

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék



Tudományos Diákköri Dolgozat

Cinkujj fehérjék tervezése, előállítása és tulajdonságaik vizsgálata

Csipak Brigitta

I. Vegyész Msc

Témavezető: Dr. Gyurcsik Béla
egyetemi adjunktus

2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1. Cinkujj fehérjék	3
2.2. A Zinc Finger Tools program	5
2.3. A cinkujj fehérjék specifikusságának vizsgálata	7
2.4. Cinkujj-fehérjék Ni^{2+} -ionnal előidézett hasadása	10
3. Célkitűzés	12
4. Kísérleti módszerek	13
4.1. A polimeráz láncreakció (PCR)	13
4.2. PCR termék tisztítása	14
4.3. DNS hasítás	14
4.4. Agaróz gélelektroforézis és tisztítás	14
4.5. Koncentráció-meghatározás - DNS	15
4.6. Ligálás	15
4.7. Transzformálás	16
4.8. Mesterlemez készítése, „Colony”-PCR és a ligálás sikerességének ellenőrzése	16
4.9. Szekvenálás	17
4.10. Fehérjék kifejezése és tisztítása	17
4.11. SDS-PAGE	18
4.12. Koncentráció-meghatározás – fehérje (Bradford-módszer)	18
4.13. Gél-eltolódás kísérletek	19
5. A kísérleti eredmények és értékelésük	20
5.1. A Zinc Finger Tools programmal történt fehérjetervezés reprodukálása	20
5.2. A cinkujj fehérjékhez rendelhető specifikus DNS szakaszok kialakítása	21
5.3. A cinkujj fehérjék előállítása, tisztítása	27
5.4. Gél-shift kísérletek	31
5.5. Hidrolízis Ni^{2+} -ionokkal	34
6. Összefoglalás	36
7. Irodalomjegyzék	38
8. Függelék	41

1. Bevezetés

A cinkről tudjuk, hogy az emberi szervezet számára létfontosságú. Toxikus hatása nagyobb dózisok esetén sem ismeretes. Hiánya viszont pl. növekedési rendellenességeket okoz. Már régebben is ismeretes volt, hogy szinte kizárólagos szerepe van a peptidhormonok felszabadításában, és hogy nagy koncentrációban van jelen például a növényi pollenekben, de csak 1983-ban vált nyilvánvalóvá jelenléte egy DNS-kötő transzkripciós faktorban (TFIIIA). Azóta már tudjuk, hogy a cink számos metalloproteinben és metalloenzimben megtalálható. A cinktartalmú metalloproteinek egy családját alkotják, az úgynevezett cinkujj fehérjék, melyek a Zn^{2+} -ion által kialakított ujjszerűen feltekeredett szerkezetükről kapták a nevüket. Egy ilyen fehérje rendszerint több ujjból áll, melyekben a fémionok megkötődésének lehetőségét ciszteinekből származó kén-donoratomok és hisztidinekből származó nitrogén-donoratomok biztosítják. Az egyes ujjakon jól megőrzött helyzetben aromás gyűrűt tartalmazó aminosavak (fenilalanin, tirozin) találhatók. Ezen oldalláncok révén képesek a cinkujj fehérjék a DNS-sel szekvencia-specifikus kölcsönhatásokat kialakítani a DNS nagyárbában. [1] DNS kötő tulajdonságuk mellett, ha ezekhez a fehérjékhez egy endonukleáz domént fűznek, akkor az így kialakított cinkujj nukleázokkal elérhető a DNS tetszőlegesen kiválasztott szekvenciánál történő hasítása. Mivel azonban a jelenleg ismert cinkujj nukleázok dimerként funkcionálnak, a specifikus hasítás igazolása még nem elegendő bizonyíték a specifikus DNS kötésre. Ugyanis a monomerek nonspecifikus kötődése még nem okoz kettősszalú hasítást. Továbbá a cinkujj nukleázok koncentrációjának növelésével, vagy a fehérje sérülése nyomán nonspecifikus megkötődés is és ennek következtében nonspecifikus hasítás is létrejöhet. Amennyiben az ilyen nemkívánatos eseményeket el tudjuk kerülni, a cinkujj fehérjék és nukleázok a genetikai betegségek gyógyításában nyithatnak új távlatokat.

Ilyen betegség pl. a Duchenne-féle izomdisztrófia, az izomsorvadásos megbetegedések leggyakoribb változata, mely ~3500 fiúból egyet érint. A betegséget okozó gén az X kromoszómán található, recesszív öröklődésű, így a nők következmények nélkül hordozhatják, mivel két X kromoszómájukból, ha az egyik hibás is, a másik átveheti annak szerepét. Fiúknál azonban az örökölt hibás génszakasz zavarokat okoz a disztrofin fehérje kifejeződésében, mely az izomsejtek citoplazmája és membránja közötti kapcsolat kiépítéséért felelős. A fehérje hiányában a sejtmembrán

Kutatócsoportunkban a Zinc-Finger Tools nevű program segítségével egy Duchenne-féle izomdisztrófiában szenvedő beteg hibás génszakaszához várhatóan specifikusan kötődő cinkujj fehérjét terveztünk, ami a ZF1 nevet kapta. Ennek aminosav sorrendje az 1.1. ábrán látható.

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

1.1. ábra: A ZF1 cinkujj fehérje szekvenciája. A három ujjhoz tartozó aminosavakat egymás alá helyeztük el a hasonlóság kiemelése céljából. A félkövérrel kiemelt aminosavak a DNS-kötés specifikusságát határozzák meg (ld. később).

A fehérje három ujjrészből épül fel, melyek egyenként három-három bázist ismernek fel a célszekvencián. Szakdolgozat Tudományos diákköri dolgozatomban a fenti cinkujj fehérje előállítását, tisztítását, valamint a DNS-kötés specifikusságának tanulmányozását végeztem el egy általam megtervezett és előállított tesztrendszerben egy már ismert specifikussággal rendelkező USZF nevű cinkujj fehérjével összehasonlítva.

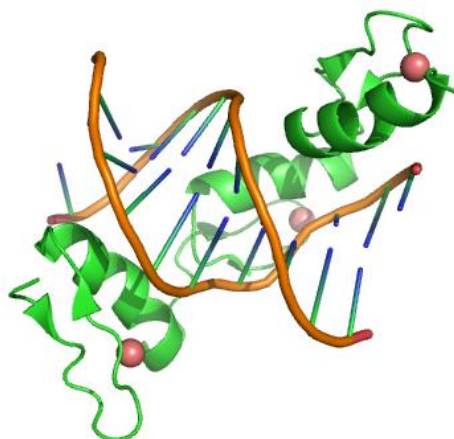
2. Irodalmi áttekintés

2.1. Cinkujj fehérjék

Az élő szervezetben a cinkujj fehérjék a nukleinsavak specifikus szekvenciáinak felismerésében vesznek részt. Ezeket a fehérje doméneket először transzkripció faktorokban mutatták ki, melyek az élő sejtekben a gének-aktivációját és inaktivációját szabályozzák. Mindebből kiindulva mesterségesen előállított cinkujj fehérjék is alkalmasak lehetnek terápiás génszabályozásra. [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]

Egy cinkujj domén általános aminosav szekvenciája a következőképpen írható fel: (Tyr,Phe)-X-Cys-X_{2,4}-Cys-X₃-Phe-X₅-Leu-X₂-His-X₃₋₅-His [10] Egy ilyen domént két antiparallel β -redő és egy α -hélix alkot. A Zn^{2+} -ion a β -redőn található két cisztein, és a hélixen található két hisztidin oldalláncainak donoratomjaihoz koordinálódik. A megfelelő szerkezet kialakulásához elengedhetetlen a fémion megkötése, azonban toxikus fémionok is kerülhetnek a Zn^{2+} -ion helyére, ami a szerkezet megváltozását idézi elő a fehérjében.

A Cys2-His2 családba tartozó cinkujj fehérjék aminosav szekvenciájának vizsgálata során a fehérje-DNS kölcsönhatás egyfajta szabályozottságára bukkantak a kutatók. Minden cinkujj domén a DNS-en levő kiterjedtebb felismerési helyen egy-egy kisebb egységgel lép kölcsönhatásba. Ezt alátámasztották, az eddigi ismereteket pedig kibővítették a Zif268-as cinkujj fehérje DNS-sel alkotott komplexének 3D szerkezetének meghatározásával. Az említett fehérje szerkezetéből megállapították, hogy: (1) minden egyes cinkujj domén egy három bázispárból álló alegységgel hat kölcsön specifikus kölcsönhatásba lépve azokkal a DNS nagyárkában úgy, hogy az egyes alegységek közvetlen szomszédságban állnak; (2) a fehérje-DNS szekvencia-specifikus kölcsönhatásokat minden cinkujj domén α -hélixének kezdetétől számított - 1,2,3 és 6-os helyzetben levő aminosavai határozzák meg; (3) a fehérje legtöbb esetben csak a DNS egyik szálával kerül kölcsönhatásba; (4) a DNS megközelítőleg B-formát vesz fel, de szerkezete enyhén torzult, ami csökkent helikális csavarban és egy kiterjedtebb nagyárokban nyilvánul meg. Ezt az egyszerű képet azonban újabban árnyalta, hogy számos további cinkujj fehérje DNS-sel alkotott komplexeinek szerkezetét határozták meg röntgendiffrakciós módszerrel. Egy ilyen szerkezetet mutat a (2.1. ábra).



2.1. ábra: Egy cinkujj – DNS komplex kristályszerkezete a PyMol programmal ábrázolva [Pdb kód: 1A1L]

Ezek alapján az α -hélix kezdetéhez viszonyított -1, 1, 2, 3, 5 és 6 aminosavakat tartják felelősnek a specifikus DNS kötésért, de ugyanakkor a β -kanyarban levő aminosavak milyensége is befolyásolja a cinkujj fehérjék DNS kötő sajátságait [11, 12]. Ezek változtatásával bármilyen tetszőleges DNS szekvenciát specifikusan megcélozhatunk különálló cinkujj doménekből összefűzött fehérjékkel. Specifikus cinkujjak tervezése tetszőlegesen választott DNS szekvenciára azonban nem könnyű feladat, figyelembe kell venni ugyanis az összekötő szekvenciát is az egyes ujjak között [13, 14]. Ezen fehérjék tervezésekor korábbi kísérleti eredményeket [15, 16, 17], már ismert tulajdonságú cinkujj fehérjékből álló könyvtárakat [18, 19], vagy közvetlen affinitás alapú kiválasztási módszereket - mint pl. a fág-, riboszóma vagy mRNS könyvtárak - használnak fel. A cinkujjak nagyszámú variációs lehetőségei miatt egyedi cinkujj doméneket elsősorban a fenti módszerek ötvözésével, *de novo* tervezik meg. Az így nyert doméneket ezután kombinálhatjuk a kiválasztott célszekvenciának megfelelően. [20, 21] Az összefűzött cinkujj domének közti kölcsönhatások erősíthetik, vagy gyengíthetik egymás kölcsönhatását a DNS-sel. [22] Habár több mint négy ujjból álló cinkujj fehérjék is megtalálhatók a természetben, az ezekben fellépő szerkezeti feszülések csökkenthetik a DNS-sel alkotott komplexeik stabilitását. A feszülés elkerülése érdekében a hat ujjat tartalmazó fehérjéket összekötő szekvenciákkal látták el, melyek a két, három ujjból álló rész között találhatók. Az így létrehozott fehérjék

nem folytonos célszekvenciák felismerésére képesek, és az összekötő szakasz szerepet kaphat, pl. a megkötött DNS hasításában. A felsorolt kölcsönhatásokat mind figyelembe kell venni egy-egy új cinkujj fehérje megtervezésekor.

A cinkujj fehérjék specifikussága kritikus pontja azok terápiás alkalmazásának. Így elengedhetetlenné válik, hogy jobban megértsük e fehérjék és a DNS közötti kölcsönhatásokat. Ebből a célból folyamatosan bővülő adatbázisokat és programokat hoznak létre. A bioinformatikát, csakúgy, mint az elméleti számításokat is alkalmazzák manapság, beleértve a dokkolási kísérleteket, molekuláris dinamikát és szemiempirikus számításokat, hogy kiegészítsék a kísérleti eredményeket. Programok, melyek cinkujj fehérjék tervezésében nyújtanak segítséget bárki számára elérhetők bizonyos weboldalakon is: ZifiT (<http://zifit.partners.org/ZifiT/>), Zinc Finger Tools (<http://www.scripps.edu/mb/barbas/zfdesign/zfdesignhome.php>), FoldX (<http://foldx.crg.es/>).

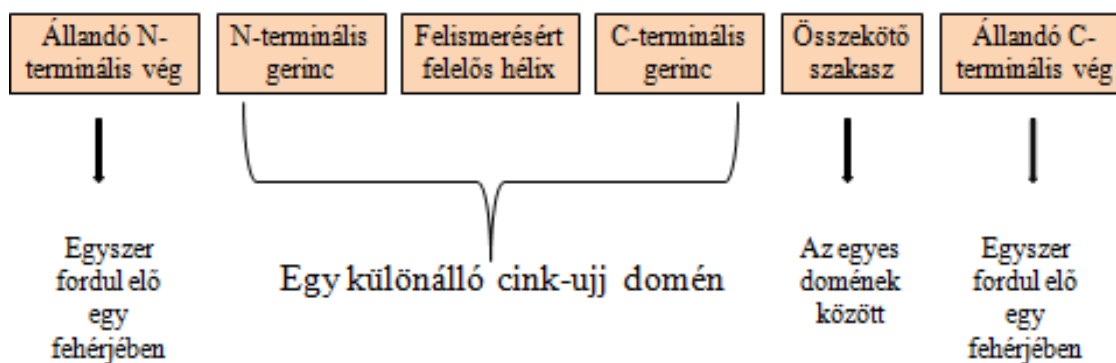
2.2. A Zinc Finger Tools program

A cinkujj fehérjék tervezésének területén kitűzött egyik cél az, hogy a cinkujj domének olyan tárházát hozzák létre, melyben megtalálhatók mind a 64 lehetséges DNS bázishármast nagy specifikussággal és affinitással felismerő cinkujj domének. Mindehhez fág-könyvtárakat, szerkezeti becsléseket és természetben is előforduló cinkujj doméneket vették alapul. A következő lépés az, hogy különböző ilyen doméneket úgy fűzzük össze, hogy a kapott cinkujj fehérje képes felismerni 9-18 bázispár hosszúságú DNS szakaszokat megtartva az egyes ujjak specifikusságát és nagy affinitását.

Korábban csak a megfelelő szakértelemmel rendelkező laboratóriumokban tudtak a cinkujjak ígéretes technológiájával foglalkozni. Mostanában azonban a cinkujj fehérjék széleskörű figyelemre tettek szert. Sajnos a sikeres tervezés nem triviális. Először is, a megfelelő célszekvencia kiválasztásának sikere a nagy specifikusságú és affinitású domének ismeretétől függ, aminek az irodalomból való begyűjtése nem mindig egyértelmű. Másodszor, a kívánt hosszúsággal és bázisösszetétellel rendelkező cél-DNS szakasz megtalálása hosszadalmas és fárasztó munka lehet a humán genomban. Végül a teljes fehérjeszekvencia összeállítása megköveteli a gerinc és az

összekötő szekvenciák ismeretét. Mindemellett figyelembe kell venni azt is, hogy a cinkujj fehérjék N-terminális vége a DNS célszekvencia 3' végéhez kötődik.

A Zinc-Finger Tools egy interneten keresztül bárki számára elérhető program, melynek célja, hogy fejlessze ezt a területet, és több kutatónak tegye elérhetővé a cinkujj fehérjék tervezésének lehetőségét. A program a lehetséges célszekvenciák azonosítását, és egy adott kötőhelyhez vélhetően specifikusan kapcsolódni képes cinkujj fehérje aminosav sorrendjének megtervezését segíti. A cinkujj domének gerincét alkotó szekvencia megalkotásához egy a Cys2-His2 cinkujj fehérjék családjába tartozó fehérjét, a humán transzkripciós faktor SP1-et veszi alapul. Az N-terminális végen található, β -redőt alkotó, YKCPECGKSFS aminosavakat (a β -redő aláhúzva) és a C-terminális végen elhelyezkedő α -hélixen levő HQRTH aminosavakat ebből a fehérjéből kölcsönözték. Egy másik szintén használatos szerkezet a rágcsáló transzkripciós faktor Zif268 fehérjéből származik. Az ujjakat összekötő szekvencia (TGEKP) a Transzkripciós Faktor adatbázisban meglévő információkból létrehozott konszenzus szekvencia. Ez csak az egymás utáni cinkujjak közé kerül be, így ha valaki egy egy cinkujjból álló fehérjét szeretne létrehozni, ez a szekvencia abban nem lesz benne. A cinkujj fehérjék ily módon történő felépítését a 2.2. ábra mutatja be.



2.2. ábra: A Zinc Finger Tools program által alkalmazott fehérjeépítőkövek.

A programmal folytonos – egy szálon levő megszakítás nélküli bázisstriplettek sora - és különálló célszekvenciákat is módunkban áll keresni. A kereséshez meg kell adni egy minimális hosszúságot bázispárban mérve. Különálló célszakaszok keresésekor a megadott hosszúság felének megfelelő hosszúságú szakaszt fog keresni a

program úgy, hogy az egy felhasználó által kiválasztott „maggal” legyen elválasztva, melyhez nem kötődik cinkujj fehérje. Fel is térképezhetjük az összes, a felhasználó által megadott DNS szekvencián levő cinkujjakkal megcélozható szakaszt. Mivel ezek között átfedés lehetséges, ez a funkció csak a célszekvenciák összességének vázolására alkalmas, nem feltétlenül mutatja meg az egyes különálló célszekvenciákat. [23]

2.3. A cinkujj fehérjék specifikusságának vizsgálata

A fentiekben leírtaknak megfelelően kutatók megkíséreltek úgy cinkujj fehérjéket létrehozni, hogy egy konszenzus szekvencián belül 24 aminosavat érintetlenül hagytak, a négy specifikus felismerésben szerepet játszó – kontakt – aminosavat pedig megváltoztatták. A konszenzus szekvencia használatának előnye az, hogy vizsgálhatjuk csak a megváltoztatott aminosavak hatását a specifikusságra, más egyéb kölcsönhatások megváltoztatása nélkül. További előnye, hogy magába foglalja azokat az aminosavakat, amik szekvencia-független kölcsönhatásba léphetnek a DNS-sel, és nagyon stabil szerkezeteket alkotnak, ami fémion affinitásuk és EDTA-val szembeni ellenállóságuk alapján igazolható. Egy ilyen konszenzus szekvencia alapján előállított, három ujj-részből álló cinkujj fehérje DNS-hez való kötődését kísérleti úton részletesen megvizsgálták [24]. A fehérje DNS komplexének röntgen-diffrakciós szerkezetét sikerült megfejteni. Ezen eredmények sok hasznos információt szolgáltatnak a DNS-kötés specifikusságát meghatározó kölcsönhatásokról.

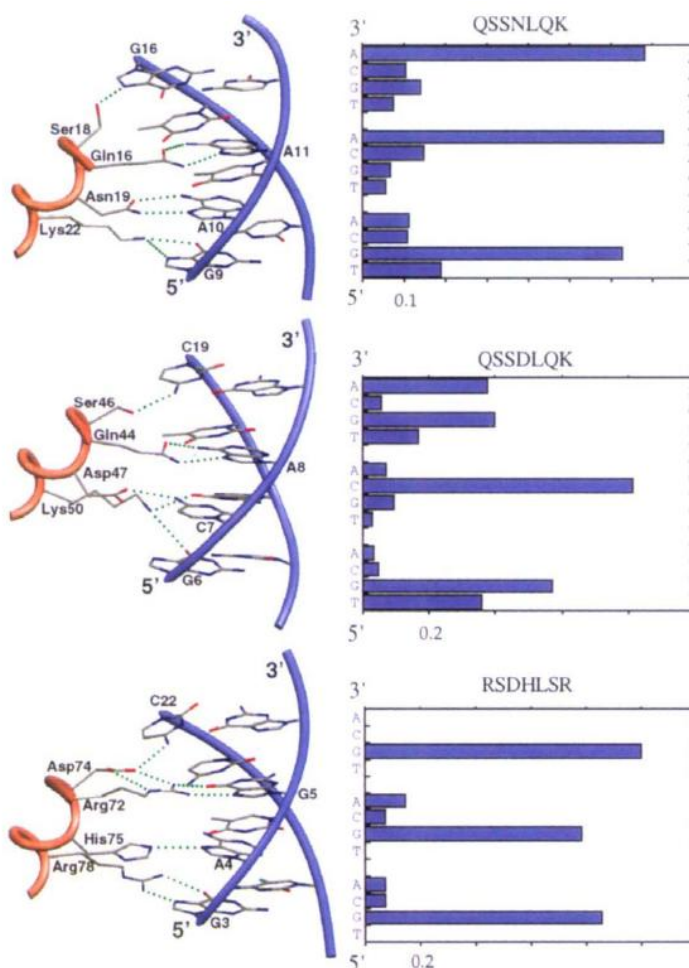
A 2.3. ábra a) részén a cinkujj fehérje szekvenciája látható összehasonlítva az általunk tanulmányozni kívánt fehérje aminosav-sorrendjével. Jól felismerhető a megőrzött konszenzus szekvencia, és benne az egyes ujjakban változtatott aminosavak. Az ábra b) részén pedig a specifikusságért felelő aminosavak kölcsönhatásai láthatók. Az ábráról az is leolvasható, hogy sok esetben az egy ujj által felismert bázishármason belül az egyes bázisokkal kialakított specifikusság nem tökéletes. Az első ujj pl. mind a három kötési pont esetében a lehetséges négyféle bázis közül eggyel a többihez képest kiemelkedő affinitással alakít ki kölcsönhatást. A második ujj első kötőhelyén viszont az adenzin és a guanozin, a harmadik kötőhelyén pedig a guanozin és a timidin nagyon hasonló kölcsönhatást alakít ki, így a megkötődés specifikussága csökken.

a)

-1123 56

LEP
 GEKPYKCPECGKSFS**DP**GALVRHQRTHT
 MEKPYKCPECGKSFS**QSSNLQKH**QRTHT
 GEKPYKCPECGKSFS**RS**DKLVRHQRTHT
 GEKPYKCPECGKSFS**QSSDLQKH**QRTHT
 GEKPYKCPECGKSFS**TH**LDLIRHQRTHT
 GEKPYKCPECGKSFS**RS**DHLSR**H**QRTHTQ
 GK KTS
 NKK

b)



2.3. ábra: a) A vizsgált cinujj fehérjék szekvenciái (feketével az általunk előállított fehérje). **b)** Az egyes cinujj domének DNS-t alkotó bázisokkal kialakított kölcsönhatásainak sematikus ábrája (fentről lefelé az 1-es, 2-es és 3-as ujj). Mellettük a megkötődés kedvezményezettsége a kötőhelyen levő egyes bázisokra nézve. Az ábrázolt értékeket az 1-es és 2-es ujjra hosszúság-alapú multiplex kötőhely tanulmányokból nyerték, a 3-as ujjra pedig 13 válogatott szekvenciából számolták. [24]

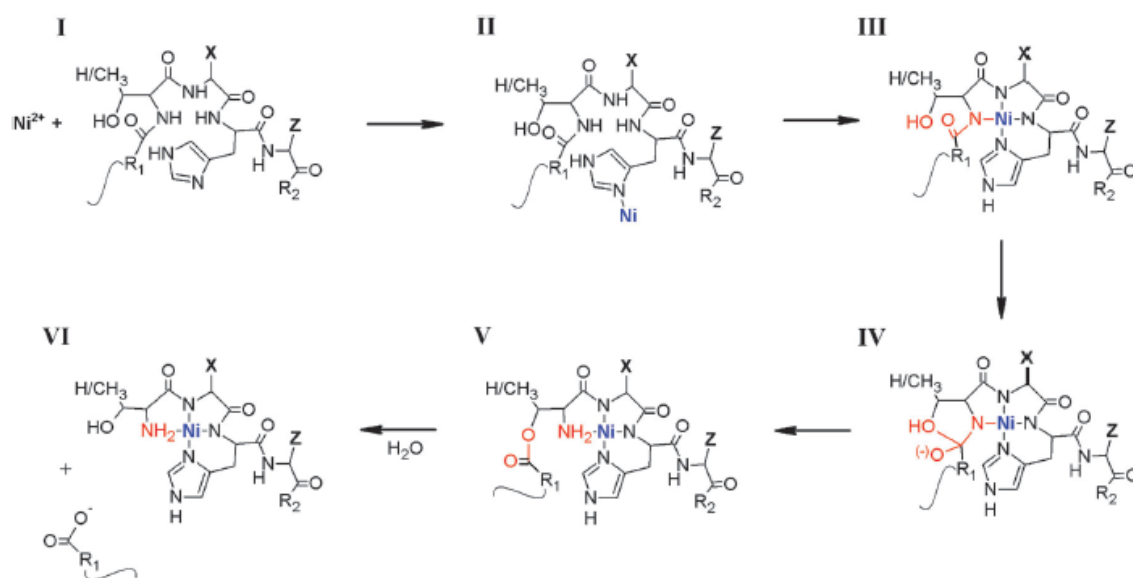
A harmadik ujj az első kötőhelyén szinte kizárólagosan a guanozinnal lép kölcsönhatásba az adott kontakt aminosavval kialakított hidrogénkötésen keresztül. Mindebből arra következtethetünk, hogy viszonylag egyszerűen lehet olyan szekvencia-specifikus DNS-kötő fehérjét tervezni, melyek kontakt aminosavai hidrogén-kötések hálózatán keresztül lépnek kölcsönhatásba a DNS bázisaival. Habár a természetben előforduló cinkujj fehérjék sokkal változatosabb képet mutatnak kölcsönhatásaikban a DNS-sel, az olyan fehérjék, melyek egy rögzített aminosav-keretszekvenciát tartalmaznak, beleértve az összekötő szekvenciákat, sokkal könnyebben szabályozható módon működnek. Továbbá a fent említett tervezett fehérje kiterjedtebb szekvenciafüggő kölcsönhatásokat mutat, mint amit a természetes cinkujj-DNS komplexekben megfigyeltek, mert az esetek túlnyomó többségében minden bázispár kettő vagy több hidrogénkötést alakított ki. Ezen eredmények igazolták azt is, hogy az először a Zif268-ban megfigyelt moduláris kölcsönhatások felhasználhatók az új szekvencia-specifikus DNS-kötő fehérjék tervezésének megalapozásában. Ily módon egy új utat nyitottak a kölcsönhatás specifikussága meghatározó elemeinek felderítésére.

Egy másik módja a cinkujj – DNS kölcsönhatás specifikusság vizsgálatának, ha a cinkujj fehérjét egy enzimátikus egységgel kapcsoljuk össze. Ennek alapján cinkujjakhoz a FokI restriktációs endonukleáz nukleáz doménjét fűzve mesterséges nukleázokat állítottak elő. Ily módon az enzimátikus hasítás specifikusságából következtethettek a DNS kötés specifikusságára. Mivel ez az új kimer metalloenzimek dimerként funkcionálnak, heterodimer (azaz két különböző cinkujj fehérjét tartalmazó enzim dimerje) formájában hosszabb DNS szekvenciát ismernek fel. Így, pl. a sejtekben kifejtett toxikus hatást, mint mellékhatást a kutatók egy csoportja csökkenteni igyekezett azáltal, hogy a heterodimer képződését elősegítő változtatásokat hajtottak végre a FokI dimerizációs felületen. [25] Számítógépes modellezést követően néhány megváltoztatott FokI dimerizációs felülettel rendelkező mesterséges cinkujj nukleázt állítottak elő, és vizsgálták tulajdonságaikat. Ehhez tesztrendszereket alakítottak ki. A módosított nukleázok hasítását *in vitro* vizsgálták a következőképpen: kétféle tisztított cinkujj nukleáz fehérjét olyan DNS fragmensekkel inkubáltak, melyek közül az egyik csak az egyik fehérje számára tartalmazott két kötőhelyet, a másik csak a másik fehérje kötőhelyeivel rendelkezett, a harmadikban pedig egy vegyes kötőhelyet alakítottak ki.

Utóbbi kötőhelyen heterodimerek képződhetnek, míg az előző kettőn homodimerek. Az inkubálás után az esetleges hasítás eredményét agaróz gélen ellenőrizték. Azt tapasztalták, hogy a homodimerek nem hasították egymás, illetve a heterodimerek kialakítására alkalmas kötőhelyeken a DNS-t. A továbbiakban egy másik tesztelési mód alapján is ellenőrizték az eredményt. A hasítással ugyanis a sejtekben ún. homológ rekombináció indukálható, ami egyfajta DNS javító mechanizmus. [25] Tudnunk kell azonban, hogy a dimerizáció követelménye azt eredményezi, hogy az ilyen tesztrendszerben csak a dimerek, de nem az egyes cinkujjak DNS kötésének specifikusságára, kapunk információt.

2.4. Cinkujj-fehérjék Ni^{2+} -ionnal előidézett hasadása

A nikkel(II)vegyületek az emberi szervezetre mérgezőek, belégzéssel a szervezetbe jutva rákot, bőrrel érintkezve allergiás reakciókat okozhatnak egyes embereknél. Ni^{2+} -ionokról kimutatták, hogy képesek Naa-(Ser/Thr) aminosavakat tartalmazó peptid kötések hidrolízisére Naa-(Ser/Thr)-Xaa-His-Zaa szekvenciákban, ami a természetben is gyakran előfordul, például humán transzkripciós faktorok Cys2-His2 szerkezetű ujjában. (Naa tetszőleges aminosav lehet.) Lengyel kutatók két ilyen fehérje ujjairól mintázott peptidekkel modellezték a Ni^{2+} -ion katalizálta hidrolízist, melyhez az Sp1 transzkripciós faktor harmadik, és a ZNF302 transzkripciós faktor első ujját vették alapul. Kísérleteiket 8,2-es pH-n, HEPES-sel pufferelt közegben végezték 60 °C-on, a hidrolízist HPLC/ESI-MS-sel követték nyomon. Párhuzamosan Zn^{2+} -ionokat is tartalmazó mintákat is vizsgáltak, de nem tapasztaltak különbséget sem a hasadás helyében, sem a kinetikában, csupán a hidrolízis sebessége csökkent le jelentősen. Mindkét modell-peptid esetén tapasztaltak hasadást a kívánt szekvenciánál, azonban az eredmények és a mechanizmus ismerete alapján kisebb pH-n és hőmérsékleten (fiziológiai körülmények között) a reakció nagyon lassú lenne. [26]



2.4. ábra: Ni^{2+} katalizálta peptidhidrolízis mechanizmusa (a hidrolitikus komplex és a termék szerkezete mutatja, hogy a Zn^{2+} -ion jelenlétében is lejátszódhat a reakció) [26]

3. Célkitűzés

Munkám során adott DNS-szekvenciákat felismerő, és azokhoz specifikusan kötődni képes cinkujj fehérjékkel foglalkoztam. Célul a megtervezett fehérjék előállítását, és vizsgálatát tűztük ki, DNS-hez való kötődésük milyenségének, és Ni^{2+} -ionok jelenlétében esetlegesen lejátszódó reakciójuk szempontjából. Ennek érdekében a következő kísérleteket terveztük meg:

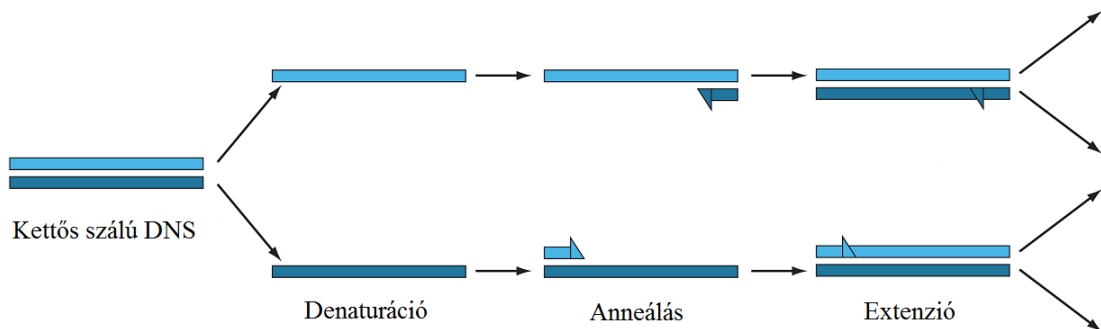
- a vektorba ültetett génről a ZF1 fehérje kifejezése bioszintézissel, tisztítása affinitás-kromatográfiás módszerrel;
- a DNS célszekvencia előállítása, beültetése plazmidba és sokszorozása bioszintézissel; egy a célszekvenciát tartalmazó rövidebb DNS szakasz sokszorozítása Polimeráz láncreakcióval az előállított plazmidról;
- agaróz-gél-eltolódás kísérletek az előállított fehérje és a DNS célszekvencia kölcsönhatásának tanulmányozása céljából;
- referenciaként ugyanennek a műveletsornak végrehajtása az USZF nevű, mások által tanulmányozott, specifikus cinkujj fehérjével [25].
- Ni^{2+} -ionok oldatával történő inkubálás az esetleges hidrolízis vizsgálatára [26]

További szándékunk ezekhez a fehérjékhez egy a DNS hasítására képes részlet (endonukleáz) hozzáfűzése, mellyel a hasítás tulajdonságai is vizsgálhatóvá válnának, illetve a megkötődés és a hasítás közti kapcsolatot is tanulmányozhatnánk. Kísérleteink egy másik iránya pedig a Ni^{2+} -ionok okozta hidrolízis felhasználása a DNS fehérjével egyidejűleg történő hasítására.

4. Kísérleti módszerek

4.1. A polimeráz láncreakció (PCR)

A polimeráz láncreakció segítségével egy általunk kijelölt DNS szakaszt sokszorosíthatunk rövid idő alatt, nagy mennyiségben (4.1. ábra). A reakciónak négy fontos összetevője van: (1) a templát DNS, mely tartalmazza a sokszorosítani kívánt szakaszt, és a folyamat során mintaként szolgál; - (2) primerek – néhány bázispár hosszúságú DNS darabok, oligonukleotidok – melyek a templáton a megfelelő komplementer szekvenciához tapadva kijelölik a sokszorosítandó szakasz kezdeti és végpontját; (3) a létrejövő új DNS szál dNTP-kből (dezoxi-nukleotid-trifoszfátok) épül fel; (4) mindezt a polimeráz enzim teszi lehetővé pufferelt, Mg^{2+} -ionokat tartalmazó közegben.



4.1. ábra: A PCR sematikus ábrázolása.

A reakciót egy speciálisan kialakított fűthető tetővel rendelkező PCR készülékben végezzük el. A PCR elegyeket az erre használatos vékonyfalú PCR-csövekben helyezünk a készülékbe. Első lépésben az elegyet magas, 94-97 °C-os hőmérsékletre melegítjük fel, mely a kettősszálú templát DNS szétválását eredményezi (denaturálás). Ezután az alkalmazott primerek olvadáspontjának megfelelő, általában 50-70 °C tartományba eső hőmérsékletre hűtjük vissza. Ennek során a primerek a képződött egyszálú DNS komplementer szakaszaival összetapadnak (hibridizáció, anneálás). Végül az így kijelölésre került szakaszon a polimeráz enzim a már említett dNTP-kből a primerektől kiindulva felépíti az új szálát (meghosszabbítás, extenzió). Ez a három lépés alkot egy ciklust, melyet 25-30-szor végrehajtva a cél DNS szakasz eredeti mennyiségének milliárdszorosa keletkezhet. Fontos megemlíteni az alkalmazott polimeráz enzim egy különleges tulajdonságát, a jó hőtűrő képességét, mely a reakció

során alkalmazott magas hőmérsékletek végett elengedhetetlen. A polimeráz láncreakció sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőrizzük (ld. később)

4.2. PCR termék tisztítása

Annak érdekében, hogy a PCR-ben előállított DNS fragmenst tartalmazó, tiszta oldatot nyerjünk, elsőként fenol-kloroform eleggyel extrakciót hajtottunk végre. Ehhez a szerves oldószerkelet és a PCR elegy 1:1 térfogatarányú keverékét használtuk. A fenol szerepe a szennyeződések (pl. fehérjék, mint a polimeráz enzim) eltávolítása, míg a kloroform, illékonyságának köszönhetően a fenolt távolítja el. Az extrakció után a felső, DNS-t tartalmazó fázis egy pipetta segítségével leszívható. Ezt követően az elegyben levő oldott DNS-t abszolút etanollal csaptuk ki Na-acetátos közegben, és 70%-os hideg etanollal mostuk. Végezetül TE-ben oldottuk fel, miután steril fülke alatt a maradék etanolt elpárologtattuk róla.

4.3. DNS hasítás

Hogy az előzőekben előállított fragmenst egy cirkuláris DNS hordozóba (vektorba (pGEX-6P-1)) beilleszthessük, először mindkettőt el kellett hasítanunk specifikus nukleáz enzimmel. Ezt az enzimes emésztést az EcoRI restrikciós endonukleázzal végeztük. Ez a baktériumok védekezésére is szolgáló enzim, mint a restrikciós endonukleázok többsége, palindrom szekvenciát ismer fel a DNS-en (GAATTC), ahol dimerizálódva kettős szálú hasításra képes. Így mind a vektoron, mind a fragmenszen egyforma, ún. ragadós végek jönnek létre. A vektor önmagával történő újbóli összezárulását megelőzendő alkalikus foszfatázt is alkalmaztunk, ami az 5' végen levő foszfátcsoportot távolítja el.

4.4. Agaróz gélelektroforézis és tisztítás

Agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, hogy sikerrel jártunk-e a hasítás során. Ennek érdekében a hasítási elegyekből megegyező mennyiségeket kivéve, azokat festékkoldattal összekeverve az előre elkészített agaróz gél zsebeibe vittük föl, miután azt az erre a célra használatos futtatókádba, pufferoldatba helyeztük. Egyenáramot alkalmazva adott ideig futtattuk. A DNS-t etídium-bromiddal tettük láthatóvá a gélben, ami a DNS-szálnak ékelődve UV-fénnyel történő megvilágítás hatására fluoreszkál. A DNS negatív töltése révén az anód felé vándorol a gél üregeiben. A nagyobb méretű

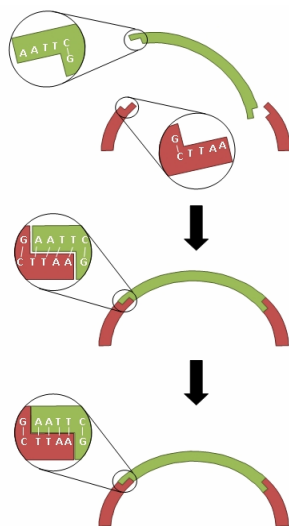
DNS nehezebben jut előre, így méret szerinti elválasztás valósítható meg. A vizsgált DNS fragmensek mérete egy ismert méretű DNS fragmensekből álló marker mintával történő összehasonlítással becsülhető. Az eredmény a géldokumentációs készülékben digitálisan rögzíthető. Miután meggyőződünk a kísérlet sikerességéről, a fent leírt fenol-kloroformos extrakciós módszerrel tisztítottuk meg az oldatokat.

4.5. Koncentráció-meghatározás - DNS

A további kísérletezéshez szükség volt az oldatok koncentrációinak ismeretére. Erre a célra UV-spektrofotometriás módszert alkalmaztunk. A 200 nm-től 300 nm-ig terjedő intervallumban vettük fel a steril víz, a fragmensoldat és a vektoroldat spektrumait, majd a steril víz spektrumával korrigálva a másik kettőt, a koncentrációt a 260 nm-en mért abszorbancia-értékekből számítottuk ki.

4.6. Ligálás

Ebben a lépésben a kisméretű DNS fragmenst kíséreltük meg beépíteni a vektorba. Ehhez már az előző lépések során kialakítottuk a ragadós végeket, megtisztítottuk az oldatokat és meghatároztuk azok koncentrációit, ami alapján meghatároztuk az összemérési arányokat is.



4.2. ábra: A ligálás sematikus ábrázolása.

A ligálás során elsőként a ragadós végek hibridizációja játszódik le, majd a ligáz enzim kialakítja az új foszfodiészter kötéseket (4.2. ábra). A ligáláshoz T4 ligáz enzimet és a

hozzátartozó pufferoldatot használtuk. Összehasonlító kísérleteket is végeztünk: hasítási kontrollként olyan elegyet mértünk össze, amiben csak a vektor volt, ligáz enzim nem, ligálási kontrollként pedig egy vektort és enzimet igen, de a cél DNS fragmenst nem tartalmazó elegyet állítottunk össze. Ezután a fragmenst és a vektort változó arányban tartalmazó elegyeket készítettünk, majd 48 órára a 4 °C-os hűtőbe tettük őket.

4.7. Transzformálás

Transzformáláson a ligálási reakció során nyert cirkuláris DNS bejuttatását értjük olyan ún. kompetens baktérium sejtekbe, melyeket előzőleg erre alkalmassá tettek. Fontos, hogy csak cirkuláris plazmidokat juttathatunk be a baktériumokba, mert ezeket ismerik fel sajátjaként. A DH10B kompetens sejtekhez jégén mértük hozzá a ligátumokat, majd rövid hősokknak tettük ki az elegyet 42 °C-on. Ennek során a kompetens baktériumok pórusai kitágultak, és a ligátum bediffundálhatott a sejt belsejébe. Ezt követően ismét jégre tettük az elegyeket, hogy a pórusok összezáruljanak, majd tápoldat hozzáadása után 37 °C-on inkubáltuk őket 1 órán át. Ezután lemezeken elkészített táptalajra kentünk ki az elegyekből egy alkohollal fertőtlenített meghajlított üvegbot segítségével, majd egy éjszakán át a 37 °C-os inkubátorba tettük a lemezeket, hogy baktériumtelepek növekedhessenek. Annak érdekében, hogy más baktériumok ne képezhessenek telepeket az említett lemezekben, a táptalajokba antibiotikumot tettünk, melyre nézve az általunk transzformált sejtek rezisztensek.

4.8. Mesterlemez készítése, „Colony”-PCR és a ligálás sikerességének ellenőrzése

Egy éjszaka elteltével, miután az előbb említett lemezekben felszaporodtak a baktériumtelepek egy-egy különálló telepet egy égetett végű fogpiszkáló segítségével egy másik táptalajjal ellátott lemezre vittünk át. Ezt nevezzük mesterlemeznek, aminek az aljára kívülről egy táblázatot rajzoltunk. Ennek minden cellájába minden lemezről egy-egy kiválasztott telep került. A fogpiszkálót e művelet után egy PCR reakcióhoz elkészített elegybe mártottuk, hogy a rajta maradt baktériumokban levő DNS templátként szolgálhasson az ún. „Colony”-PCR során. A „Colony”-PCR-re a ligálás sikerességének ellenőrzése miatt volt szükség. A reakcióban egy adott hosszúságú szakaszt sokszoroztunk a templát DNS-ről ami tartalmazza az általunk létrehozott és beépíteni kívánt fragmenst. Mivel agaróz gélelektroforézissel nem tudunk

meggyőződni a ligálás sikerességéről a fragmens kis mérete miatt, ezért hasítási próbát végeztünk. A SacI restrikciós endonukleáz enzimmal, puffereelt körülmények között végeztük az emésztést. A kísérlet alapja az volt, hogy ha a kívánt fragmens beépült a vektorba, akkor az új plazmidba bekerül egy SacI hasítóhely (a beépülés iránya ez esetben nem okozott gondot, mert palindrom szekvenciáról van szó). Így ezzel az enzimmal hasítva a „Colony”-PCR terméket a gélelektroforézis során egy rövidebb DNS darabnak és egy hosszabb DNS darabnak megfelelő sávot látunk, amennyiben a ligálás sikeres volt.

4.9. Szekvenálás

A SacI-es emésztés alapján sikeresnek mondható ligátumokból és a „Colony”-PCR-hez használt 5' primerből néhány μ l-nyit a Baygen Intézetbe vittünk, ahol kapilláris szekvenálással (ABI BigDye® Terminatorv3.1 kittel) megszekvánálták azt. Az eredmény az adott DNS-szakasz pontos bázissorendjét adja meg. Ennek alapján pedig végleges bizonyítást nyert, hogy a kívánt fragmens jó irányítással épült be a hordozó vektroba.

4.10. Fehérjék kifejezése és tisztítása

Rendelkezésünkre állt a ZF1 cinkujj fehérje génje pGEX-6P-1 hordozó vektorban, amit *E. coli* BL21 sejtekbe transzformáltunk, a 4.7. fejezetben már leírt módon. A BL21 sejtek olyan kompetens baktériumsejtek, melyeket fehérjetermelésre optimalizáltak. Transzformálás és átoltás során a sejtek szaporodnak, indukálószer (IPTG) hozzáadására viszont az általunk kívánt fehérje kifejeződése kezdődik meg nagy mennyiségben. Az indukálás után 2-3 óra elteltével a baktériumkultúrákat lecentrifugáltuk, majd az ülepített baktériumokat ultrahanggal roncsoltuk el 1×PBS oldatban. A szonikálás után oldatba került fehérjét affinitás kromatográfiás módszerrel tisztítottuk meg. Erre azért volt lehetőségünk, mert a vektorunk tulajdonsága, hogy a kifejeződött célfehérje egy GST fúziós fehérje lesz, ami azt jelenti, hogy esetünkben a cinkujj fehérjéhez annak N-terminális része felől egy glutation-S-transzferáz fehérje fűződött hozzá. Így a fehérjét Glutation Sepharose 4b gyantán meg tudtuk kötni, majd többszöri mosás után arról redukált glutation oldattal eluálni lehetett. Az eluálást követően a fehérjeoldatokat molekulaszűrőn centrifugáltuk át (Amicon Ultra – 0.5 Centrifugal Filter Devices (10 K)), amin az oldat redukált glutation-tartalma

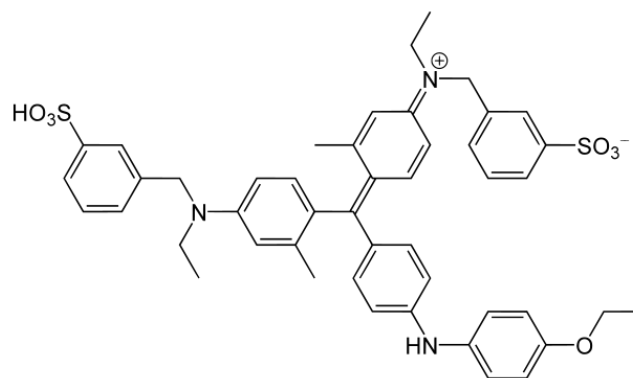
keresztülhaladt, a fehérje viszont kis térfogatban a szűrőn maradt. Ezt a maradék oldatot visszacentrifugálva töményebb, illetve redukált glutation-mentes fehérjeoldatot nyertünk.

4.11. SDS-PAGE

A fehérjével történő munka több fázisában is vettünk mintát az adott oldatokból, hogy SDS-PAGE módszerrel vizsgáljuk. A poliakrilamid-gélelektroforézisben (PAGE) használt gél két részből áll, melyek két üveglap között található, és akrilamid-koncentrációjukban különböznek. Maga az elektroforézis függőlegesen, pufferoldattal feltöltött kádban zajlik. A felső gél a zsebekbe felvitt minták egy szintbe hozásáért felelős (rétegző gél), míg az alsóban történik az elválasztás. A fehérjeoldatokhoz nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) és merkaptó-etanol tartalmazó oldatot adtunk. Az SDS, mint felületaktív molekula egyenletes eloszlásban tapad a fehérjékhez, denaturálja azokat és egységes, méretükkel arányos, negatív töltést biztosít nekik. Ezáltal egyenáramú elektromos térben azonos irányban, méretükkel fordítottan arányos sebességgel mozognak. Így az SDS-PAGE biztosítja az agaróz gélelektroforézisnél megismert méret szerinti elválasztást. Futtatás után a gél desztillált vízzel mostuk, és festékoldatba tettük egy éjszakára (Page Blue Protein Staining Solution), majd a felesleges festéket ismét desztillált vízzel mostuk ki a gélből. A digitalizáláshoz irattartó fóliába helyeztük, és beszkeneltük.

4.12. Koncentráció-meghatározás – fehérje (Bradford-módszer)

Fehérjeoldatok koncentrációjának meghatározására a gyakorlatban többféle spektroszkópiás módszer terjedt el. Ilyenek pl.: (1) A fehérje saját UV abszorbanciájának mérése; (2) Lowry-módszer; (3) Smith-módszer; (4) Bradford-módszer. Az utóbbi három fehérjefüggő színváltozást vizsgál. Ezek közül is a legszéleskörűbben alkalmazott a Bradford-módszer, ami a Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 festékmolekula elnyelésének megváltozásán alapul, amikor ahhoz fehérje kötődik. Erősen savas körülmények között a festékmolekula a kétszeresen protonált formájában stabilizálódik, ami piros színű. Fehérje hozzákötődése során azonban a protonátlan kék színű formája válik stabilabbá.



4.3. ábra: A CBB G-250 sematikus szerkezete.

Mi is ez utóbbi módszert alkalmaztuk. A kívánt fehérjeoldat koncentrációjának meghatározásához kalibráló oldatsorozat készítésére volt szükség. Ehhez szilárd szarvasmarha szérum albuminból (BSA) törzsoldatot, majd ebből megfelelő hígítási sorozatot készítettem. A kapott oldatokhoz azonos mennyiségű Bradford-reagenst adtam, és összerázás után szobahőmérsékleten 15 percre inkubáltam. Ezután megmértem a steril víz, a vakolat és az oldatsorozat tagjainak spektrumát a 400-700 nm tartományban. A 600 nm-en mért abszorbancia értékekből készítettem kalibráló egyenest, melynek egyenletéből, a hígítással számolva megkaptam a fehérjeoldataim pontos koncentrációját.

4.13. Gél-eltolódás kísérletek

A gél-eltolódás kísérletek során a fehérjék és a DNS fragmensek kölcsönhatását vizsgáltuk. PCR-ben sokszorozított, viszonylag rövid DNS-fragmenseket használtunk az eredmény jó láthatósága érdekében. A koncentrációk alapján adott molarányoknak megfelelő elegyeket készítettünk, amit állandó térfogatra egészítettünk ki, és fél órán át szobahőmérsékleten inkubáltunk. Ezután az elegyet azonnal agaróz gélre vittük fel, és a megszokott módon megfuttattuk. A kísérlet lényege, hogy a DNS-hez kötődő fehérjék megváltoztatják annak vándorlási sebességét a gélben.

5. A kísérleti eredmények és értékelésük

5.1. A Zinc Finger Tools programmal történt fehérjetervezés reprodukálása

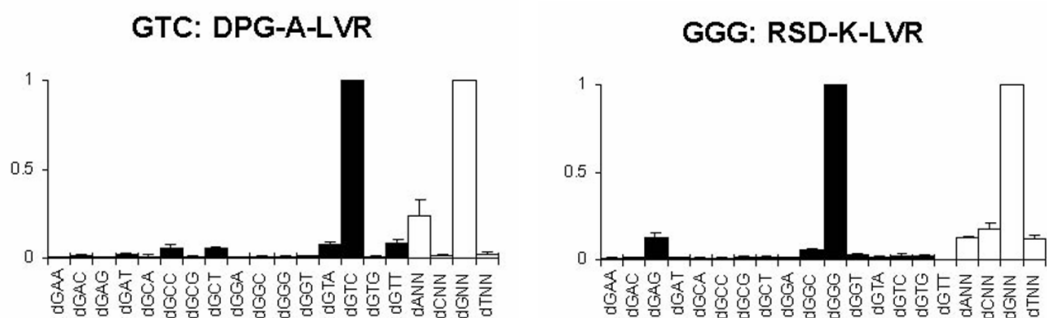
Kutatócsoportunk korábban már megtervezett egy cinkujj fehérjét (ZF1), amihez egy Duchenne páciens DNS-ét vették alapul. Egy egészséges ember DNS-ével összehasonlítva megkeresték azt a töréspontot, ahol a disztrofint kódoló DNS szakasz meghibásodott. Ennek a pontnak a szűkebb környezetében kerestek olyan bázishármasokat, melyekhez specifikusan kötődő cinkujj-fehérjéket lehet létrehozni. Ezt a már említett Zinc Finger Tools programmal végezték, a következő szekvenciát felhasználva (aláhúzva a töréspontban extrán beépült szekvencia látható):

```
TGCATAAGATGCTGGCCTATGCGTTAGAGGACAAAACCTCAAGACATTCTCATGCAGAAACCAA  
ACTTGGAACAAAGGAACCTcactgggGTCCTCACTGGGGCACTGCCTAGTGGAGCCATGAGAAG  
AGGCCCACCATCTAGACCCCAGAATGGTAGATCCACTGACAACTT
```

Munkám első lépéseként megpróbáltam az előző eredményeket reprodukálni, és kiegészíteni. A program első menüpontjába (Search DNA Sequence for Contiguous or Separated Target Sites) bemásolva ezt a szekvenciát a program megkereste és kilistázta a lehetséges felismerési helyeket. Ezek közül aztán azt választottuk ki, ami részben a töréspontot is lefedi (ACTGGGGTGC). A következő lépésben az ehhez a kilenc bázispárhoz vélhetően specifikusan kötődő cinkujj-fehérje aminosav sorrendjét terveztem meg (Design a ZF). A kapott szekvencia a következő volt:

```
LEPGEKPYKCPECGKSFS DPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS RSDKLVRHQRTHTGEKPY  
KCPECGKSFS THLDLIRHQRTHTGKKT
```

(sárgával a GTC triplettet, zölddel a GGG triplettet, pirossal pedig az ACT triplettet felismerő aminosavakat emeltem ki). Ez a szekvencia megegyezik azzal, amit az 1.1. ábrán is bemutatam. Ellenőrzésképp ezt az aminosav szekvenciát egy másik menüpontba is bemásoltam (Predict Target Site from ZF Protein Sequence), ami egy cinkujj-fehérje felismerőhelyét határozza meg annak aminosav sorrendje alapján. Eredményül a kiindulási kötőhelyet kaptam vissza. Két ujj esetében (GTC és GGG) a kötés várható szelektivitására is információt nyújtott a program, ám a harmadik ujjra ilyen információ nem állt rendelkezésre (5.1. ábra). Látható, hogy mindkét cinkujj nagy szelektivitást mutat a guanozinnal kezdődő bázishármasokra, és ezeken belül a kiszemelt szekvenciákra.



5.1. ábra: A Zinc Finger Tools program adatbázisa segítségével elvégzett szelektivitásvizsgálat eredménye.

A kialakítani kívánt tesztrendszerben referencia fehérjének választott USZF cinkujj-fehérjével is elvégeztük a fenti műveletsort. Az USZF fehérje szekvenciája alapján a következő DNS célszekvenciát adta eredményül a program: GAAGATGGT. A fordított irányú keresés során ehhez a DNS szekvenciához az alábbi fehérjeszekvenciát szolgáltatta, ami az 5.2. ábrán látható az irodalomban közölt fehérjével összehasonlítva.

LEPGEKPYKCPECGKSFSSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSGNLVRHQRTHTGEK
 LEPGEKPYACPECGKSFSSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSGNLVRHQRTHTGEK
 PYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGKKT
 PYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTG

5.2. ábra: Az USZF fehérje szekvenciája a Zinc Finger Tools program adatbázisából (zöld), illetve a [25] irodalomból (piros).

5.2. A cinkujj fehérjékhez rendelhető specifikus DNS szakaszok kialakítása

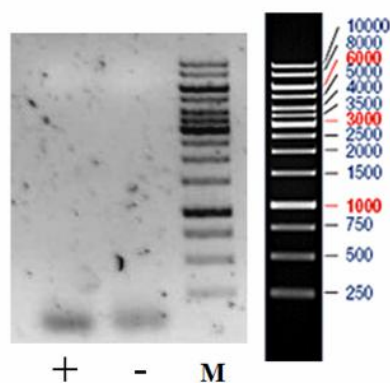
Munkám kezdetekor az említett két fehérje génje már rendelkezésemre állt pGEX-6P-1 hordozó vektorban, így azok DNS-sel kialakított kölcsönhatásainak vizsgálatára első lépésként olyan 24 bázispáros DNS szakaszok előállítására volt szükség, melyek két azonos cinkujj fehérje számára tartalmaznak kötőhelyet (pirossal kiemelve), és közöttük hat bázispárnyi ún. spacer található. A ZF1 fehérje esetében ehhez a PL megjelölésű primert használtuk fel:

5'-GGAATTC**GACCCAGT**gagctc**ACTGGGGTC**-3' (PL: 24bp, T_{olv}: 64 °C; 67%G, C)

A kisbetűvel jelölt gagctct a SacI restrikciós endonukleáz hasítóhelye. Templát DNS hiányában a primer önmagával tapadt össze, a következőképpen:

5'-GGAATTC**GACCCAGT**gagctc**ACTGGGGTC**-3'
 3' **CTGGGGTCA**ctcgag**TGACCCAG**CTTAAG_5'

A PCR segítségével a fenti adduktum teljes kétszálú DNS molekulává egészül ki. Két PCR elegyet állítottunk össze, egy + jelzésű, amihez hozzáadtuk a polimeráz enzimet, és kontrollként egy - jelzésű mintát, melyben nincs polimeráz enzim. A kísérlet során a függelékben ismertetett (8.2.1) PCR elegyet állítottuk össze, és a leírt programmal hajtottuk végre a reakciót. Ezután 5-5 µl-nyi PCR oldattal 1-1 µl festék hozzáadása után agaróz-gélen elektroforézist végeztünk (5.3 ábra).



5.3. ábra: Egy agaróz gélelektroforézis gélképe. M betűvel a markert jelöltem, - jellel a polimeráz enzimet nem tartalmazó minta, + jellel az enzimet is tartalmazó minta látható.

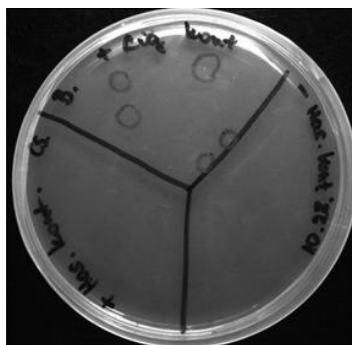
A gélképből megbizonyosodtunk, hogy megfelelő mérettartományba eső rövid DNS fragmenst (250 bázispárt jelző sáv alatt található) sikerült előállítanunk. Az is látható, hogy habár az enzimet nem tartalmazó elegyben is végbement a primerek összetapadása, ennek a sávnak sokkal kisebb az intenzitása. Ezzel szemben a polimeráz enzimet tartalmazó PCR-keverékben viszonylag nagy mennyiségű fragmens keletkezett.

Ezek után a terméket fenol-kloroform eleggyel történő extrakcióval tisztítottuk meg a feleslegessé vált polimeráz enzimtől, dNTP-ktől és az esetlegesen képződött számunkra nem hasznos DNS szálaktól (bővebben ld. 8.2.2.). A kicsapás Na-acetát jelenlétében történt jéghideg abszolút etanollal. A kicsapott DNS mosásához szintén hideg 70%-os etanolt használtam. Steril fülke alatti szárítás után 50 µl TE-ben oldottam

fel. A tisztítás után újabb agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem, hogy a megfelelő DNS-t nyertem-e ki.

Következő lépésben az előállított fragmenst pGEX-6P-1 hordozóba szeretnénk volna ligálni. Ehhez előbb a vektor és a fragmens hasítására volt szükség, melyet az EcoRI nevű restrikciós endonukleázzal végeztünk (hasítási hely: GAATTC). Az egy enzimes emésztéssel (ld. 8.2.3) mind a fragmensben, mind a vektorban túlnyúló ragadós végeket alakítottunk ki. Mivel egy enzimmel hasítottunk, figyelniünk kellett arra, hogy például a vektor ne záródjon újra össze önmagával, mielőtt a fragmenst hozzáadnánk. Ennek érdekében alkalikus foszfáttal is kezeltük a hasított elegyek egy részét. Ez az enzim úgy gátolja meg a vektor újbóli összezáródását, hogy annak a szabadon levő 5' végéről lehasítja a foszfátcsoportot. Így hiába kerülne a 3' vég az összekapcsolódáshoz megfelelő helyzetbe, nincs meg az a foszfátcsoport, amivel az észterkötés kialakulhatna.

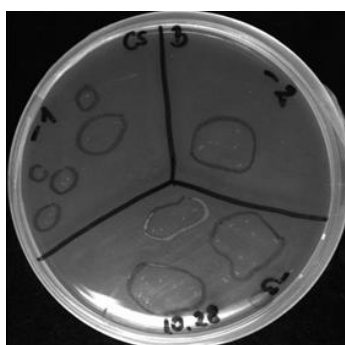
A hasítás után ismét gélelektroforézissel ellenőriztük annak sikerességét. A hasított DNS ugyanis – szétnyílt DNS láncként – lassabban fut a gélen, mint annak szuperhelikális szerkezetű formája. Ezután ismét megtisztítottuk az oldatot a fehérjétől a már ismertetett fenol-kloroformmal történő extrakcióval. A 8.2.4.-es pontban leírtaknak megfelelően készítettük el a ligálási elegyet, amit 48 órára a 4 °C-os hűtőbe tettünk. Ebből 2 µl-nyit DH10B sejtekbe transzformáltuk (ld. 8.2.5) és lemezekre öntött táptalajokra kentük ki. Egy éjszakai inkubálás (37 °C) során az életképes sejtekből telepek nőttek (5.4. ábra).



5.4. ábra: A transzformálás során készített összehasonlító lemez, ami a hasítás és ligálás eredményességének ellenőrzésére szolgált

A lemezeről készített fényképen jól látható, hogy a ligálási összehasonlítóként összeállított, a fragmensen kívül mindent tartalmazó elegy transzformálása sikeres volt, telepek nőttek a lemezen (filctollal bekarikázva). Tehát a ligáz enzim a pGEX-6P-1

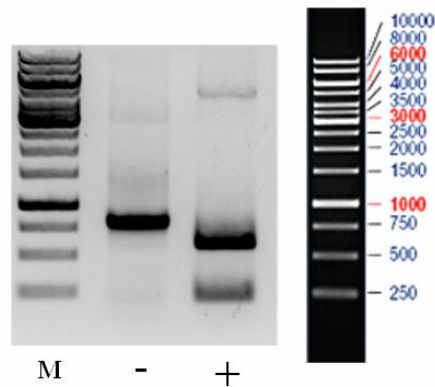
vektor két végét az elővigyázatossági intézkedéseink (defoszforilálás) ellenére összekapcsolta. Az így képződött néhány cirkuláris plazmidot a baktériumsejtek képesek voltak felvenni, és így elszaporodni az Ampicillin antibiotikumot tartalmazó táptalajon, mivel a bejuttatni kívánt plazmid tartalmazza az Ampicillin-rezisztenciát biztosító génszakaszt. A hasítási kontrollként csak steril vizet és hasított pGEX-6P-1 vektor oldatát tartalmazó eleggyel végzett transzformálás során viszont nem nőttek telepek. Így – habár előzőleg agaróz gélelektroforézissel is ellenőriztük – ismét megbizonyosodhattunk a hasítás sikerességéről. A nyitott vektort ugyanis a baktérium nem ismeri fel saját DNS-eként, és így ezek a baktériumok az Ampicillin-tartalmú táptalajon nem képesek szaporodni.



5.5. ábra: Ampicillin-tartalmú táptalajra kikent, előzőleg transzformált DH10B kompetens sejtek

Ahogy az 5.5. ábrán látható, a ligált elegyekkel történő transzformálás sikeres volt, több telep is nőtt a táptalajon, ám ebből még nem tudhattuk biztosan, hogy ezek a telepek az általunk létrehozni kívánt plazmidot tartalmazzák-e? Hogy ezt kiderítsük, minden lemezrészletről egy-egy különálló telepet vittünk át egy mesterlemezre, és ezzel párhuzamosan egy-egy PCR elegybe. Így a baktériumokban levő plazmidok szolgáltak templátként a „Colony”-PCR-ben. A 8.2.1. fejezetben részletezett eljárást és programot használtuk hosszú pGEX primereket alkalmazva. A PCR terméket agaróz gélelektroforézisnek vetettük alá. Ebből láthatóvá vált, hogy mely telepek vették fel az említett plazmidot, azt azonban még nem tudhattuk, hogy a fragmens ligálása is sikeres volt-e, ugyanis telepek akkor is nőttek, ha a ligáló elegy a fragmenst nem tartalmazta. Ehhez hasítási próbát végeztünk: a SacI enzimmel minden előzőleg futatott PCR elegyből néhány μ l-t elhasítottunk. Amennyiben a fragmensünk beépült a hasított vektorba, akkor az az új plazmidban egy SacI hasítóhely megjelenését idézi elő (GAGCTC). Így azoknál a plazmidoknál, ahova nem épült be fragmens, a SacI-es

emésztés során nem várható hasítás, a gélképen pedig egyetlen sávot várunk. Azok a PCR termékek azonban, amelyeket a cél DNS fragmenst tartalmazó plazmidról sokszorozódtak, és így SacI hasítóhellyel rendelkeznek, el fognak hasadni egy kisebb és egy nagyobb méretű DNS szakaszra.

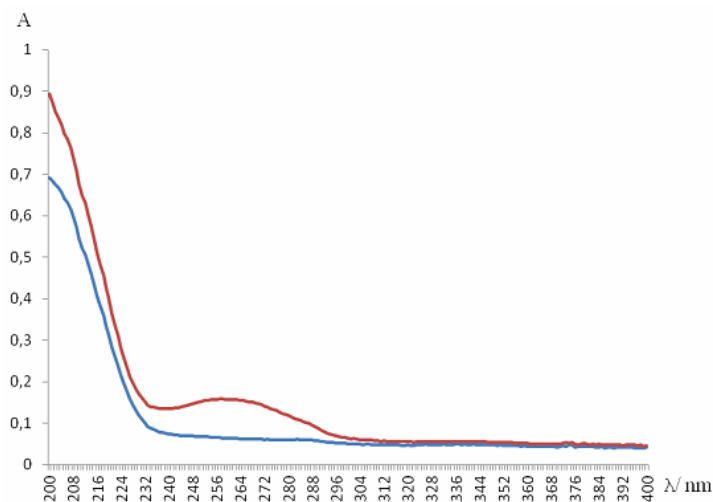


5.6. ábra: A SacI enzimmel történt emésztés eredménye agaróz gélen. Baloldalon a marker DNS (M), középen a hasítatlan DNS (-), jobb oldalon pedig a hasított DNS (+) látható.

A PCR termékek SacI hasítási próbája után készült gélképen (5.6. ábra) a (+) és (-) mintákat összehasonlítva jól látható a hasítás eredménye. A (3) mintánál megjelennek a 250 és 550 bázispár körüli DNS daraboknak megfelelő sávok. Ez pontosan az, amit vártunk, a pGEX hosszú primerek ugyanis 777 bázispár nagyságú szakaszt sokszorozítanak, a fragmensünk pedig 24 bázispár. Hogy teljesen biztosak lehessünk az eredményben, még egyszer megismételtük a hasítási próbát ezzel az egy mintával, ami sikeres volt.

A mesterlemezen visszakerestük, hogy melyik telepből származott a sikeresen ligált plazmid, és azt kémcsőben levő tápoldatba oltottuk át. Hagytuk, hogy a baktériumok felszaporodjanak a kémcsőben, majd a nagyobb hozam érdekében nagyobb térfogatú tápoldatba öntöttük át. Miután itt is kellőképpen felszaporodtak a baktériumsejtek lecentrifugáltuk őket, és a Quiagen Plasmid Mini Kittel kitisztítottuk belőle a plazmid DNS-t. Agaróz gélen ellenőriztük a kinyerés sikerességét. Ezután a frissen tisztított plazmidról PCR-t készítettünk a pGEX hosszú primerek felhasználásával, a függelékben ismertetett PCR eljárás alapján. Ezt kitisztítottuk fenol-kloroform eleggyel extraháltuk, majd meghatároztuk a koncentrációját, hogy szekvenálásra küldhessük. Ehhez a tiszta DNS oldatból 10 µl-t vettünk ki, amihez 490 µl steril vízhez adtuk. Ennek az oldatnak 200 - 400 nm tartományban felvettük az UV-

Vis spektrumát egy Helios spektrofotométerben. Ugyanígy jártunk el a tiszta steril vízzel is.



5.7. ábra: DNS koncentrációjának meghatározása. Kékkel a steril víz spektruma, pirossal pedig az adott DNS oldat spektruma látható.

Ahogy az az 5.7. ábrán is látható, az oldott DNS-nek 260 nm-nél van elnyelési maximuma. A koncentráció kiszámítása során is ezt a 260 nm-en mért abszorbanca értéket használjuk fel. Figyelembe kell azonban venni a 280 nm-en felvett abszorbanca értéket is, ez ugyanis az esetlegesen jelenlévő szennyeződések, pl. fehérjék elnyeléséből származik. A 260 nm-en és 280 nm-en mért abszorbanca értékek hányadosa a DNS oldat tisztaságáról ad információt. Ha ez a hányados 1,8 és 2 közötti érték, akkor a vizsgált oldat megfelelően tiszta, koncentrációja kellő biztonsággal meghatározható. Miután erről megbizonyosodtunk, kiszámoltuk a koncentrációt. A számítás során felhasználtuk a kétszálú DNS-re azt az általánosan elfogadott szabályt, miszerint a 260 nm-nél mért 1,00 abszorbanca érték megfelel 50 ng/μl DNS koncentrációnak, és azt korrigáltuk a hígítás mértékével. Így megkaptuk a koncentrációt ng/μl-ben mérve. A koncentráció ismeretében 20 μl DNS oldatot és 15 μl 5' hosszú pGEX primert vittünk el a BayGen Intézetbe szekvenálás céljából. Az eredmény a pontos szekvenciát szolgáltatta, melyben sárga háttérrel az EcorI hasítóhelyeket jelöltem, kékkel pedig a SacI hasítóhelyet. A beépíteni kívánt fragmenst aláhúztam. Az alábbiakban látható, hogy sikeres volt a ligálás. Az így kialakított plazmidot a következőekben PL-GT-nek nevezzük.

CTGGGTTTGTGTTTTTAAAAACGTATTGAGCTATCCCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGC
AAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAA

AATCGGATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCCCGGAATTCGACCCAGTGAGCT
 CACTGGGGTCCGAAATTCGCGGTGCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTC
 GCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTT
 GTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTG
 TCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGATAATTCTTGAAGACGAAAG
 GGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAG
 GTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAA
 TATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT
 ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTTGTTT
 TTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGG
 TTACATCGA

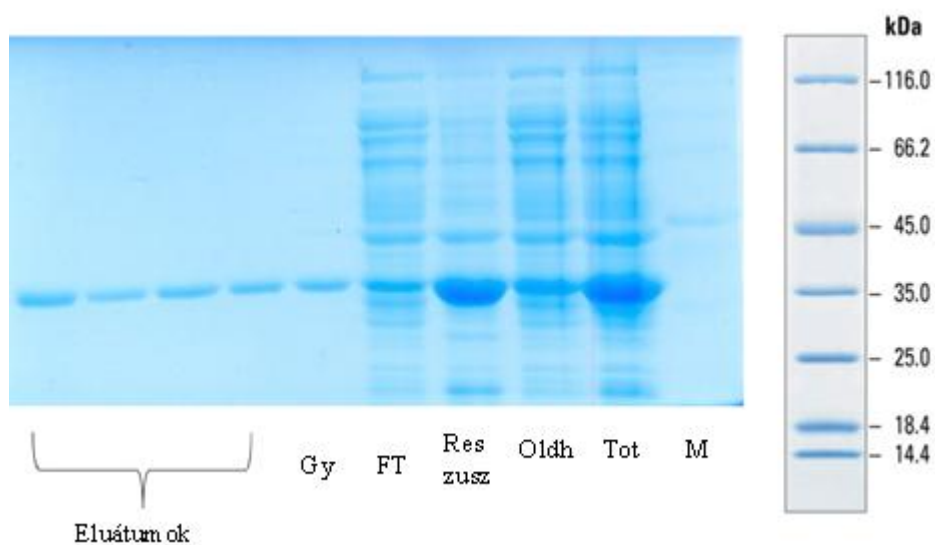
Hasonló módon sikeresen előállítottuk az USZF fehérje specifikus szekvenciáját (ld. Függelék) tartalmazó plazmidot is.

5.3. A cinkujj fehérjék előállítása, tisztítása

Miután előállítottuk a cinkujj fehérjéhez rendelhető specifikus DNS célszekvenciákat, a következő lépésben magukat a fehérjéket szeretnénk volna előállítani és tisztítani. Ehhez a fehérjék génjeit tartalmazó plazmidokat BL21-es, fehérjetermelésre optimalizált kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd a megszokott módon, lemezen levő Ampicillin tartalmú táptalajra kentük ki. Egy éjszakányi 37 °C-on történő inkubálás után a baktériumokat kémcsövekbe oltottuk át, tovább szaporítottuk, majd mikor kellően opálossá váltak az oldatok, lombikokban levő nagyobb térfogatú tápoldatokba öntöttük őket át. Mikor ezekben is elszaporodtak a sejtek, indukálószerrel adtuk hozzá. Erre a célra IPTG-t használtunk, mely a plazmidunkban lévő *lac* operon indukálást végzi. A fehérjeszintézis mindaddig nem indul meg amíg a baktériumok táptalajában glükóz található, mert a laktóz bontása kisebb energianyereséggel jár a sejt számára. A szaporodásuk során és az IPTG hozzáadása után viszont – a glükóz fogyása és a laktózt imitáló izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid megjelenésének köszönhetően – a *lac* operonról aktiválódik a fehérjetermelődés, így az általunk kívánt fehérje is nagy mennyiségben termeltethető.

Indukálás után 2-3 óra elteltével a sejt kultúrákat szobahőmérsékleten 4000 rpm-es fordulaton lecentrifugáltuk, majd hozzákezdünk a tisztításukhoz. Mivel a pGEX-6P-1 plazmid szerkezetének köszönhetően fehérjénk egy N-terminális GST toldalékkal

fejeződnek ki, a tisztításhoz affinitás-kromatográfias módszert választottunk, melynek során a glutation-S-transzferáz fehérje szubsztrátját tartalmazó gyantán kötöttük meg a fehérjeinket. Első lépésben el kellett roncsolnunk a sejteket, hogy a fehérjeink az oldható frakcióba kerülhessenek. Ezt ultrahanggal végeztük 1×PBS pufferben, az oldatokat végig jégen tartva a felmelegedés okozta fehérje denaturáció elkerülése végett. A roncsolást addig folytattuk, míg közel átlátszó oldatokat nem kaptunk, majd ezeket 4 °C-ra hűtött centrifugában lecentrifugáltuk, és a felülúszókat az affinitás-gyantára pipettáztuk. A centrifugálásból visszamaradt baktériumüledékeket még egyszer szonikáltuk 1×PBS-ben, hogy ellenőrizhessük, hogy az első roncsolással oldhatóvá tettünk-e minden fehérjét. A gyantát is tartalmazó csöveket 30 percen keresztül lassan forgattuk szobahőmérsékleten, hogy elősegítsük a fehérjék megkötődését, majd 1000 rpm-en rövid ideig centrifugáltuk. A feleslegessé vált, a sejtek saját fehérjeit is tartalmazó felülúszót lepipettáztuk a gyantákról (a későbbi SDS-PAGE vizsgálathoz mintát vettünk belőlük). A gyantát 3× mostuk 1×PBS-oldattal. Ezután frissen készített redukált glutationoldattal eluáltuk a fehérjét, ezzel a reagenssel ugyanis kompetíció révén leszoríthatjuk a fúziós fehérjeinket a gyantáról.



5.8. ábra: Egy SDS-PAGE gél képe. Jobb oldalon a marker (és a hozzá tartozó létra), mellette balra haladva a teljes fehérjetartalom (Tot), az oldható fehérjetartalom (Oldh), az oldhatatlan fehérjetartalom (Reszusz), az átfolyó frakció (FT), a gyanta (Gy) és az eluátumok fehérjetartalma látható.

Ezzel az oldattal is 30 percet forgattuk a gyantákat, valamint egy éjszakán át tartó elúciós lépést is végrehajtottunk, ezt már forgatás nélkül, 4 °C-on. SDS PAGE

vizsgálattal győződünk meg a fenti folyamatok sikerességéről. Az 5.8. ábra ennek eredményét mutatja be a GUSZF fehérje példáján.

Az így kapott fehérjeoldatok azonban még nem voltak megfelelőek a géltolódás kísérletekhez, azok redukált glutation tartalma miatt. Ennek eltávolítására molekulaszűrőt alkalmaztunk, ami a 10 kDa molekulatömegűnél kisebb molekulákat átengedi, de az ennél nagyobbakat nem. Mivel mindkét fehérje (GZF, GUSZF), amivel dolgoztunk 40 kDa körüli méretű volt, ez a molekulaszűrő céljainkra megfelelt.

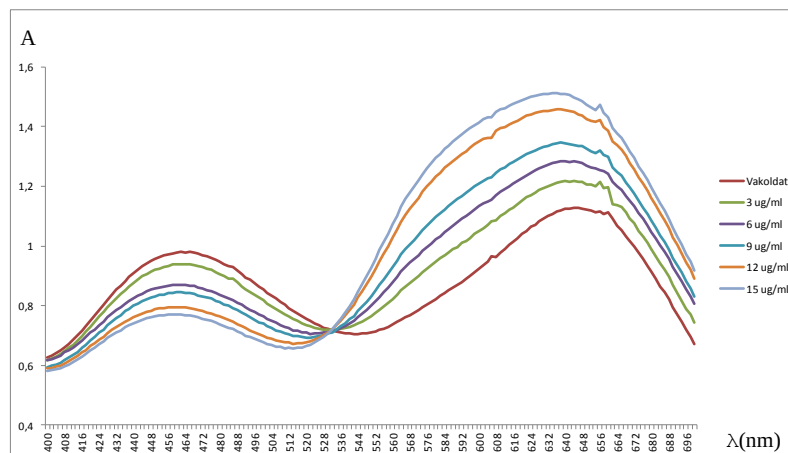
A tiszta fehérjeoldatok koncentrációját is meg kellett mérnünk. Ehhez a Bradford módszer szerint jártunk el. Először egy tömény festékoldatot kellett készítenünk a Coomassie Brilliant Blue G-250-es festékből, abszolút etanol, foszforsav és desztillált víz hozzáadásával. Ez a tömény festékoldat sötét bordó színű, és nagyon savas (pH~1). A koncentráció meghatározáshoz szükséges reagenst ennek az 5× desztillált vizes hígításával kaptuk. Ez az oldat zöldes barna színű, pH-ja az előzőhöz hasonló. Miután elkészítettük a reagenst szarvasmarha szérumból (BSA), a biztonságosabb bemérés miatt először 5 mg/ml-es törzsoldatot (Tris-HCl-ben oldva) készítettünk, majd ebből hígítottunk néhány µl-t úgy, hogy 0,5 mg/ml-es oldatot kapjunk. Ebből az 5.1. táblázatban látható összetételű kalibráló oldatsorozatot készítettük el:

	vakoldat	3 µg/ml	6 µg/ml	9 µg/ml	12 µg/ml	15 µg/ml
Tris-HCl	100 µl	94 µl	88 µl	82 µl	76 µl	70 µl
BSA oldat (0,5 mg/ml)	0 µl	6 µl	12 µl	18 µl	24 µl	30 µl
Bradford reagens	900 µl					

5.1. táblázat: A Bradford-féle koncentrációmeghatározás kalibráló oldatsorozatának összetétele.

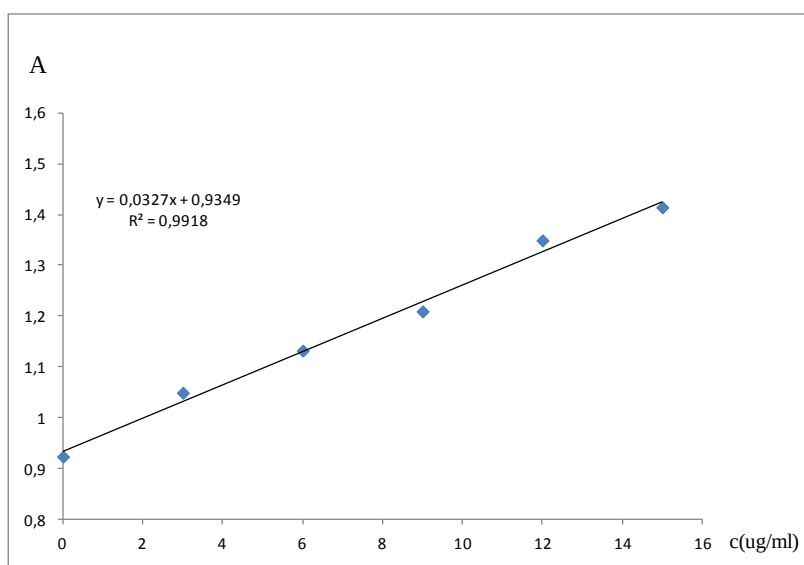
Az ismeretlen koncentrációjú fehérjeoldatokból pedig 10-10 µl-t vettünk ki, amelyekhez 90-90 µl Tris-HCl-t, és 900-900 µl Bradford reagenst adtunk. Az elegyeket óvatos összeforgatás után 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, hogy a

festékmolekula a fehérjéhez kötődhessen (habár már a törzsoldat Bradford-reagenshez adásakor észrevehető volt a zöldes oldat megkékülése).



5.9. ábra: A kalibráló oldatsorozat spektrumai a vízzel korigálva. Jól látható a 450 nm körüli maximum csökkenése, és a 650 nm körüli maximum tolódása és növekedése a növekvő fehérjekoncentrációval.

Ezután UV-Vis spektrofotométerben felvettük a steril víz, majd az egyes oldatok és az ismeretlen spektrumait 400 nm-től 700 nm-ig (5.9. ábra). A 600 nm-en mért abszorbancia értékekre kalibrációs egyenest illesztettünk (5.10. ábra).



5.10. ábra: A fehérjekoncentráció meghatározására szolgáló kalibrációs egyenes (600 nm-en mért abszorbancia-értékek a koncentrációk függvényében)

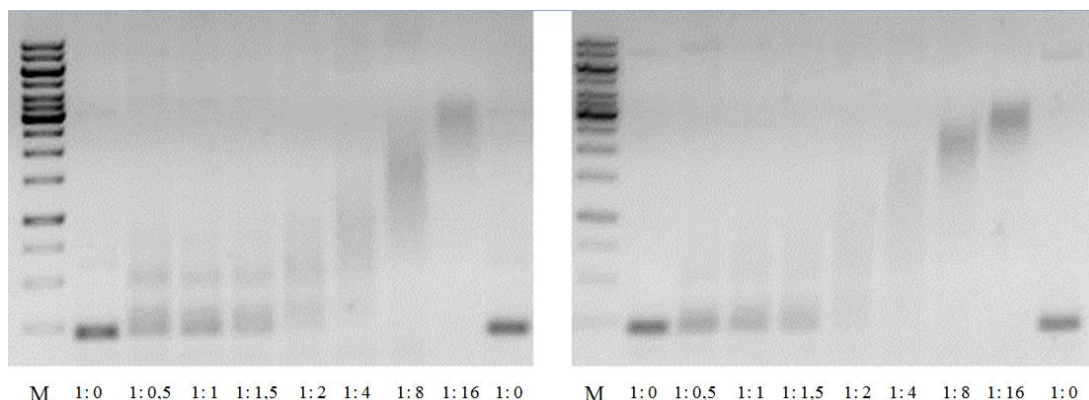
Az ábrázolt egyenes egyenletéből kiszámoltuk a mintáink koncentrációit, amiből a hígítást figyelembe véve, a fehérje moláris tömegét és az osztérfogatot ismerve a moláris koncentrációk egyszerűen kiszámolhatók. Az adott fehérje molekulatömegét –

és egyéb tulajdonságait - az ExPASy Tools segítségével határoztuk meg. Ez egy interneten keresztül elérhető program (<http://expasy.org/>). A kifejezett fehérjék génjének ismeretében a molekulatömeget úgy a legegyszerűbb meghatározni, hogy a fent említett oldalon a Translate menüpontra navigálunk. Itt a felhasználó által feltöltött DNS szekvenciát aminosav szekvenciára tudjuk átfordítani, majd ezt a ProtParam menüpontba bemásolva, a program megadja a fehérje becsült paramétereit (molekulatömeg, elméleti pI, aminosav összetétel, atomi összetétel, becsült félélettartam, instabilitási index, stb.)

5.4. Gél-shift kísérletek

A DNS és fehérjeoldatok pontos koncentrációjának ismeretében gél-eltolódás kísérleteket terveztünk és állítottunk össze. Mindezt úgy tettük, hogy az egyes fehérjéket a hozzájuk specifikusnak vélt szekvenciával is, és nem specifikus szekvenciával is reagáltattuk. Minden kísérletet ugyanazon molarányoknak megfelelően, azonos körülmények között hajtottunk végre. Ez az elegyek összeállítása, és állandó 15 µl-es térfogatra való kiegészítése után 30 perc szobahőmérsékletű inkubálást jelentett. Ennek leteltével azonnal 3 µl agaróz gélelektroforézishez használt 6×töménységű festéket adtunk az elegyekhez, és felvittük őket a gélre. 40-45 perc 140 V egyenáram hatására történő futtatás után a géleket a gél dokumentációs készülékben lefényképeztük. A kísérletekhez felhasznált, PCR-ben előállított DNS szekvenciák és a cinkujj fehérjék aminosav szekvenciái a függelékben találhatók.

A kísérletek során eredményül azt vártuk, hogy a növekvő fehérje koncentrációval a szabad DNS-nek megfelelő sáv intenzitása csökken, vagyis fogy a szabadon levő DNS. Ezzel egyidejűleg egy másik sáv – az 1:1 komplex - jelenik meg egy a szabad DNS-éhez képest nagyobb mérettartománynál. Azért tolódik el a gélben a kialakuló fehérje-DNS komplex, mert amikor a fehérje a DNS-hez hozzáköt, a komplex tömege, alakja, és töltése (a fehérje árnyékolása miatt) megváltozik. Az új sáv intenzitásának a fehérje mennyiségével nőnie kell, mert egyre több DNS-hez köt oda a fehérjénk, így egyre több molekulának változik meg a tömege, töltése, illetve alakja és így a vándorlási sebessége is a gélben. Egy harmadik sáv megjelenését is vártuk, ami az 1:2 komplex kialakulását jelzi.

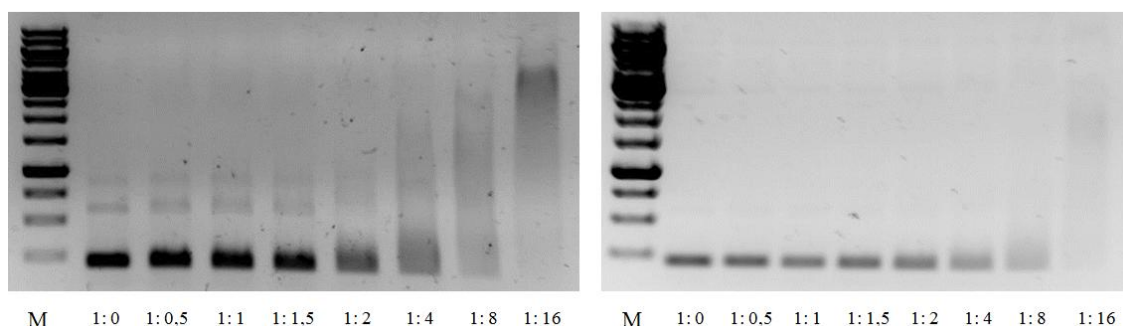


5.11. ábra: A GUSZF fehérjével végzett gél-eltolódás kísérletek gélképei. Baloldalon a hozzá tartozó specifikus DNS szekvenciát is tartalmazó, jobb oldalon pedig egy nem specifikus szekvenciájú DNS-t alkalmaztunk (itt a ZF1 specifikus szekvenciáját használtuk).

A GUSZF fehérjével végzett kísérletek során mindez jól látható (5.11. ábra, bal oldali gélkép). A géltre két szabad DNS mintát vittünk fel a jobb láthatóság érdekében. Az első négy, fehérjét is tartalmazó mintánál két jól elkülönülő sávot láthatunk (1:0,5 – 1:2 DNS: fehérje arányoknál) – valószínűleg a szabad DNS-ét és az 1:1, vagy 1:2 komplexnek megfelelőt – és halványan egy harmadik sáv is látható. A szabad DNS sávja a vártak megfelelően halványul a fehérje: DNS arány növelésével. A második és harmadik sáv intenzitása azonban szinte változatlanul tekinthető. Ebből arra következtettünk, hogy a fehérje ugyan specifikusan kötődik a DNS-hez, de a komplexek – és a szabad DNS is – egyensúlyban vannak egymással. A fehérje feleslegét tovább növelve egy hosszan elmosódott sávot kaptunk, ami arra utal, hogy a DNS-en levő specifikus kötőhelyek telítődtek, így a többi fehérje már nem-specifikus kölcsönhatásokba lép a DNS-ben levő bázispárokkal. Ebben az esetben viszont a fehérje nem alakít ki olyan szoros kölcsönhatást, mint a specifikus esetben, azaz nem illeszkedik pontosan a DNS nagyárába. Így például az is előfordulhat, hogy csak két ujj alakít ki kölcsönhatást a DNS-sel, és a harmadik szabadon lóg. Mindez a komplex alakját is nagyban befolyásolja, így az a gélben minden bizonnyal nehezebben vándorol. Mindez még jobban látható a nem-specifikus kötődést vizsgáló gélen (5.11. ábra, jobb oldali gélkép). Itt a DNS: fehérje = 1:2 arány alatt is már megfigyelhető a sávok elmosódása, de nem látható olyan sávszétválás, mint az előzőekben tárgyalt gélképen, tehát jól definiált komplex nem alakul ki. Az 1:2 és 1:4 aránynál viszont egy kis intenzitású nagyon elnyúlt sávot láthatunk. Ez arra utalhat, hogy a fehérje a DNS bármely szakaszán képes a nagy felesleg miatt megkötődni, de mint ahogy azt már

említettük, az ilyen nem specifikus megkötődések során a fehérje kilóg a DNS nagy árkából, vagy nem mind a három domén kötődik meg, így nagyon sok, különböző alakú DNS-fehérje komplex jön létre. Azonban ezek egyike sincs jelen nagy mennyiségben, ez okozza az elnyúlt sáv kis intenzitását. A fehérje nagyon nagy feleslegének jelenlétében a DNS lánc szinte telítődik a nem specifikusan hozzá kötődő fehérjékkel. Ezeknek a komplexeknek a mérete és alakja már nem különbözik annyira egymástól, így hasonlóan vándorolva a gélben újra egy jól kivehető, intenzív sávot adnak.

A GUSZF fehérjével végzett kísérletekkel összehasonlítva a GZF1 fehérjével kapott eredményeket az mondható el, hogy ennek a fehérjének a specifikussága nehezebben tanulmányozható a kidolgozott rendszerben. A gélképek alapján ez mindenképpen kisebb mértékű, mint a GUSZF fehérje specifikussága (5.12. ábra). Sávszétválást sajnos nem tapasztaltunk, csak a szabad DNS sávjainak elmosódását, ami arra enged következtetni, hogy ugyan kialakul komplex, ami vélhetően specifikus, de nem nagy mennyiségben. Nagy fehérjefelesleg alkalmazásánál a GUSZF fehérjéhez hasonlóan viselkedik: a nem-specifikus DNS-sel való kísérletben viszont csak nagy fehérjefeleslegeknél láthatunk gél-eltolódást.



5.12. ábra: A GZF1 fehérjével végzett gél-eltolódás kísérletek gélképei. Baloldalon a specifikus DNS szekvenciát is tartalmazó, jobb oldalon pedig egy ezt nem tartalmazó DNS szakasszal (jelen esetben a másik fehérjéhez (USZF) specifikus szekvenciát használtuk) végezve az elektroforézist.

Ez utóbbi megfigyelés is arra utal, hogy az általunk tervezett cinkujj fehérje gyengébb kölcsönhatást alakít ki a DNS molekulával. Azaz a tesztrendszerünk még nem eléggé finom a specifikusság tanulmányozásához, további optimalizálás szükséges.

5.5. Hidrolízis Ni^{2+} -ionokkal

A már említett fehérjéket tovább vizsgáltuk Ni^{2+} -ionok jelenlétében egyfajta specifikus ujjlehasadást remélve. A GZF1 fehérjében az irodalmi áttekintésben említett Naa-(Ser/Thr)-Xaa-His-Zaa szekvencia a harmadik ujjban, míg a GUSZF fehérjében az első ujjban található.

GZF1 cinkujj fehérje szekvenciája:

```
L E P
  G E K P Y K C P E C G K S F S D P G A L V R H Q R T H T
  G E K P Y K C P E C G K S F S R S D K L V R H Q R T H T
  G E K P Y K C P E C G K S F S T H L D L I R H Q R T H T
G K K T S
```

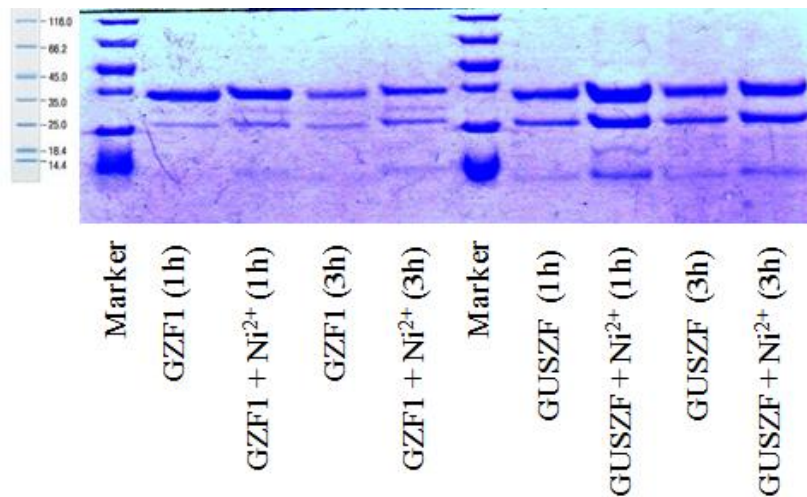
A GUSZF cinkujj fehérje szekvenciája:

```
L E P
  G E K P Y A C P E C G K S F S T S G H L V R H Q R T H T
  G E K P Y K C P E C G K S F S T S G N L V R H Q R T H T
  G E K P Y K C P E C G K S F S Q S S N L V R H Q R T H T
G A A A R
```

5.13. ábra: A vizsgált fehérjék aminosav-szekvenciája (a GST toldalék nélkül), benne zölddel kiemelve a Ni^{2+} -ion katalizálta hidrolitikus hasadás várható helye

Mint ahogyan az 5.13. ábrán is látszik, a hidrolízis lejátsszódása után a GZF1 esetében egy egy ujjal rövidebb fehérjét, míg a GUSZF esetében egy mindhárom ujját elvesztett fehérjemaradványt kell kapnunk. A méretbeli különbséget kihasználva a folyamat nyomonkövetésére poliakrilamid-gélelektroforézist alkalmaztunk.

A kísérlet során vizsgáltuk maguk a (Ni^{2+} és bármilyen más fémionmentes, tisztított, redukált glutationtól szűrt, Tris-HCl pufferben) levő fehérjék, és hozzáadott Ni^{2+} -ionokat ($10 \times$ feleslegben) tartalmazó fehérjék oldatát. 40°C -on, Tris-HCl eleggyel pufferelt közegben (50 mM, 7,003 pH) végeztük az inkubálást. Egy és három óra után vettünk mintákat. Az SDS-PAGE eredménye az 5.14. ábrán látható.



5.14. ábra: A cinkujj fehérjék SDS PAGE képe a Ni^{2+} -ionok távol-, illetve jelenlétében történt inkubálás után

A gélképen a párhuzamos mintákon (fehérjénként a Ni^{2+} -ionok jelen-, illetve távollétében inkubált oldatok) látható, hogy a hozzáadott fémiont tartalmazó mintáknál egy új, halvány sáv jelenik meg a GZF1 esetében a kiindulási fehérje sávja alatt, míg a GUSZF esetében jóval alatta. Ez egyezik a várt eredménnyel, miszerint a GZF1-ről egy ujj, míg a GUSZF-ről mindhárom ujj lehasad. Ennek megfelelően a GZF-nél egy ~ 20 aminosavval rövidebb fehérjének megfelelő sáv jelenik meg, a GUSZF estén pedig ~ 70 aminosavval lesz rövidebb a fehérje. Az idő előrehaladtával az új sáv intenzitása a GZF esetén növekszik, míg a GUSZF mintában ennek megítélhetősége bizonytalan.

A fenti eredmények igazolására, és a GUSZF fehérjével kapcsolatos kételyek eloszlatására egy újabb kísérletet végeztünk a hőmérséklet emelésével ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$). Az előző kísérletnél ismertetett pufferben inkubáltuk a fehérjeoldatokat fémion hozzáadásával és anélkül. A GZF1 esetén a gélképen ismét megjelent az új sáv az eredeti fehérje sávja alatt, a GUSZF esetén viszont nem tapasztaltunk változást a kiindulási fehérjéhez képest.

Kísérleteink mindenképp biztatóak, de további, részletes vizsgálatok szükségesek a teljes kép kialakításához. A továbbiakban vizsgáljuk azt is, hogy a hidrolitikus folyamat specifikus, illetve nem-specifikus DNS jelenlétében is lejátszódik-e, valamint, hogy a képződő termék képes-e a DNS hasítására.

6. Összefoglalás

Tudományos diákköri dolgozatomban a kutatócsoportunk által a Zinc Finger Tools nevű programmal megtervezett ZF1 cinkujj fehérje DNS-sel kialakított kölcsönhatásának vizsgálatára egy agaróz-gélelektroforézisen alapuló rendszer kidolgozását tűztük ki célul. Elsőként a fenti program használatát tanultam meg, ellenőrizve a tervezési folyamatot. Ezek után a ZF1 cinkujj fehérjéhez tartozó specifikus DNS részletet állítottuk elő úgy, hogy egy két kötőhelyet tartalmazó palindrom szekvenciájú primert PCR készülékben önmagával összetapasztottunk és kétszálú DNS-t alakítottunk ki belőle. Ezt a fragmenst pGEX-6P-1 hordozó vektorba ültettük EcoRI restriktációs endonukleáz és T4 ligáz segítségével. Ezzel párhuzamosan előállítottuk az irodalomban specifikusnak leírt USZF cinkujj fehérjéhez tartozó specifikus DNS-t tartalmazó szakaszt is. Ezt követően a már meglévő gének alapján megkezdtük a GZF1 és GUSZF fehérjék termeltetését baktériumokban. E fehérjéket affinitás-kromatográfiás módszerrel megtisztítottuk. A további kísérletekben szükségünk volt a DNS és a fehérjeoldatok koncentrációjának ismeretére, amit mindkét esetben spektrofotometriás módszerrel határoztunk meg. A fehérje-DNS kölcsönhatások specifikusságának vizsgálatára tesztként gél-eltolódás kísérleteket végeztünk. Ezek során jól definiált arányokban inkubáltuk együtt a különböző DNS és fehérjemolekulákat specifikus, illetve nonspecifikus kölcsönhatások tanulmányozása céljából. A cinkujj fehérjék DNS-kötését agaróz gélen végrehajtott gél-eltolódás alapján vizsgáltuk. A GUSZF cinkujj fehérjével és a hozzá specifikus DNS-sel végzett kísérletek eredményei jó összehasonlítási alapot biztosítottak. Ezek bizonyították a GUSZF cinkujj fehérje nagy specifikusságát, ugyanakkor a saját fehérjénk esetében nem jelent meg olyan jól kivehető sávészérválás, mint a GUSZF-nél. A szabad DNS sávjának elmosódásából valószínűsíthetjük, hogy a GZF1 fehérje is kölcsönhat a DNS-sel méghozzá a nonspecifikus DNS molekulától különböző módon. A különbség valószínűleg a kölcsönhatás erősségének eltéréséből ered.

A fentiek miatt a továbbiakban finomítani szeretnénk ezen a tesztelési módszeren. Ennek egyik iránya lehet a GST toldalék eltávolítása, valamint rövidebb, a specifikus felismerőhelyet tartalmazó DNS szakaszok előállítása. Több cinkujj fehérjén is szeretnénk a módszert kipróbálni, valamint további célkitűzésünk lehet az is, hogy a

ZF1 fehérjéhez endonukleázt fűzzünk (pl. FokI), hogy az enzimatis hasítás specifikusságát is vizsgálhassuk. Ez volt az egyik oka annak, hogy a munkát egy új célszekvencia előállításával kezdtük, mert a létrehozott szekvenciában – egy már meglévő, szintén a GZF1 fehérjéhez rendelhető specifikus DNS-sel szemben – a cinkujjak kötőhelyei úgy állnak, hogy ha a fehérjéhez endonukleázt fűzünk, az a két kötőhely közötti összekötő szekvencián tud dimerizálódni, és hasítani.

A hidrolízisre irányuló kísérleteink a GZF1 fehérjénél a várt eredményeket szolgáltatották. Valószínűsíthető a hidrolitikus Ni^{2+} -komplex kialakulása, és a harmadik ujj fehérjéről való leszakadása. A GUSZF fehérjével végzett kísérletek eredménye viszont még nem egyértelmű. Mindenesetre szeretnénk a továbbiakban plazmidokkal együtt is inkubálni az említett fehérjét Ni^{2+} -ionok jelenlétében, és az esetleges DNS hasadást a már jól alkalmazott sáveltolódás kísérlettel vizsgálni.

7. Irodalomjegyzék

- [1] Kiss T., Gajda T., Gyurcsik B.: Bevezetés a bioszervetlen kémiába, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2007)
- [2] Duchenne Muscular Dystrophy, Advances in therapeutics, szerk. J.S. Chamberlain, T.A. Rando, Taylor & Francis, New York (2006)
- [3] F.D. Urnov, E.J. Rebar, A. Reik, P.P. Pandolfi: Designed transcription factors as a structural functional and therapeutic probes of chromatin *in vivo*. *EMBO Reports*, 3, 610-615 (2002).
- [4] S.H. Mishra, C.M. Shelley, D.J. Barrow, M.K. Darby, M.W. Germann: Solution structures and characterization of human immunodeficiency virus rev responsive element IIB RNA targeting zinc finger proteins. *Biopolymers*, 83, 352–364 (2006).
- [5] T. Mino, T. Mori, Y. Aoyama, T. Sera: Cell-permeable artificial zinc-finger proteins as potent antiviral drugs for human papillomaviruses. *Arch. Virol.*, 153, 1291–1298 (2008).
- [6] M.G. Di Certo, N. Corbi, G. Strimpakos, A. Onori, S. Luvisetto, C. Severini, A. Guglielmotti, E.M. Batassa, C. Pisani, A. Floridi, B. Benassi, M. Fanciulli, A. Magrelli, E. Mattei, C. Passananti: The artificial gene Jazz, a transcriptional regulator of utrophin, corrects the dystrophic pathology in mdx mice. *Hum Mol Genet.*, 19, 752-760 (2010).
- [7] C. Passananti, N. Corbi, A. Onori, M.G. Certo, E. Mattei: Transgenic mice expressing an artificial zinc finger regulator targeting an endogenous gene. *Methods Mol Biol.*, 649, 183-206 (2010).
- [8] M. Imanishi, T. Nakaya, T. Morisaki, D. Noshiro, S. Futaki, Y. Sugiura: Metal-stimulated regulation of transcription by an artificial zinc-finger protein. *Chembiochem*, 11, 1653-1655 (2010).
- [9] S. Stolzenburg, A. Bilsland, W.N. Keith, M.G. Rots: Modulation of gene expression using zinc finger-based artificial transcription factors. *Methods Mol. Biol.*, 649, 257-270 (2010).
- [10] D. Jantz, B.T. Amann, G.J. Gatto, J.M. Berg: The design of functional DNA-binding proteins based on zinc finger domains: *Chem. Rev.*, 104, 789-799 (2004).
- [11] Y. Shiraishi, M. Imanishi, T. Morisaki, Y. Sugiura: Swapping of the beta-hairpin region between Sp1 and GLI zinc fingers: significant role of the beta-hairpin region in DNA binding properties of C2H2-type zinc finger peptides. *Biochemistry*, 44, 2523-2528 (2005).
- [12] M. Dhanasekaran, S. Negi, M. Imanishi, Y. Sugiura: DNA-Binding Ability of GAGA zinc finger depends on the nature of amino acids present in the β -hairpin. *Biochem.*, 46, 7506-7513 (2007).
- [13] E. Peisach, C.O. Pabo: Constraints for zinc finger linker design as inferred from X-ray crystal structure of tandem Zif268–DNA complexes. *J. Mol. Biol.*, 330, 1–7 (2003).

- [14] E.M. Händel, S. Alwin, T. Cathomen: Expanding or restricting the target site repertoire of zinc-finger nucleases: the inter-domain linker as a major determinant of target site selectivity. *Mol. Ther.*, 17, 104-111 (2009).
- [15] P.V. Benos, M.L. Bulyk, G.D. Stormo: Additivity in protein-DNA interactions: how good an approximation is it? *Nucl. Acids Res.*, 30, 4442-4451 (2002).
- [16] W. Nomura, Y. Sugiura: Design and synthesis of artificial zinc finger proteins. *Methods Mol Biol.*, 352, 83-93 (2007).
- [17] M. Dhanasekaran, Sh. Negi, Y. Sugiura: Designer Zinc Finger Proteins: Tools for creating artificial dna-binding functional proteins. *Acc. Chem. Res.*, 39, 45-52 (2006).
- [18] J.G. Mandell, C.F. Barbas: Zinc Finger Tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases. *Nucl. Acids Res.*, 34, W516-W523 (2006).
- [19] D.J. Segall, C.F. Barbas: Custom DNA-binding proteins come of age: polydactyl zinc-finger proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12, 632-637 (2001).
- [20] M.S. Bhakta, D.J. Segal: The generation of zinc finger proteins by modular assembly. *Methods Mol. Biol.*, 649, 3-30 (2010).
- [21] M. Minczuk: Engineered zinc finger proteins for manipulation of the human mitochondrial genome. *Methods Mol. Biol.*, 649, 257-270 (2010).
- [22] C.L. Ramirez, J.E. Foley, D.A. Wright, F. Müller-Lerch, S.H. Rahman, T.I. Cornu, R.J. Winfrey, J.D. Sander, F.Fu, J.A. Townsend, T. Cathomen, D.F. Voytas, J. K. Joung: Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat. Methods.*, 5, 374-375 (2008).
- [23] J.G. Mandell, C.F. Barbas III : Zinc Finger Tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases. *Nucl. Acids Res.*, 34, W516-W523 (2006)
- [24] C.A. Kim, J.M. Berg: A 2.2 Å resolution crystal Structure of a designed zinc finger protein bound to DNA. *Nature Struct. Biol.*, 3, 940-945 (1996)
- [25] M. Szczepek, V. Brondani, J. Büchel, L. Serrano, D.J. Segal, T. Cathomen: Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnol.*, 25, 786-793 (2007)
- [26] E. Kurowska, J. Sasin-Kurowska, A. Bonna, M. Grynberg, J. Poznan, L. Knizewski, K. Ginalska, W. Bal: The C₂H₂ zinc finger transcription factors are likely targets for Ni(II) toxicity. *Metallomics*, 3, 1227–1231 (2011)

Felhasznált internetes források

<http://www.di.uq.edu.au/sparq/images/stickyends.jpg>

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/55/Coomassie_Brilliant_Blue_G-250.svg/620px-Coomassie_Brilliant_Blue_G-250.svg.png

http://www.doktorinfo.hu/drinfo/pid/0/betegsegKonyvProperties/oid/0/KonyvReszegys eg.4_1589

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Kiss Tamás tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette számomra, hogy a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken tudományos diákköri dolgozatomat elkészítsem.

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Gyurcsik Bélának, aki a biológiai kémia iránti lelkesedésével az én figyelmemet is erre az izgalmas témakörre irányította. Hasznos tanácsaival és ötleteivel mindvégig segített abban, hogy elsajátíthassam a molekuláris biológia módszereit, és érdekes kísérleteket hajthassak végre. Köszönet illeti Mátyás Andreát is, a kezdeti közös munkáért, és a kutatócsoport minden tagját a laborban jelenlevő szüntelen jókedvéért.

8. Függelék

8.1.1 A ZF1 jelölésű cinkujj fehérje aminosav és DNS szekvenciája:

L E P G E K P Y K C P E C G K S F S D P G A L V R H Q R T H
T G E K P Y K C P E C G K S F S R S D K L V R H Q R T H T G
E K P Y K C P E C G K S F S T H L D L I R H Q R T H T G K K
T S

CTGGAACCGGGCGAAAAACCGTATAAATGCCCGGAATGCGGCAAAAGCTTTAGCGATCC
GGGCGCGCTGGTGCGCCATCAGCGCACCCATAACCGGCGAAAAACCGTATAAATGCCCGG
AATGCGGCAAAAGCTTTAGCCGCAGCGATAAACTGGTGCGCCATCAGCGCACCCATAAC
GGCGAAAAACCGTATAAATGCCCGGAATGCGGCAAAAGCTTTAGCACCCATCTGGATCT
GATTGAAAAACCGTATAAATGCCCGGAATGCGGCAAAAGCTTTAGCACCCATCTGGATC
TGATTGCGCCATCAGCGCACCCATAACCGGCAAAAAAACCGC

8.1.2 Az USZF jelölésű cinkujj fehérje aminosav és DNS szekvenciája:

L E P G E K P Y A C P E C G K S F S T S G H L V R H Q R T H
T G E K P Y K C P E C G K S F S T S G N L V R H Q R T H T G
E K P Y K C P E C G K S F S Q S S N L V R H Q R T H T G

CTCGAGCCCGGGGAGAAGCCCTATGCTTGTCCGGAATGTGGTAAGTCCTTCAGCACCAG
TGGCCACTTGGTTAGACACCAGCGTACCCACACGGGTGAAAAACCGTATAAATGCCCG
AGTGCGGCAAATCTTTTAGCACCAGCGGCAACCTGGTGCGCCATCAACGCACTCATACT
GGCGAGAAGCCATACAAATGTCCAGAATGTGGCAAGTCTTTCAGCCAGTCCAGCAACCT
GGTGCGCCACCAACGTACTCACACCGGT

8.1.3 A pGEX-6P-1 hordozó vektor bázisszekvenciája:

ACGTTATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGGTCGTAAATCACTG
CATAATTCGTGTCGCTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTCGCGCGACATCATAACGGTTCTGGCAAAATATTCGTAAAT
GAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGTATTTCATGTCCC
CTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTTTTGGAAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTT
GTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTATTATATTGATGGT
GATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACGTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTGTGCCAAAAGAGCGTGCAG
AGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAACTCTCAAAGT
TGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTGCAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGGTGATCATGTAACC
CATCCTGACTTCATGTTGATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACA TGGACCCAATGTGCCTGGATGCG TTCCCAAAATAGTTGTT
TTAAAAACGTATTGAAGCTATCCCAAAATGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCA GGGCTGGCAAGC
CACGTTTGGTC GTGGCGACCATCTCCAAAATCGGATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTG GGATCCCG GAATTC CCGGTCGA
CTCGAGCGCGCATCGTGACTGACGATCTGCCTCGCGCTTTCGGTGATGACGGTGAAAA CTCTGACACATGCAGCTCCCGC
AGACGGTCACAGCTTGTCTGAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGGCGC
AGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGATAATCTTGAAGACGAAAGGGCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAAT
GTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATAC
ATTCAAATATGATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTAACATTT
CCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAA
GATCAGTT GGGTGCACGAGTGGGTTACATCG AACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTC
CAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACA
CTATTCTCAGATGACTTGGTTGAGTACTACCAAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAAGTGCT
GCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACA
TGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGC
AGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGATGGAGGCG
GATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTC

GCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCCAACTATGGATGA
 ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTTGGTAAGTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATT
 GATTTAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTT
 CGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGTCAGAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAC
 AAAAAAACCCGCTACCCAGCGGTGGTTTGTTCGCGGATCAAGAGCTACCAACTCCTTTTCCGAAGGTAATCTGCTGCTGAGCAGCG
 CAGATACCAAACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGC
 TAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCA
 GCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTA
 TGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGC
 TTCCAGGGGGAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGG
 GGGCGGAGCCTATGGAAGAACGCCAGCAACGCGGCTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGTGCGCCTTTTGTCTACATGTTCTTCTCT
 GCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCG
 AGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATAAAATCCGA
 CACCATCGAATGGTGCAAAACCTTTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCGGAAGAGAGTCAATTACGGGTGGTGAATGTGAAACAGTA
 ACGTTATACGATGTCGAGAGTATGCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGGTGAACAGGCCAGCCAGCTTTCTGCGAAAA
 CGCGGGAAGAGTGGAGCGCGGATGGCGGAGCTGAATTACATTTCCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGCGGGCAACAGTCTGTGCT
 GATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCCGTGCGAAATTTGTGCGGCGGATTAATCTCGCGCGGATCAACTGGGTGCC
 AGCGTGGTGGTGTGATGGTAGAACGAAGCGGCGTCGAAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACGCGTCACTGGGG
 TGATCATTAACATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTTGGAAGCTGCGTGCATAATGTTCCGGCGCTTATTTCTTGATGCTCTC
 TGACCAGACACCCATCAACAGTATTATTTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTGCATTGGGTCAACAG
 CAAATCGCGCTGTAGCGGGCCCATTAAGTTCTGTCTCGGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAA
 TTCAGCGGATAGCGGAACGGGAAGGCGACTGGAGTGCCATGTCCGGTTTCAACAAACCATGCAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCC
 CACTGCGATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCATTACCGAGTCCGGGTGCGCGTTGGTGCGGATATC
 TCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCCGTCAACCACCATCAACAGGATTTTCGCTGCTGGGGC
 AAACAGCGTGGACCGCTTGTCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAGAAA
 AACACCTTGGCGCCCAATACGCAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCGGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGTTTCCCGACTG
 GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGT
 ATGTTGTGTGAATTTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGCTGTTTTACAA
 CGTCTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCGCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
 CCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCTGCTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGA
 AAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCTGAGGCGGATAGTGTCTGCTGCCCTCAAACCTGGCAGATGCACGTTACGATGCGCCCATCTAC
 ACCAACGTAACCTATCCCATACGGTCAATCCGCGCTTTGTTCCACGGAGAATCCGACGGGTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTG
 ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTGTGATGCGGTGGAATT

A pirossal kiemelt szakaszok a pGEX rövid N- (forward) és C-terminális (reverse) primerjeit jelölik. A zöld kiemelés a hosszú N- (forward) és C-terminális (reverse) primerek helyét mutatja. Világoskék színnel a két EcorI hasítóhely látható.

8.1.4 A ZF1 cinkujj fehérjéhez tartozó specifikus DNS szekvencia:

GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG GTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGAAGTTC
 TGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCCCG **GAATTC** GACCCAGTGAGCTCACTGGGGTC **GAA**
TTT CCGGGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTT
 CGGTGATGACGGTGAAAA **CCTCTGACACATGCAGCTCCCGG**

8.1.5 Az USZF cinkujj fehérjéhez tartozó specifikus DNS szekvencia:

GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG GTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGAAGTTC
 TGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCCCG **GAATTC** ACCATCTTCATTAATGAAGATGGT **GAA**
TTT CCGGGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCGTTT
 CGGTGATGACGGTGAAAA **CCTCTGACACATGCAGCTCCCGG**

Sárgával a pGEX rövid N- (forward) és C-terminális (reverse) primerjeit jelöltem. Pirossal az EcorI hasítóhelyeket emeltem ki, a cinkujjak kötőhelyét pedig aláhúztam.

8.2 Alkalmazott módszerek

8.2.1 Polimeráz láncreakció

Egy általunk alkalmazott tipikus PCR elegy összetétele:

Steril víz	35,5 µl
PCR puffer (Mg^{2+} -t tartalmaz)	5 µl
dNTP	5 µl
Primer PL	4 µl
DNS polimeráz (Taq polimeráz)	0,5 µl
Össztérfogat	50 µl

A alkalmazott PCR-program:

- 1) lépés: 98 °C 1perc
- 2) lépés: 98 °C 20 mp
- 3) lépés: 64 °C 1perc (az alkalmazott primertől függően változhat)
- 4) lépés: 72 °C 1perc
- 5) lépés: 30x2 vissza a 2. lépésre
- 6) lépés: 72 °C 4perc
- 7) lépés: 10 °C amíg le nem állítjuk
- 8) lépés: vége

8.2.2 Tisztítás PCR elegyből

A PCR elegyekhez csövenként 50 µl fenol-kloroformot adtam, ezzel összevortexeltem, majd 5 percig szobahőmérsékleten 13500 rpm-en centrifugáltam. A felső fázist leszívtam, az alsót eldobtam. 5 µl 3 M Na-acetátot adtam hozzá, összevortexeltem, majd 125 µl jéghideg abszolút etanolt adtam hozzá. Ezzel is vortexeltem, majd a -80 °C-os hűtőbe tettem 30 percre. 4 °C-ra hűtött centrifugában 15 percig 13500 rpm-en centrifugáltam, majd a felülúszót leszívtam, és 200 µl jéghideg 70%-os etanolt adtam hozzá. Ezzel is vortexeltem, majd újabb 5 percet centrifugáltam 4°C-on 13500 rpm-en. Leszívtam a felülúszót, és steril flüskében szárítottam a kicsapott DNS-t, amit ezek után TE-ben oldottam fel.

8.2.3 Hasítás

A pGEX-6P-1 vektort 25 µl össztérfogatban hasítottam a következőképpen: 1 µl pGEX-6P-1; 2,5 µl EcoRI puffer; 2,5 µl EcoRI enzim; 19 µl steril víz.

A fragmenst 60 µl össztérfogatban hasítottam el: 45 µl PCR elegy; 6 µl EcoRI puffer; 2 µl EcoRI enzim; 7 µl steril víz

Másfél órán keresztül 37 °C-on inkubáltam az elegyeket, majd 20 percre 80 °C-ra melegített rázóinkubátorba tettem, hogy az enzimet inaktiváljam.

Az alkalikus foszfatázzal (Fast AP) is kezelt elegyeket az enzim hozzáadása után további 10 percig 37 °C-on tartottam, majd 65 °C-on 15 percig inaktiváltam.

8.2.4 Ligálás

A pGEX-6P-1 vektorból állandó mennyiséget, 3,5 µl-t használtam, ehhez 6 µl, 3,5 µl majd 1,5 µl fragmens oldatot adtam. T4 ligáz enzimet használtam, ebből is elegyenként 1-1 µl-t, és az ennek megfelelő T4 ligáz pufferből 2 µl-t mértem be. Az elegyeket steril vízzel egészítettem állandó, 20 µl-es térfogatra. Hasítási kontrollként csak pGEX-6P-1-ből és steril vízből álló elegyet készítettem, ligálási kontrollként pedig a fragmens oldaton kívül minden összetevőt tartalmazó elegyet állítottam össze. Ezeket 48 órára 4 °C-ra tettem.

8.2.5 Transzformálás

30 µl kompetens sejthez (DH10B vagy BL21) 2 µl-t tettem a plazmidot tartalmazó oldatból. Összemérés után 10 percig jégen tartottam az elegyeket, majd 2 percre 42 °C-os vízfürdőbe tettem. Ezután azonnal jégre kerültek újabb 30 percre, majd 37 °C-ra melegített rázóinkubátorba tettem őket egy órára 150 µl LB tápoldat hozzáadásával.

8.2.6 „Colony-PCR”

A már fent leírt általános PCR-elegynek megfelelő mesterkeveréket készítettem el, pGEX hosszú primereket alkalmazva, templátként pedig a fogpiszkálóra éppen felszúrt baktériumtelepben levő DNS szolgált. A fent ismertetett PCR program megfelelt a primerek olvadáspontjának, így itt is ezt használtam.

8.2.7 A ligálás sikerességének ellenőrzése

SacI enzimmel végeztem hasítást 20 µl össztérfogatban, 1 µl SacI enzim, 2 µl SacI puffer, 5 µl PCR-elegy és 12 µl steril víz hozzáadásával. Egy órán keresztül 37 °C-on inkubáltam, majd 65 °C-ra melegített rázóinkubátorban 20 percig inaktiváltam az enzimet.

8.2.8 Fehérje tisztítása

A folyamatot jégen végeztem. A lecentrifugált baktérium pelletet 3 ml 1×PBS-ben roncsoltam 3×40 másodpercig ugyanennyi szünetet tartva a roncsolások közt. A szonikátor teljesítménye 61% volt. Ezután 13500 rpm-en 4 °C-ra hűtött centrifugában 10 percig centrifugáltam. A felülúszót a már előkészített gyantára pipettáztam, és 30 perig szobahőmérsékleten forgattam. Ennek leteltével 1000 rpm-en 2 percig centrifugáltam, és leszívtam a felülúszót. Ezután 3 mosás következett 1 ml 1×PBS oldattal. A mosások során is 1000 rpm-en 2 percig centrifugáltam, majd frissen készített redukált glutation oldatot pipettáztam a gyantára (300 µl) és ezzel újabb 30 percen keresztül forgattam. Végül ismét 1000 rpm-en centrifugáltam 2 percig, majd leszívtam a felülúszót, amiben az eluált fehérje volt. A gyantát nem dobtam el, egy éjszakai elúciót is csináltam, szintén 300 µl redukált glutation oldattal, 4 °C-on, forgatás nélkül.

A Glutation Sepharose 4b gyanta előkészítése:

A gyanta 75%-osan, etanolban oldva áll rendelkezésre. Első lépésként a gyanta használati utasításában szereplő táblázatból kiválasztottam a baktérium kultúrámnak megfelelő várható fehérje mennyiségét, és kiszámoltam az ennek megfelelő mennyiségű gyantát. Annak figyelembevételével, hogy a gyanta 75%-os készítményként állt rendelkezésemre, kiszámoltam a kimérendő térfogatot, és ezt 1000 rpm-en 2 percig centrifugáltam. A felülúszót lepipettáztam róla, és 3× 250 µl 1×PBS oldattal mostam, alkalmanként 1000 rpm-en 2 percig centrifugálva. Végül annyi 1×-es PBS-ben oldottam fel, hogy 50%-os oldatot kapjak, ezzel dolgoztam tovább a fehérjetisztítás során.

8.3 A felhasznált gélek leírása:

8.3.1 Agaróz gél

1%-os gélét öntöttem úgy, hogy 1,2 g szilárd agarózt 120 ml desztillált vízben oldottam melegítve, majd mikor kéz melegre hűlt 2,4 ml 50×TAE puffert és 120 µl etídium-bromidot adtam hozzá. Ezután a formába öntöttem és beletettem a fésűket. Mindvégig vigyáztam, hogy buborékok ne képződjenek az oldatban.

8.3.2 SDS gél

Az alsó gélhez 5 ml desztillált vizet, 6,25 ml akril-amid (30%) oldatot és 3,75 ml B-pufferoldatot kevert össze, majd 125 µl APS és 18,75 µl TEMED hozzáadásával inicializáltam a polimerizációt. Ebből rögtön 3,5 ml-t a formába előre befogott, alkohollal tisztára töltött üveglapok közé pipettáztam, majd vizet rétegeztem rá, és 20 percig hagytam polimerizálódni. A felső gélhez 5,4 ml desztillált vizet, 2 ml akrilamid (30%) oldatot és 2,5 ml C-pufferoldatot tartalmazó elegyet készítettem, melyben 50 µl APS-sel és 7,5 µl TEMED-del inicializáltam a polimerizációt. Az alsó gél megszilárdulása után a vizet leöntöttem róla, és rárétegeztem a felső gél oldatát, majd újabb 20 percig vártam, hogy megszilárduljon.

A hidrolízis vizsgálatához speciális alsó gélét használtam, melynek összetétele: 1,5 g glicin, víz, akrilamid (30%) oldat, a polimerizációhoz 50 µl APS, és 7,5 µl TEMED volt szükséges.

8.4. Az alkalmazott oldatok rövidítése és azok jelentése:

HEPES puffer: 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav (6,8 - 8,2 pH)

TE: Tris-EDTA oldat

IPTG: izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid

1×PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ (pH 7.3)

50 × TAE puffer: 2,0 M Tris-acetát, 0,05 M EDTA, (pH 8,0)

APS: ammónium-perszulfát

TEMED: tetrametil-etilén-diamin

Tris-HCl: Trisz(hidroximetil)-aminometán (7,2 - 9,0 pH) és sósavoldat keveréke.