

OTDK DOLGOZAT



A Nukleáris Faktor I fehérje DNS kötő doménjének előállítása és kölcsönhatása DNS-sel

KÉSZÍTETTE:

Fógel Benjámín

II. éves Vegyész MSc hallgató

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Gyurcsik Béla, egyetemi docens

Zeyad Hasan Nafae, posztdoktor

Szeged

2025

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszék

Tartalomjegyzék

Rövidítések.....	3
1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. A Nukleáris Faktor I specifikus DNS-kötő fehérje	5
2.2. I-Block kísérlet a fehérje-DNS kölcsönhatás tanulmányozására.....	9
3. Célkitűzés	11
4. Kísérleti anyagok és módszerek	12
4.1. Polimeráz láncreakció	12
4.2. Extrakció fenol-kloroform eleggyel	13
4.3. DNS kicsapása etanollal	14
4.4. Hasítás restrikciós endonukleáz enzimekkel és ligálás	14
4.5. Transzformálás	15
4.6. Szaporítás	15
4.7. A DNS tisztítása sejtekből - miniprep	16
4.8. A cél-DNS beépülésének ellenőrzése.....	16
4.9. Gélelektroforézis	17
4.9.1. Agaróz gélelektroforézis	17
4.9.2. Poliakrilamid gélelektroforézis	17
4.10. Mikrolemmez-olvasó.....	18
5. Eredmények.....	19
5.1. A Nukleáris Faktor I DNS-kötő fehérjedomén előállítása	19
5.1.1. PCR - A fehérje génjének előállítása DNS hordozóról	20
5.1.2. Hasítás restrikciós endonukleázzal	22
5.1.3. Ligálás és transzformálás	23
5.1.4. A NFI Fehérje előállítása.....	24
5.2. I-Block kísérlet fehérje – DNS kölcsönhatás vizsgálatára sejteken belül	25
5.2.1. A DNS célszekvencia beépítése a DNS hordozóba.....	25
5.2.3. A fehérje génjének beépítése pBAD24 hordozóba.....	28
5.2.5. Kettős transzformálás	34
5.2.6. I-Block kísérlet Plate Readerrel.....	39
6. Összefoglalás.....	44
7. Irodalomjegyzék.....	45
8. Köszönetnyilvánítás	47

Rövidítések

(k)bp: (kilo)bázispár – a bázispár kifejezést a DNS molekulában az egymáshoz hibridizálódó dezoxinukleotid-pár helyett használva

AdenoV: Adenovírus

AMP: Ampicillin

Ara: Arabinóz

dCMP: Dezoxicitidin-monofoszfát

DNáz: Dezoxiribo-nukleáz

DNS-Prot: DNS-Fehérje komplex

Glu: Glükóz

KAN: Kanamicin

kDa: kiloDalton

LB: Lysogeny broth, egy tápanyagban gazdag tápoldat/talaj, elsősorban baktériumok szaporítására szolgál.

NFI: Nukleáris Faktor I

NFI-BD: NFI DNS-kötő domén

PCR: Polimeráz láncreakció

pdUA-lacI_N: *lacI* gént tartalmazó pdUA DNS hordozó, NheI (hasító enzim) felismerő szakasszal a promóter régióban.

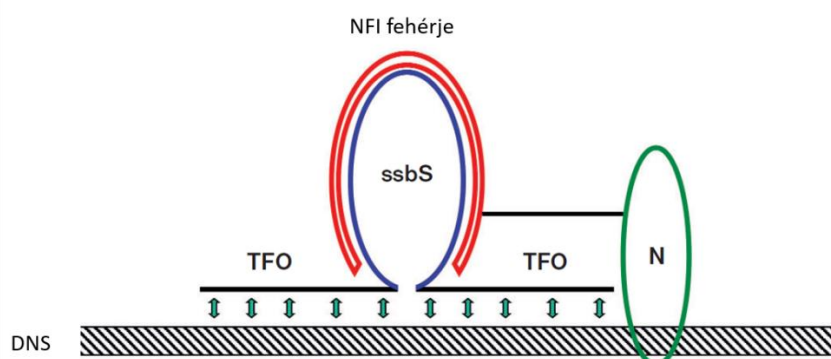
pdUA-lacI_{NE}: *lacI* gént tartalmazó pdUA DNS hordozó, NheI és EcoRI (hasító enzimek) felismerő szakaszokkal a promóter régióban.

Pol: Polimeráz

1. Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben a mesterséges nukleázok kutatása egyre nagyobb figyelmet kapott, mivel segítségükkel kezelni, esetleg gyógyítani is lehetne genetikai betegségeket. Ez a DNS természetes hibajavító mechanizmusának aktiválásával érhető el a dezoxi-ribonukleotidok közötti foszfodiészter kötések mesterséges nukleázokkal történő hasításán keresztül. Ezek a nukleázok ún. kiméra fehérjék, melyeket egy DNS-felismerő és egy nukleáz domén alkot. A ma is alkalmazott mesterséges DNS hasító enzimek például a meganukleázok, a cinkujj, TALE (transcription activator-like effector) és a CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 nukleázok. Ez utóbbi rendszer leírásáért Emmanuelle Charpentier és Jennifer Anne Doudna 2020-ban megkapták kémiai Nobel-díjat. A CRISPR/Cas9 rendszer segítségével tetszőlegesen kiválasztott DNS-szekvencia egyszerűen megcélozható akár az emberi genomban is a DNS szekvenciát felismerő RNS molekula változtatása révén [1], [2], [3]. Ez óriási előny a mesterséges nukleázok előző generációival szemben, melyekben a célszekvencia megváltoztatásához a fehérje áttervezését kellett elvégezni. Mindazonáltal, ezek a mesterséges nukleázok mind alkalmasak génmódosítási feladatok tanulmányozására, illetve végrehajtására.

Az SZTE Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjában egy hasonló rendszer kialakításán dolgoznak (1. Ábra), ami három terület eredményeit ötvözi: i) a Kyosuke Nagata, japán együttműködő partner, által felfedezett Nukleáris Faktor I (NFI) specifikus DNS-kötő fehérje [4]; ii) Carine Giovannangeli, francia kutató DNS-t specifikusan hasító mesterséges nukleázaiban előforduló triplexképző oligonukleotidok; és a iii) saját kutatásokban szereplő NColE7 nukleáz, mely alkalmas lehet egy szabályozott mesterséges enzim kialakítására. Ezen kutatásokba kapcsolódtam be tudományos diákköri munkám során az NFI fehérje részletes tanulmányozása területén [5].



1. Ábra: Az NFI fehérje DNS kötésén alapuló mesterséges nukleáz. Az alsó sáv a cél-DNS-szekvencia, a TFO a cél-DNS-szekvencia specifikus felismerésére szolgáló triplexképző oligonukleotid, az ssbS a hurokképző egyszálú DNS, amit megköt az NFI fehérje. Az N egy nukleáz domén, ami a DNS hasítását végzi.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A Nukleáris Faktor I specifikus DNS-kötő fehérje

A Nukleáris Faktor I (továbbiakban NFI) a helyspecifikus DNS-kötő fehérjék családjába tartozik, és szerepet játszik mind az emlősöknél a DNS átírásában RNS-sé (transzkripció), mind az Adenovírus (AdenoV) DNS másolásában (replikáció). Kimutatták, hogy az NFI-aktivitás számos szervrendszerben alapvető fontosságú, és így jelentős hatással bír az emberi egészségre [6]. A vizsgált NFI egy ~47 kilodalton (kDa) nagyságú fehérje, amit humán eredetű, ún. HeLa sejtek nukleáris kivonataiból tisztítottak és izoláltak először. Részt vesz az AdenoV DNS *in vitro* replikációjának iniciációjában, és valószínűleg a meghosszabbításában is. 499 aminosavból áll, aminek az N-terminális 240 aminosavból álló szakasza a DNS-kötő domén (2. Ábra, NFI-BD), a C-terminális 241–499 aminosavak közötti szakasz pedig a transzkripció aktivációs rész [7], [8], [9], [10]. Az NFI-BD-t laboratóriumunkban előzőleg különböző körülmények között termeltették baktériumsejtekben (expresszió), azonban ennek a fehérjének a tisztítása kihívásokkal teli feladat. A fehérje az oldhatatlan fázisban halmozódik fel, emiatt hiányzik a jellemzése, nem áll rendelkezésre elegendő információ a tulajdonságairól. Az NFI-BD fehérjéből az 1. Ábra szerint kialakítható mesterséges metallonukleáz (DNS-t hasító hidrolitikus enzim) viszont jó jelölt lehet génterápiás célra.

**MYSPCLLTQDEFHPFIEALLPHVRAFAYTWFNLQARKRKYFKKHEKMSKEEERAVKDELLSEKPEVKQKWASRLLA LKLRKDI
RPEYREDFVLTVTGKKPPCCVLSNPDQKGKMRIDCLRQADKVWRDLVMVILFKGIPLESTDGERLVKSPQCSNPGLCVQPH
HIGVSVKELDLYLAYFVHAADSSQSESPSQPSEADIKDQPENGHLGFGQDSFVTSGVFSVTELVRSQTPIAAGT**

2. Ábra: A tanulmányozott Nukleáris Faktor I fehérje DNS-kötő szakaszának (NFI-BD) aminosav szekvenciája.

A helyspecifikus DNS-kötő fehérjék nélkülözhetetlenek a dezoxi-ribonukleinsavból (DNS) ribonukleinsavvá (RNS) történő átíráshoz (transzkripcióhoz), rekombinációhoz, összecsomagoláshoz és replikációhoz. Az eukarióták helyspecifikus DNS-kötő fehérjeivel kapcsolatos számos tanulmány vizsgált olyan fehérjéket vagy DNS-molekulákat, amelyeket olyan vírusokhoz kapcsolódnak, mint az AdenoV. Az AdenoV-ok kétszálú DNS genomján keresztül jól modellezhetők az eukariótákban DNS-sel kapcsolatosan végbemenő folyamatok. Az AdenoV DNS replikációjával kapcsolatos kísérletekben kimutatták, hogy a gazdasejt genomja által kódolt fehérjék specifikusan kötődnek a vírus DNS régióihoz, és így szabályozzák a transzkripciót és/vagy a replikációt [11].

Az NFI fehérje AdenoV DNS replikációban betöltött szerepét korábban már részletesen tanulmányozták. Mindössze öt fehérjére van szükség a teljes hosszúságú AdenoV DNS *in vitro* szintéziséhez. Két fehérjét kódol a gazdaszervezet (NFI és II), míg három további fehérjét a vírus genomja kódol, ezek az 5'-terminális fehérje prekursora (pTP), az AdenoV DNS polimeráz és az AdenoV DNS-kötő fehérje. Az AdenoV DNS egy ~35 kilobázispár (kbp) hosszúságú lineáris kétszálú molekula, amely egy-egy ~55 kDa méretű fehérjével kovalensen kapcsolódik mindkét 5'-terminálisán. Az AdenoV DNS-replikáció megindítása a DNS-molekula bármelyik végén történhet a dCMP pTP-hez történő kovalens kapcsolódása révén. A pTP-dCMP komplex AdenoV DNS-en történő képződéséhez AdenoV DNS polimeráz, DNS-kötő fehérje és pTP jelenléte szükséges. Ezen vírusfehérjék jelenlétében a NFI mintegy tízszeres hatékonysággal stimulálja a reakciót [12].

A NFI fehérje szelektíven kötődik az AdenoV genom 1–451 nukleotidjait tartalmazó kétszálú DNS fragmentumához [13]. A DNáz védelmi kísérletek kimutatták, hogy a NFI egy 32 bp hosszúságú szekvenciához kötődik, közel az AdenoV DNS 5' terminusához, egy olyan DNS részlethez, amely hajtúszerkezet kialakítására képes [14]. Ez a klónozott 5-ös szerotípusú AdenoV DNS 17–48 szakaszának felel meg, közel az AdenoV DNS replikációs kezdőpontjához. *In vitro* vizsgálati eljárást fejlesztettek ki az AdenoV DNS-sel versengő DNS-szekvenciákkal a NFI kötődéséért. Ezzel a vizsgálattal kimutatták, hogy a humán DNS-szekvenciák specifikusan kötődnek a NFI-hez, valamint a NFI DNS-kötő aktivitását felhasználva izolálták és klónozták az emberi DNS olyan szegmenseit, amelyek szorosan kötődnek ehhez a fehérjéhez. A HeLa sejtgenomban átlagosan minden 100000 bázispáronként jelen van egy NFI kötőhely. Ezen DNS szekvenciák kötődése a NFI-hez hasonlít a klónozott AdenoV DNS kötéséhez, és ellenáll az ionerősség növelésének [15].

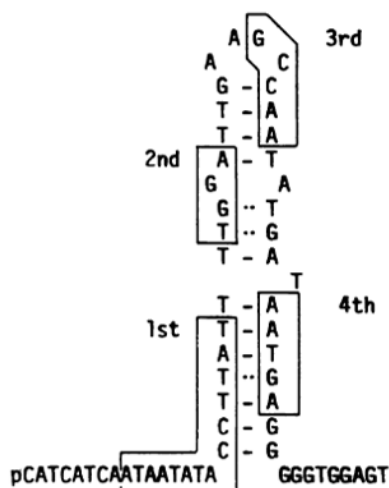
A pLA1 plazmid (bakteriális eredetű cirkuláris) DNS, amelybe az Ad5 AdenoV DNS 3,3 kb méretű 5' vég felőli szakaszát építették be. Elősegíti a pTP-dCMP iniciációs komplex kialakulását, feltéve, hogy úgy linearizálják, hogy a klónozott Ad DNS szekvenciák a lineáris molekula terminálisán helyezkedjenek el. Mutagenézis során előállították a pLA1 DNS különböző változatait és elemezték, hogy ezek képesek-e támogatni az *in vitro* Ad DNS replikációt. A fentiekkel egyező módon az eredmények azt mutatták, hogy az Ad genom 5' terminális felőli 50 bp hosszúságú szakaszára van szükség ahhoz, hogy a plazmid DNS hatékony templát lehessen az *in vitro* DNS-replikációban, és hogy ez az 50 bp szakasz két, funkcionálisan különálló részre osztható. Ezek alapján a vizsgált plazmid DNS-eket három osztályba sorolták. I. osztályú DNS az, amelyhez az NFI kötődik, és hatékony templátként működik az iniciációs és elongációs reakciókban (pLAI, pLAS108 és pLAS107). II. osztályú

DNS az, amelyhez a NFI nem kötődik, és rossz templát a pTP-dCMP iniciációs komplex kialakításához, valamint nem támogatja az iniciációs komplex meghosszabbítását (pLAS114 és S201). A III. osztályú DNS-ek azok, amelyekhez a NFI kötődik, de inaktívak az iniciáció és az elongáció szempontjából (R8 és R17) [16].

Egy 32 bp dezoxi-ribonukleotid fragmentum hosszát ~ 110 Å-re becsülik. A NFI sugara a 47 kDa molekulatömegéből számítva ~ 27 Å, feltételezve, hogy a fehérje ideális esetben gömb alakú. Ez arra utal, hogy a NFI két molekulájára van szükség a teljes 32 bp hosszúságú DNS szekvencia védelméhez a nukleázokkal szemben. A 32 bp hosszúságú NFI kötőhely potenciálisan olyan hajtűszerkezetet képez (3. Ábra), amelynek ΔG értéke $-6,1$ kcal/mol [14]. Ez a régió négy „konszenzus” szekvenciát (különböző eredetű DNS-molekulák adott pozícióban megegyező nukleotid sorrendje) is tartalmaz, amelyek számos AdenoV szerotípus DNS-5' terminálásán megtalálhatók. Nem világos, hogy a 32 bp régió felismerése a NFI által egy ilyen hajtűszerkezettől, a konszenzus szekvenciáktól, a nem illeszkedő régióktól vagy a hajtűszerkezet körüli szomszédos régióktól függ-e [17]. Nitrocellulóz szűrőn történő visszatartás vizsgálat alapján azt találták, hogy a harmadik és negyedik konszenzus szekvenciák között a NDS-t MnlI nukleáz enzimmel elhasítva, megszűnt a NFI kötődése. Lehetséges, hogy a negyedik konszenzus szekvencia elengedhetetlen az AdenoV DNS terminális NFI által történő felismeréséhez, vagy egy ilyen hajtűszerkezet kialakításához, vagy az, hogy a negyedik konszenzus szekvencia melletti G-C párokra van szükség a hajtűszerkezet stabilizálásához.

M. Challberg és munkatársai azt találták, hogy az 1–18 DNS szakasz a pTP-AdenoV Pol komplex kötődésében szerepet játszó részlet, és van Bergen arról számolt be, hogy az első konszenzus szekvencia lényegesnek tűnik pTP-dCMP iniciációs komplex kialakításához [18]. DNáz-védelmi technikák alkalmazásával megfigyelték, hogy az AdenoV DNS-kötő fehérje a teljes 451 bp kétszálú fragmentumot védte a nemspecifikus DNS hasítással szemben, ami arra utal, hogy az AdenoV DNS-kötő fehérje nem specifikusan kötődik a DNS-hez. Továbbá, amikor a NFI és az AdenoV DNS-kötő fehérje fehérjéket egyidejűleg adták hozzá, jelentős DNáz emésztést figyeltek meg a NFI kötőhelye mellett, de nem azon belül, ami arra utal, hogy a NFI-DNS komplexszel határos terület szabaddá vált. Ez a megfigyelés magyarázatot adhat a NFI szerepére az iniciációs reakcióban [13]. A NFI serkenti a pTP-dCMP iniciációs komplex képződését a pTP-AdenoV Pol által, és az AdenoV DNS-kötő fehérje gátolja ezt a reakciót a NFI hiányában. A NFI hozzáadása megszünteti az AdenoV DNS-kötő fehérje által okozott gátlást, és a pTP-dCMP komplex maximális képződését eredményezi. Valószínűleg a NFI kölcsönhatása ezzel a specifikus DNS-régióval lehetővé teszi a pTP-AdenoV Pol komplex számára, hogy hatékonyan felismerje a pTP-dCMP iniciációs komplex kialakulásához

szükséges DNS-szekvenciákat, amelyeket egyébként az AdenoV DNS-kötő fehérje elfed. A pTP-AdenoV Pol komplex kötődik az egyszálú DNS-hez, de nem kötődik a duplex DNS-hez kis ionerősség mellett. Lehetséges, hogy az AdenoV DNS replikáció indításában részt vevő öt fehérje (pTP, AdenoV Pol, AdenoV DNS-kötő fehérje, NFI és az AdenoV DNS-Prot [19]) együttes hatása a pTP-AdenoV Pol szelektív kötődéséhez vezet a templát végén, amelyet ezek a fehérjék egyszálúvá alakítottak. Ennek megfelelően a pTP-dCMP komplexet az AdenoV Pol bármilyen egyszálú DNS-en kialakíthatja. Ezt a reakciót az AdenoV DNS-kötő fehérje gátolja, a NFI pedig nem befolyásolja. Az AdenoV DNS konszenzus DNS szekvenciát tartalmazó duplex DNS esetén a NFI az AdenoV DNS-kötő fehérjével együtt egyszálú régiókat hozhat létre, amelyek magukban foglalják az első olyan konszenzus DNS-szekvenciát, amelyhez a pTP szelektíven kötődhet. Az AdenoV DNS-Prot terminális fehérje irányíthatja a belépő pTP-t ebbe a régióba.



3. Ábra: A DNS-régió lehetséges másodlagos szerkezete a NFI kötőhelyén. A bekeretezett szekvenciák négy konszenzus szekvenciát képviselnek, amelyek az AdenoV DNS több szerotípusában is megtalálhatók. (Ez a szekvencia analóg az 1. Ábrán látható ssbS molekularészlettel [14].

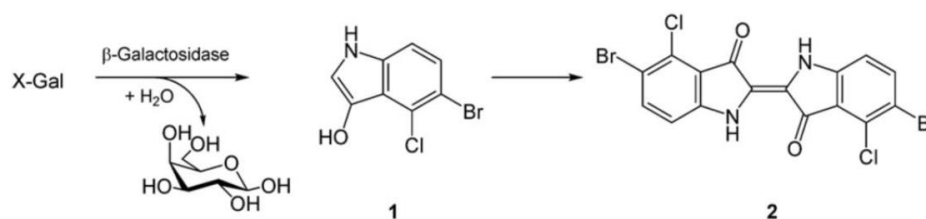
Jelenleg nem világos, hogy a NFI szerepet játszik-e a DNS meghosszabbításban a replikáció során. A NFI stimulálja a pTP-dCMP komplex meghosszabbítását, de nem biztos, hogy ez a hatás az iniciációs reakció jelentős elősegítéséből fakad. Ez a faktor nincs hatással az AdenoV Pol által katalizált elongációs reakcióra az egyszálú DNS-templátokon. Tamanoi és munkatársai kimutatták [20], [18], hogy a terminális fehérjét nem tartalmazó kétszálú AdenoV szekvenciával is megvalósítható az iniciáció és az elongáció, feltéve, hogy ez a szekvencia a templát 5' végén van. A terminális szekvenciák ekvimoláris koncentrációit használva azt találták, hogy a szintézis határfoka körülbelül 5%-a az AdenoV DNS-Prot esetében megfigyelt

szintézis hatásfokának. Ezen túlmenően azt találták, hogy egy további gazdasejtmag fehérjére van szükség a DNS replikáció iniciálásához és a DNS szintéziséhez templátként EcoRI restrikciós endonukláz enzimmal hasított pLAI DNS-t felhasználva. Ez az új fehérje, amelyre a pTP, AdenoV Pol, AdenoV DNS-kötő fehérje és NFI mellett szükség van, nincs hatással az AdenoV DNS-Prot függő iniciációs vagy elongációs reakcióra [14].

A fentiek alapján az NFI fehérje DNS kötését jellemző affinitási és szerkezeti viszonyok mindmáig kérdésesek. Nem áll rendelkezésünkre a fehérje-DNS komplex háromdimenziós szerkezete. Emiatt érdemes tovább tanulmányozni a kölcsönhatás és a molekulafelismerés pontos körülményeit, amennyiben a NFI DNS kötő doménjét mesterséges nukleáz fejlesztés céljára szeretnénk felhasználni.

2.2. I-Block kísérlet a fehérje-DNS kölcsönhatás sejten belüli tanulmányozására

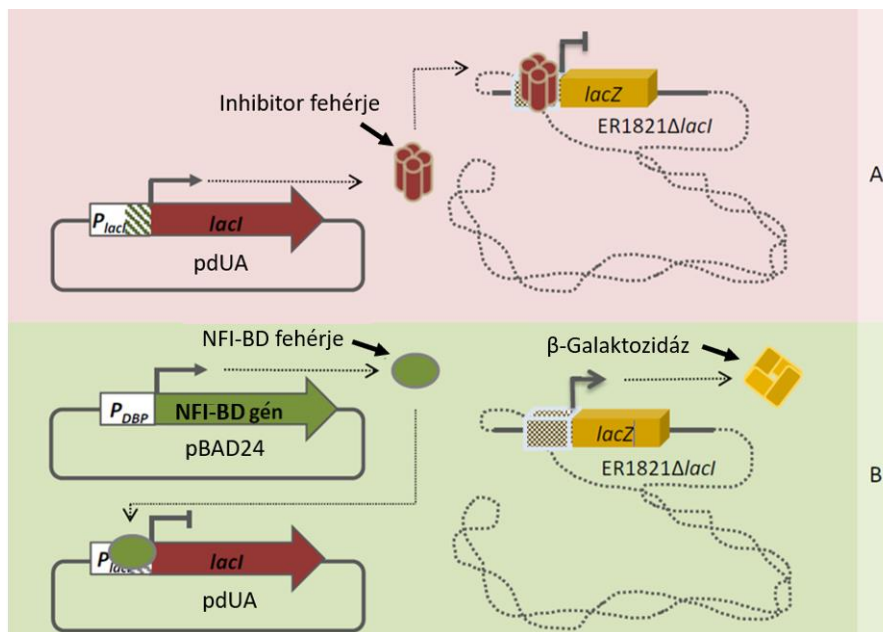
Az ún. I-Block kísérlet egy tesztrendszer, melyet biológiai szenzornak is nevezhetünk, mert segítségével a β -galaktozidáz enzim megjelenésén és működésén keresztül érzékeljük a fehérje-DNS kölcsönhatást. Az I-Block kísérlet lényege, hogy az alkalmazott *E. coli* baktériumsejt (ER1821 Δ *lacI*) folyamatosan termeli a β -galaktozidáz fehérjét, ami egy X-Gal fantázianevű szubsztrátot (5-bróm-4-kloro-3-indolyl- β -D-galaktozid) elbont, és az így képződő festékanyag (4-klór-3-bróm-indigó) a sejteket kékre színezi (4. Ábra), [21]. Így a működőképes enzim jelenlétét tudjuk detektálni.



4. Ábra: Az X-Gal hasításának reakcióegyenlete. A β -glikozidos kötés elhasítása után galaktóz és kék színű, oldhatatlan indigószármazék vegyület keletkezik.

Az I-Block kísérlet sematikus ábrázolása az 5. ábrán látható. Az *E. coli* ER1821 sejteket úgy módosították, hogy bennük a lac inhibítor fehérje (LacI), ami megakadályozná a β -galaktozidáz fehérje (LacZ) kifejeződését, nem képződik, ugyanis az azt kódoló DNS szakaszt (a fehérje génjét - *lacI*) eltávolították: ER1821 Δ *lacI*. Készítettek ehhez a sejthez egy olyan DNS hordozót (p μ UA), ami tartalmazza az inhibitor fehérje génjét (*lacI*). Ezt a DNS hordozót a sejtbe juttatva, termelődik a LacI inhibítor fehérje, tehát nem fog képződni β -galaktozidáz, és nem lesznek kékek a sejtek az X-Gal-tartalmú táptalajon (5. Ábra-A). Ha ezt a DNS hordozót úgy

alakítjuk át, hogy az ún. promóter régióba (P), ahonnan a LacI fehérje génjének átírása iniciálható (P_{LacI}), beépítünk egy DNS-kötő fehérje felismerési DNS szekvenciáját, és bejuttatjuk egy másik DNS hordozón (pBAD24) ennek a DNS-kötő fehérjének (pl. NFI-BD) a génjét a P_{DBP} promóter régió után, akkor ez a fehérje, a DNS célszekvenciájához kötődve, megakadályozhatja a LacI inhibitor fehérje képződését. Ebben az esetben kékek lesznek a sejtek a vizsgált fehérje DNS-kötését kimutatva (5. Ábra-B) [22]. Ügyelni kell rá, hogy ha a pdUA hordozóba beépítjük a rövid DNS célszekvenciát, akkor önmagában a promóter DNS szekvencia módosításával ne akadályozzuk az inhibitor fehérje kifejeződését.



5. Ábra: Az I-Block rendszer működésének sematikus ábrázolása [22].

3. Célkitűzés

A mesterséges nukleázok ígéretes eszközök lehetnek a génterápiában. Azonban fontos tudni, hogy a ma ismert mesterséges nukleázoknak citotoxikus hatásuk is van, azaz további finomítások szükségesek. A gyógyászatban való alkalmazáshoz elengedhetetlen, hogy a nukleáz csak az arra kijelölt helyen, specifikusan végezze a hasítást. Azaz további optimalizálás szükséges. A specifikus DNS-kötő fehérjékből kialakított metallonukleázok szabályozhatók a fémionok segítségével. Egy ilyen specifikus DNS-kötő fehérje, a Nukleáris Faktor I vizsgálatát tűztük ki célul.

Ennek érdekében célom volt a Nukleáris Faktor I fehérje DNS-kötő szakaszának előállítás. Továbbá annak vizsgálata, hogy az NFI-BD hogyan hat kölcsön DNS-sel, bebizonyítani, hogy ez a kölcsönhatás valóban specifikus. Sikeres fehérjeszintézis és tisztítás esetén terveztük annak vizsgálatát is, hogy milyen szerkezetet vesz fel a DNS-fehérje komplex.

A fentiek érdekében a NFI-BD fehérjét kódoló DNS szakaszt több DNS hordozóba is terveztük beépíteni a rekombináns DNS technológia eszközeit felhasználva. A tisztítást affinitás kromatográfiával terveztük, és ehhez választottuk ki a megfelelő hordozókat, melyek segítségével az affinitás-toldalékokat a fehérjéhez fűzhetjük. Párhuzamosan ezzel, a fehérje előállításának bonyolultsága miatt, a DNS kötés tanulmányozása céljából I-Block kísérletek elvégzését terveztük kvalitatívan táptalajon baktériumtelepekkel, illetve kvantitatívan lemezolvasó segítségével.

Távlati terveink között szerepel a fehérje átalakítása úgy, hogy DNS-t is hasíthassunk vele.

4. Kísérleti anyagok és módszerek

4.1. Polimeráz láncreakció

A polimeráz láncreakció (PCR) lehetővé teszi egy DNS molekula kiválasztott szakaszának tesztcsőben történő sokszorosítását. Fontos feltétele, hogy a sokszorosítandó DNS szakasz mindkét végén ~10-20 bázispárból álló szekvenciát ismerjünk, mert a sokszorosításhoz olyan dezoxi-oligonukleotidok (primerek) kellenek, amelyek a DNA szétválasztott szálainak 3'-végéhez kapcsolódva (hibridizálódva) indító-szekvenciaként szolgálnak. Ezután innen megkezdődik az új egyszálú komplementer DNS szakasz felépítése 5'→3' irányban az antiparallel templát szál szekvenciájának megfelelő módon. Elengedhetetlen, hogy legyen egy hőtűrő enzim, ami elviseli a nagyobb hőmérséklet-változásokat is. Ilyen például az alkalmazott Xceed TAQ DNS polimeráz. Szükség van még dezoxi-nukleozid-trifoszfát építőegységekre, és Mg^{2+} -ionokat tartalmazó pufferre, ami biztosítja a polimeráz működéséhez megfelelő energiát és környezetet. Erre a célra az Xceed reakciópuffert használtuk [23].

A kísérletek során MJ Research PTC-150 PCR készüléket használtunk. A PCR készülék az általunk betáplált hőmérséklet-programot hajtotta végre. A folyamat egy ciklusa három lépésből áll. Az első a denaturáció, ahol az elegyet 95°C-on tartjuk 1 percig. Ebben a részben szakadnak fel a hidrogén-kötések a DNS két szála között. A második a kapcsolódás, amikor a hőmérsékletet lecsökkentjük egy olyan értékre, ahol a primerek képesek a DNS szálakhoz kapcsolódni. Ez a folyamat 20 másodpercig tart a primer olvadási hőmérsékletén. A harmadik lépésben visszamelegítjük a reakcióelegyet 72°C-ra 1 percig. Ez a meghosszabbítás, amikor megvalósul az új szál szintézise. A három lépést 30-szor ismételtük meg, majd a végén az elegyet lehűtöttük 10°C-ra 4 percig. A folyamat során nem megfelelő hosszúságú DNS szakaszok is keletkeznek, amelyek száma a 30 ciklus végén elhanyagolható az exponenciális mértékben sokszorozódó célszekvenciák mellett.

Az aktuális kísérleteknél a reakcióelegyeket az alábbiakban feltüntetett táblázatok alapján állítottuk össze, amint azt az adott kísérletek leírásánál jeleztük.

1. Táblázat: A pGEX 5' és a pGEX 3' primerekre tervezett PCR folyamat alkotóelemei és mennyiségeik az egyes mintákban.

Hozzávalók	C _{kezdeti}	C _{végso}	NFI-BD	pGEX-6P-1
Xceed 5× Reakciópuffer	10×	1×	10 µL	10 µL
Desztillált víz	-	-	34,5 µL	33,5 µL
pGEX 5' (primer)	10 µM	0,4 µM	2 µL	2 µL
pGEX 3' (primer)	10 µM	0,4 µM	2 µL	2 µL
pGEX-NFI-BD	-	-	1 µL	-
pGEX-6P-1	-	-	-	2 µL
Xceed Taq DNS polimeráz	5 egység/µL	0,5 egység	0,5 µL	0,5 µL
Végso térfogat	-	-	50 µL	50 µL

2. Táblázat: A pUA_pdUA-F és a pUA_pdUA-R primerekre tervezett PCR folyamat alkotóelemei és mennyiségeik az egyes mintákban.

Hozzávalók	C _{kezdeti}	C _{végso}	pdUA	pdUA-Ad-I/1-6
Xceed 5× Reakciópuffer	5×	1×	10 µL	10 µL
Desztillált víz	-	-	33,5 µL	33,5 µL
pUA_pdUA-F (primer)	10 µM	0,4 µM	2 µL	2 µL
pUA_pdUA-R (primer)	10 µM	0,4 µM	2 µL	2 µL
pdUA	-	-	2 µL	-
pdUA-Ad-I/1-6	-	-	-	2 µL
Xceed Taq DNS polimeráz	5 egység/µL	0,5 egység	0,5 µL	0,5 µL
Végso térfogat	-	-	50 µL	50 µL

3. Táblázat: Az AK92 és az AK155 primerekre tervezett PCR folyamat alkotóelemei és mennyiségeik az egyes mintákban.

Hozzávalók	C _{kezdeti}	C _{végso}	pBAD	1-12
Xceed 5× Reakciópuffer	5×	1×	10 µL	10 µL
Desztillált víz	-	-	34,5 µL	34,5 µL
AK92 (primer)	10 µM	0,4 µM	2 µL	2 µL
AK155 (primer)	10 µM	0,4 µM	2 µL	2 µL
pBAD24	-	1-50 ng	1 µL	-
BD Ec(t)/H(N) 1/2/3	-	-	-	1 µL
Xceed Taq DNS polimeráz	1 egység/µL	0,5 egység	0,5 µL	0,5 µL
Végso térfogat	-	-	50 µL	50 µL

4.2. Extrakció fenol-kloroform eleggyel

Ezt az eljárást az enzim (fehérje) eltávolítására használjuk a PCR termékből vagy egyéb módon enzimekkel kezelt DNS oldatból. Az oldathoz 1:1 arányban fenol-kloroform elegyet adtunk hozzá. Jól összeráztuk vortex segítségével, majd szobahőmérsékleten 5 percig centrifugáltuk 14500 rpm sebességgel egy asztali Eppendorf centrifugában. A felső, vizes fázist nagyon óvatosan gyűjtöttük össze, ügyelve, hogy az alsó szerves fázisból egy csepp se kerüljön át.

4.3. DNS kicsapása etanollal

Az összegyűjtött felső fázishoz 1:10 térfogat arányban adunk 3 M NaOAc (pH = 5.2) oldatot adtunk, vortexeltük majd 2,5:1 térfogat arányban hideg abszolút etanolt adtunk hozzá. Homogenizáltuk az előzőhöz hasonló módon és folyékony nitrogén segítségével megfagyasztottuk. Ezután 4°C-on 15 percig centrifugáltuk 13500 rpm-en egy Harrier típusú hűthető centrifugában. Ezután a felülúszót óvatosan eltávolítottuk, vigyázva, hogy az alján összegyűlt DNS a csőben maradjon. Ezután 0,2 mL hideg 70%-os etanollal mostuk a szilárd DNS-t. Vortexelés után hasonló módon centrifugáltuk 8 percig. Az felülúszó eltávolítása után a DNS-t megszáritottuk a vízsugárszivattyúval felszerelt vákuum-exszikkátorban. A végén a DNS-t visszaoldottuk ~31 µL desztillált vízben vagy pufferben, és megmértük a koncentrációját Thermo Scientific spektrofotométerrel. Vakoldatként ugyanazt a desztillált vizet vagy puffert használtuk, amiben oldottuk a DNS-t.

4.4. Hasítás restrikciós endonukleáz enzimekkel és ligálás

A legtöbb esetben a DNS szakaszok összeépítésére restrikciós enzimek által kialakított ragados végeket használunk. Ezek az enzimek felismernek egy adott DNS szekvenciát és azt hidrolitikusan hasítják. Az enzimek felismerési helyeit a primerek segítségével építjük be a génekbe a PCR során a kiválasztott DNS hordozóban megtalálható felismerési helyek alapján. Így a specifikus DNS hasítás után a gén beépíthető a DNS hordozóba további kísérletek céljából. A kutatómunkám során olyan enzimeket használtunk, amelyek ferdén (átlósan) hasítottak, így ragados végeket (sticky ends) eredményeztek. A kísérletekben alkalmazott Thermo Scientific™ EcoRI, NheI, BamHI, XhoI enzimek mind ilyenek.

A DNS fragmensekhez desztillált vizet és olyan puffert adtunk, ami az adott restrikciós enzim részére optimális reakció-körülményeket biztosít. 2 óráig 37°C-on inkubáltuk, majd 20 percig termikusan inaktiváltuk az enzimet Thermo Shaker segítségével (NheI esetén 65°C-ra, a többinél 80°C-ra kellett felmelegíteni a reakcióelegyet). Az aktuális kísérleteknél a reakcióelegyet az alább feltüntetett táblázatban feltüntetettekhez hasonlóan állítottuk össze.

4. Táblázat: A pdUA-LacI_N hasítása NheI restrikciós enzimmal.

Hozzávalók	C _{kezdeti}	C _{végso}	pdUA-lacI _N /Nh
pdUA-lacI _N	x ng/µL	56 ng/µL	15 µL
Tango (sárga) puffer	10x	1x	5 µL
H ₂ O	-	-	28 µL
NheI	10 U/µL	20 U	2 µL
Végso térfogat	-	-	50 µL

Ezután az elhasított DNS molekulákat ligáz enzim segítségével kovalens kötésekkel kapcsoltuk össze. Thermo Scientific T4 DNS ligáz enzimet és hozzá tartozó puffert használtunk a kísérletek során. 60 percig inkubáltuk 22°C-on, majd a keveréket ~38 óráig 4°C-on tartottuk.

Az aktuális kísérleteknél a reakcióelegyeket az alább feltüntetett táblázat alapján állítottuk össze.

5. Táblázat: Ad-I-Block/NheI és pdUA-lacI_N/NheI ligálása ligáz enimmel.

Hozzávalók	pdUA-lacI _N /NheI/Ligált	pdUA-lacI _N -Ad-I (+ATP)	pdUA-lacI _N -Ad-I (-ATP)
Ad-I-Block/NheI 0,1 µM	-	5 µL	5 µL
pdUA-lacI _N /NheI 0,01 µM	5 µL	5 µL	5 µL
Puffer	2 µL	2 µL	2 µL
ATP (10000 µM)	-	0,5 µL	-
Ligáz	0,2 µL	0,2 µL	0,2 µL
H ₂ O	12,8 µL	7,3 µL	7,8 µL
Végző térfogat	20 µL	20 µL	20 µL

4.5. Transzformálás

A transzformálás folyamatában a DNS hordozóba épített cél-DNS molekulát ún. kompetens baktérium sejtekbe juttatjuk. Ezek a DNS molekulák a sejtsztódás során öröklődnek, így szaporíthatók (klónozás), illetve a célfehérje kifejezése is megvalósítható. A kísérleteinkben többféle kompetens sejtet használtunk: DH5α, Rosetta™, BL21(DE3)pLysS. A kísérletben ~50 µL sejtszuspenziót adtunk 2 µL DNS oldathoz (~ 100 ng DNS), majd 5 percig jégen hűtve inkubáltuk. A sejteket 41°C-ra előmelegített vízfürdőben 2 perces hő sokknak tettük ki, majd gyorsan visszatettük jégre. Így a meleg hatására felnyílt pórusok visszazáródtak, a sejtekbe zárva a hordozó DNS-t. Az elegyből 20-40 µL-t vittünk fel a megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB-agar táptalajra. A hordozó DNS egy antibiotikum rezisztenciáért felelős fehérjét is kódol, ezért azok a sejtek, amelyeket sikeresen transzformáltuk szaporodnak, viszont a hordozót nem tartalmazó baktériumsejtek elpusztulnak a táptalajon. A sejteket 37°C-on inkubáltuk 12-16 óráig (egész éjszaka) baktériumtelepek növesztése céljából.

4.6. Szaporítás

A transzformálás után kiválasztottunk egy, a többtől elkülönülő, elég nagy baktériumtelepet és egy steril eszköz segítségével átvittük 5 mL LB tápoldatba, ami szintén tartalmazott antibiotikumot. 37°C-on 200 rpm sebességgel ráztattuk, amíg a baktériumkultúra zavarosság értéke elérte a >1,5 OD₆₀₀ értéket. Ezután eppendorf csőben részletekben 13500 rpm

sebességgel centrifugáltuk 2 percig, hogy a baktériumsejtek összegyűljenek a cső alján. A felső folyadékréteget eltávolítottuk és külön összegyűjtöttük sterilizálás céljából.

4.7. A DNS tisztítása sejtekből - miniprep

A folyamatot a ZR Plasmid MiniprepTM – Classic tisztító kit leírása alapján végeztük. Minden centrifugálási folyamat 11000-16000 g-n történt. Elsőként 200 µL P1 puffert adtunk a sejteket tartalmazó eppendorfba és teljesen újraszuszpendáltuk a pelletet vortexeléssel vagy pipetázással. Ezután 200 µL P2 puffert adtunk hozzá és forgatással összekevertük, amíg lila színű nem lett az oldat, ami a sejtek teljes lizálását jelentette. Vortexelni nem szabad ilyenkor. 1-2 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 400 µL P3 puffer hozzáadása után pipetázással (nem vortexeléssel) kevertük össze az elegyünket. A mintánk sárga színű lett, amikor a neutralizáció befejeződött. 1-2 perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után 2-4 percig centrifugáltuk a mintánkat. Egy Zymo-SpinTM IIN szűrőt helyeztünk egy gyűjtőcsőbe és átpipetáztuk a felülúszót a szűrőre. Óvatosan kell csinálni, nehogy hozzáérjünk a lecentrifugált szilárd sejttermékhez. 30 másodpercig centrifugáltuk, majd kiöntöttük az átfolyó folyadékot. 200 µL Endo mosópuffert pipetáztunk a szűrőre és centrifugáltuk 30 másodpercig. Ezután 400 µL Plasmid mosópufferrel 1 percig centrifugáltuk. Mindezek után a szűrőt áthelyeztük egy tiszta 1,5 mL mikrocentrifuga-csőbe és közvetlenül a szűrő mátrixához ≥ 30 µL DNS elúciós puffert adtunk. 1 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 30 másodpercig centrifugáltuk, hogy eluáljuk a plazmid DNS-t.

A folyamat végén megmértük a minta koncentrációját a Thermo Scientific spektrofotométerrel a DNS elúciós puffert használva vakoldatként.

4.8. A cél-DNS beépülésének ellenőrzése

Az új DNS preparálása és tisztítása után ellenőriztük, hogy sikerült-e azt a hordozót előállítani, amiben benne van az NFI gén. Egyik ilyen módszer, hogy kiválasztunk egy, vagy két hasítási helyet, ami jellemző az új hordozóra. Ha nem sikerült beépíteni, akkor a cirkuláris DNS-t elhasítja és egy darab nyílt láncú fragmensünk lesz. Ha sikerült beépíteni, akkor is elhasítja, de akkor két fragmens képződik: egy akkora, mint az NFI-BD és egy másik az üres elhasított plazmiddal megegyező méretű. Egy másik módszer, hogy PCR során promoter és terminátor primereket használjuk, amik a klónozó régió két végére odatapadnak. Ha nem sikerült beilleszteni az új hordozóba a gént, akkor csak egy rövid szakasz fog sokszorozódni, de ha beépült, akkor hosszabb lesz a sokszorozott szakasz. Ezt gélelektroforézissel ellenőriztük.

4.9. Gélelektroforézis

A gélelektroforézis alapelve, hogy a töltéssel rendelkező molekulák elektromos térben az ellentétes töltésű elektród felé mozdulnak el. Tehát a negatív töltésű részecskék az anód felé, a pozitív töltésű részecskék a katód felé vándorolnak. A vándorlás sebességét a használt feszültség, a molekulák mérete és töltéssűrűsége, valamint a gél sűrűsége és pórusátmérője befolyásolja [24]. DNS keverékek elválasztásához általában térhálós szerkezetű agaróz gél, fehérjék elválasztásában pedig poliakrilamid gél használunk.

4.9.1. Agaróz gélelektroforézis

Mivel a DNS negatív töltésű, ezért az anód felé fog elmozdulni. A DNS molekulák alapvetően lineáris formájúak és a kisebb méretűek vándorolnak gyorsabban a gélben. A baktériumsejtekből izolált plazmid DNS azonban szerkezete alapján három formában lehet jelen: lineáris, cirkuláris és szuperhelikális. Ezekből a szuperhelikális a legkompaktabb, így az halad a leggyorsabban, a cirkuláris kiterjedése a legnagyobb, így az a leglassúbb [25].

A munkánk során 1 g/100 mL (1 m/V%) töménységű géllal dolgoztunk. A gél elkészítéséhez 1,2 g agarózhoz 70 mL MilliQ vizet adtunk, majd felmelegítettük az agaróz feloldódásáig (~1 perc). A gyorsabb lehűlés érdekében a maradék 50 mL vizet ezután adtuk hozzá. Miután így ~ 50°C hőmérsékletre hűlt 2,4 mL 50× töménységű TAE puffert (Tris-HCl, ecetsav és EDTA) adtunk hozzá. A DNS könnyebb kimutatása érdekében 120 µL 500 µg/mL etídium-bromid oldatot adtunk a gélhez. Az etídium ion beépül (interkalálódik) a kettős hélix szerkezetbe és így fluoreszcenciája révén kimutatható UV fény hatására.

A DNS méretének becslésére GeneRuler 1kb Plus markert használtunk. A DNS elegyeket 5:1 arányban kevertük össze 6× töménységű LD (Loading Dye) festékkel. A futtatást 40 percig végeztük 100 V-on.

4.9.2. Poliakrilamid gélelektroforézis

A fehérjék elválasztására, kimutatására, azonosítására alkalmas a gélelektroforézis. A módszer tisztításra vagy molekulatömeg becslésre is alkalmas. Az aminosavak sokszínűsége azonban itt gondot okoz. Az aminosav oldalláncok adott pH-n pozitív vagy negatív töltéseket hordozhatnak. Így az elektroforézis során vándorlásuk akár ellentétes irányú is lehet a gélben. Ráadásul, még ha azonos töltésű fehérjéket hasonlítanánk is össze, azok töltése nem szükségszerűen arányos méretükkel.

Azonban egy apró módosítással megoldható a helyzet. A fehérjeminta gélelektorforézishez detergenst adunk. Ez leggyakrabban a nátrium-dodecil-szulfát (SDS). A detergens széttekeri a fehérjét, megszünteti a 3D szerkezetet összetartó másodlagos kölcsönhatásokat. Amennyiben a fehérje kovalens diszulfidhidakat is tartalmaz, szükség van redukálószer alkalmazására is, ami az esetek többségében 2-merkaptó-etanol. Ennek eredményeként a fehérjeelegy molekulái egységesen lineáris formát vesznek fel, és molekulatömegükkel arányos mennyiségű dodecil szulfát-iont kötnek meg, így mindegyik fehérjemolekula a méretével arányos negatív töltést hordoz [26]. Ezért is nevezik a módszert SDS-PAGE-nek (nátrium-dodecil-szulfátos poliakrilamid-gélelektroforézis). A poliakrilamid gél két (esetenként három) rétegből áll. (6. Táblázat)

A mintáinkat 2× töménységű Cracking pufferrel kevertük össze és 10 percig 95°C-on inkubáltuk. A futtatás 70 V feszültségen 30 percig történt, majd 120 V-on 150 percig. Ennél a módszernél nem a mintákhoz adtuk a festéket közvetlenül. Az elektroforézis után a gél fél óráig CBB fehérjefesték oldatába (Coomassie Brilliant Blue R 250) áztattuk, majd a felesleges festéket eltávolítottuk.

6. Táblázat: A felső a rétegző gél (stacking), amelyik a fehérjéket egy vonalba rendezi az elválasztás hatékonysága érdekében. Az alsó elválasztó réteg (separating) a méretük alapján szétválasztja őket. A nagyobb molekulatömegű fehérjék felül, míg a kisebbek alul találhatók.

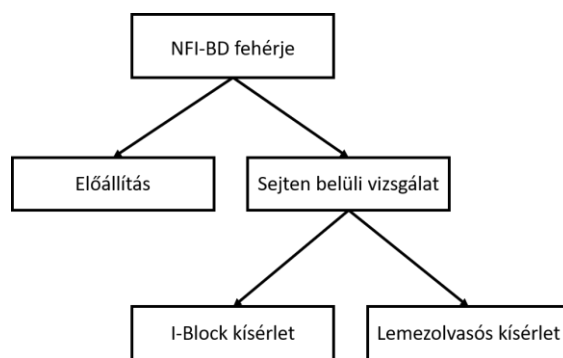
Hozzávalók	Elválasztó	Rétegző
30% akrilamid (29:1 akrilamid:bis-akrilamid)	3,65 mL	0,50 mL
gél puffer	4,35 mL	0,94 mL
glicerín (~87%)	1,05 mL	-
H ₂ O	-	2,33 mL
APS (ammónium-peroxo-diszulfát)	34 µL	33 µL
TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin)	3,4 µL	3,3 µL

4.10. Mikrolemez-olvasó

A mikrolemez-olvasó vagy mikrolemez-fotométer, más néven Plate Reader, olyan eszköz, amely a lemezeken lévő minták biológiai, kémiai vagy fizikai változásainak kvantitatív mérésre szolgál. Széles körben használják gyógyszerkutatásban, bioassay validálásban, minőség-ellenőrzésben és gyártási folyamatokban. A mintareakciókat 1-1536 lyukú mikroliteres lemezeken lehet vizsgálni. Az legelterjedtebben használt mikrolemez-formátum a 96-lyukú (8×12-es mátrix), amelynek jellemző reakciótérfogata 100 és 200 µl közötti reakció elegyenként. A mikrolemezes vizsgálatok általános kimutatási módjai az abszorbancia, a fluoreszcencia intenzitása, a lumineszcencia, az időfelbontású fluoreszcencia és a fluoreszcencia polarizáció.

5. Eredmények

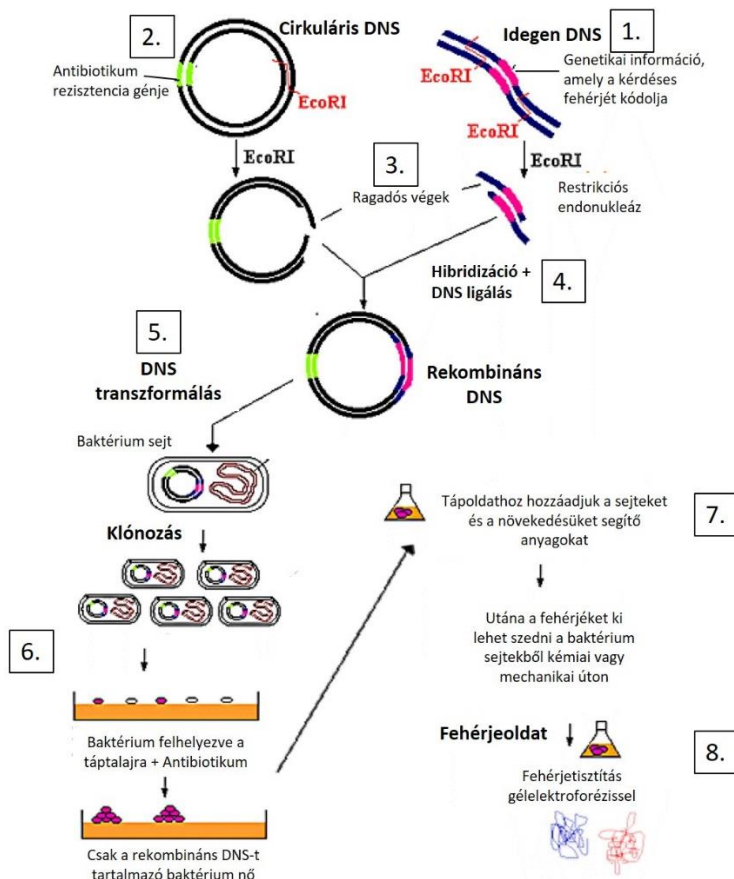
A NFI fehérje DNS-kötő doménjének a DNS-kötő sajátságait fogom a továbbiakban tanulmányozni kétféleképpen. Az egyik a közvetlen módszer, amikor a fehérjét előállítjuk, kitisztítjuk és ennek a kölcsönhatását vizsgáljuk meg. A másik az I-Block szenzoron keresztül történő vizsgálat baktériumsejtekben a fehérje tisztítása nélkül (6.Ábra).



6. Ábra: A munkám főbb lépéseinek sematikus bemutatása.

5.1. A Nukleáris Faktor I DNS-kötő fehérjedomén (NFI-BD) előállítása

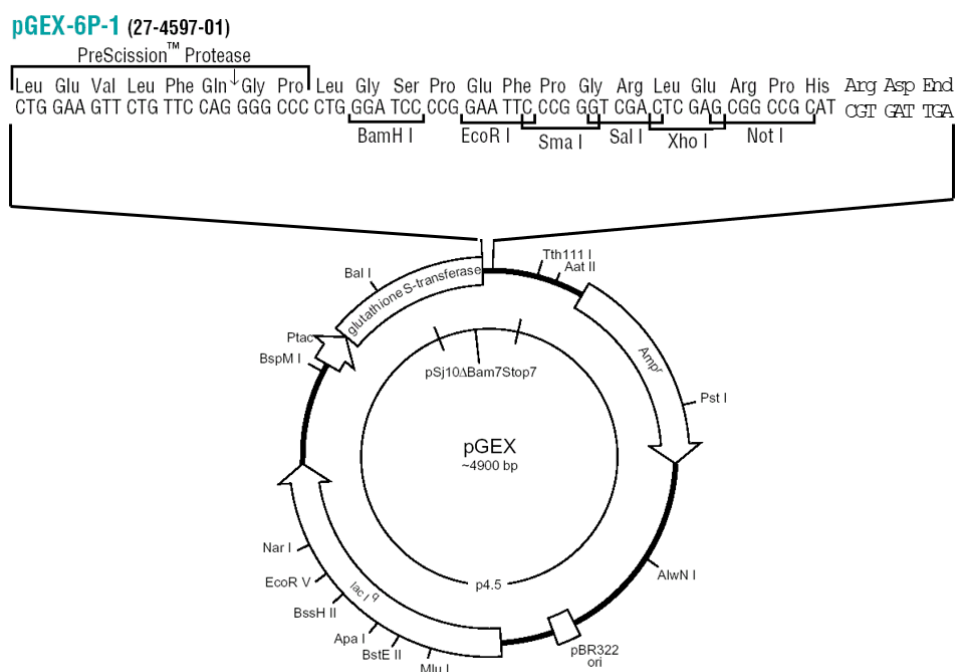
A 7. ábra a NFI-BD előállításának lépéseit szemlélteti. A továbbiakban ezen lépéseket fogom részletezni.



7. Ábra: A rekombináns DNS technológia folyamatábrája [27].

5.1.1. PCR - A fehérje génjének előállítása DNS hordozóról

Az első lépés a Nukleáris Faktor I DNS-kötő fehérjedomént (NFI-BD) kódoló DNS molekula előállítása. Ezt PCR segítségével sokszorosítottuk a Kyosuke Nagata professzor (Tsukubai Egyetem, Japán) által rendelkezésünkre bocsájtott NFI fehérjét kódoló DNS-t használva templátként (7. Ábra-1.). Két tervezett dezoxi-oligonukleotid (primer) tapadási helye közötti DNS szakaszt sokszorosítottunk. El kellett döntenünk, hogy a gént, amit előállítunk, milyen DNS hordozóba építsük be, mert ettől függően kell kiválasztanunk a restrikciós hasítási helyeket és az ezek által kialakuló ragadós végeket (7. Ábra-2.). Az elsőként kiválasztott DNS hordozó a pGEX családba tartozó pGEX-6P-1 vektor (1. Séma), ami egy glutation-S-transzferáz enzimet fűz a célfehérje N-terminális végéhez.

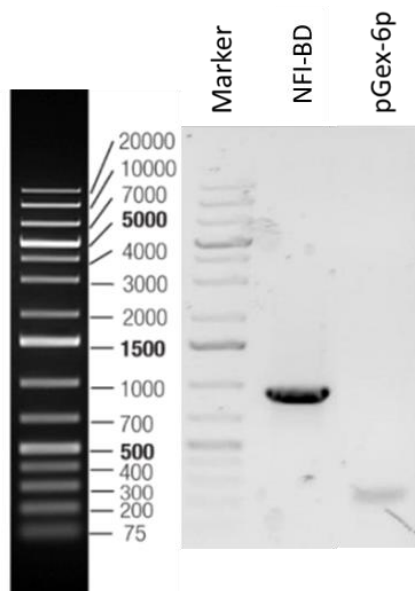


1. Séma: A pGEX-6P-1 DNS hordozó (vektor) a kinagyított multiklónozó régióval.

Ennek előnye lehet a fehérje jobb oldhatósága, illetve a lehetőség egy affinitás kromatográfiás tisztításhoz az enzim szubsztrátján keresztül, melyet szilárd hordozóhoz rögzítettek. A primerek segítségével EcoRI restrikciós endonukleáz hasítási helyet alakítottunk ki a PCR fragmens két végéhez közel, és ezek segítségével építettük be a gént a DNS hordozóba. Az így kialakított plazmid DNS-nek a pGEX-6P-1-NFI-BD nevet adtuk.

A gén beépülésének ellenőrzésére szintén polimeráz láncreakciót alkalmaztunk, melynek során a forgalmazó által tervezett pGEX 5' és pGEX 3' primer szekvenciákat használtuk – ezek a klónozó régió két szélén található DNS szekvenciákhoz hibridizálódnak. Itt a PCR ciklus

második lépését 57 °C-on hajtottuk végre. A reakcióelegy összeállítása az 1. Táblázat szerint történt (ld. a Kísérleti anyagok és módszerek fejezetben). A 30. ciklus után a PCR terméket agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk meg (8. Ábra).



8. Ábra: A PCR termék vizsgálata agaróz gélelektroforézis segítségével.

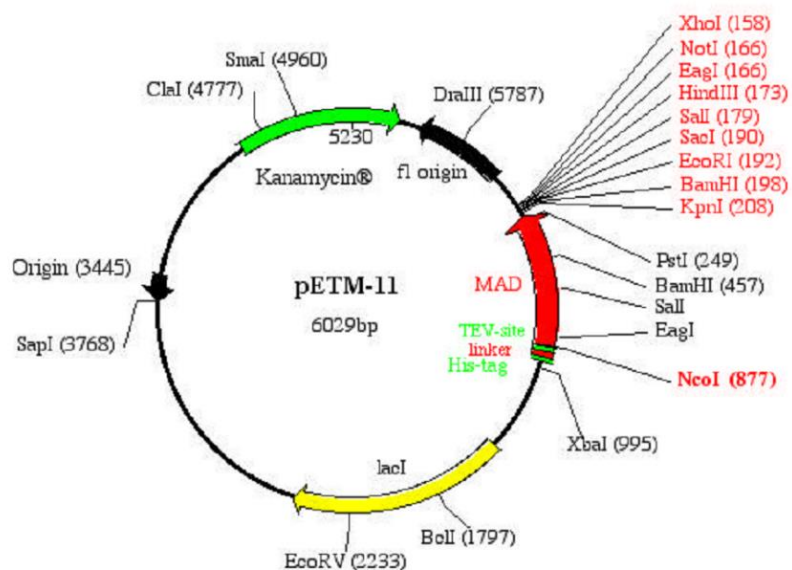
A sokszorosított NFI-BD gént tartalmazó DNS 732 bp-ból áll. A 8. Ábrán látszik, hogy a detektált sáv a 700 és 1000 bp DNS markerek sávjai közé esik, ami azt jelenti, hogy az NF-BD fehérjét kódoló DNS szakaszt sikerült beépíteni a DNS hordozóba. A negatív összehasonlítóként alkalmazott pGEX-6P-1 vektor esetében azt a szakaszt sokszoroztuk, ahová még nem illesztettük be a célfehérjét kódoló génszakaszt, azért ilyen rövid.

A pGEX-6P-1-NFI-BD plazmidot használtuk fel arra, hogy a fehérje génjét további hordozókba is beépítsük, melyeket az alábbiakban szemléltetünk.

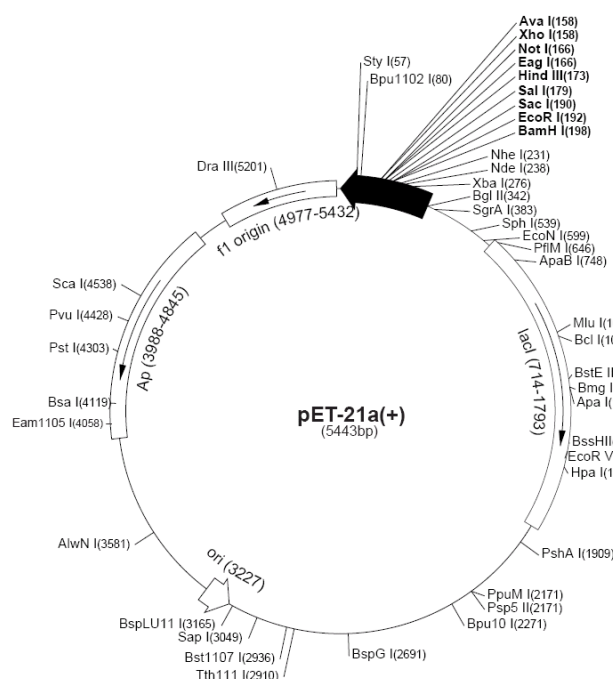
A pETM11 DNS hordozó (2. Séma) egy oligo-hisztidin toldalékot tartalmazó SUMO fehérjét fűz a célfehérje N-terminális végéhez. Ennek előnye a nagymértékű fehérjetermelés, jó oldhatóság, Ni(II)-affinitás alapú tisztítási lehetőség.

A pET21a vektorba (3. Séma) építve a fehérje génjét a pontos szekvencia nyerhető ki, vagy stop kód alkalmazása nélkül C-terminális oligohisztidin toldalékkal fejeződik ki a fehérje (tisztítás Ni(II)-affinitás alapon).

Amíg a pETM11 DNS hordozóba történő beépítéshez a pGEX-6P-1-hez hasonlóan alkalmazható az EcoRI hasítási hely, addig a pET21a vektor alkalmazásakor új 5' primert kellett tervezni a végén NdeI hasítási hellyel, mely a kezdő atg kodont biztosította.



2. Séma: A pETM11 DNS hordozó (vektor) a kinagyított multiklónozó régióval.

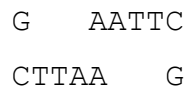


3. Séma: A pET21a DNS hordozó (vektor) a kinagyított multiklónozó régióval.

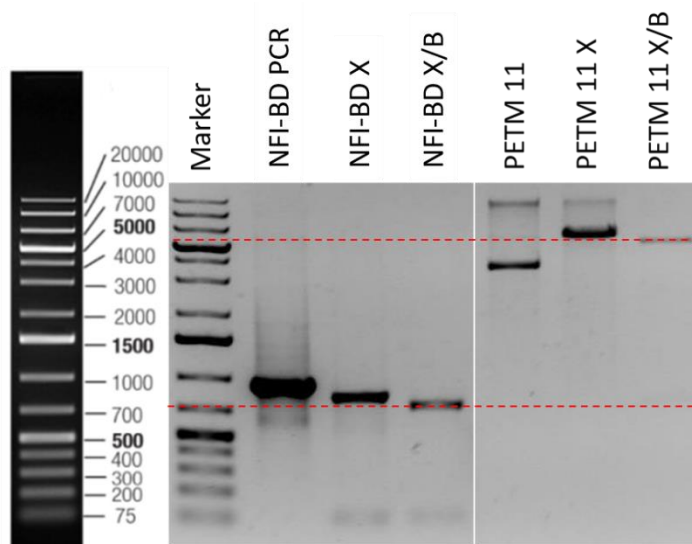
5.1.2. Hasítás restrikciós endonukleázokkal

A hasítás a DNS hordozó multiklónozó régiójában történik, ahol egyedi restrikciós endonukleáz felismerési/hasítási helyek találhatók (7. Ábra-3.). Többféle stratégiát alkalmaztunk, egy vagy kettő hasítási helyet kiválasztva. Egy hasítást általában az EcoRI felhasználásával végeztünk, így az elhasított DNS mindkét végén azonos ragadós vég lett. A beépülés során az EcoRI hely tehát megkétszereződik, ugyanis a gén mindkét végén megjelenik

majd. Ha azonban a gén mindkét végén azonos ragadós vég található, akkor az mindkét lehetséges irányba beépülhet a hordozóba. Ha fordítva épül be a génszakasz, akkor nem fejeződik ki a célfehérje. Az EcoRI az alábbi ragadós végeket eredményezve segíti a gén beépülését:



Kettős hasítást a BamHI-EcoRI, vagy a BamHI-XhoI felismerési helyeken végeztünk. Ebben az esetben a hasítási helyek között lévő DNS szakaszt helyettesíti a beépítendő gén. Két különböző enzim használatakor megpróbáltuk egyszerre és külön is használni őket, mert más-más pufferkörnyezet kedvező az egyes enzimek részére (9. Ábra). Az inkubálás és az inaktiválás után gélelektroforézissel vizsgáltuk, hogy sikeres volt-e a hasítás.



9. Ábra: pETM11 hordozóba történő beépítés restrikciós endonukleázokkal történő előkészítésének ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel (X-XhoI, B-BamHI).

A dupla hasítás során 40 bp-ral rövidebb DNS-t kaptunk, így az NFI-BD X/B ~692 bp-ból állt. A pETM11 X/B 5989 bp-ból álló linearizált DNS. A gélképen jól látható a PCR termék méretének csökkenése a hasítás után, illetve a hordozó DNS átalakulása szuperhelikálisból lineáris formába. a gélelektroforézis eredménye alapján a hasítások sikeresek voltak, ugyanis a méretek a megfelelő értékek körül mozogtak a DNS markerrel összehasonlítva.

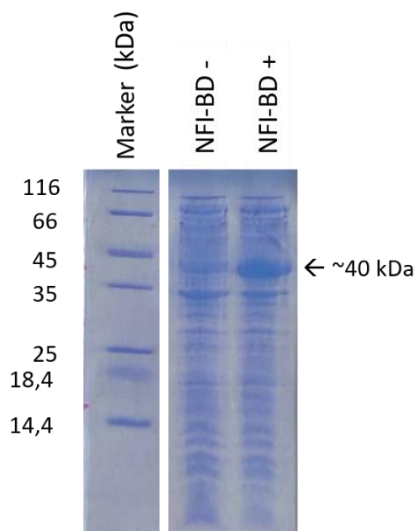
5.1.3. Ligálás és transzformálás

A DNS fragmenst és a hordozót a ligáz enzimmal összekapcsoltuk (7. Ábra-4.), és ezt az elegyet használtuk fel a baktériumsejtek transzformálására (7. Ábra-5.). A DH5α *E. coli* sejtekben sokszorosítottuk az újonnan elkészült cirkuláris DNS-molekulákat (plazmidokat),

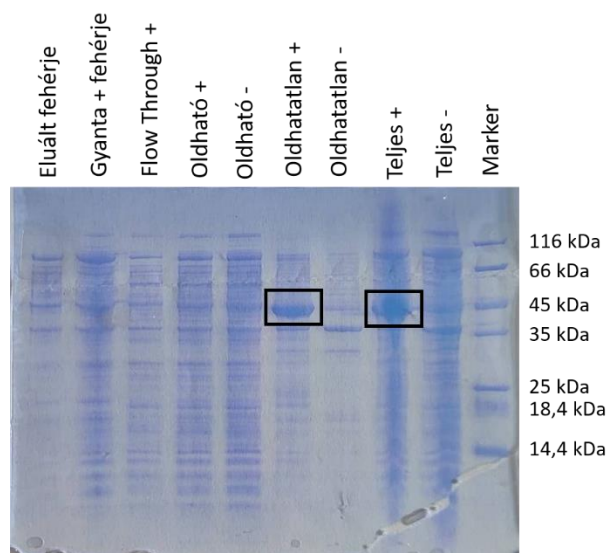
melyek tartalmazták a NFI DNS-kötő domén génjét. A DNS-t tartalmazó baktériumsejteket felvittük a megfelelő antibiotikum tartalmú LB-agar táptalajra Petri-csészében (7. Ábra-6.). Másnap egy baktériumtelepet kiválasztottunk, amit átvittünk antibiotikum tartalmú LB-táptalajra, ahol tovább szaporítottuk a sejteket (7. Ábra-7.). Ezután a centrifugálással összegyűjtött baktériumsejteket lefagyasztottuk a miniprep DNS tisztítási eljárás megkezdéséig (ld. 4.7. fejezet). Az NFI-BD gén beépülését a kiválasztott hordozókba minden esetben PCR, majd DNS szekvenálás segítségével igazoltuk.

5.1.4. A NFI-BD fehérje előállítás

A fehérje kifejezésre *E. coli* BL21, BL21(PlysS), illetve Rosetta sejteket használtunk. A fehérje termelését IPTG segítségével (izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid) indukáltuk (10. és 11. Ábra) [28]. Első kísérleteink során a pGEX-6P-1-NFI-BD hordozót alkalmaztuk, mellyel sikerült ugyan fehérjét előállítanunk, de olyan kevés termék képződött, hogy nem lehetett UV-abszorpciós és cirkuláris dikroizmus spektroszkópiás módszerekkel tanulmányozni. Ezért a kísérleteket megismételtük a fentiekben bemutatott további DNS hordozókkal is. Végül a pETM11-NFI-BD DNS hordozó bizonyult a leginkább megfelelőnek. Ezzel a hordozóval sikerült a fehérje túltermeltetése.



10. Ábra: A NFI-BD fehérje kifejeződése BL21 sejtekben. A fehérje kifejezéshez pETM11-NFI-BD vektort használtuk. A + jelzésű elegyben 0,4 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk a fehérje túltermelését. A képződő (His)₆-sumo-NFI-BD fehérje mérete ~40 kDa, ahol látszik a túltermelődés (7. Ábra-8.).



11. Ábra: A (His)₆-sumo-NFI-BD fehérje tisztítása és kifejezése BL21 sejtekből. A + jelzésű elegyekben 3 mM IPTG segítségével indukáltuk a fehérje kifejeződését.

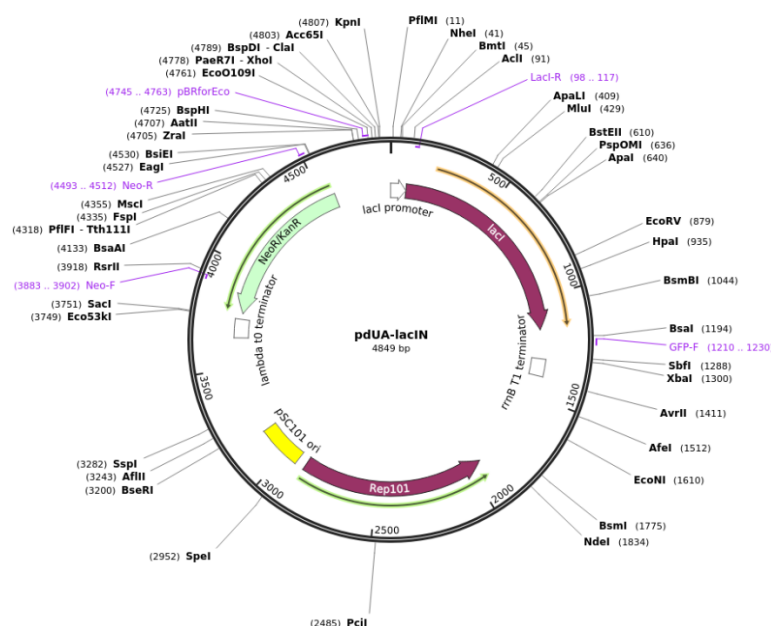
Az ábrán azonban látható, hogy a fehérjénk a teljes, valamint a sejtek roncsolása után csak az oldhatatlan fázisban jelenik meg, ami annyit jelent, hogy az elválasztási és tisztítási folyamatok nehézkesek. Tehát a továbbiakban ezeket a folyamatokat kell optimalizálnunk.

5.2. I-Block kísérletek fehérje – DNS kölcsönhatás vizsgálatára sejteken belül

A fenti kísérletekkel párhuzamosan az I-Block (2.2. fejezet) rendszert is kipróbáltuk a fehérje – DNS kölcsönhatás vizsgálatára. Ezeket a kísérleteket kétféle módon végeztük el. Előbb tesztelés céljából, petricsészékben különböző táptalajokon dolgoztunk (egyszeres és kétszeres transzformálás), majd nagyszámú kísérletet hajtottunk végre mikrolemez-olvasó segítségével. A következőkben ezeket mutatom be a fenti sorrendben.

5.2.1. A DNS célszekvencia beépítése a DNS hordozóba

Az I-Block teszt elvégzéséhez két DNS hordozóra van szükség. Az egyik a pdUA-lacI_N DNS hordozó (4. Séma), mely a *lacI* gént tartalmazza. Ebbe a hordozóba illesztjük be a NFI-BD fehérje által felismert rövid DNS célszekvenciát az NheI restrikciós endonukleáz enzim hasítási helyére. A DNS célszekvenciát dezoxi-oligonukleotidok formájában megrendeltük. Ezeket hibridizáltatva NheI ragadós végekkel rendelkező kétszálú DNS-t kaptunk.



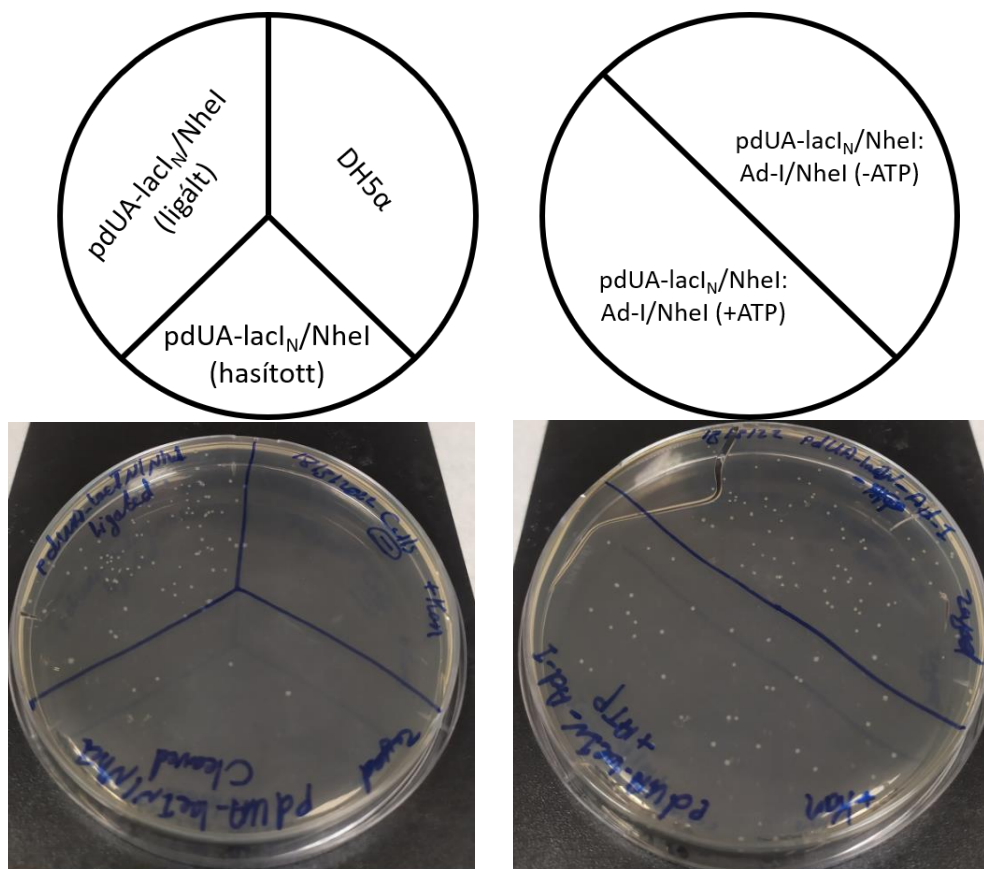
4. Séma: A pdUA-LacI_N DNS hordozó (vektor).

A pdUA-lacI_N hordozót NheI enzimmal hasítottuk el, ami így ragadós végeket alakított ki, ahová a NFI-BD által felismert DNS célszekvenciát építhetjük. A pdUA-lacI_N DNS-t 50 µL Tris-HCl pufferben oldottuk, hogy elérje az 56 ng/µL végkoncentrációt. A restriktós enzim optimális működéséhez 1×Tango (sárga) puffert használtunk. A reakcióelegyek összeállítása a 4. Táblázat szerint történt (ld. a Kísérleti anyagok és módszerek fejezetben).

Ad-I-Block/NheI és pdUA-lacI_N/NheI minták koncentrációi elég nagyok lettek, ezért A ligáláshoz 1:500, illetve 1:100-szoros hígítást végeztünk, hogy elérjük a 5. Táblázatban leírt koncentrációkat. A reakcióelegyek összeállítása a 5. Táblázat szerint történt (ld. a Kísérleti anyagok és módszerek fejezetben).

A ligálás utáni reakcióelegyekkel transzformált sejteket két, kanamicin antibiotikumot tartalmazó táptalajra vittük fel, az egyik a kontrol lemez (bal), a másik a minta lemez (jobb). A kontrol lemez egyik harmadára csak baktériumsejteket (itt például DH5α sejteket) vittünk fel, a másikkra transzformált baktériumsejteket elhasított DNS hordozót alkalmazva, a harmadik harmadra pedig transzformált baktériumsejteket ligált DNS hordozót alkalmazva (12. Ábra). Az első kettőnél azt vártuk, hogy nem jelennek meg baktériumtelepek, mert a sejtek nem rezisztensek a kanamicin antibiotikumra. Ezzel ellenőriztük, hogy megfelelő-e a táptalaj. A harmadiknál megjelennek majd a baktériumtelepek az inkubáció után, amennyiben a ligáz enzim megfelelően működik, ugyanis ebben az esetben a linearizált vektor önmagával történő összezáródása történik meg cirkuláris DNS-sé.

A minta lemeznél feleztük a területet, a bal felére olyan mintát adtunk, amihez további ATP-t is adtunk a ligáz működésének segítésére. Itt mind a hordozót, mind a beépítendő DNS szakaszt az NheI enzimmel hasítottuk el, majd a ligáz enzimmel kapcsoltuk össze őket.



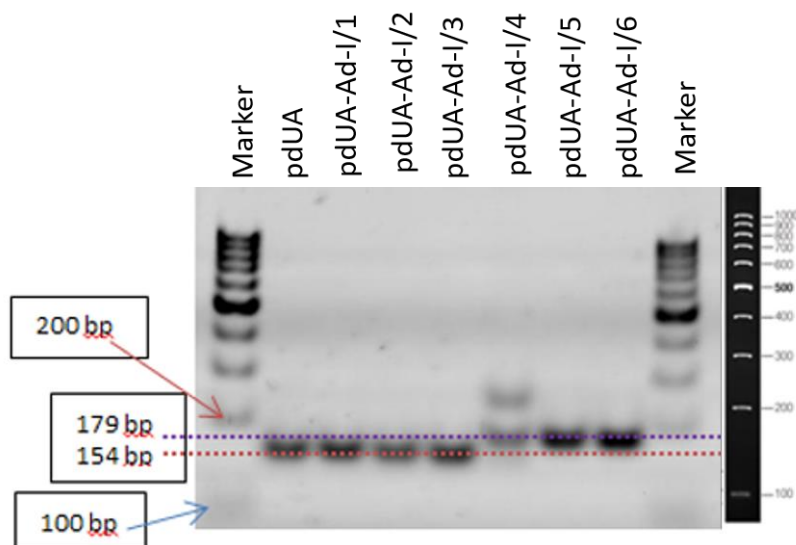
12. Ábra: Példa a LB táptalajt tartalmazó Petri-csésze felosztására a sokszorosítási folyamathoz.

Az ábrán látszódik, hogy mind a kontrol, mind a minta kísérletek sikeresek voltak, ugyanis csak ott jelentek meg telepek, ahol a fentiek alapján vártuk, vagyis a ligált részeknél. Úgy tűnik az ATP felesleg hozzáadása nem változtatott jelentősen a ligálás folyamatán. Ezekkel a sikeresen ligált DNS hordozókkal folytattuk a kísérleteket.

5.2.2. A DNS célszekvencia beillesztésének ellenőrzése PCR eljárással

Először egy rövidebb fehérje felismerési szekvenciát építettünk be a hordozóba, hogy minél kevésbé változtassuk meg a promóter régiót:

5' -CTAGCTATTTTGGATTGAAGCCAAG-3'

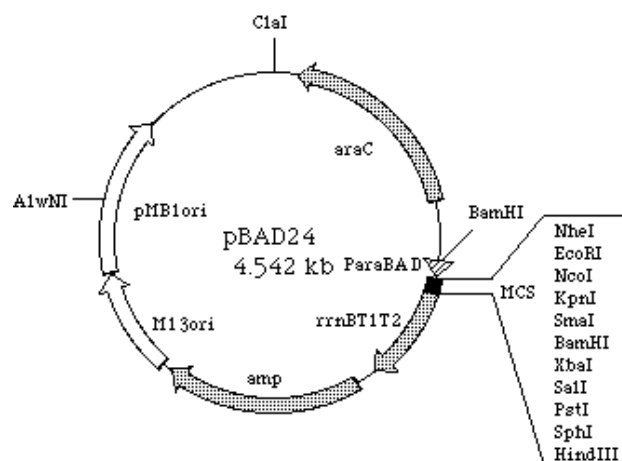


13. Ábra: A PCR termékek méretének ellenőrzése natív PAGE gélképen.

Annak ellenőrzése, hogy a DNS szakasz beépítése a hordozóba sikeres volt-e elsőként PCR módszerrel történt, a hordozóhoz tervezett oligonukleotid primerek segítségével. A reakcióelegy összeállítása a 2. Táblázat szerint történt (ld. a Kísérleti anyagok és módszerek fejezetben). A pdUA-LacI_N hordozóról, mint templárról sokszorosított DNS fragmens a beillesztett célszekvencia nélkül 154 bp, a beillesztett célszekvenciával 179 bp méretű. Ilyen kisméretű DNS fragmensek megbízható elválasztása és detektálása poliakrilamid gélen lehetséges (13. Ábra). Ennek eredményét figyelembe véve az Ad-I/5 és 6 jelű minták tűntek megfelelőnek a további kísérletekhez.

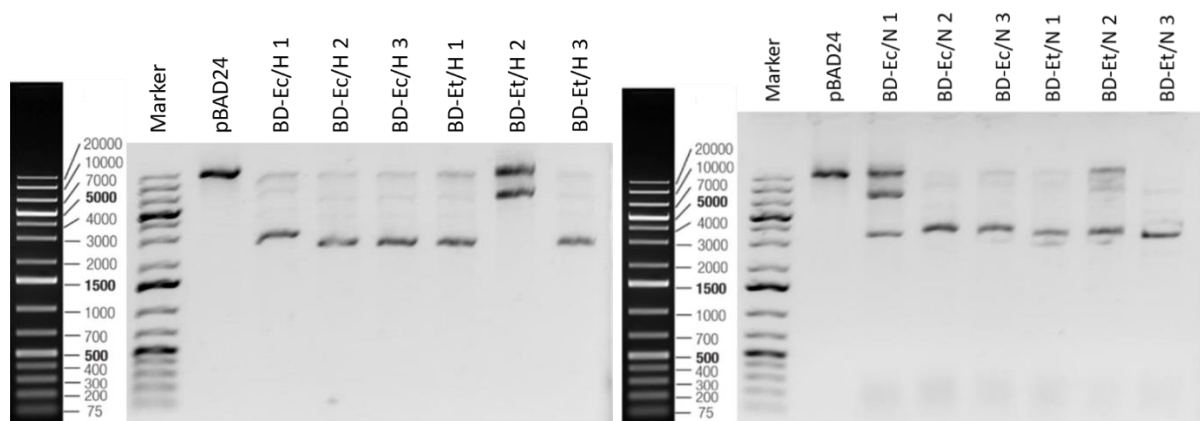
5.2.3. A fehérje génjének beépítése pBAD24 hordozóba

Az I-Block kísérletben, az előzőektől eltérően, nem nyerjük ki a fehérjét a baktériumsejtekből, mivel a sejteken belül vizsgálható a fehérje-DNS kölcsönhatás. Az NFI-BD fehérje génjét ezért a pBAD24 (5. séma) DNS hordozóba építettük be. Az eddigiekben alkalmazott módszerek szerint, (ld. 5.1.1. fejezet) állítottuk elő a fehérje génjét PCR eljárással.



5. Séma: A pBAD24 DNS hordozó (vektor).

A pBAD24 hordozó elhasítása után, ligáz enzimmal összekapcsoltuk azt a szintén elhasított génszakaszokkal (13. Ábra).



14. Ábra: A génszakaszok beépülésének vizsgálata a hordozóba agaróz gélelektroforézissel. (Ec-EcoRc, Et-EcoRI, H-HindIII, N-NcoI)

A 14. ábrán bemutatott gélképek eredményét eléggé bizonytalanul tudtuk megítélni, ezért végeztünk olyan kísérletet is, amikor PCR-t hajtottunk végre a pBAD24 hordozóhoz tervezett primerpárokkal:

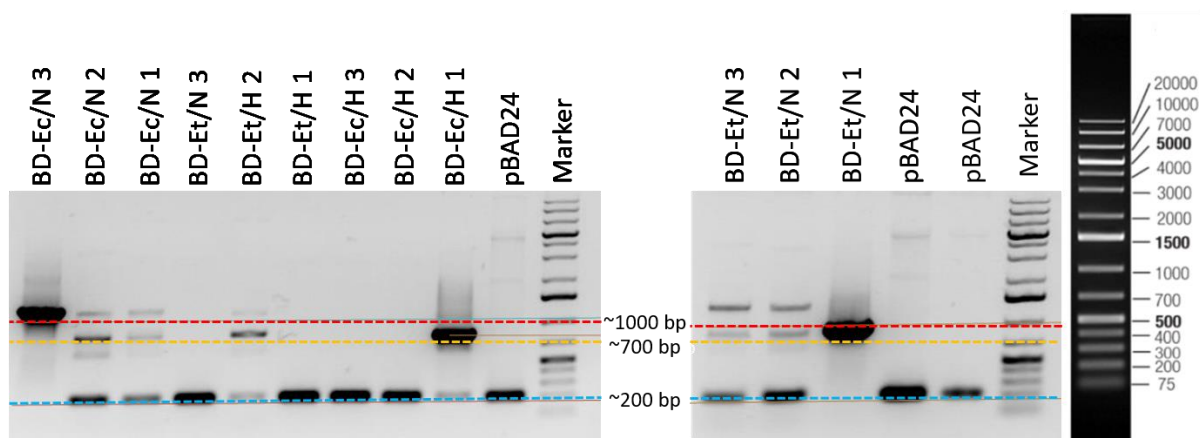
pBAD-F: 5'-ATGCCATAGCATTTTTATCC-3'

pBAD-R: 5'-GATTTAATCTGTATCAGG-3'

AK92: 5'-GATTAGCGGATCCTACCTGA-3'

AK155: 5'-AGACCGCTTCTGCGTTCTGA-3'

Példaként az AK primerpárral elvégzett kísérlet eredményét mutatom be (15. Ábra). A reakcióelegy összeállítása a 3. Táblázat szerint történt (ld. a Kísérleti anyagok és módszerek fejezetben).



15. Ábra: A DNS hossz az AK92 és AK155 primerek között 203 bp. A NFI-BD klónozása EcoRI-NcoI között 934 bp, EcoRI-HindIII között pedig 890 bp hosszúságú PCR terméket ad.

Az ábrán jól látható, hogy a legtöbb kísérletben nem, vagy csak nagyon kis koncentrációban képződtek megfelelő bázispár hosszúságú minták (a 700-as és 1000-es jelek között). A gélkép alapján tehát, csak a BD-Et/N 1, BD-Ec/N 3 és a BD-Ec/H 1 mintákat használhattuk a további kísérleteink során.

A beépült DNS fragmensek épségét DNS szekvenálással ellenőriztük. A szekvenálási reakciókban egy primert használunk, hogy csak az egyik szál szekvenciáját határozzuk meg – így egyértelmű. Lehetséges olyan primert használni, mely a hordozóhoz hibridizálódik. Ennek több előnye is van: egyrészt a hordozó állandó szekvenciával rendelkezik, így egy jól bevált, általánosan használható primer tervezhető hozzá. A szekvenáláshoz a primereket általában a DNS szál elején vagy végén (a képződő fehérje N- és C-terminális részét kódoló végeken) helyezik el. A szekvenálással a beépített gén iránya is megállapítható. Továbbá, a primerek komplementer szekvenciái a gén kezdetétől olyan távolságra vannak, ami épp elegendő ahhoz, hogy a szekvenálási reakció kezdetén fennálló bizonytalanságok már ne zavarják a gén szekvenciájának megbízható meghatározását. Ebben az esetben mind az AK92 forward, mind pedig az AK155 reverz primer alkalmazásával elvégeztük a szekvenálást, mivel a gén meglehetősen hosszú.

Ilyenkor alkalmazható az a primer is, melynek segítségével a beépített gén restrikciós endonukleáz felismerési helyet tartalmazó végét építettük ki – azaz hozzáfűztük ezt a szekvenciát, hogy utána hasítható legyen az enzimmel és így kialakítható legyen a ragadós vég. Az ilyen primerek azonban az adott génhez egyedi, illetve mivel közvetlenül a gén kezdetéhez kapcsolódnak, a szekvenálási reakcióban bizonytalanná válik a számunkra fontos első ~50 nukleotid leolvasása. Továbbá a gén beépülésének iránya sem határozható meg, ha a szekvenálás értékelése során rövidebb szekvencia értelmezhető, mint maga a gén.

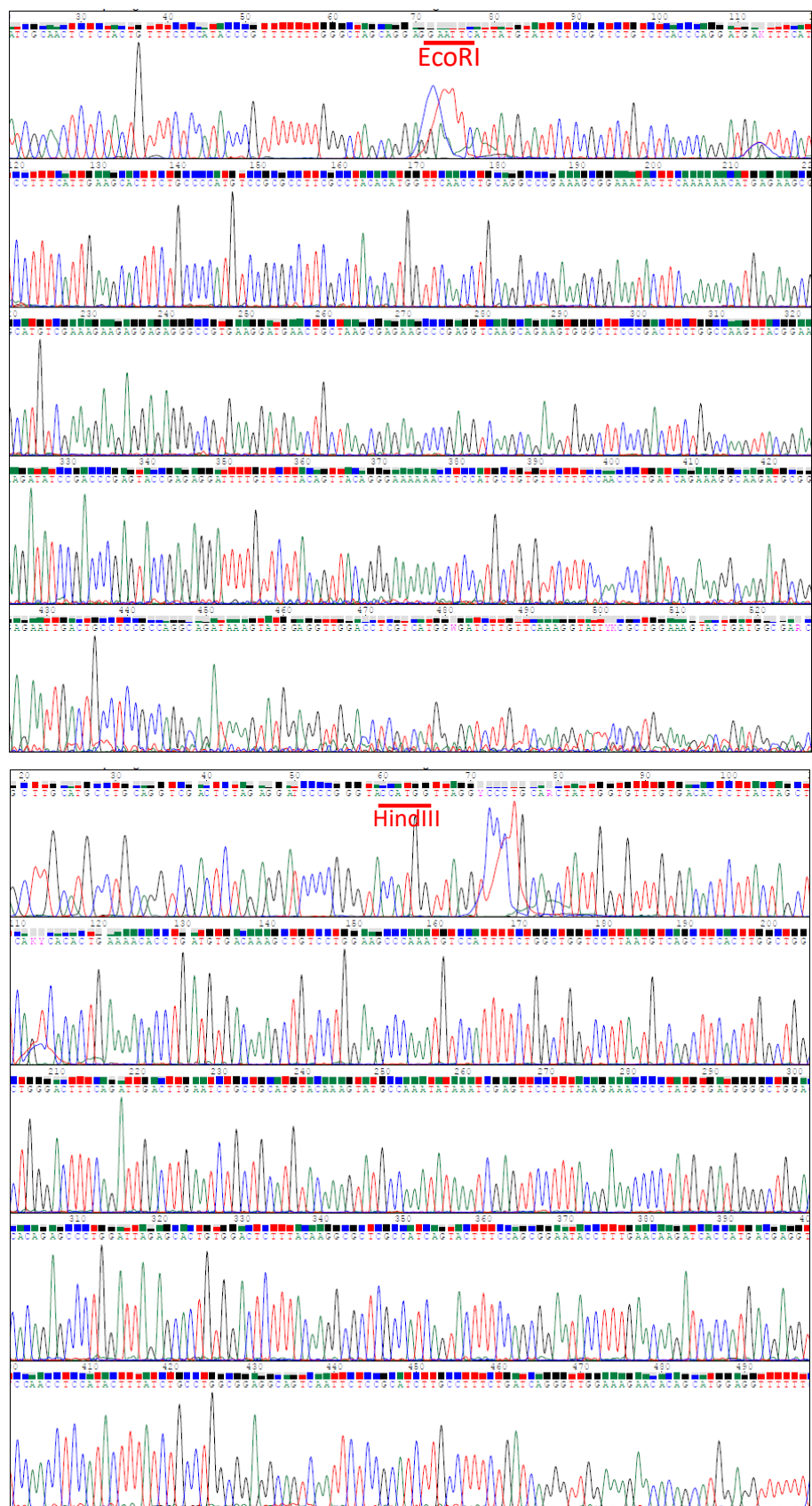
A szekvenálás során alkalmazott 4 lánczáró didezoxi-nukleotidot különböző színű fluoreszcens festékekkel megszínezzük, amik gerjesztés hatására fluoreszkálnak. A szekvenálási folyamat automatizálható jó felbontású kapilláris gélelektroforézis segítségével, fluoreszcens detektálással. A pBAD-NFI-BD-Et/N 1 DNS hordozó cél-DNS-t tartalmazó szakaszának szekvenálási eredménye a 16. Ábrán látható, melyet összehasonlítottunk a várt DNS szekvenciával (az EcoRI – gaattc és HindIII – aatg restrikciós endonukleáz felismerési helyek kiemelve):

5' ggaattcattatgtattctccgctctgtctcaccaggatgagtttcatcctttcattgaagcacttctgccc
catgtccgcgccttcgcctacacatggttcaacctgcaggcccgaaagcggaaatacttcaaaaaacatgagaag
cgcatgtcgaaagaagaggagagggccgtgaaggatgaactgctaagcgagaagcccgaggtcaagcagaagtgg
gcttcccgacttctggccaagttagcgaaagatatccgacccgagtaccgagaggattttgttcttacagttaca
gggaaaaaacctccatgctgtgttctttccaacctgatcagaaaggcaagatgcgggagaattgactgcctccgc
caggcagataaagtatggaggttgacctcgtcatggtgatcttgttcaaaggtattccgctggaaagtactgat
ggcgagcgccttgtaaagagtccacagtgtctaatccagggctctgtgtccagcccatcacataggggtttct
gtaaaggaactcgatttatatttggcatacttctgtacatgcagcagattcaagtcaatctgaaagtccagccag
ccaagtgaagctgacattaaggaccagccagaaaatggacatttgggcttccaggacagctttgtcacatcaggt
gttttcagtgtgactgagctagtaagagtgtcacaacaccaatagctgcagggacctaaccatggg3'

Inverz (reverz és komplementer) DNS szekvencia:

5' ccatgggttaggtccctgcagctattgggtgttgtgacactcttactagctcagtcacactgaaaacacctga
tgtgacaaagctgtcctggaagcccaatgtccattttctggctggtccttaatgtcagcttcaacttggctggct
gggactttcagattgacttgaatctgctgcatgtacaaagtatgccaaatataaatcgagttcctttacagaaaac
ccctatgtgatggggctggacacagagccctggattagagcactgtggactctttacaaggcgctcgccatcagt
actttccagcggaatacctttgaacaagatcacatgacgaggtccaacctccatactttatctgcctggcggag
gcagtcaattctccgcatcttgcctttctgatcagggttgaaagaacacagcatggagggtttttccctgtaac
tgtaagaacaaaatcctctcggtactcgggtcggtatctttccgtaacttgccagaaagtcgggaagcccaactt
ctgcttgacctcgggcttctcgttagcagttcatccttcacggccctctcctcttcttctcgacatgcgcttctc
atgttttttgaagtatttccgcttccggcctgcaggttgaaccatgtgtaggcgaaggcgcgacatggggcag
aagtgttcaatgaaaggatgaaactcatcctgggtgagacagagcggagaatacataaatgaattc3'

Az összehasonlítás eredménye a szekvenciák azonosságát mutatta az esetleges automatikus hozzárendelés során jelentkező bizonytalanságok manuális ellenőrzése és kiküszöbölése után. Amennyiben az automatikus hozzárendelés nem volt egyértelmű, ott az elektroferogram alapján mi ki tudtuk választani a helyes dezoxi-nukleotidot. A két reakció alapján egyértelműen azonosítottuk a várt szekvenciát. A szekvenálást témavezetőm a Tsukubai Egyetemen (Japán) végezte el.



16. Ábra: A pBAD-NFI-BD_Et/N 1 DNS szekvenálások elektroferogramjai: felül a forward, alul az inverz (reverz és komplementer) DNS szekvenciák.

5.2.4. Fehérje jelenlétének kimutatása

Az NFI-BD fehérje aminosav szekvenciája az alábbi:

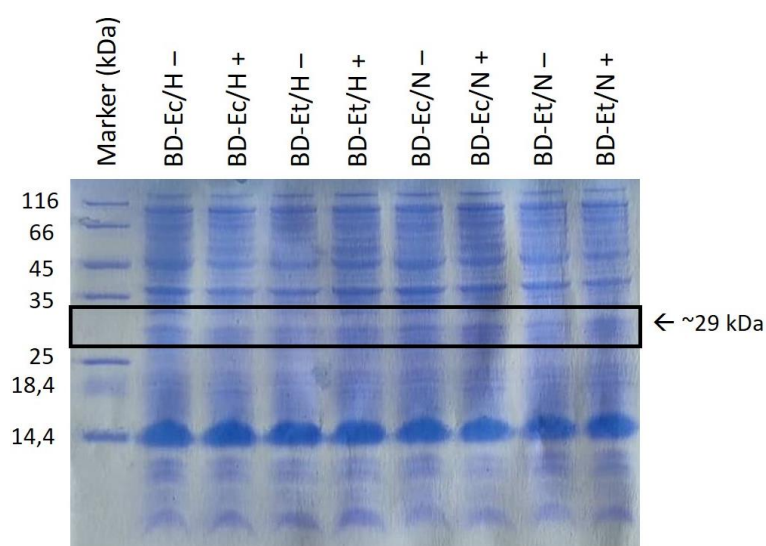
MYSPLCLTQDEFHFPFIEALLPHVRAFAYTWFNLQARKRKYFKKHEKRMSKEEERAVKDELLS
EKPEVKQKWASRLAKLRKDIRPEYREDFVLTVTGKKPPCCVLSNPDQKGKMRRIDCLRQAD
KVVRLDLVMVILFKGIPLSTDGERLVKSPQCSNPGLCVQPHHIGVSVKELDLYLAYFVHAA
DSSQSESPSQPSEADIKDQPENGHLGFQDSFVTSGVFSVTELVRVVSQTPIAAGT

A 7. Táblázatban feltüntettem a fehérjére az ExPASy ProtParam programmal számolt/becsült néhány fizikai tulajdonságot (<https://web.expasy.org/protparam/>).

7. Táblázat: A pBAD-NFI-BD_Et/N 1 néhány fizikai tulajdonsága.

	Molekulatömeg (Da)	Izoelektromos pont	Aminosavszám	Moláris abszorbancia (oxidált Cys) $M^{-1}cm^{-1}$	Moláris abszorbancia (redukált Cys) $M^{-1}cm^{-1}$
pBAD-NFI- BD-Et/N 1	27430,56	8,65	240	0,941	0,927

A fehérje kifejezésére BL21, (BL21(PlysS)), Rosetta vagy ER1821 Δ lacI *E. coli* sejteket használtunk. A termelését arabinózzal indukáltuk (17. Ábra). A cél NFI-BD mérete ~29 kDa, amelyik mérettartományban (bekeretezett) nem látunk túltermelődést. Arra gondoltunk, hogy talán a fehérje citotoxikus lehet a baktériumra nézve, ezért az elkülöníthette a sejt többi részétől egy membrán segítségével, amiből elég nehéz kinyerni. A mintáinkat egyszer 6 M ureával, egyszer 500 mM NaCl is kezeltük, de nem láttunk szignifikáns változást.



17. Ábra: Az NFI-BD fehérje kifejeződése. A fehérje génjét a pBAD24 hordozóba különböző restrikciós endonukleázokkal végeztük (ld. szöveg). A + jelzésű mintákban 4 mM arabinózzal indukáltuk a kifejeződést.

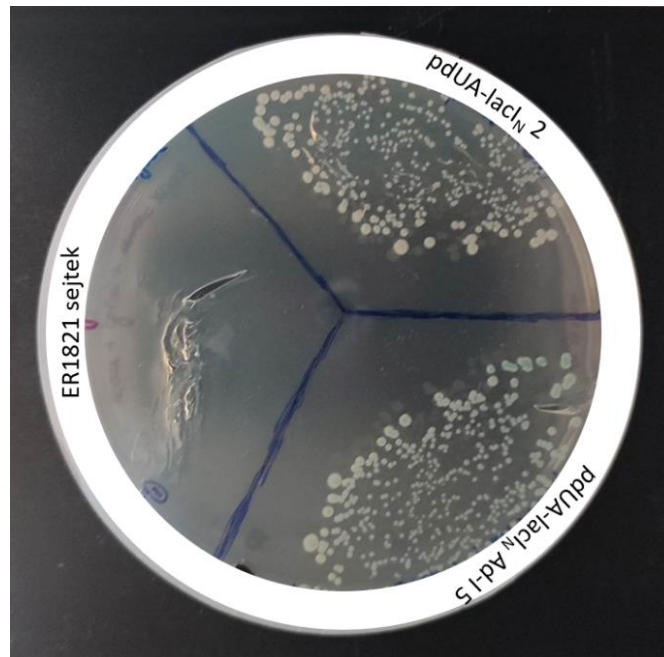
5.2.5. Kettős transzformálás

Az NFI-BD felismerő helynek megfelelő rövid DNS szekvenciát beépítése a pdUA-lacI_N vektorba meggátolhatja a promóter funkciót, és ezzel a LacI fehérje kifejeződését. Ebben az esetben a hordozó sejtekbe juttatása ellenére sem képződik a LacI fehérje. Ezt egy olyan kísérlettel ellenőriztük, ahol egyik reakcióelegyben transzformáltuk a ER1821Δ*lacI* sejteket, a másikon viszont nem. A nem transzformált sejteknek kéknek kell lenniük, a másikon a sejtek fehérek maradnak. Ha mindkét esetben kék sejteket kapunk, akkor a promóter régió nem funkcionális az új DNS szekvencia beépítése miatt, és az RNS-polimeráz nem képes a transzkripciót végrehajtani.

A másik hordozó a pBAD24, amibe a NFI-BD fehérje génjét ültettük be. Ha ezt a kettőt együtt juttatjuk be a sejtbe, akkor az indukálás során képződő NFI-BD fehérje a célszekvenciájához kötődve megakadályozza az inhibitor fehérje képződését. Ekkor termelődhet a β-galaktozidáz és megjelenik a kék szín. Az eddigi tapasztalatok alapján nagyon kevés DNS-kötő fehérje megjelenése is elég ennek a kísérletnek a sikerességéhez.

Kipróbáltuk, hogy az új plazmidok hogyan viselkednek a sejtekben külön-külön és együtt, IPTG-indukálással, valamint indukálás nélkül. Transzformálást hajtottunk végre olyan pdUA hordozókkal, melyek közül az egyik tartalmazta, a másik pedig nem az NFI-BD célszekvenciát. A célszekvencia nélkül biztosan kifejeződik az inhibitor fehérje, ezért a sejtek fehérek lesznek. Ha a beépített célszekvencia nem okoz változást a hordozóban, akkor hasonló tapasztalhatunk, viszont, ha megakadályozza a *LacI* transzkripciót, akkor megjelenik a kék szín a sejtekben. Ebben az esetben más módon kell a DNS célszekvenciát beépíteni. Tehát ez a kísérlet arra szolgál, hogy meghatározzuk, sikeres volt-e a DNS célszekvencia beépítése (18. Ábra).

A kísérlet sikeres volt, habár kis mértékben megjelent egy halvány kék szín. Azonban hasonló volt a cél-DNS-t nem tartalmazó DNS-sel transzformált sejtek harmadrésze is, ami a módszer háttérét mutatja. Határozottabb kék szín megjelenése azt jelentené, hogy nem keletkezett az inhibitor fehérje, ami megakadályozná a β-galaktozidáz termelődését. Azonban itt nem volt jelen a fehérjét előállító hordozó, hogy megakadályozza az inhibitor fehérje előállítását, ezért jelent meg a kék szín helyett a fehér.

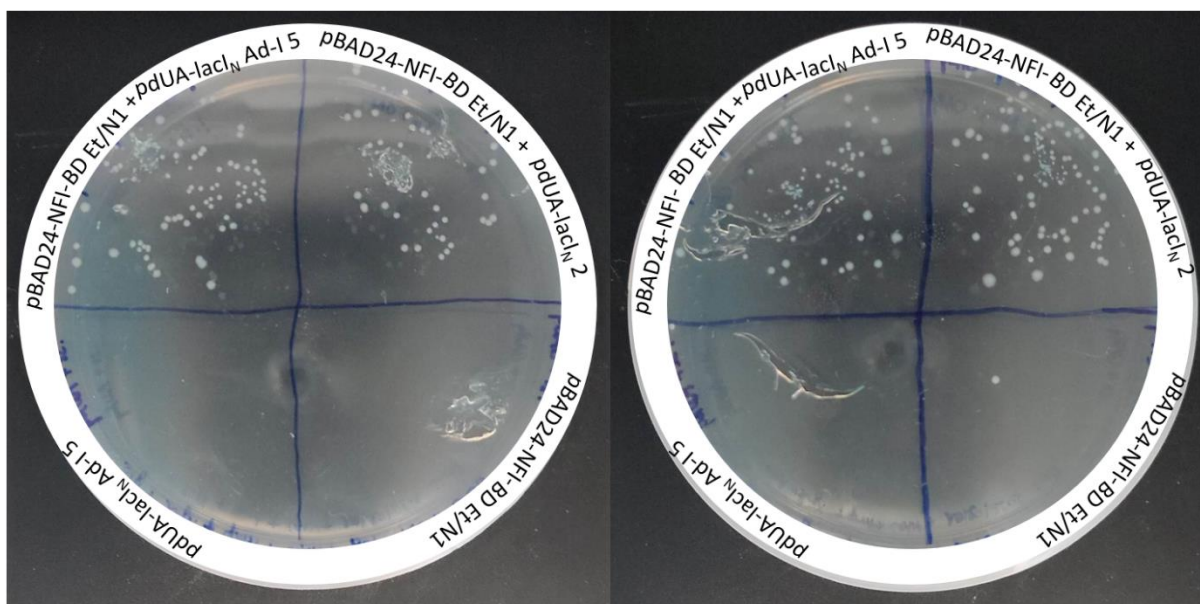


18. Ábra: A transzformálás során ER1821 (I-Block) sejteket használtunk. Az agar táptalajunk X-Gal-t, glükózt és kanamicint tartalmazott. A petricsészét harmadoltuk, az egyes harmadokba vittük fel a transzformált baktériumsejteket tartalmazó reakcióelegyet, illetve kontrollként a nem transzformált sejteket. Az antibiotikum jelenlétében utóbbiak nem életképesek, nem szabad telepeket alkotniuk.

A kísérleti anyagok és módszerek fejezetben leírt transzformálási folyamatot kissé átalakítottuk a kettős transzformáláshoz, hogy biztosan megtörténjen a hordozók bejutása a baktériumsejtekbe. ~50 μ L I-Block sejtet adtunk 2 μ L DNS-hez, majd 30 percig jeges hűtést alkalmaztunk. A vízfürdőt felmelegítettük 41°C-ra és 2 percig hősokknak voltak kitéve, majd gyorsan visszatettük jégre. Ehhez hozzáadtunk 40 μ L sterilizált, antibiotikum mentes LB tápoldatot és pipetázással összekevertük. A keveréket 30 percig rázattuk 37°C-on a BIOSAN TS-100 Thermo Shaker segítségével, majd ezt vittük fel a táptalajra.

A kettős transzformálást hasonlóan végezzük, mint ahogy azt a kontrol kísérletben leírtam, annyi különbséggel, hogy a sejtekhez egyszerre adtuk hozzá a pBAD24-NFI-BD és a pdUA-*lacI_N*-Ad-I 5 cél-DNS szekvenciát tartalmazó, illetve anélküli (pdUA-*lacI_N* 2) DNS hordozókat, valamint a lemezek kanamicint és ampicilint is tartalmaztak az X-Gal mellett. Kettő táptalajon is elvégeztük a kísérleteket, egyik arabinózt (bal), a másik glükózt (jobb) is tartalmazott (19. Ábra).

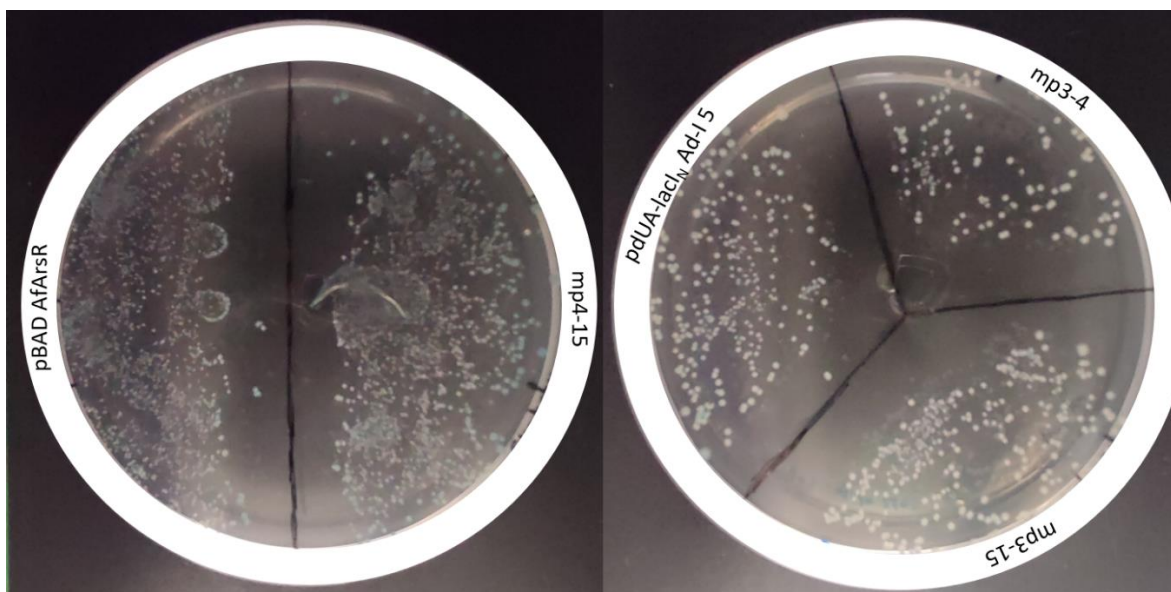
Itt kontrollként nem transzformálás nélküli sejteket használtunk, hanem a pBAD24-NFI-BD és a pdUA-*lacI_N*-Ad-I 5 hordozókkal egyszeresen transzformált sejteket, hiszen ezek csak az egyik antibiotikumra rezisztensek, így ilyen táptalajon nem tudnak telepeket alkotni.



19. Ábra: A petricsészék kontrol részén (alsó fele) nem nőtték telepek, tehát a táptalaj megfelelő a kísérlethez. Viszont a kék szín nem, vagy csak alig jelent meg.

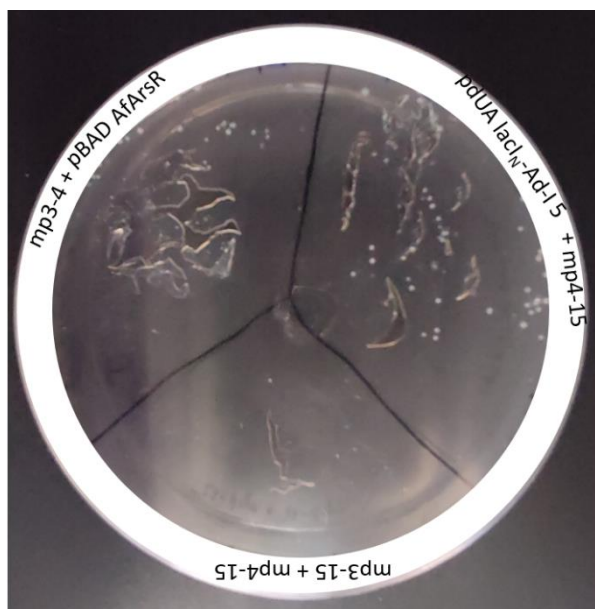
Az előző kísérletben nem kaptunk egyértelmű eredményt, a kék szín hiánya a kísérlet sikertelenségére utal, ezért az NFI-BD szekvenciát újra beépítettük a pBAD24 horozóba, annyi különbséggel, hogy a hasítási hely és a metionin kód közé beépítettünk egy ACC kódot, ami a riboszóma megkötésére szolgál. A pdUA hordozóba most egy hosszabb fehérje felismerési szekvenciát építettünk be, mert lehet, hogy az előző kísérletben a DNS célszekvencia rövidsége miatt nem kapcsolódott oda a DNS-kötő fehérje (5' – CTAGCTACCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGG – 3').

Az egyik kontrol lemez táptalajához X-Galt és ampicillint adtunk, amivel a pBAD24 hordozót vizsgáltuk. Mivel ebben nincs *lacI* gén, ezért a keletkező sejteknek kék színűeknek kell lenniük (20. Ábra-bal). A másikhoz X-Galt és kanamicint adtunk, amivel a pdUA hordozót vizsgáltuk. Most a rövid és a hosszabb szekvenciát tartalmazó hordozót is vizsgáltuk egymás mellett (20. Ábra-jobb).



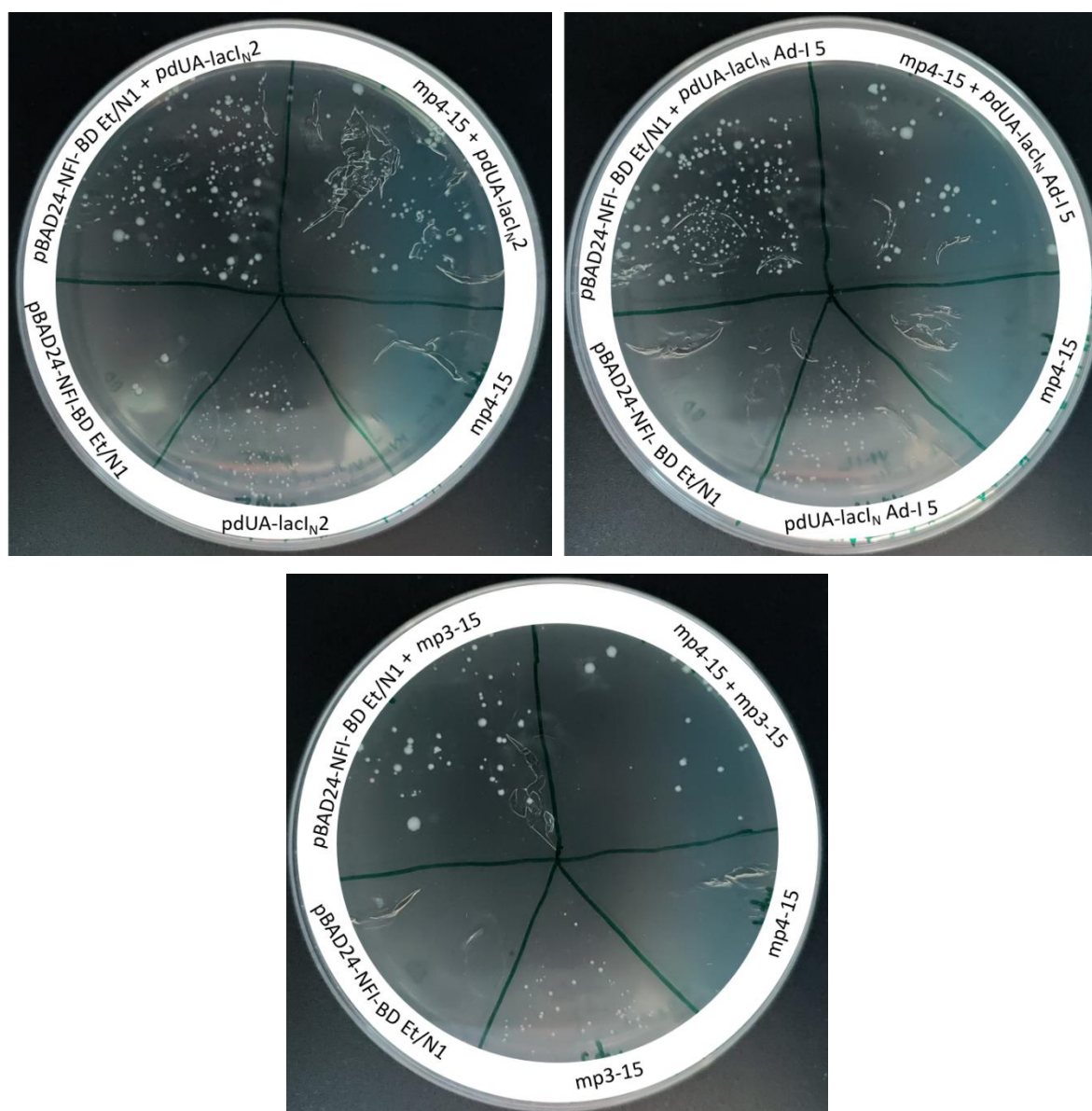
20. Ábra: A pBAD-ot tartalmazó sejtek kék színűek lettek, míg a pUA-t tartalmazó sejtek fehérek, tehát a kontrol kísérletek sikeresek voltak. Az mp3-15 a pUA-lacI_{NE} NFI-NE-4-et, az mp4-15 a pBAD24-NFI-BDc-3-at jelöli. Az mp3-4 és a pBAD AfArsR a kutatásomban nem releváns.

A kontrol kísérlet sikeres volt, ugyanis a pBAD24 hordozót tartalmazó sejtekben megjelent a kék szín, míg a pUA hordozókat tartalmazó sejtek fehérek maradtak. Ezután újabb minta lemezt készítettünk a kettős transzformáláshoz, ami X-Galt, kanamicint, ampicillint és arabinózt tartalmazott. Itt is a kettős transzformáláshoz átalakított transzformálási folyamatot alkalmaztuk (21. Ábra).



21. Ábra: Elég kisszámú telep képződött, és azokban sem látható a kék szín. Az mp3-15 a pUA-lacI_{NE} NFI-NE-4-et, az mp4-15 a pBAD24-NFI-BDc-3-at jelöli. Az mp3-4 és a pBAD AfArsR a kutatásomban nem releváns.

Ez a kísérlet sem lett sikeres, tehát feltételezhetjük, hogy nem a fehérje felismerési szekvencia hossza a probléma. A sikerhez nélkülözhetetlen, hogy a sejtekbe mindkét hordozó bekerüljön a transzformálási folyamat során. A kettős transzformálási kísérletet többször megismételtem az összes lehetséges hordozó-párosítással a lehető legfrissebb táptalajokkal, ugyanazon módszerekkel. Végül sikerült pozitív eredményt elérni, megjelent a kék szín a kevés telepszám ellenére is (22. Ábra). Érdekes még megemlíteni, hogy az önmagukban álló többi pdUA hordozó apró, halvány kékszerű telepeket adtak. A jelenségre nem találtam egyértelmű választ, de valószínűleg csupán kis átfertőződés történt.



22. Ábra: Az újra elvégzett kísérletekben 6 párosítás közül a felső négyénél nem jelent meg a kék szín, viszont az mp3-15 hordozót alkalmazva a telepek jól láthatóan kék színűek lettek.

Végül a kísérlet sikeresnek mondható, ugyanis többnyire csak a kettős transzformált sejtek maradtak életben és azok kékek lettek. Azonban a módszernek továbbá is egy nagy hátránya, hogy csak a vizuálisan, kvalitatív módon tudjuk megfigyelni a megjelenő színeket.

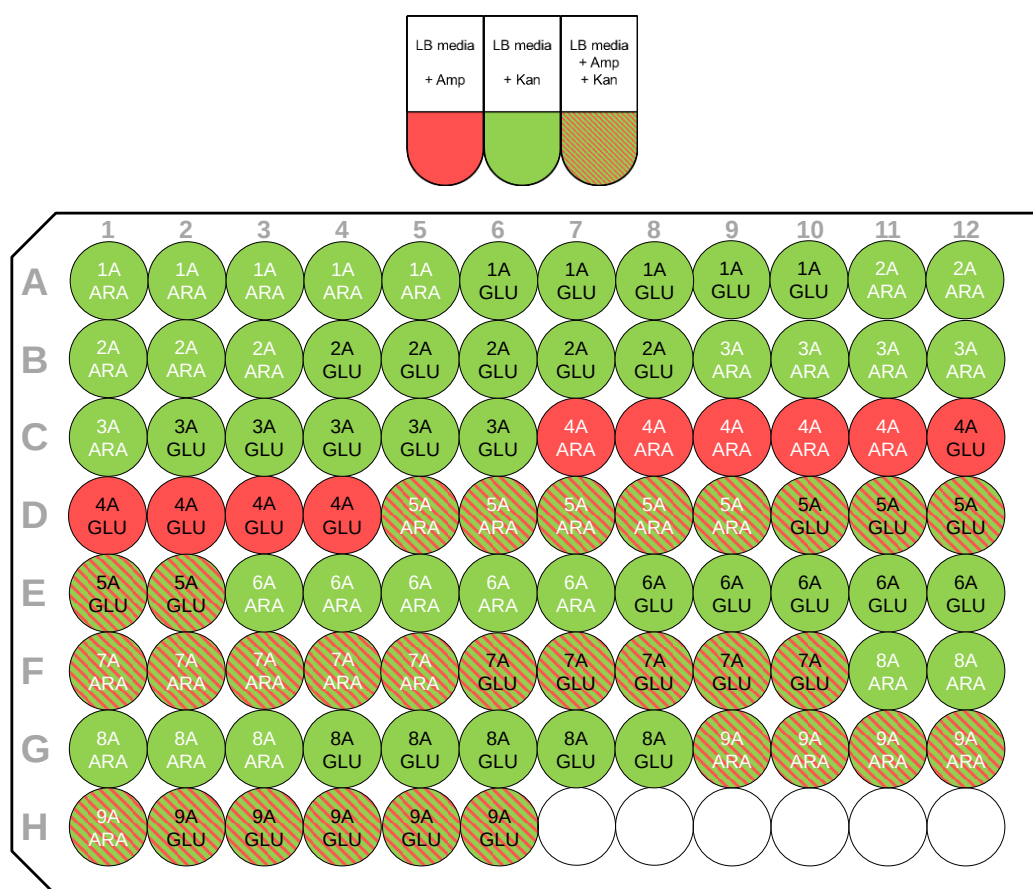
5.2.6. I-Block kísérlet Plate Readerrel

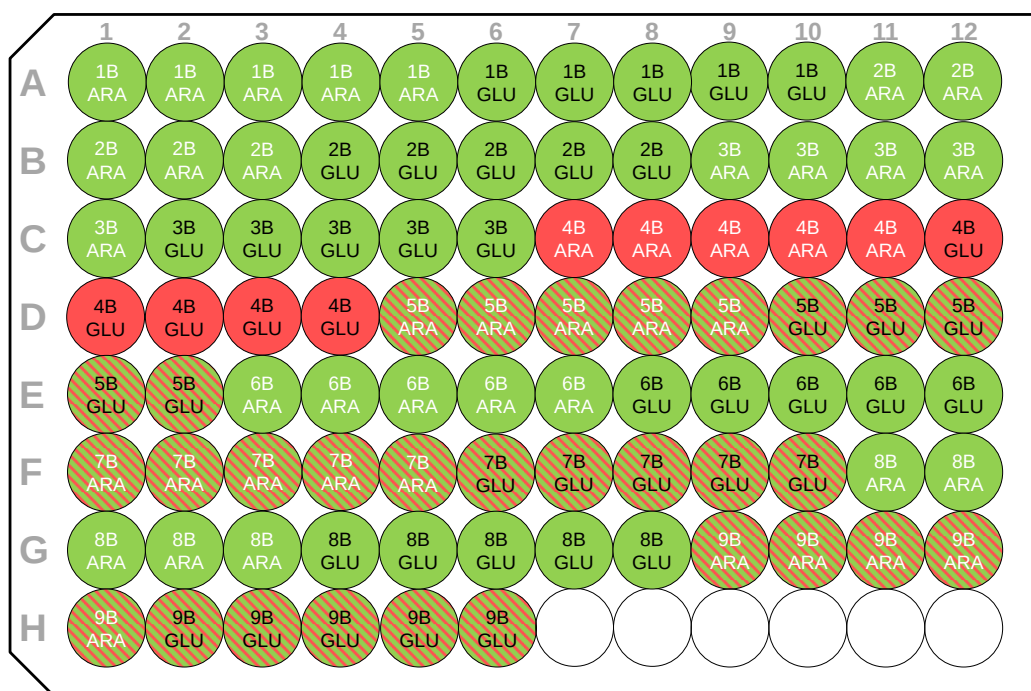
A továbbiakban egy műszert, a Mikrolemez olvasót (Plate Reader) használtunk, hogy kvantitatívvá tehesük a kísérletet. A kísérleti tervet a 8. Táblázat szemlélteti, a reakciókat ezek alapján végeztem el. Mivel a kísérlet meglehetősen összetett, ezért a jobb megértés érdekében ezt táblázatot nem az eredményektől távol a Kísérleti anyagok és módszerek fejezetben mutatom be, hanem közvetlenül az eredmények közelében.

8. Táblázat: Kísérletsorozat összeállítása a Plate Readerrel történő mérésekhez.

Sejt	DNS felismerési plazmid	Fehérje gén	Ara/ Glu	Antibiotikum	Hely		Cső
ER1821ΔLacI +	pdUA-LacI _{NE}		ARA	KAN	A1-A5	- kontrol	1A&1B
ER1821ΔLacI +	pdUA-LacI _{NE}		GLU	KAN	A6-A10	- kontrol	1A&1B
ER1821ΔLacI +	pdUA-LacI _{NE} -6ZA		ARA	KAN	A11-B3	- kontrol	2A&2B
ER1821ΔLacI +	pdUA-LacI _{NE} -6ZA		GLU	KAN	B4-B8	- kontrol	2A&2B
ER1821ΔLacI +	pdUA-lacI _{NE} NFI-NE-4 (mp3-15)		ARA	KAN	B9-C1	- kontrol	3A&3B
ER1821ΔLacI +	pdUA-lacI _{NE} NFI-NE-4 (mp3-15)		GLU	KAN	C2-C6	- kontrol	3A&3B
ER1821ΔLacI +		pB6ZA	ARA	AMP	C7-C11	+ kontrol	4A&4B
ER1821ΔLacI +		pB6ZA	GLU	AMP	C12-D4	+ kontrol	4A&4B
ER1821ΔLacI +	pdUA-LacI _{NE} -6ZA	pB6ZA	ARA	KAN+AMP	D5-D9	++ kontrol	5A&5B
ER1821ΔLacI +	pdUA-LacI _{NE} -6ZA	pB6ZA	GLU	KAN+AMP	D10-E2	++ kontrol	5A&5B
ER1821ΔLacI +		pBAD24-NFI-BD Et/N1	ARA	AMP	E3-E7	+ kontrol	6A&6B
ER1821ΔLacI +		pBAD24-NFI-BD Et/N1	GLU	AMP	E8-E12	+ kontrol	6A&6B
ER1821ΔLacI +	pdUA-lacI _{NE} NFI-NE-4 (mp3-15)	pBAD24-NFI-BD Et/N1	ARA	KAN+AMP	F1-F5	Minta	7A&7B
ER1821ΔLacI +	pdUA-lacI _{NE} NFI-NE-4 (mp3-15)	pBAD24-NFI-BD Et/N1	GLU	KAN+AMP	F6-F10	Minta	7A&7B
ER1821ΔLacI +		pBAD24-NFI-BDc-3 (mp4-15)	ARA	AMP	F11-G3	+ kontrol	8A&8B
ER1821ΔLacI +		pBAD24-NFI-BDc-3 (mp4-15)	GLU	AMP	G4-G8	+ kontrol	8A&8B
ER1821ΔLacI +	pdUA-lacI _{NE} NFI-NE-4 (mp3-15)	pBAD24-NFI-BDc-3 (mp4-15)	ARA	KAN+AMP	G9-H1	Minta	9A&9B
ER1821ΔLacI +	pdUA-lacI _{NE} NFI-NE-4 (mp3-15)	pBAD24-NFI-BDc-3 (mp4-15)	GLU	KAN+AMP	H2-H6	Minta	9A&9B

Átvittem a megfelelő glicerines sejt készletet egy műanyag csőben lévő tápoldatba a megfelelő antibiotikummal. KAN + AMP: 8850 μL (a 35 mL-es Duran üvegből), KAN: 8850 μL (2 cső), AMP: 8850 μL (2 cső). A csöveket a vízfürdős rázatóba helyeztem 37 °C-on, amíg az elegyek el nem érték a $\sim 0.3 \text{ OD}_{600}$ értéket. Közben előkészítettem 2 $\times$ KAN+Ara, 2 $\times$ KAN+Glu, 2 $\times$ AMP+Ara, 2 $\times$ AMP+Glu, 35 mL AMP+KAN+Ara, 35 mL AMP+KAN+Glu tartalmazó csöveket. 295-295 μL -t töltöttem a megfelelő csőből a kijelölt helyre a Greiner BioOne átlátszó F-bottom mikrolemezre (LEMEZ#1 és LEMEZ#2) és hozzáadtam 5-5 μL -t a fentebb említett növesztett kultúrákból, ahogy az a 23. Ábrán látható:





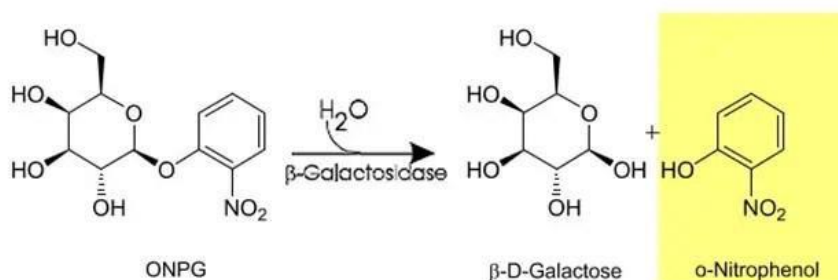
23. Ábra: LEMEZ#1 (felül) és LEMEZ#2 (alul) összeállítása.

Megmértem az OD₆₀₀ értékét a Clariostar plus PlateReaderrel (V = 300 µL). Lefedtem a lemezeket alumínium fóliával és 8 óráig rázattam őket (150-200 rpm, 30 °C). Ezután 45-45 µL permeabilizáló oldatot adtam (100 mM Na₂HPO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,8 mg/ml hexadecil-trimetilammónium-bromid (CTAB), 0,4 mg/mL Na-deoxikolát és 5,4 µL/mL β-merkaptotetanol; 9. Táblázat) két új lemezre (LEMEZ#3 and LEMEZ#4) az A1–H6 helyekre.

Átvittem 5-5 µL sejt kultúrát/LB-t LEMEZ#1-ről 2-ről A1–F12 helyekre a LEMEZ#3-ra és 4-re. Homogenizáltam a LEMEZ#3 és 4-es oldatokat pipettázással, majd lefedtem a lemezeket alumínium fóliával és 30 percig rázattam (150-200 rpm, 30 °C). A lemezeket 30 perc után kivettem és a Plate Readeren beállítottam a következő paramétereket: ONPG_time_dep_2: (sample volume: 340 µL, temperature: 30 °C, wavelengths: 420 nm és 550 nm, no. of cycles: 100, no. of flashes: 50, cycle time: 300 sec, + shaking. 290 µL szubsztrátoldatot (1 mg/mL ONPG, 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄ és 2,7 µL/mL β-merkaptotetanol; 9. Táblázat) adtam az A1-H6 helyekre. (Mérni kellett az időt, ami a lemez feltöltésére szükséges, mert később az adatok kiértékelésénél korrekciót kellett alkalmazni.) A keveréket pipettázással homogenizáltam.

A folyamat során keletkezett sejteket ezúttal másfajta módon festettük be. Az orto-nitrofenil-β-galaktozid (ONPG) egy spektrofotometriás szubsztrát a β-galaktozidáz aktivitás kimutatására. Ez a vegyület szintelen. Ha azonban β-galaktozidáz van jelen, az ONPG

molekulát galaktózzá és orto-nitrofenollá (ami sárga színű) hidrolizálja, (24. Ábra). Ennek intenzitását vizsgáltuk a Plate Reader-rel.



24. Ábra: Az ONPG hasításának folyamata.

9. Táblázat: A permeabilizáló és a szubsztrátoldatok elkészítése. (Törzsoldatok: 400 mM NaH₂PO₄; 250 mM Na₂HPO₄; 10 mM MgSO₄; 100 mM KCl)

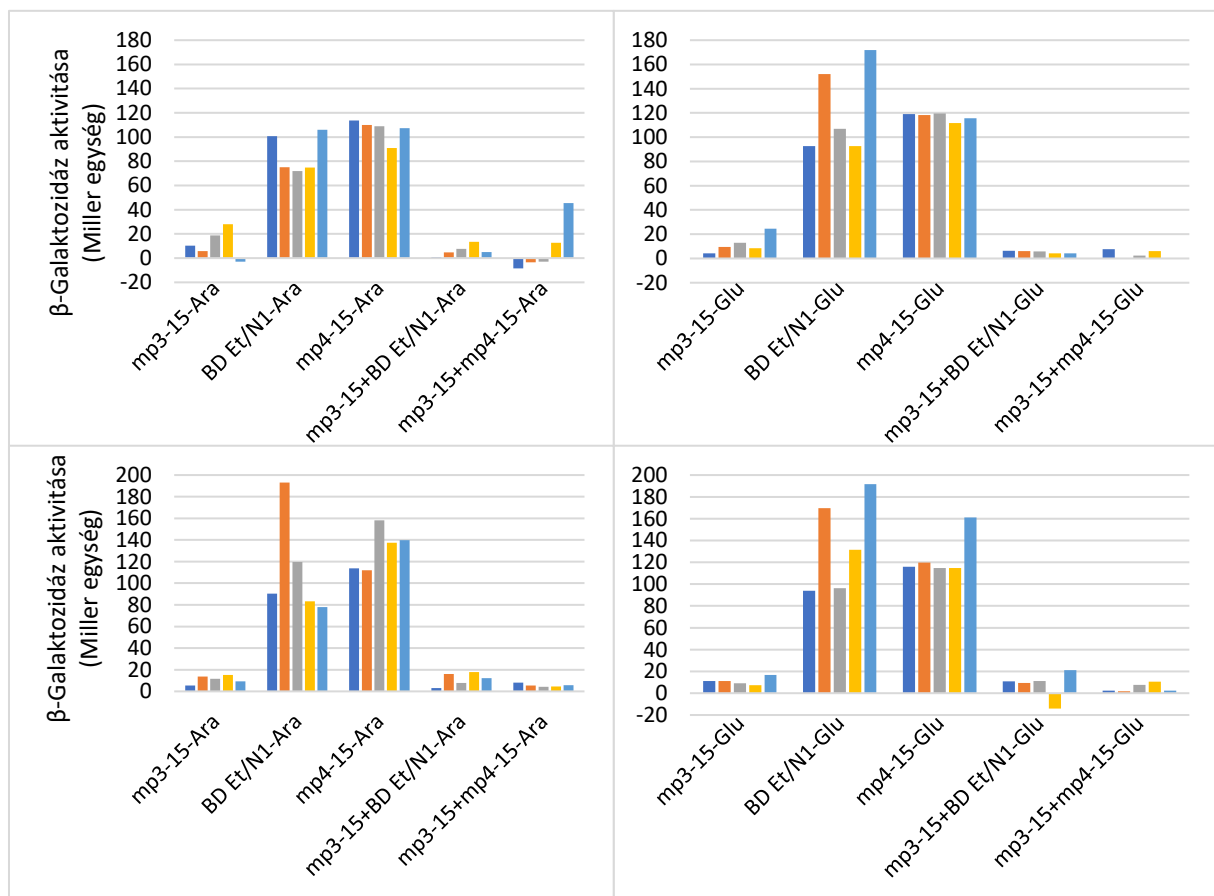
20 mL Permeabilizáló oldat	120 mL szubsztrátoldat
8 mL Na ₂ HPO ₄	28,8 mL Na ₂ HPO ₄
4 mL KCl	12 mL NaH ₂ PO ₄
4 mL MgSO ₄	324 μ L β -Merkaptoetanol
16 mg CTAB	120 mg ONPG
8 mg Deoxichoid	Töltse fel MilliQ vízzel
108 μ L β -Merkaptoetanol	
Töltse fel MilliQ vízzel	

A két lemezen ugyanazok az anyagok voltak, azaz párhuzamos eredményeket kaptunk. Mindkét lemezen minden anyaghoz vagy arabinózt (ARA), vagy glükózt (GLU) adtam. A kísérlet szempontjából az arabinózzal végzett reakció a fontosabb, ugyanis az indukálja az NFI-BD fehérje képződését és ott várjuk a szín megjelenését (25. Ábra).

A 25. Ábrán a β -Galaktozidáz aktivitását a kutatócsoportunkban már korábban használt módszerrel számoltam ki. A lyukak feltöltésének idejével és a háttér kivonásával korrigáltam az értékeket. Emellett a két hullámhossz által adott értékekből (420 és 550 nm) faktor értékeket számoltam. A minták fényelnyelésének változásait vizsgáltam a különböző hullámhosszokon. Miller-egységekre számoltam át a mérések során kapott abszorbancia értékeket. A következő képlettel kaptam meg a β -Galaktozidáz aktivitását [29]:

$$\beta - \text{Galaktozidáz aktivitása} = \frac{(A(420 \text{ nm}) - A(550 \text{ nm})) * \text{Faktor}(420/550)) * 1000}{\text{Korrigált háttér} * t(\text{reakció}) * V(\text{sejtszuspenzió})}$$

Viszont mp3-15+BD Et/N1 és mp3-15+mp4-15-nél a mérések többségnek a Miller-egysége a 20-at sem érte el. Egy kiugró értéket láthatunk LEMEZ#3-on mp3-15+mp4-15 esetében, viszont ez sem jelentős. Az eredmény azt mutatta, hogy az arabinóz jelenléte ellenére az intenzitás nem kiemelkedő a glükózt tartalmazó minták intenzitásához képest, ami várakozásunkkal ellentétes eredmény lett.



25. Ábra: LEMEZ#3 (felül) és LEMEZ#4 (alul) eredményei, különvéve az arabinózt (bal oldal) és a glükózt tartalmazó (jobb oldal) mintákat. A különböző színű oszlopok a párhuzamos méréseket mutatják.

A továbbiakban érdemes lenne megbizonyosodni az NFI-BD fehérje termelődéséről és megjelenéséről az oldatfázisban. Az is elképzelhető, hogy a fehérje és a fehérje felismerési szakasz között a kötődés sztérikus vagy esetleg kinetikai okból kifolyólag gátolt. A kísérlet további optimalizációjával sikeresebb kísérleteket remélünk.

6. Összefoglalás

A kutatómunkám célja a Nukleáris Faktor I fehérje DNS-kötő részének előállítása és vizsgálata volt. Mivel ismert, hogy a fehérje tisztítása rendkívül nehéz, ezért a közvetlenül előállítás mellett a sejteken belül is szeretnénk volna megvizsgálni a fehérje DNS kötését az I-Block kísérlet segítségével.

Számos hordozóba építettük be a fehérje génjét tartalmazó DNS szekvenciát. Kezdetben nem értünk el fehérje kifejeződést egyikkel sem, végül a pETM11 hordozó segítségével sikerült túltermelést kimutatni, és így képesek voltunk előállítani a fehérjét BL21 sejtekből, amit poliakrilamid gélen azonosítottunk. Azonban miután a fehérjeoldatot szétválasztottuk az oldható és oldhatatlan fázisára, bizonyossá vált, hogy a fehérje az oldhatatlan frakcióba került. Emiatt a tiszta fehérje kinyerése bonyolult, de a jövőbeli terveink között szerepel a fehérje tisztítási folyamatainak az optimalizációja, valamint a szerkezetének vizsgálata különböző módszerekkel. a jövőben megpróbálkozunk a fehérje tisztításával denaturáló körülmények között, hiszen a fémion-affinitás kromatográfia így is működőképes lehet.

A kezdeti I-Block kísérletben nem értünk el sikert a rövidebb DNS célszekvencia beépítése miatt a pDUA hordozóba. A minta nem mutatott egyértelmű eredményt, bár a kontrol kísérletek alapján az összeállított DNS hordozók önmagukban megfelelően működtek. A hosszabb DNS célszekvenciával javuló eredményeket értünk el, a várt szín megjelenését megfigyelhettük a kvalitatív kísérletben. A Plate Readerrel végrehajtott mérés viszont még további optimalizációt igényel.

7. Irodalomjegyzék

- [1] Y. Ma, L. Zhang, and X. Huang, "Genome modification by CRISPR/Cas9," *FEBS J.*, vol. 281, no. 23, pp. 5186–5193, 2014.
- [2] S.-W. Wang *et al.*, "Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer," *Mol. Cancer*, vol. 21, no. 1, p. 57, 2022.
- [3] T. Zhan, N. Rindtorff, J. Betge, M. P. Ebert, and M. Boutros, "CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy," in *Seminars in cancer biology*, Elsevier, 2019, pp. 106–119.
- [4] R. A. Guggenheimer, B. W. Stillman, K. Nagata, F. Tamanoi, and J. Hurwitz, "DNA sequences required for the in vitro replication of adenovirus DNA.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 81, no. 10, pp. 3069–3073, 1984.
- [5] B. Gyurcsik, "Kémiai Nobel-díjat ért a mesterséges nukleázok kutatása 2020-ban," *Magyar Kémikusok Lapja*, LXXVI. (2.), pp. 34–36, 2021.
- [6] M. Piper, R. Gronostajski, and G. Messina, "Nuclear factor one X in development and disease," *Trends Cell Biol.*, vol. 29, no. 1, pp. 20–30, 2019.
- [7] A. Novak, N. Goyal, and R. M. Gronostajski, "Four conserved cysteine residues are required for the DNA binding activity of nuclear factor I.," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 18, pp. 12986–12990, 1992.
- [8] S. Bandyopadhyay and R. M. Gronostajski, "Identification of a conserved oxidation-sensitive cysteine residue in the NFI family of DNA-binding proteins.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 47, pp. 29949–29955, 1994.
- [9] S. Bandyopadhyay, D. W. Starke, J. J. Mieyal, and R. M. Gronostajski, "Thioltransferase (glutaredoxin) reactivates the DNA-binding activity of oxidation-inactivated nuclear factor I.," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 1, pp. 392–397, 1998.
- [10] J. Dekker, J. A. W. M. van Oosterhout, and P. C. van der Vliet, "Two regions within the DNA binding domain of nuclear factor I interact with DNA and stimulate adenovirus DNA replication independently," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, no. 8, pp. 4073–4080, 1996.
- [11] H. Göös *et al.*, "Human transcription factor protein interaction networks," *Nat. Commun.*, vol. 13, no. 1, p. 766, 2022.
- [12] J. H. Lichy *et al.*, "Isolation of proteins involved in the replication of adenoviral DNA in vitro," in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1983, pp. 731–740.
- [13] K. Nagata, R. A. Guggenheimer, T. Enomoto, J. H. Lichy, and J. Hurwitz, "Adenovirus DNA replication in vitro: identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 79, no. 21, pp. 6438–6442, 1982.
- [14] K. Nagata, R. A. Guggenheimer, and J. Hurwitz, "Specific binding of a cellular DNA replication protein to the origin of replication of adenovirus DNA.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 80, no. 20, pp. 6177–6181, 1983.
- [15] R. M. Gronostajski, K. Nagata, and J. Hurwitz, "Isolation of human DNA sequences that bind to nuclear factor I, a host protein involved in adenovirus DNA replication.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 81, no. 13, pp. 4013–4017, 1984.
- [16] F. Tamanoi and B. W. Stillman, "Initiation of adenovirus DNA replication in vitro requires a specific DNA sequence.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 80, no. 21, pp. 6446–6450, 1983.
- [17] P. Aleström, A. Stenlund, P. Li, and U. Pettersson, "A common sequence in the inverted terminal repetitions of human and avian adenoviruses," *Gene*, vol. 18, no. 2,

- pp. 193–197, 1982.
- [18] B. G. M. van Bergen, P. A. van der Ley, W. van Driel, A. D. M. van Mansfeld, and P. C. van der Vliet, “Replication of origin containing adenovirus DNA fragments that do not carry the terminal protein,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 11, no. 7, pp. 1975–1989, 1983.
 - [19] F. E. J. Coenjaerts and P. C. van der Vliet, “Early dissociation of nuclear factor I from the origin during initiation of adenovirus DNA replication studied by origin immobilization,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 22, no. 24, pp. 5235–5240, 1994.
 - [20] F. Tamanoi and B. W. Stillman, “Function of adenovirus terminal protein in the initiation of DNA replication,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 79, no. 7, pp. 2221–2225, 1982.
 - [21] S. F. Burn, “Detection of β -galactosidase activity: X-gal staining,” *Kidney Dev. Methods Protoc.*, pp. 241–250, 2012.
 - [22] S. Szentes *et al.*, “I-Block: a simple Escherichia coli-based assay for studying sequence-specific DNA binding of proteins,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 48, no. 5, pp. e28–e28, 2020.
 - [23] T. M. Powledge, “The polymerase chain reaction,” *Adv. Physiol. Educ.*, vol. 28, no. 2, pp. 44–50, 2004.
 - [24] B. D. Hames, *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*, vol. 197. OUP Oxford, 1998.
 - [25] B. G. Johansson, “Agarose gel electrophoresis,” *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 29, no. sup124, pp. 7–19, 1972.
 - [26] B. J. Smith, “SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins,” *Proteins*, pp. 41–55, 1984.
 - [27] T. El-Bialy, D. Aizenbud, H. Sadeghi, P. Scott, and I. Aizenbud, “Cloning, purification and characterization of human dentine matrix protein 1 (DMP1),” *Saudi Dent. J.*, vol. 35, no. 5, pp. 553–558, 2023.
 - [28] G. Kollárovic, D. Majera, K. Luciaková, and P. Baráth, “Expression and purification of recombinant NFI proteins for functional analysis,” *Gen. Physiol. Biophys.*, vol. 28, no. 4, pp. 331–339, 2009.
 - [29] J. Miller, “A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for escherichia coli and related bacteria,” *A short course Bact. Genet. a Lab. Man. handbood escherichia coli Relat. Bact.*, pp. 143–149, 1992.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Gyurcsik Béla, egyetemi docensnek, hogy a dolgozatomat a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport tagjaként írhattam meg és azért is, hogy annyit segített nekem a kutatásom során.

Köszönöm továbbá Hajdu Bálintnak, Tóth Pankának, Fazekas Bettinek és Buránszki Józsinak a kutatásom során nyújtott segítséget, azt, hogy bármikor számíthattam rájuk és, hogy fenntartották a lelkesedésemet.

Sokkal tartozom Zeyad H. Nafae-nak, aki nélkül semeddig sem jutottam volna a munkámmal. Köszönöm segítségét és türelmét a kísérletek elvégzésében és az összefüggések elmagyarázásában.