



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

TDK dolgozat

**Pontmutációk kialakítása az N-ColE7
metallonukleázban és ezek hatása az aktivitásra**

KÉSZÍTETTE:

Schilli Gabriella Krisztina

III. Kémia BSc hallgató

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Gyurcsik Béla, egyetemi adjunktus

Németh Eszter, PhD hallgató

Szeged

2012

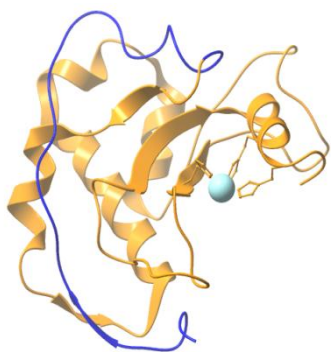
Tartalom

1. Bevezetés.....	3
2. Célkitűzés	4
3. Irodalmi összefoglaló	5
3.1. A nukleáz enzimekről általában	5
3.2. A cinkujj-motívum	6
3.3. Génterápia céljaira tervezett cinkujj-nukleázok.....	6
3.4. A ColE7 nukleáz előfordulása és felépítése.....	7
3.4.1. Az N-ColE7 szerkezete.....	8
3.4.2. HNH-motívum	9
3.4.3. Az N-ColE7 működési mechanizmusa	9
3.4.4. DNS kötés	10
3.4.5. A fémion szerepe az N-ColE7 szerkezetében és működésében	11
3.4.6. Allosztérikus szabályozás a fehérjékben	11
3.5. Előzmények kutatócsoportunk vizsgálatai alapján	12
3.5.1. Allosztérikus szabályozás kialakításának lehetősége az N-ColE7-ben	12
3.5.2. A pontmutációk tervezésének előzményei	14
4. Kísérleti módszerek	16
4.1. Agaróz gélelektroforézis	16
4.2. Poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)	17
4.3. Rekombináns DNS technológia	18
4.3.1. Polimeráz láncreakció (PCR).....	18
4.3.2. Hasítás.....	20
4.3.3. Ligálás.....	20
4.3.4. Transzformálás.....	20
4.4. UV-VIS spektrofotometria.....	21
4.5. A sejtek életképességének tanulmányozása	22
5. Eredmények	23
5.1. A mutációk helyeinek megtervezése.....	23
5.2. A mutáns fehérjék génjét tartalmazó plazmidok előállítása	25
5.3. A PCR optimalizálása	29
5.3.1. Hiány megjelenése	29
5.3.2. Polimeráz enzim által okozott véletlen mutációk vizsgálata	30
5.4. Előállított plazmidok.....	30

5.5.	Az alanin mutáns fehérjék vizsgálata.....	31
5.5.1.	Az N560D és R568G mutációk feltételezett hatása.....	31
5.5.2.	Az F489L és S535P mutációk feltételezett hatása.....	32
5.5.3.	A sejtek életképességének tanulmányozása.....	33
5.5.4.	A fehérje kifejeződésének ellenőrzése SDS-PAGE kísérlettel.....	34
5.5.5.	Az eredmények értékelése	37
6.	Összefoglalás	38
7.	Hivatkozások.....	40
8.	Köszönetnyilvánítás.....	42
9.	Függelék.....	43
9.1.	Előállított plazmidok.....	43
9.1.1.	A pGEX-6P-1 vektor sematikus ábrája	43
9.1.2.	N-ColE7 szekvenciája.....	44
9.1.3.	Az általunk előállított plazmidok bázis- és aminosav szekvenciája a hasítási helyek közötti részben	44
9.2.	Kísérleti módszerek.....	46
9.2.1.	PCR-hez használt primerek	46
9.2.2.	1. PCR: az átfedő szakaszok előállítása.....	46
9.2.3.	Gél-extrakció:	47
9.2.4.	2. PCR: részek összetapasztása.....	47
9.2.5.	A DNS kinyerése a reakcióelegyből	48
9.2.6.	Hasítás EcoRI és XhoI enzimekkel	48
9.2.7.	Ligálás:.....	49
9.2.8.	Transzformálás:	49
9.2.9.	Kolónia PCR.....	50
9.2.10.	Plazmidtisztítás	50
9.2.11.	PCR a plazmidokról szekvenáláshoz	50
9.2.12.	DNS-minták koncentrációjának meghatározása	51
9.2.13.	SDS-PAGE	51
9.2.14.	OD ₆₀₀ mérés	52
9.2.15.	Agaróz gél elektroforézis.....	52

1. Bevezetés

A genetikai betegségeket a gének hibás szekvenciája okozza. Ezeket a betegségeket úgy lehetne gyógyítani, hogy a hibát kijavítjuk. Mivel az ilyen hibákat a sejtek DNS-javító mechanizmusa nem ismeri fel, a hibás bázisszekvenciánál vagy annak közvetlen közelében elhasítva a DNS-t indukálhatjuk a javító folyamatokat. A természetes javítómechanizmus észleli ezt a sérülést, és megfelelő templát jelenlétében a sérüléssel együtt a betegséget okozó hibát is kijavítja. Több specifikus (DNS hasítására alkalmas) nukleázt ismerünk, azonban ezek száma még így is kevés ahhoz, hogy tetszőleges helyen hasítsuk a genomiális DNS-t. Ehhez olyan nukleázra van szükség, amelyben szabadon változtatható a tapadási rész specifikussága. Ilyen céllal állították elő a cinkujj-Fok-I nukleázokat, melyekről azonban kiderült, hogy citotoxikusak. Ennek feltehetőleg az az oka, hogy a sejtben a fehérje



1.1. ábra: Az N-ColE7 Röntgen-diffrakciós szerkezete. [8]

esetleges sérülésének következtében az már nem-specifikusan kötődhet a DNS-hez. Amennyiben az aktivitását a sérülés okozta változások ellenére sem veszíti el, a DNS-t több helyen is elhasíthatja, amivel a sejt halálát okozza. Kutatócsoportunk célja egy pozitív allosztérikus szabályozással rendelkező nukleáz létrehozása, amire a colicin E7 bakteriális toxin nukleáz doménje (N-ColE7) tűnt alkalmasnak (1.1. ábra). Ugyanis az N-ColE7 csak akkor rendelkezik nukleáz aktivitással, ha a szekvencia mindkét vége, azaz az N-, és a C-terminális részei egymáshoz képest megfelelően közel helyezkednek el. Egy ilyen fehérje N-, és C-terminális szakaszát megőrizve, közéjük a DNS-t specifikusan kötő cinkujj fehérjét beépítve, az új enzim csak a DNS megkötődése után rendelkezhet az aktivitáshoz szükséges konformációval. Egy ilyen újszerű cinkujj nukleáz létrehozása bonyolult folyamat. Pontosán kell tudni, hogy hová és hogyan építsük be a cinkujjakat ahhoz, hogy az új nukleáz aktív legyen a kívánt körülmények között. Mindenekelőtt fontos tudnunk, hogy a terminális részek megfelelő elhelyezkedését mely aminosavak kölcsönhatásai biztosítják. Ennek érdekében azt vizsgáltam, hogy az N-ColE7 N-terminális részén lévő aminosavak közül melyik lehet szükséges az aktivitás megtartásához.

2. Célkitűzés

Kutatócsoportunk célja egy a DNS-hez tetszőlegesen választott szekvenciánál specifikusan kötődő, pozitív allosztérikus kontrollal rendelkező nukleáz létrehozása. Ehhez a colicin E7 nem-specifikus metallonukleáz doménjét (N-ColE7) szeretnénk felhasználni cinkujj motívumokkal biztosítva a kívánt szekvenciához való kötődést.

Az N-ColE7 fehérje aktivitásához szükséges, hogy az N- és a C-terminális végei megfelelő közel helyezkedjenek el egymáshoz, és így a hasítási mechanizmushoz szükséges kölcsönhatások kialakulhassanak. Az N-terminális részen levő aminosavak nélkül az enzim elveszíti az aktivitását, ezért fontos megvizsgálni, hogy a cinkujjak beépítése során mely aminosavakat szükséges az eredeti szekvenciából megtartani, hogy a fehérje csak a kívánt körülmények között legyen aktív.

Munkám célja a fentiek alapján annak vizsgálata volt, hogy az N-terminális részen kiválasztott aminosavak közül, melyeknek van jelentős szerepe az aktivitás kialakításában, valamint, hogy ezen kölcsönhatások hiánya elég-e ahhoz, hogy az N-terminális oldallánc elhelyezkedése megváltozzon, és így az aktivitás megszűnjön. Ennek érdekében terveink között szerepelt:

- az N-ColE7 N-terminális részén azon aminosavak kiválasztása, melyek fontosak lehetnek a C-terminális katalitikus központtal kialakított kölcsönhatások szempontjából, majd ezek cseréje alaninra a fehérjét kódoló DNS megváltoztatása révén;
- a mutáns gének baktériumban történő sokszorosítása;
- a módosított DNS molekuláról kifejezett fehérjék túltermelése *E. Coli* baktériumban;
- a fehérjék sejtmérgező hatásának vizsgálata baktérium-szaporodási kísérletekben.

3. Irodalmi összefoglaló

3.1. A nukleáz enzimekről általában

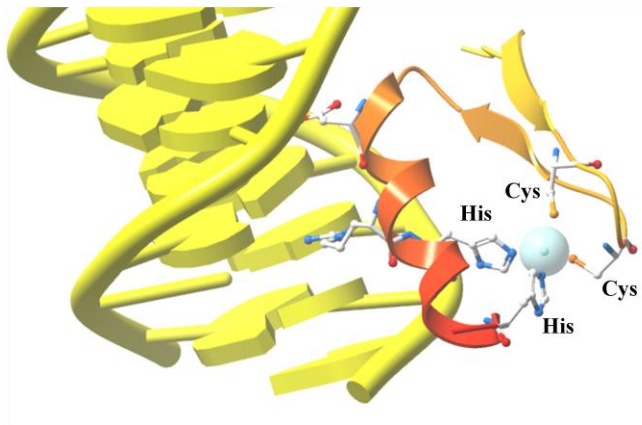
A nukleázok olyan enzimek, amelyek a DNS-ben és/vagy az RNS-ben a nukleotid egységek közötti foszfodiészter kötések hidrolitikus hasítását katalizálják. Az exonukleázok a terminális, míg az endonukleázok a láncközi kötések hidrolizálják. Ismerünk nem-specifikus és specifikus nukleázokat is. Utóbbiak csak adott DNS-szekvencia hasítására képesek, ilyenek pl. a restrikciós endonukleázok.

A nukleázok számos sejtfolyamatban vesznek részt, mint a DNS-javítás, replikáció, restrikció, rekombináció [1]. A katalízis mechanizmusa sokféle lehet, de a legtöbb esetben fémion szükséges hozzá. Leggyakrabban kétvegyértékű fémionok, pl. Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} vesznek részt. A fémion a következő feladatokat láthatja el:

- 1) aktiválhatja a vízmolekulát, amely így általános nukleofil bázisként a hasadó foszfát támadásáért felelős;
- 2) szerepet játszhat a szubsztrát megkötésében és annak elektrosztatikus aktiválásában;
- 3) Lewis savként stabilizálhatja az ötértékű negatívan töltött foszforán átmeneti állapotot;
- 4) általános savként a fémion által kötött vízmolekula pedig protonálhatja a távozó csoportot [2].

3.2. A cinkujj-motívum

A cinkujjak olyan fehérjemotívumok, melyek szerkezetét egy cinkion stabilizálja, és specifikus módon kötődnek a DNS-hez annak károsítása nélkül. Általános szekvenciájuk: (Tyr, Phe)-X-Cys-X₂₋₄-Cys-X₃-Phe-X₅-Leu-X₂-His-X₃₋₅-His. A fémion a két-két megőrzött cisztein és hisztidin oldallánchoz koordinálódik[3].



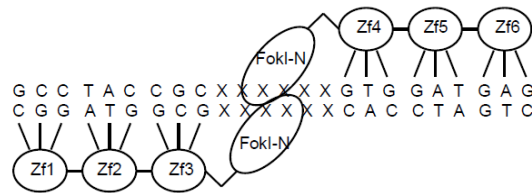
3.1. ábra. Egy cinkujj-motívum DNS molekulával kialakított komplexe. A specifikus DNS-kötést biztosító oldalláncok az α -hélixről irányulnak a DNS bázisai felé (PDB kód: 1MEY, [4]).

A 3.1. ábra mutatja, hogy egy cinkujj-motívum két β -redő részletét egy hurok köti össze egy α -hélix-szel. Ez utóbbi a DNS nagyárkában kötődhet meg specifikusan. Egy cinkujj-motívum általában három egymás utáni bázissal alakít ki specifikus kölcsönhatást. A DNS szekvenciát, amelyhez a fehérje kötődik, az α -hélix kezdetétől számított -1, 1, 2, 3, 5 és 6 helyzetben lévő hat aminosav határozza meg. Ezen aminosavak változtatásával, valamint a cinkujj-motívumok sorbakapcsolásával tetszőleges DNS szekvenciához specifikusan kötődő cinkujj-fehérje állítható elő.

3.3. Génterápia céljaira tervezett cinkujj-nukleázok

A cinkujj-nukleázok olyan kimér fehérjék, melyek egy nem-specifikusan hasító nukleáz, és általában három specifikusan kötődő cinkujj doménből állnak, a teljes fehérje specifikusan hasítja a DNS-t az általunk tervezett helyen, és így a sejt saját javítómechanizmusával érzékeli és megfelelő templát jelenlétében korrigálja a génhibát.

Erre a célra állították elő a FokI cinkujj nukleázokat. A FokI a természetben is előforduló nem-specifikus nukleáz doménnel rendelkező fehérje.

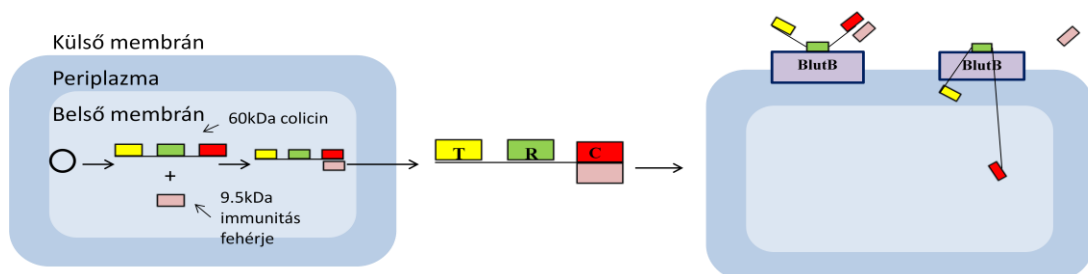


3.2. ábra. A DNS molekulához specifikusan kötődő cinkujjakkal összekapcsolt FokI nukleáz dimerként hasítja a DNS-t.

A 3.2. ábrán látható dimerként működő cinkujj nukleáz a DNS kettős szálát egyszerre hasítja el. Ez a mesterséges fehérje citotoxikusnak mutatkozott. Ennek az lehet az oka, hogy a sejtben a fehérje megsérül, aminek hatására nem-specifikus módon is megkötődhet a DNS-en. Amennyiben az aktivitását a sérülés okozta változások ellenére sem veszíti el, a DNS-t több helyen is elhasíthatja, amivel a sejt halálát okozza. Feltételezzük, hogy ennél biztonságosabb mesterséges nukleázt lehetne előállítani, ha a FokI helyett egy módosított colicin E7 nukleáz domén szerepelne. Diákköri munkám során ezért az N-ColE7-ben kialakítható allosztérikus szabályozást tanulmányoztam.

3.4. A ColE7 nukleáz előfordulása és felépítése

Az *Escherichia Coli* baktérium colicin fehérjéket termel az idegen baktériumsejtekkel szembeni védekezés céljából. E fehérjék membránkötő, membrán transzlokációs és citotoxikus doménekből állnak [5]. A különböző colicinek az idegen baktériumsejtbe jutva eltérő módon fejtik ki citotoxikus hatásukat. Egyes típusuk DNáz vagy RNáz funkcióval rendelkezik, mások ionofórok. A gazdasejtek a nukleáz doménhez specifikusan kötődő immunitásfehérjéket termelnek, annak érdekében, hogy megvédjék magukat a citotoxikus hatástól.

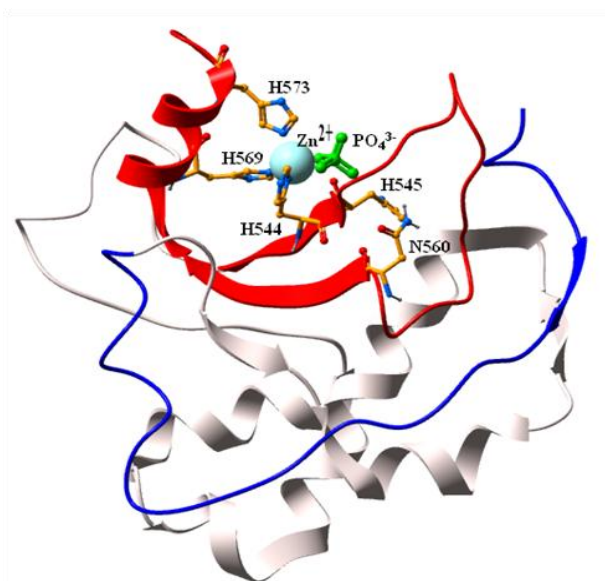


3.3. ábra. A colicin E7 működésének sematikus ábrája. Sárga szín a transzlokációs, zöld a receptorkötő, a piros a nukleáz domént jelöli [6].

A colicin E7 nem-specifikus DNáz és RNáz [7] aktivitással rendelkező fehérje. A gazdasejtből kijutva az idegen baktériumsejt külső membránján lévő BtuB-receptoron megkötődik és a transzlokációs domén segítségével a nukleáz domén (N-ColE7) bejut a sejtbe (3.4. ábra). Itt nem-specifikus módon elhasítja a kromoszómális DNS molekulát, elpusztítva az idegen sejtet. Ez a folyamat azért nem következik be a gazdasejtben, mert az a ColE7 mellett az Im7 nevű immunitásfehérjét is termeli, amely a colicin E7 nukleáz doménjének szubsztrátkötő részével alakít ki kölcsönhatást, megakadályozva a nukleáz DNS-hez történő kötődését [8].

3.4.1. Az N-ColE7 szerkezete

Az N-ColE7 egy $\beta\alpha$ -fémion-kötő motívumot tartalmaz, amely a DNS nem-specifikus hasításáért felelős. Aktív központban Zn^{2+} -ion található, amely három hisztidinhez (His544, His569 és His573) koordinálódik torzult tetraéderes szerkezetben. A negyedik, szabad koordinációs helyet betöltheti egy vízmolekula, egy foszfátion vagy a szubsztrát DNS hasadó foszfátja. Ez az aktív központ az N-ColE7 C-terminális részén helyezkedik el az utolsó 30 aminosav által alkotott ún. HNH-motívumban (3.4. ábra) [9].



446 - K R N K P G K A T G K G K P
V N N K W L N N A G K D L G S P
V P D R I A N K L R D K E F K S F
D D F R K K F W E E V S K D P E L
S K Q F S R N N N D R Met K V G K
A P K T R T Q D V S G K R T S F E
L H H E K P I S O N G G V Y D Met
D N I S V V T P K R H I D I H R G K
– 577

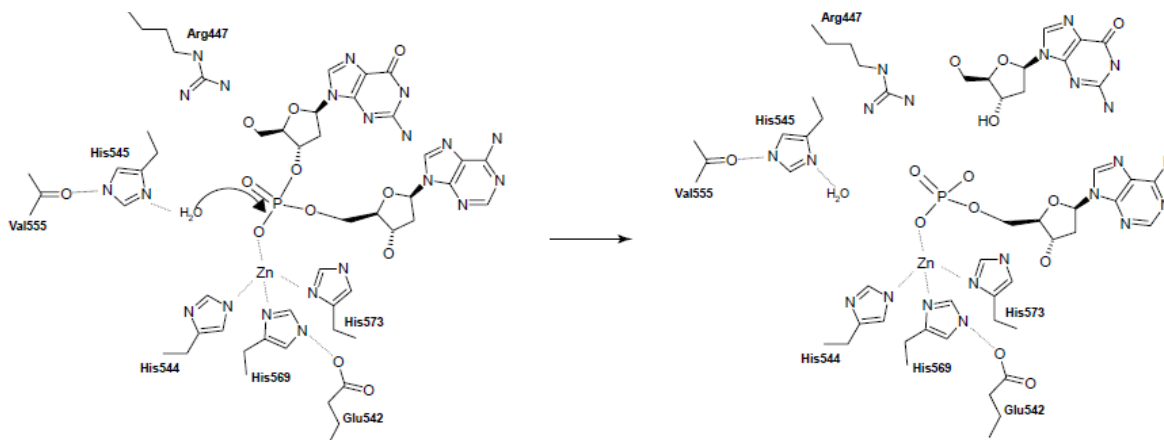
3.4. ábra: Az N-ColE7 szerkezete (PDB kód: 1M08, [8]) és aminosav-szekvenciája. Kék színnel az N-terminális, míg piros színnel a C-terminális szakaszt jelöltük. A világos kék gömb a cinkiont és a zöld szín a foszfátcsoportot jelöli. Az aminosav-szekvencia számozása megegyezik a ColE7 számozásával.

3.4.2. HNH-motívum

A colicinek nukleáz doménjei nagy szekvencia hasonlóságot mutatnak. A C-terminális részen egy EXHHX₁₄NX₈HX₃H konszenzus szekvenciát tartalmaznak [2], mely a benne lévő aminosavakról a HNH-motívum nevet kapta: a HNH motívumban mindig jelen van két megőrződött hisztidin és egy aszparagin [10]. A motívum két antiparalell β -redőzött lánc egy α -hélixhez kapcsolódik, a központjában egy kétértékű fémion található. Szerkezete nagyon hasonló a cinkujj motívumhoz, azonban a fémiont itt három hisztidin koordinálja. Emellett a HNH motívumban rövidebb az α hélix, hosszabb hurok köti össze a két β redőt és a cinkion negyedik liganduma nem a fehérje hanem egy vízmolekula vagy a szubsztrát [2].

3.4.3. Az N-ColeE7 működési mechanizmusa

Az N-ColeE7 molekula hidrolitikusan hasítja a DNS foszfodiészter kötéseit. A pontos reakciómechanizmus még nem tisztázott. Feltételezett mechanizmusát a 3.5. ábra szemlélteti [11].



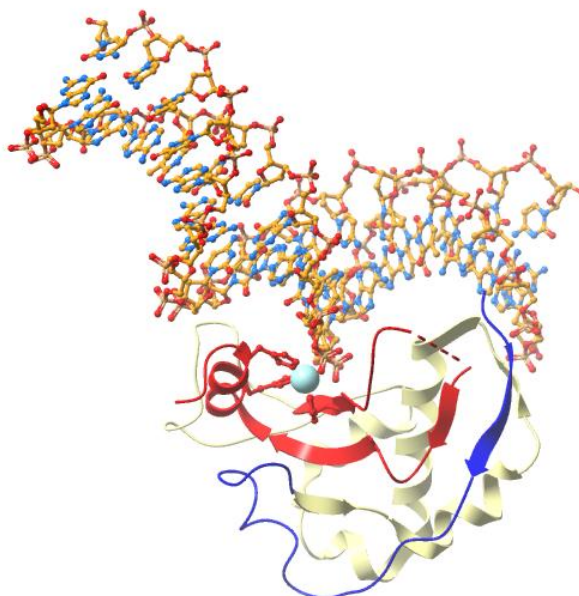
3.5. ábra Az N-ColeE7 feltételezett működési mechanizmusa [11]

Első lépésben az 545-ös hisztidin (H545) általános bázisként deprotonál egy vízmolekulát. Az így képződő hidroxidion nukleofil támadást indít a hasadó foszfátcsoporra. A cinkion megköti a hasadó foszfátcsoportot és stabilizálja a reakció átmeneti állapotát. A hidrolitikus reakciókban szükség van még egy általános savra, amely protont szolgáltat a távozó csoport 3'-oxigénjének. A Mg²⁺-tartalmú nukleázoknál ezt a

funkciót a hat koordinációs hellyel rendelkező fémionhoz kötődő vízmolekula látja el. Azonban ebben a fehérjében a cinkion tetraéderes koordinációs szférával rendelkezik: három hisztidin és a foszfátion koordinálódik hozzá. Több elmélet létezik arra vonatkozóan, hogy mi látja el az általános sav szerepét. A DNS megkötődése során a Zn^{2+} -ionnak kialakulhat egy ötödik koordinációs helye [2], ahová megkötődhet egy vízmolekula. Mások szerint HNH-motívum közelében megjelenő megőrződött 447-es arginin oldallánca tölti be ezt a szerepet [11].

3.4.4. DNS kötés

Az N-ColE7 nem-specifikus módon kötődik a DNS molekulához az α -hélix részek révén a nagyárokban, míg a HNH-motívum a DNS molekula kisárkába kerül (3.6. ábra), közrefogva a DNS egyik szálát [7]. A fehérje szerkezetét különböző hosszúságú DNS-hez való kötődés során vizsgálva kiderült, hogy a hidrolízishez minimum 8 bázispárra van szükség. A vizsgálatok során azt is megállapították, hogy az N-ColE7 képes RNS molekula hasítására is.



3.6.Ábra. Az N-ColE7 DNS molekulával kialakított komplexe (PDB kód: 2IVH, [12])

3.4.5. A fémion szerepe az N-ColE7 szerkezetében és működésében

Az N-ColE7 aktív központjában cinkion található, ami a szerkezet stabilitásáért [13] és a katalitikus hidrolíziséért [14] egyaránt felelős. Az aktivitás feltétele egy kétvegyértékű fémion jelenléte az aktív központban [14]: nemcsak cinkion, hanem pl. Ni^{2+} , Mn^{2+} és Co^{2+} , és alkáliföldfémionok is (pl. Ca^{2+} , [13]) elősegíthetik az aktivitást [7].

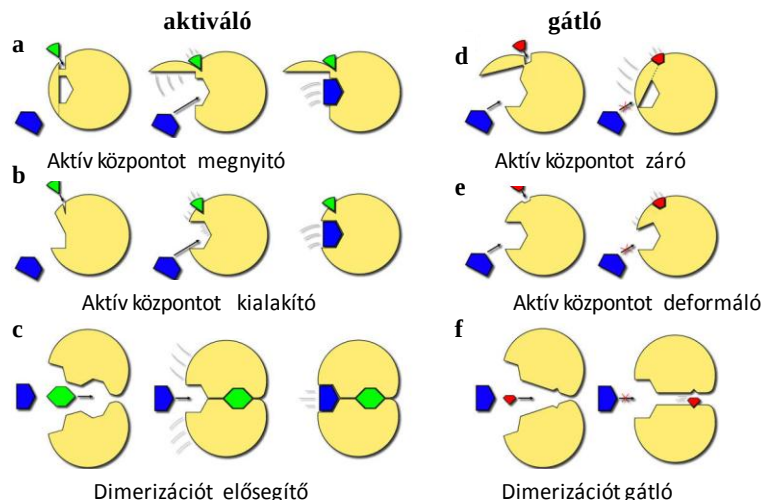
Az N-ColE7-ről készült olyan kristályszerkezet, melyben a cinkiont a fehérje DNS-sel alkotott komplexéből a kristályosítás során EDTA-hozzáadással eltávolították. A három hisztidin közül kettő megőrizte a konformációját a cinkion távollétében is, a harmadik orientációja megváltozott, de a fehérje általános szerkezete nem változott meg jelentősen [7].

A cinkion részt vesz a hidrolitikus reakcióban: a 3.1. fejezetben említett feladatok közül a szubsztráthoz kötődik aktiválva azt, valamint stabilizálja az ötértékű negatívan töltött foszforán átmeneti állapotot. Vitatott, hogy el tudja-e látni az általános sav szerepét is, ugyanis nincs szabad koordinációs helye a vízmolekula megkötésére.

Magnéziumion hozzáadása az N-ColE7-hez növelte a fehérje aktivitását. Ez alapján feltételezhető, hogy az N-ColE7 tartalmaz egy második fémkötő helyet a Mg^{2+} -ion számára, amely csak DNS jelenlétében kötődik meg [2].

3.4.6. Allosztérikus szabályozás a fehérjékben

A fehérje allosztérikus szabályozásáról akkor beszélünk, ha az effektorként vagy inhibitorként szolgáló ligandum megkötődése az aktív centrumtól jól elkülöníthető helyen történik meg. Ez a távolság néhány Å-tól több 10 Å-ig terjedhet. Különböző mechanizmusú allosztérikus szabályozással rendelkező fehérjék vannak. Néhány típus működési elvét a 3.7. ábra szemlélteti [15]. A 3.7. ábra **a** pontjában a ligandum megkötődésének a hatására a fehérje konformációja megváltozik, oly módon, hogy a szubsztrátkötőhely hozzáférhetővé válik. A **b** pontban a ligandum-fehérje kötés kialakulásának következtében, a fehérje aktív központjának szerkezete megváltozik, szubsztrátkötésre alkalmassá válik.



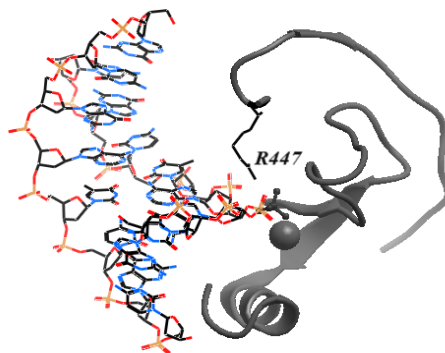
3.7. ábra Allosztérikus szabályozás mechanizmusának néhány típusa. Zöld és piros szín a ligandumot, kék szín a szubsztrátot, a sárga szín a fehérjét jelöli [15].

A **c** pont a dimerizációt elősegítő ligandumok mechanizmusát szemlélteti: a ligandum fehérjéhez való kötődését követően a fehérje könnyebben dimerizálódik és a dimer kialakulása során létrejön az új fehérjében egy szubsztrátkötőhely.

3.5. Előzmények kutatócsoportunk vizsgálatai alapján

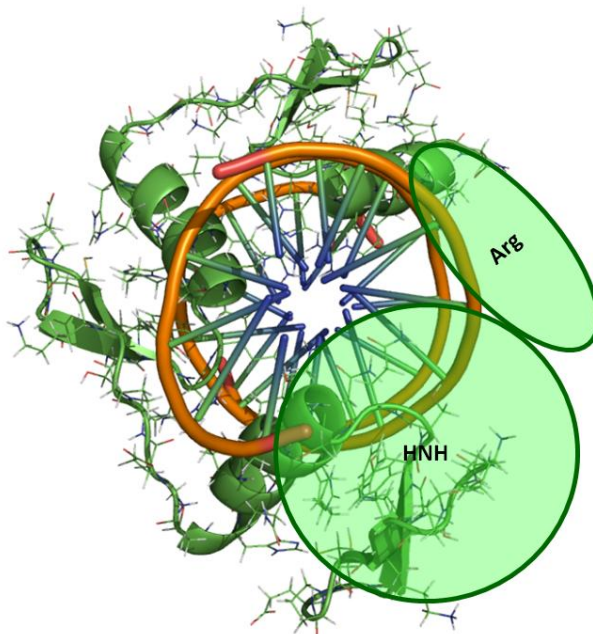
3.5.1. Allosztérikus szabályozás kialakításának lehetősége az N-ColE7-ben

Kutatócsoportunkban mutációanalízis segítségével kimutatták, hogy az N-ColE7 C-terminális részén levő aktív centrum kölcsönhatásban van az N-terminális részen lévő pozitív töltésű aminosavakkal. Az utolsó négy aminosav (KRNK) nélkül a fehérje elveszíti az aktivitását. Ezek közül az argininnek (R447) fontos szerepet tulajdonítanak a hasadó foszfátcsoporthoz megkötésében a térbeli közelség és az erős elektrosztatikus kölcsönhatások révén (3.8. ábra). Mivel azonban a fenti négy aminosav egy mozgékony hurok része, felmerül a kérdés, hogy milyen kölcsönhatások teszik lehetővé, hogy a C-terminális rész közelébe kerülhessenek.



3.8. Ábra. Az R447 szerepét szemléltető N-ColE7-DNS komplex szerkezete [16]. A képen az N-ColE7 szerkezetének C-terminális (HNH-motívum) és N-terminális (hurok) része van csak feltüntetve

A pozitív allosztérikus szabályozással rendelkező mesterséges fehérje szerkezetének kialakítását úgy képzeljük el, hogy az N-ColE7 N-terminális szakaszához 3-4 cinkujj-motívumból álló specifikus DNS-kötő domént kapcsolunk, majd cinkujj fehérjéhez hozzákapcsoljuk az N-ColE7-ből származó HNH-motívumot, ahogy azt a 3.9. ábra szemlélteti. Ez az új fehérje a cinkujjoknak köszönhetően specifikusan megkötődve körülöleli a DNS-t, miközben a fehérje terminális részei megfelelő térszerkezetbe kerülnek. Ennek hatására a nukleáz aktívvá válik és elhasítja a DNS-t.

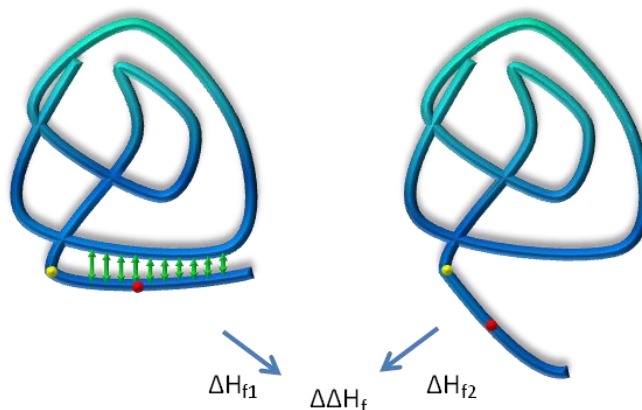


3.9. ábra. A mesterséges cinkujj-N-ColE7 kimér fehérje szerkezetének sematikus terve DNS komplexében. A DNS felülnézetből látható középen, a *HNH* jelű rész utal az N-ColE7 aktív központjára, míg az *Arg* jelű egység az N-ColE7 N-terminális végéből származó, arginin tartalmú szabályozó rész.

A 3.9. ábrán látható N-ColE7 nukleáz domént tartalmazó tervezett fehérjének az aktiváló jellegű allosztérikus szabályozási mechanizmusa a 3.7. ábrán látható **b** típusra hasonlít leginkább. Ennek lényege, hogy az ott zölddel jelölt ligandum megkötődésének a hatására (ami esetünkben maga a szubsztrátmolekula, mely az aktív központtól távol elhelyezkedő cinkujjakhoz kapcsolódik) a fehérje konformációja megváltozik: az aktív központot alkotó C- és N-terminális részek egymáshoz közel kerülnek a szubsztrát átalakítására alkalmas helyzetet kialakítva. Ez megfelelne annak a célkitűzésnek, hogy egy olyan nukleázt hozzunk létre, amely a DNS szubsztrát specifikus kötődése nélkül nem rendelkezik az aktivitáshoz szükséges konformációval. Egy ilyen enzim ugyanis a fehérje esetleges sérüléseinek következtében nem lesz képes a DNS-t nem-specifikus helyen elhasítani.

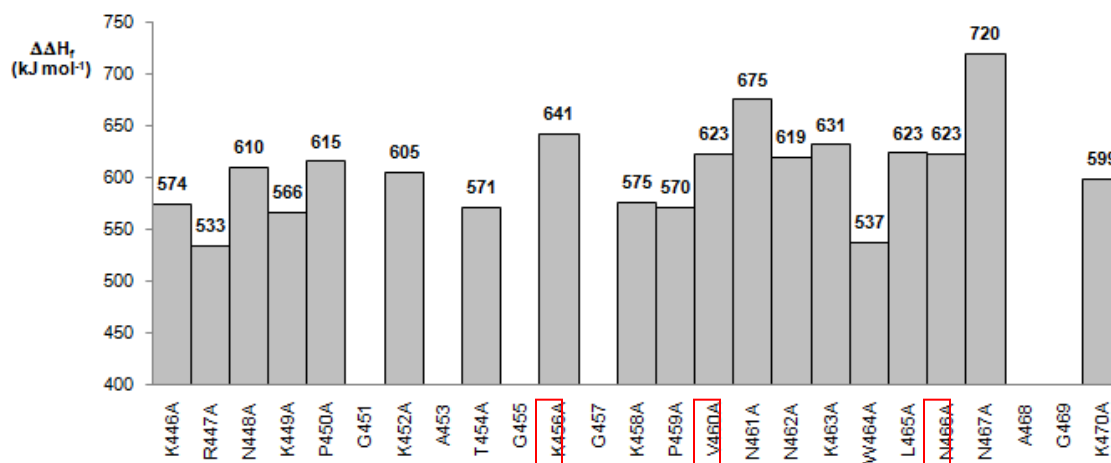
3.5.2. A pontmutációk tervezésének előzményei

A munkám során tervezett pontmutációk helyének kiválasztása egyrészt az irodalomban közölt Röntgen-diffrakciós szerkezetek alapján feltételezhető kölcsönhatások, másrészt a tanszéken korábban elvégzett kvantumkémiai számítások alapján történt. Az N-ColE7 fehérje N-terminális részén lévő utolsó 25 aminosav oldalláncainak a fehérje többi részével kialakított kölcsönhatásait szemiempirikus kvantumkémiai számításokkal tanulmányozták. Az ún. virtuális alanin-scan során minden egyes oldallánc alaninra történő cseréjét követően kiszámították a gombolyag képződési entalpiáját, majd a láncban a K470 és a D471 aminosavnál (az 3.10. ábrán sárga körrel jelölve) mesterséges torziót hoztak létre és az így keletkezett, torz szerkezetű alanin-mutánsoknak is kiszámították a képződési entalpiáját (3.10. ábra).



3.10. ábra. Alanin-scan számítások sematikus ábrája. A sárga kör a K470 és a D471 közötti torzió helyét, piros kör a mutáció helyét, míg a zöld nyilak az N-terminális részen lévő aminosavak oldalláncai és a fehérjegyombolyag közötti kölcsönhatásokat jelölik.

Páronként az entalpia értékek különbsége (3.11. ábra) alapján becsülhető az egyes oldallánccok és a fehérjemolekula többi része közötti kölcsönhatás erőssége.



3.11. ábra. Kvantumkémiai számítások eredményeként kapott entalpia-különbségek az egyes mutánsokra nézve [16].

Minél kisebb a entalpiakülönbség értéke, a csere annál nagyobb változást okozott a lánc kötődésében, vagyis a kicserélt aminosav-oldallánc annál erősebb kölcsönhatást alakított ki az eredeti fehérjemolekulában. Feltételezhető tehát, hogy annál fontosabb a szerepe az aktivitás kialakításában.

4. Kísérleti módszerek

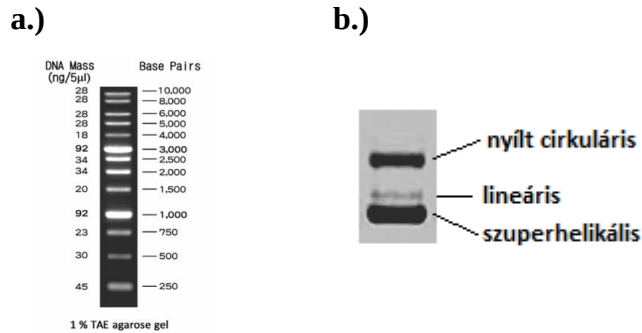
A kísérletek részletes leírása a függelékben, a 8.2. fejezetben található meg, az alábbiakban csak az egyes módszerek elvi hátterét mutatjuk be.

4.1. Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz gélelektroforézis DNS fragmensek tisztítására, hosszának és formájának (szuperhelikális, lineáris, nyílt cirkuláris) vizsgálatára szolgáló technológia. Elektromos térben a DNS molekula a negatív töltéseinek hatására a pozitív pólus felé vándorol. A gél üregeiben az áramlás sebessége fordítottan arányos a DNS méretével: a kisebb molekulák gyorsabban haladnak. Az elválasztáshoz agaróz gél-t használunk, amely egy agarobióz diszacharid egységekből felépülő poliszacharid. Meleg TAE (tris, ecetsav és EDTA-tartalmú) pufferoldatban feloldva, majd megfelelő formába öntve megszilárdul, és egy üreges gél alakul ki. Általában 1 g/100ml (1%) koncentrációjú gél-t állítunk elő, de az agaróz koncentrációjának növelésével a gél üregeinek mérete csökken, ami lassítja a benne áramló DNS molekulákat. Így alkalmas koncentráció megválasztásával elérhető a vizsgálni kívánt DNS molekulák méret szerinti elválása.

A gélben a DNS láthatóvá tehető pl. fluoreszcens jelölő molekulával (etídium-bromid), amely a kettősszalú DNS molekulába interkalálódva UV fénnel gerjeszthető és a látható fény tartományában emittál.

A minta mellé felvitt ún. marker DNS különböző, ismert hosszúságú lineáris DNS molekulákat tartalmaz. A minta sávjának helyét összevetve a marker sávjaival becsülhető a minta DNS mérete (4.1.a. ábra). Ha plazmid DNS-t tartalmazó mintát futtatunk, az lehet helikális, szuperhelikális és cirkuláris, a különböző konformációjú DNS molekulák eltérő sebességgel haladnak (4.1.b. ábra).



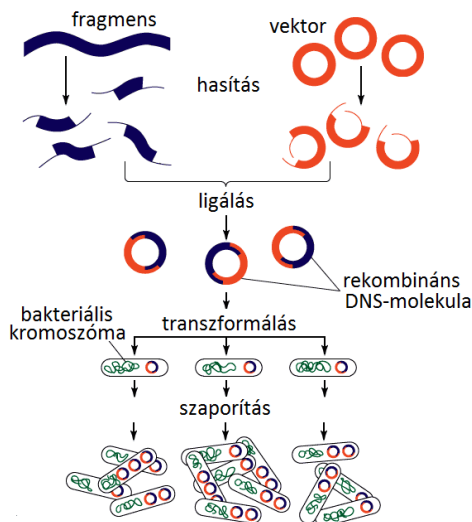
4.1. ábra a) Lineáris DNS agaróz gélelektroforézis alapján történő méretbecsléséhez használt marker és **b)** példa a DNS térszerkezetének hatására történő elkülönítésre.

4.2. Poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

Az SDS-PAGE (nátrium-dodecil-szulfátos poliakrilamid gélelektroforézis) a fehérjék méret-szerinti elválasztására alkalmas módszer. A nátrium-dodecil-szulfát (SDS) olyan felületaktív anyag, amely a fehérjemolekulát denaturálja (a nemkovalens kötések elhasításával megszünteti a natív szerkezetet), és a polipeptidláncok felületét a méretükkel arányos mennyiségű negatív töltéssel körbevonja. Az SDS segítségével negatív töltéssel ellátott fehérjék oldatát a futtatókádban lévő pufferoldatba merülő gél zsebeibe juttatva egyenáramú elektromos feszültség hatására a fehérje a pozitív pólus felé vándorol. A gél üregeiben történő vándorlás sebességét a molekula mérete szabja meg: a kisebb méretű fehérjék gyorsabban haladnak. A gél a következő komponensekből áll: akrilamid, bisz-akrilamid, nátrium-dodecil-szulfát, trisz(hidroximetil)-aminometán, HCl, ammónium-perszulfát (APS) és N,N,N,N-tetrametil-etiléndiamin (TEMED). Az APS és a TEMED a vinil addíciós polimerizációs folyamatok megindításáért felelősek. A bisz-akrilamid és az akrilamid molekulák között keresztkötések jönnek létre, aminek fontos szerepe van a pórusszerkezet kialakulásában. A fehérjék megjelenítése festékekkel történhet. Különböző, de ismert méretű fehérjéket tartalmazó marker egyidejű futtatásával, a vizsgált fehérje hozzávetőleges molekulatömege meghatározható.

4.3. Rekombináns DNS technológia

A rekombináns DNS technológia lehetővé teszi módosított DNS előállítását, sokszorozását. Első lépésben polimeráz láncreakcióval (PCR) előállítjuk a mutáns DNS-t kis mennyiségben, melyet baktériumsejtbe juttatva sokszorozíthatunk. A PCR során keletkező gén lineáris, azonban a baktérium csak cirkuláris DNS-t vesz fel. Ezért cirkuláris DNS hordozóba, ún. plazmidba építjük be. Ennek egy módja, hogy a plazmidot és az új DNS szakaszt azonos restrikciós endonukleázzal elhasítva összeillő „ragadós” végeket alakítunk ki, melyeket ligáz enzimmal összekapcsolunk. Ha a plazmid a sejt által felismert replikációs origóval rendelkezik, képes a sejtben sokszorozódni. A sejteket táptalajon szaporítva nagymennyiségű DNS állítható elő, melyet kinyerhetünk, majd fehérjetermelésre optimalizált sejtbe juttatva kifejezhetjük a gén által kódolt módosított fehérjét. A folyamatot a 4.2. ábra szemlélteti.



4.2.Ábra A rekombináns DNS technológia

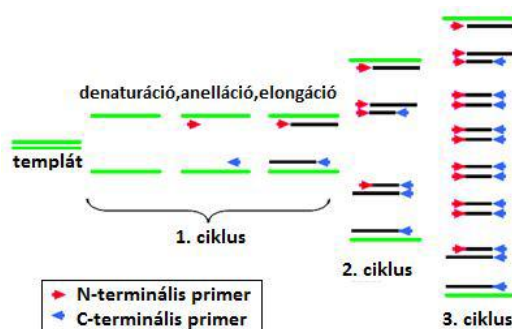
4.3.1. Polimeráz láncreakció (PCR)

A polimeráz láncreakció (PCR) során egy kettősszálú DNS kívánt szakaszát megsokszorozzuk. A reakcióelegy elkészítéséhez az alábbiakra van szükség.

1. DNS templát, amely tartalmazza a sokszorozítani kívánt DNS szakaszt.
2. Hőstabil DNS polimeráz enzim, amely katalizálja a komplementer nukleotidok beépülését. Ilyen például a Taq polimeráz.

3. A polimeráz enzimnek szüksége van a reakció elindulásához egy rövid kettősszalú részre a templát DNS-en, melyet meghosszabbíthat. Ezt biztosítják a primerek. Ezek a mesterséges oligonukleotidok a templáthoz kötődve egyben határolják is a célszekvenciát. Ha a primerek végére mutációkat építünk be, akkor a PCR során az eredeti templát helyett az adott részen mutáns gén sokszorozódik.
4. dNTP (dezoxi-nukleotid-trifoszfát) keverék: citozin-, adenozin-, guanozin- és timidin-trifoszfátok.
5. Magnéziumion.
6. Pufferoldat, mely a polimeráz optimális működését biztosítja.

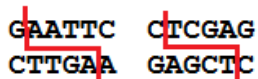
A reakciót három lépésre lehet elkülöníteni. Elsőként 98 °C-ra melegítjük fel az oldatot, aminek hatására a kettősszalú DNS bázisai közötti hidrogénkötések felszakadnak, a DNS-szálak elválnak egymástól. A következő lépés az anellálás. Ekkor az oldatot lehűtjük a primerek olvadáspontja környékére. Ennek hatására a primerek specifikusan hozzátapadnak a szétvált DNS komplementer szakaszaihoz, kijelölve a megsokszorozandó szakaszt. A harmadik lépés során a hőmérsékletet 72°C-ra emelve a DNS-polimeráz enzim megkezdí dNTP-k felhasználásával az új szálak felépítését 5'→3' irányban. A fenti három lépés egy ciklust alkot, melyet addig ismételhetünk, amíg kívánt mennyiségű DNS-t kapunk vagy az oldatból el nem fogy valamely komponens, illetve a hatékonyság csökkenéséig. Az általunk alkalmazott körülmények között (templát, primer és dNTP-k mennyisége) általában 30 ciklust állítottunk be. A cél-DNS mennyisége mindegyik ciklus alatt megkétszereződik a replikációs folyamat során (4.3. ábra).



4.3.Ábra PCR működési elve

4.3.2. Hasítás

A klónozó vektor (plazmid) és a PCR-elegyből származó, sokszorozni kívánt DNS szakasz hasítása során a restriktációs endonukleáz a kettősszálú DNS molekulák mindkét szálát elhasítja úgy, hogy összeillő, úgynevezett ragadós végek keletkeznek. Ezek az enzimek ún. palindrom szekvenciákat ismernek fel. Ilyen szekvenciák például az általunk is alkalmazott, a 4.4. ábrán látható EcoRI és XhoI enzimek hasítási helyei.



4.4. ábra. Az *EcoRI* és *XhoI* restriktációs endonukleáz hasítási sémája

Ezek a hasítási helyek a pGEX-6P-1 vektorban megtalálhatók, a fehérje génjében viszont nem szerepelnek, ezért annak végére a PCR során kellett beépíteni őket előzetesen, a primerek segítségével. A restriktációs endonukleázokat a hasítási reakció után magas hőmérsékleten (80°C-on) inaktiváltuk.

4.3.3. Ligálás

A hasítás során keletkezett ragadós végekkel rendelkező fragmensek összekapcsolása ligáz enzim segítségével történik. Annak érdekében, hogy a megfelelő végek tapadjanak össze, a vektort és a cél-DNS molekulát megfelelő arányban kell összekeverni. Ehhez meg kell határozni a ligálni kívánt DNS szakaszt és a vektort tartalmazó oldatok koncentrációit, amit spektrofotométerrel végeztünk. Ezt követően a következő képlettel számoltuk ki a ligálási elegy megfelelő összetételét:

$$\text{inzert molekulatömege (ng)} = 6 \cdot \frac{\text{inzert hossza (bp)}}{\text{vektor hossza (bp)}} \cdot \text{vektor molekulatömege (ng)}$$

A képletben *bp* a bázispárok számára utal. A ligálási reakció sikerének akkor a legnagyobb a valószínűsége, ha a plazmid:inzert anyagmennyiségének aránya 1:6. További feltétel, hogy 20 μ l ligálási elegyben ne legyen több 20 ng vektornál.

4.3.4. Transzformálás

A transzformálás során a cél-DNS-t tartalmazó vektort bejuttatjuk a baktériumsejtbe, majd táptalajon szaporítva sokszorozítjuk a kívánt DNS-t előállító sejteket. A baktériumokat előzőleg CaCl_2 -dal kezelve, majd hősokk hatására a sejtfal a cirkuláris DNS számára könnyen átjárhatóvá válik. A transzformált baktériumok antibiotikumot tartalmazó táptalajra kikenve szaporíthatók. Az antibiotikum rezisztenciáért felelős gént a vektor tartalmazza, így az antibiotikum hatására a vektort nem tartalmazó sejtek elpusztulnak. Egy éjszakán át 37°C -on inkubálva a táptalajon baktériumtelepek nőnek.

A ligálás sikerességét pl. úgynevezett kolónia PCR-rel ellenőrizhetjük. Ennek során kismennyiségű baktériumsejtet juttatunk a PCR elegybe valamely telepről templát gyanánt. Amikor a PCR során az oldatot első alkalommal 98°C -ra melegítjük, bekövetkezik a sejtek lízise, felszabadul a DNS, mely a folyamat további részében templátként szolgál és róla a primerek által határolt szakasz sokszorozódik. Ha gélelektroforézissel megvizsgálva a PCR termék a megfelelő méretű DNS, akkor a ligálás feltehetőleg sikeres volt. Erről egyértelműen a minták szekvenálásával győződhetünk meg, melynek eredményeképp a teljes bázisszekvenciát megkapjuk.

4.4. UV-VIS spektrofotometria

Az UV-látható spektroszkópia a DNS vagy RNS molekulát tartalmazó oldat pontos koncentrációjának meghatározására alkalmas módszer. A nukleotidokban lévő nitrogéntartalmú bázisoknak 260 nm-nél van az elnyelési maximuma. A következő képlet alapján az ismert adatok behelyettesítésével meghatározható a DNS koncentráció.

$$c_{\text{DNS}}(\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{hígítási faktor} \times \frac{A_{260} \times \text{hígítási faktor} \times 50 \mu\text{g DNS/ml}}{1 A_{260} \text{ egység}}$$

A 280 nm-nél mért abszorbancia alapján meghatározható a DNS-t tartalmazó oldat tisztasága, ugyanis a triptofánnak, amit a legtöbb fehérje tartalmaz, 280 nm-nél van az elnyelési maximuma. Ha a 260 nm és a 280 nm-nél mért abszorbancia értékeknek a hányadosa 1.65 és 1.85 között van, akkor megfelelő tisztaságú a DNS oldatunk.

4.5. A sejtek életképességének tanulmányozása

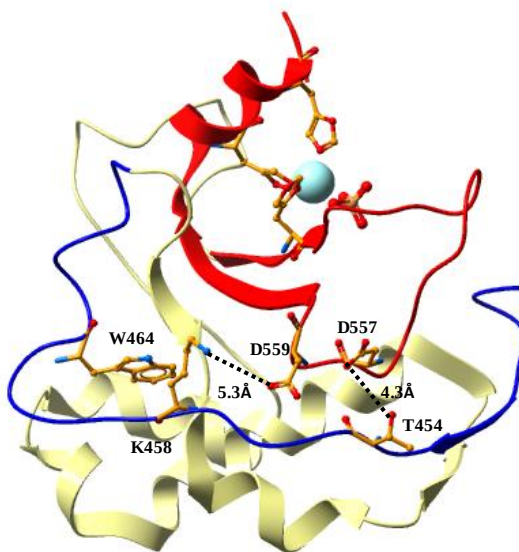
Spektrofotométerrel mért optikai sűrűségből meg lehet határozni a baktériumsejtek számát a szuszpenzióban. A sejtszám növekedésével az oldat zavarossága nő, így detektorba eljutó fény intenzitása csökken. A sejtek halálát követő lízis hatására a szuszpenzió fényáteresztő képességének növekedése következik be.

Vannak olyan baktériumsejtek, mint például a BL21, amelyek IPTG (izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid) hatására fehérjét kezdenek el termelni. Ezekbe a sejtekbe a transzformálással juttathatjuk be a vizsgálni kívánt fehérjénk DNS-ét. A plazmidot tartalmazó sejteket tápoldatban felszaporítjuk. Ezt követően IPTG hatására a sejtekben megkezdődik a fehérje kifejezése és rendszeres ún. OD₆₀₀ (600 nm-en mért optikai sűrűség) mérésekkel követhetjük a sejtek számának változását a fehérje kifejeződésének hatására.

5. Eredmények

5.1. A mutációk helyeinek megtervezése

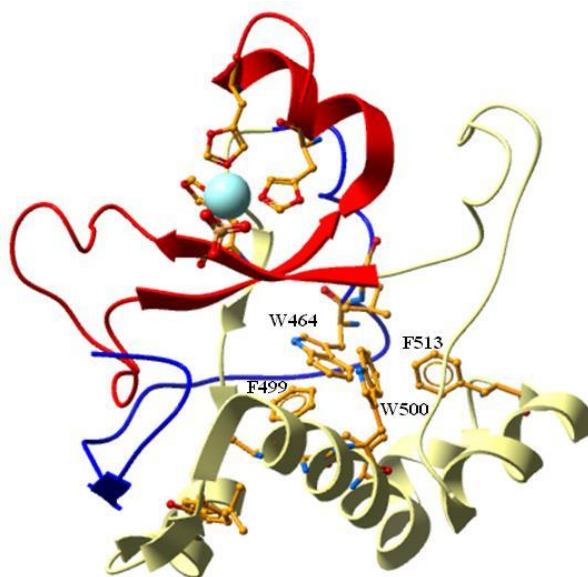
Munkánk során olyan mutációkat terveztünk az N-ColE7 N-terminális hurok részében, melyeken keresztül vizsgálható a C- és N-terminális részek kölcsönhatása. A korábbi kvantumkémiai számítások (alanin-scan, 3.11. ábra) alapján várhatóan a 464-es triptofán, a 459-es prolin, a 458-as lizin és a 454-es treonin oldalláncai játszanak fontos szerepet az enzim aktivitásához szükséges N-terminális lánc elhelyezkedésében. Kristályszerkezeti képek alapján következtetni lehet arra, hogy ezek az oldalláncok, melyik aminosavakkal alakíthatnak ki kölcsönhatásokat, amelyeknek a hiányában a fehérje elveszíti aktivitását. A röntgen kristályszerkezetben nem szerepelnek a hidrogén atomok, így a hidrogénkötések sem látszanak, azonban ezek elhelyezkedése feltételezhető a kötéstávolságok és kötésszögek alapján. Az alanin-scan során kiválasztott aminosavakat részletesen megvizsgáltam irodalmi kristályszerkezeti adatok alapján, melyek felbontása 2-4 Å között változik (5.1. ábra).



5.1.ábra Választott mutációk (W464A, K458A és T454A) helye és az eredeti aminosavak lehetséges kölcsönhatásai az N-ColE7-ben (PDB-kód: 1M08).

A 459-es prolin (P459) alanin-mutáns lecsökkent entalpiakülönbség értéke az alanin scan számításokban feltehetőleg a peptidkötés gerincében okozott feszültség hatása, ugyanis ezen oldallánc gyűrűs szerkezete kb. -75° -ra rögzíti a diéderes szöget.

A 464-es triptofán (W464) alanin-mutáns kis entalpiakülönbsége abból származhat, hogy a fehérje belsejében az 500-as triptofánnal (W500) és az 513-as fenilalaninnal (F513) egy hidrofób zsebben helyezkedik el, többek között ún. *stacking* kölcsönhatásokat alakítanak ki egymással (5.2. ábra).



5.2.ábra W464 elhelyezkedése az N-Cole7 belsejében lévő aromás és apoláris oldalláncú aminosavak által kialakított hidrofób zsebben (PDB-kód: 1M08).

Az ilyen hidrofób kölcsönhatások a vizes közegben nagy szerepet játszanak a fehérje szerkezetének összetartásában annak ellenére, hogy gyenge kölcsönhatások, erősségük 2-4 kJ/mol körül van.

A 458-as lizin (K458) egyrészt pozitív töltésével elektrosztatikus kölcsönhatást alakíthat ki a C-terminális részen elhelyezkedő negatív töltésű 559-es aszparaginsavval, másrészt hidrogénkötésben is részt vehet (5.1. ábra). Az ionos kötés erőssége akár tízszerese lehet a hidrogénkötésnek, értéke átlagosan 42 kJ/mol, míg a hidrogénkötés 4-30 kJ/mol között változik és szintén fontos szerepet játszik a fehérjék szerkezetének stabilizálásában. Emiatt fontosnak tartottam ennek az aminosav oldalláncnak a további vizsgálatát is.

Az 5.1. ábrán jól látszik, hogy a 454-es treonin (T454) hidrogénkötést alakít ki a tőle 4,3 Å távolságra levő 557-es aszparaginsavval (D557). A D557 is a HNH motívumban, a két β -

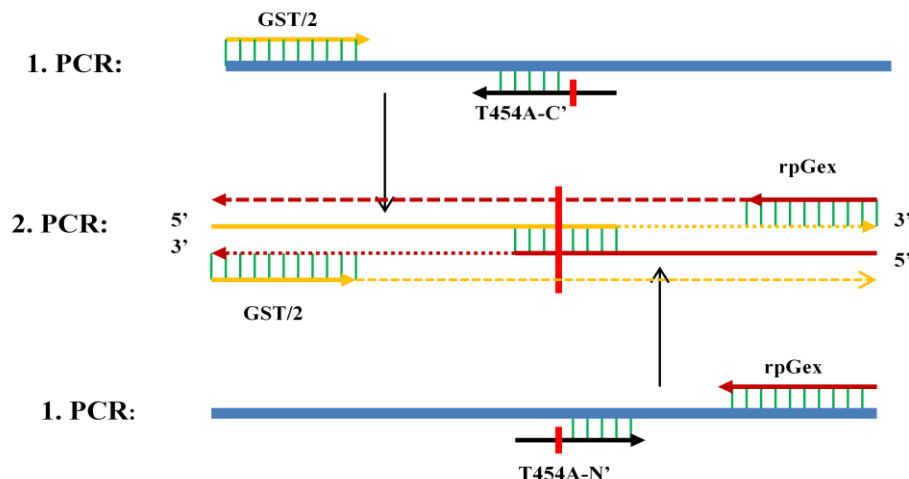
lemezt összekötő hurokban található, így ez a kölcsönhatás feltehetőleg elősegíti az N-terminális szerkezet nélküli lánc kötődését a C-terminális végen található aktív központhoz. A T454 további vizsgálata információt nyújthat arról is, hogy egy, a C- és N-terminális részt összekötő hidrogénhíd megszűnése elegendő-e ahhoz, hogy az N-terminális lánc annyira elmozduljon, hogy inaktívvá váljon a nukleáz.

A három utóbbi oldallánc (W464, K458, T454) további vizsgálatára pontmutációs kísérleteket terveztünk. A kérdéses aminosav nem hagyható ki a szekvenciából, mert akkor a szekvencia rövidülne és a fehérje szerkezete teljesen megváltozna. Glicinnel helyettesíteni sem jó, mert az túl nagy flexibilitása révén megváltoztatja a fehérje adott részének dinamikáját. Az egyes aminosavak szerepe ezért úgy tanulmányozható legegyszerűbben, hogy azokat alaninra cseréljük, és vizsgáljuk, hogyan változik a fehérje viselkedése a mutáció hatására. Ez az irodalomban elfogadott módszer, kísérleti úton [17] és számítógépes modellezéssel [18] egyaránt vizsgálnak alanin mutánsokat a választott oldallánc szerepének tanulmányozására. Kísérleteinkben tehát első lépésben három alanin mutáns előállítását tűztük ki célul: W464A, K458A, T454A.

5.2. A mutáns fehérjék génjét tartalmazó plazmidok előállítása

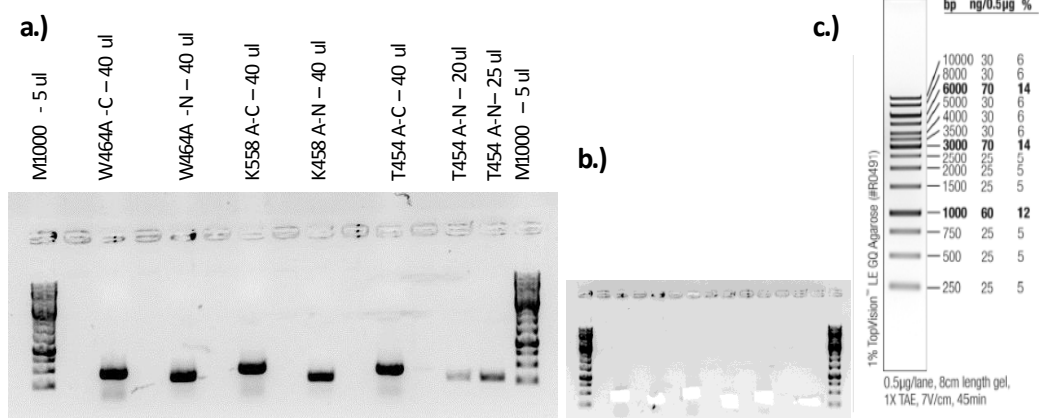
Elsőként a mutáns fehérjéket kódoló gént kell előállítani, amelyhez az eredeti nukleáz domén templátként, azaz mintaként szolgálhat. A DNS templátot polimeráz láncreakció segítségével lehet sokszorozni, a mutációk pedig a DNS másolását indító primerek segítségével alakíthatók ki.

Minden aminosav cseréhez négy primerre volt szükségünk. A primerek mindig a sokszorosított DNS-szakasz végeit határolják, a mutáció azonban ebben az esetben a szekvencia középső részére esik, és nem a végére. Ezért egy lépésben nem tudtuk előállítani a mutáns fehérje génjét. Előállítható viszont két olyan DNS-szakasz, melyek a mutáció helyének környezetében átfednek: az egyik szakasz az egyik, a másik a másik végen tartalmazza a mutációt. A két génrészlet egy újabb PCR segítségével "összetapasztható", és a teljes hosszúságú DNS-szakasz sokszorosítható.



5.3.ábra A mutáns fehérje génjének előállítása két egymás utáni PCR-ben

A tervezett primerek pontos adatai megtalálhatóak a függelék 8.2.1. pontjában. A mutáns fehérjét kódoló teljes DNS szakaszt az 5.3. ábra sémája alapján két egymás utáni PCR segítségével állítottuk elő, a függelék 8.2.2.-8.2.4. fejezeteiben leírtak szerint. Elvileg a két reakció egy PCR-elegyben is elvégezhető, ha PCR során az oldat mind a négy primert tartalmazza, de ebben az esetben az eredeti templát is sokszorozódna, ami csökkentené az előállítás hatékonyságát. Annak érdekében, hogy a második PCR, melynek templátja az 1. PCR-ből származik, ne tartalmazzon egy molekulát sem az eredeti templátból, a két PCR között gél-extrakcióval tisztítottuk a mintát (5.4. ábra, a részletes leírás a függelék 5.2.3. pontjában megtalálható).



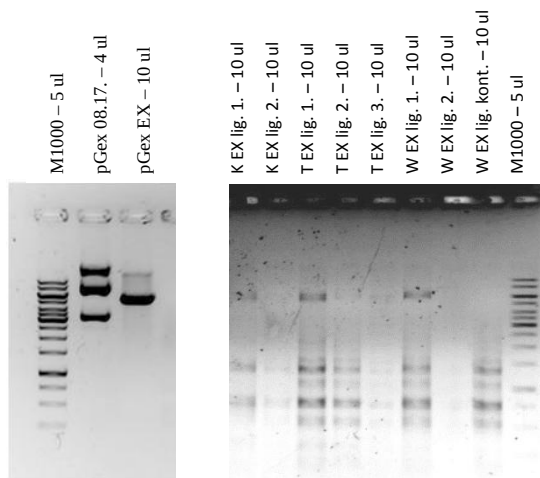
5.4. ábra Első PCR termék ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel és tisztítása gélből . **a)** első PCR termékekről készült gélkép **b)** a megfelelő hosszúságú DNS-t tartalmazó gélrészlet kivágása után készült kép **c)** marker jelentése

A gélekpről (5.4.a. ábra) marker segítségével megállapítható, hogy az első PCR során képződött termékek a vártnak megfelelő hosszúságúak.

A második PCR során a templátot az első PCR-ben előállított és gélből tisztított szakaszok szolgálták. A reakció során a két szélső, a GST/2 és a rpGex 3' primert alkalmaztuk. A primerek olvadáspontja 60 °C, az összetapadó részeké a gén közepén viszont csak 50 °C. Ezért célszerű volt olyan PCR-programot használni, amelyben először néhány ciklusban 50°C, majd a többiben 60°C tapadási hőmérsékletet állítottunk be. A második PCR eredményét is agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, melyből jól látszott, hogy megfelelő hosszúságú és tisztaságú termék képződött.

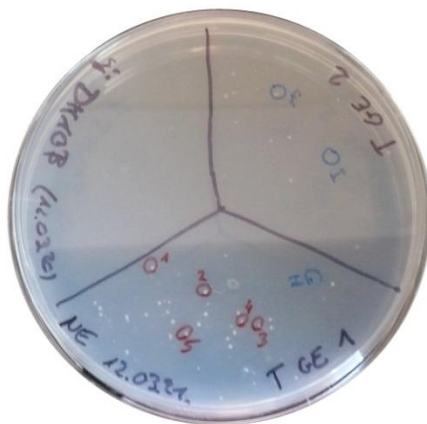
Ezt követően fenol-kloroform eleggyel történő extrakció során eltávolítottuk az enzimet a reakcióelegyből, majd propán-2-ollal kicsaptuk a DNS-t, megszabadulva a maradék vízdoldható szennyeződésektől (pl. maradék dNTP-k) is. TE-ben (trisz-EDTA oldatban) történő feloldás után meghatároztuk a DNS-minta koncentrációját.

A második PCR-rel előállított DNS fragmenseket (W464A, T454A, K458A) és a pGEX plazmidot az EcoRI (E) és XhoI (X) enzimekkel hasítottuk, ezek ún. ragadós végeket hoznak létre (rendre G|AATTC és C|TCGAG). A fragmensek esetén EcoRI hasít az N-terminális, XhoI a C-terminális véget kódoló részen. A ragadós véggel rendelkező W464A, T454A és K458A DNS fragmenseket ligálással építettük be a pGEX plazmidba. A hasítási és ligálási reakciók sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (5.5. ábra).



5.5. ábra. Hasítás és ligálás ellenőrzése: az EX az EcoRI és XhoI enzimekkel történő hasítást jelzi. A ligált fragmensek esetén a pGEX plazmid méretének tartományában megjelenő sávok jelzik a ligálás sikerességét.

Az így kapott cirkuláris szerkezetű plazmidok tartalmazzák a fehérje génjét, és a megfelelően előkészített, kompetens sejtek (*E. coli* DH10B) képesek felvenni őket az ún. transzformálás során. A táptalaj, amelyen a sejteket növesztettük, ampicillint tartalmazott. A pGEX plazmidban van ampicillin antibiotikum rezisztencia gén, ezért ezen a táptalajon csak azok a sejtek életképesek, amelyek felvették a transzformálás során a DNS-t.

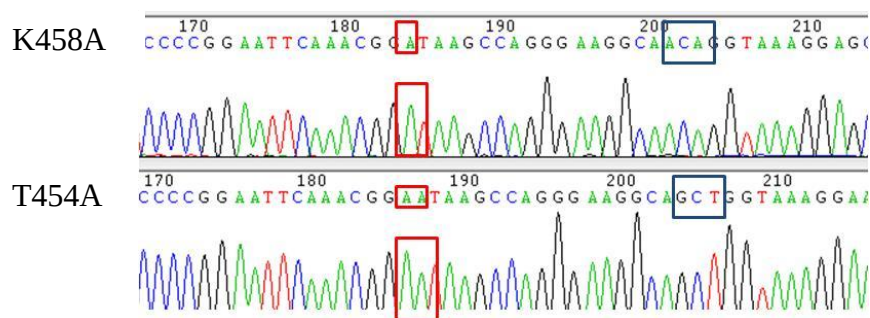


5.6. ábra. Mutáns fehérje génjét tartalmazó plazmidot termelő baktériumtelepek növesztése ampicillin-tartalmú táptalajon

Az, hogy a lemezen nőtt baktériumok a kívánt hosszúságú DNS-t tartalmazzák-e, ún. kolónia PCR segítségével ellenőrizhető. Ennek során az első 98°C-os lépésben a baktériumsejtek lízise bekövetkezik és felszabadul a DNS, amely a továbbiakban templátként szolgál. Amennyiben a kolónia PCR terméke agaróz gél alapján megfelelő hosszúságú volt, a DNS-t tartalmazó baktériumtelepeket átoltottuk tápoldatba és felszaporítottuk a sejteket. Ezekből a sejtekből centrifugálás után a QIAGEN MINI KITTEL nyertük ki a plazmid DNS-t a 8.2.9. fejezetben leírtak alapján. Ezután PCR-t készítettünk róla, majd a PCR-terméket kicsaptuk és tisztítottuk. UV-látható spektrofotométerrel meghatároztuk a DNS-oldat koncentrációját és a mintát szekvenáltattuk a DNS ellenőrzése céljából.

A szekvenálások alapján mindhárom mutáns esetében sikerült a ligálás és a tervezett mutáció (5.7. ábra), azonban véletlenszerű hibák jelentek meg a szekvenciákban. Ez nem okoz problémát, ha a csere hatására nem történik aminosav változás, ami lehetséges, mivel egy aminosavat több bázis triplet kódol. Egyes esetekben azonban ezek a hibák aminosav-cserét is okoznak. Emellett több esetben találtunk egy bázis hiányt a szekvencia első részletében (5.7. ábra). Ez a fehérjetermelés során egy stop kód gyors megjelenéséhez

vezet, és így nem a kellő hosszúságú fehérje fejeződik ki. Az 5.7.ábrán is jól látszik, a bázispár hiányánál sem adódott szekvenálási probléma, annak eredménye megbízható. A továbbiakban azokat a plazmidokat használtuk fehérjetermelésre, amelyekben nincs hiányzó bázis és a véletlen kialakult pontmutációk várhatóan nem jelentősek az általunk vizsgált rész szempontjából.



5.7.ábra A K458A és T454A plazmidok szekvenálása. Piros négyzöggel jelöltem a K458A és a W464A plazmidban fellépő hibák helyét. Kék négyzögekben a T454A mutáció helye látható.

5.3. A PCR optimalizálása

5.3.1. Hiány megjelenése

A W464A és a K458A többszöri előállítása során minden esetben ugyanaz a bázis hiányzott. Szekvenáltatás során kiderült, hogy a hiány már a templátban is jelen van. Ez a hiányzó bázis a T454A primerjeinek a tapadási részén helyezkedik el a templátban, ezért annak előállításánál nem okoz problémát. Az első PCR során a T454A primerek hozzákapcsolódnak a templáthoz ezzel elfedik, kijavítják a hiányt.

Mindebből az következik, hogy az adott templát alapján csak a T454A mutáns előállítása lehetséges, a K458A és W464A mutánsok előállítása előtt a templátot ki kell javítani, ami megfelelő primerek segítségével polimeráz láncreakcióval lehetséges és folyamatban van.

5.3.2. Polimeráz enzim által okozott véletlen mutációk vizsgálata

A T454A és a W464A előállításánál során a DNS-szekvenciában több báziscsere történt, melyek elhelyezkedése véletlenszerű. Ezeknek az oka lehet, hogy a DreamTaq polimeráz megbízhatósága korlátozott, mert nem rendelkezik javítómechanizmussal, ezért a körülmények optimálistól való kis mértékű eltérése is zavarokat okozhat a működésében. Kérdés, hogy a hibák melyik PCR során keletkeznek. A szekvenálásig három PCR történik a mintával:

- 1) a gén két részletét előállító PCR
- 2) a gén két részét összetapasztó és meghosszabbító PCR
- 3) a sikeresen ligált és tisztított, megfelelő gént tartalmazó plazmidról a szekvenáláshoz készített PCR.

Annak kiderítésére, hogy mikor lépnek fel hibák, egy szisztematikus vizsgálatot végeztünk. Az egyik hibás T454A plazmidot és az arról készült két párhuzamos PCR-elegyet szekvenáltatva kiderült, hogy már a gént előállító PCR-nél megjelentek az eltérések, ugyanis az abból készült plazmid már hibás volt, és hibái ugyanúgy megjelentek az erről készült PCR-termékekben.

Az első PCR során nem a primerek teljes szakasza kapcsolódik a templáthoz, a mutációt bevezető rész szekvenciája ugyanis eltér a mintaszekvenciától. Ez a polimeráz működésében problémát okozhat, amiről az irodalomban nem találtunk információkat. Feltételeztük, hogy az első PCR során a hőmérséklet növelésével növelhetjük a specifikusságot és ezek a hibák megszüntethetők. Ennek érdekében 63°C-ra emeltük a hibridizációs hőmérsékletet, aminek a hatására a hibák száma nem változott egyik mutánsnál sem. 68°C-ra történő hőmérsékletemeléskor hatására a W464A mutánsnál megszűntek a véletlenszerű báziscserék, míg a T454A-nál ez nem változott.

5.4. Előállított plazmidok

Több, a függelék 8.2.1.-8.2.10. fejezetében leírtak alapján végzett kísérletsorozattal előállított plazmidot vizsgáltunk, melyek bázisszekvenciáját szekvenálással határoztuk meg (BayGen Intézet, Szeged), ezeket az 5.1. táblázat tartalmazza.

5.1.Táblázat. Tervezett és véletlen mutációk az előállított plazmidokban. A hiányzó bázist tartalmazó minták esetén e fehérje szekvenciáját a hiányt pótolva fordítottuk.

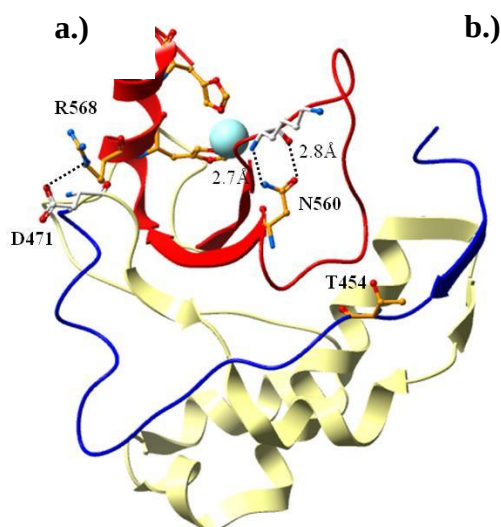
Tervezett mutációk	Hibák száma a bázisszekvenciában	Bázis hiány	Előállított plazmidban lévő mutációk	Fehérje kifejezés
T454A	3	0	T454A, N560D, R568G	*
	2	1	T454A, N517S, R538G	
	3	0	T454A, F489L, S535P	*
W464A	1	1	W464A, F449S	
	0	1	W464A	
K458A	0	1	K458A	
	0	1	K458A	

5.5. Az alanin mutáns fehérjék vizsgálata

Azon fehérjéket tudtuk a továbbiakban tanulmányozni, melyek génjének bázisszekvenciája nem tartalmazott hiányt. Két ilyen mutáns fehérje volt: T454A/N560D/R568G és T454A/F489L/S535P.

5.5.1. Az N560D és R568G mutációk feltételezett hatása

Mivel a bázisszekvenciában megjelent véletlen mutációk az aminosavszekvenciában is okoznak eltéréseket, először tanulmányoztuk, hogy ezen véletlen mutációknak lehet-e hatása lehet az általunk tanulmányozott részek közötti kölcsönhatásokra, illetve a fehérje aktivitására.



GAATTCAAACGGAATAAGCCAGGGAAGGCAGCTGGTAAA
GGAAAACCTGTCAATAATAAGTGGTTAAATAATGCAGGTA
AAGACTTAGGTTCTCCTGTTCCAGATCGTATAGCTAATAAAA
CTACGTGATAAGGAGTTTAAAGTTTCGATGATTTTCGGA
AGAAATTCGGAAGAAGTGTCAAAGATCCTGAGTTAAG
TAAACAATTTAGTAGGAACAATAATGATCGAATGAAGGTG
GGAAAAGCGCCCAAGACTAGAACCCAGGATGTTTCAGGG
AAGAGAACTTCATTCGAGCTTCATCATGAGAAGCCGATCA
GCCAAAATGGTGGTGTCTATGATATGGATGACATCAGCGT
GGTAACACCTAAAAGGCATATTGATATTCACCGAGGTAAA
TAG**CTCGAG**

c.)

E F K R N K P G K A **A** G K G K P V N N K W L N N A G K D L
G S P V P D R I A N K L R D K E F K S F D D F R K K F W E E
V S K D P E L S K Q F S R N N N D R **Met** K V G K A P K T R T
Q D V S G K R T S F E L H H E K P I S Q N G G V Y D **Met** **D**
I S V V T P K **C** H I D I H R G K **Stop** L E

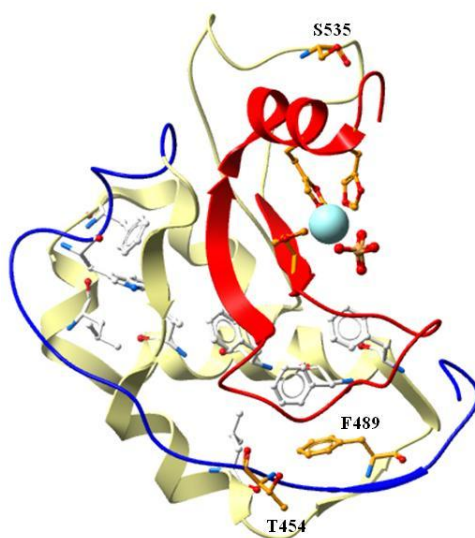
5.8.ábra a.) Az R568G és az N560D mutációk elhelyezkedése és a mutációk hatására feltehetőleg megszűnő kölcsönhatások (PDB-kód: 1M08). **b.)** Az előállított plazmid DNS szekvenciája az EcoRI és XhoI hasítási helyek között és **c.)** az általa kódolt fehérje szekvencia

A T454A-nál (5.8. ábra) az első kettő hiba a bázisszekvenciában nem okozott aminosav változást a második kettő esetben pedig egy aszpargin cserélődött ki aszparginsavra és egy arginin cserélődött ki glicinre. Az aszparagin aszparginsavra történő cseréje látszólag nem okozhatna nagy problémát, mert hasonlít egymásra az oldalláncuk és helyük messze van az N-terminális résztől. Azonban az irodalom alapján az N560D mutánsok aktivitása csökkent, a vad típusú fehérje aktivitásának 6,9%-a [19].

5.5.2. Az F489L és S535P mutációk feltételezett hatása

A második plazmidban a következő mutációk jöttek létre a kívánt T454A mellett: a 489-es fenilalanin leucinra (F489L) és az 535-ös szerin prolinra (S535P) cserélődött. Az 5.9. ábrán jól látható, hogy a 489-es apoláris fenilalanin (F489) a fehérjében lévő hidrofób üregben helyezkedik el, ezért ennek szintén hidrofób leucinra történő cseréje feltehetőleg nem okozhatja a szerkezet jelentős változását, így az aktivitás csökkenését sem.

Az 535-ös szerin (S535) a C- és N-terminális rész között egy hurokban helyezkedik el. Közelében csak egy apoláris leucin helyezkedik el, így a szerkezet kialakításában valószínűleg nem játszik szerepet. A prolin viszont befolyásolhatja a másodlagos szerkezetet, de a hurok valószínűleg nem játszik szerepet az aktivitás kialakításában.

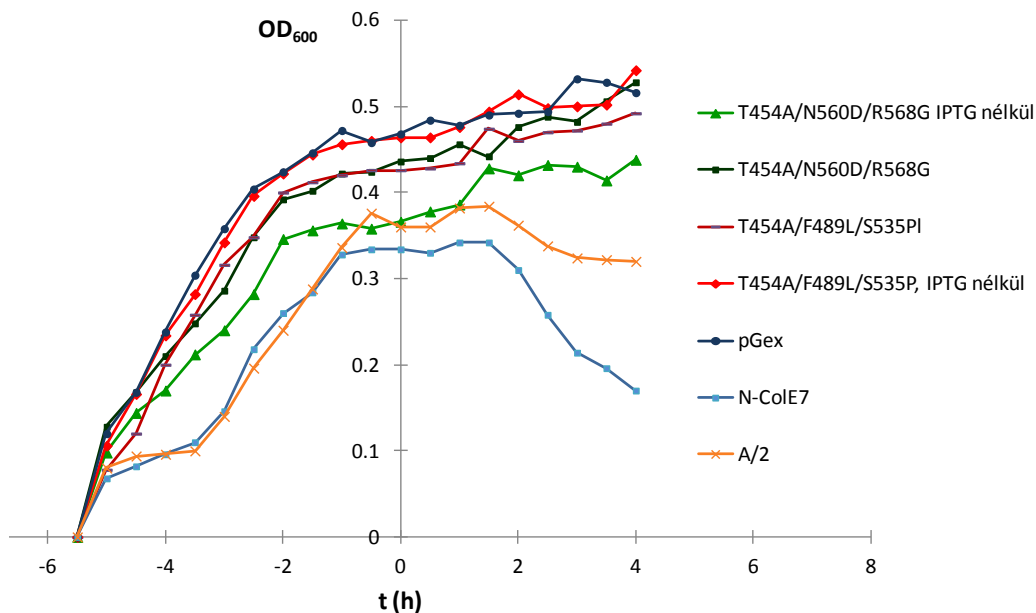


5.9. ábra. A T454A, F489L, S535P mutációk helye az N-Cole7-ben (PDB-kód: 1M08).

5.5.3. A sejtek életképességének tanulmányozása

Elsőként transzformálással (hőshockot alkalmazva) BL21-es baktériumsejtekbe juttattuk be a tisztított plazmidokat, és az OD_{600} követésével vizsgáltuk a baktériumok mennyiségét. 37°C-on folyamatosan rázatva 30 percenként mértük az OD_{600} -értéket, ami a zavarosság mértékét mutatja.

Kontrollként ismert aktivitású a pGEX-6P-1-et és pGEX-N-ColE7-et, valamint az A/2-vel jelzett aktív mutáns N-ColE7 nukleázt használtuk. Amikor a minta zavarossága elérte a 0,4-0,6 körüli OD_{600} -értéket, IPTG-t adtunk a baktériumoldathoz, ami aktiválja a sejtek fehérjetermelését. Ennek során a pGEX-6P-1-et tartalmazó baktériumok GST fehérjét (glutation-S-transzferáz) fejeznek ki, a pGEX-N-ColE7 tartalmúak pedig aktív GST-N-ColE7-et. Ez utóbbi baktériumok elpusztulnak, mert a fehérje elkezd elhasítani a genomiális DNS-üket, és lízis is bekövetkezik, így az OD_{600} érték csökkenni kezd. Mivel a GST fehérje nem rendelkezik nukleáz aktivitással, a sejtek száma a pGEX-6P-1 plazmidot tartalmazó mintában növekszik, és eléri a telítést.



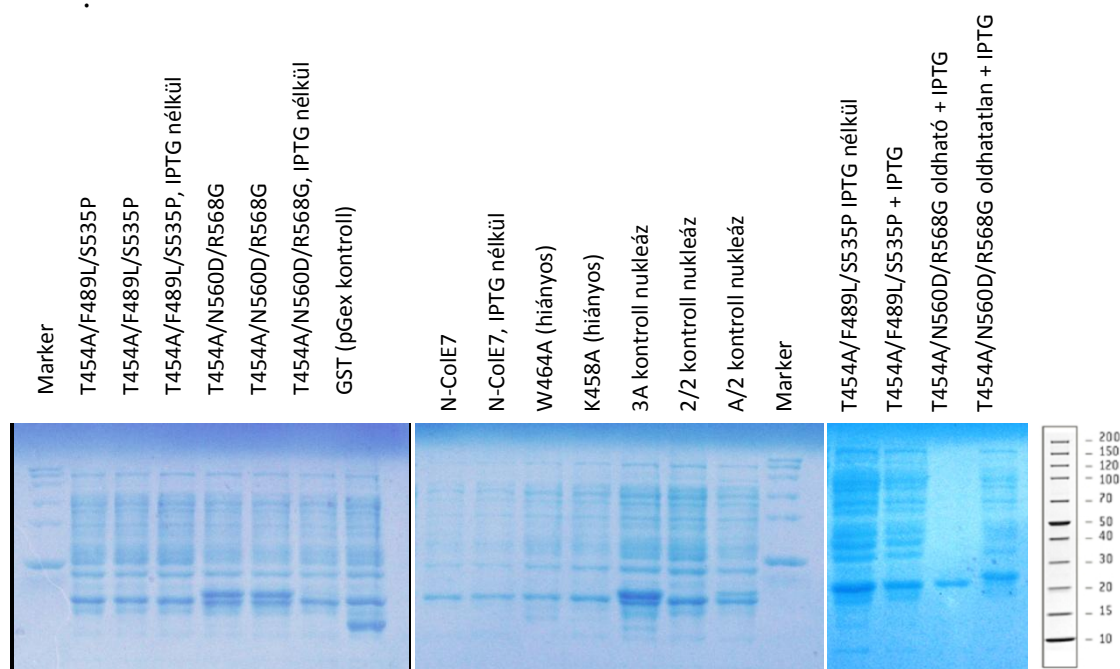
5.10.ábra OD_{600} mérések, a fehérjetermelést a $t = 0$ h-val jelölt időpontban indukáltuk. Az ismert aktivitású GST, N-ColE7 és az A/2 kontroll fehérjék működése megfelelő, ami a vizsgált mutánsok sejtmérgező hatásának hiányát jelzi.

A T454A fehérjét tartalmazó baktériumok száma mindkét T454A mutáns esetén növekedett. Ez két dolgot jelenthet: vagy kifejezi a baktérium a fehérjét, de az nem rendelkezik nukleáz aktivitással, vagy valamiért nem sikerült kifejezni a fehérjét. Ezen kérdés megválaszolására további kísérleteket végeztünk.

5.5.4. A fehérje kifejeződésének ellenőrzése SDS-PAGE kísérlettel

SDS-PAGE kísérlettel ellenőriztük, hogy az OD₆₀₀ mérés során az IPTG-vel kezelt sejtekben kifejeződött-e a megfelelő hosszúságú fehérje. Ez alapján kiderül, hogy az aktivitás hiánya azért következett be, mert a sejt nem fejezte ki a nukleázt, vagy azért mert a fehérje nem aktív.

Három összehasonlító kísérletet is elvégeztünk: IPTG-vel nem kezelt sejteket, GST fehérjét kifejező pGEX-tartalmú sejteket, és ismert aktivitású nukleázokat (N-ColE7, „A/2”-N-ColE7, „3A”-N-ColE7, „2/2”-N-ColE7) is megpróbáltunk kifejezni.



5.11.ábra Az előállított mutáns fehérjék jelenlétének és méretének ellenőrzése SDS-PAGE módszerrel és a marker sávjainak méretei. Kontrollként ismert méretű és aktivitású mutánsokat használtunk. A vad típusú fehérje számított tömege: 16262 g/mol=16,262 kDa

Az SDS-PAGE eredménye az 5.11.ábrán látható. Azokban az esetekben, amikor nem indukáltuk IPTG-vel a fehérjetermelést (4. és 7. sáv az első gélben), a sejt saját fehérjei

látszanak. Ha ehhez képest eltérést tapasztalunk IPTG hozzáadás után a megfelelő mérettartományban, akkor a sejtbe korábban általunk bejuttatott plazmidról kifejezett fehérje túltermelődött. Az 5.11. ábra alapján látható, hogy a pGEX-6P-1 vektorról túltermelődött a GST fehérje, amit a pGEX plazmid tartalmaz és fehérje kifejezés során hozzáfűz az N-ColE7 molekulához. A 3A és 2/2 inaktív nukleázok, míg az N-ColE7 és az A/2 aktív. Az A/2 aktív nukleáznál jól látszik, hogy a fehérje kifejeződött, de mielőtt a sejt túltermelhette volna elpusztult ezért a vártnak megfelelő helyen csak egy halvány sáv látható, ami a megfelelő méretű kis mennyiségű fehérje kifejeződésére utal. A GST-N-ColE7 az előző mutánsnál is nagyobb aktivitást mutatott, a sejtszám itt csökkent a legnagyobb mértékben, a gélen a sejt saját fehérjei sem látszanak, aminek oka, hogy kevés élő sejt maradt az oldatban. Ez azt jelentheti, hogy a GST-N-ColE7 sejtmérgező hatása akkora, hogy a fehérjét kifejező sejtek azonnal elpusztultak.

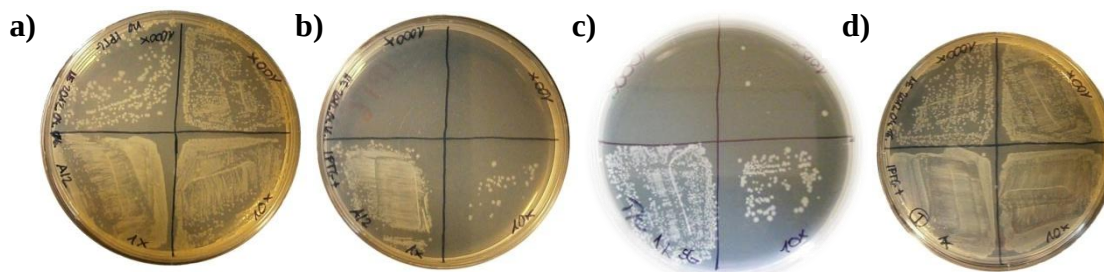
A K458A és W464A minta DNS molekulájában egy bázis hiányzik, emiatt elcsúszik az olvasási keret az aminosavra történő átírás során, vagyis nem megfelelő aminosavak fejeződnek ki és néhány aminosav után egy stop-kód jelenik meg, ezért ezek a sávok nem értelmezhetőek. Érdekes viszont, hogy a rövidebb GST-hez hasonló fehérje sávja nem jelenik meg.

A T454A/N560D/R568G aminosav-cseréket tartalmazó fehérje esetén az 5.11. ábrán lévő gélképen jól látszik, hogy a sejt túltermelte a megfelelő hosszúságú fehérjét. Megvizsgáltuk ennek a fehérjének az oldhatóságát a sejtben. Erre azért volt szükség, mert ha a fehérje nem oldódik, pl. mert túl gyorsan termelődik, akkor aggregálódik a sejten belül és így nem képes kifejezni a nukleáz aktivitását. A gélképen (5.11 ábra) látható, hogy az oldható frakcióban jelent meg a fehérje, így az oldhatósága valószínűleg nem befolyásolja a fehérje működését. A sejtek szaporodásának vizsgálata során az OD₆₀₀-as érték és ezzel együtt a sejtek száma viszont folyamatosan növekedett a tápoldatban. A két vizsgálat alapján ez a mutáns inaktív vagy nagyon lecsökkent aktivitással rendelkező nukleáz.

A T454A/F489L/S535P mutánssal kapcsolatos kísérletek nehezebben értelmezhetőek. Ezen mintánál ugyanis reprodukálhatóan nőtt a baktériumoldat zavarossága, azonban az SDS-gélen nem tudtuk detektálni a fehérje túltermelését annak ellenére, hogy a sejt biztosan tartalmazta a plazmidot. Ezt onnan tudjuk, hogy az ampicillin-tartalmú oldatban

életképes volt, és nem is idegen fehérje génje nélküli pGEX plazmidot tartalmazott, mivel a GST fehérjét sem termelte túl.

Az OD₆₀₀ mérések alátámasztása érdekében IPTG-vel kezelt és IPTG nélküli táptalajra kikenve a baktériumokat szintén megvizsgáltuk a BL21-sejtekbe transzformált plazmidokat. Ezt a kísérletet mindkét mutánsnál elvégeztük. Összehasonlításként az aktív A/2 nukleáz használtuk. A 0,5-ös OD₆₀₀ értékig szaporított sejt kultúrákat 1-, 10- 100- és 1000-szeres hígításban kentük ki ampicillin, ill. ampicillin és IPTG tartalmú táptalajra.



5.12.ábra. A/2 kontroll nukleáz IPTG-t nem tartalmazó (a) és tartalmazó (b) táptalajon, valamint T454A/N560D/R568G plazmidot (c) és T454A/F489L/S535P plazmidot (d) tartalmazó BL21-es sejtek IPTG-vel kezelt táptalajon

Az 5.12. ábrán látható, hogy a hígítás növelésével a telepek száma a vártnak megfelelően minden esetben csökkent. A nukleáz aktivitással rendelkező A/2 kontroll mintánál az IPTG-vel nem kezelt lemezekeken mind a négy hígítási aránynál nőttek telepek, míg az IPTG-tartalmú lemezekeken a 100- és 1000-szeres hígításnál nem jelentek meg. Ebből arra lehet következtetni, hogy a kifejezett A/2 fehérje aktív, így ez a kísérlet megfelelő a mutáns fehérjék sejtmérgező hatásának vizsgálatára. Mivel az IPTG-vel nem kezelt táptalajon minden esetben azonos képet kaptunk, így azok képeit itt nem ábrázoltam. A T454A/F489L/S535P mutánsnál azonban nem volt különbség az IPTG-vel kezelt és a nem kezelt táptalajra kikent baktériumok telepeinek száma között. Ennek az egyik oka az lehet, hogy a kifejezett mutáns fehérje inaktív. Azonban ez abból is adódhatott, hogy a nukleáz nem fejeződött ki (ld. 5.11. ábra). T454A/N560D/R568G mutánsnál azt tapasztaltuk, hogy a sejt kultúrát tartalmazó oldat optikai sűrűségének követése kevésbé pontos a fehérjék sejtmérgező hatásának vizsgálatára, mint ez utóbbi módszer, hiszen azzal nem sikerült kimutatni a kismértékű aktivitást, amely az irodalom alapján legfeljebb 7%-os.

5.5.5. Az eredmények értékelése

Eddigi kísérleteink alapján a T454A/F489L/S535P mutánst nem sikerült túltermeltetni a BL21 sejtekben. Ez lehet az oka annak, hogy az OD-mérés során nem tudtuk kimutatni a sejtek pusztulását.. Feltehetőleg nem aktív ez a mutáns, ugyanis ellenkező esetben már kis mértékű, az SDS-gélen nem kimutatható termelése is elpusztítaná a sejtet. Irodalmi adatok alapján akár egyetlen Colicin E7 molekula is képes a sejt pusztítására. Ezen mutáns (in)aktivitásának bizonyítására további kísérletek szükségesek.

A T454A/F489L/S535P mutáns sejtekben történő kifejezését még optimalizálnunk kell. Ezzel szemben a T454A/N560D/R568G mutáns fehérje irodalom alapján vártak megfelelően kis aktivitással rendelkeznek. A sejtek reprodukálhatóan túltermelték ezt a fehérjét, azonban az IPTG-vel kezelt lemezekkel végzett kísérlet során mérgező hatást tapasztaltunk. Ez a csökkent aktivitás azért előnyös számunkra, mert a DNS-kötésben bekövetkező változásokat aktív nukleázban nem tudjuk vizsgálni. Az N560D révén elrontott aktivitás azonban a szerkezetre és így várhatóan a DNS-kötésre nincs nagy hatással, mivel ez az oldallánc a HNH motívum β -redői közötti hurok szerkezetének fenntartásában, ill. az általános bázis (H545) pozícionálásában játszik szerepet [19]. Így ennek a mutánsnak a további vizsgálatával annak ellenére is tanulmányozhatjuk a T454A mutáció szerepét a DNS-kötésben, hogy ez a mutáns az N560D mutáció nélkül feltehetőleg aktív nukleáz lenne. Az is kiderült kísérleteink alapján, hogy a teljes értékű nukleáz aktivitáshoz valószínűleg szükséges a T454 jelenléte. A fent ismertetett, pozitív allosztérikus szabályozással rendelkező fehérje tervezése során tehát figyelembe kell vennünk, hogy az N-terminális szabályozó egység megfelelő orientálásához feltehetőleg szükség lesz a T454 oldallánc által kialakított kölcsönhatások biztosítására.

6. Összefoglalás

Kutatócsoportunk célja a DNS molekulához specifikusan kötő pozitív allosztérikus szabályozási mechanizmussal rendelkező mesterséges cinkujj nukleáz előállítása. Erre a célra a colicin E7 nukleáz doménje tűnt a legalkalmasabbnak. Úgy gondoljuk, hogy az N- és C-terminális szakaszok közé beépített cinkujjakkal specifikussá és szabályozottá tehető a nukleáz. Az aktivitáshoz szükséges, hogy az N- és C-terminális részek egymáshoz közel helyezkedjenek el. Emiatt fontos, hogy tudjuk, hogy hova lehet beépíteni a cinkujjakat. Pontosan ismerni kell az egyes aminosavak szerepét az aktivitásban és a fehérje szerkezetének kialakításában. Munkám során azt vizsgáltam, hogy az N-terminális részen elhelyezkedő 25 aminosav közül, melyiknek az oldallánca alakít ki jelentős kölcsönhatást a molekula többi részével.

Első lépésben korábbi kvantumkémiaili számítások alapján kiválasztottam a fontosabbnak tűnő aminosavakat. A nukleáz kristályszerkezeti képén megvizsgáltam, hogy az oldalláncaik a fehérje melyik részével alakíthatnak ki erősebb kölcsönhatást. A kísérletekhez a következő aminosavakat választottuk: K458, W464, T454. Ezen aminosavak helyére alanint építettünk be, és így vizsgáltuk hiányuk hatását a fehérje aktivitására. A T454A mutációt tartalmazó plazmidokat sikeresen előállítottuk, azonban véletlenszerű génhibák is keletkeztek. A következő két plazmidot vizsgáltuk részletesebben: T454A/N560D/R568G és T454A/F489L/S535P. Kristályszerkezeti képek alapján feltételezhető, hogy az ezekből a plazmidokból kifejezett fehérjékben a véletlenszerűen lecserélt aminosavak nem alakítanak ki aktivitást befolyásoló kölcsönhatásokat, kivéve az N560D-t, amely mutáns aktivitása csökkent. A két plazmidot IPTG hatására fehérjét kifejező sejtekbe transzformáltuk, és vizsgáltuk a fehérjék sejtmérgező hatását. Ennek ellenőrzésére SDS-PAGE kísérletet alkalmaztunk. A kísérletek alapján a T454A/N560D/R568G erősen lecsökkent aktivitással rendelkezik. A T454A/F489L/S535P mutánsnál nem kaptunk egyértelmű választ az aktivitásra. A baktériumszaporodási kísérletek során a fehérje nem pusztította a sejteket, azonban SDS-PAGE során az is kiderült, hogy nem sikerült a fehérje túltermelése. Ennek két oka lehet: a sejtek egy része kifejezte a fehérjét, azonban a fehérje nukleáz aktivitással rendelkezett így

ezek a sejtek elpusztultak. A másik ok, hogy a sejtek IPTG hozzáadása ellenére sem fejeztek ki fehérjét.

További céljaink között szerepel a PCR során fellépő véletlen mutációk kiküszöbölése, a keletkezett T454A/N560D/R568G csökkent aktivitású mutáns szerkezetének, DNS- és fémion kötésének vizsgálata, valamint a K458A és W464A mutánsok előállítása.

7. Hivatkozások

- [1] N. C. Mishra, "Nucleases-molecular biology and applications," *John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey*, 2002.
- [2] M.-J. Sui et al., "Metal ions and phosphate binding in the H-N-H motif: crystal structures of the nuclease domain of ColE7/Im7 in complex with a phosphate ion and different divalent metal ions.," *Protein Science*, vol. 11, no. 12, pp. 2947-57, 2002.
- [3] B. Gyurcsik; A. Czene, "Towards artificial metallonucleases for gene therapy: recent advances and new perspectives," *Future Med Chem vol 3., No 15*, pp. 1935-1966, 2011.
- [4] C. A. Kim and J. M. Berg, "A 2.2 Å resolution crystal structure of a designed zinc finger protein bound to DNA," *Nat Struct Mol Biol*, vol. 3, no. 11, pp. 940-945, 1996.
- [5] R. James, C. Kleanthous, and G. R. Moore, "The biology of E colicins: paradigms and paradoxes," *Microbiology*, no. 1, 996, pp. 1569-1580, 1996.
- [6] C. Kleanthous and D. Walker, "Immunity proteins: enzyme inhibitors that avoid the active site," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 26, no. 10, pp. 624-631, 2001.
- [7] K.-C. Hsia, K.-F. Chak, P.-H. Liang, Y.-S. Cheng, W.-Y. Ku, and H. S. Yuan, "DNA binding and degradation by the HNH protein ColE7.," *Structure (1993)*, vol. 12, no. 2, pp. 205-14, 2004.
- [8] Y.-sheng Cheng, K.-chiang Hsia, L. G. Doudeva, K.-fu Chak, and H. S. Yuan, "The Crystal Structure of the Nuclease Domain of Colicin E7 Suggests a Mechanism for Binding to Double-stranded DNA by the H – N – H Endonucleases," *Journal of Molecular Biology*, vol. 2836, no. 2, pp. 227-236, 2002.
- [9] T.-P. Ko, C.-C. Liao, W.-Y. Ku, K.-F. Chak, and H. S. Yuan, "The crystal structure of the DNase domain of colicin E7 in complex with its inhibitor Im7 protein," *Structure*, vol. 7, no. 1, pp. 91-102, 1999.
- [10] H. Huang and H. S. Yuan, "The conserved asparagine in the HNH motif serves an important structural role in metal finger endonucleases.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 368, no. 3, pp. 812-21, 2007.
- [11] K.-C. Hsia, C.-L. Li, and H. S. Yuan, "Structural and functional insight into sugar-nonspecific nucleases in host defense," *Current Opinion in Structural Biology*, pp. 126-134, 2005.

- [12] Y.-T. Wang, W.-J. Yang, C.-L. Li, L. G. Doudeva, and H. S. Yuan, "Structural basis for sequence-dependent DNA cleavage by nonspecific endonucleases.," *Nucleic Acids Research*, vol. 35, no. 2, pp. 584-94, 2007.
- [13] A. J. Pommer et al., "Homing in on the Role of Transition Metals in the HNH Motif of Colicin Endonucleases," *Biochemistry*, vol. 274, no. 38, pp. 27153-27160, 1999.
- [14] W. Ku et al., "The zinc ion in the HNH motif of the endonuclease domain of colicin E7 is not required for DNA binding but is essential for DNA hydrolysis," *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 7, pp. 1670-1678, 2002.
- [15] R. A. Laskowski, F. Gerick, and J. M. Thornton, "The structural basis of allosteric regulation in proteins," *FEBS Letters*, vol. 583, no. 11, pp. 1692-1698, 2009.
- [16] Németh E., "Allosztérikus szabályozás a colicin E7 fehérje nukleáz doménjében," *SZTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék*, Diplomamunka, 2011.
- [17] K. L. Morrison and G. A. Weiss, "Combinatorial alanine-scanning," *Current Opinion in Chemical Biology*, pp. 302-307, 2001.
- [18] A. M. El-assaad, C. A. Kieslich, R. D. Gorham, and D. Morikis, "Electrostatic exploration of the C3d – FH4 interaction using a computational alanine scan," *Molecular Immunology*, vol. 48, no. 15-16, pp. 1844-1850, 2011.
- [19] H. Huang and H. S. Yuan, "The conserved asparagine in the HNH motif serves an important structural role in metal finger endonucleases.," *Journal of Molecular Biology*, vol. 368, no. 3, pp. 812-821, 2007.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Kiss Tamás tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette számomra, hogy a Szegedi Tudományegyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén dolgozzak.

Köszönetet mondok témavezetőimnek, Dr. Gyurcsik Béla egyetemi adjunktusnak és Németh Eszter Ph.D. hallgatónak, akik sokat segítettek a kísérleti munkában és az eredmények kiértékelésében.

9. Függelék

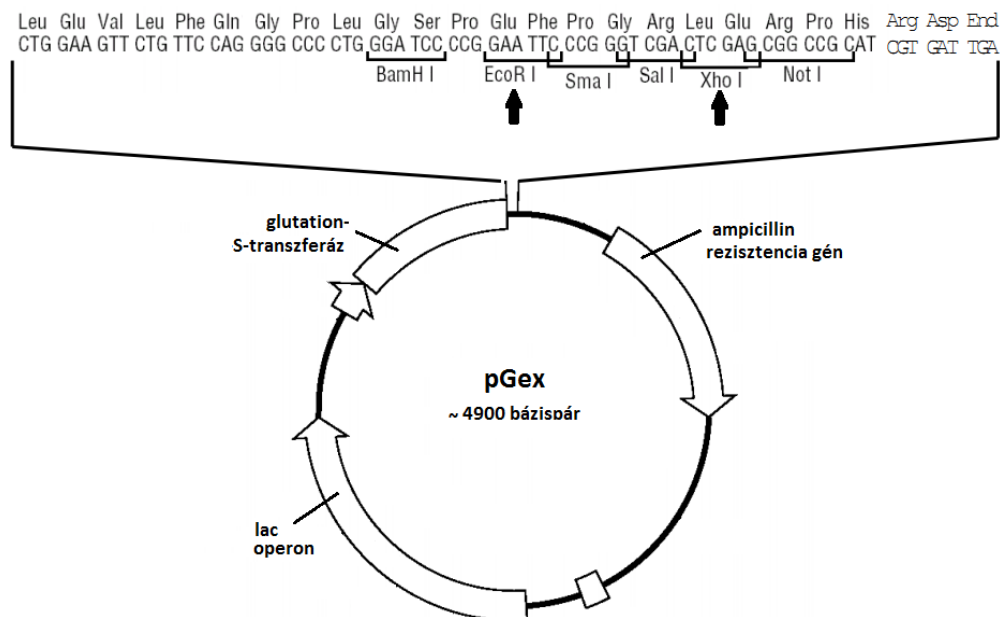
9.1. Előállított plazmidok

8.1.táblázat. Tervezett és véletlen mutációk az előállított plazmidokban. A hiányzó bázist tartalmazó minták esetén a fehérje szekvenciáját a hiányt pótolva fordítottuk.

Tervezett mutációk	Hibák száma a bázisszekvenciában	Bázis hiány	Előállított plazmidban lévő mutációk	Fehérje kifejezés
T454A	3	0	T454A, N560D, R568G	*
	2	1	T454A, N517S, R538G	
	3	0	T454A, F489L, S535P	*
W464A	1	1	W464A, F449S	
	0	1	W464A	
K458A	0	1	K458A	
	0	1	K458A	

9.1.1. A pGEX-6P-1 vektor sematikus ábrája

A mutáns fehérjék génjét a pGEX-6P-1 vektorba építettük be. Ez a vektor a fehérje kifejezés során hozzáfűzi a GST (glutathion-S-transzferáz) fehérjét a nukleázhoz, ami a további tisztítás céljából fontos.



9.1.ábra. A pGEX-6P-1 vektor sematikus ábrája, a kinagyított rész a klónozó régió

9.1.2. *N-ColE7 szekvenciája*

A templátként használt pGEX-N-ColE7 bázisszekvenciája az EcoRI és XhoI hasítási hely között a következő:

GAATTCAAACGGAATAAGCCAGGGAAGGCAACAGGTAAAGGAAAACCTGTCAATAATAAGTGGTTAAATAATG
CAGGTAAAGACTTAGGTTCTCCTGTTCCAGATCGTATAGCTAATAAACTACGTGATAAGGAGTTTAAAGTTTC
GATGATTTTCGTAAGAAATTCTGGGAAGAAGTGCAAAAGATCCTGAGTTAAGTAAACAATTTAGTAGGAACA
ATAATGATCGAATGAAGGTTGGAAGCGCCCAAGACTAGAACCCAGGATGTTTCAGGGAAGAGAACTTCATT
CGAGCTTCATCATGAGAAGCCGATCAGCCAAAATGGTGGTGTCTATGATATGGATAACATCAGCGTGGTAACAC
CTAAAGGCATATTGATATTCACCGAGGTAAATAGCTCGAG

Ebből a génből az alábbi szekvenciájú fehérje fejezhető ki:

EFKRNKPGKATGKGKPVNNKWLNNAGKDLGSPVPDRIANKLRDKEFKSFDDFRKK
FWEEVSKDPELSKQFSRNNNDR**MET**KVVGKAPKTRTQDVSGKRTSFELHHEKPISQN
GGVYD**MET**DNISVVTPKRHIDIHRGK**STOP** LE

9.1.3. *Az általunk előállított plazmidok bázis- és aminosav szekvenciája a hasítási helyek közötti részben*

T454A / N560D / R568G

GAATTCAAACGGAATAAGCCAGGGAAGGCAGCTGGTAAAGGAAAACCTGTCAATAATAAGTGGTTAAATAATG
CAGGTAAAGACTTAGGTTCTCCTGTTCCAGATCGTATAGCTAATAAACTACGTGATAAGGAGTTTAAAGTTTC
GATGATTTTCGCAAGAAATTCTGGGAAGAAGTGCAAAAGATCCTGAGTTAAGTAAACAATTTAGTAGGAACA
ATAATGATCGAATGAAGGTCGGAAGCGCCCAAGACTAGAACCCAGGATGTTTCAGGGAAGAGAACTTCATT
CGAGCTTCATCATGAGAAGCCGATCAGCCAAAATGGTGGTGTCTATGATATGGATGACATCAGCGTGGTAACAC
CTAAAGGCATATTGATATTCACCGAGGTAAATAGCTCGAG

EFKRNKPGKAAGKGKPVNNKWLNNAGKDLGSPVPDRIANKLRDKEFKSFDDFRKK
FWEEVSKDPELSKQFSRNNNDR**MET**KVVGKAPKTRTQDVSGKRTSFELHHEKPISQN
GGVYD**MET**DISVVTPKGHIDIHRGK**STOP** LE

T454A / F489L / S535P

GAATTCAAACGGAATAAGCCAGGGAAGGCAGGTGGTAAAGGAAAACCTGTCAATAATAAGTGGTTAAATAATG
CAGGTAAAGACTTAGGTTCTCCTGTTCCAGATCGTATAGCTAATAAACTACGTGATAAGGAGCTTAAAGTTTC
GATGATTTTCGTAAGAAATTCTGGGAAGAAGTGCAAAAGATCCTGAGTTAAGTAAACAATTTAGTAGGAACA
ATAATGATCGAATGAAGGTCGGAAGCGCCCAAGACTAGAACCCAGGATGTTCCAGGGAAGAGAACTTCATT
CGAGCTTCATCATGAGAAGCCGATCAGCCAAAATGGTGGTGTCTATGATATGGATAACATCAGCGTGGTAACAC
CTAAAGGCATATCGATATTCACCGAGGTAAATAGCTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCGCCTC
GCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACACATCCAGCCTTCCCGA

KRNKPGKAAGKGKPVNNKWLNNAGKDLGSPVPDRIANKLRDKELKSFDDFRKKF
WEEVSKDPELSKQFSRNNNDR**MET**KVVGKAPKTRTQDVPGKRTSFELHHEKPISQNG
GVYD**MET**DNISVVTPKRHIDIHRGK**STOP**LERPHRD**STOP**LTICLARFGDDGENL**STOP**

T454A / N517S / R538G - hiányos

GAATTCAAACGGAATAAGCCAGGAAGGCAGCTGGTAAAGGAAAACCTGTCAATAATAAGTGGTTAAATAATG
CAGGTAAAGACTTAGGTTCTCCTGTTCCAGATCGTATAGCTAATAAACTACGTGATAAGGAGTTTAAAGTTTC
GATGATTTTCGTAAGAAATTCTGGGAAGAAGTGCAAAAGATCCTGAGTTAAGTAAACAATTTAGTAGGAACA
GTAATGATCGAATGAAGGTCGGAAGCGCCCAAGACTAGAACCCAGGATGTTTCAGGGAAGGGAACTTCATT
CGAGCTTCATCATGAGAAGCCGATCAGCCAAAATGGTGGTGTCTATGATATGGATAACATCAGCGTGGTAACAC
CTAAAGGCATATTGATATTCACCGAGGTAAATAGCTCGAG

A hiányzó adenint pótolva a fordítás:

EFKR NKPGKAAGK GKPVNNKWLNNAGKDLGSPVPDRIANKLRDKEFKSFDDFRKK
FWEEVSKDPELSKQFSRNSNDR**MET**KV GKAPKTRTQDVSGKGT SFELHHEKPISQN
GGVYD**MET**DNISVVTPKRHIDIHRGK**STOP**

A hiányzó adenint figyelembe véve:

EFKR NKPGRQLVKENLSIISG**STOP**

W464A / F449S - hiányos

GAATTCAAACGGA**T**TAAGCCAGGGAAGGCAACAGGTAAAGGAAAACCTGTCAATAATAAG**GCC**TTAAATAATG
CAGGTAAAGACTTAGGTTCTCCTGTTCCAGATCGTATAGCTAATAAACTACGTGATAAGGAGTTTAAAGTTTC
GATGATTTTCGTAAGAAAT**C**CTGGGAAGAAGTGTCAAAAGATCCTGAGTTAAGTAAACAATTTAGTAGGAACA
ATAATGATCGAATGAAGGTCGGAAAAGCGCCCAAGACTAGAACCCAGGATGTTTCAGGGAAGAGAACTTCATT
CGAGCTTCATCATGAGAAGCCGATCAGCCAAAATGGTGGTGTCTATGATATGGATAACATCAGCGTGGTAACAC
CTAAAGGCATATTGATATTCACCGAGGTAAATAGCTCGAG

a hiányzó adenint pótolva a fordítás:

EFKR NKPGKATGK GKPVNNK**A**LNNAGKDLGSPVPDRIANKLRDKEFKSFDDFRKK
SWEEVSKDPELSKQFSRNNNDR**MET**KV GKAPKTRTQDVSGKRTS FELHHEKPISQN
GGVYD**MET**DNISVVTPKRHIDIHRGK**STOP**LE

A hiányzó adenint figyelembe véve:

EFKRISQGRQQVKEPLSIISG**STOP**

K468A – hiányos

GAATTCAAACGGA**T**TAAGCCAGGGAAGGCAACAGGTAAAGGA**GCC**CCTGTCAATAATAAGTGGTTAAATAATG
CAGGTAAAGACTTAGGTTCTCCTGTTCCAGATCGTATAGCTAATAAACTACGTGATAAGGAGTTTAAAGTTTC
GATGATTTTCGTAAGAAATCTGGGAAGAAGTGTCAAAAGATCCTGAGTTAAGTAAACAATTTAGTAGGAACA
ATAATGATCGAATGAAGGTCGGAAAAGCGCCCAAGACTAGAACCCAGGATGTTTCAGGGAAGAGAACTTCATT
CGAGCTTCATCATGAGAAGCCGATCAGCCAAAATGGTGGTGTCTATGATATGGATAACATCAGCGTGGTAACAC
CTAAAGGCATATTGATATTCACCGAGGTAAATAGCTCGAG

Az aminosavszekvencia jó lenne, ha nem hiányozna az adenin:

KR NKPGKATGK**A** PVNNKWLNNAGKDLGSPVPDRIANKLRDKEFKSFDDFRKKF
WEEVSKDPELSKQFSRNNNDR**MET**KV GKAPKTRTQDVSGKRTS FELHHEKPISQNG
GVYD**MET**DNISVVTPKRHIDIHRGK**STOP**LE

A hiányzó adenint figyelembe véve:

EFKRISQGRQQVKEPLSIISG**STOP**

W464A- hiányos

GAATTCAAACGGA**T**TAAGCCAGGGAAGGCAACAGGTAAAGGAAAACCTGTCAATAATAAGGCCTTAAATAATG
CAGGTAAAGACTTAGGTTCTCCTGTTCCAGATCGTATAGCTAATAAACTACGTGATAAGGAGTTTAAAGTTTC
GATGATTTTCGTAAGAAATCTGGGAAGAAGTGTCAAAAGATCCTGAGTTAAGTAAACAATTTAGTAGGAACA
ATAATGATCGAATGAAGGTCGGAAAAGCGCCCAAGACTAGAACCCAGGATGTTTCAGGGAAGAGAACTTCATT
CGAGCTTCA**C**CATGAGAAGCCGATCAGCCAAAATGGTGGTGTCTATGATATGGATAACATCAGCGTGGTAACAC
CTAAAGGCATATTGATATTCACCGAGGTAAATAG**CTCGAG**

A hiányzó adenint pótolva a fordítás:

EFKR NKPGKATGK GKPVNNKALNNAGKDLGSPVPDRIANKLRDKEFKSFDDFRKK
FWEEVSKDPELSKQFSRNNNDR**MET**KV GKAPKTRTQDVSGKRTS FELHHEKPISQN
GGVYD**MET**DNISVVTPKRHIDIHRGK**STOP**

A hiányzó adenint figyelembe véve:

EFKRISQGRQQVKENLSIIRP**STOP**

9.2. Kísérleti módszerek

9.2.1. PCR-hez használt primerek

9.1.táblázat. Primerek szekvenciája, tapadási tulajdonságai. A primer oldatok koncentrációja 10 nmol/mol

		teljes primer			tapadó rész		átfedő rész	
	szekvencia	gc%	T _m (°C)	bp	T _m (°C)	bp	T _m (°C)	bp
GST/2	GGTGATCATGTAACCCA TCCTGACTTCATG	46	62	30	62	30	-	-
rövid pGex 3'	CGGGGAGCTGCATGTGT CAGAGG	65	62	23	62	23	-	-
rövid pGex 5'	GGGCTGGCAAGCCACGT TTGGTG	65	62	23	65	23	-	-
W/A-C'	GCATTATTAAAGGCTT ATTATTGACAGGTTTC CTTACCTGTTC	36	65	47	59	33	26	52
W/A-N'	GTCAATAATAAGGCTT AAATAATGCAGGTAAG ACTTAGGTTCTCCTG	37	66	49	60	34	26	52
K/A-C'	TGACAGGAGGCTCCTTTA CCTGTTGCCTTCCCTGGC	60	70	35	61	25	18	50
K/A-N'	GTAAGGAAGGCTCCTGTC AATAATAAGTGGTTAAA TAATGCAGGTAA	37	65	46	59	35	18	50
T/A-C'	CTTTACCAAGCTGCCTTCC CTGGCTTATCCGTTTG	51	67	35	59	25	18	50
T/A-N'	GGAAGGCAAGTGGTAA AGGAAAACCTGTCAATA ATAAGTGGTTAAA	39	66	46	59	35	18	50

9.2.2. 1. PCR: az átfedő szakaszok előállítás

9.2.táblázat. PCR keverék összetétele

	Lot.	MM (ul)	W/N (ul)	W/C (ul)	T/N (ul)	W/C (ul)	K/N (ul)	K/C (ul)
st. H ₂ O		207	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5
Dream puffer (MgCl ₂ +)	00068548	30	5	5	5	5	5	5
dNTP mix 2 mM	00078240	30	5	5	5	5	5	5
templát: 50x pGex-Col		6	1	1	1	1	1	1
Dream Taq polimeráz	00069583	3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Térfogat		276	46	46	46	46	46	46
GST/2 primer			2		2		2	
rövid pGex 3' primer				2		2		2
W/A-C' primer			2					
W/A-N' primer				2				
T/A-C' primer					2			
T/A-N' primer						2		
K/A-C' primer							2	
K/A-N' primer								2
Teljes térfogat		184	50	50	50	50	50	50

9.3.táblázat. PCR program

Step 1.	98 °C	1 min
Step 2.	98 °C	20 sec
Step 3.	63 °C	1 min
Step 4.	72 °C	1 min
Step 5.	Cycle 30 Times To 2	
Step 6.	72 °C	4 min
Step 7.	10 °C	0 sec
Step 8.	End	

A „step 3” hőmérsékletét ebben a programban a különböző mutánsok előállítása során 63-68 °C között változtattuk a PCR optimalizálása céljából.

9.2.3. Gél-extrakció:

A gél-extrakciót a Toyobo cég MagExtractor (Lot. 93160G1, Code NPK-601) kittel végeztük (állvány: Toyobo Lot. 94030, Code MGS-101).

A mintákat nagyszsebés gélen futtattuk 1%-os agaróz gélben (120 µl agaróz 2,4 ml TAE, 120 µl EtBr, 120 ml deszt. víz). A gélből UV-fény alatt kivágtuk a megfelelő méretű DNS sávját. A Mag Extractor kit előírásai alapján a megfelelő oldattal melegen kioldottuk a DNS-t a gélből. Ezután mágnes szuszpenziót adtunk a mintához, amely megkötö a DNS-t, így egy mágneses állványban szeparálni lehet azt a szennyeződések tartalmazó oldattól. Végül TE-oldattal eluáltuk a DNS-t a mágnesről.

9.2.4. 2. PCR: részek összetapasztása

9.4.táblázat. PCR keverék összetétele az átfedő részek összetapasztásához

	Lot.	MM (ul)	T 1 (ul)	T2 (ul)	K1 (ul)	K2 (ul)	W1 (ul)	W2 (ul)
st. H ₂ O		201	33,5	33,5	33,5	33,5	33,5	33,5
Dream puffer (MgCl ₂ incl.)	00068548	30	5	5	5	5	5	5
dNTP mix 2 mM	00078240	30	5	5	5	5	5	5
GST/2 primer		12	2	2	2	2	2	2
rövid pGex 3' primer		12	2	2	2	2	2	2
Dream Taq polimeráz		3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Térfogat		288	48	48	48	48	48	48
T/N templát			1	1				
T/C templát			1	1				
K/N templát					1	1		
K/C templát					1	1		
W/N templát							1	1
W/C templát							1	1
Teljes térfogat		300	50	50	50	50	50	50

A mesterkeveréket vékonyfalú PCR-csőben állítjuk össze. Az enzim hozzáadása előtt vortexeljük és röviden centrifugáljuk az asztali centrifugában.

9.5.táblázat. PCR program

Step 1.	98 °C	1 min
Step 2.	98 °C	20 sec
Step 3.	55 °C	1 min
Step 4.	72 °C	1 min
Step 5.	Cycle 5 Times To 2	
Step 6.	98 °C	20 sec
Step 7.	65 °C	1 min
Step 8.	72 °C	1 min
Step 9.	Cycle 25 Times To 2	
Step 10.	72 °C	4 min
Step 11.	10 °C	0 sec
Step 12.	End	

9.2.5. A DNS kinyerése a reakcióelegyből

A fenol-kloroform eleggyel történő extrakció során az 50 µl-es elegyekhez 50 µl fenol-kloroformot adtunk, a mintát vortexeltük, majd 5 percig, 13500 rpm fordulatszámmal szobahőmérsékleten centrifugáltuk, és a felső fázisokat gyűjtöttük. Ezután etanollal végeztünk kicsapást: a vizes fázishoz 5 µl NaOAc-ot, majd 2,5-szeres mennyiségű (125 µl) hideg absz. etanolt adtunk. Alapos vortexelés után 20 percig -80°C-ra helyeztük a mintákat, majd 15 percig 13500 rpm fordulatszámmal 4 °C-on centrifugáltuk. A folyadék óvatos eltávolítása után 200 µl hideg, 70%-os etanolt adtunk a szilárd anyaghoz és rövid vortexelés után ismét centrifugáltuk 5 percig, 13500 rpm fordulatszámmal, 4 °C-on. A folyadék eltávolítása után zárt steril fülkében szárítottuk 20 percig a mintát és 30 µl TE-ben feloldottuk 4 °C-on.

9.2.6. Hasítás *EcoRI* és *XhoI* enzimekkel

A PCR-rel előállított fragmenseket és a pGEX plazmidot (162 ng/ul) hasítottuk az *EcoRI* és *XhoI* (Fermentas, 10 u/ul) enzimekkel. A mintákat 80 percen keresztül inkubáltuk 37 °C-on. Ezután 20 percig 80 °C-on inkubáltuk, hogy az enzimeket hővel inaktiváljuk.

9.6.táblázat. A hasítási elegy összetétele. A táblázatban E az EcoRI enzimmal, X az XhoI enzimmal, EX a mindkét enzimmal hasított mintát jelenti.

	DNS (ul)	EcoRI (ul)	XhoI (ul)	2xTango puffer (ul)	Steril H ₂ O(ul)	V (ul)
Lot.		66604	55884	73295		
K EX	8	1	1	5	10	25
W EX	8	1	1	5	10	25
T EX	8	1	1	5	10	25
pGEX E	1	1	-	5	18	25
pGex X	1	-	1	5	18	25
pGex EX	1	1	1	5	17	50

9.2.7. Ligálás:

A ragadós véggel rendelkező fragmenst ligálással (T4 ligáz, 1 Weiss u /ul, ~200 coh. end lig. u/ul) építettük be a pGex plazmidba. A plazmid mennyisége 20 µl-es ligálási elegyben ~20 µl vektor volt, az inzert:vektor molarány 6:1 és ettől kissé eltérő érték volt. A megfelelő arányt spektrofotométerrel mért koncentrációk alapján számítottuk. A ligálási elegyeket 4 °C-on inkubáltuk, majd DH10B sejtekbe transzformáltuk.

9.7.táblázat. Ligálási elegy összetétele

	W-EX (ul)	T-EX (ul)	K-EX (ul)	pGex- EX (ul)	pGex- X (ul)	pGex- E (ul)	Puffer (ul)	T4 ligáz (ul)	St H ₂ O (ul)	V (ul)
W EX lig1	5			3.5			2	1	8.5	20
T EX lig1		5		3.5			2	1	8.5	20
K EX lig1			5	3.5			2	1	8.5	20
W EX lig2	5			1			2	1	11.5	20
T EX lig2		5		1			2	1	11.5	20
K EX lig2			5	1			2	1	11.5	20
T EX lig3		3		3			2	1	9.5	20
W EX (K-)	5						2	1	12	20
pGex-EX (K)				3.5			2	1	13.5	20
pGex-X (K+)					3.5		2	1	13.5	20
pGex-E (K+)						3.5	2	1	13.5	20

9.2.8. Transzformálás:

A plazmid DNS-t, amely tartalmazza a mutáns fehérje génjét, az ún. transzformálás során juttattuk be az *E.coli* DH10B típusú, előzőleg CaCl₂-os kezelés révén kompetenssé tett sejtekbe. A30 µl jégen tárolt DH10B kompetens sejthez (-80 °C-on tárolva) 2 µl ligátumot adtunk. Ezután 0 °C (5 perc) – 42 °C (2 perc) - 0 °C (5 perc) hősokkot alkalmaztunk: a hidegen tartott sejtek hirtelen meleg környezetbe kerülve kitágítják pórusaikat, felveszik a DNS-t és hirtelen lehűtve bezárulnak a pórusaik. Az egyes mintákból 20 µl-t (1/3 lemez) vagy 30 µl-t (1/2 lemez) kikentünk ampicillines LB-táptalajra. A lemezeket “fejjel lefelé” elhelyezve 38 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át.

LB-táppoldat: 5g tripton, 2,5 g élesztő kivonat, 5g NaCl, 1 ml 1 M NaOH, 500 ml deszt.víz (pH=7,0), sterilizálás

LB-táptalaj 4-5 lemezhez (Amp+): 100 ml LB-táppoldat, 1,5 g agar-agar, sterilizálás 100 µl ampicillin (sterilizálás után kell beleszórni, amikor 50 °C-os az oldat)

9.2.9. Kolónia PCR

9.8.táblázat. Kolónia PCR keverék összetétele

	Lot.	10xMM (µl)
st. H ₂ O		355
Dream puffer (MgCl ₂ incl.)	68548	50
dNTP mix 2 mM	78240	50
rövid pGex 5' primer		20
rövid pGex 3' primer		20
Dream Taq polimeráz	92065	5
Térfogat		500

9.9.táblázat. Kolónia PCR program

Step 1.	98 °C	1 min
Step 2.	98 °C	20 sec
Step 3.	63 °C	30 sec
Step 4.	72 °C	1 min 20 sec
Step 5.	Cycle 30 Times To 2	
Step 6.	72 °C	4 min
Step 7.	10 °C	0 sec
Step 8.	End	

9.2.10. Plazmidtisztítás

Reggelre az előző nap beoltott 5 ml-es kultúrák zavarosak, ezeket Eppendorf csövekbe töltöttük és 13500 rpm fordulatszámmal 2 percig centrifugáltuk.

A fölülúszó leöntése után a sejtekből a QIAGEN Mini Kittel nyertük ki a DNS-t, majd a mintát 50 µl TE.oldatban oldottuk fel 4 °C-on.

9.2.11. PCR a plazmidokról szekvenáláshoz

A tisztított plazmidok szekvenálása nem mindig volt sikeres, ezért PCR-t készítünk róla a kolónia PCR-hez hasonló módon, de baktériumtelep helyett a plazmid templátból 1 µl-t adunk az elegyhez, amit fenol-kloroformos extrakció és etanolos kicsapást követően szekvenáltatunk.

9.2.12. DNS-minták koncentrációjának meghatározása

A DNS-minták koncentrációját spektrofotométerrel határoztuk meg víz háttérrel, 260 nm-en. Meghatároztuk az $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ arányt is a tisztaság vizsgálata érdekében, ami megfelelő tisztaságú minta esetén 1,8 és 2,0 között van. A háttérrel korrigált 260 nm-es értékből kiszámítottuk a koncentrációt: $c(\text{ng}/\mu\text{l}) = \text{hígítás} * A_{260,\text{korrig}}/0,02$

9.2.13. SDS-PAGE

9.10.táblázat. SDS gél összetétele

	desztillált víz	A-oldat	B-oldat	C-oldat
Alsó gél (12,5%)	5 ml	6,25 ml	3,75 ml	-
Felső gél	5,4 ml	2 ml	-	2,5 ml

Iniciáljuk a polimerizációt a gél oldatában:

- alsó gél: hozzáadunk 125 μl APS-t és 18,75 μl TEMED-et
- felső gél: hozzáadunk 50 μl APS-t és 7,5 μl TEMED-et

Az oldatok:

- A-oldat: 29 w/v% akrilamid, 1 w/v% N,N' -metilén-biszakrilamid B-oldat (500 ml, pH=8,8): 90,75 g Trizma bázis, 2 g SDS, 12 ml HCl
- C-oldat (500 ml, pH=6,8): 30,3 g Trizma bázis, 2 g SDS, 20 ml HCl
- APS (ammónium-perszulfát): -20°C-on tároljuk
- TEMED (N,N,N',N' -tetrametilén-diamin): 4°C-on tároljuk sötét üvegben
- 1 l elektroforézis puffer oldatot készítünk a 10x-es pufferből
(10×SDS PAGE puffer: 30.2 g Trizma bázis, 144 g glicin, 10 g SDS / 1000 ml)

Mintaelőkészítés: 5 ml-es kultúra

- 1) Eppendorf csőben 1,5 ml-t centrifugálunk az egyes mintákból az asztali centrifugán 13500 rpm fordulatszámmal, 1-2 percig.
- 2) A sejteket alapos vortexeléssel felfuszpendáljuk 300 μl jéghideg 1xPBS-oldatban. (10× PBS: 1.4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na_2HPO_4 , 18 mM KH_2PO_4 , pH 7.3). Mindent mindig jégen tartunk.
- 3) Lízis: 3x15 s-ig szonikáljuk jégen a mintákat és 9 μl -t félreteszünk SDS-PAGE-re (teljes fehérje frakció). Amplitudó: 60%

- 4) Centrifugálással (10 min, 13500 rpm, 4 °C) eltávolítjuk az oldhatatlan anyagot. A fölülúszót új Eppendorfba pipetázzuk, 9 µl-t félreteszünk SDS-PAGE-re (oldható frakció).
- 5) Az oldhatatlan anyagot újra felfuszpendáljuk 200 µl 1xPBS-ben. 1x15 s szonikálással diszpergáljuk az anyagot. 9 µl-t félreteszünk SDS-PAGE-re (oldhatatlan frakció).

Ezután mindhárom frakciót SDS-gélen futtatjuk. A 9 µl-es mintához 3 µl merkaptóetanol tartalmú festéket adunk és az így összekészített mintát 3 percig 100°C-on tartjuk és felvisszük a gélre. 30-60 mA-t használva futtatjuk a mintát. A gél előhívása előtt desztillált vízzel 3-4-szer lemossuk, majd annyi festékoldatot öntünk rá, hogy ellepje. Lassú mozgatással szobahőmérsékleten tartjuk 1 óráig, vagy egy éjszakán át, amíg sötétkék nem lesz. Végül ismét vízzel lemossuk a gélt.

9.2.14. *OD₆₀₀ mérés*

BL21-es sejtekbe transzformáltuk a fragmenseket és egy éjszakán át inkubáltuk. Ezt követően 5ml ampicillines tápoldatba átoltottuk a kiválasztott telepeket és újabb egy éjszakán át inkubátorban hagytuk felszaporodni a sejteket. Másnap a kultúrából 1 ml-t új, 5 ml ampicillines tápoldatba öntöttünk. 37°C-os vízfürdőben inkubáltuk és 30 percenként megmértük az oldat optikai sűrűségét DEN-1B McFarland Densitometer-rel. Ez a műszer mcF-ben adja meg az értéket, 3 mcF körülbelül 0,6 OD₆₀₀-nak felel meg. 0,4 és 0,6-os OD₆₀₀ között IPTG-t adtuk hozzá, ezzel indukálva a fehérjetermelést.

9.2.15. *Agaróz gél elektroforézis*

A kísérletek során minden lépés után agaróz gél elektroforézissel ellenőriztük a mintákat. A gélelektroforézis során az elkészített gélt elhelyezzük a futtatókádban, melyben annyi TAE pufferoldat található, amennyi ellepi a gélt. A gélben a géllöntés során kialakított mélyedésekbe ún. zsebekbe juttatjuk pipetta segítségével a DNS-t tartalmazó oldatunkat. A DNS felvitele során glicerint is adunk hozzá annak érdekében, hogy a DNS a zsebben maradjon az elektroforézis kezdetéig. Ha követni akarjuk az elektroforézis előrehaladását,

akkor festéket kell adagolnunk a DNS molekulákhoz. Erre alkalmas például a brómfenolkék és a xilén cianol. Miután elhelyeztük a DNS-t tartalmazó oldatokat a zsebekben feszültséget kapcsolunk a készülékre, aminek a hatására a DNS molekulák elmozdulnak a pozitív pólus felé. A vándorlás sebessége a DNS töltésétől, alakjától és méretétől, az elektromos térerőtől és a gél koncentrációjától függ.