

Uracil detektálása a DNS-ben fluoreszcensen jelölt UNG fehérjével

Zsótér Soma

Vegyész Msc I. évfolyam

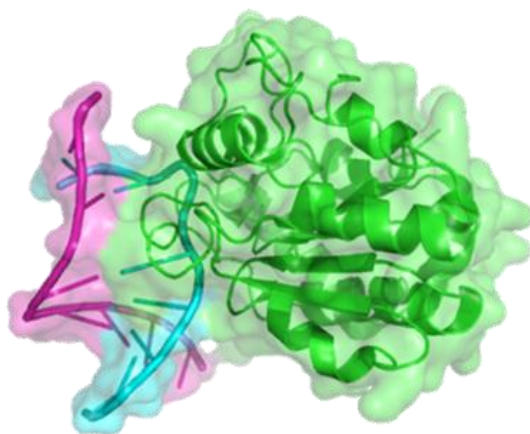
Témavezetők:

Prof. Vértessy G. Beáta, MTA doktora, egyetemi tanár

Róna Gergely, PhD hallgató

Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont

Enzimológia Intézet, Genom metabolizmus és javítás csoport



———— Eötvös Loránd Tudományegyetem ————
—— Természettudományi Kar ——
—— Budapest, 2012——

Tartalomjegyzék

1. Köszönetnyilvánítás	1
2. Rövidítésjegyzék	2
3. Bevezetés és irodalmi áttekintés	4
3.1 A DNS molekula	4
3.2 DNS hibák és javításuk	5
3.3 Uracil a DNS-ben.....	7
3.4 Az UDG enzimek csoportosítása	10
3.5 A humán UNG2 szerkezete	11
4. Célkitűzés	13
5. Anyagok és módszerek	15
5.1 Kompetens sejt készítés.....	15
5.2 Rekombináns DNS transzformálása	16
5.3 Fehérje expresszió	16
5.4 A sejtek feltárása	17
5.5 Fehérje kinyerése és tisztítása affinitás kromatográfiával.....	18
5.6 Nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézis	20
5.7 Agaróz gélelektroforézis	21
5.8 Spektrofotometriás koncentrációmérés	21
5.9 Western blot.....	22
5. 10 Uracilt tartalmazó plazmid előállítása	23
5.11 Cirkuláris plazmid linearizálása.....	24
5.12 Elektroforetikus mobilitás teszt (EMSA)	25
5.13 Agaróz-assay.....	25
5.14 Dot-blot.....	26
5.15 Fluoreszcens mikroszkópia.....	27
5.16 Konfokális mikroszkópia.....	27
5.17 Sejtvonalak fenntartása és passzálása	28
5.18 Sejtek plételezése és kezelése FdUR-el	28
5.19 Sejtek fixálása és festése a rekombináns fehérjével.....	28

6. Eredmények és értékelésük.....	31
6.1 Fehérjeexpresszió optimalizálása (próbaexpresszió)	31
6.2 Fehérjeexpresszió és tisztítás	34
6.3 Fehérjedegradáció vizsgálata.....	35
6.4 DNS-kötő képesség ellenőrzése.....	37
6.5 Katalitikus aktivitás ellenőrzése	39
6.6 A fehérje specifitásának ellenőrzése	41
6.7 Uracilfelhalmózódás térképezése MEF sejtek felhasználásával.....	44
6.8 További fehérjék tervezése a hatékonyabb uracildetektáláshoz	46
7. Összefoglalás	48
8. Irodalomjegyzék.....	49

1. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani csoportvezetőmnek, **Prof. Vértessy Beátának**, aki lehetőséget biztosított számomra a kutatócsoportban való munkára és hasznos tanácsokkal látott el a témámmal kapcsolatban.

Köszönöm **Prof. Buday Lászlónak**, az Enzimológia Intézet igazgatójának, hogy engedélyezte az intézetben végzett kutatómunkámat.

Kiemelt köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Róna Gergelynek**, aki megismertetett a laboratóriumi munka alapjaival, munkámat felügyelte és végtelen türelmével, precizitásával nagyban hozzájárult TDK-dolgozatom elkészüléséhez.

Köszönettel tartozom kollégámnak, **Scheer Ildikónak** a kvantitatív dot-blot kísérletekben való közreműködéséért.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Békési Angélának**, amiért rendelkezésemre bocsájtotta a vad típusú, és a dupla mutáns hUNG2-DsRed-M génjét tartalmazó plazmidokat.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni **a teljes kutatócsoportnak** a támogatást és az inspiratív környezet biztosítását.

2. Rövidítésjegyzék

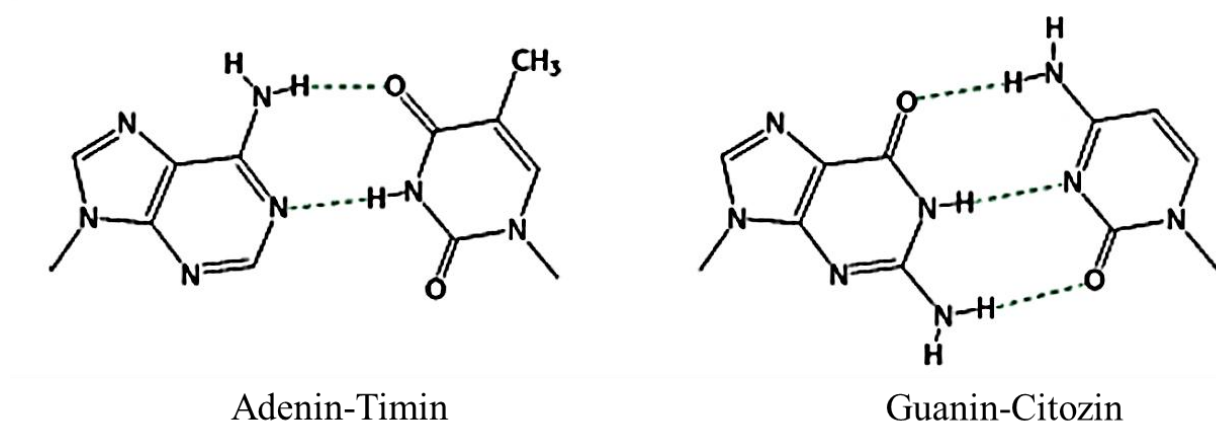
A	Adenin
AID	Activation-Induced Deaminase; Aktiválás indukált dezamináz
AP hely	Apurinic/apyrimidinic site; pirimidin/purin mentes hely
APE	AP endonukleáz (Endonukleáz IV)
APS	Ammónium-perszulfát
BA	Benzamidin
BER	Base excision repair; Báziskivágáson alapuló javítás
BSA	Bovine serum albumin; Szarvasmarha szérum albumin
C	Citozin
CAPS	N-ciklohexil-3-aminopropán-szulfonsav
CPD	Ciklobután-pirimidin-dimer
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNS	Dezoxiribonukleinsav
dNTP	Dezoxinukleozid-trifoszfát
dTMP	Dezoxitimidin-monofoszfát
DTT	Ditio-treitol
dTTP	Dezoxitimidin-trifoszfát
dUMP	Dezoxiuridin-monofoszfát
dUTP	Dezoxiuridin-trifoszfát
dUTPáz	Dezoxiuridin-trifoszfát-pirofoszfátáz
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay; Elektroforetikus mobilitás teszt
FBS	Fetal Bovine Serum
FdUR	5-fluoro-dezoxiuridin
G	Guanin
HEPES	N-(2-hidroxietil)-piperazin-N'-etánszulfonsav
HF	High fidelity
HRP	Horse Radish Peroxidase; Torma peroxidáz
HS	High salt
IPTG	Izopropil- β -D-tiogalaktozid
LB	Luria-Bertani (tápoldat)
LS	Low salt
LSCM	Laser Scanning Confocal Microscopy
MBD4	methyl-CpG-binding domain protein 4
MEF	Mouse embrional fibroblast/egér embrionális fibrobalszt
MMR	Mismatch repair; hibáspár javítás
MOPS	3-(N-morfolino)-propánszulfonsav

MS	Mass Spectrometry; Tömegspektrometria
NEB	New England Biolabs
NER	Nucleotide excision repair; nukleotid kivágó mechanizmus
NTA	Nitrilo-triecsav
ON	Overnight (kb. 16 óra)
PBS	Phosphate buffered saline; foszfátrendszer által pufferelt sóoldat
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polimerase chain reaction; polimeráz láncreakció
PMSF	Fenilmetánszulfonil-fluorid
PVDF	poli-vinilidén-fluorid
qPCR	Kvantitatív real time PCR
RNS	Ribonukleinsav
ROS	Reactive oxygen species; Reaktív oxigén gyökök
RPA2	Replication protein A2
SAM	S-adenozil-metionin
SDS	Sodium dodecil sulfate; Nátrium-dodecil-szulfát
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; Nátrium-dodecilszulfát - poliakrilamid gélelektroforézis
SMUG1	Single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase
T	Timin
TAE	Tris-acetát-EDTA puffer
TDG	T/U mismatch DNA glycosylase; T/U hibáspár DNS glikoziláz
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-etiléndiamin
TRIS	Trisz-(hidroximetil)-aminometán
TS	Timidilát szintáz
U	Uracil
UDG	Uracil-DNS glikoziláz
UGI	Uracil-glikoziláz inhibitor
UNG	Uracil-DNS N-glikoziláz
VHS	Very high salt buffer
β-ME	β-merkaptó-etanol

3. Bevezetés és irodalmi áttekintés

3.1 A DNS molekula

A Földön kialakult élő szervezetek számára nélkülözhetetlen a biológiai információ stabil tárolása és továbbadása egyik generációról a másikra. Ezt a feladatot egy lineáris polimer típusú makromolekula, a dezoxiribonukleinsav látja el. A DNS monomerjei a 2-dezoxi-D-ribózból, o-foszforsavból és nitrogéntartalmú heterociklusos bázisból álló nukleotidok, amelyek foszfodiészter-kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. A cukorhoz β -N-glikozid kötéssel kapcsolódó bázisok purinszármazékok (adenin és guanin) vagy pirimidinszármazékok (timin, uracil és citozin) lehetnek. A normál DNS molekula két antiparalel lefutású polinukleotid egységből épül fel, amelyek egymás köré tekeredve jellegzetes kettős hélix szerkezetet alakítanak ki. A két szál a bázisok között kialakuló hidrogénhid-kötések, és az egymás fölött elhelyezkedő aromás gyűrűk között fellépő van der Waals kölcsönhatások tartják össze. A bázispárok képzése szigorú szabályok szerint történik: az adeninnel szemben timin (2 hidrogénhid-kötés), a guaninnal szemben pedig citozin (3 hidrogénhidkötés) foglal helyet. Ezeket összefoglaló néven Watson-Crick féle bázispároknak nevezzük (3.1.1 ábra).



3.1.1 ábra A Watson-Crick féle bázispárok

Az adenin és timin között kettő, a guanin és citozin között pedig három hidrogénhidkötés alakul ki [1].

Az egyszálú ribonukleinsavak 2-dezoxi-D-ribóz helyett D-ribózt, timin helyett pedig uracilt tartalmaznak. A genetikai információt mindkét nukleinsav esetében a bázisok változatos sorrendje hordozza. Az információ áramlása néhány retrovírustól eltekintve DNS $\Rightarrow$ RNS $\Rightarrow$ fehérje irányú (centrális dogma), vagyis a transzkripció során képződő RNS szekvenciája megfeleltethető a DNS szekvenciának, a transzláció során képződő fehérje aminosav szekvenciája pedig N $\Rightarrow$ C irányban megfeleltethető az mRNS szekvenciának. Egyértelmű tehát, hogy a DNS megfelelő működése és információtartalmának megőrzése elengedhetetlen minden élőlény számára.

3.2 DNS hibák és javításuk

Az élő szervezetek DNS állománya számos endogén és exogén eredetű károsító hatásnak van kitéve. Ezek végeredménye az információt hordozó bázisok kémiai módosulása, illetve szélsőségesebb esetekben egyes és kettős száltörés. A DNS-károsító folyamatok közül igen gyakori az oxidáció, az UV abszorpció, az alkilálódás és a spontán dezamináció (3.2.1 ábra). A DNS hiba további forrásai lehetnek még az egymással szemben lévő, nem Watson-Crick párosodásnak megfelelő nukleotidok, melyek nagy része a replikáció során képződik a DNS-polimerázok nem 100%-os megbízhatósága miatt.

Az aerob metabolizmus melléktermékeként keletkező reaktív oxigén specieszek (pl szuperoxidok, peroxidok, hidroxilgyök) oxidatív DNS károsodást eredményeznek. Az oxidáció legnagyobb részben a szabad dNTP prekursorokat érinti, mert a DNS kettőshélixében „elrejtett” nukleotidok sokkal kevésbé hozzáférhetőek. Az így képződött hibás „építőelemek” a replikáció során beépülhetnek a genomba. A legjellemzőbb oxidációs termék a 2-hidroxi-adenin és a 8-hidroxi-guanin [2].

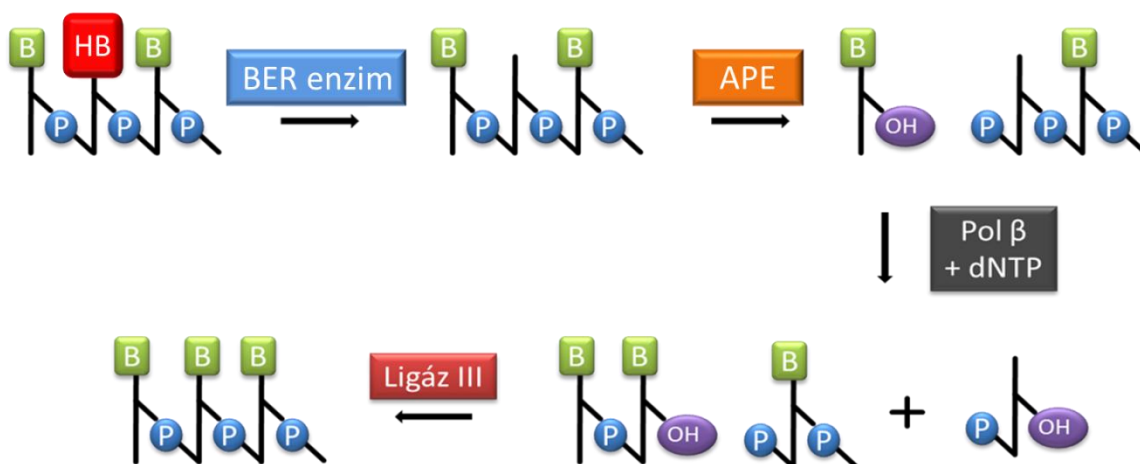
UV-fény elnyelésekor a szomszédos pirimidin-bázisok között ciklobután-pirimidin-dimerek (CPD) képződhetnek (cikloaddíciós reakció), a nagy energiájú, ionizáló sugárzások hatására pedig egyes és kettős száltörések jelenhetnek meg [3].

További káros módosulás lehet a bázisok nem enzimatis alkilálódása is. Ennek legfőbb endogén forrása az S-adenozil-metionin (SAM), amely szubsztitúciós reakcióban metilcsoportot kapcsol a bázisok nukleofil részeire. Kettős szálú DNS esetében a leggyakoribb termék a 7-metil-guanin és a 3-metil-adenin [4].

Gyakran előfordulhat még a bázisok aminocsoportjának spontán hidrolízise (dezaminálódás), amely a megfelelő hidroxivegyületet eredményezi. A termékek közül a legfontosabb az uracil (citozinból), a hipoxantin (adeninből) és a xantin (guaninból). Bizonyos anyagok (pl. salétromosav, nitrogén-oxidok, ROS) hatására a dezaminációs reakció sebessége jelentős mértékben megnövekszik [5].

A fent említett DNS-hibák legnagyobb része erősen mutagén, ezért a korrigálásuk minden organizmus számára létfontosságú feladat. Ennek ellátására az evolúció során több különböző javítási útvonal alakult ki.

Ezek közül igen fontos szereppel bír a báziskivágáson alapuló javító útvonal (Base Excision Repair/BER), melynek első lépése a hibás bázis enzimatiszta eltávolítása a cukor-foszfát gerincről. Ezt a feladatot a különböző bázismódosulásokra specifikus DNS-glikozilázok látják el. A kivágás után létrejövő bázismentes helyeket (AP site) az AP endonukleázok felismerik, majd elvágják a DNS cukor-foszfát gerincét az AP helyhez képest 5' irányban. Ezek után a DNS polimeráz β eltávolítja az „üres” cukor-foszfátot és beépíti az eredeti nukleotidot a templát szál alapján. Az utolsó lépésben a DNS ligáz újra kialakítja a foszfodiészter-kötést (3.2.1 ábra) [6, 7].



3.2.1 ábra A BER útvonal sematikus ábrája

A folyamat első lépése a hibás bázis („HB”) eltávolítása a megfelelő DNS-glikoziláz közreműködésével

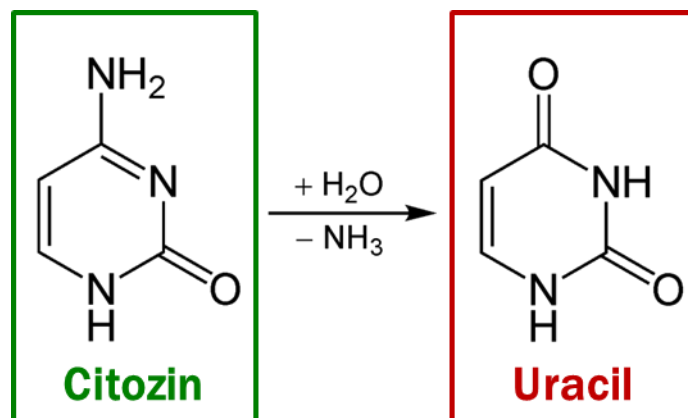
Az UV sugárzás hatására keletkező pirimidin-dimerek eltávolítása a nukleotid kivágó mechanizmussal történik (Nucleotide Excision Repair/NER). Prokariótákban először az UvrA fehérjéből álló dimer kikötődik a DNS-hibához, majd az UvrB és UvrC közreműködésével egy rövidebb szakasz leemésztődik a DNS egyik száláról (a két hibás nukleotidot is beleértve). Ezután a DNS-polimeráz I beilleszti a megfelelő nukleotidokat, majd a DNS ligáz összekapcsolja a szabad végeket [3].

A replikáció során képződő, nem Watson-Crick bázispárok helyreigazítása a hibaspár javítómechanizmus feladata (Mismatch repair/MMR). Prokariótáknál ennek első lépése a hibás bázispár felismerése a MutS fehérje által. A MutS a MutH fehérje segítségével aktiválja a MutL exonukleázt, amely a hiba mellett elvágja az újonnan szintetizálódott DNS szálát. A MutL hatására még néhány további enzim lép működésbe, amelyek leemésztenek egy hosszabb szakaszt a DNS-szálról (a hibás nukleotidot is beleértve). Az utolsó lépésben a DNS polimeráz III újraszintetizálja a hiányzó nukleotidokat, a DNS ligáz pedig kialakítja a foszfodiészter-kötést a szabad végek között [8, 9].

3.3 Uracil a DNS-ben

Annak ellenére, hogy az uracil nem tartozik a DNS natív összetevői közé, az egyik leggyakoribb hibaként mégis megtalálható benne. Megjelenése két fő útvonalon keresztül valósulhat meg.

Az egyik a citozin dezaminálódása (3.3.1 ábra), amely fiziológias körülmények között is gyakori eseménynek számít [5]. A keletkező G:U pár, a hibajavítás elmaradása esetén A:T tranzíciót eredményez a DNS-megkettőződés során az egyik szálon, vagyis mutagén hatású. Az RNS-világ hipotézis értelmében a timint tartalmazó DNS csak később jelent meg az evolúció során. Az uracil lecserélésére feltehetőleg azért volt szükség, hogy a sejt meg tudja különböztetni azt a citozin dezaminálódásából származó uraciltól, és hogy ez által lehetővé váljon ennek szelektív javítása. Erre a célra az idők folyamán a metilcímkevel ellátott uracil, a timin (5-metil-uracil) szelektálódott [10, 11].

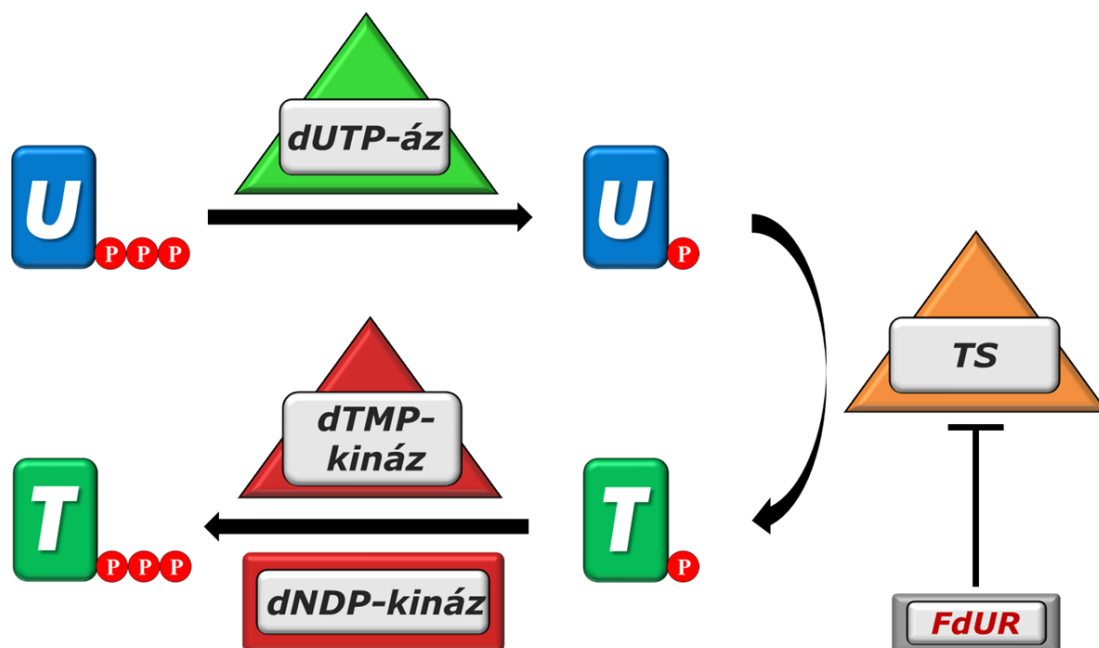


3.3.1 ábra A citozin dezaminálódása

A mutagén G:U párt eredményező folyamat fiziológias körülmények között is gyakran lejátszódik.

A másik út a dUTP hibás beépítése a replikáció során, amely azért lehetséges, mert a DNS polimerázok (az archeákat leszámítva) nem képesek hatékonyan különbséget tenni a hidrogénkötési mintázatuk szempontjából ekvivalens dTTP és dUTP között. Az így bekerült uracil nem mutagén (A:U pár), azonban megváltoztathatja a különböző fehérjék DNS-hez való affinitását, így a javítás ebben az esetben is szükséges.

Ahhoz, hogy a DNS-szintézis során ne épüljön be az uracil, a dTTP/dUTP arányt megfelelően magas értéken kell tartani. Ennek biztosításában két enzim, a dezoxiuridin-trifoszfát pirofoszfataz (dUTPáz) és a timidilát-szintáz (TS) játszik kulcsszerepet. A dUTPáz a dUTP mennyiségét csökkenti azáltal, hogy azt dUMP-re és inorganikus pirofoszfátra hidrolizálja. A képződött dUMP-ből a timidilát-szintáz dTMP-t állít elő, ami pedig kinázok (dTMP-kináz és NDP-kináz) hatására dTTP-vé alakul (3.3.2 ábra) [10, 11]. A timidilát-szintáz fontos célpontja lehet bizonyos kemoterápiás drogoknak (pl. 5-fluoruracil, 5-fluorodezoxiuridin, raltitrexed) is. A TS inhibitorok hatására a sejtekben lecsökken a dTTP-koncentráció, melynek következtében megnő a DNS uraciltartalma, ami pedig végső soron sejthalált eredményez (daganatos sejtek elpusztítása) [12].



3.3.2 ábra A megfelelő dTTP/dUTP arány kialakítása a sejtben

A folyamatban résztvevő két kulcsenzim a dUTPáz és a timidilát-szintáz

A DNS-ben megjelenő uracil azonban fiziológias folyamatokban is kulcsfontosságú lehet. Jó példa erre a szomatikus hipermutáció és az osztályváltó rekombináció, amelyek fontos szerepet játszanak a B-limfociták érésében az immunválasz során. Mindkét folyamat első lépésében a DNS megfelelő szakaszán elhelyezkedő néhány citozin enzimatikusan dezaminálódik az AID (aktiválás-indukált dezamináz) fehérje hatására, majd a képződő uracil a BER útvonalon keresztül kivágódik [13, 14]. A DNS-ben a megfelelő fejlődési stádiumban, és szövetben megjelenő uracilnak kiemelt szerepe lehet a *Drosophila melanogaster* megfelelő egyedfejlődésében is [15, 16]. Ezeken felül az emelkedett uraciltartalom a HIV-DNS genomba való integrálódásában is fontos szerepet játszik [17].

Az eddigi irodalmi adatok ismeretében az uraciltartalom mérése kvantitatív PCR (qPCR) és tömegspektrometria (MS) segítségével történhet [12] [18]. A qPCR technikával egy megadott, körülbelül 1000bp hosszú DNS szakaszon vizsgálhatjuk az uracil előfordulását. A mérés alapja, hogy a felhasznált *P. furiosus*-ból származó DNS-polimeráz (Pfu-polimeráz) uracilhoz érve nem képes folytatni a szintézist, így ha mindkét szál tartalmaz legalább egy uracilt, akkor nem történik amplifikáció. Ezzel párhuzamosan a kísérletet egy uracilra nem érzékeny polimerázzal (V93Qmutáns Pfu) is elvégezzük, majd a két részeredményből egy statisztikai modell felhasználásával kiszámítható az uraciltartalom [18].

Megjegyzendő azonban, hogy a jelenlegi, uracil mérésére alkalmas módszerekkel nem tudjuk meghatározni az uracil-hibák genomban való eloszlási mintázatát, csak azok összmenyiségére következtethetünk.

3.4 Az UDG enzimek csoportosítása

A DNS-ben jelen lévő uracil eltávolítását az uracil-DNS-glikozilázok (UDG) végzik, melyek a báziskivágáson alapuló javítás (BER) enzimek. Ezek a fehérjék képesek szelektíven felismerni az uracilt, majd a β -N-glikozid kötés hidrolízisével kialakítják az AP helyeket. Emlősökben legalább 5 különböző UDG ismert, névszerint az UNG1, UNG2, TDG, SMUG1 és az MBD4 [7, 19].

Az ung génről, az alternatív promóterhasználat révén két fehérje is képződhet, amelyek csak az N-terminális részükben különböznek egymástól. Az egyik a mitokondriális lokalizációjú UNG1, a másik pedig a magi lokalizációjú UNG2. Az UDG-közül az UNG fehérjék képesek a leghatékonyabban eltávolítani az uracilt a DNS-ből. Aktívak egyes és kettősszalú DNS-en, valamint képesek kivágni az uracilt az A:U és a G:U párokból is [19, 20].

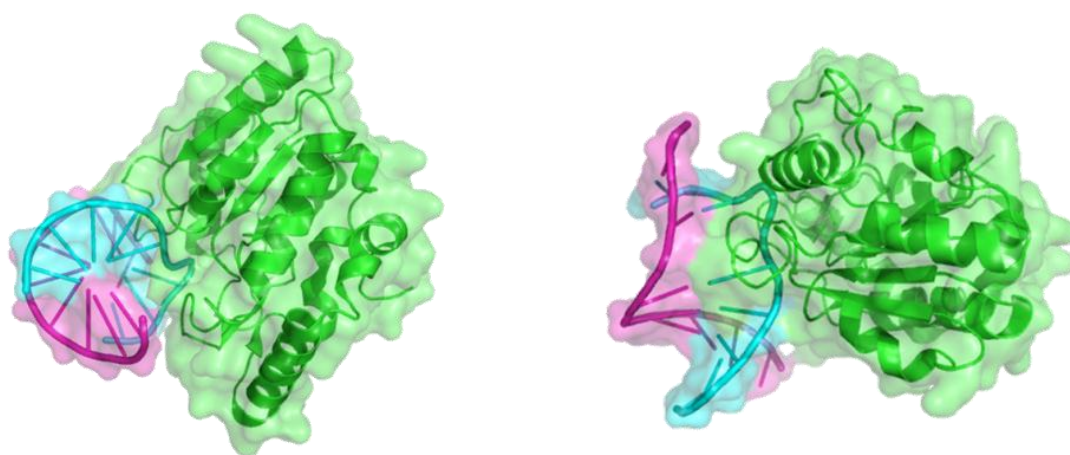
A T/U hibaspár DNS-glikoziláz (T/U mismatch DNA glycosylase/TDG) a timin és az uracil eltávolítására is alkalmas G:T és G:U párokból. Az enzim csak kettős szalú DNS-en aktív és az affinitása jóval nagyobb a G:U párhoz [19, 21].

A SMUG1-et (single-strand-selective monofunctional uracil-DNA-glycosylase) felfedezésekor egyes szalú DNS-en aktív hibajavító fehérjeként azonosították, azonban később kiderült, hogy kettős szalú DNS-el is működik. Az enzim szubsztrátspecifitása az előzőeknél szélesebb spektrumú, mivel nemcsak az uracil, hanem egyéb bázishibák eltávolítására is alkalmas (pl. 5-hidroximetil-uracil; 3,N4-etenocitozin). Feltehetőleg az 5-hidroximetil-uracil kivágásáért felelő legfőbb enzim a SMUG1 [19].

Az MBD4 (Methyl-CpG-binding domain protein 4) hibás uracilt és timint képes eltávolítani a dezaminálódott CpG- ből (egymás mellett lévő citozin és guanin) és a dezaminálódott metil-CpG-ből [19].

3.5 A humán UNG2 szerkezete

A későbbi kísérleteink tárgyát képező humán UNG2 egy magi lokalizációjú uracil-DNS-glikoziláz. Az enzim öt konzervált szerkezeti motívumot tartalmaz. Ezek rendre a vizet aktiváló hurok ($^{143}\text{GQDPYH}^{148}$), a DNS 5' irányba való elhajlásáért felelős hurok ($^{165}\text{PPPPS}^{169}$), az uracil kötő rész ($^{199}\text{GVLLN}^{204}$), a DNS 3' irányba való elhajlásáért felelős hurok ($^{246}\text{GS}^{247}$) és a DNS kisarkába nyúló ($^{268}\text{HPSDLS}^{273}$) rész [20]. Az enzimen vékony pozitív árok található, amely a DNS felismerésért felelős. Ebben az árokban található a fehérje aktív centruma, az uracilkötő zseb is. A DNS szál a fehérje megkötődésének hatására $\sim 45^\circ$ -os szögben elhajlik, majd az adott helyen lévő nukleobázis kifordul a kettős hélixből (3.5.1 ábra) [20, 22].



3.5.1 ábra hUNG2-DNS komplex szerkezete oldalnézetből és felülnézetből

Az ábrán a DNS egyik szála rózsaszínnel, a másik szála pedig kézzel van jelölve.

Az adott helyen lévő nukleobázis kifordul a kettős hélixből. (PDB ID: 2OYT)

A hidrolízis azonban csak akkor lehetséges, ha ez a bázis uracil. Ez azért lehetséges, mert az uracilkötő zsebbe sem a timin, sem a citozin nem illeszkedik, a purinbázisok pedig a nagyobb méretük miatt eleve nem férnek be. A timin kizárásáért a 147-es tirozin aminosav felelős, amelynek hatására nem kerülhet be az 5-ös pozíció szubsztituált pirimidinbázis. Ha a tirozint alaninra változtatjuk (Y147A pontmutáció), akkor az enzim timinre lesz specifikus. Hasonló módon történik a citozin kizárása is a 204-es aszparagin segítségével, amely normál esetben hidrogénkötést létesít az uracillal az N3 és O4 pozíciók között. A citozin esetében ez nem tud megvalósulni, vagyis elmarad a hidrolízis. Ha az aszparagint aszparaginsavra változtatjuk (N204D pontmutáció), akkor az enzim citozinra lesz specifikus [20].

A fehérje katalitikus aktivitása jelentősen lecsökken a D145N pontmutáció hatására (a változás a vizet aktiváló hurkot érinti). A D145N és H268N dupla pontmutáció hatására, az uracil kötő képesség megtartása mellett a katalitikus aktivitás teljesen megszűnik [23].

4. Célkitűzés

A kutatómunkám célja egy olyan kvalitatív módszer kidolgozása, amellyel sejtekben, szövetekben lehetne kimutatni a DNS-be hibásan beépült, vagy egyéb úton (pl. a citozin dezaminálódása során) képződött uracil pozícióját. Ez azért lenne érdekes, mert az eddigi módszerek (qPCR és MS alapú) elsősorban az uracil mennyiségi meghatározására alkalmasak, így az uracil-hibák genomban való eloszlási mintázata csak nehezen vizsgálható. Megfelelő specifikitású ellenanyag hiányában a megoldást egy olyan fluoreszcensen jelölt, mutáns uracil-DNS-glikoziláz jelenthetné, amely szelektíven kötődik a DNS-ben jelen lévő uracilhoz, azonban nem képes azt lehidrolizálni a cukorfoszfát gerincről. Erre a célra a DsRed-M nevű fluoreszcens fehérjével fuzionált katalitikusan inaktív humán UNG2 (D145N és H268N pontmutáció) enzimet szeretném használni (4.1 ábra).



4.1 ábra A DsReddel fuzionált konstrukt szerkezete

A DsRed-M-mel fuzionált konstrukt C-terminális vége His-taget hordoz, affinitás kromatográfiás tisztítás végett.

Munkám során három fő célt tűztem ki:

1. A fehérjeexpresszió optimalizálása és a szükséges mennyiségű fehérje előállítása

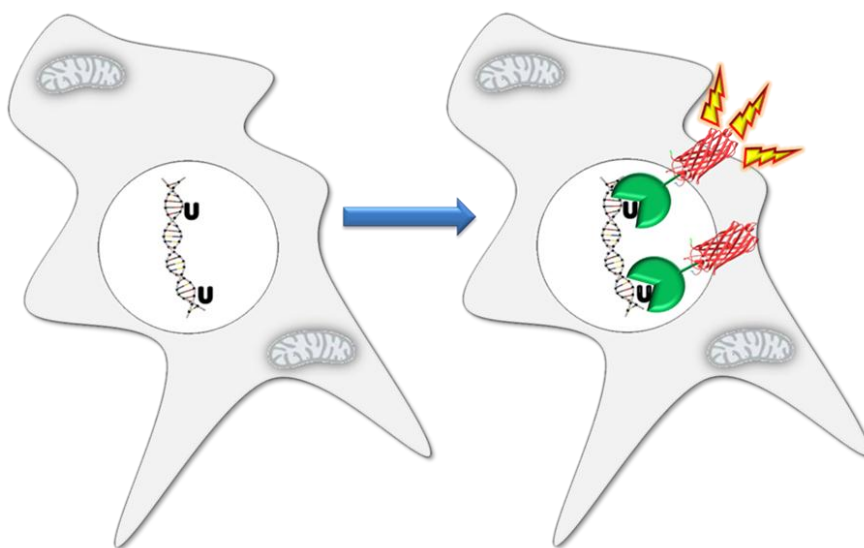
A duplamutáns UNG-DsRed-M fehérje mellett szükség volt a vad típusú UNG-DsRed-M fehérje előállítására is, hogy azt a későbbi kísérletekben kontrollként használhassuk. Az expresszió optimalizálását 5 féle *E. coli* törzsszel végeztem két különböző hőmérsékleten. A fehérje termelésére legalkalmasabb sejttípust és a megfelelő hőmérsékletet a próbaexpresszió alapján választottam ki.

2. Az expresszált dupla mutáns enzim karakterizálása

A natív hUNG2 D145N és H268N pontmutációk hatására, az uracil kötő képességének megtartása mellett, képtelenné válik a β -N-glikozid kötés hidrolízisére [23]. A fluoreszcens jelölés után azonban nem biztos, hogy megmaradnak ezek a tulajdonságok. A későbbi kísérletekhez tehát feltétlenül szükséges meggyőződni arról, hogy a megtermelt rekombináns fehérje az elvárt módon működik, tehát katalitikusan inaktív (nem hidrolizálja le az uracilt) és változatlanul kötődik a DNS-molekulához.

3. Uracil detektálására az előállított fehérjével

A kísérletek megkezdése előtt fontos ellenőrizni a fehérje uracil tartalmú DNS-re mutatott specificitását. Ezek után kerülhet csak sor az in vitro, és a sejt rendszerben történő uracil kimutatásra. A detektálás a hUNG2-DsRed-M fluoreszcenciája alapján lenne megoldható (4.2 ábra).



4.2 ábra A sejt rendszerben történő uracilfelhalmozódás tervezett detektálásának sematikus ábrája

A sejt genomjában megjelenő uracil, az azt specifikusan felismerő hUNG2-DsRed-M fluoreszcenciája alapján lenne detektálható.

5. Anyagok és módszerek

5.1 Kompetens sejt készítés

A fehérjeexpresszióhoz használt *E. coli* sejteket alkalmassá kell tenni a rekombináns DNS (a célfehérjét kódoló cirkuláris DNS /plazmid/) hatékony felvételére. Ezt a művelet nevezzük kompetens sejt készítésnek.

Fagyasztott, -80°C-on tárolt *E. coli* szuszpenzióba steril pipetaheggyel kacsolunk, majd a sejteket 5ml 33,9 µg/ml chloramphenicol-t tartalmazó Luria Broth (LB) -táppoldatba oltjuk és 37°C-os rázógépből overnight (~16 h) felnevesztjük. Az expressziós kísérletekben használt összes baktériumtörzs chloramphenicol-rezisztens (BL21 pLys, BL21 Star pLys, BL21 Rosetta, BL21 ung-, BL21 Codon+) . A felszaporított előkultúrából 0,5 ml-t 50 ml chloramphenicol tartalmú LB-oldatba mérünk, majd 37°C-on addig rázatjuk, amíg a 600 nm-en mért optikai denzitása (A_{600}) 0,4 körüli érték lesz (~2 óra). Az abszorbanciákat spektrofotométeren mértem üres LB-oldatot használva referenciaként. Az 50 ml szuszpenziót steril falconba önjük át és 4°C-on 20 percig centrifugáljuk 2300 g-vel. A felülúszó folyadék leöntése után a sejtpelletet visszaszuszpendáljuk 10 ml TFB I.-oldatban, majd a kapott szuszpenziót 20 perc jégen való hűtés után ismét lecentrifugáljuk (4 °C, 20 perc, 2300 g). A felülúszót leöntjük, a sejtsapadékokat pedig visszaszuszpendáljuk 1ml TFB II.-oldatban és 20 percig hűtjük jégen. Az elkészített 1ml sejtsuszpenzióhoz 150 µl steril szűrt 95%-os glicerint adunk, majd a teljes mennyiséget 100 µl-es adagokra osztjuk szét. A csöveket folyékony nitrogénben való gyorsfagyasztás után -80°C-on tároljuk.

A felhasznált oldatok:

LB-táppoldat: 10 g/l tripton

5 g/l élesztőkivonat

10 g/l NaCl

pH=7,0

TFB I.-oldat: 100 mM RbCl

50 mM MnCl

30 mM K-acetát

10 mM CaCl₂

15 % glicerín

pH=5,8

TFB II.-oldat: 10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂
15 % glicerín
pH=6,8

5.2 Rekombináns DNS transzformálása

A rekombináns DNS baktériumsejtbe juttatását transzformációnak nevezzük.

A hatékony plazmidfelvétel érdekében kompetens sejteket használunk, melyek pozitív ionokat tartalmazó (kedvez a negatív DNS megkötődésének), fellazított sejtfallal rendelkeznek. A DNS felvétele aktív transzporttal történik.

A transzformáláshoz felhasznált 100 µl kompetens sejthez 14,23 mM koncentrációban β-merkaptóetanolt adtunk és 5 percig hagyjuk állni jégen. Ezután adjuk hozzá a körülbelül 100 ng mennyiségű plazmidot (vizes oldat formájában), majd további 30 percen át jégen állni hagyjuk. A sejteket ezután 1 percig tartó 42°C-os hő sokknak vetjük alá. Ennek hatására történik meg a sejtfalban megkötődött DNS felvétele. A hő sokk után 2 percig jégen hűtjük a szuszpenziót, 200 µl friss LB-t mérünk rá és egy óráig rázatjuk 37 °C-on antibiotikumtól mentesen. A sejteket ezután két antibiotikumot tartalmazó plate-en (50 ml LB; 0,75g agaróz; 33,9 µg/ml chloramphenicol; 50 µg/ml carbenicillin) kikenjük és overninght 37°C-on inkubáljuk. A transzformálás során használt plazmid, amelyről a kívánt fehérje expressziója megvalósítható, carbenicillin rezisztenciát is hordoz, ezért csak azok a sejtek képesek elszaporodni, amelyek felvették.

5.3 Fehérje expresszió

A bejuttatott rekombináns DNS-ben (pET-20b vektorban kódolt UNG2-DsRed fúziós fehérje) a fehérje szekvenciája előtt T7 promóter található, amihez a T7 RNS polimeráz képes kötődni. Az általunk felhasznált baktériumok genomjába mesterségesen beépítették a T7 RNS polimeráz génjét, melynek átírását az előtte lévő lac operátor és lac promóter szabályozza. A lac operátor szakaszon kötődik meg a sejt által folyamatosan termelt represszor fehérje, amely csak laktóz vagy megfelelő laktóz-analóg (például IPTG) megkötésekor engedi el a DNS-t.

Laktóz (vagy laktóz-analóg) hatására tehát a represszor leválik az operátor régióról, megindul a T7 RNS polimeráz szintézise, ez pedig megkezdí a kívánt gén átírását.

A plate-en felnevesztett kolóniákból 4-5-be steril pipettahegyet nyomunk, 50 ml LB-oldatba dobjuk és a baktériumokat overnight felszaporítjuk a megfelelő antibiotikumok jelenlétében. Az így kapott előkultúrából 5 ml-t átpipetázunk 500 ml LB-oldatba (a próbaexpressziónál minden sejttípus esetében 50 ml LB-t használtam fel ennél a lépésnél) és 37°C-on rázatjuk körülbelül $A_{600}=0,6$ -os optikai denzitás eléréséig (~2 h). A fehérje termelését 0,6 mM IPTG-vel indukáljuk és overnight 20°C-on expresszálunk rázótermosztátban (a próbaexpresszió esetében minden sejttípussal elvégeztük a 4 órás 30°C-os expressziót is). A szuszpenziót ezután 20 percig centrifugáljuk 4000 g-vel, a felülúszót leöntjük, majd a sejtpelletet folyékony nitrogénnel gyorsfagyasztjuk és -80°C-os hűtőben tároljuk feltárásig.

A felhasznált oldat:

PBS: 138 mM NaCl
2,7 mM KCl
1,31 mM NaH_2PO_4
8,69 mM Na_2HPO_4
pH=7,4

5.4 A sejtek feltárása

A fagyasztott sejtsapadékokat potterező edénybe helyezzük és felszuszpendáljuk 50 ml (próbaexpresszió esetében törzsenként 5ml) lízis pufferben. A lízis puffer feladata a célfehérjét a baktériumból felszabadítani, és azt oldható fázisban tartani. A lizozim a sejfalat alkotó poliszacharidok enzimatis hidrolíziséét felelős, a Triton X-100 nemionos detergens pedig a sejtmembrán diszpergálását végzi. A magas sótartalom miatt fennálló hipertóniás közeg elősegíti a sejtek feltárodását. A DNáz és az RNáz a sejtekben lévő nukleinsavak bontásáért felelős, a jobb viszkozitás és kezelhetőség érdekében. A redukív közeg biztosító β -merkaptoetanol megakadályozza a diszulfid-hidak kialakulását a fehérjék között, ezáltal az esetleges aggregációt. A PMSF a szerin-proteázokat, a BA a trombin-szerű proteázokat, az EDTA a fém kofaktorral rendelkező metalloproteázokat. A Roche által gyártott proteáz gátló

koktél egy széles spektrumú proteázgátló, amely számos proteáz működését gátolja. A feltárás végén az oldatba került, részlegesen elemésztett DNS molekulák miatt viszkózus folyadékot kapunk. A sejtmarmadványok, DNS és az egyéb sejtalkotók (például sejtfa törmelék) további feldarabolását ultrahangos szonikálással végezzük jeges hűtés mellett. A mintában még mindig jelen lévő oldhatatlan, szilárd sejtörmelékeket centrifugálással távolítjuk el (30 perc, 4 °C, 22000 g).

A felhasznált oldat:

Lízis puffer: 50 mM TRIS

300 mM NaCl

0,5 mM EDTA

0,1 V/V% Triton X-100

1 mM fenil-metilszulfonil-fluorid (PMSF)

5 mM benzamidin (BA)

2 db EDTA mentes proteázgátló tabletta

10 mM β -merkaptoetanol (β -ME)

0,1 mg/ml lizozim

0,1 mg/ml DNáz

0,01 mg/ml RNáz A

pH=8,0

5.5 Fehérje kinyerése és tisztítása affinitás kromatográfiával

A szelektív elválasztás azon alapul, hogy a rekombináns fehérje a C-terminális részén hisztidin-címkét (hat darab hisztidin /His-tag/) tartalmaz, amely Ni(II)-ionokkal rendkívül stabil kelátkomplexet képes kialakítani.

A sejteltárás után kapott oldatból a célfehérjét nikkel-nitrilo-trieetsav (Ni-NTA) hatóanyagú oszlop segítségével választjuk el. Az oszlopot először lízis pufferrel ekvilibráljuk. A jégen hűtött fehérjeoldathoz 30 mM koncentrációban imidazolt adunk, majd Pasteur-pipetta segítségével az oszlopra juttatjuk egy viszonylag alacsony átfolyási sebesség mellett. Ezek után az oszlopot különböző összetételű oldatokkal mossuk: rendre LS-pufferrel, HS-pufferrel,

VHS-pufferrel és differenciáló pufferrel. Erre azért van szükség, hogy eltávolítsuk a gyantához aspecifikusan kikötődött fehérjeszennyezőket. A nagyobb tisztaság érdekében a fehérje leoldásához gradiens-elúciót alkalmazunk. Az elúciós puffer imidazoltartalmát 20 perc alatt lineárisan növeljük 0 mM-ról 350 mM-ra (a frakciókat 1,5ml-es Eppendorf-csövekbe gyűjtjük). A próbaexpresszió esetében a differenciáló-puffer imidazoltartalma 30 mM, az elúció pedig egyszeri, 500 mM imidazoltartalmú LS-pufferes mosással történik. A frakciókból mintát veszünk és SDS-PAGE alapján meghatározzuk, majd összeöntjük a legtöményebb és legtisztábbakat. Az így kapott oldatot dializismembránba pipetázzuk és dialízis pufferben overnight dializáljuk. Ezek után a kapott fehérjeoldatot membrános töményítő oszlopba helyezük, és addig centrifugáljuk, amíg fagyasztásra optimális koncentrációt el nem ér (>1.5 mg/ml). A betöményítés után a mintát kisebb adagokra osztjuk, folyékony nitrogénben gyorsfagyasztjuk és a felhasználásig folyékony nitrogénben tároljuk.

A felhasznált oldatok:

LS-puffer:	50 mM HEPES	VHS-puffer:	20 mM HEPES
	30 mM KCl		500mM NaCl
	5 mM β -ME		40mM imidazol
	pH=7,5		5 mM β -ME
			pH=7,5
HS puffer:	50 mM TRIS	Differenciáló puffer:	50mM imidazol
	300 mM KCl		5mM β -ME
	5 mM β -ME		pH=7,5
	pH=7,5		(LS-pufferben oldva)

Elúciós puffer: 0-350 mM imidazol
0,1 mM PMSF
1 db EDTA mentes
proteázgátló tabletta
10 mM β -ME
pH=7,5
(LS-pufferben oldva)

Dialízis puffer: 30 mM TRIS.HCl
140 mM NaCl
0,01 V/V% Tween-20
1 mM EDTA
15 mM β -ME
pH=7,4

5.6 Nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézis

A nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) egy széles körben alkalmazott eljárás a fehérjék moláris tömeg szerinti szétválasztására.

A fehérjemintához négyszeres térfogatú mintakotélt adunk, majd öt percre 95°C-os száraz termosztátba helyezzük. A kész gelet az elektroforézis-készülék futtató kádjába helyezzük, a kádat pedig feltöltjük futtatópufferrel. A megfelelő mennyiségű fehérjemintát hamilton-fecskendő segítségével juttatunk a gél zsebeibe. A zsebek egyikébe az ismert moláris tömegű fehérjéket tartalmazó oldat, a „fehérjelétra” kerül. A gélelektroforézist 200V feszültség mellett addig végezzük, amíg a mintakotélba kevert brómfenolkék frontvonal el nem éri a gél legalsó részét. Ezután a gelet kivesszük, kétszer mossuk desztillált vízzel, majd Coomassie Brilliant Blue (fehérjéhez aspecifikusan kötődő, kék színű festék) tartalmú oldattal ON rázatjuk. Az előhívás után a festéket leönjük, a gelet pár óráig desztillált vízzel differenciáltatjuk, majd lefotózzuk.

A felhasznált oldatok:

Mintakotél: 250 mM TRIS.HCl
50 % glicerin
0,05 % brómfenolkék festék
10 % SDS
250 mM DTT
pH=7,8

Futtatópuffer: 25 mM TRIS
192 mM glicin
0,1 % SDS
pH=8,5

5.7 Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz-gélelektroforézis a nukleinsavak méret (moláris tömeg) szerinti elválasztására alkalmas módszer.

TAE-pufferhez 0,75g/100ml arányban agarózt adunk. Az agaróz feloldásához a keveréket forrásig melegítjük, majd hideg vízzel 60°C hőmérsékletre hűtjük. Ezek után az oldathoz 10000X-es hígításban GelRed (töltés nélküli interkaláló, nem karcinogén festék) festéket adunk és átöntjük a gélkészítésre használt műanyag edénybe. A zsebek kialakításához fésűt rakunk az oldatba és hagyjuk megszilárdulni (~10 perc). A műanyag edényt és az elkészített gelet futtatókádba helyezzük, majd a kádat feltöltjük TAE-pufferrel. A 20 V/V% futtatófestéket (6X DNA Loading Dye, Fermentas) tartalmazó DNS mintákból 10 µl-t pipetázunk a gél zsebeibe. A 100V-on végzett elektroforézis után a kapott gelet UV lámpa alatt lefotózzuk.

A felhasznált oldatok:

Futtatófesték: 10 mM TRIS-HCl	TAE-puffer: 40 mM TRIS-acetát
0,03 V/V% brómfenolkék	1 mM EDTA
0,03 V/V% xilol-cianol	pH=8,0
60 V/V% glicerin	
60 mM EDTA	

5.8 Spektrofotometriás koncentrációmérés

A nukleinsavak és fehérjék koncentrációmérését Nanodrop ND-1000 spektrofotométerrel végezzük. A minta itt nem küvettában, hanem két, egymástól 1mm-re lévő optikai szál között helyezkedik el. Ilyen elrendezés mellett nagyon kis térfogatok (1-2 µl) is megbízhatóan vizsgálhatók. A fehérjék 280 nm-en, nukleinsavak pedig 260 nm-en adnak elnyelési maximumot, amiért mindkét esetben az aromás gyűrűk π - π^* átmenete a felelős (fehérjéknél a triptofán és tirozin aminosavak, nukleinsavaknál a bázisok). A koncentráció meghatározását a szoftver a Lambert-Beer törvény ($A = \epsilon \cdot c \cdot l$) segítségével végzi a mérendő komponens fajlagos extinkciós koefficiensének ismeretében (fehérje és nukleinsav együttes

jelenlétekor a program automatikusan korrigál az egymásból származó elnyeléssel). Hosszabb nukleinsavak esetében az ε nem nagyon függ az összetételtől (csak a típustól), tehát közel állandó, meghatározott érték (kétszálú DNS-re 0.020 ml/ μ g*cm, egyszálú DNS-re 0.027 ml/ μ g*cm és RNS-re 0.025 ml/ μ g*cm). A fehérjék mérésekor mindig meg kell adni a hozzájuk tartozó ε -értéket. Ezek kiszámolását az Expasy nevű internetes oldal ProtParam szoftverével végezzük. Referenciaként minden esetben a minta készítéséhez felhasznált „üres” puffert használjuk.

5.9 Western blot

A western blot a fehérjék kvalitatív kimutatására alkalmazott analitikai módszer. A vizsgálandó fehérjekeveréket SDS-PAGE segítségével elválasztjuk, majd a kapott géllal szemben fehérjekötő membránt (PVDF, nitrocellulóz, nylon) helyezünk el. A gélben lévő fehérjéket elektromos tér segítségével a membránra kényszerítjük („blottolás”). A blottolás után a további fehérjekötődés megakadályozására a membrán üresen maradt helyeit más, a vizsgálat szempontjából inert fehérjékkel (pl. BSA vagy sovány tejpor) telítjük. Ezek után a membránt elsődleges ellenanyaggal kezeljük, amely specifikusan kötődik a vizsgálandó fehérjéhez. Ezt követi az elsődleges ellenanyagra specifikus másodlagos ellenanyag hozzáadása. A detektálást a másodlagos ellenanyaghoz kapcsolt jelzőmolekula teszi lehetővé (radioaktív címke, fluoreszcens csoport, enzim).

A tisztítás után kapott dupla mutáns UNG-DsRed oldatból hígítási sort készítünk és SDS-PAGE segítségével elválasztjuk. A kész gélben lévő SDS-t transzfer-pufferes mosással eltávolítjuk, majd a géllet PVDF membránnal szemben rögzítjük és transzfer pufferrel feltöltött blottoló kádba helyezzük. A fehérjék SDS hiányában a sav-bázis tulajdonságuknak és a hidrogénion koncentrációnak megfelelő relatív töltéssel rendelkeznek, ezért a sikeres transzfer érdekében ügyelni kell rá, hogy a puffer pH-ja a fehérje izoelektromos pontja felett legyen. A fehérjéket ezután 4°C-on 180 mA-es áramerősség mellett 16 órán keresztül blottoljuk, majd a készülék szétszedése után a sikeres PVDF membránra való kikötést egy reverzibilis fehérjefestékekkel ellenőrizzük (pl. Ponceau-S). A festéket TBS-T oldattal kimossuk, majd a membránt 2 óráig sovány tejpor oldatban rázatjuk („blokkolás”). Az újabb TBS-T-vel való mosás után a membránt 1,5 óráig kezeljük az elsődleges ellenanyaggal (a minták egyik részében ez Proteintech nyúlban termeltetett anti-UNG poliklonális ellenanyaga 1000X-es hígításban, a minták másik részében pedig a Millipore egérben termeltetett anti-

His-tag monoklonális ellenanyaga 1000X-es hígításban). A TBS-T-s mosást követően a membránt további 1 óráig rázatjuk a másodlagos ellenanyaggal (az anti-UNG-al kezelt minták esetében ez a GE-Healthcare HRP-vel konjugált anti-nyúl másodlagos ellenanyaga 5000X-es hígításban, az anti-His-tag-el kezelt minták esetében pedig a Sigma HRP-vel konjugált anti-egér másodlagos ellenanyaga 80000X-es hígításban). Az ellenanyaggal jelölt fehérjék előhívását a Millipore által gyártott kemilumineszcens szubsztráttal (Western Chemiluminescent HRP Substrate) végezzük a gyártó által javasolt protokollt követve, Kodak röntgenfilm felhasználásával. A membránok denzitometriás kiértékelést Uvi-doc szoftverrel végeztem.

A felhasznált oldatok:

TBS-T: 25 mM TRIS	sovány tejpor oldat: 5 m/V% sovány tejpor
137 mM NaCl	(TBS-T-ben)
2,7 mM KCl	
0,05 % Tween-20	Transzfer puffer: 10 mM CAPS
pH=7,4	15 V/V% metanol
	pH=10,0

5. 10 Uracilt tartalmazó plazmid előállítás

Az uracil tartamú plazmid előállítására a dUTP-áz és UNG fehérjék termelésére képtelen *E.coli* CJ-236 ung-/dut- sejteket használjuk. A két gén kiütése jelentős uracilfelhalmozódást okoz a sejtek DNS-állományában (qPCR mérések alapján 12-16 uracil/1000 bp).

A transzformálást 100 µl *E.coli* CJ-236 ung-/dut- kompetens sejttel végezzük 50 ng pEGFP (a EGFP fehérje génjét tartalmazó vektor, amely kanamycin rezisztenciát is hordoz) plazmid felhasználásával (lásd 5.2). Ezzel párhuzamosan a transzformálást *E.coli* XL1 Blue-val is elvégezzük, mert a későbbi kísérletekben szükség van egy uracilmentes negatív kontrollra is. A transzformálás után a sejteket két antibiotikumot tartalmazó plate-re (a CJ-236 esetében 33,9 µg/ml chloramphenicol és 50 µg/ml kanamycin, az XL1 Blue esetében pedig 12,5 µg/ml tetraciklin és 50 µg/ml kanamycin) szélesztettük és overninght 37°C-on inkubáljuk.

A plate-en felnövesztett kolóniákból egybe steril pipettahegyet nyomunk, 5 ml LB-oldatba dobjuk és a baktériumokat overnight felszaporítjuk. Az így kapott sejt kultúrákat 20 percig centrifugáljuk 3600 rpm fordulatszámmal, majd leöntjük a felülúszót. A sejtekből a Macherey-Nagel cég NucleoSpin Plasmid kitjével izoláljuk a DNS-t a gyártó által javasolt protokoll szerint. A spektrofotometriás koncentrációmérés után a plazmidokat -20°C-os hűtőben tároljuk a felhasználásig.

5.11 Cirkuláris plazmid linearizálása

A cirkuláris plazmidok többféle szupercsavart szerkezettel is rendelkeznek. A különböző formák elektroforetikus mobilitása eltérő, vagyis agaróz gélelektroforézis során több vonalat adnak. A könnyebb kiértékelés érdekében a kísérletekhez felhasznált plazmidokat NotI restrikciós endonukleázzal linearizáljuk. A NotI által felismert nukleotidszekvencia csak egyszer szerepel a pEGFP konstrukcióban (ez teszi lehetővé a linearizálást) ugyanakkor nem tartalmaz timint, vagyis az enzim működésére nincs hatással az uracilfelhalmozódás.

Az emésztést 0,1 mg/ml BSA-t is tartalmazó NEB4 pufferben végezzük 80 ng/μl DNS-koncentráció mellett. A NotI-HF enzimből (New England Biolabs) 1,5 μl-t használunk 50 μl-es össztérfogat esetén. Az így elkészített oldatokat 37°C-on termosztáljuk 90 percig, majd az enzimet 65°C-on hőinaktiváljuk 20 percig. A lineáris DNS-t a Macherey-Nagel cég NucleoSpin Gel and PCR Clean-up nevű kitjével izoláljuk a gyártó által javasolt protokoll szerint.

A felhasznált oldat:

NEB4 puffer: 50 mM Kálium-acetát
20 mM TRIS-acetát
10 mM Magnézium-acetát
1 mM DTT
pH=7,9

5.12 Elektroforetikus mobilitás teszt (EMSA)

Az elektroforetikus mobilitás teszt a nukleinsavkötő fehérjék vizsgálatára alkalmas. Agaróz gélelektroforézis során a fehérje-nukleinsav komplex kisebb mobilitással rendelkezik, mint a szabad nukleinsav, ezért ehhez képest a nagyobb molekulatömeg felé tolódik el.

A normál és uracilos linearizált DNS-ekből 12 ng/μl koncentrációjú oldatot készítünk UNG dialízis puffer felhasználásával. A kötődés vizsgálatához több különböző koncentrációban vad típusú UNG-DsRed és duplamutáns UNG-DsRed fehérjét mérünk a DNS-hez (a koncentrációkat a gélkép fölött tüntettem fel). Az így kapott mintákat, natív körülmények között agaróz gélen megfuttatjuk 100V-os feszültség mellett.

5.13 Agaróz-assay

A vad típusú és duplamutáns UNG fehérjék aktivitásának ellenőrzését agaróz gélelektroforézissel végeztük (agaróz-assay). Az UNG hatására az uracilos DNS-en bázismentes helyek (AP site) képződnek. Az AP endonukleáz (APE) a bázismentes helyeket felismeri és kivágja azokat a DNS-ből, vagyis száltörést eredményez. Aktív UNG és APE enzimeket használva az uracilos plazmid feldarabolódik és agaróz gélen megfuttatva jóval kisebb moláris tömeg felé tolódott, elmosódott sávokat eredményez.

Az uracilos és uracilmentes pEGFP plazmidokból 15 ng/μl koncentrációjú oldatot készítünk APE-pufferben (Fermentas), majd 2 μg/ml koncentrációban UNG fehérjét mérünk hozzá és 1 órán át 37°C-on termosztáljuk. Ezek után a DNS-hez 500 unit/ml koncentrációban APE enzimet adunk és újabb 1 óráig termosztáljuk 37°C-on. Az így kapott oldatokhoz 3:1 arányban inaktiváló mintakotélt keverünk, 15 percig termosztáljuk (37°C), majd a mintákat agaróz gélen megfuttatjuk 100V-os feszültség mellett. A kísérletet a vad típusú és a dupla mutáns fehérjékkel végeztük uracilos és uracilmentes plazmidok felhasználásával. Kontrollként a gélen APE-mentes, UNG-mentes és UGI-t (Uracil-glikoziláz inhibitor, New England Biolabs) tartalmazó minták is szerepelnek (mindkét plazmiddal). A módszer alkalmazhatóságát, ugyanilyen körülmények mellett 10 unit/ml kereskedelmi forgalomban kapható bakteriális, DsRed-mentes UNG-al (Fermentas) ellenőriztük.

Felhasznált oldatok:

APE-puffer: 50 mM Tris-acetát	Inaktiváló mintakoktél: 5 mM TRIS.HCl
50 mM KCl	0,015 V/V% brómfenolkék
1 mM EDTA	0,015 V/V% xilol-cianol
0,05 V/V% Triton X-100	30 V/V% glicerin
pH=7,5	60 mM EDTA
	2,5 m/V% SDS
	2,5 mg/ml Proteináz-K

5.14 Dot-blot

Az UNG-DsRed fúziós fehérje, uracil tartalmú DNS-re mutatott szelektivitását, dot-blot technikával ellenőriztem. Ennek során *E. coli*-ból izolált uracilos (*E. coli* BL21 CJ236) illetve normál (*E. coli* XL1 Blue) genomi/plazmid DNS-t cseppentünk ki ugyanolyan mennyiségben (1 µg DNS/pötty) pozitívan töltött felületű nylon membránra (GE Healthcare Amersham HybondTM-N⁺). Fél órás levegőn szárítás után a membránt 10 percig UV fénnel világítjuk meg (254 nm) a DNS-sel való keresztkötések kialakításához. A membránt ezután 16 óráig mossuk 10 mM β-merkapto-etanol, 100 µg/ml lazac sperma DNS-t és 1:1000 hígításban alkalmazott dupla mutáns hUNG-DsRed-et tartalmazó bETBS-T-vel. A membránt 3X10 percig mossuk ETBS-T-vel, majd 1,5 óráig kezeljük az elődleges ellenanyag (nyúlban termeltetett anti-UNG poliklonális ellenanyag, 1000X-es hígításban, Proteintech) bETBS-T-s oldatával. Az újabb 3X10 perces ETBS-T-s mosást követően a membránt 1 óráig rázatjuk másodlagos ellenanyagot (HRP-vel konjugált anti-nyúl másodlagos ellenanyag, 5000X-es hígítás, GE-Healthcare) tartalmazó bETBS-T-ben. A membrán előhívását a Millipore által gyártott kemilumineszcens szubsztráttal (Western Chemiluminescent HRP Substrate) végezzük a gyártó által javasolt protokollt követve, Kodak röntgenfilm felhasználásával.

A kvantitatív dot-blot során, a DNS membránra való felvitelét, egy 96 lyukú, vákuumra kapcsolható apparátussal végeztem. Az ezt követő lépések megegyeznek a fent leírtakkal. A növekvő uraciltartalmú kalibráló sort *E. coli*-ból izolált normál (XL1 Blue) és uracilos (BL21 CJ236) genomi DNS-ek különböző arányú összekeverésével készítetjük. Az uracilos genomi DNS uraciltartalma qPCR mérésekből ismert, vagyis megadható az uracil bázisok pontos száma a keverékekben [18]. A DNS összmenyisége 0,05 µg/pötty. Az

előhívás után kapott röntgenfilmeket lefényképezzük és az ImageJ 1.46j (NIH, Bethesda) szoftverrel meghatározzuk az egyek pöttyök intenzitását.

A felhasznált oldatok:

ETBS-T: 25 mM TRIS

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

0,05 % Tween-20

1 mM EDTA

pH=7,4

bETBS-T: 25 mM TRIS

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

0,05 % Tween-20

1 mM EDTA

5 m/V% sovány tejpor

pH=7,4

5.15 Fluoreszcens mikroszkópia

A fluoreszcens fehérje jelenlétét mikroszkópos felvételekkel ellenőrizzük. Az expresszió után kapott sejtsuszpenzióból 100 µl térfogatú mintát veszünk és 2300 x g-vel 15 percig centrifugáljuk. A sejtpelletet desztillált vizes mosás után tárgylemezre helyezük és FluorSave gyantába ágyazzuk. A fedőlemez ráhelyezése után a mintát Leica DM IL LED FLUO mikroszkóppal lefényképezzük (azonos expozíciós idő mellett, 400X-os nagyításban). A DsRed gerjesztésére 515-560 nm-es bandpass excitációs szűrőt használtunk egy 580 nm-nél vágó dikroikus tükörrel, a detektálást pedig 590 nm-es longpass emissziós szűrővel végeztük.

5.16 Konfokális mikroszkópia

A fluoreszcens mikroszkópiánál jobb minőségű felvételeket készíthetünk konfokális mikroszkópia segítségével, mert ez a módszer képes a nem fókuszsíkról érkező fénysugarak kiszűrésére. Ez azt jelenti, hogy a műszer az adott pillanában csak a minta egy igen vékony szeletét detektálja. A többi Z-tengely menti szeletet is felvéve lehetőség van a 3D-s képalkotásra is. A fluoreszcens mikroszkópiához hasonlóan a kívánt makromolekulát/sejtorganelumot ebben az esetben is fluoreszcensen jelöljük, majd azt a megfelelő

hullámhosszú fénnel gerjesztve az emittált fényt detektálhatjuk. A kísérleteim során a Zeiss 710 lézeres szkennelő mikroszkópot (LSCM) használtuk. A DAPI gerjesztését a 405 nm-es, a DsRed-ét pedig az 543 nm-es lézerrel végeztük.

5.17 Sejtvonalak fenntartása és passzálása

A mikroszkópos kísérleteinkehez egérből származó, ung-/- embrionális fibroblaszt sejteket használunk (mouse embrinal fibroblast /MEF-DR14/). A tenyésztő flaskában elhelyezett sejteket 50 µg/ml penicillint, 50 µg/ml sztreptomocint, 1 V/V % nem esszenciális aminosav-keverék (Gibco) és 10V/V % szarvasmarha szérumot (fetal bovine serum /FBS/) tartalmazó médiumban (Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 HAM, Sigma) növesztjük 37 °C-os termosztátban 5 V/V% CO₂ mellett. A sejtkultúrák passzálásához (friss tápoldatba való átoltását) a Sigma Tripszin-EDTA oldatát használtam.

5.18 Sejtek plételése és kezelése FdUR-el

24 lyukú plétbe, 13 mm átmérőjű steril, 0,16 mm vastagságú boroszilikát óráüveget teszünk. Az egyes lyukakba 500 µl tápoldatot és összesen ~10 ezer sejtet tartalmazó szuszpenziót mérünk ki. A plételés után 24 órával a sejtekről lemérjük a tápoldatot, majd 0,5 ml-nyi 15 µM Fluoro-dezoxiuridint tartalmazó friss médiumot mérünk rájuk. A FdUR-es kezelés időtartama 48 óra.

5.19 Sejtek fixálása és festése a rekombináns fehérjével

Az FdUR-el kezelt sejtekről leszívjuk a tápoldatot, majd 5 perces PBS-el való mosást követően Carnoy fixáló oldatot mérünk a lyukakba és plate-et 20 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk. A Carnoy fixáló oldat leszívása után a lyukakba etanolos posztfixáló oldatot pipetázunk és a sejteket 10 percre -25°C-ra helyezzük. Ezek után az egyes lyukakat (az etanolos fixáló eltávolítása után) leszálló alkoholsorral kezeljük, azaz először 50V/V% etanol-PBS-t, majd (az 50% etanol-PBS eltávolítása után) 30V/V% etanol-PBS-t mérünk (a 3 percig állni hagyjuk szobahőmérsékleten) a mintákra. A lyukakat 3X5 percig PBS-el mossuk, majd a

mintákat 0,5 V/V% Triton X-100-at tartalmazó 2 M-os sósavval kezeljük 30 percig szobahőmérsékleten (a kromatin állomány lazítása és a DNS állomány részleges denaturálása végett). A 3X5 perces PBS-es mosást követően a mintákat bTBS-T-vel (15 perc, RT), majd, 100 µg/ml szonikált lazac sperma DNS-t tartalmazó bTBS-T-vel (15 perc, RT) blokkoljuk. Ezek után a sejteket 16 óráig 4°C-on kezeljük 100 µg/ml szonikált lazac sperma DNS-t és 1:250 hígítású DM-UNG-DsRed-et tartalmazó bTBS-T-vel. Az UGI-val történő kezelés esetén a DM-UNG-DsRed-et tartalmazó oldatba (összesen 200 µl mintánként) 20 Unit UGI-t (NEB) mértem, majd szobahőmérsékleten inkubáltam 10 percig. A mintákra csak ezt követően mértem rá az oldatot. A lyukakat 2X15 percig TBS-el, majd 15 percig TBS-T-vel mossuk. Az DNS fluoreszcens festésére 0,1 µg/ml koncentrációjú DAPI-t tartalmazó PBS-t mérünk a mintákra. Ezután a lyukakat 10 percig PBT-vel, majd 5 percig PBS-el mossuk. Az óráüvegeket csipesszel kivesszük a plate-ről, majd desztillált vizes mosás után FluorSave gyanta segítségével tárgylemezre rögzítjük. Az előkészített mintákat konfokális mikroszkópiával vizsgáljuk.

A felhasznált oldatok:

Carnoy fixáló: 60 V/V% etanol		Etanolos fixáló: 70 V/V% etanol	
30 V/V % ecetsav		50 mM glicin	
10 V/V% kloroform			
TBS:	50 mM TRIS.HCl	TBS-T:	25 mM TRIS
	137 mM NaCl		137 mM NaCl
	2,7 mM KCl		2,7 mM KCl
	pH= 7,4		0,05 % Tween-20
			pH=7,4
bTBS-T:	25 mM TRIS	PBS:	138 mM NaCl
	137 mM NaCl		2,7 mM KCl
	2,7 mM KCl		1,31 mM NaH ₂ PO ₄
	0,05 % Tween20		8,69 mM Na ₂ HPO ₄
	5 m/V% sovány tejpor		pH=7,4
	pH=7,5		

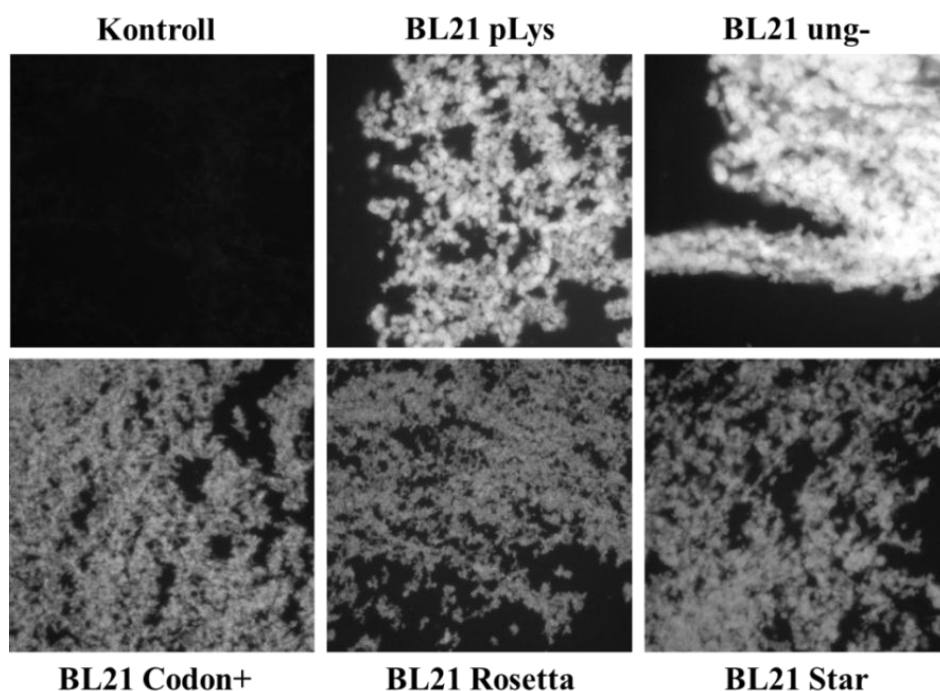
PBT: 138 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 1,31 mM NaH₂PO₄
 8,69 mM Na₂HPO₄
 0,05 V/V% Triton-X 100
 pH=7,4

6. Eredmények és értékelésük

6.1 Fehérjeexpresszió optimalizálása (próbaexpresszió)

A kísérletek kezdetén rendelkezésemre bocsájtották a Békési Angéla által már elkészített különféle rekombináns DNS konstruktokat. Ezek közül a pET-20b vektorba klónozott dupla mutáns (DM) hUNG2-DsRed-Monomert és a szintén pET-20b vektorba klónozott vad típusú (WT) hUNG2-DsRed-Monomert használtam fel. Az első feladat a fehérje termelésére legalkalmasabb sejttípus és a megfelelő expresszási körülmények kiválasztása volt. Beke Angéla eredményeiből már ismert volt, hogy a 4 órás, 37°C-on végzett expresszió fehérjehozama meglehetősen csekély volt. Az optimalizálást ezért 4 óráig 30°C-on, illetve ON 20°C-on végeztem 5 féle *E. coli* törzsben (BL21 pLys, BL21 Star pLys, BL21 Rosetta pLys, BL21 ung- pLys, BL21 Codon+).

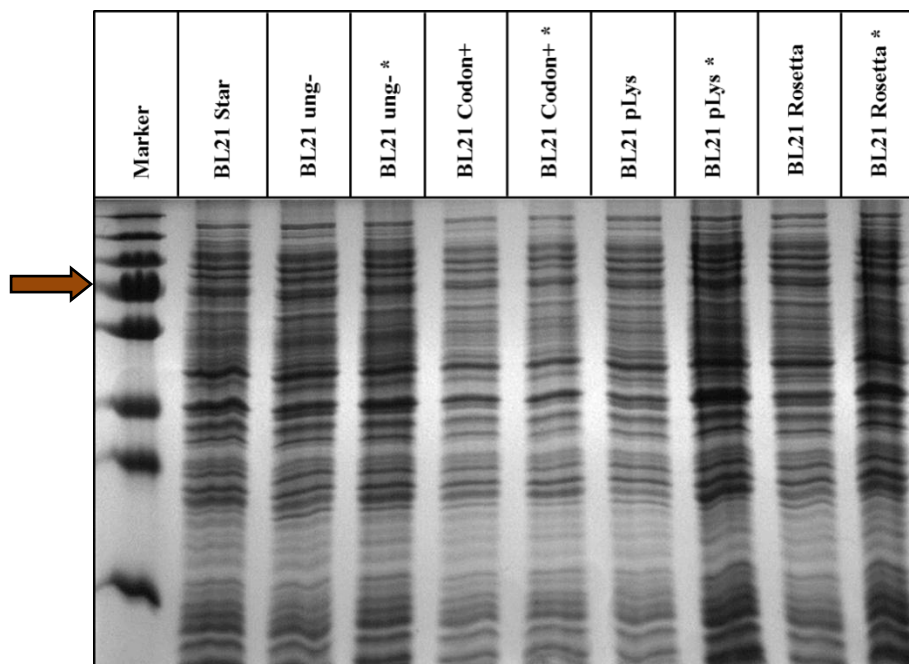
A 4 órás 30°C-on végzett expresszió nem járt sikerrel, a sejtek lefugálása után kapott pelletéken nem látszódott a DsReddel fuzionált fehérjékre jellemző pirosas szín. Ezzel ellentétben a 20°C-os ON termeltetés mind az 5 sejttípus esetében rózsaszín pelletet eredményezett. A célfehérje jelenlétét fluoreszcens mikroszkópiával is ellenőriztük. A felvételeken jól látható, hogy az összes törzs sikeresen expresszálta a kívánt fehérjét, és a kontrollként használt, nem indukált BL21 ung- pLys sejtek pedig nem adtak fluoreszcencia jelet. A fényképek alapján a legjobb expresszió a BL21 pLys és a BL21 ung- esetében valósult meg (6.1.1 ábra).



6.1.1 ábra Fehérjeexpresszió vizsgálata mikroszkóppal

A felvételeken jól látszódik, hogy a rekombináns fehérje mindegyik sejttípusban jelen van. A fényképek alapján a legjobb expresszió a BL21 pLys és a BL21 ung- esetében valósult meg.

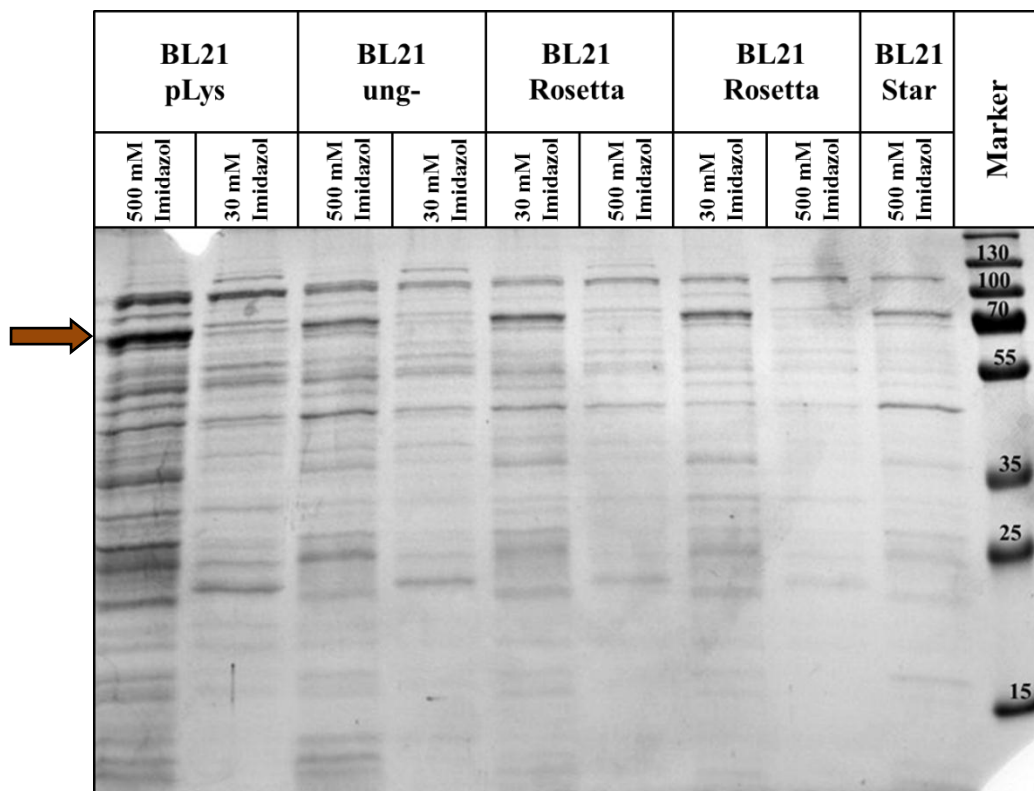
A továbbiakban a sejtek feltárása után kapott mintákat SDS-PAGE segítségével is vizsgáltam, hogy a kívánt fehérje túltermelődését egy kvantitatív módszerrel is nyomon követhessem. A nem túl intenzív expresszió miatt azonban nem látunk nagy különbséget az indukció előtti és az indukció utáni állapotok között, azaz nem tapasztalunk intenzív sávvastagodást a kifejeztetett fehérjére mólsúlyánál (6.1.2 ábra). Ezen eredmények tükrében relatíve alacsony fehérjehozamra számítottunk, így az affinitáskromatográfiás tisztítást is ennek megfelelően terveztük meg.



6.1.2 ábra A sejtek feltárása után kapott minták SDS gélén

A kismértékű expresszió miatt nem látunk különbséget az indukció előtti és az indukció utáni minták között. Az indukció utáni minták csillaggal vannak jelölve.

A feltárt sejtekből kapott oldatot Ni-NTA töltetű oszlopra vittem fel és a megfelelő mosási lépéseket követően a fehérjét 500 mM imidazol tartalmú LS pufferrel eluáltam. Az elúcióval és az utolsó mosási lépéssel (30 mM imidazoltartalmú differenciáló-puffer) kapott frakciókat poliakrilamid-gélelektroforézissel elemeztem. A gélkép alapján a legkevésbé expresszáló sejtípus a BL21 Star, a legjobban expresszáló sejtípus pedig a BL21 pLys. A gélképeken az is jól látható, hogy főleg az alacsony expresszió miatt, a kötőhelyekért való gyenge kompetíció következtében a végső eluátum igen sok fehérjeszennyezőt tartalmaz (6.1.3 ábra). Végül az *E. coli* törzsek közül a BL21 ung- pLys-re (UNG deficiens BL21 törzs) esett a választás, mert ennek további előnye, hogy nem tartalmaz endogén UNGenzimet, így az ebben termeltetett, katalitikusan inaktív duplamutáns fehérje biztosan nem fog tartalmazni katalitikusan aktív bakteriális UNG-ot háttérszennyezőként. Megjegyzendő azonban, hogy a kívánt fehérje mindegyik sejtípusból kinyerhető lenne kielégítő mennyiségben.



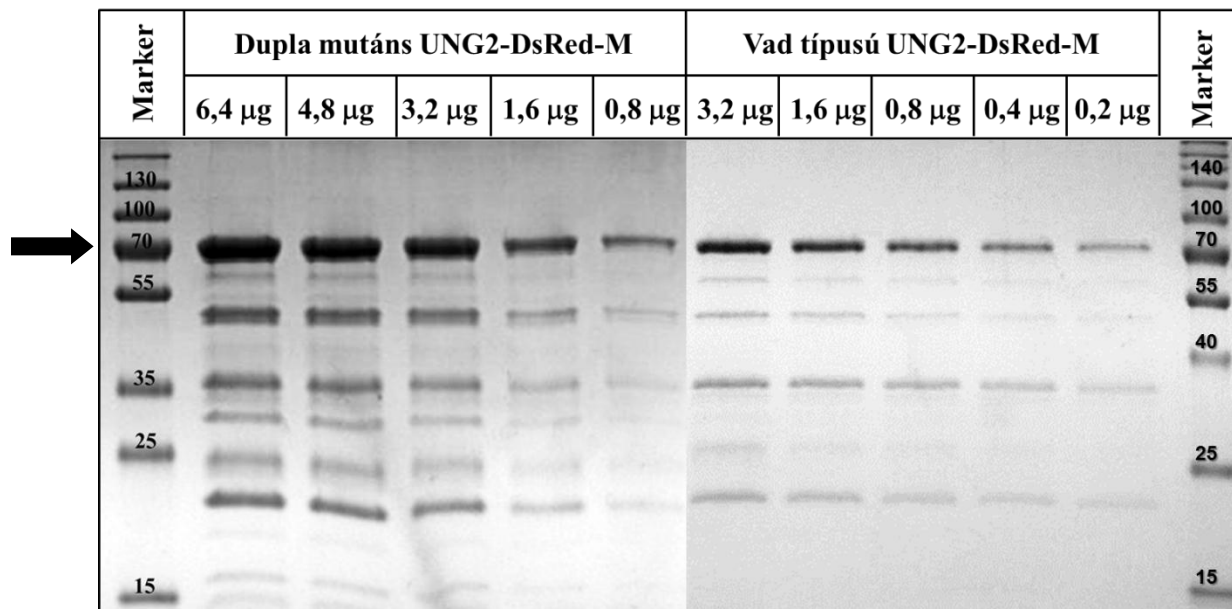
6.1.3 ábra A Ni-NTA oszlopon való tisztítás eredménye

Jól látható, hogy az elúció után nyert frakciókban megjelenik a rekombináns fehérje és hogy a differenciáló-puffer valóban nem szedi le az oszlopról nagy mennyiségben a cél fehérjét.

6.2 Fehérjeexpresszió és tisztítás

A optimalizálás alapján a duplamutáns UNG-DsRed és a vad típusú UNG-DsRed fehérjék expresszióját ON 20°C-on végeztem BL21 ung- pLys sejtek felhasználásával. A nagyobb tisztaság érdekében a differenciáló-puffer (utolsó mosás) imidazoltartalmát 50 mM-ra növeltük és gradiens elúciót alkalmaztunk (0-350 mM imazolkoncentráció). Ezeken felül a fehérjekötő gyanta mennyiségét jelentősen lecsökkentettük, annak érdekében, hogy kevesebb aspecifikus fehérje tudjon rá kikötni a kötőhelyekért folyó csekély kompetíció miatt. A fehérjepreparátumból hígítási sort készítettünk és a tisztaságukat SDS-PAGE-el vizsgáltuk. A gélképek alapján a fehérjék jóval kevesebb szennyezőt tartalmaznak, mint a próbaexpresszió esetében (6.2.1 ábra). Fontos megjegyezni, hogy a mi esetünkben a fehérjepreparátum nagyfokú tisztasága nem elengedhetlen feltétel, hiszen a detektálásnál a DsRed fluoreszcencia jelére fogunk hagyatkozni, ezt pedig nem befolyásolják a szennyező fehérjék.

Fontos azonban, hogy a szennyező fehérjék ne hassanak negatívan a konstrukt stabilitására, és ne legyen UNG aktivitásuk, mert ellenkező esetben kompetíció jönne létre az uracilos helyekért.



6.2.1 ábra duplamutáns UNG-DsRed és vad típusú UNG-DsRed fehérjék SDS-PAGE-en

A gélekpeken megfigyelhető, hogy a fehérjék a próbaexpresszióhoz viszonyítva jóval kevesebb szennyezőt tartalmaznak. A gél fölött az egy zsebbe jutó fehérjék tömegét jeleztem.

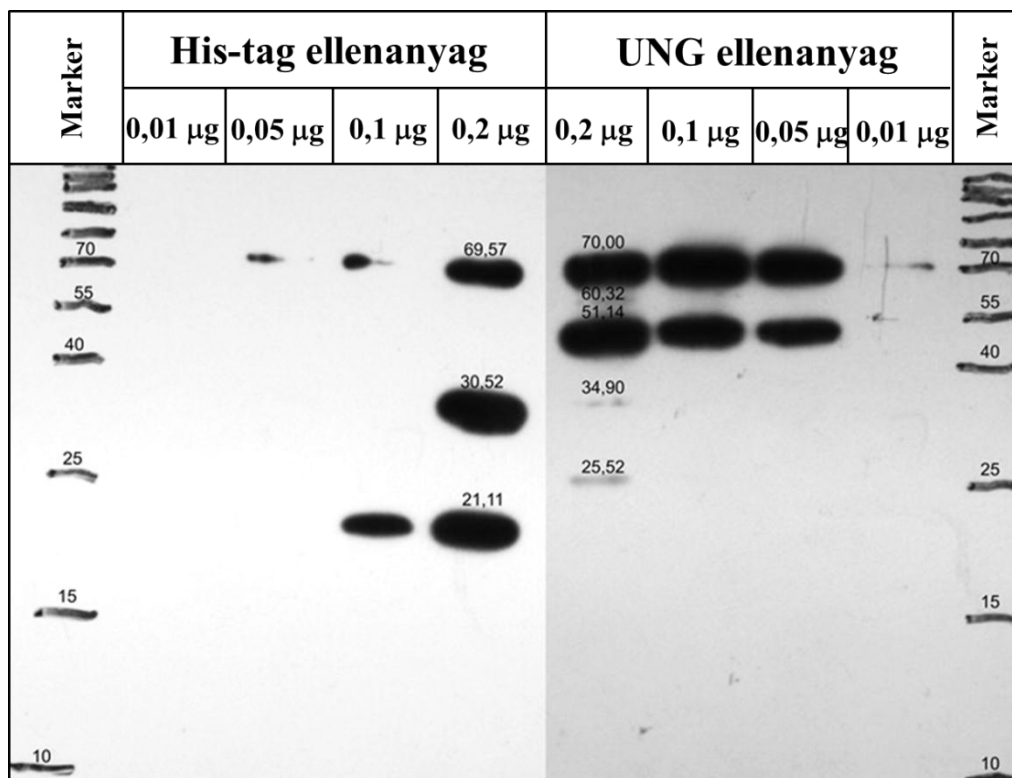
6.3 Fehérjedegradáció vizsgálata

Irodalmi adatok alapján ismert volt, hogy a hUNG2 expressziója során az N-terminális, körülbelül 100 aminosavat tartalmazó szegmens lehasadhat a fehérjéről [20]. Ebből kifolyólag szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a saját preparátumunkban lévő egyéb fehérjék közül származhat-e valamelyik a konstrukt degradálódásából. A bomlástermékek kvalitatív kimutatására western blot analízist használtunk.

Az expresszió során nyert duplamutáns UNG-DsRed fehérje oldatából két egyforma hígítási sorozatot készítettünk, a komponenseket két poliakrilamid gélen elválasztottuk, majd a geleket fehérjekötő membránra transzferáltuk. Az egyik membránt nyúlban termeltetett anti-UNG poliklonális ellenanyaggal, a másik membránt pedig egérben termeltetett anti-His-tag monoklonális ellenanyaggal kezeltük. A membránokat ezután az anyagok és módszerek

részben leírt módon előhívtuk. A két különböző elsődleges ellenanyag használatával a lehetséges fragmensek nagy része láthatóvá tehető. Az UNG ellenanyaggal az UNG-ot (vagy UNG-részletet) tartalmazó bomlástermékek mutathatók ki, azaz nem látjuk a levált DsRed-et (vagy DsRed-részletet). Ezzel ellentétben az anti-His-taggel a C-terminálisról lehasadt termékek mutathatók ki, vagyis nem látszódnak az N-terminálisból származók.

A röntgenfilm alapján megállapítható, hogy a mintában lévő egyéb fehérjék jelentős része a célfehérje degradálódásából származik (6.3.1 ábra). Az ép fehérje mindkét esetben 70 kDa-nál látható. A legnagyobb mennyiségű bomlástermékek 21 kDa-nál; 30 kDa-nál és 51 kDa-nál jelennek meg.



6.3.1 ábra Western blot analízis eredménye

A szennyező fehérjék jelentős része a célfehérje degradálódásából származik. A fehérje 70 kDa-nál; a legnagyobb mennyiségű bomlástermékek pedig 21 kDa-nál; 30 kDa-nál és 51 kDa-nál jelennek meg. A membrán fölött az egy zsebbe jutó fehérjék tömegét jeleztem.

Figyelembe véve a rekombináns fehérje szerkezetét (4.1 ábra) és a denzitometriásan meghatározott moláris tömegekben mutatkozó állandó, 6-7 kDa-os pozitív hibát, a főbb fragmensek a következőknek sejtethők:

- 21 kDa: DsRed (elméleti érték: 27 kDa)
- 30 kDa: DsRed és a dupla mutáns hUNG2 egy része
- 51 kDa: az N-terminális részből ~100 AA leszakadt
- 70 kDa: a teljes rekombináns fehérje (elméleti érték: 63 kDa)

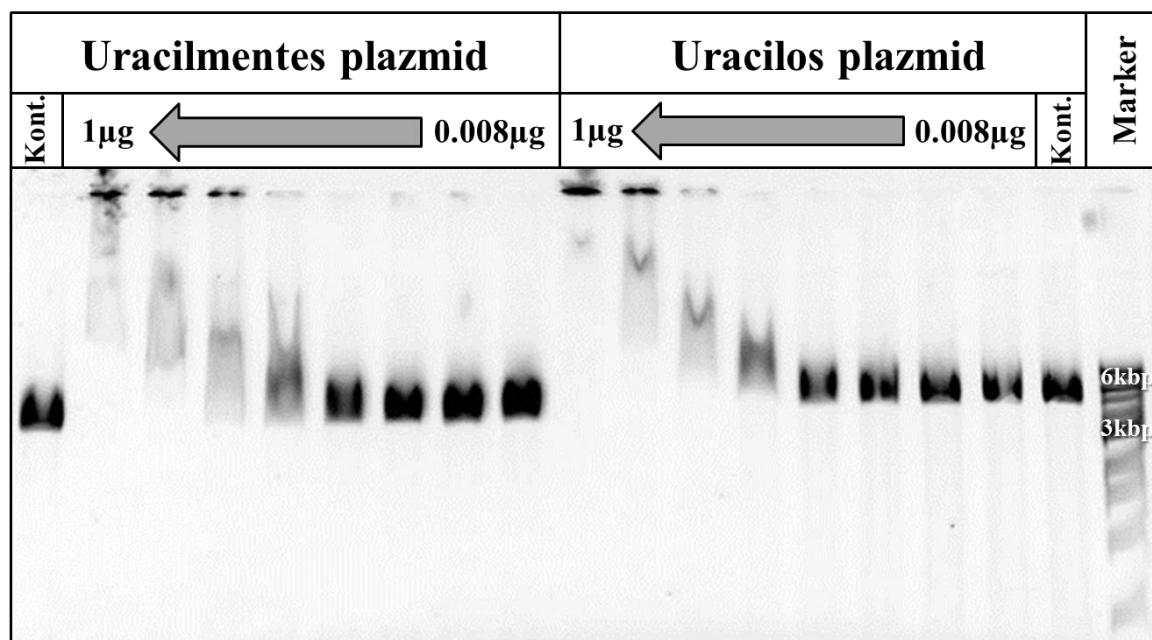
6.4 DNS-kötő képesség ellenőrzése

A dupla mutáns UNG-DsRed konstrukt DNS-kötő képességét elektroforetikus mobilitás teszttel ellenőriztük linearizált uracilos és linearizált uracilmentes plazmidon. A fehérje-nukleinsav komplex kisebb mobilitással rendelkezik, mint a szabad nukleinsav, tehát pozitív eredményt jelent, ha a fehérjét is tartalmazó minták a gélképen nagyobb molekulatömeg felé tolódnak el az „üres” kontrollhoz képest. A kísérletet a vad típusú UNG-DsRed fehérjével is elvégeztük. A plazmidok koncentrációja minden minta esetében egyenlő volt, a fehérjék koncentrációja pedig felező hígításokban csökkent (az egy zsebre jutó mennyiséget a gél fölött jeleztem).

A gélképeken jól látszódik, hogy mindkét konstrukt rendelkezik DNS-kötő képességgel uracilmentes és uracilos plazmidon egyaránt (3.4.1 ábra) (3.4.2 ábra). Az uracilos plazmidok esetében a görbe meredekebb lefutású, vagyis a fehérjék affinitása magasabb az uraciltartalmú DNS-hez.

A meredekebb lefutás összhangban van azzal a ténnyel miszerint, az UNG DNS-kötő képessége 10-30-szor nagyobb uraciltartalmú DNS esetében [20]. A DNS-kötő fehérjék jellemző tulajdonsága, hogy aspecifikus DNS-kötő képességgel rendelkeznek, amely lehetővé teszi az egydimenziós szánkázásukat a DNS szálon (célszekvencia „keresése”). Ezzel magyarázható, hogy az uracilmentes plazmid esetében is kapunk EMSA jelet.

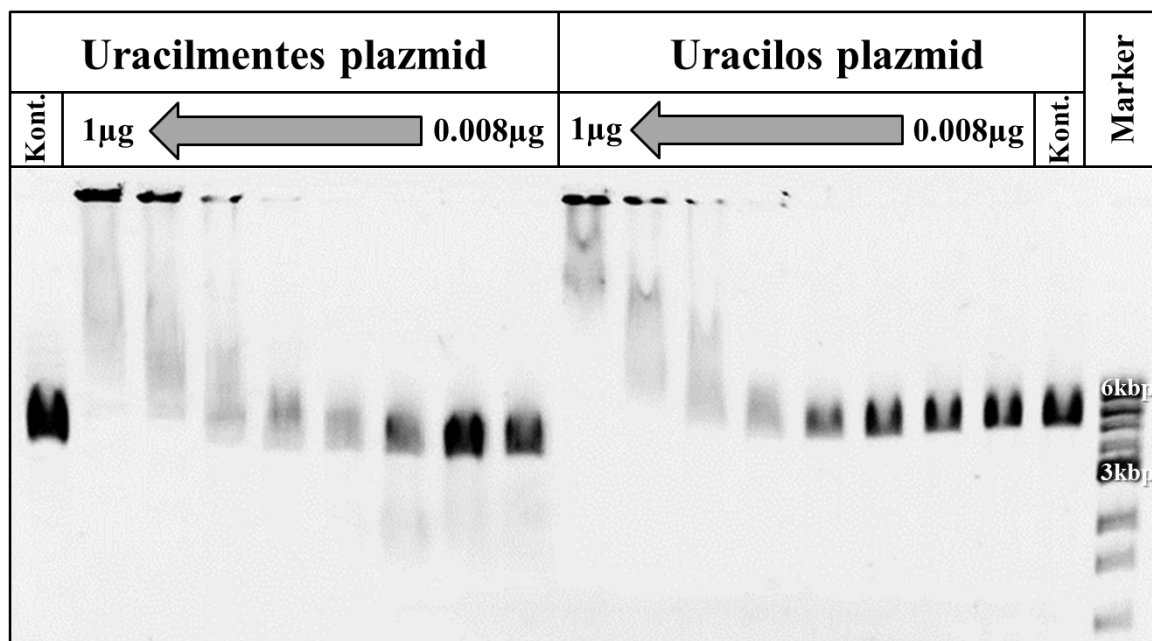
Dupla mutáns UNG-DsRed-M



3.4.1 ábra Az EMSA eredménye dupla mutáns UNG-DsRed esetében

A fehérje-nukleinsav komplex nagyobb molekulatömeg felé tolódik el a gélképen.
Az uracilos plazmid esetében a görbe meredekebb lefutású.

Vad típusú UNG-DsRed-M

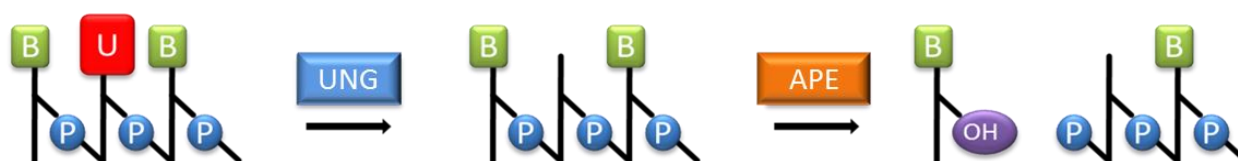


3.4.2 ábra Az EMSA eredménye vad típusú UNG-DsRed esetében

A fehérje-nukleinsav komplex nagyobb molekulatömeg felé tolódik el a gélképen.
Az uracilos plazmid esetében a görbe meredekebb lefutású.

6.5 Katalitikus aktivitás ellenőrzése

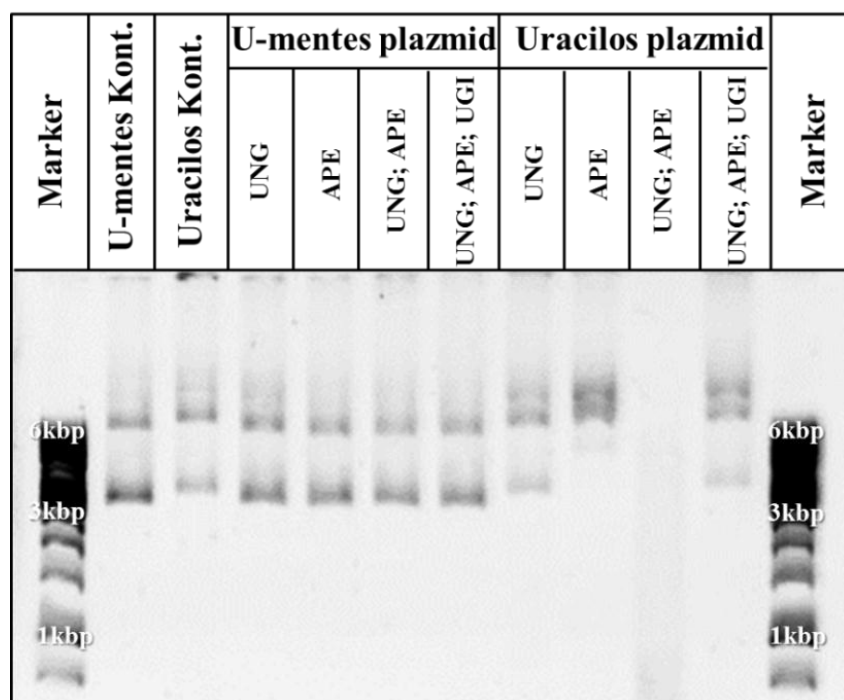
A dupla mutáns hUNG2-DsRed konstrukt katalitikus inaktivitását agaróz-assayvel ellenőriztük. A módszer lényege, hogy az uracilos DNS-en, aktív UNG hatására bázismentes helyek (AP site) jönnek létre az uracilt tartalmazó pozíció helyén. Az így kapott, AP helyeket tartalmazó DNS APE enzim hatására feldarabolódik (6.5.1 ábra). A feldarabolódott DNS agaróz gélelektroforézis során jóval kisebb moláris tömeg felé tolódott, elmosódott jelet eredményez.



6.5.1 ábra Az elvégzett agaróz-assay sematikus ábrája

Az uracilos DNS aktív UNG és AP Endonukleáz hatására feldarabolódik

Első lépésben szerettünk volna meggyőződni a módszer alkalmazhatóságáról, ezért a kísérletet a Fermentas által gyártott bakteriális UNG-al is elvégeztük ugyanolyan körülmények mellett. Gyári UNG-ot használva az agaróz-assay kiválóan működött: csak az UNG-al és APE-vel együttesen kezelt uracilos plazmid darabolódott fel (6.5.2 ábra). Az UNG aktivitása specifikusan gátolható volt UGI felhasználásával (az UGI egy fehérje alapú inhibitora az UNG-nak [24]). A kísérlet során felhasznált cirkuláris plazmidok több vonalban futnak agaróz-gélelektroforézis során a különböző csavart és szupercsavart szerkezetük miatt.

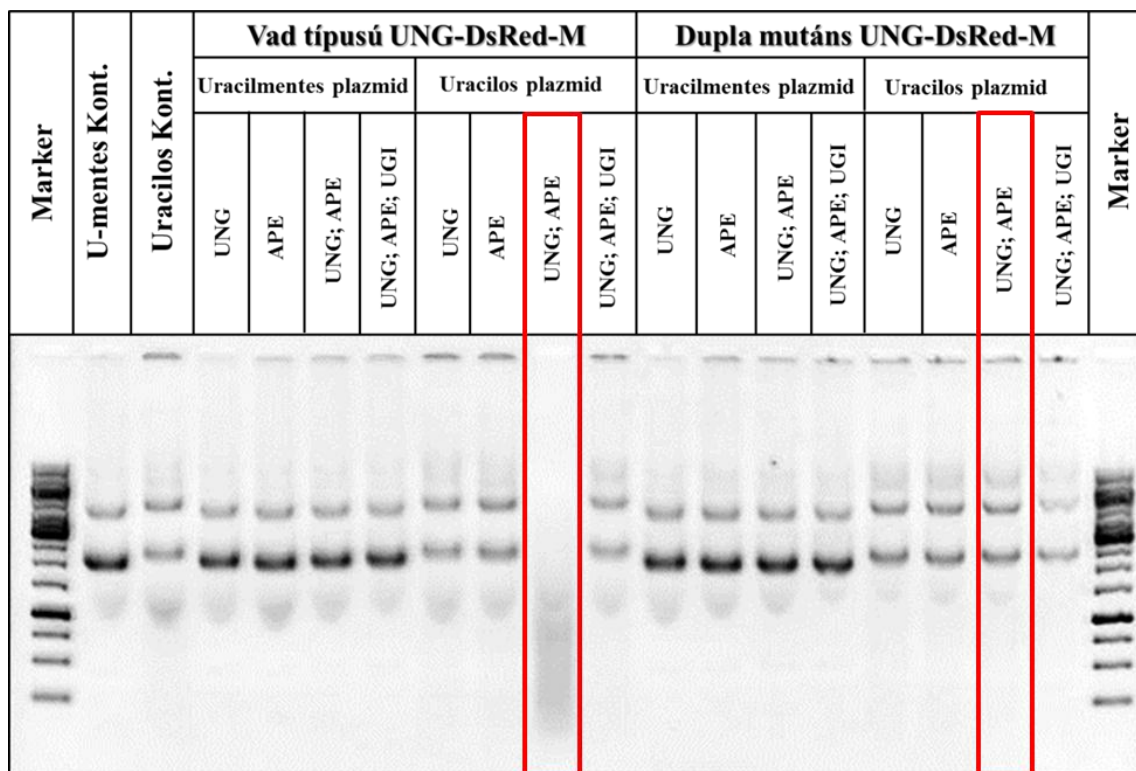


6.5.2 ábra Agazóz-assay gyári ung felhasználásával

Kizárólag az UNG-al és APE-vel kezelt uracilos plazmid darabolódott fel.

Az aktivitás ellenőrzését vad típusú és duplamutáns UNG-DsReddel végeztük uracilos és uracilmentes plazmid felhasználásával. A cirkuláris plazmidokat, a rekombináns fehérjét és a különböző enzimeket mindig ugyanolyan koncentrációban alkalmaztuk. Negatív kontrollként a gélen az APE-mentes, az UNG-mentes és az UGI-t (Uracil glikoziláz inhibitor, NEB) is tartalmazó minták is szerepelnek (mindkét plazmiddal). Az APE- és UNG-mentes kontrollra azért volt szükség, mert meg akartunk győződni arról, hogy az enzimpreparátumok önmagukban nem tudják feldarabolni a DNS-t. Az UGI-t is tartalmazó kontrollal azt akartuk bizonyítani, hogy UNG aktivitás hiányában nem történhet degradáció.

A rekombináns fehérjével elvégzett kísérlet eredménye hasonló volt, mint a bakteriális UNG esetében: a feldarabolódás csak egy helyen, a vad típusú UNG-DsRed-et, APE-t és uracilos plazmidot tartalmazó mintánál következett be. A géliképen jól látszódik, hogy önmagában az APE és az UNG nem okoz degradációt (6.5.3 ábra). A specifikus UNG aktivitást erősíti meg az a tény is, hogy az UGI védett a degradáció ellen. A dupla mutáns UNG-DsRed-et, APE-t és uracilos plazmidot tartalmazó minta esetében nem történt DNS degradáció, vagyis bebizonyosodott, hogy a konstrukt katalitikusan inaktív.



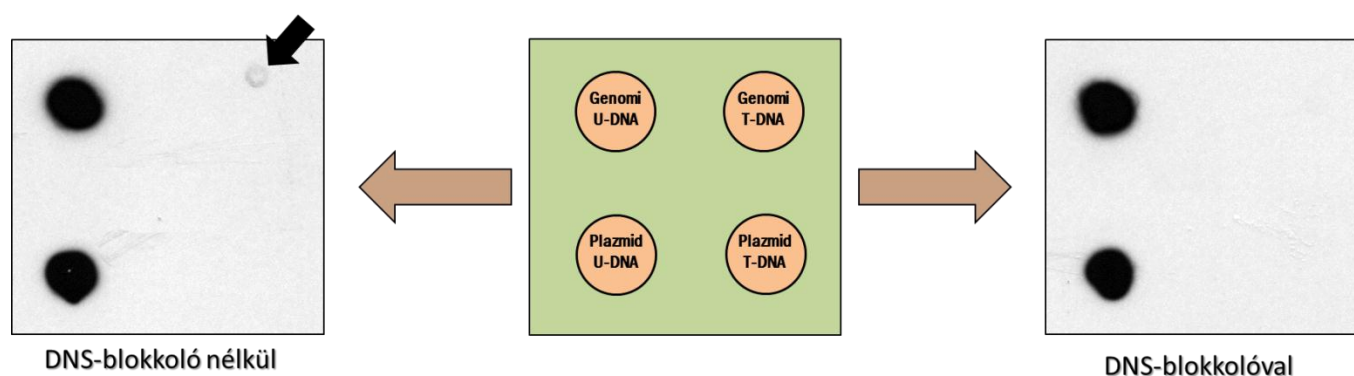
6.5.3 Agaróz-assay a rekombináns fehérjék felhasználásával

Kizárólag a vad típusú UNG-DsReddel és APE-vel kezelt uracilos plazmid darabolódott fel.
A dupla mutáns UNG-DsRed katalitikusan inaktív.

6.6 A fehérje specificitásának ellenőrzése

A rekombináns fehérje uracil tartalmú DNS-re mutatott specificitását dot-blot technikával ellenőriztem. A folyamat első lépésében *E. coli*-ból izolált uracilos és normál genomi/plazmid DNS-t rögzítettem nylon membránra. Ezek után a membránt rekombináns fehérjével, elsődleges ellenanyaggal és másodlagos ellenanyaggal kezeltem. A fehérje kikötődésére az előhívott röntgenfilmen megjelenő fekete foltokból következtethetünk.

A kísérletek első része a dot-blot assay optimalizálása volt. A különböző pufferek megválasztása és a fehérjekoncentrációk beállítása mellett kiemelten fontos volt, hogy a hUNG2-DsRed-del történő kezeléssel egyidőben DNS-blokkolót kell alkalmaznunk a teljes szelektivitás érdekében. Ez azt jelenti, hogy az aspecifikus komplexet (normál DNS-hUNG2-DsRed) meg tudjuk bontani az oldatban nagy feleslegben lévő blokkolóként funkcionáló DNS-sel. DNS-blokkoló alkalmazása nélkül a membránra kötött normál DNS esetében is enyhe feketedés látható a röntgenfilmen (6.6.1 ábra).



6.6.1 Dot-blot eredmények

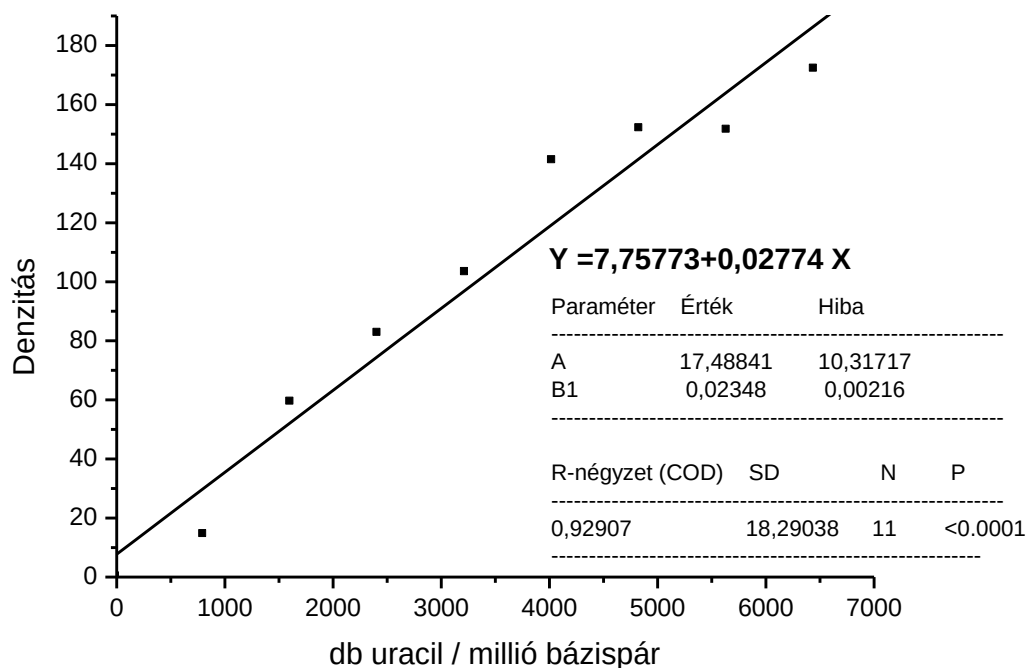
A képeken jól látható, hogy az aspecifikus kötődés megszüntethető DNS-blokkoló használatával.

Növekvő uraciltartalmú kalibráló sor készítésével a dot-blot alapú módszer kvantitatív meghatározásra is alkalmazható (6.6.2 ábra). A kalibráló egyenes elkészítéshez az előhívott pöttyök szoftveresen meghatározott denzitását kell ábrázolni a hozzájuk tartozó uracilmennyiség függvényében. Az ábrán látható, hogy az így számított görbe jó közelítéssel egyenes (6.6.3 ábra). A membránra felvitt, ismeretlen minták uraciltartalma a kalibráló egyenes egyenletéből számítható.



6.6.2 Előhívott kalibráló sorozat röntgenfilmen

Az uraciltartalom növekedésével egyre nagyobb denzitású pöttyök detektálhatók a röntgenfilmen



6.6.3 Kalibráló egyenes

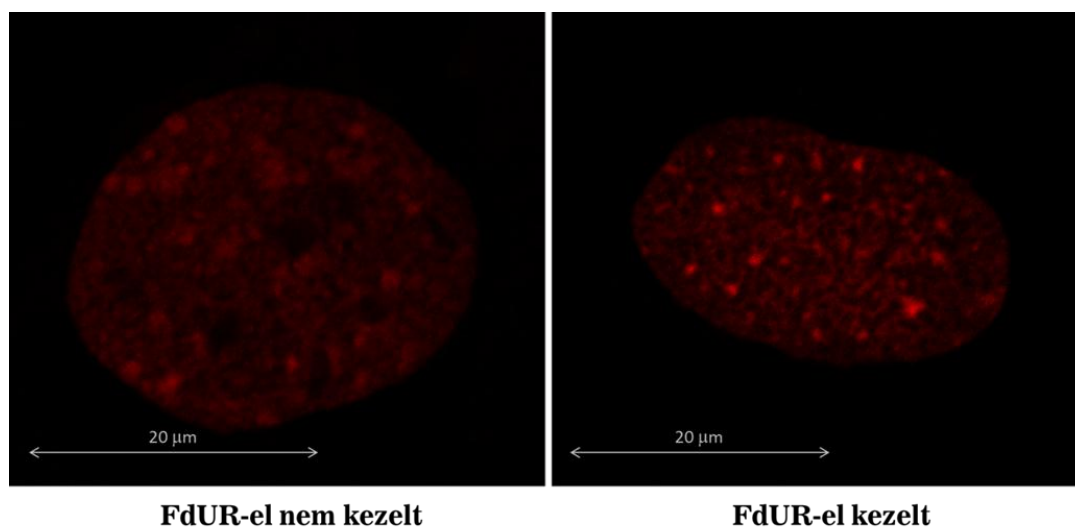
A denzitást ábrázolva az uracilok darabszámának függvényében jó közelítéssel egyenest kapunk. Az egyenes egyenletéből meghatározható a megfelelően előkészített biológiai minták uraciltartalma.

Kollégám, Scheer Ildikó már sikeresen alkalmazza ezt az új, dot-blot alapú technikát a teljes átalakulással fejlődő rovarok vizsgálatára. Ezen szervezetek egyedfejlődése során fontos szerepet játszhat a DNS-ben megjelenő uracil a lárvális szövetek lebontásában [15, 16]. Ebben az érdekes biológiai kérdésben a módszer új lehetőségeket teremt, annak nagy áteresztőképessége révén, mivel gyorsan lehet a különböző egyedfejlődési stádiumban lévő organizmusok uraciltartalmát mérni.

Jövőbeli terveim között szerepel a módszer további optimalizálása kémiai szintézissel gyártott, uracilt tartalmazó oligonukleotidok felhasználásával. Elképzeléseim szerint ezekkel még megfelelőbb kalibráló egyenest lehetne majd felvenni.

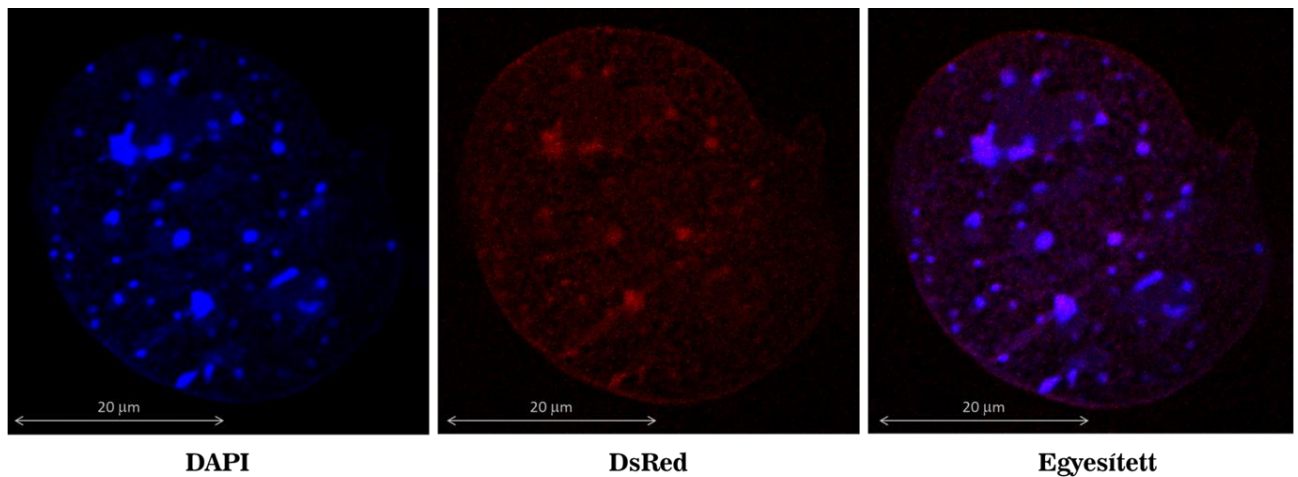
6.7 Uracilfelhalmozódás térképezése MEF sejtek felhasználásával

A dupla mutáns UNG-DsRed további vizsgálatát FdUR-el kezelt, fixált egér embrionális fibrobalszt ung^{-/-} (MEF DR14) sejteken végeztem. Ebben a sejtvonalban ki van ütve az ung gén, vagyis az nem képes az UNG fehérje expressziójára. UNG hiányában a sejt fluoro-dezoxiuridinnel (TS gátlása) való kezelés hatására nem képes hatékonyan kijavítani a DNS-ében felgyülemelő uracilt, tehát jelentős uracilfelhalmozódás történik a genomban [18, 25]. A sejt kísérletek optimalizálása még korai stádiumban van, azonban elmondható, hogy látható különbség van az FdUR-el nem kezelt és az FdUR-el kezelt minták között. Az utóbbi esetben a sejtmagban intenzívebb, jól körülhatárolt foltok figyelhetők meg, míg FdUR kezelés hiányában a foltok elkenetebbek, kevésbé jól behatárolhatóak (6.7.1 ábra). Nukleinsav festést (DAPI) is alkalmazva megfigyelhető, hogy a DAPI-intenzív foltok jórészt átfednek a DsRed-intenzív foltokkal (6.7.2 ábra). Elképzelhető, hogy a heterokromatikus régiókban lévő erősen kondenzált DNS esetében megnő a lehetőség az aspecifikus kötődésre. Ennek a lehetőségnek a kizárása miatt további blokkolási lépések beiktatását tervezzük.



6.7.1 FdUR-el kezelt és FdUR-el nem kezelt MEF sejtmagok

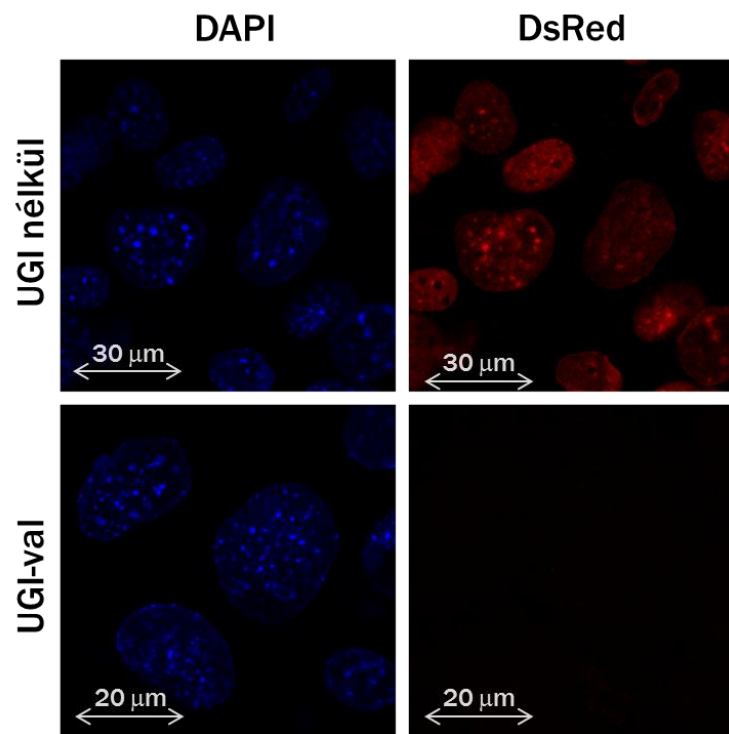
Az FdUR-el kezelt sejtek esetében intenzív pöttyök figyelhetők meg



6.7.2 DAPI-val is festett, FdUR-kezelt minta sejtmagja

A DAPI-intenzív pöttyök részben átfednek a DsRed-intenzív pöttyökkel

Egy következő kísérletben az FdUR-kezelt minták egy részéhez UGI-t (Uracil glikoziláz specifikus inhibitor) is adtam. Ezzel a fehérje specifikus kötődését szerettem volna bizonyítani. A mikroszkópos felvételeken jól látható, hogy a DsRed fluoreszcenciája UGI hozzáadásakor eltűnik, vagyis igazoltam, hogy nem aspecifikus kötődésről van szó (6.7.3 ábra).



6.7.3 A fehérje specifitásának igazolása

A felvételeken látható, hogy a DsRed fluoreszcenciája UGI hozzáadásakor eltűnik.

A fehérje kötődése specifikus.

6.8 További fehérjék tervezése a hatékonyabb uracildetektáláshoz

Az irodalom idén leírt eredménye szerint a humán UNG2 kölcsönható partnere a szintén magi lokalizációjú PCNA és RPA2 fehérjéknek [26]. A kötést felelős régiók az UNG2 N-terminális részén helyezkednek el. A PCNA-val és RPA2-vel való kölcsönhatás problémát jelenthet a tervezett uracildetektálás során, mert a rekombináns fehérje ezekhez is kapcsolódhat a festés során. Elképzelhető, hogy a nem FdUR-kezelt minták esetében is a PCNA-val és RPA2-vel létesített kapcsolat miatt látjuk a viszonylag erős háttérrel.

Az itt vázolt probléma megoldására több új konstruktot is terveztem. Ezek mindegyike az N-terminális 84 aminosavval csonkított $\Delta 84$ UNG-ot tartalmazza, vagyis itt már nincs lehetőség a kötőpartnerekkel való kölcsönhatásra. Ezt az UNG formát az irodalomban már széleskörűen jellemezték. Az első 84 aminosav elvesztése nem okoz jelentős különbséget a fehérje aktivitásában, sem pedig uracil felismerésében [23], ami alkalmassá teszi az általunk tervezett genomi uracil térképezésére. Az új fehérjék mindegyike tartalmaz egy AU1 epitóptaget (immuncitokémiai detektáláshoz), valamint egy His-taget a tisztításhoz. Ezen felül az első 1XFLAG epitóptaget, a második 3XFLAG epitóptaget, a harmadik pedig egy GST-taget tartalmaz (6.7.3 ábra).

Régi konstrukt: DsRed-taggel:



I. Új konstrukt 1XFlag/3XFlag-taggel:



II. Új konstrukt GST-taggel:



6.7.3 Az új konstruktok sematikus ábrája

A kódoló gén klónozása már folyamatban van

Az 1XFLAG és 3XFLAG epitópokkal jóval érzékenyebb detektálást is elérhetünk immuncitokémiai módszerekkel, mint ha csak a DsRed fluoreszcenciájára hagyatkoznánk. A nagyobb érzékenység azt is jelenti, hogy a konstruktunkat hígabban használhatjuk a festés során, ami szintúgy javíthat az aspecifikus háttér csökkentésében. A GST fúzionált

konstruktra a megfelelő bifunkcionális keresztkötő reagenssel egy konvencionális Quantum-dot-hoz hasonló, ám annál jóval kisebb méretű SiC alapú nanokristályt ($d \sim 2$ nm) tervezek kapcsolni, amit Gali Ádámék laboratóriuma sikerrel állított már elő [26]. A konstruktokat kódoló plazmidok klónozása már folyamatban van.

7. Összefoglalás

A munkám célja egy olyan jelölt enzim előállítása és jellemzése volt, amellyel sejtekben és szövetekben lehetne vizsgálni a DNS-ben előforduló uracil eloszlásának mintázatát. Erre a feladatra a DsRed nevű fluoreszcens fehérjével fuzionált, katalitikusan inaktív humán UNG2-t (D145N és H268N pontmutáns) szeretném használni. A konstrukt génjét hordozó expressziós plazmid kész állapotban állt a rendelkezésemre.

A kísérleteim első része a fehérjeexpresszió optimalizálásából, majd ezt követően a szükséges mennyiségű fehérje előállításából és tisztításából tevődött össze. SDS-PAGE és mikroszkópos eredmények alapján az enzim termelését *E. coli* BL21 ung- sejttypussal végeztem, 20°C-os hőmérsékleten, 16 órán keresztül. A fehérjét Ni-NTA töltetű oszlopon tisztítottam gradiens elúciót alkalmazva

A kísérleteim második része az így előállított fehérje karakterizálása volt. Irodalmi adatokból ismert, hogy a D145N és H268N pontmutációk hatására a humán UNG2, az uracil kötő képességének megtartása mellett, képtelenné válik a β -N-glikozidos kötés hidrolízisére. Kérdés azonban, hogy a DsRed-el történő kapcsolás után megmaradnak-e ezek a tulajdonságok. Ennek eldöntésére a fehérje aktivitását agaróz-assayvel, a DNS kötő képességét pedig elektroforetikus mobilitás teszttel (EMSA) ellenőriztük. Az agaróz-assay és az EMSA alapján megállapítottuk, hogy a fúziós konstrukt katalikusan inaktív és rendelkezik DNS kötő képességgel. A rekombináns fehérje uracil tartalmú DNS-re mutatott specificitását dot-blot technikával ellenőriztem. A módszer optimalizálása során bebizonyosodott, hogy az enzim szelektív az uracil tartalmú DNS-re és a megfelelő kalibrációs pontok biztosítása mellett alkalmas a gyors, kvantitatív uracil meghatározásra bármely DNS mintából.

Jelenlegi munkám során 5-Fluorodezoxiuridinnel (FdUR) kezelt, ung-/- egér embrionális fibroblast sejteket festek az előállított fehérjével. Az FdUR a timidilát-szintáz gátlásán keresztül uracil felhalmozódást idéz elő a genomban. A konfokális mikroszkóppal készült felvételeken jól látható különbség van az FdUR-el kezelt és nem kezelt minták között, amelynek specificitását bizonyítja, hogy a festés az UNG specifikus inhibitorával, az UGI-val megszüntethető.

Jövőbeli terveim között szerepel a festési eljárás optimalizálása és olyan további konstruktok előállítása, amelyekkel még nagyobb érzékenység érhető el. A módszer így olyan biológiai jelenségek vizsgálatára is alkalmas lenne, amelyek csak csekély mértékű lokális uracil felhalmozódással járnak (pl.: szomatikus hipermutáció, osztályváltó rekombináció).

8. Irodalomjegyzék

1. Stryer, L.B., Jeremy M.; Tymoczko, John L., *Biochemistry*. 5. ed. 2001: W. H. Freeman and Company.
2. Kamiya, H., *Mutagenicity of oxidized DNA precursors in living cells: Roles of nucleotide pool sanitization and DNA repair enzymes, and translesion synthesis DNA polymerases*. Mutat Res, 2010. **703**(1): p. 32-6.
3. Grossman, L., et al., *Repair of DNA-containing pyrimidine dimers*. FASEB J, 1988. **2**(11): p. 2696-701.
4. Sedgwick, B., et al., *Repair of alkylated DNA: Recent advances*. DNA Repair, 2007. **6**(4): p. 429-442.
5. Kow, Y.W., *Repair of deaminated bases in DNA*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(7): p. 886-93.
6. Robertson, A.B., et al., *DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(6): p. 981-93.
7. Krokan, H.E., R. Standal, and G. Slupphaug, *DNA glycosylases in the base excision repair of DNA*. Biochem J, 1997. **325** (Pt 1): p. 1-16.
8. Hsieh, P., *Molecular mechanisms of DNA mismatch repair*. Mutat Res, 2001. **486**(2): p. 71-87.
9. Marti, T.M., C. Kunz, and O. Fleck, *DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways*. J Cell Physiol, 2002. **191**(1): p. 28-41.
10. Krokan, H.E., F. Drablos, and G. Slupphaug, *Uracil in DNA--occurrence, consequences and repair*. Oncogene, 2002. **21**(58): p. 8935-48.
11. Vertessy, B.G. and J. Toth, *Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases*. Acc Chem Res, 2009. **42**(1): p. 97-106.
12. Luo, Y., M. Walla, and M.D. Wyatt, *Uracil incorporation into genomic DNA does not predict toxicity caused by chemotherapeutic inhibition of thymidylate synthase*. DNA Repair (Amst), 2008. **7**(2): p. 162-9.
13. Stavnezer, J., J.E. Guikema, and C.E. Schrader, *Mechanism and regulation of class switch recombination*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 261-92.
14. Doseth, B., et al., *Uracil-DNA glycosylase in base excision repair and adaptive immunity: species differences between man and mouse*. J Biol Chem, 2011. **286**(19): p. 16669-80.
15. Bekesi, A., et al., *Developmental regulation of dUTPase in Drosophila melanogaster*. J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 22362-70.
16. Muha, V., et al., *Uracil-containing DNA in Drosophila: stability, stage-specific accumulation, and developmental involvement*. PLoS Genet, 2012. **8**(6): p. e1002738.
17. Yan, N., et al., *HIV DNA is heavily uracilated, which protects it from autointegration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(22): p. 9244-9.
18. Horvath, A. and B.G. Vertessy, *A one-step method for quantitative determination of uracil in DNA by real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(21): p. e196.
19. Krokan, H.E., et al., *Uracil in DNA and its processing by different DNA glycosylases*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2009. **364**(1517): p. 563-568.
20. Zharkov, D.O., G.V. Mechetin, and G.A. Nevinsky, *Uracil-DNA glycosylase: Structural, thermodynamic and kinetic aspects of lesion search and recognition*. Mutat Res, 2010. **685**(1-2): p. 11-20.

21. Cortazar, D., et al., *The enigmatic thymine DNA glycosylase*. DNA Repair, 2007. **6**(4): p. 489-504.
22. Friedman, J.I. and J.T. Stivers, *Detection of damaged DNA bases by DNA glycosylase enzymes*. Biochemistry, 2010. **49**(24): p. 4957-67.
23. Krusong, K., et al., *A comparative study of uracil-DNA glycosylases from human and herpes simplex virus type 1*. J Biol Chem, 2006. **281**(8): p. 4983-92.
24. Bennett, S.E., M.I. Schimerlik, and D.W. Mosbaugh, *Kinetics of the uracil-DNA glycosylase/inhibitor protein association. Ung interaction with Ugi, nucleic acids, and uracil compounds*. J Biol Chem, 1993. **268**(36): p. 26879-85.
25. Van Triest, B., et al., *Downstream molecular determinants of response to 5-fluorouracil and antifolate thymidylate synthase inhibitors*. Ann Oncol, 2000. **11**(4): p. 385-91.
26. Torseth, K., et al., *The UNG2 Arg88Cys variant abrogates RPA-mediated recruitment of UNG2 to single-stranded DNA*. DNA Repair (Amst), 2012. **11**(6): p. 559-69.