

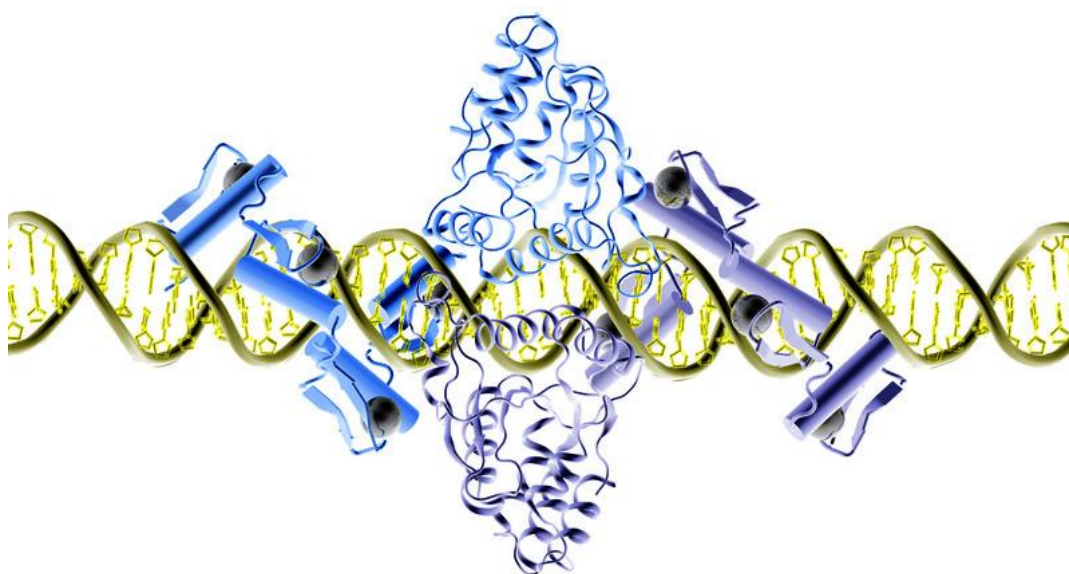


Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar

Pálincás Hajnalka Laura

Biomérnöki MSc szak
Alkalmazott biotechnológia szakirány

**A genom integritását biztosító mechanizmusok vizsgálata
humán sejtvonalakban helyspecifikus, biallélikus
génkiütés technológiával**



Témavezető: **Dr. Vértessy G. Beáta**
BME-ABÉT
MTA TTK Enzimológiai Intézet

Konzulens: **Róna Gergely**
MTA TTK Enzimológiai Intézet,
Genom metabolizmus és hibajavítás csoport

TDK dolgozat
Budapest, 2013.

Tartalom

Köszönetnyilvánítás	4
Rövidítések	5
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés	8
1.1. Timidilát bioszintézis	8
1.1.1. Timidilát szintézis, mint kemoterápiás célpont.....	9
1.1.2. A dUTPáz szerepe a timidilát bioszintézisben	11
1.2. A nukleotid metabolizmus hatása a DNS összetételére	14
1.3. Nem konvencionális nukleotidok eltávolítása a DNS-ből	15
1.4. A javító mechanizmusok hatása a genom integritására.....	17
1.5. A DNS épségének preventív védelme.....	17
1.6. A DNS károsodás sejtválasz (DDR)	20
1.6.1. A DNS károsodás aktivált sejtciklus leállás.....	21
1.6.2. A DNS károsodás által kiváltott sejthalál	22
1.7. Célzott génmanipulációs technikák.....	23
2. Célkitűzések	27
3. A génkiütési/menekítési rendszer megtervezése.....	30
3.1. A menekítő kazetta megtervezése	30
3.2. A Cre rekombinázt expresszáló kazetta megtervezése	36
4. Anyagok és módszerek.....	40
4.1. Az emlős HCT116 és HCT116+Chr3 sejtek bemutatása.....	40
4.1.1. Emlős HCT116 és HCT116 +Chr3 sejtek fenntartása és az MMR- deficiencia ellenőrzése	40
4.1.2. A ZFN-ek dUTPáz felismerőhelyének és az AAVS1 hely ellenőrzése PCR-rel ...	41
4.2. Az indukálható Cre rekombinázt expresszáló kazetta klónozása.....	42
4.2.1. Tetraciklin regulálható promóter klónozása a Donor vektorba.....	42
4.2.2. A CRE2ERT2 szekvencia beemelése a CMV _{TET} -pZDonor-ba.....	45
4.3. CMV _{TET} -CRE2ERT2-pzDonor konstrukció tesztelése sejtekben.....	47
4.3.1. Tranziens transzfekcióval.....	47
4.3.2. Funkcionális tesztelés loxP-GFP-loxP ko-transzfekcióval	48
4.3.3. A Cre rekombináz represszálhatóságának tesztelése TetR ko-transzfekcióval.....	48
4.4. A dUTPázokat kódoló menekítő kazetta tesztelése.....	48
4.4.1. Az exogén dUTPázok expressziójának és lokalizációjának vizsgálata tranziens transzfekcióval	49
4.4.2. A destabilizált Wasabi fluoreszcens riporter fehérje féléletidejének tesztelése.....	49
4.5. A menekítő rendszer sejtbe juttatásának tesztelése nukleofektálással	50
4.5.1. HCT116 és HCT116+Chr3 sejtek transzfekciója a nukleofektor technológia optimalizálásával	51

4.5.2. DNS és mRNS próba ko-transzfekció nukleofektálással	51
4.5.3. Az indukálható menekítő rendszer sejtbe juttatása nukleoporálással	52
4.5.4. A menekítő rendszer sejtbe juttatása ötvözve a hagyományos eljárást a modern nukleofektor technológiával	52
4.6. Az indukálható menekítő rendszer integrálása az AAVS1 lókuszbba ZFN mRNS nukleoporálásával	53
4.7. A ZFN aktivitás kimutatása Cel-1 Assay-vel	53
4.8. A transzfektált sejtpopuláció szelekciója fluoreszcenciával aktivált sejtszortírozó berendezéssel (FACS) és hygromycin szelekcióval	55
4.9. Egyedi sejtklónok izolálása és genotipizálás PCR-rel	56
5. Eredmények és értékelésük	59
5.1. Emlős HCT116 és HCT116 +Chr3 sejtek fenntartása és az MMR- deficiencia ellenőrzése	59
5.2. A ZFN-ek dUTPáz felismerőhelyének és az AAVS1 hely ellenőrzése PCR-rel	60
5.3. Az indukálható Cre rekombinázt expresszáló kazetta klónozása	60
5.3.1. Tetraciklin regulálható promóter klónozása a Donor vektorba	60
5.3.2. A CRE2ERT2 szekvencia beemelése a CMV _{TET} -pZDonor-ba	62
5.4. CMV _{TET} -CRE2ERT2-pzDonor konstrukció tesztelése	64
5.4.1. Tranziens transzfekcióval	64
5.4.2. Funkcionális tesztelés loxP-GFP-loxP ko-transzfekcióval	65
5.4.3. A Cre rekombináz represszálhatóságának tesztelése TetR ko-transzfekcióval	66
5.5. A dUTPázokat kódoló menekítő kazetta tesztelése	67
5.5.1. Az exogén dUTPázok expressziójának és lokalizációjának vizsgálata tranziens transzfekcióval	67
5.5.2. A destabilizált Wasabi fluoreszcens riporter fehérje féléletidejének tesztelése	69
5.6. A menekítő rendszer sejtbe juttatásának tesztelése nukleofektálással	70
5.6.1. HCT116 és HCT116+Chr3 sejtek transzfekciója a nukleofektor technológia optimalizálásával	70
5.7. Az első éles transzfekciót, majd nukleoporálást követő immunfestés	73
5.8. A ZFN aktivitás kimutatása Cel-1 Assay-vel	74
5.9. A transzfektált sejtpopuláció szelekciója fluoreszcenciával aktivált sejtszortírozó berendezéssel (FACS) és hygromycin szelekcióval	75
5.10. Egyedi sejtklónok genotipizálása PCR-rel	76
6. Összefoglalás	78
Hivatkozások	80

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani *Dr. Vértessy Beátának*, aki lehetővé tette számomra, hogy kutatócsoportjában dolgozhassak, megismertetett a téma alapjaival és lelkesítő ötleteivel segítette munkám előrehaladását.

Köszönöm *Buday Lászlónak*, az Enzimológiai Intézet igazgatójának, hogy engedélyezte kutatómunkámat az intézetben.

Hálás köszönettel tartozom *Róna Gergelynek*, hogy bevezetett a laboratóriumi munka világába, megismertetett a molekuláris biológia lehetőségeivel, munkámat irányította, felmerülő kérdéseimre pedig mindig nagy türelemmel és készségesen válaszolt.

Köszönettel tartozom *Horváth Andrásnak* a kísérletek megtervezésében nyújtott segítségéért.

Köszönöm *Borsos Máténak*, hogy a klónozási munkálatok megtervezésében a segítségemre volt.

Köszönöm *Batki Júliának*, hogy segítségemre volt a kísérletek kivitelezésében.

Végül szeretném megköszönni *az egész kutatócsoportnak* bátorító támogatásukat és a felmerülő problémák megoldásában nyújtott segítségüket.

Rövidítések

4-OHT	4-hidroxitamoxifen
5FdU	5-fluoro-dezoxiuridin
5FU	5-fluorouracil
APE1	AP endonukleáz 1
ATM	Ataxia telangiectasia mutated kináz
ATP	adenozin trifoszfát
ATR	ATM-related kináz
BER	Báziskivágó javító mechanizmus (Base Excision Repair)
bp	bázispár
BSA	marhaszérum albumin (Bovine Serum Albumin)
C	citozin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Cdk	ciklin függő kináz
CDP	citidin difoszfát
CMV	Citomegalovírus
Cre	Cre rekombináza
CRISPR	Szabályosan megszakított rövid palindróm ismétlések (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)
C-terminális	karboxi-terminális
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
dATP	dezoxiadenozin trifoszfát
dC	dezoxicitidin
DCD	dCTP dezamináz
dCDP	dezoxicitidin difoszfát
dCMP	dezoxicitidin monofoszfát
DCTD	dezoxicitidin monofoszfát dezamináz
dCTP	dezoxicitidin trifoszfát
DDR	DNS károsodás sejtválasz
dG	dezoxiguanozin
dGTP	dezoxiguanozin trifoszfát
DHF	dihidrofolát
DHFR	dihidrofolát reduktáz
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleotid trifoszfát
DSB	dupla szálú DNS törés
dT	dezoxtimidin
dTDP	dezoxtimidin difoszfát
dTMP	dezoxtimidin monofoszfát
dTTP	dezoxtimidin trifoszfát
dU	dezoxiuridin
dUDP	dezoxiuridin difoszfát

dUMP	deoxiuridin monofoszfát
dUTP	deoxiuridin trifoszfát
dUTPáz	deoxiuridin trifoszfát pirofoszfatáz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein - zöld fluoreszcens fehérje
ERT2	humán ösztrogén (ER) receptor két módosított ligandum-kötő doménje
FACS	Fluoreszcenciával aktivált sejtszortírozó berendezés
FBS	Foetal bovine serum - marha magzati szérum
FdUMP	5-fluoro-dUMP
FdUTP	5-fluoro-dUTP
FGS	Foetal goat serum - kecske magzati szérum
gDNS	genomi DNS
GFP	Green Fluorescent Protein - zöld fluoreszcens fehérje
HA-L	Bal oldali homológia kar (Homology Arm)
HA-R	Jobb oldali homológia kar
HCT116	humán vastagbélrák sejtvonal (Human colorectal carcinoma)
HeLa	méhnyakrák sejtvonal
HEPES	N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etán-szulfonsav)
HR	Homológ rekombináció
HT29	humán vastagbél karcinóma sejtvonal
Hygro	Hygromycin
IRES	Riboszóma belépőhely (Internal Ribosome Entry Site)
KO	knock-out, génkiütés
LB	Luria-Bertani tápoldat
LigI	DNS ligáz I
LigIII	DNS ligáz III
loxP	locus of crossover-P1
LSCM	Laser Scanning Confocal Microscopy
MCS	Multi Cloning Site
MdUTPáz	mitokondriális dUTPáz
MMR	Hibáspár javítás (Mismatch Repair)
MRN	Mre11, Rad50, Nbs1 komplex
mRNS	hírvivő/messenger RNS
MTHF	metilén-tetrahidrofolát
MTX	metotrexát
NDPK	nukleotid difoszfát kináz
NDPK	nukleotid difoszfát kináz
NdUTPáz	sejtmagi dUTPáz
NEB	New England Biolabs
NHEJ	Nem homológ végek összekapcsolása (Non-homologous end joining)
NK	nukleotid kináz
NLS	sejtmagi lokalizációs szignál
NMPK	nukleotid monofoszfát kináz

N-terminális	amino-terminális
OD	optikai denzitás
PBS	izotóniás foszfát puffer (phosphate buffered saline)
PCR	polimeráz láncreakció
PFA	paraformaldehid
PGK	foszfoglicerát kináz
poliA	poliadenilációs szignál
Pol β	DNS polimeráz β
PTX	pemetrexed
RBEs	Cre rekombinááz kötőhelyek
RNR	ribonukleotid reduktáz
RNS	ribonukleinsav
RTX	Raltitrexed /Tomudex (TDX)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SHMT	szerin-hidroximetil transzferáz
SSB	egyes szálú DNS törés
ssDNS	egyes szálú DNS
SW620	colorectal adenocarcinoma sejtvonal
TALE-nukleáz	Transcriptional activator-like effector nucleases
TET	tetraciklin
TetR	tetraciklin regulálható represszor
THF	tetrahidrofolát
TK	timidin kináz
TMPK	timidilát kináz
TRIS	2-Amino-2-hidroximetil-propán-1,3-diol
TS	timidilát szintáz
UDP	uridin difoszfát
UNG	Uracil-DNS N-glikoziláz
UV	ibolyántúli (ultraviola) fény
ZFN	cink-ujj nukleáz (Zinc finger nucleases)
β -ME	β -merkaptotanol

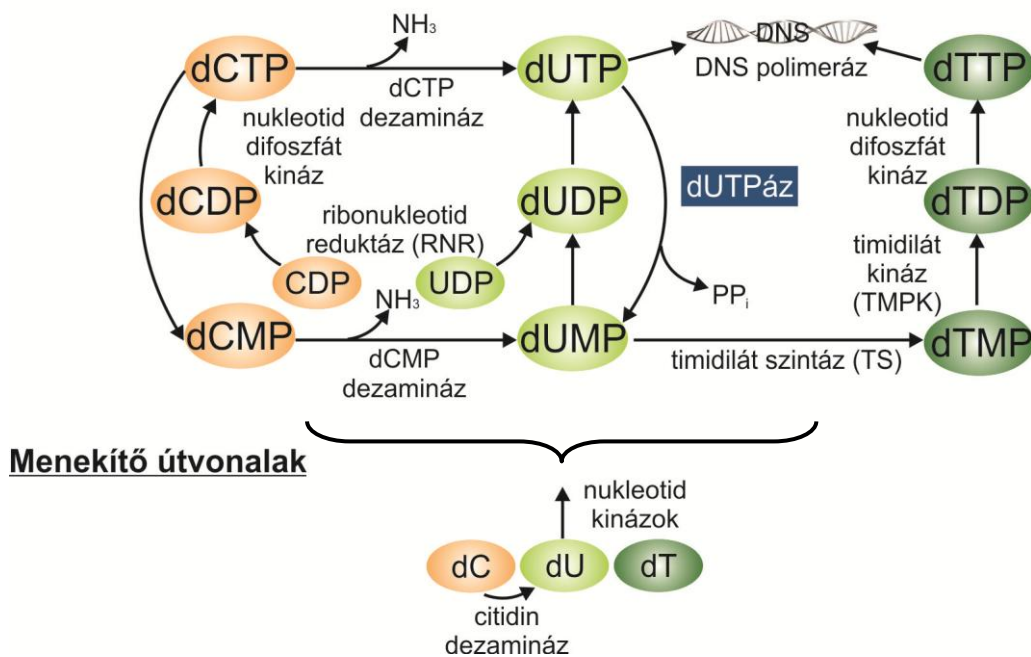
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. Timidilát bioszintézis

A genetikai információ megőrzése és változatlan továbbadása elengedhetetlen feladat minden élőlény számára. A genetikai információ azonban a bázisok kémiai változékonysága miatt a stabilnak mondható DNS-ben is könnyen károsodhat, megváltozhat, akár különösebb mutagén környezeti hatások nélkül is.

A timidilát bioszintézis minden sejtben létfontosságú, mivel a belőle keletkező dTTP a DNS szintézis egyik építőköve. A timidinnek nincs ribonukleotid megfelelője, így annak szintézise csak uridin vagy citidin prekursorokból lehetséges. Mindkét útvonal deoxiuridin monofoszfát (dUMP) intermediéren keresztül valósul meg. Régóta ismert tény, hogy az uracil megjelenése a genomban részben természetes módon lejátszódó folyamatok eredménye. Ez megvalósulhat a citozin spontán oxidatív dezaminálódása által, illetve a polimerázok azon tulajdonsága miatt, hogy nem képesek különbséget tenni a dTTP és a dUTP között. A *de novo* timidilát bioszintézis útvonalai, az azt kiegészítő menekítő utak, illetve az uracil beépülésének lehetősége az alábbi **1. ábrán** láthatóak összefoglalva.

De novo dTTP szintézis



1. ábra

A *de novo* timidilát bioszintézis útvonalai eukarióta sejtekben

Timidin helyett az uracil is képes beépülni a DNS-be annak szemikonzervatív megkettőződése során. Az ehhez szükséges dUTP dUDP-ből és dCTP-ből keletkezhet. A vad

típusú sejtekben a dUTP mennyisége csekély a dTTP készlethez képest, mivel a dUTPáz gondoskodik annak lebontásáról dUMP-vé.

Eukariótákban és Gram pozitív baktériumokban jelentős útvonalat képvisel a dezoxicitidin monofoszfát (dCMP) konverziója dUMP-vé, amit a **dCMP dezamináz (DCTD)** katalizál [1]. Az eddig vizsgált emlős sejtvonalakban a dCMP dezamináció bizonyult az elsődleges forrásnak a *de novo* dTTP szintézis számára, amihez hozzávetőlegesen 60-80%-ban járul hozzá [2, 3]. A DCTD funkció csökkentése emlős sejtvonalakban a dNTP arányok drasztikus felborulását eredményezi, a sejtbeli dCTP koncentráció a többszörösére nő, míg a dTTP koncentráció csökken [4, 5].

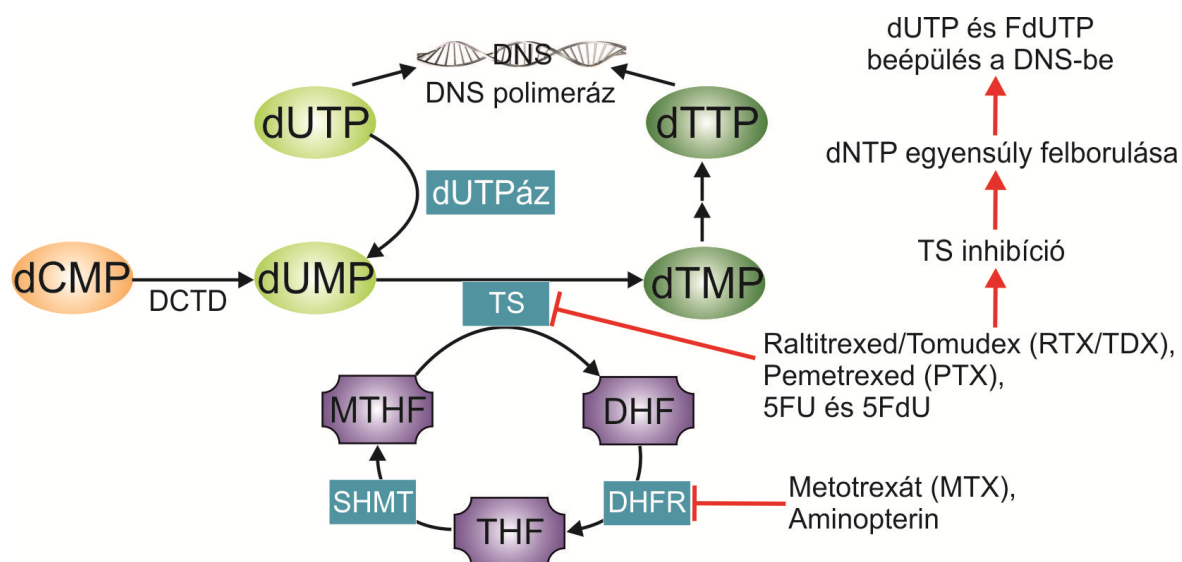
A másik jelentős útvonal a dUMP prekursor dezoxiuridin trifoszfátból (dUTP) állítja elő. A dUTP származhat az ribonukleotid reduktáz (RNR) termékéből (dUDP), amit aztán a nukleotid difoszfát kinázok (NDPK) foszforilálnak, illetve dCTP dezaminálásából, amit a **dCTP dezamináz (DCD)** végez. A dUTP hidrolízisét a **dUTP pirofoszfátáz (dUTPáz)** végzi, amely széles körben elterjedt az élővilágban. A katalitikusan aktív enzim három alegységből alakít ki egy homotrimert, ami hármas szimmetriát mutat, körülölelve egy központi csatornát. Az aktív helyek a szomszédos alegységek határán alakulnak ki, amelyekhez hozzájárulnak az egyes alegységek C-terminális flexibilis karjai is.

A *de novo* nukleotid metabolizmus mellett a sejtek képesek lehetnek arra is, hogy külső forrásokat használjanak fel a dNTP szintézishez, ezek az ún. menekítő útvonalak. A **nukleotid monofoszfát kinázok (NMPK)** jellemzően a dNTP bioszintézis menekítő útvonalában vesznek részt. A timidilát kináz (TMPK) kivételt képez ez alól, ugyanis ez elengedhetetlen a dTMP foszforilációjához. A dTMP mellett a dUMP-t is elfogadja szubsztrátjaként. A keletkező dezoxitimidin difoszfát (dTDP) és dUDP molekulákat a nukleotid difoszfát kinázok alakítják tovább dTTP-vé és dUTP-vé [6].

1.1.1. Timidilát szintézis, mint kemoterápiás célpont

A timidilát szintézis szűk keresztmetszete a dUMP, melynek metilációját a **timidilát szintáz (TS)** katalizálja dTMP-vé egy redukáló kofaktor jelenlétében [7]. A legtöbb élőlényben kofaktorként és metil-donorként a metilén-tetrahidrofolát (MTHF) szolgál, amelyet az enzim az uracil metilálását követően dihidrofoláttá alakít (DHF). A DHF regenerálása egy újabb katalitikus ciklushoz két lépésben zajlik: a **dihidrofolát reduktáz (DHFR)** alakítja át tetrahidrofoláttá, amit aztán a **szerin-hidroximetil transzferáz (SHMT)**

alakít tovább metilén-tetrahidrofoláttá [8]. Mivel a TS egy kulcsfontosságú folyamatot katalizál, kedvelt kemoterápiás célpont. Timidilát szintáz deficiens egér sejtvonalban a külső timidin forrás megszüntetését követően a dTTP és dGTP készlet csökkenését és a dATP készlet növekedését figyelték meg [9]. A folát-függő *de novo* timidilát szintézis útvonala és a leggyakrabban használt kemoterápiás ágensek főbb célpontjai a **2. ábrán** láthatóak.



2. ábra

Fluoropirimidin és antifolat származékok hatása a timidilát bioszintézisre

Sejtek fluoropirimidin vagy antifolat kezelése a timidilát szintáz gátlás következtében a dNTP készlet komponenseinek felborulását eredményezi. A dNTP metabolizmus enzimeinek gátlása nem szokványos bázisok nukleotid trifoszfát származékainak megjelenéséhez és a dNTP készlet kényes egyensúlyának felborulásához vezethet.

Az **5-fluorouracil (5FU)** és **5-fluoro-dezoxiuridin (5FdU)** metabolitja az **5-fluoro-dUMP** irreverzibilis inhibitora a timidilát szintáznak [10]. Emlős sejtvonalak 5-fluorouracil (5FU) és 5-fluoro-dezoxiuridin (5FdU) kezelése hasonló hatással van sejtekre, mint a TS hiányos sejtekre a timidin megvonás [9, 11]. Ezen kívül számos esetben a dUTP készlet növekedését is megfigyelték 5FU és 5FdU kezelést követően [12-15]. Az 5FU és az 5FdU kezelés eltérő módon fejti ki toxicitását. Az 5FU molekulák a sejtbe jutva elsősorban az RNS-be, átalakulva pedig kismértékben a DNS-be épülhetnek be. Az 5FdU molekulák képesek beépülni a DNS-be, azaz genotoxikus hatásúak, illetve foszforilált formájuk a timidilát szintázt gátolja [16].

Számos antimetabolit folátszármazék is létezik, amely hatással van a timidilát bioszintézisre (**2. ábra**). A **metotrexát (MTX)** és az **aminopterin** a DHFR ismert inhibitorai,

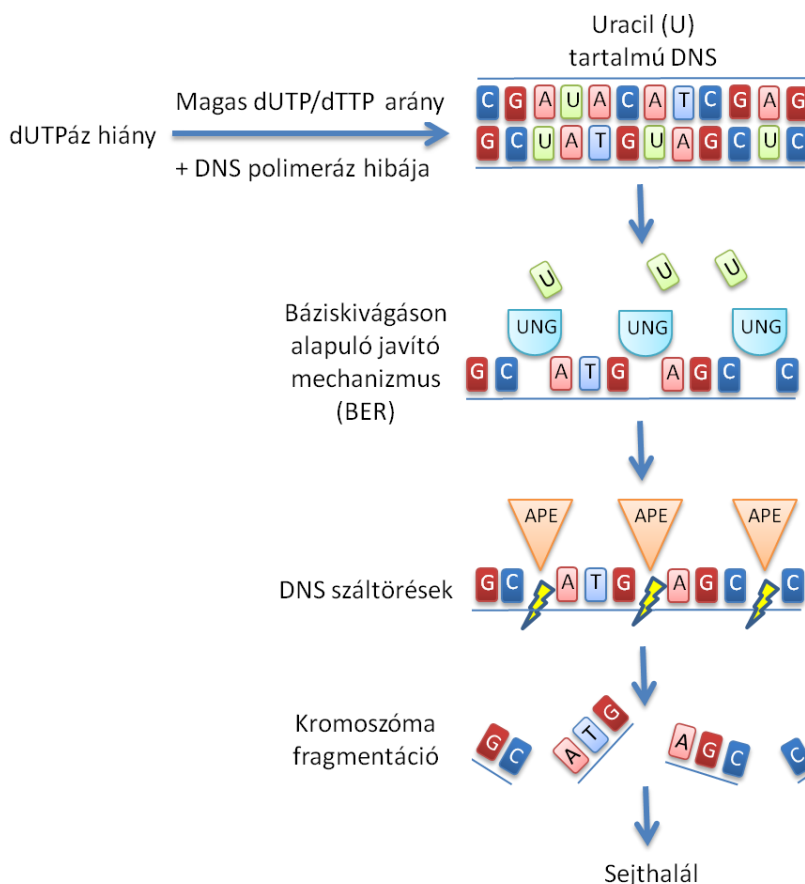
együttal gátolják a metil transzferhez szükséges folát ciklust is. Sejtek mindkét droggal történő kezelése esetén megfigyelték a dTTP készlet csökkenését és a dUTP készlet növekedését [17-21]. Más antifolát származékok, mint a **raltitrexed** (RTX vagy más néven tomudex, TDX) vagy **pemetrexed** (PTX) a timidilát szintázzal komplexálva gátolják a szintézist, ami szintén ugyanilyen hatással van a dTTP és dUTP készletre [13, 14, 19]. Csökkentett folát tartalmú médiumon növesztett sejtvonalak az 5FdU kezelésre nagyobb mértékű dTTP készlet csökkenéssel és dUTP készlet növekedéssel reagáltak. A TS gátlását követően, a dUTP készlet növekedését kimutathatóan befolyásolja a dUTPáz expressziója is [12]. A dUTPáz túltermelés csökkent mértékű, a csendesítés megnövekedett dUTP készletet tesz lehetővé [13, 15].

1.1.2. A dUTPáz szerepe a timidilát bioszintézisben

A **dUTPáz** a dUTP foszfát láncát hasítja el az α és β foszfát között. Ezt a reakciót a magnéziumion a foszfátlánc koordinálásával jelentősen felgyorsítja. A katalízis során a dUTP-t dUMP-vé és pirofoszfáttá hidrolizálja, illetve a termék dUMP egyben a dTTP bioszintézisének előanyaga. Ezzel a dUTPáz közvetve két oldalról is segíti a sejtbeli dUTP/dTTP arány megfelelően alacsony szinten tartását, így hatékonyan képes biztosítani az uracil kizárását az újonnan szintetizálódó DNS-ből megőrizve a genom integritását [22].

A fehérje esszenciálisnak bizonyult *Escherichia coli*-ban [23], *Saccharomyces cerevisiae*-ben [24], *Caenorhabditis elegans*-ban [25], *Trypanosoma brucei*-ben [26], *Arabidopsis thaliana*-ban [27] és *Mycobacterium smegmatis*-ban [28], ahol a dUTPáz hiánya sejthalálhoz vezetett. dUTPáz hiánya esetén a dUTP/dTTP arány megnő a sejtben, azaz az uracil és timin mennyisége összemérhető mennyiségben lesz jelen. Mivel a DNS polimeráz nem tud különbséget tenni uracil és timin között, azonos valószínűséggel építi be ezeket a DNS-be. Ez a DNS-ben nem okoz maradandó változást, mivel a timin és az uracil bázispár párosodási tulajdonságai azonosak, mindkettővel szemben adenin fog beépülni. A genomban megjelenő uracilt azonban hibaként érzékelik a sejtek, és különböző javítómechanizmusok révén igyekeznek eltávolítani. A báziskivágó javító mechanizmus (BER) sem tudja megkülönböztetni a különböző módon kialakult uracil hibákat és javítja azokat. Magas dUTP/dTTP arány esetén a DNS uracil tartalma (a DNS polimeráznak köszönhetően) igen magas, így a javítómechanizmus aktiválódva szinte felszabdalja a DNS-t magas uracil szint esetén. Az újraszintetizálás során újra nagyszámú uracil épül be a DNS-be, a dUTP/dTTP készlet aránytalansága miatt, és végül a javítás egy hiábavaló ciklussá válik. Ez a DNS

feldarabolódásához, kettősszáltörésekhez, majd sejthalálhoz vezet. Ezt a fajta sejthalált **timin-mentes sejthalálnak** nevezzük (**3. ábra**).

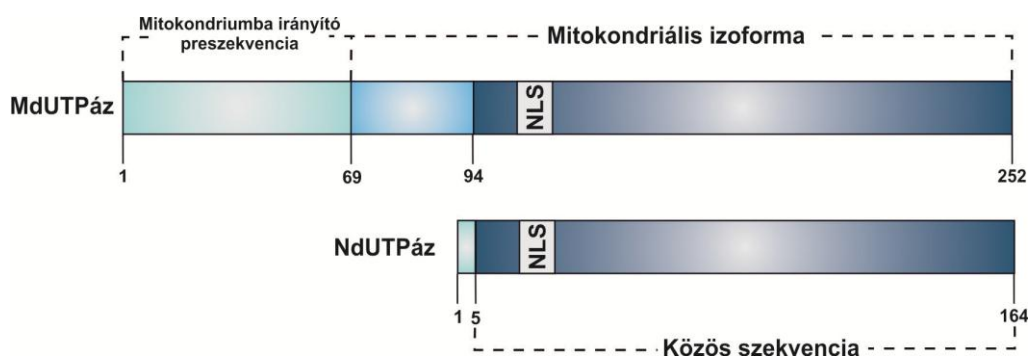


3. ábra

A dUTPáz hiányában végbemenő timin-mentes sejthalál folyamata

Az uracil tartalmú DNS miatt hiperaktivált báziskivágó javítómechanizmus DNS fragmentálódáshoz, végül sejthalálhoz vezet.

A legtöbb eukarióta szervezetben a dUTPáz enzimnek két izoformája alakult ki. Emberben a dUTPáz egyik izoformája a sejtmagba, míg a másik a mitokondriumba transzlokálódik. A két izoforma ugyanarról a génről íródik át, a különbség a mRNS alternatív splicing-ja során az eltérő promóter és 5' exon használatból adódik, amely fehérje szinten az N-terminális egy rövid szakaszán okoz különbséget [29]. Mindkét izoforma N-terminálisán megtalálható a bázikus aminosavakból álló, klasszikus nukleáris lokalizációs szignál (NLS) szekvencia. Azonban a mitokondriális izoforma egy mitokondriumba irányító preszekvenciával is rendelkezik (**4. ábra**) [30]. A mitokondriális izoforma termelődése folytonos, míg a sejtmagi izoforma sejtbeli szintje a sejtciklustól függően, a DNS replikációval összhangban változik (főleg az S-fázishoz köthető).



4. ábra

A humán dUTPáz mitokondriális (MdUTPáz) és sejtmagi (NdUTPáz) izoformája

Az alternatív splicing a fehérjék N-terminálisában eltérést eredményez: mindkét izoforma hordozza a nukleáris lokalizációs szignált (NLS), azonban a mitokondriális izoforma egy mitokondriumba irányító preszekvenciát is tartalmaz. Az ábrán a számok aminosav sorszámot jelölnek.

A dUTPáz aktivitás szabályozása sejtciklustól és fejlődési állapottól függ, magas enzimaktivitás csak aktív DNS szintézist folytató sejtekben figyelhető meg. A dUTPáz ígéretes gyógyszer-célpont rákellenes és antimikrobiális terápiákban, mivel az aktívan osztódó, például rákos sejtekben, a dUTPáz termelődése is fokozott [31, 32]. dUTPáz inhibitor(ok) alkalmazásával a timidilát metabolizmus gátlása talán még eredményesebbé tehető akár önállóan alkalmazva, akár más kemoterápiás gyógyszerekkel kombinálva. A dUTPáz hiányában létrejövő timin-mentes sejthalál mechanizmusa kevésbé ismert folyamat, indukálása azonban egy széles körben elterjedt módszer a klinikumban: a rákellenes szerek közel egyharmada ezen útvonal érintésével fejt ki hatását (fluoropirimidinek, metotrexát és származékai). Ezen drogokat sikerrel alkalmazzák a gyógyászatban, annak ellenére, hogy sok esetben a pontos hatásmechanizmusuk a mai napig nem teljesen ismert. A legtöbb drog esetén megfigyelték a kezelést követő uracil felhalmozódását a genomban, melynek nagy szerepe lehet abban, hogy a sejt elpusztul.

A drogkezelésekre adott válaszban nem tisztázott az útvonalban kulcsfontosságú dUTPáz pontos szerepe. Tény, hogy a dUTPáz szöveti kifejeződése jelentősen befolyásolja a genombeli uracil felhalmozódását [28, 33]. Az eddigi megfigyelések szerint a dUTPáz túlműködése részleges rezisztenciát okoz a fluoropirimidinekkel szemben, hiánya pedig érzékenyít [12, 31, 34-36], ennél fogva különösen fontos a fehérje működésének és szerepének alaposabb megismerése. Érdekes terület az enzim sejtbeli lokalizációjának a timidilát metabolizmus szabályozásában betöltött szerepe [30, 37]. Ezen folyamatok orvosi biológiai jelentősége miatt különösen fontos a fehérje működésének alaposabb megismerése.

dUTPáz csendesített sejtekben eddig még nem végeztek teljes körű dNTP készletre vonatkozó vizsgálatot, azok csupán a sejtbeli dUTP és dTTP koncentrációra korlátozódtak. Vastagbél és tüdőrák sejtvonalakban vizsgálták a dUTPáz expressziós szintek és a sejtbeli dTTP és dUTP koncentráció összefüggését. A dUTP egyik esetben sem volt kimutatható. A HT29 sejtvonalban negyed akkora dUTPáz aktivitás mellett feleakkora dTTP koncentráció volt megfigyelhető az SW620 sejtvonalhoz képest [12]. Ilyen összefüggést azonban nem sikerült kimutatni a tüdőrák sejtvonalak esetében [38]. A dUTPáz csendesítése tumoros sejtvonalakon szintén nem járt egyértelmű következményekkel. A legtöbb esetben a dTTP koncentrációja nem változott jelentős mértékben a csendesített sejtekben, azonban dUTP koncentrációnövekedést több esetben sikerült kimutatni [13, 39, 40]. A dUTPáz csendesítés hatása tehát feltehetően sejttypus függő. Az, hogy a dUTPáz csendesítés nem volt egyértelmű hatással a timidilát bioszintézisre, alátámasztja, hogy a dCMP dezamináció a domináns útvonal. A dUTPáz csendesítés hatásának hiányára egy másik lehetséges magyarázat, hogy a csendesítés ellenére elegendő enzimatis aktivitás maradt a dTTP koncentráció zavartalan fenntartásához, illetve a tápoldatban lévő timidin menekítő forrásként szolgálhatott, amennyiben nem dializált szérumot használtak. Mivel számos prokariótában nincs jelen a DCTD, ezekben az élőlényekben a timidilát *de novo* szintézisében jóval nagyobb szerep juthat a dUTP-nek és a dUTPáznak [28].

1.2. A nukleotid metabolizmus hatása a DNS összetételére

A dNTP bioszintézisben szerepet játszó enzimek a dNTP készlet komponenseinek mennyiségi meghatározásával befolyásolni képesek a DNS szintézist. Mivel a DNS által kódolt információt a bázisok hordozzák, rendkívül fontos a bázissorrend hibamentes reprodukálása.

A dNTP készlet komponenseinek aránya a sejtekben nem egyenlő. A legkisebb koncentrációban a dezoxiguanozin trifoszfát (dGTP) van jelen emlős sejtekben [41], S-fázisú HeLa sejtekben [42] és S-fázisú sarjadzó élesztőben [43]. A legnagyobb koncentrációban a dezoxitimidin trifoszfát (dTTP) van jelen. Ezek az arányok ugyan nem tükrözik az egyes nukleotidok előfordulását a genomban, feltehetően inkább a DNS polimerázok optimális működéséhez szükségesek. A DNS szintézis túlnyomórészt a sejtciklus S fázisában történik, ennek az igénynek megfelelően van szabályozva a dNTP készlet. Ezt a sejtek többnyire a nukleotid bioszintézisben részt vevő gének expressziójának transzkripció vagy posztranszlációs módosításával érik el.

A legtöbb **DNS polimeráz** templátfüggően szintetizál DNS-t, és ehhez szüksége van egy, már a komplementer szálra hibridizált dezoxinukleotid monofoszfát (dNMP) 3'-hidroxil csoportjára. Az aktív helyre véletlenszerűen kötődnek be a dNTP molekulák a lokális koncentrációjuknak megfelelően. Az egyes dNTP komponensek lokális túlsúlyának következtében mutagén hatású nukleotid szubsztitúció történhet. Amellett, hogy a DNS polimerázok a DNS 5' - 3' irányba történő szintézisét katalizálják, rendelkeznek egy ún. proofreading 3' - 5' exonukleáz doménnel is. Ez a domén képes arra, hogy a polinukleotid lánc 3' végéről levágja az utolsó nukleotidot, amennyiben az az aktív helyről fluktuál. A fluktuáció annál gyakoribb, minél kevésbé illeszkedik a komplementer bázishoz. Miután a DNS polimeráz beépít egy nukleotidot és továbbmozdul a DNS-en, a következő nukleotid beépítéséig van lehetőség kivágni a hibásan beépített nukleotidot. Tehát minél gyorsabban építi be a polimeráz a következő nukleotidot, annál kisebb az esély a hiba kijavítására. Amennyiben a következő nukleotidnak megfelelő dNTP nagy mennyiségben van jelen, annak beépülése gyorsabb, csökkentve ezzel a proofreading hatékonyságát a korábban beépült nukleotidra nézve. Ezt a jelenséget „**következő nukleotid hatás**”-nak nevezzük [44].

A hibaspárok kialakulásán keresztül a dNTP aránytalanság rövid inszerciók vagy deléciók megjelenésének gyakoriságát is növelheti. Ez akkor valósulhat meg, amikor a hibaspár egyik bázisa egy közeli nukleotiddal alakít ki bázispárt, és ilyen módon egy-két nukleotidos kihurkolódást stabilizál [45].

A dGTP készlet nem véletlenül a legalacsonyabb a sejtekben: a dGTP sejtbeli koncentrációjának mesterséges megemlése nagymértékben növeli a mutációs frekvenciát. Sokkal kisebb mértékű változást okoz a dCTP vagy a dTTP készletek növelése [5]. Az 5FdU, a timidin metabolizmus gátlásával egyidejűleg kiváltott dNTP készlet aránytalanság következtében hibaspárként beépülhet az örökítőanyagba, azaz genotoxikus hatású [46]. A dUTPáz feltehetően a fluoropirimidinek DNS-be történő beépülését is megakadályozza, képes ugyanis hidrolizálni az 5-fluoro-dUTP-t [34].

1.3. Nem konvencionális nukleotidok eltávolítása a DNS-ből

A sejtek DNS hibajavító mechanizmusai a felelősek a nem szokványos nukleotidok eltávolításáért. Ezek a nukleotidok vagy rendellenes bázispárosodást alakítanak ki, ami torzulást okoz a DNS szerkezetében, vagy szerkezetileg/kémiaiilag más karakterrel rendelkeznek, mint a szokványos bázisok, ami befolyásolhatja a kölcsönhatást a DNS kötő

fehérjék felszínével. Ha a kromoszóma két szála közül csak az egyik hibás, a másik szál használható mintaként, ami alapján végbemehet a károsodott szál javítása.

A **direkt javítómechanizmusok** a legkíméletesebbek a DNS integritása szempontjából. Ezek többnyire közvetlenül a módosult bázist alakítják vissza az eredeti bázissá. Eltérő módon működnek a **kivágó mechanizmusok**, amelyek eltávolítják a károsodott nukleotidot, és a helyére egy sértetlent építenek be úgy, hogy a másik DNS szál nukleotidját kiegészítse.

A **báziskivágó javító mechanizmus (BER)** során a módosult bázis eltávolítása történik a DNS-ből. A módosult bázisok felismerését számos fajta ún. **DNS glikoziláz** végzi. Ezek a DNS hélixen gördülve kifordítják a bázisokat az aktív helyük felé, mely sztérikus preferenciával rendelkezik az eltávolítandó bázisra nézve. Az uracil kivágására specializálódott DNS glikozilázok az N-glikozidos kötés elhasítását katalizálják. Az uracil-DNS glikoziláz szupercsalád osztályai azonban némileg eltérő szubsztrátkörnyezetre specializálódtak [47]. Az 1-es családba tartozik az *E. coli*-ban, élesztőben, *C. elegans*-ban és emlősökben megtalálható **UNG**. Nincs jelen azonban teljes átalakulással fejlődő rovarokban. Az UNG képes uracilt, illetve 5-fluorouracilt kivágni egyes és kettős szálú DNS szubsztrátokból. Ellentétben a legtöbb élőlénnel, a *Bacillus subtilis* PBS2 fágja uracillal dúsított genomot tart fenn, ennek érdekében a fertőzött sejtben **Ugi** fehérjét expresszál, amely az 1-es családba tartozó összes UNG enzimet képes specifikusan gátolni [48]. Emlősökben az UNG-nak két izoformája van jelen, a mitokondriális UNG1 és a sejtmagi UNG2. A monofunkcionális DNS glikozilázok után hátra maradt abázikus helyet az **AP endonukleáz 1 (APE1)** ismeri fel, mely egyesszáltörést hoz létre a helytől 5' irányban, a nukleotid újraszintézisét pedig a **DNS polimeráz β (Pol β)** végzi [49, 50]. A folyamat végén a **DNS ligáz III (LigIII)** vagy a **DNS ligáz I (LigI)** kapcsolja össze a DNS szálakat.

A DNS polimerázok által létrehozott hibáspárok a helytelen illeszkedés miatt torzulást okoznak a DNS-ben. A **hibáspár javítás (MMR)** ilyen torzulások felismerésére specializálódott, ami a replikáció hűségének 50-1000-szeres növekedését is eredményezheti [51]. Humán sejtek 5FdU kezelését követően kimutatták, hogy a hibáspár javítómechanizmus hiányában az 5-fluorouracil bázisok nagyobb hányada alakít ki guaninnal bázispárt, mint a működő javítás esetén [46]. Ez arra utal, hogy a hibáspár javítás az 5-fluorouracil eltávolításában is jelentős szerepet játszik.

A negyedik javítómechanizmus a **nukleotid kivágó javítás** (nucleotide excision repair - NER), amely nagyobb, DNS hélixet torzító módosulások eltávolítására specializálódott, amit nukleotidok közötti keresztkötések és beékelődő komplexek alakíthatnak ki.

A DNS javító rendszerek kiemelkedő fontosságát mutatja, hogy számos örökletes, rákos elfajuláshoz vezető betegség hátterében gyakran DNS javító fehérjék génjében keletkezett mutációk állnak.

1.4. A javító mechanizmusok hatása a genom integritására

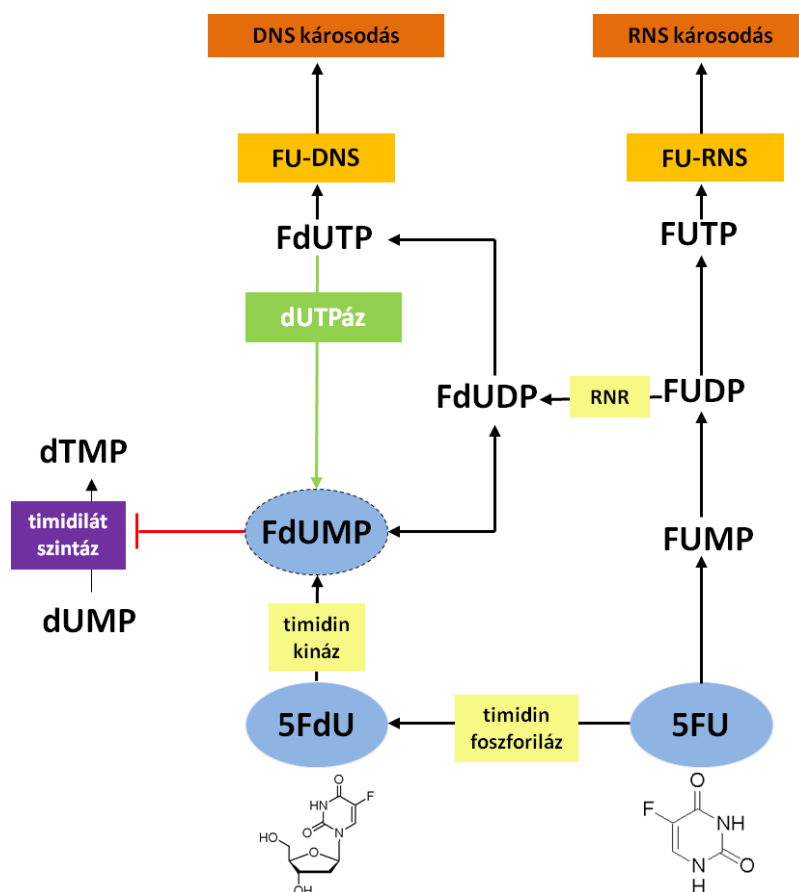
A nukleotid metabolizmus zavara esetén beépült bázismódosulások mellett, hogy mutagének lehetnek, a genom integritására is veszélyt jelenthetnek. Ez megvalósulhat egyfelől a replikáció elakadása, másfelől éppen a módosult bázisokat eltávolítani hivatott javítómechanizmusok által, melyek a közvetlen javítómechanizmusoktól eltekintve mindig egyesszáltörések átmeneti megjelenésével járnak. A sejtek sorsa szempontjából nagy jelentőségű, hogy a beépült módosult bázisokat az átfedő szubsztrát specifitással rendelkező javítómechanizmusok közül melyik távolítja el. A felsorolt javítómechanizmusok közül a hibáspár javítás (MMR) energiaigénye a legnagyobb, de a genom integritása szempontjából is a legkockázatosabb a sejt számára. A javítás köztitermékeként kialakuló több kilobázis hosszú egyes szálú szakaszok nagyobb mértékben vannak kitéve további károsodásnak, ami akár DNS kettősszáltörések gyakoribb megjelenéséhez is vezethet. A genom integritásának csökkenése drasztikus hatással lehet a sejtek életciklusára. A DNS fragmentáció vezethet a sejtek öregedéséhez a telomérák rövidülését okozva, vagy a mitokondriális genom károsodásának következtében a mitokondriumok számának csökkenéséhez. A nukleáris genom károsodása okozója lehet karcinogén elváltozásoknak, de bizonyos sejtválaszoknak köszönhetően a sejtciklus leállítását vagy sejthalált is kiválthat.

1.5. A DNS épségének preventív védelme

A módosult bázisok metabolitjait hidrolizálni képes enzimek a javítás szempontjából preventív hatásúak, funkciójuk ugyanis megelőzi a javítómechanizmusok szubsztrátjainak megjelenését a DNS-ben.

Eddig *Escherichia coli*-ban [23], *Saccharomyces cerevisiae*-ben [24], *Caenorhabditis elegans*-ban [25], *Trypanosoma brucei*-ben [26], *Arabidopsis thaliana*-ban [27] és *Mycobacterium smegmatis*-ban [28] karakterizálták a **dUTPáz** deficiencia következményeit. Ezek többségében igazolták, hogy a dUTPáz hiánya a genom fragmentálódásával jár együtt. Egyéb dUTPáz gént érintő mutációk a genom fragmentálódásához vezetnek, amit az UNG kiütésével komplementálni lehet [23, 52].

Az 5FU molekulák a sejtbe jutva és metabolizálva elsősorban az RNS-be, átalakulva pedig kismértékben a DNS-be épülhetnek be. Az 5FdU molekulák képesek beépülni a DNS-be, azaz genotoxikus hatásúak, illetve foszforilált formájuk (5-fluoro-dUMP (FdUMP)) a timidilát szintázt gátolja [16, 34] (**5. ábra**). A dUTPáz részleges rezisztenciát biztosít az 5FU és 5FdU toxicitással szemben, ami arra utal, hogy a fluoropirimidinek beépülését is megakadályozza a DNS-be [12, 27, 34-36]. Ez felveti annak a kérdését, hogy a fluorouracil milyen módon okoz genotoxicitást. A dUTPáz ugyanis az 5-fluoro-dUTP (FdUTP) hidrolízisével az 5-fluoro-dUMP keletkezését katalizálja, ami a timidilát szintáz inhibitora. Ez alapján a rezisztencia mechanizmusa nem a timidilát bioszintézis gátlásának mérséklésén alapul. A dUTPáz túltermelés egyéb, más mechanizmusú TS gátlószerek toxicitását is mérsékelni képes [21, 38, 53].



5. ábra

Az 5FdU és az 5FU molekulák toxikus hatása

Az fluoropirimidinek a sejtbe jutva és metabolizálva az RNS-be vagy a DNS-be épülhetnek be, súlyosan károsítva a genom integritását. A dUTPáz képes megakadályozni a toxikus molekulák integrálódását a DNS-be.

Érdekes módon a dUTPáz egyéb genotoxikus hatások ellen is védelmet nyújt, melyek nem hozhatók szoros kapcsolatba az aktivitásával: a dUTPáz túltermelése élesztőben rezisztenciát biztosít a hidrogén-peroxid és a kadmium toxicitással szemben. A hidrogén peroxiddal szemben mutatott védő hatás humán sejtekben is kimutatható [54].

A dTTP koncentráció csökkenésével párhuzamosan azonban **dUTP** is beépülhet a DNS-be. Az *E. coli*-ban történő **Ugi** expresszió, mely az **UNG** specifikus inhibitora, némi rezisztenciát biztosít az 5FdU-val szemben [55]. *S. cerevisiae*-ben egy timidilát szintáz érintő mutáció uracil felhalmozódáshoz vezet a magi és a mitokondriális genomban, egyúttal növekedési defektust eredményez, azonban utóbbi fenotípus menekíthető az UNG kiütésével [56]. Ugyanebben az organizmusban az 5FU és az antifolát aminopterin toxicitást is mérsékli az UNG funkció elvesztése. Továbbá, a *C. elegans* UNG csendesítése is menekítő hatásúnak bizonyult az 5FU kezelésre [57].

Érdekes módon, az emlős és csirke sejtekben az UNG szerepe eltérő az előbbiekhöz képest: a timidilát szintáz 5FdU-val vagy antifoláttal történő gátlását nem menekíti az UNG kiütése vagy gátlása [14, 16, 58]. Elmondható, hogy emlős sejtekben 5FdU kezelés esetén a DNS-be beépülő uracil és 5FU kivágását elsősorban az UNG katalizálja, azonban ez a katalízis nem veszélyezteti a genom integritását. Mégis elegendő ahhoz, hogy a drogkezelt sejtek genomjában ne legyen kimutatható az uracil, és 5FdU hatására csak UNG deficiens sejtek genomjában tud felhalmozódni az uracil. Feltehetően sejtípustól függő, illetve törzsek közti egyedi különbséggel magyarázható az a megfigyelés, amely során az UNG csendesítése menekítő hatással volt HeLa sejtek 5FdU kezelésére [59].

A DNS polimeráz β kiütése menekítő hatásúnak bizonyult egér embrionális fibroblaszt sejtek RTX toxicitására nézve [60]. A hibáspárpár javítás MSH2 és MLH1 enzimei kulcsfontosságúak lehetnek a timidilát szintáz gátlása esetén tapasztalható toxicitáshoz, mivel kiütésük nagymértékben növeli a rezisztenciát 5FdU és RTX-re nézve [46, 61, 62]. A vastagbélrákos elváltozások 10-15%-ára jellemző a hibáspár javító enzimeket kódoló kromoszómáreszek elvesztése vagy epigenetikus csendesítése, ami ezeknek a sejteknek rezisztenciát biztosít kemoterápiás kezelésekkel szemben. Kimutatták, hogy az 5FU szubsztitúciók kivágásában a BER-hez képest nem vesz részt jelentősen a hibáspár javítás. Azonban a TS gátlás következtében felborult dNTP készlet miatt számos más konvencionális bázis is hibáspárként épülhet be, aminek a hibáspár javítás által történő javítása nagymértékben veszélyezteti a genom integritását. Bizonyos alkilált bázisok kijavítása az 5FU-hoz hasonlóan a hibáspár javításnak köszönhetően válhat kritikussá, ennek hiányában a sejtek ellenállóbbá válnak a 6-oxo-metilguanin kiváltott toxicitásra [63].

1.6. A DNS károsodás sejtválasz (DDR)

DNS károsodást kiváltó hatások folyamatosan érik a sejteket, melyeket a preventív és DNS javító enzimek minimalizálni képesek. Kiterjedtebb károsodás azonban komplexebb, magasabb szintű sejtválaszt igényel, a gyakori hibák ugyanis számos sejtfunkciót megzavarhatnak. A genom drasztikus károsodása esetén szükséges lehet a sejtciklus leállítása, a DNS szintézisben és javításban szerepet játszó fehérjék expressziójának stimulálása és végső esetben a sejthalál aktiválása. A DNS károsodást ezekkel a folyamatokkal az ún. **DNS károsodás sejtválasz** (DDR - DNA damage response) kapcsolja össze. A DDR számos komponense része az ún. integrált stressz válasznak. A DDR-t a DNS kettősszáltörések (DSB) vagy a DNS replikáció leállás, lassulás vagy DNS javítási köztitermékek során kialakuló egyes szálú DNS (ssDNS) tartós megjelenése képes kiváltani. Az ssDNS és DSB által kiváltott útvonalak a DDR-en belül nagyrészt elkülönülnek, de részben átfedhetnek.

A **DNS kettősszáltörés** (DSB - DNA double strand break) érzékelése az ún. MRN komplex (Mre11, Rad50, Nbs1) által történik, amely a sérüléshez toborozza az ATM (Ataxia telangiectasia mutated) kinázt. Ez inaktív állapotban homodimerként van jelen, majd aktiváció során autofoszforilálódik, és aktív monomerekre disszociál. Az aktiváció során a Tip60 acetil transferáz is acetilálja az ATM kinázt. Az ATM a DSB-hez kötve számos szubsztrátot foszforilál, melyek a hiba közelében komplexálódnak vagy a foszforilációt követően disszociálnak, és további sejtválaszokat aktiválnak. Az ATM foszforilálja az útvonal másik fő fehérjét, a Chk2-t is. A Chk2 ezt követően autofoszforilálódik, disszociál és további szubsztrátokat foszforilál. A kettősszáltörést a sejtek a nem homológ végek összekapcsolásával (NHEJ: Non-homologous end joining) vagy homológ rekombinációval (HR) javíthatják. A rekombinációs javításhoz szükség van egy közel azonos szekvencia jelenlétére, ami mintaként szolgál a törés megjavításához, míg a nem homológ végek összekapcsolása (NHEJ) során a törés két vége mintaszekvencia nélkül kapcsolódik össze.

Az **egyes szálú DNS** (ssDNS) megjelenését az RPA (RPA1, RPA2 komplex) detektálja, mely beburkolja az egyes szálú láncot. Az RPA-ssDNS komplexhez az ATR (ATM-related) kináz az ATRIP fehérjével együtt kötődik, majd további mediátorok segítségével aktiválódik. Az ATR és Chk1 az aktiváció során egymást is foszforilálja, valamint a Chk1 autofoszforiláción is átesik. Az aktivációt követoen a Chk1 disszociál és további szubsztrátokat foszforilál. Az ATR illetve a Chk1 foszforilálni képes a DNS szálak közti keresztkötések javításában és homológ rekombinációban résztvevő Fanconi Anemia ubiquitin ligáz komplex bizonyos komponenseit, valamint annak szubsztrátját [64].

Általánosságban tehát elmondható, hogy az ATM/Chk2 a DSB, az ATR/Chk1 a replikációs késlekedés és a ssDNS megjelenés során aktiválódik. Azonban a két útvonal részben átfedhet: kis valószínűséggel az ATM/Chk2 aktiválódhat az ssDNS jelenlétében. A DSB során az újravágást követően az ATR útvonal is aktiválódik, így a két útvonal együttműködése a DSB homológ rekombináció által történő javítását teszi lehetővé.

Az ATM/Chk2 útvonal bizonyos tumorokban is előfordul, az útvonalat érintő homozigóta mutációk nem letálisak. Azonban az ATR/Chk1 útvonal létfontosságú osztódó sejtek számára. Ez az útvonal az S-fázis során folyamatos, alacsony aktivitást mutat, aminek fontos szerepe lehet a replikáció kontrollálásában [65]. A Chk1 folyamatos jelenléte szupresszálja a Kaszpáz 2-t. A Kaszpáz 2 önmagában elegendő az apoptózis kiváltására, ennél fogva a Chk1 hiánya sejthalálhoz vezet [66].

C. elegans-ban a dUTPáz hiány okozta letalitást a Chk1 és a Clk2 csendesítése képes részben kompenzálni, ami az ATR/Chk1 útvonalra utal [67]. *Arabidopsis thaliana*-ban a dUTPáz csendesítése a Rad51 expresszió emelkedéséhez és a homológ rekombináció gyakoriságának növekedéséhez vezet, ami szintén lehet az uracil szubsztituált genom hiperaktív javításának köszönhetően aktivált DDR következménye [27].

Az alkiláló környezeti hatások szintén az ATR/Chk1 útvonal aktiválódását okozzák. Az oxidatív stressz is képes DDR sejtválaszt kiváltani: magas oxigén koncentráció és hidrogén peroxid kezelés mind az ATM/Chk2, mind az ATR/Chk1 útvonalat képes aktiválni [68].

A DNS károsodás során **a hiba gyors kijavítása** és az érintett szakasz újra szintézise szükséges. Ennek érdekében a DDR gyakran indukálja a dNTP szintézis és a DNS javítás fehérjéinek termelődését vagy relokalizációját.

1.6.1. A DNS károsodás aktivált sejtciklus leállás

A DNS károsodás érzékelését követően szükséges a replikáció leállítása, hogy a sejt időt hagyjon a hibák kijavítására. Mind az ATM/Chk2, mind az ATR/Chk1 útvonal képes leállítani a sejtciklust különböző fázisokban. Az ATM/Chk2 útvonal aktiválta p53 a p21 fehérje indukciója által a G1 stádiumban tudja leállítani a sejtciklust. A p21 a ciklin függő kináz (Cdk) - ciklin komplexekhez kötve gátolja azok aktivitását. Az ATM/Chk2 útvonal aktivációjára utal, hogy 5FU kezeléssel sikeresen kiváltottak p53 függő G1 fázis leállást emlőrák sejtvonalonban [69].

Az S fázis alatt azonban mindkét útvonal képes blokkolni a sejtciklust. Az ATR/Chk1 még ismeretlen mechanizmusok által képes az S-fázisban lelassítani a replikációs villa mozgását és megakadályozni az inicializált replikációs origókról induló elongációt. A TS csendesítése egér sejtvonalban a sejtciklus leállítását eredményezi az S-fázisban [70]. A TS 5FU és antifolát általi gátlása hasonló, Chk1 foszforilációtól függő S-fázis blokkot eredményez, ami a hibáspár javítómechanizmus kiütésével vagy dTTP hozzáadásával feloldható [71-73].

A G2 fázis leállítását szintén mindkét útvonal képes kiváltani. A hasonlóságok ellenére az ATM/Chk2 és az ATR/Chk1 útvonalak azonban eltérő módon váltják ki a G2 leállást. Az ATM/Chk1 egy azonnali G2 blokkot, míg az ATR/Chk1 hatása hosszabban tartó G2 felhalmozódást okoz [65]. Humán vastagbélrák sejtekben 5FdU hatására indukálható egy hibáspár javítás független S-fázis lassulás és egy hibáspár javítás függő G2/M sejtciklus blokk [61]. Alkiláló ágensek hatására humán sejtek szintén G2 fázisban feldúsulást mutatnak [74].

1.6.2. A DNS károsodás által kiváltott sejthalál

A DNS károsodást követően aktivált DDR a sejtciklus leállításával és a DNS javítás serkentésével a sejt túlélését segíti, azonban aktivál pro-apoptotikus útvonalakat is. Mind az ATM/Chk2, mind az ATR/Chk1 útvonal aktiválódása esetén megfigyelhető a p53 aktivációja. Gyakran megfigyelték, hogy a DNS károsodás gyakran p53 függetlenül is képes sejthalált kiváltani. A p53 alternatívája ebben az esetben a p53 családba tartozó p73 lehet, amely a p53-hoz hasonló módon képes kiváltani apoptózist. A p73-at az ATM és az ATR/Chk1 útvonal is képes stimulálni [75]. A p53 és a p73 alapvetően kétféle úton képes apoptózist kiváltani (extrinsic és intrinsic útvonal).

A Kaszpáz 2 az egyetlen sejtmagban folyamatosan jelen lévő prokaspáz, aktivációjával p53 független apoptózist lehet kiváltani. Bizonyos DNS károsító hatásokra sikerült kaszpáz 2 függő sejthalált kiváltani, azonban az aktiváció mechanizmusa egyelőre ismeretlen [63].

A TS csendesítése a p53 stabilizálásához és a Kaszpáz 3 effektor kaszpáz aktiválódásához vezet humán sejtvonalban [70]. A TS 5FU, 5FdU és antifolát általi gátlása esetén is kimutatható a p53 stabilizálódása, ami az apoptózis intrinsic és extrinsic útvonalát is stimulálja [69, 76]. Az alkiláló ágensek muslicában a p53 aktivációját váltja ki [77]. Oxidatív stressz hatására pedig a p53 ATM függő módon stabilizálódik, valamint ATR függő módon

foszforilálódik [68]. Genotoxikus stressz hatására egyéb lehetséges p53 független útvonalakat is megfigyeltek.

1.7. Célzott génmanipulációs technikák

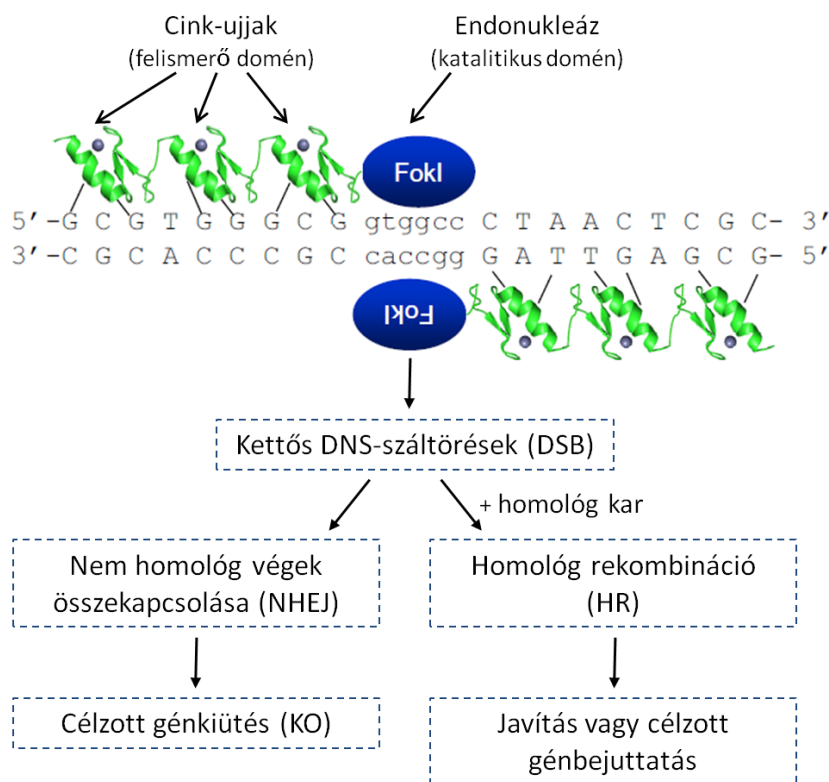
Munkánk során a dUTPáz gén kiütésének hatását szeretnénk volna megvizsgálni humán sejtvonalon, melyhez először ki kellett választanunk a legalkalmasabb génmanipulációs technikát, mely mindkét allélon helyspecifikus génmódosítást tesz lehetővé.

A legtöbb ma használatos célzott génmódosító eljárás a **homológ rekombináció** alapul. A homológ rekombináció eukarióta és prokarióta szervezetekben is használható. Ezt a jelenséget fel lehet használni a plazmidok és mesterséges kromoszómák közötti DNS-darabok cseréjéhez. A homológiát mutató DNS-darabok rekombináció révén például egyesíthetnek két különféle DNS-darabot, vektort (különösen, ha azon csak egy homológ szakasz van).

A kromoszomális DNS célzott átszabása iránti nagy igény egészen újszerű módszerek kifejlesztéséhez vezetett. Az elmúlt néhány évben jelentek meg először olyan technológiák, amelyekkel mód van lényegében **tetszőleges genomiális régió célzott** hasítására, illetve rekombinálására. Olyan mesterséges enzimeket kellett tervezni, amelyek egy DNS-felismerő elem és egy laza specificitású endonukleáz katalitikus domén fúziójával hozhatóak létre (**moduláris felépítés**). Jelenleg három ilyen megközelítés létezik, amelyet a gyakorlatban is használnak: az egyik közülük az úgynevezett cink-ujj nukleázokon alapszik.

A **cink-ujj nukleázok** (ZFNs: Zinc finger nucleases) olyan mesterséges enzimek, melyek egy DNS-felismerő elem és egy laza specificitású endonukleáz katalitikus domén fúziójával hozhatóak létre (moduláris felépítés), így tetszőleges genomiális régió hasítására, illetve rekombinálására alkalmasak. A természetes cink-ujj transzkripciós faktorok a DNS-hez jól meghatározott szekvencia-specificitással kötnek, leggyakrabban három cink-ujjal. A cink-ujjak irányított mutációival ez a specificitás megváltoztatható, és több cink-ujj motívummal még pontosabb specificitás hozható létre: akár a genom egyetlen szakasza is célba vehető. A mesterséges nukleázok bevitele által okozott kettősszáltörést a sejtek a nem homológ végek összekapcsolásával (NHEJ: Non-homologous end joining) vagy homológ rekombinációval (HR) javíthatják. Amint már említettem, a rekombinációs javításhoz szükség van egy azonos vagy közel azonos szekvencia jelenlétére (homológ kar), ami mintaként szolgál a törés megjavításához, míg a nem homológ végek összekapcsolása (NHEJ) során a törés két vége enélkül kapcsolódik össze. Tartósabb expresszió esetén a nagyszámú hasítás-javítás ciklussal járó hibákkal könnyű **deléciókat** létrehozni (NHEJ útvonal). Az NHEJ útvonal aktiválódása

akár több száz bázispárnyi deléciót is okozhat, amely frameshift mutációk révén az adott gén kiütését eredményezi. Ha pedig célzott kettőstörést okozunk a kiszemelt génben, amihez egy bejuttatott DNS tökéletesen illeszkedik a megfelelő homológ karokkal, **célzott génbejuttatás** vagy **helyspecifikus pontmutáció** valósítható meg (HR útvonal) [78-80]. A cink-ujj nukleázok felépítése, helyspecifikus DNS-hasítása és annak lehetőségei a génmódosításban az alábbi **6. ábrán** láthatóak.



6. ábra

Heterodimer cink-ujj nukleázok (ZFNs) helyspecifikus DNS-hasítása és annak következményei

A megfelelő nukleázzal (FokI) képzett fúziós fehérje célzottan el tudja vágni a kromoszomális DNS-t a felismerő hely közelében (DSB). Donor szekvencia hiányában az NHEJ útvonal aktiválódik, ami célzott génkiütést tesz lehetővé. Rekombinációs javításhoz (HR) minta szekvencia szükséges, megfelelő homológ karok alkalmazásával pedig célzott génbejuttatás valósulhat meg.

(<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/zinc-finger-nuclease-technology.html>)

A módszer hátulütője, hogy itt minden egyes genomális szakaszra **külön tervezett enzimre** van szükség. Maguk a cink-ujjas nukleázok is bizonyos szempontból korlátozottak, egyes DNS-szekvenciákon nem elég szelektív a működésük. Ez abból a tényből fakad, hogy a cink-ujjak a célszekvenciát blokkokban ismerik fel, nem pedig egyedi nukleotidoként.

Léteznek viszont olyan természetes fehérjék, amelyek ezen a szinten is tökéletesen modulárisak. Ezeket **TALE-nukleázok**nak hívják (TALEN: transcriptional activator-like effector nucleases). A fúziós fehérje alapja itt egy, a parazita *Xanthomonas* baktériumokból izolált fehérjecsalád. Ezeket a fehérjéket a baktérium termeli, és juttatja be a gazdanövénybe azért, hogy ott bizonyos géneket célzottan aktiváljanak, innen kapták a nevüket (transzkripció faktorokhoz hasonlítanak). A szerkezetük erősen **repetitív**: minden egyes rövid, 33-35 aminosavas szerkezeti blokk (repeat) **egy-egy nukleotid kötéséért** felelős, mégpedig nagy specificitással. Így az általunk megtervezett repeat-sorrenddel az egész TALE fehérje a kívánt DNS-szekvencia szerint építhető fel (általában párban, hogy mind a két DNS-szálat elhasítsuk). Mindezt nem-specifikus endonukleáz doménekhez (FokI) kapcsolva egy újfajta mesterséges endonukleáz lesz az eredmény [81, 82]. Nehézséget okoz azonban a gén mesterséges előállítása a repetitív DNS-szekvenciák miatt, illetve a TALE nukleázok nagy mérete megnehezíti azok hatékony sejtbe juttatását és kellő mértékű expressziójukat.

A legújabb technológia a **CRISPR/Cas rendszer**, melyet 1987-ben fedezték fel, funkcióját azonban csak az elmúlt évtizedben sikerült megfejteni [83]. Már korábban is ismert volt, hogy a baktériumok és az archaeák rendelkeznek egy adaptív, nukleinsavakon alapuló immunválasszal, melyet az őket fertőző vírusok, esetleg plazmidok ellen vetnek be. A **CRISPR** rendszer neve csoportos, szabályosan megszakított rövid palindróm ismétléseket (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) jelent. A CRISPR-elemek és a velük kapcsolatban álló ún. **Cas**-fehérjék által, melyek endonukleázként működnek, a baktériumok és az archaeák képesek rövid specifikus **crRNS**-molekulákat létrehozni (a crRNS jelentése CRISPR-ből származó RNS). Ezek megtalálják és elpusztítják a baktériumokra veszélyes vírus, illetve plazmid DNS-t. A crRNS szolgál vezetőként, ez határozza meg nagyon specifikusan, hogy hol történjen a hasítás. A kutatók bebizonyították, hogy ezeket az RNS-párosokat le lehet cserélni mesterségesen tervezett, egy darabban szintetizált kiméra-RNS-ekkel, hogy helyspecifikus DNS-hasítást érhessenek el. Ez megnyitja az utat az eddig nem létező mesterséges **RNS-vezérelte DNS-hasításhoz** [84]. A módszer igazi szépsége, hogy a CRISPR rendszerekhez szükséges valamennyi gént könnyen át lehet vinni egyik bakteriális rendszerből a másikba, plazmidok segítségével.

Az előzőekben bemutatott mesterséges endonukleázok: a cink-ujj nukleázok (ZFNs), a TALE-nukleázok és a CRISPR/Cas rendszer elemei (beleértve a DNS felismerő és elvágó komponenseket) hatékonyak bizonyultak a genom eredményes és specifikus módosításában, sejtenyészetekben, növényekben és állatokban [80-82, 84]. A kutatók ezen génmanipulációs

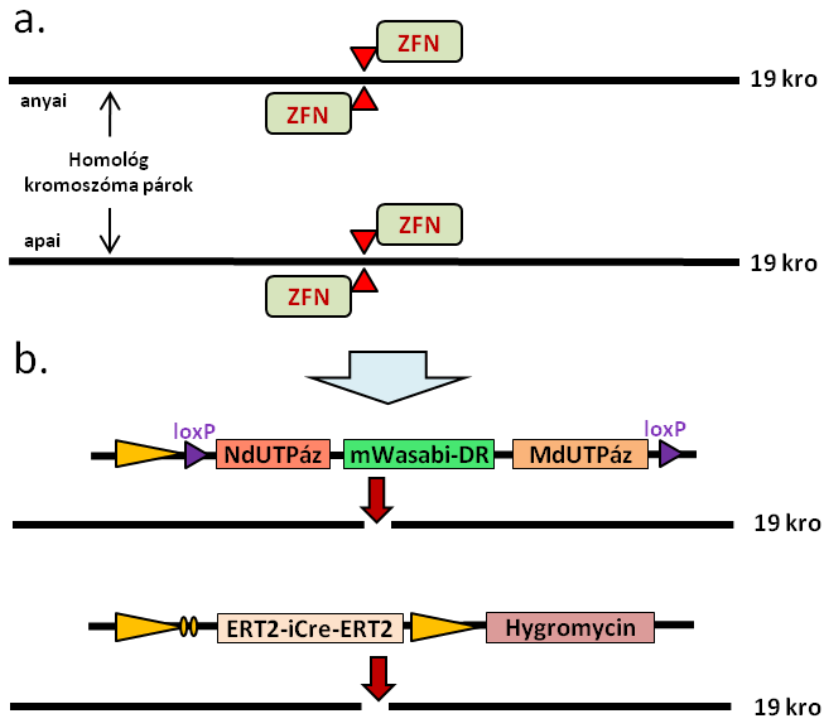
technikák fejlődésében látják a jövőt a biológiai kutatásban, hiszen azok forradalmi jelentőséggel bírnak az egyedi terápiás kezelésekben [85].

A kísérletekhez a tetszőleges DNS szekvenciát felismerő cink-ujj nukleázokat (ZFN-ek) választottuk, melyek lehetővé teszik a helyspecifikus, biallélikus genomi manipulációkat. Ez a technológia az irodalmi adatok alapján kellően fejlettnak és eredményesnek bizonyult hasonló kutatási projektekből. A ZFN technológia tulajdonosa a Sangamo BioSciences, amely terápiás kezelések kifejlesztésére használja (<http://www.sangamo.com/index.html>). Kutatási célokra a Sigma Aldrich kereskedik célszekvenciára tervezett ZFN párokkal (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/zinc-finger-nuclease-technology.html>).

2. Célkitűzések

Számos publikáció említi a dUTPáz kiemelt szerepét a fluoropirimidinekkel történő kemoterápiás kezelés esetén [15, 31]. Az eddigi eredmények tükrében a fehérje megemelt szintje részleges rezisztenciát okoz az általánosan használt fluoropirimidinekkel szemben, hiánya pedig érzékenyít. Azonban az enzim ezen hatásának pontos mechanizmusa még nem teljesen ismert a *de novo* timidilát metabolizmust támadó kemoterápiás szerek terén. A gén szerepét a folyamatban eddig csupán csendesítéssel [13, 34, 39], de génkiütéssel még nem vizsgálták.

Kutatásunk fő célja egy olyan életképes, modell sejtvonal létrehozása, melyben a dUTPáz génjét kiütöttük, így vizsgálhatnánk annak hatását a kemoterápiás szerekkel történő kezelésre. A génkiütést egy humán rák modell sejtvonalon (HCT116) kísérelnénk meg, egy nemrég kifejlesztett, úttörő módszerrel, a tetszőleges DNS szekvenciát felismerő cink-ujj nukleázok (ZFN-ek) révén. Ez a módszer lehetővé teszi sejtvonalakon a hatékony biallélikus (vagy akár poliallélikus) modifikációt. Az endogén dUTPáz specifikus kiütése előtt, annak feltételezhető letális mivolta miatt, először biztosítani kell a sejtnak egy menekítő rendszert, enélkül nem lehetne életképes kiütött sejtvonalat létrehozni. A menekítést olyan módon szeretnénk megoldani, hogy a genom egy másik ismert pontjára egy olyan konstrukciót építünk be, ami a dUTPáz sejtmagi és mitokondriális izoformáját egyaránt biztosítja, amely azonban a kívánt időben Cre rekombinááz mediált kivágással megszüntethető. Ezáltal egy indukálható dUTPáz knock-out (KO) sejtvonalat szeretnénk nyerni, ahol a dUTPáz expresszió csak az általunk szabályozott exogén forrásból történhet, így vizsgálhatnánk a dUTPáz hiányos állapotot. Az **7. ábrán** látható sémát szeretnénk megvalósítani:

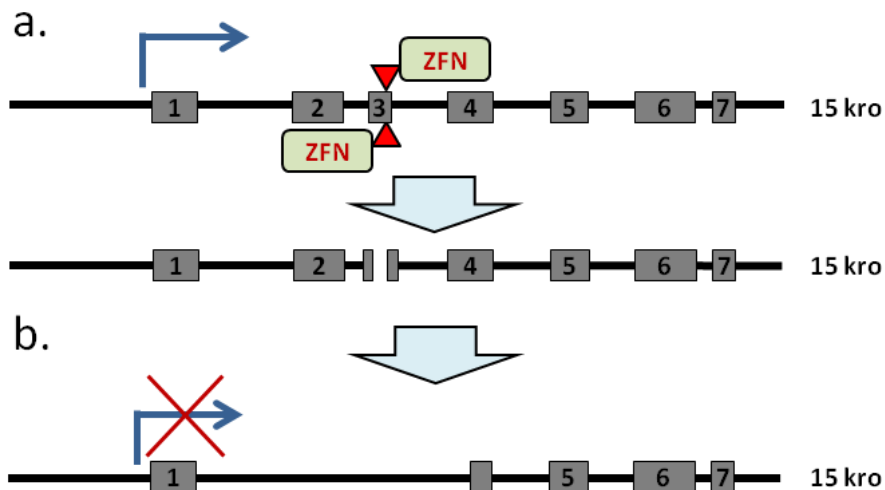


7. ábra

A Cre rekombinázt kódoló és a menekítő dUTPázokat kódoló kazetta beintegrálása

- A ZFN-ek specifikusak az AAVS1 lókuszra a humán genomban, és kettős szál töréseket okoznak az XY kromoszómákon.
- Miközben a sejt kijavítja a kettős szál töréseket, a kívánt szekvencia képes integrálódni a genomba homológ rekombináció segítségével.

Számos genetikai elemből álló komplex rendszert kell összerendeznünk egyetlen integráló vektorba, ami klónozási feladatok egész sorát jelenti. Mindegyik genetikai elem fontos szerepet játszik, hogy a menekítés és az indukálható kikapcsolhatóság jól működjön. Miután a sejtekbe integráltuk az exogén dUTPáz forrást, megkezdhetjük az endogén kiütését specifikus ZFN párok segítségével, a **8. ábrán** látható módon.



8. ábra

Az endogén dUTPáz kódoló gén kiütése

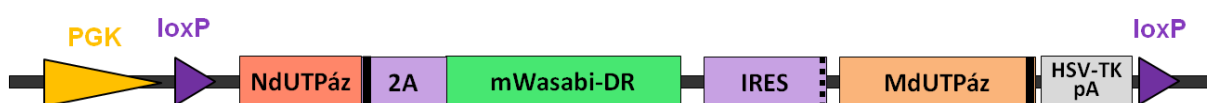
- a. Egy ZFN pár specifikusan felismeri az endogén dUTPáz 3. exonjának végét, és egy kettős száltörést okoz mindkét kromoszómán.
- b. A nem homológ végek összekapcsolásán (NHEJ) alapuló hibajavítás végül a gén tönkremeneteléhez vezet (deléciók révén).

A létrehozott indukálható dUTPáz kiütött sejtvonal lehetővé teszi a dUTPáz genomi integritás megőrzésében játszott szerepének jobb megértését, a timin-mentes sejthalál útvonala eddig nem tanulmányozott részleteinek megismerését. A hatásmechanizmus jobb megismerése pedig lehetővé tenné, hogy a klinikai kezelések hatásfokának javítására javaslatot tegyünk. A nukleotid metabolizmus komponensek sejtbeli lokalizációjának és molekuláris kölcsönhatásainak fontosságára csak az utóbbi években figyelt fel az irodalom. A dUTPáz szerepének ilyen jellegű vizsgálata új távlatokat nyithat az orvosi biológiában.

3. A génkiütési/menekítési rendszer megtervezése

3.1. A menekítő kazetta megtervezése

Egy olyan menekítő kazettát kellett terveznünk, mely a dUTPáz sejtmagi és mitokondriális izoformájának expresszióját egyaránt exogén módon biztosítja, és egy fluoreszcens fehérje markert hordoz a konstrukció detektálásához. A megfelelő konstrukció létrehozásához bázisról bázisra meg kellett terveznünk annak genetikai elemeit. A konstrukciót végül több mint 3900 bázispár hosszúságúra terveztük meg, melynek sematikus képe a **9. ábrán** látható.



9. ábra

A dUTPázokat kódoló menekítő konstrukció sematikus képe

A sejtmagi (NdUTPáz) és a mitokondriális (MdUTPáz) dUTPáz izoformán kívül a kazetta egy PGK promótert, loxP felismerő helyeket, fluoreszcens szelekciós markert (mWasabi-DR) és számos genetikai összekötő elemet, illetve restrikciós hasítóhelyet tartalmaz.

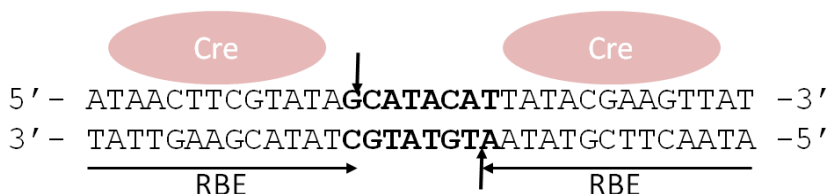
A továbbiakban szeretném bemutatni az egyes genetikai elemek kiválasztási szempontjait és a feltételezett szerepüket a menekítő folyamatban.

- **PGK promóter**

A menekítő kazetta meghajtásához a PGK promótert választottuk. A PGK a 3-foszfoglicerát kináz enzimet kódolja, amely a sejtek glikolíziséhez szükséges. A promóter régió guaninban és citozinban gazdag, öt hexadezoxinukleotid (GGGCGG) kópiát, az Sp1 transzkripciós faktor potenciális kötőhelyét, egy CCAAT szekvenciát tartalmaz. Ez a promóter kellő expressziós szintet képes biztosítani riporter és terápiás géneknek egyaránt. A PGK promóter a gyengébb promóterek közé tartozik emlős expressziós rendszerekben [86], ami számunkra előnyös, mivel nem szerettük volna túlságosan túltermelni az exogén dUTPázokat. A promóter tervezésekor szintén fontos szempont volt, hogy az első loxP hely elé kerüljön, mert ha a Cre rekombinázzal kivágjuk a loxP helyek közti részt, nem maradhat aktív promóterrel rendelkező cirkularizált extrakromoszómális DNS konstrukció a sejtben.

- **loxP felismerő helyek**

A menekítő útvonal megszüntetéséhez alkalmazott **Cre rekombinááz** eredetileg a P1 bakteriofágból ered, és egyedi felismerő hellyel rendelkezik, ez a **loxP** (locus of crossover-P1). A loxP helyek nem szimmetrikusak, irányultságuk van, mivel a két szélükön palindrom, középen viszont aszimmetrikus nukleotid szekvenciát (ATAACTTCGTATA-GCATAACAT-TATACGAAGTTAT) tartalmaznak. A hasítás a nem palindrom szakaszon belül fog bekövetkezni (**10. ábra**) [87].

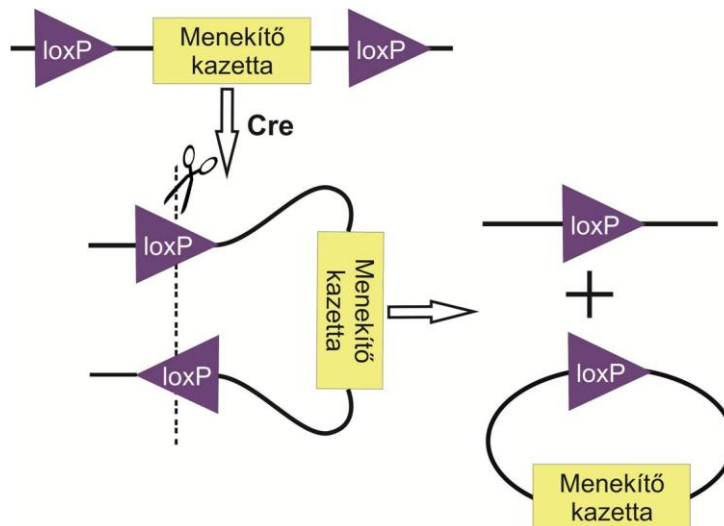


10. ábra

A Cre rekombinááz kötődése a loxP felismerő helyhez

A Cre specifikusan köt a rekombinááz kötőhelyekhez (RBEs: recombinase binding elements) a palindrom szekvenciában. A középső 8 bp a loxP hely aszimmetrikus része, itt fejt ki endonukleáz hatását az enzim. A vágás helyét függőleges nyilak jelzik.

A Cre enzim azonban nem csak endonukleáz aktivitással rendelkezik, hanem (a tetramerizáció révén, saját DNS-ligáz aktivitása révén) elősegíti a szabaddá vált végek egyesülését is (site-specific recombination). Ez által a két (megfelelően irányított) loxP hely közötti DNS-darab a Cre enzim hatására kivágódik és cirkularizálódik (**11. ábra**). A cirkuláris, kivágott darab az osztódások során általában elvész, deléciót hozva létre. A kivágás után egy ép loxP hely marad a kromoszómán, mely szabadon rekombinálódhat egy másik loxP hellyel. A Cre rekombinááz alkalmazása után ezért szelektálnunk kell azokra a sejtekre, melyek nem hordozzák a menekítő kazettát. A tervezésnél a promóter után terveztük az első loxP helyet, hogy a kivágódó, cirkularizálódó darab ne tartalmazhasson promótert, melyről megindulhatna az átírás. A konstrukcióhoz azonos szekvenciájú loxP helyeket választottunk, és a PGK promóterhez képest több nukleotid távolságot hagytunk, hogy a kapcsolódó polimeráz ne zavarhassa meg a Cre rekombinááz felismerő tulajdonságát.



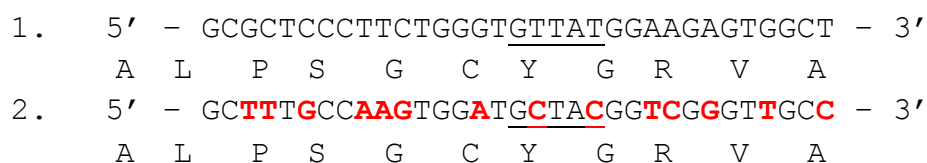
11. ábra

Kromoszómális deléció kiváltása Cre rekombinázzal

Ha a loxP helyek azonos orientációban helyezkednek el egy kromoszóma szegmensén (cisz elrendeződés), a Cre rekombináz hatása az adott szegmens delécióját eredményezi.

- **NdUTPáz (a dUTPáz sejtmagi izoformája)**

A magi és a mitokondriális dUTPáz izoformát a menekítő kazettáról biztosítottuk exogén módon, hiszen amennyiben esszenciálisnak bizonyul az enzim, így vizsgálhatnánk a különböző izoformák menekítő hatását. Az NdUTPáz gén elé Kozak-szekvenciát terveztünk, mely az első start kodont (ATG) is tartalmazza. Ha a menekítő dUTPázok szekvenciája teljes mértékben azonos lenne az endogénével, akkor az endogén kiütéséhez használt ZFN párok az exogén dUTPázokat is elhasítanák, így nem lenne lehetséges a menekítés. Módosítanunk kellett az exogén dUTPázok szekvenciáját a ZFN-ek felismerő helyén, hogy az integrált menekítő kazetta érintetlen maradjon az endogén kiütésénél. A **12. ábrán** láthatóak a módosított nukleotidok, amelyek az aminosav sorrendet nem befolyásolják, ugyanakkor védelmet jelentenek a ZFN-ek aktivitásától.



12. ábra

Az endogén dUTPáz ZFN felismerő helyei és a tervezett, módosított dUTPáz szekvencia

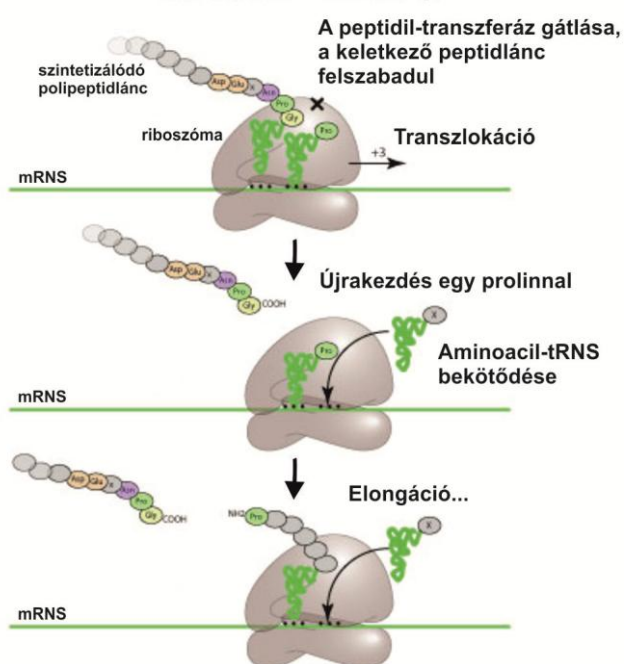
1. Az endogén dUTPáz ZFN felismerő helyei és a kódolt aminosavak. Az aláhúzott rész a Fok1 endonukleáz hasítóhelyét jelzi.

2. Az általunk tervezett exogén dUTPázok szekvenciája. Piros jelöléssel az endogénhez képest módosított nukleotidok láthatóak. A nukleotid cseréket úgy terveztük meg, hogy az ne módosítsa az aminosavsorrendet.

A sejtmagba lokalizálódó exogén dUTPáz detektálásához **AU1 epitóp tag**-et választottunk az enzim C-terminálisára. Az AU1-tag szarvasmarha papilloma vírus L1 kapszid proteinből származik [88]. Fehérjékhez fuzionáltatva érzékeny és specifikus detektálást tesz lehetővé a megfelelő antitestekkel, nem mutatott erős háttérfestődést és nem befolyásolta a jelölt fehérje lokalizációját [89]. Az AU1 epitóp elé egy 15 nukleotidból álló linker szakaszt is terveztünk, mely glicinekben és prolinokban gazdag, amelyek másodlagos szerkezeti elem megtörő tulajdonsággal bírnak, így segítve, hogy a peptid hozzáférhető legyen a specifikus antitest molekulák számára.

- **2A peptid**

A magi dUTPáz és a fluoreszcens riporter gén (mWasabi-DR) közé egy ún. 2A peptidet terveztünk, ami lehetővé teszi több fehérje expresszióját egyetlen promóterrel, közös mRNS-ről, így nem szükséges fúziós fehérjéket létrehozni. A 18 aminosavas 2A peptid közbeiktatása két önálló fehérje szintézisét eredményezi a transzláció során. A 2A oligopeptid elhasítódik a folyamat során, eleje az NdUTPázra, míg utolsó prolinja a riporter fehérjénkre (mWasabi-DR) kerül, amit a fehérje metioninja követ (**13. ábra**) [90]. A 2A peptid szekvenciája elé egy rövid, három aminosavat (GSG) kódoló linker szakaszt is betettünk, mely az irodalmi adatok alapján növeli a 2A peptid funkciójának hatékonyságát [91].



13. ábra

A 2A peptidet tartalmazó mRNS-ről átíródó polipeptidek

A transzláció során a 2A peptid utolsó glicinje után megáll a szintézis és felszabadul az addig keletkezett polipeptidlánc. Az azt követő prolinnal folytatódik az újabb peptidlánc szintézise a riboszómán, így két fehérje keletkezhet közös promóter felhasználásával.

- **mWasabi-DR**

Szükségünk volt egy olyan fluoreszcens riporter fehérjére, amely biztosítja a menekítő kazetta integrálódásának és expressziójának gyors detektálhatóságát és szelektálhatóságát. A választásunk egy nemrég felfedezett fluoreszcens fehérjére, az ún. **mWasabi**-ra esett. Az mWasabi egy monomer zöld fluoreszcens fehérje, amely az mTFP1 monomer cián fluoreszcens fehérjéből származik [92]. Az mWasabi jelentősen fényesebb, mint a többi, ma használatos zöld fluoreszcens fehérje. Az EGFP-hez képest közel kétszer olyan erősen világít, és hasonló pH érzékenységgel, illetve stabilitással rendelkezik, ahogy azt a **14. ábra** is mutatja.

Fehérje	mWasabi	EGFP
Excitációs Max (nm)	493	488
Emissziós Max (nm)	509	507
Kvantum Yield	0,8	0,6
Extinkciós koefficiens	70,000	56,000
Fényesség	56	33,6
pKa	6	6

14. ábra

Az mWasabi és az EGFP fluoreszcens fehérjék összehasonlítása

(<http://www.allelebiotech.com/mWasabi>)

Egy olyan fluoreszcens riporter fehérjét szerettünk volna alkalmazni, amelynek expressziója biztosan detektálható, ugyanakkor a riporter fehérje szintje gyorsan lecsökken a sejtben, amikor a menekítő kazettát kiütjük. Ehhez egy destabilizáló szekvenciát kellett terveznünk, amely a fluoreszcens fehérje féléletidejét jelentősen lecsökkenti. Mind az integrációs eseményre való szelekciónál, mind pedig majd a Cre rekombinázzal történő kiemésztésnél hasznosnak ígérkezik egy ilyen destabilizált fluorofór, ami gyorsan tükrözi a DNS-beli változásokat fehérjeszinten. Az egér ornitin dekarboxiláz (MODC) degradációs doménjének 39 aminosavát (422-461), az ún. **PEST szekvenciát** kötöttük az mWasabi C-terminálisára, egy öt aminosavból álló linkert követően. Ez a destabilizáló elem az irodalmi adatok alapján egy órára csökkenti a fúziós fehérje féléletidejét [93-95].

- **IRES**

A destabilizált Wasabi riporter gén és a mitokondriális dUTPáz izoforma (MdUTPáz) közé egy IRES szekvenciát terveztünk. A szekvenciát 1988-ban fedezték fel poliovírus és

encephalomyocarditis vírus RNS-ben. Az **IRES (Internal Ribosome Entry Site)** egy olyan nukleotid szekvencia, amely lehetővé teszi a transzláció inicializálását akár az mRNS közepén, mivel odavonzza az eukarióta riboszómát [96]. Méretét tekintve sokkal nagyobb (több száz nukleotid), mint a 2A szekvencia, erről azonban nem szintetizálódik fehérje, csupán a legvégén található start kodonról és az azt követő szekvenciáról történő transzláció megindítása a feladata. Hatékonysága nagyon lecsökken, amennyiben szekvenciáját nem rögtön az átírandó fehérje első metioninja követi [97], ezért csak egy restriktációs helyet építettünk ide (MfeI), amely egyben tartalmazza az ATG start kodonját az MdUTPáz szekvenciájának.

- **MdUTPáz (a dUTPáz mitokondriális izoformája)**

A mitokondriális dUTPáz szekvenciáját a ZFN felismerő helyeken módosítani kellett, a sejtmagi dUTPáz tervezésénél bemutatott módon (**12. ábra**). Az MdUTPáz C-terminálisára egy **V5 epitóp tag**-et iktattunk be, hogy a fehérje kifejeződését külön detektálhassuk a magi dUTPázétól. Ez az epitóp a majom vírus 5 (SV5) P és V fehérjéinek C-terminális szekvenciájából származik. A V5 epitóp elé egy rövid, 9 nukleotidból álló linker szakaszt is terveztünk, melynek glicin és prolin tartalma biztosítja a peptid hozzáférhetőségét a specifikus antitest molekulák számára.

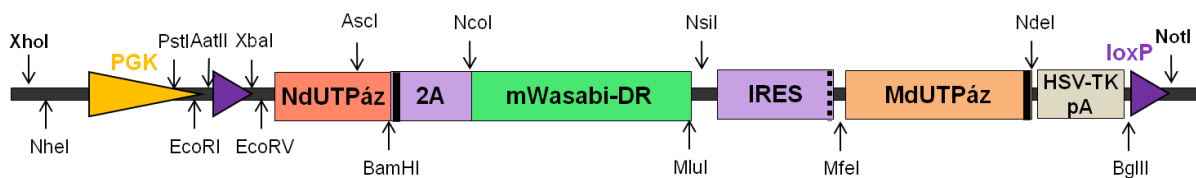
- **HSV-TK-pA poliadenilációs szignál**

A teljes kazetta mRNS-ének megfelelő életidejéhez és stabilitásához szükséges volt egy **poliadenilációs szignálszekvencia** kiválasztása is, amely kijelöli az eukarióta mRNS végét egy nukleáz komplex számára. A herpesz simplex vírus 1-es típusú (HSV) timidin kináz (TK) poliadenilációs szignálját választottuk [98]. A poliA előtt hosszú összekötő szekvenciát hagytunk, mely a pDsRed-Monomer-N1 (Clontech) plazmidjának (egy kereskedelmi forgalomban kapható jól működő emlős expressziós vektor) poliA szignálját megelőző szakasszal egyezik meg.

- **restriktációs hasítóhelyek**

A **15. ábrán** láthatóak a tervezett restriktációs enzim hasítóhelyek. Minden genetikai elem után terveztünk legalább egy restriktációs helyet, hogy a későbbiekben bármelyik alkotóelemet egyszerűen lecserélhessük, amennyiben az nem működik megfelelően. Például a PGK promóter köré több hasítóhelyet is betettünk, mivel nem voltunk biztosak abban, hogy ez a promóter elegendően erős fehérje expressziót fog-e biztosítani. A tervezés során

figyelembe vettük, hogy egy enzim csak egy helyen legyen képes elhasítani a szekvenciát, és a hipotetikus enzimpárok egy-egy elem kivágásához kompatibilisek legyenek szimultán emésztés esetén.

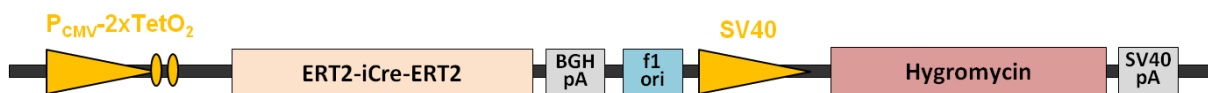


15. ábra

A menekítő kazetta a tervezett restrikciós hasítóhelyekkel együtt

3.2. A Cre rekombinázt expresszáló kazetta megtervezése

Az indukálható dUTPáz kiűtött sejtvonal megvalósításához szükséges egy Cre rekombinázt expresszáló kazetta integrálása is, amellyel tetszőleges időpontban megszüntethető az exogén dUTPáz forrás. A tamoxifen indukálható Cre rekombinázt expresszáló kazettát a 19-es kromoszóma másik alléljának AAVS1 helyére kíséreltük meg beépíteni specifikus ZFN párok segítségével. A tervezett konstrukció kb. 6000 bázispár hosszúságú sematikus képe a 16. ábrán látható.



16. ábra

A Cre-rekombinázt expresszáló konstrukció sematikus képe

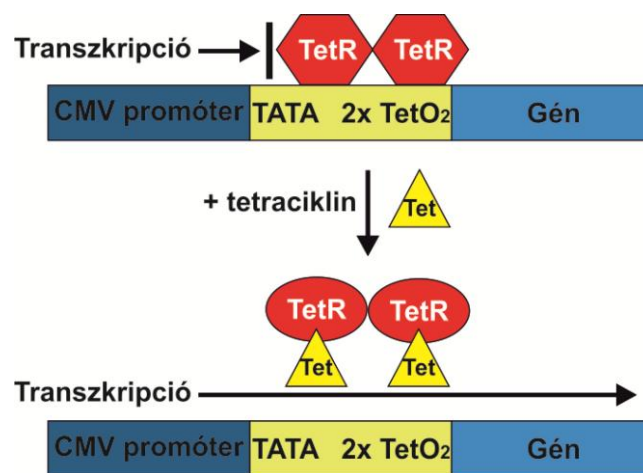
A kazetta legfontosabb elemei a tetraciklin függő promóter, a tamoxifen indukálható Cre-gén és a szelektálhatóságot biztosító, hygromycint kódoló szekvencia.

A továbbiakban szeretném bemutatni a Cre kazettát felépítő genetikai elemek tulajdonságait és kiválasztási szempontjait.

- **P_{CMV}-2xTetO₂ promóter**

A Cre rekombinázt kódoló kazetta meghajtásához az eukarióta expressziós vektorok körében gyakran használatos, az egyik legerősebb promótert választottuk, amely a humán citomegalovírusból (CMV) származik [86]. A Cre kazetta expressziójának szigorú

szabályozása rendkívül fontos, mivel ha a rendszer „szivárog”, azaz a Cre rendelkezik némi háttéraktivitással, akkor kivághatja a loxP helyek között elhelyezkedő exogén dUTPázokat, ami az endogén KO után, letális fenotípust is eredményezhet. Továbbá a megfigyelések szerint az aktív Cre enzim toxikus hatású volt néhány esetben [99, 100], így szükséges lehet a Cre rekombinááz expressziós szintjének további modulálása. Ezen okokból kiindulva egy tetraciklin regulálható rendszert terveztünk, amely lehetővé teszi a Cre rekombinááz expressziójának teljes gátlását szükség esetén. Az ún. **Tet-On** rendszer az *E. coli*-ból származó **TetR-t (tetraciklin represszor)** használja ki, amely a DNS TetO operátor szekvenciájához képes kapcsolódni és meggátolni a mögötte cisz helyzetben lévő gén átírását. A Tet-On rendszerben ismétlődő TetO szekvenciákat helyeztek egy CMV promóter mögé és az átírandó gén elé, így kialakítván a TRE (tetraciklinre reagáló elem) szekvenciát. Ha **tetraciklin** antibiotikumot adunk a rendszerhez, az a TetR-hez köt, így a represszor nem tud a DNS-hez kapcsolódni, tehát megindulhat a transzkripció (**17. ábra**).



17. ábra

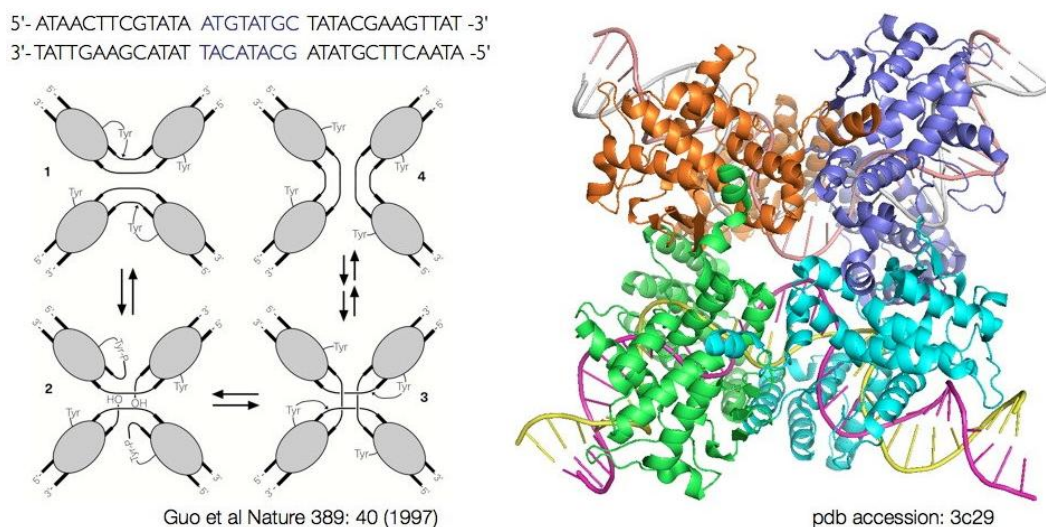
Tetraciklin indukálta expressziós rendszer

Két homodimer TetR represszor kapcsolódik a TetO₂ operátor szekvenciához meggátolva a transzkripció iniciációját. Tetraciklin (Tet) hatására azonban a TetR elengedi az operátort, ami derepresszálja a promótert és megindul a génátírás.

- **ERT2-iCre-ERT2 (röviden CRE2ERT2)**

Az ún. homing endonukleázok *in vivo* is képesek specifikus módon módosítani a célszervezet genomiális DNS-sét. Ellentétben a bakteriális restrikciós enzimekkel, ezek hosszú (14-44 nukleotidos) DNS-szakaszokat ismernek fel, és nagyon specifikus folyamatokban játszanak szerepet. A Cre DNS-rekombinááz (P1 bakteriofág helyspecifikus rekombinááz enzime (**18. ábra**)) meghatározott DNS-szekvenciához, a loxP hely (pallindrom-

core-pallindrom szerkezetű, 34 bp) „core” régiójához kötődik, és a pallindrom szakaszt vágja ki, rekombinálja vagy fordítja meg. A Cre enzim expressziójának időzítésével, a loxP-szekvenciával „körbevett” gének a kívánt időszakban kivághatók.

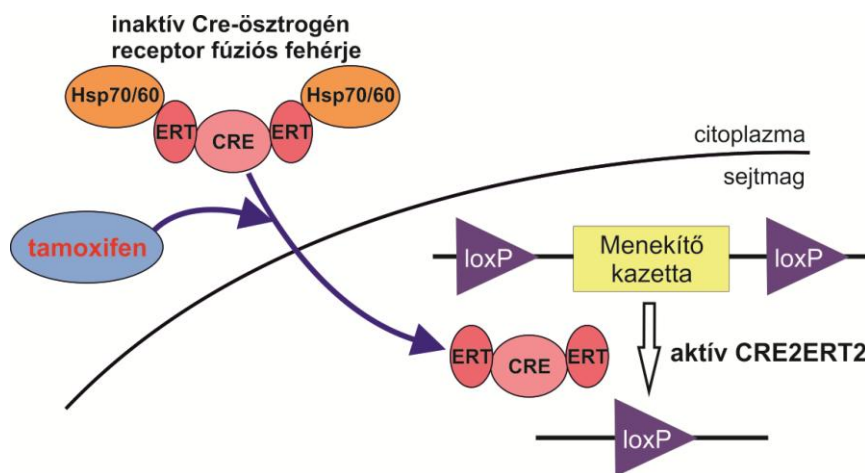


18. ábra

A P1 bakteriofág helyspecifikus Cre rekombináza enzime

A Cre rekombináza tetramerizációra képes saját DNS-ligáz aktivitása révén.

A CRE2ERT2 rendszer a Cre enzim tamoxifen által szabályozható formája, melynek szinte nem detektálható a háttéraktivitása, ugyanakkor *in vivo* nagyon magas hatékonysággal indukálható. A fehérje a humán ösztrogén receptor módosított ligandum-kötő doménjének és a Cre rekombináznak fúziójából jött létre [101]. Az elnevezés az enzim felépítésére utal: humán kodon optimalizált Cre (iCRE) szekvenciából és a humán ösztrogén (ER) receptor két módosított ligandum-kötő doménjéből (ERT2) áll. A módosított ERT domén nem képes kellő hatékonysággal kötni az ösztrogént, csak annak természetes körülmények között nem fellelhető formáját, a 4-hidroxitamoxifent (4-OHT). A fúzió megakadályozza az enzimet endonukleáz hatásának kifejtésében, mivel elválasztja szubsztrátjától, azaz a két ERT domén a fehérjét kint tartja a citoplazmában (Hsp70 fehérjéhez kapcsolja a Cre rekombinázt). 4-OHT kezelés hatására a citoplazmás kipányvázás megszűnik az ERT doménekben lejátszódó konformáció változás következtében, így a Cre rekombináza képes bejutni a sejtmagba, ahol kapcsolódik a DNS-hez és beindítja a loxP rekombinációt (**19. ábra**) [102, 103].



19. ábra

Tamoxifen indukálható Cre rekombinázt ösztrogén-receptor fúziós fehérje

A tamoxifen hatására a Cre-rekombinázt ösztrogén-receptor fúzió felbomlik, az aktív Cre bejut a sejtmagba és képes kivágni a loxP helyek között lévő menekítő kazettánkat.

- **BGH pA poliadenilációs szignál**

A Cre rekombinázt kódoló gén után a szarvasmarha növekedési hormon (BGH) poliadenilációs szignálját tettük be, amely kijelöli a fehérje expresszió végét az eukarióta mRNS-en, és biztosítja annak megfelelő további processzálasát.

- **SV40 promóter**

A hygromycin rezisztencia gént meghajtó promóternek a majom vírus 40 (SV40) poliomavírusból származó promótert választottuk ki, amely a CMV-nél valamelyest alacsonyabb expressziót biztosít [86].

- **hygromycin rezisztencia gén**

Az integrációs esemény után elengedhetetlen feladat a pozitív sejtek minél gyorsabb és hatékonyabb kiválogatása. A Cre rekombinázt expresszáló sejtek szelekciójához hygromycin B antibiotikum rezisztencia gént terveztünk a Cre kazettára. A hygromycin B antibiotikumot a *Streptomyces hygroscopicus* termeli. Ez az aminoglikozid termék képes elpusztítani baktériumokat, gombákat és eukarióta sejteket egyaránt, a fehérjeszintézisük gátlásával [104].

- **SV40 pA poliadenilációs szignál**

A hygromycin rezisztencia géntranszkripció terminációjának aktiválásához az SV40 poliadenilációs szignálját választottuk [105].

4. Anyagok és módszerek

4.1. Az emlős HCT116 és HCT116+Chr3 sejtek bemutatása

4.1.1. *Emlős HCT116 és HCT116 +Chr3 sejtek fenntartása és az MMR-deficiencia ellenőrzése*

Az általunk használt **HCT116** sejtvonal egy hibáspár javítás (MMR) deficiens sejtvonal, mivel biallélikusan hiányzik belőle a hMLH1 nevű fehérjét kódoló gén, mert hármas kromoszómájának egy részletét elvesztette. A HCT116 humán vastagbélrák eredetű, jól kezelhető sejtvonal, melyből számos izogén sejtvonal elérhető. Aktív hibáspár javítórendszerrel rendelkező sejtvonal az ún. HCT116+Chr3 (MMR-proficiens), melyet egy plusz 3-as kromoszóma beültetésével hoztak létre fibroblaszt sejtvonal segítségével [106, 107]. Az MMR-deficiens HCT116 sejtvonalban a hibáspárok kijavítása a báziskivágó javító mechanizmus (BER) elemeire hárul.

A sejteket szérumos (10 % fetal bovine serum (FBS)) médiumban (McCoy's 5A) tartottuk, 50 µg/ml penicillinnel és 50 µg/ml sztreptomocinnel kiegészítve; 37 °C-on, 5 %-os CO₂ tartalom mellett termosztálva. A HCT116+Chr3 vonal esetén 400 µg/ml G418 antibiotikummal biztosítottuk az utólagosan visszaépített hármas kromoszóma fentartását.

A kísérletekhez használt HCT116 (MMR-deficiens) és HCT116+Chr3 (MMR-proficiens) sejtvonalak stabil fenntartása mellett, meg kellett bizonyosodnunk arról, hogy valóban rendelkeznek-e aktív hibáspár javítórendszerrel. Immuncitokémia és konfokális mikroszkópia segítségével vizsgáltuk meg, hogy a HCT116 sejttípusok expresszálnak-e hMLH1 fehérjét.

A sejteket 24 lyukú plétre, óraüvegekre tettük ki, majd 24 óra elteltével 4 %-os paraformaldehiddel (PFA PBS-ben, pH=7.4) fixáltuk őket, mely a fehérjék között keresztkötéseket létesítve befagyasztotta valamennyi sejtbeli folyamatot. 10 perces fixálás után izotóniás foszfát pufferrel (PBS) mostuk a mintákat, és 0,1 %-os Triton-X 100-zal permeabilizáltuk a sejtmembránt a későbbi immunfestéshez, majd 2 órás blokkolás következett. A blokkoló oldat összetétele: 5 % szérum (fetal goat serum (FGS)), 2 % BSA (albumin-bovine serum). A blokkolás célja, hogy a sejtben fehérje megkötésére alkalmas helyek, mind telítve legyenek a kísérlet szempontjából valamilyen inert fehérjével, hogy ezen helyek később ne ellenanyagot kössenek meg.

Ezután a hMLH1 fehérjére specifikus elsődleges ellenanyagban (blokkoló oldatban kihígítva, 1:400, Abcam) 2 órán keresztül rázódtak a sejtek, majd mosási lépések következtek,

hogy eltávolítsuk a nem kötődő ellenanyagot. Egyszer PBS-ben, 10 percig PBTA-ban (1 % BSA, 0,05 % Triton-X 100, 0,02 % NaN_3 , PBS-ben), majd újra PBS-ben 15 percig mostuk a mintákat. A blokkolóban kihígított másodlagos ellenanyagban (1:1000, anti-egér Alexa 633, Molecular Probes) 1 órán keresztül, sötétben rázódtak a sejtek. PBS-sel történő mosás (2x 10 perc) után DAPI festékkel (1 $\mu\text{g/ml}$) megfestettük a DNS-t tartalmazó sejtmagot. Végül a mintákat FluorSave (Calbiochem) beágyazóval fedtük és konfokális mikroszkóppal hasonlítottuk össze. Munkánkhoz az alábbi képen látható Zeiss 710-es lézerszkennelő mikroszkópot (LSCM) használtuk (20. ábra).



20. ábra

Zeiss LSCM 710-es lézerszkennelő mikroszkóp

A konfokális mikroszkópia számos rendkívüli lehetőséget kínál a konvencionális fluoreszcens mikroszkópián felül. Előnyös tulajdonsága, hogy kvázi pontszerű gerjesztéssel dolgozik, valamint, hogy a fókuszon kívülről érkező fénysugarakat képes kiküszöbölni.

4.1.2. A ZFN-ek dUTPáz felismerőhelyének és az AAVS1 hely ellenőrzése PCR-rel

Az endogén dUTPáz kiütéséhez használt ZFN-ek által felismert régió intaktságának ellenőrzése elengedhetetlen a sikeres ZFN hasításhoz. A HCT116 és HCT116+Chr3 sejtvonalak 15-ös kromoszómáján lévő ZFN dUTPáz felismerőhelyet polimeráz láncreakcióval (PCR-rel) vizsgáltuk meg. A reakcióhoz először genomi DNS-t nyertünk ki a sejtekből MasterPureTM DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies) segítségével. A reakcióhoz a Finnzymes nagy pontossággal működő Phusion Hot Start DNS polimerázát és Phusion High Fidelity pufferét, valamint a Fermentas cég 0,2 mM dNTP mix nukleotid keverékét használtuk. A primereket 0,25 μM -os koncentrációban adtuk az 100 μl -es

reakcióelegyhez, amely 600 ng DNS templátot tartalmazott. A következő primereket (Eurofins Operon MWG) használtuk:

Forward primer: 5'- GCCTTTCTGCCCTTTCACGCTG - 3'

Reverz primer: 5'- AGGAGGGCGTCACAGCTCCATTG - 3'

A loxP-felismerőhelyekkel körülvett menekítő genetikai elemet és az indukálható Cre rekombinázt, helyspecifikusan, szintén cink-ujj nukleázokkal kívánjuk a sejtek genomjába integrálni, azok AAVS1 lókuszába, a 19-es kromoszómába. A sikeres integráláshoz meg kellett győződnünk a ZFN-ek által felismert AAVS1 genomi régió intakt mivoltáról is. A PCR-et MyTaq polimerázzal raktuk össze, a következő primerekkel (Eurofins Operon MWG):

Forward primer: 5'- GCCACCTCTCCATCCTCTTG - 3'

Reverz primer: 5'- ACACCTAGGACGCACCATTC - 3'

4.2. Az indukálható Cre rekombinázt expresszáló kazetta klónozása

A tamoxifen indukálható CMV-Cre2ERT2 kazettát egy megfelelő homológia karokkal rendelkező integráló vektorba (Donor vektor) klónoztuk úgy, hogy a promóterét közben lecseréltük egy Tet represszálható CMV promóterre. Először a tetraciklin regulálható CMV promótert kellett átemelnünk a pcDNA4-TO-MycHisA plazmidból a pZDonor vektorba, majd a létrehozott CMV_{TET}-pZDonor konstrukcióba klónoztuk a Cre rekombinázt génjét a pcDNA3.1-CRE2ERT2-Hygro plazmidból (hygromycin szelekciós lehetőséggel), melyet Jean-Paul Herman professzortól kaptunk [102]. A következőkben szeretném ismertetni a klónozások egyes lépéseit.

4.2.1. Tetraciklin regulálható promóter klónozása a Donor vektorba

4.2.1.1. Az inszert felszaporítása polimeráz láncreakcióval (PCR) és ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel

A CMV_{TET} promótert a pcDNA4-TO-MycHisA plazmidról polimeráz láncreakcióval (PCR) szaporítottuk fel. A reakcióhoz Phusion Hot Start DNS polimerázt, Phusion High Fidelity puffert, 0,2 mM mennyiségű dNTP keverékét és 55 ng DNS templátot használtunk 100 µl-es reakcióvégtérfogatban. A restriktációs hasítóhelyeket hordozó primereket úgy terveztük meg, hogy 25-30 nukleotid hosszúak legyenek, és a hasítóhelyek a génben kitapadó

rész (alábbi primereken zölddel jelölve) után következzenek. A PCR-hez az alábbi primereket (Eurofins Operon MWG) használtuk 0,25 µM-os koncentrációban:

Forward primer: 5' - ACT AAGCTT GTACGGGCCAGATATACGCG-3'
HindIII

Reverz primer: 5' - CGATCCAGCCTCCGGACT GAATTC TTGG-3'
EcoRI-HF

A reakciót Applied Biosystems Gene AMP 2700 típusú PCR készülékben végeztük.

Agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, hogy keletkeztek-e megfelelő molekulaméretű PCR termékek. Az agaróz gélelektroforézis a DNS fragmensek elválasztására, identifikálására és tisztítására általánosan elterjedt módszer. Az elektroforézis során a molekulákat elektromos térben futtatjuk, melynek hatására töltésüknek, méretüknek és konformációjuknak megfelelően válnak szét. A DNS a foszfát csoportok miatt negatív töltéssel rendelkezik, így a pozitív pólus felé vándorol.

Az alkalmazott 0,75 %-os agaróz gél összetétele: 0,15 g agaróz TAE pufferben (40 mM Tris-acetát, 0,001 M EDTA, pH=8.0) melegítéssel feloldva. A gél GelRed (Biotium) festékkel festettük meg, mely interkalálódik a DNS szálai közé és UV megvilágításra a látható tartományba emittál. A DNS sávok molekulamérete a különböző ismert molekulatömegű DNS fragmensek keverékét tartalmazó DNS létra (Fermentas) segítségével határozható meg. A nagyobb molekulák lassabban, a kisebbek gyorsabban haladnak az agaróz gélben a 100 V-os futtató feszültség mellett.

4.2.1.2. Restriktációs emésztés és ligálás

A PCR reakcióval felszaporított DNS terméket gélextrakcióval kipucoltuk, hogy megszabaduljunk a PCR során megmaradt nukleotidoktól, primerektől, polimeráztól, sóktól.

A felszaporított CMV_{TET} promótert kódoló DNS szakaszokat és a használni kívánt pZDonor expressziós vektort HindIII és EcoRI-HF (New England Biolabs (NEB)) restriktációs endonukleázokkal kezeltük. A reakcióhoz a NEB 2-es pufferét használtuk. Az enzimekkel 10 órán keresztül, 37 °C-on emésztettük az összes inszertet és a célvektort (3 µg pZDonor vektor) 50-50 µl végtérfogatban, majd 20 perces hőinaktiváció következett 65 °C-on.

Az inszert DNS fragmentumok végéről levágott rövid oligonukleotidoktól a Qiagen PCR Cleanup Kit segítségével szabadultunk meg (a gyártó utasításait követve). A cirkuláris, emésztetlen vektorokat agaróz gélelektroforézissel választottuk el a linearizált, emésztett plazmidoktól. A megfelelő gélcsávokat kivágtuk és QIAquick Gel Extraction Kit-tel (Qiagen)

tisztítottuk a gyártó útmutatása szerint. Az ilyen módon előállított plazmid és inszert DNS fragmentumok egymással kompatibilis ragadós véggel rendelkeztek. A pucolt DNS mintákat - 80°C-on tároltuk az emésztett DNS végek instabilitása miatt. Az emésztett és pucolt inszertek és vektor integritását agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük ligálás előtt.

Mivel a két hasítóhely nagyon közel van egymáshoz a vektorban, ezért lehetséges, hogy csak az egyik enzim emésztett, és így ligáláskor önzáródó vektort kapnánk. Emiatt Arctic Phosphatase (NEB) enzimmel kezeltük az összes vektort, ami leemészteti a DNS 5' végén lévő foszfátot, így megelőzve a vektor önzáródását. Az enzim pufferében 35 percig inkubáltuk a vektort 37 °C-on, majd 5 percig 65 °C-on hőinaktiváltuk. Ezután PCR Cleanup Kit segítségével újra megtisztítottuk, hogy biztosan ne maradjon aktív enzim.

Az inszertet T4 DNS ligázzal (NEB) integráltuk a pZDonor plazmidba. A vektort a hozzá képest feleslegben lévő inszerttel (legalább hatszoros moláris feleslegben alkalmazva) együtt öt percig 70 °C-on előinkubáltuk, majd két percre 0 °C-ra hűtöttük, hogy garantáljuk a kompatibilis ragadós végek helyes összetapadását, ezt követte a ligáz puffer és a ligáz bemérése. A ligálás 16 órán keresztül, 16 °C-on zajlott T4 DNS ligáz pufferben 10 µl végtérfogóban.

4.2.1.3. Kompetens sejtek előállítása és transzformáció

XL1-Blue kompetens sejteket használtunk a plazmidligátumok felszaporítására. Először kémiai transzformáláshoz kompetenssé kellett tenni a sejteket, hogy a baktériumok alkalmasak legyenek hatékony plazmid felvételre.

E. coli XL1-Blue overnight (16 órán át) 37 °C-on növesztett előkultúrából indultunk ki, amely 12,5 µg/ml tetraciklin antibiotikumot tartalmazott. A sejt kultúrát 50 ml Luria-Bertani (LB) tápoldatban (10 g tripton, 5 g élesztő kivonat, 10 g NaCl, pH=7.0) szaporítottuk tovább tetraciklin jelenlétében $A_{600}=0,4$ -es optikai denzitás eléréséig, melyet spektrofotométerrel követtem 600 nm-es hullámhosszon. Az inkubáció után 4 °C-on 1380 g-vel 20 percig centrifugáltuk a sejteket. A felülúszó leöntése után a sejtsapadékokat 10 ml TFB I. oldattal (100 mM RbCl, 50 mM MnCl, 30 mM K-acetát, 10 mM CaCl₂, 15 % glicerin, pH=5.8) visszaszuszpendáltuk, a szuszpenziót 35 percig állni hagytuk jégen, majd újra lecentrifugáltuk. Ezután a sejtsapadékokat 1 ml TFB II. oldattal (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % glicerin, pH=6.8) felsuszpendáltuk és 30 percig jégen állni hagytuk.

A transzformálást 100 µl kompetens sejttel végeztük, 14,23 mM β-merkaptóetanolt adtunk hozzá és 5 percig jégen állni hagytuk. Ezután hozzáadtunk 10 µl-t a transzformálni

kívánt ligáz reakcióelegyből és 30 percig jégen hagytuk. Hőshockot alkalmazva (1,5 perc 42 °C, majd 1,5 perc 0 °C) értük el, hogy a kompetenssé vált baktériumok sejtfalában bekövetkezett szerkezeti és permeabilitási változások következtében a sejtek ténylegesen felvegyék a DNS-t. A hőshock után 200 µl friss antibiotikum mentes LB-t adtunk a baktérium szuszpenzióhoz és 37 °C-on egy órán keresztül inkubáltuk. A sejteket megfelelő antibiotikumot (XL1-Blue tetraciklin, pZDonor karbenicillin rezisztenciát biztosít) tartalmazó plétre szélesztettük, hogy csak a plazmiddal transzformált sejtek nőjenek ki a szilárd táptalajon.

4.2.1.4. Tesztemésztés a CMV_{TET}-pZDonor kolóniákon

A klónozás sikerességéről a kolóniák tesztemésztésével és szekvenálással bizonyosodtunk meg. Három kolóniából overnight előkultúrát készítettünk 5 ml LB-ben, majd a plazmidot Qiagen MiniPrep Kit segítségével tisztítottuk meg, és restriktációs enzimekkel megemésztettük. A reakció során HindIII, illetve EcoRI-HF enzimekkel 10 órán keresztül, 37 °C-on emésztettük a termékeket (1,2 µg) 50-50 µl végtérfogatban, majd 20 perces hőinaktiváció következett 65 °C-on a cég 2-es pufferében. A restriktációs emésztést agaróz gélen ellenőriztük, mely szerint az egyik klón (1-es számú) esetében sikeresnek bizonyult a klónozás. A mintát szekvenálásra küldtük, és a szekvenálás eredménye alapján a korrekt szekvenciát tartalmazó plazmidot (CMV_{TET}-pZDonor) használtuk a további klónozáshoz.

4.2.2. A CRE2ERT2 szekvencia beemelése a CMV_{TET}-pZDonor-ba

4.2.2.1. A CMV_{TET}-pZDonor vektor és a CRE2ERT2 inszert restriktációs emésztése

A Cre rekombinázt és a hygromicin rezisztenciát kódoló szekvencia beillesztése a megfelelő promótert tartalmazó Donor vektorba nem PCR-rel történt, hanem csupán restriktációs endonukleáz emésztéseket alkalmaztunk („copy-paste” módszer). Az inszert pcDNA3.1-CRE2ERT2-HygroI plazmidot (4 µg) SalI-HF (NEB) enzimmal emésztettük meg 10 órán át, 37 °C-os hőmérsékleten, NEB 4-es pufferben, 50 µl-es végtérfogatban. A CMV_{TET}-pZDonor vektort SalI enzimmal nem emésztettük meg, mert a regulálható promóter tartalmazott egy ilyen restriktációs hasítóhelyet. Ehelyett XhoI (NEB) endonukleázzal inkubáltuk a vektort (2 µg). Mivel az XhoI kompatibilis végeket képez a SalI hellyel, és így össze lehet ligálni a két különböző enzimmal emésztett DNS fragmenseket. A reakcióhoz a

NEB 4-es pufferét használtuk, és az elegyhez bovine-albumin szérumot (BSA) (1 mg/ml) is adtunk. Mindkét enzim inaktiválása 20 perc alatt 65 °C-on történt meg.

4.2.2.2. Ligálás és transzformálás

Az egyszeres restrikciós emésztés után agaróz gélen megfuttattuk a mintákat, a megfelelő gélcsávokat kivágtuk és QIAquick Gel Extraction Kit-tel tisztítottuk a gyártó útmutatása szerint. Az ilyen módon előállított plazmid és inszert DNS fragmentumok egymással kompatibilis ragadós véggel rendelkeztek. Az emésztett, pucolt inszert és vektor integritását agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük ligálás előtt.

Az inszertet Arctic Phosphatase (NEB) enzimmel kezeltük, ami leemészteti a DNS 5' végén lévő foszfátot, így megelőzve az önzáródást. Az enzim pufferében 1 órán keresztül inkubáltuk a vektort 37 °C-on, majd 10 percig 65 °C-on hőinaktiváltuk. Ezután QIAquick Gel Extraction Kit-tel gélből kipucoltuk, hogy biztosan ne maradjon aktív enzim.

Az inszertet T4 DNS ligázzal (NEB) integráltuk a CMV_{TET}-pZDonor plazmidba. A ligálás 100 ng inszerttel és 100 ng vektorral (a hasonló arányokat az inszert és vektor közel azonos mérete indokolta), 16 órán keresztül, 16 °C-on zajlott T4 DNS ligáz pufferben 20 µl végtérfogatban. A plazmidligátum teljes térfogatát XL1-Blue kompetens sejtekbe transzformáltuk a már ismertett protokoll szerint, öt kolónia nőtt fel az antibiotikumot tartalmazó pléten.

4.2.2.3. A kolóniák tesztelése kolónia PCR-rel és restrikciós emésztéssel

A klónozás sikerességéről kolónia PCR-teszteléssel, restrikciós emésztéssel és szekvenálással bizonyosodtunk meg, mivel ezzel a módszerrel két eltérő orientációban is beépülhet az inszert, amiből nekünk csak az egyik megfelelő. A PCR reakcióelegy forward és reverz primereket (0,2 µM), MyTaq Red mixet (Sigma) és nukleázmentes vizet tartalmazott, amibe belekevertük az adott kolóniához érintett pipettahegy végét. A forward primert a CMV promóter szekvenciára, míg a reverz primert a Cre szekvenciára terveztük. Mivel a CRE2ERT2 két orientációban is beépülhet a CMV_{TET}-pZDonor-ba, két reverz primert terveztünk, amiből következtethetünk az orientációra.

Forward primer: 5' - CATCAATGGGCGTGGATAG - 3'

Reverz primer: 5' - CATCTTCCAGGTGTGTTTCAG - 3' (megfelelő irányú beépülés)

5'-TCGATGAGCTGATGCTTTG-3' (fordított irányú beépülés)

Több kolóniából overnight előkultúrát készítettünk 5 ml LB-ben, majd a plazmidokat Qiagen MiniPrep Kit segítségével tisztítottuk meg, és restrikciós enzimekkel megemésztettük. NdeI vagy NotI-HF enzimekkel 1 órán keresztül, 37 °C-on emésztettük a plazmidokat (0,4 µg) 20-20 µl végtérfigatban, majd 20 perces hőinaktiváció következett 65 °C-on a cég 4-es pufferében.

A kolónia PCR és a restrikciós emésztés eredményeit agaróz gélen ellenőriztük és az ígéretes klónokat szekvenálásra küldtük. A szekvenálás eredménye alapján a korrekt szekvenciát tartalmazó plazmidot (CMV_{TET}-CRE2ERT2-pZDonor) használtuk a további kísérletekhez.

4.3. CMV_{TET}-CRE2ERT2-pZDonor konstrukció tesztelése sejtekben

4.3.1. *Tranziens transzfekcióval*

A létrehozott CMV_{TET}-CRE2ERT2-pZDonor konstrukciót az emlős HCT116 sejtekbe transzfektáltuk, hogy megvizsgáljuk expresszáldódik-e a kazetta, és tamoxifen hatására hogyan változik a Cre rekombinááz intracellulláris lokalizációja. A transzfekciót 24 lyukú pléten, óraüvegeken kivitelettük 500 µl-nyi tápoldatban. A megfelelő számú sejtet (70 %-os konfluencia) a transzfekciót megelőző napon raktuk ki az óraüveggel ellátott plétekbe. A transzfekciót ExtremeGene-HP transzfekciós reagenssel (Roche) végeztük a gyártó által javasolt protokollt követve (maximum 600 ng DNS-t használva lyukanként).

A sejteken 24 óra elteltével tápot cseréltünk, és **4-hidroxitamoxifennel** (4-OHT) kezeltük őket 100 nM-os koncentrációban, 2,5 órán keresztül. Ezután 4 %-os paraformaldehiddel (PFA PBS-ben, pH=7.4) fixáltuk őket 10 percig, utána izotóniás foszfát pufferrel (PBS) mostuk a mintákat, és 0,1 %-os Triton-X 100-zal permeabilizáltuk a sejtmembránt a későbbi magfestéshez, majd 2 órás blokkolás következett. A blokkoló oldat összetétele megegyezett a hMLH1 festésnél ismertetett oldattal. Ezután a Cre rekombinááz fehérjére specifikus, egér, monoklonális (Millipore) elsődleges ellenanyagban (blokkoló oldatban kihígítva, 1:2000) 2 órán keresztül rázódtak a sejtek, majd mosási lépések következtek. Egyszer PBS-ben, 10 percig PBTA-ban, majd újra PBS-ben 15 percig mostuk a mintákat. A blokkolóban kihígított másodlagos ellenanyagban (1:1000, anti-egér Alexa 488, Molecular Probes) 1 órán keresztül, sötétben rázódtak a sejtek. PBS-sel történő mosás után DAPI festéssel (1 µg/ml) megfestettük a DNS-t tartalmazó sejtmagot. A fedőlemez

tárgylemezre való ragasztásához FluorSave beágyazószert (Calbiochem) használtunk. A mintákat konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

4.3.2. Funkcionális tesztelés loxP-GFP-loxP ko-transzfekcióval

Emlős HCT116 sejteket tranziensen ko-transzfectáltunk a CMV_{TET}-CRE2ERT2-pzDonor konstrukciónkkal és egy loxP szekvenciákkal körbevett GFP-t (loxP-GFP-loxP) tartalmazó plazmiddal (amit Szűcs Dávid bocsátott rendelkezésünkre), hogy megvizsgáljuk, az expresszálandó Cre rekombináza képes-e betölteni funkcióját. A tranziens transzfekciónál ismertetett körülményeket és fixálási eljárást alkalmaztuk, azzal a változtatással, hogy most 200 nM 4-OHT-vel kezeltük a ko-transzfectált sejteket. Kontrollként tamoxifennel nem kezelt, ko-transzfectált sejteket is immunfestettünk.

4.3.3. A Cre rekombináza represszálhatóságának tesztelése TetR ko-transzfekcióval

A Cre kazetta expressziójának szigorú szabályozásához egy **tetraciklin** regulálható rendszert terveztünk Tet represszálható CMV promóter beépítésével. Ez a rendszer lehetővé teszi a Cre rekombináza expressziójának teljes gátlását, amennyiben az esetleges Cre háttéraktivitást el kell nyomni vagy a magas szintű Cre expresszió toxikusnak bizonyul a sejtek számára. Tranziensen ko-transzfectáltunk HCT116 sejteket a CMV_{TET}-CRE2ERT2-pzDonor konstrukciónkkal és TetR represszort expresszáló vektorral (pcDNA6/TR, Invitrogen), hogy megvizsgálhassuk, működik-e a tetraciklin regulálható represszió exogén TetR forrásból. A ko-transzfekció után 1 µg/ml tetraciklinnel kezeltük a sejteket 24 h-ig, amely megköti a represszort és átíródhat a Cre kazetta (a kontroll sejtekhez nem lett tetraciklin adva). A tetraciklines derepresszió után 200 nM 4-OHT-vel is kezeltük a sejteket, melynek hatására a Cre rekombináza a sejtmagba áramlik.

4.4. A dUTPázokat kódoló menekítő kazetta tesztelése

Egy olyan menekítő kazettát terveztünk, mely a dUTPáz sejtmagi és mitokondriális izoformájának expresszióját egyaránt exogén módon biztosítja, és egy fluoreszcens fehérje markert is hordoz a konstrukció detektálásához. A tervezett körülbelül 3900 bázispár hosszú menekítő kazettát (AAVS1 inszert) pBluescript SK(+) szubklónozó vektorban kaptuk meg a

Genscript cégtől. A menekítő kazettát Xho1 és Not1 restrikciós endonukleázokkal emeltük át a pZDonor expressziós vektor klónozó régiójába (MCS: Multi Cloning Site) (ennek menete megegyezik a korábban ismertetett klónozási munkáinknál leírtakkal). Miután meggyőződünk a klónozás sikeréről PCR-rel és szekvenálással, megkezdhattuk az AAVS1-pZDonor menekítő konstrukció tesztelését élő sejteken.

4.4.1. Az exogén dUTPázok expressziójának és lokalizációjának vizsgálata tranziens transzfekcióval

A menekítő AAVS1-pZDonor konstrukcióval tranziensen transzfektáltunk HCT116 sejteket, hogy megvizsgáljuk a kazetta transzfekciós hatékonyságát és expresszióját, majd a dUTPázok lokalizációját. A menekítő kazetta destabilizált mWasabi fluoreszcens riporter fehérjét kódol, ami lehetővé teszi a kazetta integrálódásának és expressziójának gyors detektálhatóságát. A transzfekciós és fixálási eljárás a Cre rekombináz transzfekciójánál ismertett módon történt. A sejtmagot DAPI festéssel tettük láthatóvá.

Az exogén dUTPázokat immunfestéssel tettük láthatóvá. A sejtmagba lokalizálódó exogén dUTPáz (NdUTPáz) detektálásához **AU1 epitóp tag**-et, a mitokondriális izoforma (MdUTPáz) **V5 epitóp tag**-et iktattunk be a fehérjék C-terminálisára, hogy a dUTPázok kifejeződését külön-külön detektálhassuk. A Cre rekombináz immunfestésénél ismertetett eljárást alkalmaztuk, csak az ellenanyagok különböztek. Elsődleges ellenanyagként monoklonális egér anti-V5 (blokkoló oldatban kihígítva, 1:1000) és nyúl anti-AU1 (1:500, NovusBio) ellenanyagot használtunk. Az alkalmazott másodlagos ellenanyagok pedig a következők voltak: anti-egér Alexa 546 (1:1000) és anti-nyúl Alexa 633 (1:1000) (Molecular Probes). A sejtmagot DAPI-val festettük meg.

4.4.2. A destabilizált Wasabi fluoreszcens riporter fehérje féléletidejének tesztelése

Egy olyan fluoreszcens riporter fehérjét terveztünk a menekítő kazettára, amelynek expressziója detektálható, ugyanakkor a riporter fehérje szintje gyorsan lecsökken a sejtben, amikor a menekítő kazettát kiütjük. Ehhez egy destabilizáló szekvenciát (PEST szekvencia) terveztünk az mWasabi C-terminálisára, amely a fluoreszcens fehérje féléletidejét jelentősen lecsökkenti. Az előkísérletek során meg szeretnénk vizsgálni, hogy a fluoreszcens

mWasabi fehérje valóban destabilizált, azaz alacsony féléletidővel rendelkezik-e. Ehhez HCT116 sejteket transzfektáltunk az AAVS1-pZDonor menekítő vektorunkkal, és megvizsgáltuk a Wasabi expressziós szintjének változását **cikloheximid** kezelés hatására. A cikloheximid az eukarióta fehérjeszintézis (elongáció) gátlásával működő antibiotikum, melyet a *Streptomyces griseus* baktérium termel. A sejtek transzfekciója után 21 órával 100 µg/ml cikloheximiddel kezeltük a sejteket 2, 4, illetve 5 órán keresztül. Ezután fixáltuk a mintákat, és konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk meg az mWasabi-DR expresszióját.

4.5. A menekítő rendszer sejtbe juttatásának tesztelése nukleofektálással

Az integrálandó exogén dUTPázokat (AAVS1-pZDonor), illetve a Cre rekombinázt (CMV_{TET}-CRE2ERT2-pZDonor) kódoló szakaszok plazmidon, míg az AAVS1 specifikus ZFN-ek mRNS formában álltak a rendelkezésünkre. Egyidejű sejtbe juttatásukat **nukleofektálással** kíséreltük meg, mely egy klasszikus kémiai transzfekción és elektroporáción alapuló, kombinált transzfekciós módszer.

Az alkalmazott Amaxa-Nukleofektor technológia (Lonza, <http://bio.lonza.com/cell-biology/transfection/technology/>) egy igen hatékony (nem-virális génbejuttatáson alapuló) módszer primer sejtek és nehezen transzfektálható sejtek esetén, mely ötvözi a kémiai transzfekciót az elektroporációval [108]. Képes a szubsztrátokat akár közvetlenül a sejtmagba vagy a citoplazmába juttatni, így nem függ a sejtek osztódásától a transzfekció sikere. Az optimális nukleofektálási körülmények a sejt típusától, és a bejuttatandó anyag mivoltától függenek. Kísérleteinkhez a **21. ábrán** látható 4D-Nucleofector™ System (Lonza) készüléket használtuk.



21. ábra

A tervezett génkonstrukciók és a ZFN mRNS-ek sejtbe juttatásához használt 4D-Nucleofector™

System (Lonza)

(<http://www.lonza.com/products-services/bio-research/transfection/nucleofector-devices/4d-nucleofector-system.aspx>)

4.5.1. HCT116 és HCT116+Chr3 sejtek transzfekciója a nukleofektor technológia optimalizálásával

Az fő kísérletek előtt meg kellett vizsgálnunk a HCT116 és HCT116+Chr3 sejtek transzfektálhatóságát nukleoporálással, beállítva az optimális nukleofektálási körülményeket. Először pDsRed kontroll plazmiddal nukleoporáltuk a sejteket három, különböző Nukleofektor (Amaxa) programot kipróbálva.

A transzfekcióra szánt HCT116 és HCT116+Chr3 sejt kultúrának a következő kritériumoknak kellett megfelelnie: a passzázsszáma legyen kisebb, mint 8 és a konfluenciája 85% körüli legyen. A sejteket tripszin-EDTA-s kezelés után centrifugálással (37 °C, 5 perc, 100 g) összegyűjtöttük, Bürker-kamrás sejtszámlálással megszámoltuk és szétosztottuk az egy transzfekcióhoz szükséges 2×10^5 sejtes adagokra. A sejteket 37 °C-on 5 percig 100 g fordulatszámmal centrifugáltuk, és a felülúszó alapos eltávolítása után 20 µl 96-well Nucleofector (Amaxa) oldatban vettük fel. Ehhez adtuk hozzá a 400 ng pDsRed vektort, és a transzfekciót kisméretű Nucleofector küvetében (Lonza), a 4D-Nucleofector (Lonza) készülék gyártó által javasolt FP-100-as, EH-100-as és DS-138-as programjával végeztük el. A porálás után a sejteket 10 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk, 1 ml kondicionált médiumban mostuk át 12 lyukú plétre, majd 24 óra elteltével médiumot cseréltünk, mellyel eltávolítottuk az elpusztult sejteket. A transzfekció hatékonyságát és a sejtek életképességét a pDsRed kontroll vektorral transzfektált mintákban fluoreszcens mikroszkóppal ellenőriztük.

4.5.2. DNS és mRNS próba ko-transzfekció nukleofektálással

Miután kiválasztottuk a legjobbnak bizonyult nukleofektálási programot (DS-138), kíváncsiak voltunk, hogy a kontroll DNS nukleoporálása mellett az mRNS ko-transzfekció is megfelelő hatékonysággal működik-e, mivel a fő kísérletekben a ZFN-eket mRNS formájában kell a sejtbe juttatnunk az integráló vektorokkal egyetemben. Ennek ellenőrzéséhez pDsRed plazmiddal és EGFP mRNS-sel egyidőben nukleoporáltunk HCT116 sejteket. A nukleofektálást az előzőekben ismertetett módon végeztük, de a sejteket 500 ng pDsRed DNS-t és 200 ng EGFP mRNS-t tartalmazó, 20 µl végtérfogatú Nucleofector (Amaxa) oldatban poráltuk. A pDsRed vektornak RNáz mentesnek kellett lennie, hogy mRNS-sel ko-transzfektálhassuk, ezért a proteináz K-val kezelt plazmidpreparációkat Qiagen Gel Extraction Kit-tel tisztítottuk tovább a porálás előtt.

4.5.3. Az indukálható menekítő rendszer sejtbe juttatása nukleoporálással

Az kontroll kísérletek után az integrálandó exogén dUTPázokat (AAVS1-pZDonor), illetve Cre rekombinázt (CMV_{TET}-CRE2ERT2-pZDonor) kódoló vektorokat is megkíséreltük a HCT116 sejtekbe juttatni. A nukleoporálás menete megegyezett az előzőekben leírtakkal, de az eredmények sajnos nem váltották be a hozzáfűzött reményeket. Számos körülményt kipróbáltunk a sejtek túlélésének javítására és a nukleoporálási hatékonyság növelésére, de a sejteket ($1,5 \times 10^6$ db) nagy mennyiségű (6,5 µg) DNS-sel porálva sem sikerült elfogadható mértékben transzfektálni ezzel az eljárással. A menekítő kazetta bejutását az mWasabi-DR fluoreszcens fehérje detektálásával, míg a Cre kazettát immunfestéssel (a CRE2ERT2 konstrukció tesztelésénél ismertetett protokoll szerint) tettük láthatóvá.

4.5.4. A menekítő rendszer sejtbe juttatása ötvözve a hagyományos eljárást a modern nukleofektor technológiával

Mivel a menekítő kazettát és Cre rekombinázt kódoló vektorok sejtbe juttatását nukleofektálással csak elenyésző hatékonysággal tudtuk biztosítani, egy új módszert kellett találnunk azok mRNS-sel történő transzfekciójához. Úgy döntöttünk, hogy a transzfekciót két lépésben próbáljuk meg: először a hagyományos transzfekciós reagenssel bejuttatjuk a plazmidokat, majd 24 óra elteltével nukleoporáljuk őket a ZFN mRNS-sel. A kidolgozott eljárást pDsRed vektorral és EGFP mRNS-sel is kipróbáltuk.

A HCT116 sejteket 3 µg pDsRed plazmiddal vagy 3 µg CMV_{TET}-CRE2ERT2-pZDonor vektorokkal transzfektáltuk ExtremeGene-HP transzfekciós reagenssel (Roche) (a gyártó által javasolt protokollt követve), 6 lyukú pléten, 2 ml tápoldatban. 24 óra elteltével következett a transzfektált sejtek nukleofektálása 200 ng EGFP mRNS-sel 20 µl-ben, a már bemutatott protokoll szerint. A sejtek fixálása után a Cre kazettát tartalmazó mintákat immunfestettük (a CRE2ERT2 konstrukció tesztelésénél ismertetett eljárás szerint) és konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk meg az újfajta transzfekciós módszer hatékonyságát.

4.6. Az indukálható menekítő rendszer integrálása az AAVS1 lókuszba ZFN mRNS nukleoporálásával

A fő kísérletet az általunk kifejlesztett, kétlépcsős transzfektálási eljárással végeztük el. Megkíséreltük az AAVS1-pZDonor és a CMV_{TET}-CRE2ERT2-pZDonor plazmidok sejtbe juttatását hagyományos kémiai transzfekcióval, majd a ZFN mRNS-t nukleoporáltuk a 4D-Nucleofector™ System (Lonza) készülékkel.

Először 9,5 µg AAVS1-pZDonor és 6,5 µg CMV_{TET}-CRE2ERT2-pZDonor plazmidokkal transzfektáltuk a HCT116 sejteket, 6 ml tápoldatban (T25-ös flakában), 80-90 %-os konfluencia szint mellett. A transzfekciót nagy tisztaságú, HP Plasmid Miniprep (Sigma) Kit-tel izolált plazmidokkal végeztük. A kémiai transzfektálás és a 24 óra elteltével alkalmazott nukleofektálás főbb lépései a korábban ismertetett módon történtek. A HCT116 sejt kultúra 3×10^6 számú sejtjét 0,6 µg/µl ZFN mRNS-sel (Sigma) poráltuk 100 µl-es végtérifogatban (nagy méretű küvettában), a nukleoporátor DS-138-as programjával. Ezután szobahőmérsékleten, 2 percig inkubáltuk a mintát és 500 µl meleg tápoldattal pipettáztuk át egy kis flakába, amely 600 µl FBS-t, 1,5 ml kondicionált és 3,9 ml teljes értékű tápoldatot tartalmazott. A flakát 6 óráig 37 °C-on inkubáltuk, majd 48 óráig 30 °C-on tartottuk, mivel ezen a hőmérsékleten a legstabilabb a ZFN fehérje, ezután került újra a 37 °C-os termosztátba.

Az első éles transzfekció, majd nukleoporálás sikerességét a Cre kazetta és a sejt magi dUTPáz (menekítő kazetta) immunfestésével, illetve az mWasabi-DR fluoreszcens fehérje jelének detektálásával vizsgáltuk meg konfokális mikroszkóppal.

4.7. A ZFN aktivitás kimutatása Cel-1 Assay-vel

Az indukálható menekítő rendszer ZFN-ekkel történő nukleoporálása után kíváncsiak voltunk, hogy a specifikus ZFN-ek képesek voltak-e elhasítani a DNS kettősszálát az AAVS1 lókuszban. A ZFN aktivitásának és a mutáns klónok jelenlétének kimutatására szolgál a **Cel-1 Assay**, melynek lépéseit a **22. ábra** mutatja be.

A Cel-1 Assay a ZFN-ek által érintett genomi DNS régió PCR-rel történő amplifikációjával kezdődik (**22. ábra, B., C.,**). A kísérletet 3 mintán végeztük el: ZFN mRNS-sel nukleoporált sejtek genomi DNS-éből, az integráló vektorok bejuttatása után kapott sejteink genomi DNS-éből és egy integrációs kontroll (Sigma) genomi DNS-sel is elvégeztük, melynek AAVS1 helyére rövid, 50 bp-os MCS lett integrálva ZFN-ek által. A

PCR-t Phusion HotStart Flex polimerázzal, annak pufferében, 200 μ M dNTP keverékkel kiegészítve, 200 ng genomi DNS-sel (MasterPure™ DNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies)) végeztük, a Sigma által biztosított primerekkel (0,5 μ M), melyek a következők voltak:

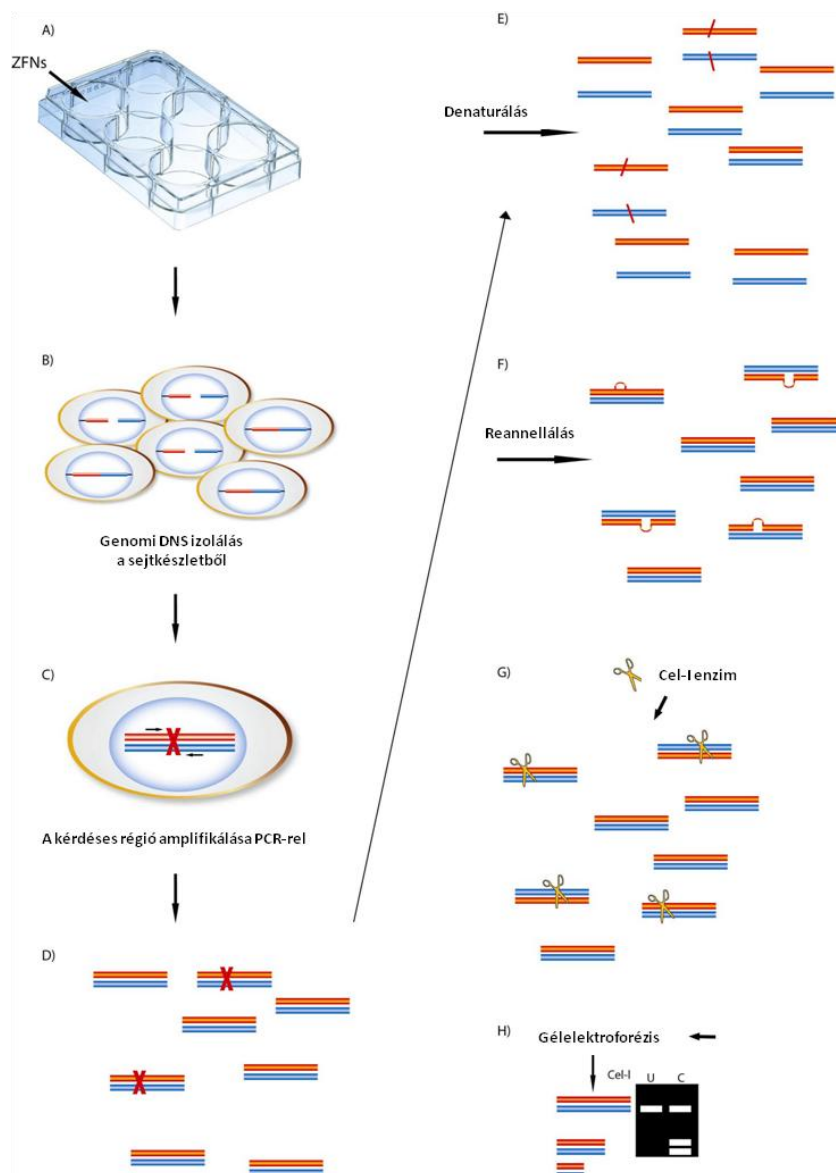
Forward primer: 5' - TTCGGGTCACCTCTCACTCC - 3'

Reverz primer: 5' - GGCTCCATCGTAAGCAAACC - 3'

A következő lépésben denaturáltuk, majd újra annelláltuk a PCR termékeket (**22. ábra, E., F.,**) az alábbi eljárást alkalmazva:

Hőmérséklet	Időtartam	Hűtési sebesség
95 °C	10 min	2.0 °C/s
85 °C	1 min	0.3 °C/s
75 °C	1 min	0.3 °C/s
65 °C	1 min	0.3 °C/s
55 °C	1 min	0.3 °C/s
45 °C	1 min	0.3 °C/s
35 °C	1 min	0.3 °C/s
25 °C	1 min	
4 °C	∞	

A reannellált frakciókban a DNS szimplaszálú kihurkolódásokat fog tartalmazni ott, ahol a ZFN hasítás után fellépő NHEJ hibajavítás következtében eltérés lesz a vad típusú és a hibásan javított szál között (**22. ábra, F.,**). Ezután 1 μ l Surveyor Cel-1 Nukleáz S és 1 μ l Surveyor Enhancer S (Sigma) oldatot adtunk a ~ 30 ng/ μ l annellált DNS-hez, és 42 °C-on, 1 órán keresztül inkubáltuk a mintákat. Ez a speciális nukleáz a DNS torzulásokra érzékeny, és képes kettősszálú DNS hasítást végezni a kihurkolódásoknál (**22. ábra, G.,**). Az 1 órás inkubálás után 1 μ l Stop Solution-t (Sigma) adtunk a reakcióhoz, hogy leállítsuk az emésztést. A mintákat agaróz gélen megfuttatva ellenőriztük, hogy történt-e megfelelő mintázatú fragmens képződés, ami arra utal, hogy történtek-e a sejtekben ZFN-ek által indukált kettősszáltörések, vagyis tapasztalható volt-e ZFN aktivitás (**22. ábra, H.,**).



22. ábra

A Cel-1 Assay egyes lépéseinek sematikus ábrája

(www.sigmaaldrich.com)

4.8. A transzfectált sejtpopuláció szelekciója fluoreszcenciával aktivált sejtszortírozó berendezéssel (FACS) és hygromycin szelekcióval

A sejtek szelekcióját fluoreszcenciával aktivált sejtszortírozó berendezés (FACS) segítségével végeztük el. A FACS készüléken be lehet állítani, hogy milyen intenzitású fluoreszcens jelet adó sejteket gyűjtsön külön a többitől.

Egy nappal a nukleoporálást követően, szortoláshoz HCT116 sejteket tripszin-EDTA-s kezelés után centrifugálással (37 °C, 5 perc, 100 g) összegyűjtöttünk, és leszámolt ~ 10 millió

sejtet transzfer pufferben (2 mM EDTA, 25 mM HEPES, 20 % FBS, 100 µg/ml penicillinnel, 100 µg/ml sztreptomicinnel, 50 µg/ml Gentamycinnel, 5 µg/ml Plasmocinnel, 25 µg/ml Funginnal, McCoy's 5A médiumban) viaszszuszpendáltuk a FACS készülékhez történő szállításhoz. A szortolást 4 °C-on végeztük szortoló pufferben, ami a transzfer pufferrel megegyező összetételű volt, de 40 % FBS-t tartalmazott. Az mWasabi-DR jelére történő szortolás végén a szelektált sejtek szortoló pufferbe érkeztek, és jégen tároltuk őket. A sejteket 24 óráig EDTA mentes transzfer pufferben termosztáltuk, majd friss tápoldatot cseréltünk rajtuk.

A szortolással összegyűjtött sejteket felszaporítottuk és 300 µg/ml hygromycin antibiotikummal kezeltük, amellyel szelektálhatóak azok a sejtek, melyekbe a Cre kazetta sikeresen integrálódott. A hygromycin szelekciót követően 2 hét múlva ismét FACS-oltuk a sejteket.

4.9. Egyedi sejtklónok izolálása és genotipizálás PCR-rel

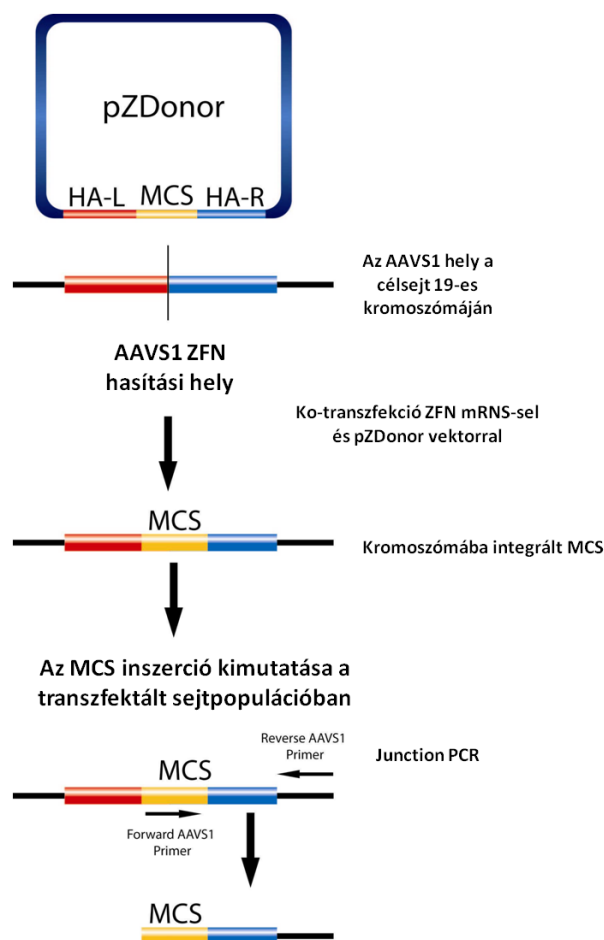
A hygromycines szelekció és a FACS-olások után meg kellett találnunk azokat az egyedi sejteket, amelyek mindkét integrációs vektorunkat tartalmazzák az AAVS1 genomi lókuszon. Ehhez egysejt klónokat kellett izolálnunk, majd egyenként genotipizálni őket, a pozitív klónokat pedig végül szekvenáltatni.

Az egysejt klónok körültekintő izolálása rendkívül fontos volt, mivel meg akartuk találni a menekítő és a Cre kazettát is tartalmazó sejteket. A szelektált sejtpopulációt kihígításos módszerrel kíséreltük meg egyedi sejtekre osztani. Bürker-kamrás sejtszámlálással becsültük meg a sejtszámot, és a sejtkultúrát 96 lyukú plétekre osztottuk szét úgy számolva, hogy minden 100 µl-nyi médiumba 1 db sejt kerüljön. Ezután mikroszkóppal meggyőződünk azon plét lyukakról, ahova sikeresen ki tudtunk tenni egy sejtet. Az egyedi sejteknek körülbelül három hétre volt szükségük mire benőtték a 96 lyukú plétet. 4 db 96 lyukú plétre tettünk ki egysejt klónokat, majd ebből a harmadik hét végére összesen 72 lyukban nőttek fel megfelelően a sejtek. A továbbiakban ezt a 72 klónt genotipizáltuk.

Az klónok genotipizálását PCR-rel végeztük el, amihez kifejlesztettünk egy gyors és hatékony genomi DNS izolálási eljárást. Ennek során $\sim 3 \times 10^4$ sejtet gyűjtöttünk össze mintánként (konfluens 96 lyukú plét), és 50 µl extrakciós pufferben 55 °C-on inkubáltuk őket 40 percig (10 percenként vortexelve). Az extrakciós puffer összetétele: 10 mM Tris, pH=8.0,

1 mM EDTA, 0,2 % Triton X-100 és 200 µg/ml proteináz K volt. Ezután 10 percig 95 °C-on inaktiváltuk a proteináz K-t és a gDNS mintákat -20 °C-on tároltuk.

A genotipizáló, ún. Junction PCR-rel ellenőrizni lehet, hogy történt-e helyspecifikus integráció, mivel specifikusan az integrációs eseményt amplifikáljuk (**23. ábra**) a PCR reakció során.



23. ábra

A Junction PCR egyes lépéseinek sematikus ábrája

(www.sigmaaldrich.com)

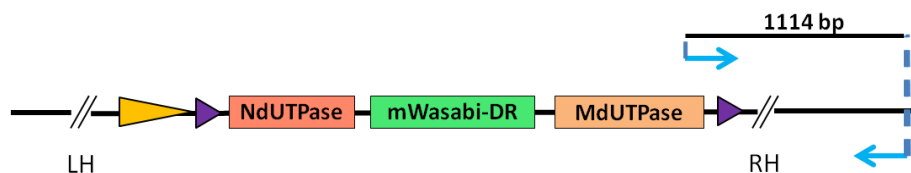
PCR-t MyTaq Hot Start Mastermix polimerázzal végeztük, 0,4 µM mennyiségű primerekkel, 10 µl-es végtérfogatban, melyhez 1 µl izolált gDNS-t adtunk mintánként.

A menekítő kazetta integrálódásának ellenőrzésére tervezett primerek a következők voltak:

Forward primer: 5' - ACACGGAAGGAGACAATACC - 3'

Reverz primer: 5' - CCTACTTGGCCTGGACCCCAC - 3'

A primerek egy 1114 bp hosszúságú szakaszt hoznak fel, a **24. ábrán** látható módon.



24. ábra

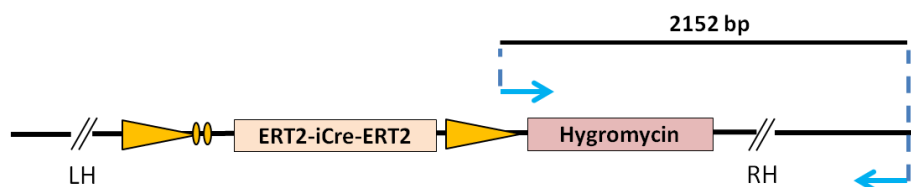
A Wasabi Junction PCR terméke

A Cre kazetta integrálódásának ellenőrzésére tervezett primerek a következők voltak:

Forward primer: 5' - GCTTTCAGCTTCGATGTAGG - 3'

Reverz primer: 5' - CCTACTTGGCCTGGACCCCAC - 3'

A Junction PCR ezekkel a primerekkel egy 2152 bp hosszúságú szakaszt amplifikál, a **25. ábrán** látható módon.



25. ábra

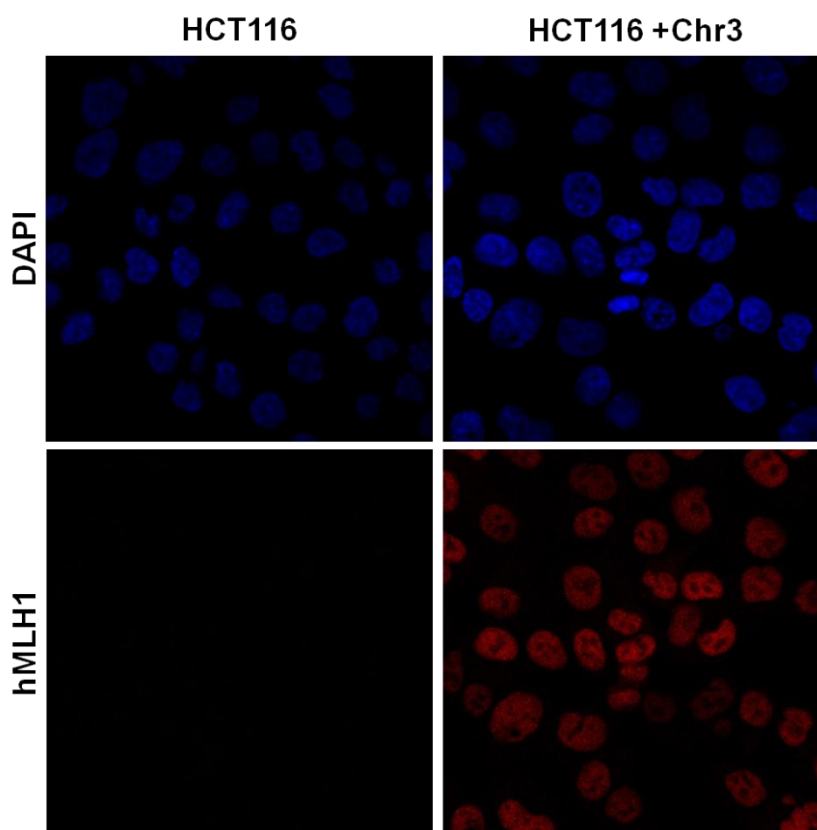
A Cre Junction PCR terméke

A dupla pozitív (kettős integráns) klónokat szekvenálásra küldtük, hogy meggyőződjünk arról, hogy mindkét beépített kazetta szekvenciálisan intakt.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. Emlős HCT116 és HCT116 +Chr3 sejtek fenntartása és az MMR-deficiencia ellenőrzése

A kísérletekhez használt HCT116 (MMR-deficiens) és HCT116+Chr3 (MMR-proficiens) sejtvonalakat hMLH1 immunfestéssel ellenőriztük, hogy megállapítsuk rendelkeznek-e aktív hibáspár javítórendszerrel. Az immunfestés eredménye az alábbi **26. ábrán** látható. Ez alapján a HCT116 sejtvonal valóban MMR-deficiensnek bizonyult, míg a HCT+Chr3 sejtvonal a vártak megfelelően aktív MMR rendszerrel rendelkezik, mivel kimutatható benne az hMLH1 fehérje.



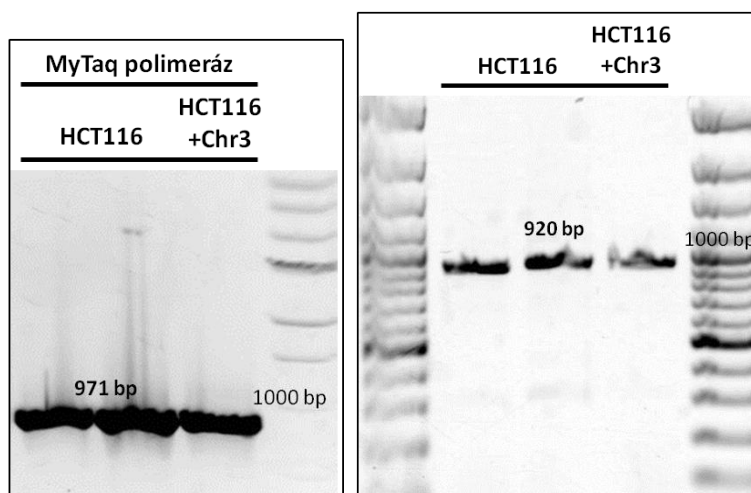
26. ábra

HCT116 és HCT116 +Chr3 sejtvonalak MMR aktivitásának ellenőrzése

A felső képeken a sejtmagok láthatóak DAPI festéssel megjelenítve, alatta pedig a hozzájuk tartozó hMLH1 fehérje immunfestése. Jól látható, hogy a HCT116 +Chr3 sejtek mindegyike erősen expresszálja a hMLH1 fehérjét, míg a HCT116 sejtekből teljesen hiányzik ez a fehérje.

5.2. A ZFN-ek dUTPáz felismerőhelyének és az AAVS1 hely ellenőrzése PCR-rel

Az endogén dUTPáz kiütéséhez használt ZFN-ek által felismert régió és a menekítő rendszer integrálásához szükséges AAVS1 hely intaktságát PCR-rel és szekvenálással ellenőriztük. A PCR-ek eredménye az alábbi ábrákon látható. Az adott genomi régiók mutáció mentesnek bizonyultak, így a HCT116 és a HCT116 +Chr3 sejtvonalak alkalmas modellek a dUTPáz génkiütési/menekítési rendszer ZFN-ek általi létrehozására.



27. ábra

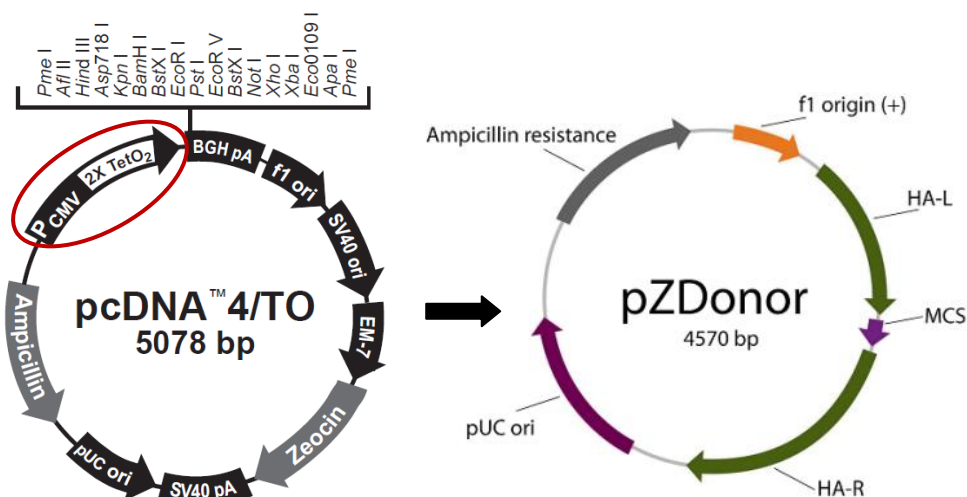
A ZFN dUTPáz felismerőhely és az AAVS1 lókuszt intaktságának ellenőrzése

A ZFN felismerőhely esetén 971 bp, az AAVS1 szekvencia esetén 920 bp magasságban vártunk terméket. A PCR reakciók és a szekvenálás eredménye megerősítette a ZFN-ek által érintett genomi régiók intaktságát mindkét sejtvonalba.

5.3. Az indukálható Cre rekombinázt expresszáló kazetta klónozása

5.3.1. Tetraciklin regulálható promóter klónozása a Donor vektorba

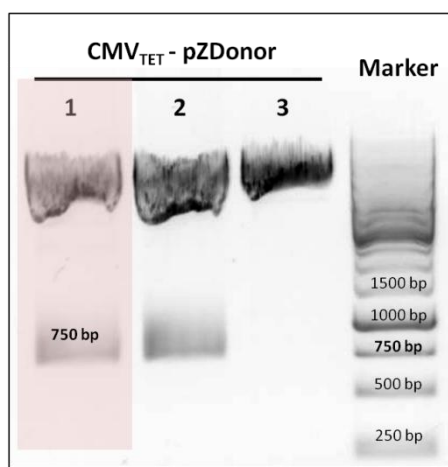
A tamoxifen indukálható CMV-Cre2ERT2 kazettát egy megfelelő homológia karokkal (HA-L és HA-R) rendelkező integráló vektorba (Donor vektor) klónoztuk úgy, hogy a promóterét közben lecseréltük egy Tet represszálható CMV promóterre. Először a tetraciklin regulálható CMV promótert kellett átemelnünk a pcDNA4-TO-MycHisA plazmidból a pZDonor vektorba (28. ábra).



28. ábra

A CMVTET promótert tartalmazó plazmid és a pZDonor expressziós vektor restriktációs térképe

A CMV_{TET} promótert a pcDNA4-TO-MycHisA plazmidről polimeráz lánreakcióval (PCR) szaporítottuk fel. Ezután az inszertet és a vektort HindIII és EcoRI-HF restriktációs endonukleázokkal emésztettük meg. Az inszertet PCR Cleanup Kit segítségével, a vektort QIAquick Gel Extraction Kit-tel tisztítottuk meg. A kompatibilis ragadós végekkel rendelkező inszertek és vektor kialakítása után ligáltuk a termékeket egymással, végül a kész ligált DNS konstruktot XL1-Blue kompetens sejtekbe transzformáltuk. Három kolóniát ellenőriztünk restriktációs tesztelésrel a CMV_{TET}-pZDonor konstruktot tartalmazó plétről, hogy megnézzük, az inszertet megfelelően be tudtuk-e építeni a kívánt expressziós vektorba. A restriktációs emésztést agaróz gélen ellenőriztük (29. ábra).



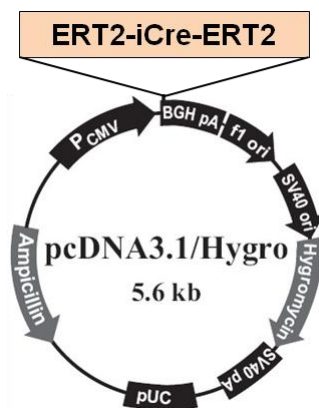
29. ábra

A CMV_{TET}-pZDonor konstrukció ellenőrzése restriktációs emésztéssel

A tesztelő emésztés során a CMV_{TET}-pZDonor plazmidből kieső CMV_{TET} szekvenciát 750 bázispár magasságban vártuk. A 3-as klónban az üres pZDonor vektort kaptuk vissza ~ 4600 bp magasságban. Az 1-es és a 2-es klón esetében sikeresnek bizonyult a klónozás, amit a szekvenálás eredménye is igazolt, a további kísérletekben a pirossal kiemelt 1-es kolóniát használtuk.

5.3.2. A CRE2ERT2 szekvencia beemelése a CMV_{TET}-pZDonor-ba

A létrehozott CMV_{TET}-pZDonor konstrukcióba (1-es klón) klónoztuk a Cre rekombinázt és a hygromycin rezisztencia génjét a pcDNA3.1-CRE2ERT2-Hygroi plazmidból (30. ábra).

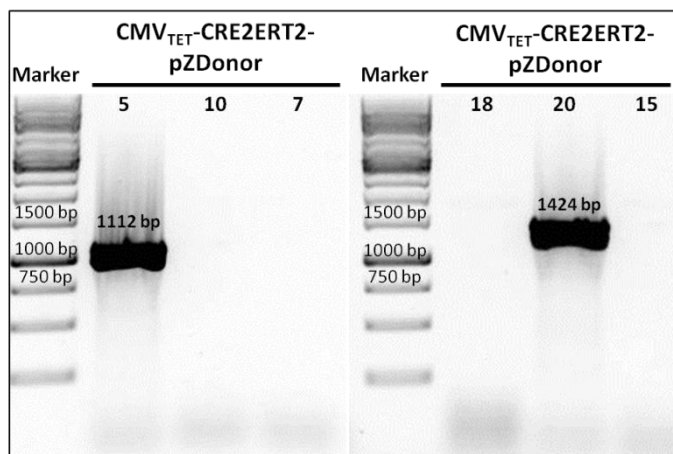


30. ábra

A pcDNA3.1-CRE2ERT2-Hygroi expressziós plazmid restrikciós térképe

Az inszert pcDNA3.1-CRE2ERT2-Hygroi plazmidot SalI-HF (NEB) enzimmal, míg a CMV_{TET}-pZDonor vektort XhoI restrikciós enzimmal emésztettük meg. Az emésztett inszertet és vektort QIAquick Gel Extraction Kit-tel tisztítottuk meg, T4 DNS ligázzal ligáltuk őket, végül a kész ligált DNS konstruktot XL1-Blue kompetens sejtekbe transzformáltuk.

A klónozás sikerességéről kolónia PCR-teszteléssel, restrikciós emésztéssel és szekvenálással bizonyosodtunk meg. Huszonöt kolóniát ellenőriztünk kolónia PCR-rel a CMV_{TET}-CRE2ERT2-pZDonor konstrukciót tartalmazó plétről, amivel mindösszesen egy pozitív klont találtunk (31. ábra).



31. ábra

A CMV_{TET}-CRE2ERT2-pZDonor konstrukcióval transzformált kolóniák ellenőrzése PCR-rel

Jó orientációban történő beépülés esetén 1424 bázispárból álló terméket vártunk, míg rossz irányú beépülés esetén 1112 bp magasságban kellett terméket látnunk az agaróz gélen.

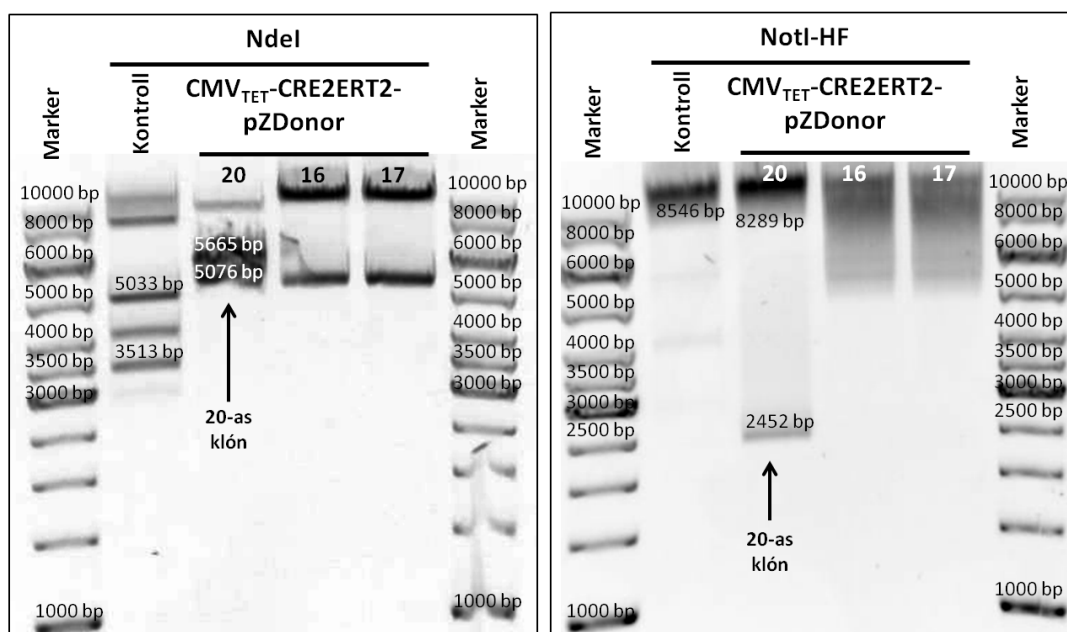
A kolóniákat restrikciós tesztelésrel is ellenőriztük NdeI vagy NotI-HF enzimekkel, hogy megnézzük, az inszertet megfelelően be tudtuk-e építeni a kívánt expressziós vektorba. A pcDNA3.1-CRE2ERT2-Hygro vektort is emésztettük pozitív kontrollként. A CMV_{TET}-CRE2ERT2-pZDonor konstrukció klónozási utáni lehetséges emésztési mintázatot a **32. ábrán** foglaltam össze aszerint, hogy az NdeI vagy a NotI-HF enzimmel emésztettük.

	NdeI	NotI-HF
CMV _{TET} -CRE2ERT2-pZDonor	5665 bp	8289 bp
Jó irányú beépülés esetén	5076 bp	2452 bp
CMV _{TET} -CRE2ERT2-pZDonor	9400 bp	7730 bp
Rossz irányú beépülés esetén	1341 bp	3011 bp
pcDNA3.1-CRE2ERT2-Hygro	5033 bp	8546 bp
Pozitív kontroll	3513 bp	

32. ábra

A restrikciós tesztelés eredményének lehetőségei

A tesztelés eredményét a **33. ábrán** látható agaróz gélen ellenőriztük. Az ígért klónokat szekvenálásra küldtük. A szekvenálás eredménye alapján a megfelelő szekvenciát tartalmazó 20-as plazmidot (CMV_{TET}-CRE2ERT2-pZDonor) használtuk a további kísérletekhez.



33. ábra

A CMV_{TET}-CRE2ERT2-pZDonor konstrukcióval transzformált kolóniák ellenőrzése restrikciós emésztéssel

A 20-as számú klón terméke jelent meg egyedül a várt magasságban mindkét emésztés esetében. A szekvenálás megerősítette a kapott pozitív eredményt.

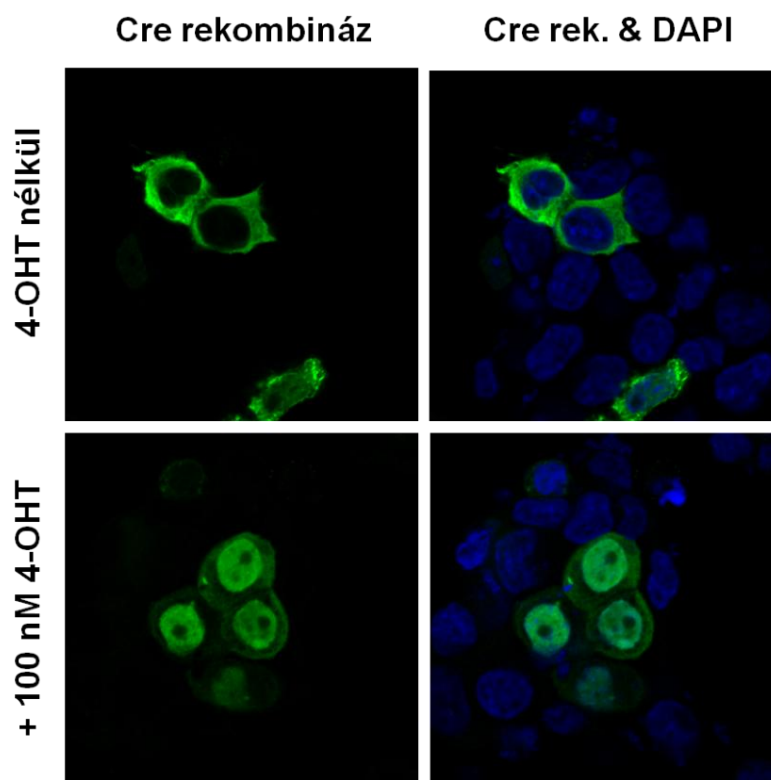
5.4. CMV_{TET}-CRE2ERT2-pZDonor konstrukció tesztelése

5.4.1. *Tranziens transzfeccióval*

A létrehozott CMV_{TET}-CRE2ERT2-pZDonor konstrukciót az emlős HCT116 sejtekbe transzfeccióztuk, hogy megvizsgáljuk expresszáldódik-e a kazetta és, hogy tamoxifen hatására hogyan változik a Cre rekombinááz intracellulláris lokalizációja.

A CMV_{TET}-CRE2ERT2-pZDonor kazettáról expresszáldó fehérje a Cre (iCRE) szekvenciából és a humán ösztrogén (ER) receptor két módosított ligandum-kötő doménjéből (ERT2) áll. A módosított ERT domén nem képes kellő hatékonysággal kötni az ösztrogént, csak a 4-hidroxitamoxifent (4-OHT). A fúzió megakadályozza az enzimet endonukleáz hatásának kifejtésében, mivel a két ERT domén a fehérjét kint tartja a citoplazmában (Hsp70 fehérjéhez kapcsolja a Cre rekombinááz). 4-OHT kezelés hatására a citoplazmás kipányvázás megszűnik, így a Cre rekombinááz képes bejutni a sejtmagba, ahol kapcsolódhat a DNS-hez és beindíthatja a loxP rekombinációt.

A **34. ábrán** látható az immunfestés eredménye Cre rekombináázra 4-OHT kezelés nélkül és 100 nM 4-OHT hozzáadásával. A képek konfokális mikroszkóppal készültek. Jól látható, hogy 4-OHT hatására az expresszáldó Cre rekombinááz elkezd a sejtmagban felhalmozódni.

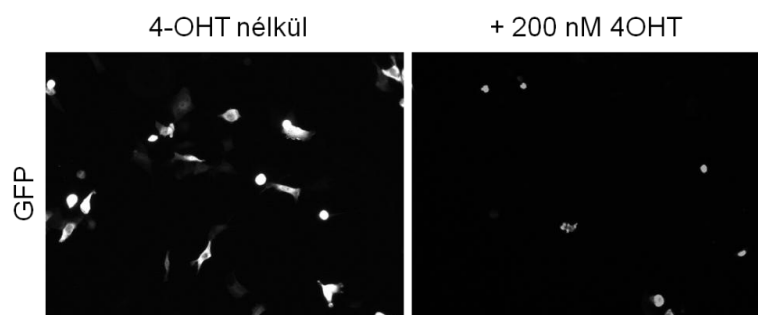


34. ábra

CMV_{TET}-CRE2ERT2-pzDonor konstrukció expressziója HCT116 sejtekben és a 4-hidroxitamoxifen kezelés hatása a Cre rekombinááz lokalizációjára

5.4.2. *Funkcionális tesztelés loxP-GFP-loxP ko-transzfekcióval*

CMV_{TET}-CRE2ERT2-pzDonor konstrukciónkkal és loxP-GFP-loxP szekvenciát tartalmazó plazmiddal ko-transzfectáltunk HCT116 sejteket, hogy lássuk, az expresszálandó Cre rekombinááz képes-e betölteni funkcióját. 4-OHT kezelés hatására a Cre rekombinááz képes bejutni a sejtmagba, ahol felismerve a loxP helyeket, kapcsolódik a DNS-hez és kivágja a loxP helyek által közrefogott szekvenciát. A kísérletünkben tehát, amennyiben a Cre rekombinááz képes 4-OHT hatására felszabadulni, a sejtmagba lokalizálódni és betölteni endonukleáz funkcióját, a GFP kivágódik a plazmidból, nem fog átíródni, így nem ad fluoreszcens jelet. A ko-transzfekció és 4-OHT kezelés eredményét a **35. ábra** mutatja.

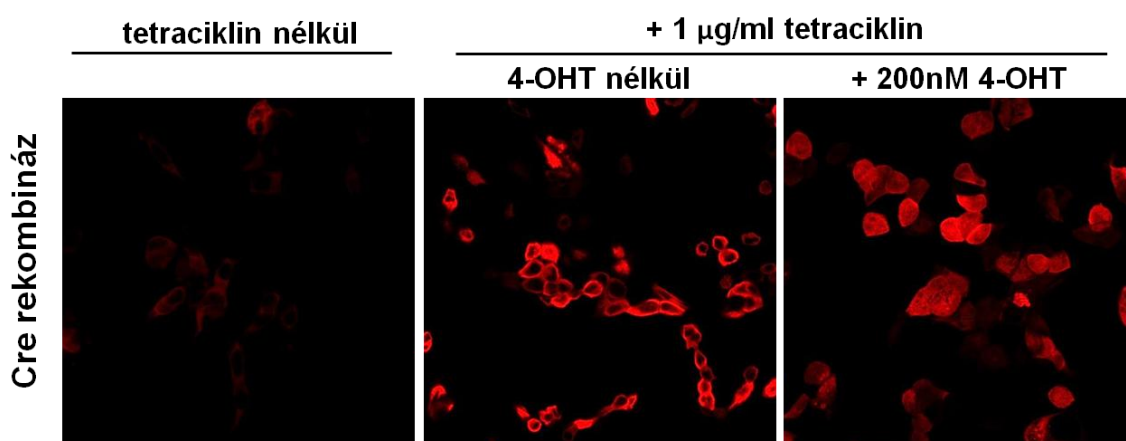


35. ábra

CMV_{TET}-CRE2ERT2-pzDonor konstrukció funkcionális tesztelése loxP-GFP-loxP szekvenciát kódoló plazmid ko-transzfekeciójával és 4-hidroxitamoxifen kezeléssel

5.4.3. *A Cre rekombinááz represszáálhatóságának tesztelése TetR ko-transzfekecióval*

Tranziensen ko-transzfekektáltunk HCT116 sejteket a CMV_{TET}-CRE2ERT2-pzDonor konstrukciónkkal és TetR represszort expresszááló vektorral (pcDNA6/TR), hogy megvizsgálhassuk, működik-e a tetraciklin regulálható represszió TetR jelenlétében. A ko-transzfekektált sejtekben alig láttunk Cre expressziót, mivel a TetR represszor meggátolja annak szintézisét. Ha tetraciklin antibiotikumot adunk a rendszerhez, az a TetR-hez köt, így a represszor nem tud a DNS-hez kapcsolódni, tehát megindulhat a transzkripció, és a Cre rekombinááz jele megjelenik a citoplazmában. 4-OHT kezelés hatására a Cre rekombinááz sejtmagban történő feldúsulása is megindul (36. ábra).



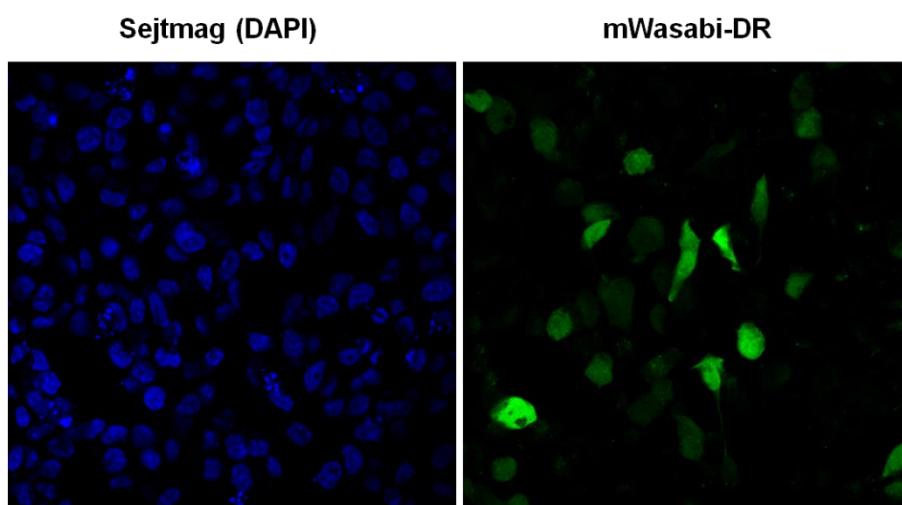
36. ábra

A Cre rekombinááz represszáálhatóságának ellenőrzése TetR ko-transzfekecióval, tetraciklin 4-hidroxitamoxifen kezeléssel

5.5. A dUTPázokat kódoló menekítő kazetta tesztelése

5.5.1. Az exogén dUTPázok expressziójának és lokalizációjának vizsgálata tranziens transzfekcióval

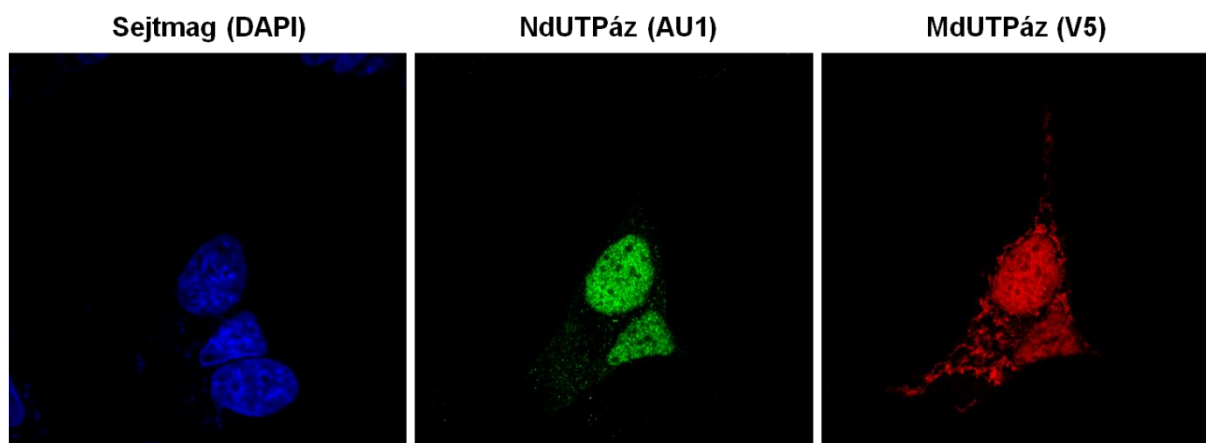
Tranziensen transzfektáltunk HCT116 sejteket a menekítő AAVS1-pZDonor konstrukcióval, hogy megvizsgáljuk a kazetta transzfekciós hatékonyságát, expresszióját és a dUTPázok lokalizációját. A **37. ábrán** jól látható a destabilizált mWasabi fluoreszcens fehérje jele, amely jelzi a menekítő kazetta kifejeződését.



37. ábra

Az AAVS1-pZDonor menekítő kazetta expressziója transzfektált HCT116 sejtekben

Miután meggyőződünk a fluoreszcens riporter fehérje expressziójáról, az exogén dUTPázokat azok epitópjának segítségével festettük meg. A **38. ábrán** az első kép a sejtmagfestést mutatja, a 2. képen a sejtmagi dUTPáz (NdUTPáz AU1 epitóppal), míg a 3. képen a mitokondriális izoforma (MdUTPáz V5 tag-gel) expressziója és lokalizációja látszik. A mitokondriális izoforma érdekes sejtbeli lokalizációt mutat. Nemcsak a mitokondriumban, hanem a sejtmagban is megjelent az MdUTPáz.



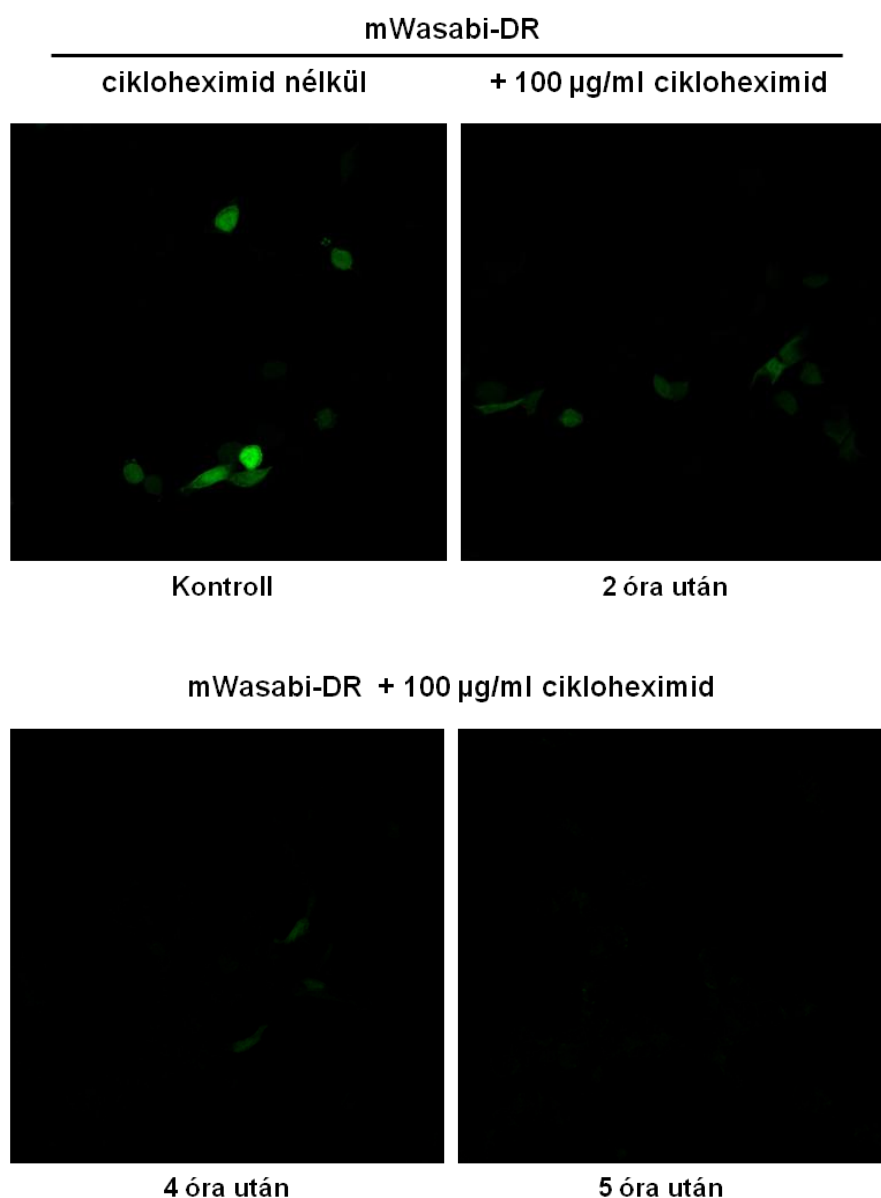
38. ábra

**A menekítő kazettáról expresszáldó sejtmagi és mitokondriális dUTPáz izoforma
lokalizációja**

Az MdUTPáz különös lokalizációjának oka feltételezésünk szerint az exogén fehérje transzlációjában keresendő. A destabilizált Wasabi riporter gén és a mitokondriális dUTPáz közé egy IRES szekvenciát terveztünk, amely lehetővé teszi a fehérjeszintézis inicializálását az mRNS közepén, mivel odavonzza az eukarióta riboszómát. A menekítő kazetta transzlációja során az IRES-nek köszönhetően, a sejtmagi dUTPáz alegysége után közvetlenül a mitokondriális dUTPáz alegységének szintézise megy végbe. Az alegységek mind tartalmaznak NLS szekvenciát, illetve a mitokondriális dUTPáz alegység egy mitokondriális preszekvenciával is rendelkezik. A katalitikusan aktív enzim három alegység trimerizálódásával jön létre. A homotrimer hármas szimmetriát mutat, körülölelve egy központi csatornát. Feltételezésünk szerint a szintetizálódó NdUTPáz és MdUTPáz alegységek képesek egymással véletlenszerűen kapcsolódni és heterotrimereket képezni. Elméletünk szerint a sejtmagba azok a heterotrimerek is képesek bejutni, melyek egy vagy két MdUTPáz alegységet tartalmaznak, a homotrimer NdUTPáz mellett. Ezzel ellentétben a mitokondriumba való szelektív bejutáshoz a homotrimer MdUTPáz mindhárom mitokondriális preszekvenciával rendelkező alegységére szükség van, hiszen oda csatornákon letekerve, alegységenként jutnak be a fehérjék. A mi esetünkben azonban nagy valószínűséggel keletkeznek heterotrimer MdUTPázok a menekítő kazettáról, így a sejtmagban is kimutatható mennyiségben lesz jelen a V5 epitóppal rendelkező mitokondriális izoforma. Ez azonban a menekítő kazetta funkciójára nézve nem probléma, hiszen célunk az volt, hogy mindkét sejtkompartimentumban, a magban és a mitokondriumokban is biztosítsunk kellő mennyiségű dUTPázt.

5.5.2. A destabilizált Wasabi fluoreszcens riporter fehérje féléletidejének vizsgálata

A HCT116 sejteket transzfektáltuk a menekítő kazettánkkal, és különböző ideig cikloheximiddel kezeltük őket, hogy megvizsgáljuk a destabilizált Wasabi fluoreszcens riporter fehérje féléletidejét. A 39. ábra mutatja a konfokális mikroszkóppal készített képeket. A cikloheximiddel történő kezelés hatására már 2 óra elteltével jóval kevesebb sejt világított, 4 óra elteltével a Wasabi jele szinte teljesen megszűnt, 5 óra után pedig már csak háttérrel láthattunk.



39. ábra

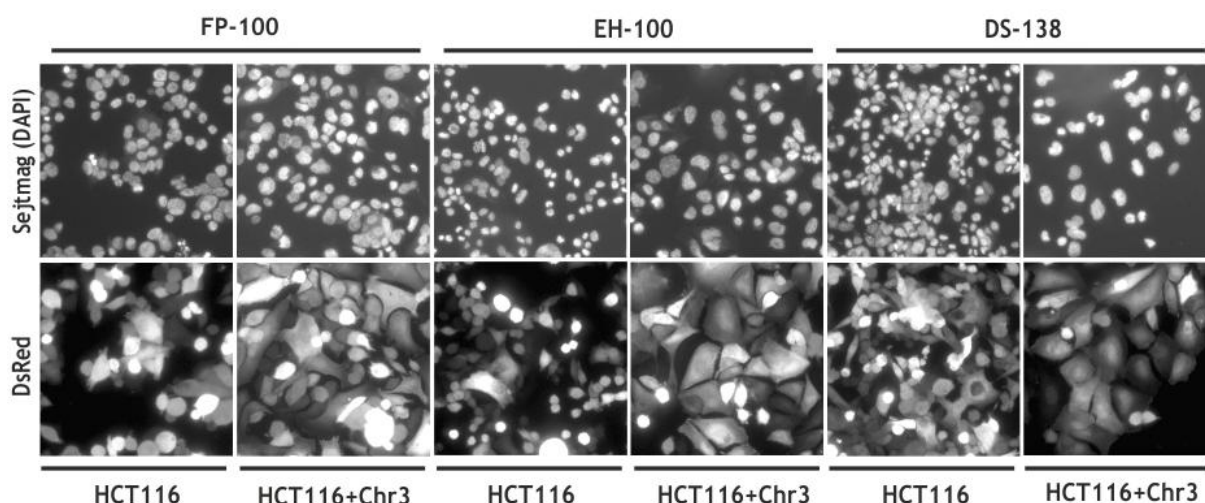
A destabilizált mWasabi féléletidejének vizsgálata cikloheximid kezelés hatására, tranziensen transzfektált HCT116 sejtekben

Az irodalmi eredményekkel összhangban megállapíthatjuk, hogy a PEST szekvencia jelentősen csökkenti a fúziós fehérje féléletidejét, mivel annak hiányában az EGFP-vel összemérhető (~24 h) féléletidőt tapasztaltak [93-95]. Mind az integrációs eseményre való szelekciónál, mind pedig majd a Cre rekombinázzal történő kiemésztésnél hasznos lesz ez a destabilizált fluorofór, ami gyorsan tükrözi a DNS-beli változásokat fehérjeszinten.

5.6. A menekítő rendszer sejtbe juttatásának tesztelése nukleofektálással

5.6.1. *HCT116 és HCT116+Chr3 sejtek transzfekciója a nukleofektor technológia optimalizálásával*

pDsRed kontroll plazmiddal nukleoporáltuk a HCT116 és HCT116+Chr3 sejteket három, különböző Nukleofektor (Amaxa) programot kipróbálva, hogy megvizsgáljuk a sejtek porálhatóságát és, hogy meghatározzuk a nukleofektálás optimális körülményeit. A **40. ábra** mutatja az FP-100, EH-100 és a DS-138 programon végzett kontroll nukleofektálás eredményeit. A transzfekciós hatékonyság rendkívül jónak bizonyult, mindegyik programnál 90 % feletti volt. Egyedül a sejtek túlélésében láttunk különbséget, a DS-138-as programmal történő nukleoporálással követően tartották meg leginkább a sejtek az eredeti morfológiájukat, és itt tapasztaltuk a legalacsonyabb mértékű sejtpusztulást is. Ezért a további kísérletekhez a legmegfelelőbbnek bizonyult, DS-138-as nukleofektálási programot választottuk.

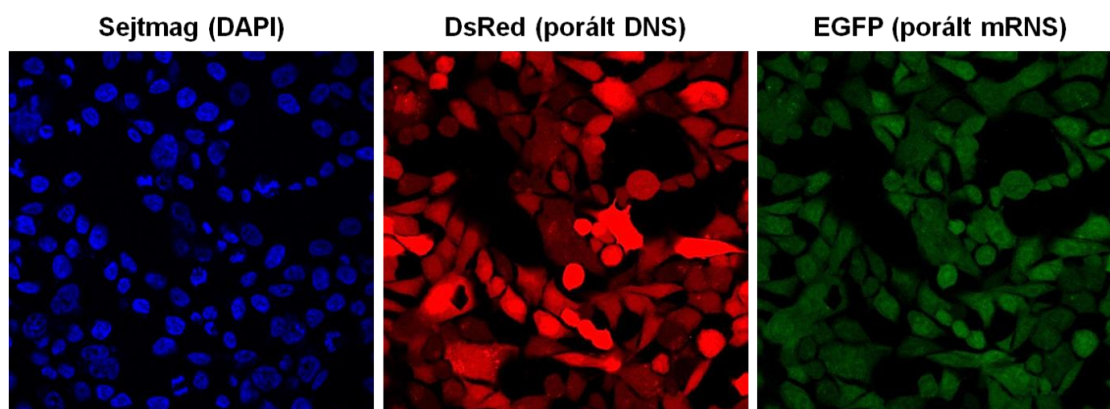


40. ábra

A nukleofektálás optimalizálása pDsRed vektor porálásával HCT116 és HCT116+Chr3 sejtekben

5.6.1.1. DNS és mRNS próba ko-transzfekció, nukleofektálással

pDsRed expressziós vektorral és EGFP mRNS-sel ko-transzfectáltunk HCT116 sejteket nukleofektálással (DS-138-as programon), hogy megvizsgáljuk az mRNS és a DNS egyidőben történő nukleoporálása milyen hatékonysággal megy végbe. A ko-transzfekció során nagy mennyiségű sejt pusztult el, viszont a ko-transzfekciós hatékonyság itt is közel 90 %-osnak bizonyult (**41. ábra**). Tehát a módszer alkalmas plazmidok és mRNS egyidejű sejtbe juttatására.

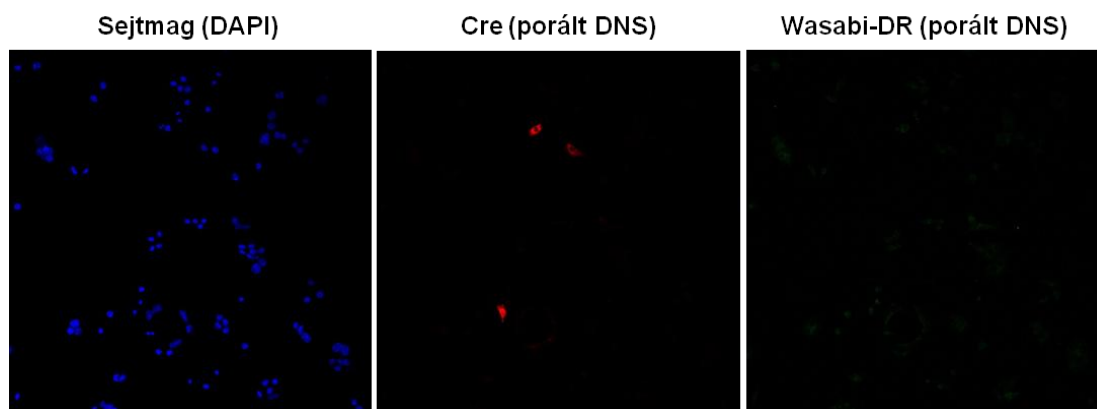


41. ábra

A DNS, mRNS ko-transzfekció hatékonyságának vizsgálata HCT116 sejtek nukleofektálásával

5.6.1.2. Az indukálható menekítő rendszer sejtbe juttatása nukleoporálással

A kontroll kísérletek után az AAVS1-pZDonor és a CMV_{TET}-CRE2ERT2-pZDonor vektorokkal is megkíséreltük a HCT116 sejtek nukleoporálását. A sejtek jelentős része azonban elpusztult a porálás hatására, és a ko-transzfekciós hatékonyság még az 1 %-ot sem érte el (**42. ábra**), ellentétben a DsRed és EGFP kontroll nukleoporálások pozitív eredményével. A Cre rekombinázt kódoló plazmid egyértelműen bejutott néhány sejtbe, de az mWasabi szinte egyáltalán nem világított. Sajnos feltételezhetően a HCT116 sejtek nukleoporálásának hatékonysága erősen vektorfüggő.



42. ábra

Az menekítő és a Cre kazetta sejtbejuttatási kísérlete nukleofektálással

5.6.1.3. A menekítő rendszer sejtbe juttatása ötvözve a hagyományos eljárást a modern nukleofektor technológiával

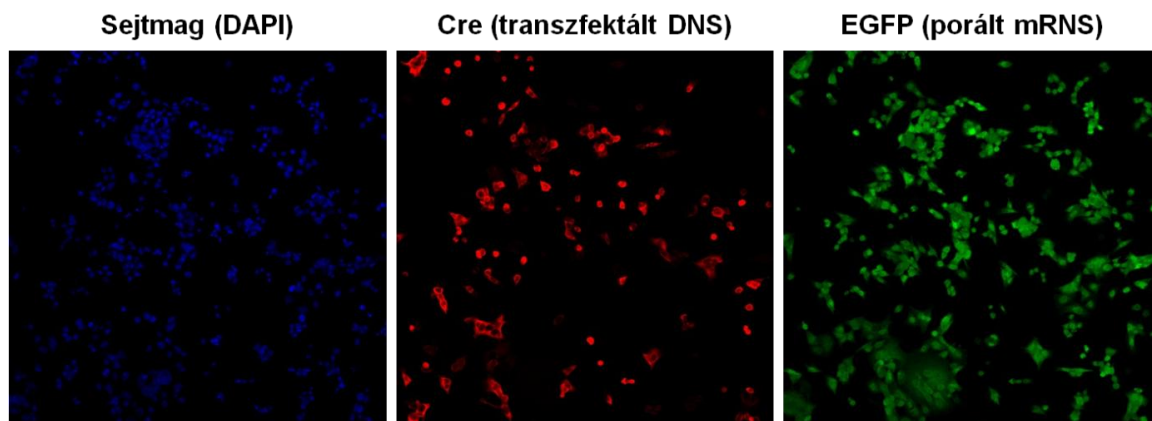
HCT116 sejteket pDsRed plazmiddal vagy CMV_{TET} -CRE2ERT2-pzDonor vektorokkal transzfektáltunk ExtremeGene-HP transzfekciós reagenssel (Roche), majd 24 óra elteltével nukleofektáltuk a transzfektált sejteket EGFP mRNS-sel, hogy megvizsgáljuk az általunk kidolgozott, kétlépcsős transzfekciós eljárás hatékonyságát.

A 43. ábrán látható a kontroll pDsRed vektor transzfekciója hagyományos technikával és EGFP mRNS-sel porálva, a 44. ábrán pedig a Cre rekombinázt kódoló plazmiddal történt a kémiai transzfekció az EGFP mRNS nukleoporálás előtt. Ezzel az eljárással már összemérhető transzfekciós hatékonyságot kaptunk a kontroll DsRed-hez képest. A sejtek nagy része túlélte a porálást, az EGFP mRNS továbbra is nagy hatékonysággal bejutott a sejtekbe, és a Cre kazetta is erősen világított a ko-transzfektált sejtekben.



43. ábra

Kontroll DsRed plazmid és EGFP mRNS kétlépcsős transzfekció

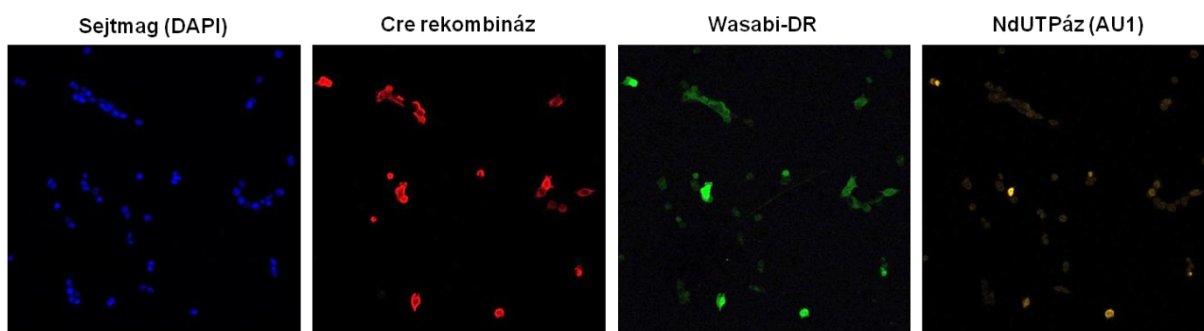


44. ábra

Kétlépcsős transzfekció a CMV_{TET}-CRE2ERT2-pzDonor konstrukciónkkal és EGFP mRNS-sel

5.7. Az első éles transzfekciót, majd nukleoporálást követő immunfestés

Az első éles, kétlépcsős transzfekció (AAVS1-pZDonor és a CMV_{TET}-CRE2ERT2-pzDonor vektorok hagyományosan, majd a ZFN mRNS nukleoporálva) sikeresnek bizonyult az első tesztek alapján, ahol a Cre kazettát és a sejtmagi dUTPázt (NdUTPáz) immunfestettük, illetve az mWasabi-DR fluoreszcens fehérje jelét (menekítő kazetta) detektáltuk konfokális mikroszkóppal (45. ábra). A Cre rekombinázza világitó sejtek nagy hatékonysággal ko-transzfektálódtak a menekítő kazettával is.

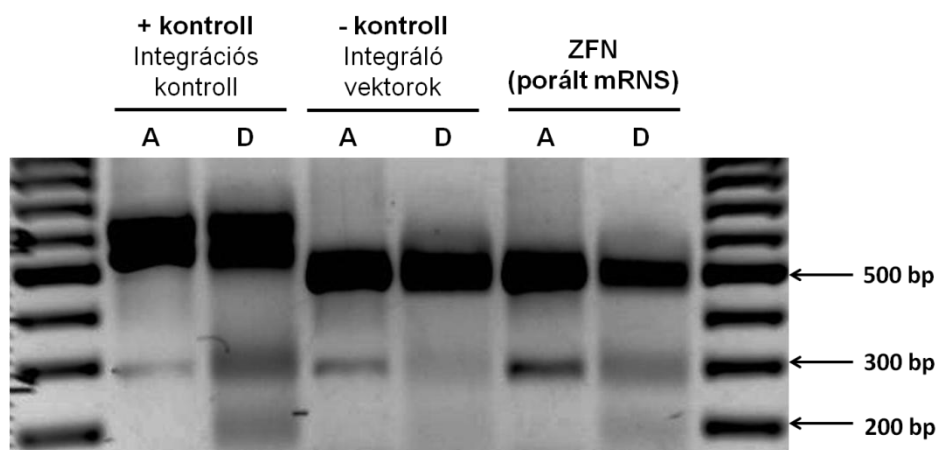


45. ábra

Az első éles, kétlépcsős transzfekció sikeresnek bizonyult az első immunfestés alapján

5.8. A ZFN aktivitás kimutatása Cel-1 Assay-vel

Cel-1 Assay segítségével vizsgáltuk meg, hogy a menekítő rendszer sejtekbe juttatása során volt-e ZFN aktivitás, és így képesek lehettek-e integrálódni a vektorok az AAVS1 lókuszba. A kísérletet 3 mintán végeztük el: egy integrációs kontroll (Sigma) genomi DNS-en (pozitív kontroll), olyan sejtek genomi DNS-éből, ahol az integráló vektorokat juttattuk be (negatív kontroll) és végül egy harmadik mintán, a ZFN mRNS-sel nukleoporált sejtek genomi DNS-én. A detekció alapja a következő: az AAVS1 régióra tervezett specifikus primerekkel egy ~500 bp-os szakaszt felszaporítottunk, amelyben megtalálható az a szakasz, amit a specifikus ZFN-ek felismernek. Abban az esetben, ha volt ZFN aktivitás, az NHEJ hibajavítási útvonal miatt különböző méretű deléciók keletkezhetnek, amik érintetlen vad típusú régióval annellálva kihurkolódásokhoz vezetnek. A Cel-I enzim ezen szimplaszálú DNS hurkok mentén mindkét DNS szálon hasítást végez. Agaróz gélen az emésztetlen (a gélen „A” betűvel jelölt), illetve a Cel-I enzimmal megemésztett mintákat (a gélen „D” betűvel jelölt) hasonlítottuk össze (**46. ábra**). A 200 és 300 bp-nál megjelenő specifikus fragmensek alapján volt kimutatható ZFN aktivitás az AAVS1 lókuszban. Habár a Sigma Aldrich cégtől kapott pozitív kontrollon jobban látható a két emésztési termék, a mi mintánkról is elmondható, hogy biztosan voltak aktív ZNF-ek a sejtekben.



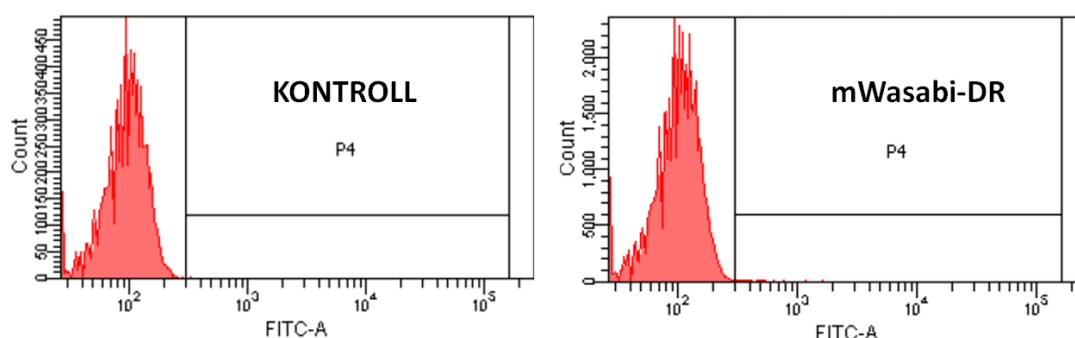
46. ábra

A ZFN aktivitás kimutatása az AAVS1 lókuszban Cel-1 Assay-vel

„A” betűvel az annellált, „D” betűvel az emésztett mintát jelöltem.

5.9. A transzfektált sejtpopuláció szelekciója fluoreszcenciával aktivált sejtszortírozó berendezéssel (FACS) és hygromycin szelekcióval

A sejtek szelekcióját fluoreszcenciával aktivált sejtszortírozó berendezés (FACS) segítségével végeztük el az mWasabi-DR fluoreszcens jelére szelektálva (**47. ábra**), a ZFN-ek bejuttatását követő 5. napon. Összesen mintegy 10 millió sejtet szortoltunk, de csupán 1300 sejtet sikerült összegyűjtenünk. A negatív kapuzást transzfektálatlan, tehát mWasabi mentes sejtekre végeztük.

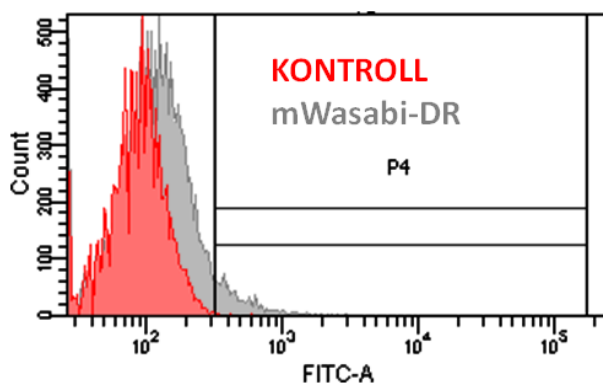


47. ábra

A transzfektált sejtpopuláció szelekciója FACS készülékkel

A FACS hisztogramon jól látható, hogy a sejteknek csupán elenyészően kis része bizonyult Wasabi pozitívnak 5 nappal a ZFN-ek bejuttatása után.

A sejteket ezt követően két hetes hygromycin szelekciónak tettük ki, majd utána újra szortoltuk a sejteket Wasabi fluoreszcenciára (**48. ábra**). A Wasabi pozitív sejtek itt már egyértelmű dúsulást mutattak egy kontroll (Wasabi negatív) sejtpopulációhoz képest.



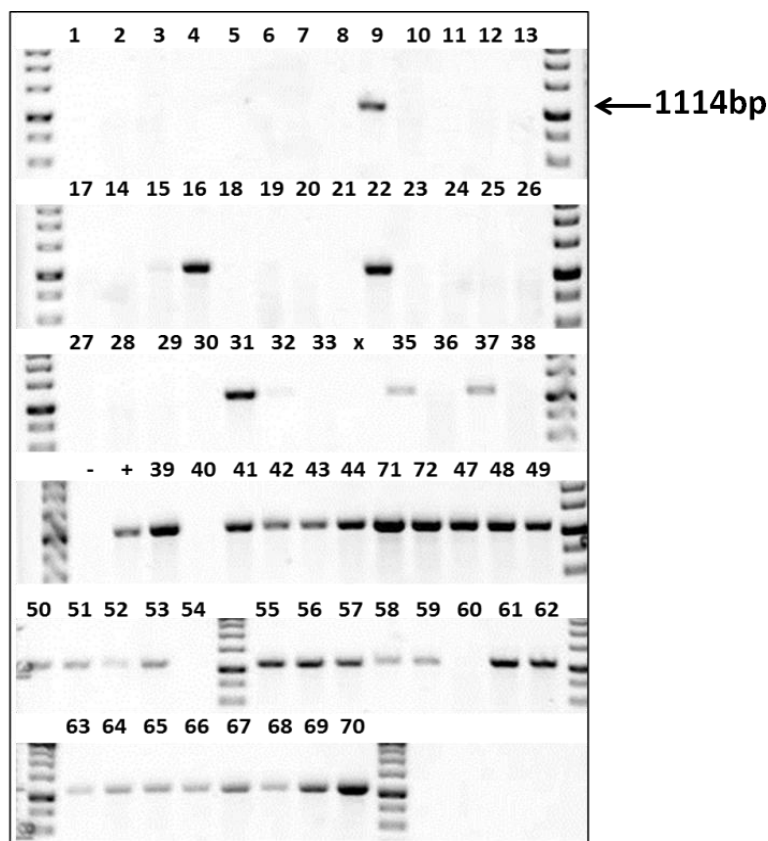
48. ábra

Hygromycin szelektált sejtek újra szortolása FACS berendezéssel

Két hétig tartó hygromycines szelekciót követően a sejteknek már nagyobb hányada volt Wasabi pozitív, mint az első FACS szelekció alkalmával. A kontrollhoz (Wasabi negatív sejtek) képest jelentős fluoreszcenciával bíró sejteket gyűjtöttük csak össze.

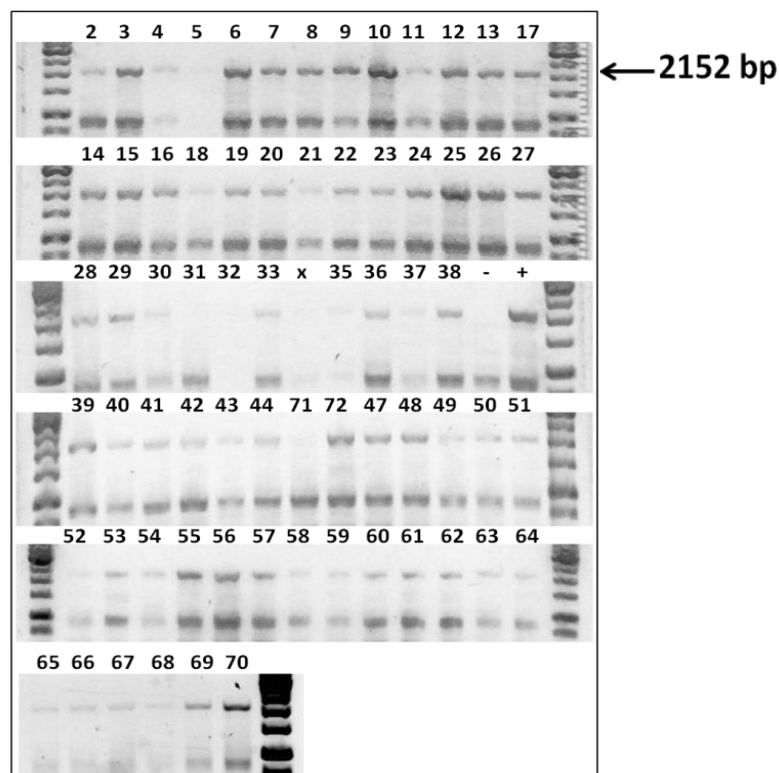
5.10. Egyedi sejtklónok genotipizálása PCR-rel

A hygromycines szelekció és a FACS-olások után egysejt klónokat izoláltunk a sejtpopulációból. 4 db 96 lyukú plétre tettünk ki egysejt klónokat, majd ebből a harmadik hét végére 72 lyukban nőttek fel megfelelően a sejtek. A 72 egysejt klón genotipizálását Junction PCR-rel végeztük. A **49. ábrán** a menekítő kazetta integrálódásának ellenőrzésére tervezett primerekkel végzett PCR látható. A PCR során 1114 bp hosszúságú termék keletkezett azoknál a klónoknál, ahol a megfelelő helyre beépült a menekítő kazetta. A **50. ábra** pedig a Cre kazetta beépülésének ellenőrzésére tervezett Junction PCR-t mutatja. Helyspecifikus integráció esetén 2152 bp hosszúságú terméket vártunk.



49. ábra

Genotipizálás Wasabi Junction PCR-rel



50. ábra
Genotipizálás Cre Junction PCR-rel

A Junction PCR alapján a klónok nagy része (~ 46 %) tartalmazza mindkét kazettát, míg a maximum egy kazettát tartalmazók a sejtek 54 %-át adják (**51. ábra**). A kettős integráns klónokat szekvenálásra küldtük, hogy információkat kapjunk a beépült kazetták szekvenciájáról.

Junction PCR		
Cre	Wasabi	Kolóniaszám
+	-	31
-	+	2
+	+	33
-	-	6

51. ábra
Egyes és kettős integráns klónok eloszlása a genotipizálás alapján

A szekvenálás alapján több klónba sikeresen integráltuk a menekítő és a Cre rekombinázt kódoló kazettáinkat, ezen klónok fehérje szintű vizsgálata folyamatban van.

6. Összefoglalás

Munkánk során célul tűztük ki egy olyan modell humán sejtvonal létrehozását, amellyel a dUTPáz funkcióját tanulmányozhatnánk a *de novo* timidin bioszintézist célzó kemoterápiás szerek kontextusában. Ehhez szeretnénk a dUTPázt humán sejtekből biallélikusan kiütni, ami egy vélhetően esszenciális fehérje révén különleges megközelítést igényelt. Ezért egy olyan indukálható knock-out rendszert terveztünk meg, amivel a dUTPáz jelenléte a sejtekben tetszőleges időpontban megszüntethető, és vizsgálható az így megjelenő fenotípus. Ennek eléréséhez egy olyan integrálható loxP szekvenciákkal határolt menekítő kazettát terveztünk meg, mely mindkét dUTPáz izoforma exogén expresszióját lehetővé teszi, és ennek könnyű detektálásához fluoreszcens fehérje markert is kódol. A loxP szekvenciákkal körbezárt menekítő kazetta eltávolításához egy indukálható Cre rekombinázt expresszáló génkazetta genomi integrációját is megterveztük, melynek aktivitása mind transzkripcionálisan és fehérje lokalizáció révén egyaránt szabályozható. A kazetták sikeres megklónozása után, mindkettő (menekítő és Cre rekombinázt expresszáló kazetta) működéséről meggyőződünk tranziens transzfekciókat követően. A kiválasztott sejtvonalban (HCT116) az integrációs hely (AAVS1 lókuszt) intaktságáról szekvenálással győződünk meg.

Számos transzfektálási és nukleoporálási kísérlet után végül sikerült kidolgoznunk egy kétlépcsős transzfektálási eljárást, mely ötvözi a hagyományos és a modern transzfekciós technológiát. Az exogén dUTPáz izoformákat és az indukálható Cre rekombinázt kódoló konstrukciókat kémiai transzfektálással juttattuk be a sejtekbe, majd a helyspecifikus ZFN mRNS-eket nukleoporáltuk. A transzfektált sejteket hygromycinnel és fluoreszcenciával aktivált sejtszortírozással (FACS) szelektáltuk, hogy kiválogassuk a kettős integránsokat. A heterogén sejtpopulációból egysejt klónokat izoláltunk, genotipizálással meghatároztuk a mindkét kazettára pozitív klónokat, melyeket szekvenálásra küldtünk, hogy meggyőződjünk arról, hogy mindkét beépített kazetta szekvenciálisan intakt. A beépült kazettákat megfelelően tartalmazó klónok fehérje szintű vizsgálata folyamatban van.

Amennyiben a tervezett expressziós kazettákat sikeresen integráltuk a sejtek AAVS1 lókuszába, megkezdhetjük majd az endogén dUTPáz biallélikus kiütését, egy újabb specifikus ZFN párral. Az exogén dUTPáz expresszió kikapcsolását követően pedig vizsgálhatjuk a dUTPáz vagy a különböző dUTPáz izoformák hiányának hatását.

Később a sejtek fluoropirimidinek (5FU, 5FdU), metotrexát és raltitrexed kezelésre való érzékenységét is szeretnénk tesztelni dUTPáz kiütött, illetve különböző dUTPázok (katalitikusan inaktív, trunkált, NLS szignál módosított formák) által menekített sejtek esetén,

hogyan nyerjünk információkat a dUTPáz pontos szerepéről a különböző kemoterápiás szerekekkel történő kezelések során. A létrehozott indukálható dUTPáz kiütött modell sejtvonal lehetővé tenné a dUTPáz genomi integritás megőrzésében játszott szerepének jobb megértését, a timin-mentes sejthalál útvonal eddig nem tanulmányozott részleteinek megismerését, mely új távlatokat nyithat a rákos megbetegedések klinikai kezelési hatásfokának javításához.

Hivatkozások

1. Weiner, K.X., et al., *Primary structure of human deoxycytidylate deaminase and overexpression of its functional protein in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1993. **268**(17): p. 12983-9.
2. Jackson, R.C., *The regulation of thymidylate biosynthesis in Novikoff hepatoma cells and the effects of amethopterin, 5-fluorodeoxyuridine, and 3-deazauridine*. J Biol Chem, 1978. **253**(20): p. 7440-6.
3. Bianchi, V., E. Pontis, and P. Reichard, *Regulation of pyrimidine deoxyribonucleotide metabolism by substrate cycles in dCMP deaminase-deficient V79 hamster cells*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(12): p. 4218-24.
4. Weinberg, G., B. Ullman, and D.W. Martin, Jr., *Mutator phenotypes in mammalian cell mutants with distinct biochemical defects and abnormal deoxyribonucleoside triphosphate pools*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(4): p. 2447-51.
5. Dare, E., et al., *Molecular analysis of mutations in the hprt gene of V79 hamster fibroblasts: effects of imbalances in the dCTP, dGTP and dTTP pools*. J Mol Biol, 1995. **252**(5): p. 514-21.
6. Van Rompay, A.R., M. Johansson, and A. Karlsson, *Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases*. Pharmacol Ther, 2000. **87**(2-3): p. 189-98.
7. Ivanetich, K.M. and D.V. Santi, *Biomedical science and the third world. Under the volcano. Recent studies on thymidylate synthase*. Ann N Y Acad Sci, 1989. **569**: p. 201-10.
8. MacFarlane, A.J., et al., *Nuclear localization of de novo thymidylate biosynthesis pathway is required to prevent uracil accumulation in DNA*. J Biol Chem, 2011. **286**(51): p. 44015-22.
9. Yoshioka, A., et al., *Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-Fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death*. J Biol Chem, 1987. **262**(17): p. 8235-41.
10. Meyers, M., et al., *A role for DNA mismatch repair in sensing and responding to fluoropyrimidine damage*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7376-88.
11. Elstein, K.H., et al., *Nucleoside-mediated mitigation of 5-fluorouracil-induced toxicity in synchronized murine erythroleukemic cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 1997. **146**(1): p. 29-39.
12. Canman, C.E., et al., *Resistance to fluorodeoxyuridine-induced DNA damage and cytotoxicity correlates with an elevation of deoxyuridine triphosphatase activity and failure to accumulate deoxyuridine triphosphate*. Cancer Res, 1993. **53**(21): p. 5219-24.
13. Wilson, P.M., et al., *Inhibition of dUTPase induces synthetic lethality with thymidylate synthase-targeted therapies in non-small cell lung cancer*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(3): p. 616-28.
14. Grogan, B.C., et al., *Effect of the thymidylate synthase inhibitors on dUTP and TTP pool levels and the activities of DNA repair glycosylases on uracil and 5-fluorouracil in DNA*. Biochemistry, 2011. **50**(5): p. 618-27.
15. Wilson, P.M., et al., *Novel opportunities for thymidylate metabolism as a therapeutic target*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(9): p. 3029-37.
16. Pettersen, H.S., et al., *UNG-initiated base excision repair is the major repair route for 5-fluorouracil in DNA, but 5-fluorouracil cytotoxicity depends mainly on RNA incorporation*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(19): p. 8430-44.

17. Fenech, M., *Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity*. Mutat Res, 2012. **733**(1-2): p. 21-33.
18. Blount, B.C. and B.N. Ames, *DNA damage in folate deficiency*. Baillieres Clin Haematol, 1995. **8**(3): p. 461-78.
19. Chen, V.J., et al., *Preclinical cellular pharmacology of LY231514 (MTA): a comparison with methotrexate, LY309887 and raltitrexed for their effects on intracellular folate and nucleoside triphosphate pools in CCRF-CEM cells*. Br J Cancer, 1998. **78 Suppl 3**: p. 27-34.
20. Oliver, F.J., M.K. Collins, and A. Lopez-Rivas, *Overexpression of a heterologous thymidine kinase delays apoptosis induced by factor deprivation and inhibitors of deoxynucleotide metabolism*. J Biol Chem, 1997. **272**(16): p. 10624-30.
21. Tinkelenberg, B.A., M.J. Hansbury, and R.D. Ladner, *dUTPase and uracil-DNA glycosylase are central modulators of antifolate toxicity in Saccharomyces cerevisiae*. Cancer Res, 2002. **62**(17): p. 4909-15.
22. 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.
23. Tye, B.K., et al., *Uracil incorporation: a source of pulse-labeled DNA fragments in the replication of the Escherichia coli chromosome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(1): p. 233-7.
24. Gadsden, M.H., et al., *dUTP pyrophosphatase is an essential enzyme in Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J, 1993. **12**(11): p. 4425-31.
25. Erdelyi, P., et al., *Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in Caenorhabditis elegans*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 9): p. 1510-8.
26. Castillo-Acosta, V.M., et al., *Increased uracil insertion in DNA is cytotoxic and increases the frequency of mutation, double strand break formation and VSG switching in Trypanosoma brucei*. DNA Repair (Amst), 2012. **11**(12): p. 986-95.
27. Dubois, E., et al., *Homologous recombination is stimulated by a decrease in dUTPase in Arabidopsis*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18658.
28. Pecs, I., et al., *The dUTPase enzyme is essential in Mycobacterium smegmatis*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37461.
29. Tinkelenberg, B.A., et al., *Identification of sequence determinants of human nuclear dUTPase isoform localization*. Experimental cell research, 2003. **287**(1): p. 39-46.
30. Rona, G., et al., *Phosphorylation in the vicinity of the nuclear localization signal of human dUTPase abolishes nuclear import: structural and mechanistic insights*. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 2013. **D69** in press.
31. Ladner, R.D., et al., *dUTP nucleotidohydrolase isoform expression in normal and neoplastic tissues: association with survival and response to 5-fluorouracil in colorectal cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3493-503.
32. Grasser, F.A., et al., *dUTPase in human neoplastic cells as a potential target for therapeutic intervention*. Curr Protein Pept Sci, 2001. **2**(4): p. 349-60.
33. Muha, V., et al., *Uracil-containing DNA in Drosophila: stability, stage-specific accumulation, and developmental involvement*. PLoS Genet, 2012. **8**(6): p. e1002738.
34. Merenyi, G., et al., *Cellular response to efficient dUTPase RNAi silencing in stable HeLa cell lines perturbs expression levels of genes involved in thymidylate metabolism*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2011. **30**(6): p. 369-90.
35. Pugacheva, E.N., et al., *Novel gain of function activity of p53 mutants: activation of the dUTPase gene expression leading to resistance to 5-fluorouracil*. Oncogene, 2002. **21**(30): p. 4595-600.

36. Canman, C.E., et al., *Induction of resistance to fluorodeoxyuridine cytotoxicity and DNA damage in human tumor cells by expression of Escherichia coli deoxyuridinetriphosphatase*. Cancer Res, 1994. **54**(9): p. 2296-8.
37. Merenyi, G., E. Konya, and B.G. Vertessy, *Drosophila proteins involved in metabolism of uracil-DNA possess different types of nuclear localization signals*. FEBS J, 2010. **277**(9): p. 2142-56.
38. Webley, S.D., et al., *Deoxyuridine triphosphatase (dUTPase) expression and sensitivity to the thymidylate synthase (TS) inhibitor ZD9331*. Br J Cancer, 2000. **83**(6): p. 792-9.
39. Studebaker, A.W., et al., *Modulation of human dUTPase using small interfering RNA*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **327**(1): p. 306-10.
40. Koehler, S.E. and R.D. Ladner, *Small interfering RNA-mediated suppression of dUTPase sensitizes cancer cell lines to thymidylate synthase inhibition*. Mol Pharmacol, 2004. **66**(3): p. 620-6.
41. Hofer, A., et al., *DNA building blocks: keeping control of manufacture*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2012. **47**(1): p. 50-63.
42. Mathews, C.K., *DNA precursor metabolism and genomic stability*. FASEB J, 2006. **20**(9): p. 1300-14.
43. Kumar, D., et al., *Highly mutagenic and severely imbalanced dNTP pools can escape detection by the S-phase checkpoint*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(12): p. 3975-83.
44. Zhang, X. and C.K. Mathews, *Natural DNA precursor pool asymmetry and base sequence context as determinants of replication fidelity*. J Biol Chem, 1995. **270**(15): p. 8401-4.
45. Bebenek, K., J.D. Roberts, and T.A. Kunkel, *The effects of dNTP pool imbalances on frameshift fidelity during DNA replication*. J Biol Chem, 1992. **267**(6): p. 3589-96.
46. Meyers, M., et al., *DNA mismatch repair-dependent response to fluoropyrimidine-generated damage*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5516-26.
47. Lee, H.W., B.N. Dominy, and W. Cao, *New family of deamination repair enzymes in uracil-DNA glycosylase superfamily*. J Biol Chem, 2011. **286**(36): p. 31282-7.
48. Wang, Z. and D.W. Mosbaugh, *Uracil-DNA glycosylase inhibitor gene of bacteriophage PBS2 encodes a binding protein specific for uracil-DNA glycosylase*. J Biol Chem, 1989. **264**(2): p. 1163-71.
49. Jacobs, A.L. and P. Schar, *DNA glycosylases: in DNA repair and beyond*. Chromosoma, 2012. **121**(1): p. 1-20.
50. Nemec, A.A., S.S. Wallace, and J.B. Sweasy, *Variant base excision repair proteins: contributors to genomic instability*. Semin Cancer Biol, 2010. **20**(5): p. 320-8.
51. Germann, M.W., C.N. Johnson, and A.M. Spring, *Recognition of damaged DNA: structure and dynamic markers*. Med Res Rev, 2012. **32**(3): p. 659-83.
52. Warner, H.R., et al., *Synthesis and metabolism of uracil-containing deoxyribonucleic acid in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1981. **145**(2): p. 687-95.
53. Parsels, L.A., et al., *Mechanism and pharmacological specificity of dUTPase-mediated protection from DNA damage and cytotoxicity in human tumor cells*. Cancer Chemother Pharmacol, 1998. **42**(5): p. 357-62.
54. Williams, D., et al., *Evidence for a second messenger function of dUTP during Bax mediated apoptosis of yeast and mammalian cells*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(2): p. 315-21.
55. Wang, Z. and D.W. Mosbaugh, *Uracil-DNA glycosylase inhibitor of bacteriophage PBS2: cloning and effects of expression of the inhibitor gene in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1988. **170**(3): p. 1082-91.

56. Chien, C.Y., C.K. Chou, and J.Y. Su, *Ung1p-mediated uracil-base excision repair in mitochondria is responsible for the petite formation in thymidylate deficient yeast*. FEBS Lett, 2009. **583**(9): p. 1499-504.
57. Kumar, S., et al., *Anticancer drug 5-fluorouracil induces reproductive and developmental defects in Caenorhabditis elegans*. Reprod Toxicol, 2010. **29**(4): p. 415-20.
58. 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.
59. Fischer, J.A., S. Muller-Weeks, and S.J. Caradonna, *Fluorodeoxyuridine modulates cellular expression of the DNA base excision repair enzyme uracil-DNA glycosylase*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8829-37.
60. Li, L., et al., *Determination of apoptosis, uracil incorporation, DNA strand breaks, and sister chromatid exchanges under conditions of thymidylate deprivation in a model of BER deficiency*. Biochem Pharmacol, 2005. **70**(10): p. 1458-68.
61. Liu, A., et al., *The mismatch repair-mediated cell cycle checkpoint response to fluorodeoxyuridine*. J Cell Biochem, 2008. **105**(1): p. 245-54.
62. Geng, L., et al., *Checkpoint signaling, base excision repair, and PARP promote survival of colon cancer cells treated with 5-fluorodeoxyuridine but not 5-fluorouracil*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28862.
63. Roos, W.P. and B. Kaina, *DNA damage-induced cell death by apoptosis*. Trends Mol Med, 2006. **12**(9): p. 440-50.
64. Moldovan, G.L. and A.D. D'Andrea, *How the fanconi anemia pathway guards the genome*. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 223-49.
65. Smith, J., et al., *The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer*. Adv Cancer Res, 2010. **108**: p. 73-112.
66. Eimon, P.M. and A. Ashkenazi, *The zebrafish as a model organism for the study of apoptosis*. Apoptosis, 2010. **15**(3): p. 331-49.
67. Dengg, M., et al., *Abrogation of the CLK-2 checkpoint leads to tolerance to base-excision repair intermediates*. EMBO Rep, 2006. **7**(10): p. 1046-51.
68. Das, K.C. and R. Dashnamoorthy, *Hyperoxia activates the ATR-Chk1 pathway and phosphorylates p53 at multiple sites*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **286**(1): p. L87-97.
69. Hernandez-Vargas, H., et al., *Transcriptional profiling of MCF7 breast cancer cells in response to 5-Fluorouracil: relationship with cell cycle changes and apoptosis, and identification of novel targets of p53*. Int J Cancer, 2006. **119**(5): p. 1164-75.
70. Shirasaki, T., et al., *Effects of small interfering RNA targeting thymidylate synthase on survival of ACC3 cells from salivary adenoid cystic carcinoma*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 348.
71. Xiao, Z., et al., *A novel mechanism of checkpoint abrogation conferred by Chk1 downregulation*. Oncogene, 2005. **24**(8): p. 1403-11.
72. Yang, Z., A.S. Waldman, and M.D. Wyatt, *DNA damage and homologous recombination signaling induced by thymidylate deprivation*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(8): p. 987-96.
73. Longley, D.B., et al., *The role of thymidylate synthase induction in modulating p53-regulated gene expression in response to 5-fluorouracil and antifolates*. Cancer Res, 2002. **62**(9): p. 2644-9.
74. Wagner, M.W., et al., *Role of c-Abl kinase in DNA mismatch repair-dependent G2 cell cycle checkpoint arrest responses*. J Biol Chem, 2008. **283**(31): p. 21382-93.

75. Wang, X., et al., *A positive role for c-Abl in Atm and Atr activation in DNA damage response*. Cell Death Differ, 2011. **18**(1): p. 5-15.
76. Webley, S.D., et al., *The ability to accumulate deoxyuridine triphosphate and cellular response to thymidylate synthase (TS) inhibition*. Br J Cancer, 2001. **85**(3): p. 446-52.
77. Ravi, D., et al., *A network of conserved damage survival pathways revealed by a genomic RNAi screen*. PLoS Genet, 2009. **5**(6): p. e1000527.
78. Urnov, F.D., et al., *Genome editing with engineered zinc finger nucleases*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(9): p. 636-46.
79. Pan, Y., et al., *Biological and biomedical applications of engineered nucleases*. Mol Biotechnol, 2013. **55**(1): p. 54-62.
80. Orlando, S.J., et al., *Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(15): p. e152.
81. Miller, J.C., et al., *A TALE nuclease architecture for efficient genome editing*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(2): p. 143-8.
82. Xiao, A., et al., *Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(14): p. e141.
83. Deveau, H., J.E. Garneau, and S. Moineau, *CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions*. Annu Rev Microbiol, 2010. **64**: p. 475-93.
84. Fu, Y., et al., *High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(9): p. 822-6.
85. Gaj, T., C.A. Gersbach, and C.F. Barbas, 3rd, *ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering*. Trends Biotechnol, 2013. **31**(7): p. 397-405.
86. Qin, J.Y., et al., *Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10611.
87. Ghosh, K. and G.D. Van Duyne, *Cre-loxP biochemistry*. Methods, 2002. **28**(3): p. 374-83.
88. Lim, P.S., et al., *Distribution and specific identification of papillomavirus major capsid protein epitopes by immunocytochemistry and epitope scanning of synthetic peptides*. J Infect Dis, 1990. **162**(6): p. 1263-9.
89. Shevtsova, Z., et al., *Evaluation of epitope tags for protein detection after in vivo CNS gene transfer*. Eur J Neurosci, 2006. **23**(8): p. 1961-9.
90. de Felipe, P., et al., *E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein*. Trends Biotechnol, 2006. **24**(2): p. 68-75.
91. Holst, J., et al., *Rapid analysis of T-cell selection in vivo using T cell-receptor retrogenic mice*. Nat Methods, 2006. **3**(3): p. 191-7.
92. Hackett, E.A., et al., *A family of destabilized cyan fluorescent proteins as transcriptional reporters in S. cerevisiae*. Yeast, 2006. **23**(5): p. 333-49.
93. Li, X., et al., *Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter*. J Biol Chem, 1998. **273**(52): p. 34970-5.
94. Kitsera, N., A. Khobta, and B. Epe, *Destabilized green fluorescent protein detects rapid removal of transcription blocks after genotoxic exposure*. Biotechniques, 2007. **43**(2): p. 222-7.
95. Corish, P. and C. Tyler-Smith, *Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells*. Protein Eng, 1999. **12**(12): p. 1035-40.
96. Douin, V., et al., *Use and comparison of different internal ribosomal entry sites (IRES) in tricistronic retroviral vectors*. BMC Biotechnol, 2004. **4**: p. 16.
97. Martin, P., et al., *Development of a new bicistronic retroviral vector with strong IRES activity*. BMC Biotechnol, 2006. **6**: p. 4.

98. Cole, C.N. and T.P. Stacy, *Identification of sequences in the herpes simplex virus thymidine kinase gene required for efficient processing and polyadenylation*. Mol Cell Biol, 1985. **5**(8): p. 2104-13.
99. Loonstra, A., et al., *Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 9209-14.
100. Baba, Y., et al., *Practical range of effective dose for Cre recombinase-expressing recombinant adenovirus without cell toxicity in mammalian cells*. Microbiol Immunol, 2005. **49**(6): p. 559-70.
101. Feil, R., et al., *Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **237**(3): p. 752-7.
102. Jullien, N., et al., *Use of ERT2-iCre-ERT2 for conditional transgenesis*. Genesis, 2008. **46**(4): p. 193-9.
103. Buelow, B. and A.M. Scharenberg, *Characterization of parameters required for effective use of tamoxifen-regulated recombination*. PLoS One, 2008. **3**(9): p. e3264.
104. Borovinskaya, M.A., et al., *Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis*. RNA, 2008. **14**(8): p. 1590-9.
105. Hart, R.P., et al., *Definition of essential sequences and functional equivalence of elements downstream of the adenovirus E2A and the early simian virus 40 polyadenylation sites*. Mol Cell Biol, 1985. **5**(11): p. 2975-83.
106. de las Alas, M.M., et al., *Loss of DNA mismatch repair: effects on the rate of mutation to drug resistance*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(20): p. 1537-41.
107. Koi, M., et al., *Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation*. Cancer Res, 1994. **54**(16): p. 4308-12.
108. Gresch, O., et al., *New non-viral method for gene transfer into primary cells*. Methods, 2004. **33**(2): p. 151-63.