegyületeiből nehéz kiszorítani. Amennyiben Schiff-bázisokkal alkotott komplex formájában kerül kölcsönhatásba cinkujj fehérjével megvalósítható a szubsztitúció és Co(III) cinkujj komplex képződése közben, az eredeti fehérjeszerkezet összeomlik [82].

A Ni(II) a második leggyakrabban vizsgált átmenetifém-ion a cinkujj fehérjével kialakított kölcsönhatást tekintve. A telítetlen d alhéjának köszönhetően szintén van mód UV-Vis abszorpciós spektroszkópiás mérésekre. A d-d átmenetek mellett, különösen ciszteinekkel, intenzív töltésátviteli sávok jelennek meg az UV tartományban. A cinkujj egységekkel elsősorban torzult tetraéderes geometriájú Ni(II)-komplexek képződnek – habár a szakirodalomban síknégyzetes koordinációra is akad példa [83] –, melyek stabilitását μM nagyságrendű disszociációs állandók jellemzik. Emiatt meglehetősen nagy felesleg Ni(II) szükséges a Zn(II) kiszorításához annak cinkujj fehérjével alkotott komplexéből [67]. Az Sp1 fehérjével végzett vizsgálatok alapján a Ni(II)-szubsztitúciót követően sem szűnt meg a fehérje DNS-felismerése, azonban a felismert szekvencia módosult, ami feltehetően a torzult szerkezet következménye [84]. A cinkujj fehérjék Zn(II)-komplexei kevésbé hajlamosak oxidatív részecskék hatására oxidálódni, azonban a Ni(II) jelenléte katalizálhatja ezt a folyamatot [85].

A Cd(II) erősebb "soft" karakterű, mint a Zn(II). Ezért a tiolcsoportokkal alakítja ki a legstabilisabb komplexeket. Ugyanakkor biológiai rendszerekben nitrogén és oxigén donoratomokkal is képes kölcsönhatásba lépni. Modellpeptidekkel végzett vizsgálatok alapján, a Cys₂His₂ típusú peptidek két-három nagyságrenddel erősebben kötik a Zn(II)-t mint a Cd(II)-t, a Cys₃His esetében hasonló affinitásról beszélhetünk, a Cys₄ cinkujj motívumok esetében viszont már a Cd(II) javára mérhető ~3 nagyságrend eltérés [54,86-87]. Mindezek mellett Uwe Heinz és mtsai. a CP1 modellpeptidet felhasználva megállapították, hogy a „soft” karakterből adódóan ligandumfelesleg esetén biszkomplex képződhet, amelyben csak a cinkujj motívumok ciszteinjei koordinálódnak Cys₄ módon, majd 1:1 arányhoz közelítve fokozatosan kialakul a monokomplex Cys₂His₂ koordinációval [88].

A Cd(II) a fent említett módokon elviekben gátolhatja a cinkujj fehérjék DNS-felismerését, és így a transzkripciót, ami a fémion toxikus hatásának egyik lehetséges mechanizmusa [89], de a szakirodalomban ezzel kapcsolatban több ellentmondás található. A TFIIIA cinkujj fehérje nagy és kis stabilitású kötőhelyei ~2,5, illetve körülbelül egy nagyságrenddel gyengébben kötik a kadmiumot a Zn(II)-nél [90]. Ennek ellenére Petering és mtsai., valamint Hanas és mtsai. szerint a Cd(II) képes gátolni a Zn(II)-kötött TFIIIA DNS kötését [89,91-92]. A TFIIIA harmadik cinkujj alegységét tanulmányozva megállapították, hogy miután kialakul a Cd(II):cinkujj peptid 1:1 komplex, annak szerkezete nagyban hasonlít a Zn(II)-komplexhez, illetve (nemspecifikus) DNS-felismerése csak kis mértékben gyengébb [93]. A humán Sp1 cinkujj fehérjével kapott eredmények még ellentmondásosabbak, hiszen egyes publikációk alapján a Cd(II) képes volt gátolni a Zn(II)-kötött fehérje DNS-felismerését [94-96], míg mások nem tapasztaltak változást [97]. Ezen felül Kuwahara és mtsai. szerint az Sp1 fehérje Cd(II)-komplexe képes felismerni a fehérje specifikus DNS szekvenciáját, de az affinitása kisebb a Zn(II)-komplexénél [98]. Az eukarióta Ros87 Cys₂His₂ cinkujj fehérjének Cd(II)- és Zn(II)-affinitása összemérhető Malgieri és mtsai. szerint, illetve a két komplex másodlagos szerkezete is nagy hasonlóságot mutat. Ezen felül a Cd(II)-Ros87 is képes volt felismerni DNS célszekvenciáját, azonban meg kell jegyezni, hogy ez a fehérje csak egy cinkujj-alegységet tartalmaz egyéb fehérjerészekkel összekapcsolódva, így a DNS-kötésben feltehetően ezek az alegységek is szerepet játszanak [99]. Hasonló jelenséget figyeltek meg a két cinkujj alegységből felépülő Tramtrack fehérjénél, habár Cd(II)-komplexben a cinkujjak α -hélix tartalma és a fehérje DNS-affinitása kisebbnek bizonyult a Zn(II)-kötött formáénál CD és gélelektroforézis sáveltolódás mérések (EMSA) alapján [100]. A 6 Cys₂His₂ alegységből felépülő MTF-1 fehérjében a Cd(II) képes volt gátolni a DNS-kötést, akár az apo-formát, akár a Zn(II)-kötött fehérjét titrálták a toxikus fémionnal [101, 97]. Giedroc és mtsai. a szekvenciájuk alapján jobban eltérő három C-terminális cinkujj alegységet (4-6.) tanulmányozták rekombináns fehérjeként. Az NMR és UV-Vis mérések rámutattak, hogy a Cd(II) kötődik ezekhez az alegységekhez, de a kialakult komplex másodlagos szerkezete jelentősen különbözik a natív $\beta\beta\alpha$ -formától, amiért valószínűleg az 5. cinkujj alegység két ciszteinje között található nem megszokott aminosavak felelősek [102].

A szintén toxikusságáról ismert ólom főként Pb(II) oxidációs állapotban fordul elő. Elsősorban ciszteinekhez koordinálódik trigonális piramisos geometriát kialakítva. Nincsenek d-d átmenetből adódó elnyelési sávjai, azonban kölcsönhatása kén

donoratomokkal intenzív töltésátviteli sávokat eredményez az UV hullámhossz-tartományban. A kadmiumhoz hasonlóan a Cys₄ cinkujj fehérjékhez nagyobb az affinitása a cinknél, míg a hisztidint is tartalmazó szekvenciákat gyengébben köti [54,86]. Ennek ellenére kimutatható volt a TFIIIA Cys₂His₂ fehérje transzkripciós aktivitásának gátlása [89]. Érdekes azonban megjegyezni, hogy e fehérje Zn(II)-komplexének K_d értéke jóval nagyobb volt a modellkísérletekben használtakénál [74,90]. A Pb(II) képes volt megszüntetni a holo-Sp1 DNS-kötését [94], míg a Ros87 eukarióta cinkujj fehérje Pb(II) komplexe nem rendelkezik jól meghatározott másodlagos szerkezettel, nem képes megkötni a fehérje DNS célszekvenciáját, de a Pb(II) 1,5 nagyságrenddel gyengébben köti a fehérjét, mint a Zn(II), így nem képes eredményesen kiszorítani a Zn(II)-t a holo fehérjéből [103].

A réz jelenléte elengedhetetlen a szervezet megfelelő működése szempontjából. Cu(I) és Cu(II) oxidációs állapotban fordul elő, melyek közül sejteken belül az előbbi a domináns. A Cu(I) ismételten soft karakterű, így kén donoratomokkal alakít ki erős kölcsönhatást [104]. A modellpeptidekkel végzett vizsgálatok során a Cu(I) minden esetben kiszorította a Zn(II)-t komplexéből, és a CD mérések alapján a fehérje szerkezete is összeomlott [68, 104]. Azonban ezzel ellentétes eredmények is találhatóak a szakirodalomban [105], ami ugyancsak azt bizonyítja, hogy csak körültekintő módon lehet következtetéseket levonni. Egy új fehérje tanulmányozása során fontos megvizsgálni annak kölcsönhatásait fémionokkal. Cu(II)-vel még nem történtek klasszikus Cys₂His₂ cinkujj motívummal kompetíciós vizsgálatok, azonban egy amb2 fehérjéről mintázott ciszteint és hisztidint tartalmazó peptiddel, illetve a Ros87 fehérjével igazolták, hogy a fémion jelenlétében a ciszteinek részlegesen oxidálódnak. Ennek következtében több peptid is összekapcsolódhat diszulfid-hidakon keresztül, a redukálódott Cu(I) pedig véletlenszerű bekötődésével adduktumok képződését segíti elő [106-107].

Az Au(I), illetve Au(III) vegyületeket több évtizede alkalmazzák reumatoid arthritisz, valamint daganatos megbetegedések kezelésében, így szervezetbeli eloszlásukat is behatóan tanulmányozták [108]. Igazolták, hogy az Au(I) komplexet képez az Sp1-3 peptiddel, sőt ez négy nagyságrenddel stabilisabb, mint a Zn(II) komplex [109]. Az Au(I) lineáris geometriában koordinálódik, így egy monomer akár több fémion megkötésére is képes, valamint intermolekuláris kötések is lehetségesek [110]. Ezáltal a fehérje szerkezete összeomlik, így pedig a DNS-felismerés is megszűnik [111]. Au(III) jelenlétében bekövetkezhet a ciszteinek oxidációja, miközben a képződő Au(I) a fennmaradó tiolcsoportokhoz koordinálódik, ami tovább csökkenti a szerkezet rendezettségét [108].

A platinakomplexek az első ismert fémtartalmú rákellenes szerek, amelyeket azóta is széles körben alkalmaznak. Mivel a bejuttatott komplex ~1%-a fejt ki hatását DNS-hez kötődve, szükséges volt tanulmányozni, milyen kölcsönhatásokat alakíthat ki a fémion a szerkezet egyéb komponenseivel [112]. Az irodalmi adatok alapján az, hogy megtörténik-e egy cinkujj fehérjében a Zn(II) kicserélődése egy Pt(II)-vegyület jelenlétében, nagyban függ mind a platinakomplexben található ligandumoktól, mind a cinkujj fehérje szekvenciájától. A rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet általánosítani, azonban akadtak olyan esetek, ahol sikerült gátolni a cinkujj fehérjék DNS-felismerését [113-114].

A nanoméretű fémmezüst, illetve Ag(I)-komplexek felhasználása jelentősen növekszik elsősorban antimikrobiális, gyulladáscsökkentő és rákellenes tulajdonságaiknak köszönhetően [115-117]. A nanorészecskékből az ezüst képes Ag(I) formában a sejtmagba jutni [118]. CP1 modellpeptiddel végrehajtott vizsgálatok alapján az Ag(I) kiszoríthatja a Zn(II)-t, Ag_nS_n klaszterek képződése közben [119]. Cys_2His_2 és Cys_3His cinkujjakban az ezüst bekötődése rendezetlen, míg Cys_4 esetében α -helikális és torzult β -redős fehérjeszerkezetet okozott [119].

A Hg(II) toxicitása közismert, azonban az egyensúlyi vizsgálatokat, és az egyes eredmények összehasonlíthatóságát megnehezíti, hogy a Hg(II) igen nagy stabilitású komplexet képes kialakítani fiziológiás körülmények között Cl^- -ionokkal ($\lg\beta_{ML_2} = 13,23$) [120]. Annak függvényében, hogy a mérések milyen közegben történtek, egyes kutatások a Hg(II) és Zn(II) affinitását Cys_2His_2 cinkujj motívumokhoz összemérhetőnek tekintik, míg kloridionok hiányában a Hg(II) minden esetben nagyobb stabilitású komplexeket képez, mivel affinitása a ciszeteinekhez nagyobb a Zn(II)-nél [121]. Az alkalmazott körülmények függvényében található olyan publikáció, amelyben a Hg(II) nem volt képes gátolni a TFIIA DNS-kötését DNáz I emésztés alapján [92]. Más kutatók mérései alapján a Zn(II)-tartalmú cinkujj fehérjék szerkezete összeomlott szerves és szervetlen Hg(II) jelenlétében is, és a Zn(II)-tartalmú cinkujj fehérjék DNS-kötése is megszűnik [94,98,103].

2.2 Az ATCUN motívum

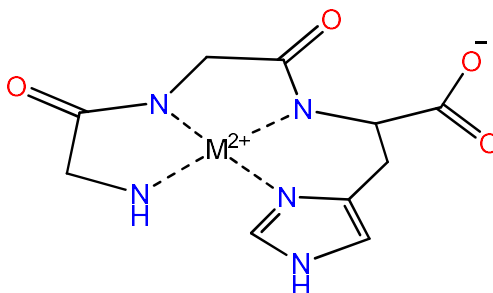
A nikkell szerepe biológiai folyamatokban 1975-től ismert, amikor sikerült azonosítani az ureáz enzimben, ahol Ni(II) oxidációs állapotban hidrolitikus folyamatot katalizál. A nikkell-vas hidrogenázokban, F430 koenzimben, Ni-SOD-ban redoxireakciókat katalizál váltakozó oxidációs állapota révén. Normál körülmények között a Ni(II) oxidációs állapot a kedvezményezett, és változatos sztereokémiával rendelkezik. A legtöbb esetben az oktaédes koordináció preferált a tetraédesrel szemben, de a ligandumtér erősségétől függően d^8 elektronkonfiguráció esetén kialakulhatnak síknégyzetes komplexek is. Habár a Ni(I), Ni(III) és Ni(IV) oxidációs állapotok nem stabilisak, de biológiai rendszerekben kialakulhatnak. Mivel a nikkell előfordulása a környezetünkben jóval meghaladja a szükséges napi mennyiséget (<1 mg/kg), így elsősorban karcinogén hatását tanulmányozták a szakirodalomban [122-123].

A réz szintén létfontosságú nyomelem, +1 és +2 oxidációs állapotban is előfordul a szervezetben. Hiánya és feleslege is komoly betegségeket okozhat (pl.: Menkes-, Wilson-kór), emellett vizsgálták az Alzheimer-kór kialakulásában játszott szerepét is [124].

Mindkét fémion többségében fehérjékhez kötődve fordul elő a szervezetben, különösen a hisztidin-, vagy cisztein-tartalmú motívumok alkalmasak a megkötésükre, de képesek peptidszerű koordinációra is – amikor a deprotonált amidcsoportokhoz, illetve esetlegesen az N-terminális aminocsoportokhoz koordinálnak [122].

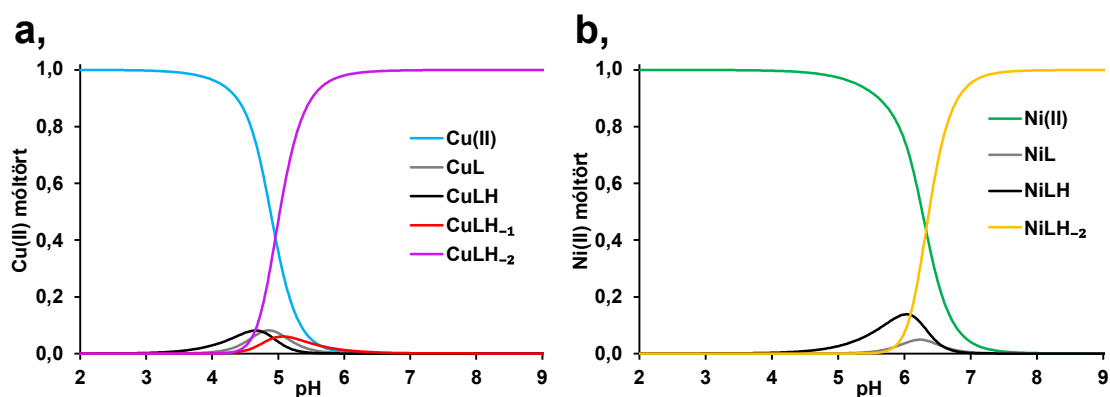
A szervezetben felszívódó Cu(II) 90-95%-a az α_2 globulinok közé tartozó ceruloplazminhoz kötődve raktározódik, míg a Humán szérumalbumin (HSA) köti meg a fennmaradó 5-10%-ot, egyben a Cu(II) transzportjáért is ez a fehérje felelős. A Ni(II) ~95%-a is HSA-hoz kötődve fordul elő a vérplazmában [125]. A HSA jelentős Cu(II) és Ni(II)-megkötő képességéért az N-terminális végén elhelyezkedő tripeptid részlet felelős, ahol a harmadik pozícióban egy hisztidin található. Ezt a szekvenciát a szakirodalomban ATCUN-motívumnak (Amino Terminal Cu(II) and Ni(II) binding site) nevezik, amelyben a fémion a „horgonykötőhelyként” funkcionáló imidazol-nitrogénhez (fehérjeszerű koordináció), a deprotonált amidnitrogénhez (peptidszerű koordináció), illetve az N-terminális aminocsoportokhoz koordinálódik. Az emberi szervezet egyéb fehérjeiben is található ATCUN motívum például az örökítőanyag DNS állományát védő HP2 (Humán Protain 2) fehérjében [126]. Az emberi szérumfehérje mellett a szarvasmarha (BSA) és patkány (RSA) albumin fehérjeje is tartalmaz ATCUN motívumot, de például kutyáknál ez a szakasz hiányzik [127].

Az ATCUN motívum síknégyzetes geometriájú komplexet alkot Cu(II)-vel, és Ni(II)-vel potenciometriás titrálások, NMR és UV-Vis spektroszkópiás és röntgen kristallográfiás mérések alapján (**2. ábra**) [128-130]. További vizsgálatok rámutattak, hogy a Co(III), Au(III), Pd(II), Pt(II) fémek is képesek hasonló geometriájú komplexek kialakítására az ATCUN motívummal [131-133].



2. ábra: A GGH Cu(II)-vel, és Ni(II)-vel alkotott MLH, valamint MLH₂ komplexének síknégyzetes szerkezete.

A Cu(II):GlyGlyHis (1:1) (továbbiakban GGH) rendszerben pH ~3-nál megjelenik a CuLH komplex (a kialakult komplexek töltéseit az egyszerűség kedvéért nem tüntetem fel), amelyben a Cu(II) a hisztidin imidazol oldalláncához koordinálódik. pH ~6 körül már ~100%-ban síknégyzetes geometriájú CuLH₂ forma van jelen és a korábban leírt módon koordinálódik (**3. ábra**). Az UV-Vis spektrumban 522 nm-nél a CuLH₂ komplexhez rendelhető csúcs ($\epsilon \approx 100 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) intenzitása fokozatosan nő (a komplex lila színű), majd pH ~6-nál eléri a maximumot. A köztes állapotok – CuL; CuLH₁ – csak kis százalékban fordulnak elő [130]. Nikkel esetében a csak imidazolhoz koordinálódott forma pH 4 felett kezd kialakulni, és a NiLH₂ komplex pH ~8 körül van jelen 100%-ban, amit az UV-Vis abszorbancia spektrumon 423 nm-nél megjelenő ($\epsilon \approx 150 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) sáv jelez (a komplex sárga színű) [134].



3. ábra: a, Cu(II) és b, Ni(II) GGH komplexek eloszlási diagramja. $c(\text{Cu(II)}) = 1 \text{ mM}$; $c(\text{Ni(II)}) = 1 \text{ mM}$; $c(\text{GGH=L}) = 1 \text{ mM}$ [134].

A szakirodalmi adatokat összegezve az ATCUN motívum stabilitása Ni(II)-vel $\lg\beta_{\text{Ni(II)}} = 19,19 - 23,37$, míg Cu(II)-vel $\lg\beta_{\text{Cu(II)}} = 24,65 - 25,96$ tartományban mozog fiziológias körülmények között [135-144].

2.2.1 ATCUN motívum kialakítása fehérjékben

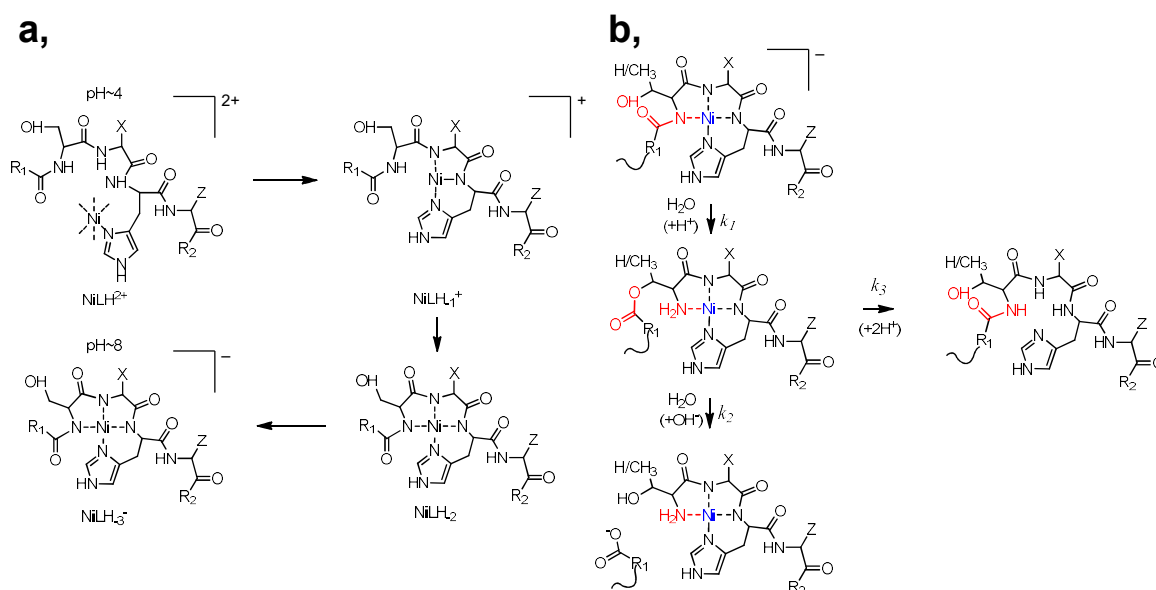
Az ATCUN-típusú koordináció mellett a Cu(II) és Ni(II) a legtöbb esetben fehérjeszerű koordinációban vesz részt, így több olyan fehérjének – és az ezekről mintázott modellpeptideknek – tanulmányozták a Cu(II) és Ni(II)-kötését, amelyek tartalmaztak hisztidint. A kromoszomális DNS-védelméért felelős hiszton H2A fehérje C-terminális régiójáról mintázott TESHHK hexapeptidet tanulmányozva azt találták, hogy Ni(II) hatására specifikusan elhasad a szerin előtti peptidkötés, és a folyamatban egy Ni(II)-SHHK ATCUN-típusú komplex alakult ki. A jelenséget a teljes fehérjével is sikerült reprodukálni *in vitro* és alanin-scan¹ segítségével igazolták, hogy a folyamatért a szerin és a szerintől két aminosav távolságra lévő hisztidin felelős, ezek hiányában a hidrolízis nem tud lejátszódni [145].

Egy peptidkönyvtár vizsgálatával megállapították, hogy a Ni(II) az -Naa-(Ser/Thr)-Xaa-His-Zaa-Baa- aminosav-szekvenciát képes hidrolitikusan elhasítani az Naa és Ser/Thr aminosavak között, ahol Baa bármilyen, Naa és Xaa prolin és cisztein kivételével bármilyen, Zaa cisztein kivételével bármilyen α ,L-aminosav lehet [146-147]. Az Xaa, Zaa és Baa pozícióban a terjedelmes hidrofób oldalláncokkal rendelkező aminosavak, míg a Ser/Thr helyen a szerin jelenléte jelentősen növeli a reakciósebességet a tömegspektrometriával követett vizsgálatok alapján, továbbá a pH és hőmérséklet emelése is kedvez a hidrolízisnek. Összességében a -Ser-(Arg/Lys)-His-(Trp/Tyr)-(Trp/Tyr/Phe)- szekvenciák esetén a legnagyobb a reakciósebesség [148-149].

A reakciót megelőzően a fémion elsőként a hisztidin imidazol nitrogénjéhez, majd a deprotonálódó amid nitrogénekhez koordinálódik, miközben az eredeti oktaédres geometria síknégyszetessé alakul (analog módon az ATCUN motívumok Ni(II)-komplexének kialakulásához) (4. ábra a.). A vizsgált peptidben Baa pozícióban (ábrán R₂) egy lizin helyezkedett el, amely szintén deprotonálódott pH ~ 8 felett, de ez a mechanizmus szempontjából nem lényeges. A NiLH₃ komplexben a hidrolízis első lépésében intramolekuláris N-O acilvándorlás megy végbe az Naa-(Ser/Thr) peptidkötés

¹ Az eredeti peptidszekvenciában egyesével kicserélik az aminosavakat alaninra, hogy megfigyeljék az adott módosítás befolyásolta-e a vizsgált folyamat lejátszódását.

nitrogéncsoportja és a (Ser/Thr) hidroxilcsoportja között. A köztitermék egy vizes közegben instabil észter, amely bázis-katalizált észter-hidrolízis során két peptidre esik szét [150]. Mivel a vizsgálatok alapján egyértelműen a fémion-indukált szerkezetváltozás idézte elő a hidrolízist, a reakció a karbonsavak fémkatalizált nukleofil szubsztitúciói közé sorolható. Ennek ellenére a folyamat mégsem tekinthető teljes egészében katalitikusnak, mivel a kialakult -(Ser/Thr)-Xaa-His- peptid stabilan megköti a Ni(II)-t. A reakció sztöchiometrikus, irreverzibilis és kétlépéses, az alábbi kinetikai modell alapján jellemezhető: $S \xrightarrow{k_1} IP \xrightarrow{k_2} P$. Mindkét részlépés sebességi állandója elsőrendű, az IP köztitermékhez koordinálódott Ni(II) gátolja annak visszaalakulását: $IP \xrightarrow{k_3} S$ (**4. ábra b**), [147].



4. ábra: **a,** Naa-(Ser/Thr)-Xaa-His-Zaa-Baa peptid Ni(II) komplexének kialakulása növekvő pH hatására; **b,** Naa-(Ser/Thr)-Xaa-His-Zaa-Baa peptid Ni(II) komplexének lehetséges reakciói: k_1 IP-észter köztitermék kialakulása, k_2 P-végtermék képződése a hidrolízis során, k_3 IP-észter köztitermék erőteljes megsavanyításával visszaalakul S-kiindulási peptidre [147-148].

Cu(II)-vel is hasonló módon megy végbe a reakció, de mivel az átmeneti CuLH₃ komplex ~1,5 egységgel kisebb pH-n alakul ki a Ni(II) analóghoz képest (**3. ábra**), így a hasadás már pH ~7-nél is lejátszódik. A hőmérséklet és pH növelése ebben az esetben is növeli a reakciósebességet, de Ni(II)-nél ez a hatás intenzívebb, így akár két nagyságrend eltérés is elérhető a reakciók sebességi együtthatói között pH ~9,5 felett 37 °C-on utóbbi javára [151]. A fent ismertetett reakció végterméke egy ATCUN motívumot tartalmazó peptid, és a hasításhoz szükséges szekvencia számos fehérjében előfordul a természetben (hisztonok, cinkujj fehérjék).

2.2.2 Az ATCUN komplexek DNS hasító tulajdonsága

Az ATCUN motívumok fémkomplexei képesek redoxireakciókat katalizálni, és hidroxilgyököket, vagy egyéb reaktív oxidatív részecskéket (ROS) generálni, ami tovább növelte a motívum iránti érdeklődést a kutatások során. Az aszkorbát-Cu(II) rendszerről ismert, hogy önmagában is kifejezetten hatékony gyökképző az alábbi mechanizmus szerint:

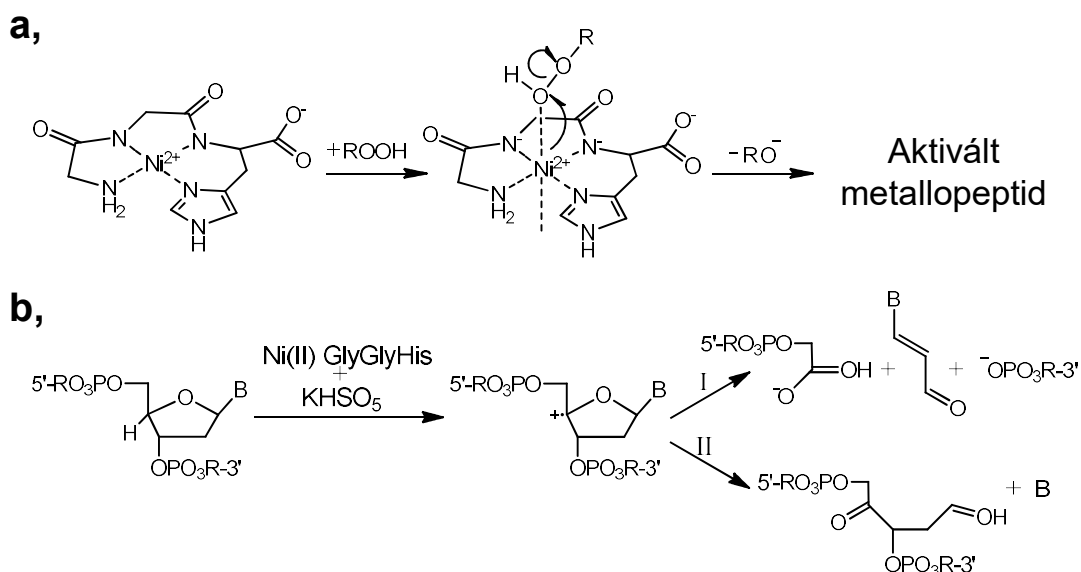


azonban a Cu(II) gyakorlatilag nem fordul elő szabadon a szervezetben, csak fehérjékhez kötött formában [152]. Ezzel szemben az ATCUN motívum nagy stabilitású Cu(II)-komplekképző, és egyes irodalmak szerint aszkorbinsav jelenlétében a gyökgenerálás azonos mechanizmus szerint játszódik le, mint szabad Cu(II)-vel, csupán a reakció sebessége lassabb [153]. Mivel ezzel párhuzamosan kimutatták, hogy az ATCUN motívumok fémkomplexei képesek nonspecifikus módon – egyes publikációk állítása alapján szelektíven – koordinálódni a DNS kisárákában [154-155], így a redukálószer jelenlétében termelődő hidroxilgyökök elsősorban a DNS-közelében lokalizálódnak, ez pedig DNS hasításhoz vezethet [126]. Az *in vitro* kísérletek mellett sikerült *Ehrlich ascites* tumorsejtek pusztulását is előidézeni Cu(II)-GGH komplexszel aszkorbinsav segédreagens jelenlétében [156].

Az ATCUN motívum Ni(II)-komplexével is kimutattak DNS hasítást, de itt aszkorbinsav nem alkalmazható, mivel a Ni(I) oxidációs állapot nem kedvezményezett. Habár a Ni(III) forma sem kedvezményezett, de kis spinszámú Ni(II) komplexek – például a síknégyszetes Ni(II)-GGH – oxidálhatók Ni(III) formává akár fiziológiás pH-n is, míg oligopeptidekkel ehhez magasabb pH-ra ($\text{pH} \geq 9$) van szükség [157-158]. Az oxidáció előidézhető H_2O_2 , KHSO_5 , magnézium monoperoxifalát (MMPP) segítségével, sőt egyes eredmények alapján a levegő oxigénje is alkalmas a feladatra [134,159-160].

Az előbb említett oxidálószereket alkalmazva segédreagensként a metallopeptid aktiválása azonos módon történik: a Ni(II) megköt egy hidroxilgyököt (Ni(III)-HO \cdot), vagy egy oxidiont (Ni(IV)=O) miközben a koordinációs mód átalakul síknégyszetesből oktaéderessé (**5. ábra a.**). Ez a folyamat UV-Vis spektroszkópiával is követhető mivel a síknégyszetes komplexre jellemző 425 nm abszorpciós maximum eltűnik és 375 nm-nél új sáv jelenik meg. A reakcióban az egyik javasolt mechanizmus szerint az aktivált komplex

hasít le egy hidrogénatomot a dezoxiribóz negyedik szénatomjáról majd két eltérő reakcióút valósulhat meg (**5. ábra b**).



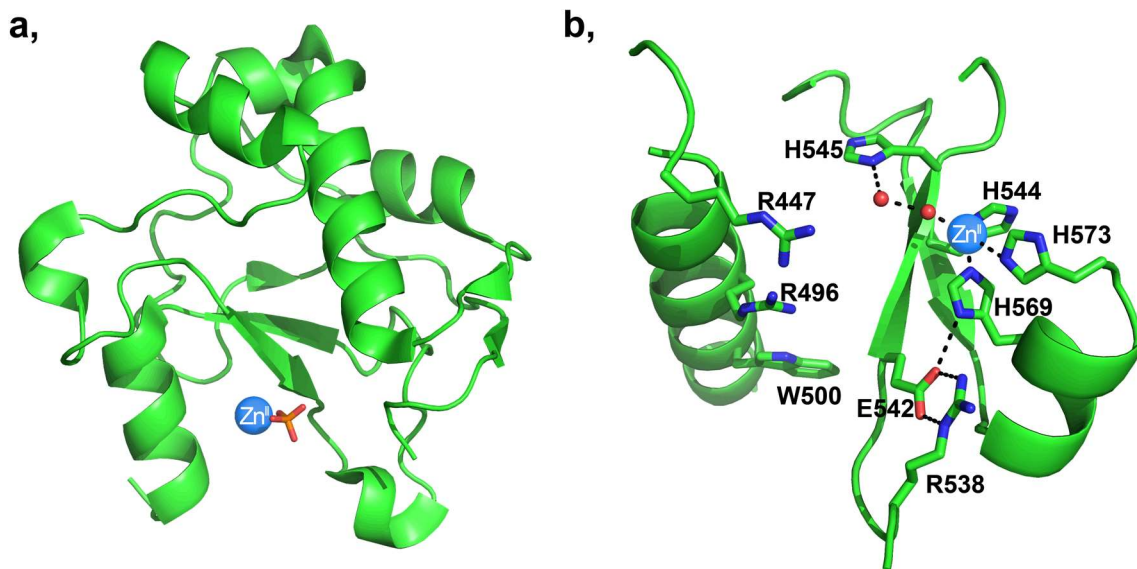
5. ábra: **a,** A Ni(II)-GGH komplex aktiválása; **b,** Az aktivált metallopeptid-DNS reakció lépései [155]

További harmadik pozícióban hisztidint tartalmazó ATCUN komplexekkel vizsgálódva arra jutottak, hogy az aminosavak befolyásolják a DNS hasítás mechanizmusát, például a Ni(II)-GGH a dezoxiguanozint, míg Ni(II)-LysGlyHis inkább a dezoxiadenozint és dezoxitimidint oxidálta [126,161].

A Cu(II) és Ni(II) komplexek mellett sikerült DNS hasítást kimutatni a Co(II)-ATCUN komplexekkel is fény hatására, ahol a javasolt mechanizmus szerint a levegő oxigénje oxidálta a Co(II)-t Co(III) formába [162].

2.3 A kolicin E7 nukleáz domén

A kolicin E7 (továbbiakban ColE7) az *Eschericia coli* baktériumokban termelődő egyik olyan nemspecifikus endonukleáz, amivel az ellenséges baktériumtörzseket képesek elpusztítani stresszhelyzetben. A ColE7 enzim mellett további variánsok is előfordulnak (pl.: E2, E8, E9), ezek mind hasonló működésűek, a nukleáz domének aminosav szekvenciája ~65%-ban megegyezik [163-164]. Az enzim aktivitása oly nagymértékű, hogy akár egyetlen molekula is képes egy sejt elpusztítására [165]. A kolicin E7 N-terminális végén egy receptorkötő domén, C-terminális végén a katalitikus aktivitásért felelős nukleáz (továbbiakban NColE7), a kettő között pedig egy membrán-transzlokációs domén található [166].



6. ábra: a, Az NColE7 kristályszerkezete, immunitás-fehérjéje (Im7) jelenlétében röntgenkristallográfia alapján (PDB kód: 1MZ8). A Zn(II) (világoskék gömb) negyedik koordinációs helyén a szubsztrátot modellező foszfátot (piros) található [167]; **b,** A Zn(II)-t koordináló H544, H569 és H573 aminosavak a HNH motívumban. A Zn(II) negyedik koordinációs helyét egy könnyen cserélhető vízmolekula foglalja el (piros gömb) tetraédres szerkezetben (PDB kód: 7CEI) [168].

Az NColE7 domén 131 aminosav hosszúságú és vegyesen található benne α -hélix, valamint β -redős másodlagos szerkezeti elem, illetve egy 22 aminosavból álló szakasz hidrofób zsebet képez (**6. ábra a,**) [168]. Az NColE7 nukleáz domén apo és holo formában is hasonló szerkezetű. Habár apo formában is képes a DNS megkötésére, de nukleáz aktivitása csak Zn(II)-jelenlétében van. Ekkor a fehérje C-terminális végén található ún. HNH motívumának 3 hisztidinje (H544, H569, H573) koordinálódik a fémionhoz, míg annak negyedik szabad helyén egy vízmolekula található, (**6. ábra b,**) amely helyére bekötődhet a DNS vagy RNS molekula foszfodiészter csoportja [164,169]. Azonban ha a vízmolekula helyére egy további hisztidin koordinálódik, az meggátolhatja a szubsztrát

kötését és a foszfodiészter kötés hidrolízisét. A fehérje mutációs vizsgálata alapján mind a négy hisztidin kulcsfontosságú az enzim működéséhez [170], illetve a motívumban található egy szintén jól megőrzött 560-as aszparagin ami a fehérje szerkezetének stabilizálásában játszhat szerepet hidrogénkötések révén [163]. A nukleáz csak az ún. Im7 immunitásfehérje génjével együtt fejeződik ki sejten belül, ennek hiányában az enzim az azt kifejező baktérium saját genomiális DNS-ét is képes feldarabolni [171]. Az Im7 az NColE7 DNS-kötő régiójához koordinálódva gátolja a fehérje nukleáz aktivitását. Az immunitás fehérje hiányában (és Zn(II) jelenlétében) az NColE7 aktivitása mindaddig megmarad, amíg az elérhető DNS szakaszok legalább 8 bázispár hosszúságúak. Ennek feltehetően az a magyarázata, hogy a DNS-kötő régió és a katalitikus központ nem azonos helyen található [163].

A kutatásokban egy további érdekességre is fény derült: habár az NColE7 enzimben a C-terminális régióban található a fehérje katalitikus központja, funkcióját mégsem képes ellátni a fehérje N-terminális szakasza hiányában [172]. A C-terminális régiótól számított 106 és 127 aminosavból álló csonkított fehérjék oldatbeli szerkezete kevésbé bizonyult stabilnak az eredeti NColE7-hez képest és a Zn(II)-affinitásuk is csökkent. Ezzel együtt azonban továbbra is képesek voltak a DNS megkötésére, csupán a hasítási funkció szűnt meg. Ennek oka elsődlegesen az N-terminális régióban található 447-es arginin (R447) hiánya, ami az összes kolicin toxinban megtalálható és feltehetően az elhasított DNS-t stabilizálja, és lassítja a reakció fordított irányú lejátszódását. További funkciója lehet a protontranszfer a folyamat során, mivel igen flexibilis [164]. Történtek vizsgálatok az NColE7 olyan verzióival is, ahol a N-terminális KRNK aminosavakat rendre glicinre cserélték [173]. Ezeknek a módosított fehérjéknek a Zn(II)-affinitása nem változott, ám a nukleáz aktivitásukban jelentős eltérések mutatkoztak az alábbi sorrend alapján: GGNG < GGNK ~ KGNG < KGNK << NColE7. Molekuladinamikai számítások alapján a GGNG verzió szerkezete módosult a legnagyobb mértékben, míg a KGNG és KGNK fehérjeverziókban az N-terminális toldalék közel tudott kerülni a foszfodiészter kötéssel szimuláló foszfát csoporthoz, így feltehetően pozitív töltésük révén a lizinek is képesek valamilyen mértékben stabilizálni az átmeneti állapotot [169].

Összegezve, az NColE7 fehérjében, az N- és C-terminális fehérjevégek térbeli közelsége és a pozitív töltésű aminosavak jelenléte az N-terminális részen elengedhetetlen a nukleáz aktivitáshoz [172,174].

2.4 Cinkujj fehérje-alapú mesterséges metallonukleázok tervezése

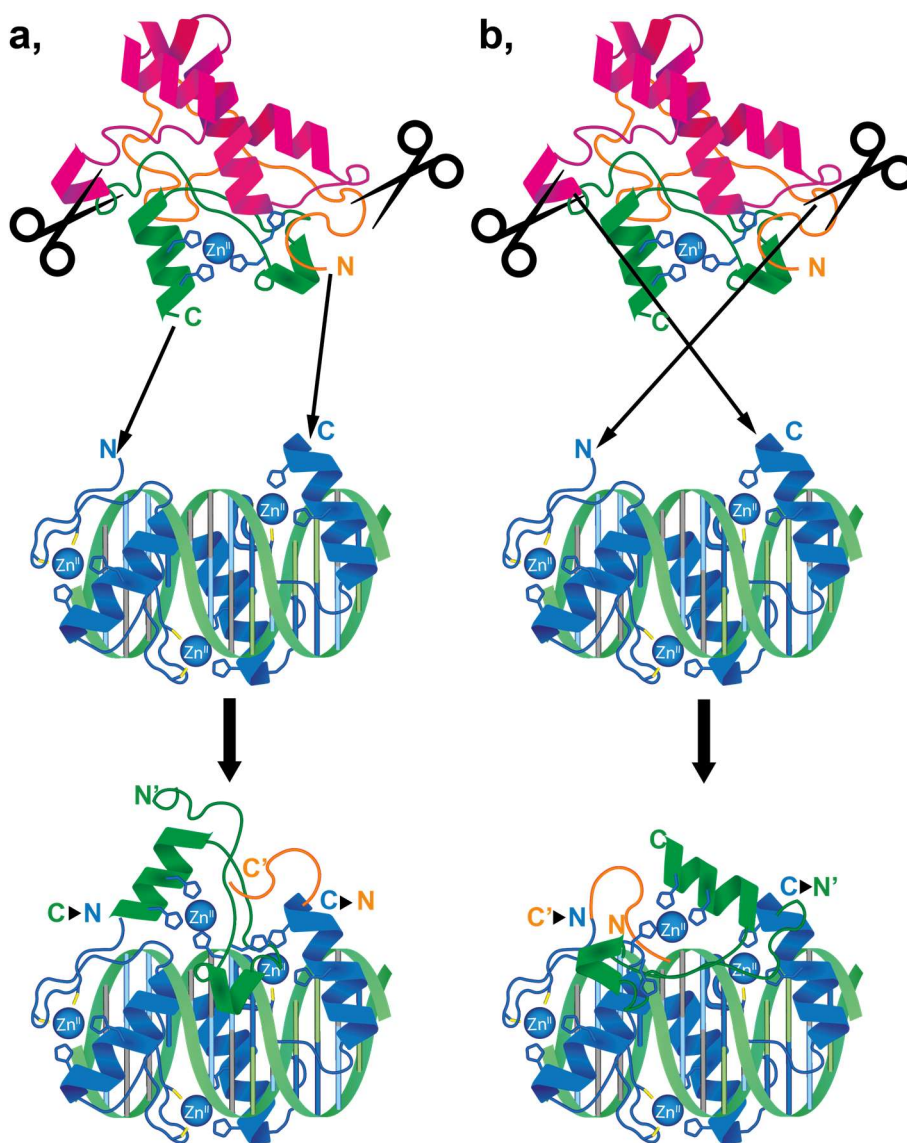
Egy gyógyászatban is alkalmazható nukleáznál elengedhetetlen, hogy könnyen újratervezhető legyen új célpontokhoz, és minden esetben nagy specifitással és alacsony citotoxicitással rendelkezzen. Emellett fontos, hogy amennyiben a fehérjében bárminemű degradáció következne be, az ne legyen többé funkcionális.

Habár specifikus nukleázok előfordulnak a természetben is, ezekkel csak bizonyos DNS szakaszokat lehet elhasítani és áttervezésük egyéb DNS szekvenciák felismerésére jelenleg rendkívül körülményes, mivel bonyolult másodlagos szerkezettel rendelkeznek. Akár csak egy nukleobázist felismerő aminosav módosítása a teljes fehérje szerkezetének módosulását is okozhatja. A korábbi fejezetekben jellemeztük a cinkujj fehérjék specifikus, moduláris DNS-felismerő képességét (**ld. 2.1.2 fejezet**), illetve néhány önmagában nemspecifikus nukleázt is (**ld. 2.2.2, 2.3 fejezetek**). Ezek kombinációjával elméletben lehetséges specifikus, könnyen újratervezhető nukleázok kialakítása is, ahol a cinkujj fehérje alegységek felelősek a DNS specifikus felismeréséért, míg a nukleáz alegység a hasításért, de immáron specifikus módon.

Az első sikeres mesterséges metallonukleázokkal végrehajtott kísérletben is cinkujj fehérjéket alkalmaztak, míg a nukleáz domén szerepét a FokI enzim nukleáz egysége töltötte be. A FokI Mg(II)-jelenlétében homodimer formájában képes felismerni az 5'-CATCC-3' DNS szekvenciát, majd az ezt követő 9. és a másik szálon a 13. bázispárnál hasítja el a foszfodiészter kötést [175]. A fehérje egy alegysége nem képes DNS hasításra, csak annak megkötésére [176]. A cinkujj-FokI mesterséges nukleázban a FokI DNS-felismerő doménjét cserélték le 3-4 alegységből álló cinkujj fehérjére. A kialakított nukleáz elméletben a természetes FokI nukleázhoz hasonlóan dimer formában képes csak működni, azaz $2 \times 9-12$ bázispárnyi DNS szakaszt ismer fel specifikusan [177]. Ezzel szemben a vizsgálatok alapján egy fehérje is képes volt DNS hasítást előidézni, tehát csak 9-12 bázispárnyi specifikus szekvenciáról beszélhetünk [178].

Habár az enzim képes volt specifikus DNS hasítást előidézni, azonban jelentős citotoxicitással is rendelkezett. Ennek egyik oka feltehetően az, hogy már nem csak homodimerként volt képes DNS hasításra, illetve amennyiben a sejten belül fragmentáció során lehasadt a cinkujj alegységekről a FokI nukleáz, az továbbra is aktív maradt, de immáron nemspecifikusan hasított [178].

Az előbb felvázolt problémára elviekben megoldást jelenthet, ha a nukleáz domén szerepét az NCoIE7 fehérje tölti be, mivel az NCoIE7 funkciója megszűnik, amennyiben a fehérje bármely része fragmentálódik (ld. 2.3 fejezet) [172,174].



7. ábra: a, C→ZF→N (straight) **b,** N→ZF→C (reverse) cinkujj-NCoIE7 fúziós nukleázok kialakításának sematikus ábrázolása. Cinkujj fehérje domének (kék), Zn(II) (kék gömbök), cinkujj fehérje által felismert DNS szekvencia (világoszöld), NCoIE7 katalitikus, C-terminális domén (zöld), NCoIE7 DNS-kötő domén (rózsaszín), NCoIE7 N-terminális domén (narancssárga), a két kiindulási fehérje N- és C-terminális végei rendre N és C betűkkel, az újonnan kialakult terminális végek N' és C'-vel vannak jelölve [179].

Kutatócsoportunk régóta foglalkozik cinkujj fehérje-NCoIE7 fúziós nukleázok kifejlesztésével. A két fehérje összekapcsolása kétféleképpen valósítható meg: az egyik esetben mindkét fehérje meglévő terminális végeit kapcsoljuk össze, majd az NCoIE7 szekvenciáját tetszés szerinti helyeken „elvágvva”² olyan fehérjéket kaphatunk, ahol az

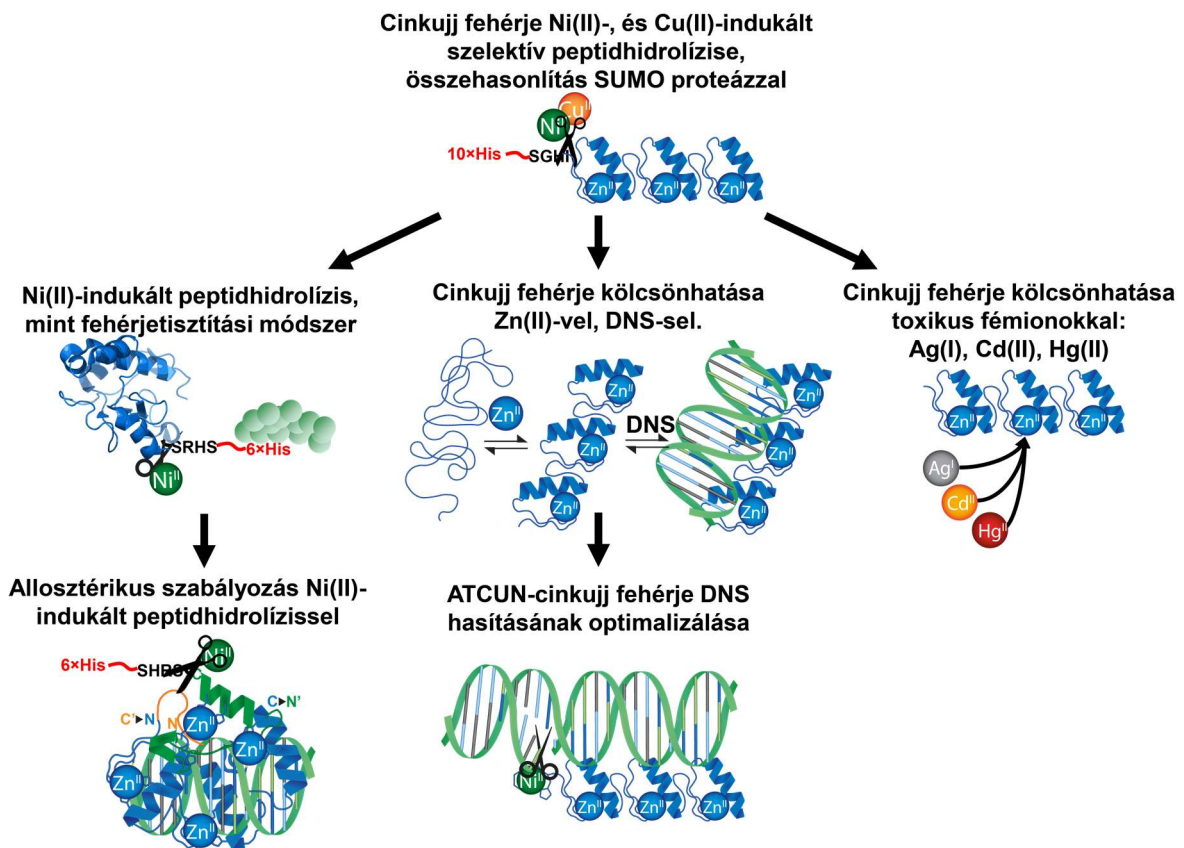
² A valóságban csak a fehérjéket kódoló génrészeket illesztjük össze.

eredeti NCoIE7 mindkét korábbi terminális vége a szekvencián belül helyezkedik el (7. ábra a.). Egy másik elgondolásban az NCoIE7 szekvenciáját két helyen „elhasítva”, majd a cinkujj doménekhez kapcsolva elviekben jobban megőrződik az NCoIE7 felépítése. Habár a molekuladinamikai számítások és nukleáz aktivitási kísérletek alapján mindkét koncepció működőképesnek bizonyult, azonban az enzimek aktivitása még finomhangolásra szorul [174,179].

A **2.2.2 alfejezetben** bemutatott ATCUN motívum alkalmazása, mint DNS-hasító motívum is felmerült a szakirodalomban. Itt nem beszélhetünk tényleges nukleáz aktivitástól, mivel nem a DNS foszfodiészter kötésének hidrolitikus hasítását idézi elő a motívum. Ebből adódóan a hasítás során kapott DNS molekulák végei nem hozhatók helyre homológ rekombináció (HR) révén, csupán abban az esetben, ha előzőleg a sejt visszabontja a DNS szálát, majd az úgynevezett nemhomológ végeket kapcsolja össze (non-homologous end joining, NHEJ) [180]. Ebből adódóan ATCUN-motívumot, mint „nukleáz” domént tartalmazó enzimek semmiképp sem ideális jelöltek génszerkesztés céljából, azonban daganatos megbetegedések kezelésére megfelelőek lehetnek, ahol nem cél a sejt helyreállítása, elegendő annak elpusztítása. Harold és mtsai. az ATCUN motívumot egy specifikus DNS-felismerő fehérjéhez (Fos138-211) kapcsolva specifikus DNS hasítást mutattak ki mind Cu(II), mind Ni(II) komplexekkel [153]. A szakirodalomban egy próbálkozás történt eddig, ATCUN motívum-alapú cinkujj nukleázok Ni(II) komplexének kialakítására. Ebben az esetben a humán Sp1 cinkujj fehérje N-terminális végéhez kapcsoltak egy GGH tripeptidet és ily módon sikerült detektálni DNS hasítást $5'$ - ^{32}P jelölt DNS-t alkalmazva [181].

3 Célkitűzés

A Ni(II) emberi szervezetre gyakorolt hatása többségében káros. A pontos hatásmechanizmus feltérképezése közben kiderült, hogy a Ni(II), illetve Cu(II) képes szelektív módon hidrolizálni fehérjéket, amennyiben azok tartalmazznak (S/T)XH motívumokat. Mindamellett, hogy ez a megfigyelés magyarázatot jelenthet a Ni(II) potenciális toxicitására, a szelektív hidrolízis kémiai szempontból is érdekes, mivel fehérjék szekvensspecifikus hasításához a legtöbb esetben enzimekre van szükség. Számos humán fehérje tartalmazhatja a hidrolitikus hasításhoz szükséges szekvenciát, többek között a gének átíródását szabályozó cinkujj fehérjék is. Az utóbbi évtizedekben a cinkujj fehérjékkel végzett kutatások több irányban is zajlottak: egyfelől még a mai napig sem ismert pontosan a működésük a szervezeten belül, továbbá egyes elképzelések alapján a cinkujj fehérjéket felhasználva lehetséges mesterséges metallonukleázok tervezése, amelyek segítségével kezelhetővé válnak daganatos megbetegedések, genetikai rendellenességek.



8. ábra: Doktori dolgozatomban érintett területek, és azok egymásra épülésének sematikus vázlatja.

A szakirodalmi előzmények alapján munkámban az alábbi kérdéseket igyekeztem megválaszolni:

1. Megvalósítható-e a Ni(II)-, és Cu(II)-indukált szelektív peptidhidrolízis egy cinkujj fehérje esetében?

Célom volt tanulmányozni, hogy a két fémionnal végrehajtott hidrolízis milyen módon megy végbe, és a folyamat milyen hatással van a cinkujj alegységek szerkezetére, a fehérje tulajdonságaira. A reakciót összehasonlítottam egy fehérje alapú proteáz segítségével végrehajtott hidrolízissel, valamint megvizsgáltam, hogy a reakciótermékekben mennyire lehet elkülöníteni az ATCUN motívum és a cinkujj alegységek komplexképzési sajátosságait.

2. Milyen kapcsolat van egy mesterséges cinkujj fehérje, modellpeptidek és természetes cinkujj fehérjék Zn(II) és DNS-kötése között?

A szakirodalomban számos cinkujj motívum Zn(II)-affinitására található adatok, ám teljes cinkujj fehérjéről csak elvétve, így az adatok összehasonlítása is nehézkes. Szintén kihívást jelent az egyes természetes fehérjék DNS-kötésének kvantitatív értelmezése. Célul tűztem ki a szakirodalomban elérhető cinkujj motívumok és az általam előállított mesterséges cinkujj fehérje termodinamikai sajátosságainak összehasonlítását. Továbbá annak vizsgálatát, hogy mekkora a háromtagú cinkujj fehérje affinitása és specifitása DNS szekvenciákkal szemben, ez hogyan viszonyul a természetes cinkujj fehérjék DNS-kötő tulajdonságaihoz, illetve milyen összefüggés van a fehérje DNS és Zn(II)-kötése között.

3. Hogyan hat kölcsön egy cinkujj fehérje Ag(I), Cd(II), Hg(II) toxikus fémionokkal?

Számos ellentmondás fedezhető fel a cinkujj fehérjék és toxikus fémionok kompetíciójával kapcsolatos közleményekben. Így célom volt alaposabban tanulmányozni ezeket a kölcsönhatásokat kvalitatív, és kvantitatív szempontból, külön kitérve a DNS célszekvencia hatására.

4. Alkalmazható-e a Ni(II)-indukált szelektív peptidhidrolízis fehérjetisztítási módszerként természetes szekvenciák előállítására?

A fehérjetisztítási folyamatokban gyakran alkalmazott affinitástoldalék eltávolítása sokszor elengedhetetlen, hogy a továbbiakban a pontos szekvenciájú natív fehérje tulajdonságait tanulmányozhassuk. Célom volt megvizsgálni, hogy erre

alkalmazható-e a Ni(II) a jóval drágább proteázok helyett, illetve, egy ilyen folyamat megvalósításának optimalizálása oldatban, vagy közvetlenül az affinitásgyantán.

5. Felhasználható-e a Ni(II)-indukált peptidhidrolízis enzimek allosztérikus szabályozásában?

Tanulmányoztam, hogy olyan fehérjék esetében, ahol csak a natív szekvenciájú enzim működőképes, alkalmazható-e egy Ni(II)-vel hidrolizálható affinitástoldalék a fehérje inhibíciójára/szabályozására. Amennyiben igen, ez a szabályozási mechanizmus tisztán allosztérikus jellegű, vagy koordinatív sajátosságok is szerepet játszhatnak a folyamatban.

6. Alkalmazható-e a cinkujj fehérjék Ni(II)-, vagy Cu(II)-komplexe, mint mesterséges specifikus DNS-hasító enzim?

Céljaim között szerepelt, hogy megvizsgáljam a szakirodalomban bemutatott ATCUN-cinkujj fehérje DNS-hasító enzim működése reprodukálható-e amennyiben Ni(II)-vel vagy Cu(II)-vel hidrolizált cinkujj fehérjét alkalmazunk. Továbbá, hogy mekkora egy ilyen enzim aktivitása, specifitása, és milyen mértékben befolyásolja ezeket az ATCUN motívum és a cinkujj alegységek közötti összekötő aminosavszekvencia.

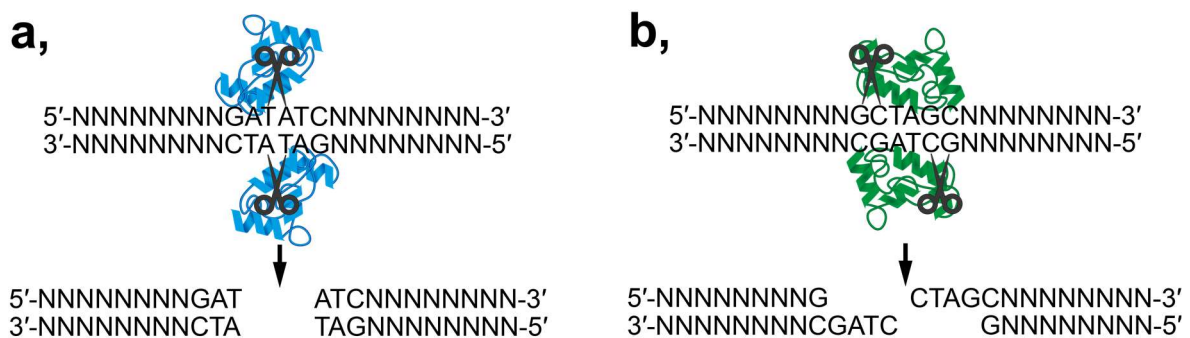
4 Kísérleti rész

4.1 Rekombináns DNS technológia

A rekombináns DNS technológiai eljárások segítségével különböző DNS szakaszokat módosíthatunk, építhetünk össze, majd ezt bejuttatva egy élőlénybe, új genetikai információt hozunk létre [182].

4.1.1 DNS hasítás

Új DNS szakaszok összeállításához szükséges a DNS szálak specifikus hasítása. Erre a célra olyan, természetben előforduló restriktív endonukleázok alkalmazhatók, amelyek nagy specifitással képesek felismerni viszonylag rövid ~5-6 bp hosszúságú palindrom DNS szekvenciákat, majd ezekben a foszfodiészter kötéseket elhasítják. Ha a DNS szálon egymással szemben történik a hasítás, akkor tompa végeket kaphatunk (blunt end), míg ellenkező esetben az egyik szál túlnyúlik, ezzel úgynevezett ragadós végek (sticky end) képződnek (9. ábra).



9. ábra: Restriktív endonukleázok által kialakított **a**, tompa; **b**, ragadós végű DNS-ek sematikus ábrázolása. A tompa végű hasítást EcoRV, a ragadós végű hasítást az NheI restriktív enzim példáján keresztül ábrázoltuk. N bármilyen nukleotidot jelölhet.

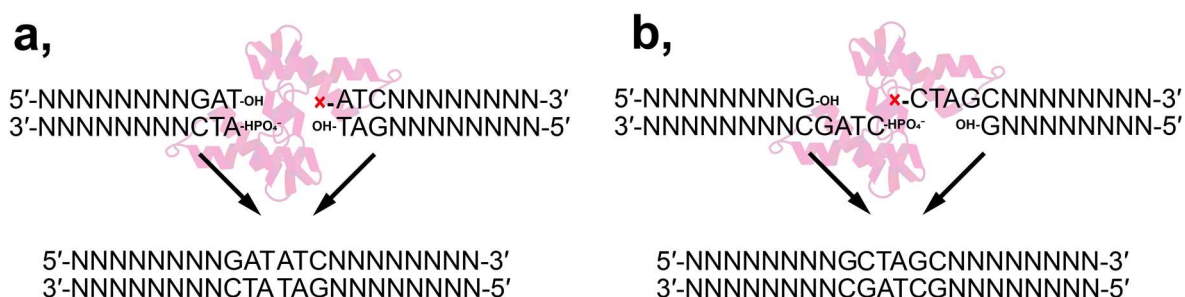
Munkánk során 100-500 ng DNS-t hasítottunk tipikusan 5 Unit³ enzim jelenlétében (pl.: BamHI, NheI, NcoI, EcoRI, HindIII, NdeI, XhoI (Thermo Scientific)) 1-4 óra alatt 37 °C-on, a gyártó által ajánlott pufferben, majd a nukleázokat hő sokk segítségével inaktiváltuk (65-80 °C, 10-30 perc).

4.1.2 DNS ligálás

Az elhasított DNS molekulákat ligáz enzim segítségével lehet „összeragasztani”. Tompa végek esetében bármilyen két DNS molekula összeilleszthető, míg ragadós végek

³ Restriktív endonukleázoknál 1 Unit az az enzim mennyiség, amely 1 µg DNS-t 1 óra alatt 37 °C-on 50 µl térfogatban 100%-ban elhasít.

esetében csak abban az esetben, ha a túlnyúló egyszálú DNS szekvenciák egymás komplemfnterei (**10. ábra**). Ebből adódóan, ha ragadós végeket hátrahagyó restriktációs endonukleázokkal hasítunk el két DNS-t, azok biztosan ligálhatók, és a ligálás során újra helyreáll a restriktációs enzim felismerési helye.



10. ábra: Ligálási reakció **a**, tompa; **b**, ragadós végű DNS szálak esetén. Az X-szel jelölt helyen foszfátcsoport és hidroxilcsoport is lehet, a ligálás mindkét esetben megvalósulhat Adenozin-trifoszfát (ATP) jelenlétében.

A tompa végű QuikChange reakciótermékeket 50 µl ligálási elegyben, 0,07 Unit/µl⁴ T4 DNS ligáz (Thermo Scientific, Toyobo) segítségével ligáltuk 1 órán keresztül 37 °C-on. A ragadós végű DNS-eket 0,15 Unit/µl enzim segítségével ligáltuk 12 órán keresztül 16 °C-on vagy 1 órán keresztül 37 °C-on. Az enzimet 65 °C, 10 perc inkubálással inaktíváltuk.

4.1.3 DNS foszforilálás-defoszforilálás

A munkánk során alkalmazott T4 DNS ligáz (Thermo Scientific, Toyobo) képes abban az esetben is összeilleszteni két DNS szálát, amennyiben a két szál közül csupán az egyik tartalmaz 5' foszfátcsoportot (**10. ábra**), amennyiben mindkét foszfátcsoport hiányzik már nem történik ligálás. Ez lehetőséget teremt arra, hogy két DNS összeillesztése során elkerüljük, hogy ugyanazon DNS két vége egymással kapcsolódjon össze. A DNS hasítása után az 5' végen elhelyezkedő foszfátcsoportot, a FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific) enzim segítségével lehet eltávolítani. Az enzimet 1 Unit⁵ mennyiségben alkalmaztuk (10 perc, 37 °C), majd 5 percen keresztül 75 °C-on inaktíváltuk.

A szilárdfázisú oligonukleotid szintézis segítségével előállított oligonukleotidok 5' végein hidroxilcsoport található, így ahhoz, hogy a ligálási reakciókat végrehajthassuk, esetenként szükség lehet az egyik vagy másik lineáris DNS molekula foszforilálására vagy defoszforilálására. Kísérleteink során 10 Unit⁶ T4 Polinukleotid kináz enzimet (Thermo

⁴ Ligáz esetén 1 Unit/µl koncentráció az az enzimkoncentráció, amely 1 nmol ³²P-jelölt pirofoszfátot ATP-vé alakít 20 perc alatt 37 °C-on 66 mM Tris-HCl pH 7,6 6,6 mM MgCl₂ 10 mM DTT 66 µM ATP pufferben.

⁵ Alkalikus foszfátáz enzimmél 1 Unit az a mennyiség, amely képes 1 µg DNS 5'-végeiről 10 perc alatt 37 °C-on 100%-ban eltávolítani a foszfátcsoportokat.

⁶ T4 Polinukleotid Kináz esetén 1 Unit jelenti azt a mennyiséget, amely képes 1 nmol DNS-t foszforilálni 30 perc alatt 37 °C-on.

Scientific) alkalmaztunk 1 μM ATP jelenlétében ~ 45 μg lineáris DNS foszforilálásához (20 perc 37 °C), majd az enzimet 10 percen keresztül 75 °C-on inaktiváltuk. A reakció során az enzim az ATP-ről viszi át a foszfát csoportokat a DNS 5'- végére.

4.1.4 Transzformálás

A ligálási reakciót követően egy olyan vegyes DNS elegyünk van, amely legalább egy, általunk tervezett DNS molekulát tartalmaz, emellett pedig számos egyéb nemkívánt terméket. A legegyszerűbb szelekciós módszer, ha a DNS molekulákat baktériumsejtekbe juttatjuk be. Egy baktériumsejten belül nem maradhat fenn két olyan DNS hordozó, amelyek replikációs origójukban megegyeznek, de a szekvenciájukban valahol eltérés található. Ezesetben a sejt az egyik DNS-t lebontja. Ezzel a sejtek kvázi elvégzik a DNS molekulák szelektálását. További egyszerűsítést jelent, hogy a legtöbb rekombináns DNS hordozó tartalmaz antibiotikum-rezisztenciát kódoló génszakaszt, így antibiotikum-tartalmú táptalajon csak azok a sejtek maradnak életben, amelyekbe bejutott egy körkörös DNS hordozó.

A folyamat végrehajtásához olyan sejtekre van szükség, amelyeknek a sejtfalát előzőleg fellazítottuk, ezeket kompetens sejteknek nevezzük. Kompetens sejtek előállíthatók elektroporációval, illetve CaCl_2 segítségével. Kutatásaink során mi utóbbi technikát alkalmaztuk. Az eredetileg antibiotikum-rezisztenciát és körkörös DNS hordozót még nem tartalmazó baktériumsejteket LB-agar táptalajon szaporítottuk egy éjszakán át 37 °C-on, majd egy telepet 5 ml antibiotikummentes LB tápoldatba oltottuk át. A sejteket 37 °C-on 150-200 percenkénti fordulatszámmal (RPM) rázattuk ~ 1 OD_{600} érték eléréséig, majd 50 ml antibiotikummentes LB oldatba átolttva, további 3 órán keresztül ~ 1 OD_{600} értékig.

A sejtszuszpenziót jégen hűtöttük, a sejteket centrifugálással üleptítettük, (4000 g 10 perc 4 °C) majd 25 ml 0 °C 0,1 M CaCl_2 oldatban szuszpendáltuk. 1 óra inkubáció alatt a Ca(II) hatására a sejtfal fellazult, ezután a sejteket ismét üleptítettük, végül 4 ml 0,1 M CaCl_2 15 (V/V)% glicerin oldatba szuszpendáltuk, és 50-100 μl adagokban -80 °C-on tároltuk felhasználásig.

Egy tipikus transzformálás során 50 μl DH5 α kompetens sejtet kevertünk össze jégen ~ 100 ng DNS-sel, majd jégen tároltuk az elegyet 1 órán át. Ezután hősokkot alkalmaztunk, hogy a kompetens sejtek pórusai bezáródjanak (42 °C 2 perc, 0 °C 2 perc). A sejteket 50-100 μl 37 °C-os antibiotikummentes LB tápoldat hozzáadását követően inkubáltuk (1 óra, 37 °C), majd 50-150 μl szuszpenziót, antibiotikum-tartalmú (100 ng/ μl ampicillin vagy 50 ng/ μl kanamicin) LB+-agar Petri csészékre szélesztettünk és inkubáltuk (37 °C,

12-16 óra). A továbbiakban az antibiotikum jelenlétét a tápoldatban, táptalajokban LB+ jelöléssel tüntettük fel.

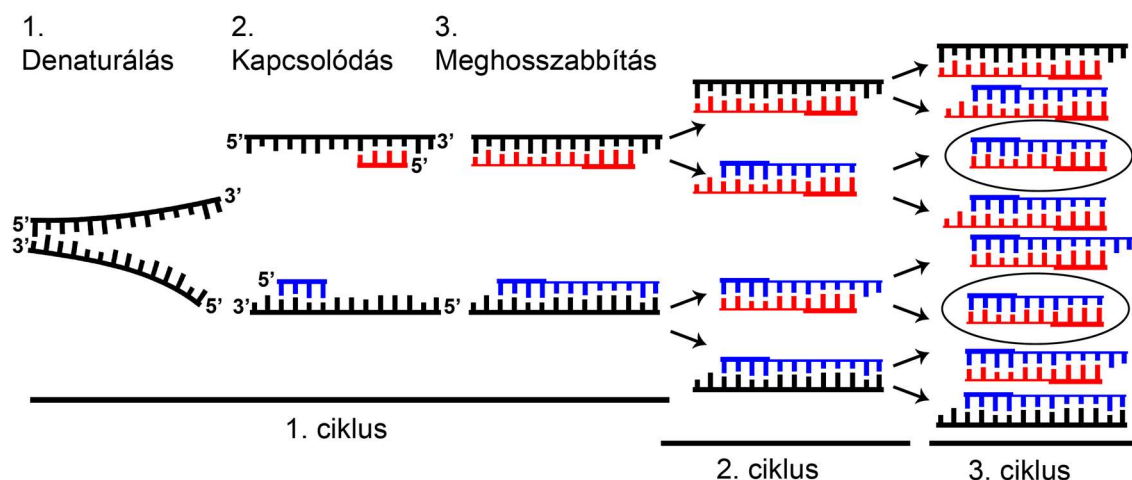
4.1.5 Polimeráz láncreakció

A polimeráz láncreakció (PCR) segítségével DNS szakaszok sokszorosíthatók, amennyiben a kiválasztott régió két végén ismert a DNS szekvencia. Első lépésben olyan oligonukleotidokat (primerek) kell szilárdfázisú oligonukleotid szintézis segítségével előállítani, amelyek a sokszorosítandó DNS szakasz (templát) két szálának 5'-végeivel azonosak és ~12-20 nukleotid (bp) hosszúságúak. Ezek az oligonukleotidok hozzátapadnak a linearizált DNS templát komplementer 3' végeihez, ezzel pedig indító szekvenciaként funkcionálnak a DNS polimerizációhoz. A polimeráz enzim a primerektől indulva 5'→3' irányban megkezd az új szál felépítését megfelelő építőegységek, dezoxi-nukleozid-trifoszfátok jelenlétében.

A folyamat emberi szervezetben is végbemegy, ám itt további fehérjékre is szükség van, amelyek kitekerik a kromoszómákat, és a DNS két szálát szétválasztják, ezzel lehetőséget adva, hogy polimeráz enzim által előállított komplementer oligonukleotidok és a polimeráz enzim hozzáférjen a sokszorosítandó régióhoz. Az *in vitro* PCR során magas hőmérsékletet alkalmazunk a DNS szálak szétválasztására. A reakcióhoz speciális hőtűrő polimeráz enzimekre van szükség. Az enzim működéséhez elengedhetetlen a Mg(II)-jelenléte.

A reakciót a hőmérséklet programozott változtatásával szabályozhatjuk. Első lépésben (denaturálás) 94-98 °C-on a kiindulási DNS két szála közötti hidrogénkötések felbomlanak. Második lépésben (kapcsolódás) a hőmérsékletet olyan értékre csökkentjük le, ahol a primerek hozzákapcsolódnak a DNS szálaihoz. Ez az érték jellemzően a primer olvadási hőmérséklete ± 5 °C. Harmadik lépésben (meghosszabbítás) a DNS-polimeráz az egyszálú DNS-ekhez kapcsolódott primerektől megkezd az új szál szintézisét. Az alkalmazott hőmérséklet az enzim fajtájától függően 65-72 °C között alakulhat. A DNS-polimerázok többségére igaz, hogy a reakció körülményei között egy perc alatt ~1000-2000 nukleotidot építenek a láncba, így a meghosszabbítás ideje a sokszorosítandó szakasz hosszától függ. Ezt a három lépést egy ciklusnak tekintjük, és a folyamat végén a kiindulási sokszorosítandó DNS szakaszból immár kétfő lesz. A ciklust többször megismételve a DNS mennyisége exponenciálisan növekszik, amíg el nem fogynak az építőegységek, ami általában 30-35 ciklust követően történik meg. Amennyiben hosszabb kiindulási DNS-t alkalmazunk, mint a sokszorosítandó régió, akkor minden ciklusban képződik nem

megfelelő hosszúságú szakasz is, de ezeknek a száma csak lineárisan nő, így harminc ciklus után ezek aránya elhanyagolható (11. ábra).



11. ábra: Egy PCR első három ciklusa. Az első ciklus részlépéseit külön tüntettem fel. A várt kétszálú termék (bekarikázva) a 3. ciklustól kezdve képződik.

A kísérleteket MJ Research PTC-150 és BioRAD iCycler PCR készülékben hajtottuk végre. DreamTAQ (Thermo Scientific), Phusion High Fidelity (Thermo Scientific), vagy KOD –Plus (Toyobo) polimerázt alkalmaztunk a gyártók protokolljait követve.

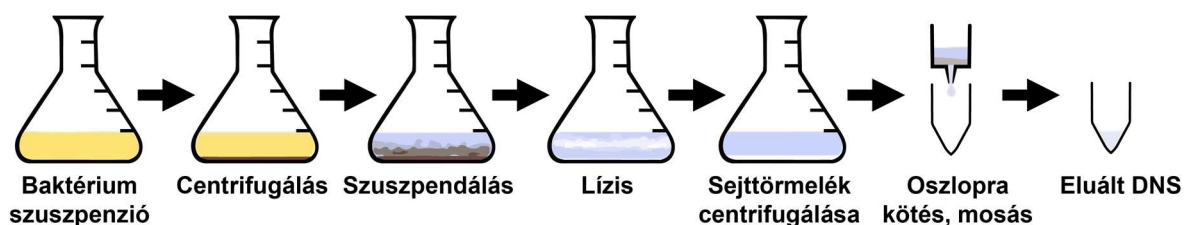
4.2 DNS hordozó sokszorosítás, tisztítási módszerek

Nagyobb mennyiségű körkörös bakteriális DNS hordozó előállításához a Petri csészén felnevesztett baktériumtelepeket egyesével antibiotikum tartalmú (100 ng/μl ampicillin vagy 50 ng/μl kanamicin) LB+ tápoldatba juttattuk, majd inkubáltuk (37 °C, 150-200 RPM rázatás), amíg a szuszpenzió zavarossága el nem érte az ~1-2 OD₆₀₀ értéket.

Az így előállított sejtsuszpenzióból későbbi felhasználás céljából minden esetben glicerines törzsoldatot készítettünk (20 (V/V)% glicerinnel), amit -75 °C-on tároltunk, amivel elkerülhető az ismételt transzformálás szükségessége. Kismennyiségű DNS előállításához (small scale) ezen a ponton a fennmaradó oldatból a sejteket centrifugálással ülepítettük (14000 g, 2 perc). Nagyobb mennyiségű DNS előállításakor az 5 ml sejtkultúrából 100-250 μl-t 250 ml antibiotikum tartalmú LB+ tápoldatba oldottunk át, ezt tovább inkubáltuk (37 °C, 150-200 RPM rázatás) ~1-2 OD₆₀₀ érték eléréséig, majd a sejteket centrifugálással ülepítettük (4000 g, 15 perc, 4 °C) és a felülúszót dekantáltuk. A sejteket RNáz A-tartalmú oldatban szuszpendáltuk fel, ami elbontja az RNS molekulákat, majd a DNS hordozókat alkalikus lízis segítségével nyertük ki a sejtekből (0,1 M NaOH és 1 (m/V)% SDS⁷(nátrium-

⁷ 1 g SDS 100 ml oldatban

dodecil-szulfát)). Lúgos közegben a DNS két szála elválék egymástól, majd az elegyhez kálium acetát puffert (pH 5,2) adva a pH hirtelen lecsökkent. Így a bakteriális körkörös DNS-ek ismét kétszálúvá alakulnak, míg a genomiális DNS a gyors pH változás hatására nem tud hibridizálódni, és kicsapódik a fehérjékkel és egyéb sejtalkotókkal együtt. Az oldhatatlan komponensek centrifugálással távolíthatók el (14100 g, 2 perc, vagy 20000 g 30 perc, 4 °C).

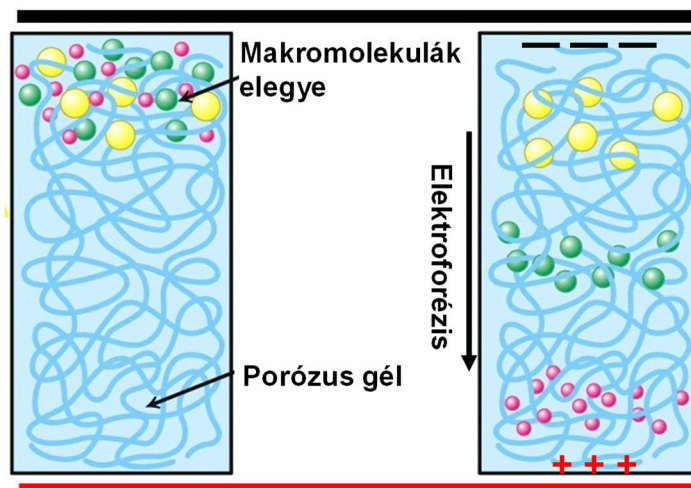


12. ábra: Bakteriális DNS hordozó tisztításának sematikus folyamatábrája

A DNS hordozót tartalmazó felülúszót anioncserélő oszlopra felvéve, a DNS enyhén savas közegben megkötődik, a többi még jelenlévő szennyező pedig átmosható etanol és izopropanol-tartalmú oldatokkal. A tiszta DNS semleges, enyhén lúgos közegben (1× TE pufferrel) eluálható a gyantáról (12. ábra). Munkánk során kismennyiségű DNS tisztításához a ZR Plasmid Miniprep-Classic kit-et, nagymennyiségű DNS-hez a GeneJet Plasmid Maxiprep Kit-et és a Geneaid Maxi Plasmid DNA Kit-et használtuk.

4.3 Gélelektroforézis

Elektroforézisen töltéssel rendelkező részecskék elektromos erőter hatására történő vándorlását értjük olyan közegben, amely lehetőséget nyújt azok szétválasztására.

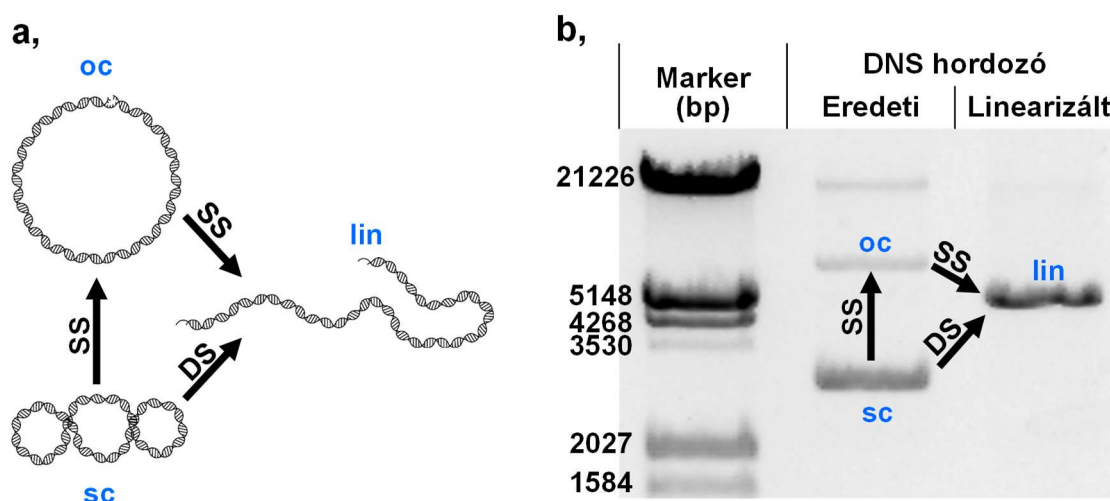


13. ábra: Gélelektroforézis sematikus vázlatja: A töltéssel rendelkező makromolekulák elegyét a porózus gél előre kialakított üregeibe töltjük, majd elektroforézis során azok az ellentétes töltésű elektród felé indulnak el. Vándorlásuk sebességét a gélben az effektív töltésük, alakjuk, méretük, géllal való kölcsönhatásuk befolyásolja így a különböző molekulák fokozatosan szétválasztódnak [183].

A DNS vagy fehérje minták elválasztásához agaróz vagy poliakrilamid gélt alkalmazunk. A pozitív töltésű részecskék a katód, a negatívak az anód felé vándorolnak. Ennek sebességét befolyásolja a gél sűrűsége, pórusátmérője, az alkalmazott feszültség, a makromolekulák töltéssűrűsége, mérete és alakja (**13. ábra**).

4.3.1 Agaróz gélelektroforézis

A térhálós szerkezetű agaróz géleket elsősorban nagyobb méretű (>100 bp) DNS keverékek elválasztására használjuk. A nukleinsavak foszfátcsoportjaik révén negatív töltéssel rendelkeznek, így az anód felé vándorolnak. Haladásuk sebessége méretük logaritmusával ellentétesen arányos.



14. ábra: Bakteriális DNS hordozó különböző formái **a**, sematikusan ábrázolva; **b**, 1 (m/V)% agaróz gélben futtatva. sc: szuperhelikális, oc: nyílt cirkuláris, lin: lineáris forma. DS: kétszálú DNS hasítás, SS: egyszálú DNS hasítás. Marker: EcoRI, HindIII hasított λ marker.

A vizsgálatok során használt bakteriális DNS-ek három fő formáját⁸ különböztethetjük meg. Normál állapotban szuperhelikális formában fordulnak elő (sc), amennyiben egyik szálban sem fordul elő hasadás. Szerkezetük többszörösen feltekeredett, így rendkívül kompakt. A gélben ez a forma képes a legkönnyebben előrehaladni elektroforézis során. Ha a szuperhelikális DNS két szálának egyikén hasadás történik (SS), nyílt cirkuláris forma alakul ki (oc), mely a három forma közül leglassabban jut át a gél pórusain. Amennyiben a szuperhelikális DNS-ben kétszálú hasítás történik (DS) lineáris (lin) formájúvá alakul, és többnyire rendezetlen alakjának köszönhetően a szuperhelikális és nyílt cirkuláris forma között vándorol a gélben. Szintén lineáris forma alakul ki, ha egy nyílt

⁸ A szakirodalomban gyakran eltérő konformációkként hivatkoznak az eltérő formákra, habár nem teljesen azonos molekulákról beszélünk.

cirkuláris DNS-ben a felnyílt szállal átellenes pozícióban további egyszálú hasítás következik be (**14. ábra a.**). Számos esetben megfigyelhető egy sáv a géleképeken, amely a leglassabban fut, és ez feltételezések szerint a DNS aggregálódásából adódhat. Ezt konkatermernek nevezzük, de a legtöbb vizsgálat során nem vesszük figyelembe (**14. ábra b.**). A DNS kimutatására gélben elosztatott etídium-bromidot alkalmazunk, amely interkalálódik a kettős hélix szerkezetébe, és ilyen formában UV fény hatására látható fényel lumineszkál. Az agaróz gélre – a vizsgált mintákkal párhuzamosan – ismert méretű DNS-ek elegyét (marker) is felvisszük. Ezekkel összehasonlítva a DNS mérete megbecsülhető. Munkánk során 5 µl felvitt DNS mellé 1 µl hatszoros töménységű glicerin-tartalmú festékoldatot (Loading Dye) adagoltunk, amely biztosította a könnyű mintafelvételt, és a kék festék segítségével nyomon követhető volt az elektroforézis előrehaladása. Az elektroforézist horizontális elrendezésű futtatókádban 100 V-on, általában 30-60 percig végeztük.

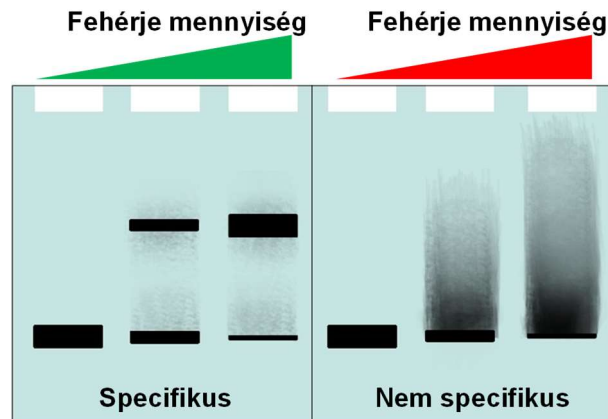
4.3.2 Poliakrilamid gélelektroforézis

Az akrilamid gyökös polimerizáció során hosszú elágazásmentes poliakrilamidot képez. A gyökös reakció katalizátoraként N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamint (TEMED) használunk, az iniciátor pedig ammónium-peroxo-monoszulfát (APS). Az akrilamid vizes oldatába megfelelő arányban bisz-akrilamidot keverve térhálós polimert kapunk, amely alkalmas fehérjék, illetve kisebb méretű (< 100 bp) DNS szakaszok elválasztására. Megkülönböztethetünk natív (natív-PAGE), valamint nátrium-dodecil-szulfátot tartalmazó (SDS) poliakrilamid géleket (SDS-PAGE).

Natív gélben a fehérje előrehaladása az oldalláncainak töltése mellett a makromolekula alakjától is függ. Ha előzőleg SDS-sel, illetve β-merkaptóetanollal kezeljük a fehérjemintákat, akkor azok egységesen „szivar” alakot vesznek fel, és méretükkel arányos negatív töltésre tesznek szert, mivel az SDS az aminosavak oldalláncaihoz kapcsolódik hidrofób kölcsönhatások révén. Az így kezelt fehérjék méretük, azaz molekulatömegük alapján elkülöníthetők, illetve ismert molekulatömegű fehérjék elegyével (marker) párhuzamosan futtatva molekulatömegük becsülhető. A fehérjesávok előhívására leggyakrabban az eredetileg textilipar számára kifejlesztett Coomassie Brilliant Blue festéket használják, mivel az a gélben csak a fehérjékhez kötődik hozzá. Kutatásaink során 16,5 (m/V)% Tricin-SDS-PAGE géleket használtunk (120 V, 4 h) a fehérjék vizsgálatára.

4.3.3 Gélelektroforézis sáveltolódás vizsgálat

A fent említett agaróz és poliakrilamid gélelektroforézis segítségével fehérje-DNS kölcsönhatások kimutatása is lehetséges, melynek alapja, hogy amennyiben a DNS-hez fehérje köt hozzá, az lassabban halad előre gélben, mint szabad formában. A specifikus és nem specifikus kölcsönhatások is elkülöníthetők ily módon az ionerősség változtatásával (15. ábra). A módszert angol elnevezése alapján (Electrophoretic Mobility Shift Assay) általában EMSA-nak rövidítik.



15. ábra: DNS sáv eltolódása gélben növekvő fehérjefelesleg hatására specifikus, illetve nem specifikus kölcsönhatás következtében sematikusán ábrázolva.

Az EMSA kísérletekben 34 bp hosszúságú DNS molekulákat alkalmaztunk. Az 1MEY# cinkujj fehérje specifikus (5'-GAGGCAGAA-3') szekvenciáját tartalmazó S1 DNS-t az 5'-GAATTCCTGCTGAGAGGCAGAAACATAGGGGTCG-3' és 5'-CGACCCCTATGTTTCTGCCTCTCAGCAGGAATTC-3' oligonukleotidok, a nonspecifikus S0 DNS-t a 5'-CTAGTTTGCTGAACTGGGGTCACATAGATTAATA-3' és 5'-TATTAATCTATGTGACCCAGTTCAGCAAAGTAG-3' oligonukleotidok hibridizálásával állítottuk elő. Az oligonukleotidok szilárdfázisú oligonukleotidszintézis révén készültek el (Invitrogen). A kísérletek során 6 (m/v)% natív PAGE-t használtunk, ami 29:1 arányban tartalmazott akrilamidot és bisz akrilamidot. A felesleges akrilamid eltávolítása érdekében a gél 60 percig előfuttattuk üresen (4 °C, 100 V). A futtatásokat 4 °C-on hajtottuk végre 30 percig 12,5 mM Tris, 96 mM glicin (pH 8,3); pufferben vertikális futtatókádban (Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad)). A mintákat 10 mM HEPES (pH 7,4); 150 mM NaClO₄, 10 (m/V)% glicerin pufferben állítottuk össze, majd 5 µl-t vittünk fel a géltre. Referenciaként minden esetben 5 µl FastRuler Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific) markert alkalmaztunk. A géleket futtatást követően 0,5 µg/ml EtBr

festéssel (15 perc) tettük láthatóvá. Az eredményeket Uvitec BTS 20MS készülékben dokumentáltuk.

4.4 Spektroszkópiás vizsgálati módszerek

4.4.1 UV-Vis spektroszkópia

Ultraibolya-látható (UV-Vis) spektroszkópia abban az esetben alkalmazható, ha egy anyagnak van fényelnyelése a 200-800 nm hullámhossz-tartományban. A fényelnyelés mértékét az abszorbancia jellemzi, ami egy dimenziómentes mennyiség. A hullámhossz minőségi, míg az intenzitása mennyiségi információt hordoz. A DNS nukleobázisai purin (adenin, guanin) és pirimidinvázis (citozin, timin) heteroaromás vegyületek, melyek abszorbanciájában ~260 nm környékén található lokális maximum. Minél hosszabb egy DNS szál, annál valószínűbb, hogy a négy nukleobázis egyenlő arányban lesz jelen, ekkor a minta fényelnyelésének lokális maximuma pontosan 260 nm-nél található. 50 µg/ml DNS, 33 µg/ml egyszálú DNS és 40 µg/ml RNS egyes abszorbanciát mutat 260 nm-en 1 cm úthosszon, ami alapján könnyen meghatározható spektrofotometriával ezen minták koncentrációja. A laboratóriumban előállított lineáris, valamint körkörös bakteriális DNS-ek tisztaságának megállapítására UV-Vis mérések során jellemzően a 260 és 280 nm-en mért abszorbancia hányadosát használják. Ez az érték optimális esetben 1,8-2 között mozog. Magasabb érték RNS, míg 1,8 alatti érték feltehetően fehérje/aromás szennyezésre utal a mintában. A fehérjék 280 nm-környékén rendelkeznek lokális abszorpciós maximummal, azonban a moláris abszorbancia függ az aminosav összetételtől. Habár léteznek programok, amelyek megbecsülik ezt az értéket [184], azonban a valóságban 10-20% eltérés is lehet a tényleges értékhez képest, így körültekintően kell ezt a módszert fehérjék koncentrációjának meghatározására használni. A fémionok d-d átmeneteit és a fémion és ligandum közötti töltésátviteli sávot is lehetséges UV-Vis spektroszkópiával követni. Így akár stabilitási állandók is meghatározhatók. Azonban a Zn(II) a látható és közeli UV tartományban nem rendelkezik fényelnyeléssel, így esetünkben ez a módszer közvetlenül nem alkalmazható, csak kromofór csoporttal rendelkező Zn(II)-szelektív molekulákat alkalmazva (pl. 4-(2-piridilazo)rezorcín (PAR)).

Teljes UV-Vis abszorbancia spektrumokat egy Evolution 220 (Thermo Fischer) spektrofotométeren rögzítettük 1 cm úthosszban, míg DNS-koncentráció meghatározásra egy rögzített hullámhosszokon működő Nanodrop Lite készüléket használtunk (Thermo Fischer), amelyben 2× 0,5 mm úthosszal 1 µl mintatérfogat mellett is kivitelezhető a mérés.

4.4.2 Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

A fehérjék szerkezetének meghatározására többféle fizikai-kémiai módszer alkalmazható. Röntgen-diffraktometriával meghatározható egy fehérje háromdimenziós szerkezete, de ehhez egykristályra van szükség, aminek előállítása gyakran nagy kihívást jelent. Az NMR spektroszkópia az oldatban lévő fehérje szerkezetére ad információt, azonban meglehetősen tömény, és/vagy ^{13}C és ^{15}N izotópokkal dúsított fehérjemintára van szükség, továbbá a mérés és kiértékelés időigényes. A krio-elektronmikroszkópia egy új és ígéretes eljárásnak számít, amely kiküszöbölheti az előbbi módszerek hátrányait, de 50 kDa alatti fehérjékre nem alkalmazható jelenleg. A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia bevett eljárás, melynek segítségével ~10% pontossággal becsülhető a fehérjék másodlagos szerkezeti összetétele híg (μM -os) oldatokból is. A másodlagos szerkezeti elemek megléte az esetek többségében a megfelelő harmadlagos szerkezet kialakulását is alátámasztja.

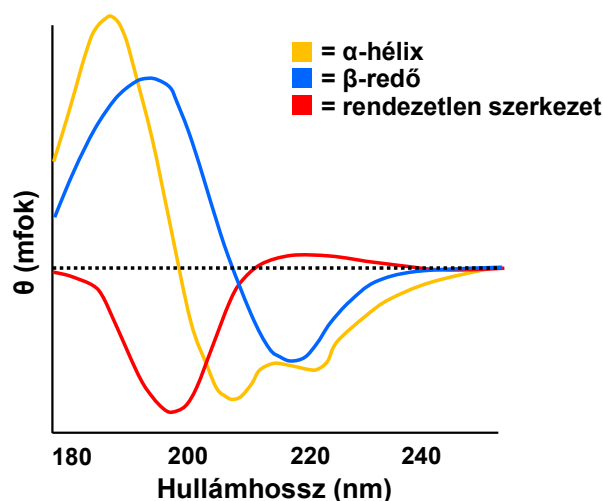
A fényre jellemző, hogy haladási irányára merőlegesen a térerősség vektorainak intenzitása (esetlegesen iránya) adott pontban periodikus változást mutat. Lineárisan poláros fény esetén a térerősség vektorok minden esetben azonos sík mentén mozognak. A síkban polarizált fény felbontható két azonos intenzitású, de ellentétesen cirkulárisan polarizált sugárra. Ha a síkban polarizált fény olyan optikailag aktív anyagon halad keresztül, mely az egyik cirkulárisan polarizált alkotót nagyobb mértékben nyeli el, az átjutó fény amplitúdója és fázisa is különbözni fog a beesőtől, ez a cirkuláris dikroizmus jelensége. Az amplitúdó változása elliptikusan polarizált fényt eredményez, mértékét az ellipticitással (θ) jellemezhetjük: $\tan\theta = b/a$, ahol b és a az ellipszis kis- és nagytengelyének hossza. A CD spektrométerben elsődlegesen mért érték a balra és jobbra cirkulárisan polarizált fénysugarak abszorbanciájának különbsége: $\Delta A = A_L - A_R$. A két mértékegység közti átváltás az alábbi összefüggés alapján lehetséges: $\theta = 32,98 \times \Delta A$ [185].

A fehérjékben megfigyelhető másodlagos szerkezeti elemeket (α -hélix, β -kanyar, antiparallel/parallel β -redő) az amidkötések egymáshoz viszonyított elrendeződése hozza létre. Mivel e csoport a távoli ultraibolya tartományban (180-260 nm) $n-\pi^*$, illetve $\pi-\pi^*$ átmenetei révén CD jelet ad, megbecsülhető a fehérjéket felépítő másodlagos szerkezeti elemek egymáshoz képesti aránya (**16. ábra**). A közeli UV tartományban (260-320 nm) az aromás oldalláncok elnyelése mérhető, így azok egymáshoz képesti orientációjából következtetni lehet a fehérjék harmadlagos szerkezetére.

A CD spektrumokból számítógépes programok segítségével (BeStSel, CDpro) becsülhető meg a másodlagos szerkezeti elemek aránya. Ehhez gyakran szükséges az adatok átváltása. A delta epszilon ($\Delta\varepsilon$) számolása az alábbi képlet alapján történik:

$$\Delta\varepsilon = \frac{\theta[\text{mfok}]}{32982 \cdot \frac{c_{\text{fehérje}}[\mu\text{M}]}{1000000} \cdot n \cdot l[\text{cm}]} \quad (1)$$

ahol n a fehérjét alkotó aminosavak száma, l a kűvetta úthossza [186].



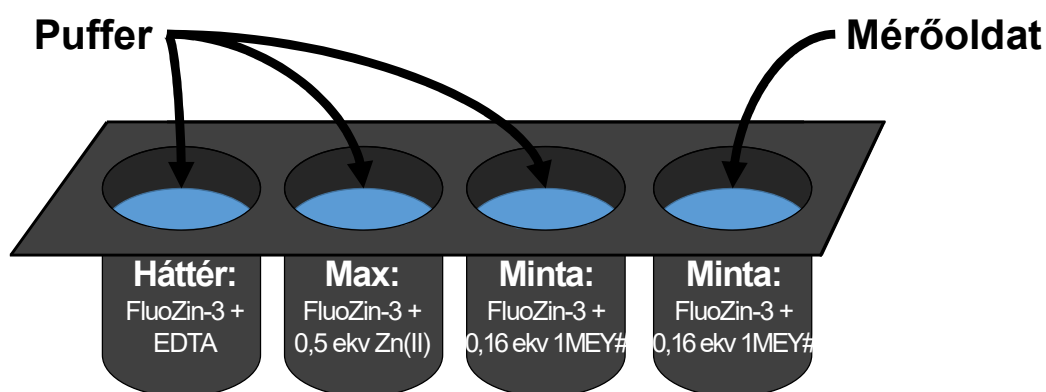
16. ábra: A fehérjék másodlagos szerkezeti elemeire jellemző CD spektrumok. A legnagyobb intenzitású jeleket az α -hélixek szabályosan elrendeződő kromofórijai eredményezik [187].

A CD méréseket egy JASCO J-815, illetve Jasco J-1500 spektropolariméteren végeztük 180-330 nm hullámhossztartományban 1 nm felbontással 2 s integrációs idővel és 1 nm-es sáv szélességgel 0,1 vagy 0,2 mm cilindrikus kűvetában (SUPRA-SIL, Hellma GmbH) szakaszos mérés móddal. A szinkrotron sugárforrású CD méréseket (SRCD) az Aarhusi Egyetemen, Dániában végeztük (CD1 beamline of the storage ring ASTRID at the Institute for Storage Ring Facilities (ISA)) 170-330 nm hullámhossz-tartományban [188-189].

4.4.3 Spektrofluorimetria

Fluoreszcencia akkor lép fel, ha egy anyagot UV vagy látható fényvel gerjesztve, az 10^{-9} - 10^{-6} s elteltével azonos vagy nagyobb hullámhosszúságú fény kibocsájtása közben jut vissza alapállapotba. Jellemzően az aromás, vagy többszörösen konjugált kettős kötés-tartalmú, merev szerkezetű molekulák rendelkeznek fluoreszcenciával. Az 1MEY#-Zn(II), Cd(II)- és Hg(II)-affinitásának meghatározására a 2-[2-[2-[2-[bisz(karboxil metil)amino]-5-metoxi-fenoxi]etoxi]-4-(2,7-difluor-3-oxido-6-oxo-4a,9a-dihidroxantén-9-il)anilino]acetát (FluoZin-3) fluoreszcens festéket alkalmaztuk CLARIOstar Plus lemezolvasóban

(BMG Labtech). A szabad FluoZin-3 491 nm-en, a Zn(II)-komplexben lévő FluoZin-3 494 nm-en rendelkezik lokális abszorpciós maximummal. A vegyület Zn(II) (vagy egyéb soft d^{10} fémion) jelenlétében 516 nm-en fluoreszkál maximális intenzitással. A fluorofór Zn(II) kötés $\lg\beta = 8,16$ pH független stabilitási állandóval jellemezhető [190]. A vizsgálataink során nem volt szükség fémion-FluoZin-3-cinkujj fehérje vegyeskomplexek feltételezésére, a folyamatok leírásához. A FluoZin-3 koncentrációját spektrofotometriásan határoztuk meg az irodalmi moláris abszorbancia adatokat felhasználva ($\lambda_{\max} = 491$ nm, $\epsilon_{\max} = 71143$ M⁻¹cm⁻¹, (pH 7,4)). Az 1MEY# Zn(II)-affinitásának becslésére 200-200 μ l egyedi mintákat állítottunk össze 96-lyukú mikrolemezeken (96 well polystyrene non-binding flat-bottom black microplates (Greiner Bio-One)). A FluoZin-3 koncentráció állandó volt, míg a Zn(II)-kötött 1MEY# koncentrációja fokozatosan növekedett. 30 perc fénytől elzárt 25 °C inkubálást követően, 480 – 490 nm hullámhossz-tartományban gerjesztettük a mintákat, és 510 – 520 nm hullámhossz-tartományban mértük a fluoreszcenciát. Referenciaként olyan mintákat is összeállítottunk, ahol a Zn(II)-kötött 1MEY# helyett azonos koncentrációjú ZnCl₂-t adtunk a mintákhoz, ezzel határoztuk meg a maximális elérhető fluoreszcencia intenzitás értéket minden mérési pontban.



17. ábra: Fluorimetriás titrálási eljárás. A kiindulási fluoreszcenciát a FluoZin-3-hoz képest 10-szeres feleslegben alkalmazott EDTA-val határoztuk meg. Az elérhető maximális fluoreszcencia értéket 0,5 ekv Zn(II) FluoZin-3 ('Max') alkalmazásával határoztuk meg. A FluoZin-3 kétszeres feleslegére azért volt szükség, hogy a Zn(II) 100%-a komplexben legyen. A 'Max' referencia mintával azonos mennyiségű Zn(II)-t tartalmazó 1MEY# mintát titráltuk. A titrálás során a hígítási hatást puffer injektálásával határoztuk meg (a mérőoldat helyett).

Amennyiben a Zn(II)-1MEY# és a toxikus fémionok közötti kompetíciót követtük, a lemezolvasó beépített injektorait használtuk a tényleges titrálás során. Minden pontban 3-3 μ l mérőoldatot injektáltunk kiindulási mintához. Minden injektálást követően a mintákat inkubáltuk (30 s 150 RPM rázatás, 5 perc 25 °C). A titrálást automatizáltuk (**ld. F1. táblázat**). A tényleges fehérje-fémion mérés mellett minden esetben további összehasonlító

méréseket is végrehajtottunk annak érdekében, hogy ismerjük a hígulás hatását, továbbá minden pontban ki tudjuk számolni a relatív fluoreszcencia értékeket (17. ábra).

4.4.4 Fluoreszcencia anizotrópia

Amennyiben egy fluoreszcens molekula besugárzása polarizált fényel történik, információt nyerhetünk róla, hogy a besugárzás, és az emisszió között milyen mértékben képes elfordulni. Az ilyen mérések előnyösek makromolekulák és fluoreszcens kismolekulák kölcsönhatásának detektálására, mivel a méretváltozással együtt a molekulák mozgékonyága is változik. Kísérleteink során ezt a módszert az 1MEY# fehérje és a specifikus DNS kölcsönhatását jellemző stabilitási állandó becslésére alkalmaztuk.

Egy molekula anizotrópiája az alábbi módon adható meg:

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}} \quad (2)$$

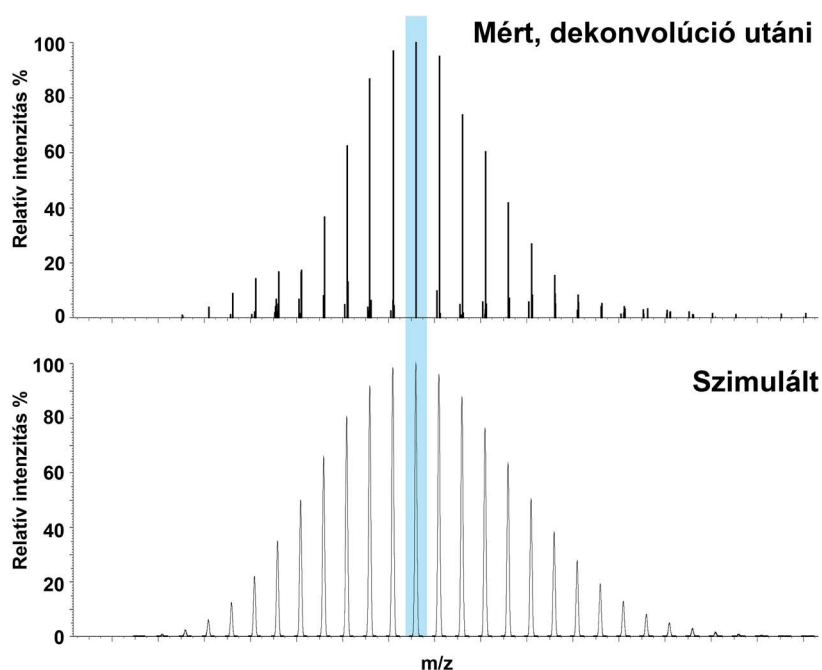
ahol r az anizotrópia, I_{VV} a vertikális, míg I_{VH} a horizontális intenzitás.

200-200 μ l egyedi mintákat állítottunk össze 96-lyukú mikrolemezeken (96 well polystyrene non-binding flat-bottom black microplates (Greiner Bio-One)). 474 – 490 nm gerjesztési és 510 – 550 nm emissziós szűrőket használtunk és egy 6-karboxilfluoreszcein (FAM)-kapcsolt 28 bp méretű DNS molekula fluoreszcenciáját követtük nyomon növekvő mennyiségű 1MEY# cinkujj fehérje jelenlétében egyedi mintákat összeállítva. A DNS-t a fluorofórral jelzett 5'-FAM-CCGAGGCAGAAATTCGTTCTGCCTCAG-3' és 5-TAMRA-CTGAGGCAGAACGAATTCTGCCTCGG-3' (tetrametilrodamin) oligonukleotidok hibridizálásával kaptuk meg (Invitrogen).

4.5 Tömegspektrometria

A tömegspektrometria azon alapszik, hogy az eltérő tömegű és töltésű gázfázisú ionok – elektromágneses tér hatására – tömeg/töltés hányadosuk alapján egymástól eltérő idő alatt érik el a detektálás helyét. A módszer nagy érzékenységgű (akár fg tömegű minta meghatározható), széles tömegtartományú, jól reprodukálható, szelektív, valamint elválasztástechnikai módszerekkel, így például gázkromatográfiával (GC-MS), folyadékkromatográfiával (LC-MS) vagy kapilláris elektroforézissel (CE-MS) kombinálható. A tömegspektrométerek három fő része az ionforrás, analizátor és detektor. A mérés lépései a következők: a vizsgálandó mintából ionokat hozunk létre, majd ezeket a különböző tömeg/töltés arányuknak megfelelően elválasztjuk. Az ionokat ezután detektáljuk, majd az összegyűjtött adatokból kirajzolódik a tömegspektrum. Munkánk során egy HPLC-vel összekötött elektropray ionizációs (ESI) ionforrással ellátott TOF (Time Of

Flight) detektorral üzemelő Premier Q-Tofl Waters és egy TriVersa NanoMate (Advion) chip-alapú ESI-MS feltétel ellátott LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Scientific) tömegspektrométerrel dolgoztunk. Az ESI-MS lágy ionforrásnak köszönhetően vizsgálhatók makromolekulák anélkül, hogy fragmentáció következne be. Méréseinket $R=120000$ (400 m/z -értéknél) felbontással végeztük. Tömegspektrometria során csak illékony pufferek alkalmazhatók, így a méréseket megelőzően a fehérjeminták pufferét puffercserével cseréltük ki 100 mM ammónium acetát, ($\text{pH } 8,1$) vagy 2 mM ammónium-hidrogén-karbonát (ABC) ($\text{pH } \sim 7,8$) pufferre az **F1.5 fejezetben** leírtakhoz hasonló módon. A csúcsok dekonvolúcióját az XCalibur 2 programcsomag (Thermo Scientific) Xtract programja segítségével hajtottuk végre, a részecskék szimulációját ugyanezen programcsomag Freestyle 1.6 programja segítségével végeztük. A fémmentes fehérjék molekulatömegeit monoizotópos formában is megadtuk, míg a fémtartalmú fehérjék esetében a dekonvolúcióval kiszámított és a szimulált tömegspektrumok legnagyobb intenzitású MH^+ csúcsaihoz rendelhető molekulatömegeket hasonlítottuk össze (**18. ábra**). A fémtartalmú fehérjekomplexek molekulatömegeinek kiszámításakor a fémionok töltésével egyenértékű számú protont vontunk ki az összegképletből.



18. ábra: Fémtartalmú fehérjeminták ESI-MS tömegspektrumainak reprezentatív kiértékelése. Felül a mért, és dekonvolúcióval egyetlen MH^+ részecskére visszafejtett fehérjeminta izotópeloszlása látható, míg alul ugyanezen fehérje szimulált eloszlása. A legintenzívebb szimulált és mért izotópcsúcsok molekulatömegeit hasonlítottuk össze munkánk során (világoskék háttér).

Amennyiben a fehérjeszekvenciát alaposabb vizsgálatnak akartuk alávetni, MS/MS méréseket is végeztünk ütközés-indukált disszociációs (CID) módszerrel 30 eV gyorsítófeszültség mellett. Ekkor $R = 30000$ felbontással (400 m/z-értéknél) dolgoztunk.

4.6 Izotermális kalorimetria

A fehérje-fémion kölcsönhatások vizsgálatában az izotermális titrálásos kalorimetria (ITC) előnye, hogy oldatfázisban, immobilizálás és egyéb módosítások nélkül is végrehajtható. A titrálás során a kötőhelyek száma, a kölcsönhatás erőssége ($\lg\beta$) és egyéb termodinamikai paraméterei (entalpia ΔH , szabadentalpia ΔG_0 , entrópia, ΔS_0 , állandó nyomáson mért fajlagos hőkapacitás különbség ΔC_p) is meghatározhatók. További előny, hogy közvetlen információt szolgáltat, fenntartási költsége pedig alacsony.

A kaloriméterben egy referencia és egy mérőcella található, melyek közül előbbibe vizet utóbbiba a vizsgálandó fehérje vagy oldatát töltjük. Mivel a víz hőkapacitása nagyságrendekkel nagyobb a vizsgálandó komponensénél, ezért nem szükséges a referenciacellába és a mérőcellába teljesen azonos oldatot tölteni. A mérőcella tartalmához – folyamatos kevertetés mellett – egy automatikus injektorral adagoljuk a kölcsönható partner oldatát (mérőoldat). Túltöltéses titrálás során a mérőcellát teljes mértékben feltöltjük a mérendő oldattal, így minden injektálási lépés során a befecskendezett térfogattal azonos térfogat kiszorul a cellából. Ebből adódóan a titrálás teljes térfogata állandó lesz, azonban a kezdeti titrált minta anyagmennyisége fokozatosan csökken, amit figyelembe kell venni a számolásoknál.

A mérés során mindkét cellát kis mértékben fűtjük. A cellák hőmérséklete ezredfok pontossággal megegyezik, és a mérés során ennek az állapotnak a fenntartásához szükséges fűtőteljesítményt mérjük. Amennyiben nincs reakció, a mérőcellát a referencia fűtőteljesítményével megegyező mértékben fűtjük. Ha endoterm reakció zajlik le a mérőcellát kell jobban fűteni, míg ha exoterm, akkor csak olyan mértékben, hogy megfeleljen a referenciacella hőmérsékletének.

A titrálás során mért hőváltozás egyenesen arányos azzal, hogy az injektált komponens mekkora hányada lép kölcsönhatásba. A titrálás vége felé a titráló komponens egyre kisebb hányada lép kölcsönhatásba, míg végül csak az oldathígulásból származó jel lép fel. A titrálendő és titráló komponens pontos koncentrációjának ismerete elengedhetetlen, valamint célszerű teljesen azonos pufferben azonos pH-n feloldani mindkettőt, hogy a keveredésből, ionizációs entalpiaváltozásból adódó többletjel minimális legyen. Az injektálások során mérhető hő az alábbi képlettel számítható:

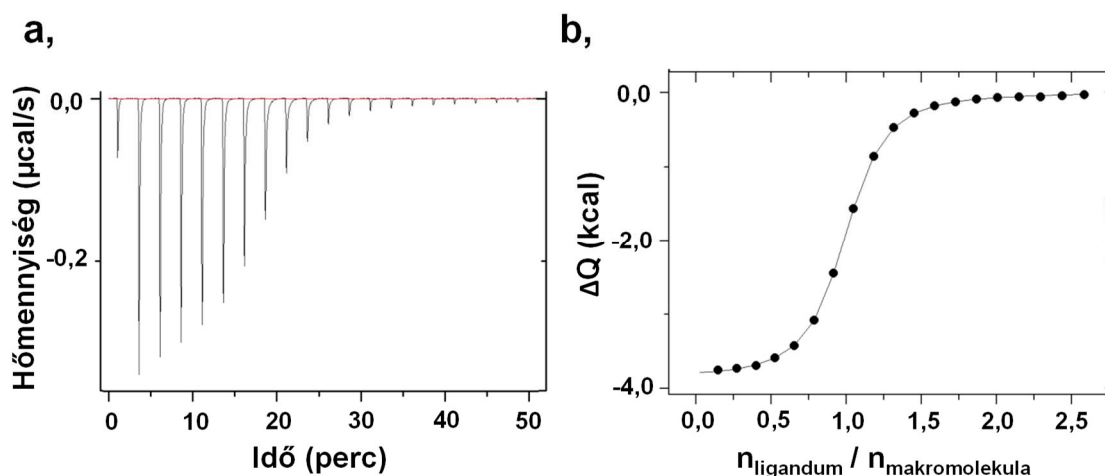
$$\Delta Q = \sum_{i=1}^n \Delta H_i^0 \delta n_i \quad (3)$$

ahol ΔH_i^0 az i . részecskéhez tartozó entalpia, δn pedig az i . részecske anyagmennyiségének változása. A minél pontosabb mérési eredmény elérése érdekében mind a fémion mind a makromolekula esetében összehasonlító mérés is szükséges, melynek során a hígulásból adódó hőt mérjük. Általában ez utóbbi elhanyagolható.

Az egyensúlyi állandó meghatározásához megfelelő tartományon belül kell megválasztani a minta koncentrációját a mérés során, melyhez az alábbi kísérleti képlet nyújt segítséget:

$$a = n \cdot [L] \cdot K_a \quad (4)$$

ahol a az affinitáshoz kapcsolódó paraméter, melynek 1 és 1000 között kell lennie, K_a a folyamathoz tartozó egyensúlyi állandó, $[L]$ pedig a ligandum koncentrációja [191].



19. ábra: a, Nyers ITC adatok, ahol a csúcsok a meghatározott időközönként történő injektálás hatására bekövetkező hőváltozást jelölik; **b,** a tényleges titrálási görbe.

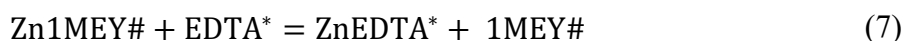
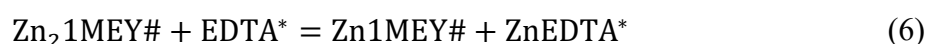
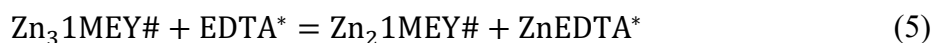
A méréskor fontos, hogy helyesen válasszuk meg az injektálások hosszát, azaz, hogy egy egységnyi ligandum térfogatot milyen sebességgel adagoljon a rendszer, különben a kapott válaszjel a mérhető tartományon kívül esik. Az is fontos, hogy elegendő idő teljen el két injektálás között, máskülönben nem tudjuk meghatározni a későbbiekben az alapvonalat (**19. ábra a,**). A mérés során kapott csúcsok alatti területeket integrálva kapjuk meg a tényleges titrálási pontokat, amelyekkel elvégezhetjük az illesztést (**19. ábra b,**).

Méréseinket egy kis térfogatú NanoITC (TA) készülékben hajtottuk végre $25 \pm 0,1$ °C-on túltöltéses módban, 350 RPM kevertetés mellett. 50 µl mérőoldatot injektáltunk 0,5-2,5 µl adagokban (100-20 adatpont) 170 µl mintához. 10 mM HEPES

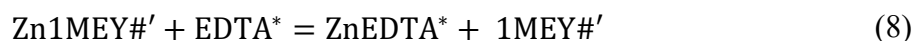
(pH 7,40) pufferben dolgoztunk, így a számításoknál figyelembe kellett venni a HEPES protonálódásának relatíve magas entalpiáját is (**ld. F1.3 fejezet**). A puffert szűrt, gázmentesített vízben oldottuk fel, majd a nyomnyi fémszennyezést 5 mg/dm^3 Chelex® 100 kationcserélő gyanta (Sigma-Aldrich) segítségével távolítottuk el 30 perc $25 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubáció során. Ezt követően az oldatot $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ MF-Millipore vegyes cellulóz membránszűrőn szűrtük át (Merck). A fehérjeminták pufferét ultraszűrés segítségével cseréltük le a fentiek szerint elkészített pufferre. Amicon 3K $0,5 \text{ ml}$ szűrőket (Merck) használtunk ($14000\times \text{ g}$, $15 \text{ }^\circ\text{C}$, $6\times 5 \text{ perc}$), és az utolsó szűrési lépésben kinyert átfolyó szolgált háttérként az ITC méréseknél. Az ultraszűrés során tipikusan $\sim 20 \text{ }\mu\text{M}$ koncentrációjú fehérjeoldatot kaptunk. A mérőoldatokat (AgClO_4 vagy EDTA) a fenti pufferrel hígítottuk az alkalmazott koncentrációra. Az EDTA koncentrációt komplexometriásan határoztuk meg $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ titrálás során, míg az AgClO_4 mérőoldatot csapadékos titrálással KCl segítségével. Minden mérést legalább háromszor ismételtünk meg, a mérések között pedig víz-víz, valamint Ca(II)-EDTA referenciatitrálásokat hajtottunk végre, hogy igazoljuk sikerült-e megfelelően kitisztítani a cellát. Az injektálások között minden esetben elegendő időt vártunk (5-24 perc), hogy az egyensúly biztosan beálljon (és a válaszjel visszajusson nulla értékre). A hosszú injektálási intervallumok esetében referenciatitrálások segítségével vettük figyelembe a diffúzió hatását. A kontrol mérések erős negatív Pearson korrelációt mutattak ($r = -0,715$), így minden esetben korrigáltuk a mért értékeket, ha 5 percnél hosszabb idő telt el két injektálás között (**F1. ábra**).

4.6.1 ITC adatok értékelése

A készülék Nano Analyze programja (TA Instruments) számos kötési modellt tartalmaz, de ezek nem voltak alkalmasak, a rendszerünk leírására bonyolultabb esetekben. Az 1MEY#-EDTA titrálásoknál egy analitikusan megoldható kompetíciós modellel számoltunk. A titrálás során az alábbi folyamatok játszódhatnak le:



ahol EDTA^* az EDTA aktuális protonáltsági állapotát jelöli. Amennyiben feltételezzük, hogy a három cinkujj azonos erősséggel köti a $\text{Zn}(\text{II})$ -t egymástól függetlenül a reakció egyszerűbben is felírható kötőhelyekre, ahol 1MEY#' az 1MEY# cinkujj fehérje egy cinkujj alegységét jelöli.



A **8. egyenlet** alapján egy egyszerű kompetíciós modell is használható, ahol az egyensúlyi koncentrációk analitikusan kiszámíthatók, míg a ΔH és $\lg\beta'$ értékek az Excel Solver bővítményével (Microsoft) illeszthetők. A részletes levezetéseket a szakirodalomból vettük át [192], csupán a (ΔQ_i) hőváltozást leíró egyenleteket módosítottuk, hogy megfelelően jellemezze a túltöltött NanoITC-ben végrehajtott titrálást (**9. egyenlet**).

$$\Delta Q_i = \left(V_0 \cdot c_{\text{Zn(II),0,i}} \cdot x_{[\text{Zn1MEY\#}']_i} - (V_0 - v_i) \cdot c_{\text{Zn(II),0,i-1}} \cdot x_{[\text{Zn1MEY\#}']_{i-1}} \right) \cdot \Delta H_{\text{ITC}} + \quad (9)$$

$$+ \left(V_0 \cdot c_{\text{Zn(II),0,i}} \cdot x_{[\text{ZnEDTA}]_i} - (V_0 - v_i) \cdot c_{\text{Zn(II),0,i-1}} \cdot x_{[\text{ZnEDTA}]_{i-1}} \right) \cdot \Delta H_{[\text{ZnEDTA}]}$$

ahol V_0 a kiindulási cellatérfogata, v_i az i . injektálás térfogata, $c_{\text{Zn(II),0,i}}$ a Zn(II) totálkoncentrációja az i . injektálást követően, $c_{\text{Zn(II),0,i-1}}$ pedig ugyanaz az összkoncentráció az $(i-1)^{\text{th}}$ injektálás után, $x_{[\text{Zn1MEY\#}']_i}$ a Zn(II)-kötött cinkujj alegység móltörtje az i . injektálást követően, $x_{[\text{ZnEDTA}]_i}$ pedig a ZnEDTA* komplex móltörtje az i . injektálás után, $\Delta H_{[\text{ZnEDTA}]}$ az entalpiaváltozása ZnEDTA* komplex képződése során, amit referenciatitrálással határozhatunk meg, ΔH_{ITC} pedig az összes egyéb folyamat entalpiaváltozása, ami a Zn(II) felszabadulása során lejátszódik. A tényleges cinkujj alegység Zn(II)-kötéséhez tartozó $\Delta H_{\text{Zn1MEY\#}'}$ entalpiaértéket a ΔH_{ITC} értékből határozhatjuk meg (**ld. F1.3 fejezet**). Az Ag(I) titrálása során egy egyszerű kompetíciós modell nem volt elegendő, így itt a PSEQUAD program alapján számoltunk, amit a következő alfejezetben mutatok be részletesen.

4.7 Egyensúlyi számolások

Az egyensúlyi állandókat a PSEQUAD program segítségével számítottuk [4], amennyiben UV-Vis abszorbancia, fluorimetria, cirkuláris dikroizmus spektroszkópia vagy EMSA adataink voltak. Az ESI-MS és az ITC mérések illesztésére a PSEQUAD program nem alkalmas, így ezeket a méréseket Excel-ben értékeltük ki, de a PSEQUAD programban is alkalmazott anyagmérleg egyenletek alapján.

Első lépésként összeállítottuk a részecskemátrixot, és közelítő értékeket adtunk meg minden m . komponens $[c_{m,i}]$ egyensúlyi koncentrációjára minden i . titrálási pontban, illetve minden α részecskemátrixban szereplő j . részecskének a β'_j látszólagos stabilitási állandójára.

Ezt követően minden t . komponens ($c_{0,t,i}^{\text{calc}}$) összkoncentrációját kiszámoltuk minden i . titrálási pontban felírva az anyagmérleg egyenleteket:

$$C_{0,t,i}^{calc} = \sum_{j=1}^n \alpha_{jt} \beta_j' \prod_{m=1}^k [c_{m,i}]^{\alpha_{jm}} \quad 10$$

ahol n a részecskék és komponensek számának összege, k a komponensek száma és α_{jm} a sztöchiometriai érték, ami meghatározza az m . komponensek és j . részecskék számát. Ezt követően minden t . komponensre minden i . titrálási pontban felírtuk a különbséget a kiszámított és a ténylegesen mért összkoncentráció között:

$$f_{t,i} = C_{0,t,i}^{calc} - C_{0,t,i}^{exp} \quad 11$$

Ezután az egyensúlyi koncentrációkat Newton-Raphson módszer segítségével optimalizáltuk oly módon, hogy az $f_{t,i}$ értéke minimális legyen:

$$[c_{m,i}]_{y+1} = [c_{m,i}]_y - \frac{f_{t,i,y}}{f'_{t,i,y}} \quad 12$$

ahol $[c_{m,i}]_{y+1}$ a $[c_{m,i}]$ egyensúlyi koncentráció az $(y + 1)$. iterációs lépésben, $[c_{m,i}]_y$ pedig a $[c_{m,i}]$ egyensúlyi koncentráció az y . iterációs lépésben. $f_{t,i,y}$ a mért és számított összkoncentrációk ($f_{t,i}$) közti különbsége az y . iterációs lépésben és $f'_{t,i,y}$ $f_{t,i}$ első deriváltja az y . iterációs lépésben, ami analitikusan megoldható.

Az iterációt mindaddig ismételtük, amíg a **13. egyenlet** nem teljesült (PSEQUAD alapján):

$$\left| \frac{C_{0,t,i}^{exp} - C_{0,t,i,y}^{calc}}{C_{0,t,i}^{exp}} \right| \leq 5 \cdot 10^{-4} \quad 13$$

Miután meghatároztunk minden egyensúlyi $[c_{m,i}]$ koncentrációt, egy közelítő értéket adtunk meg minden j . részecske ΔH_j entalpiájára. Ekkor a mért hőváltozások túltöltött cella esetén az alábbi egyenlet szerint számolhatók:

$$\Delta Q_i = \sum_{j=1}^n \Delta H_j \cdot \left\{ \left(\beta_j' \prod_{m=1}^k [c_{m,i}]^{\alpha_{jm}} \right) \cdot V_0 - \left(\beta_j' \prod_{m=1}^k [c_{m,i-1}]^{\alpha_{jm}} \right) \cdot (V_0 - v_i) \right\} \quad 14$$

A látszólagos stabilitási állandók és entalpiák finomítása ezt követően már megoldhatóvá vált az Excel Solver bővítményével.

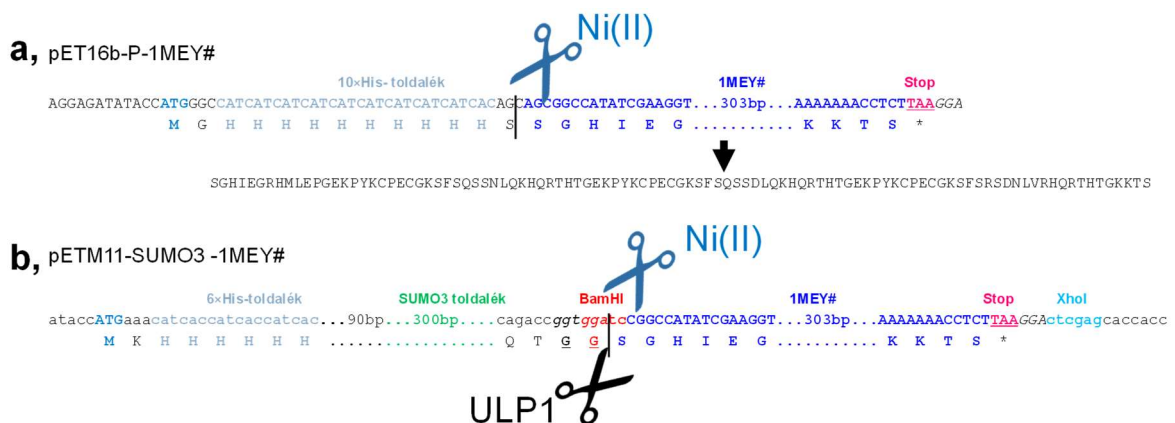
5 Eredmények

5.1 Ni(II)-indukált hidrolízis megvalósítása cinkujj fehérjékben

Az *in vitro* biotechnológiai, biokémiai kutatásokban felhasznált fehérjék a legegyszerűbben sejteken belül állíthatók elő. Ahhoz, hogy a célfehérje egyszerűen kinyerhető legyen a sejt többi fehérjéje közül, általában peptid,- vagy fehérjealapú affinitástoldalékot kapcsolnak hozzá a rekombináns DNS technológia módszerét felhasználva. Az ilyen toldalékok a későbbi vizsgálatok során befolyásolhatják a fehérje szerkezetét, működését, oldatkémiai tulajdonságait, így a tisztítást követően célszerű eltávolítani azokat. Munkám első részében arra kerestem a választ, hogy a szakirodalomban jellemzett X|(S/T)XH aminosav motívum Ni(II)- és Cu(II)-indukált szelektív hidrolízise alkalmazható-e cinkujj fehérjék tisztítása során, valamint, hogy ez a reakció minden szempontból azonos végterméket szolgáltat-e egyéb klasszikus toldalék hasítási technikával, mint például a sumoiláció [148-151] melynek részletes leírása az alábbiakban olvasható.

5.1.1 Gének tervezése, fehérjetisztítás

A vizsgált cinkujj fehérje három alegységből épült fel, aminosav szekvenciája hasonló az 1MEY PDB (Protein Data Bank) kóddal jelölt fehérje-DNS kristályszerkezetben található cinkujj fehérjéhez [1], de a 3. cinkujj alegységben két aminosavcsere történt végére (H99N; S101V) (**Id. F1.1 fejezet**). A módosításra azért volt szükség, mivel az eredeti 1MEY fehérje 3. cinkujj alegységben is található volt két további potenciális X|(S/T)XH hasítási hely, így a fehérje itt is elhasadhatott volna a hidrolízis során [193]. A továbbiakban a módosított fehérje elnevezése 1MEY#.



20. ábra: Az előállítandó fehérjék szekvenciája, és az azokat kódoló gének elhelyezkedése a bakteriális DNS hordozókban. **a,** pET16b-P-1MEY#; **b,** pETM11-SUMO3-1MEY#.

A fehérjét kódoló gént a Ni(II)-indukált hidrolízis tanulmányozása céljából egy pET-16b DNS hordozóba (vektorba) építettük be. A kifejeződés során egy N-terminális dekahisztidin toldalékkal és az előzőleg említett S|SGH aminosav szekvenciával együtt képződik a fehérje (**20. ábra a**), melynek elnevezése His-1MEY#. Annak érdekében, hogy a reakció összehasonlítható legyen egy enzimalapú poszttranszlációs fehérjetisztítási eljárással, a fehérje génjét pETM11-SUMO3 hordozóba is beépítettük, ami egy hexahisztidin toldalék mellett egy SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) N-terminális fehérjetoldalék hozzákapcsolódását is eredményezi (sumoiláció) az 1MEY# cinkujj fehérjéhez (His-SUMO-1MEY#) (**ld. F1.1 fejezet**). Ez a toldalék későbbiekben az ULP1 proteázzal specifikusan lehasítható (**20. ábra b**) [194]. A His-1MEY# és His-SUMO-1MEY# fehérjéket BL21 (DE3) *E.coli* sejtekben termeltettük. A deka-, illetve hexahisztidin toldalék lehetővé tette a Ni(II)-affinitás kromatográfia alkalmazását a tisztítás során. Az ULP1 proteáz a fehérjéssel azonos módon fejezhető ki és tisztítható, mivel szintén rendelkezik hexahisztidin toldalékkal az N- és C-terminális végein (**ld. F1.2 fejezet**) (**F2. táblázat**).

5.1.2 Ni(II)-indukált hidrolízis és desumoiláció összehasonlítása

A His-1MEY# cinkujj fehérjét Zn(II)-kötött formában sikerült kitisztítanunk, mivel a rendezett $\beta\alpha$ másodlagos szerkezetre jellemző CD spektrummal rendelkezett a minta, ami csak a fehérje holo formájában alakulhat ki (**F4. ábra**). A Ni(II)-indukált hidrolitikus hasítási reakciót 100 mM HEPES (pH 7,4 és 8,2 pH) pufferben 37 °C és 50 °C-on vizsgáltuk 10× Ni(II) felesleg mellett. Fiziológias körülmények között (pH 7,4; 37 °C) a reakció lassú ($t_{1/2} \sim 11$ nap), míg pH 8,2-n 50 °C-n három nap alatt a fehérje közel 100%-ban átalakul ($t_{1/2} \sim 7,5$ óra) az SDS-PAGE vizsgálat alapján (**21. ábra a**). A tömegspektrometriás mérések alapján a reakció fő terméke a – várákosoknak megfelelően a – 12-es és 13-as szerin között elhasadt fehérje (**21. ábra d**). A többnapos 10× Ni(II)-felesleg jelenlétében végrehajtott inkubáció nem befolyásolta a cinkujj fehérje alegységek szerkezetét, azok továbbra is Zn(II)-t kötöttek meg. Ni(II)-kompetíció a cinkujj alegységekért nem volt megfigyelhető, ami a cinkujj fehérjék Zn(II)- és Ni(II)-komplexeire jellemző stabilitási állandók közti ~4-5 nagyságrendbeli eltéréssel magyarázható [21]. Emellett a cinkujj fehérje új N-terminális végén kialakult egy Ni(II)-kötő ATCUN motívum (**21. ábra e**). A Ni(II)-indukált szelektív peptidhidrolízis és a SUMO toldalékot specifikusan lehasítani képes ULP1 proteázzal történő kezelés azonos végterméket eredményezett. Az SDS-PAGE képek alapján a hasítások szelektivitásában sem mutatkozott jelentős eltérés (**21. ábra a, b**). A termékek

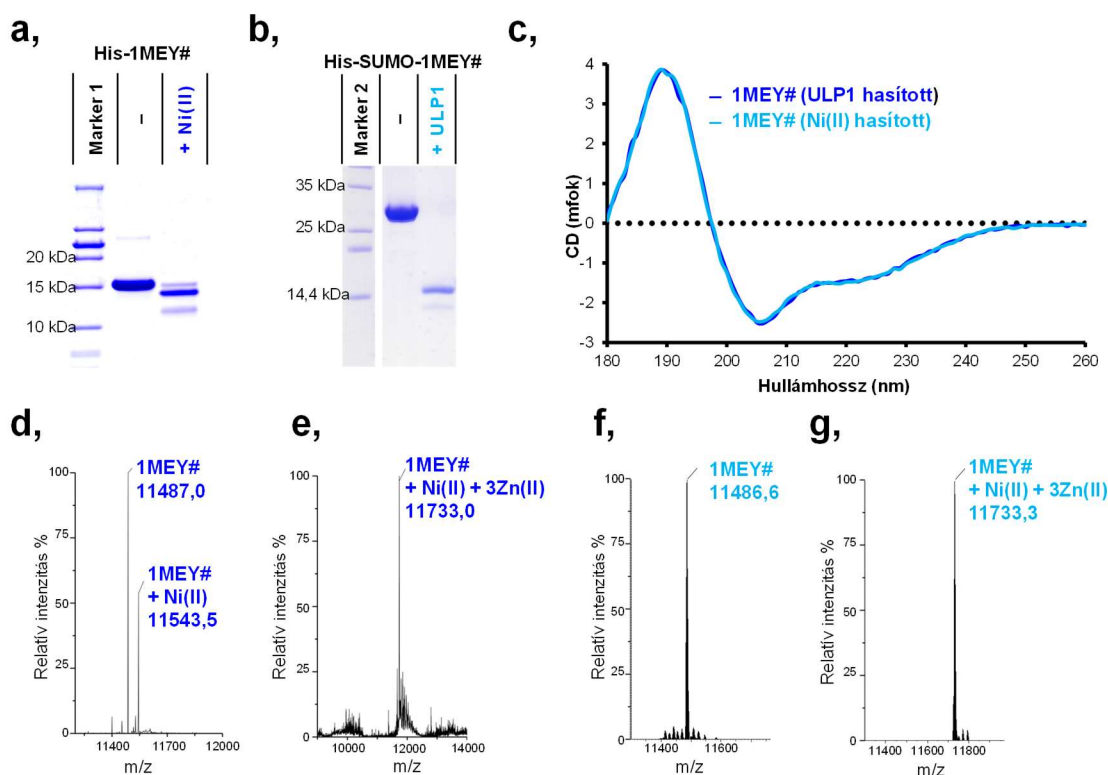
CD spektruma azonos volt, a fragmensek molekulatömege ESI-MS vizsgálatok alapján megegyezett savanyított közegben (21. ábra d,f),(2. táblázat), míg pH ~7,7-en azonos módon kötöttek három Zn(II)-t és egy Ni(II)-t (21. ábra e,g),(2. táblázat).

2. táblázat: Ni(II)-indukált szelektív peptidhidrolízis és ULP1 enzimmel végrehajtott hasítás során képződött 1MEY# fehérjék ESI-MS vizsgálata.

	Elméleti molekulatömeg (Da)	Ni(II) ionokkal hasított fehérje (Da)	ULP1 enzimmel hasított fehérje (Da)
apo 1MEY#	11486,5	11487,0	11486,6
1MEY# + Ni(II) + 3 Zn(II)*	11733,2	11733,0	11733,3

* – 8 proton.

Érdeemes megemlíteni, hogy az ULP1 enzimmel hasított 1MEY# fehérje az N-terminális ATCUN motívumában Ni(II)-t kötött, annak ellenére, hogy a reakcióelegy nem tartalmazott hozzáadott Ni(II)-t, így azt a szakaszos (batch) Ni-affinitás fehérjetisztításhoz használt Ni(II)-nitrilotriacetát (Ni-NTA) gyantából vette fel. Ez összhangban van az irodalmi adatokkal, mivel az ATCUN motívum ($lg\beta = 19,19 - 23,37$) ~10 nagyságrenddel erősebben köti a Ni(II)-t, mint az NTA ($lg\beta = 10,75 - 11,54$) [134-144,195-196].



21. ábra: Ni(II)-indukált szelektív peptidhidrolízis és ULP1 enzimmel történő hasítás összehasonlítása **a**, A His-1MEY# fehérje Ni(II)-indukált hidrolízis előtt és után Tricine-SDS-PAGE módszerrel vizsgálva. **c**(His-1MEY#) = 40 μ M; $c(\text{ZnCl}_2) = 100 \mu\text{M}$; $c(\text{NiCl}_2) = 100 \mu\text{M}$; 100 mM HEPES (pH 8,2); 72 óra; 50 °C; **b**, Ni-NTA gyantára kötött His-SUMO-1MEY# fehérje hidrolízise ULP1 proteázzal Tricine-SDS-PAGE módszerrel vizsgálva. 100 mM HEPES (pH 8,2); 150 mM NaCl; 60 mM imidazol; 16 óra; 4 °C; 2 RPM; **c**, 1MEY# cinkujj fehérje CD spektruma Ni(II)-indukált szelektív peptidhidrolízis és ULP1 enzimmel történő hasítás után. A fehérjekoncentrációt 18,8 μ M-ra normáltuk. 10 mM HEPES (pH 7,4); $l = 0,1$ mm. A Ni(II) hatására hidrolizált

His-1MEY# fehérje ESI-MS vizsgálata **d**, 0,1 (V/V)% hangyasav jelenlétében, **e**, 100 mM ABC (pH 8,1) pufferben. ULPI enzimmel hidrolizált His-SUMO-1MEY# fehérje ESI-MS vizsgálata **f**, 0,1 (V/V)% hangyasav jelenlétében, **g**, 10 mM ABC (pH 7,9) pufferben.

Emellett a Ni(II)-komplex kinetikailag inertnek bizonyult, mivel a mintát 0,1 (V/V)% hangyasavval kezelve 5 perc elteltével még ~50% relatív intenzitással detektálható volt a Ni(II)-tartalmú fehérjéhez tartozó csúcs az ESI-MS spektrumokon (**21. ábra d**).

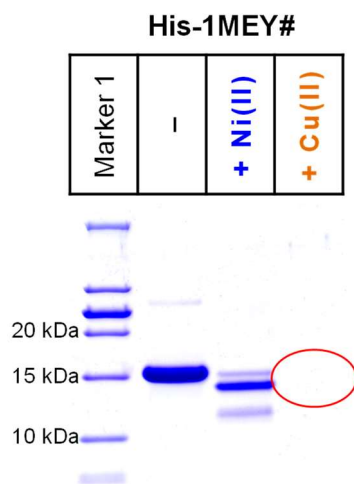
5.1.3 ATCUN motívum és cinkujj alegységek függetlenségének vizsgálata

Az a tény, hogy a Ni(II) még savas körülmények között sem távozott el teljes mértékben az 1MEY# fehérjéből az ESI-MS alapján (**21. ábra d**), fontos a további kísérletek szempontjából. Így alaposabban megvizsgáltuk, hogy a fehérjében található cinkujj alegységek és az ATCUN motívum fémkötése mennyiben különíthető el egymástól. Az N-terminális ATCUN motívum Ni(II)-komplexének képződése megnöveli az UV-Vis abszorbanciát 280 nm-en, illetve egy új kis intenzitású sáv is észlelhető a látható hullámhossz tartományban ~400 nm környékén (**F5. ábra a**). A fehérjét 66 ekvivalens EDTA-val kezelve ~400 órába telt, amíg sikerült elérni a teljesen Ni(II)-mentes fehérje UV-Vis spektrumát (**F5. ábra b**). Az ESI-MS spektrumok alapján a holo 1MEY# fehérjét 12,5 ekvivalens EDTA jelenlétében sem sikerült Ni(II)-mentes fehérjeformában azonosítani 30 perc inkubációt követően sem. Mindeközben a fehérje Zn(II) tartalmát fokozatosan komplexálta az EDTA (**F6. ábra**). Mindezek a tapasztalatok arra utalnak, hogy az ATCUN motívumban kötött Ni(II) termodinamikailag stabilis, valamint nagy inertségének is köszönhetően nem szabadul fel a fehérjéből. Így lehetséges a cinkujj fehérjék Zn(II)-affinitásának meghatározása Ni(II) jelenlétében.

5.1.4 Cu(II)-Ni(II) csere a hidrolizált cinkujj fehérjében

Igazoltuk, hogy a cinkujj fehérjék tisztítása megvalósítható Ni(II)-indukált szelektív hidrolízis révén, amennyiben a szekvencia tartalmaz X|(S/T)XH aminosav motívumot, valamint, hogy a Ni(II) nem lép kompetícióba a cinkujj alegységekért a Zn(II)-vel a reakció során. Habár a szakirodalomban bemutatásra került a hidrolízis Cu(II)-vel is rövid peptideket felhasználva [151], a reakciót cinkujj fehérjével nem tudtuk megvalósítani. A Ni(II)-vel analóg módon végrehajtott inkubáció során Cu(II) felesleg jelenlétében a His-1MEY# cinkujj fehérje másodlagos szerkezete pillanatszerűen összeomlott és a fehérje aggregálódott. Ezt követően nem tudtuk ismételt oldatba vinni, emiatt az SDS-PAGE képeken nem láthatók fehérjesávok (**22. ábra**). Hasonló reakciókat cinkujj fehérjével nem vizsgáltak a szakirodalomban, de az amb2 fehérje cisztein-, és hisztidintartalmú fémkötő

motívumát modellező peptid vizsgálata alapján megfigyelhető volt, hogy a Cu(II) oxidálta a fehérje ciszteinjeit. Ezzel intra-, és intermolekuláris diszulfid-hidak alakultak ki, miközben a Cu(II) Cu(I) oxidációs állapotba redukálódott [106]. A redukciót követően a "szoft" karakterű Cu(I) effektíven versengett a Zn(II)-vel a fehérjében épen maradt ciszteinekért, további szerkezeti összeomlást előidézve [104].



22. ábra: A Ni(II) és Cu(II) jelenlétében inkubált His-1MEY# fehérjék összehasonlítása Tricin-SDS-PAGE módszerrel.

Megvizsgáltuk, hogy a Ni(II)-indukált hidrolízist követően az ATCUN motívumban kötött Ni(II) helyettesíthető-e Cu(II)-vel, azaz kerülő úton létrehozható-e Cu(II)–ATCUN komplex. A szakirodalmi adatok alapján az ATCUN-Cu(II)-komplex termodinamikai stabilitása még a Ni(II)-komplexnél is ~5 nagyságrenddel nagyobb [134-139,141-143]. Így feltehetően nagyobb valószínűséggel kötődik egy szabad Cu(II) a szabad ATCUN motívumhoz, minthogy kompetícióba lépjen Zn(II)-vel a cinkujj alegységek ciszteinjeiért. Ehhez 1 órán keresztül 50 °C-on 100× EDTA felesleg mellett inkubáltuk a holo 1MEY# fehérjét 0,1 mM trisz(2-karboxietil)-foszfín (TCEP) jelenlétében, hogy eltávolítsuk a fehérjében kötött Ni(II)-t és Zn(II)-t, majd puffercserét követően ZnCl₂ adagolásával helyreállítottuk a fehérje másodlagos szerkezetét. A TCEP redukálószerre a cinkujjak ciszteinjeinek megvédése érdekében volt szükség, mivel Zn(II)-hiányában a fehérje érzékeny az oxidációra [197]. A tömegspektrometriás mérések alapján a kezelést követően a fehérje 80%-a csak három Zn(II)-t kötött meg, azonban 20% -ban még továbbra is jelen volt az ATCUN motívumhoz koordinálódó Ni(II), ami szintén a komplex kinetikai inertségére utal (**23. ábra a.**). A kezelést követően kialakítható volt a fehérje 100%-ban Ni(II)-kötött formája, amennyiben pedig a kiindulási 3 Zn(II)-t tartalmazó fehérjéhez 0,8 ekvivalensnyi Cu(II)-t adunk, egy új csúcs jelent meg a tömegspektrumban, ami az

1MEY# cinkujj fehérje Cu(II)-komplexéhez volt köthető (23. ábra b, c). A kiindulási elegyben jelenlévő Ni(II)-tartalmú forma is megfigyelhető 5 Da távolságra a Cu(II)-tartalmú fehérje csúcsától. A mért molekulatömegek jó egyezést mutattak az elméleti értékekkel (3. táblázat).

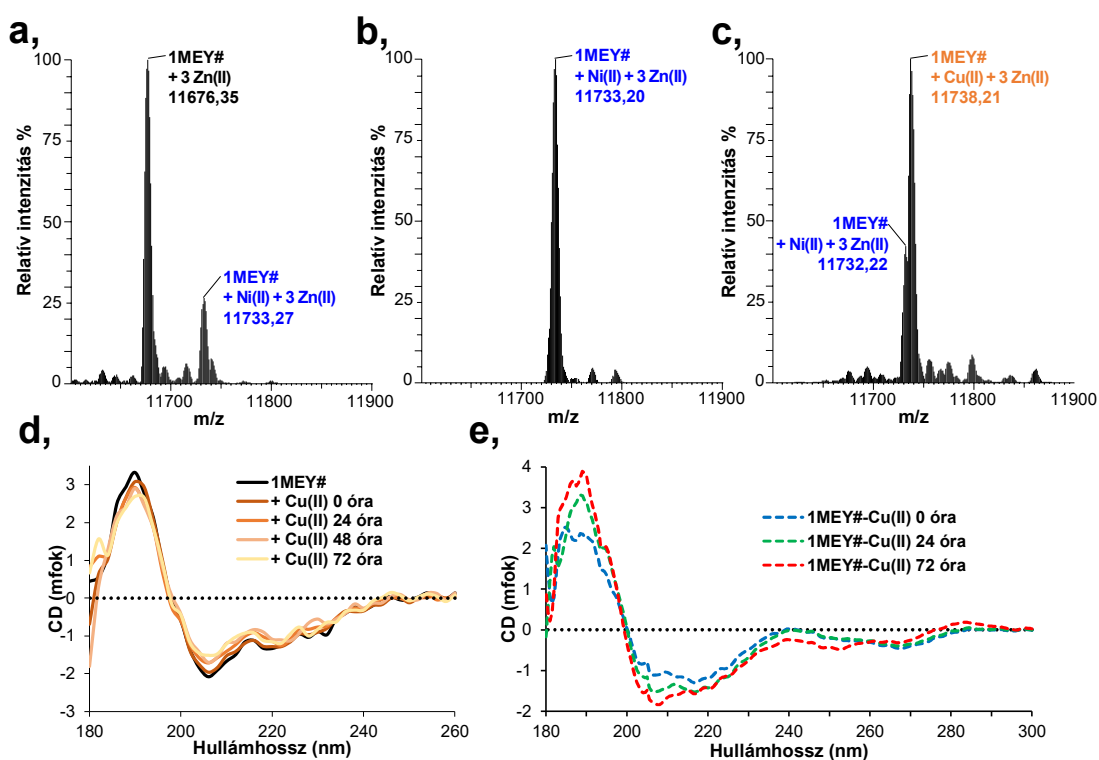
3. táblázat: Az 1MEY# cinkujj fehérje Zn(II)-, Ni(II)- és Cu(II)-komplexeinek ESI-MS vizsgálata.

	Elméleti molekulatömeg (Da)	Mért molekulatömeg (Da)
1MEY# + 3 Zn(II) ^o	11676,3	11676,4
1MEY# + 3 Zn(II) + Ni(II)*	11733,2	11733,2
1MEY# + 3 Zn(II) + Cu(II)*	11738,2	11738,2

^o – 6 proton;

* – 8 proton

A mérés időtartama során nem volt megfigyelhető a Zn(II) szubsztitúciója, az továbbra is a cinkujj alegységekhez koordinálódott. A hipotézisünk, miszerint a Cu(II) elsősorban a szabad ATCUN motívumhoz kötődik, helyállónak bizonyult.



23. ábra: 1MEY# fehérje vizsgálata ESI-MS módszerrel: **a**, amennyiben a fehérje fém tartalmát előzetesen 100× EDTA felesleg segítségével eltávolítottuk, majd Zn(II)-vel telítettük; **b**, Ni(II)-telítés után. **c**, Cu(II)-vel történő telítést követően. Az 1MEY# cinkujj fehérje másodlagos szerkezetének alakulása CD spektroszkópia segítségével követve: **d**, 0,8 ekv Cu(II) jelenlétében. $c(1MEY\#) = 14 \mu\text{M}$; 10 mM ABC (pH 7,9); $l = 0,1 \text{ mm}$; **e**, 0,8 ekv Cu(II) és 1 ekv specifikus DNS jelenlétében. $c(1MEY\#) = 10 \mu\text{M}$; 10 mM HEPES (pH 8,2); $l = 0,1 \text{ mm}$; A DNS CD spektrumát a mért spektrumokból kivonva kaptuk meg a szaggatott vonallal jelzett különbségi spektrumokat.

Többnapos inkubáció hatására az így előállított Cu(II)-tartalmú fehérje másodlagos szerkezetének kismértékű változása figyelhető meg. Ennek oka feltehetően, a Cu(II) és

ciszteinek között fellépő lassú redoxireakció lehet, azonban ez a folyamat visszaszorítható volt amennyiben a cinkujj fehérje a specifikus DNS célszekvenciájához kötődött (23. ábra d, e). Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy a fehérje–DNS kölcsönhatás növelhette a Zn(II)-kötés stabilitását is, amit a későbbiekben alaposabban tanulmányoztunk (ld. 5.2.3 fejezet).

Összességében tehát elmondható, hogy sikerült kialakítani a Cu(II)-komplexét egy ATCUN motívummal rendelkező cinkujj fehérjének oly módon, hogy a Cu(II) csak az N-terminális ATCUN motívumhoz kötődjön, míg a cinkujj alegységek továbbra is Zn(II)-t kötnek meg. Ez az eredmény azért fontos, mert így a fehérje Ni(II)-komplexe mellett lehetőség volt a Cu(II)-komplex DNS hasítását is tanulmányozni a későbbi kísérleteink során (ld. 5.6 fejezet).

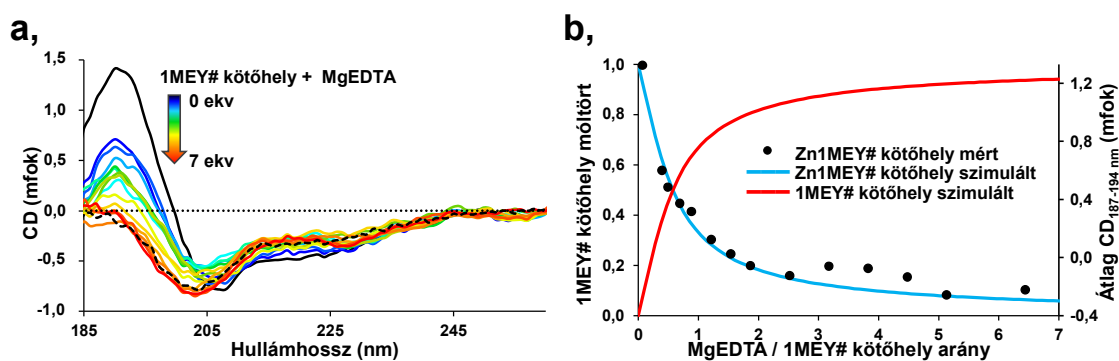
5.2 Az előállított cinkujj fehérje Zn(II)-, és DNS affinitása

5.2.1 Cinkujj fehérjék Zn(II)-affinitása

A cinkujj fehérjék Zn(II)-affinitásának meghatározása során számos korlátozó tényezővel találkozunk. A Zn(II) kölcsönhatása cinkujj fehérjékkel a fémion lezárt d-alhéja miatt nem követhető UV-Vis abszorpciós spektrometriával. A vizsgálható koncentrációtartomány limitált, mivel $< \mu\text{M}$ koncentrációknál a környezet nagy Zn(II)-szennyezettsége teszi pontatlanná a mérést, míg a mM tartományban pH 7,4 felett Zn(OH)₂ csapadék képződik. Ezen kívül az Zn(II)-mentes apo-formájú cinkujj fehérjék instabilak, könnyen aggregálódnak, és amint korábban említettük, cisztein oldalláncaik oxidációra hajlamosak. Ezért javasolt a kísérleteket a holoproteinnel kezdeni megfelelő kompetitor alkalmazásával [197]. A puffertől függően egy vizsgált cinkujj fehérje hajlamos a kicsapódásra $\sim 20 \mu\text{M}$ koncentráció felett. Amennyiben a látszólagos stabilitási állandó egy cinkujj motívumra vonatkoztatva nagyobb, mint 10^9 , közvetlen titrálás még az apofehérjével sem lehetséges, kompetitorok alkalmazása válhat szükségessé. Zn(II)-tartalmú fehérjék kompetitorokkal végzett titrálásánál, azonban a cserereakciók kinetikája lehet limitáló tényező [21,68]. A szakirodalomban kevés adat található több alegységből felépülő cinkujj fehérjék Zn(II)-affinitására vonatkozóan (4. táblázat). Az önálló cinkujj motívumokra vonatkozó értékek pedig nagyban függenek az alkalmazott módszertől és a mérési körülményektől (1. táblázat).

Méréseink során abból indultunk ki, hogy az 1MEY# fehérje három cinkujj motívuma egymástól függetlenül, azonos erősséggel köti meg a Zn(II)-t. Elsőként a FluoZin-3, Zn(II)-szelektív fluoreszcens kelátor alkalmazásával [190] becsültük meg az ily

módon definiált, egy cinkujj motívumra vonatkozó látszólagos stabilitási állandót ($\beta^{\text{pH } 7,4}$). A kísérleti pontokat különböző feltételezett affinitás értékek alapján szimulált görbékkel összehasonlítva a $\beta^{\text{pH } 7,4}$ nagyobbak bizonyult 10^9 -nél (**F7. ábra b**). Mivel az adott mérés nem volt lehetséges ennél pontosabb becslés, így a FluoZin-3-nál a Zn(II)-vel nagyobb stabilitású komplexet kialakító kelátorra volt szükség. A kereskedelmi forgalomban azonban ilyen fluoreszcens kelátor nem érhető el. Ezért hagyományos, nem fluoreszcens és nem királis kelátorokat felhasználva CD spektroszkópiával vizsgáltuk tovább rendszerünket. Ez a módszer alkalmas az 1MEY# cinkujj fehérje holo formájára jellemző $\beta\beta\alpha$ másodlagos szerkezet Zn(II) eltávolításának hatására bekövetkező összeomlásának követésére. Az EDTA kelátorral végrehajtott titrálás látszólag túl éles töréspontot eredményezett a végpontban. A CD spektrumok kis jel/zaj aránya nem tette lehetővé, hogy stabilitási állandót számoljunk a titrálási görbéből (**F8. ábra**). Itt fontos kiemelni, hogy a töréspont ~ 3 ekvivalens hozzáadott EDTA környékén észlelhető a titrálási görbén, ami szintén arra utal, hogy mindhárom cinkujj alegységben kötött Zn(II) felszabadult, azonban a Ni(II) továbbra is a fehérje N-terminális ATCUN motívumában marad kötött formában, amint azt az előző alfejezetben is már bizonyítottuk (**ld. 5.1.3 fejezet**). Az etilén-glikol-bisz(β -amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetraacetát (EGTA) az EDTA-nál két nagyságrenddel gyengébben köti a Zn(II)-t ($\lg\beta_{\text{ZnEGTA}} = 14,5$) [198], ami biztatónak tűnt a CD-titrálási görbe alakját illetően. A mérések során azonban az egyensúly rendkívül lassan állt be: $600 \times$ EGTA felesleg 1 óra alatt sem volt képes teljes mértékben eltávolítani a Zn(II)-t a cinkujj fehérjéből (**F9. ábra**).



24. ábra: a, Az 1MEY# CD spektruma növekvő koncentrációjú MgEDTA komplex jelenlétében. Fekete szaggatott vonal: 1MEY# 5 ekvivalens EDTA jelenlétében 5 perc inkubációt követően $c(\text{holo-1MEY\#}) = 7 \mu\text{M}$; 10 mM HEPES (pH 7,4); $l = 0,1$ mm; Az egyedileg összeállított mintákat 12 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk a CD mérések előtt. b, 1MEY# kötőhely eloszlási diagramja a CD spektrumok 187-194 nm hullámhossz-tartományából számolva PSEQUAD program segítségével [4]. A 187-194 nm tartományban mért átlag ellipticitás értékek (fekete pontok) összehasonlítva a szimulált Zn1MEY# kötőhely móltörttel (világoskék görbe).

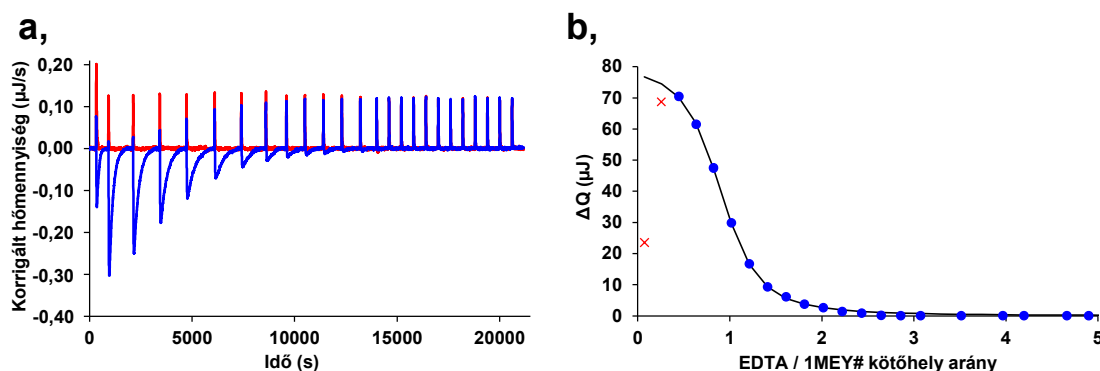
A fenti nehézségek áthidalásaként végül MgEDTA komplex-szel hajtottuk végre a titrálást. Mg(II)-jelenlétében sikerült az EDTA Zn(II)-komplexének látszólagos stabilitását

~2 nagyságrenddel csökkenteni, miközben a kompetíció kinetikailag mérhető időtartományban zajlott le. Mindazonáltal a külön összeállított mintákat 12 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten a méréseket megelőzően (**24. ábra a, b**). A mérési adatok illesztése során feltételeztük, hogy az 1MEY# cinkujj fehérje három alegysége azonos erősséggel köti a Zn(II)-t, mivel az aminosav szekvenciák nagy hasonlóságot mutattak (**25. ábra**). Az így meghatározott látszólagos stabilitási állandó értéke ($\lg\beta^{\circ}_{\text{pH } 7,4} = 12,0 \pm 0,1$) (**4. táblázat**), nagyságrendjében megegyezett a CP1 modellpeptidre meghatározott állandók alsó közelítésével.

		Aminosav szekvencia																												
		N-terminális toldalék	S G H I E G R H M L E P G E K																											
1MEY#	1. cinkujj	P	Y	K	C	P	E	C	G	K	S	F	S	Q	S	S	N	L	Q	K	H	Q	R	T	H	T	G	E	K	
	2. cinkujj	P	Y	K	C	P	E	C	G	K	S	F	S	Q	S	S	D	L	Q	K	H	Q	R	T	H	T	G	E	K	
	3. cinkujj	P	Y	K	C	P	E	C	G	K	S	F	S	R	S	D	N	L	V	R	H	Q	R	T	H	T	G	K	K	T
CP1		P	Y	K	C	P	E	C	G	K	S	F	S	Q	K	S	D	L	V	K	H	Q	R	T	H	T	G			

25. ábra: Az 1MEY PDB kódnevű cinkujj fehérjén [1] alapuló 1MEY# cinkujj fehérje aminosav szekvenciája összehasonlítva a 26 aminosavból álló Cys₂His₂ típusú CP1 modell cinkujj peptiddel [65]. Az 1MEY# cinkujj fehérje szekvenciájának eltérései a CP1-hez képest a DNS-kötő régióban található piros háttérrel jelölve. Zöld háttérrel a CP1-gyel megegyező aminosavakat, szürke színnel a Zn(II)-kötést feltehetően nem befolyásoló N-terminális toldalékot, illetve az alegységek közötti linkereket jelöltük.

A CD-titrálás alapján meghatározott Zn(II)-affinitás érték megerősítése céljából független módszerként ITC kísérletet is végrehajtottunk. A szakirodalmi adatok alapján a kompetitív ITC mérések egy kelátor alkalmazásával optimálisak lehetnek cinkujj fehérjék Zn(II)-affinitásának meghatározására [21,68], de tudomásunk szerint ilyen méréseket eddig cinkujj fehérjékkel nem, csak metallotionein komplexek vizsgálata során végeztek [199].



26. ábra: **a**, Az 1MEY# cinkujj fehérje reprezentatív titrálása EDTA-val, ITC-vel követve. $c(\text{holo-1MEY\#}) = 10 \mu\text{M}$ (kék görbe), illetve az 1MEY# ultraszűrés utáni átfolyó frakciójának titrálása (piros görbe). 2-2 μl injektálások 500 μM EDTA mérőoldattal 10 mM HEPES (pH 7,40); **b**, Az integrált, alapvonalal korrigált hőváltozás értékek a holo-1MEY# fehérje EDTA-val történő titrálása során (kék pontok), és az illesztett titrálási görbe kompetíciós titrálási modell felhasználásával (fekete görbe). Az illesztés nem tartalmazza az első két injektálás hőmennyiségét (piros x-ek).

Egy ITC mérés során a kapott válaszjel szigmoidális jellegű, az ekvivalenciapontban érzékeny a változásokra. Emiatt lehetségessé vált a holo-1MEY# cinkujj fehérje – EDTA

rendszerben mért titrálási görbék illesztése. A kompetitív ITC mérésnek számos előnye van egyéb módszerekkel és direkt titrálási technikákkal szemben: a környezetben előforduló viszonylag magas Zn(II)-szennyezés [200], a Zn(OH)₂ kicsapódása és a ciszteinek oxidációja a mérés körülményei között nem játszódnak le, vagy hatásuk könnyen kiszűrhető, így nem zavarják a mérést. Továbbá a mérés során kis térfogatok ($\geq 190 \mu\text{l}$) és koncentrációk ($\geq 10 \mu\text{M}$) alkalmazhatók. Az egyetlen valódi korlátozó tényező a kompetíciós reakció szokásosnál lassúbb kinetikája volt. Míg a CD-spektrumok azt mutatták, hogy az egyensúly gyorsan beállt az 1MEY#–EDTA rendszerben, addig az ITC-kísérletekben az egyensúlyi állapot beálltához az egyes injektálások után közel 30 perc várakozásra volt szükség (**26. ábra a,**) a tipikus 5 perces ITC-időtartam helyett. Igen nagy eltérések mutatkoznak a cinkujj–EDTA kompetíciós reakciók kinetikájára vonatkozóan a szakirodalomban. Sènèque és Latour szerint, a Zn(II):CP1:EDTA 1:1:1 rendszerben az egyensúly csak 250 perc alatt állt be ($\lg\beta'_{\text{ZnCP1, pH } 7,4} = 15,7$) [68]. Heinz és mtsai. három nagyságrenddel gyorsabb cserereakcióról számoltak be a CP1- $\Delta 8$ peptidet használva, amelyben a 8. helyen lévő glicint eltávolították ($\lg\beta'_{\text{ZnCP1-}\Delta 8, \text{ pH } 7,4} = 11,4$) [68,201]. Ez arra utalhat, hogy kismértékű változások az aminosav szekvenciában jelentősen befolyásolhatják a reakció kinetikáját.

Az integrált ITC titrálási görbét standard kompetíciós modell segítségével illesztettük (**26. ábra b,**) (ld. **4.6.1 fejezet**). A Zn(II)–EDTA reakció entalpiáját külön határoztuk meg ($\Delta H_{\text{ZnEDTA}} = -17,24 \text{ kJ/mol} = -4,1 \text{ kcal/mol}$), ami a szakirodalomban meghatározott entalpiaértékek tartományába esik ($-14,98 - -23,5 \text{ kJ/mol}$) [202-206]. Ezt az entalpia értéket és az EDTA-ra vonatkozó szakirodalmi Zn(II)-affinitás értéket ($\lg\beta'_{\text{pH } 7,4} = 13,56$) [207] felhasználva hajtottuk végre a kompetíciós rendszer illesztését. Az entalpiaértékek korrekcióját **F1.3 fejezet** tartalmazza. Az 1MEY# titrálási görbe szigmoidális alakja arra utal, hogy a lejátszódo reakció egyetlen folyamattal leírható, azaz a három Zn(II)-kötőhely valóban nem megkülönböztethető (**26. ábra b,**). Így egyetlen Zn(II)-affinitás értéket és Zn(II)-kötési entalpiát határozhattunk meg mindhárom kötőhelyre, ami az illesztést jelentősen megkönnyítette.

Korábbi CP1 modellpeptiddel végzett ITC mérések alapján $\sim 0,5$ cisztein protonálódik a Zn(II) felszabadulása során [208]. Ezt az értéket elfogadva a számított $\Delta H_{\text{kötőhely}} = -23,5 \pm 1,3 \text{ kcal/mol}$ entalpia érték hibahatáron belül megegyezik Blasie és mtsai. által a CP1 modellpeptidre közölt értékekkel ($\Delta H_{\text{CP1}} = -22,9 \pm 1,1; -23,4 \pm 1,0 \text{ kcal/mol}$ [208-209] 200 mM piperazin-N, N'-bisz (2-etánszulfonsav) (PIPES) (pH 7,0); 50 mM NaCl), míg kismértékben eltér a HEPES-ben meghatározott entalpiától

($\Delta H_{CP1} = -27,6 \pm 0,6$ kcal/mol 200 mM HEPES (pH 7,0); 50 mM NaCl) [208]. A közelmúltban Kluska és mtsai. meghatározták a CP1 modellpeptid tiolcsoportjainak pK_a értékeit ($pK_{a1}^{SH} = 7,77$; $pK_{a2}^{SH} = 9,15$) [73], amely alapján átlagosan 1,68 ekvivalens protont vesznek fel a ciszteinek a mérési körülményeink között (pH 7,40). Ezt a cisztein protonálódási értéket felhasználva $\Delta H_{kötőhely} = -28,0 \pm 1,4$ kcal/mol entalpia kapható az 1MEY# fehérje alegységeire, ami 5,1-5,3 kcal/mol egységgel nagyobb, mint a CP1 fehérje K/S verziójára meghatározott entalpia ($-22,9$ kcal/mol [209]; $-22,68$ kcal/mol) [73], míg jóval közelebb helyezkedik el az eredeti CP1 peptidre HEPES pufferben meghatározott entalpiához. Attól függetlenül, hogy milyen cisztein protonálódási értéket veszünk figyelembe, a meghatározott entalpiaértékek közel vannak a különböző CP1 modellpeptidekre az évek során meghatározott entalpiaértékekhez, így ezek alapján nem jelenthető ki, hogy a több fehérjealegység összekapcsolása, illetve a linkerszakaszok jelenléte érdemben befolyásolná az alegységek Zn(II)-kötését termodinamikai szempontból.

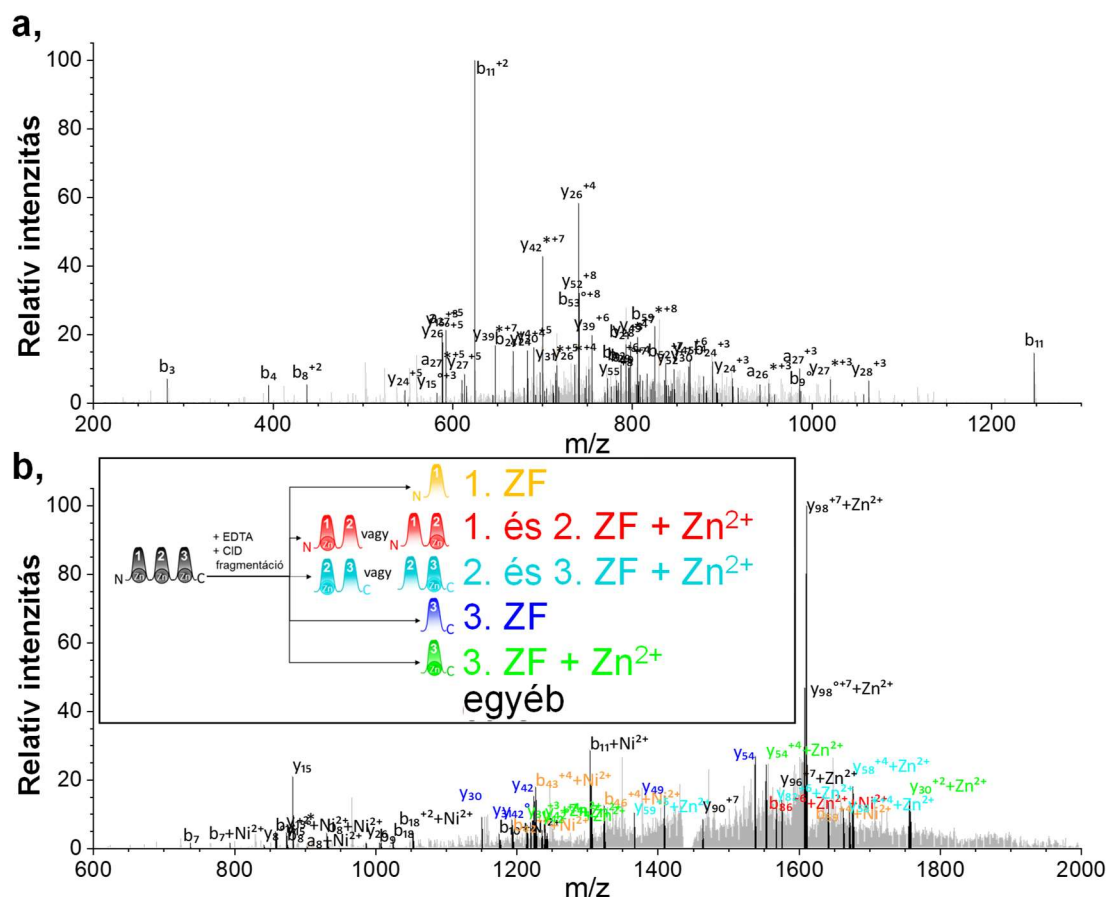
A cinkujj alegységek Zn(II)-kötésére meghatározott $\lg\beta'_{pH\ 7,4} = 12,2 \pm 0,1$ érték közel áll a MgEDTA kompetíciós titrálásból a CD spektrumok alapján számított értékhez (**4. táblázat**). A CP1 és az 1MEY# cinkujj fehérje alegységeinek nagymértékű hasonlósága alapján feltételezhető, hogy Zn(II)-affinitásuk is hasonló (**25. ábra**). A Zn(II)–CP1 rendszerre az évek során meghatározott $\lg\beta'_{pH\ 7,4}$ értékek a mérési módszertől és az alkalmazott puffertől függően 12,0-15,7 között változnak (**1. táblázat**). Az 1MEY# Zn(II)-affinitása hasonló a CP1 modellpeptidre meghatározott legkisebb $\lg\beta'$ értékhez [65,72] (**1. táblázat**), miközben 3,5 egységgel kisebb, mint az irodalomban legutóbb közölt $\lg\beta'$ érték [68]. A CP1-alapú 1MEY# cinkujj fehérje hasonló erősséggel köti a Zn(II)-t a természetben előforduló cinkujj alegységekhez (**1. táblázat**) és a teljes cinkujj fehérjékhez, mint pl. az MTF1 (**4. táblázat**).

4. táblázat: Cinkujj fehérje-Zn(II)-kölcsonhatásokhoz rendelhető átlagos $\lg\beta'$ értékek alegységekre vonatkoztatva; RT: UV-Vis spektroszkópiával követett reverz titrálás; CDc: Titrálás kompetitorokkal CD spektroszkópiával követve; cITC: Titrálás kompetitorokkal ITC-vel követve; ED: egyensúlyi dialízis; PAR: PAR kompetitor jelenlétében végrehajtott spektroszkópiás titrálás;

cinkujj fehérje	Körülmények	$\lg\beta'$ pH 7,4	Hivatkozás
1MEY# teljes	10 mM HEPES (pH 7,4)	12,2 \pm 0,1 (cITC)	[210]
		12,0 \pm 0,1 (CDc)	[210]
TFIIIA teljes	50 mM HEPES (pH 7,4); 50 mM KCl	8,0 (ED)	[90]
MTF1 teljes	100 mM HEPES (pH 7,0); 50 mM NaCl	11,3 (RT)*	[76]
	10 mM HEPES (pH 7,4); 100 mM NaClO ₄	9,1 (PAR)	[77]

* pH 7,4-re átszámolva Kluska és mtsai. által [21]

Az MS/MS mérések is azt valószínűsítették, hogy nincs kitüntetett stabilitású Zn(II)-kötőhely az 1MEY# cinkujj fehérjében. Az eredmények értékelését azonban megnehezítette, hogy a Zn(II) kötődése jelentősen csökkentette a fehérje fragmentálhatóságát továbbá módosította a fehérje töltöttségi állapotát az MS mérések körülményei között. A holo-1MEY# fragmentációja nem volt megvalósítható, míg az apo-fehérje számos fragmentációs csúcsot eredményezett azonos mérési körülmények között (27. ábra a,).



27. ábra: a, Az apo-1MEY# cinkujj fehérje MS/MS analízise. A CID fragmentációhoz a legintenzívebb $m/z = 766$ ($z = 15$) prekuzort választottuk ki; **b,** A holo-1MEY# cinkujj fehérje MS/MS analízise 12,5 ekvivalens EDTA jelenlétében. A CID fragmentációhoz a legintenzívebb $m/z = 1451$ ($z = 8$) prekuzort választottuk ki, amelyben egy Zn(II) és egy Ni(II) kapcsolódott a fehérjéhez. A feliratok jelzik az egyes cinkujj alegységek (ZF) színekódolását: az első cinkujj alegység sárga, az első és második cinkujj alegység egy Zn(II)-vel piros; A második és harmadik cinkujj alegység egy Zn(II)-vel világoskék; a harmadik cinkujj alegység (kék); míg a harmadik cinkujj alegység egy Zn(II)-vel (zöld). Az N-terminális fragmensekben a Ni(II) az ATCUN motívumhoz kötődve található. Az NH₃ veszteségek jelölése: *, a H₂O veszteségek jelölése: °. Az azonosított csúcsokat feketével, a nem azonosítottakat szürkével jelöltük (F3. és F4. táblázat).

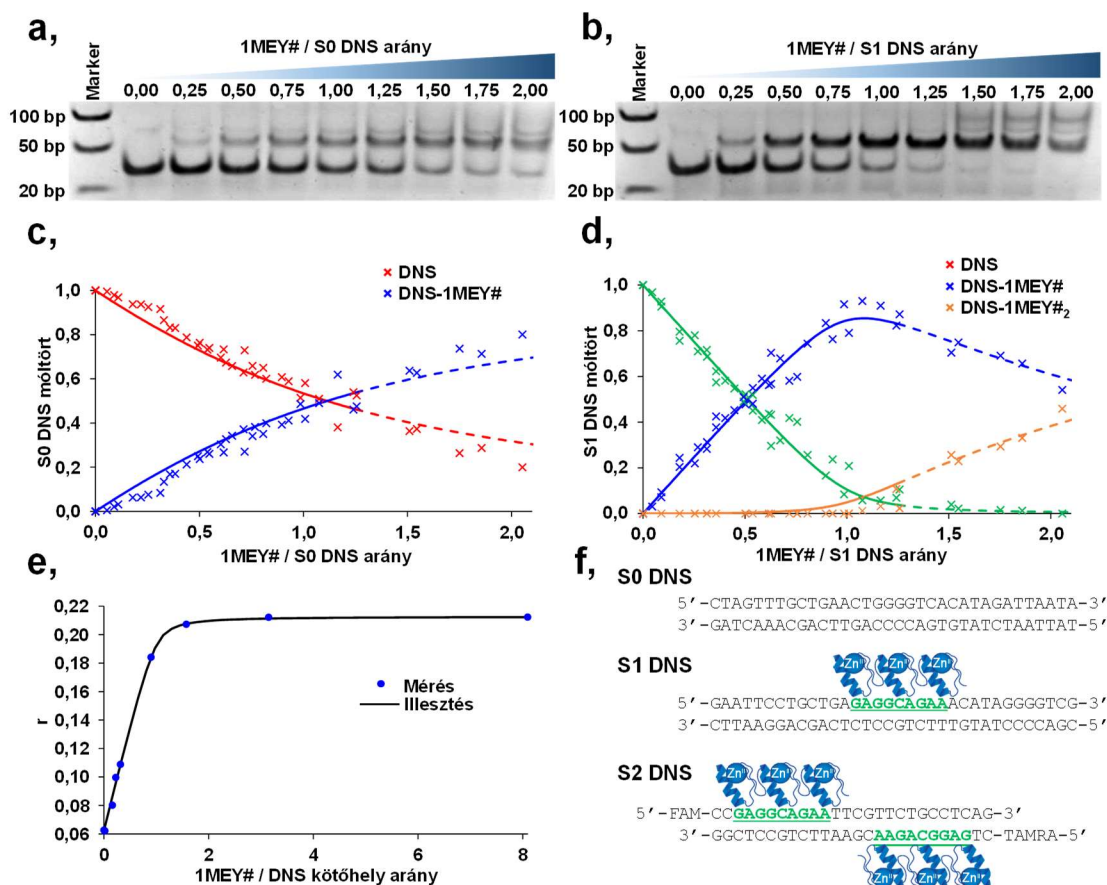
Továbbá az MS mérések körülményei között csak 12,5 ekvivalens EDTA jelenlétében lehetett elérni, hogy a holo-cinkujj fehérje döntő hányada Zn₁1MEY# részecskék formájában forduljon elő. E részecske fő fragmentációs termékei csak néhány N- vagy C-terminális aminosavat veszítettek el, míg a Zn(II) kötve maradt. Sikerült olyan

fragmenseket azonosítani, amelyekben a Zn(II) a harmadik cinkujj alegységhez, a harmadik vagy második, illetve az első vagy második cinkujj egységhez koordinálódott (**27. ábra b**).

5.2.2 Cinkujj fehérjék DNS-felismerése

A Berg és mtsai. által vizsgált cinkujj fehérje [1] (Protein Data Bank code: 1MEY) az 5'-G(A/G)G(G/T)C(A/G)GAA-3' DNS szekvenciát ismeri fel szelektíven. Mivel a röntgendiffrakciós vizsgálatok során a fehérjét az 5'-GAGGCAGAA-3' DNS szekvenciával együtt kristályosították ki, ezt a szekvenciát tekintették a későbbiekben az 1MEY specifikus szekvenciájának. A gélelektroforézis sáveltolódás vizsgálatok alapján az 1MEY# cinkujj fehérje is felismeri a 5'-GAGGCAGAA-3' DNS szekvenciát (**28. ábra**). A gélképek kvantitatív értékelése alapján a kölcsönhatás $\sim 1,9$ nagyságrenddel erősebb, mint az alkalmazott 34 bázispárból (bp) álló S0 nonspecifikus DNS molekulával (**5. táblázat**). A holo-1MEY# kötődése az S0 DNS szakaszhoz $\lg\beta' = 6,27 \pm 0,02$ értékkel jellemezhető. A fehérjefelesleg növelésével egy további halvány sáv is megjelent, de ez nem volt egyértelműen elkülöníthető, így nem vettük figyelembe a számolások során (**28. ábra a, c**). Erőteljesebb géleltolódás figyelhető meg a szintén 34 bp-ból álló, de a specifikus szekvenciárészletet is tartalmazó S1 DNS jelenlétében, ahol az 1:1 komplexhez $\lg\beta' = 8,20 \pm 0,08$ érték rendelhető, ami jó egyezést mutat a fluoreszcencia anizotrópiás mérésekkel is (**28. ábra b, d, e**) (**5. táblázat**).

Az 1MEY# fehérje specifikus és nonspecifikus DNS-felismerése közötti eltérés mértéke jó egyezést mutat a mesterségesen tervezett cinkujj fehérjék szelektivitására vonatkozó irodalmi adatokkal. Berg és mtsai. hasonló mértékű növekedést tapasztaltak amennyiben a nonspecifikus szekvenciát specifikusra cserélték egy konszenzus peptiden alapuló cinkujj fehérje vizsgálata során [211]. Az S1 DNS a 9 bázispárnyi specifikus szekvencia mellett 25 bp guanin-gazdag nonspecifikus szekvenciát is tartalmaz, így ezzel a DNS-sel is megfigyelhető szemi-specifikus vagy nonspecifikus kölcsönhatás [212]. A ~ 100 bp mérettartományban megfigyelhető egy új sáv, ami feltehetően a DNS:Fehérje 1:2 komplexhez rendelhető és kvantitatíve $\lg\beta' = 14,26 \pm 0,10$ stabilitási állandóval jellemezhető (**28. ábra b**). Ha ebből az értékből levonjuk a specifikus fehérje-DNS kölcsönhatáshoz rendelhető $\lg K_1'$ stabilitási állandót, a kapott $\lg K_2' = 6,06$ érték közel esik a nonspecifikus fehérje-DNS kölcsönhatásra meghatározott értékhez ($\lg\beta' = 6,27 \pm 0,02$), így feltehetően a második fehérje hasonló módon koordinálódik, mint a nonspecifikus kísérletekben alkalmazott DNS.



28. ábra: Reprezentatív gélelektroforézis sáveltolódás vizsgálatok **a**, nonspecifikus (S0 DNS); **b**, specifikus (S1 DNS) 34 bp hosszúságú DNS molekulával, növekvő mennyiségű holo-1MEY# jelenlétében. $c(\text{DNS}) = 0,88 \mu\text{M}$, 10 mM HEPES pH (7,40); 150 mM NaClO₄; 10 (m/V)% glicerin; **c**, S0, illetve **d**, S1 DNS eloszlási diagramja növekvő cinkujj fehérjekoncentráció mellett. Az adott fehérje/DNS arányokhoz tartozó pontokat négy-négy független gélelektroforézis sáveltolódás mérés intenzitásadataiból számítottuk az ImageJ program segítségével [3]. Folytonos vonalakkal a PSEQUAD program segítségével számolt értékeket ábrázoltuk [4]. A szaggatott vonalakkal jelölt arányoknál a szimuláció nagyobb hibával terhelt, mivel további elmosódott sávok is megjelennek a gélképeken. **e**, Egy FAM/TAMRA-jelölt két felismerési helyet tartalmazó rövid DNS fluoreszcencia anizotrópiájának mérése növekvő mennyiségű 1MEY# fehérje jelenlétében. $c(\text{DNS kötőhely}) = 0,4 \mu\text{M}$; 10 mM HEPES (pH 7,40); a 200 μl összterfogatú mintákat egyedileg állítottuk össze, majd 15 perc 25 °C-on történő inkubálást követően lemezolvasóval mértük az anizotrópiát. A folytonos vonalak a PSEQUAD program segítségével számolt értékeket mutatják. **f**, Az S0, S1 és S2 DNS szakaszok szekvenciája, amelyek 0, 1, illetve 2 1MEY# felismerési helyet tartalmaznak: 5'-GAGGCAGAA-3' (aláhúzva, zölddel kiemelve).

Az eltérő mérési körülmények ellenére az 1MEY# cinkujj fehérje specifikus DNS-kötésére jellemző affinitás összemérhető az MTF-1 fehérjével, – amennyiben az csak 4 Zn(II)-t köt meg a nagy affinitású kötőhelyein, és a felismert DNS szekvencia 12 bp hosszúságú. Ezeknek a fehérjéknek a Zn(II)-affinitása is hasonló (**4. táblázat**). Ezzel szemben a TFIIIA fehérje Zn(II)-affinitása 4 nagyságrenddel kisebb az 1MEY# fehérjénél és a DNS-kötése is gyengébb (**5. táblázat**). Az Sp1 cinkujj fehérje DNS kötése gyengébb, mint a CP1-en alapuló 1MEY# fehérjének, – különösen, amennyiben nem a guanin-gazdag konszenzus DNS szekvenciával történik a vizsgálat (**5. táblázat**^a) – azonban nem

egyértelmű, hogy ez összefüggésbe hozható-e a gyengébb Zn(II)-kötéssel, mivel ilyen mérések a teljes Sp1 fehérjével nem történtek a szakirodalomban, csupán a C-terminális alegység Zn(II)-kötésére vonatkozó állandót határozták meg, ami kisebb a CP1 modellpeptid látszólagos stabilitási állandójánál (**1. táblázat**).

5. táblázat: Cinkujj fehérjék és specifikus vagy nem specifikus DNS között kialakuló kölcsönhatásokhoz tartozó látszólagos stabilitási állandók logaritmus értékei ($\lg\beta'$). Az 1MEY# fehérjére jellemző értékeket az **28. ábra** alapján számoltuk a PSEQUAD program segítségével. Az irodalmi adatokat átszámoltuk $\lg\beta'$ értékké. ZF: cinkujj alegységek száma a fehérjén belül, SDNS: specifikus DNS; NSDNS: nonspecifikus DNS; TFIIA teljes: natív *Xenopus laevis* transzkripciósfaktor; TFIIA 1-3: TFIIA fehérje első 3 cinkujj alegysége; EGR1 vagy ZIF268: „Early growth response protein 1”; WT1: „Wilms Tumor Protein”; Sp1C: Humán Sp1 fehérje, amelyben a megőrzött aminosavak a konszenzus peptiddel azonosak; MTF-1: fémszabályozó transzkripciósfaktor I; DNS célszekvenciák: 1MEY#: 5'-GAGGCAGAA-3'; WT1: 5'-GCGTGGGCGTGT-3'; EGR1 és ZIF268: 5'-GCGTGGGCG-3'; TFIIA 1-3: 5'-GGATGGGAG-3'; MTF-1: 5'-GAGCTCTGCACTCCGCCGAAAA-3'. EMSA: gélelektroforézis sáveltoldás vizsgálat, ANI: fluoreszcencia anizotrópia; SPR: felületi plazmon rezonancia spektroszkópia; FBA: szűrő membrán kötődés vizsgálat; FLU: fluoreszcenciás mérés; ITC: izoterm kalorimetriás titrálás.

	ZF	Körülmények	SDNS	NSDNS	Módszer	Hivatkozás
1MEY#	3	10 mM HEPES (pH 7,4); 150 mM NaClO ₄ ; 10 (m/V)% glicerin	8,20 ± 0,08	6,27 ± 0,02	EMSA	[210]
1MEY#	3	10 mM HEPES, (pH 7,4)	8,0		ANI	[210]
Sp1	3	25 mM Tris (pH 8,0); 100 mM KCl; 10 (m/V)% glicerin; 2 mM DTT; 50 µg/ml BSA; 2 µg/ml dI-dC	6,9 ^a 7,6 ^b		EMSA ^r	[213]
		10 mM Tris (pH 8,0); 50 mM NaCl; 5 (m/V)% glicerin; 1 mM 2-merkaptóetanol; 0,05 (V/V)% NP-40; 100 µM ZnCl ₂	7,4 ^b		EMSA ^r	[214]
Sp1 1-2	2	10 mM Tris (pH 8,0); 50 mM NaCl; 5 (m/V)% glicerin; 1 mM 2-merkaptóetanol; 0,05 (V/V)% NP-40; 100 µM ZnCl ₂	6 ^b		EMSA ^r	[214]
Sp1 2-3	2	10 mM Tris (pH 8,0); 50 mM NaCl; 5 (m/V)% glicerin; 1 mM 2-merkaptóetanol; 0,05 (V/V)% NP-40; 100 µM ZnCl ₂	6,8 ^b		EMSA ^r	[214]
Sp1C	3	25 mM Tris (pH 8,0); 100 mM KCl; 10 (m/V)% glicerin; 2 mM DTT; 50 µg/ml BSA; 2 µg/ml dI-dC	7,3 ^a 8,4 ^b		EMSA ^r	[213]
WT1	4	20 mM Tris (pH 7,5); 150 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 1 mg/ml CM-dextrán; 1 mM DTT; 0,005 (V/V)% poliszorbát 20;	8,2		SPR	[215]
	4	20 mM Tris (pH 7,5); 100 mM KCl; 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 100 µg/ml BSA; 5 µg/ml dI-dC; 5 µM ZnCl ₂	8,94		FBA ^r	[216]
WT1 1-3	3	20 mM Tris (pH 7,5); 150 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 1 mg/ml CM-dextrán; 1 mM DTT; 0,005 (V/V)% poliszorbát 20;	7,75		SPR	[215]
WT1 2-4	3	20 mM Tris (pH 7,5); 150 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 1 mg/ml CM-dextrán; 1 mM DTT; 0,005 (V/V)% poliszorbát 20;	8,37		SPR	[215]
WT1 2-3	2	20 mM Tris (pH 7,5); 150 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 1 mg/ml CM-dextrán; 1 mM DTT; 0,005 (V/V)% poliszorbát 20;	6,65		SPR	[215]
MTF-1	6	40 mM MOPS (pH 7,0); 20 mM NaCl	8,58 ^c 8,04 ^d		ANI	[217]
EGR1	3	20 mM Tris (pH 7,5); 100 mM KCl; 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 100 µg/ml BSA; 5 µg/ml dI-dC; 5 µM ZnCl ₂	8,45		FBA ^r	[216]
		10 mM Tris (pH 7,5); 150 mM KCl; 0,2 µM ZnCl ₂	6,9		ANI	[218]
			8,2		ANI	[219]
Zif268	3	15 mM HEPES (pH 7,8); 50 mM KCl; 50 mM kálium-acetát; 50 mM kálium-glutamát; 5 mM MgCl ₂ ; 5 (V/V)% glicerin; 0,1 (V/V)% NP-40; 100 µg/ml BSA; 20 µM ZnSO ₄	10,6		EMSA ^r	[220]
TFIIIA teljes	9	20 mM HEPES (pH 7,5); 50 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 12 (V/V)% glicerin; 5 mM DTT; 50 µM ZnCl ₂	5,34 ^e		EMSA ^r	[221]
	3		5,75 ^e		EMSA ^r	[221]

TFIIIA 1-3	20 mM HEPES (pH 7,5); 50 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 12 (V/V)% glicerin; 5 mM DTT; 50 μM ZnCl ₂	6,16 ^f		EMSA ^r	[221]
		6,54 ^g		EMSA ^r	[221]
	50 mM Kálium-foszfát (pH 6,67); 100 mM NaCl; 50 μM ZnCl ₂	6,88		FLU	[222]
		6,88		ITC	[222]
YY1 4	20 mM HEPES (pH 7,5); 150 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM TCEP; 100 μM Zn(Ac) ₂	6,25		ITC	[223]
	25 mM Tris (pH 8,5); 100 mM NaCl; 10 mM MgCl ₂ ; 5 mM DTT; 100 μg/ml BSA; 0,04 (m/V)%; PEG-20000; 0,02 (m/V)% NaN ₃ ; 100 μM ZnCl ₂	6,78	4,44	ANI	[224]
	10 mM Tris (pH 7,9); 100 mM NaCl; 10 mM MgCl ₂ ; 5 mM DTT; 0,05 (V/V)% poliszorbát 20; 100 μM ZnCl ₂	7,36		SPR	[224]

^a 5'-GAGGCGGGG-3' szekvenciájú DNS-t alkalmaztak

^b 5'-GGGGCGGGG-3' szekvenciájú DNS-t alkalmaztak

^c Az MTF-1 cinkujj fehérje összes alegysége tartalmazott Zn(II)-t

^d Az MTF-1 cinkujj fehérjének csak a négy nagy affinitású alegysége tartalmazott Zn(II)-t

^e 72 bp hosszúságú DNS-t alkalmaztak

^f 21 bp hosszúságú DNS-t alkalmaztak

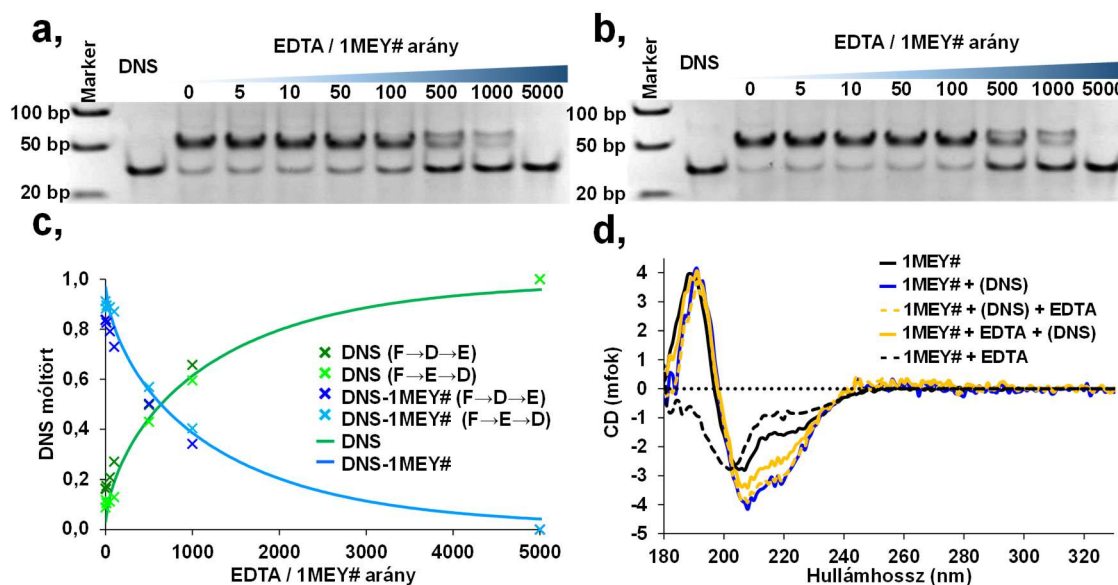
^g 13 bp hosszúságú DNS-t alkalmaztak

^r <1 pmol radioaktívan jelölt DNS-t alkalmaztak

5.2.3 Versengés EDTA-val

A DNS jelenléte befolyásolhatja a cinkujj fehérjék Zn(II)-affinitását is. Erre utal az a meglepő megfigyelés, hogy a DNS:1MEY# komplex CD spektrumában nem tapasztaltunk jelentős változást EDTA-felesleg hozzáadására (**29. ábra d**, - szaggatott sárga görbe). Ezzel szemben DNS hiányában azonos körülmények között a cinkujj fehérje másodlagos szerkezete összeomlott az EDTA-val történő kezelés során (szaggatott fekete görbe). További érdekesség, hogy amennyiben a specifikus DNS-t utólag adtuk hozzá az EDTA-val kezelt fehérjemintához, szintén helyreállt a holo-cinkujj fehérjére jellemző ββα-szerű másodlagos szerkezet (folytonos sárga görbe). A fentiek alapján a DNS képes elősegíteni az apo-1MEY# Zn(II)-felvételét a Zn(II)-EDTA komplexből. Hasonló eredményeket kaptunk a gélelektroforézis sáveltolódás vizsgálatok során, ahol a sáveltolódás attól függetlenül megfigyelhető volt, hogy a minták összeállítási sorrendje Fehérje→DNS→EDTA vagy Fehérje→EDTA→DNS volt (**29. ábra a, b**). Az EDTA csak ~5000× feleslegben (5 mM) tudta teljes mértékben gátolni a cinkujj fehérje DNS-kötését. Míg az ITC és CD mérések alapján a 1MEY# cinkujj fehérje Zn(II)-affinitása DNS hiányában $\lg\beta'_{\text{pH } 7,4} = 12,2 \pm 0,1$ (**4. táblázat**), addig ehhez képest DNS hatására átlagosan 3,4 nagyságrenddel nőtt az egyes cinkujj alegységek Zn(II)-kötésének látszólagos stabilitási állandója ($\lg\beta'_{\text{pH } 7,4} = 15,6$) (**29. ábra c**). Így az EDTA nem tudott hatékonyan versengeni a Zn(II)-ért. A szakirodalomban az MTF-1 cinkujj fehérje vizsgálatai alapján, 0,5 mM EDTA jelenlétében tudták megszüntetni a fehérje DNS-kötését 1 óra alatt [76,225], azonban sejtextaktumokat használtak, így az EDTA és a fehérje pontos aránya nem ismert. Az MTF-1 fehérjéhez

viszonyítva a humán Sp1 DNS-kötésének megszüntetése jóval nehezebb volt, ami felkeltette a kutatók érdeklődését az évek során.



29. ábra: Reprezentatív gélelektroforézis sáveltolódás vizsgálatok a specifikus 34 bp hosszúságú S1 DNS szakasz és holo-1MEY# között kialakuló kölcsönhatás vizsgálatára céljából növekvő mennyiségű EDTA jelenlétében. **a,** Fehérje→DNS→EDTA, illetve **b,** Fehérje→EDTA→DNS összeállítási sorrend esetén. $c(\text{DNS}) = 1 \mu\text{M}$; $c(\text{holo-1MEY\#}) = 1 \mu\text{M}$; $c(\text{EDTA}) = 0\text{--}5 \text{ mM}$; 10 mM HEPES (pH 7,40); 150 mM NaClO₄; 10 (m/V)% glicerin; a DNS és EDTA hozzáadása után az elegyeket 1 órán át inkubáltuk 25 °C-on; **c,** Az S1 DNS eloszlási diagramja az eltérő sorrendben összeállított mintákban a gélelektroforézis sáveltolódás vizsgálatok intenzitásértékei alapján. A DNS sávokat az ImageJ program segítségével alakítottuk móltörtökké [3]. Az (F→D→E) mintákat fehérje→DNS→EDTA sorrendben állítottuk össze, míg az (F→E→D) mintákban először az EDTA-t adtuk a fehérjéhez, majd 1 óra inkubációt követően az S1 DNS-t. A mérési adatok alapján PSEQUAD programmal határoztuk meg a látszólagos Zn(II)-affinitást (**ld. F1.4.1 fejezet**), majd számoltuk ki az eloszlási diagramot (folytonos görbék). **d,** A holo-1MEY# cinkujj fehérje CD spektrumának összehasonlítása három ekvivalens EDTA és egy ekvivalens specifikus DNS jelenlétében, illetve hiányában. A DNS CD spektrumát kivontuk a mért CD spektrumokból. A fehérjekoncentrációt 18,8 μM -ra normáltuk. 10 mM HEPES (pH 7,4); $l = 0,1 \text{ mm}$

Petering és mtsai. a Zn(II)-Sp1-DNS rendszert EDTA jelenlétében vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy a cinkujj fehérje-DNS komplex vagy kinetikailag inert, vagy termodinamikailag nagyobb stabilitású EDTA-nál, de kísérleteikben ~500× EDTA felesleg megszüntette a fehérje-DNS kölcsönhatást [226-227]. Mivel csak gélelektroforézis vizsgálatok történtek ezen kutatások során, így nem lehetett biztosan tudni, hogy a fehérje→EDTA→DNS sorrendben összeállított mintában az EDTA azért nem volt képes eltávolítani a Zn(II)-t, mert nem volt elegendő az inkubációs idő (kinetikai effektus), vagy mert DNS hatására a fehérje képes volt újra Zn(II)-t felvenni (termodinamikai hatás). Utóbbi lehetőséget az Sp1 fehérje esetén nehéz bizonyítani, mivel ennek DNS-kötése nem kiemelkedő. Ezzel szemben az Sp1C fehérje – amelynek az Sp1 fehérje megőrzött aminosav szekvenciáját a CP1 modellpeptid szekvenciájára módosították, míg a DNS-felismerésért felelős aminosavakat érintetlenül hagyták – DNS-affinitása megnövekedett (**5. táblázat**).

Berg és mtsai. nem tudták EDTA segítségével eltávolítani a Zn(II)-t a Zn(II)-Sp1C-DNS komplexből, és – amennyiben jól értelmezzük az adatokat – ezt együttes kinetikai és termodinamikai hatással magyarázták [213]. Munkánk során független módszerekkel igazoltuk, hogy az ugyancsak CP1-alapú 1MEY# cinkujj fehérje DNS komplexéből az EDTA összemérhető koncentráció jelenlétében nem tudja eltávolítani a Zn(II)-t, továbbá az apo-fehérje képes visszanyerni a Zn(II)-t a Zn(II)EDTA komplexből specifikus DNS jelenlétében. Az 1MEY# cinkujj fehérje kölcsönhatása DNS-sel jelentősen (3,4 nagyságrenddel) növeli a fehérje látszólagos Zn(II)-affinitását. Kísérletünkben ez az effektus jól tanulmányozható volt, mivel a kompetítorként alkalmazott EDTA látszólagos Zn(II) stabilitási állandója éppen a Zn(II)–1MEY# és Zn(II)–1MEY#–DNS rendszer Zn(II)-affinitása között helyezkedett el. Hasonló stabilizáció, vagy szerkezet és funkció helyreállítás feltehetően egyéb cinkujj fehérjéknél is megfigyelhető, amelyek specifikus DNS célszekvenciákat ismernek fel. Nagy valószínűséggel ilyen effektusok is szerepet játszhatnak abban, hogy olyan cinkujj fehérjék is betöltik funkciójukat az élő szervezetekben, amelyek Zn(II)-affinitása önmagában nem indokolná, hogy a fehérje a sejtbeli körülmények között holo-formában forduljon elő egyéb nagy affinitású Zn(II)-kompetitorok (pl. tionein fehérjék) jelenlétében [80,199,227-231].

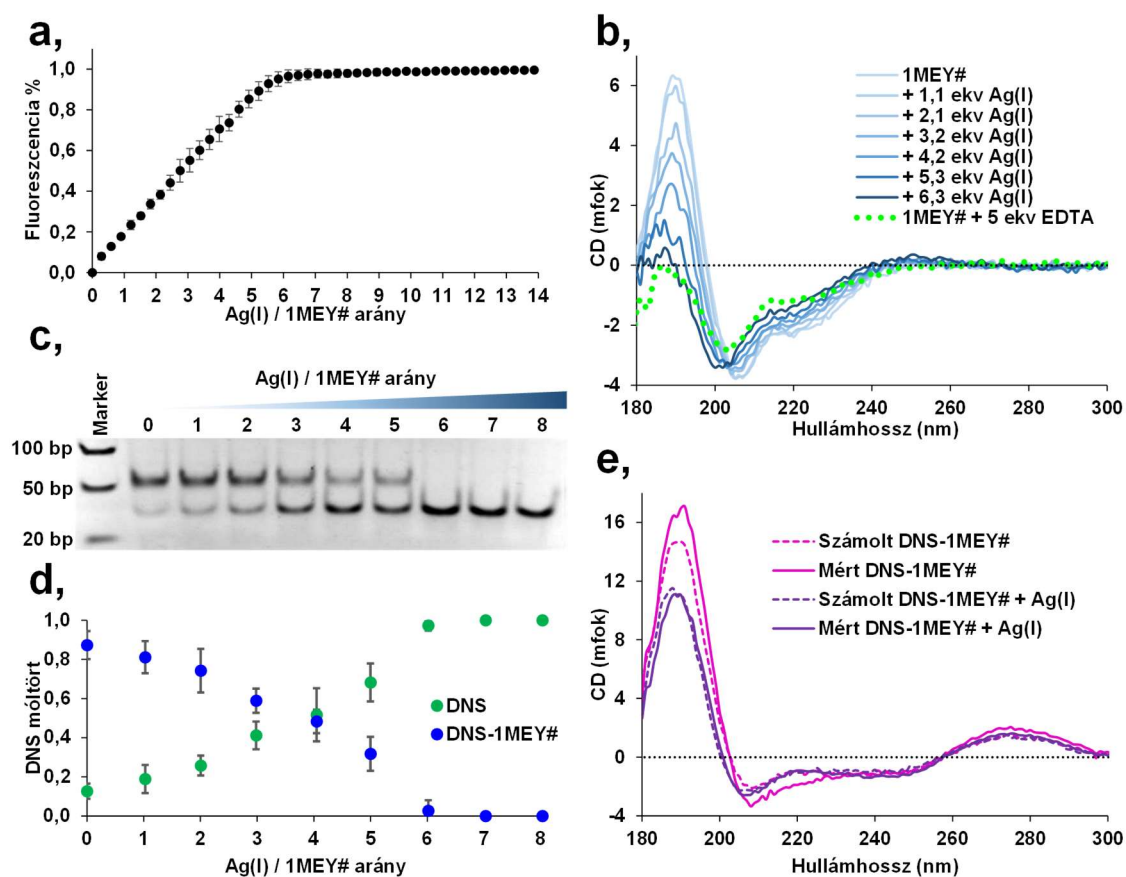
5.3 Az előállított cinkujj fehérje kölcsönhatása "soft" fémionokkal

Az irodalmi áttekintésben bemutatott cinkujj fehérje-fémion kompetíciós reakciók többségében csak egy-egy cinkujj alegységet vizsgáltak (leginkább a CP1 modellpeptidet). Arról, hogy ezek a fémionok hogyan hatnak kölcsön teljes cinkujj fehérjékkal, hogyan befolyásolják azok funkcióját nem, vagy csak alig állnak rendelkezésre szakirodalmi (kvantitatív) adatok. Így miután kvantitatíve jellemeztük az 1MEY# cinkujj fehérje Zn(II)-és DNS-kötését megvizsgáltuk a fehérje kompetíciós reakcióit „soft” karakterű Ag(I), Cd(II), Hg(II) toxikus fémionokkal.

5.3.1 Ag(I) hatása a cinkujj fehérjére

Együttműködő partnereink modellpeptidekkel végrehajtott vizsgálatait kiegészítve [119] elsőként igazoltuk, hogy az Ag(I) kiszorítja a Zn(II)-t egy több egységet tartalmazó cinkujj fehérjéből [232]. A folyamat kvantitatív, két Ag(I) képes egy Zn(II) kiszorítására, amint az a FluoZin-3 Zn(II)-szelektív fluorofór jelenlétében végrehajtott titrálásokkal bizonyítottuk (**30. ábra a.**). A három cinkujj alegységből felépülő 1MEY# cinkujj fehérje titrálása során éles töréspont látható a fluoreszcencia intenzitásának növekedésében 6 Ag(I)

ekvivalens Ag(I) hatására (két-két ekvivalens Ag(I) kötőhelyenként). Azonos eredményre jutottunk egy másik Zn(II)-szelektív szenzor, a 4-(2-piridilazo)rezorcin (PAR) alkalmazásával is UV-Vis spektroszkópiás mérés során (F10. ábra). Mivel az összehasonlító méréseink alapján az Ag(I) sem a FluoZin-3-mal, sem a PAR-ral nem képez komplexet, így ezen szenzorok jelenlétében végrehajtva egy cinkujj fehérje titrálását Ag(I)-gyel meghatározható a fehérje koncentrációja is, amit a későbbiekben gyakran alkalmaztunk.

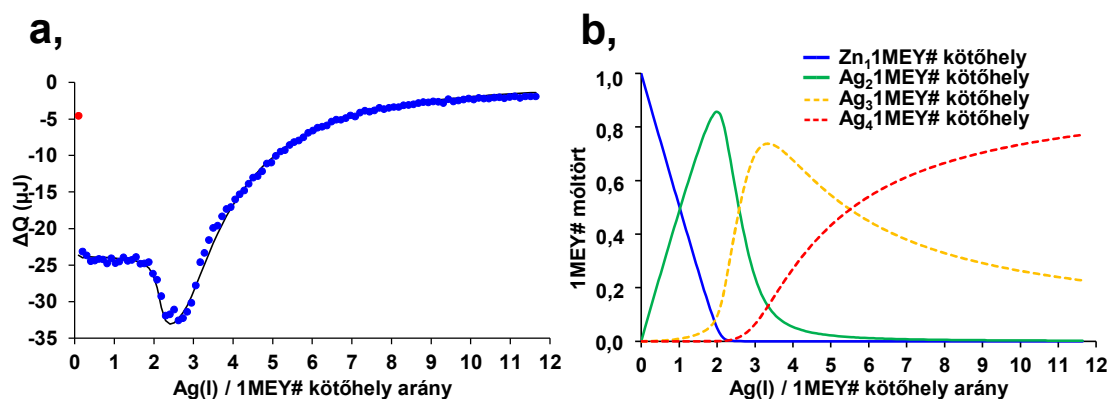


30. ábra: a, holo-1MEY# cinkujj fehérje titrálása AgClO_4 mérőoldattal FluoZin-3 jelenlétében fluorimetriásan követve (gerjesztés = 480 – 490 nm, emisszió = 510 – 520 nm). $c(\text{FluoZin-3}) = 10 \mu\text{M}$; $c(1\text{MEY\#}) = 1 \mu\text{M}$; 10 mM HEPES (pH 7,4); 150 mM NaClO_4 ; a relatív fluoreszcencia értékeket referencia Zn(II)-FluoZin-3 titrálások segítségével határoztuk meg. Az ábrán 6 független mérés átlagát tüntettük fel az egyes pontokhoz tartozó hibákkal. b, 1MEY# CD spektruma növekvő koncentrációjú AgClO_4 jelenlétében. Zöld szaggatott vonal: 1MEY# 5 ekvivalens EDTA jelenlétében 5 perc inkubációt követően. $c(\text{holo-1MEY\#}) = 16 \mu\text{M}$; 10 mM HEPES (pH 7,4); $l = 0,1 \text{ mm}$; az egyedileg összeállított mintákat 5 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten a mérés előtt. c, Reprezentatív gélelektroforézis sáveltoldás vizsgálat specifikus (S1 DNS) 34 bp hosszúságú DNS szakasz és holo-1MEY# között növekvő mennyiségű AgClO_4 jelenlétében. $c(\text{DNS}) = 0,7 \mu\text{M}$; $c(\text{holo-1MEY\#}) = 0,9 \mu\text{M}$; 10 mM HEPES (pH 7,4); 150 mM NaClO_4 ; 10 (m/V)% glicerin; az elegyeket az Ag(I) hozzáadását követően fél órán át inkubáltuk 25 °C-on. d, DNS eloszlási diagramja a DNS-1MEY# rendszernek növekvő AgClO_4 koncentráció hatására. Az egyes frakciókhoz tartozó pontok 5 független gélelektroforézis sáveltoldás vizsgálat intenzitásadatainak átlagából származnak a hozzájuk tartozó hibákkal. Az intenzitásokat ImageJ program segítségével határoztuk meg [3]. e, DNS-1MEY# komplex mért és számított CD spektrumának összehasonlítása 6 ekvivalens AgClO_4 jelenlétében, illetve hiányában. $c(\text{holo-1MEY\#}) = 12 \mu\text{M}$; $c(\text{S1 DNS}) = 12 \mu\text{M}$; 10 mM HEPES (pH 7,4); 90 mM NaClO_4 ; $l = 0,1 \text{ mm}$; a számított spektrumok a DNS saját CD spektrumának és a holo-1MEY# vagy 1MEY#-Ag(I) rendszer (apo-1MEY#) CD spektrumának összegei.

CD spektroszkópiával követett titrálás során megállapítottuk, hogy a cinkujj fehérje $\beta\beta$ másodlagos szerkezete összeomlik Ag(I)-hatására, mivel az első 6 ekvivalens Ag(I)-bekötődése során kapott CD spektrum hasonló alakú, mint a rendezetlen szerkezetű apo-1MEY# CD spektruma (**30. ábra b.**). Gélelektroforézis sáveltolódás vizsgálatok és CD mérések alapján a fehérjét DNS célszekvenciája sem képes megvédeni az Ag(I)-gyel szemben (**30. ábra c, d, e.**). A cinkujj fehérje-DNS komplex (folytonos rózsaszín görbe) intenzívebb, módosult alakú CD spektrumot eredményezett, mintha összeadtuk volna a szabad DNS és holo-1MEY# CD spektrumát (szaggatott rózsaszín görbe) ami a fehérje DNS-kötésére utal. Ezzel szemben az Ag(I)-jelenlétében mért DNS-1MEY# spektrum alakja teljes egyezést mutat a külön-külön megmért 1MEY#-Ag(I) és DNS CD spektrumainak összegével. Ennek alapján a fehérje szerkezete összeomlott Ag(I) hatására a specifikus DNS jelenlététől függetlenül (**30. ábra e.**). Poliakrilamid gélen a fehérje-DNS komplexhez rendelhető sáv megfelel egy 50 bp-os DNS sáv elhelyezkedésének, és fokozatosan halványul növekvő Ag(I) mennyiség hatására. 6 ekvivalens Ag(I) adagolását követően teljesen szétesik a komplex és csak a szabad 34 bp-os DNS sávja látható (**30. ábra c.**). A gélelektroforézis sáveltolódás vizsgálatok során detektált sávok intenzitását „integrálva” (**ld. 4.3.3 fejezet**) a pontok lefutása enyhén szigmoidális, ami utalhat a fehérje DNS-kötésének kooperativitására, mivel egy cinkujj alegység szerkezetének összeomlása nem csökkenti jelentősen a fehérje DNS affinitását, viszont két cinkujj alegység összeomlása után a fennmaradó egy egység már nem, vagy alig kötődik a DNS-hez a mérések körülményei között (**30. ábra d.**).

Független módszerként ITC titrálásokat is végeztünk az Ag(I) és a fehérje kölcsönhatásának tanulmányozása céljából. Az integrált titrálási görbét kötőhely ekvivalensek függvényében ábrázolva egy ekvivalens Ag(I)-nél nem látható inflexiós pont, ezek alapján a kompetíciós reakció változatlan módon zajlik egészen két kötőhelyekvivalens Ag(I) adagolásáig (**31. ábra a.**). Ez egyértelműen bizonyítja, hogy az Ag(I) kompetíció kooperatív, $Ag_1Zn_11MEY\#_{kötőhely}$ vegyeskomplex és $Ag_11MEY\#_{kötőhely}$ monokomplex feltételezése nem szükséges a kompetíciós rendszer jellemzéséhez attól függetlenül, hogy a monokomplex jelenlétét az apo CP1 modellpeptid telítése során megfigyelték korábban [119]. A két Ag(I) bekötődéséhez tartozó reakció $\Delta H(Ag_21MEY\#_{kötőhely}) = -38,2$ kcal/mol reakcióentalpiával jellemezhető, azaz 15 kcal/mol egységgel nagyobb a Zn(II) bekötődésénél. Elméletben a kalorimetriás titrálások segítségével meghatározható az $Ag_21MEY\#_{kötőhely}$ komplex látszólagos stabilitási állandója, azonban amint az a titrálási

görbén látható, a két ekvivalens Ag(I)-et követő injektálások során a hőváltozás növekedett, majd később fokozatosan simult bele a mérés alapvonalába (**31. ábra a,**). Ebből arra következtethetünk, hogy a reakció a második ezüst bekötődését követően nem zárul le, további exoterm reakció(k) során újabb Ag(I) koordinációja figyelhető meg. Így csupán azt lehet kijelenteni, hogy az $\text{Ag}_2\text{1MEY}\#_{\text{kötőhely}}$ komplex legalább $\lg\beta^{\text{pH } 7,4} \geq 22,2$ stabilitású, a pontosabb számításokhoz egyéb kiegészítő mérésekre lenne szükség, amelyekkel jellemezhetőek a további képződő komplexek.



31. ábra: a, Integrált, alapvonal-korrigált hőváltozás értékek holo-1MEY# Ag(I)-titrálása során (kék pontok) ITC-vel követve és az illesztett titrálási görbe (fekete vonal) Excel-lel számolva (**ld. 4.7 fejezet**). $c(\text{holo-1MEY}\#) = 15 \mu\text{M}$; 10 mM HEPES (pH 7,40); 0,5 μl injektálások 1,68 mM AgClO_4 mérőoldattal 25,00 °C. **b,** ITC titrálás adatainak értékelése alapján generált eloszlási diagram. A szaggatott vonallal jelölt részecskék segítségével az ITC titrálás jellemezhető volt, de ezek pontos összetételére nincs egyértelmű bizonyíték.

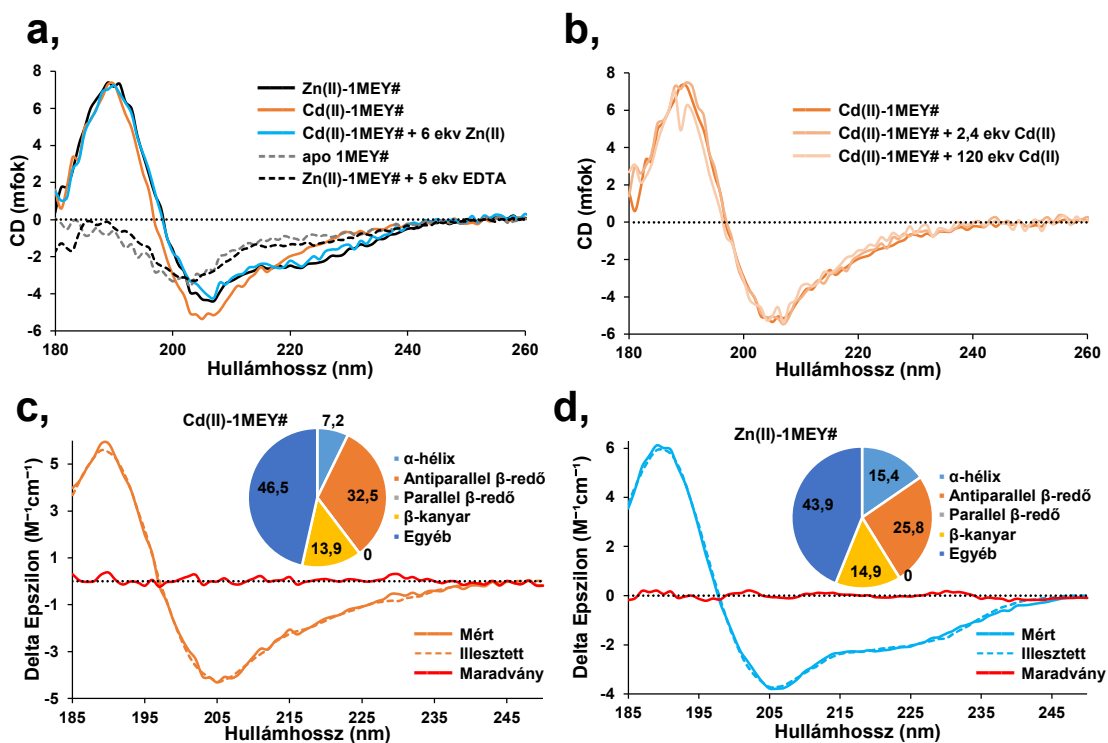
ESI-MS módszerrel, a fehérje : Ag(I) arány növelése során még 19 Ag(I)-et kötő fehérjeadduktumot is megfigyeltünk a mérés körülményei között, így a rendszer alapos kvantitatív jellemzése feltehetően nem lehetséges (**F11. ábra**). Emellett meg kell említeni, hogy a teljes holo-1MEY# Ag(I)-kompetícióját tömegspektrometriával vizsgálva nem volt tapasztalható átmeneti állapot, ahol a három cinkujj alegység közül csak az egyikben, vagy kettőben cserélődött volna ki a Zn(II) két Ag(I)-re. Az első olyan részecske, amelyben már Ag(I) volt megfigyelhető, azonban 5 Ag(I)-et kötött a várt 6 helyett, amely részecske csak az Ag(I) felesleget növelve jelent meg. Ennek magyarázata nem egyértelmű, de valószínűleg az ESI-MS mérési körülményeknek tudható be a különleges komplex megjelenése. A szakirodalomban van arra példa, hogy több ciszteint tartalmazó fehérjéknél nem észlelhető a csak 1 vagy 2 Ag(I)-et kötő forma hanem egyből 4 – 5 Ag(I) kötődése figyelhető meg [233]. Ennek az ellentmondásnak a tisztázására a jövőben mindenképpen további kísérleteket hajtunk végre.

5.3.2 Cd(II) hatása a cinkujj fehérjére

A Cd(II) és cinkujj fehérjék kölcsönhatásának szakirodalmában számos ellentmondás található (**Id. 2.1.3 fejezet**), és nehéz összefüggést találni a peptidekkel és természetes cinkujj fehérjékkel végzett vizsgálatok között. Ennek a problémának az áthidalására kitűnő lehetőséget biztosított az 1MEY# cinkujj fehérje, mivel a CP1-modellpeptid szekvenciáján alapul (**25. ábra**), de képes specifikus DNS-felismerésre is, akár csak a természetes cinkujj fehérjék. Elsőként az apo-fehérje és a Cd(II) kölcsönhatását tanulmányoztuk. Ehhez az eredetileg Zn(II)-tartalmú fehérjéből EDTA-kezeléssel távolítottuk el a fémiont, majd puffercsere során eltávolítottuk az EDTA-t (**Id. F1.5 fejezet**). A folyamat eredményeként kapott apo-1MEY# CD-spektruma – az elvárásoknak megfelelően – rendezetlen másodlagos szerkezetre utal egyetlen negatív csúccsal 200 nm körül. Három ekvivalens Cd(II) hozzáadását követően (egy ekvivalens kötőhelyenként) a fehérje a Zn(II)-kötött szerkezethez hasonló CD-spektrumot mutatott (**32. ábra a.**). Ezek alapján a Cd(II) is képes indukálni a Cys₂His₂ cinkujj alegységek egyfajta másodlagos szerkezetének rendeződését. További Cd(II) hozzáadására nem észlelhető a CD spektrum változása még 120-szoros feleslegben sem (40 ekvivalens Cd(II) kötőhelyenként) (**32. ábra b.**). Az UV-Vis abszorpciós spektrum 230-250 nm tartományában is megfigyelhető volt a Cd(II) koordinációja a cinkujj fehérjék tiolcsoportjaihoz ligandum-fém töltésátviteli sávokon keresztül [234, 235] (**F12. ábra**).

A fehérje Cd(II)-, és Zn(II)-komplexének CD spektruma nem teljes mértékben egyezik. A Cd(II)-kötött fehérje spektrumában 220 nm körül eltűnt a negatív csúcs, míg 205 nm-nél növekedett a negatív csúcs intenzitása. A különböző komplexek másodlagos szerkezetét a BeStSel program segítségével becsültük meg a CD spektrumok alapján [2](**32. ábra c,d.**). Az adatok alapján a Cd(II)-komplexben az antiparallel β -redő aránya ~6%-kal nőtt, míg az α -hélix aránya ~8,5%-kal csökkent, amire magyarázat lehet, hogy a β -redőket alkotó szakaszban található a Cd(II) által preferált cisztein aminosavak, és az ezekhez történő erősebb koordináció eredményezi a másodlagos szerkezeti elemek arányának növekedését. Mindazonáltal ezt a magyarázatot árnyalja, hogy a legjelentősebb változás a 220-240 nm tartományban következett be, ahol szerepe lehet a ligandum-fém töltésátviteli sávok királis hozzájárulásának is a CD spektrum lefutásához [234-236]. A fehérje CD-spektrumok kiértékelésére használt programok ezeket a hozzájárulásokat nem veszik külön figyelembe, így végül ezeket a másodlagos szerkezeti elemek változásaként detektálják. Esetünkben ez a fehérje β -redő tartalmának túlbecslését eredményezheti. Ettől

függetlenül a fentiek alapján megállapítható, hogy az 1MEY# cinkujj fehérje Cd(II) jelenlétében rendezett másodlagos szerkezetet vesz fel, ami nagy valószínűséggel hasonlít a Zn(II)-tartalmú fehérje másodlagos szerkezetéhez. Ez összhangban van Malgieri és mtsai. megfigyeléseivel a Ros87 cinkujj fehérje esetén [43] és Krepkiy és mtsai. eredményével a TFIIIA 3. ujjával kapcsolatban [93]. Ezzel szemben a Tramtrack cinkujj fehérje esetében Roesijadi és mtsai. csak a 220-240 nm hullámhossztartományban figyeltek meg változásokat, a 190 nm körüli intenzív csúcsok nélkül, amelyek leginkább az α -hélixhez rendelhetők [100]. A Cd(II)-1MEY# komplex CD spektruma arra utalt, hogy a mérési körülmények között a Cys₂His₂ típusú koordináció a preferált a Cys₃, vagy Cys₄ koordinációs móddal szemben. Habár ezek a koordinációs módok szintén lehetségesek lettek volna, mivel az 1MEY# fehérje összesen 6 ciszteint tartalmaz, azonban ez esetben az ujszerű szerkezet összeomlana, ami nem volt megfigyelhető.



32. ábra: a, 1MEY# cinkujj fehérje CD spektruma különböző formákban: Zn(II)-kötött (fekete), Cd(II)-kötött (narancs), fémmentes (szaggatott szürke), Cd(II)-kötött forma + 6 ekvivalens Zn(II) / 1MEY# (2 ekvivalens kötőhelyenként) (világoskék) és Zn(II)-mentes forma 5 ekvivalens EDTA / 1MEY# jelenlétében (1,7 ekvivalens kötőhelyenként) (szaggatott fekete). b, Cd(II)-kötött 1MEY# CD-spektruma feleslegben lévő Cd(II) jelenlétében. Az CD-spektrumok 18,8 μ M fehérjekoncentrációra normáltuk. 6,6 mM HEPES (pH 7,4); 33 mM NaClO₄; $l = 0,2$ mm; c, Cd(II)-1MEY# és d, Zn(II)-1MEY# mért és illesztett CD spektruma a 185-250 nm hullámhossz tartományban. Az illesztett és mért spektrumok közötti különbségeket mutató maradványspektrumokat piros színnel jelöltük. A kördiagramok a komplexek becsült másodlagos szerkezeti összetételét jelzik. Az illesztést a BeStSel programcsomaggal hajtottuk végre [2].

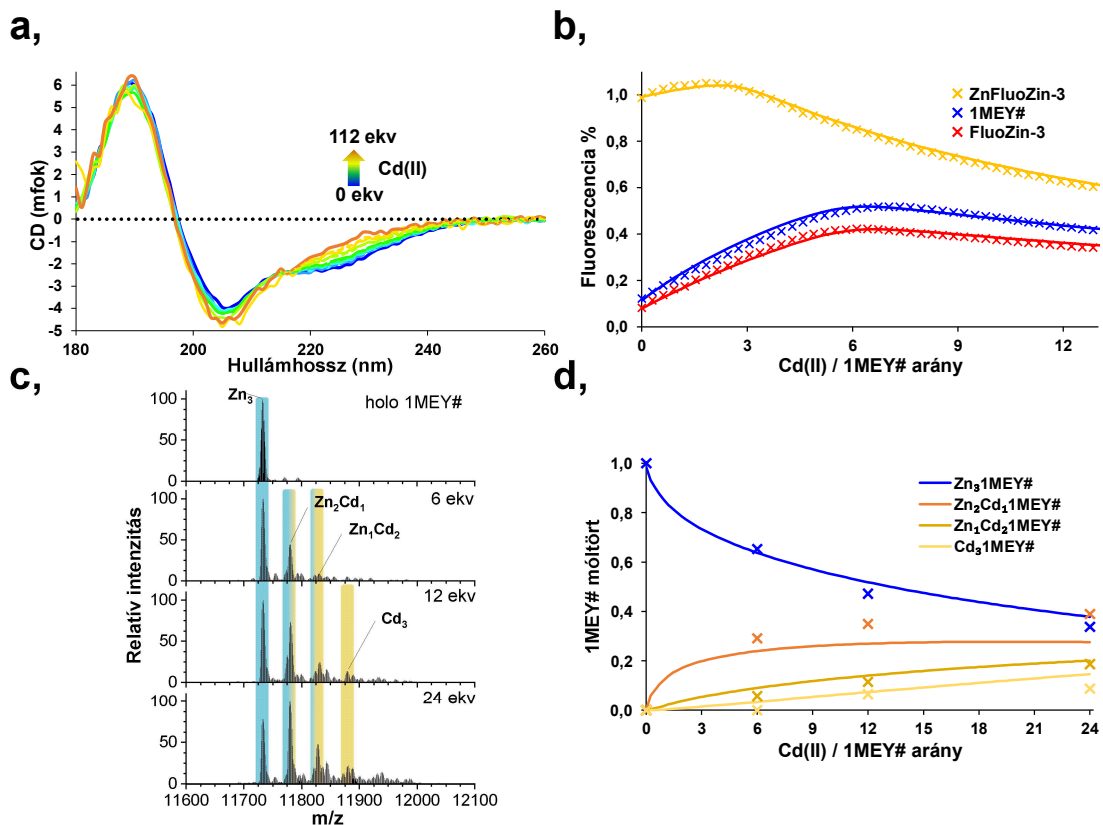
A Cd(II)-komplexhez 6 ekvivalens Zn(II)-t hozzáadva (2 ekvivalens kötőhelyenként) helyreállt az eredeti Zn(II)-kötött fehérjére jellemző CD spektrum, ami arra utal, hogy a

Zn(II) valóban jóval erősebb kölcsönhatást alakít ki a Cys₂His₂ cinkujj alegységekkel, mint a Cd(II), másfelől igazoltuk, hogy az **F1.5 fejezetben** részletezett Zn(II)-eltávolítási folyamat során a fehérjében található ciszteinek nem oxidálódtak (**32. ábra: a**).

Miután igazoltuk, hogy az apo fehérje képes felvenni három Cd(II)-t, kompetíciós reakciókat is végrehajtottunk, hogy megállapítsuk, milyen mértékben lehetséges a Cd(II)-Zn(II) csere. Fluorimetriás, CD-spektroszkópiás és ESI-MS mérések alapján nem sikerült teljes mértékben kicserélni a Zn(II)-t Cd(II)-re a mérés körülményei között. A Cd(II)-holo-1MEY# rendszert FluoZin-3 Zn(II)-szelektív fluorofór jelenlétében tanulmányozva megállapítottuk, hogy hozzávetőleg ~2 nagyságrenddel gyengébben köti a fehérje a Cd(II)-t ($\lg\beta'_{\text{pH } 7,4} = 10,11 \pm 0,03$), mint a Zn(II)-t, míg az 1MEY# cinkujj fehérje alapjául szolgáló CP1 modellpeptidnél ~2,5 nagyságrend eltérést tapasztaltak (**6. táblázat**) [72] (**33. ábra b**). A mérés pontatlanságát növeli, hogy a Cd(II) monokomplexet képez a FluoZin-3-mal is. Ezt a folyamatot független mérésekkel jellemeztük, és a számítások során figyelembe vettük (**ld. F1.5 fejezet**).

A CD spektroszkópiával követett titrálási adatokból egy nagyságrenddel nagyobb Cd(II)-stabilitási állandót határoztunk meg, mint fluorimetria esetében, azonban ez betudható a kismértékű változásoknak, amik a fehérje CD-spektrumában következtek be, így a mérés pontatlansága is nagyobb volt (**33. ábra a**) (**6. táblázat**).

A Cd(II)-holo-1MEY# rendszer ESI-MS vizsgálata során megfigyelhetők voltak az átmeneti Zn₂Cd₁ és Zn₁Cd₂ vegyeskomplexek, ahol csak egy, illetve kettő Zn(II) cserélődött ki Cd(II)-re, majd nagyobb Cd(II)-feleslegnél a Cd₃ formát is észleltük (**33. ábra c**). A Zn(II)-affinitás meghatározásánál tapasztaltakra alapozva (**26. ábra**) ebben az esetben is azonosnak tekintettük a három cinkujj alegységet a számítások során (**ld. F1.4.2 fejezet**). Így $\lg\beta' = 10,75$ átlagos stabilitási értéket határoztunk meg. A számított és a kísérleti ESI-MS adatok közötti jó egyezés alátámasztotta azt a hipotézist, hogy az 1MEY# fehérjén belül a három cinkujj alegység azonosan köti Zn(II)-t és Cd(II)-t (**33. ábra d**). Tekintettel arra, hogy az ESI-MS mérések eredményei az eltérő mérési körülmények, illetve a különböző részecskék potenciálisan eltérő ionizációs képessége miatt nem mindig korrelálnak az oldategyensúlyi adatokkal, ez az érték nagyon jó egyezést mutat a fluorimetriásan és CD spektroszkópiásan meghatározott stabilitási állandókkal (**6. táblázat**).



33. ábra: **a,** 1MEY# mért (folytonos vonalak) és szimulált (szaggatott vonalak) CD-spektruma növekvő mennyiségű Cd(II) jelenlétében; A titrálás végpontját (Cd(II)-kötött 1MEY#, folytonos narancssárga spektrum) külön határoztuk meg apo-1MEY#-ből kiindulva; $c(1\text{MEY}\# = 16,4 \mu\text{M})$; 7,5 mM HEPES (pH 7,4); $l = 0,2 \text{ mm}$; A 215 – 260 nm tartományt használtuk a PSEQUAD programmal történő számítások során [4]. **b,** Mért (pontok) és szimulált (folytonos vonalak) relatív fluoreszcencia görbék, amelyeket a holo-1MEY# (kék) Cd(II)-vel történő titrálásával kaptunk. Ezzel egyidejűleg referencia titrálásokat is végeztünk, hogy meghatározható legyen a relatív fluoreszcencia érték 1MEY# fehérje hiányában (piros adatsor), vagy az 1MEY# Zn(II)-tartalmával megegyező mennyiségű Zn(ClO₄)₂ jelenlétében (sárga adatsor). 200 μl minta, 3 μl injektálások $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. $c(\text{FluoZin-3} = 6 \mu\text{M})$; $c(1\text{MEY}\# = 1 \mu\text{M})$; 10 mM HEPES (pH 7,4); 150 mM NaClO₄. A számításokat PSEQUAD programmal végeztük. **c,** holo 1MEY# fehérje ESI-MS módszerrel vizsgálva növekvő mennyiségű Cd(II) jelenlétében. $c(1\text{MEY}\#) = 2 \mu\text{M}$; 8,2 mM ABC (pH 7,8). **d,** 1MEY# fehérje eloszlási diagramja ESI-MS mérés alapján. Relatív intenzitásadatok alapján számított 1MEY# móltörtök (pontok), számított eloszlási diagram (folytonos vonalak). Az eloszlási diagram számítását a Microsoft Excel Solver bővítményével hajtottuk végre (**ld. F1.4.2 fejezet**).

Az eredmények alapján a Cd(II)/Zn(II) csere reverzibilis az 1MEY# cinkujj fehérje esetében és kooperatív effektus nem volt megfigyelhető, ami arra utal, hogy a cinkujj alegységek azonos módon viselkednek (**34. ábra a,**). Az 1MEY# fehérje Cd(II)-affinitása a legnagyobb a szakirodalomban fellelhető egyéb Cys₂His₂ cinkujj fehérjék között (**6. táblázat**), habár még így is 1-2 nagyságrenddel elmarad a fehérje Zn(II)-affinitásától azonos körülmények között ($\lg\beta'_{\text{Zn(II)}} = 12,2$) [210]. A különbség a Zn(II) és Cd(II)-affinitásban a CP1 modell peptid és a TFIIIA fehérje esetében 2,5 nagyságrend [72,90], míg a Ros87 cinkujj fehérje esetében 1,2 nagyságrend [237].

6. táblázat: Cinkujj fehérje-Cd(II) és Zn(II)-kölcsonhatásokhoz rendelhető átlagos $\lg\beta'$ értékek alegységekre vonatkoztatva; cITC: Titrálás kompetitorokkal ITC-vel követve; FTc: Fluoreszcens kompetitorokkal végrehajtott titrálás fluorimetriával követve; rCD: CD spektroszkópiával követett reverz titrálás; ESI-MS: reverz titrálás ESI-MS mérésel követve; RT: UV-Vis spektroszkópiával követett reverz titrálás; ED: egyensúlyi dialízis; DT: UV-Vis spektroszkópiával követett direkt titrálás

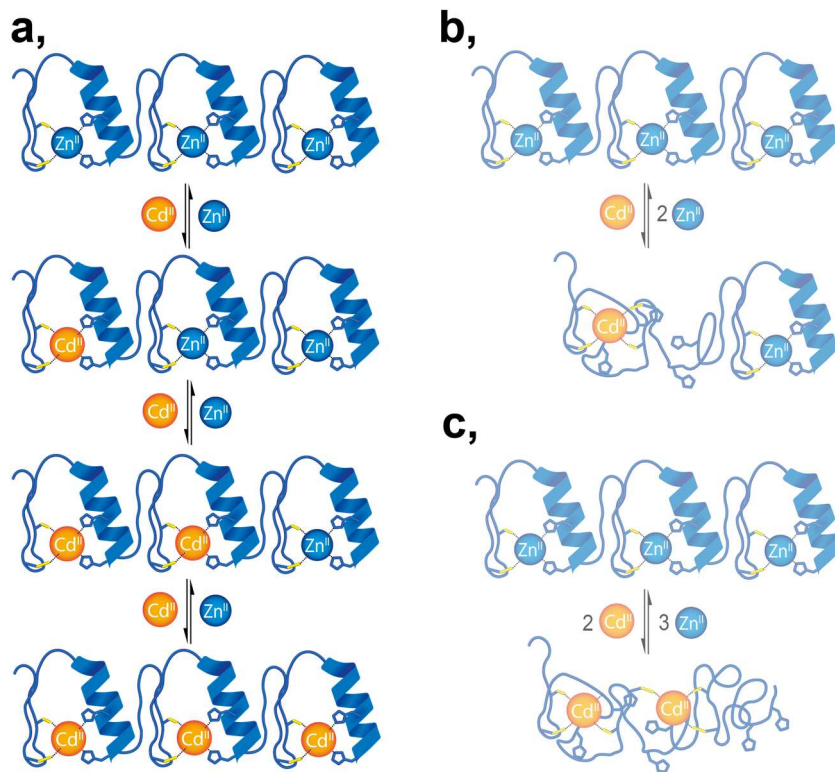
	$\lg\beta'$ Cd(II)	$\lg\beta'$ Zn(II)	$\Delta\lg\beta'^1$	Módszer	Hivatkozás
1MEY#		12,2		cITC	[210]
	10,11 ± 0,03		2,11	FTc	[238]
	11,14 ± 0,03		1,06	rCD	[238]
	10,75		1,45	ESI-MS	[238]
CP1	8,7	11,2	2,5	RT	[72]
TFIIIA	5,6 ^a	8,0 ^a	2,4	ED	[90]
	3,8 ^b	4,6 ^b	0,8	ED	[90]
Ros87	8,0	9,2	1,2	RT	[103,239]
	7,7			DT	[99]

¹ különbség a Zn(II)- és Cd(II) affinitásértékek között, ha a mérési körülmények azonosak

^a nagy stabilitású kötőhelyek

^b kis stabilitású kötőhelyek

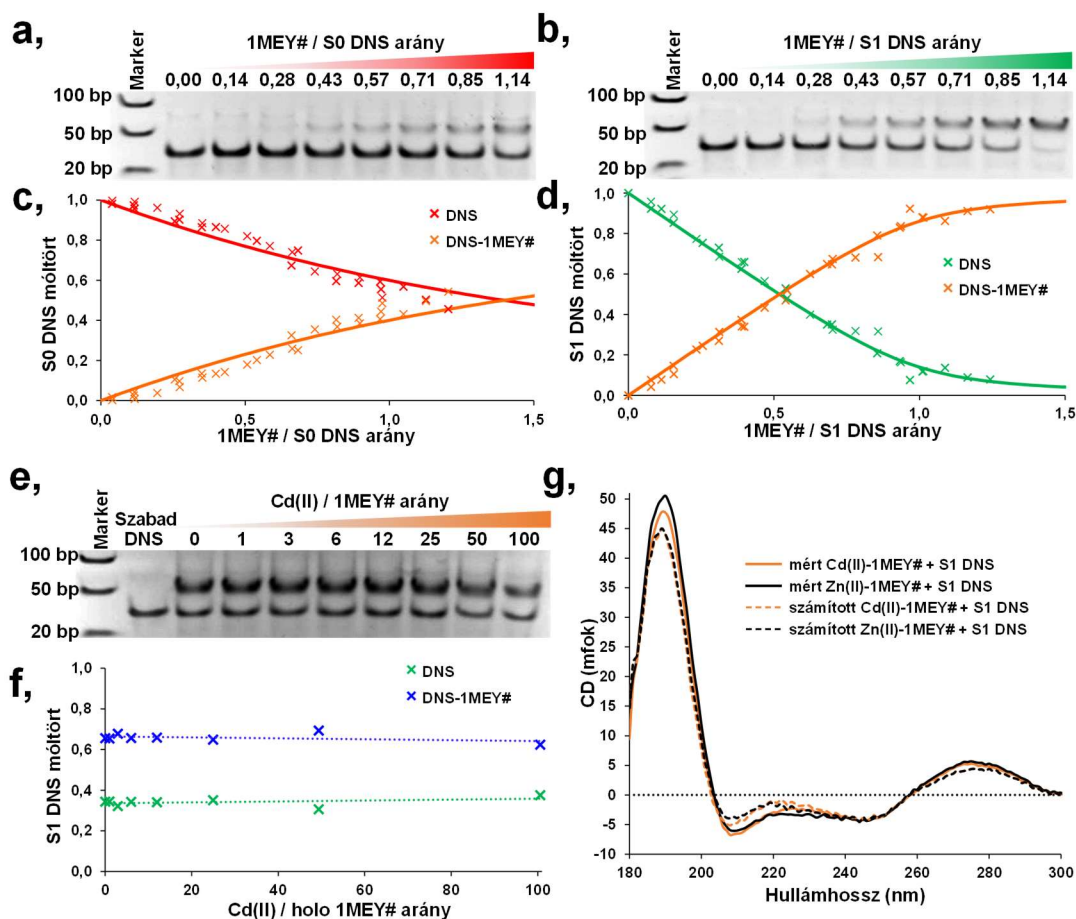
A CD mérések alapján (**32. ábra**) következtettünk arra, hogy a Cd(II) Cys₂His₂ koordinációs módban köt a cinkujj fehérje alegységekhez. Ezt a feltételezést az ESI-MS mérések is megerősítették, mivel nem volt észlelhető Cd₁, Zn₁Cd₁ vagy Cd₂ részecskék jelenléte (**33. ábra c**), amelyek Cys₄, illetve Cys₃ koordinációval jellemezhetők. Ilyen koordinációs módokban a Cd(II) több cinkujj alegység ciszteinjeihez koordinálódhatna, ami megakadályozná a rendezett $\beta\beta\alpha$ fehérjeszerkezet kialakulását és gátolná a cinkujj fehérje DNS-kötését (**34. ábra b, c**). Utóbbi jelenség magyarázatot adhat rá, hogy egyes cinkujj fehérjék, amelyekben a Cys₂His₂ koordinációs helyek kis Zn(II)-, és Cd(II)-affinitással bírnak, miért veszítik el funkciójukat Cd(II)-jelenlétében. A TFIIIA cinkujj fehérje 9 cinkujj alegysége közül csupán 2-3 rendelkezik nagy Zn(II)-affinitással ($K_d < \mu\text{M}$). Habár a szakirodalmi adatok alapján lehetséges a fehérje előállítás 9 Zn(II)-kötött formában, ám Cd(II)-jelenlétében elvégezve a fehérje előállítását, csupán ~4 Cd(II)-kötődik a kitisztított TFIIIA-hoz [89-92]. Elképzelhető, hogy egyes Cys₂His₂ kötőhelyek Cd(II)-affinitása olyan kicsi, hogy kedvezőbb a Cys₃, vagy Cys₄ kötőmód, ahol a Cd(II)- több cinkujj alegység ciszteinjeivel alakít ki kölcsönhatást [87,91].



34. ábra: a, A fokozatos Zn(II)/Cd(II) reverzibilis cserereakció sematikus ábrázolása az 1MEY# cinkujj fehérje esetében. A kicserélődés sorrendje véletlenszerű, az ábra egyszerűség kedvéért nem mutatja be az összes lehetséges variációt; Feltételezett reakciósémák, ahol a Cd(II) több cinkujj alegység ciszteinjeihez koordinálódva b, Cys₄, illetve c, Cys₃ koordinációs módban köt egy cinkujj fehérjéhez. Utóbbi 2 reakcióséma az 1MEY# esetén bizonyítottan nem következik be, de kis stabilitású cinkujj alegységeknél (pl.: TFIIIA) elképzelhető.

Gélelektroforézis sáveltolódás vizsgálatok során igazoltuk, hogy a Cd(II)-kötött 1MEY# cinkujj fehérje nem csupán szerkezetét tekintve mutat nagy hasonlóságot a Zn(II)-komplex-szel, de képes felismerni és megkötni annak DNS célszekvenciáját is (**35. ábra**). A gélképek kvantitatív értékelése alapján $\lg\beta' = 6,04 \pm 0,02$ látszólagos stabilitási állandót határoztuk meg a Cd(II)-1MEY# komplex és a nonspecifikus S0 DNS szekvencia kölcsönhatására. Ez csak kis mértékben tér el a Zn(II)-komplex nonspecifikus DNS-kötésre nyert értéktől ($\lg\beta' = 6,27$) (**5. táblázat**). Jelentősebb, $\sim 0,6$ nagyságrendbeli csökkenést tapasztaltunk a Cd(II)-komplex specifikus DNS-affinitásában ($\lg\beta' = 7,62 \pm 0,04$) a Zn(II)-komplexéhez képest ($\lg\beta' = 8,20$) (**5. táblázat**). Azonban a Cd(II)-1MEY# DNS-kötése még mindig erősnek mondható. Meg kell említeni, hogy a Cd(II)-1MEY# nonspecifikus DNS-kötést enyhén szigmoidális jellegű görbe írta le az elvárható telítési görbe helyett. Elképzelhető, hogy ezt a DNS minták utólagos festésének és a gélképek kvantitatív kiértékelésének bizonytalansága okozta a kezdeti mérési pontokban, ahol nagyon kicsi volt a fehérje-DNS komplex aránya. A Cd(II)-kötött 1MEY# DNS-kötése hasonló jellegű változásokat okozott a rendszer CD spektrumában 190 nm környékén, mint a Zn(II)-

komplex (35. ábra g.). A Cd(II)-1MEY# DNS komplexének CD spektruma nagyobb intenzitást mutatott ebben a tartományban, mint a külön megmért cinkujj fehérje és DNS spektrumok összege, ami a fehérje és DNS másodlagos szerkezetének torzulására utalt a kölcsönhatás során. Azonban a változás mértéke elmarad a Zn(II)-komplex esetén tapasztalt intenzitásnövekedéstől. A sáveltolódás vizsgálatok mellett ez a jelenség is alátámasztotta a Cd(II)-kötött 1MEY# fehérje kisebb DNS-affinitását.



35. ábra: Reprezentatív gélelektroforézis sáveltolódás vizsgálatok **a**, nonspecifikus (S0 DNS); **b**, specifikus (S1 DNS) 34 bp hosszúságú DNS molekulával, növekvő mennyiségű Cd(II)-kötött 1MEY# jelenlétében. $c(\text{DNS}) = 0,88 \mu\text{M}$; 10 mM HEPES (pH 7,4); 150 mM NaClO₄; 10 (m/V)% glicerin; **c**, S0, illetve **d**, S1 DNS eloszlási diagramja növekvő cinkujj fehérjekoncentráció mellett. Az adott fehérje/DNS arányokhoz tartozó pontokat három-három független gélelektroforézis sáveltolódás vizsgálat intenzitásadataiból számítottuk az ImageJ program segítségével [3]. Folytonos vonalakkal a PSEQUAD program segítségével számolt értékeket ábrázoltuk [4]. **e**, Gélelektroforézis sáveltolódás vizsgálat specifikus 34 bp (S1 DNS) hosszúságú DNS szakasz és holo-1MEY# között növekvő mennyiségű Cd(ClO₄)₂ jelenlétében. $c(\text{DNS}) = 0,7 \mu\text{M}$; $c(\text{holo-1MEY\#}) = 0,88 \mu\text{M}$, 10 mM HEPES (pH 7,4); 150 mM NaClO₄; 10 (m/V)% glicerin; az elegyeket a Cd(II) hozzáadását követően fél órán át inkubáltuk 25 °C-on. **f**, DNS eloszlási diagramja a DNS-1MEY# rendszerben Cd(II)-hatására. Az intenzitásokat ImageJ program segítségével integráltuk [3]. **g**, Az S1 DNS CD-spektrumának összehasonlítása 0,5 ekvivalens Zn(II)-1MEY# (fekete) és 0,5 ekv. Cd(II)-1MEY# (narancssárga) jelenlétében. A szaggatott vonal a megfelelő fehérje- és DNS-spektrumok összegzésével számított CD-spektrumot reprezentálja. Az összes CD spektrumot 18,8 μM fehérjekoncentrációra normált. 7,5 mM HEPES (pH 7,4); 45 mM NaClO₄; $l = 0,2 \text{ mm}$

Miután igazoltuk, hogy a Zn(II)-, és Cd(II)-kötött 1MEY# is képes felismerni DNS célszekvenciáját, kompetíciós reakcióban is tanulmányoztuk a fehérje DNS kötését. A Zn(II)-kötött 1MEY#-S1 DNS komplexhez növekvő mennyiségben adagolva Cd(II)-t nem tapasztaltunk változást a fehérje DNS-kötésében (**35. ábra e, f**). Ez egyfelől utalhat rá, hogy a Zn_2Cd_1 1MEY# és Zn_1Cd_2 1MEY# vegyeskomplexek is azonos mértékben képesek felismerni ugyanazt a DNS célszekvenciát, mint a Zn(II)-, és Cd(II)-kötött formák. Mindemellett elképzelhető, hogy DNS jelenlétében a Cd(II) még kevésbé képes versengeni az 1MEY# kötőhelyeiért a Zn(II)-vel szemben, amint azt az EDTA-val végrehajtott kompetíciós reakcióban is tapasztaltuk (**ld. 5.2.3 fejezet**).

Az eredményeink alapján kijelenthető, hogy a Cd(II) toxicitása az élő szervezetekben nem tulajdonítható közvetlenül a nagy stabilitású Cys₂His₂ cinkujj fehérjékkel való kölcsönhatásának. Amennyiben egy ilyen fehérje Zn(II)-kötött formában van jelen, nagy Cd(II) feleslegre lenne szükség, hogy akár részlegesen is megtörténjen a Zn(II) szubsztitúciója fiziológias körülmények között. Egy nagy Zn(II)-affinitású, de apo cinkujj fehérjével a Cd(II) stabil komplexet képezhet. A Cd(II)-kötött és a vegyeskomplexek is képesek megkötni a fehérje DNS-célszekvenciáját, vizsgálataink alapján az egyetlen különbség a kialakult Cd(II)-komplexek affinitásában volt, amint ezt néhány publikáció is említi [97-98,100]. Ebből adódóan, egy Cd(II)-kötő cinkujj fehérje továbbra is képes lehet betölteni a fehérje funkcióját. Továbbá, még ha a fehérje szerkezete eltérő is, az nem feltétlenül jelenti azt, hogy a specifikus DNS-kötő funkció is teljesen megszűnik. A Tramtrack cinkujj fehérje esetében, ahol a CD mérések alapján a fehérje α -hélix tartalma jelentősen csökkent a Cd(II)-kötés során, a komplex még képes volt felismerni DNS célszekvenciáját, bár a kölcsönhatás ~ 1 nagyságrenddel gyengébb volt a Zn(II)-kötött formáénál [100].

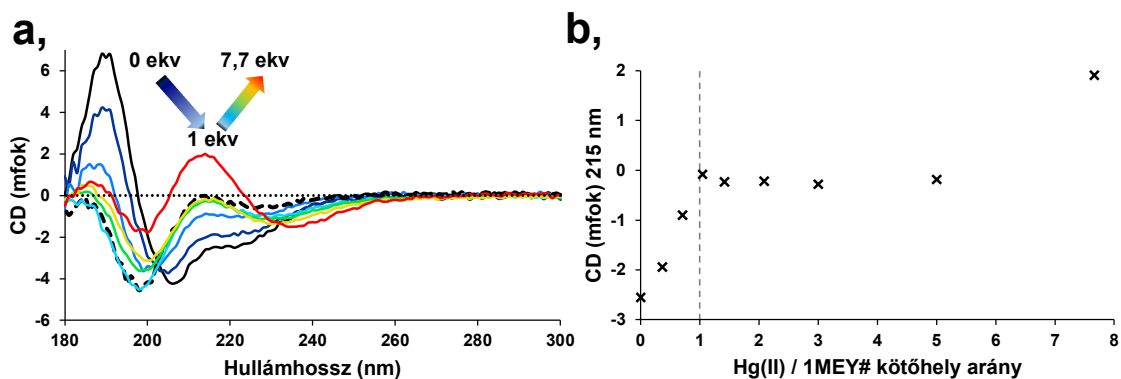
5.3.3 Hg(II) hatása a cinkujj fehérjére

A Hg(II) cinkujj fehérjékre gyakorolt hatása jelentősen különbözik a Cd(II)-tól. A méréseink során Hg(ClO₄)₂ sót használtunk, elkerülendő a Hg(II) koordinációját a kloridionokhoz, így lehetőségünk volt a közvetlen kölcsönhatást vizsgálni a cinkujj fehérje és a fémion között (**ld. 2.1.3 fejezet**). Három ekvivalens (1 ekvivalens / kötőhely) Hg(II) hatására az 1MEY# fehérje CD spektruma jelentősen megváltozott, ami a fehérje $\beta\beta\alpha$ másodlagos szerkezetének összeomlására utal, egyes irodalmi eredményekhez hasonlóan [103]. Az α -hélixhez rendelhető pozitív csúcs 190 nm-környékén teljes mértékben eltűnt (**36. ábra**). Ebből adódóan azt feltételeztük, hogy a reakció során Hg₃1MEY# komplex

képződik, amelynek másodlagos szerkezete többnyire rendezetlen. Mivel a Hg(II) igen nagy affinitást mutat a cisztein-tiolátokhoz, ez volt a várt eredmény, függetlenül attól, hogy a Zn(II) teljesen kiszorult-e a kialakult komplexből vagy terner komplexek képződtek.

1MEY# kötőhelyenként ~5 ekvivalens Hg(II) hozzáadásáig csak kismértékű, de folyamatos változás zajlott a fehérje CD spektrumában, ami arra utalt, hogy további folyamatok játszódnak le. Kötőhelyenként ~8 ekvivalens Hg(II) hatására egy intenzív pozitív sáv jelent meg 215 nm körül, ami valószínűleg a Hg(II) töltésátviteli sávja [236,240-241] (**36. ábra a.**).

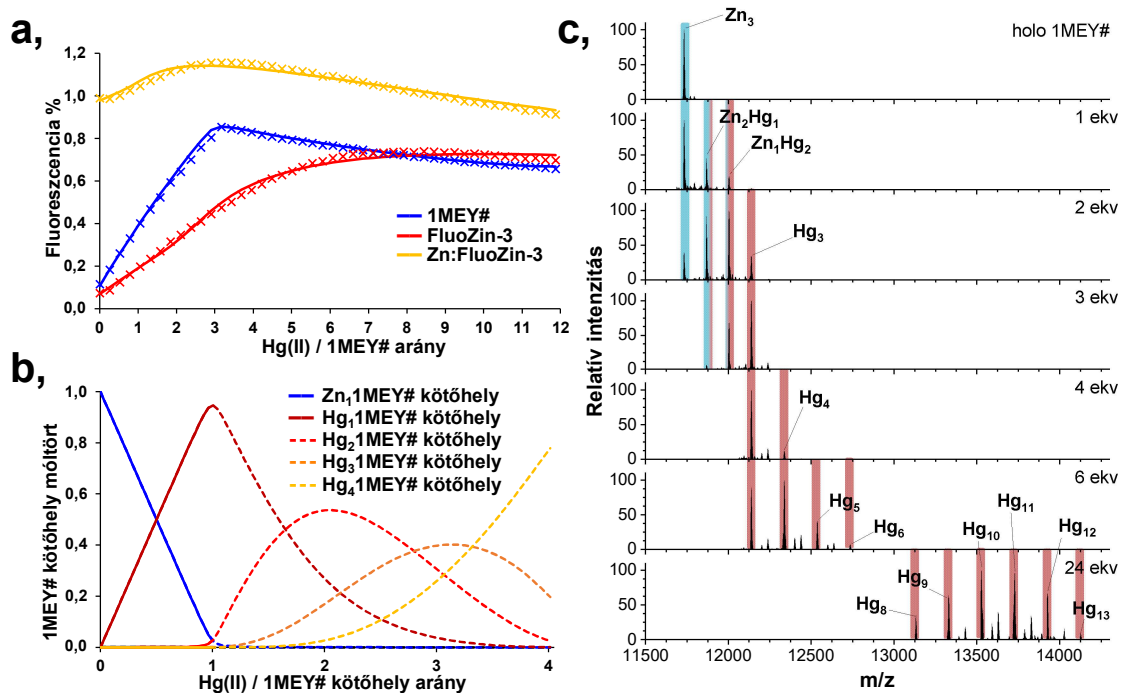
Amennyiben a 215 nm-en mért ellipticitás értékeket ábrázoltuk a hozzáadott Hg(II) ekvivalensek függvényében, egy éles töréspont volt látható egy kötőhely ekvivalens higany hozzáadásának hatására, ami ugyancsak arra utalt, hogy a Hg(II) erősebb kompetitor az 1MEY# cinkujj fehérje kötőhelyeiért, mint Cd(II) (**36. ábra b.**). Az éles töréspont egy kötőhely-ekvivalens Hg(II)-nél továbbá arra is utalt, hogy a Zn(II)/Hg(II) csere fokozatosan ment végbe és az egyik alegység szétesése nem gyengítette a fehérje további Zn(II)-tartalmú alegységeinek Zn(II)-kötését. Ez a megfigyelés ugyancsak alátámasztja, hogy az 1MEY# fehérjében az egyes alegységek függetlenül viselkednek fémion koordináció szempontjából egymástól.



36. ábra: a, 1MEY# CD spektruma növekvő koncentrációjú Hg(ClO₄)₂ jelenlétében. Zn(II)-kötött fehérje (fekete teljes vonal), 1 ekvivalens Hg(II) 1MEY# kötőhelyenként (fekete szaggatott spektrum).c(holo-1MEY#) = 16 μM; 10 mM HEPES (pH 7,4); l = 0,1 mm;. Az egyedileg összeállított mintákat 5 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten CD mérés előtt. b, 215 nm-en mért ellipticitás értékek Hg(II) ekvivalensek függvényében ábrázolva.

A Hg(II) kölcsönhatását a Zn(II)-kötött 1MEY# fehérjével fluorimetriás titrálások során is vizsgáltuk a FluoZin-3 Zn(II)-szelektív fluorofór segítségével. A javasolt szelektivitása ellenére a fluorofór Hg(II)-vel is képes volt fluoreszcens komplex kialakítására, így a Hg(II)-1MEY# rendszer kvantitatív vizsgálatához előzőleg a Hg(II)-FluoZin-3 rendszert jellemeztük (**ld. F1.5 fejezet**), ám mint kiderült, ezekre az adatokra később nem volt szükség. A fehérje jelenlétében történő mérések alapján a Hg(II) olyan

erősséggel koordinálódik az 1MEY# fehérje cinkujj alegységeihez, hogy FluoZin-3 jelenlétében is kvantitatív módon valósult meg a Zn(II) lecserélése. Három ekvivalens Hg(II) (1 kötőhelyekvivalens) hatására a kapott fluoreszcenciás intenzitásemelkedés azonos mértékű volt, mintha megfelelő mennyiségű szabad Zn(II)-t adagoltunk volna a rendszerhez. Ez arra utal, hogy a Hg(II) kvantitatíve kiszorította a fehérjéből a Zn(II)-t amely koordinálódott a FluoZin-3-hoz (**37. ábra a**). További érdekesség, hogy a várakozásokkal ellentétben folytatva a titrálást sem volt megfigyelhető a fluoreszcencia emelkedése, a minta gyakorlatilag úgy viselkedett, mintha pufferrel hígítottuk volna, ami arra utal, hogy a további extra Hg(II)-t is az 1MEY# cinkujj fehérje kötötte meg. Ez a jelenség lehetőséget nyújtott, hogy ne csupán a kötőhelyenkénti első, de további Hg(II) koordinációjához rendelhető affinitásértékeket is megbecsüljük (**7. táblázat**). Habár ebben az esetben már bizonytalan, hogy az alegységeket függetlenül kezelhetjük vagy sem. Ugyanakkor bármilyen koordináció is megy végbe, annak nagyobb stabilitású komplexet kell eredményezni Hg(II)-vel, mint a FluoZin-3-nak.



37. ábra: a, Holo 1MEY# cinkujj fehérje titrálása $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ mérőoldattal (sötétkék) FluoZin-3 segítségével fluorimetriásan követve. A folytonos vonalak a számolt titrálási görbéket jelölik. Ezzel egyidejűleg referencia titrálásokat is végeztünk, hogy meghatározható legyen a relatív fluoreszcencia érték 1MEY# fehérje hiányában (piros adatsor), vagy az 1MEY# Zn(II)-tartalmával megegyező mennyiségű $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$ jelenlétében (sárga adatsor). 200 μl minta, 3 μl injektálások $T = 25^\circ\text{C}$. $c(\text{FluoZin-3}) = 6 \mu\text{M}$; $c(1\text{MEY}\#) = 1 \mu\text{M}$; 10 mM HEPES (pH 7,4); 150 mM NaClO_4 ; A számításokat PSEQUAD programmal végeztük; **b**, A fluorimetriás és ESI-MS mérés alapján generált eloszlási diagram. A szaggatott görbével jelzett részecskék eloszlása bizonytalan. A szimulációt a Microsoft Excel Solver bővítményével hajtottuk végre (**ld. F1.4.2 fejezet**). **c**, holo 1MEY# fehérje ESI-MS módszerrel vizsgálva növekvő mennyiségű Hg(II) jelenlétében. $c(1\text{MEY}\#) = 2 \mu\text{M}$; 8,2 mM ABC (pH 7,8)

A számítások során ebben az esetben is feltételeztük, hogy az 1MEY# cinkujj fehérje alegységei azonosak, a számolt eloszlási diagramon a szaggatott vonallal jelzett szakasz bizonytalan, mivel a stabilitási állandók alsó becslések és nincs pontos információnk arról, hogy itt milyen részecskék alakultak ki (**37. ábra b**).

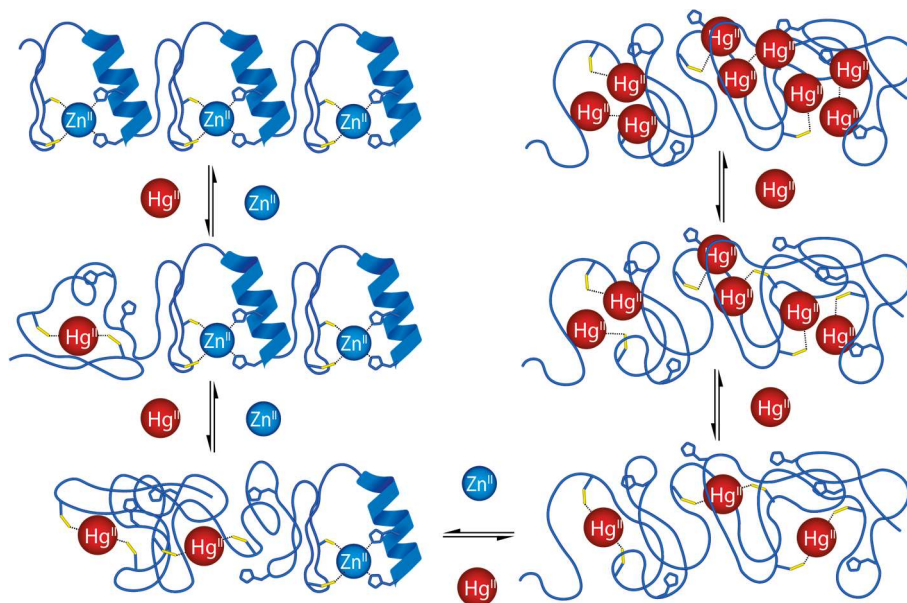
ESI-MS körülmények között megismételve a titrálást is kimutatható volt a Zn(II) fokozatos kiszorítása, $Zn_2Hg_11MEY\#$ és $Zn_1Hg_21MEY\#$ átmeneti termékeken keresztül. Emellett sikerült kimutatni, hogy akár 12-nél is több Hg(II) képes koordinálódni az 1MEY# fehérjéhez nagyobb Hg(II) feleslegben (**37. ábra c**). Az ESI-MS-alapján számolt stabilitási állandó a monokomplexre megegyezett a fluorimetriás titrálásból számított alsó küszöbértékkel (**7. táblázat**).

Feltételezhetően az első három bekötődő Hg(II) csak a ciszteinekhez koordinálódik [103], így elméletben a hisztidinekhez továbbra is koordinálódhatna Zn(II), de az ESI-MS mérés alapján nem látható vegyeskomplex, ahol egy cinkujj alegységen belül többféle fémion koordinálódik (**38. ábra**). Habár technikailag a $Zn_2Hg_11MEY\#$, $ZnHg_21MEY\#$ részecskék terner komplexek, de mivel a különböző fémionok különböző cinkujj alegységekhez kötődnek, így a fémionok koordinációja nagy valószínűséggel egymástól független.

7. táblázat: Hg(II) : 1MEY# rendszerre megbecsült látszólagos stabilitási állandók fluorimetriás és ESI-MS mérések alapján (**37. ábra**).

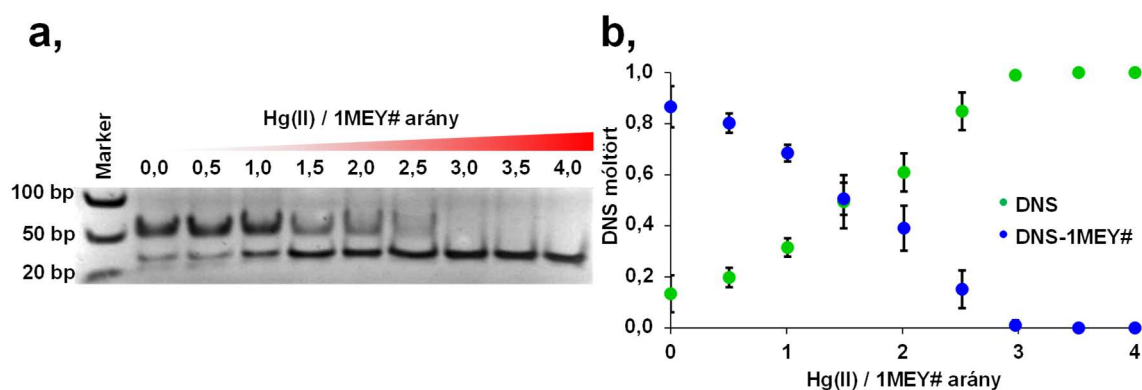
	pK'
Hg ₁ 1MEY# kötőhely	≥ 16,7 ^{a,b}
^a Fluorimetria	
^b ESI-MS	

Az első Hg(II) koordinációjára kapott látszólagos stabilitási állandó ($\lg\beta^{\circ}_{Hg(II)-1MEY\# \text{ kötőhely}} \geq 16,7$) meglehetősen nagy érték a cinkujj fehérjék között. A CXXC-aminosav szekvenciát tartalmazó peptideknek csak azokban az esetekben volt hasonló, vagy nagyobb affinitása a Hg(II) iránt, ahol a ciszteinek kedvező helyzetben voltak, és a másodlagos szerkezet sem volt teljes mértékben rendezetlen [242-245]. Habár az 1MEY# CD-spektruma kötőhelyenként egy ekvivalens Hg(II) jelenlétében jelentősen eltér a rendezetlen szerkezetű fehérje CD spektrumától (**F14. ábra**), a tiolát-Hg(II) töltésátviteli sávok hozzájárulása miatt nem lehetünk benne biztosak, hogy a kettő közötti különbség rendezett másodlagos szerkezetre utal-e [236,240-241]. A szintén Cys₂His₂ típusú Ros87 cinkujj fehérje NMR-vizsgálata alapján feltételezhető, hogy a szerkezet nem teljesen rendezetlen [103]. Sivo és mtsai. a Ros87 Hg(II)-affinitását is meghatározta HgCl₂ kompetíció segítségével ($\lg\beta^{\circ}_{Hg(II)-Ros87} = 6,1$) [103].



38. ábra: A fokozatos Zn(II)/Hg(II) cserereakció sematikus ábrázolása az 1MEY# cinkujj fehérje esetében. A kicserélődés sorrendje véletlenszerű, az ábra egyszerűség kedvéért nem mutatja be az összes lehetséges variációt

Gélelektroforézis sáveltolódás vizsgálatok alapján a Hg(II) effektíven kiszorította a Zn(II)-t az 1MEY#-S1 DNS komplexből. A DNS-nek nem volt kimutatható gátló hatása a folyamatra. Három ekvivalens Hg(II) (1 kötőhelyekvivalens) teljesen megszüntette a cinkujj fehérje DNS-kötését (**39. ábra a, b,**).



39. ábra: a, Reprezentatív gélelektroforézis sáveltolódás vizsgálatok specifikus (S1 DNS) 34 bp hosszúságú DNS szakasz és holo-1MEY# között növekvő mennyiségű $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ jelenlétében. $c(\text{DNS}) = 1 \mu\text{M}$; $c(\text{holo-1MEY\#}) = 1 \mu\text{M}$; 10 mM HEPES; (pH 7,40); 150 mM NaClO_4 ; 10 (m/V)% glicerin; az elegyeket a Hg(II) hozzáadását követően fél órán át inkubáltuk 25 °C-on. **b,** DNS eloszlási diagramja a DNS-1MEY# rendszer Hg(II) titrálása során. Az egyes frakciókhoz tartozó pontok 3 független gél mobilitás-változás mérés intenzitásadatainak átlagából származnak a hozzájuk tartozó hibákkal. Az intenzitásokat ImageJ program segítségével számítottuk [3].

Ezek alapján a Hg(II) hatása kompetitor ligandumok hiányában egyértelmű. Módosítva a körülményeket (Cl^- -ion, DTT jelenléte a pufferben) ez az effektus jelentősen csökkenthető, de a legtöbb irodalmi adat szerint a Hg(II) mégis hatékonyan gátolja a cinkujj fehérjék DNS-kötését [94,98,103].

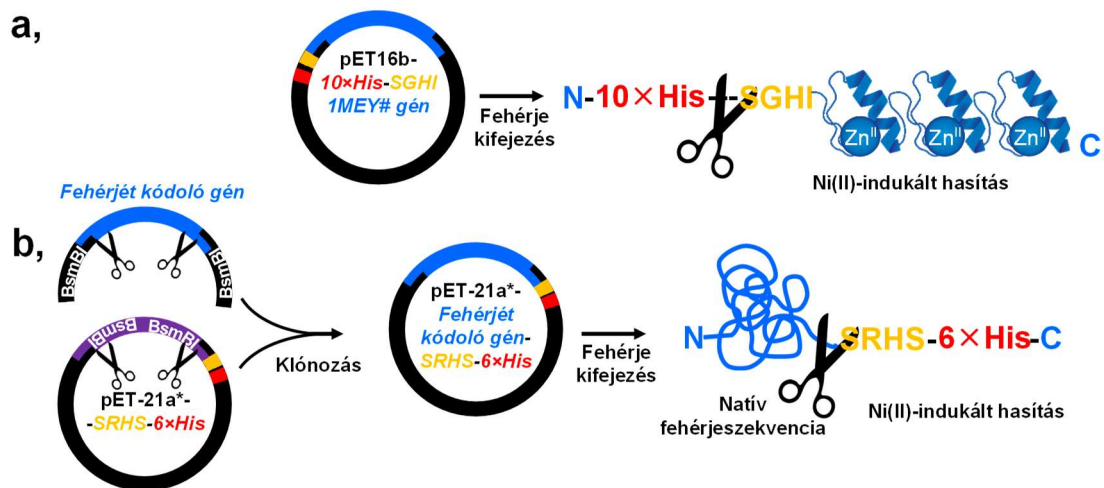
5.4 Alkalmazás: fehérjetisztítási módszer

A fehérjetisztítások hatékony kivitelezéséhez a fehérjéket egy affinitástoldalékkal ellátva célszerű előállítani. Ez a toldalék azonban jelentősen módosíthatja a fehérjék funkcióját, gátolhatja működésüket, így számos esetben később szükséges az eltávolításuk (poszttranszlációs módosítás). A toldalékok lehasítására több specifikus proteáz áll rendelkezésre, azonban ezek előállítása igen körülményes és drága, a reakciót követően további tisztítási lépések lehetnek szükségesek az enzim eltávolítására, illetve sok proteáz hagy hátra nem-natív aminosavakat a vizsgálni kívánt fehérjéken. Mindemellett további aminosavak kapcsolódhatnak a fehérjéhez, amennyiben a fehérje génjének beültetésére alkalmazott restriktív endonukleázok felesleges oligonukleotid túlnyúlásokat hagynak hátra.

Az **5.1 alfejezetben** igazoltuk, hogy a His-1MEY# fehérjéről szelektíven lehasítható az affinitástoldalék Ni(II) segítségével. Ez működőképes eljárás akkor, ha a fehérje szekvenciája tartalmaz egy X-(Ser/Thr)-X-His-Z-B motívumot, – ahol B bármilyen, X cisztein és prolin kivételével bármilyen, Z cisztein kivételével bármilyen aminosav lehet [146-147]. A hidrolízis a szerin/treonin előtt következik be, és a C-terminális fragmens új N-terminális végéhez koordinálódik egy Ni(II), ahol egy ATCUN motívum alakul ki. Ezzel szemben az N-terminális fragmens aminosav szekvenciája a hidrolízistől eltekintve módosulás nélkül marad hátra a reakcióban. Így felmerült a kérdés, hogy alkalmazható-e a Ni(II)-indukált szelektív hidrolízis natív fehérjeszekvenciák előállítására, ezzel elkerülve az erre a célra nem is igen használható költséges proteázok beszerzését/előállítását.

5.4.1 Gének tervezése, fehérjetisztítás

Az ötlet megvalósításához a meglévő pET16b DNS-hordozón alapuló rendszert át kellett tervezni oly módon, hogy a fehérje kifejeződése során az affinitástoldalék az eddig N-terminálisról annak C-terminális végére kerüljön (**40. ábra**). Mindemellett olyan DNS hordozóra volt szükségünk, ahol lehetséges úgy beépíteni a fehérjét kódoló gént, hogy ne kapcsolódjanak extra aminosavak később a fehérjéhez. A rendszer működőképességét ezt követően egy csoportunk által a korábbiakban alaposan tanulmányozott Δ N4-NColE7 fehérjével teszteltük [164]. A pET-21a* DNS hordozónak a kialakítását, a fehérjék kifejezését, illetve Ni(II)-affinitás tisztítását kutatócsoportunk korábbi PhD hallgatója doktori disszertációjában már részletesen bemutatta [246-247].



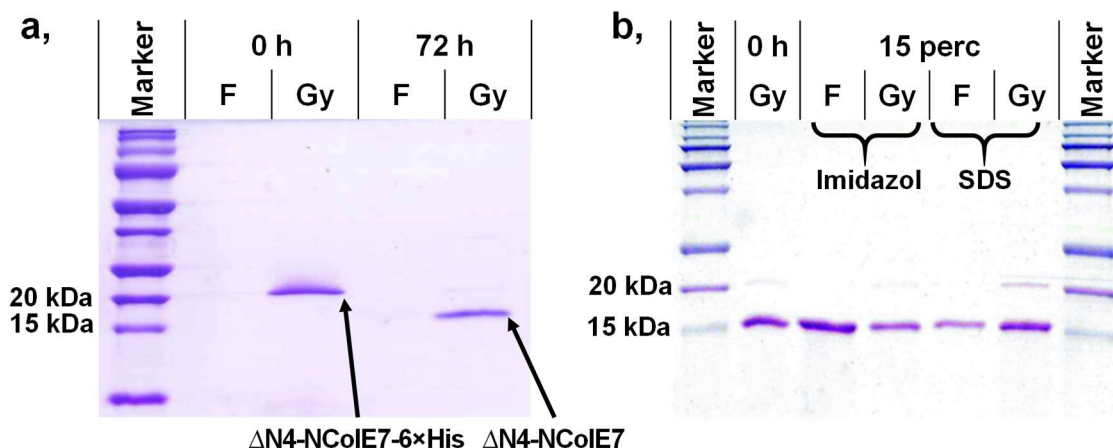
40. ábra: a, Az 1MEY# fehérje és az azt kódoló gén sematikus ábrázolása. b, A módosított pET-21a* DNS hordozó, a lehetséges fehérje gének beültetésének módja és az abból kifejeződő fehérje sematikus ábrázolása.

5.4.2 Hidrolízis oldatban és Ni-NTA gyantán

A fehérjetisztítást követően elsőként oldatban vizsgáltuk meg a hidrolitikus reakciót. Az SDS poliakrilamid gélek alapján a 3 napos inkubáció 50 °C-on a hidrolízis teljes mértékű lejátszódásához vezetett 1 mM Ni(II) hatására 100 mM HEPES (pH 8,2) pufferben (F15. ábra). A kiindulási affinitástoldalékkal ellátott fehérje sávja ~20 kDa-nál jelent meg a gélképen, ami jó egyezést mutat ennek az elméleti 17220 Da tömegével. Három nap elteltével ez a sáv teljes mértékben eltűnt és egyetlen éles sáv jelent meg ~15 kDa-nál, ami feltehetően az affinitástoldalék nélküli fehérjéhez rendelhető. Mivel egyéb sávok és elmosódás nem mutatkozott a gélképen, így feltételezhetően a reakció specifikusan zajlott le és csak az SRHS aminosavszekvenciát megelőzően történt hidrolízis.

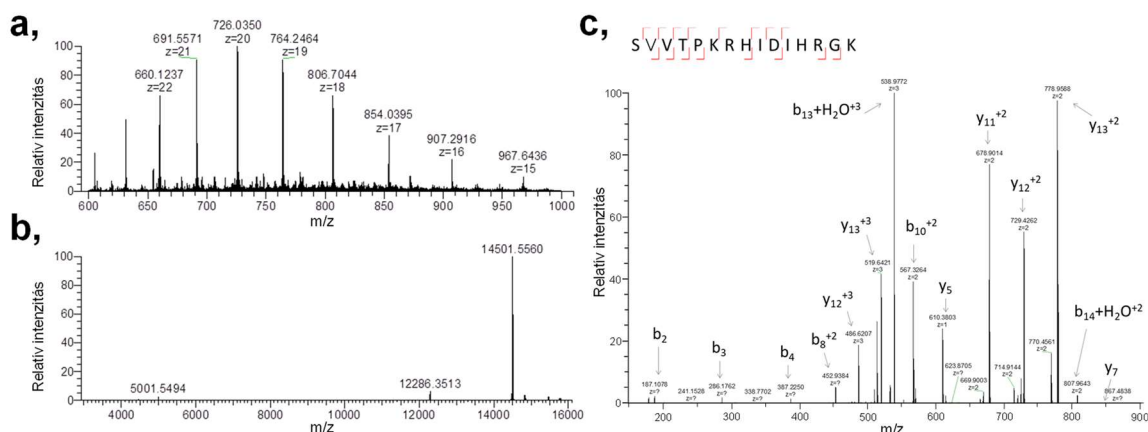
A sikeres oldatbeli reakciót követően megkíséreltük a Ni(II)-NTA gyantán is végrehajtani a hasítást, mivel komoly előnyt jelent a fehérjetisztítás során, ha nem kell külön eluálni a fehérjét a hordozóról majd puffert cserélni az elegyen, hanem a szükséges natív fehérjét közvetlenül lehet lehasítani a tisztítást követően, míg az affinitástoldalék a gyantához kötve marad. A reakciót azonos körülmények között hajtottuk végre, mint az oldatbeli hidrolízist. Az SDS-poliakrilamid gélek alapján ebben az esetben is 100%-ban végbement a hasítás, a ~20 kDa-nál látható fehérjesáv az inkubációt követően eltűnt és az új sáv ~15 kDa-nál jelent meg, azonban meglepő módon a teljes fehérjemennyiség továbbra is a gyantára kötve maradt, holott a hidrolízist követően az N-terminális fragmens – ami az előállítandó natív fehérje – már nem tartalmazott hexahisztidin affinitástoldalékot (41. ábra a.). A reakcióra nem volt hatással, hogy az inkubáció során kevertettük-e a gyantát vagy sem, így megkíséreltük különböző módokon eluálni a fehérjét a gyantáról. Habár

kvantitatív elúciót nem sikerült elérni, azonban 15 perc 0,5 M NaCl, 1 M imidazol kezeléssel a fehérjemennyiség ~60%-a, míg 0,5 (m/V)% SDS kezeléssel ~25%-a felszabadítható volt a gyantáról (41. ábra b).



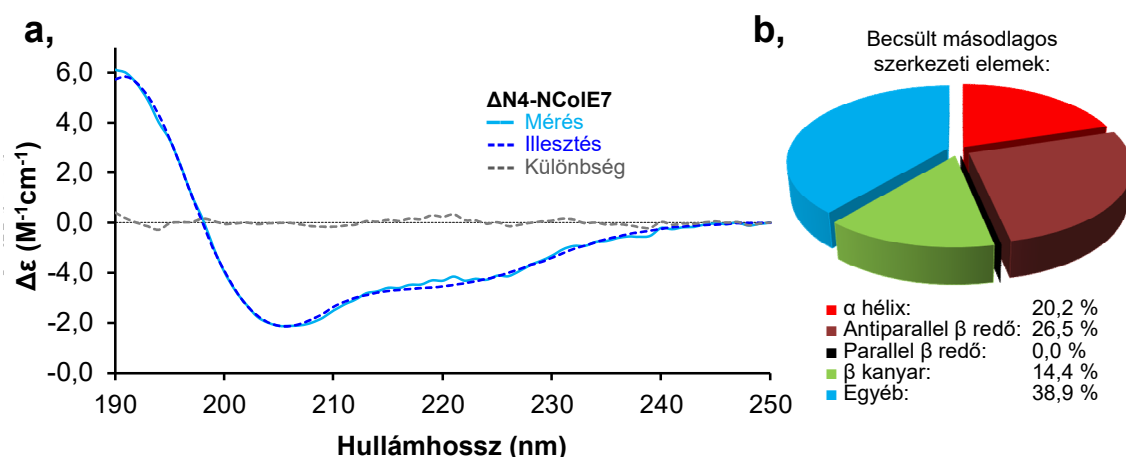
41. ábra: a, Ni-NTA gyantára kötött $\Delta N4\text{-NCoIE7-}6\times\text{His}$ fehérje hidrolízise Ni(II)-vel 50 °C-on 72 órán keresztül Tricin-SDS-PAGE módszerrel vizsgálva. $c(\text{NiCl}_2) = 1 \text{ mM}$; $c(\text{ZnCl}_2) = 0,25 \text{ mM}$, 100 mM HEPES (pH 8,2); F: felülúszóból vett minta, Gy: gyantából vett minta. b, hidrolizált $\Delta N4\text{-NCoIE7}$ fehérje eluálása a gyantáról 0,5 M NaCl, 1 M imidazzollal, illetve 0,5 (m/V)% SDS-sel 15 perc inkubáció során.

A hasítást követő gyantára kötődés feltehetően minden fehérje esetén eltérő mértékű, és a fehérje részleges aggregációjával magyarázható. A $\Delta N4\text{-NCoIE7}$ fehérje esetében az is szerepet játszhat, hogy 4 egymáshoz közeli hisztidin aminosavat is tartalmaz a C-terminális végéhez közel, így minden bizonnyal ezek képesek az affinitástoldalék lehasítását követően továbbra is koordinálódni a Ni-NTA gyantához. Ezzel magyarázható az is, hogy 1 M imidazol hatására nagy százalékban oldatba sikerült vinni a fehérjét. A kezeléshez használt SDS vagy imidazol ezt követően puffercserével távolítható el. A kísérleteink során ultraszűrést alkalmaztunk 10 kDa pórusátmérőjű Amicon Ultra-0,5 mL membránszűrők felhasználásával, ám itt érdemes megjegyezni, hogy az SDS effektív eltávolításához az oldatot a micellaképződési koncentráció alá kell hígítani a folyamat megkezdése előtt (~0,23 (m/V)% SDS esetén), illetve a kezelés imidazzollal felszabadíthatja az affinitástoldalékot is, ez azonban ultraszűrés során az átfolyóba kerül. A tisztítási eljárás sematikus folyamatábrája a függelékben található (F16. ábra).



42. ábra: **a**, A hidrolizált $\Delta N4$ -NCoIE7 fehérje mért m/z tömegspektruma. **b**, Dekonvolúcióval kiszámított MH^+ tömegspektrum csúcsa. **c**, 726 m/z ($z=20$) csúcs nagyenergiájú ütközéses disszociációja (HCD) során keletkezett 528 m/z ($z=3$) csúcs (y_{15}^{3+}) ütközés-indukált disszociációjának (CID) MS^3 tömegspektruma

A reakció termékeként képződő 127 aminosavból álló $\Delta N4$ -NCoIE7 fehérje dekonvolúcióval kiszámított tömegspektrumában csak egy fő csúcs látható, melléktermékekhez rendelhető csúcsok csak elenyésző mértékben ($< 5\%$) figyelhetők meg (**42. ábra b**). A hidrolizált fehérje mért (14501,6 Da) és elméleti (14501,4 Da) tömege jó egyezést mutatott. Annak érdekében, hogy igazoljuk, a Ni(II)-indukált hasítás nem okozott – a hidrolízist leszámítva egyéb – módosulást az előállítandó fehérje szekvenciájában a legintenzívebb 726 m/z ($z=20$) csúcsot kiválasztva fragmentáltuk HCD technikával. A fragmentáció során sikerült azonosítanunk egy nagy intenzitású y_{15}^{3+} részecskét (528 m/z , $z=3$), ami a fehérje utolsó 15 aminosavját tartalmazta: SVVTPK R R H I D I H R G K. Ennek a további CID fragmentációját elvégezve a kapott ionok megegyeztek a natív fehérjéből várható fragmensek tömegeivel (**42. ábra c**).



43. ábra: **a**, $\Delta N4$ -NCoIE7 mért és BeStSel által illesztett CD spektruma. **b**, másodlagos szerkezeti elemek becsült megoszlása $\Delta N4$ -NCoIE7 fehérjében BeStSel illesztés alapján [2].

Mindemellett a fehérje CD spektruma rendezett másodlagos szerkezetre utal, a BeStSel illesztés alapján 60% az α -hélix, β -redő és β -kanyar szerkezeti elemek relatív mennyisége, így a fehérje gyantáról eluálható hányada valószínűleg inkább koordinatív okokból maradt a hidrolízist követően kötve, mintsem aggregáció miatt (**43. ábra**).

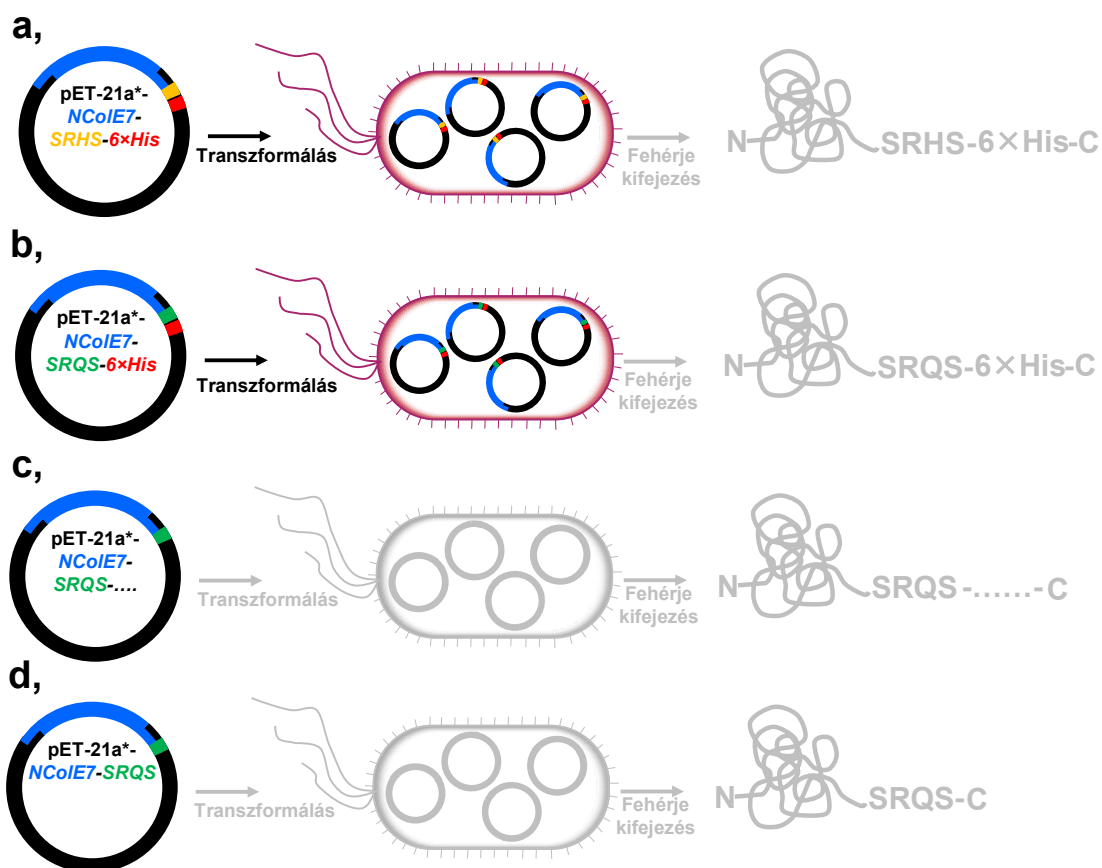
5.5 Alkalmazás: allosztérikus szabályozás

Az előző alfejezetben ismertetett tisztítási procedúrát laboratóriumunkon belül is több fehérje előállítására alkalmaztuk. A koncepció különösen előnyösnek bizonyult az NColE7 fehérjén alapuló mesterséges metallonukleázok előállítása során, ahol a fehérje N- és C-terminális végeinek térbeli közelsége elengedhetetlen a fehérje nukleáz aktivitásának kifejtéséhez [172,174], így bármilyen extra aminosav jelenléte gátolhatja a funkciót. Munkánk során felkeltette a figyelmünket, hogy amíg a tisztítás végtermékeként kapott natív fehérjék aktívak voltak, addig a hexahisztidin toldalék – a Ni(II)-szelektív hidrolízist megelőzően – kimagasló gátló effektust gyakorolt a nukleázokra. Ezt a jelenséget alaposabban körüljártuk.

5.5.1 Gének tervezése, sejtbeli kísérletek

A Ni(II)-indukált hidrolízisen alapuló fehérjetisztítási rendszer optimalizációjához használt Δ N4-NColE7 fehérjével szemben annak teljes változatában, nem hiányzik a KRNK szekvencia a fehérje N-terminális végéről. Ez a fehérje oly nagymértékű nonspecifikus nukleáz aktivitással rendelkezik, hogy akár egyetlen molekula is képes egy sejt elpusztítására [165]. Ebből kifolyólag már a fehérje génje sem juttatható be bakteriális hordozóba – csak az ún. Im7 immunitásfehérje génjével együtt –, mivel amint a bejuttatott génről minimális mennyiségű fehérje fejeződik ki, az feldarabolja a sejt saját genomiális DNS-ét is (**44. ábra d**). Ez a gyakorlatban úgy nyilvánul meg, hogy a táptalajon nem növekednek fel baktériumtelepek, miután a gént tartalmazó DNS hordozót bejuttatjuk a baktériumsejtekbe. Ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy a pET-21a*SRHS-6 \times His hordozóba épített NColE7 gént lehetséges bejuttatni sejtekbe, és képződnek telepek táptalajon, ami a fehérje aktivitásának drasztikus csökkenésére utal. A fehérje túltermeltetése a sejtekben ugyanakkor már nem volt lehetséges, azaz az enzim aktivitása nem szűnt meg teljes mértékben (**44. ábra a**). Az NColE7 egy módosított verziójáról, amelyben az N-terminális KRNK szekvencia egy argininjét glicinre cseréltük (továbbiakban KGNK-SRHS-6 \times His [169]), már a fehérje túltermeltetése is lehetségessé vált Im7 fehérje nélkül. A

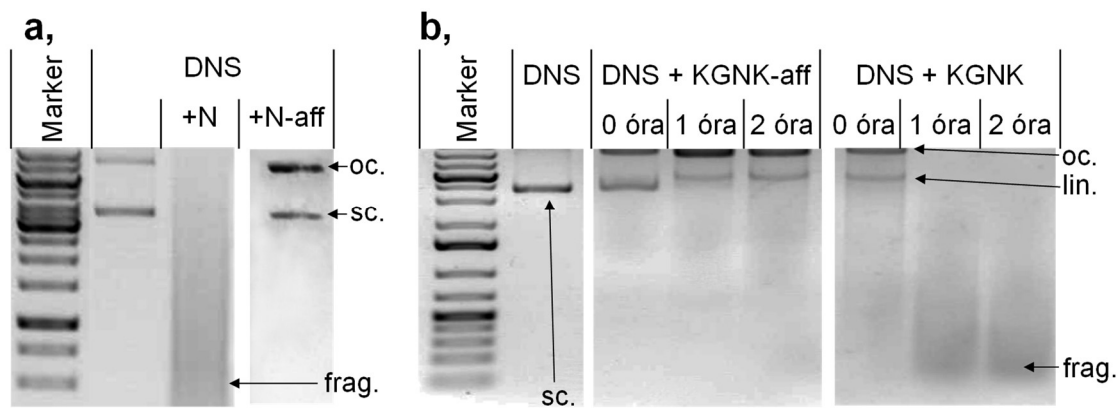
gének tervezését és bakteriális sejtekkel végzett munkát csoportunk korábbi PhD hallgatója doktori disszertációjában már részletesen bemutatta [246,248].



44. ábra: NColE7 gén beépítése különböző DNS hordozókba és ennek hatása *E. coli* sejtekre. **a**, NColE7-SRHS-6xHis és **b**, NColE7-SRQS-6xHis gén bejuttatható sejtekbe, de a fehérje nem termelhető túl. **c**, NColE7-SRQS-..... és **d**, NColE7-SRQS gén nem juttatható be sejtekbe.

5.5.2 Ni(II)-indukált hidrolízis hatása a nukleáz aktivitásra

Kutatócsoportunk távlati céljai között szerepel olyan NColE7-alapú mesterséges metallonukleázok tervezése, amelyek már specifikus DNS hasításra is alkalmasak [174]. Megvizsgálva egy C45-ZF-N85, illetve C45-ZF#-N85 jelölésű mesterséges metallonukleáz DNS hordozójának integritását a fehérje affinitás toldalékkal és annak hiányában történő kifejezését követően egyértelműen látható volt, hogy az affinitástoldalék képes a DNS hasítás visszaszorítására. A körkörös DNS a kiindulási szuperhelikális formában van és nagyobb hányada egyszálú hasítást követően átalakult nyílt cirkuláris formába (**45. ábra a**). Ezzel szemben affinitástoldalék hiányában a DNS hordozó apró darabokra fragmentálódott, amit a gélképen látható elmosódás jelöl.



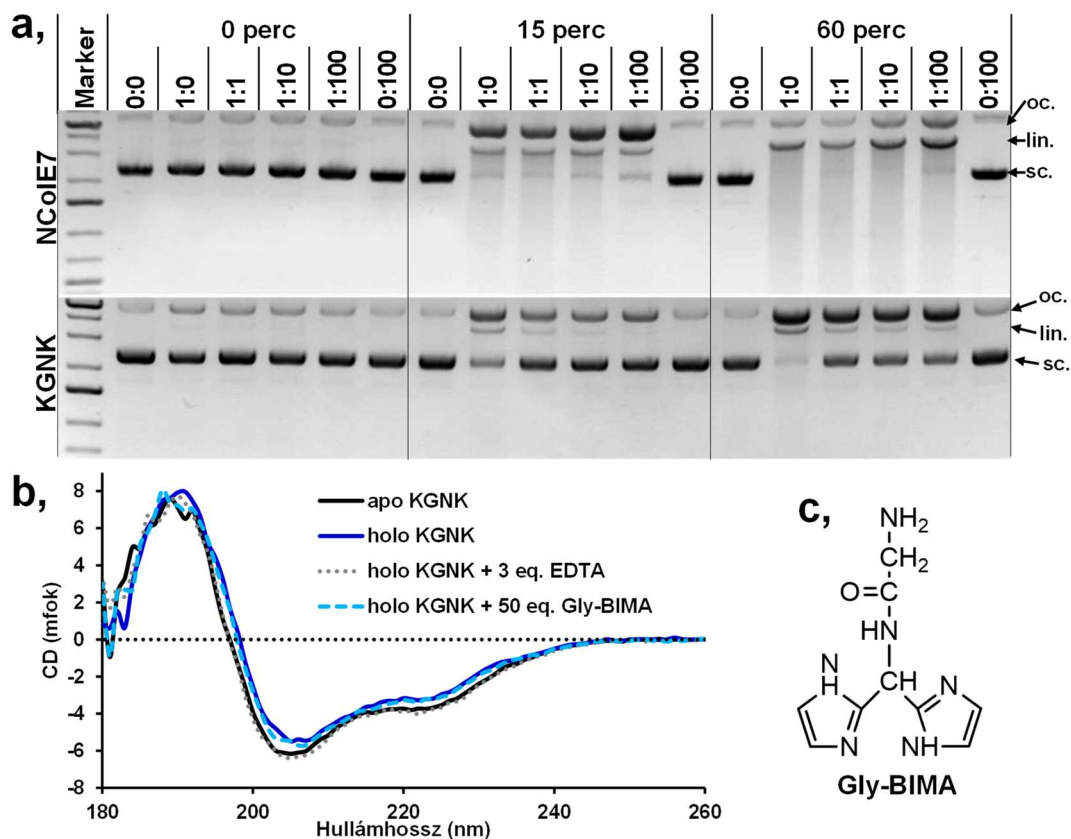
45. ábra: **a,** mesterséges metallonukleázt kódoló DNS hordozó preparálása fehérjekifejezés előtt és után 1 (m/V)% agaróz gélen vizsgálva. N: C45-ZF-N85 mesterséges metallonukleáz túltermeltetése, N-aff: pET-21a*SRHS-6×His hordozóba épített C45-ZF#-N85-SRHS-6×His fehérje túltermeltetése. **b,** KGNK fehérje nukleáz aktivitás vizsgálata Ni(II)-indukált peptidhidrolízis előtt és az affinitástoldalék lehasítását követően. KGNK-aff: toldalékkal ellátott KGNK-SRHS-6×His fehérje. Sc.: szuperhelikális, Oc.: nyílt cirkuláris, lin.: lineáris formájú bakteriális DNS hordozó. Frag.: fragmentálódott DNS

In vitro DNS hasítási kísérleteket hajtottunk végre a KGNK-SRHS-6×His fehérjével. A fehérjetisztítást követően a fehérje egy részletéről lehasítottuk az affinitástoldalékot, míg egy másik részletével változatlanul dolgoztunk tovább. A két fehérjeverzió aktivitása között jelentős eltérés mutatkozott, affinitástoldalék hiányában a nukleáz már a minta összeállítását követően „0 órás minta” teljes mértékben átalakította a szuperhelikális kiindulási DNS-t, és a nyílt cirkuláris és lineáris forma mellett a fragmentáció is látható (**45. ábra b,**). Két óra elteltével a fragmensek döntő hányada 100-200 bp hosszúságú, míg az affinitástoldalékkal ellátott KGNK-SRHS-6×His csak egy és kétszálú hasításokat idézett elő, kismértékű fragmentáció mellett.

5.5.3 Az affinitástoldalék szerepének vizsgálata

Az NColE7-alapú nukleázok funkciójukat csak Zn(II)-jelenlétében képesek betölteni, ahol a fehérje ún. HNH motívumának három hisztidinje (H544, H569, H573) koordinálódik a fémionhoz, míg annak negyedik szabad helyén egy vízmolekula található. Ennek a vízmolekulának a helyére kötődhet be a DNS vagy RNS molekula foszfodiészter csoportja [164,169]. Azonban, ha a vízmolekula helyére egy további hisztidin koordinálódik, az meggátolhatja a szubsztrát megkötését és a foszfodiészter kötés hidrolízisét. Több imidazolcsoportot tartalmazó ligandumokkal tanulmányoztuk, hogy a C-terminális affinitástoldalékban található hisztidinek koordinatív effektusa lehet-e felelős a jelentős mértékű gátló hatásért. A három hisztidin aminosavat tartalmazó Ac-Lys-His-Pro-His-Pro-His-Gln-NH₂ heptapeptid (továbbiakban KQ [249]) nem tudott kimutatható gátló hatást kifejteni az NColE7 nukleázra. Az már 15 percet követően <100 bp hosszúságú

fragmensekre szabdalta a körkörös kiindulási DNS-t (**F17. ábra**). A KGNK fehérjét – aminek aktivitása önmagában legalább tízszer kisebb, mint az NCoIE7 enzimé – azonban sikerült már 1:1 arányban jelentősen gátolnia, mivel egy órát követően is még látható lineáris DNS. Ezzel szemben a KQ peptid hiányában a KGNK is 1000 bp-nál kisebb fragmensekre darabolta a kiindulási DNS-t (**F17. ábra**).



46. ábra: a, NCoIE7 és KGNK nukleáz aktivitása növekvő mennyiségű imidazoltartalmú ligandum (Gly-BIMA) jelenlétében 1 (m/V)% agaróz gélen vizsgálva. b, apo és holo KGNK fehérje CD spektruma EDTA és Gly-BIMA jelenlétében. c, Gly-BIMA ligandum szerkezeti képlete [255].

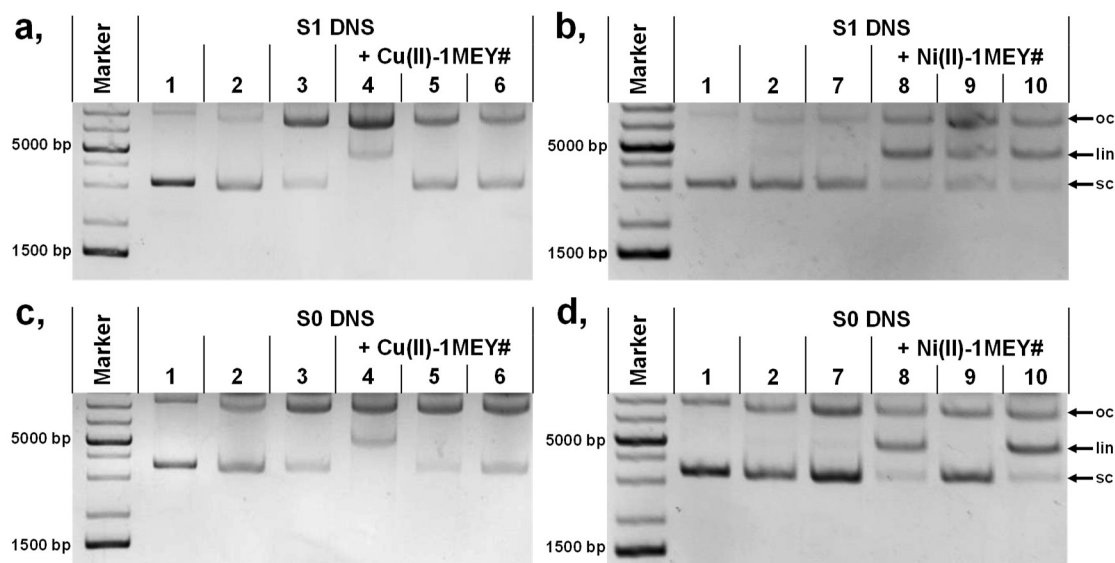
A kísérleteinket egy egyszerűbb bisz-imidazol (továbbiakban Gly-BIMA) peptiddel is megismételtük, amely szintén képes két imidazol gyűrűjének nitrogénjeivel kelátgyűrűt kialakítani Zn(II)-vel (**46. ábra b**). A ligandumot Dr. Várnagy Katalin bocsájtotta rendelkezésünkre [250]. A KQ peptiddel végzett kísérletekhez képest egy nagyságrenddel kisebb fehérjekoncentrációt és nagyobb kelátorfelesleget alkalmazva sikerült kimutatnunk az NCoIE7 enzim részleges gátlását is. Egy órát követően a holo NCoIE7 esetén a szuperhelikális DNS sávja teljesen eltűnt, a nyílt cirkuláris sáv halványan látszódott, míg jelentős fragmentáció is megfigyelhető volt (**46. ábra a**). Ezzel szemben 100× Gly-BIMA felesleget alkalmazva a lineáris és cirkuláris sáv is jóval intenzívebb maradt, míg a fragmentációhoz rendelhető sáv kevésbé elmosódott a kisebb tömegtartományok felé. A

KGNK fehérje esetében még nagyobb mértékű gátlást tapasztaltunk. Itt 1:1 aránynál még a kiindulási szuperhelikális DNS sávja is intenzíven látszódott, míg a Gly-BIMA ligandum hiányában ez teljesen eltűnt és intenzív lineáris sáv jelent meg (**46. ábra a.**).

Sikerült tehát kimutatnunk hasonló gátló effektust a fehérjeszekvenciához nem kapcsolódó imidazoltartalmú ligandumokkal is, mint a hexahisztidin toldalék esetén. A gátló hatás kétféleképpen következhet be: a ligandum imidazol nitrogénjének koordinációja révén a katalitikus Zn(II) negyedik koordinációs helyére, vagy oly módon, hogy a ligandum imidazol nitrogénjei elvonják a Zn(II)-t a katalitikus központ három hisztidinjétől. Ismerve az NCoIE7, KGNK, KQ és Gly-BIMA Zn(II)-affinitását utóbbi eset nem valószínű, ám a feltételezést mindenképpen bizonyítani akartuk. Erre az adott lehetőséget, hogy a korábbi kutatásaink során sikerült igazolnunk, hogy az NCoIE7-alapú nukleázok esetén a katalitikus Zn(II) bekötődése reprodukálhatóan 2 nm-rel eltolja a fehérje CD spektrumának X-tengely metszetét a nagyobb hullámhosszok irányába [169]. Mindemellett a Gly-BIMA ligandum akirális, azaz nincs saját CD spektruma, ami egyszerűsíti a rendszer megértését/kiértékelését. Megfigyelhető volt, hogy a holo és az apo KGNK CD spektrumának 197 nm környékén mérhető x tengelymetszete között valóban ~2 nm a különbség (**46. ábra c.**). EDTA hatására megkaptuk az apofehérjére jellemző CD spektrumot, míg 50× feleslegben alkalmazva a Gly-BIMA ligandumot, a CD spektrum a zajtól eltekintve megegyezik a holo fehérje jelével. Így igazoltuk, hogy valóban a hisztidinek koordinálódnak a Zn(II) negyedik szabad helyére ternerkomplexet képezve, és nem távolítják el a fémiont a katalitikus centrumból.

5.6 Alkalmazás: metallonukleáz kialakítása

A specifikus mesterséges nukleázok kialakításának legelterjedtebb stratégiája szerint egy nem specifikus DNS-hasító egységet (pl. ATCUN motívum) egy specifikus DNS felismerő egységgel kapcsolnak össze (pl. cinkujj fehérje). Ennek mintájára egy S/TXH aminosavszekvenciát tartalmazó cinkujj fehérje Ni(II)-indukált szelektív peptidhidrolízise révén eljuthatunk egy ilyen potenciális DNS-hasító enzimhez. Azt követően, hogy igazoltuk, megvalósítható az ATCUN motívumot hordozó 1MEY# előállítás (ld. **5.1.2 fejezet**), a fehérje specifikusan felismeri DNS célszekvenciáját (ld. **5.2.2 fejezet**), továbbá a Ni(II)- és Cu(II)-komplexének kialakítása is lehetséges (ld. **5.1.4 fejezet**), tanulmányoztuk a rendszer esetleges DNS-roncsoló tulajdonságait bakteriális DNS hordozót felhasználva (**47. ábra**).



47. ábra: DNS hasítási kísérlet **a**, specifikus DNS + Cu(II)-1MEY#; **b**, specifikus DNS + Ni(II)-1MEY#; **c**, nemspecifikus DNS + Cu(II)-1MEY#; **d**, nemspecifikus DNS + Ni(II)-1MEY# jelenlétében 1 (m/V)% agaróz gélen vizsgálva. A mintákat 1 (m/V)% SDS-sel kezeltük a futtatást megelőzően. S1 DNS: 1MEYpGEX DNS hordozó; S0 DNS: pET21a DNS hordozó; $c(\text{DNS}) = 4 \text{ nM}$; 2 mM HEPES (pH 8,2); 30 mM NaCl; 72 h; 37 °C; (1) nincs inkubálás (2) DNS; (3) +100 μM L-aszorbinsav; (4) +0,8 μM Cu(II)-1MEY# + 100 μM L-aszorbinsav; (5) 0,08 μM Cu(II)-1MEY# + 100 μM L-aszorbinsav; (6) +0,8 μM Cu(II)-1MEY#; (7) +100 μM H₂O₂; (8) +0,8 μM Ni(II)-1MEY# + 100 μM H₂O₂; (9) +0,08 μM Ni(II)-1MEY# + 100 μM H₂O₂; (10) +0,8 μM Ni(II)-1MEY#. sc.: szuperhelikális, oc.: nyílt cirkuláris, lin.: lineáris formájú bakterióális DNS hordozó. Marker: 1 kb Gene Ruler Plus

A háromnapos inkubációt követően a reakcióelegyet 1 (m/V)% agaróz gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk meg. A kiindulási körkörös DNS hordozó főként szuperhelikális formában volt jelen (sc), így gyorsan tudott előrehaladni a gél pórusaiban elektromos erőterben (**47. ábra 1, 2 oszlopok**) (ld. **4.3.1 fejezet**). A mintában emellett kisebb intenzitású sávok is láthatók voltak 5000 bp felett, amelyek a nyílt cirkuláris formához rendelhetők. Amennyiben a DNS hasítás során a szakirodalom alapján szükséges aszorbinsav, vagy H₂O₂ segédreagenseket is tartalmazta a rendszer, a nyílt cirkuláris DNS aránya megnövekedett (**47. ábra 3, 7 oszlopok**). Az 1MEY# Cu(II)- és Ni(II)-komplexével sikerült DNS-hasítást kimutatnunk, mivel a DNS-ek kiindulási szuperhelikális formája (sc) az enzim hatására fokozatosan nyílt cirkuláris (oc), majd esetenként lineáris formába (lin) alakult, ami 5000 bp környékén jelent meg a gélképeken (**47. ábra 4, 8, 9, 10 oszlopok**). A reakció azonban meglehetősen lassúnak bizonyult, mivel 72 órán keresztül kellett inkubálni a rendszert, emellett nagy (200×) fehérjefeleslegre volt szükség, ebből adódóan nem kifejezetten volt látható eltérés a fehérje viselkedésében specifikus (**47. ábra a, b**) és nemspecifikus (**47. ábra c, d**) DNS-szel szemben. Ezzel szemben a szakirodalomban bemutatott Ni(II)-GGH-Spl cinkujj fehérje komplexet alkalmazva 30 percet követően sikerült specifikus hasítást detektálni. Fontos azonban kiemelni, hogy radioaktívan jelzett

DNS-t alkalmaztak és a kísérlet nem adott információt arra vonatkozóan, hogy a kiindulási termék hány százaléka alakult át, továbbá arról sem, hogy a detektált specifikus hasítás mellett bekövetkezett-e nonspecifikus roncsolás [181]. Az ATCUN motívum DNS hasítása összetett folyamat (**Id. 2.2.2 fejezet**) és a reakció sebessége függ az ionerősségtől és a pH-tól is [126]. Mindemellett a redukáló és oxidálószer, mint segédreagensek alkalmazása miatt, amennyiben nyomnyi mennyiségű szabad vegyértékváltó fémszennyezés van a rendszerben (pl.: Fe(II)/Fe(III)), az fals pozitív eredményt adhat, így ezeket a kísérleteket nagy körültekintéssel kell értelmezni [251]. Annak érdekében, hogy jobban detektálhatóvá váljanak a specifikus DNS-hasítások, olyan pUC19 DNS hordozókat terveztünk és állítottunk elő rekombináns DNS technológia segítségével, amelyekbe több 1MEY# fehérje felismerési helyet (5'-GAGGCAGAA-3') építettünk be egymással átellenesen. Ily módon egy homodimer fehérjéhez hasonlóan funkcionálhat az 1MEY# Ni(II)-, vagy Cu(II)-komplexe, és az egymással szemben bekövetkező egyszálú hasítások a körkörös DNS hordozó linearizálódását eredményezhetik (**F18. ábra**).

5.6.1 A linker szakasz módosítása az ATCUN motívum és a cinkujj fehérje között

Az előző fejezet végén felvezetett új DNS hordozók csak a DNS hasítások érzékenyebb detektálására adhatnak lehetőséget. Emellett megkíséreltük oly módon áttervezni az 1MEY# cinkujj fehérjét, hogy annak növekedjen a DNS-hasítási aktivitása, specifitása. A szakirodalomban fellelhető GGH-Sp1 cinkujj fehérje szekvenciáját tanulmányozva módosítottuk az 1MEY# cinkujj fehérjében az N-terminális ATCUN motívum és a cinkujj alegységek között található összekötő (linker) szakasz hosszát, illetve az aminosavösszetételét. A **8. táblázat** alapján látható, hogy az 1MEY# fehérjében 5 aminosavval hosszabb a linkerszakasz az ATCUN motívum és az első cinkujj fehérje ciszteinje között. Így az 1MEY#.2 fehérjeverzióban lerövidítettük a linkerszakaszt. Ezzel együtt, további rövidebb linkereket tartalmazó fehérjéket is terveztünk.

A GGH-Sp1 fehérjében a linker szakaszon belül három pozitív töltésű oldallánccal rendelkező lizin fordul elő, ami elősegítheti, hogy közelebb kerüljön az ATCUN motívum a DNS szálhoz, így bekövetkezzen a hasítás. Ezzel szemben az 1MEY# fehérje linker szakaszában három glutaminsav is található, melyek karboxilcsoportjai negatív töltésükkel taszítják a DNS-t. Ebből kifolyólag terveztünk olyan 1MEY# verziókat is, ahol a glutaminsavak helyett lizineket építettünk be, illetve az ATCUN motívumba egy szintén pozitív oldallánccal rendelkező arginint.

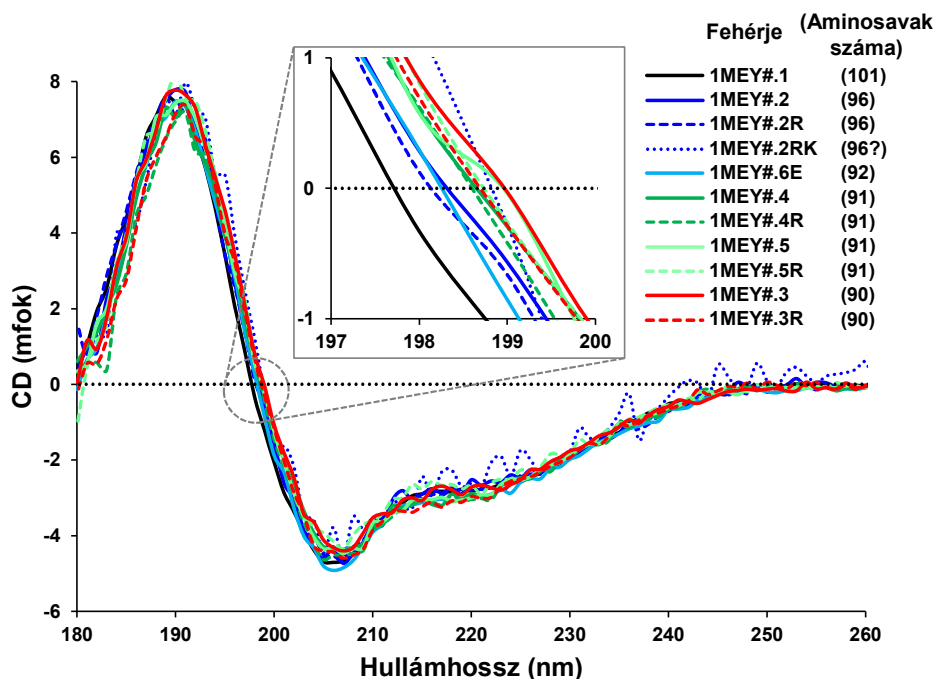
A fehérjék génjeit a pETM11-SUMO3-1MEY# körkörös DNS-ből kiindulva állítottuk elő (**ld. F1.7 fejezet**), majd a His-SUMO-1MEY# fehérjével analóg módon (**ld. F1.2 fejezet**) történt a fehérjék tisztítása Ni-NTA gyantát alkalmazva. A His-SUMO toldalékot ULP1 proteázzal hasítottuk le, és Tricin-SDS-PAGE gélelektroforézis alapján minden fehérje tisztítása sikeres volt, a géleken egy jól meghatározott sáv volt látható megfelelő tömegtartományban (**F19. ábra h.**). A hasítást követően az affinitástoldalék, illetve egyes esetekben az el nem hidrolizált kiindulási fehérje is a gyantához kötve maradt (**F19. ábra i.**).

8. táblázat: A GGH-Sp1 [181], az 1MEY# és a megtervezett 1MEY# verziók N-terminális régiójának, illetve az első cinkujj alegységének összehasonlítása. A linker szakaszt aláhúzás jelöli, a pozitív töltésű oldallánccal rendelkező aminosavakat pirossal, a negatívakat kékkel jelöltük. A Zn(II)-hez koordinálódó ciszteinek sárga, a hisztidinek világoskék háttérűek.

Név	Hossz		Szekvencia
	Fehérje	Linker	
GGH-Sp1		10	GGHGD PKKKQ HI CHI Q CG KVY GKTS HLRAHLRWHTGERPFM...
1MEY#	101	15	SGH IEGR H MLE PG EKPYK C PE --CGKSFSQSSNLQKHQ RTHT GEKPYK...
1MEY#.2	96	10	SGH ILE PG EKPYK C PE --CGKSFSQSSNLQKHQ RTHT GEKPYK...
1MEY#.2R	96	10	SRH ILE PG EKPYK C PE --CGKSFSQSSNLQKHQ RTHT GEKPYK...
1MEY#.2RK	96	10	SRH ILK PG EKPYK C PE --CGKSFSQSSNLQKHQ RTHT GEKPYK...
1MEY#.3	90	4	SGH KPYK C PE --CGKSFSQSSNLQKHQ RTHT GEKPYK...
1MEY#.3R	90	4	SRH KPYK C PE --CGKSFSQSSNLQKHQ RTHT GEKPYK...
1MEY#.4	91	5	SGH KKPYK C PE --CGKSFSQSSNLQKHQ RTHT GEKPYK...
1MEY#.4R	91	5	SRH KKPYK C PE --CGKSFSQSSNLQKHQ RTHT GEKPYK...
1MEY#.5	91	5	SGH EKPYK C PE --CGKSFSQSSNLQKHQ RTHT GEKPYK...
1MEY#.5R	91	5	SRH EKPYK C PE --CGKSFSQSSNLQKHQ RTHT GEKPYK...
1MEY#.6E	92	6	SGH GEKPYK C PE --CGKSFSQSSNLQKHQ RTHT GEKPYK...

A módosított fehérjék CD spektrumait összehasonlítva a kiindulási 1MEY# fehérje spektrumával nagymértékű hasonlóságot láthatunk. Ez alapján feltehetően minden fehérje három Zn(II)-t tartalmazott és ezzel együtt felvette a megfelelő $\beta\beta$ másodlagos szerkezetet (**48. ábra**). A 197-201 nm hullámhossztartományt közelebbről megvizsgálva, a spektrumok X-tengelymetszete minden módosított fehérje esetén a nagyobb hullámhosszak felé tolódott el. Mindezekon felül, összefüggés figyelhető meg a tengelymetszet és a fehérjék hossza között. Ez azzal magyarázható, hogy minél rövidebb az N-terminális végen elhelyezkedő rendezetlen szerkezetű szakasz, annál nagyobb mértékű a Cys₂His₂ cinkujj alegységek hozzájárulása a fehérjék CD spektrumához. A szakirodalmi adatok alapján a tisztán α -helikális szerkezetű fehérjék CD spektruma ~200 nm környékén, míg a β -redős fehérjék ~205 nm környékén metszik az X-tengelyt, ezzel szemben a rendezetlen fehérjeszerkezet a

kisebb hullámhosszak felé tolja el azt (**ld. 4.4.2 fejezet**). A tendenciától csupán az 1MEY#.2RK fehérje tért el, ám amint a **48. ábrán** is látható, ez a spektrum kifejezetten zajos, a ténylegesen megmért fehérje koncentrációja ~6 μM volt. A fehérje CD spektrumokat megkíséreltük kiértékelni a BeStSel program segítségével is, hogy alátámaszthassuk az X-tengelymetszetek alapján tett megállapításainkat. Azonban mivel a program még a legjobb illesztés esetén is 44% nem hozzárendelhető szerkezeti elemmel számol, így az arányokban megfigyelhető apró változásokat nem tudtuk egyértelműen meghatározni (**F6. táblázat**).



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

A CD mérés eredményeit az ESI-MS mérések is alátámasztották a legtöbb esetben. A fehérjék három Zn(II)-t és egy Ni(II)-t kötöttek meg és a holo-fehérjék molekulatömegei jó egyezést mutattak az elméleti értékekkel (**9. táblázat**). A fémmentes fehérjék molekulatömegei egy-két esetben 0,5-2 Da-nal kisebbek voltak a várt értéknél, ami ciszteinek oxidációjára utalna a kiindulási fehérjében, azonban ennek ellentmond, hogy ugyanezeknek a fehérjéknek a Zn(II)-kötött formáiban teljes egyezést tapasztaltunk. A látszólagos ellentmondásra magyarázat lehet, hogy a mérést chip-alapú TriVersa NanoMate (Advion) ESI-MS ionizációs feltét segítségével hajtottuk végre, és a 0,1 (V/V)% hangyasavat tartalmazó (apo) mintákat egyszerre állítottuk össze a mérést megelőzően. Mivel a Zn(II)-t eltávolítottuk, a szabad ciszteinek idővel oxidálódhattak, ezért láthatók

szisztematikus tömegeltérések a később sorra kerülő apofehérje mintákban. Zn(II)-jelenlétében fehérjék ciszteinjeit védte a fémion az oxidációtól, így az utolsóként sorra kerülő holo fehérje minták továbbra is épek maradtak.

9. táblázat: A módosított IMEY# fehérjék molekulatömegei ESI-MS mérés alapján 8 mM ABC (pH 7,8)

	Apo fehérje		Holo fehérje (3 Zn(II) 1 Ni(II))	
	Szimulált (Da)	Mért (Da)	Szimulált (Da)	Mért (Da)
IMEY#.2	10875,26	10875,32	11122,92 ^c	11121,98 ^c
IMEY#.2R	10974,34	10974,41	11222,00	11222,04
IMEY#.2RK	10973,40	10970,41 ^a	11220,05 ^a	11218,12 ^a
IMEY#.3	10236,94 ^c	10235,99 ^c	10483,59	10483,66
IMEY#.3R	10336,01	10336,05	10582,67	10582,72
IMEY#.4	10365,03	10359,07 ^a	10611,68	10611,74
IMEY#.4R	10464,11 ^c	10463,19 ^c	10710,76	10710,83
IMEY#.5	10365,98 ^b	10364,01 ^b	10612,63	10612,68
IMEY#.5R	10465,06 ^b	10463,10 ^b	10711,71	10711,79
IMEY#.6E	10423,00 ^c	10422,02 ^c	10669,65	10669,72

^a 2 Da-nál nagyobb eltérés

^b 1-2 Da közötti eltérés

^c 0,5-1 Da közötti eltérés

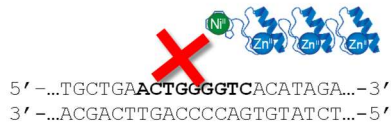
Ismét kivételt jelentett az IMEY#.2RK fehérje, aminek sem apo-, sem holo fehérje mért molekulatömege nem egyezik a várt értékkel (**9. táblázat**). Az apofehérje molekulatömege három Da-nal kisebb a vártnál, azonban az eltérést nem okozhatja a ciszteinek részleges oxidációja, mivel a holo fehérjében három Zn(II)- jelenléte detektálható. A helyzetet tovább bonyolítja, hogy a holo fehérje mérésénél 2 csúcs is megjelent egymástól 6 Da távolságra (11224,11 Da és 11218,12 Da). Megkíséreltük fragmentálni az apofehérjét, hogy azonosíthassuk az eltérés okát. Ütközés indukált disszociációs technikával (CID) azonosítottuk a fehérje 10 aminosavból álló N-terminális fragmensét, és egy C-terminális 26 aminosavból felépülő fragmenst is, amelyek molekulatömegei megegyeztek az elméleti értékkel (**F20. ábra**). Ebből látszólag arra lehetett volna következtetni, hogy a fehérje középrégiójában fordult elő valamilyen módosulás, annak ellenére, hogy a fehérje génjének szekvenciája jónak bizonyult, így ezt az IMEY# verziót a későbbiekben újra elő kell állítani és alaposabban megvizsgálni.

5.6.2 *In vitro* nukleáz aktivitási vizsgálat

Mivel az IMEY#.2RK kivételével a többi fehérjét SDS-PAGE, CD és ESI-MS alapján is sikeresen előállítottuk, ezek Ni(II)-komplexeivel megkezdhetjük a nukleáz aktivitási kísérleteket (10 fehérje). A korábbi IMEY# fehérjével végzett vizsgálatokhoz képest növeltük a DNS koncentrációt, hogy a fehérjék ne legyenek extrém feleslegben a DNS-hez képest. Annak érdekében, hogy jobban detektálhatóvá váljon a DNS hasítás, több

felismerési helyet tartalmazó DNS molekulákat is felhasználtunk kísérleteinkben (F18. ábra).

S0



	1	2	2R	3	3R	4	4R	5	5R	6E
Δ oc	23%	24%	25%	17%	12%	18%	12%	23%	12%	-60%
Δ lin	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Δ sc	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

S1



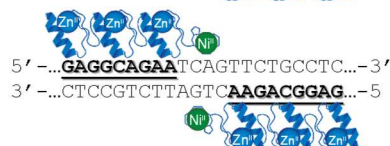
	1	2	2R	3	3R	4	4R	5	5R	6E
Δ oc	-9%	-3%	-12%	18%	3%	-3%	5%	4%	-15%	4%
Δ lin	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Δ sc	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

N0



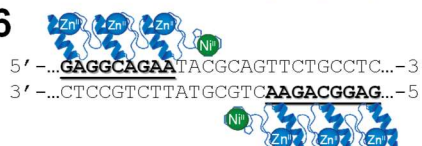
	1	2	2R	3	3R	4	4R	5	5R	6E
Δ oc	4%	5%	3%	19%	37%	28%	41%	36%	-1%	4%
Δ lin	0%	0%	0%	0%	7%	6%	9%	8%	0%	0%
Δ sc	-4%	-5%	-2%	-23%	-42%	-33%	-48%	-43%	1%	-4%

N3



	1	2	2R	3	3R	4	4R	5	5R	6E
Δ oc	-9%	-7%	-13%	-12%	22%	14%	25%	22%	-11%	-11%
Δ lin	0%	0%	0%	0%	3%	2%	5%	5%	0%	0%
Δ sc	0%	0%	0%	0%	-26%	-17%	-31%	-28%	0%	0%

N6



	1	2	2R	3	3R	4	4R	5	5R	6E
Δ oc	-9%	1%	-13%	2%	6%	1%	-67%	5%	6%	14%
Δ lin	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Δ sc	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

49. ábra: Nukleáz aktivitási teszt különböző 1MEY# verziók Ni(II)-komplexeivel. **S0:** nulla, **S1:** egy, **N0, N3, N6:** két felismerési helyet tartalmazó pUC-19 DNS. A két felismerési hely között **N0,** nulla; **N3,** négy; **N6,** hét bázispárnyi távolság van amint azt a sematikus ábrák is bemutatják. $c(\text{DNA}) = 0,05 \mu\text{M}$; $c(\text{1MEY# fehérje variáns}) = 0,1 \mu\text{M}$; $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 50 \mu\text{M}$; 10 mM HEPES (pH 8,2); 150 mM NaCl; 48 h; 37 °C; a fehérje-DNS elegyeket 1 (m/v)% agaróz gélen vizsgáltuk, a sávintenzitásokat ImageJ program segítségével kvantifikáltuk. Az ábrán az egyes DNS formák arányában bekövetkező változást jelöltük a nulla órás mintához képest százalékos formában. Δ oc: nyílt cirkuláris DNS, Δ lin: lineáris DNS, Δ sc: szuperhelikális DNS. Minél sötétebb kék, illetve zöld egy érték hátere, az adott fehérje annál nagyobb mértékben volt képes elhasítani a vizsgált DNS-t.

A nagy mintaszámból adódóan a gélképek bemutatása nem lenne átlátható, így a **49. ábra** a gélen megjelenő DNS sávok intenzitásának változását mutatja be számszerűsítve a 0 órás mintához viszonyítva. DNS hasítás esetén a szuperhelikális DNS-hez tartozó sáv arányának csökkenése és a nyílt cirkuláris és lineáris DNS formák arányának növekedése figyelhető meg. Ilyen jelenségeket az 1MEY#.3, .3R, .4, .4R és .5 fehérjevariánsok esetén láthatunk leginkább a pUC-19-N0, valamint -N3 DNS hordozókat alkalmazva, azonban az adatok között igen nagy az eltérés. Ezeket az eredményeket még további mérésekkel kell alátámasztani. A jövőben további körülményeket is meg kell vizsgálni. Amennyiben a megfigyelésünk valóban ezen 1MEY# variánsok specifikus DNS hasításához rendelhető, akkor a DNS hasításhoz a legrövidebb és több pozitív aminosav oldalláncot tartalmazó linkerszakaszok a legkedvezőbbek.

6 Összefoglalás

Doktori munkám során a Ni(II)-indukált peptidhidrolízist és annak alkalmazási lehetőségeit tanulmányoztam főként cinkujj fehérjét felhasználva, valamint jellemeztem a kialakult termékek oldatkémiai sajátosságait.

Sikeresen előállítottunk olyan DNS-hordozókat, amelyek tartalmazták egy 3 alegységből felépülő cinkujj fehérje, dekahisztidin-, vagy hexahisztidin-SUMO toldalékkal ellátott génjét, majd olyan fehérjetisztítási módszert optimalizáltunk, amivel előállítható a tiszta célfehérje. SDS-PAGE vizsgálatok segítségével megállapítottuk, hogy az (S/T)XH szekvenciát tartalmazó 1MEY# fehérje Ni(II)-indukált peptidhidrolízis révén szelektíven és kvantitatíve elhasítható az (S/T) aminosavat megelőző peptidkötés mentén 3 nap alatt, 50 °C-on (pH 8,2). A reakció végtermékeként kapott Ni(II)-1MEY# fehérje teljes mértékben azonos volt a hagyományos fehérjetisztítási módszer segítségével tisztított, majd ULP1 proteázzal elhasított fehérjével. ESI-MS mérések alapján igazoltuk, hogy a reakciótermék mindkét esetben három Zn(II)-t és egy Ni(II)-t tartalmaz, és másodlagos szerkezete CD mérések alapján rendezett volt. UV-Vis abszorbancia és ESI-MS mérésekkel megállapítottuk, hogy a Ni(II)-ATCUN komplex kinetikai inertségének köszönhetően nem befolyásolta a fehérje cinkujj alegységeinek tanulmányozását, továbbá a Ni(II) 10× feleslegben sem tudott versengeni a Zn(II)-vel a cinkujj kötőhelyekért. Ezzel szemben Cu(II) felesleg jelenlétében a cinkujj fehérjék szerkezete összeomlott, a fehérje fokozatosan aggregálódott, így a cinkujj fehérje Cu(II)-indukált szelektív peptid hidrolízise nem valósítható meg. Vizsgálataink alapján amennyiben a fehérje N-terminális végén az ATCUN motívum szabadon volt miközben a cinkujj alegységek telítettek voltak Zn(II)-vel, a Cu(II) elsőként az ATCUN motívumhoz koordinálódott, és csak Cu(II) felesleg alkalmazása esetében kezdődött meg a fehérje szerkezetének fokozatos összeomlása.

Kompetíciós ITC és CD titrálások alapján megállapítottuk, hogy az 1MEY# cinkujj fehérje cinkujj alegységeinek Zn(II)-affinitása és a Zn(II)-kötésre jellemző entalpiája hasonló a fehérje alapjául szolgáló CP1 modellpeptid értékeihez. Ez azt sugallta, hogy a kötőhelyek összekapcsolása nem befolyásolta jelentősen a viselkedésüket, azok egymástól függetlennek tekinthetők. Hasonló kvantitatív összehasonlító vizsgálat korábban nem állt rendelkezésre a szakirodalomban. Gélelektroforézis sáveltolódás és fluoreszcencia anizotrópia vizsgálatok alapján az 1MEY# cinkujj fehérje nM-os K_d -val tudta felismerni DNS célszekvenciáját és 2 nagyságrend különbség volt a specifikus és nonspecifikus, de guaninban gazdag szekvenciák felismerésében. Továbbá igazoltuk, hogy a fehérje DNS-

kötése termodinamikailag stabilizálta a Zn(II)-kötést is. A DNS célszekvencia jelenlétében a fehérje látszólagos Zn(II)-affinitása 3,4 nagyságrenddel növekedett. Ez a megfigyelés magyarázatot adhat rá, hogyan képesek egyes Zn(II)-t kis affinitással kötő természetes cinkujj fehérjék is kifejteni funkciójukat a szervezetben.

A cinkujj fehérjék és toxikus fémionok kölcsönhatása terén számos ellentmondás található a szakirodalomban. Elsőként igazoltuk, hogy az Ag(I) képes meggátolni egy cinkujj fehérje DNS-felismerését, és Cys₂His₂ cinkujj fehérjék esetében 2 Ag(I) képes egy Zn(II) kiszorítására a cinkujj kötőhelyről. Emellett kimutattuk, hogy további Ag(I) is képes koordinálódni a fehérjéhez, ám ezek pontos szerkezete nehezen meghatározható. Egyértelműen igazoltuk, hogy nagy stabilitású cinkujj fehérjékben a Cd(II) a Zn(II)-hez hasonlóan képes koordinálódni a Cys₂His₂ kötőhelyekhez 1-2 nagyságrenddel kisebb affinitással. A kialakult komplex szerkezete nagyban hasonlított a Zn(II)-komplexéhez, és szintén képes volt specifikusan felismerni a fehérje eredeti DNS célszekvenciáját, de ~0,6 nagyságrenddel csökkent affinitással. A Hg(II) kloridion-mentes közegben legalább 4 nagyságrenddel erősebben tudott koordinálódni a cinkujj alegységekhez, mint Zn(II), rendezetlen fehérjeszerkezetet kialakítva. Így a fehérje a továbbiakban nem volt képes DNS célszekvenciájához kötődni. Az 1MEY# fehérje akár 12-nél is több Hg(II) megkötésére is képes volt Hg(II) feleslegben. A fémionok pontos koordinációja nem ismert, de fluorimetriásan követett kompetíciós mérések alapján mindegyik fémion legalább ~nM-os K_d-val koordinálódott a fehérjéhez.

A fehérjék tisztítása gyakran affinitástoldalékok segítségével történik, azonban ezek módosíthatják a natív fehérje funkcióját. Így a tisztítást követően sok esetben el kell távolítani a toldalékokat. Korábban erre csak proteázok segítségével volt lehetőség, azonban ezek előállítás, tisztítása, időigényes és költséges. Sikerült olyan DNS hordozót terveznünk, amelybe egy fehérje génjét beépítve az egy N-terminális hisztidintoldalékkal fejeződött ki. Bemutattuk, hogy tisztítást követően ez a toldalék eltávolítható Ni(II)-indukált szelektív peptidhidrolízis révén mind oldatban, mind Ni-NTA gyantán. CD és ESI-MS mérések alapján a hidrolitikus reakció N-terminális fragmense maga a natív fehérje, így bizonyítottuk, hogy drága és körülményes proteázok helyett Ni(II)-ionokat alkalmazva is megvalósítható egy natív szekvenciájú fehérje előállítása és tisztítása.

Egyes enzimek aktivitását jelentősen gátolhatja, amennyiben a natív fehérjeszekvenciához további peptidrészlet kapcsolódik. Az NCoIE7 nukleáz módosított verzióinak tanulmányozása során azt tapasztaltuk, hogy ezeknek a rendkívül toxikus

enzimeknek az előállítása az általunk kifejlesztett fehérjeelőállítási és tisztítási módszerrel lehetségessé vált, holott a tooldalék hiányában a fehérje génjét bejuttatva egy sejtbe az azonnal elpusztult. A gátolt aktivitású enzimet Ni(II)-indukált szelektív hidrolízis révén újra lehetett aktiválni, ami a nukleázok szabályozását tette lehetővé. Nukleáz aktivitási és CD mérésekkel igazoltuk, hogy az effektusért nem teljes mértékben allosztérikus hatások felelősek. A hisztidintoldalék az enzim aktív centrumában lévő Zn(II) szabad koordinációs helyéhez kötött.

A His-1MEY# cinkujj fehérje Ni(II)-indukált szelektív peptid hidrolízise során sikerült előállítani a Ni(II)-1MEY# komplexet, majd ebben utólag megvalósítható volt a Ni(II) cseréje Cu(II)-re. Az így előállított cinkujj-ATCUN fúziós fehérjék képesek voltak DNS hasítást előidézni körkörös DNS hordozókban, azonban a reakció aktivitása és specifitása mérsékelt volt. Új körkörös DNS-hordozókat terveztünk, melyek segítségével könnyebben tudtuk detektálni a specifikus hasításokat, továbbá újraterveztük az 1MEY# fehérjét, annak reményében, hogy javítsuk az enzim aktivitását és specifitását. A módosítás során az ATCUN motívum és a cinkujj alegységek közötti linker szakasz hosszát és aminosav-összetételét módosítottuk. 9 fehérje Ni(II)-komplexét sikerrel előállítottuk és kitisztítottuk. Azok szerkezete, mérete és fémtartalma SDS-PAGE, ESI-MS és CD mérések alapján a vártak megfelelő volt. Az előzetes mérések alapján a rövidebb linkerszakaszokat és a több pozitív töltésű oldalláncot tartalmazó fehérjék aktivitása volt a legnagyobb. A közeljövőben ezek a fehérjék további vizsgálatra szorulnak, emellett tanulmányozni kívánjuk a Cu(II)-komplexek viselkedését is eltérő körülmények között (ionerősség, pH). Távlati terveink között szerepel, a nukleázok működésének sejten belüli tanulmányozása is.

7 Summary

During my doctoral work, I investigated the Ni(II)-induced peptide bond hydrolysis using zinc finger and other proteins and its possible applications. The solution chemical properties of the formed products were also characterized.

We successfully established DNA molecules containing the gene of a 3-subunit zinc finger protein with a decahistidine or hexahistidine-SUMO tag, and then optimized a protein purification method that can be used to produce the pure target protein. By SDS-PAGE experiments, we determined that the protein containing the (S/T)XH sequence can be selectively cleaved before the (S/T) amino acid by Ni(II)-induced peptide bond hydrolysis in 3 days at 50 °C (pH 8.2). The Ni(II)-1MEY# protein, obtained as the final product of the reaction is completely identical to the protein purified by the traditional protein purification method and then cleaved by the ULP1 protease. Based on ESI-MS measurements, the reaction product contains three Zn(II) and one Ni(II) in both cases, and based on CD measurements the proteins were folded into the $\beta\beta\alpha$ secondary structure. Using UV-Vis absorbance and ESI-MS measurements, we proved that due to the kinetic inertness of the Ni(II)-ATCUN complex, it does not affect the investigation of the zinc finger subunits of the protein, and Ni(II) cannot compete with Zn(II) even in a 10 \times excess for the zinc finger binding sites. In contrast, in the presence of excess Cu(II), the structure of the zinc finger proteins collapses. The protein gradually aggregates, so Cu(II)-induced selective peptide bond hydrolysis of zinc finger proteins cannot be performed. Based on our experiments, however, if the ATCUN motif is freely located at the N-terminal end of the protein, but the zinc finger subunits are saturated with Zn(II), Cu(II) coordinates first to the ATCUN motif, and only in the presence of Cu(II) excess the gradual collapse of the protein structure is observed.

Based on competitive ITC and CD titrations, we determined that the Zn(II) binding affinity of the zinc finger subunits in 1MEY# zinc finger protein and the Zn(II) binding enthalpy are similar to the values obtained for the CP1 model peptide. This suggests that the fusion of the binding sites does not significantly affect their behaviour, they behave independently of each other. A similar quantitative comparative study was not previously available in the literature. Based on gel electrophoresis band shift and fluorescence anisotropy studies, the 1MEY# zinc finger protein can recognize its target DNA sequence with nM K_d and the recognition of specific DNA is 2 orders of magnitude stronger than with a non-specific but guanine-rich sequence. Furthermore, we proved that the interaction with

DNA thermodynamically stabilizes the Zn(II)-binding of the protein as well. In the presence of a DNA target sequence, the apparent Zn(II)-binding affinity of the protein increases by 3.4 orders of magnitude. This observation may explain how some natural zinc finger proteins that bind Zn(II) with low affinity are also able to perform their biological function.

There are many contradictions in the literature regarding the interaction of zinc finger proteins and toxic metal ions. For the first time, we reported that Ag(I) can inhibit the DNA recognition of a zinc finger protein, and in the case of Cys₂His₂ zinc finger proteins, 2 Ag(I) can displace a Zn(II) from the zinc finger binding site. In addition, we showed that further Ag(I) can coordinate to the protein, but the exact structure of the complex is challenging to determine. We clearly proved that in high-stability zinc finger proteins Cd(II) can coordinate to Cys₂His₂ binding sites with 1-2 orders of magnitude lower affinity than Zn(II). The structure of the formed complex is very similar to the Zn(II) complex. It is also able to specifically recognize the protein's DNA target sequence, but with a decreased affinity of ~0.6 orders of magnitude. In a chloride ion-free medium, Hg(II) can coordinate to the zinc finger subunits at least 4 orders of magnitude stronger than Zn(II), forming complex with disordered secondary structure. So the protein is no longer able to bind its target DNA sequence. The 1MEY# protein can bind more than 12 Hg(II) in an excess of Hg(II), where the exact coordination of the metal ions is not known, but based on fluorimetrically monitored competition measurements, each metal ion binds to the protein with an at least ~nM K_d .

Proteins are often purified using affinity tags, but these tags can modify the function of the native protein, so in many cases these tags must be removed after purification. Previously, this was only possible with the use of proteases, but their production and purification is time-consuming and expensive. We managed to design a DNA carrier in which a protein gene is incorporated and expressed with an N-terminal histidine affinity tag. We demonstrated that after purification, this overhang can be removed by Ni(II)-induced selective peptide bond hydrolysis both in solution and on Ni-NTA resin. Based on CD and ESI-MS measurements, the N-terminal fragment of the hydrolytic reaction is the native protein itself. So we proved that it is possible to use Ni(II) ions instead of expensive and cumbersome proteases to produce and purify a protein with a native sequence.

The activity of some enzymes can be significantly inhibited if an additional peptide fragment is attached to the native protein sequence. During the investigation of the modified variants of the NColE7 nuclease, we experienced that the production of these highly toxic

enzymes became possible with the aforementioned protein expression and purification method, although in the absence of the attachment, introducing the gene of the protein into a cell killed it immediately. The inhibited enzyme could be reactivated through Ni(II)-induced selective peptide bond hydrolysis, thus the regulation of nucleases became feasible. With nuclease activity and CD measurements, we confirmed that not only allosteric effects are responsible for the inhibition. The oligohistidine sequence was able to coordinate to the free site of the central Zn(II) in the active centre of the enzyme preventing the binding of the substrate.

During the Ni(II)-induced selective peptide bond hydrolysis of His-1MEY# zinc finger protein, we could establish the Ni(II)-1MEY# complex, after which it was also possible to exchange Ni(II) for Cu(II). The synthesized zinc finger-ATCUN fusion proteins were able to induce DNA cleavage in circular DNA vectors, however, the activity and specificity of the reaction was moderate. We designed new circular DNA vectors, in order to detect more easily the specific DNA cleavages, and we also redesigned the 1MEY# protein in hope to improve the activity and specificity of the enzyme. The length and amino acid composition of the linker section between the ATCUN motif and the zinc finger subunits were modified. The Ni(II) complexes of 9 proteins were successfully expressed and purified, their structure, size and metal content met the expectations based on SDS-PAGE, ESI-MS and CD measurements. The activity of proteins with shorter linker sections and increased number of more positively charged side chains was promising. In the near future, further optimisation of these proteins is needed, and we also plan to study the behaviour of Cu(II) complexes under different conditions (ionic strength, pH). In the future, nuclease activity experiments inside cells are also planned.

8 Irodalomjegyzék

- [1] C. A. Kim, J. M. Berg, (1996) A 2.2 Å resolution crystal structure of a designed zinc finger protein bound to DNA, *Nat Struct Mol Biol* 3:940–945
- [2] A. Micsonai, É. Moussong, F. Wien, E. Boros, H. Vadász, N. Murvai, Y.-H. Lee, T. Molnár, M. Réfrégiers, Y. Goto, Á. Tantos, J. Kardos, (2022) BeStSel: webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy, *Nucleic Acids Res* 50:90-98
- [3] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat Methods* 9:671–675
- [4] L. Zékány, I. Nagypál, (1985) A Comprehensive Program for the Evaluation of Potentiometric and/or Spectrophotometric Equilibrium Data Using Analytical Derivatives, in *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, 291-353 Boston, Springer
- [5] K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov, t. U. team, (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit, *Bioinformatics* 28:1166-1167
- [6] G. Parkin, (2004) Synthetic Analogues Relevant to the Structure and Function of Zinc Enzymes, *Chem Rev* 104:699-767
- [7] W. Maret, Y. Li, (2009) Coordination Dynamics of Zinc in Proteins, *Chem Rev* 109:4682-4707.
- [8] C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, (2006) Counting the Zinc-Proteins Encoded in the Human Genome, *J Proteome Res* 5:196-201
- [9] C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, (2006) Zinc through the Three Domains of Life, *J Proteome Res* 5:3173-3178
- [10] D. S. Auld, (2001) Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites *BioMetals* 14:271-313
- [11] W. Maret, (2006) Protein interface zinc sites: the role of zinc in the supramolecular assembly of proteins and in transient protein–protein interactions, in *Handbook of Metalloproteins* 1-10. John Wiley & Sons Ltd
- [12] Cambridge Structural Database, [Online]. <https://www.ccdc.cam.ac.uk/>. [Hozzáférés dátuma: 2023.02.24.]
- [13] F. H. Allan, (2002) The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising, *Acta Crystallogr B* 58.:380-388
- [14] I. L. Alberts, K. Nadassy, S. J. Wodak, (1998) Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures, *Protein Sci* 7:1700-1716
- [15] Y. Lee, C. Lim, (2008) Physical Basis of Structural and Catalytic Zn-Binding Sites in Proteins, *J Mol Biol* 379:545-53
- [16] S. Negi, M. Imanishi, M. Hamori, Y. Kawahara-Nakagawa, W. Nomura, K. Kishi, N. Shibata, Y. Sugiura, (2023) The past, present, and future of artificial zinc finger proteins: design strategies and chemical and biological applications, *J Biol Inorg Chem*:1432-1327
- [17] D. M. Ichikawa, O. Abdin, N. Alerasool, M. Kogenaru, A. L. Mueller, H. Wen, D. O. Giganti, G. W. Goldberg, S. Adams, J. M. Spencer, R. Razavi, S. Nim, H. Zheng, C. Gionco, F. T. Clark, A. Strokach, T. R. Hughes, T. Lionnet, M. Taipale, P. M. Kim, M. B. Noyes, (2023) A universal deep-learning model for zinc finger design enables transcription factor reprogramming, *Nat Biotechnol* 1546-1696
- [18] J. C. W. Willis, P. Silva-Pinheiro, L. Widdup, M. Minczuk, D. R. Liu, (2022) Compact zinc finger base editors that edit mitochondrial or nuclear DNA in vitro and in vivo, *Nat Commun* 13:7204
- [19] M. Zhang, Z. Bodi, K. Mackinnon, S. Zhong, N. Archer, N. P. Mongan, G. G. Simpson, R. G. Fray, (2022) Two zinc finger proteins with functions in m6A writing interact with HAKAI, *Nat Commun* 13:1127
- [20] K. Lim, S.-I. Cho, J.-S. Kim, (2022) Nuclear and mitochondrial DNA editing in human cells with zinc finger deaminases, *Nat Commun* 13:366
- [21] K. Kluska, J. Adamczyk, A. Krężel, (2018) Metal binding properties, stability and reactivity of zinc fingers, *Coord Chem Rev* 367:18-64
- [22] E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* 409:860-921
- [23] J. P. Mackay, M. Crossley, (1998) Zinc fingers are sticking together, *Trends Biochem Sci* 23:1-4
- [24] R. Tupper, G. Perini, M. R. Green, (2001) Expressing the human genome, *Nature* 409:832-833

- [25] J. Miller, A. Klug, A. McLachlan, (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes, *The EMBO Journal* 4:1609-1614
- [26] K. Aaron, (2010) The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation, *Annurev Biochem* 79:213-231
- [27] Y.-G. Kim, J. Cha, S. Chandrasegaran, (1996) Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusion to Fok I cleavage domain, *PNAS Biochemistry* 93:1156-1160
- [28] F. D. Urnov, E. J. Rebar, M. C. Holmes, S. H. Zhang, P. D. Gregory, (2010) Genome editing with engineered zinc finger nucleases, *Nat Rev Genet* 11:636-646
- [29] T. Gaj, C. A. Gersbach, C. F. Barbas, (2014) ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering, *Trends Biotechnology* 31:394-405
- [30] D. J. Segal, J. F. Meckler, (2013) Genome Engineering at the Dawn of the Golden Age, *Annual Reviews Genomics* 14:135-158
- [31] F. D. Urnov, J. C. Miller, Y.-L. Lee, C. M. Beausejour, J. M. Rock, S. Augustus, A. C. Jamieson, M. H. Porteus, G. Holmes, M. C. Holmes, (2005) Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases, *Nature* 435:646-651
- [32] C. Passananti, N. Corbi, A. Oniri, M. G. Di Certo, E. Mattei, (2010) Transgenic Mice Expressing an Artificial Zinc Finger Regulator Targeting an Endogenous Gene, *Engineered Zinc Finger Proteins, Methods Mol Biol* 649:183-206
- [33] J. F. Petolino, (2015) Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases, *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 51:1-8
- [34] D. G. Ousterout, A. M. Kabadi, P. I. Thakore, P. Perez-Pinera, M. T. Brown, W. H. Majoros, T. E. Reddy, C. A. Gersbach, (2015) Correction of Dystrophin Expression in Cells From Duchenne Muscular Dystrophy Patients Throug Genomic Excision of Exon 51 by Zinc Finger Nucleases, *Mol Ther* 23:523-532
- [35] M. Cassandri, A. Smirnov, F. Novelli, C. Pitolli, M. Agostini, M. Malewicz, G. Melino, G. Raschella, (2017) Zinc-finger proteins in health and disease, *Nature* 3:17071
- [36] J. M. Berg, Y. Shi, (1996) The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc, *Science* 271:1081-1085
- [37] J. T. Kellis Jr, K. Nyberg, D. S̄ail, A. R. Fersht, (1988) Contribution of hydrophobic interactions to protein stability, *Nature* 333:784–786
- [38] G. Bulaj, T. Kortemme, D. P. Goldenberg, (1998) Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides, *Biochem* 37:8965-8972
- [39] A. T. Maynard, D. G. Covell, (2001) Reactivity of Zinc Finger Cores: Analysis of Protein Packing and Electrostatic Screening, *J Am Chem Soc* 123:1047-1058
- [40] J. N. Smith, J. T. Hoffman, Z. Shirin, C. J. Carrano, (2005) H-Bonding Interactions and Control of Thiolate Nucleophilicity and Specificity in Model Complexes of Zinc Metalloproteins, *Inorg Chem* 44:2012-2017
- [41] Y.-M. Lee, C. Lim, (2011) Factors Controlling the Reactivity of Zinc Finger Cores, *J Am Chem Soc* 133:8691-8703
- [42] S. M. Quintal, Q. A. dePaula, N. P. Farrell, (2011) Zinc finger proteins as templates for metal ion exchange and ligand reactivity. Chemical and biological consequences, *Metallomics* 3:121-139
- [43] A. D. Frankel, J. M. Berg, C. O. Pabo, (1987) Metal-dependent folding of a single zinc finger from transcription factor IIIA, *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4841-4845
- [44] S. S. Krishna, I. Majumdar, N. V. Grishin, (2003) Structural classification of zinc fingers, *Nucleic Acids Res* 31:532-550
- [45] HUGO Gene Nomenclature Committee, [Online] <https://www.genenames.org/data/genegroup/#!/group/26>. [Hozzáférés dátuma: 2023.02.24.]
- [46] S. J. Lee, S. L. Michel, (2014) Structural Metal Sites in Nonclassical Zinc Finger Proteins Involved in Transcriptional and Translational Regulation, *Acc Chem Res* 47:2643-2650
- [47] A. Fedotova, A. Bonchuk, V. Mogila, P. Georgiev, (2017) C2H2 Zinc Finger Proteins: The Largest but Poorly Explored Family of Higher Eukaryotic Transcription Factors, *Acta Naturae* 9:47-58
- [48] H. D. Tadepally, G. Burger, M. Aubry, (2008) Evolution of C2H2-zinc finger genes and subfamilies in mammals: Species-specific duplication and loss of clusters, genes and effector domains, *BMC Evol Biol* 8:176-191

- [49] L. Fairall, D. Rhodes, A. Klug, (1986) Mapping of the sites of protection on a 5 S RNA gene by the *Xenopus* transcription factor IIIA: A model for the interaction, *J Mol Biol* 192:577-591
- [50] D. Rhodes, A. Klug, (1986) An underlying repeat in some transcriptional control sequences corresponding to half a double helical turn of DNA, *Cell* 46:123-132
- [51] G. P. Diakun, L. Fairall, A. Klug, (1986) EXAFS study of the zinc-binding sites in the protein transcription factor IIIA, *Nature* 324:698-699
- [52] M. S. Lee, G. P. Gippert, K. V. Soman, D. A. Case, P. E. Wright, (1989) Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain, *Science* 245:635-637
- [53] J. M. Berg, (1988) Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor IIIA and related proteins, *PNAS* 85:99-102
- [54] G. Párraga, S. J. Horvath, A. Eisen, W. E. Taylor, L. Hood, E. T. Young, R. E. Klevit, (1988) Zinc-dependent structure of a single-finger domain of yeast ADR1, *Science* 241:1489-1492
- [55] L. Schrodinger, (2010) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3,
- [56] N. P. Pavletich, C. O. Pabo, (1991) Zinc Finger-DNA Recognition: Crystal Structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å, *Science* 252:809-816
- [57] M. E. Erickson, T. E. Benson, C. O. Pabo, (1998) High resolution structures of variant Zif268-DNA complexes: implications for understanding zinc finger-DNA recognition, *Structure* 6:451-464
- [58] M. Dhanasekaran, S. Negi, M. Imanishi, Y. Sugaira, (2007) DNA-Binding Ability of GAGA Zinc Finger Depends on the Nature of Amino Acids Presents in the β -Hairpin, *Biochem* 46:7506-7513
- [59] S. A. Wolfe, E. I. Ramm, C. O. Pabo, (2000) Combining structure-based design with phage display to create new Cys2His2 zinc finger dimers, *Structure* 8:739-750
- [60] J. A. Gogos, J. Jin, H. Wan, M. Kokkinidis, F. C. Kafatos, (1996) Recognition of diverse sequences by class I zinc fingers: Asymmetries and indirect effects on specificity in the interaction between CF2II and A+T-rich sequence elements, *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2159-2164
- [61] E. Peisach, C. O. Pabo, (2003) Constraints for Zinc Finger Linker Design as Inferred from X-ray Crystal Structure of Tandem Zif268-DNA complexes, *J Mol Biol*:1-7
- [62] H. J. Kim, H. J. Lee, H. Kim, W. S. Cho, S. J. Kim, (2009) Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly, *Genome Research* 19:1279-1288
- [63] J. G. Mandell, C. F. Barbas III., (2006) Zinc Finger Tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases, *Nucleic Acids Res*:516-623
- [64] J. D. Sander, L. M. Maeder, D. Reyon, D. F. Voytas, J. K. Joung, D. Dobbs, (2010) ZiFiT (Zinc Finger Targeter): an updated zinc finger engineering tool, *Nucleic Acids Res*:462-468
- [65] B. A. Krizek, B. T. Amann, V. J. Kilfoil, D. L. Merkle, J. M. Berg, (1991) A consensus zinc finger peptide: design, high-affinity metal binding, a pH-dependent structure, and a His to Cys sequence variant, *J Am Chem Soc* 113:4518-4523
- [66] A. N. Besold, L. R. Widger, F. Namuswe, J. L. Michalek, S. L. Michel, D. P. Goldberg, (2016) Revisiting and re-engineering the classical zinc finger peptide: consensus peptide-1 (CP-1), *Mol Biosyst* 12:1183-1193
- [67] M. Anna, A. Krężel, (2014) Metal binding properties of the zinc finger metallome-insights into variations in stability, *Metallomics* 6:2015-2024
- [68] O. Sénèque, J.-M. Latour, (2010) Coordination Properties of Zinc Finger Peptides Revisited: Ligand Competition Studies Reveal Higher Affinities for Zinc and Cobalt, *J Am Chem Soc* 132:17760-17774
- [69] Y. Shi, R. D. Berger, J. M. Berg, (1993) Metal binding properties of single amino acid deletion mutants of zinc finger peptides: studies using cobalt(II) as a spectroscopic probe, *Biophys J* 64:749-753
- [70] A. Hartwig, M. Asmuss, I. Ehleben, U. Herzer, D. Kostelac, A. Pelzer, T. Schwerdtle, B. A., (2002) Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms, *Environ Health Perspect* 110:797-799
- [71] A. Witkiewicz-Kucharczyka, W. Bal, (2006) Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis, *Toxicol Lett* 162:29-42
- [72] B. A. Krizek, D. L. Merkle, J. M. Berg, (1993) Ligand variation and metal ion binding specificity in zinc finger peptides, *Inorg Chem* 32:937-940

- [73] K. Kluska, A. Chorążewska, M. D. Peris-Díaz, J. Adamczyk, A. Krężel, (2022) Non-Conserved Amino Acid Residues Modulate the Thermodynamics of Zn(II) Binding to Classical betabetaalpha Zinc Finger Domains, *Int J Mol Sci* 23:1-17
- [74] J. M. Berg, D. L. Merkle, (1989) On the metal ion specificity of zinc finger proteins, *J Am Chem Soc* 111:3759-3761
- [75] A. Kocyla, A. Pomorski, A. Krężel, (2015) Molar absorption coefficients and stability constants of metal complexes of 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR): Revisiting common chelating probe for the study of metalloproteins, *J Inorg Biochem* 152:82-92
- [76] A. L. Guerrero, J. M. Berg, (2004) Metal Ion Affinities of the Zinc Finger Domains of the Metal Responsive Element-Binding Transcription Factor-1 (MTF1)[†], *Biochem* 43:5437-5444
- [77] A. W. Bulathge, R. L. E. Villones, F. C. Herbert, J. J. Gassensmith, G. Meloni, (2022) Comparative cisplatin reactivity towards human Zn7-metlothionein-2 and MTF-1 zinc fingers: potential implications in anticancer drug resistance, *Metallomics* 14:1-18
- [78] M. J. Lachenmann, J. E. Ladbury, X. Qian, K. Huang, R. Singh, M. A. Weiss, (2009) Solvation and the hidden thermodynamics of a zinc finger probed by nonstandard repair of a protein crevice, *Prot Sci* 13:3115-3126
- [79] K. L. Chan, I. Bakman, A. R. Marts, Y. Batir, T. L. Dowd, D. L. Tierney, B. R. Gibney, (2014) Characterization of the Zn(II) Binding Properties of the Human Wilms' Tumor Suppressor Protein C-terminal Zinc Finger Peptide, *Inorg Chem* 53:6309-6320
- [80] M. C. Posewitz, D. E. Wilcox, (1995) Properties of the Sp1 Zinc Finger 3 Peptide: Coordination Chemistry, Redox Reactions, and Metal Binding Competition with Metallothionein, *Chem Res Toxicol* 8:1020-1028
- [81] A. M. Rich, E. Bombarda, A. D. Schenk, P. E. Lee, E. H. Cox, A. M. Spuches, L. D. Hudson, B. Kieffer, D. E. Wilcox, (2012) Thermodynamics of Zn²⁺ Binding to Cys2His2 and Cys2HisCys Zinc Fingers and a Cys4 Transcription Factor Site, *J Am Chem Soc* 134:10405-10418
- [82] A. Louie, T. Meade, (1998) A cobalt complex that selectively disrupts the structure and function of zinc fingers, *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6663-6668
- [83] W. Bal, T. Schwerdtle, A. Hartwig, (2003) Mechanism of Nickel Assault on the Zinc Finger of DNA Repair Protein XPA, *Chem Res Toxicol* 16:242-248
- [84] M. Nagaoka, J. Kuwahara, Y. Sugiura, (1993) Alteration of DNA Binding Specificity by Nickel (II) Substitution in Three Zinc (II) Fingers of Transcription Factor Sp1, *Biochem Biophys Res Commun* 194:1515-1520
- [85] M. A. Searles, D. Lu, A. Klug, (2000) The role of the central zinc fingers of transcription factor IIIA in binding to 5 S RNA, *J Mol Biol* 301 301:47-60
- [86] E. Kopera, T. Schwerdtle, A. Hartwig, W. Bal, (2004) Co(II) and Cd(II) Substitute for Zn(II) in the Zinc Finger Derived from the DNA Repair Protein XPA, Demonstrating a Variety of Potential Mechanisms of Toxicity, *Chem Res Toxicol* 17:1452-1458
- [87] A. Hartwig, (2001) Zinc Finger Proteins as Potential Targets for Toxic Metal Ions: Differential Effects on Structure and Function, *Antioxidants & Redox Signaling* 3:625-634
- [88] U. Heinz, L. Hemmingsen, M. Kiefer, H.-W. Adolph, (2009) Structural Adaptability of Zinc Binding Sites: Different Structures in Partially, Fully, and Heavy-Metal Loaded States, *Chem Eur J* 15:8664-8664
- [89] D. H. Petering, M. Huang, S. Moteki, C. F. Shaw, (2000) Cadmium and lead interactions with transcription factor IIIA from *Xenopus laevis*: A model for zinc finger protein reactions with toxic metal ions and metallothionein, *Mar Env Rev* 50:89-92
- [90] G. S. Makowski, F. Sunderman Jr., (1992) The interactions of zinc, nickel, and cadmium with *Xenopus* transcription factor IIIA, assessed by equilibrium dialysis, *J Inorg Biochem* 48:107-119
- [91] M. Huang, D. Krepiy, W. Hu, D. H. Petering, (2004) Zn-, Cd-, and Pb-transcription factor IIIA: properties, DNA binding, and comparison with TFIIIA-finger 3 metal complexes, *J Inorg Biochem* 98:775-785
- [92] J. S. Hanas, C. G. Gunn, (1996) Inhibition of Transcription Factor IIIA-DNA Interactions by Xenobiotic Metal Ions, *Nucleic Acids Res* 24:924-930
- [93] D. Krepiy, H. F. Försterling, D. H. Petering, (2004) Interaction of Cd²⁺ with Zn Finger 3 of Transcription Factor IIIA: Structures and Binding to Cognate DNA, *Chem Res Toxicol* 17:863-870

- [94] M. Razmiafshari, N. H. Zawia, (2000) Utilization of a Synthetic Peptide as a Tool to Study the Interaction of Heavy Metals with the Zinc Finger Domain of Proteins Critical for Gene Expression in the Developing Brain, *Toxicol Appl Pharmacol* 166:1-12
- [95] R. Kothinti, A. Blodgett, N. M. Tabatabai, D. H. Petering, (2010) Zinc Finger Transcription Factor Zn3-Sp1 Reactions with Cd²⁺, *Chem Res Toxicol* 23:405-412
- [96] R. K. Kothinti, A. B. Blodgett, D. H. Petering, N. M. Tabatabai, (2010) Cadmium down-regulation of kidney Sp1 binding to mouse SGLT1 and SGLT2 gene promoters: Possible reaction of cadmium with the zinc finger domain of Sp1, *Toxicol Appl Pharmacol* 244:254-262
- [97] D. Bittel, T. Dalton, S. L. A. Samson, L. Gedamu, G. K. Andrews, (1998) The DNA Binding Activity of Metal Response Element-binding Transcription Factor-1 Is Activated in vivo and in Vitro by Zinc, but Not by Other Transition Metals*, *J Biol Chem* 273:7127-7133
- [98] J. Kuwahara, J. E. Coleman, (1990) Role of the zinc(II) ions in the structure of the three-finger DNA binding domain of the Sp1 transcription factor, *Biochem* 29:8627-8631
- [99] G. Malgieri, M. Palmieri, S. Esposito, V. Maione, L. Russo, I. Baglivo, I. de Paola, D. Milardi, D. Diana, L. Zaccaro, P. V. Pedone, R. Fattorusso, C. Isernia, (2014) Zinc to cadmium replacement in the prokaryotic zinc-finger domain, *Metallomics* 6:96-104
- [100] G. Roesijadi, R. Bogumil, M. Vasák, J. H. Kägi, (1998) Modulation of DNA Binding of a Tramtrack Zinc Finger Peptide by the Metallothionein-Thionein Conjugate Pair*, *J Biol Chem* 273:17425-17432
- [101] B. Zhang, O. Georgiev, M. Hagmann, Ç. Günes, M. Cramer, P. Faller, M. Vasák, W. Schaffner, (2003) Activity of Metal-Responsive Transcription Factor 1 by Toxic Heavy Metals and H₂O₂ In Vitro Is Modulated by Metallothionein, *Mol Cell Biol* 23:8471-8485
- [102] D. P. Giedroc, X. Chen, M. A. Pennella, A. C. LiWang, (2001) Conformational Heterogeneity in the C-terminal Zinc Fingers of Human MTF-1: AN NMR AND ZINC-BINDING STUDY, *J Biol Chem* 276:42322-42332
- [103] V. Sivo, G. D'Abrosca, I. Baglivo, R. Iacovino, P. V. Pedone, R. Fattorusso, L. Russo, G. Malgieri, C. Isernia, (2019) Ni(II), Hg(II), and Pb(II) Coordination in the Prokaryotic Zinc-Finger Ros87, *Inorg Chem* 58:1067-1080
- [104] R. T. Doku, G. Park, K. E. Wheeler, K. E. Splan, (2013) Spectroscopic characterization of copper(I) binding to apo and metal-reconstituted zinc finger peptides, *J Biol Inorg Chem* 18:669-678
- [105] F. Sommer, J. Kropat, D. Malasarn, N. E. Grosseohme, X. Chen, D. P. Giedroc, S. S. Merchant, (2010) The CRR1 Nutritional Copper Sensor in *Chlamydomonas* Contains Two Distinct Metal-Responsive Domains, *Plant Cell* 22:4098-4113
- [106] D. Choi, A. A. Alshahrani, Y. Vytla, M. Deconada, V. J. Serna, R. F. Saenz, L. A. Angel, (2015) Redox activity and multiple copper(I) coordination of 2His–2Cys oligopeptide, *J Mass Spectrom* 50:316–325
- [107] M. Dragone, R. Grazioso, G. D'Abrosca, I. Baglivo, R. Iacovino, S. Esposito, A. Paladino, P. V. Pedone, L. Russo, R. Fattorusso, G. Malgieri, C. Isernia, (2022) Copper (I) or (II) Replacement of the Structural Zinc Ion in the Prokaryotic Zinc Finger Ros Does Not Result in a Functional Domain, *Int J Mol Sci* 23:1422-0067
- [108] A. Jacques, C. Lebrun, A. Casini, I. Kieffer, O. Proux, J.-M. Latour, O. Sénéque, (2015) Reactivity of Cys4 Zinc Finger Domains with Gold(III) Complexes: Insights into the Formation of “Gold Fingers” *Inorg Chem* 54:4104-4113
- [109] J. L. Larabee, J. R. Hocker, J. S. Hanas, (2005) Mechanisms of Aurothiomalate–Cys2His2 Zinc Finger Interactions, *Chem Res Toxicol* 18:1943-1954
- [110] Z. Du, R. E. F. de Paiva, K. Nelson, N. P. Farrell, (2017) Diversity in Gold Finger Structure Elucidated by Traveling-Wave Ion Mobility Mass Spectrometry, *Angew Chemie Int Ed* 56:4464-4467
- [111] M. A. Franzman, A. M. Barrios, (2008) Spectroscopic Evidence for the Formation of Goldfingers, *Inorg Chem* 47:3928-3930
- [112] V. M. Gonzalez, M. A. Fuertes, C. Alonso, J. M. Perez, (2001) Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis?, *Mol Pharmacol* 59:657-663
- [113] C. Siming, D. Xu, H. Jiang, Z. Xi, P. Zhu, Y. Liu, (2012) Trans-Platinum/Thiazole Complex Interferes with Sp1 Zinc-Finger Protein, *Angew Chemie - Int Ed* 51:12258-12262
- [114] Z. Du, R. E. F. de Paiva, Y. Qua, N. P. Farrell, (2016) Tuning the reactivity of Sp1 zinc fingers with platinum complexes, *Dalton Trans* 45:8712-8716

- [115] S. Eckhardt, P. S. Brunetto, J. Gagnon, M. Priebe, B. Giese, K. M. Fromm, (2013) Nanobio Silver: Its Interactions with Peptides and Bacteria, and Its Uses in Medicine, *Chem Rev* 113:4708-4754
- [116] K. C. Bhol, P. J. Schechter, (2007) Effects of Nanocrystalline Silver (NPI 32101) in a Rat Model of Ulcerative Colitis, *Dig Dis Sci* 52:2732-2742
- [117] S. J. Allison, M. Sadiq, E. Baronou, P. A. Cooper, C. Dunnill, N. T. Georgopoulos, A. Latif, S. Shepherd, S. D. Shnyder, I. J. Stratford, R. Wheelhouse, C. Willans, R. M. Phillips, (2017) Preclinical anti-cancer activity and multiple mechanisms of action of a cationic silver complex bearing N-heterocyclic carbene ligands, *CanLet* 403:98-107
- [118] S. V. Tardillo, E. Karepina, M. Chevallet, B. Gallet, C. Cottet-Rousselle, P. Charbonnier, C. Moriscot, I. Michaud-Soret, W. Bal, A. Fuchs, R. Tucoulou, P.-H. Jouneau, G. Veronesi, A. Deniaud, (2020) Nuclear translocation of silver ions and hepatocyte nuclear receptor impairment upon exposure to silver nanoparticles, *Environ Sci: Nano* 7:1373-1387
- [119] K. Kluska, M. D. Peris-Diaz, D. Płonka, A. Moysa, M. Dadlez, A. Deniaud, W. Bal, A. Krężel, (2020) Formation of highly stable multinuclear Ag_nSn clusters in zinc fingers disrupts their structure and function, *Chem Comm* 56:1329-1332
- [120] L. Ciavatta, M. Grimaldi, (1968) Equilibrium constants of mercury(II) chloride complexes, *J Inorg Nucl Chem* 30:197-205
- [121] G. S. Makowski, S.-M. Lin, S. M. Brennan, H. M. Smilowitz, S. M. Hopfer, F. W. Sunderman, (1991) Detection of two Zn-finger proteins of *Xenopus laevis*, TFIIIA, and p43, by probing western blots of ovary cytosol with ⁶⁵Zn²⁺, ⁶³Ni²⁺, or ¹⁰⁹Cd²⁺, *Biol Trace Elem Res* 29:93-109
- [122] T. Kiss, T. Gajda, B. Gyurcsik, (2007) Bevezetés a bioszervetlen kémiába, Budapest: Nemzeti Tankönyvkiadó,
- [123] N. N. Greenwood, A. Earnshaw, (1997) *Chemistry of the Elements* 2ed., Butterworth-Heinemann,
- [124] G. Arena, G. Pappalardo, I. Sovago, E. Rizzarelli, (2012) Copper(II) interaction with amyloid: Affinity and speciation, *Coord Chem Rev* 256:3-12
- [125] P. J. Sadler, A. Tucker, J. H. Viles, (1994) Involvement of a Lysine residue in the N-terminal Ni²⁺ and Cu²⁺ binding site of serum albumins Comparison with Co²⁺, Cd²⁺ and Al³⁺, *Eur J Biochem* 220:193-200
- [126] Y. Jin, M. A. Lewis, N. H. Gokhale, E. C. Long, J. A. Cowan, (2007) Influence of Stereochemistry and Redox Potentials on the Single- and Double-Strand DNA cleavage Efficiency of Cu(II)- and Ni(II)-Lys-Gly-His-Derived ATCUN Metallopeptides, *J Am Chem Soc* 129:8353-8361
- [127] D. W. Applenton, B. Sarkar, (1971) The Absence of Specific Copper(II)-binding Site in Dog Albumin, *J Biol Chem* 246:5040-5046
- [128] N. Camerman, A. Camerman, B. Sarkar, (1976) Molecular design to mimic the copper(II) transport site of human albumin. The crystal and molecular structure of copper(II) – glycyglycyl-L-histidine-N-methyl amide mono-aqua complex, *Can J Chem* 54:1309-1316
- [129] H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba, T. K. Jankowska, (1999) Specific structure-stability relations in metallopeptides, *Coord Chem Rev* 184:319-346
- [130] E. Farkas, I. Sóvágó, T. Kiss, A. Gergely, (1984) Studies on Transition-metal-Peptide Complexes. Part 9. Copper(II) Complexes of Tripeptides containing Histidine, *Dalton Trans*:611-614
- [131] C. J. Hawkins, J. Martin, (1983) Cobalt(III) complex of glycyglycyl-L-histidine: preparation, characterization, and conformation, *Inorg Chem* 22:3879-3883
- [132] S. L. Best, T. K. Chattopadhyay, M. I. Djuran, R. A. Palmer, P. J. Sadler, I. Sóvágó, K. Várnagy, (1997) Gold(III) and palladium(II) complexes of glycyglycyl-L-histidine: crystal structures of [AuIII(Gly-Gly-L-His-H-2)]Cl · H₂O and [PdII(Gly-Gly-L-His-H-2)] · 1.5H₂O and HisNH deprotonation, *J Chem Soc Dalton Trans*:2587-2596
- [133] G. E. Kirvan, D. W. Margerum, (1985) Formation and NMR spectra of platinum(II)-tripeptide complexes, *Inorg Chem* 24:3017-3021
- [134] R. W. Hay, M. M. Hassan, C. Y. Quan, (1993) Kinetic and Thermodynamic Studies of the Copper and Nickel(II) Complexes of Glycyglycyl-L-Histidine, *J Inorg Biochem* 52:17-25
- [135] P. Gizzi, B. Henry, P. Rubini, S. Giroux, E. Wenger, (2005) A multi-approach study of the interaction of the Cu(II) and Ni(II) ions with alanyl-glycyl-histamine, a mimicking pseudo-peptide of the serum albumine N-terminal residue, *J Inorg Biochem* 99:1182-1192

- [136] M. Sokolowska, A. Krezel, M. Dyba, Z. Szewczuk, W. Bal, (2002) Short peptides are not reliable models of thermodynamic and kinetic properties of the N-terminal metal binding site in serum albumin, *Eur J Biochem* 269:1323-1331
- [137] P. Młynarz, D. Valensin, K. Kociolek, J. Zabrocki, J. Olejnik, H. Kozłowski, (2002) Impact of the peptide sequence on the coordination abilities of albumin-like tripeptides towards Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ ions. Potential albumin-like peptide chelators, *New J Chem* 26:264-268
- [138] M. Mylonas, J. C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, (2004) Interactions of Ni(ii) and Cu(ii) ions with the hydrolysis products of the C-terminal -ESHH- motif of histone H2A model peptides. Association of the stability of the complexes formed with the cleavage of the -E-S- bond, *Dalton Trans* 4152-4160
- [139] W. Bal, M. Jeżowska-Bojczuk, K. S. Kasprzak, (1997) Binding of Nickel(II) and Copper(II) to the N-Terminal Sequence of Human Protamine HP2, *Chem Res Toxicol* 10:906-914
- [140] W. Bal, G. N. Chmurny, B. D. Hilton, P. J. Sadler, A. Tucker, (1996) Axial Hydrophobic Fence in Highly-Stable Ni(II) Complex of Des-Angiotensinogen N-Terminal Peptide, *J Am Chem Soc* 118:4727-4728
- [141] T. Gajda, B. Henry, A. Aubry, J.-J. Delpuech, (1996) Proton and Metal Ion Interactions with Glycylglycylhistamine, a Serum Albumin Mimicking Pseudo-peptide, *Inorg Chem* 35:586-593
- [142] P. Młynarz, N. Gaggelli, J. Panek, M. Stasiak, G. Valensin, T. Kowalik-Jankowska, M. L. Leplawy, Z. Latajka, H. Kozłowski, (2000) How the α -hydroxymethylserine residue stabilizes oligopeptide complexes with nickel(II) and copper(II) ions, *J Chem Soc, Dalton Trans* 1033-1038
- [143] C. Conato, H. Kozłowski, P. Młynarz, F. Pulidori, M. Remelli, (2002) Copper and nickel complex-formation equilibria with Lys-Gly-His-Lys, a fragment of the matricellular protein SPARC, *Polyhedron* 21:1469-1474
- [144] I. Sóvágó, K. Várnagy, K. Ósz, (2002) Metal complexes of peptides containing monodentate or chelating imidazole nitrogen donors: Factors influencing the coordination of amide groups and imidazole side chains, *Comments Inorg Chem* 23:149-178
- [145] W. Bal, J. Lukszo, K. Bialkowski, K. S. Kasprzak, (1998) Interactions of Nickel(II) with Histones: Interactions of Nickel(II) with CH₃CO-Thr-Glu-Ser-His-His-Lys-NH₂, a Peptide Modeling the Potential Metal Binding Site in the "C-Tail" Region of Histone H2A, *Chem Res Toxicol* 11:1014-1023
- [146] G. Malandrios, A. M. Nunes, K. Zavitsanos, N. Hajiliadis, (2011) Peptide models in the study of the mechanism of carcinogenesis by heavy meals, *Pure Appl Chem* 83:1751-1762
- [147] E. I. Podobas, A. Bonna, A. P. Nowakowska, W. Bal, (2014) Dual catalytic role of the metal ion in nickel-assisted peptide bond hydrolysis, *J Inorg Biochem* 136:107-114
- [148] E. Kopera, A. Krezel, A. M. Protas, A. Belczyk, A. Bonna, A. W. Cieszyńska, J. Poznanski, W. Bal, (2010) Sequence-Specific Ni(II)-Dependent Peptide Bond Hydrolysis for Protein Engineering: Reaction Conditions and Molecular Mechanism, *Inorg Chem* 49:6636-6645
- [149] A. M. Protas, H. H. N. Ariani, A. Bonna, A. P. Nowakowska, J. Poznanski, W. Bal, (2013) Sequence-specific Ni(II)-dependent peptide bond hydrolysis for protein engineering: Active sequence optimization, *J Inorg Biochem* 127:99-106
- [150] R. A. Cox, (2011) A greatly Under-Appreciated Fundamental Principle of Physical Organic Chemistry, *Int J Mol Sci* 12:8316-8332
- [151] A. Belczyk-Ciesielska, I. A. Zawisza, M. Mital, A. Bonna, W. Bal, (2014) Sequence-Specific Cu(II)-Dependent Peptide Bond Hydrolysis: Similarities and Differences with the Ni(II)-Dependent Reaction, *Inorg Chem* 53:4639-4646
- [152] G. Erdem, C. Öner, A. Önal, D. Kisakürek, A. Ögüs, (1994) Free radical mediated interaction of ascorbic acid and ascorbate/Cu(II) with viral and plasmid DNAs, *J Biosci* 19:9-17
- [153] C. Harold, S. Narindrasorasak, B. Sarkar, (1996) The Designed Protein M(II)-Gly-Lys-His-Fos(138-211) Specifically Cleaves the AP-1 Binding Site Containing DNA, *Biochem* 35:4271-4278
- [154] R. Nagane, T. Koshigoe, M. Chikira, E. C. Long, (2001) The DNA-bound orientation of Cu(II)·Xaa-Gly-His metallopeptides, *J Inorg Biochem* 83:17-23
- [155] E. C. Long, (1999) Ni(II)-Xaa-Xaa-His Metallopeptide-DNA/RNA Interactions, *Acc Chem Res* 32:827-836
- [156] E. Kimoto, H. Tanaka, J. Gyotoku, F. Morishige, L. Pauling, (1983) Enhancement of Antitumor Activity of Ascorbate against Ehrlich Ascites Tumor Cells by the Copper:Glycylglycylhistidine Complex, *Cancer Res* 43:824-828

- [157] J. L. Kurtz, (1978) Trivalent Nickel Catalysis of the Autoxidation of Nickel(II) Tetraglycine, *Inorg Chem* 17:1034-1042
- [158] T. K. Jankowska, H. Kozłowski, E. Farkas, I. Sóvágó, (2007) Nickel Ion Complexes of Amino Acids and Peptides, In: *Nickel and Its Surprising Impact in Nature* A. Sigel, H. Sigel R.K.O. Sigel 3:63-107
- [159] J. G. Muller, R. P. Hickerson, R. J. Perez, C. J. Burrows, (1997) DNA Damage from Sulfite Autoxidation Catalyzed by a Nickel(II) Peptide, *J Am Chem Soc* 119:1501-1506
- [160] Q. Liang, D. C. Ananias, E. C. Long, (1998) Ni(II)·Xaa-Xaa-His Induced DNA Cleavage: Deoxyribose Modification by a Common “Activated” Intermediate Derived from KHSO₅, MMPP, or H₂O₂, *J Am Chem Soc* 120:248-257
- [161] Q. Liang, P. D. Eason, E. C. Long, (1995) Metallopeptide-DNA Interactions: Site-Selectivity Based on Amino Acid Composition and Chirality, *J Am Chem Soc* 117:9625-9631
- [162] D. C. Ananias, E. C. Long, (1997) DNA Strand Scission by Dioxygen + Light-Activated Cobalt Metallopeptides, *Inorg Chem* 36:2469-2471
- [163] K.-C. Hsia, K.-F. Chak, P.-H. Liang, Y.-S. Cheng, W.-Y. Ku, H. S. Yuan, (2004) DNA Binding and Degradation by the HNH Protein ColE7, *Structure* 12:205-214
- [164] A. Czene, E. Tóth, E. Németh, H. Otten, J.-C. N. Poulsen, H. E. M. Christensen, L. Rulíšek, K. Nagata, S. Larsen, B. Gyurcsik, (2014) A new insight into the zinc-dependent DNA-cleavage by the colicin E7 nuclease: a crystallographic and computational study†, *Metallomics* 6:2090-2099
- [165] A. J. Pommer, U. C. Kühlmann, A. Cooper, A. M. Hemmings, G. R. Moore, R. James, C. Kleantous, (1999) Homing in on the Role of Transition Metals in the HNH Motif of Colicin Endonucleases*, *J Biol Chem* 274:27153-27160
- [166] C.-C. Liao, K.-C. Hsiao, Y.-W. Liu, P.-H. Leng, H. S. Yuen, K.-F. Chak, (2001) Processing of DNase Domain during Translocation of Colicin E7 across the Membrane of *Escherichia coli*, *Biochem Biophys Res Commun* 284:556-562
- [167] M.-J. Sui, L.-C. Tsai, K.-C. Hsia, L. G. Doudeva, W.-Y. Ku, G. W. Han, H. S. Yuan, (2002) Metal ions and phosphate binding in the H-N-H motif: Crystal structures of the nuclease domain of ColE7/Im7 in complex with a phosphate ion and different divalent metal ions, *Prot Sci* 11:2947-2957
- [168] T.-P. Ko, C.-C. Liao, W.-Y. Ku, K.-F. Chak, H. S. Yuan, (1999) The crystal structure of the DNase domain of colicin E7 in complex with its inhibitor Im7 protein, *Structure* 7:91-102
- [169] E. Németh, T. Körtvélyesi, P. W. Thulstrup, H. E. M. Christensen, M. Kožíšek, K. Nagata, A. Czene, B. Gyurcsik, (2014) Fine tuning of the catalytic activity of colicin E7 nuclease domain by systematic N-terminal mutations, *Prot Sci* 23:1113-1122
- [170] L. G. Doudeva, H. Huang, K.-C. Hsia, Z. Shi, C.-L. Li, Y. Shen, Y.-S. Cheng, H. S. Yuan, (2006) Crystal structural analysis and metal-dependent stability and activity studies of the ColE7 endonuclease domain in complex with DNA/Zn²⁺ or inhibitor/Ni²⁺, *Prot Sci* 15:269-280
- [171] Y.-S. Cheng, K.-C. Hsia, L. G. Doudeva, K.-F. Chak, H. S. Yuan, (2002) The Crystal Structure of the Nuclease Domain of Colicin E7 Suggests a Mechanism for Binding to Double-stranded DNA by the H-N-H Endonucleases, *J Mol Biol* 324:227-236
- [172] A. Czene, E. Németh, I. G. Zóka, N. I. Jakab-Simon, T. Körtvélyesi, K. Nagata, H. E. M. Christensen, B. Gyurcsik, (2013) The role of the N-terminal loop in the function of the colicin E7 nuclease domain, *J Biol Inorg Chem* 18:309-321
- [173] Z. Shi, K.-F. Chak, H. S. Yuan, (2005) Identification of an Essential Cleavage Site in ColE7 Required for Import and Killing of Cells*, *J Biol Chem* 280:24663-24668
- [174] E. Németh, M. N. Asaka, K. Kato, Z. Fábrián, C. Oostenbrink, H. E. M. Christensen, K. Nagata, B. Gyurcsik, (2018) Chemical Approach to Biological Safety: Molecular-Level Control of an Integrated Zinc Finger Nuclease, *ChemBioChem* 19:66-75
- [175] D. A. Wah, J. A. Hirsch, L. F. Dorner, I. Schildkraut, A. K. Aggarwal, (1997) Structure of the multimodular endonuclease FokI bound to DNA, *Nature* 388:97-100
- [176] J. Smith, M. Bibikova, F. G. Whitby, A. R. Reddy, S. Chandrasegaran, D. Carroll, (2000) Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains, *Nucleic Acids Res* 28:3361-3369
- [177] S. Durai, M. Mani, K. Kandavelou, J. Wu, M. H. Porteus, S. Chandrasegaran, (2005) Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells, *Nucleic Acids Res* 33:5978-5990

- [178] M. Szczepek, V. Brondani, J. Büchel, L. Serrano, D. J. Segal, T. Cathomen, (2007) Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases, *Nat Biotechnol* 25:786-793
- [179] E. Németh, G. K. Schilli, G. Nagy, C. Hasenhindl, B. Gyuresik, C. Oostenbrink, (2014) Design of a colicin E7 based chimeric zinc-finger nuclease, *J Comput Aided Mol Des* 28:841-850
- [180] K. Hyongbum, K. Jin-Soo, (2014) A guide to genome engineering with programmable nucleases, *Nat Rev Genet* 15:321-334
- [181] M. Nagaoka, M. Hagihara, J. Kuwahara, Y. Sugiara, (1994) A Novel Zinc Finger-Based DNA Cutter: Biosynthetic Design and Highly Selective DNA Cleavage, *J Am Chem Soc* 116:4085-4086
- [182] P. Nambisan, (2017) Recombinant DNA Technology and Genetically Modified Organisms, In: *An Introduction to Ethical Safety and Intellectual Property Rights Issues in Biotechnology* 83-126 Academic Press
- [183] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, (2012) *Biochemistry* 7th edition W.H. Freeman & COMPANY Book Companion
- [184] M. R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J.-C. Sanchez, K. L. Williams, R. D. Appel, D. F. Hochstrasser, A. J. Link, (2005) "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server In: *The Proteomics Protocols Handbook* 571-607 Humana Press Totowa, NJ
- [185] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, (2005) How to study proteins by circular dichroism, *BBA* 1751:119-139
- [186] N. Sreerama, R. W. Woody, (2000) Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set, *Anal Biochem* 287:252-260
- [187] Circular Dichroism (CD) Spectroscopy [Online]. <http://www.proteinchemist.com/cd/cdspec.html>. [Hozzáférés dátuma: 2023.02.24.]
- [188] M. J. Andrew, H. V. Søren, T. Ye, J. W. Robert, W. A. B., (2007) Synchrotron Radiation Circular Dichroism (SRCD) spectroscopy: New beamlines and new applications in biology, *Spectrosc* 21:245-255
- [189] A. J. Miles, R. W. James, A. Brown, D. T. Clarke, S. C. J., Y. Tao, B. A. Wallace, H. V. S., (2008) Light flux density threshold at which protein denaturation is induced by synchrotron radiation circular dichroism beamlines, *J. Synchrotron Radiat* 15:420-422
- [190] I. Marszałek, A. Krężel, W. Goch, I. Zhukov, I. Paczkowska, W. Bal, (2016) Revised stability constant, spectroscopic properties and binding mode of Zn(II) to FluoZin-3, the most common zinc probe in life sciences, *J Inorg Biochem* 161:107-114
- [191] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, L.-N. Lin, (1989) Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter, *Anal Biochem* 179:131-137
- [192] B. W. Sigurskjold, (2000) Exact Analysis of Competition Ligand Binding by Displacement Isothermal Titration Calorimetry, *Anal Biochem* 277:260-266
- [193] A. Belczyk-Ciesielska, B. Csipak, B. Hajdu, A. Sparavier, M. N. Asaka, K. Nagata, B. Gyuresik, W. Bal, (2018) Nickel(II)-promoted specific hydrolysis of zinc finger proteins, *Metallomics* 10:1089-1098
- [194] M. P. Malakhov, M. R. Mattern, O. A. Malakhova, M. Drinker, S. D. Weeks, T. R. Butt, (2004) SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins, *J Struct Funct Genomics* 5:75-86
- [195] A. E. Martell, R. M. Smith, R. J. Motekaitis, (2001) NIST Standard Reference Database 46: Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes, 22:270-279. Texas A&M University College Station TX 77843-3255 : U.S. Department of Commerce Technology Administration National Institute of Standards and Technology Standard Reference Data Program Gaithersburg
- [196] G. Anderegg, (1982) Critical survey of stability constants of NTA complexes, *Pure Appl Chem* 12:2693-2758
- [197] K. A. Webster, H. Prentice, N. H. Bishopric, (2001) Oxidation of Zinc Finger Transcription Factors: Physiological Consequences, *ARS* 3:535-548
- [198] J. N. Holloway, C. N. Reilley, (1960) Metal Chelate Stability Constants of Aminopolycarboxylate Ligands, *Anal Chem* 32:249-256

- [199] M. C. Carpenter, A. S. Shah, S. DeSilva, A. Gleaton, A. Su, B. Goundie, M. L. Croteau, M. J. Stevenson, D. E. Wilcox, R. N. Austin, (2016) Thermodynamics of Pb(II) and Zn(II) binding to MT-3, a neurologically important metallothionein, *Metallomics* 8:605-617
- [200] J. Blok, (2005) Environmental exposure of road borders to zinc, *Sci Total Environ* 348:173-190
- [201] U. Heinz, M. Kiefer, A. Tholey, H.-W. Adolph, (2005) On the Competition for Available Zinc, *J Biol Chem* 280:3197–3207
- [202] R. B. Othman, N. G. Buckman, J. O. Hill, R. J. Magee, (1990) A thermometric titration study of the interaction of Al³⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ with ethylenediaminetetraacetic acid, *Thermochim Acta* 157:335-345
- [203] K. Doi, M. Tanaka, (1974) The use of auxiliary complexing agents in the differential compleximetric titration of zinc and cadmium with thermometric end-points, *Anal Chim Acta* 71:464-467
- [204] D. L. Wright, J. H. Holloway, C. N. Reilley, (1965) Heat and Entropies of Formation of Metal Chelates of Polyamine and Polyaminocarboxylate Ligands., *Anal Chem* 37:884-892
- [205] R. A. Care, L. A. K. Staveley, (1956) The thermodynamics of the formation of complex ions of ethylenediaminetetra-acetic acid and bivalent cations, *J Chem Soc*:4571-4579
- [206] R. G. Charles, (1954) Heats and Entropies of Reaction of Metal Ions with Ethylenediaminetetraacetate*, *J Am Chem Soc* 76:5854-5858
- [207] G. Anderegg, (1977) CRITICAL SURVEY OF STABILITY CONSTANTS OF EDTA COMPLEXES, In: *Critical Evaluation of Equilibrium Constants in Solution: Stability Constants of Metal Complexes* 1-36 Pergamon
- [208] C. A. Blasie, J. M. Berg, (2002) Structure-based thermodynamic analysis of a coupled metal binding-protein folding reaction involving a zinc finger peptide, *Biochem* 41:15068-15073
- [209] C. A. Blasie, J. M. Berg, (2004) Entropy–Enthalpy Compensation in Ionic Interactions Probed in a Zinc Finger Peptide, *Biochem* 43:10600–10604
- [210] B. Hajdu, É. Hunyadi-Gulyás, K. Kato, A. Kawaguchi, K. Nagata, B. Gyurcsik, (2023) Zinc binding of a Cys2His2-type zinc finger protein is enhanced by the interaction with DNA, *J Biol Inorg Chem nyomtatásban*
- [211] J. R. Desjarlais, J. M. Berg, (1993) Use of a zinc-finger consensus sequence framework and specificity rules to design specific DNA binding proteins, *PNAS* 90:2256-2260
- [212] C.-C. Chou, S.-Y. Wei, Y.-C. Lou, C. Chen, (2017) In-depth study of DNA binding of Cys2His2 finger domains in testis zinc-finger protein, *PLoS ONE* 12:1–17
- [213] Y. Shi, J. M. Berg, (1995) A direct comparison of the properties of natural and designed zinc-finger proteins, *Chem Biol* 2:83–89
- [214] K. Matsushita, Y. Sugiura, (2001) Effect of arginine mutation of alanine-556 on DNA recognition of zinc finger protein Sp1, *Bioorg Med Chem* 9:2259-2267
- [215] E. Nurmamedov, R. K. Yengo, H. Uysal, R. Karlsson, M. M. Thunnissen, (2009) New insights into DNA-binding behavior of Wilms Tumor Protein (WT1)—A dual study, *Biophys Chem* 145:116–125
- [216] T. B. Hamilton, F. Borel, P. J. Romaniuk, (1998) Comparison of the DNA Binding Characteristics of the Related Zinc Finger Proteins WT1 and EGR1, *Biochem* 37:2051-2058
- [217] X. Chen, A. Agarwal, D. P. Giedroc, (1998) Structural and Functional Heterogeneity among the Zinc Fingers of Human MRE-Binding Transcription Factor-1, *Biochem* 37:11152–11161
- [218] C. A. Kemme, R. Marquez, R. H. Luu, J. Iwahara, (2017) Potential role of DNA methylation as a facilitator of target search processes for transcription factors through interplay with methyl-CpG-binding proteins, *Nucleic Acids Res* 45:7751-7759
- [219] A. Chattopadhyay, L. Zandarashvili, R. H. Luu, J. Iwahara, (2016) Thermodynamic Additivity for Impacts of Base-Pair Substitutions on Association of the Egr-1 Zinc-Finger Protein with DNA, *Biochem* 55:6467-6474
- [220] J. C. Miller, C. O. Pabo, (2001) Rearrangement of side-chains in a zif268 mutant highlights the complexities of zinc finger-DNA recognition, *J Mol Biol* 313:309-315
- [221] X. Liao, K. R. Clemens, L. Tennant, P. E. Wright, J. M. Gottesfeld, (1992) Specific interaction of the first three zinc fingers of TFIIIA with the internal control region of the Xenopus 5 S RNA gene, *J Mol Biol* 223:857-871
- [222] J. R. Liggins, P. L. Privalov, (2000) Energetics of the Specific Binding Interaction of the First Three Zinc Fingers of the Transcription Factor TFIIIA With its Cognate DNA Sequence, *Proteins* 41:50-62

- [223] H. B. Houbaviy, S. K. Burley, (2001) Thermodynamic analysis of the interaction between YY1 and the AAV P5 promoter initiator element, *Chem Biol* 8:179-187
- [224] F. M. Golebiowski, A. Górecki, P. Bonarek, M. Rapala-Kozik, A. Kozik, M. Dziedzicka-Wasylewska, (2012) An investigation of the affinities, specificity and kinetics involved in the interaction between the Yin Yang 1 transcription factor and DNA, *Febs J* 279:3147-3158
- [225] T. P. Dalton, D. Bittel, G. K. Andrews, (1997) Reversible activation of mouse metal response element-binding transcription factor 1 DNA binding involves zinc interaction with the zinc finger domain, *Mol Cell Biol* 17:2781-2789
- [226] R. Kothinti, N. M. Tabatabai, D. H. Petering, (2011) Electrophoretic mobility shift assay of zinc finger proteins: Competition for Zn²⁺ bound to Sp1 in protocols including EDTA, *J Inorg Biochem* 105:569-576
- [227] U. Rana, R. Kothinti, J. Meeusen, N. M. Tabatabai, S. Krezoski, D. H. Petering, (2008) Zinc binding ligands and cellular zinc trafficking: Apo-metallothionein, glutathione, TPEN, proteomic zinc, and Zn-Sp1, *J Inorg Biochem* 102:489-499
- [228] C. A. Blindauer, M. D. Harrison, J. A. Parkinson, A. K. Robinson, J. S. Cavet, N. J. Robinson, P. J. Sadler, (2001) A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity, *PNAS* 98:9593-9598
- [229] M. Vašák, C. Berger, J. H. Kägi, (1984) Dynamic structure of metallothionein, *FEBS Letters* 168:174-178
- [230] A. Muñoz, A. R. Rodríguez, (1995) Electrochemical behavior of metallothioneins and related molecules. Part III: Metallothionein, *Electroanalysis* 7:674-680
- [231] T. B. J. Pinter, M. J. Stillman, (2014) The Zinc Balance: Competitive Zinc Metalation of Carbonic Anhydrase and Metallothionein 1A, *Biochem* 53:6276-6285
- [232] K. Kluska, G. Veronesi, A. Deniaud, B. Hajdu, B. Gyurcsik, W. Bal, A. Krezel, (2022) Structures of Silver Fingers and a Pathway to Their Genotoxicity, *Angew Chem Int Ed* 61:e202116621
- [233] S. Dong, M. Shirzadeh, L. Fan, A. Laganowsky, D. H. Russell, (2020) Ag⁺ Ion Binding to Human Metallothionein-2A Is Cooperative and Domain Specific, *Anal Chem* 92:8923-8932
- [234] J. H. Kägi, B. L. Vallee, J. M. Carlson, (1961) Metallothionein: a Cadmium and Zinc-containing Protein from Equine Renal Cortex: II. PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES, *J Biol Chem* 236:2435-2442
- [235] H. Willner, M. Vasak, J. H. R. Kaegi, (1987) Cadmium-thiolate clusters in metallothionein: spectrophotometric and spectropolarimetric features, *Biochem* 26:6287-6292
- [236] L. A. Basile, J. E. Coleman, (1992) Optical activity associated with the sulfur to metal charge transfer bands of Zn and Cd GAL4, *Prot Sci* 1:617-624
- [237] M. Palmieri, G. Malgieri, L. Russo, I. Baglivo, S. Esposito, F. Netti, A. Del Gatto, I. de Paola, L. Zaccaro, P. V. Pedone, C. Isernia, D. Milardi, R. Fattorusso, (2013) Structural Zn(II) Implies a Switch from Fully Cooperative to Partly Downhill Folding in Highly Homologous Proteins, *J Am Chem Soc* 135:5220-5228
- [238] B. Hajdu, É. Hunyadi-Gulyás, B. Gyurcsik, (2023) Interactions of an Artificial Zinc Finger Protein with Cd(II) and Hg(II): Competition and Metal and DNA Binding, *Inorganics* 11:1-18
- [239] R. Grazioso, S. García-Viñuales, L. Russo, G. D'Abrosca, S. Esposito, L. Zaccaro, R. Iacovino, D. Milardi, R. Fattorusso, G. Malgieri, C. Isernia, (2020) Substitution of the Native Zn(II) with Cd(II), Co(II) and Ni(II) Changes the Downhill Unfolding Mechanism of Ros87 to a Completely Different Scenario, *Int J Mol Sci* 21:1422-0067
- [240] D. Szunyogh, B. Gyurcsik, F. H. Larsen, M. Stachura, P. W. Thulstrup, L. Hemmingsen, A. Jancsó, (2015) ZnII and HgII binding to a designed peptide that accommodates different coordination geometries, *Dalton Trans* 44:12576-12588
- [241] J. H. Kägi, M. Vasák, K. Lerch, D. E. Gilg, P. Hunziker, W. R. Bernhard, M. Good, (1984) Structure of mammalian metallothionein., *Environ Health Perspect* 54:93-103
- [242] W. Stricks, I. M. Kolthoff, (1953) Reactions between Mercuric Mercury and Cysteine and Glutathione. Apparent Dissociation Constants, Heats and Entropies of Formation of Various Forms of Mercuric Mercapto-Cysteine and -Glutathione, *J Am Chem Soc* 75:5673-5681
- [243] S. Pires, J. Habjanič, M. Sezer, C. M. Soares, L. Hemmingsen, O. Iranzo, (2012) Design of a Peptidic Turn with High Affinity for HgII, *Inorg Chem* 51:11339-11348

- [244] T. M. DeSilva, G. Veglia, F. Porcelli, A. M. Prantner, S. J. Opella, (2002) Selectivity in heavy metal-binding to peptides and proteins, *Biopolymers* 64:189-197
- [245] P. Rousselot-Pailley, O. S  n  que, C. Lebrun, S. Crouzy, D. Boturyn, P. Dumy, M. Ferrand, P. Delangle, (2006) Model Peptides Based on the Binding Loop of the Copper Metallochaperone Atx1: Selectivity of the Consensus Sequence MxCxxC for Metal Ions Hg(II), Cu(I), Cd(II), Pb(II), and Zn(II), *Inorg Chem* 45:5510-5520
- [246] H. A. E. H. A. ELHAMEED, (2020) ARTIFICIAL METALLONUCLEASES - MOLECULAR TOOLS FOR GENE THERAPY OF CANCER, Doktori disszert  ci  , Szegedi Tudom  nyegyetem
- [247] H. A. A. Elhameed, B. Hajdu, R. K. Balogh, E. Hermann,   . Hunyadi-Gulyás, B. Gyurcsik, (2019) Purification of proteins with native terminal sequences using a Ni(II)-cleavable C-terminal hexahistidine affinity tag, *Protein Expr Purif* 159:53–59
- [248] H. A. H. Abd Elhameed, B. Hajdu, A. Jancsó, A. Kéri, G. Galbács,   . Hunyadi-Gulyás, B. Gyurcsik, (2020) Modulation of the catalytic activity of a metallonuclease by tagging with oligohistidine, *J Inorg Biochem* 206:111013
- [249] N. I. Jakab, O. L  rincz, A. Jancsó, T. Gajda, B. Gyurcsik, (2008) Approaching the minimal metal ion binding peptide for structural and functional metalloenzyme mimicking, *Dalton Trans*:6987-6995
- [250] O. Szil  gyi, K.   sz, K. Várnagy, D. Sanna, H. S  li-Vargha, I. Sóvágó, G. Micera, (2006) Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) and zinc(II) complexes of bis(imidazol-2-yl) derivatives of tripeptides, *Polyhedron* 25:3173-3182
- [251] B. Hajdu, (2018) Cinkujj feherj  k módosítása – alkalmaz  si lehet  s  gek, Diplomamunka, Szegedi Tudom  nyegyetem
- [252] J. Benesty, J. Chen, Y. Huang, I. Cohen, (2009) Pearson Correlation Coefficient, In *Noise Reduction in Speech Processing 1-4* Springer Berlin Heidelberg
- [253] J. Sambrook, D. W. Russel, (2006) Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform, In *Cold Spring Harbor Protocols*
- [254] P. Gerhardt, R. G. Murray, N. R. Krieg, W. A. Wood, (1994) *Methods for General and Molecular Bacteriology* Washington D.C.: American Society for Microbiology
- [255] M. A. Marini, W. J. Evans, R. L. Berger, (1985) Use of the twin-cell differential titration calorimeter for binding studies. I. EDTA and its calcium complex, *J Biochem Bioph Meth* 10:273-285
- [256] H. Fukada, K. Takahashi, (1998) Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride, *Proteins: Struct Funct Bioinf* 33:159-166
- [257] L. Alderighi, P. Lucia, S. Midollini, A. Vacca, (2003) Co-ordination chemistry of the methylmercury(II) ion in aqueous solution: a thermodynamic investigation, *Inorg Chim Acta* 356:8-18
- [258] J. Bjerrum, (1941) *Metal amine formation in aqueous solution* Copenhagen, Haase
- [259] M. I. Beck, I. Nagyp  l, D. A. Durham, (1990) *Chemistry of complex equilibria* Budapest and Chichester: Akad  miai Kiad   and Ellis Horwood Limited Publishers
- [260] L. M. Malaiyandi, H. Sharthiya, A. N. Barakat, J. R. Edwards, K. E. Dineley, (2019) Using FluoZin-3 and fura-2 to monitor acute accumulation of free intracellular Cd²⁺ in a pancreatic beta cell line, *Biometals* 32:951-964

9 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Gyurcsik Bélának, hogy laboratóriumában kutathattam BSc, MSc és PhD tanulmányaim során. Az elmúlt kilenc év során bármikor fordulhattam hozzá segítségért, tanácsért, és mindig biztosított lehetőséget, hogy változatos tématerületeken, helyzetekben és helyszíneken fejlesszem tudásom. Meghatározó szerepe volt abban, hogy ma úgy látom a világot, ahogy, és a szakmai tudáson felül megtanított a kutatás, oktatás szeretetére is.

Köszönettel tartozom a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék korábbi és jelenlegi vezetőinek, Dr. Galbács Gábornak és Dr. Enyedy Éva Annának, hogy lehetőséget biztosítottak doktori munkám elvégzéséhez a tanszéken.

Köszönettel tartozom volt és jelenlegi hallgatóimnak, Tóth Gábornak, Albeck Gyulának, Kis Máté Leventének, Fazekas Bettinának, Homoki Dominik Zsoltnak, Horvát Melindának, Valtner Tamásnak és Buránszki Józsefnek, akik laboratóriumi munkájukkal nagyban hozzájárultak doktori disszertációm elkészüléséhez és témavezetésük során én is sok újdonságot tanulhattam. Külön köszönettel tartozom Csáki Rékának, aki szintén rengeteg segítséget nyújtott kísérleteim során.

Hálás vagyok laboratóriumunk korábbi és jelenlegi PhD hallgatóinak, munkatársainak, Hermann Enikőnek, Dr. Heba Abd Elhameednek, Dr. Balogh Ria Katalinnak, Fodor Anna Eszternek, Zeyad Hasan Nafaeenak és Tóth Annamáriának a mindennapok során nyújtott tanácsaikért, segítségükért.

Köszönettel tartozom Dr. Hunyadi-Gulyás Évának az ESI-MS mérések kivitelezésében és kiértékelésében nyújtott segítségével, Dr. Várnagy Katalinnak, amiért rendelkezésünkre bocsájtotta a Gly-BIMA ligandumot, Dr. Jancsó Attilának többek között, amiért segítséget nyújtott a ligandum HPLC tisztítása során, Dr. Milan Koziseknek a pETM11-SUMO3 bakteriális DNS hordozóért, Dr. Artur Kręzelnek a PAR ligandumért. Köszönöm együttműködő partnereinknek, Dr. Kohsuke Katonak, Dr. Atsushi Kawaguchinak és Dr. Kyosuke Nagatanak amiért lehetőséget biztosítottak rá, hogy 5 hónapot tölthessek a Tsukubai Egyetemen.

Hálás vagyok a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport és tanszékünk valamennyi dolgozójának a munkám során nyújtott segítségükért, és amiért minden nap jó hangulatban telt a tanszéken, a PhD szobában és a laborokban – külön kiemelve Dr. Dömötör Orsolyát, Dr. Mészáros János Pétert és Pósa Vivient.

Nagyon köszönöm Dr. Mészáros János Péternek, dr. Balázs Noéminek, Tóth Annamáriának, Szűcs Andornak és Jenei Dávidnak, hogy átnézték a dolgozatot.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak, hogy mindig mellettem álltak és támogattak a céljaim elérésében.

Köszönöm az anyagi támogatást a Kulturális és Innovációs Minisztérium UNKP-18-3-II-SZTE-6; UNKP-19-3-SZTE-99; UNKP-21-3-SZTE-432; UNKP-22-4-SZTE-491 kódszámú pályázatainak, a Tempus Közalapítvány CM-SMP-KA107/471080/2022 Campus Mundi pályázatának, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal GINOP-2.3.2-15-2016-00038; 2019-2.1111-TÉT-2019-00089 és K_16/120130 pályázatainak, továbbá az Európai Unió COST ARBRE MOBIEU, MOSBRI és Horizon 2020 CALIPSOplus (grant no. 730872; grant no. 739593) pályázatainak és a Japán Tudományfejlesztési társaság pályázatának (JSPS).

10 Közlemények listája

A dolgozat alapját képező közlemények:

1. A. Belczyk-Ciesielska, B. Csipak, **B. Hajdu**, A. Sparavier, M.N. Asaka, K. Nagata, B. Gyurcsik, W. Bal: Nickel (II)-promoted specific hydrolysis of zinc finger proteins, *Metallomics*, DOI: 10.1039/C8MT00098K IF = 3,571
 2. H.A.H. Abd Elhameed, **B. Hajdu**, R. K Balogh, E. Hermann, É. Hunyadi-Gulyás, B. Gyurcsik: Purification of proteins with native terminal sequences using a Ni (II)-cleavable C-terminal hexahistidine affinity tag, *Protein Expr. Purif.*, DOI: 10.1016/j.pep.2019.03.009 IF = 1,513
 3. H.A.H. Abd Elhameed, **B. Hajdu**, A. Jancsó, A. Kéri, G. Galbács, É. Hunyadi-Gulyás, B. Gyurcsik: Modulation of the catalytic activity of a metallonuclease by tagging with oligohistidine, *J. Inorg. Biochem.*, DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2020.111013 IF = 4,155
 4. K. Kluska, G. Veronesi, A. Deniaud, **B. Hajdu**, B. Gyurcsik, W. Bal, A. Krezel: Structures of silver fingers and a pathway to their genotoxicity, *Angew. Chem. Int. Ed.*, DOI: 10.1002/anie.202116621 IF = 16,823 (2021)
 5. **B. Hajdu**, É. Hunyadi-Gulyás, B. Gyurcsik: Interactions of an artificial zinc finger protein with Cd(II) and Hg(II): Competition and metal and DNA binding, *Inorganics*, DOI: 10.3390/inorganics11020064 IF = 3,149 (2021)
 6. **B. Hajdu**, É. Hunyadi-Gulyás, K. Kato, A. Kawaguchi, K. Nagata, B. Gyurcsik: Zinc binding of a Cys2His2-type zinc finger protein is enhanced by the interaction with DNA, *J. Biol. Inorg. Chem.*, DOI:10.1007/s00775-023-01988-1 IF = 3,862 (2021)
- Σ IF = 33,073

Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények:

1. **B. Hajdu**, G. Czako: Benchmark ab Initio Characterization of the Complex Potential Energy Surfaces of the X- + NH₂Y [X, Y = F, Cl, Br, I] Reactions, *J. Phys. Chem. A*, DOI: 10.1021/acs.jpca.7b11927 IF = 2,641
 2. N. Ivošević DeNardis, J. Pečar Ilić, I. Ružić, N. Novosel, T. Mišić Radić, A. Weber, D. Kasum, Z. Pavlinska, R.K. Balogh, **B. Hajdu**, A. Marček Chorvátová, B. Gyurcsik: Algal cell response to laboratory-induced cadmium stress: a multimethod approach, *Eur. Biophys J.*, DOI: 10.1007/s00249-019-01347-6 IF = 2,094
 3. V. Pósa, **B. Hajdu**, G. Tóth, O. Dömötör, C. R. Kowol, B. K. Keppler, G. Spengler, B. Gyurcsik, Éva A. Enyedy: The coordination modes of (thio)semicarbazone copper(II) complexes strongly modulate the solution chemical properties and mechanism of anticancer activity, *J. Inorg. Biochem.*, DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2022.111786 IF = 4,336 (2021)
 4. T.V. Petrasheuskaya, F. Kovács, N. Igaz, A. Rónavári, **B. Hajdu**, L. Bereczki, N.V. May, G. Spengler, B. Gyurcsik, M. Kiricsi, É. Frank, É.A. Enyedy: Estradiol-based salicylaldehyde (thio)semicarbazones and their copper complexes with anticancer, antibacterial and antioxidant activities, *Molecules*, DOI 10.3390/molecules28010054 IF = 4,927 (2021)
- Σ IF = 13,998
 $\Sigma\Sigma$ IF = 47,071

Az értekezés anyagához kapcsolódó saját előadások, poszterek:

1. **Hajdu B.**, Kiricsi M., Moncol J. Gyurcsik B. (magyar nyelvű előadás)
Kismolekulák és fehérjék kölcsönhatása DNS-sel fémionok jelenlétében
52. Komplex Kémiai Kollokvium, 2018.05.22-24 Balatonvilágos, Magyarország
2. **Hajdu B.**, Kato K., Kyosuke N., Gyurcsik B. (magyar nyelvű előadás)
Fém tartalmú fehérje alapú nukleázok DNS specifikitása
53. Komplex Kémiai Kollokvium, 2019.05.21-23 Velence, Magyarország
3. **B. Hajdu**, H. Abd Elhameed, E. Hermann, É. Hunyadi-Gulyás, K. Kato, N. Kyosuke, W. Bal, B. Gyurcsik (angol nyelvű poszter)
Applications of Ni(II)-Induced Peptide Bond Cleavage
19. ICBIC, 2019.08.11-16 Interlaken, Svájc
4. **B. Hajdu**, R. Csáki, K. Kato, N. Kyosuke, B. Gyurcsik (angol nyelvű előadás)
NOVEL ZINC FINGER-BASED ARTIFICIAL NUCLEASES
ARBRE-MOBIEU, 2020.02.24-26 Prága, Csehország
5. **Hajdu B.**, Gyurcsik B. (magyar nyelvű előadás)
Hogyan szerkeszthetünk DNS-t?
XV. PSAK, 2020.10.08-10 online
6. **Hajdu B.**, Gyurcsik B. (magyar nyelvű előadás)
Cinkujj fehérjék kölcsönhatása fémionokkal
54. Komplex Kémiai Kollokvium, 2021.05.26-27 online
7. **B. Hajdu**, B. Gyurcsik (angol nyelvű poszter)
Metal binding of a potential zinc finger nuclease
35th Anniversary Protein Science Symposium, 2021.07.07-14 online
Protein Sci. 2021, 30, 69.
8. **B. Hajdu**, B. Gyurcsik (angol nyelvű poszter)
Interaction of an artificial zinc finger protein with toxic metal ions.
Workshop on Structural Biophysics, 2021.12.06-10 Bordeaux, Franciaország
9. **B. Hajdu**, B. Gyurcsik (angol nyelvű poszter)
Interaction of an artificial zinc finger protein with toxic metal ions
1st MOSBRI scientific conference, 2022.06.20-22 Párizs, Franciaország
10. **B. Hajdu**, É. Hunyadi-Gulyás, B. Gyurcsik (angol nyelvű poszter)
Interaction of a Cys2His2 zinc finger protein with toxic metal ions
16th EuroBIC, 2022.07.17-21 Grenoble, Franciaország
11. **Hajdu B.**, Gyurcsik B. (magyar nyelvű előadás)
Mesterséges cinkujj fehérje kölcsönhatása toxikus fémionokkal
XVI. PSAK, 2022.10.13-15 Szeged

Az értekezés anyagához kapcsolódó előadások, poszterek társszerzőként:

1. Z. Fábián, B. Hajdu, E. Hermann, H. Abd Elhameed, W. Bal, B. Gyurcsik (angol nyelvű poszter)
Affinity protein purification resulting in protein sequence without remaining amino acid residues.
ISMEC2018, International Symposium on Metal Complexes, 2018.06.03-07 Firenze, Olaszország
2. E. Németh, Z. Fábián, **B. Hajdu**, E. Hermann, R.K. Balogh, C. Oostenbrink, K. Nagata, B. Gyurcsik (angol nyelvű előadás)
Design and investigation of novel zinc finger–NCoIE7-based artificial nucleases.
ISMEC2018, International Symposium on Metal Complexes, 2018.06.03-07 Firenze, Olaszország
3. B. Gyurcsik, Z. Fábián, E. Hermann, E. Németh, **B. Hajdu**, R.K. Balogh, H.A. Hosiny, C. Oostenbrink, K. Nagata (angol nyelvű előadás)
Development of novel zinc finger-based artificial nucleases.
43rd International Conference on Coordination Chemistry (ICCC2018), 2018.07.30-08.04 Sendai, Japán
4. B. Gyurcsik, B. Hajdu, Z. Fábián, E. Hermann, E. Németh, R.K. Balogh, H. Hosiny, C. Oostenbrink, K. Nagata (angol nyelvű poszter)
Multiple allosteric control in novel zinc finger-based artificial nucleases.
14th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC 14), 2018.08.26-30 Birmingham, Egyesült Királyság
5. Gyurcsik B., Hajdu B., H.A.H. Abd Elhameed, Balogh R.K., Hermann E., Németh E. (magyar nyelvű előadás)
Szabályozott fehérjealapú mesterséges enzimek fejlesztése
Reakciókinetikai és Fotokémiai Munkabizottság és a Koordinációs Kémiai Munkabizottság Munkabizottsági ülése, 2018.11.8-9 Veszprém
6. B. Gyurcsik, B. Hajdu, E. Hermann, R.K. Balogh, H.A.H. Abd Elhameed (angol nyelvű előadás)
Intramolecular allosteric control of NCoIE7 metallonuclease based on the specific protease action of nickel(II) ions.
Molecular Biophysics: ABC of the puzzle of Life, ARBRE-MOBIEU Plenary Meeting, 2019.03.18-20 Zágráb, Horvátország
7. Gyurcsik B., Hajdu B., H.A.H. Abd Elhameed, W. Bal, K. Nagata (magyar nyelvű előadás)
Fémionok által szabályozott mesterséges nukleázok.
53. Komplexkémiai Kollokvium és az MTA Koordinációs Kémiai Munkabizottság ülése, 2019.05.21-23 Velence
8. Hermann E., H.A.H. Abd Elhameed, Németh E., Csáki R., **Hajdu B.**, C. Oostenbrink, Gyurcsik B (magyar nyelvű előadás)
A C45-ZF-N85 összetett cinkujj-nukleáz és mutánsainak előállítása és vizsgálata.
MKE Vegyészkonferencia, 2019.06.24-26 Eger
9. H.A. Abd Elhameed, B. Hajdu, E. Hermann, M.K. Goppisetty, M. Kiricsi, D.A. Ungor, E. Csapó, W. Bal, B. Gyurcsik (angol nyelvű előadás)
Metal ions as regulatory elements of artificial nucleases.
ISMEC2019, International Symposium on Metal Complexes, 2019.06.11-14 Debrecen

10. H.A.H. Abd Elhameed, **B. Hajdu**, B. Gyurcsik (angol nyelvű poszter)
Modulation of catalytic activity of the NColE7 metallonuclease.
ISMEC2019, International Symposium on Metal Complexes, 2019.06.11-14 Debrecen
11. B. Gyurcsik, **B. Hajdu**, H.A. Abd Elhameed, W. Bal, K. Nagata (angol nyelvű előadás)
Metal ions as regulatory elements of artificial DNA cleaving enzymes.
15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC15),
2019.06.02-05 Nara, Japán
12. E. Hermann, H.A. Abd Elhameed, E. Németh, R. Csáki, **B. Hajdu**, B. Gyurcsik (angol nyelvű előadás)
Purification and characterization of the C45-ZF-N85 artificial zinc-finger nuclease and its mutants.
XXVII. International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry (XXVII. ICCBIC), 2019.06.02-07 Smolenice, Szlovákia
13. B. Gyurcsik, **B. Hajdu**, H.A.H. Abd Elhameed, W. Bal, K. Nagata (angol nyelvű poszter)
Metal ions as regulatory elements of artificial DNA cleaving enzymes.
Serbian Biochemical Society, Ninth Conference with international participation,
University of Belgrade, 2019.11.14-16 Belgrád, Szerbia
14. H.A.H. Abd Elhameed, **B. Hajdu**, N. Igaz, M.K. Goppisetty, M. Kiricsi, D. Ungor, E. Csapó, B. Gyurcsik (angol nyelvű poszter)
6×His tag modulates the catalytic activity of NColE7 nuclease.
Living Molecules: Towards Integrative Biophysics of the Cell, ARBRE-MOBIEU
Plenary Meeting, 2020.02.24-26 Prága, Csehország
15. B. Gyurcsik, **B. Hajdu**, H.A. Abd Elhameed, K. Nagata (angol nyelvű előadás)
Metal ions as regulators of hydrolytic enzymes.
XXVIII. International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry
(XXVIII. ICCBIC), 2022.06.05-10 Smolenice, Szlovákia
16. B. Gyurcsik, **B. Hajdu**, H.A. Abd Elhameed, A. Jancsó, É. Hunyadi-Gulyás (angol nyelvű előadás)
Interplay of multiple metal ion binding sites regulates the catalytic activity of metalloenzymes
EuroBIC-16, 16th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2022.07.17-
21 Grenoble, Franciaország

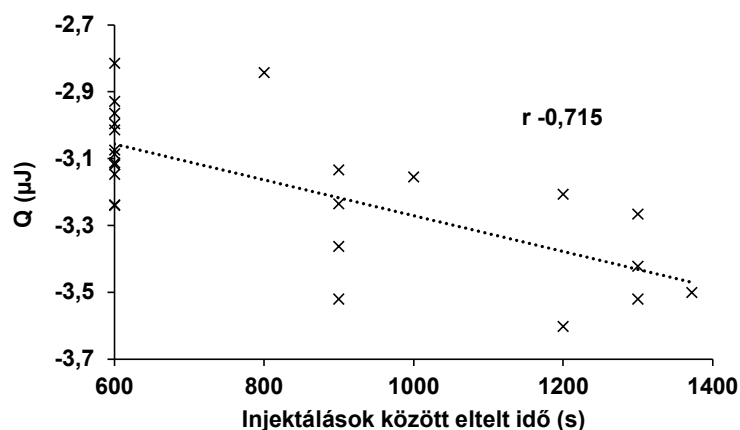
Az értekezés anyagához nem kapcsolódó előadások és poszterek:

1. **Hajdu B.**, Kis M.L., Ivayla P., Gyurcsik B. (magyar nyelvű előadás)
Monensin A – egy ionofór antibiotikum fémkomplexei kétértékű fémionokkal
54. Komplex Kémiai Kollokvium, 2021.05.26-27 online
2. Hajdu B., Kis M.L., Ivayla P., Gyurcsik B. (magyar nyelvű előadás)
Monensin A kölcsönhatása kétértékű fémionokkal
XLIV. Kémiai Előadói Napok, 2021.10.26-27 Szeged
3. V. Pósa, **B. Hajdu**, G. Tóth, O. Dömötör, C.R. Kowol, B.K. Keppler, G. Spengler, B. Gyurcsik, É.A. Enyedy (angol nyelvű poszter)
Effects of variations in coordination modes of copper(II) complexes of (thio)semicarbazones on solution chemical and biological properties
COST NECTAR 4th Annual Conference, 2021.09.06-08 Ljubljana, Szlovénia

F1. Függelék

F1. táblázat: CLARIOstar Plus lemezolvasó automatizált titrálásainak programja.

```
;Protocol Names:
st1:"Scan"
st2:"Injection"
;Plate ID:
ID1:""
;Number of readings(number of kinetic cycles):
NumberOfReadings1:=20
;Define the time in seconds after which the plate should be measured again:
CycleTime:=900
;Define the shaking parameters
ShakingTime:=30
ShakingFrequency:=150
;set target temperature
TargetTemp:=25.0
;=====
R_Temp 0.1 ;switch on temperature monitoring
R_Temp TargetTemp ;switch incubator on
wait for temp >= TargetTemp ;wait until target temperature reached
for Reading:=1 to NumberOfReadings1 do begin ;kinetic loop
ID2:"Script"
R_Run"<st1>" ;execute test protocol
R_Run"<st2>" ;execute first injection
;merge horizontal (kinetic):
if Reading>1 then begin
Call "MergeReadings.exe <DataPath> <User> S ID2"
end;
R_Shake 2 ShakeFrequency ShakeTime
end;
R_Run"<st1>" ;execute test protocol
;merge horizontal(kinetic):
Call "MergeReadings.exe <DataPath> <User> S ID2"
;end of script
```



F1. ábra: Az injektálások között eltelt idő hatása az integrált hőváltozás értékekre az EDTA–Zn(II) ITC titrálások során. Az adatok között erőteljes negatív Pearson korreláció ($r = -0,715$) állapítható meg [252].

F1.1. A cinkujj fehérjék génjeinek tervezése

Az 1MEY PDB kóddal jelölt fehérje-DNS kristályszerkezetben található cinkujj fehérje génjét STOP-kodonnal ellátva rendeltük meg (IDT Japan Ltd). Ez a gén az NdeI és a BamHI restrikciós endonukláz helyek közé került beépítésre a pET-16b bakteriális eredetű DNS hordozókba. Ezt követően QuikChange[®] típusú pontmutációkat hajtottunk végre a DNS molekulában (QCM, Stratagene, La Jolla, CA). Ennek következtében a képződő fehérjében a 99. helyen lévő hisztidin helyett aszparagin (H99N), a 101. helyen lévő szerin helyett pedig valin (S101V) épült be. Így a fehérjében csak egyetlen olyan szekvencia jelent meg, ahol a Ni(II) vagy Cu(II)-indukált szelektív peptidhidrolízis megvalósulhat. Az így kialakított duplán módosított fehérjét a továbbiakban 1MEY#-nek neveztük. Ehhez az 1MEY#-F (5'-tcgccatcagcgtaccacatac-3') és 1MEY#-R (5'-accaggtatcgctgcgggaaatgacttc-3') oligonukleotidokat használtuk [193].

A pET-16b-1MEY# vektorból (**F2. ábra b,**) a cinkujj fehérje génjét átklónoztuk a pETM11-SUMO3 hordozóba. Ehhez polimeráz láncreakcióban (DreamTaq polimeráz, Thermo Scientific) sokszorosítottuk a 303 bp hosszúságú gént (inzer) az 5'-aaaaggatcCGGCCATATCGAAGGTC-3' és 5'-ttttctcgagTCCTTAAGAGGTTTTTTTACCAG-3' oligonukleotidokat felhasználva (**F2. ábra c,**). Az aláhúzott szakaszok a génhez újonnan hozzákapcsolt BamHI és XhoI restrikciós endonukleáz felismerési helyeket jelölik. Ezekkel az enzimekkel alakítottuk ki a megfelelő ragadós DNS végeket a beépítendő cinkujj fehérje génjében és a vektorban is. Az elegyet előbb fenol-kloroform eleggyel extraháltuk, majd a DNS-t a vizes fázisból etanollal csaptuk ki tisztítás céljából [253]. Az így kezelt inzeret és a hordozót ~20:1 molarányban T4 DNS ligázzal (Thermo Scientific) összekapcsoltuk (**F2. ábra d,**), majd a reakcióelegyet vagy annak egy részét *E. coli* DH5 α kompetens sejtek transzformálásához használtuk fel. Az LB+ táptalajon képződő baktériumtelepekből néhányat kiválasztva, azokat 5-5 ml LB+ tápoldatban szaporítottuk [210]. A sejtek feltárása és a pETM11-SUMO3-1MEY# DNS tisztítása alkalikus lízis segítségével történt EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kit (BioBasic) alkalmazásával.

~10 g nedves tömegű sejtet nyertünk ki 1 liter tápoldatból. A sejteket 500 mM NaCl, 100 mM HEPES (pH 8,2) tartalmú pufferben szuszpendáltuk fel. A His-1MEY# esetében a puffer további 10 mM imidazolt (dekahisztidin toldalék), míg a His-SUMO-1MEY# és ULP1 fehérjék esetében 5 mM imidazolt (hexahisztidin toldalék) és 1 (V/V)% Triton X-100 nemionos detergenst tartalmazott. A sejteket ultrahangos roncsolással tártuk fel 50% amplitúdóval, 10 × 30 s ciklusokban (VCX 130 PB 130 W). Az oldható fázist centrifugálással (4000× g; 35 perc; 4 °C) választottuk el a sejtörmeléktől.

Ezt követően a His-1MEY# fehérjét HPLC segítségével Ni(II)-affinitás oszlopon tisztítottuk (GE AKTA Explorer). Imidazol koncentráció-gradienst alkalmazva a legintenzívebb fehérje frakciót 300 mM imidazol koncentráció mellett eluáltuk az oszlopról. Az SDS-PAGE képen a termékben egyetlen fő sáv látható (**F3. ábra a.**). A fehérje Zn(II)-tartalmú formában nyerhető ki a sejtekből, amint azt a holo fehérjék ββα másodlagos szerkezetére jellemző CD spektrum igazolta (**F4. ábra**).

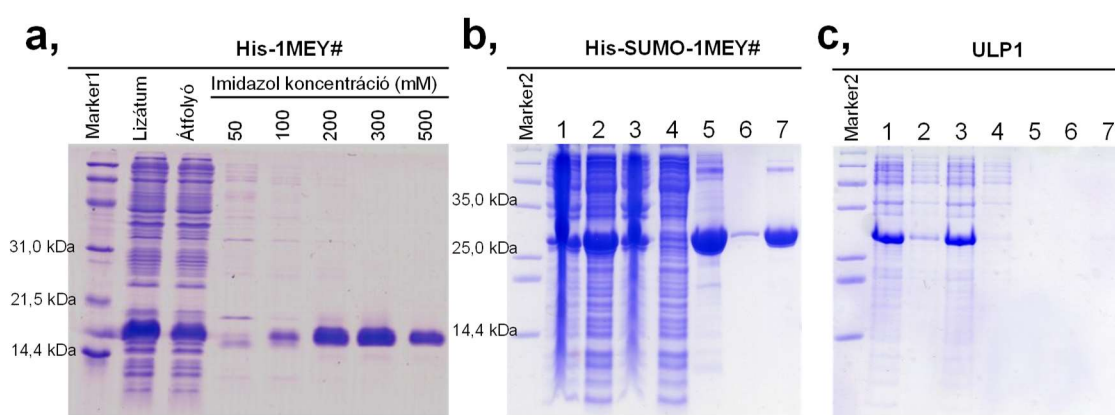
A His-SUMO-1MEY#, illetve ULP1 fehérjéket szakaszos (batch) módszerrel tisztítottuk. A lizátum oldható frakcióját 1/20× gyantatérfogatnyi Ni(II)-affinitás gyantára kötöttük (His•Bind Novagen) 1 órán keresztül 4 °C-on forgatva, majd a gyantát centrifugálással (1000× g; 5 perc; 4 °C) választottuk el a felülúszótól. Ezután 3 × 2 gyantatérfogatnyi 500 mM NaCl; 100 mM HEPES (pH 8,2); 50 mM imidazol tartalmú pufferrel mostuk a gyantát, majd a folyamatot 3 × 2 gyantatérfogatnyi 500 mM NaCl; 100 mM HEPES (pH 8,2); 60 mM imidazol tartalmú pufferrel folytattuk. A tisztítás végén csak egy intenzív fő sáv volt látható, ami a gyantára kötött His-SUMO-1MEY# fehérjéhez rendelhető (**F3. ábra b.**). Az ULP1 rosszul oldódott a lízis körülményei között. Ezért a tisztítás végén csak halvány fehérjesáv látható a gyantára kötött fehérje SDS-PAGE vizsgálata során. Ez a fehérje azonban elegendőnek bizonyult a SUMO affinitástoldalék hidrolíziséhez (**F3. ábra c.**).

F2. táblázat: ULP1 proteáz aminosav szekvenciája.

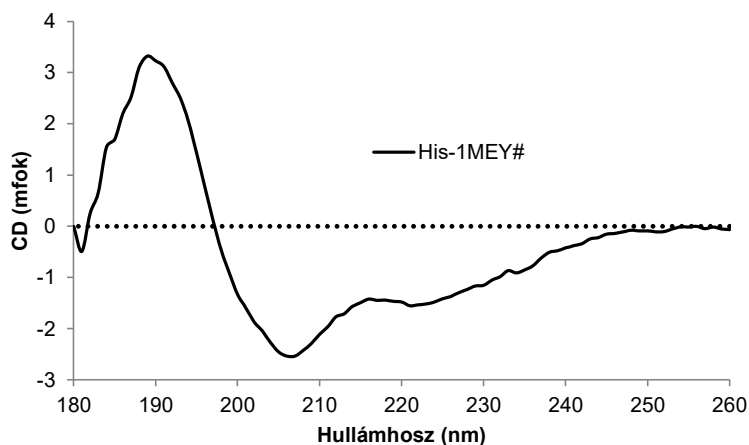
MHHHHHSALVPELNEKDDDDQVQKALASRENTQLMNRDNIEITVRDFKTLAPRRWLNDTIIIEFF MKYIEKSTPNTVAFNSFFYTNLSERGYQGVRWRMKRKKTKQIDKLDKIFTPINLNQSHWALGIIDL KKKTIGYVDSLSNGPNAMSFALTDLQKYVMEESKHTIGEDFDLIHLDCPQQPNGYDCGIYVCMN TLYGSADAPLDFDYKDAIRMRRFIAHLILTDALKGHHHHHHH

A His-SUMO-1MEY# fehérje esetében a desuomilációt a fehérje tisztítása közben valósítottuk meg oly módon, hogy a gyantára kötött cinkujj fehérjét és proteázt összekevertük, majd 16 °C-on 12 órán keresztül forgattuk (10 RPM) az elegyet 50 μM végkoncentrációjú Zn(ClO₄)₂ jelenlétében. A Zn(II)-re azért volt szükség, hogy a folyamat

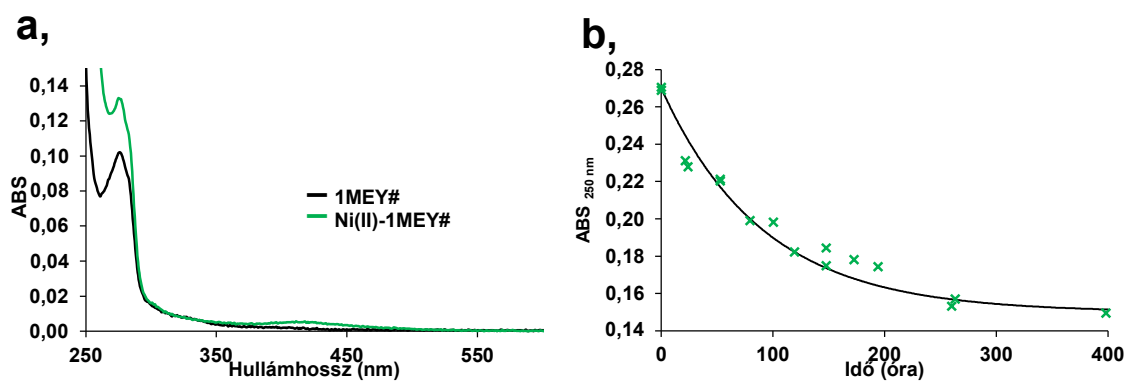
közben biztosítjuk a cinkujj alegységek Zn(II)-telítettségét, megvédve a ciszteineket az esetleges oxidációtól. Az inkubációt követően a gyantaszuszpenziót 3× térfogatra hígítottuk 100 mM HEPES (pH 7,4) oldattal. Ezzel az imidazolkoncentrációt 20 mM-ra csökkentettük. További 1 órán keresztül forgattuk (10 RPM) az elegyet 16 °C-on. Ezzel biztosítottuk, hogy a His-SUMO-1MEY# hidrolízise során felszabadult C-terminális holo-1MEY# a felülúszóba kerüljön, míg az N-terminális His-SUMO fragmens, valamint az ULP1 proteáz biztosan a gyantához kötődve maradjon. A gyantától elválasztott felülúszó az ESI-MS vizsgálatok alapján valóban csak holo-1MEY# fehérjét tartalmazott, ULP1 proteázhoz, vagy His-SUMO toldalékhoz rendelhető csúcsokat nem tudtunk detektálni (21. ábra b, f, g).



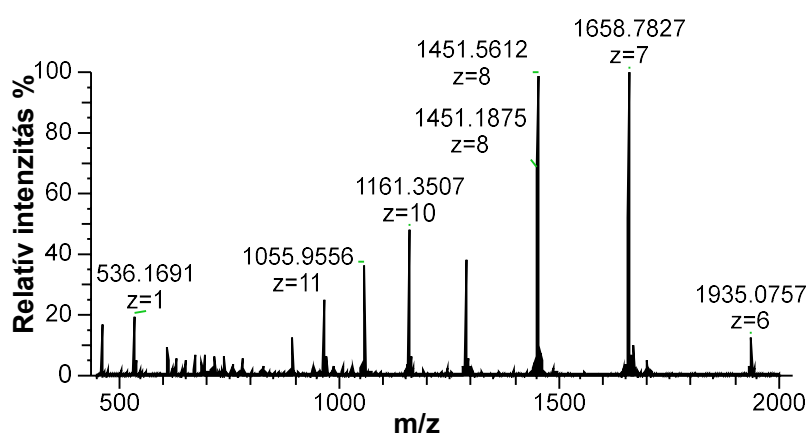
F3. ábra: a, A His-1MEY#; b, a His-SUMO-1MEY#; c, és az ULP1 fehérjék tisztítása során gyűjtött frakciók vizsgálata SDS-PAGE segítségével. Jelölések a b, és c, ábra esetén: 1: a teljes fehérjefrakciók szonikálás után; 2: az oldható fehérjefrakciók; 3: az oldhatatlan fehérjefrakciók; 4: a Ni-NTA gyantához való kötődés után a felülúszó; 5: a gyanta fehérjekötés után; 6: felülúszó a 6. mosási lépést követően; 7: a gyanta mosás után. Marker1: 5 µl Low Range Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard Bio-Rad. Marker2: 5 µl Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker.



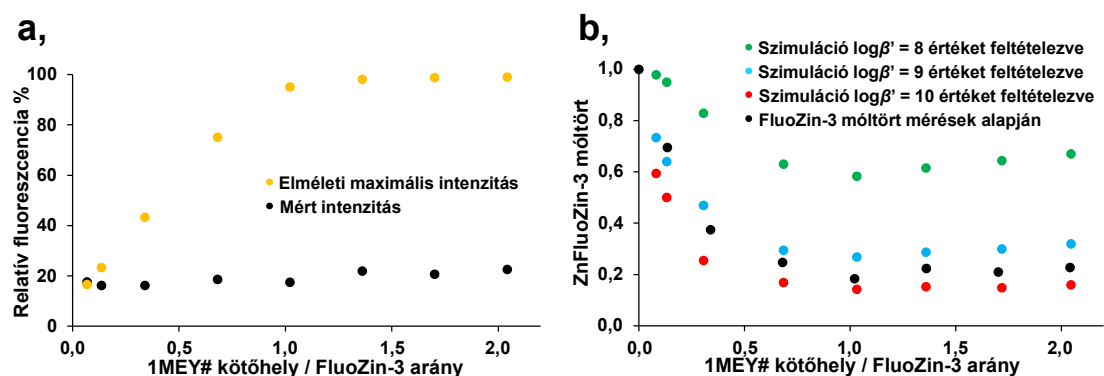
F4. ábra: His-1MEY# fehérje CD spektruma 18,8 µM koncentrációra normálva 10 mM HEPES (pH 7,4); l=0,1 mm



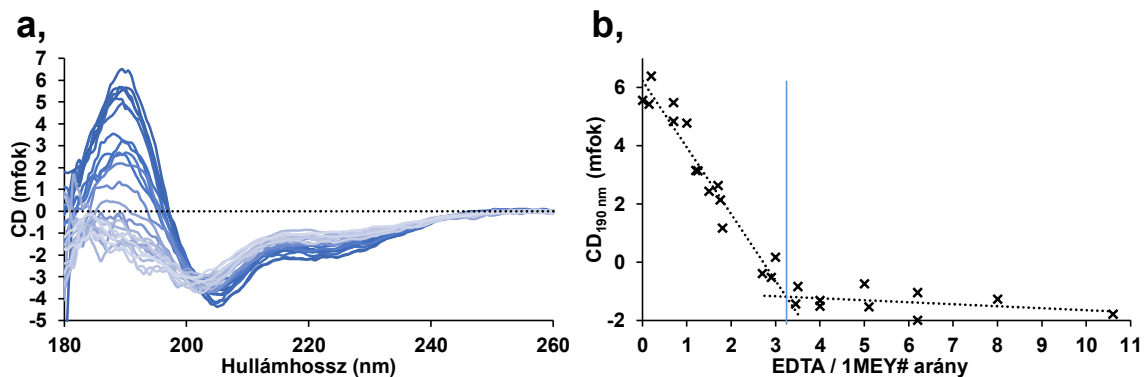
F5. ábra: a, 1MEY# UV-Vis abszorpciós spektruma Ni(II) jelenlétében (zöld) és hiányában (fekete) az N-terminális ATCUN motívumban. b, 250 nm-en mért abszorbanca időbeli alakulása 66 ekvivalens EDTA jelenlétében. $c(1MEY\#) = 25 \mu M$; 10 mM HEPES (pH 7,4); $l = 1 \text{ cm}$



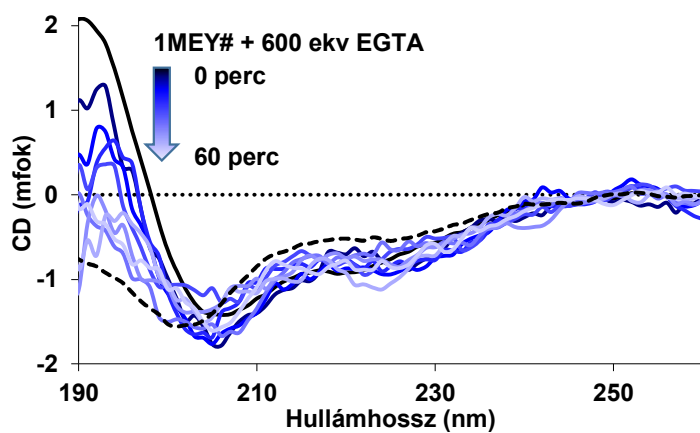
F6. ábra: Holo 1MEY# ESI-MS mérések alapján 12,5 ekvivalens EDTA jelenlétében. A látható csúcsok mind $Ni(II)_1Zn(II)_21MEY\#$ és $Ni(II)_1Zn(II)_11MEY\#$ részecskékhez rendelhetők, Ni(II)-mentes formát nem detektáltunk. z az adott részecske töltését jelöli.



F7. ábra: a, A ZnFluoZin-3 komplex fluoreszcenciája növekvő mennyiségű holo-1MEY# jelenlétében (fekete pontok). Ezzel párhuzamosan referencia méréseket is végeztünk, ahol a holo-1MEY# helyett azonos mennyiségű $ZnCl_2$ -t adtunk a FluoZin-3-hoz (sárga pontok), így megadva a lehetséges maximális intenzitást. A mérési pontokat egyedileg állítottuk össze (végkoncentrációk: $c(\text{FluoZin-3}) = 1,1 \mu M$; $c(\text{holo-1MEY\# kötőhely}) = 0 - 2,25 \mu M$; 10 mM HEPES (pH 7,4); végtérfogat: 150 μl ; 12 h; b, ZnFluoZin-3 komplex móltörtje növekvő koncentrációjú holo-1MEY# fehérje jelenlétében Zn(II)-kötőhelyre vonatkoztatva (egy 1MEY# fehérje három egyenértékű kötőhelyet tartalmaz). A FluoZin-3 móltört (fekete pontok) az F7. ábra a, részén bemutatott mért intenzitások és az elméleti maximális mért intenzitásértékek hányadosa. A mért értékek szimulációkkal vannak összevetve, feltételezve, hogy a Zn1MEY# komplex látszólagos stabilitása egy kötőhelyre vonatkoztatva ($\lg\beta'_{\text{pH } 7,4}$) 8 (zöld pontok), 9 (világoskék pontok) vagy 10 (piros pontok). A szimulációkat PSEQUAD programmal végeztük [4].



F8. ábra: a, holo-1MEY# fehérje titrálása EDTA-val CD spektroszkópiával követve b, 190 nm hullámhosszon mért ellipticitás értékek az EDTA / 1MEY# arány függvényében ábrázolva. 3 ekvivalens környékén látható töréspont. A mérési pontokat egyedileg állítottuk össze. $c(1MEY\#) = 16,4 \mu\text{M}$; 10 mM HEPES (pH 8,2); $l = 0,2 \text{ mm}$

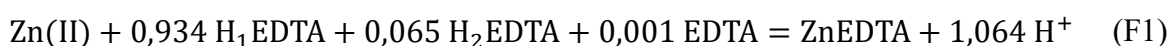


F9. ábra: Az 1MEY# cinkujj fehérje CD spektrumának időfüggése 600 ekvivalens EGTA jelenlétében. Fekete szaggatott vonal: 1MEY# 5 ekvivalens EDTA jelenlétében 5 perc inkubációt követően $c(\text{holo-1MEY}\#) = 9,3 \mu\text{M}$; 10 mM HEPES (pH 7,4); $l = 0,1 \text{ mm}$

F1.3. Entalpia értékek korrekciója

Az ITC mérések során több folyamat játszódik le egyidőben. Ezen folyamatok mindegyike különböző mértékű hőeffektussal járul hozzá a tényleges mért hőmennyiségekhez. Emiatt összehasonlító mérésekre van szükség. A ZnEDTA referenciamérés során a ZnCl₂ törzsoldatot EDTA mérőoldattal titráltuk 10 mM HEPES (pH 7,40) pufferben. EDTA-puffer mérések is történtek, a hígulásból származó hő meghatározására, majd ezzel az értékkel a referenciatitrálást kaptuk meg a Zn-EDTA rendszer alapvonalkorrigált entalpiáját ($\Delta H_{ITC} = -16,2$ kJ/mol).

Az EDTA pK_a értékeit (2,07; 2,75; 6,26 10,34) [207] figyelembe véve PSEQUAD programsegítségével kiszámoltuk [4], hogy pH 7,40 értéken 93,4% H₁EDTA, 6,5% H₂EDTA és 0,1% protonátlan forma van jelen. Ezek alapján 1,064 ekvivalens proton felszabadulására számíthatunk a Zn(II)-komplexálódása során (a töltéseket nem tüntettük fel):



A felszabaduló protonok egy része reagál a HEPES pufferrel:



Figyelembe véve az EDTA ($\Delta H_{K_1} = -22,3$ kJ/mol; $\Delta H_{K_2} = -17,2$ kJ/mol) [255] és HEPES ($\Delta H_{\text{H}_1\text{HEPES}} = -21,01$ kJ/mol) [256] szakirodalmi protonálódási entalpiaértékeit 25 °C-on, az alábbi egyenlet megoldásával kaptuk meg a tényleges Zn(II)-EDTA komplexképződéshez rendelhető entalpiát:

$$\Delta H_{\text{ZnEDTA}} = \Delta H_{ITC} - \Delta n_{\text{H}^+} \cdot \Delta H_{\text{H}_1\text{HEPES}} - \Delta n_{\text{H}_1\text{EDTA}} \cdot \Delta H_{K_1} - \Delta n_{\text{H}_2\text{EDTA}} \cdot (\Delta H_{K_1} + \Delta H_{K_2}) \quad (\text{F3})$$

Az így meghatározott ΔH_{ZnEDTA} értéket felhasználhattuk az EDTA-1MEY# rendszer jellemzése során. Ebben az esetben is meghatároztuk a hígulásból származó hőeffektust EDTA-1MEY# átfolyó⁹ titrálások segítségével. Az alábbi egyenletet használtuk fel az adatok illesztése során:

$$\Delta Q_i = \Delta n_{\text{Zn1MEY}\#,i} \cdot \Delta H_{ITC} + \Delta n_{\text{ZnEDTA},i} \cdot \Delta H_{\text{ZnEDTA}} \quad (\text{F4})$$

ahol ΔH_{ZnEDTA} a korábban meghatározott ZnEDTA komplexképződés entalpiája, ΔH_{ITC} pedig magában foglalja az összes egyéb mért folyamatot. Ebből az alábbi egyenlet alapján

⁹ Az 1MEY# átfolyót a holo-1MEY# fehérje ultraszűrésének utolsó lépése során kaptuk így a fehérjét leszámítva teljes mértékben megegyezik a ténylegesen titrált mintával. Az ultraszűrést Amicon 3K ultraszűrő segítségével hajtottuk végre (ld. 4.6 fejezet).

lehet kiszámítani az 1MEY# fehérje cinkujj alegységeinek Zn(II)-komplexálásához rendelhető entalpiát:

$$\Delta H_{Zn1MEY\#} = \Delta H_{ITC} + \Delta n_{H_1EDTA} \cdot \Delta H_{K_1} + \Delta n_{H_2EDTA} \cdot (\Delta H_{K_1} + \Delta H_{K_2}) + \Delta n_{H^+} \cdot \Delta H_{H_1HEPES} + \Delta n_{H_1Cys} \cdot \Delta H_{H_1Cys} \quad (F5)$$

ahol $\Delta H_{Zn1MEY\#}$ értelemszerűen az 1MEY# fehérje egy alegységének Zn(II)-komplexálódásához rendelhető entalpia, míg a fehérje ciszteinjeinek protonálódását a szakirodalmi adatok alapján vettük figyelembe: $\Delta H_{H_1Cys} = -29,7$ kJ/mol [257].

A folyamat során 1,064 ekvivalens proton szabadul fel az EDTA-ból, amit a puffer és a cinkujj fehérje ciszteinjei képesek felvenni. Habár elméletben a kompetíció során a cinkujj fehérje két ciszteinje képes protonálódni pH 7,40 értéken, de Blasie és mtsai. kísérletileg azt találták, hogy a CP1 modellpeptidben csak ~0,5 cisztein protonálódik feltehetően a közelben elhelyezkedő pozitív töltésű aminosav oldalláncoknak köszönhetően [208]. Mivel az 1MEY# fehérje alegységeinek szekvenciája nagymértékben hasonlít a CP1 modellpeptidre (25. ábra), első közelítésben elfogadtuk az itt meghatározott értéket, és az alábbi egyenlet megoldásával határoztuk meg a tényleges Zn(II)-1MEY# kötőhely entalpiát:

$$\Delta H_{Zn1MEY\#} = \Delta H_{ITC} - 0,934 \cdot \Delta H_{K_1} - 0,065 \cdot (\Delta H_{K_1} + \Delta H_{K_2}) + 0,564 \cdot \Delta H_{H_1HEPES} + 0,5 \cdot \Delta H_{H_1Cys} \quad (F6)$$

F1.4. Statisztikus tényezők figyelembevétele stabilitási állandók számításánál

A legtöbb számítás során azzal a feltételezéssel éltünk, hogy az 1MEY# cinkujj fehérje három alegysége azonos erősséggel kötötte meg a Zn(II)-t. Így a fehérje koncentrációja helyett a kötőhelyek koncentrációjával számoltunk. Egyes kísérletekben azonban a teljes fehérje viselkedését követjük nyomon (EMSA, ESI-MS), így az alegységek fokozatos telítődését külön kell kezelni. Ilyen esetekben, habár a kötőhelyek identikusan viselkednek, mégis statisztikai alapon a fehérje K_1 K_2 K_3 értékei között eltérés mutatkozik. J. Bjerrum vezette be a következő összefüggést a lépcsőzetes stabilitási állandók becslésére:

$$\frac{K_j}{K_{j+1}} = f_j x^2 \quad (F7)$$

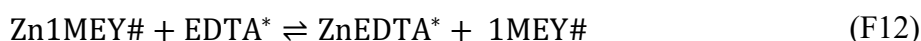
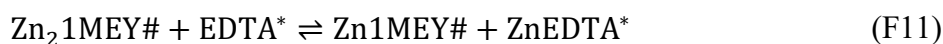
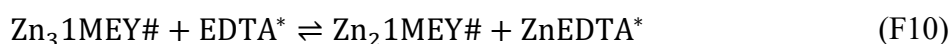
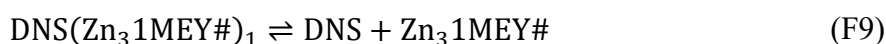
ahol x a "terjedési faktor" és f_j a statisztikai alapon várható egyensúlyi állandók hányadosa [258, 259]. Ebben az esetben az azonos tulajdonságú kötőhelyekre meghatározott átlagos \bar{K} stabilitási állandó és az egyedi lépcsőzetes K_j stabilitási állandók közötti összefüggés az alábbi egyenlettel írható le:

$$K_j = \frac{(N - j + 1)}{j} \bar{K} \cdot x^{(N+1-2j)} \quad (\text{F8})$$

ahol j a telített kötőhelyek száma, N pedig a kötőhelyek száma összesen. A terjedési faktor identikusan viselkedő kötőhelyek esetében $x = 1$, amennyiben a lépcsőzetes stabilitási állandók nem teljesen identikus kötőhelyekre vonatkoznak $x > 1$.

F1.4.1. Zn(II)-1MEY#-DNS-EDTA rendszer jellemzése

Amennyiben a fehérje és az EDTA DNS jelenlétében verseng a Zn(II)-ért az alábbi reakciók írhatók fel:



ahol EDTA^* az aktuális protonált formáját jelöli az EDTA-nak, és a töltéseket az egyszerűség kedvéért elhanyagoltuk. Amennyiben a fehérje alegységeinek Zn(II)-affinitását azonosnak tekintjük, a következő összefüggések állapíthatók meg:

$$K'_{\text{Zn}_1\text{1MEY}\#} = \frac{(3 - 1 + 1)}{1} \bar{K} \cdot 1^{(3+1-2 \cdot 1)} = 3\bar{K} \quad (\text{F13})$$

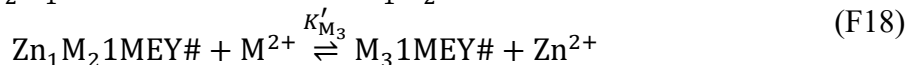
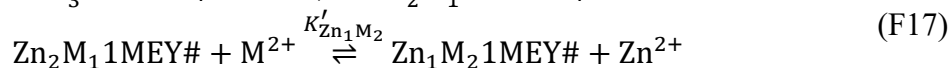
$$K'_{\text{Zn}_2\text{1MEY}\#} = \frac{(3 - 2 + 1)}{2} \bar{K} \cdot 1^{(3+1-2 \cdot 2)} = \bar{K} \quad (\text{F14})$$

$$K'_{\text{Zn}_3\text{1MEY}\#} = \frac{(3 - 3 + 1)}{3} \bar{K} \cdot 1^{(3+1-2 \cdot 3)} = \frac{\bar{K}}{3} \quad (\text{F15})$$

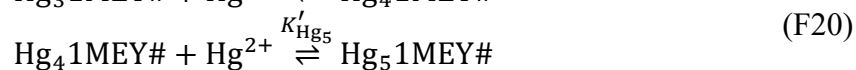
A számítások során az **F10-F12 egyenletekre** vonatkozó állandókat számoltuk ki újra a DNS jelenlétében, majd az így meghatározott \bar{K} állandót hasonlítottuk össze a korábban ITC és CD mérések alapján meghatározott értékkel.

F1.4.2. ESI-MS-ben követett kompetíciós titrálások jellemzése

Amennyiben a Zn(II)-kötött 1MEY# titrálását Cd(II)-, vagy Hg(II)-ionokkal ESI-MS-tük követve az alábbi reakciók írhatók fel:



ahol M Cd(II); Hg(II). Emellett Hg(II) esetében további fémionok bekötődése is megfigyelhető, így itt az alábbi reakciók is felírhatók:



Fontos megjegyezni, hogy a maximális kötőhelyek számát N továbbra is háromnak tekintettük és formálisan úgy kezeltük a 4-6. Hg(II) koordinációját, mint az első biszkomplex kialakulása, azaz $j = 1$ és a $\text{Hg}_3\text{1MEY}\#$ részecskét tekintettük szabad ligandumnak. Természetesen a további Hg(II) koordinációk pontos módját nem ismerjük, így az itt leírt módszer csak feltételezés amit nem tudunk alátámasztani, de a rendszer viszonylag jól leírható volt így.

A fenti reakciókra szintén megadhatók a lépcsőzetes stabilitási állandók **F2 egyenlet** alapján. A számításhoz szükséges látszólagos stabilitási állandók az alábbi általános formában írhatók fel:

$$\lg \beta'_{M_j} = \sum_j^N \lg K'_{M_j} \quad (\text{F22})$$

A vegyeskomplexekre pedig:

$$\lg \beta'_{Z_{n_2}M_1} = \lg K'_{Z_{n_1}} + \lg K'_{Z_{n_2}} + \lg K'_{M_3} \quad (\text{F23})$$

$$\lg \beta'_{Z_{n_1}M_2} = \lg K'_{Z_{n_1}} + \lg K'_{M_2} + \lg K'_{M_3} \quad (\text{F24})$$

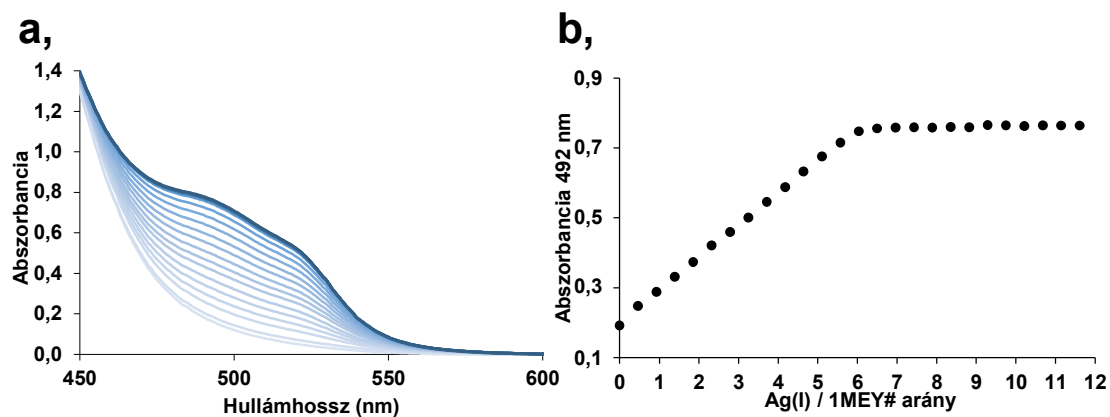
F3. táblázat: Az apo 1MEY# 766 m/z-nél található csúcának CID fragmentációját követően azonosított fragmensek. Az azonosítást a Protein Prospector programmal hajtottuk végre. ZF: cinkujj fehérje alegység.

ATCUN		C-term	1. ZF		3. ZF	1. és 2. ZF	2. és 3. ZF
b ₃	a ₁₀	y ₈ -H ₂ O	b ₄₀	a ₄₀	y ₂₇	a ₇₄ -NH ₃	y ₅₅
b ₄	a ₁₁	y ₈ -NH ₃	b ₄₂	a ₄₄ -NH ₃	y ₂₇ -H ₂ O		y ₇₃
b ₅	a ₁₄	y ₁₅	b ₄₂ -H ₂ O	a ₄₅ -NH ₃	y ₂₇ -NH ₃		
b ₈	a ₁₅ -NH ₃	y ₁₅ -H ₂ O	b ₄₂ -NH ₃	a ₄₆ -NH ₃	y ₂₈		
b ₉	a ₁₆ -NH ₃	y ₁₅ -NH ₃	b ₄₃	a ₄₇ -NH ₃	y ₂₈ -H ₂ O		
b ₉ -H ₂ O	a ₂₄ -NH ₃	y ₁₇ -NH ₃	b ₄₅ -H ₂ O	a ₅₀	y ₂₈ -NH ₃		
b ₁₀	a ₂₆ -NH ₃	y ₂₂	b ₄₅ -NH ₃	a ₅₅	y ₃₀		
b ₁₁	a ₂₇ -NH ₃	y ₂₃	b ₄₆	a ₅₆ -NH ₃	y ₃₁		
b ₁₁ -H ₂ O	a ₂₉	y ₂₄	b ₅₂		y ₃₁ -H ₂ O		
b ₁₁ -NH ₃	a ₃₀ -NH ₃	y ₂₄ -NH ₃	b ₅₃ -NH ₃		y ₃₁ -NH ₃		
b ₁₃ -H ₂ O		y ₂₅ -NH ₃	b ₅₃ -H ₂ O		y ₃₉		
b ₁₃ -NH ₃		y ₂₅ -H ₂ O	b ₄₉		y ₃₉ -H ₂ O		
b ₁₅ -H ₂ O		y ₂₆	b ₅₉		y ₃₉ -NH ₃		
b ₁₉		y ₂₆ -H ₂ O	b ₅₉ -NH ₃		y ₄₀		
b ₂₁		y ₂₆ -NH ₃	b ₅₉ -H ₂ O		y ₄₂		
b ₂₃ -H ₂ O			b ₆₀		y ₄₂ -H ₂ O		
b ₂₃ -NH ₃					y ₄₂ -NH ₃		
b ₂₄					y ₄₃		
b ₂₅					y ₄₅		
b ₂₅ -H ₂ O					y ₄₆ -H ₂ O		
b ₂₅ -NH ₃					y ₄₆ -NH ₃		
b ₂₇					y ₄₇		
b ₂₉ -H ₂ O					y ₄₉		
b ₂₉ -NH ₃					y ₄₉ -H ₂ O		
b ₃₁ -H ₂ O					y ₄₉ -NH ₃		
b ₃₁ -NH ₃					y ₅₁		
b ₃₂					y ₅₂		
b ₃₆					y ₅₄		
b ₃₆ -H ₂ O					y ₅₅		
b ₃₆ -NH ₃							

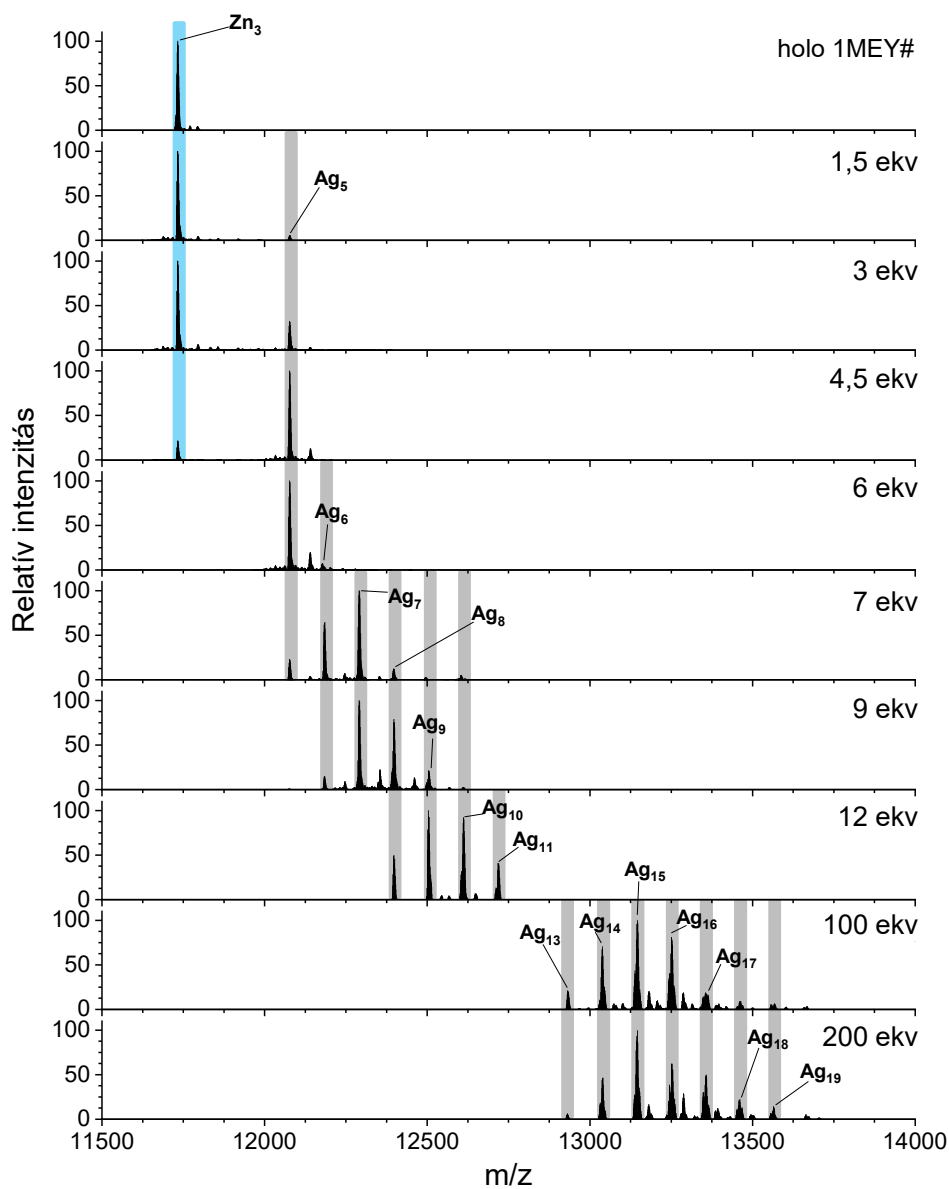
F4. táblázat: A holo-1MEY# + 12,5 ekvivalens EDTA minta 1451 m/z-nél található csúcának CID fragmentációját követően azonosított fragmensek. ZF: cinkujj fehérje alegység. Az azonosítást manuálisan hajtottuk végre a FreeStyle 1.6 (Thermo Scientific) program segítségével.

ATCUN		C-term	1. ZF		3. ZF		1. és 2. ZF	2. és 3. ZF	egyéb
	Ni ²⁺			Zn ²⁺		Zn ²⁺	Zn ²⁺	Zn ²⁺	Zn ²⁺
b ₇	b ₇ +Ni ²⁺ ^U	y ₂₆	b ₄₂ +Ni ²⁺ ^U	-	y ₃₀ ^U	y ₃₁ +Zn ²⁺ ^U	a ₈₃ +Zn ²⁺ ^U	y ₅₈ +Zn ²⁺	y ₉₈ +Zn ²⁺
b ₈	b ₈ +Ni ²⁺	y ₁₅	b ₄₃ +Ni ²⁺		y ₃₁	y ₄₂ +Zn ²⁺	b ₈₆ +Zn ²⁺ +Ni ²⁺	y ₅₈ -NH ₃ +Zn ²⁺	y ₉₈ -NH ₃ +Zn ²⁺
b ₉ ^U	a ₈ +Ni ²⁺	y ₁₅ -NH ₃	b ₄₆ +Ni ²⁺		y ₄₂	y ₄₂ -H ₂ O+Zn ²⁺	a ₉₀ +Zn ²⁺ ^U	y ₅₉ +Zn ²⁺ ^U	y ₉₈ -H ₂ O+Zn ²⁺
b ₁₁	b ₁₅ +Ni ²⁺	y ₁₅ -H ₂ O	b ₅₉ +Ni ²⁺ ^U		y ₄₂ -H ₂ O	y ₅₄ +Zn ²⁺ ^U		y ₈₂ +Zn ²⁺ ^U	y ₉₆ +Zn ²⁺
b ₁₈	b ₁₈ +Ni ²⁺	y ₈ -H ₂ O			y ₄₉	y ₃₀ +Zn ²⁺			y ₉₀ +Zn ²⁺
	b ₁₀ +Ni ²⁺				y ₅₄				y ₈₆ +Zn ²⁺
									y ₈₆ -NH ₃ +Zn ²⁺
									y ₈₆ -H ₂ O+Zn ²⁺
									a ₉₈ -NH ₃ +Zn ²⁺ +Ni ²⁺ ^U
									a ₉₈ +Zn ²⁺

^U Az illesztés bizonytalan, mivel a csúcsok átlapolódnak.



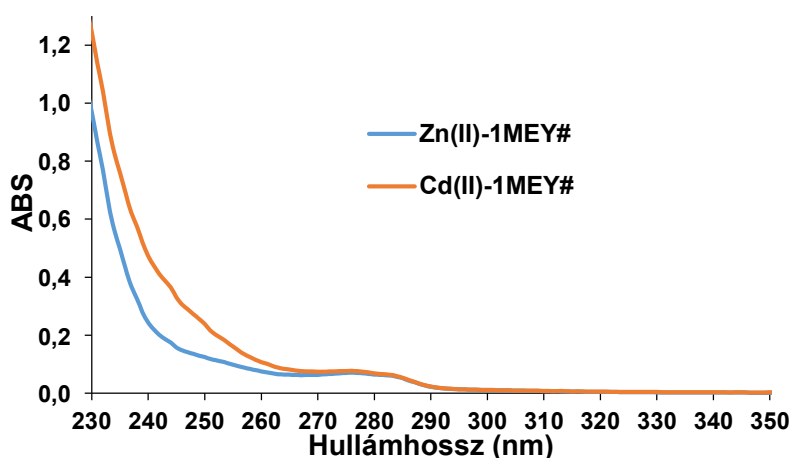
F10. ábra: a, holo-1MEY# cinkujj fehérje titrálása AgClO_4 -tal 4-(2-piridilazo)rezorcin (PAR) jelenlétében UV-Vis spektroszkópiával követve $c(1\text{MEY}\#) = 2,5 \mu\text{M}$; $c(\text{PAR}) = 89 \mu\text{M}$; 50 mM HEPES (pH 7,4); b, 492 nm-en mért abszorbancia alakulása a hozzáadott Ag(I) ekvivalensek függvényében.



F11. ábra: A holo 1MEY# fehérje ESI-MS spektruma növekvő mennyiségű Ag(I) jelenlétében. $c(1\text{MEY}\#) = 2 \mu\text{M}$; 8,2 mM ABC (pH 7,8);

F1.5. Cd(II)-Zn(II) csere az 1MEY# fehérjében

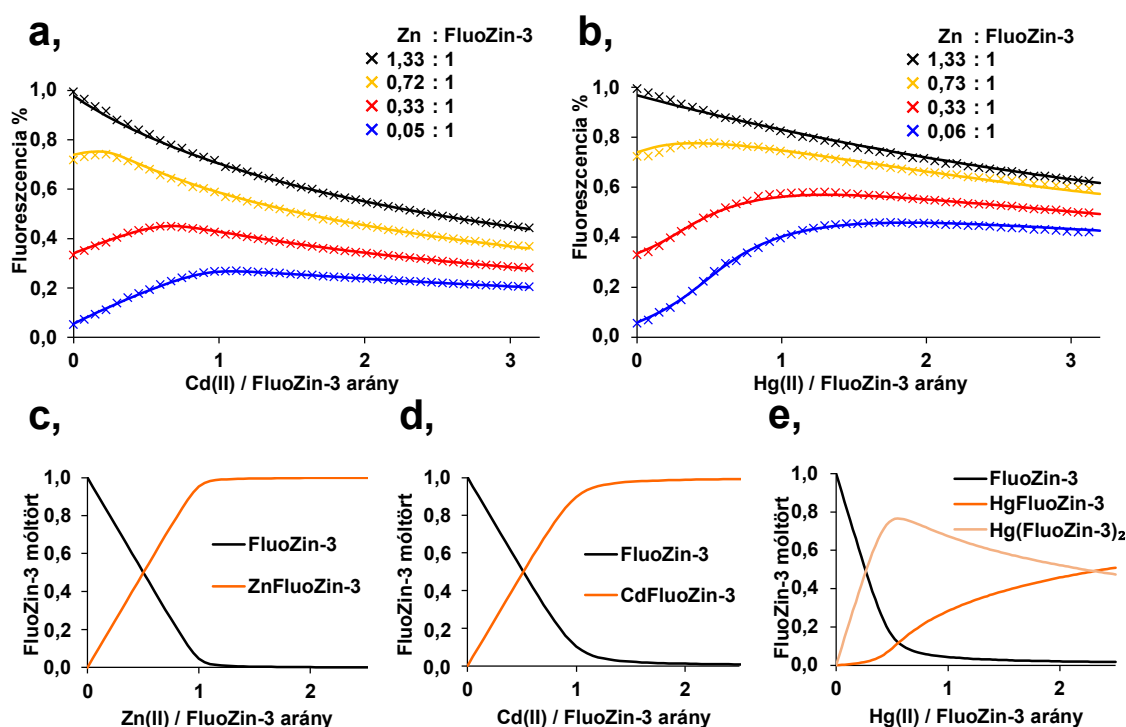
A Cd(II) hatásának vizsgálatát megnehezítette, hogy a Zn(II) 1-2 nagyságrenddel nagyobb affinitással koordinálódik az 1MEY# cinkujj fehérjéhez. Emiatt több lépésben valósítottuk meg a fémionok cseréjét, hogy tanulmányozhassuk a tisztán Cd(II)-t tartalmazó cinkujj fehérjét is. A 10 mM HEPES (pH 7,40); 50 mM NaClO₄ pufferben lévő fehérjét 25 °C-on 10 percig 0,5 mM végkoncentrációjú EDTA-val, (~25× ekvivalens 1MEY#-hez képest) kezeltük. Ezzel eltávolítottuk a koordinálódott Zn(II)-t. A puffer 0,2 mM végkoncentrációjú TCEP-t is tartalmazott a szabad tiolsoportok oxidációját elkerülendő. Ezt követően az EDTA koncentrációt fokozatosan 1 μM alá csökkentettük puffercsere során (10 mM HEPES (pH 7,40); 50 mM NaClO₄; 0,2 mM TCEP), amit ultraszűrés segítségével hajtottunk végre (Amicon 3K 0,5 ml szűrők (Merck), 14000×g 5×5 perc 15 °C). Ekkor 150 μM végkoncentrációjú Cd(ClO₄)₂-t adtunk a mintához, majd 5 percig inkubáltuk 25 °C-on. További puffercsere során a TCEP és a felesleg Cd(II)-koncentrációt is 1 μM alá csökkentettük. A puffercserét követően a Cd(II) koordinációja a fehérje UV-Vis spektrumának 230-250 nm hullámhossztartományban megfigyelhető töltésátviteli sávok megjelenésének köszönhetően (F12. ábra).



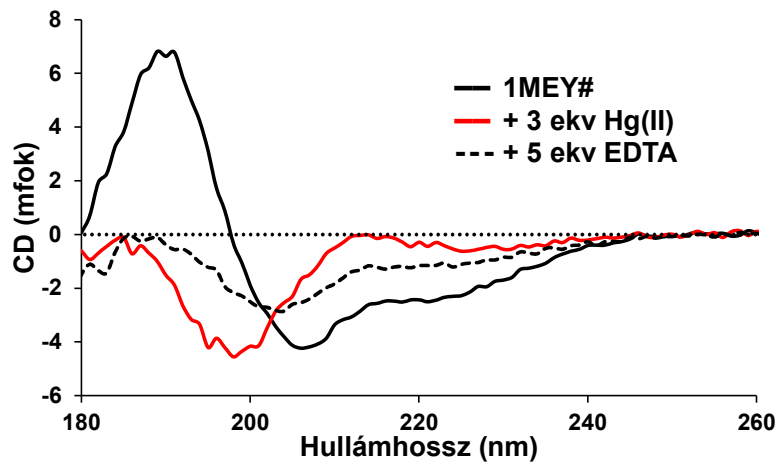
F12. ábra: 1 MEY# UV-Vis abszorpciós spektruma Zn(II)- (kék), vagy Cd(II)- (narancs) kötött formában. $c(1MEY\#) = 13,5 \mu\text{M}$; 10 mM HEPES (pH 7,4); 50 mM NaClO₄; $l = 1 \text{ cm}$.

F1.6. FluoZin-3 kölcsönhatásának tanulmányozása Cd(II)-vel és Hg(II)-vel

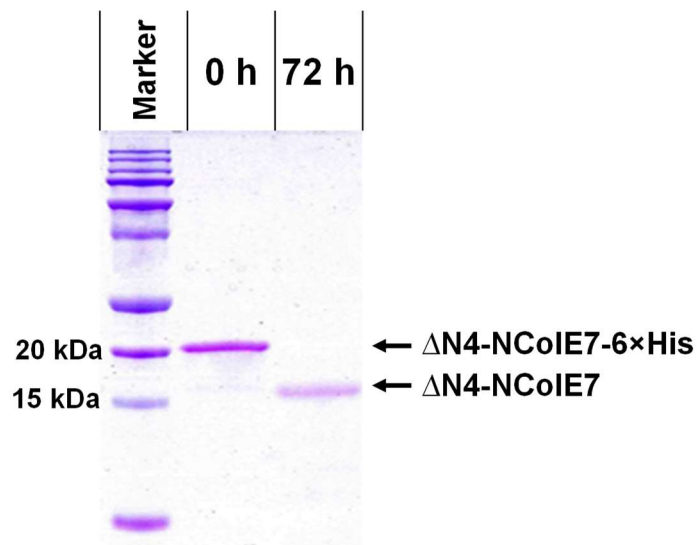
Annak érdekében, hogy a FluoZin-3 fluoreszcens kompetitort alkalmazhassuk a cinkujj fehérje Cd(II)- és Hg(II)-kölcsönhatásának tanulmányozására, előzőleg megvizsgáltuk a fémionok kölcsönhatását FluoZin-3 ligandummal. Négy eltérő összetételű Zn(II) : FluoZin-3 rendszert párhuzamosan titrálva Cd(II) vagy Hg(II)-vel megállapítottuk, hogy mindkét „soft”-karakterű fémion kölcsönhatásba lép a fluorofórral. Cd(II)-vel csak monokomplex képződése volt kimutatható. A meghatározott pH-független stabilitási állandó $\lg\beta = 7,44 \pm 0,01$ segítségével jó egyezés mutatkozott a mért és a számított titrálási görbék között (F13. ábra a, d.) Az állandó pH 7-re átszámolva ($\lg\beta'_{\text{pH } 7,0} = 7,18$) 0,3 nagyságrenddel tér el az egyetlen szakirodalomban fellelhető stabilitási állandótól: $\lg\beta'_{\text{pH } 7,0} = 6,9$ [260]. Hg(II)-re nem állt rendelkezésre szakirodalmi adat, és a mérések illesztése mono- és biszkomplex képződésének feltételezése mellett sem volt kifogástalan: $\lg\beta_{\text{ML}} = 6,68 \pm 0,06$, $\lg\beta_{\text{ML}_2} = 13,56 \pm 0,1$ (F13. ábra b.). A stabilitási állandók alapján a ligandum a Zn(II)-t preferálja Cd(II) helyett, míg Hg(II)-nél ez nem állapítható meg egyértelműen a biszkomplex képződéséből adódóan.



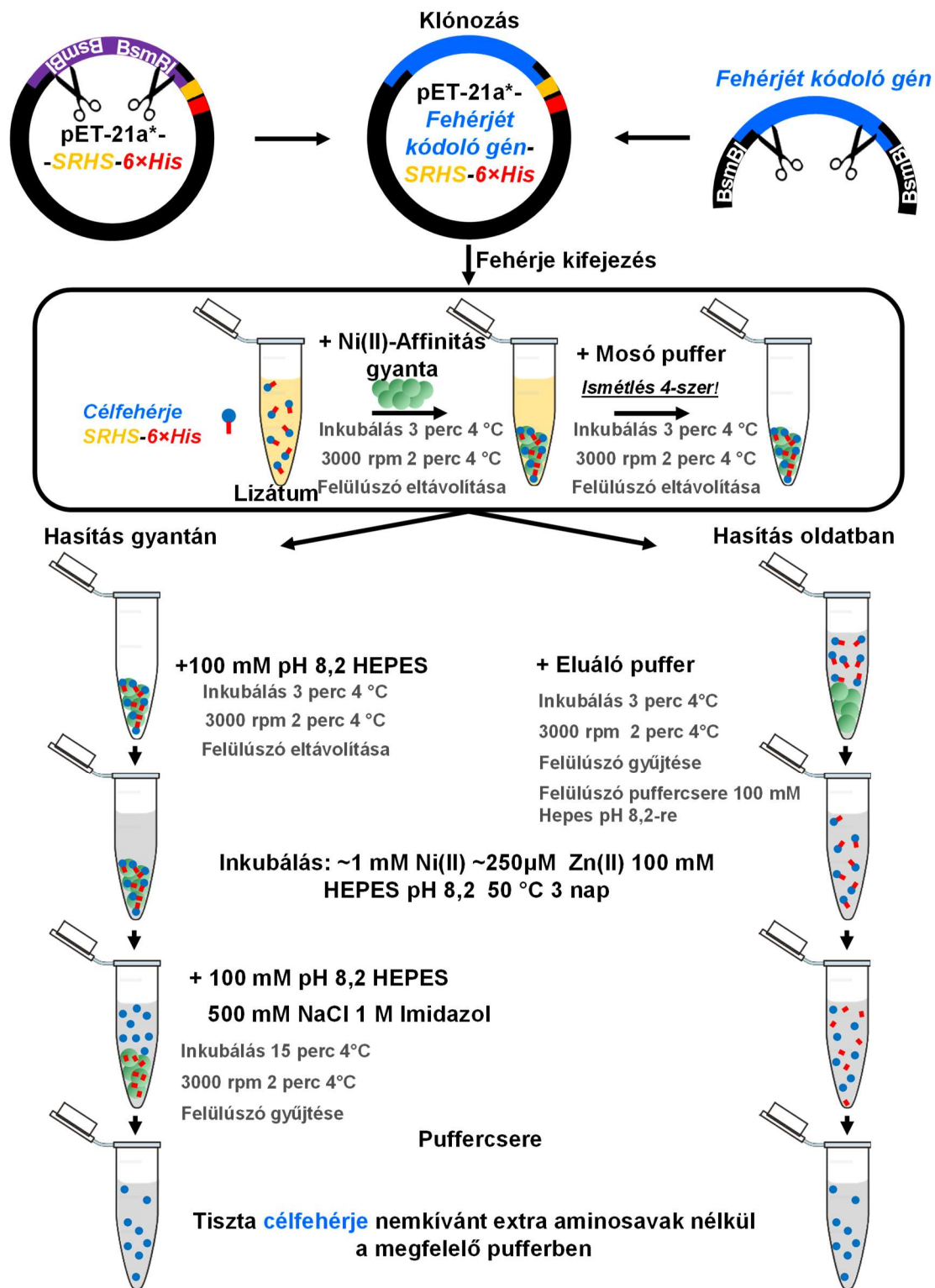
F13. ábra: Különböző összetételű Zn(II) : FluoZin-3 rendszerek mért (pont) és számított (folytonos görbe) relatív fluoreszcenciája titrálás során **a**, $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ vagy; **b**, $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ mérőoldattal. 200 μl mintákat lemezolvasó segítségével 3 μl lépésekben titráltuk 25 °C-on. $c(\text{FluoZin-3}) = 3,98 \mu\text{M}$; 10 mM HEPES (pH 7,40); 150 mM NaClO_4 . **c**, Zn(II) : FluoZin-3 rendszer eloszlási diagramja pH 7,4-en irodalmi adatok alapján számolva [190] $c(\text{FluoZin-3}) = 4 \mu\text{M}$; **d**, Cd(II) : FluoZin-3 és **e**, Hg(II) : FluoZin-3 rendszer eloszlási diagramja pH 7,4-en kompetíciós mérés alapján. A számolásokhoz a PSEQUAD programot használtuk



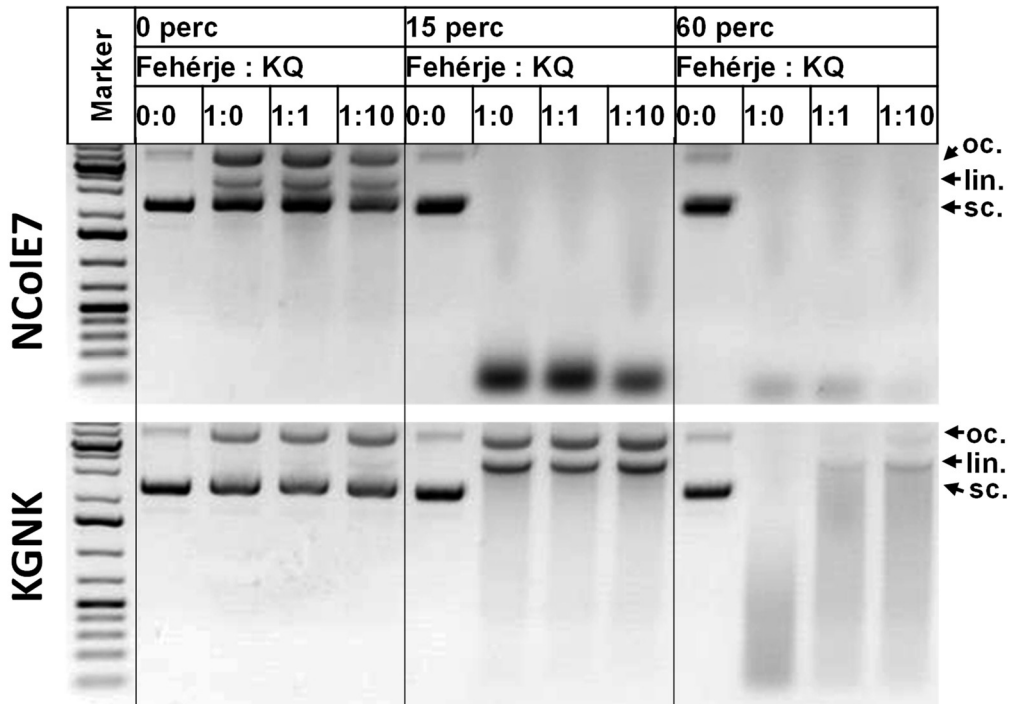
F14. ábra: Zn(II)-kötött 1MEY# (folytonos fekete), Hg(II)-kötött 1MEY# (piros) és 1MEY# 5 ekvivalens EDTA jelenlétében (1,7 ekvivalens kötőhelyenként) (szaggatott fekete) CD spektruma. $c(1MEY\#) = 16,4 \mu M$; 7,5 mM HEPES (pH 7,4); $l = 0,2$ mm ASTRID szinkrotron, Aarhus.



F15. ábra: $\Delta N4-NCoiE7-6\times His$ fehérje hidrolízise Ni(II)-vel oldatban Tricin-SDS-PAGE módszerrel vizsgálva. $c(NiCl_2) = 1$ mM, $c(ZnCl_2) = 0,25$ mM; 100 mM HEPES (pH 8,2); 72 h; 50 °C

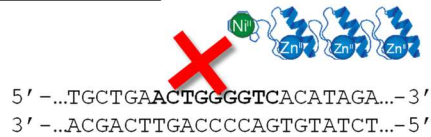


F16. ábra: A Ni(II)-indukált hidrolízist alkalmazó fehérjekifejezési és tisztítási eljárás folyamatábrája. A Mosó puffer esetünkben 100 mM HEPES 500 mM NaCl, 50 mM imidazol (pH 8,2), de összetétele az imidazol koncentrációt leszámítva finomhangolható a célfehérjéhez. Az Eluáló puffer a mosópufferhez képest legalább 300 mM imidazolt tartalmaz.



F17. ábra: NCoIE7 és KGNK nukleáz aktivitása növekvő mennyiségű imidazoltartalmú Ac-Lys-His-Pro-His-Pro-His-Gln-NH₂ heptapeptid (KQ) jelenlétében 1 (m/V)% agaróz gélen vizsgálva.

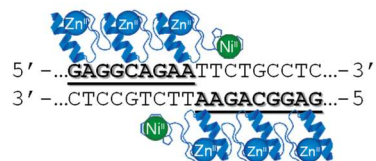
0 kötőhely



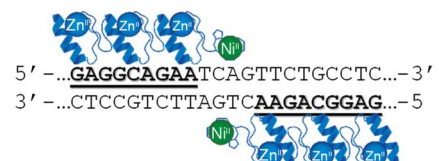
1 kötőhely



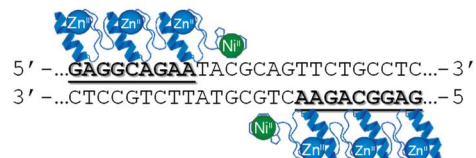
2 kötőhely 0 köz



2 kötőhely 4 köz



2 kötőhely 7 köz



F18. ábra: pUC19 DNS hordozókba beépített, különböző számú és elrendezésű 1MEY# fehérje felismerési helyek.

F1.7. Módosított fehérjék génjeinek tervezése

Elsőként a pETM11-SUMO3-1MEY#.2 DNS-t állítottuk elő. Ehhez polimeráz láncreakcióban (DreamTaq polimeráz, Thermo Scientific) sokszorosítottuk a 288 bp hosszúságú gént (inzert) az 5'-aaaaggatcCGGCCATATCCTGGAACCGGGCGAAAA-3' és 5'-gggggggctcgagtccTTAAGAGGTTTTTTTACCAG-3' oligonukleotidokat felhasználva. Az aláhúzott szakaszok a génhez újonnan hozzákapcsolt BamHI és XhoI restriktions endonukleáz felismerési helyeket jelölik. A folyamat ezt követően teljesen analóg módon zajlott, mint a pETM11-SUMO3-1MEY# DNS előállítás, tisztítása és ellenőrzése (ld. F1.1 fejezet).

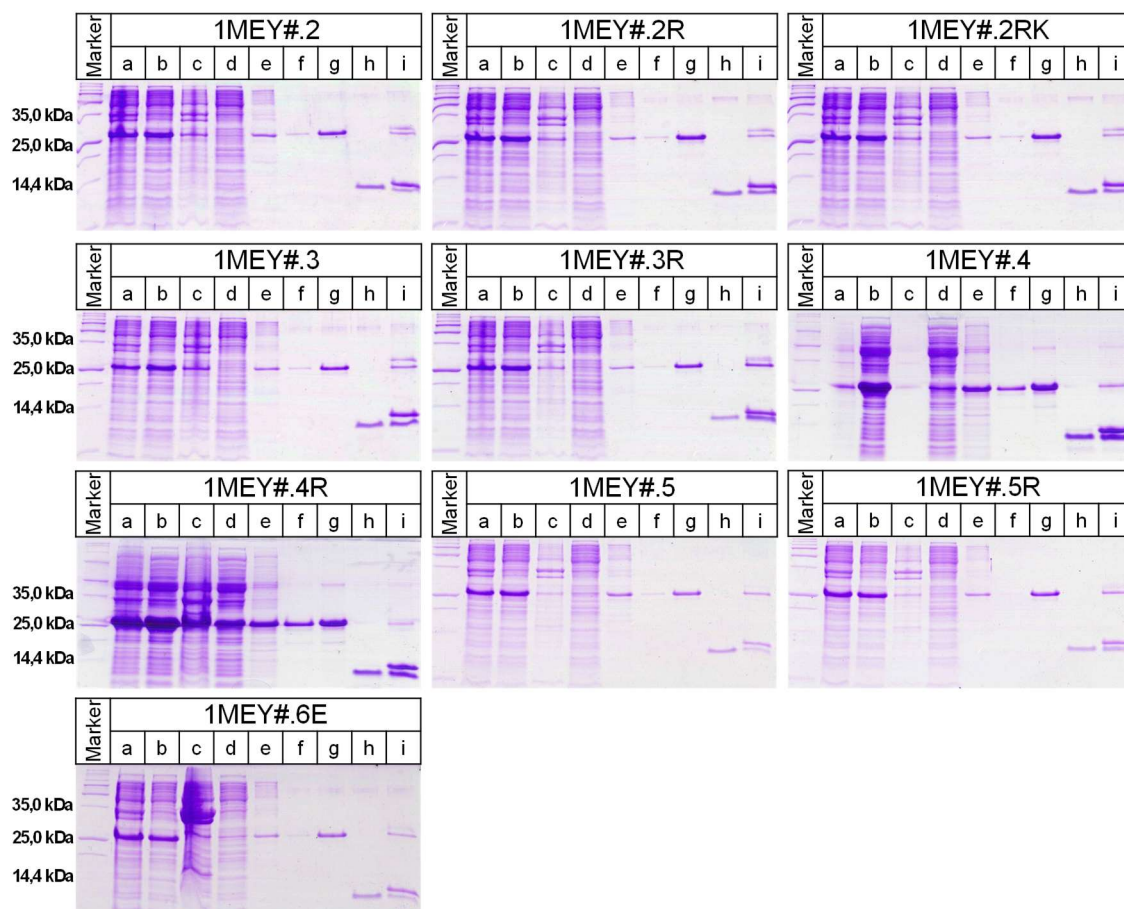
A további fehérjeverziók génjeit a pETM11-SUMO3-1MEY#.2 DNS-t felhasználva állítottuk elő Quikchange-típusú pontmutációs eljárással az **F5. táblázatban** feltüntetett oligonukleotidok segítségével.

F5. táblázat: A módosított 1MEY# fehérjék génjének előállításához használt oligonukleotidok szekvenciája.

Fehérje	Írány	Oligonukleotidok
1MEY#.2R	F	5' -ATCCTGGAACCGGGCGAAAAAG-3'
	R	5' -ATGGCGGGATCCACCGGTCTGT-3'
1MEY#.2RK	F	5' -ATCCTGAAACCGGGCGAAAAAGC-3'
	R	5' -ATGGCGGGATCCACCGGTCTGT-3'
1MEY#.3	F	5' -AAGCCGTATAAATGCCCAGAATGC-3'
	R	5' -ATGGCCGGATCCACCGGT-3'
1MEY#.3R	F	5' -AAGCCGTATAAATGCCCAGAATGC-3'
	R	5' -ATGGCGGGATCCACCGGTCTGT-3'
1MEY#.4	F	5' -AAAAAGCCGTATAAATGCCCAGAATGC-3'
	R	5' -ATGGCCGGATCCACCGGT-3'
1MEY#.4R	F	5' -AAAAAGCCGTATAAATGCCCAGAATGC-3'
	R	5' -ATGGCGGGATCCACCGGTCTGT-3'
1MEY#.5	F	5' -GAAAAGCCGTATAAATGCCCAGAATGC-3'
	R	5' -ATGGCCGGATCCACCGGT-3'
1MEY#.5R	F	5' -GAAAAGCCGTATAAATGCCCAGAATGC-3'
	R	5' -ATGGCGGGATCCACCGGTCTGT-3'
1MEY#.6E	F	5' -GGCGAAAAGCCGTATAAATGCC-3'
	R	5' -GAAAAGCCGTATAAATGCCCAGAATGC-3'

A folyamat során a Phusion™ High-Fidelity DNS polimerázzal (Thermo Scientific) a teljes DNS hordozót sokszorosítottuk a szokásos rövid szakaszok helyett. A reakciótermékeket előbb fenol-kloroform eleggyel extraháltuk, majd a DNS-t a vizes fázisból etanollal csaptuk ki tisztítás céljából [253]. A DNS 5' végeit T4 polinukleotid kinázzal (Thermo Scientific) foszforiláltuk 20 percig 37 °C-on, majd a fő reakciótermékeket gél extrakcióval különítettük el az egyéb DNS melléktermékektől 1 (m/V)% agaróz gél és GeneJET gél extrakciós kisset (Thermo Scientific) alkalmazva. A foszforilált és tisztított tompa végű lineáris DNS hordozókat T4 DNS ligázzal (Thermo Scientific) összekapcsoltuk

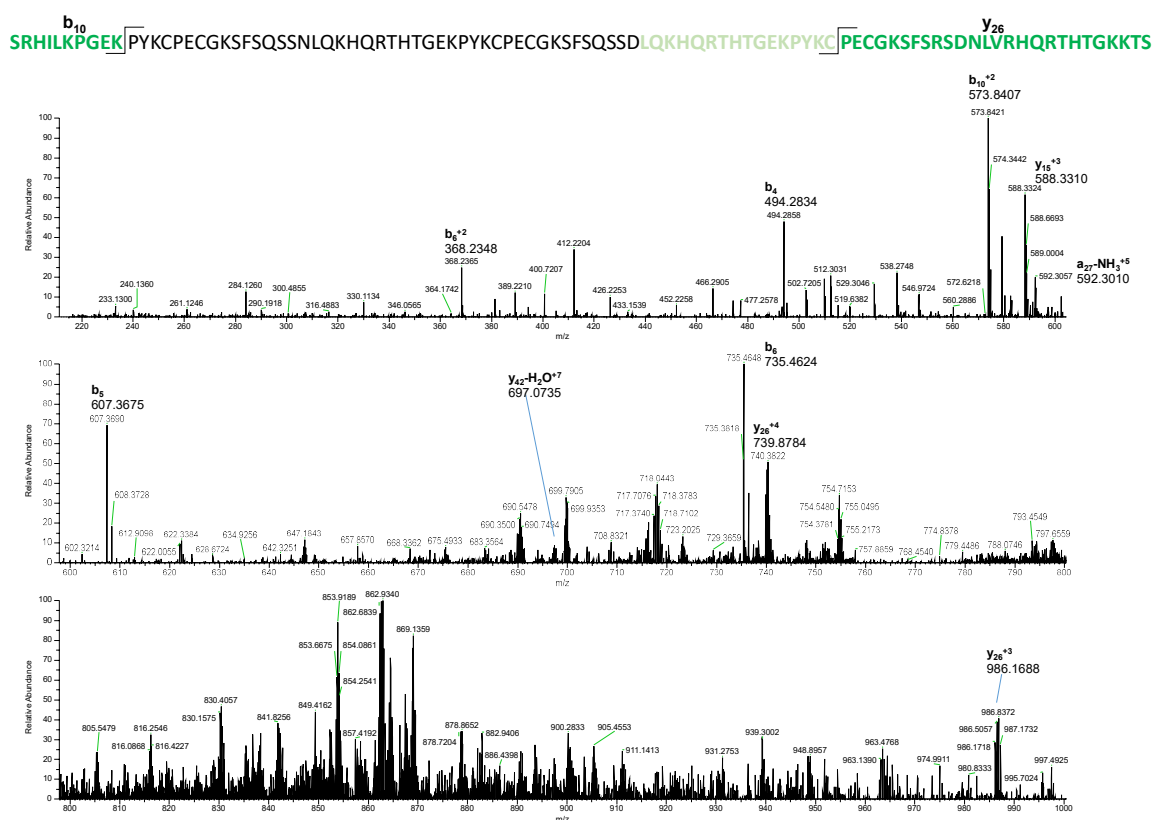
1 óra 37 °C inkubáció során, majd a reakcióelegyek részletével *E. coli* DH5 α kompetens sejteket transzformáltunk. Az előállított DNS molekulák sokszorosítása, tisztítása és ellenőrzése a korábbiakkal analóg módon zajlott (**ld. F1.1 fejezet**).



F19. ábra: 1MEY# verziók tisztításának vizsgálata Tricine-SDS-PAGE módszerrel. **a:** teljes fehérjefrakció szonikálás után; **b:** oldható fehérjefrakció; **c:** oldhatatlan fehérjefrakció; **d:** felülúszó a Ni-NTA gyantához való kötődés után; **e:** felülúszó 1. mosási lépést követően; **f:** felülúszó 4. mosási lépést követően; **g:** Ni-NTA gyanta mosás után; **h:** felülúszó ULP1-gyel történő hasítás után; **i:** gyanta ULP1-gyel történő hasítás után; Marker: 5 μ l Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker

F6. táblázat: Különböző 1MEY#-alapú cinkujj fehérjék másodlagos szerkezeti elemeinek százalékos összetétele BeStSel program alapján a CD spektrumok 185-250 nm tartományait felhasználva [2].

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



F20. ábra: 1MEY#.2RK fehérje MS2 fragmentációja, és a hozzárendelhető fragmensek. A vizsgálat során a 784,00 m/z értéknél található $14 \times$ töltött részecske csúcsát fragmentáltuk 30 eV ütközési energiával ütközés indukált disszociációs módszerrel (CID).