

A MITOKONDRIÁLIS CITOKRÓM C POSZTTRANSLÁCIÓS ÉRÉSE

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Tenger Katalin

Témavezető: Dr. Zimányi László

Konzulens: Dr. Rákhely Gábor

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet

Szeged 2010

Bevezetés

A *c* típusú citokrómok esszenciális hemtartalmú fehérjéi majdnem minden élőlénynek. Szerkezeti és funkcionális sokszínűségükben a közös vonást a kovalensen kapcsolt prosztetikus csoportjuk jelenti, amely szint és jellegzetes abszorpciós spektrumot kölcsönöz a fehérjéknek. A hem kovalens kötésére a *c* típusú citokrómok döntő többsége egy Cys-Xxx-Xxx-Cys-His hemkötő motívumot tartalmaz. A poszttranszlációs lépést, amely a hem kovalens kapcsolását jelenti a hemkötő motívumhoz, a *c* típusú citokrómok érésének nevezzük. A *c* típusú citokrómoknak többféle, eltérő bonyolultságú érlelő rendszere ismert. A kovalensen kötött hem, a citokróm *c* fehérjék sokszínűsége és a *c* típusú citokrómok érleléséhez kialakult többféle rendszer meglepte számos, még megválaszolatlan kérdést vetnek fel szerkezeti, működésbeli és evolúciós szempontból.

A sokféle szerkezettel és funkcióval bíró *c* típusú citokrómok közül az elektrontovábbító szerepet betöltő mitokondriális szolubilis *c* típusú citokrómok különösen alkalmasak különféle kísérletek elvégzésére. Ezek a fehérjék a mitokondriumok intermembrán terében helyezkednek el, a légzési lánc komponensei, és két membránkött partnerük között H^+ transzport nélkül szállítanak elektronokat.

A kísérleteinkben felhasznált ló mitokondriális citokróm *c* alkalmas lehet arra, hogy heterológ *in vivo* és *in vitro* citokróm *c* érési kísérletekkel a helyes érés biokémiai feltételeit tisztázni lehessen. A mitokondriális *c* típusú citokrómok érési vizsgálatokon túl alkalmasak elektrontranszfer kísérletek elvégzésére is. A *c* típusú citokrómok nem fotoaktív redoxmolekulák abban az értelemben, hogy az elektronfelvételt és -leadást a hemcsoport elektronikus gerjesztése nélkül végzik. Gyors, jó időfelbontású elektrontranszfer vizsgálatokhoz kovalensen és aminosavakra nézve szelektíven kell jelölni őket fényel gerjeszthető, fotoaktív (azaz gerjesztett állapotban redox aktív) molekulákkal, festékekkel. A szelektív jelöléshez felületi, funkció szempontjából semleges aminosavakat kell mutagenézissel jelölhetőekre cserélni. A külsőleg kovalensen hozzáadott festék előnye az, hogy a fehérje bármilyen kívánt pozícióban jelölhető, miáltal a donor és az akceptor (azaz a festék és a hem) távolsága, az elektrontranszfer iránya szinte tetszőlegesen változtatható. Az ily módon jelölt fehérjéken végzett elektrontranszfer kísérletek választ adhatnak a fehérje-komplexeken, ill. fehérjéken belüli elektrontranszfer mechanizmusának és természetének a kérdésére.

A mitokondriális citokróm *c* és mutánsainak előállításához gondoskodni kell nemcsak a fehérje expressziójáról, hanem annak éréséről is, azaz a hem kovalens kötéséről és a fehérje

megfelelő feltekeredéséről. Ehhez valamely érlelő rendszer megfelelő fehérjéjét is ki kell fejteni a gazdasejtben. A citokróm *c* mutánsok előállításának igénye természetesen vezetett el dolgozatom fő témájához, a citokróm *c* érésének és az érlelő fehérje, a citokróm *c* hem liáz (CCHL) működésének vizsgálatához.

Célkitűzések

Kutatásaink a citokróm *c* mutánsok előállításával és jelölésével annak a kérdésnek a tisztázására irányulnak, hogy hogyan szabályozza a fehérje a redox reakciók sebességét. Ezt olyan fehérjén, illetve fehérje-komplexezen végzett elektrontranszfer kísérletekkel vizsgáljuk, amelyekben különböző kísérleti paramétereket változtatunk meg. Főként az elektrondonor és -akceptor relatív pozícióját, miáltal módszeresen vizsgálható egyrészt az elektrontranszfer útvonal hosszának, másrészt a donor és akceptor közötti fehérjemátrix molekuláris szerkezetének a hatása az elektrontranszferre. A citokróm *c* mutánsok előállítása egy megbízhatóan működő és nagy hozamot biztosító expressziós rendszert igényel. A jó expressziós rendszer, valamint egy hatékony fehérje-tisztítási procedúra kidolgozása elengedhetetlen ahhoz, hogy nagy mennyiségben álljon rendelkezésre a kívánt fehérje. A munka ezen részének célja a ló holocitokróm *c* mutánsok megbízható és hatékony előállításának a kidolgozása volt.

Az eukarióta citokróm *c* mutánsoknak sikeres heterológ koexpressziója az érlelő enzimmel felvetette az igényét annak, hogy az érést magát önálló kutatási területként vizsgáljuk. Heterológ gazdában a sikeres *in vivo* érési kísérletek nem adhatnak választ arra vonatkozóan, hogy melyek azok a minimális kísérleti körülmények, amelyek sikeres éréshez vezethetnek. Ennek a kérdésnek a megválaszolására kontrollált *in vitro* vizsgálatok kellene. A sikeres *in vitro* rekonstitúciós kísérlet előfeltétele, hogy az érlelő enzim tisztított, aktív formája rendelkezésre álljon, ehhez pedig egy tisztítási procedúrának a kidolgozása volt a cél. Célul tűztük ki tehát a CCHL enzim heterológ expresszióját és tisztítását, különös tekintettel arra, hogy a szakirodalom tanúsága szerint ezt a fehérjét még nem tisztították ki, ezért az elsődleges szekvenciáján túl semmilyen szerkezeti ismeretünk nincs róla.

Célul tűztük ki a CCHL fehérje szerkezetének és működésének, illetve a szubsztrátjaival (hem és apocitokróm *c*) való kölcsönhatásának a tanulmányozását. Mivel a fehérje aktív formában való előállítása meglehetősen kis hatásfokú, egyelőre kristályosításhoz vagy NMR szerkezet-meghatározáshoz elegendő mennyiségre nem gondolhatunk. Ezért főként spektroszkópiai mérések elvégzését tűztük ki célul a tisztított fehérjén önmagában,

illetve szubsztrátjaival együtt. A CCHL szekvenciájának felhasználásával pedig homológia-keresés és *in silico* szerkezet-predikciós számolások segítségével kívántunk ismereteket szerezni a fehérje várható szerkezetéről és tulajdonságairól.

Az expressziós kísérletek során kiderült, hogy *E. coli*-ban „overnight” inkubáció alatt akkor is képződik holocitokróm *c* – igaz, meglehetősen kis hatásfokkal – ha a sejt csak az apocitokróm *c* génjét tartalmazza, a CCHL génjét nem. Ezt a nem-enzimátikus – az egyszerűség kedvéért – spontán érésnek nevezett jelenséget is alaposabb vizsgálat alá kívántuk vonni, hiszen a nem-enzimátikus érés lehetősége és az így képződött citokróm *c* összehasonlítása az enzimatikusan érlelt citokrómmal az enzimatikus érés mechanizmusáról és körülményeiről is elárulhat fontos részleteket.

Kísérleti módszerek

Citokróm *c* túltermelésére alkalmas plazmid-konstrukciókat állítottunk elő, amelyekkel a feladatra alkalmas *E. coli* baktérium-törzseket transzformáltuk. A CCHL génjét tartalmazó plazmidot ajándékba kaptuk Dr. Carsten Sanders-től (Kutztown University of Pennsylvania). A DNS-manipulációs eljárásokat, a kompetens sejt készítést és a törzsek transzformálását az általános gyakorlatnak megfelelően végeztük, amint az a laboratóriumi tankönyvekben és cikkekben le van írva.

A citokróm *c* mutagenezist kétlépéses PCR amplifikációval hajtottuk végre, restrikciós endonukleáz hasítással a gént a megfelelő orientációban a túltermelő plazmidba ligáltuk, majd a mutációt szekvenálást követően igazoltuk. A citokróm *c* expressziójára két különböző expressziós rendszer is szolgált. Az egyik rendszerben a két gén tandem módon egy közös promoterről íródott át, míg a másikban genetikailag kompatibilis plazmidok hordozták a citokróm *c* és a CCHL géneket, amelyek más - más erősségű promoterekről íródtak át.

A túltermelést követően a fehérjetisztítás első lépésében kémiai és mechanikai (szonikálás) módszerekkel feltárt sejtekből ultracentrifugálással szolubilis extraktumot nyertünk. A citokróm *c*-t tartalmazó extraktumot előbb 50% ammónium szulfáttal kezelve egy tisztítási lépésnek vetettük alá, majd dialízist és töményítést követően ioncserélő kromatográfiás lépéssel a holocitokróm *c*-t megtisztítottuk. A fehérjeoldatok tisztaságának megállapítására denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis vizsgálatot alkalmaztunk, a szétválasztott fehérjéket Coomassie BB G-250 festékkel tettük láthatóvá. A Strep II peptiddel ellátott citokróm *c*-t az ioncserélő lépést követően egy affinitás-tisztítási lépésnek is

alávetettük. A His₆ peptid-fuzionált CCHL-t az extraktumból affinitás-kromatográfiával tisztítottuk ki. A fehérjetisztítás kromatográfiás lépéseit FPLC (Pharmacia) készüléken végeztünk.

A Strep II és His₆ peptidekkel fuzionált fehérjéket elválasztásukat követően Western-blot analízisnek vetettük alá, majd immunodetekcióval azonosítottuk. Az így keletkezett kemilumineszcenciás jelet egy VersaDoc Imaging System készülékkel vagy röntgen filmen autoradiográfiás módszerrel detektáltuk.

A fehérjék tisztaságának megállapítására, a fehérjeoldatok koncentrációjának meghatározására és a citokróm *c* spektrális vizsgálatára alkalmas módszer az abszorpciós spektrum felvétele. Ezért UV-látható hullámhossz-tartományú spektrumokat mértünk Unicam UV4 spektrofotométeren.

Másodlagos szerkezeti elemzések céljából az ultraibolya tartományban cirkuláris dikroizmus (CD) méréseket végeztünk Jasco J-815 spektropolariméteren.

A hem kovalens kötésének kimutatására a denaturáló gélben megfutott citokróm *c* hemjének peroxidáz-aktivitásából származó kemilumineszcenciás jelet detektáltunk VersaDoc Imaging System készülékkel.

A hem kétszeres tioéter kötésének bizonyítékául megmértük a nem-enzimatikusan érő citokróm *c* redukált, piridin-koordinált hemokróm abszorpciós spektrumát. Ezen mérési körülmények között a spektrum csúcsának pozíciója a hem egyszeres vagy kétszeres kötésének függvényében változik.

A különböző módokon érő citokróмок redukációs potenciáljának meghatározására kémiai módszert, ferri-/ferrocianidos redox titrálást alkalmaztunk. A citokróm *c* középponti redoxpotenciálját a Nernst egyenlet legkisebb négyzetes illesztésével határoztuk meg.

A citokróмок elektrontranszfer aktivitásának vizsgálatára citokróm *c* oxidázzal (COX) aktivitási kísérleteket végeztünk. Ezzel a módszerrel az oxigén fogyasztást követtük, amely a COX enzim aktivitásának a következménye. Az aktivitásméréseket Model 10 (Rank Brothers Ltd) oxigráfon végeztük. A mérésekből meghatároztuk az enzimaktivitásra jellemző, a Michaelis-Menten egyenletben szereplő paramétereket, a K_m -et és a V_{max} -ot.

Eredmények és megvitatásuk

1. Kidolgoztunk egy kontrollálható, nagy hozamot biztosító citokróm *c* expressziós rendszert

Irodalmi előzmények és partnereinktől kapott kiinduló plazmidok alapján sikerült kísérleteink számára kidolgozni egy megbízható és nagy hozamot biztosító saját expressziós rendszert. Érdekessége a rendszernek, hogy eukarióta enzim érlel tökéletesen eukarióta fehérjét prokarióta citoplazmában. Semmilyen más külsőleg hozzáadott faktor nem szükséges a citokróm *c* éréséhez. A saját expressziós rendszerben a citokróm *c* és hem liáz géneit tartalmazó kazettát, illetve a citokróm *c* génjét a pBAD24 plazmid szigorú szabályozást biztosító arabinóz promóterének és szabályozó régiójának ellenőrzése alá helyeztük. A szigorú szabályozás érdekében a plazmid hordozza a P_{BAD} promóter negatív és pozitív kontrollját biztosító AraC fehérje génjét, amely konstrukció így magas indukált és rendkívül alacsony nem indukált expressziót biztosít.

2. Kimutattuk, hogy egy eukarióta citokróm *c* érése nem-enzimatikus körülmények között is lehetséges bakteriális citoplazmatikus környezetben

Nem tisztázott még a mitokondriális citokróm *c* CCHL általi enzimátikus érésének a mechanizmusa, de az általunk végzett heterológ *in vivo* és *in vitro* kísérletek ismereteket szolgáltatnak a pontos molekuláris folyamatoknak a megértéséhez. Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a CCHL közreműködése nélkül is, igaz lényegesen alacsonyabb hozammal, de képes a ló citokróm *c* az *E. coli* citoplazmájában érni, oly módon, hogy helyes kovalens kötés alakuljon ki a hem vinilcsoportjai és a polipeptidlánc ciszteinjei között. Ez az első olyan munka, amely prokarióta közegben eukarióta citokróm *c* enzimasszisztencia nélküli éréséről szolgáltat bizonyítékot és ismereteket. A nem-enzimatikus érést az *E. coli* EC06 Ccm (citokróm *c* maturációban) deficiens törzsében is megfigyeltük. CCHL jelenlétében, illetve hiányában a citokróm *c* expressziós hozama egyforma, mivel ugyanazok a kísérleti körülmények, beleértve az expressziós konstrukciót és az *E. coli* törzset is. A citokróm *c* nem-enzimatikus érése jóval lassabb folyamat, mint az enzimátikus érés. „Overnight” inkubáció után, a fehérjék tisztítását követően adható hozzávetőleges hozambecslés alapján a nem-enzimatikusan érő citokróm *c* hozama ~2 %-a az enzimátikusan érőnek. A nem-enzimatikusan érő citokróm *c* kovalens hem kötését mindenekelőtt az SDS gél-elektroforézis során denaturálódott fehérje pozitív hem peroxidáz-aktivitási eredményével igazoltuk. Ez a kísérlet ugyanakkor nem tesz különbséget a hem egyszeres vagy kétszeres

kötése között. A hem helytelen orientációja, pl. elfordulása az α , γ mezo tengelye körül a hem nem megfelelő illeszkedését jelentené a polipeptidlánchoz, és ez egyszeres hem kötést eredményezne. A nem-enzimatikusan érő citokróm *c* piridin hemokróm spektruma azonban világosan megmutatta, hogy a fehérje a hemkötő motívumának mindkét ciszteinjén keresztül köti a hemet, ami az utóbbi natív orientációjára utal.

3. Megvizsgáltuk a CCHL szerepét a hem natív környezetének a kialakításában

A CCHL hiánya nemcsak a hozamban, hanem kisebb spektrális eltolódásokban és fizikokémiai eltérésekben is megnyilvánul.

A nem-enzimatikusan érő citokróm *c* a natívhoz hasonlóan erős axiális ligandumokkal hatszorosan koordinált, alacsony spinű citokróm *c*-re jellemző Q sávval rendelkezik, de a natívhoz képest 1 nm spektrális eltolódást mutat. A natív, enzimatikusan és enzim nélkül érő citokróm *c*-k spektrumainak Q sávjai ugyanarra az öt Gauss görbére voltak felbonthatóak. A Q sávjának Gauss felbontása a nem-enzimatikusan érő citokróm homogenitását és a natívval való hasonlóságát támasztja alá. A nem-enzimatikusan érő citokróm *c* 1 nm-es vöröseltolódása a legalacsonyabb energia-átmenet esetében minimális energiaszint csökkenést jelent az alapállapot és az első gerjesztett állapot között. Az 551 nm-es csúcspontot képező egyik Gauss görbe kiszélesedése olyan konformációs heterogenitásról árulkodhat, amely a natív, illetve az enzimatikusan érő fehérjék esetében nincsen jelen, vagy csak nagyon kis mértékben. Ez jelentheti azonban az alapállapotú hem vibrációs szintjeinek a különböző populációját, amely szintén árulkodhat a nem-enzimatikusan érő citokróm *c* hemjének enyhén megváltozott geometriájáról és/vagy környezetéről.

A nem-enzimatikusan érő citokróm *c* redoxpotenciálja valamivel alacsonyabb az autentikus és a rekombináns fehérjék redukciós potenciáljánál. Az oxidált vasnak (Fe^{3+}) ez a relatív stabilitása lehet a vas és a 80-as metionin axiális ligandum közötti kölcsönhatás csekély változásának a következménye. Ugyanerre utal a 695 nm-es jellegzetes töltéstranszfer sáv eltűnése is a nem-enzimatikusan érő oxidált citokróm *c* abszorpciós spektrumából. A koordináció teljes megszűnése jóval nagyobb negatív redoxpotenciál-változást eredményezett volna, mint amekkorát mértünk. A hem zseb nagymértékű szerkezetváltozása jelentős autoxidációs sebesség-növekedéssel is járna, de ezt sem tapasztaltuk. Kiseb változások a hem geometriájában, koordinációjában, illetve a hem zseb polaritásában magyarázhatják azt az eredményt is, hogy a nem-enzimatikusan érő citokróm *c* és a COX kölcsönhatásából számolt Michaelis-Menten konstans (K_m), mely a citokróm *c*-nek COX-szal való

5. Tanulmányoztuk a CCHL kölcsönhatását szubsztrátjaival és *in vitro* környezetben rekonstituáltuk a citokróm *c* érését.

Megvizsgáltuk a tisztított CCHL és a hem kölcsönhatását. A CCHL és a hem kölcsönhatásának vizsgálatakor mért abszorpciós változások magyarázatot adnak számunkra az IUPred programmal végzett szerkezet-predikciós és az irodalomból ismert proteolitikus emésztési eredményekre. Az abszorpció-változásnak két lépése van, az első lépésben az enzim kölcsönhatásba lép a szubsztráttal, a második lépésben kialakul egy hatszorosan koordinált hem spektrum. Ezt a kétlépéses folyamatot azzal magyaráztuk, hogy a fehérje rendezetlen szerkezetű szakasza lép kölcsönhatásba a hemmel, ebben a lépésben a szabad hem fogyasztát követhettük nyomon spektrálisan, majd a második fázisban valószínű, hogy a hemszabályozó CPV motívumoknak a segítségével kialakul a hem és az enzim között egy stabilabb kölcsönhatás, amelyben a motívum cisztein oldalláncai koordinálják a vasat.

In vitro holocitokróm *c* érési kísérleteket végeztünk a tiszta CCHL-lel és az apocitokróm *c*-vel. Ezzel az *in vitro* kísérlettel sikerült rekonstituálni az enzimátikus citokróm *c* érést, amelyet denaturáló gélben detektált hem kemilumineszcenciás jellel és spektrálisan is igazoltunk.

A rekombináns citokróm *c* mutánsok előállításának, a folyamat optimalizálásának eredeti célja fehérje-elektrontranszfer mérésekhez jelölhető citokrómok készítése volt. Ugyanakkor a rekombináns mutáns citokróm *c* előállításának optimalizálása, a CCHL heterológ expressziójának és tisztításának kidolgozása lehetőséget teremt arra is, hogy a jövőben a citokróm *c* és a CCHL irányított mutagenézisével vizsgálni tudjuk a citokróm *c* érésének molekuláris mechanizmusát, elegendő mennyiségű tiszta CCHL előállítása után pedig megkíséreljük a CCHL szerkezetének további felderítését röntgendiffrakciós vagy NMR módszerrel.

Az értekezés témájához szorosan kapcsolódó közlemények és konferencia-kiadványok

1. **Tenger K**, Khoroshyy P, Leitgeb B, Rákhely G, Borovok N, Kotlyar A, Dolgikh DA, Zimányi L. **2005**. Complex kinetics of the electron transfer between the photoactive redox label TUPS and the heme of cytochrome *c*. *J. Chem. Inf. Mod.* 45(6):1520-1526. IF: 2,923
2. **Tenger K**, Khoroshyy P, Kovács KL, Zimányi L, Rákhely G. **2007**. Improved system for heterologous expression of cytochrome *c* mutants in *Escherichia coli*. *Acta. Biol. Hung.* 58:23-35. IF: 0,688
3. **Tenger K**, Khoroshyy P, Rákhely G, Zimányi L. **2008**. Heterologous overexpression of eukaryotic cytochrome *c* and cytochrome *c* heme lyase to study the mechanism of cytochrome *c* maturation. *Biochim. Biophys. Acta* 1777:S90.
4. **Tenger K**, Khoroshyy P, Rákhely G, Zimányi L. **2010**. Maturation of a eukaryotic cytochrome *c* in the cytoplasm of *Escherichia coli* without the assistance by a dedicated biogenesis apparatus. *J. Bioenerg. Biomembr.* 42:125-133. IF: 4,015

További közlemények

1. Kotlyar AB, Borovok N, Khoroshyy P, **Tenger K**, Zimányi L. **2004**. Redox photochemistry of thiouredopyrenetrisulfonate. *Photochem. Photobiol.* 79(6): 489-493. IF: 2,054

További kiadványok

1. Khoroshyy P, **Tenger K**, Borovok N, Kotlyar A, Siletsky S, Zimányi L. **2003**. Electron transfer steps in the complex of cytochrome *c* and cytochrome oxidase. 10th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Szeged, Hungary, ISBN 963 482 614 8, p. 153.
2. Zimányi L, Kulcsár Á, **Tenger K**, Borovok N, Kotlyar A. **2003**. Effect of the protein medium and dynamics on electron transfer in cytochrome *c*. 10th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Szeged, Hungary, ISBN 963 482 614 8, p. 154.
3. Zimányi L, **Tenger K**, Khoroshyy P, Dolgikh D, Siletsky N, Borovok N, Kotlyar A. **2004**. Photoinduced electron transfer in cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase. EBEC 2004 Short Reports. *Biochim. Biophys. Acta* 13:158.
4. **Tenger K**, Khoroshyy P, Leitgeb B, Rákhely G, Borovok N, Kotlyar A, Zimányi L. **2005**. Complex electron transfer kinetics between the photoactive label TUPS and the heme of cytochrome *c*. *Eur. Biophys. J.* 34(6):665.
5. Khoroshyy P, **Tenger K**, Zimányi L. **2006**. Intra- and interprotein photoinduced electron transfer in respiratory chain redox proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1757(14):187.
6. Khoroshyy P, **Tenger K**, Zimányi L. **2008**. Tuning the electron transfer rate by the redox potential of cytochrome *c* in complex with cytochrome *c* oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1777:S90.