



Pázmány Péter Katolikus Egyetem
Információs Technológiai és Bionikai Kar

Tudományos Diákkör

A posztzinaptikus Shank3 fehérje pontmutációk kóroki szerepének kísérletes és bioinformatikai vizsgálata

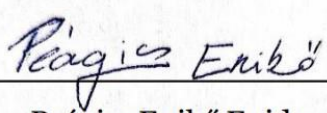
Peágics Enikő Enid
Molekuláris Bionika mérnöki BSc

2024

Témavezető: Dr. Péterfia Bálint Ferenc
Konzulens: Varga Soma

Nyilatkozat

Alulírott Peágics Enikő Enid, a Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs Technológiai és Bionikai Karának hallgatója kijelentem, hogy ezt a TDK dolgozatot meg nem engedett segítség nélkül, saját magam készítettem, és a dolgozatban csak a megadott forrásokat használtam fel. Minden olyan részt, melyet szó szerint, vagy azonos értelemben, de átfogalmazva / a dolgozat nyelvétől eltérő nyelvből fordítva, más forrásból átvettem, egyértelműen a forrás megadásával megjelöltem. Ezt a TDK dolgozatot más képzésen nem nyújtottam be.



Peágics Enikő Enid

Kivonat

A neuronok az idegrendszer alapvető funkcionális egységei, amelyek elektromos impulzusok formájában kommunikálnak egymással. Ezek a sejtek a szinapszisok révén alakítanak ki összeköttetéseket, lehetővé téve az információátvitelt és a neuronális hálózatok dinamizmusát. A szinapszis lehet excitátorikus vagy inhibitorikus, attól függően, hogy a neurotranszmitterek serkentik vagy gátolják a posztszinaptikus neuron aktivitását. A neuronális kommunikáció során a neurotranszmitterek kötődnek a szinapszisokban lévő receptorokhoz, ami kémiai jelek formájában módosítja a posztszinaptikus sejt membránpotenciálját, és így befolyásolja a neuron működését.

A posztszinaptikus denzitás (PSD) egy rendkívül összetett struktúra, amely alapvető szerepet játszik a szinapszisok működésében és a neuronok közötti kommunikációban. Az excitátorikus szinapszisok alatt található PSD kulcsfontosságú az idegi plaszticitásban, amely a tanulás és a memória mechanizmusainak alapját képezi. A posztszinaptikus denzitásban található Shank3 és Homer két fontos állványfehérje, amelyek képesek közvetlen kölcsönhatásra lépni egymással, ezzel biztosítva a szinapszis metabotróp és ionotróp receptorainak funkcionális összekapcsolását. Ez az interakció kulcsszerepet játszik a szinaptikus plaszticitás fenntartásában, és hozzájárul a neuronális hálózatok dinamizmusához.

Ezek olyan pontmutációk, melyeket igazoltan kimutattak autista betegeknél. Kutatásomban azt vizsgálom, hogy ezek a pontmutációk, hatással vannak-e a Shank3 és Homer közötti interakcióra. A Shank3 pontmutáns fehérjét biotechnológiai módszerekkel fogom előállítani, különös figyelmet fordítva a Homer kötő motívum közelében található mutációkra. A Shank3-Homer interakciót biolayer interferometriás módszerrel fogom vizsgálni, lehetővé téve a fehérjék közötti kölcsönhatások valós idejű nyomon követését.

A mutációk szerkezeti és működésbeli hatásait molekuláris biológiai és bioinformatikai eszközökkel elemzem, hogy megállapítsam, befolyásolják-e a fehérje működését és a szinapszisok funkcionalitását.

Tartalomjegyzék

Témabejelentő	i
Nyilatkozat	iii
Kivonat	iv
1. A Kutatás Célja	1
1.1. Rövidítésjegyzék	1
2. Irodalmi Áttekintés	2
2.1. Posztszinaptikus Denzitás (PSD)	2
2.1.1. Fázisszeeparáció (Liquid - Liquid Phase Separation: LLPS) és a PSD Funkciói	3
2.1.2. PSD Fő Állványfehérjék	3
2.1.3. Homer Fehérje	4
2.1.4. Shank3 Fehérje és Pontmutációi	4
3. Célkitűzés	5
4. Anyagok és Módszerek	6
4.1. In Vitro Mutagenézis	6
4.2. Expressziós Plazmid és Primertervezés	8
4.3. Polinukleotid-Kináz (PNK) Kezelés	9
4.4. PCR Reakció	10
4.5. Gélelektroforézis	11
4.6. Ligálás	12
4.7. Transzformálás	12
4.8. Plazmid DNS Izolálás	13
4.9. Sanger Szekvenálás	13
4.10. Rekombináns Fehérje Izolálásának Lépései	13

4.11. Biolayer Interferometria (BLItz)	14
4.12. Szekvencia Konzerváltságának Vizsgálata	16
4.13. Rendezetlenség Predikciók	16
4.14. Lineáris Motívum Predikciók	17
4.15. Aggregáció Predikciók	17
5. Eredmények és Megvitatásuk	18
5.1. Kiindulási Szekvencia	18
5.2. A Megtervezett Primerek	20
5.3. Mutagenézis PCR	21
5.4. Szekvenálási Eredmények	22
5.5. Sikeres Mutagenézis	22
5.6. A Hibás Plazmid Klónok Szekvencia Elemzése	23
5.7. Fehérje Affinitás Kromatográfia Eredménye	24
5.8. Szekvencia Konzerváltságának Vizsgálata	25
5.9. Rendezetlenség Predikciók	26
5.10. Lineáris Motívum Predikciók	26
5.11. Aggregáció Predikciók	28
5.12. BLItz Mérés Eredmények	28
6. Összefoglalás	31
6.1. Feladat	31
6.2. Eredmények	32
6.3. Jövőbeli tervek	32
Felhasznált irodalom	33

1. fejezet

A Kutatás Célja

A kutatásom célja a Shank3 fehérje és mutációinak neurológiai kórképekkel kapcsolatos funkcionális és strukturális megértése, különös figyelmet fordítva az Homer fehérje kötőmotívum környékén megfigyelhető pontmutációkra.

Első lépésként áttekintem a Shank3 fehérjével és mutációival kapcsolatos szakirodalmat. Ezt követően a megfelelő mutációkat tartalmazó fehérjekonstrukciók tervezésével foglalkozom, amelynek kiemelten fontos eleme a klónozáshoz szükséges primerek megtervezése. A következő lépés a fehérjék termelése és tisztítása, hogy funkcionálisan aktív fehérjéket állítsak elő a további kísérletekhez.

A biolayer interferometriás módszer segítségével a vad típusú és a megtermelt mutáns Shank3 fehérjék közötti kölcsönhatások vizsgálata következik, amely lehetővé teszi a fehérje-fehérje interakciók valós idejű nyomon követését. Emellett bioinformatikai elemzéseket is végzek, amelyek magukban foglalják a Shank3 fehérje szekvenciájának konzerváltságának vizsgálatát, a rendezetlenség predikciók alkalmazását, a lineáris kötő motívumok azonosítását, az aggregációs hajlam predikcióját.

1.1. Rövidítésjegyzék

- | | |
|---|--|
| • PSD – Postsynaptic Density | • PNK – Polynucleotide Kinase |
| • GST – Glutathione S-Transferase | • SDM – Site-Directed Mutagenesis |
| • PCR – Polymerase Chain Reaction | • NMDA – N-methyl-D-aspartate |
| • GKAP – Guanylate Kinase-Associated Protein | • PAGE – Polyacrylamide Gel Electrophoresis |

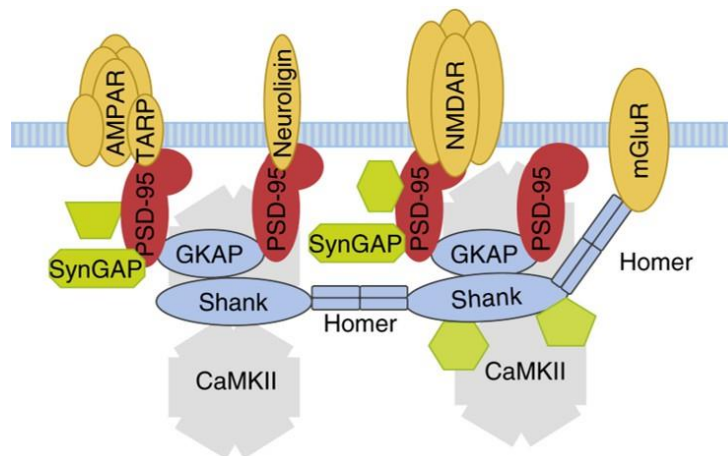
2. fejezet

Irodalmi Áttekintés

2.1. Posztszinaptikus Denzitás (PSD)

A szinapszis az idegsejtek (neuronok) közötti kapcsolat, amely lehetővé teszi az információk továbbítását az egyik sejtről a másikra. Két fő típusa van: a kémiai szinapszis, ahol a jel neurotranszmitterek felszabadulása révén terjed, és az elektromos szinapszis, ahol az elektromos impulzus közvetlenül, ioncsatornákon keresztül áramlik át. [1]

A posztszinaptikus denzitás (PSD) elsősorban a serkentő kémiai szinapszisok dendrittüskéiben található, az idegi ingerület átvitelének és feldolgozásának egyik legfontosabb szerkezeti eleme. Különösen az agy olyan területein, mint a hippocampus és a cortex, jelentős a szerepe a tanulásban és memóriában, azáltal hogy szinaptikus jelátviteli molekulákat és receptorokat rögzít és szabályoz. A PSD elektronmikroszkópos felvételkor válik láthatóvá, ahol egy nagy, megközelítőleg 30–50 nanométer vastag fehérje sűrűségű elektronrendez korong alakú szerkezetként jelenik meg, ami szorosan kapcsolódik a posztszinaptikus membránhoz. A PSD fő tömegét alkotó állványfehérjék (scaffolding proteins - 2.1 ábra) olyan makromolekulák, amelyek fontos szerepet játszanak a sejt különböző jelátviteli folyamataiban. [2] [3] [4] Ezek a fehérjék nemcsak kötőhelyet biztosítanak különböző szinaptikus jelátviteli molekulák és receptorok számára, hanem struktúrális sajátosságaik révén stabilizálják és megfelelő térbeli elrendezésbe szervezik őket. Ezáltal segítik a jelátviteli folyamatok hatékony lefolyását és biztosítják a sejtek közötti kommunikáció zavartalanságát.



2.1. ábra. Posztoszínaptikus denzitás fehérjék [2]

2.1.1. Fázisszeeparáció (Liquid - Liquid Phase Separation: LLPS) és a PSD Funkciói

A fázisszeeparáció az egyik legfontosabb mechanizmus, amely a PSD kialakulását és funkcióit szabályozza. A fő állványfehérjék folyékony-folyadék fázisszeeparáció révén (LLPS) alkotnak sűrű, kondenzált állapotú PSD-szerű struktúrákat. Ezek a kondenzátumok nem csupán receptorok és enzimek koncentrációját teszik lehetővé, de aktin filamentumokat is aggregálhatnak, miközben az inhibitoros posztoszínaptikus fehérjéket kiszorítják a struktúrából. A fázisszeeparáció főként a kondenzástumot alkotó fehérjék rendezetlen szakaszai közötti kölcsönhatások révén jön létre.

2.1.2. PSD Fő Állványfehérjék

A PSD-ben tömörülő legfontosabb fehérjék a 2.1 ábrán láthatóak. A számunkra legfontosabb Shank3 fehérjét a szinaptikus receptorokkal a PSD95 és a GKAP állványfehérjék kötik össze. A PSD-95 (postsynaptic density protein 95) kapcsolatot teremt a GKAP (guanylate kinase-associated protein) és a receptor fehérjékkel. Fő szerepe a glutamáterg szinapszisok struktúrájának stabilizálása, a receptorok és enzimek elhelyezése, valamint a szinaptikus plaszticitás támogatása. [5]

A GKAP (SAPAP) közvetlenül kapcsolódik a PSD-95 fehérje guanylate-kináz szerű (GK) doménjéhez. Ez a kölcsönhatás hozzájárul a szinaptikus fehérjék, például a K⁺ csatornák és NMDA receptorok összegyűjtéséhez, így segíti a posztoszínaptikus denzitás szerkezetének stabilizálását. [6] A GKAP C-terminálisa közvetlenül kötődhet a Shank fehérjék PDZ doménjéhez ezáltal összeköttetést biztosít a receptorok és a Shank fehérje között.

2.1.3. Homer Fehérje

A Homer állványfehérje a háromtagú Homer fehérjecsalád első tagja, a posztszinaptikus denzitás (PSD) egyik legfontosabb komponense. A Homer az úgy nevezett metabotróp glutamáterg receptorokkal és a PSD számos egyéb elemeivel is interakcióba tud lépni, köztük a Shank fehérjékkel. A Homer fehérje érdekessége az, hogy hosszabb izoformája homo-tetramereket képez, ezért a fent említett interakciós partnereket össze tudja kapcsolni egymással. Rövidebb izoformája azonban csak monomer lehet, így a Homer partnerfehérjei közötti kapcsolatot bontja. A két izoforma expressziója gyorsan megváltozik bizonyos hatásokra, alvás közben például rövid izoform mennyisége megnő, a hosszúé viszont lecsökken. A fehérje ilyen módon kulcsszerepet játszik a szinaptikus plaszticitás működésében, annak szabályozásában valamint számos neurológiai folyamat és betegség kialakulásában. [7]

2.1.4. Shank3 Fehérje és Pontmutációi

A Shank3 szintén kulcsfontosságú a PSD működésének szabályozásában. A fehérje többféle globuláris doménnel rendelkezik (SH3, PDZ, SAM) ugyanakkor van egy rendkívül hosszú, rendezetlen, prolin-gazdag régiója is, amelyről a szakirodalomban elenyésző mennyiségű információ található. Pedig ezen a régión nagyszámú kötőmotívum található különböző fehérjék számára. A Homer fehérje is itt kötődik az úgynevezett Homer kötőmotívumhoz (HBM) melynek PPPXXF a konszenzus szekvenciája. Újabb kutatási eredmények azt indikálják, hogy a glutamáterg szinapszisok működésének zavara hozzájárul a skizofrénia és az autizmus kialakulásához. [8] [9] Ezeket a zavarokat a receptorokhoz kapcsolódó állványfehérjék mutációkói is okozhatják, például pontmutációk, amelyek egyetlen bázispár cseréjét jelentik a DNS szekvenciában. [10] A Shank fehérjék számos mutációját azonosították ASD-s betegek genetikai elemzése során. [11] [10] Ebben a tekintetben a Shank3-nak kiemelkedő szerepe lehet a három Shank paralóg között (Shank1 -2 és -3), mivel gyakrabban mutálódik, és az autista betegeknél kognitív zavarokkal társul. [10]

Számos állatkísérlet született az ASD-vel kapcsolatos Shank mutációk funkcionális következményeinek feltárására. [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] [19] [20] Ezek többsége a Shank3 funkcióvesztéses (LOF) vagy csonkoló mutációira korlátozódott, annak ellenére, hogy jelentős számú misszensz mutációt is találtak ASD-s betegekben (4.2 ábra - A rész). [10] Mivel a misszensz-mutációk csak jól meghatározható változást okoznak a fehérje szerkezetében vagy dinamikájában, lényegesen alkalmasabbak annak a mechanizmusnak a megértésére, amellyel a fehérje hozzájárul a betegséghez, mint a LOF-mutációk.

A Shank3 misszensz mutációival kapcsolatban még mindig alacsony számú tanulmány született, bár ezek mindegyike jelentős előrelépéshez vezetett a Shank3 bizonyos funkcióinak megértésében. [21] [22] A legtöbb misszensz Shank mutáció funkcionális hatása és az ASD-ben betöltött szerepe azonban még mindig nem tisztázott. A Shank fehérje mutációi is számos neurológiai rendellenességgel társulnak. A fehérje szekvenciáját és autizmussal társítható pontmutációit a 4.2 ábrán láthatjuk. Az ábrán megfigyelhető, hogy a misszensz pontmutációk halmozódnak a Homer kötőhely közelében. Ez a megfigyelés adta dolgozatom alapötletét: a HBM közelében található pontmutációk in vitro kísérletes vizsgálata Homer-Shank interakció mérésével.

3. fejezet

Célkitűzés

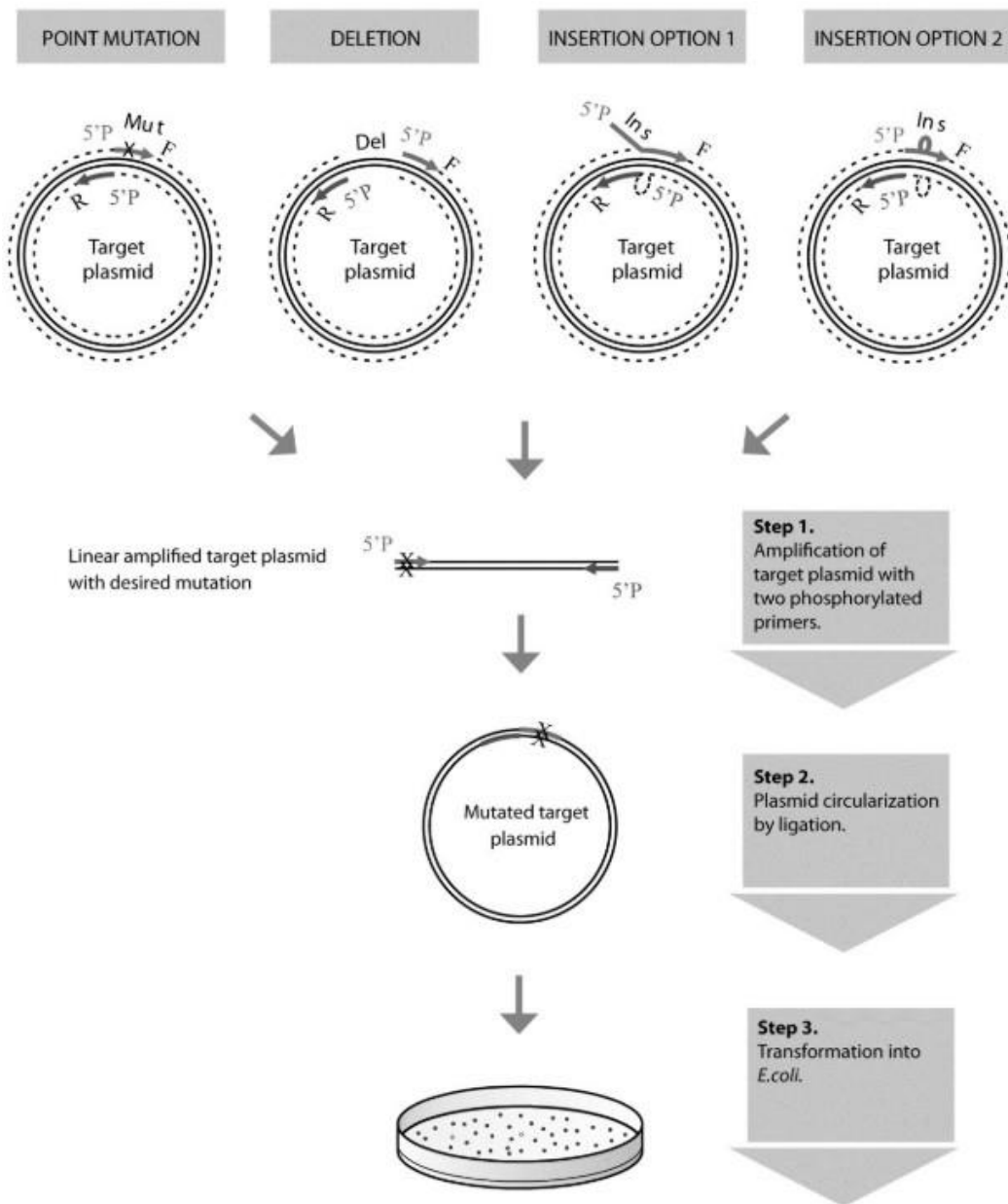
A jelen kutatás célja a SHANK3 fehérje rendezetlen régiójában, a Homer kötő motívum közelében található misszensz pontmutációk in vitro kísérletes és bioinformatikai vizsgálata. A Homer és Shank3 fehérje vadtypusú és mutációs változatait biotechnológiai úton állítottuk elő, majd interakciójukat BLItz mérésekkel vizsgáltuk.

4. fejezet

Anyagok és Módszerek

4.1. In Vitro Mutagenesis

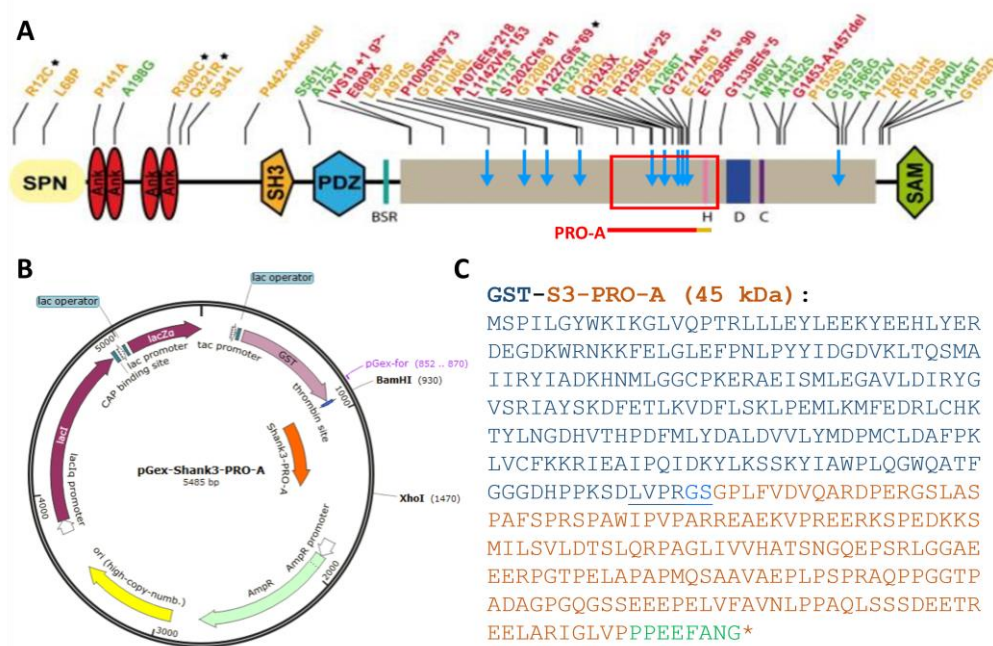
A Shank-Homer interakció vizsgálatához már rendelkezésemre álltak vad típusú, rekombináns fehérje konstrukciók. Az én feladatom a Shank3-at kódoló expressziós plazmid módosítása volt, mely által a kívánt mutánsokat lehet létrehozni. A vad típusú Shank3 vektorba az egyes mutációkat PCR mutagenézissel vittem be. Az SDM ("Site Directed Mutagenesis" = "Helyspecifikus Mutagenesis") egy olyan in vitro eljárás, amely egyedi tervezésű oligonukleotid primereket használ a kívánt mutáció átvitelére egy kettős szálú DNS-plazmidba. A folyamat ábrát, amely ezen lépéseket összefoglalja a 4.1 ábra mutatja. [23] Az egyes lépéseket (primer tervezés, PNK kezelés, PCR, ligálás stb.) a további alfejezetekben részletezem.



4.1. ábra. Folyamatábra a plazmid mutagenézisének folyamatáról. Munkám során pont-mutációkat vittünk be a plazmid szekvenciájába, melyhez a primer tervezés sémája az ábra felső sorának első rajzán látható 1. lépés: A célplazmid amplifikálása két foszforilált primer segítségével., 2. lépés: A plazmid köralakúvá zárása ligálás révén., 3. lépés: Transzformálás E. coli-ba. [23]

4.2. Expressziós Plazmid és Primertervezés

A 4.2 ábrán látható a pGex-Shank3-PRO-A plazmid térképe, amely 5485 bázis-pár hosszú. A plazmid tartalmazza a lac promotert, valamint a GST-t (glutathion S-transzferáz) egy trombin hasítási oldallal. A Shank3-PRO-A szekvencia egy BamHI és egy XhoI restrikciós hely között helyezkedik el, míg a pGex-for primer helye a BamHI helyhez közel található. A plazmid továbbá tartalmaz egy nagy kópiaszámú replikációs origót és egy ampicillin rezisztencia (AmpR) gént is a szelekcióhoz.



4.2. ábra. A: Teljes Shank3 fehérje, piros kerettel, hogy hol helyezkedik el a PRO-A konstrukció. A 'H' betű a Homer kötőhely. B: Gex-Shank3-PRO-A plazmid térképe, Shank3 narancssárgával jelölve. C: Fehérjeszekvencia, ami expresszálódik a plazmidról, zölddel jelölve a Homer kötő helyét. Shank3-PRO-A (45 kDa).

Először áttekintettük a szakirodalomban leírt pontmutációkat, ahol az adott mutációk aminosavak szintjén vannak meghatározva, és nem a DNS szekvencia alapján. Az aminosavakat különböző kodonok kódolják, melyek a genetikai információ átadásáért felelősek. A kodonok három nukleotidból álló szekvenciák, melyek egyértelműen meghatározzák az adott aminosavat a fehérje szekvenciájában. A laboratóriumunkban *E. coli* baktériumokat használunk fehérjeexpresszióhoz. Ezek a baktériumok képesek felvenni olyan plazmidokat – kör alakú DNS-molekulákat, amelyek függetlenül replikálódnak a kromoszómális DNS-től –, amelyek olyan genetikai elemeket tartalmaznak, amelyek segítik a

kívánt DNS kifejeződését. Az adott baktériumra jellemző kodonpreferenciát vettük figyelembe a fehérjét kódoló szintetikus DNS szekvencia, és a pontmutácik tervezésekor. Ez azért fontos, mert az adott organizmus kodon preferenciája határozza meg, hogy melyik kodonokat milyen gyakorisággal alkalmazza a fehérjék kódolásához. Miután az összes pontmutációt megtaláltuk, beazonosítottuk, és a szükséges bázispárok cseréjét megterveztük, tovább léptünk a primer párok tervezéséhez. A tervezési folyamatot a NEBase Changer alkalmazás segítségével kezdtük el. [24] A primereket úgy terveztük meg, hogy 5' végeik "összefeküdjenek", a 3' végeik pedig "kifelé" mutassanak, így a teljes plazmid hiánytalanul amplifikálható velük. A kívánt mutáció pedig az egyik primer közepén helyezkedik el (4.1 ábra).

Az Integrated DNA Technologies cég által kifejlesztett Tm calculator szoftver segítségével további analízist végeztünk a primer szekvenciákhoz, beleértve a hairpin, self-dimer és hetero-dimer hajlam predikcióját. [25] A hairpin értékek azt jelzik, hogy a primer molekula képes-e önmagával hurokra záródni, ami a hatékony hibridizációt és az amplifikáció hatékonyságát befolyásolhatja. A self-dimer és hetero-dimer értékek azokat a lehetséges kölcsönhatásokat jelzik, amelyek a primer molekulák között létrejöhetnek, ami befolyásolhatja a PCR reakció specifitását és hibridizációs hatékonyságát.

Azoknál a primer pároknál, ahol a predikciók erősebb dimer hajlamot mutattak, manuálisan módosítottuk a primerek 3' végének pozícióját úgy, hogy az általunk fontosnak tartott szekvencia, tehát a mutációt bevívó inszert, változatlan maradjon. Így ugyanazt a terméket amplifikálhattuk, csak hatékonyabban, mivel a nem releváns szekvenciariészek között minimalizáltuk a dimerképződést és a hajtústruktúrák kialakulását. Ezen lépések ismétlésével jelentősen csökkentettük a primerek dimerképző hajlamát.

4.3. Polinukleotid-Kináz (PNK) Kezelés

A mutagenézis sikeréhez elengedhetetlen, hogy a plazmidról készült lineáris PCR termékeket (amelyek már tartalmazzák a primerek révén a kívánt mutációt) ligáz enzim segítségével újra kör alakúvá, vagyis cirkulárisá tudjuk alakítani. Ez azért szükséges, mert a plazmid csak így képes hatékonyan replikálódni a baktériumsejtben, és ezáltal a mutáció expressziója is megvalósulhat. A ligálási folyamat sikeréhez azonban elengedhetetlen, hogy a PCR termék – vagyis a PCR primerek – foszforilált legyen, mivel a ligáz enzim csak foszforilált végeken tudja lezárni a DNS-t. Mivel a primerek eredetileg nem voltak foszforilálva, ezért szükség volt arra, hogy a PCR előtt foszfátcsoporttal ellássuk őket PNK kezeléssel. A primer párok PNK foszforilálása során a PNK enzim segítségével

foszfátcsoportokat adtunk hozzá a primer molekulák 5' végéhez. A reakcióhoz szükséges anyagokat, a megfelelő mennyiségekkel a 4.1 táblázat mutatja. A protokoll szerint először 37°C-on inkubáljuk a reakciót 30 percig majd 75°C-on inaktíváljuk a PNK enzimet.

Komponensek	1x
10x PNK puffer	1 µl
ATP (10mM)	1 µl
H ₂ O	5.5 µl
PNK enzim	0.5 µl
F + R primerek (5-5µM)	2 µl

4.1. táblázat. PNK reakció komponensek a megfelelő mennyiségekkel. Az „1x” jelölés azt jelenti, hogy az adott komponens a reakcióhoz szükséges standard, egyszeres koncentrációban van jelen.

4.4. PCR Reakció

A következő fázis a polimeráz láncreakció (PCR) megtervezése volt. A PCR egy olyan eljárás, amelynek során egy specifikus DNS-szekvenciát többszörösére amplifikálunk. A reakció során kulcsfontosságú lépés a megfelelő kapcsolódási hőmérséklet kiszámítása, amely lehetővé teszi a primer párok specifikus hibridizációját a DNS templáttal. A kapcsolódási hőmérséklet kiszámítását a Thermo Fisher által kifejlesztett T_m calculator alkalmazás segítségével végeztük el. [26] Kiszámoltuk a PCR reakcióhoz szükséges különböző komponensek mennyiségeit amelyet az 4.2 táblázat mutat. A PCR-hez az előzőleg PNK kezelt primereket használtam.

Komponensek	1x
dNTP	0.5 µl
5x puffer	5 µl
Plazmid	0.2 µl
H ₂ O	14 µl
Phusion Plus DNS polimeráz enzim	0.25 µl
F + R (foszforilált) primerek	5 µl

4.2. táblázat. PCR reakció komponensek a megfelelő mennyiségekkel. Az „1x” jelölés azt jelenti, hogy az adott komponens a reakcióhoz szükséges standard, egyszeres koncentrációban van jelen.

A PCR-nél a touchdown módszert alkalmaztuk, amely lényege az, hogy az anellálási hőmérsékletet ciklusonként csökkentjük, míg el nem érjük az optimális anellálási hőmérsékletet. Erre azért volt szükség, mert a különböző megtervezett primerek olvadáspontjai eltértek egymástól. A touchdown módszer alkalmazása lehetővé tette a specifikus amplifikáció optimalizálását azáltal, hogy a primerkötődés hőmérsékletét fokozatosan csökkenttük, így mindegyik primer optimális hőmérsékleten tudott kötődni a templát DNS-hez. A PCR reakciók protokollját a 4.3 (touch down) táblázat mutatja.

Lépések	Hőfok	Idő	Ciklusok száma
Inicializáció	98°C	1 min	1
Denaturáció	98°C	10 sec	10
Kapcsolódás	70°C (-0.5°C/ciklus)	10 sec	
Meghosszabbítás	72°C	15-30 sec/kb	
Denaturáció	98°C	10 sec	25
Kapcsolódás	68°C	10 sec	
Meghosszabbítás	72°C	15-30 sec/kb	
Végső meghosszabbítás	72°C	5 min	1
	4°C	tartás	tartás

4.3. táblázat. PCR reakció Touch down módszerrel

4.5. Gélelektroforézis

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a PCR reakció a megfelelő mennyiségű és minőségű terméket eredményezte, gélelektroforézist végeztünk el. 5 µl terméket, 1 µl 10x Fast Digest Green puffert és 300x SybrGreen-t használtunk. A Fast Digest Green puffer nemcsak optimalizálja a minták futását a gélen, hanem kék és sárga nyomjelző festékeket tartalmaz, ami segít vizuálisan nyomon követni a minta helyzetét az elektroforézis során.

4.6. Ligálás

A következő lépés a PCR termék cirkularizációja, amelyet ligálással érünk el. A lineáris, amplifikált PCR termék DNS-t a DNS ligáz enzim kovalensen összekapcsolja, így létrejön a cirkuláris, mutált célplazmid. Ez a lépés kritikus a mutagenézis hatékonyság szempontjából, mivel a plazmid csak cirkuláris formában tud fennmaradni a gazdasejtben.

Komponensek	1x
10x T4 puffer	1 µl
ATP (10 mM)	0.5 µl
H ₂ O	6 µl
50% PEG 4000	1 µl
T4 ligáz enzim	0.5 µl
PCR termék	1 µl

4.4. táblázat. Ligálás komponensek a megfelelő mennyiségekkel. Az „1x” jelölés azt jelenti, hogy az adott komponens a reakcióhoz szükséges standard, egyszeres koncentrációban van jelen.

4.7. Transzformálás

Az utolsó lépésben a ligált, mutált plazmidot *E. coli* sejtekbe transzformáljuk. A transzformáció során 50 µl kompetens baktériumhoz adtunk 5 µl-t a ligálási reakció termékéből, majd a baktériumokat egy rövid, 42 °C-os hősok kezelésnek tettük ki. Ennek hatására a sejtmembrán fluidabbá válik, így a baktériumok fel tudják venni a rekombináns plazmidot. Ezt követően egy 20-30 perces inkubálásra van szükség, amely lehetővé teszi a rezisztenciát kódoló gén expresszióját, de ez még nem a növekedés időszaka. Azok a baktériumsejtek, amelyek sikeresen felvették a plazmidot, rezisztenssé válnak az ampicillinnel szemben, ezért ampicillines lemezre szélesztve képesek telepet képezni. A használt plazmid nemcsak a kívánt fehérje génjeit, hanem az ampicillin rezisztencia gént is tartalmazza.

A továbbiakban a rezisztens telepekből izoláltunk plazmid DNS klónokat, amelyeket mindegyikét külön-külön megvizsgáltunk szekvenálással, hogy hordozzák-e a kívánt mutációt.

4.8. Plazmid DNS Izolálás

A plazmid izolálásához a Thermo Fisher GeneJET Plasmid Miniprep Kit-jét használtuk. [27] A plazmid DNS tisztítási eljárás során először reszuszpendáltam a pelletált sejteket reszuszpenziós oldatban, majd lízis oldattal kezeltem a sejteket, hogy a DNS felszabaduljon. A keverést követően neutralizáló oldatot adtam hozzá, amely segített a pH visszaállításában, és a sejtörmelék kicsapódásában, amit centrifugálással eltávolítottam. A felülúszót GeneJET spin oszlopba áthelyezve további centrifugálással és mosási lépésekkel biztosítottam a plazmid DNS tisztaságát. Végül az elúciós puffert alkalmazva eluáltam a plazmid DNS-t, amit -20°C-on tároltam.

4.9. Sanger Szekvenálás

Az izolált plazmidok klónjait a Eurofins Genomics vállalat szekvenálta meg. A plazmidokat ehhez 51-100 ng/μl koncentrációra és 20 μl térfogatúra hígítottuk. A szekvenálást pGex forward szekvenáló primerrel végezték, melyről a fehérje N terminálisához fuzionált GST-tag irányából szekvenálható az inzert. A kapott szekvenciák illesztését és elemzését a BioEdit szoftver segítségével végeztem el.

4.10. Rekombináns Fehérje Izolálásának Lépései

Az első lépésben lemérjük a pelletek tömegét és egy lízis puffer oldattal (pH: 7.4, 50 mM NaPi, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.05% Tween 20, 500 mM GuHCl, 0.5x Protease, Késhegynyi Lysozyme) 10%-os szuszpenziót készítünk belőle. Ezt követően 4 percig szonikáljuk a mintákat 25% pulzálással. Egy olyan technika, melynél ultrahangos hullámok használatával (magas frekvenciájú hanghullámok) biológiai mintákat lehet homogenizálni, továbbá sejteket vagy szöveteket feltárni. A sejtörmelékek eltávolítása érdekében a mintát centrifugáljuk. A centrifugálás 4°C-on történik, 20 percig, 11,000 fordulat/perc sebességgel. Ezt követően a centrifugálás után a felülúszót begyűjtjük és egy fecskendőszűrővel leszűrjük és ezekkel fogunk tovább dolgozni.

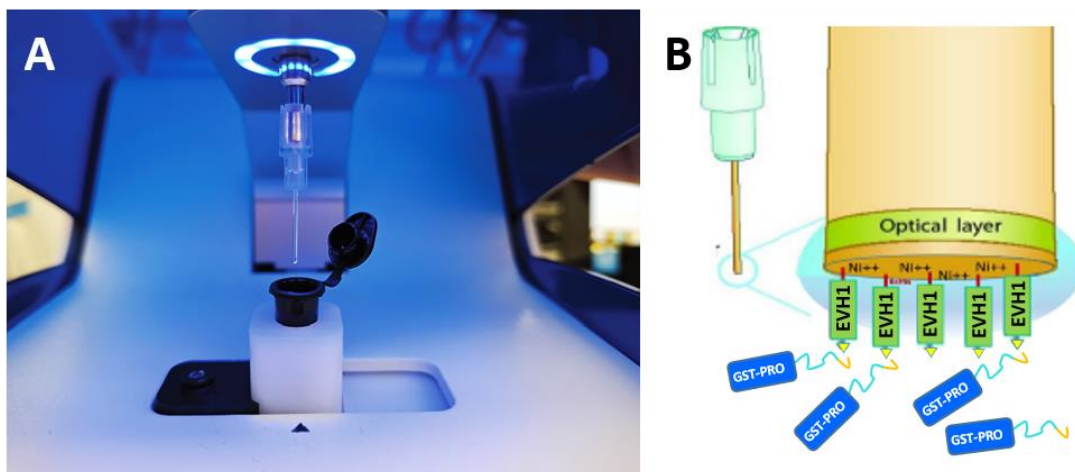
Az oszlopos tisztítás során 1.5 ml binding puffert (pH: 7.4, 50 mM NaPi, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.05% Tween 20, 500 mM GuHCl) alkalmaztunk a GST oszlopok ekvibrálásához. Ezután 150 μl-enként 7 perces szünetekkel visszük fel rájuk a korábban begyűjtött felülúszó mintákat. Mosási lépésként 0.5 ml lízis oldatot, majd 0.5 ml binding oldatot viszünk fel az oszlopokra. Ezután az oszlopokat 2 ml NaPi pufferrel

renaturáljuk majd további 150 µl elúciós puffer oldatot viszünk fel. A renaturációs lépés után az elúciós lépés következik, ahol 150 µl elúciós puffer adagokat (pH: 6.5, 0.0674 g Glutathione, 50 mM NaPi, 150 mM NaCl) használunk, több lépésben, mindegyik lépés 10 percig tartott és ezeket a frakciókat gyűjtjük be. Ahhoz, hogy megbizonyosodjunk róla, hogy van fehérje az oszlopból kifolyó mintákban Bradford reagenst használtunk. A Bradford reagens fehérjék koncentrációjának mérésére szolgál, mivel a benne lévő Coomassie Brilliant Blue G-250 festék fehérjékhez kötődve vörösesbarnából kéké válik. A kék szín intenzitása arányos a fehérjemennyiséggel. Végül 1 ml 70%-os EtOH oldattal és további 1 ml binding pufferrel takarítjuk le az oszlopokat, amelyeket 20%-os EtOH oldatban tároljuk.

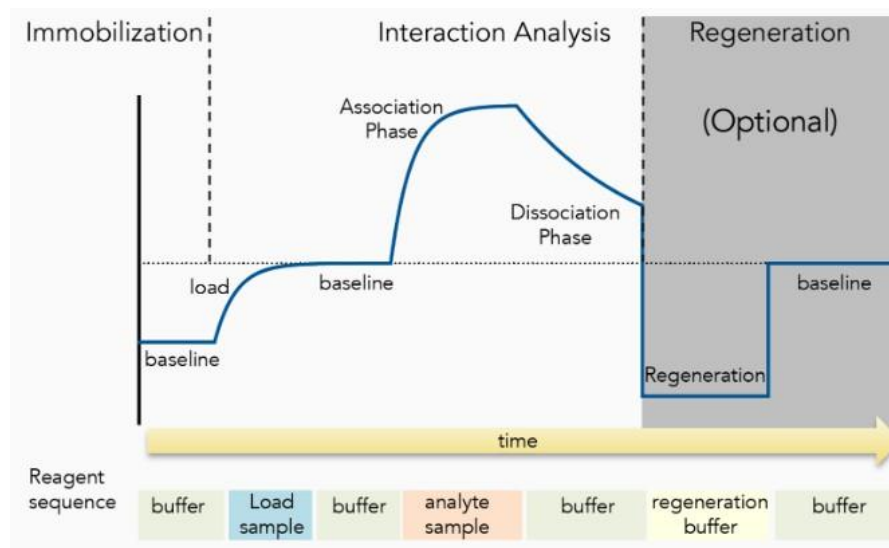
4.11. Biolayer Interferometria (BLItz)

A bioréteg-interferometria (Bio-Layer Interferometry - BLI) egy optikai technika a makromolekuláris kölcsönhatások mérésére egy bioszenzor hegyének felületéről visszaverődő fehér fény interferencia mintázatának elemzésével. A BLI-kísérleteket a molekuláris kölcsönhatások kinetikájának és affinitásának meghatározására használják. A kísérlet során egy csali molekulát immobilizálnak egy bioszenzor felületéhez. A csali az esetünkben a Homer fehérje EVH1 doménje volt (Homer 118), amelyet egy N-terminális 6xHIS-taggal állítottunk elő. A 6xHIS-tag révén a csali fehérjénk hozzákötődik a bioszenzor felületén található nikkel ionokhoz. A csali fehérje interakciós partnereit (Shank3 mutáns konstrukciók) GST fúziós tag-gel termeltük meg, ezért közvetlenül nem kötődhetnek fel a bioszenzor felületre, hanem csak a csali molekulán keresztül, indirekt módon. A bioszenzor hegyéhez kötött molekulák számának változása, vagyis a bioréteg vastagságának változása, eltolódást okoz az interferencia mintázatban, amit valós időben detektál a készülék, ezt a 4.3 képen láthatjuk.

A BLI mérés során a szenzort különböző oldatokba/mintákba merítjük és így kapjuk meg a az egyes fázisait a BLI mérésnek. A BLI szenzorgramot a 4.4 ábra mutatja. [28] Az első fázis az alapvonal felvétele kinetikai pufferrel (buffer). A második lépésben a „csalit” – vagyis a Homer fehérjét – tartalmazó eppendorf-csőbe helyezzük az érzékelőt (load sample). Ezt követően ismét a kinetikai puffert alkalmazzuk a második alapvonal felvételéhez (buffer). A negyedik lépés, hogy a detektáló kart a kívánt fehérjét tartalmazó „préda” eppendorf csőbe tesszük (analyte sample), ezt hívjuk asszociációs fázisnak, ekkor jön létre az interakció a csali és a préda között. Utolsó lépésként következik a disszociációs lépés amelyben ismét kinetikai puffert használunk (buffer).



4.3. ábra. A: BLItz eszköz a hozzacsatlakoztatott szenzorral és mintatartó csővel. B: A mérés sémája. A szenzor felületéhez az EVH1 domén rögzítve ("csali") és a "préda" a GST taggel ellátott Prolin gazdag fehérje.



4.4. ábra. BLItz mérés fázisai a protokoll szerint [28]

A mérés során 18 db szenzort használtunk, amelyeket a kísérlet előtt elő kell készíteni a következőképpen: Először kinetikai pufferben (50 mM foszfát puffer, 150 mM NaCl pH 7.4, 20mM Glutathione, 0,4% BSA, 0,05% Tween-20, 0,02% NaN₃) 10 percig kell hidratálni őket. Ez után 5 másodpercig a regeneráló bufferbe tenni majd 5 másodpercig a kinetikai bufferbe helyezni és ezt 3-szor megismételni. Utolsó lépésként 1 percig NiCl (10 mM NiCl₂) oldatban áztattam, ezzel a megtisztított szenzorokat újra nikkeleztem.

A 4.5 táblázatban láthatók a fehérje minták NanoDrop készülékkel mért moláris koncentrációi és hígítási sémájuk a BLI méréshez, valamint a fehérjékhez tartozó megfelelő Nanodroppal mért abszorbancia.

Minta	A280	mg/ml	μM	V_{minta}	$V_{\text{elu puffer}}$	$V_{20x \text{ add}}$	$V_{\text{össz}}$	$\mu\text{M final}$
1 Elu	1,03	1,00	22,2	108	177	15	300	8,0
2 Elu	1,18	1,14	25,4	94	191	15	300	8,0
4 Elu	0,91	0,88	19,6	122	163	15	300	8,0
5 Elu	1,12	1,09	24,2	99	186	15	300	8,0
6 Elu	1,17	1,13	25,2	95	190	15	300	8,0
7 Elu	0,87	0,84	18,8	128	157	15	300	8,0
8 Elu	0,39	0,38	8,4	285	0	15	300	8,0
9 Elu	0,70	0,68	15,1	159	126	15	300	8,0
10 Elu	0,55	0,53	11,9	202	83	15	300	8,0
11 Elu	0,68	0,66	14,7	163	122	15	300	8,0
Wt Elu	0,88	0,85	19,0	126	159	15	300	8,0

4.5. táblázat. A préda fehérjék NanoDrop mérési eredményei és hígítási sémájuk a BLI méréshez. A végső térfogat minden mintánál 300 μl , és ahol a táblázatban V... jelzés szerepel (V_{minta} , $V_{\text{elu puffer}}$, $V_{20x \text{ add}}$, $V_{\text{össz}}$), ott az érték μl -ben értendő. A 20x azt jelenti, hogy 20-szoros koncentrációjú addíciós puffert készítettem, amelyet később könnyen kihígíthatok a kísérleteim során.

4.12. Szekvencia Konzerváltóságának Vizsgálata

A BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) segítségével fehérjeszekvenciák hasonlíthatók össze más ismert szekvenciákkal az NCBI gén- és fehérjeadatbázisban, így meghatározható, hogy egy adott régió mennyire konzervált különböző fajokban vagy fehérjecsaládokban. Ez az elemzés segít azonosítani a funkcionálisan fontos részeket, például a kötőhelyeket, amelyek szerepet játszanak a fehérje működésében. [29] [30]

4.13. Rendezetlenség Predikciók

Az IUPred2A egy olyan alkalmazás, amely segít megtalálni a fehérjék rendezetlen régióit, azokat a részeket, amelyek nem alakítanak ki stabil másodlagos szerkezetet. Az IUPred2A pontozza a fehérje minden egyes aminosavát 0 és 1 között, jelezve annak valószínűségét, hogy az adott rész rendezetlen-e. Ezen kívül képes figyelembe venni bizonyos környezeti tényezőket, mint például a redox állapot vagy más fehérjékhez való kötődés, ami befolyásolhatja a rendezetlenséget. [31] [32] [33]

4.14. Lineáris Motívum Predikciók

Az Eukaryotic Linear Motif (ELM) adatbázis rövid fehérje-szekvenciákat, vagyis lineáris motívumokat (SLiM-eket) tartalmaz, amelyek fontos szerepet töltenek be a fehérje-fehérje kölcsönhatásokban és a sejt szabályozásban. Az ELM predikciós eszköze lehetővé teszi a fehérjeszekvenciák elemzését potenciális motívumok jelenlétére. Ezáltal megvizsgálható, hogy a mutációkat tartalmazó szakaszon a Homer kötőhelyen kívül milyen más kötő motívumok találhatók, és ezekre esik-e pontmutáció. [34] [35]

4.15. Aggregáció Predikciók

Fehérje-aggregáció akkor fordul elő, amikor a fehérjék összetapadnak, és nem stabil struktúrákat alkotnak, ami különböző betegségek, például Alzheimer- és Parkinson-kór kialakulásához vezethet. Ebben a folyamatban mutált vagy helytelenül hajtogatott fehérjék halmozódnak fel, amelyek összegyűlve aggregátumokat képeznek. Az AGGRESCAN egy online szoftver, amely képes előrejelezni a fehérjeszekvenciák aggregációra hajlamos szakaszait. [36] [37] [38]

5. fejezet

Eredmények és Megvitatásuk

5.1. Kiindulási Szekvencia

A kísérlethez használt Shank3 konstrukció a fehérje 1140-1316 szakaszát tartalmazza. Ezen a szakaszon belül az alábbiakban kiemeltem a vad típus szekvencián a vizsgálni kívánt pontmutációk helyét:

GPLFVDVQARDPERGSLASPAFSPRSPAWIPVP **A** RREA EKVPREERKSPE **D**
KKSMILSVLDTSLQRPA **G** LIVVHATSNGQEPSRLGGAE **E** **R** PGT **P** ELAPAP
MQSA AVAEPLP **S** **P** **R** AQPPGGT **P** AD **A** GPGQGSSE **E** EPELVFAVNLPPAQL
SSSDEETREELARIGLVPP **P** EEFANG

- **Piros** - nem készült el
- **Kék** - feltételezhetően patogén

A kérdéses mutációk adatait a 5.1 táblázatban foglaltam össze. A táblázatban az egyes leíró közleményeket is feltüntettem.

Mutáció	Számozás	Betegség	Index	Referencia
A1173T	A34T	ASD	1	[10]
D1190N	D51N	SCZ	2	[10]
G1208D	G69D	ASD	3	[10]
R1231H	R92H	ASD	4	[10]
P1235Q	P96Q	ASD	5	[10]
S1253C	S114C	ASD	6	[10]
R1255Q	R116Q	SCZ	7	[39]
P1263L	P124L	ASD	8	[10]
A1266T	A127T	ASD	9	[10]
E1275D	E136D	ASD	10	[10]
P1310L	P171L	HBM	11	[40]

5.1. táblázat. Elkészített mutációk a megfelelő színekkel jelölve. Számozás: a mutációk pozíciója az általunk használt konstrukción. ASD: Autizmus Spektrum betegség. SCZ: Skizofrénia. HBM: Homer kötőmotívum.

5.2. A Megtervezett Primerek

Bár a a NEBase Changer szoftver nagy segítség volt a tervezésben, néhány primerpár esetében az oligók újratervzésére volt szükség az erős dimerképződési hajlamuk miatt. Ezekben az esetekben a megoldást az jelentette, ha a mutáció helyére nem a forward, hanem a revers primert pozícionáltuk. A megtervezett primerek szekvenciáit és adatait az (5.2 táblázat) tartalmazza.

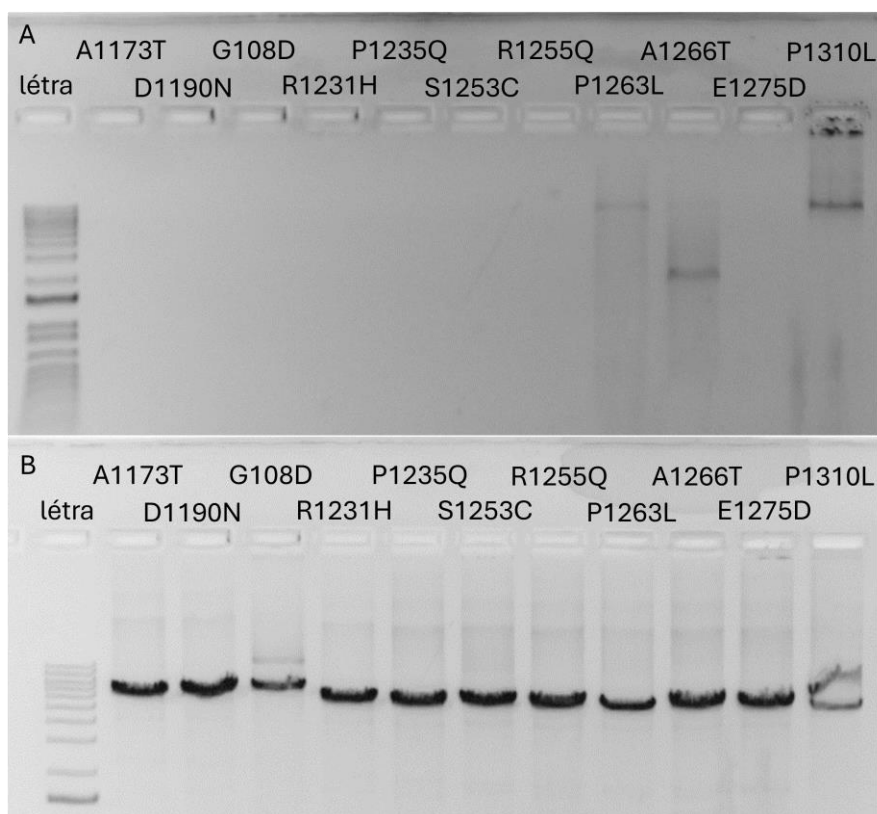
Név	Szekvencia	Tm (°C)	Ta (°C)
Shank3 A1173T_f	GCGAAGCGGAAAAAGTCC	60,8	60,8
Shank3 A1173T_r	GACGtg ^t CGGAACGGGA	62,8	60,8
Shank3 D1190N_f	CCGGAG ^a acAAGAAGTCCA	60,6	60,6
Shank3 D1190N_r	CGATTTCGCTTCTTCCCG	60,6	60,6
Shank3 G1208D_f	ACGCCCCGCTg ^a tCTGATTGT	68,2	65,2
Shank3 G1208D_r	TGCAGGCTCGTGTCCAGAA	65,4	65,4
Shank3 R1231H_f	AGAGGAAGAA ^a cCCTGGCACTC	65,8	65,3
Shank3 R1231H_r	GCACCACCTAAACGCGACG	65,3	65,3
Shank3 P1235Q_f	CCCTGGCACT ^c a ^g GA ^a CTCGCAC	70,8	67,1
Shank3 P1235Q_r	CGTTCTTCCTCTGCACCACCTAAAC	67,1	67,1
Shank3 S1253C_f	AGCCACCGGGAGGCACTC	68	68
Shank3 S1253C_r	GTGCCCCGTGG ^a cAGGCAAC	68,8	68
Shank3 R1255Q_f	CTTCTCC ^a c ^a gGCACAGCCAC	67,6	67,1
Shank3 R1255Q_r	GCAACGGCTCCGCTACAGC	67,6	67,1
Shank3 P1263L_f	GGGAGGCACT ^c t ^c GCCGATG	68,5	67,3
Shank3 P1263L_r	GGTGGCTGTGCCCCGTGG	68,5	67,3
Shank3 A1266T_f	TCCCGCCGAT ^a actGGTCCAGG	68,8	68,5
Shank3 A1266T_r	GTGCCTCCCGGTGGCTGT	68,5	68,5
Shank3 E1275D_f	CTCTAGCGAG ^a gatGAACCGGAGT	66	66
Shank3 E1275D_r	CCTTGGCCTGGACCAGCA	66	66
Shank3 P1310L_f	GGTACCGCC ^a c ^t gGAAGAGTTTCG	65,8	64
Shank3 P1310L_r	AGGCCAATACGCGCCAGTT	64	64

5.2. táblázat. Megtervezett primer szekvenciák és adataik. Az elmutált kodont kisbetűvel, az elmutált nukleotidot piros betűszínnel jelöltem. Tm: a primer becsült olvadáspontja. Ta: a PCR során alkalmazott anellálási hőmérséklet.

5.3. Mutagenesis PCR

Az 1. zsebben a "létrát" láthatjuk, egy olyan referencia anyagot, amely segít meghatározni a vizsgált minták méretét. A többi zsebbe töltöttük a mintákat. Ahogyan azt láthatjuk az első alkalommal (5.1 -A) sikertelen volt az eljárás, hiszen a zsebekben nem látszódnak PCR termékek.

A PCR reakciókat újra elvégeztük, azonban most újrahígított plazmidot használtunk DNS templátként. Az eredetivel valószínűleg az volt a baj, hogy a hosszú tárolás miatt degradálódhatott. Ez után ismét elvégeztük a gélelektroforézist, melynek az eredményét a 5.1 - B ábrán láthatjuk. A PCR termékek mindegyik mintáról megfelelő mennyiségben képződtek, más aspecifikus termékek nélkül, tehát a reakció megfelelően működött.



5.1. ábra. Mutagenesis PCR termékek agaróz gélelektroforézis eredménye. A: Első, sikertelen kísérlet. A PCR reakciókban nem, vagy csak kis mennyiségű termék keletkezett, melyek mérete sem volt megfelelő. B: Második kísérlet frissen hígított plazmid templáttal. A PCR termékek mennyisége nagy, méretük a várakozásoknak megfelelő, aspecifikus termékek elenyésző mennyiségben képződtek.

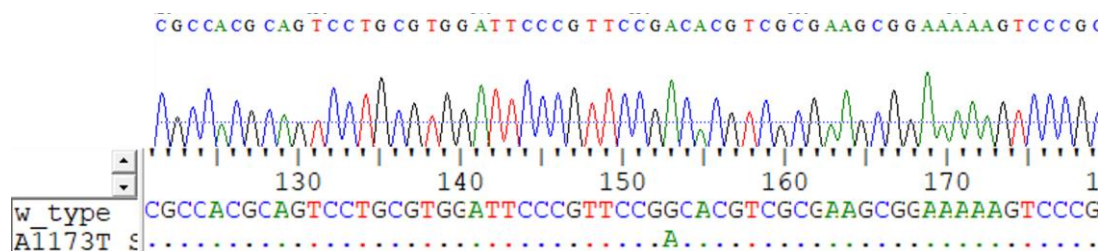
5.4. Szekvenálási Eredmények

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk a kívánt mutációk sikeres inzertálásáról, Sanger-szekvenálással ellenőriztük a plazmidklónokat. A Sanger-szekvenálás egy olyan módszer, amely a DNS-szekvencia meghatározására szolgál a nukleotidok láncterminációs szintézisének elvén alapulva. Ez a technika fluoreszcens dideoxinukleotidokat (ddNTP-eket) használ, amelyek beépüléskor megszakítják a DNS-lánc elongációját, így lehetővé téve a szekvencia precíz meghatározását kapilláris elektroforézissel. Fontos megjegyezni, hogy ezt a lépést nem mi hajtottuk végre, hanem a Eurofins Genomics cégtől rendeltük meg, biztosítva ezzel a szakszerű és pontos kivitelezését.

A pontmutációk közül a 3. minta (G1208D) többszöri ismételten után sem sikerült megfelelően. A többi mutáció esetében az alábbi klónoknál sikerült a kívánt mutációkat létrehozni (a betűk az ismételések számát jelölik): 1a , 2a , 4b, 5a, 6b, 7b, 8a, 9a, 10f, 11a.

5.5. Sikeres Mutagenézis

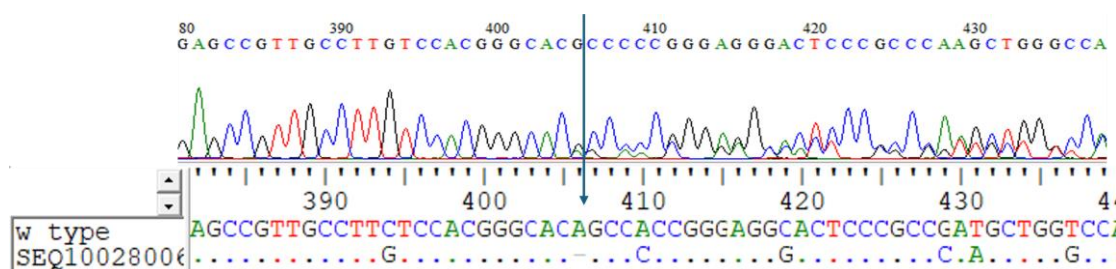
Alább láthatjuk az első mutáns szekvenálási eredményét, amely tartalmazza a mutáció környékének szekvenogramját, illetve alatta a kapott szekvencia illesztését a vad típusú referenciához. A "w_type" a vad típusú szekvenciát jelenti, amelyet referenciaként használtunk. Az eredmények kiértékeléséhez a BioEdit szoftvert használtuk, amely lehetővé teszi a szekvenciák összehasonlítását és az eltérések azonosítását. Az ábrán a pontok az azonos bázispárokat jelzik, míg a program eltérések esetén a megfelelő bázispárt jeleníti meg (5.2 ábra).



5.2. ábra. A1173T minta Sanger szekvenálás eredménye a szekvenciával - A klón szekvenciája hibátlan, és tartalmazza a kívánt mutációt.

5.6. A Hibás Plazmid Klónok Szekvencia Elemzése

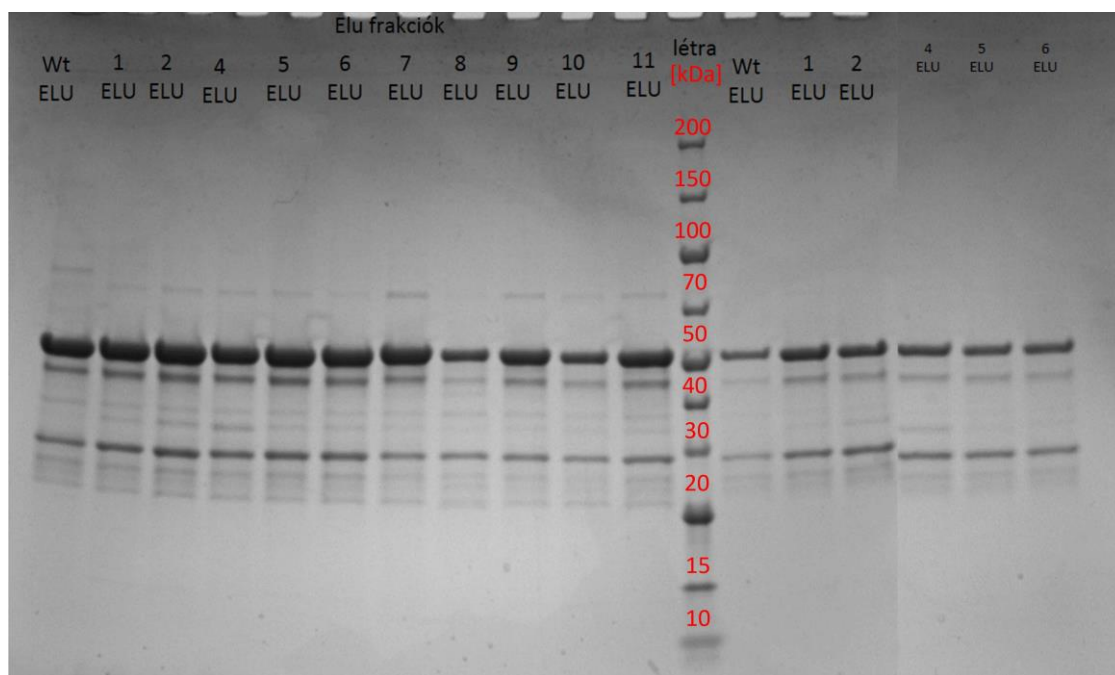
A következő mintánál a szekvencia eredménye alapján úgy tűnik, hogy a megfelelő bázispárt sikeresen lecseréltük (5.3 ábra, 394-es C helyén G van a plazmidban). Azonban a kromatogramon megjelenő dupla csúcsok a 406-os pozíciótól kezdődően arra utalnak, hogy probléma merült fel. Ez lehet szekvenálási hiba, de valószínűbb, hogy a transzformáció után megjelent telepek nem lettek megfelelően izolálva, mivel túl sűrűn helyezkedtek el. Ennek következtében az elemzés során két különböző DNS is megjelenik, egy hibátlan, és egy olyan is, amelybe nem kívánt delécio vagy szubsztitúció került, mégpedig pontosan a F és R primerek 5' végeinek találkozási pontjánál, vagyis a PCR termék végénél. Hasonló szekvencia elemzésekkel a többi mutáns első klónjait mind megvizsgáltuk. Végeredményben a 11 pontmutációból hat esetben az első vizsgált klón hibátlanak bizonyult, a többi esetben általában a PCR terméken nem kívánt deléciókat találtunk, úgyhogy ezeknél további klón vagy klónok ellenőrzésére volt szükség. Az esetek 45%-ában tehát hibás, hiányos PCR termék cirkularizálódott. Ezt a hibát valószínűleg egy hosszabb végső elongációval lehet majd mérsékelni a PCR reakciók során, illetve az elongációs idők kis mértékű növelése is megfontolandó. A nemkívánt deleciók erehetnek a PCR primerekből is, amennyiben a szintézisük során hiányos oligók is keletkezhetnek. Ez a hiba drágább tidztított primerek alkalmazásával küszöbölhető ki.



5.3. ábra. S1253C minta Sanger szekvenálás eredménye a szekvenciával - ez a klón hibás lett, a kívánt szekvencia mellett egy nemkívánatos deléció tartalmazó DNS is jelen van a plazmid mintában. A nyíl a F és R primerek 5' végeinek pozícióját mutatja.

5.7. Fehérje Affinitás Kromatográfia Eredménye

A 5.4 képen egy PAGE-gél látható, ahol a legjelentősebb (legerősebb) sáv a rekombináns fehérjénk, amelyet vizsgáltunk. Ez a jól kivehető fehérjesáv mutatja az általunk célzott fehérjét, amely az oszlopos tisztítási lépések után került a gélre, jelezve a sikeres tisztítást. 18 kDa-nál nem látunk sávot, tehát nincsen lehasadva róla a GST-tag. A legvastagabb sáv 50kDa-nál van, ami megfelel a várakozásainknak, hiszen mi 45 kDa körüli eredményre számítottunk. Az 5 kDa-os eltérés belefér a PAGE pontatlanságába. Van halványan egy sávunk 45 kDa-nál és 29 kDa-nál, amelyek valószínűleg az 50 kDa-os fehérje proteolitikus degradációjából származhat. Ez a fajta fragmentáció nem szokatlan rendezetlen fehérjéknél, mivel ezek jobban hozzáférhetőek a proteázok számára. A minta fragmentaltsága további problémákhoz vezet, a kisebb jelenlévő nem tudnak hozzákötni a Homerhez a BLI mérés közben. A mi esetünkben mindegyik minta ugyanolyan mértékben degradálódott, tehát nincs nagy különbség köztük, ugyanolyan arányban tartalmazzák a fehérje intakt formáját. A BLI mérések eredményét tehát a minták fragmentáltsága egyforma mértékben befolyásolja.



5.4. ábra. PAGE gélkép a vad típusú és a pontmutációt tartalmazó Shank3 fehérjékkel oszlopos tisztítás után

5.8. Szenkvencia Konzerváltságának Vizsgálata

AZ NCBI BLAST eredményét a 5.3 táblázat mutatja. A vizsgált szakasz (Shank3 PRO-A 1140-1316) erősen konzervált, mivel minden vizsgált fajban megtalálható, ami alátámasztja a kutatás célját, amely a mutációk szerepének vizsgálatára irányult. A szekvencia konzerváltsága arra utal, hogy az itt található aminosavak funkcionális jelentőséggel bírnak a fehérje működése szempontjából. Az erősen konzervált szekvenciák általában kulcsfontosságú szerepet játszanak a fehérjék szerkezetében és működésében, mivel a szekvencia megváltoztatása befolyásolhatja a fehérje funkcióját és az interakcióit más biomolekulákkal.

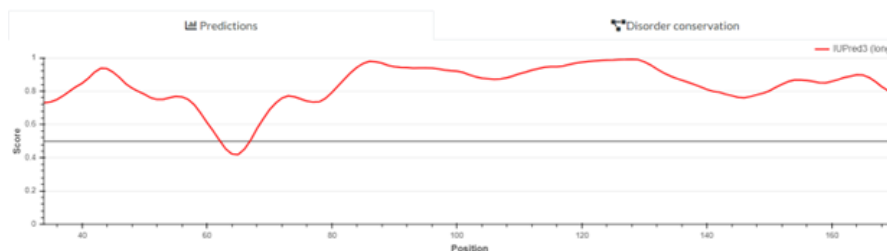
Mivel a szekvencia erősen konzervált, fontos, hogy az adott aminosavak az elvárt pozíciókban helyezkedjenek el. Amennyiben mutációk lépnek fel ezen a szakaszon, azok valószínűleg biológiai jelentőséggel bírnak, és potenciálisan hozzájárulhatnak a különböző kórképek kialakulásához, például az autizmus spektrumzavarra (ASD) és a skizofréniára (SCZ). A mutációk hatása a fehérje funkcionalitására közvetlenül befolyásolhatja az idegrendszeri fejlődést és a szinapszisok működését, ezért a kutatás során felfedezett mutációk részletesebb vizsgálata elengedhetetlen a kapcsolódó biológiai folyamatok megértéséhez.

Scientific name	Taxid	Identical percentage
Homo sapiens	9606	100.00%
Homo sapiens	9606	100.00%
Pan troglodytes	9598	100.00%
Homo sapiens	9606	100.00%
Pongo abelii	9601	100.00%
Pan troglodytes	9598	100.00%
Homo sapiens	9606	100.00%
Macaca nemestrina	9545	98.31%
Pongo pygmaeus	9600	100.00%
Pan troglodytes	9598	100.00%
Pan paniscus	9597	100.00%
Pan troglodytes	9598	100.00%
Pongo pygmaeus	9600	100.00%

5.3. táblázat. NCBI BLAST eredmények a SHANK3 megfelelő szakaszára

5.9. Rendezetlenség Predikciók

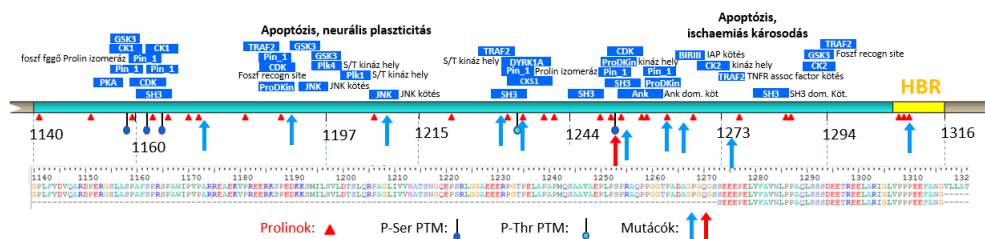
A fehérje vizsgálatból kiderült, hogy szerkezete nagyrészt rendezetlen, ami azt jelenti, hogy nincs stabil, jól meghatározott háromdimenziós formája. Az ilyen fehérjék alkalmazkodóképesek, így számos partnerrel képesek kölcsönhatásba lépni. Predikciós modellek alapján mindössze a 60-70-es aminosavak környékén mutatkozik némi hajlam strukturáltabb formációk kialakítására. Ennek eredményét a 5.5 ábra mutatja.



5.5. ábra. Rendezetlenség Predikciók

5.10. Lineáris Motívum Predikciók

A Shank3 szekvenciában végzett elemzés során azonosítottuk a lineáris motívumokat, ahol a tervezett mutációk megtalálhatóak. Ennek eredményét a 5.6 ábra mutatja. Az eredmény alapján elmondható, hogy több mutáció is lineáris kötőmotívumon található, így ezek a mutációk megváltoztathatják bizonyos fehérje partnerek affinitását az adott motívumhoz. Az S1253 szerin mutációja ezen felül még egy foszforilációs helyet is elront. A feltételezhetően elrontott kötőhelyekhez számos jól ismert jelátvivő fehérje kapcsolódik, melyek a neurális plaszticitásban és apoptózisban játszanak szerepet (GSK3, TRAF2, CDK2, CK2). Külön említést érdemel még az SH3 domén, amely a PSD számos fehérje komponensében megtalálható, sőt magának a Shank fehérjének is van SH3 doménje. Egy másik érdekes fehérjepartner a Pin1 nevű foszforiláció függő prolin izomeráz enzim, amely a prolinok cisz-transz izomerációja révén a fehérjeszakasz konformációját befolyásolja.



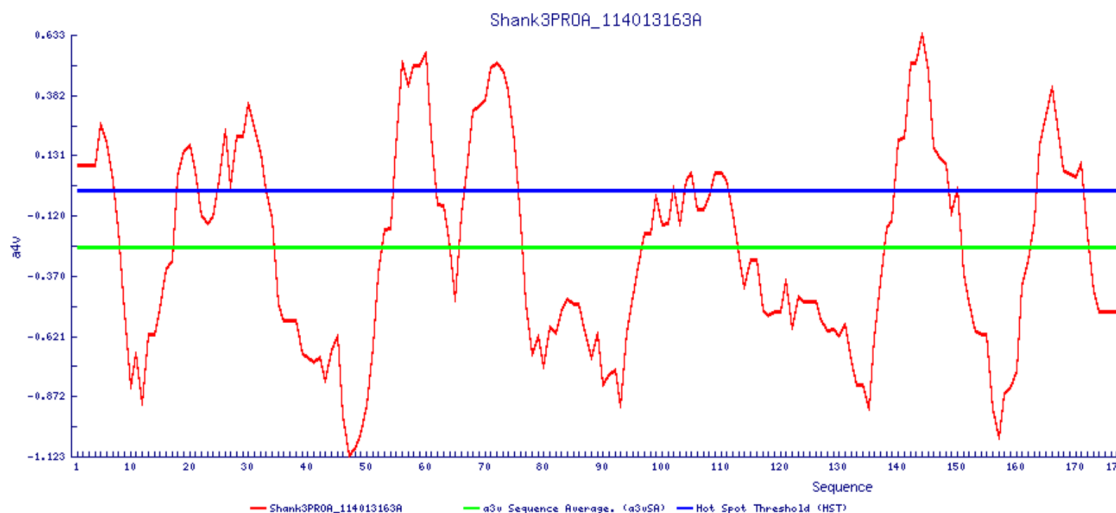
5.6. ábra. Shank3 lineáris motívum predikciók

Fehérje	Mutáció	Sorszám	Kötőmotívumok
Shank3	A1173T	1	-
Shank3	D1190N	2	MOD_CDK_SPxxK_3, MOD_GSK3_1, MOD_Plk_4, MOD_ProDKin_1, MOD_SUMO_rev_2
Shank3	R1231H	4	MOD_ProDKin_1, MOD_DYRK1A_RPxSP_1, LIG_WD40_WDR5_VDV_2, LIG_SH3_3, DOC_WW_Pin1_4
Shank3	P1235Q	5	DOC_CKS1_1, DOC_WW_Pin1_4, LIG_FHA_1, LIG_MYND_1, LIG_SH3_3, LIG_WD40_WDR5_VDV_2, MOD_DYRK1A_RPxSP_1, MOD_ProDKin_1
Shank3	S1253C	6	MOD_ProDKin_1, MOD_CDK_SPK_2, LIG_WD40_WDR5_VDV_2, LIG_SH3_CIN85_PxxPR_1
Shank3	R1255Q	7	DOC_ANK_TNKS_1, DOC_WW_Pin1_4, LIG_SH3_CIN85_PxxPR_1, LIG_WD40_WDR5_VDV_2, MOD_CDK_SPK_2, MOD_ProDKin_1
Shank3	P1263L	8	MOD_ProDKin_1, LIG_WD40_WDR5_VDV_2, LIG_FHA_2, DOC_WW_Pin1_4
Shank3	A1266T	9	LIG_BIR_III_2, LIG_FHA_2, LIG_WD40_WDR5_VDV_2
Shank3	E1275D	10	TRG_DiLeu_BaEn_1, MOD_CK2_1, LIG_WD40_WDR5_VDV_2
Shank3	P1310L	11	LIG_EVH1_2, LIG_SH3_3

5.4. táblázat. SHANK3 mutációk és kapcsolódó fehérjekötő motívumok

5.11. Aggregáció Predikciók

A vizsgálat során megvizsgáltuk az aggregációs hotspotokat a szekvencia mentén. Az alábbi pozíciókban (3-7; 55-61; 68-75; 140-146; 164-168) aggregációs hotspotokat találtunk, azonban ezeken a helyeken nem voltak mutációk. Ennek eredményét a 5.7 mutatja.



5.7. ábra. Aggregációs predikcióval megvizsgálva az aggregációs hotspotok

5.12. BLItz Mérés Eredmények

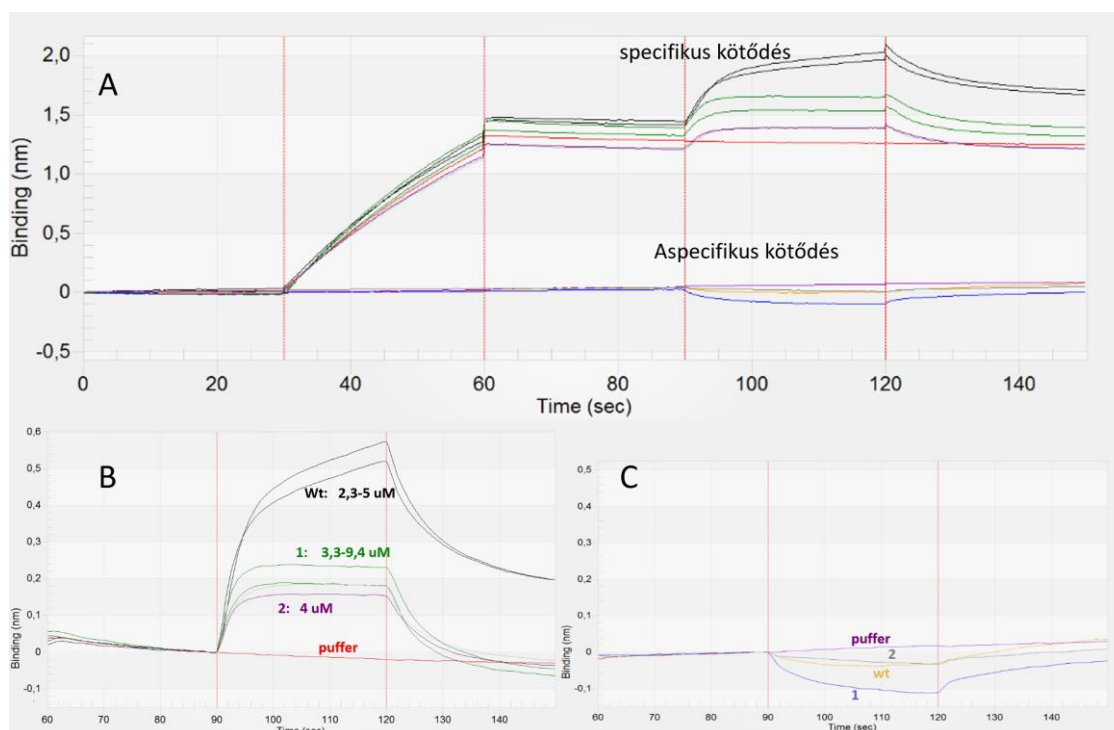
Az első mérés során megvizsgáltuk, hogy az általunk alkalmazott kinetikai pufferben aspecifikus kötődés létre tud-e jönni a préda Shank fehérjék és az érzékelő között, hiszen ez hamis eredményekhez vezetne a kiértékelésnél. Ehhez negatív kontroll méréseket végeztünk úgy, hogy a szokásos mérési protokolltól eltérve a "csali" Homer 118 fehérje helyett sima kinetikai pufferbe helyeztük az érzékelőt. Ha nincsen aspecifikus kötődés akkor a BLI szenzorgramon egy egyenes vonalat kell látnunk, hiszen nincsen jelen a fehérje amihez specifikusan kötődni tudna, ezért a bioréteg vastagsága sem változik. Ennek az eredményét a 5.8 ábra mutatja. Ahogyan láthatjuk a szenzoron a csali fehérje hiányában a bioréteg vastagságában csupán 0,1 nm-nél kisebb változást okozott a vad típusú PRO-A fehérje, ráadásul ez inkább csökkenésnek tűnik. A minimális csökkenést valószínűleg az asszociációs fázis és a két másik szakasz felvételéhez használt pufferek összetétele közötti eltérés okozhatta kötődése elhanyagolható rétegvastagodást okoz a szenzor felületén.

Munkám során több mérést hajtottunk végre. Az első kísérlet során megvizsgáltuk, hogy a korábban előállított Homer fehérje, amely eddig -80°C-on volt, megfelelően működik-e és a további kísérletekben tudjuk-e használni mint csali. Ezen felül a Shank3

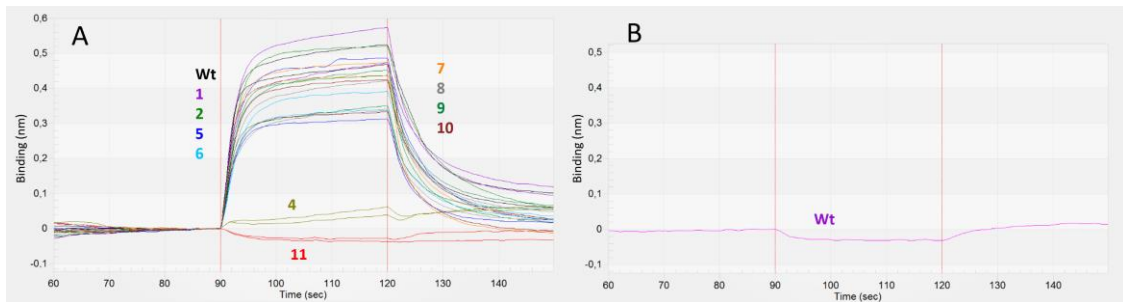
konstrukciók közvetlen, a bioszenzor felületével való aspecifikus kötődését is vizsgáltuk a csali Homer fehérje nélkül. Ehhez, mint prédát a vad típusú Shank3 és további 2 fajta mutánst használtunk (A1173T, D1190N). Az eredmények alapján a Homer megfelelően működik, így a továbbiakban ezzel dolgozunk tovább.

A 5.8 ábrán feltűnő, hogy a minták különböző erősséggel kötődtek. A kísérleti paraméterek ellenőrzése során kiderült, hogy ez egy sajnálatos hiba miatt lett így, vagyis egy műtermék okozta a különbségeket a mutánsok kötődése között. Az eredeti törzsoldatok fehérjekoncentrációi eltértek, de a kísérlethez egyforma koncentrációra kellett hígítani őket. A fehérjéket véletlenül vízben eluáltuk, majd kinetikai pufferrel hígítottuk. Mivel a mintákat különböző mértékben hígítottuk, a végén a pufferkoncentrációk is eltértek, ami befolyásolta az eredményeket.

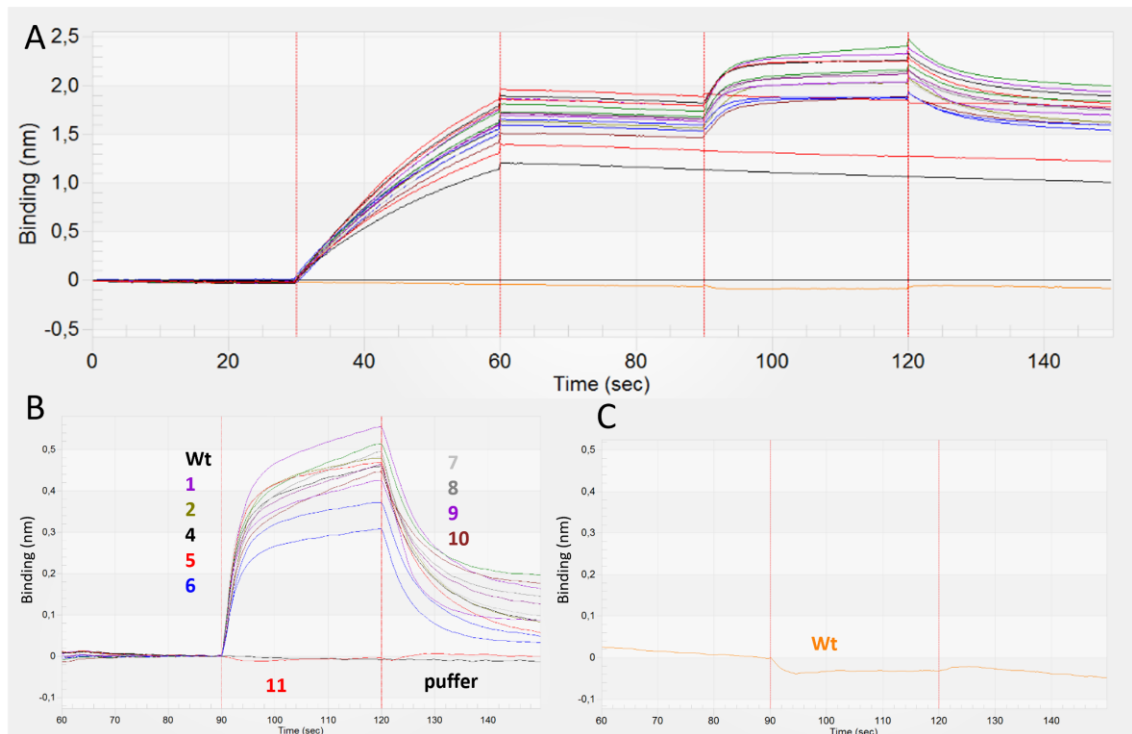
A következő mérésnél eredményként azt láttuk, hogy a 4. számú mutáció (R1231H) esetén a préda fehérje nem kötődik fel a BLItz szenzorra, amin Homer fehérje van. Ennek eredményét a 5.9 ábra mutatja. A mérés eredményeinek ellenőrzése érdekében a kísérletet megismételtük, hogy kizárjuk az esetleges mérési hibákat és biztosítsuk az eredmények megbízhatóságát. A kísérlet megismétlése során kiderült, hogy az második mérés 4. mintánál lévő érték eredménye fals negatív volt. Ennek eredménye a 5.10 ábrán látható.



5.8. ábra. BLItz specifikus és aspecifikus kötődés.



5.9. ábra. BLItz 2. mérés



5.10. ábra. BLItz 3. mérés

A három BLI mérésünk alapján összegzés képpen arra jutottunk, hogy az általunk vizsgált 9 db autizmus és skizofrénia asszociált mutációk egyike sem befolyásolja jelentős mértékben a Shank-Homer interakciót. Hozzá kell azonban tenni, hogy baktériumban előállított fehérjékkel dolgozva nincsen információnk arról, hogy ez emberi sejtben is így lenne, hiszen a baktériumban nincsenek poszttranszlációs módosulások, mint például foszforiláció. Eredményeink további korlátja az is, hogy nem a teljes hosszúságú fehérjékkel végeztük a mérést, így a Shank3 molekulán belüli kölcsönhatások, azaz a HBM hozzáférhetősége sem volt ideális. Mindezen korlátok ellenére valószínűnek tartjuk, hogy a vizsgált mutációk nem a Shank-Homer fehérje interakciójának befolyásolásán keresztül okozhatja a betegégeket. Elképzelhető, hogy más fehérje partnerek affinitása, ezáltal működése változik meg a mutációk miatt. Sőt, még azt sem zárhatjuk ki, hogy ezek a mutációk nem is patogének, tehát nem ezek okozzák a betegséget, amelyekkel társulnak

6. fejezet

Összefoglalás

6.1. Feladat

A TDK dolgozatom keretében azt vizsgáltam, hogy egyes pontmutációk befolyásolják-e a Shank3 és Homer közötti interakciót. Az irodalmi áttekintés során áttekintettem a Shank3 fehérjében megtalálható pontmutációkat, különös figyelmet szentelve a Homer fehérje kötő motívum hely környékére. A kísérletek során először megterveztem a klónozáshoz szükséges primereket, elvégeztem a Shank3 plazmid konstrukciók mutagenézisét, majd megtermeltem és affinitás kromatográfiával megtisztítottam a fehérjéket. A fehérjék kötődésének vizsgálatához Biolayer Interferometriát alkalmaztam, amely lehetővé tette a különböző mutánsok és a Homer közötti kötődési erősség mérését. Az eredmények kielemezéséhez különböző bioinformatikai programokat használtam.

6.2. Eredmények

Az elképzelésünk az volt, hogy mivel a Homer és a Shank3 mutációi is autizmushoz kapcsolódnak, ezért ezek a Shank3 mutációk a Homer interakcióban változást okozhatnak, és így hozzájárulhatnak az autizmus kialakulásához. Az in vitro kísérleteink során azonban nem figyeltünk meg jelentős változást a Homer interakcióban, így arra a következtetésre jutottunk, hogy ha a mutációk valóban okozati összefüggésben állnak az autizmussal, akkor nem a Homer interakciók révén, hanem valószínűleg más fehérjék és kötőpartnerek által jön létre a változás.

6.3. Jövőbeli tervek

Jövőbeli terveink között szerepel, hogy in vivo kísérleteket végezzünk, mivel in vitro környezetben nem tudtuk a mutációk patogenitását igazolni. Az in vivo kutatások lehetővé teszik számunkra, hogy az élő, emberi sejtes rendszerekben vizsgáljuk a fehérjék interakcióját és működését, amely sokkal közelebb áll a biológiai folyamatok valós működéséhez, mint az in vitro környezetben végzett tesztek.

Jelenleg a Homer1 fehérje volt az egyetlen, amit vizsgáltunk, de a jövőben az in vivo megközelítéssel több fehérjével való interakciót is tudunk egyszerre vizsgálni. Ezen fehérjék közötti interakciók jobb megértésével pontosabb képet nyerhetünk a posztszinaptikus denzitás működéséről és a Shank3 fehérje prolin gazdag régiójának szinaptikus plaszticitásában játszott szerepéről.

Irodalom

- [1] K. M. „Ultrastructure of Synapses in the Mammalian Brain“, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 206. old., 2012. doi: doi:10.1101/cshperspect.a005587.
- [2] E. Kim, „The postsynaptic density“, *Current Biology*, 19. évf., 17. sz., 723–R724., 2009. doi: DOI:10.1016/j.cub.2009.07.047.
- [3] M. Zeng, „Reconstituted Postsynaptic Density as a Molecular Platform for Understanding Synapse Formation and Plasticity“, *Cell*, 174. évf., 1172–1187. old., 2018. doi: doi:10.1016/j.cell.2018.06.047.
- [4] X. Chen, „Organization of the core structure of the postsynaptic density“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105. évf., 11. sz., 4453–4458. old., 2008. doi: doi:10.1073/pnas.0800897105.
- [5] A. A. „GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules“, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 82. évf., 187–194. old., 2019. doi: DOI: 10.1083/jcb.136.3.669.
- [6] E. Kim, „A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism?“, *The Journal of Cell Biology*, 136. évf., 3. sz., 669–678. old., 1997. doi: doi:10.1083/jcb.136.3.669.
- [7] Shiraishi-Yamaguchi, „The Homer family proteins“, *Genome Biology*, 8. évf., 2. sz., 206. old., 2007. doi: doi:10.1186/gb-2007-8-2-206..
- [8] A. de Sena Cortabitarte, „Investigation of SHANK3 in schizophrenia“, *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 174. évf., 4. sz., 390–398. old., 2017. doi: doi:10.1002/ajmg.b.32528.
- [9] J. Tu, „Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 Complexes by the Shank Family of Postsynaptic Density Proteins“, *Neuron*, 23. évf., 3. sz., 583–592. old., 1999. doi: doi:10.1016/s0896-6273(00)80810-7..
- [10] C. S. Leblond, „Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: A Gradient of Severity in Cognitive Impairments“, *PLoS Genetics*, 10. évf., 9. sz., 2014. doi: doi:10.1371/journal.pgen.1004580..
- [11] J. Gauthier, „Novel de novo SHANK3 mutation in autistic patients“, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 150B évf., 3. sz., 421–424. old., 2009. doi: doi: 10.1002/ajmg.b.30822.
- [12] Y. Mei, „Adult restoration of Shank3 expression rescues selective autistic-like phenotypes“, *Nature*, 530. évf., 481–484. old., 2016. doi: <https://doi.org/10.1038/nature16971>.
- [13] A. Bey, „Brain region-specific disruption of Shank3 in mice reveals a dissociation for cortical and striatal circuits in autism-related behaviors“, *Transl Psychiatry*, 8. évf., 94. sz., 2018. doi: <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0142-6>.
- [14] C. Balaan, „Juvenile Shank3b deficient mice present with behavioral phenotype relevant to autism spectrum disorder“, *Behav. Brain Res.*, 356. évf., 137–147. old., 2019. doi: doi:10.1016/j.bbr.2018.08.005.

- [15] F. C, „Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction“, *Nature*, 472. évf., 7344. sz., 437–442. old., 2011. doi: [doi : 10 . 1038 / nature09965](https://doi.org/10.1038/nature09965).
- [16] L. J, „Shank3-mutant mice lacking exon 9 show altered excitation/inhibition balance, enhanced rearing, and spatial memory deficit“, *Front Cell Neurosci.*, 9. évf., 94. sz., 2015. doi: [DOI:10.3389/fnecel.2015.00094](https://doi.org/10.3389/fnecel.2015.00094).
- [17] R. AR, „Shank3B mutant mice display pitch discrimination enhancements and learning deficits“, *Int J Dev Neurosci.*, 72. évf., 13–21. old., 2018. doi: [doi:10.1016/j.ijdevneu.2018.10.003](https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.10.003).
- [18] A. Y. Hung, „Articles, Development/Plasticity/Repair Smaller Dendritic Spines, Weaker Synaptic Transmission, but Enhanced Spatial Learning in Mice Lacking Shank1“, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, 28. évf., 7. sz., 1697–1708. old., 2008. doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3032-07.2008>.
- [19] H. Won, „Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function“, *Nature*, 486. évf., 261–265. old., 2012. doi: <https://doi.org/10.1038/nature11208>.
- [20] Y. Zhou, „Atypical behaviour and connectivity in SHANK3-mutant macaques“, *Nature*, 570. évf., 326–331. old., 2019. doi: [https : / / doi . org / 10 . 1038 / s41586-019-1278-0](https://doi.org/10.1038/s41586-019-1278-0).
- [21] W. L, „An autism-linked missense mutation in SHANK3 reveals the modularity of Shank3 function“, *Mol Psychiatry*, 25. évf., 10. sz., 2019. doi: [doi: 10 . 1038 / s41380-018-0324-x](https://doi.org/10.1038/s41380-018-0324-x).
- [22] H. Nia, „Functional Relevance of Missense Mutations Affecting the N-Terminal Part of Shank3 Found in Autistic Patients“, *Front. Mol. Neurosci.*, 11. évf., 268. old., 2018. doi: [doi:10.3389/fnmol.2018.00268](https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00268).
- [23] *Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit*, en. cím: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013377_Phusion_SiteDirected_Mutagenesis_UG.pdf.
- [24] *NEBaseChanger*, en. cím: <https://nebasechanger.neb.com/>.
- [25] *Tm Calculator*, en. cím: <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>.
- [26] *Tm Calculator*, en. cím: <https://www.thermofisher.com/hu/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>.
- [27] *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*, en. cím: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0502>.
- [28] *Biomolecular Interactions Analysis*, en. cím: <https://www.dksh.com/global-en/lab-solutions/home/research-analysis/lab/measurement-types/biomolecular-interactions-analysis>.
- [29] *NCBI BLAST*, en. cím: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome.
- [30] M. Johnson, „NCBI BLAST: a better web interface“, *Nucleic Acids Research*, 36. évf., 2008. doi: [DOI:10.1093/nar/gkn201](https://doi.org/10.1093/nar/gkn201).
- [31] *IUPred2*, en. cím: <https://iupred2a.elte.hu/>.
- [32] D. Z. Erdos G., „Analyzing Protein Disorder with IUPred2A“, *Current Protocols in Bioinformatics*, 70. évf., e99. sz., 2020. doi: [DOI:10.1002/cpbi.99](https://doi.org/10.1002/cpbi.99).
- [33] B. Mészáros, „IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding“, *Nucleic Acids Research*, 46. évf., 2018. doi: [doi:10.1093/nar/gky384](https://doi.org/10.1093/nar/gky384).

- [34] *Eukaryotic Linear Motif*, en. cím: <http://elm.eu.org/>.
- [35] M. Kumar, „ELM—the Eukaryotic Linear Motif resource—2024 update“, *Nucleic Acids Research*, 52. évf., 442–455. old., 2024. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1058>.
- [36] *Aggrescan*, en. cím: <http://bioinf.uab.es/aggrescan/>.
- [37] O. Conchillo-Solé, „AGGRESKAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides“, *BMC Bioinformatics*, 8. évf., 2007. doi: [doi:10.1186/1471-2105-8-65](https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-65).
- [38] *Protein Aggregation*, en. cím: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/protein-aggregation>.
- [39] de Sena Cortabitarte, „Investigation of SHANK3 in schizophrenia“, *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 174. évf., 4. sz., 390–398. old., 2017. doi: [doi:10.1002/ajmg.b.32528](https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32528)..
- [40] J. C. Tu, „Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 Complexes by the Shank Family of Postsynaptic Density Proteins“, *Neuron*, 23. évf., 3. sz., 583–592. old., 1999. doi: [DOI:10.1016/S0896-6273\(00\)80810-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80810-7).