PhD Disszertáció Tézisei

TRANSZKRIPCIÓS AKTIVÁTOR CUER FEHÉRJE: TISZTÍTÁS, JELLEMZÉS ÉS POTENCIÁLIS BIOANALITIKAI ALKALMAZÁS

BALOGH RIA KATALIN

Témavezetők:

DR. JANCSÓ ATTILA

Egyetemi adjunktus

DR. GYURCSIK BÉLA

Egyetemi docens

KÉMIA DOKTORI ISKOLA

2020

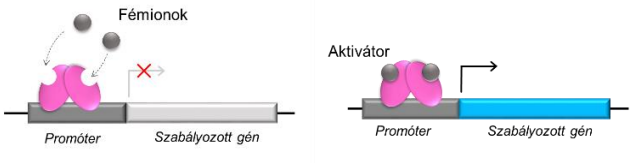
Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék

1. BEVEZETÉS

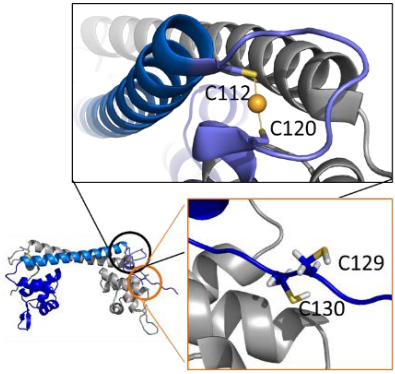
Az élő szervezetekben nagymértékben specializálódott folyamatok biztosítják a sejtek fémion-homeosztázisának fenntartását és káros hatásoktól való védelmét. A prokarióta sejtekben ezen folyamatokat a transzkripció szintjén működő fémionszabályzó fehérjék irányítják. Doktori munkám során a transzkripciós aktivátor CueR (Cu efflux Regulator) fehérje (1. ábra) fémion-kötő tulajdonságait, illetve szerkezetét vizsgáltam. Az itt bemutatott eredmények reményeink szerint hozzájárulnak a bakteriális fémion-szabályzó mechanizmusok jobb megértéséhez, valamint fémionokat szelektíven megkötő molekulák tervezéséhez vagy fémionok szelektív kimutatására alkalmas módszerek fejlesztéséhez.



1. ábra: Az aktivációs mechanizmus szerint működő fémionszabályzó fehérjék működésének sémája: a fémiont nem kötő fehérje gátolja a transzkripciót, a megfelelő fémion fehérjéhez való kötődése azonban allosztérikusan aktiválja a szabályozott gének transzkripcióját.

A CueR esetében a transzkripciót kizárólag egyértékű átmeneti fémionok, Cu(I), Ag(I) és Au(I) aktiválják. A fémionok a fehérje egy hurok-szerű részéhez koordinálódnak, ahol két cisztein aminosav lineáris geometriát biztosít a fémionok számára (2. ábra). A fehérje szerkezetében a *C*-terminális véghez közel elhelyezkedő fémionkötő-hurkot egy rövid, két-fordulatos hélix, majd egy rendezetlen szerkezetű szakasz követi. Ez utóbbi rész egy CCHH motívumban további két ciszteint tartalmaz (2. ábra). A fentebb említett két-fordulatos hélix fontos szerepet játszik a transzkripciós aktiváció folyamatában. Amikor a CueR fehérjéhez a megfelelő fémion koordinálódik, a helikális

fragmens bedokkol a fehérje többi része által kialakított hidrofób zsebbe, ami indukálja és stabilizálja a fehérje aktivátor konformációját.



2. ábra: A CueR fehérje két potenciális fémion-kötőhelyén (a fémionkötő-hurok és a CCHH motívum) található cisztein aminosavak (PDB id.: 1Q05).

2. CÉLKITŰZÉS

Annak ellenére, hogy a CueR fehérjéről meglehetősen sok információ található az irodalomban, továbbra is tisztázatlanok a fehérje transzkripciót szabályozó mechanizmusát érintő kérdések, például, hogy miként képes a CueR ilyen szelektíven különbséget tenni az egy- és kétértékű fémionok között. Továbbá az is nyitott kérdés, hogy a CueR transzkripciós aktiváló hatását közvetlenül nem befolyásoló *C*-terminális CCHH szakasznak van-e valamilyen szerepe a fehérje működésében. A PhD munkám célja ezeknek a kérdéseknek a megválaszolása volt a natív (Wild type, WT) *Escherichia coli* CueR, a *C*-terminálisról 7 aminosav (CCHHRAG) eltávolításával kapott csonkított fehérje (ΔC7-CueR), valamint az S77 aminosav ciszteinre történő kicserélésével nyert csonkított variáns (S77C-ΔC7-CueR) fémion-kötő tulajdonságainak vizsgálatán keresztül által.

A fehérjék előállítása és jellemzése mellett célul tűztük ki egy bakteriális fluoreszcens tesztrendszer kialakítását is, amelyben egy zöld fluoreszcens fehérje (EGFP) kifejeződését a CueR fehérje szabályozza.

3. MÓDSZEREK

A natív és mutáns CueR fehérjéket *E. coli* BL21(DE3) baktériumokban fejeztük ki, majd a fehérjék tisztítására speciálisan kifejlesztett nagyhatékonyságú folyadékkromatgráfiás technikákkal tisztítottuk meg. A tisztítás során nyert fehérjemintákat Na-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgáltuk meg. A fehérjék DNS kötő képességét az elektroforetikus mobilitás változásával igazoltuk, míg a megfelelő szerkezet kialakulását cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiával ellenőriztük. A fehérjék integritását elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrométer (ESI-MS) és tandem MS (MS^n) segítségével analizáltuk.

CD spektroszkópiával tanulmányoztuk a pH, a hőmérséklet és a fémionok és/vagy DNS jelenlétének a natív CueR másodlagos szerkezetére gyakorolt hatását.

A fehérjék fémkomplexeinek képződését ESI-MS mérésekkel követtük. Annak érdekében, hogy jobban megértsük a CueR fémion koordinációs sajátságait, számos kísérletet végeztünk a natív, a ΔC7- és az S77C-ΔC7-CueR fehérjéken ^{199m}Hg, ^{111m}Cd és ^{111}Ag perturbált gamma-gamma szögkorrelációs (PAC) spektroszkópiával. A PAC spektroszkópia egy radioaktív izotóp alkalmazását igénylő különleges spektroszkópiai módszer, ami alkalmas metalloproteinek fémion-kötő helyének lokális szerkezetéről és dinamikájáról információt nyújtani. Ultraibolya spektroszkópiával, a $-S^{2-}$ (tiolát) → $M^{+/2+}$ ligandum-fémion töltésátviteli sávok (LMCT) követésével is tanulmányoztuk a fémion-fehérje komplexek kialakulását.

A rekombináns DNS technológia eszközeit használtuk a bakteriális fluoreszcens tesztrendszer kialakításához szükséges gének

előállításához. A tesztrendszer működését fluoreszcens mikroszkóp és microplate reader segítségével követtük.

4. Új Tudományos Eredmények

1. A natív CueR (WT CueR) és variánsainak (ΔC7-CueR S77C-ΔC7-CueR) génjét tartalmazó pET-21a-CueR, pET-21a-ΔC7-CueR és pET-21a-S77C-ΔC7-CueR plazmidok sikeres előállítása és a fehérjék kifejezése után ez utóbbiak tisztítására alkalmas kromatográfiás eljárását dolgoztunk ki és optimalizáltunk.[1] Az eljárás a következő lépésekből épül fel: nukleinsavak emésztése DNázI enzimmel, anioncsere, affinitás kromatográfia, egy második anioncsere és végül egy gélszűrés. Igazoltuk, hogy az aminosav szekvencia megváltoztatásának ellenére a ΔC7- és S77C-ΔC7-CueR fehérjék hélixekben gazdag másodlagos szerkezete, a DNS kötő és a specifikus DNS szekvenciát felismerő képessége sem tér el a natív fehérjére jellemzőtől.

2. CD spektroszkópia segítségével kimutattuk, hogy a pH változása, az Ag(I) ionok és DNS jelenléte jelentősen befolyásolják a natív CueR másodlagos szerkezetét.

   2.1. A pH 7,5-ről 6,0-ra történő csökkentése a fehérje hélixekben gazdag szerkezetének átalakulását okozza β-redős szerkezetté, amihez hasonló jelenséget fémionszabályzó fehérjék vizsgálatakor korábban még nem tapasztaltak. A fehérje szerkezeti átalakulása részben megakadályozható Ag(I) ionok hozzáadásával, és teljesen kivédhető DNS jelenlétével, amiből arra következtettünk, hogy a DNS rögzíti a fehérjét az α-helikális formában.

   2.2. A WT CueR hőmérséklet-függő CD spektrumaiból kapott olvadási profilok alapján valószínűsítjük, hogy mind Ag(I)

ionok, mind DNS jelenlétében a fehérje DNS-kötő doménje stabilizálódik.

2.3. A natív fehérje Hg(II), Zn(II) és Cd(II) ionok jelen- és távollétében felvett CD spektruma azonos, ellenben Ag(I) ionok hatására jelentősen megváltozik a CD spektrum intenzitása és alakja, valószínűleg a fémion-kötő hurok és a hélixek stabilizálódása miatt.

3. A WT CueR Hg(II), Cd(II) és Ag(I) ionok növekvő koncentrációja jelenlétében mért ESI-MS spektrum-sorozatai a fehérje jelentősen eltérő koordinációs sajátságát tükrözik egy- és kétértékű fémionokkal szemben.

3.1. Az adatok azt mutatták, hogy két Hg(II), illetve Cd(II) ion tud nagy affinitással kötődni a natív fehérjéhez. Ez a két kötőhely nagy valószínűséggel a C112 és C120 aminosavakat tartalmazó fémion-kötő hurok és a *C*-terminális CCHH motívum.[2]

3.2. Ezt a megfigyelést megerősítették a Hg(II) - ΔC7-CueR rendszer ESI-MS spektrumai, melyekben nem találtunk a Hg_2-ΔC7-CueR összetételű komplexre utaló jeleket.[2]

3.3. Ellentétben a kétértékű fémionokkal, a WT CueR Ag(I) ionokkal történő titrálásakor mért tömegspektrumokon csak az egy fémiont kötő fehérje jeleit figyeltük meg. Ez arra utal, hogy a natív fehérje két potenciális fémion-kötő helye alapvetően eltérő Ag(I)-affinitással rendelkezik.

4. A natív és a ΔC7-CueR fehérje Hg(II)-kötő tulajdonságait UV és ^{199m}Hg PAC spektroszkópiai mérésekkel is összehasonlítottuk. Ezek a DNS jelenlétében végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy míg a Hg(II) - WT CueR rendszerben pH = 8,0-nál, az ekvimoláris

összetételnél kisebb Hg(II) koncentrációk mellett a Hg(II) kétféle szerkezet között oszlik meg, addig a ΔC7-CueR fehérjéhez csak egyféle módon tud koordinálódni.[2]

4.1. A fent említett körülmények között a Hg(II) - WT CueR rendszerre jellemző két szerkezetben a fehérje két, illetve három tiolátcsoporttal koordinálódik a fémionhoz lineáris HgS_2, illetve egy T-alakú HgS_3 geometriát kialakítva. Az utóbbi esetben a CCHH motívum egyik ciszteinje csatlakozik a fémkötő-hurok két ciszteinjéhez (C112, C120) harmadik ligandumként, vagy éppen fordítva.

4.2. pH = 6,0 és pH = 8,0-nál, a fehérjéhez képest 1 vagy 2 ekvivalens Hg(II) jelenlétében csak a HgS_2 szerkezet figyelhető meg a natív fehérjével is.

4.3. A WT CueR fehérjével ellentétben a ΔC7-CueR variáns csak egy fémion-kötő hellyel rendelkezik, melyhez a Hg(II) ionok kizárólag csak HgS_2 módon koordinálódnak.

4.4. A szerkezetvizsgálati adatok arra utalnak, hogy a WT CueR fehérjével megfigyelt HgS_3 szerkezet kulcsszerepet játszik a CueR szelektivitásában, hiszen sztérikusan gátolhatja a *C*-teminális hélix bekötődését a hidrofób zsebbe, és ezáltal megakadályozhatja a transzkripciót aktiváló fehérje-konformáció kialakulását.

5. ^{111}Ag és ^{111m}Cd PAC spektroszkópiai eredmények kombinálásával a CueR fémion-felismerési folyamatának lehetséges mechanizmusával kapcsolatos új információhoz jutottunk, mely szerint a fehérje fémion-kötő szakasza jelentős koordinációs flexibilitást mutatva köti az egy- és kétértékű fémionokat.[3]

5.1. A WT CueR pH = 8,0-nál és $T = -196$ °C-n felvett ^{111}Ag PAC spektrumán megfigyelt két nukleáris kvadrupól kölcsönhatás (NQI) két eltérő koordinációs geometriájú szerkezet együttes jelenlétét tükrözi. Ezek egyike egy torzult lineáris koordinációs geometriájú részecske, melyben két tiolátcsoport kötődése mellett a nagyobb távolságra lévő S77 karbonil-oxigénje is kapcsolódhat a fémionhoz, míg a másik egy egyértelműen nagyobb koordinációs számú szerkezet, amely egy közeli aminosav vagy egy külső ligandum, például egy környező víz molekula, koordinációjának eredménye.

5.2. Az Ag(I)-ΔC7-CueR rendszerben mért ^{111}Ag PAC spektrum a WT CueR fehérjével kialakuló részecskékhez nagyon hasonló szerkezetek jelenlétét tükrözi, ami igazolja, hogy a *C*-terminális CCHH motívum közvetlenül nem vesz részt az Ag(I) ionok megkötésében.

5.3. A Cd(II)-WT CueR rendszerben felvett ^{111m}Cd PAC spektrum eltérő a ^{111}Ag spektrumoktól és egy szimmetrikus koordinációs geometriájú, valószínűleg torzult tetraéderes CdS_4 típusú részecske jelenlétét tükrözi.

5.4. A bemutatott eredmények jól szemléltetik, hogy a PAC spektroszkópia mekkora potenciállal bír a fémion-kötő helyeken a nanoszekundumos időskálán zajló folyamatok dinamikájának vizsgálatában. Eredményeink alapján azt valószínűsítjük, hogy a CueR fehérje funkcionális, lineáris geometriát biztosító fémion-kötő helyét jelentősen megbontja a nem saját, kétértékű fémionok megkötődése, megakadályozva ezzel a transzkripció aktiválását.

6. Kialakítottunk, majd optimalizáltunk egy Cu(II)-érzékeny, bakteriális, fluoreszcens tesztrendszert. Fluoreszcencia

mikroszkopiás felvételeink azt mutatták, hogy az LB tápoldatban 1 mM, míg az M9 tápoldatban már 10 µM koncentrációjú Cu(II) ion elegendő a zöld fluoreszcens fehérje (EGFP) kifejeződésének indukálásához, ugyanakkor a CueR fémion-szelektivitásának köszönhetően a Zn(II) ionok még 10 mM koncentrációban sem indukálják az EGFP termelődését.

5. Publikációs Lista

Magyar Tudományos Művek Tára (MTMT) azonosító: 10054977

Az értekezéshez kapcsolódó tudományos közlemények

[1] R.K. Balogh, B. Gyurcsik, É. Hunyadi-Gulyás, H.E.M. Christensen, A. Jancsó: Advanced purification strategy for CueR, a cysteine containing copper(I) and DNA binding protein. *Protein Expression and Purification,* 123, 90–96 (2016).
IF = 1,29

[2] R.K. Balogh, B. Gyurcsik, É. Hunyadi-Gulyás, J. Schell, P.W. Thulstrup, L. Hemmingsen, A. Jancsó: C-terminal cysteines of CueR act as auxiliary metal site ligands upon Hg(II) binding - A mechanism to prevent transcriptional activation by divalent metal ions? *Chemistry – A European Journal*, 25, 15030-15035 (2019)
IF = 5,16

[3] R.K. Balogh, B. Gyurcsik, M. Jensen, P.W. Thulstrup, U. Köster, N.J. Christensen, F.J. Mørch, M.L. Jensen, A. Jancsó, L. Hemmingsen: Flexibility of the CueR metal site probed by instantaneous change of element and oxidation state from Ag^{I} to Cd^{II}. *Chemistry – A European Journal,* Accepted (2020)
IF = 5,16

ΣIF = 11,61

További tudományos közlemények:

[4] E. Németh, R.K. Balogh, K. Borsos, A. Czene, P.W. Thulstrup, B. Gyurcsik: Intrinsic protein disorder could be overlooked in cocrystallization conditions - An SRCD case study. *Protein Science,* 25, 1977-1988 (2016). DOI: 10.1002/pro.3010

IF = 2,42

[5] K. Kowalski, J. Skiba, Q. Yuan, A. Hildebrandt, H. Lang, D. Trzybiński, K. Woźniak, R.K. Balogh, B. Gyurcsik, and V. Vrček: Ferrocenyl GNA nucleosides: a bridge between organic and organometallic xeno-nucleic acids. *ChemPlusChem*, 83, 77-86 (2018) DOI: 10.1002/cplu.201700551

IF = 3,44

[6] 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. *European Biophysics Journal*, 48, 231-248 (2019). DOI: 10.1007/s00249-019-01347-6

IF = 2,53

[7] 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 Expression and Purification*, 159, 53-59 (2019) DOI: 10.1016/j.pep.2019.03.009

IF = 1,29

ΣΣIF = 21,29

Nemzetközi konferenciákon bemutatott poszterek

1. R. Balogh, A. Jancsó, B. Gyurcsik, H.E.M Christensen: Synthesis, purification and metal ion binding studies on native and modified CueR metalloregulatory proteins. REGIONAL CONFERENCE: "Heavy metal as contaminants of the environments"- HuRo conference, Timisoara, Romania, 17 May 2013

2. R. Balogh, A. Jancsó, B. Gyurcsik, H.E.M Christensen: Synthesis, purification and metal ion binding studies on native and modified CueR metalloregulatory proteins. 13th Edition of Academic Days Timisoara, Timisoara, Romania,13−14 June 2013

3. R.K. Balogh, K. Borsos, A. Czene, E. Németh, B. Gyurcsik: Induced Folding of NColE7 Metallonuclease Monitored by SRCD. 590. WE-Heraeus-Seminar on Synchrotron Radiation Circular Dichroism (SRCD) Spectroscopy, Bad Honnef, Germany, 17−20 May 2015

4. R.K. Balogh, A. Jancsó, B. Gyurcsik, H.E.M. Christensen, É. Hunyadi-Gulyás: Strategies for purification of a cysteine containing DNA binding protein. 13th European Biological

Inorganic Chemistry Conference, Budapest, Hungary, 28 August – 1 September 2016

5. R.K. Balogh, A. Jancsó, B. Gyurcsik, E. Németh: A study on the secondary structure of the metalloregulatory protein CueR: effect of pH, metal ions and DNA. 14th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC), Toulouse, France, 7−10 June 2017

6. R.K. Balogh, A. Jancsó, B. Gyurcsik, E. Németh: pH induced structural switch of CueR metalloregulatory protein. 19th International Union of Pure and Applied Biology (IUPAB) Congress and 11th European Biophysical Societies' Association (EBSA) Congress, Edinburgh, Scotland, 16−20 July 2017

7. R.K. Balogh, E. Mesterházy, K. Kato, K. Nagata, A. Jancsó, B. Gyurcsik: Detection of toxic metal ions by the CueR metalloregulator. 14th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Birmingham, United Kingdom, 26−30 August 2018

8. R.K. Balogh, E. Mesterházy, K. Kato, K. Nagata, A. Jancsó ,B. Gyurcsik: Detection of toxic metal ions by the CueR metalloregulator. COST-sponsored ARBRE-MOBIEU plenary meeting, Zagreb, Croatia, 18−20 March 2019

9. R.K. Balogh, B. Gyurcsik, É. Hunyadi-Gulyás, P.W. Thulstrup, L. Hemmingsen, A. Jancsó: Investigation of Hg(II) binding of CueR protein: a possible role of C-terminal cysteines in selective operation of the protein, Interlaken, Switzerland, 11−16 August 2019

Nemzetközi konferenciákon tartott előadások

1. R.K. Balogh, H.E.M. Christensen, M.N. Asaka, K. Kato, K. Nagata, B. Gyurcsik, A. Jancsó: The potential application of CueR protein in selective detection of toxic metal ions. XXV. International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry - The 50th Anniversary of ICCBIC, Smolenice, Slovakia, 31 May – 5 June 2015

2. R.K. Balogh, B. Gyurcsik, A. Jancsó: Transcriptional activator CueR protein: purification and characterization, 9th Chemistry Towards Biology (CTB), Budapest, Hungary, 24–27 September 2018

Hazai konferenciákon tartott előadások

1. Balogh R.K., Mesterházy E., Gyurcsik B., Jancsó A., H.E.M. Christensen, M.N. Asaka, K. Kato, K. Nagata; Réz(I)ionok szelektív kimutatása a CueR fémszabályzó fehérje segítségével. XXXVIII. Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2015. október 26-28.

2. Balogh R.K., Gyurcsik B., Jancsó A.: A CueR fehérje másodlagos szerkezetének vizsgálata cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával. XXXIX. Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2016. október 17-19.

3. Balogh R.K., Jancsó A., Gyurcsik B., Németh E.: Egy transzkripciós aktivátor fehérje pH indukált szerkezetváltozásának tanulmányozása. 51. Komplexkémiai Kollokvium, Balatonvilágos, 2017 május 29-31.