

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék



Csipak Brigitta

Nikkel(II)-ionok okozta fehérjehidrolízis tanulmányozása cinkujj fehérjékben

Tudományos Diákköri Dolgozat
Vegyész Msc II. évf.

Témavezető: Dr. Gyurcsik Béla
2014

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Cink és biokémiája.....	5
2.2. Nikkel és biokémiája.....	6
2.3. Cinkujj fehérjék.....	7
2.4. A Zinc Finger Tools program	9
2.5. A cinkujj fehérjék specifikusságának vizsgálata	10
2.6. Az ATCUN motívum (Amino Terminal Copper(II)- and Nickel(II)-Binding)	11
2.7. Cinkujj fehérjék Ni^{2+} -ionnal előidézett hasadása.....	13
3. Célkitűzés	15
4. Kísérleti módszerek.....	16
4.1. Alkalmazott pufferek.....	16
4.2. Polimeráz láncreakció	16
4.3. Helyspecifikus mutagenézis.....	17
4.4. Transzformálás	18
4.5. TENS.....	19
4.6. Agaróz gélelektroforézis	19
4.7. A fehérjék kifejezése és tisztítása.....	20
4.8. Tricin SDS és Natív poliakrilamid gélelektroforézis	20
4.9. Nagyteljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC).....	21
4.10. Tömegspektrometria (MS).....	22
5. Kísérleti eredmények és értékelésük	24
5.1. Mutáns fehérje tervezése.....	24
5.2. A cinkujj fehérjék specifikus célszekvenciájának kialakítása	26
5.3. Fehérje hidrolízisére irányuló kísérletek – pH 8,2.....	26
5.4. Fehérje hidrolízisére irányuló kísérletek – pH 7,4.....	32
5.5. A fehérjék hidrolízisének vizsgálata nukleinsav jelenlétében:	32
6. Összefoglalás.....	35
7. Irodalomjegyzék.....	37

Az alkalmazott rövidítések listája

HEPES: 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etánszulfonsav

dNTP: dezinukleotid

TENS: 1× TE puffer, mely 0,1 M NaOH-t és 0,5% SDS-t tartalmaz

TE: 10 mM Tris-Cl, pH 7.5. 1 mM EDTA

IPTG: izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid

PBS: **P**hosphate **b**uffered **s**aline; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄

APS: ammónium-perszulfát

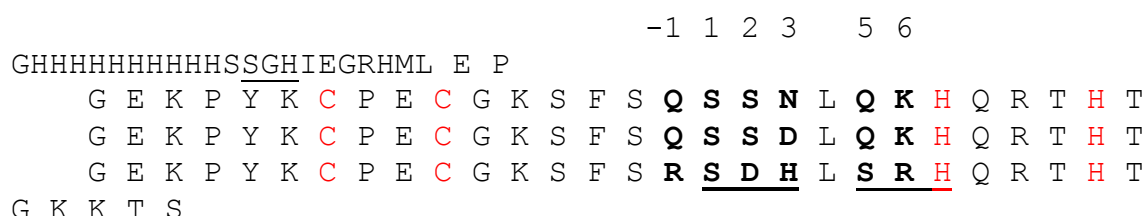
TEMED: tetrametil-etiléndiamin

1. Bevezetés

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

Egy egyszerűbb módja lehet ilyen mesterséges nukleázok kialakításának az, ha a cinkujj fehérje specifikus DNS-kötő tulajdonságát és az ún. ATCUN (Amino Terminal Copper(II)- and Nickel(II)-binding) NH_2-XXH- N-terminális peptidszekvencia DNS roncsoló hatását kombináljuk. Az ATCUN motívumot először albuminfehérjékben fedezték fel, majd később kiderült, hogy sok más élő szervezetben előforduló molekulában is megtalálható (pl. transzkripciós faktorokban). Ez a szekvencia nagy affinitással képes megkötni réz(II)- és nikkel(II)-ionokat egy síknégyszetes komplex kialakulása közben. Ilyen komplex a fémionok által előidézett peptidkötés hasítással is kialakítható. Kimutatták ugyanis, hogy a fenti fémionok – elsősorban a nikkel(II) – az $X-(S/T)XHX-$ szekvenciában a szerin/treonin N-terminális vége felőli peptidkötést

Kutatócsoportunkban korábban már tanulmányozták az 1MEY cinkujj fehérjét, melynek aminosav sorrendje az 1.1. ábrán látható. [2]



A fehérje három ujjrészből épül fel, melyek egyenként három-három bázist ismernek fel a célszekvencián, és tartalmaz három olyan helyet, amit a Ni^{2+} -ionok elhasíthatnak. Tudományos diákköri munkám során olyan mesterséges metallonukleáz előállításához szükséges alap kialakítását tűztem ki célul, amely a fent ismertetett fehérje specifikus DNS kötő tulajdonságán és Ni^{2+} -ionokkal előidézett hidrolízisén alapszik. Mivel a síknégyszetes komplex kialakulása párhuzamosan történik egy, a közelben levő peptidkötés elhasadásával, ezért olyan mutáns fehérjét is terveztem, amiben megszüntettük a harmadik ujjban levő hasítási helyeket. A két fehérjével párhuzamos kísérleteket végeztem, melyek során vizsgáltam a Ni^{2+} -ionok okozta hidrolízist nukleinsav jelenlétében és anélkül is.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Cink és biokémiája

A cink (Zn, [Ar]3d¹⁰) kékes-fehér színű, csillogó átmenetifém. Rendszáma 30, a periódusos rendszer 12. csoportjában helyezkedik el. Véltetően Paracelsus nevezte el a német Zinke szó után, ami hegyes, kristályos megjelenésére utal. Tiszta formában könnyen megmunkálható, leggyakrabban ötvözetekben és szárazelemek gyártására használják fel. Vizes közegben kizárólag +2-es oxidációs állapotban fordul elő. A Zn²⁺-ionra, a telített d alhéj miatt nem jellemzők a redoxi átalakulások. Változatos koordinációs szám és geometria jellemző rá. Affinitása az O, N vagy S donoratomokhoz hasonló, fehérjékben leggyakrabban a His, Cys, Asp és Glu oldalláncaihoz kötődik. A fehérjék szerkezetének alakításán túl enzimek aktív centrumában is megtalálható. Katalitikus központokban általában három aminosavhoz és egy vízmolekulához koordinálódik. Ilyen környezetben Lewis-savként viselkedik, növeli a koordinált vízmolekula savas jellegét. Az ily módon aktivált vízmolekula közvetlenül részt vehet a katalitikus folyamatban. Ugyanakkor a szubsztrát megkötődése is történhet a vízmolekulával történő kicserélődéssel. A pozitív töltésű fémion elektrosztatikusan aktiválja a szubsztrátot. Mindez jellemző a peptidázokra, észterázokra, nukleázokra és foszfolipázokra. A Zn²⁺-ion ritkábban megtalálható oxidoreduktázokban is (pl. Cu-Zn szuperoxid dizmutáz, alkohol dehidrogenáz), de ilyenkor a redoxireakció lejátódásához egyéb kofaktorok szükségesek. [3] Ugyanakkor fontos szerepe van az intra- és intercelluláris jelátvitelben is.

A cink az emberi szervezet számára létfontosságú elem, toxikus hatása nagyobb dózisok esetén sem ismeretes. Hiánya növekedési rendellenességeket, késleltetett nemi érést, fertőzésekre való hajlamosságot (pl. tüdőgyulladás) is okozhat. A cinkhiányt, mint betegséget először az 1960-as években figyelték meg Egyiptomban és Iránban gyakori felnőttkori törpeség és gyermekkori növekedési rendellenesség formájában. [4] Korábban már ismert volt, a cink fontos szerepe a peptidhormonok felszabadításában, és nagy koncentrációja a növényi pollenekben, de csak 1983-ban sikerült kimutatni egy DNS-kötő transzkripciós faktorban (TFIIIA). A DNS-t szabályozó cinktartalmú metalloproteinek egy családját az úgynevezett cinkujj fehérjék alkotják, melyek a Zn²⁺-ion által kialakított újszerűen feltekeredett szerkezetükről kapták a nevüket. Egy ilyen fehérje rendszerint több ujjból áll, melyekben a fémionok megkötődésének lehetőségét

ciszteinek kén és hisztidinek nitrogén donoratomjai biztosítják. Az egyes ujjakban jól megőrzött helyzetben aromás gyűrűt tartalmazó aminosavak (fenilalanin, tirozin) találhatóak. Ezen oldalláncok révén képesek a cinkujj fehérjék a DNS-sel szekvencia-specifikus kölcsönhatásokat kialakítani a DNS nagyárbában. [5] E fehérjékhez egyéb funkcionális (pl. endonukleáz) domént fűzve mesterséges cinkujj enzimek alakíthatók ki. A cinkujj nukleázokkal a DNS tetszőlegesen kiválasztott bázisszekvenciánál történő hasítása érhető el. Az ilyen enzimek a géntechnológiában, vagy genetikai betegségek gyógyításában nyithatnak új távlatokat.

2.2. Nikkel és biokémiája

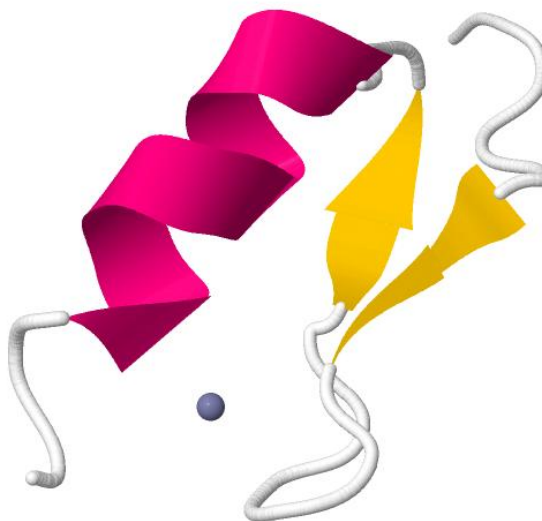
A 28-as rendszámú nikkell (Ni , $[\text{Ar}] 4s^2 3d^8$), a periódusos rendszer 10. oszlopában található, ezüstfehér színű átmenetifém. A földkéreg 0,0016%-át teszi ki, ami több, mint a réz, cink és ólom együttes mennyisége. Öt oxidációs állapota ismert (0, +1, +2, +3 és +4), melyek közül biológiai szempontból elsősorban a +2-es jelentős. A Ni^{2+} komplexei 4-6-os koordinációs számmal jellemezhetők, melyekhez tetraédes vagy síknégyszetes, tetragonális piramisos, illetve oktaédes geometria társul. A nikkell és vegyületei toxikusak az emberi szervezet számára. A nikkellmérgezés fő típusai: (i) Legközismertebb a nikkell allergia bőrön keresztüli és orális érintkezés által. Köztudottan a nikkell az egyik legfőbb előidézője a kontakt bőrirritációnak (ACD), ami átlagosan hat emberből egyet érint. Nőknél négyszer gyakrabban fordul elő, mint férfiaknál, a korábbi és gyakoribb nikkellel való érintkezés következtében (pl. bizsu ékszerek, övcsatok). [3] (ii) Karcinogén hatás a légzőszervekben a nikkell vegyületek hosszú távú inhalációja következtében. (iii) Akut mérgezés beléggzéssel vagy szájon át, amit főleg a nikkell-tetrakarbonil $[\text{Ni}(\text{CO})_4]$ okoz.

Közel egy évtizeddel ezelőtt fedezték fel, hogy a Ni^{2+} -ionok képesek a peptidkötés hasítására. A H2A hisztonfehérje vizsgálata során a C-terminális H2A oktapeptid lehasadt, és a hasadás utáni termék jelenléte rákos sejtvonulatok megjelenését idézte elő a vizsgált kultúrában. Később megállapították, hogy a hidrolízis az $\text{Aaa}(\text{Ser/Thr})\text{-Xaa-His-Zaa}$ aminosav-szekvencia jelenlétében játszódik le. A reakció során a Ser/Thr és az azt megelőző aminosav közötti peptidkötés hasad el. Ugyanakkor a kialakuló síknégyszetes nikkell-komplex DNS roncsolására is képes lehet.

2.3. Cinkujj fehérjék

Az élő szervezetben a cinkujj fehérjék a nukleinsavak specifikus szekvenciáinak felismerésében vesznek részt. A cinkujj fehérjedoménokat először transzkripciós faktorokban mutatták ki, melyek az élő sejtekben a gének aktiválását és inaktiválását szabályozzák. Ebből kiindulva mesterségesen előállított cinkujj fehérjék is alkalmasak lehetnek terápiás génszabályozásra. [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12]

Egy cinkujj domén általános aminosav szekvenciája a következőképpen írható fel: (Tyr,Phe)-X-Cys-X_{2,4}-Cys-X₃-Phe-X₅-Leu-X₂-His-X₃₋₅-His [13] Egy ilyen domént két antiparallel β -redő és egy α -hélix alkot (2.1. ábra). A Zn^{2+} -ion a β -redőn található két cisztein, és az α -hélixen található két hisztidin oldalláncainak donoratomjaihoz koordinálódik. A funkcionális szerkezet kialakulásához elengedhetetlen a fémion megkötése, azonban toxikus fémionok is kerülhetnek a Zn^{2+} -ion helyére, ami a szerkezet megváltozását idézi elő a fehérjében.



2.1. ábra: Egy cinkujj domén szerkezete Jmol programmal ábrázolva [Pdb kód: 1MEY]
Rózsaszínnel az α -hélix, sárgával a két antiparallel β -redő, kékkel a Zn^{2+} -ion látható.

A Cys2-His2 családba tartozó cinkujj fehérjék aminosav szekvenciájának vizsgálata során a fehérje-DNS kölcsönhatás szabályszerűségeire bukkantak a kutatók. A fehérje minden cinkujj doménje a DNS-en levő felismerési helyen egy-egy kisebb egységgel lép kölcsönhatásba. Az ismeretek bővítéséhez hozzájárult a Zif268 cinkujj

fehérje DNS-sel alkotott komplexének kristályszerkezete. Megállapították, hogy: (1) egy cinkujj domén három bázispárral alakít ki specifikus kölcsönhatást a DNS nagyárcában a másik domén közvetlen szomszédságában; (2) a fehérje-DNS szekvenciaspecifikus kölcsönhatásokat minden cinkujj domén α -hélixének kezdetétől számított -1,2,3 és 6-os helyzetben levő aminosavai határozzák meg; (3) a fehérje legtöbb esetben csak a DNS egyik szálával kerül kölcsönhatásba; (4) a DNS megközelítőleg B-formát vesz fel, de szerkezete enyhén torzult, ami csökkent helikális csavarban és kiterjedtebb nagyárokban nyilvánul meg. Ezt az egyszerű képet árnyalta a számos további cinkujj fehérje-DNS komplex szerkezetének meghatározása röntgendiffrakciós módszerrel. Ezek alapján ma elsősorban az α -hélix kezdetéhez viszonyított -1, 1, 2, 3, 5 és 6 aminosavakat tartják felelősnek a specifikus DNS kötésért, ugyanakkor a β -kanyarban levő aminosavak minősége is befolyásolja a cinkujj fehérjék DNS kötő sajátságait [14, 15]. Ezek változtatásával tetszőleges DNS szekvenciát specifikusan megcélozhatunk elegendő cinkujj doménból összefűzött fehérjével. Specifikus cinkujj fehérjék tervezése azonban nem könnyű feladat. Figyelembe kell venni az összekötő szekvenciát is az egyes ujjak között [16, 17]. Ezen fehérjék tervezésekor korábbi kísérleti eredményeket [18, 19, 20], már ismert tulajdonságú cinkujj fehérjékből álló könyvtárakat [21, 22], vagy közvetlen affinitás alapú kiválasztási módszereket - mint pl. a fág-, riboszóma vagy mRNS könyvtárak - használnak fel. A cinkujjak nagyszámú variációs lehetőségei miatt egyedi cinkujj doméneket elsősorban a fenti módszerek ötvözésével, *de novo* tervezik meg. Az így nyert doméneket ezután kombinálhatjuk a kiválasztott célszekvenciának megfelelően. [23, 24] Az összefűzött cinkujj domének erősíthetik, vagy gyengíthetik egymás kölcsönhatását a DNS-sel. [25] Habár több mint négy ujjból álló cinkujj fehérjék is megtalálhatók a természetben, az ezekben fellépő szerkezeti feszülések csökkenthetik a DNS-sel alkotott komplexeik stabilitását. A feszülés elkerülése érdekében a hat ujjat tartalmazó fehérjéket összekötő szekvenciákkal látták el, melyek a két, három ujjból álló rész között találhatók. Az így létrehozott fehérjék nem folytonos célszekvenciák felismerésére képesek, és az összekötő szakasz szerepet kaphat, pl. a megkötött DNS hasításában.

A cinkujj fehérjék specifikussága kritikus pontja azok terápiás alkalmazásának. Így elengedhetlenné válik, hogy jobban megértsük e fehérjék és a DNS közötti

kölcsönhatásokat. Ebből a célból folyamatosan bővülő adatbázisokat és programokat hoznak létre. Újabban a bioinformatikát és az elméleti számításokat is alkalmazzák, beleértve a dokkolási kísérleteket, molekuláris dinamikát és szemiempirikus számításokat, hogy kiegészítsék a kísérleti eredményeket. Programok, melyek cinkujj fehérjék tervezésében nyújtanak segítséget:

-ZiFiT (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/>)

-Zinc Finger Tools (<http://www.scripps.edu/mb/barbas/zfdesign/zfdesignhome.php>)

-FoldX (<http://foldx.crg.es/>).

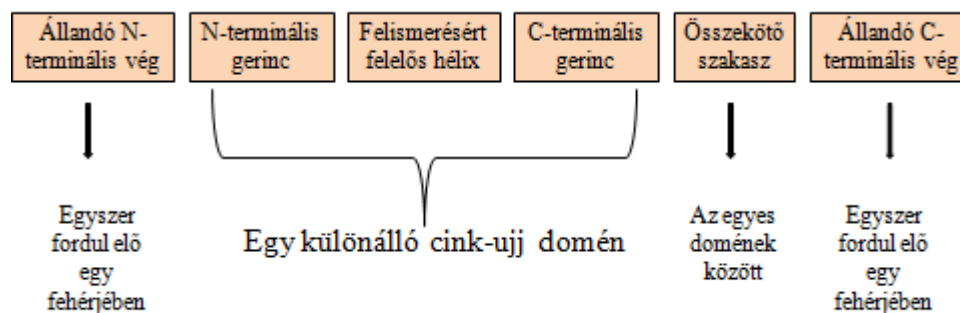
2.4. A Zinc Finger Tools program

A cinkujj fehérjék tervezésének területén kitűzött egyik cél az, hogy a cinkujj domének olyan tárházát hozzák létre, melyben megtalálhatók mind a 64 lehetséges DNS bázishármaszt nagy specifikussággal és affinitással felismerő cinkujj domének. Mindehhez az affinitás-alapú fág-könyvtárak tanulmányozásából származó eredményeket, szerkezeti becsléseket és a természetben is előforduló cinkujj doméneket vették alapul. A kiválasztott cinkujj domének összefűzése során kialakított fehérjével szemben alapvető követelmény, hogy képes legyen felismerni 9-18 bázispár hosszúságú DNS szakaszokat, megtartva az egyes ujjak affinitását és specifikusságát. Figyelembe kell venni azt is, hogy a cinkujj fehérjék N-terminális vége a DNS célszekvencia 3' végéhez kötődik.

Míg korábban csak erre specializálódott laboratóriumokban tudtak a cinkujjak ígéretes technológiájával foglalkozni, ma már kereskedelmi forgalomban is beszerezhetők a tervezett fehérjék. Sajnos a sikeres tervezés ennek ellenére nem triviális. A fő probléma a cinkujj domének összekapcsolása oly módon, hogy ne befolyásolják egymás DNS kötő sajátságait. Ez elsősorban az összekötő szekvenciák optimalizálásán múlik, amit a jelenleg rendelkezésre álló programok nem vesznek figyelembe.

A Zinc-Finger Tools program a lehetséges DNS célszekvenciák azonosítását, és egy adott kötőhelyhez vélhetően specifikusan kapcsolódni képes cinkujj fehérje aminosav sorrendjének megtervezését segíti. A cinkujj domének gerincét alkotó szekvencia megalkotásához egy a Cys2-His2 cinkujj fehérjék családjába tartozó

fehérjét, a humán transzkripciós faktor SP1-et és a Zif268 transzkripciós faktort veszi alapul. A cinkujj domén N-terminális végén található, β -redőt alkotó, YKCPECGKSFS aminosavakat (a β -redő aláhúzva) és a C-terminális végén elhelyezkedő α -hélixen levő HQRTH aminosavakat ebből a fehérjéből kölcsönözték. Az ujjakat összekötő szekvencia (TGEKP) a Transzkripciós Faktor adatbázisban meglévő információkból létrehozott konszenzus szekvencia. A cinkujj fehérjék ily módon történő felépítését a 2.2. ábra mutatja be.



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

A programmal folytonos – egy szálon levő megszakítás nélküli bázistriplettek sora - és különálló célszekvenciákat is módunkban áll keresni. A kereséshez meg kell adni egy minimális hosszúságot bázispárban mérve. Különálló célszakaszok keresésekor a megadott hosszúság felének megfelelő hosszúságú szakaszokat fog keresni a program úgy, hogy azok egy a felhasználó által kiválasztott „maggal” legyenek elválasztva, melyhez nem kötődik cinkujj fehérje. Fel is térképezhetjük az összes, a felhasználó által megadott DNS szekvencián levő cinkujj fehérjékkel megcélozható szakaszt. Mivel ezek között átfedés lehetséges, ez a funkció csak a célszekvenciák összességének vázolására alkalmas, nem feltétlenül mutatja meg az egyes különálló célszekvenciákat. [26]

2.5. A cinkujj fehérjék specifikusságának vizsgálata

A cinkujj – DNS kölcsönhatás specifikusság vizsgálatának egy módja, hogy a cinkujj fehérjét egy enzimátikus egységgel kapcsoljuk össze. Ennek alapján cinkujjakhoz a FokI restrikciós endonukleáz nukleáz doménjét fűzve ún. kimer mesterséges nukleázokat állítottak elő. Ily módon az enzimátikus hasítás specifikusságából következtethettek a DNS kötés specifikusságára. Mivel a metalloenzimek dimerként működnek, heterodimer (azaz két különböző cinkujj fehérjét

tartalmazó enzim dimerje) formájában hosszabb DNS szekvenciát ismernek fel. Így, pl. a sejtekben kifejtett toxikus hatást, mint mellékhatást csökkenteni lehet a heterodimer képződését elősegítő változtatásokkal a FokI dimerizációs felületen. E célból számítógépes modellezést követően néhány megváltoztatott FokI dimerizációs felülettel rendelkező mesterséges cinkujj nukleáz állítottak elő, és tesztrendszereken vizsgálták tulajdonságaikat a következőképpen: kétféle tisztított cinkujj nukleáz fehérjét olyan DNS fragmensekkel inkubálták, melyek közül az egyik csak az egyik cinkujj fehérje, a másik csak a másik fehérje két kötőhelyét tartalmazta, a harmadikban pedig vegyes kötőhelyet alakítottak ki. Utóbbi kötőhelyen heterodimerek képződhettek, míg az előző kettőn homodimerek. Az inkubálás után a hasítás eredményét agaróz gélen ellenőrizték. Azt tapasztalták, hogy önállóan egyik cinkujj nukleáz sem hasította a DNS-t a másik homodimer, illetve a heterodimer kialakítására alkalmas kötőhelyeken. Azonban a citotoxikus hatást így sem sikerült teljesen megszüntetni. A DNS hasítással a sejtekben ún. homológ rekombináció indukálható, ami DNS javító mechanizmusok egyik fajtája. [27] Ennek segítségével *in vivo* is ellenőrizték a reakció lejárásodását. Tudnunk kell azonban, hogy a dimerizáció követelménye azt eredményezi, hogy az ilyen tesztrendszerekben csak a dimerek, de nem az egyes cinkujjak DNS kötésének specifikusságára, kapunk információt.

2.6. Az ATCUN motívum (Amino Terminal Copper(II)- and Nickel(II)-Binding)

Az amino-terminális Cu^{2+} -, illetve Ni^{2+} -kötő motívumot (ATCUN) az elmúlt évtizedekben körültekintően tanulmányozták. Ezalatt sok információ gyűlt össze az albuminokban megtalálható kis fémionkötő helytől kezdve a több más, természetben előforduló Cu^{2+} , és Ni^{2+} -kötő motívumig, amit más fehérjékbe ültetve azokat DNS hasító sajátsággal ruházhatjuk fel. Az ATCUN motívum egy szerkezeti egység, melyet a következő feltételek határoznak meg: (1) szabad $\alpha\text{-NH}_2$ az N-terminális végen, melynek elérhetőségét nem gátolja semmilyen szerkezeti tulajdonság, (2) az N-terminustól számított a harmadik helyen egy hisztidin jelenléte, (3) a két közbeeső peptid-nitrogén deprotonálhatósága a fémionok jelenlétében. Ez a motívum megtalálható néhány albuminfehérjében (pl. humán szérum albumin, marha szérum albumin, patkány szérum albumin) neuromedin C és K-ban, humán spermium protamin P2a-ban és a hisztatin fehérjékben. Az ATCUN motívum a Cu^{2+} , és a Ni^{2+} -ionokat kiemelkedő affinitással

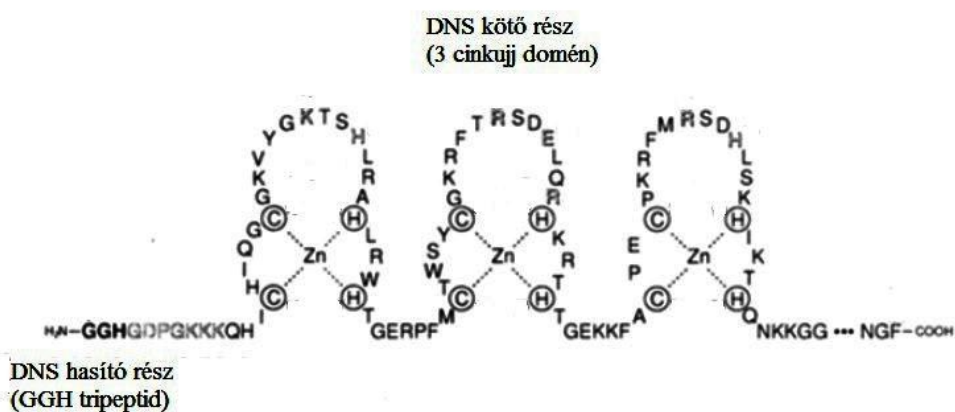
köti meg, de adott körülmények között könnyen át is adhatja a fémiont megfelelő ligandumnak, bizonyítva ezzel transzporter szerepét az albuminokban. [28]

Magát a motívumot először albuminfehérjéből (69000 Da) izolálták, ami a legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje a plazmában (4,5 g / 100 ml). Legfontosabb funkciója számos kis molekula és ion szállítása, beleértve a fémionokat is. A réz legfőbb transzporter fehérjéje a vérben az albumin, azonban a teljes rézmennyiség csupán 5-10% található ilyen formában, a többi ceruloplazminhoz kötött, illetve peptidekhez vagy hisztidinhez (tercier komplex) koordinálódnak. A vérszérumban jelenlevő Ni^{2+} -ionok 95 %-a albuminhoz kötött formában található, míg a maradék hisztidinhez kötődik. A nikkel(II) komplexe síknégyszetes geometriájú, amit alátámaszt a pH ~ 7 körül 420 nm-en megjelenő elnyelési maximum (a nonspecifikus nikkel(II) kötődés oktaéderes geometriával bír). Humán szérum albumin esetében egy modellpeptid (Asp-Ala-His) nikkel(II) komplexének segítségével ^1H és ^{13}C NMR módszereket alkalmazva kimutatták, hogy a négy, egy síkban található nitrogén ligandum által képzett síknégyszetes komplex mellett egy karboxil-oldallánc is hatással lehet a fémionra, pentakoordinált szerkezetet kialakítva. A négy, egy síkban található nitrogén jelenlétét ESR mérésekkel bizonyították réz(II) komplexben. Kutya illetve csirke szérum albuminnal végzett kísérletekkel a harmadik helyen lévő hisztidin fontosságát igazolták, ugyanis ezen két albuminfehérje nem rendelkezik ilyen hisztidinnel, így a réz(II) és nikkel(II) megkötésére sem képes. A humán szérum albumin röntgen-kristallográfiás vizsgálata kimutatta, hogy az amino-terminális régió nem rendelkezik jól meghatározott szerkezettel, így képes a fémion köré tekeredni specifikus kötőhelyet kialakítva.

Az ATCUN motívum szerkezetének jellemzését követően a Cu^{2+} -Gly-Gly-His komplex vizsgálatok megállapítást nyert, hogy az antitumor hatással is bír. Feltételezhetően az említett fémiont kötő motívum – aszkorbát jelenlétében - hidroxilgyökök ($\cdot\text{OH}$) képződése közben képes DNS vagy fehérje hasítására. A hidroxilgyök reakcióba lép a DNS foszfodiészter vázával, és elhasítja azt. Ugyanez fennáll a nikkel(II) esetében is, de a hasítás módja eltér a réztől. A Ni oxidációs állapota Ni(III) és Ni(II) között változik fehérjéhez vagy peptidhez való kötődése során. A Ni(II)-komplexeiről kimutatták, hogy oxigén gyök karakterüknek köszönhetően aszkorbát jelenlétében nem képesek a DNS oxidatív roncsolására. Azonban H_2O_2

jelenlétében képes DNS-t hasítani hidroxilgyökök és szuperoxid anionok keletkezése által. [28]

A DNS-kötő cinkujj fehérjét DNS-t hasító molekulává alakíthatjuk a fentiekhez hasonló fémiont kötő szekvencia beépítésével. Az így kialakított kimer fehérjék dimerként funkcionálnak, emiatt viszonylag rövid palindrom szekvenciák felismerésére képesek. Azonban a Cys2His2 típusú cinkujj fehérjék monomerként kötődnek, így aszimmetrikus szekvenciákat is elhasíthatnak. Kimutatták, hogy a Gly-Gly-His motívumot az Sp1 cinkujj fehérje N-terminális végére beépítve specifikus DNS hasítás érhető el magnézium-peroxo-ftalát jelenlétében. [29]



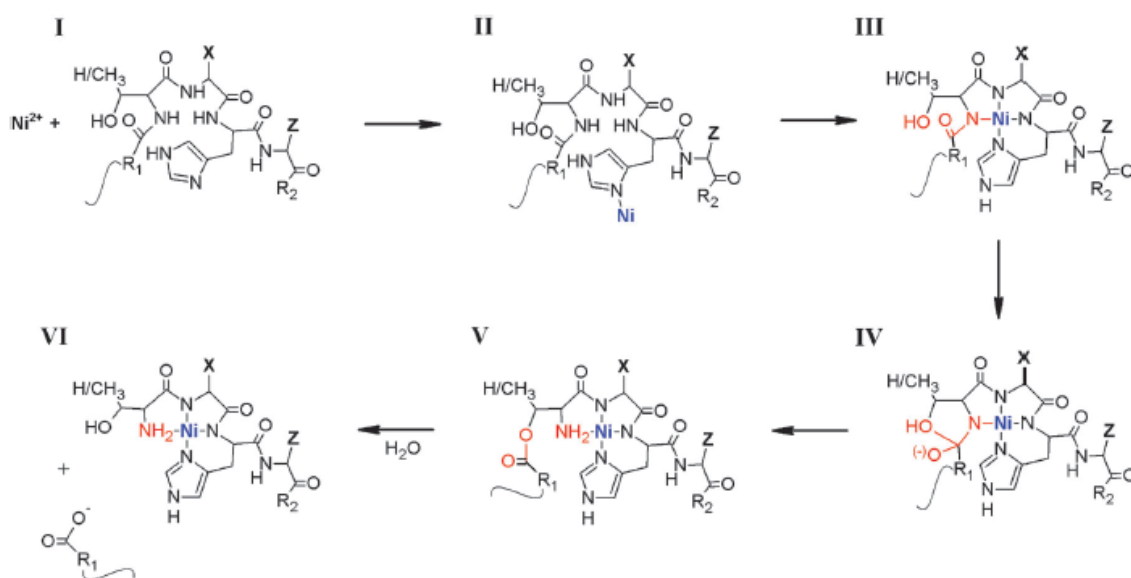
2.3. ábra: Az Sp1 cinkujj fehérjéből és a Gly-Gly-His tripeptidből létrehozott mesterséges nukleáz sematikus szerkezete [27].

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

A nikkelvegyületek az emberi szervezetre mérgezőek, belégzéssel a szervezetbe jutva rákot, bőrrel érintkezve allergiás reakciókat okozhatnak egyes embereknél. A nikkelt carcinogenezishez vezető kémiai folyamatok felkutatása során felfedezték, hogy a Ni^{2+} -ionok képesek a peptidkötés specifikus hidrolízisére a H2A hisztonfehérjéről modellezett peptidben. Később ugyanezt a hidrolitikus folyamatot a fehérjében is kimutatták *in vitro*, valamint sejtekben is. Modellpeptideket használva kutatók megállapították, hogy a Naa-(Ser/Thr)-Xaa-His-Zaa szekvencia alkalmas az aktív nikkelt(II)-komplex kialakítására. A reakció a Naa-(Ser/Thr) peptidkötés hasadásával jár (Naa bármilyen aminosav, vagy N-terminális peptid lehet). Kombinatorikus peptidkönyvtárak segítségével feltérképezve az Xaa és Zaa helyen előforduló lehetséges aminosavak hatását, megállapították, hogy a nagy hidrofób oldalláncú aminosavak növelik a reakció sebességét. A peptidkötés hidrolízise minden esetben mellékreakció

nélkül zajlott, a kísérleti körülmények (pH, hőmérséklet) változtatása során is. A fent említett szekvencia a természetes fehérjékben gyakran fellelhető, például humán transzkripciós faktorok Cys2-His2 szerkezetű ujjaiban is. Mivel ezek a fehérjék kulcsfontosságúak különböző sejtfolyamatokban, fontos célpontjaivá váltak a nikkel-karcinogenezis kutatásoknak (korábban már kimutatták, hogy a cinkujj fehérjékben a Ni^{2+} -ionok képesek a Zn^{2+} -ionokat helyettesíteni, illetve elősegíthetik a ciszteinek oxidációját is).

A reakciómechanizmus (2.3. ábra) első lépéseként egy 4N nikkel(II)-komplex alakul ki. A nitrogén donoratomok hisztidin oldalláncából és az előtte lévő három peptidkötés nitrogénjéből származnak. A második lépésben egy N-O acil vándorlás játszódik le, egy észter köztitermék (R_1 és Ser/Thr $-\text{OH}$ csoportja között) kialakulása közben. Az észter hidrolízise spontán történik a végterméket eredményezve. Az R_1 – Ser peptidkötést a nikkel(II) aktiválja egyrészt a peptid nitrogénen történő megkötődés okozta közvetlen destabilizáció által, másrészt feszülést okozva a peptidláncban. A reakció erősen függ a pH-tól és hőmérséklettől, de fiziológiás körülmények között (pH 7,4 és 37°C) is végbemegy, főleg a hatékonynak tartott (nagy térkitöltésű, hidrofób oldalláncú aminosavakat tartalmazó) szekvenciáknál. [30]



2.4. ábra: Ni^{2+} -ionok által előidézett peptidkötés hidrolízis javasolt molekuláris mechanizmusa. I - apo-peptid; II - 1N komplex: a Ni^{2+} -ion az imidazol-gyűrűhöz koordinálódik; III – stabil 4N komplex: a Ni^{2+} -ion az imidazol-nitrogénhez és három azt megelőző, peptidkötésben részt vevő nitrogénhez koordinálódik; IV - acil-vándorlás az R_1 és a Ser/Thr hidroxilcsoport között; V – észter köztitermék; VI – végtermékek: R_1 peptid szabad C-terminális karboxiláttal, és az S/TXHZR₂ - nikkel(II) komplex [28.]

3. Célkitűzés

Tudományos diákköri dolgozatomban egy, az irodalomban már jellemzett cinkujj fehérje (PDB kód: 1MEY) és egy újonnan tervezett mutánsának (1MEY#) Ni^{2+} -ionokkal kialakított kölcsönhatásait tanulmányoztam. Célul tűztem ki:

- (i) A fentiekben tárgyalt síknégyzetes nikkell(II)-komplex kialakulásának, valamint az ezzel párhuzamosan lejátszódó hidrolitikus hasadás körülményeinek tanulmányozását.
- (ii) A hasítás specifikusságának vizsgálatát.
- (iii) A két fehérje számára specifikus kötőhelyet tartalmazó nukleinsavak előállítását és azok hidrolízisre való hatásának vizsgálatát.

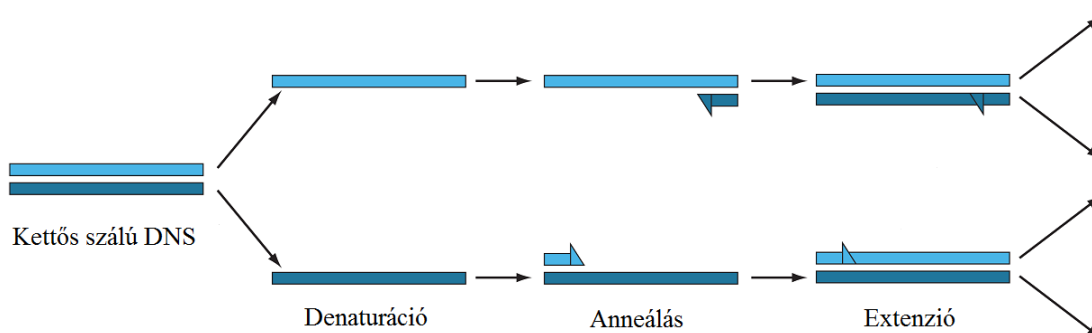
4. Kísérleti módszerek

4.1. Alkalmazott pufferek

A metalloproteineket tartalmazó katalitikus vizsgálatokban pufferek használatával értük el, hogy a hidrolízis során megfelelő, állandó körülményeket lehessen biztosítani a fehérje szerkezeti integritásának megőrzése céljából. Kísérleteim során 100 mM koncentrációjú HEPES puffert alkalmaztam 7,4-es illetve 8,2-es pH-n, amit NaOH és HCl adagolásával, keverés mellett állítottam be. Használat előtt az oldatokat szűrtem, majd hűtőben tároltam.

4.2. Polimeráz láncreakció

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



4.1. ábra: A PCR első ciklusának sematikus ábrázolása.

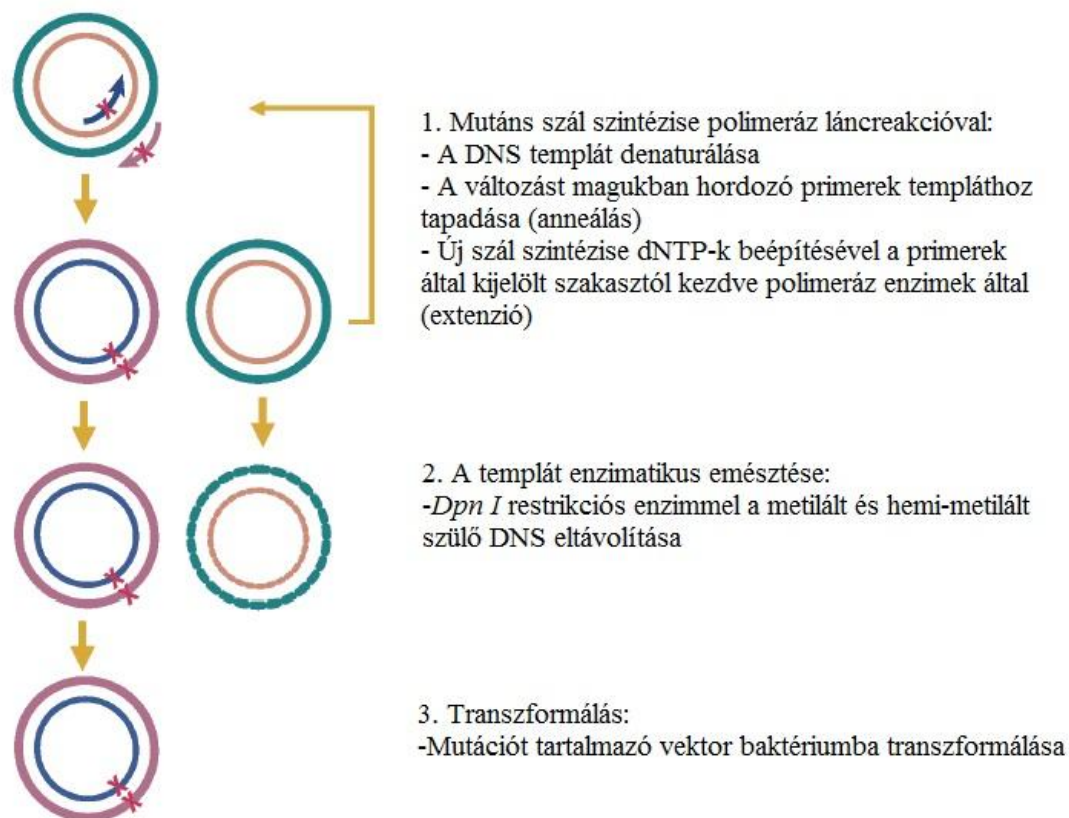
A reakciót egy speciálisan kialakított fűthető tetővel rendelkező PCR készülékben végezzük el. A PCR elegyeket az erre használatos vékonyfalú PCR-csővekben helyezzük a készülékbe. A reakciót több ciklusban hajtjuk végre, melyek során a hőmérsékletet periodikusan változtatjuk. A ciklus első lépésben az elegyet magas, 94-97 °C-os hőmérsékletre melegítjük fel, mely a kétszálú templát DNS

szétválását eredményezi (denaturálás). Ezután az alkalmazott primerek olvadáspontjának megfelelő, általában 50-70°C tartományba eső hőmérsékletre hűtjük vissza. Ennek során a primerek a képződött egyszálú DNS komplementer szakaszaival összetapadnak (hibridizáció, anneálás). Végül az így kijelölésre került szakaszon a polimeráz enzim a már említett dNTP-kből a primerektől kiindulva felépíti az új szálát (meghosszabbítás, extenzió). Ezt a három lépésből álló ciklust 25-30-szor végrehajtva a cél DNS szakasz eredeti mennyiségének milliárdszorosa keletkezhet. Fontos megemlíteni az alkalmazott polimeráz enzim egy különleges tulajdonságát, a jó hőtűrő képességét, mely a reakció során alkalmazott magas hőmérsékletek végett elengedhetetlen.

4.3. Helyspecifikus mutagenézis

Az *in vitro* helyspecifikus mutagenézis segítségével a fehérjék szerkezete és működése közötti összefüggések vizsgálhatók, illetve génexpressziós tanulmányok és DNS módosítások is megvalósíthatók. Helyspecifikus mutagenézist alkalmazva pontmutációk, aminosavak beillesztése vagy eltávolítása, vagy akár egy néhány bázispáros DNS szakasz beépítése is lehetséges egy nagyobb DNS hordozó (vektor) molekulába. Bár az eljárás nem egyszerű, a QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit alkalmazásával szinte bármilyen kétszálú DNS vektorban eszközölhetők mutációk, restrikciós helyek, többszöri transzformálás vagy külön *in vitro* metilálás szükségessége nélkül. Mindehhez a mutációt tartalmazó, de a kiindulási DNS molekulával homológiát mutató oligonukleotidok (primerek) használata szükséges, melyek tervezésekor a következőket kell figyelembe venni: (1) mindkét primernek tartalmaznia kell a mutációt, és tudnia kell tapadni a vektoron ugyanahhoz a szakaszhoz, mindkét komplementer szálon; (2) 25-45 bázispár hosszúnak kell lenniük 78°C körüli olvadási hőmérséklettel; (3) a mutációnak a primer közepén kell elhelyezkednie úgy, hogy előtte és utána is 10-15 bázispár legyen az eredeti szekvenciából; (4) a primerek GC tartalma 40% körül legyen, és egy vagy több G, illetve C nukleotid legyen a 3' végükön; (5) A primereket az 5'-végükön foszforilálni kell. A fentebb részletezett PCR elegyet ilyen esetben a mutációt tartalmazó primerekkel készítik el, majd PCR készülékben végrehajtják a sokszorosítást. A reakció végeztével a mutációt tartalmazó, nem metilált plazmid keletkezik. Mivel a

továbbiakban csak erre van szükség, ezért szelektíven, enzimatikus úton eltávolítják a metilált kiindulási plazmidot. A folyamat sematikus leírása a 4.2. ábrán látható.



4.2. ábra: A helyspecifikus mutagenézis sematikus ábrázolása. A módszer során bármilyen, kétszálú, metilált plazmid használható. (1.) Denaturáció után mindkét szálra komplementer, a mutációt hordozó primerek tapadnak, majd enzimek szintetizálják az újonnan képződő, a mutációt már hordozó szálát. (2.) A metilált szülő DNS-t *DpnI* endonukleázzal specifikusan lebontják. (3.) A reakcióterméket kompetens sejtekbe transzformálják, melyekben a mutáns szál szelektálódik és szaporodik. Az ábrán a piros X a mutációt jelöli.

4.4. Transzformálás

Transzformálási eljárással cirkuláris DNS-t juttatunk be olyan ún. kompetens baktérium sejtekbe (hőkompetens, elektrokompetens), melyeket előzőleg erre alkalmassá tettek. Fontos, hogy csak cirkuláris vektorokat juttathatunk be a baktériumokba, ezeket ismerik fel saját DNS-ként. Kísérleteinkben olyan cirkuláris DNS molekulákat használtunk fel, melyek a baktériumsejtekben önállóan tudnak sokszorozódni. Ezeket plazmidoknak nevezzük. A kompetens sejtekhez jégen mértük hozzá a mutált plazmid DNS-t, majd hirtelen elektrosokknak/hősokknak tettük ki az

elegyet, melynek során a kompetens baktériumok pórusai kitágultak, és a plazmid bediffundálhatott a sejt belsejébe. Ezt követően tápoldatot adtunk az elegyekhez és 37°C-on 1 órán át inkubáltuk őket. Ezután lemezeken előre elkészített táptalajra kentünk ki az elegyekből egy alkohollal fertőtlenített meghajlított üvegbot segítségével, majd egy éjszakán át a 37°C-os inkubátorba tettük a lemezeket, hogy baktériumtelepek növekedhessenek. Annak érdekében, hogy más baktériumok ne képezhessenek telepeket az említett lemezeken, a táptalajokba antibiotikumot tettünk, melyre nézve az általunk transzformált sejtek rezisztensek.

4.5. TENS

A TENS egy olyan plazmid izolációs módszer, amely nem igényel fenolt a fehérjék eltávolításához. Legfőbb oldata a TENS puffer, ami 1× TE puffer, mely 0,1 M NaOH-t és 0,5% SDS-t tartalmaz. Az izolálás során az előzőleg tápoldatban felszaporított, lecentrifugált baktériumkultúrákról eltávolítjuk a felülúszót egy keveset hátrahagyva, melyben újra felkeverjük a sejteket. Ehhez adjuk a TENS puffert, és újra felkeverjük a mintákat, ami által elroncsoljuk a baktériumsejtek sejtfalát, majd 3 M Na-acetát oldatot adunk hozzá és ismét keverjük. E folyamatok során az elegyet jégen tartjuk. Várakozás után a sejtmарadványokat és kromoszómális DNS-t centrifugálással távolítjuk el, ezután a tiszta felülúszóhoz abszolút etanolt adunk, ami néhány óra alatt, -80°C-on kicsapja a plazmidot. Ezután 70%-os (v/v) etanollal mossuk, majd szárítjuk a kinyert plazmidot, amit ezután TE pufferben vagy steril vízben oldunk. A módszer hátránya, hogy gyakran a plazmid DNS mellett RNS is jelen van az oldatban, ezért a későbbi alkalmazástól függően RNÁzzal történő utólagos kezelés lehet szükséges.

4.6. Agaróz gélelektroforézis

A nukleinsavak kimutatásának és elválasztásának egyik leggyakrabban alkalmazott módszere az agaróz gélelektroforézis: a DNS negatív töltése révén elektromos erőterben az anód felé vándorol a gél üregeiben. A nagyobb méretű DNS nehezebben jut előre, így méret szerinti elválasztás valósítható meg. Az eljárás során a vizsgálni kívánt DNS tartalmú mintákat festékoldattal keverjük össze, majd az előre elkészített agaróz gél zsebeibe visszük föl, miután azt az erre a célra használatos futtatókádba, pufferoldatba helyeztük. Egyenáramot alkalmazva 40 – 60 perig futtatunk. A DNS-t Etídium-bromiddal tesszük láthatóvá a gélben, ami a DNS-szalba ékelődve

UV-fénnyel történő megvilágítás hatására fluoreszkál. A vizsgált DNS fragmensek mérete egy ismert méretű DNS fragmensekből álló marker mintával történő összehasonlítással becsülhető. Az eredmény a géldokumentációs készülékben digitálisan rögzíthető.

4.7. A fehérjék kifejezése és tisztítása

A vizsgálni kívánt két cinkujj fehérje (1MEY és 1MEY#) génje pET16b hordozó vektorban található, amivel sokszorosítás és fehérjekifejezés céljából *E. coli* BL21 sejteket transzformáltunk (ld. 4.3. fejezet). A BL21 sejteket fehérjetermelésre optimalizálták. A transzformált sejtek gazdag tápoldatban szaporodtak, majd a fehérjetermelés elindítása érdekében IPTG-t adtunk hozzá, ami a plazmidban lévő *lac* operon indukálását végzi. A fehérjeszintézis mindaddig nem kezdődik meg amíg a baktériumok táptalajában glükóz található, mert a laktóz bontása kisebb energianyereséggel jár a sejt számára. A szaporodásuk során és az IPTG hozzáadása után viszont – a glükóz fogyása és a laktózt imitáló izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid megjelenésének köszönhetően - a *lac* operonról aktiválódik a célfehérje túltermelődése, azaz a kifejezni kívánt fehérje nagy mennyiségben előállítható. Az indukálás után 2-3 óra elteltével a baktériumkultúrákat lecentrifugáltuk, majd az ülepített baktériumsejteket ultrahangos roncsolásnak vetettük alá 1×PBS oldatban. A szonikálás után oldatba került fehérjét affinitás kromatográfiával tisztítottuk meg. A módszer enzim - szubsztrát, antitest - antigén, glutation – glutation-S-transzferáz (GST fúziós protein) vagy fémion - oligohisztidin fúziós fehérje kölcsönhatásokon alapulhat. A pET16b vektorra jellemző, hogy a klónozó régióba beültetett génről egy, 10 hisztidinből álló N-terminális hisztidin toldalékkal (10×His-Tag) együtt fejeződik ki a fehérje. Ezért nikkel-affinitás kromatográfiát, eluensként pedig imidazololdatot használtunk. Mindez egy japán kutatócsoporttal való együttműködés keretein belül zajlott.

4.8. Tricin SDS és Natív poliakrilamid gélelektroforézis

A fehérjével történő munka több fázisában is mintát vettünk az oldatokból, Tricin SDS-PAGE módszerrel történő ellenőrzés céljából. A poliakrilamid gélelektroforézisben (PAGE) használt speciális tricines gél három részből áll (rétegző, tömörítő és elválasztó), melyek két üveglap között találhatók, és akrilamid-koncentrációjukban különböznek. Maga az elektroforézis, pufferoldattal feltöltött

kádban zajlik. A függőleges irányú gél legfelső része (rétegző gél) a zsebekbe felvitt minták egy szintbe hozásáért felelős, a középső gélrész a sávok éles elválását segíti elő a későbbiekben, míg az alsóban történik maga az elválasztás. A fehérjeoldatokhoz nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) és merkapto-etanolt tartalmazó denaturáló pufferoldatot adtunk, majd magas hőmérsékleten kezeljük. Az SDS, mint felületaktív molekula egyenletes eloszlásban tapad a fehérjékhez, denaturálja azokat és egységes, méretükkel arányos, negatív töltést biztosít nekik. Ezáltal egyenáramú elektromos térben, azonos irányban, méretükkel fordítottan arányos sebességgel mozognak. Így az SDS-PAGE is biztosítja az agaróz gélelektroforézisnél megismert méret szerinti elválasztást. Az minták futtatása során különböző összetételű anódos és katódos puffereket használtam a jobb felbontás elérése érdekében.[31] Futtatás után a gél desztillált vízzel mostam, metanoltartalmú fixáló oldatba tettem, majd festékoldatba téve (Coomassie Brilliant Blue G250) festettem egy órán keresztül. Ezután a felesleges festéket 10%-os ecetsavval távolítottam el a gélből.

A natív PAGE módszer denaturálás nélkül, natív szerkezetű fehérjék vizsgálatára ad lehetőséget. Éppen ezért különösen ügyelni kell arra, hogyan viszonyul egymáshoz a gélben alkalmazott puffer pH értéke és az elválasztani kívánt fehérje, vagy fehérje-komplex izoelektromos pontja, hiszen ez szabja meg a fehérje vándorlási irányát. Jelen munkában DNS-fehérje komplex vizsgálatára használtuk ezt a módszert, mert a hagyományos denaturálás a komplex disszociációját eredményezné.

4.9. Nagyteljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC)

A HPLC a biokémiában és analitikai kémiában vegyületek elválasztására, azonosítására és mennyiségi meghatározására gyakran használt eljárás. A HPLC rendszert felépítő főbb alkotórészek a következők: a kromatográfiás töltetet (állófázist) tartalmazó oszlop (kolonna), a mozgófázist (eluens) a kolonnán átnyomó pumpa, illetve a molekulák retenciós idejét jelző detektor. A mérés kivitelezése során a vizsgálandó mintát kis térfogatban feloldjuk, és az áramló mozgófázisba injektáljuk. A minta, miközben keresztülhalad a kolonnán, az állófázissal specifikus kémiai vagy fizikai kölcsönhatásokat alakít ki. Emiatt visszamarad a folyadékáramhoz képest, melynek mértéke a vizsgálandó anyag és az állófázis tulajdonságaitól, valamint a mozgófázis összetételétől függ. Azt az időtartamot, mely alatt egy adott anyag megjelenik a kolonna

végén, vagyis eluálódik, retenciós időnek nevezzük. Egy adott rendszerben a retenciós idő az egyes vizsgált vegyületek viszonylag egyedi jellemzője. Nagyobb nyomást alkalmazva megnövelhető a lineáris áramlási sebesség, így a komponenseknek kevesebb idejük marad a kolonnán belüli diffúzióra, ami javítja az egyes anyagok közötti elválást. Mozgófázisként általában vizet és különböző szerves folyadékokat, leggyakrabban metanolt, illetve acetonitrilt használnak. A minta komponenseinek jobb elválasztását segíthetik a vízhez adott pufferek, sók, vagy egyéb anyagok, mint például az ionpár képzőként alkalmazott trifluorecetsav.

A kromatográfiás gyakorlatban kétféle módszert különböztetünk meg: a normál fázisú HPLC (NP-HPLC) polaritás alapján választja el a vizsgált minta komponenseit, ez volt az elsőként alkalmazott HPLC-s eljárás. Ez esetben poláris állófázist és apoláris mozgófázist alkalmaznak, viszonylag poláris anyagok elválasztására. A fordított fázisú HPLC (Reversed phase HPLC, RP-HPLC vagy RPC) esetén az állófázis felülete apoláris, míg a mozgófázis poláris, jellemzően víz és valamely szerves oldószer elegye. Gyakran használt állófázis az RMe_2SiCl -dal kezelt szilika, ahol R valamilyen nyílt szénláncú alkilcsoport, pl. $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ vagy C_8H_{17} . Ilyen állófázisokat alkalmazva a poláros molekulák gyorsabb elúciója valósul meg, míg az apolárosabb molekulák retenciós ideje megnő. Apoláros oldószert adva a mozgófázishoz csökkenthetjük, míg polárosabb oldószer hozzáadásával növelhetjük a retenciós időt. A gyógyszeripar rendszeresen alkalmazza ezt a HPLC-s eljárást a gyógyszerek minőségellenőrzése során.

A hidrolízis termékek elválasztására fordított fázisú folyadékkromatográfiás berendezést használtam (Waters In-line Degasser AF, Waters 1525u Binary HPLC Pump, Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector). Kolonnaként C18-as töltetű analitikai oszlopot alkalmaztam 1 ml/ perc-es áramlási sebességgel. Gradiens elúcióval dolgoztam, melynek során vízből és tetrafluorecetsavból álló A, és acetonitrilből, tetrafluorecetsav és víz hozzáadásával készült B eluensek keverési arányát változtattam.

4.10. Tömegspektrometria (MS)

A tömegspektrometria nagyműszeres analitikai módszer töltött anyagi részecskék tömegének meghatározására, ami azon alapszik, hogy az adott ionok elektromágneses tér hatására tömeg/töltés hányadosuk alapján egymástól eltérő idő alatt érik el a detektálás helyét. A módszer nagy érzékenységgel (akár fg tömegű minta meghatározható), széles tömegtartományú, jól reprodukálható, szelektív, valamint

elválasztástechnikai módszerekkel, így például gázkromatográfiával (GC-MS), folyadékkromatográfiával (LC-MS) vagy kapilláris elektroforézissel (CE-MS) kombinálható. A tömegspektrométereknek három részt - ionforrást, analizátort és detektort - mindenképpen tartalmazniuk kell. A mérés lépései a következők: a vizsgálni kívánt mintából ionokat hozunk létre, majd ezeket a különböző tömeg/töltés arányuknak megfelelően elválasztjuk. Az ionokat ezután detektáljuk, majd az összegyűjtött adatokból kirajzolódik a spektrum.

5. Kísérleti eredmények és értékelésük

5.1. Mutáns fehérje tervezése

Az 1MEY fehérje három, olyan a fentiekben leírt szekvenciárészletet is tartalmaz, melyhez Ni^{2+} -ionok kötődhetnek, miközben hidrolitikus hasadást idézhetnek elő. Ezek közül kettő a fehérje C-terminális, harmadik ujjában egymáshoz közel, míg a harmadik az N-terminális végen a His-tag után található.

GHHHHHHHHHHSSGHI¹EGRHMLEPG²EKPYK³CE⁴CGKSFSQSSNLQKH⁵QRTHTGEKPYK⁶
PE⁷CGKSFSQSSDLQKH⁸QRTHTGEKPYK⁹CE¹⁰CGKSFSRSDHLSR¹¹HQRTHTGKKTS

5.1.ábra. Az 1MEY fehérje elsődleges szerkezete a 10 hisztidinből álló toldalékkal; sárgával kiemelve a Zn^{2+} -iont kötő aminosavak, aláhúzva a Ni^{2+} -ionok megkötésére alkalmas szekvenciák láthatók.

Ezen fehérje vizsgálata mellett egy másik, módosított fehérje tervezését és előállítását is fontosnak tartottuk. A mutáns fehérje tervezéséhez a Zinc Finger Tools nevű interneten elérhető programot használtam. Célom az volt, hogy a harmadik ujjban lévő nikkel(II) kötőhelyeket eltávolítsam a fehérjéből, amiben így csak a hisztidin-toldalék közelében marad meg a síknégyzetes komplex kialakulásához megfelelő szekvencia. E módosítás segítségével kideríthetjük, hogy a DNS-kötésre mekkora hatással van a síknégyzetes motívum kialakulása az ujjban. A tervezés során a kiindulási 1MEY cinkujj fehérje által felismert kilenc bázispáros DNS szekvenciát használtam. A program az 5.2. ábrán látható cinkujj fehérjét tervezte.

GHHHHHHHHHHSSGHI¹EGRHMLEPG²EKPYK³CE⁴CGKSFSQSSNLVRH⁵QRTHTGEKPYK⁶
PE⁷CGKSFSQSGDLRRH⁸QRTHTGEKPYK⁹CE¹⁰CGKSFSRSDNLVRH¹¹QRTHTGKKTS

5.2.ábra. Az 1MEY# fehérje elsődleges szerkezete a 10 hisztidinből álló toldalékkal; sárgával sárgával kiemelve a Zn^{2+} -iont kötő aminosavak, aláhúzva a Ni^{2+} -ionok megkötésére alkalmas megmaradt szekvencia látható.

Meglepetésre, e fehérje szekvenciája több aminosavban is különbözik a kiindulási fehérjétől. Egyik érdekessége az új szekvenciának, hogy a harmadik ujjban nem található egy Ni^{2+} -ionok megkötésére alkalmas hely sem. Ennek alapján a mutációs kísérletet úgy valósítottuk meg, hogy a fehérje C-terminális végéhez legközelebbi helyen egy szerint valinra, a második helyen pedig egy hisztidint aszparaginra cseréltük. Ez a változtatás a Zinc Finger Tools program szerint a DNS felismerésen nem változtat.

LEPG EKPYK **C**PE **C**GKSFSQS **S**NLQKH **Q**RTHTG EKPYK **C**PE **C**GKSFSQS **S**DLQKH **Q**RT
 LEPGEKPYK **C**PE **C**GKSFSQS **S**NL **V**RH **Q**RTHTG EKPYK **C**PE **C**GKSFSQS **G**DL **R**RH **Q**RT

HTG EKPYK **C**PE **C**GKSFSRSDHLSRH **Q**RTHTGKKTS
 HTG EKPYK **C**PE **C**GKSFSRSD **N**L **V**RH **Q**RTHTGKKTS

5.3.ábra. Az eredeti (lila) és a tervezett mutáns (fekete)) fehérjék elsődleges szerkezetének összehasonlítása. Sárgával a Zn^{2+} -ionokat kötő aminosavak, narancssárgával a különbségek láthatóak, melyek közül késsel kiemelttem a végrehatott mutációkat.

Az említett két aminosav cseréjét pontmutációval hajtottuk végre a fehérjét kódoló génen a 4.3. fejezetben ismertetett QuickChange eljárást alkalmazva. Ehhez a változásokat kódoló primerekre volt szükség, amelyekkel polimeráz láncreakciót hajtottunk végre az erre alkalmas készülékben. A mutáns fehérje génje alább látható:

catatgctggaaccgggcgaaaagccgtataaatgccagaatgcgggtaaatcttttagt
 H M L E P G E K P Y K C P E C G K S F S
 caaagcagcaaccttcagaaacaccagcgtacccacacaggcgaaaaaccgtataagtgt
 Q S S N L Q K H Q R T H T G E K P Y K C
 ccggaatgtggtaaatcattctcgcagtccttcggacttgcagaaacatcaacgcacccat
 P E C G K S F S Q S S D L Q K H Q R T H
 accggcgaaaaaccgtataaatgtcccgaatgcgggaagtcattttcccgagcgataaac
 T G E K P Y K C P E C G K S F S R S D N
 ctggtcgcgcacagcgtacccatactggtataaaaaacctcttaaggatcc
 L V R H Q R T H T G K K T S - G S

Az alkalmazott primerek:

1MEY-ZFT*-F

5'-tcgccatcagcgtacccatac-3'

1MEY-ZFT*-R

5'-accaggttatcgctgcgggaaaatgacttc-3'

5.4.ábra. A módosított cinkujj fehérjét kódoló (IMEY#) gén. Késsel (1MEY-ZFT#-F) és narancssárgával (1MEY-ZFT#-R) a pontmutációhoz szükséges primerek láthatók.

A fehérjét ezután a kódoló géneket tartalmazó plazmidok segítségével baktériumokban nagy mennyiségben kifejeztük, majd a His-toldaléknak köszönhetően nikkell-affinitás kromatográfiával elválasztottuk a baktérium saját fehérjéitől. A tisztítani kívánt fehérjeoldatot Ni^{2+} -ionokat tartalmazó kromatográfiás oszlopon vezettük át, majd

többszöri mosás után imidazololdattal eluáltuk a fehérjét. Az imidazolt dialízissel eltávolítottuk, majd 100 mM HEPES pufferben oldva tároltuk a fehérjét.

5.2. A cinkujj fehérjék specifikus célszekvenciájának kialakítása

Az 1MEY és az 1MEY# fehérjék várhatóan specifikusan a GAGGCAGAA kilenc bázispáros szekvencia felismerésére képesek. A DNS-sel kialakított kölcsönhatás vizsgálatához ezért szükségünk volt egy olyan plazmid DNS-re, ami ezt a szekvenciát magában hordozza. Ehhez a célszekvenciát a pET30a+ vektorba Quick Change eljárással építettük be. A mutáció létrehozásához szükséges, a változást magukban kódoló primerek a következők voltak:

Up: 5'-GCCCAGAAGGGAGGCAGAAACGTTGATGC-3'

Down: 5'-GCATCAACGTTTCTGCCTCCCTTCTGGGC-3'

GGGTTCTGAATTGGAACCGCCATGGAAACCTTGATCAACGTTTCCACGCTCACTCTGGTAA
GGAAGGTGACAAGTACAAGTTGTCTAAGAAGGAATTGAAGGAATTGTTGCAAACCGAATTGT
CTGGTTTTCTAGAC**GCCCAGAAGGGAGGCAGAAACGTTGATGC**CGTCGATAAGGTCATGAAG
GAATTGGACGAGAACGGTGACGGTGAAGTTGATTCCAAGAATACGTTGTCTTGTTGCTGCT
TTGACCGTTGCAATGAACAACCTTCTTCTGGGAAACTCT**CTCGTCATTGGAACCGAAGCTT**
GCGGCCGCACTCGAGCACC

5.5.ábra. A cinkujj fehérjék számára specifikus DNS szekvencia kialakítása hordozó vektorban. Szürkével a kilenc specifikusan felismert bázispár, rózsaszínnel a mutagenikus primerek, sárgával és késsel a vektorról előállított rövid fragmenshez használt primerek láthatók.

Ezután kompetens sejteket transzformáltunk az új plazmiddal, és kanamicin-tartalmú táptalajon szaporítottuk őket. Néhány kiválasztott baktériumtelep átoltását követően az egy éjszakán át szaporított baktériumkultúrákból fenolmentes extrakciós módszerrel (TENS) izoláltuk a plazmid DNS-t, majd az agaróz gélelektroforézis eredménye alapján néhány mintát szekvenálásra küldtünk. A DNS-en a szekvenáláshoz használt primerek által kijelölt szakasztól kezdve megkaptuk a pontos szekvenciát eredményül.

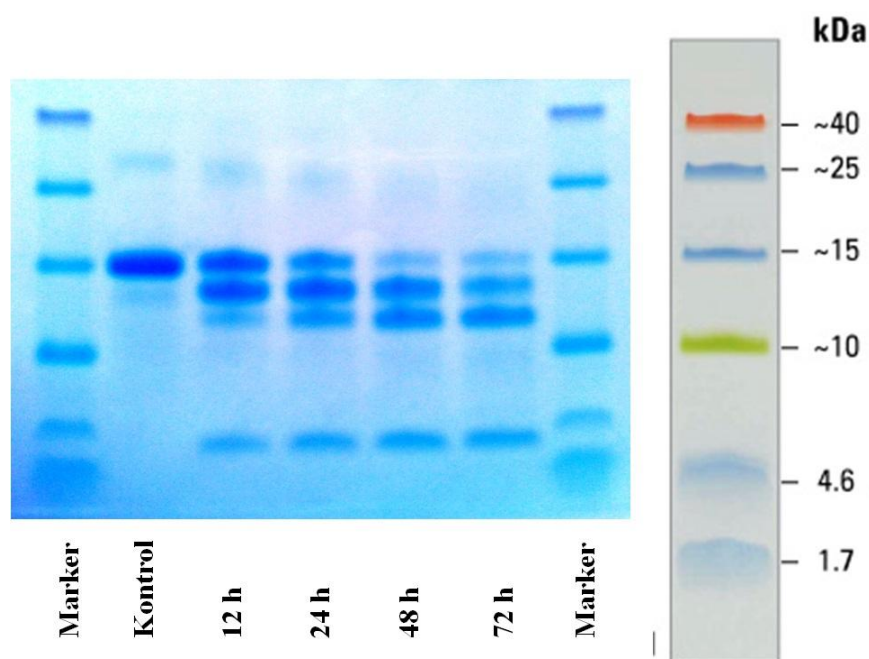
5.3. Fehérje hidrolízisére irányuló kísérletek – pH 8,2

Ahhoz, hogy megtudjuk, hogy a hidrolízis egyáltalán végbemegy-e, specifikus-e, és ha igen, akkor mindhárom célszekvencia egyaránt aktív-e, elsőként 50°C-on, 8,2-es pH-n inkubáltuk az 1MEY fehérjét Ni^{2+} -ionok $10\times$ feleslegével. Ehhez

mindenekelőtt szükség volt a fehérjeoldat koncentrációjának ismeretére. Ennek meghatározására a gyakorlatban többféle spektroszkópiás módszer terjedt el, mint pl. a fehérje saját UV abszorbanciájának mérése; Lowry-módszer; Smith-módszer; Bradford-módszer. Az utóbbi három fehérjefüggő színváltozást vizsgál, míg az első a fehérjét alkotó triptofán, illetve tirozin aminosavak elnyelését használja fel. Mivel a vizsgált fehérjében három tirozin is van, így a www.expasy.org oldalon található „ProtParam” funkciót használtam fel a fehérje aminosav szekvenciájának ismeretében abszorpciós koefficiens becslésre a fehérjemolekulában levő ciszteinek oxidált illetve redukált állapotában egyaránt. Ezután NanoDrop típusú spektrofotométeren 280 nm-en abszorbanciát mértem, és a fentiek ismeretében kiszámoltam a moláris koncentrációt.

A hasítási reakciót Tricin SDS PAGE módszerrel követtük. A poliakrilamid gél megfestése után látható volt egy új sáv megjelenése a kiindulási fehérjéhez tartozó sáv alatt, illetve halványan egy harmadik sáv is kivehető volt. Mindebből arra következtettünk, hogy a háromból legalább két helyen megtörtént a peptidkötés hasadása.

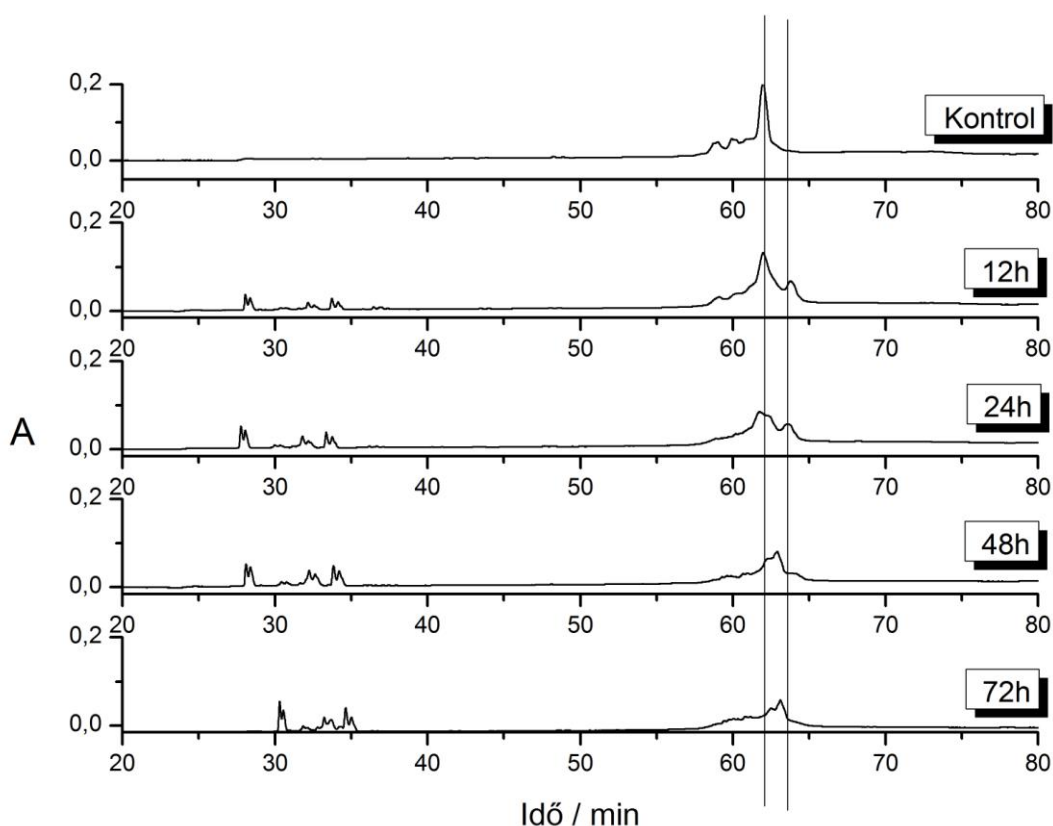
Az újabb inkubálás során az 1MEY fehérjéből olyan reakcióelegyet állítottunk össze, ami a fehérjére nézve 40 μM , a Ni^{2+} -ionokra nézve pedig 400 μM koncentrációjú volt. A pH-t tömény HCl vagy NaOH oldattal állítottuk be, ahol szükséges volt, majd Ni^{2+} -ionok hozzáadása után 37°C-on inkubáltuk 12, 24, 48 és 72 órás mintavétellel. Az egyes mintákban a reakciót 2%-os trifluor-ecetsavoldattal fagyasztottuk be, majd -20°C-on tároltuk a további felhasználásig. Összehasonlítás céljából olyan reakcióelegyet is összeállítottunk, mely nem tartalmazott Ni^{2+} -inokat, de ugyanúgy 37°C-on inkubáltuk az utolsó mintavétel időpontjáig. A mintákból 20 μl -t Tricin SDS PAGE módszerrel vizsgáltuk, melynek eredménye az 5.6. ábrán látható.



5.6.ábra. Az 1MEY fehérje Ni^{2+} -ionok jelenlétében és távollétében történő inkubálásának eredménye Tricin SDS gélen. $\{c_{\text{fehérje}}=40 \mu\text{M}, c_{\text{Zn(II)}}=100 \mu\text{M}, c_{\text{Ni(II)}}=400 \mu\text{M}; \text{HEPES pufferben (100 mM, pH 8,2), } 37^\circ\text{C}\}$

A gélelektroforézis eredménye alapján megbizonyosodtunk róla, hogy a fehérje ugyan némi degradációt szenvedett a háromnapos inkubálás során, de ennek ellenére stabilisnak mondható. Ni^{2+} -ionok jelenlétében azonban biztosan végbemegy a hidrolízis, ami által valószínűleg az egyik végén elhasadt fehérjét (közvetlen az eredeti fehérje ~ 15 kDa sávja alatti sáv: $\sim 13,5$ kDa), és a mindkét végén elhasadt fehérjét (az eredeti fehérje, és az egyik végén hasadt fehérje sávja alatti új sáv: ~ 12 kDa) megkapjuk. A hasítás során képződő kisméretű oligopeptidek is láthatók a gélen (legalsó sávok: ~ 3 kDa). A képen jól megfigyelhető az is, hogy az eredeti fehérje mennyisége az időben előrehaladva csökken, míg az egyik végén hasadt fehérje mennyisége először nő, majd az is csökkenni kezd. A mindkét végén hasadt fehérje, és a peptidek mennyisége is az időben folyamatosan nő. Bár a gélen megjelenő sávok élessége arra utal, hogy a hidrolitikus folyamat specifikus fehérjeszekvenciáknál játszódik le, mégsem ad információt arra, hogy pontosan hol történik a peptidkötés hasadása. A fehérje szekvenciája alapján várt maradék fehérjék és peptidek tömege is egymáshoz nagyon hasonló. Ezért a hasított mintákat RP-HPLC-vel elemeztük tovább. A kromatogramok felvételéhez a fordított fázisú eljárással C_{18} -as töltetű analitikai oszlopon választottuk el egymástól a hidrolízis során kapott termékeket gradiens elúciót alkalmazva (5.6 ábra).

Az adott retenciós időknél megjelenő csúcsokhoz tartozó frakciókat gyűjtöttük, majd TOF-MS készülékben meghatároztuk a hozzájuk tartozó molekulatömeget.



5.7.ábra. Az inkubálás során vett minták kromatogramjai (28, 32,6 és 34 percnél a hasadás utáni peptidek, 59,3, 60,4, 62 és 64 percnél a fehérje, ill. a hasadás utáni fehérjemaradványokra jellemző csúcsok láthatók). A két függőleges vonal a fehérje esetén bekövetkező változások követését hivatott megkönnyíteni.

Az aminosav sorrend ismeretében a hidrolízis lejátsszódása után várható elhasadt fehérjék, és a képződő peptidek tömegét a www.expasy.org weboldalon található „ProtParam” funkcióval határoztuk meg, majd ezeket összevetettük a tömegspektrumok által szolgáltatott tömegekkel. Ezáltal bizonyítást nyert, hogy mind a 10 hisztidinből álló toldalék lehasad, mind pedig a harmadik ujjrészben levő SRH szekvencia aktív. Így várhatóan a hidrolízis végére a két végén elhasadt fehérjemaradvány és két peptid van az oldatban, amit a TOF-MS ki is mutatott. A harmadik, mindössze négy aminosavból álló peptidre (SDHL) jellemző jelet nem detektáltunk. A HPLC és MS vizsgálatok során nyert információkat az 5.1 táblázat foglalja össze. A kromatogramok és a táblázat ismeretében megállapítható, hogy a harmadik ujjban lévő SRH szekvencia hidrolízise egy kicsivel gyorsabban játszódik le, mint a Hisztidin-toldalék lehasadása. Ez

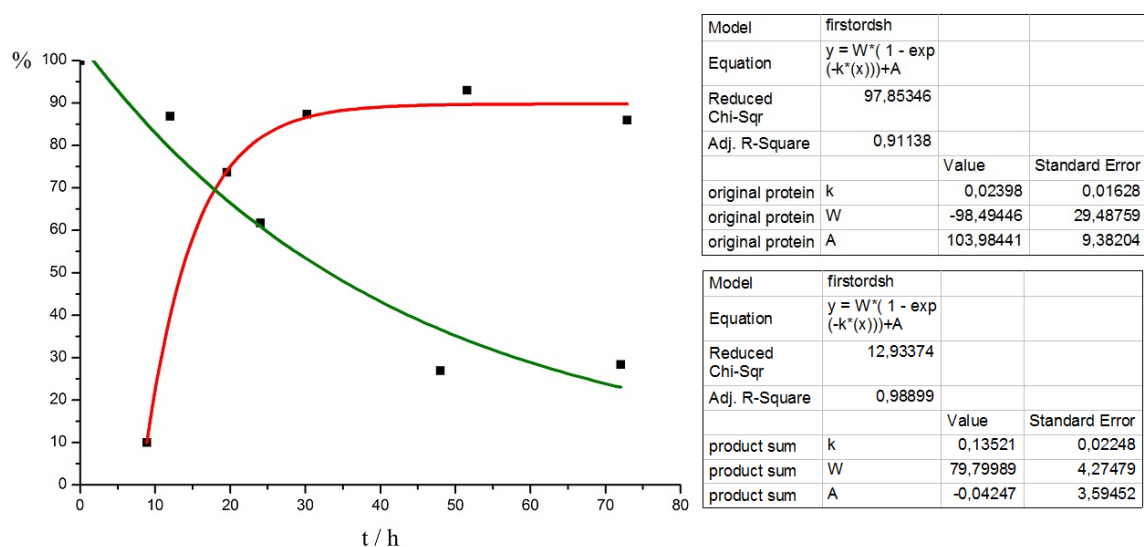
összhangban van azzal az irodalmi áttekintésben említett megfigyeléssel, ami szerint, ha az Naa-(Ser/Thr)-Xaa-His-Zaa szekvenciában nagy kiterjedésű, hidrofób oldallánccal rendelkező aminosavak vannak, akkor gyorsabb a hidrolízis (a Hisztidin toldaléknál az X aminosav glicin, aminek az oldallánca csupán egy proton, szemben az arginin terjedelmes nitrogéntartalmú oldalláncával).

Mintavétel időpontja	Retenció idő	Mért molekulatömeg	Szekvencia
12 h	59,3 min	fehérjére jellemző	-
	60,4 min	tömeg nem	
	62 min	detektálható	
	64 min	főként 11500	GHHHHHHHHHHSSGHIEGRHMLEPG EKPYKCPECGKSFSQSSNLQKHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSQSSDLQKH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHL
		mellette 9985	SGHIEGRHMLEPGEKPYKCPECGKS FSQSSNLQKHQRTHTGEKPYKCPEC GKSFSQSSDLQKHQRTHTGEKPYKC PECGKSFSRSDHL
48 h	28 min	1523,84	SRHQRTHTGKKTS
	32,6 min	1711,72	?
	34 min	1533,66	GHHHHHHHHHHS

5.1. táblázat. HPLC retenció idő és a hozzájuk tartozó tömegek MS mérések alapján

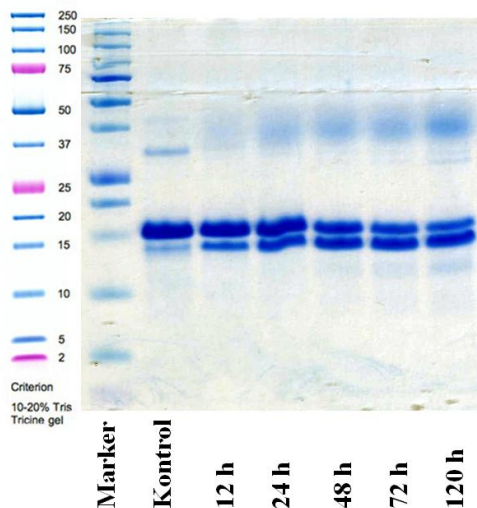
A fehérjemaradványokra kapott (11500 Da és 9985 Da) és „ProtParam” által számolt tömegek (11506 Da ill. 9991 Da) mindkét esetben 6 Da eltérést mutatnak, ami a fehérje oxidációjából adódhat, melynek során diszulfid-kötések jönnek létre. Ezt támasztja alá az is, hogy a kromatogramokon a fehérjéhez tartozó csúcs nem olyan éles, mint a kontrol mintában, tehát a hidrolízis előrehaladtával degradáció történhet.

Annak érdekében, hogy az eddigieket számszerűsítsük a jó minőségben beszkenelt Tricin SDS gélképet elemeztük az ImageJ nevű programmal a színsűrűség alapján. A százalékos megoszlásokat az idő függvényében ábrázolva sikerült igazolni, hogy ez egy elsőrendű kinetika szerint végbemenő reakció, a megfelelő függvény illesztésével (5.8.ábra). A reakció becsült felezési ideje ilyen körülmények mellett ~ 12 óra.



5.8.ábra. A Tricin SDS gékép ImageJ programmal történt elemzésének kiértékelése: a kiindulási fehérje százalékos megoszlásának változása (zöld) és a keletkező termékek összegének százalékos változása (piros) az időben.

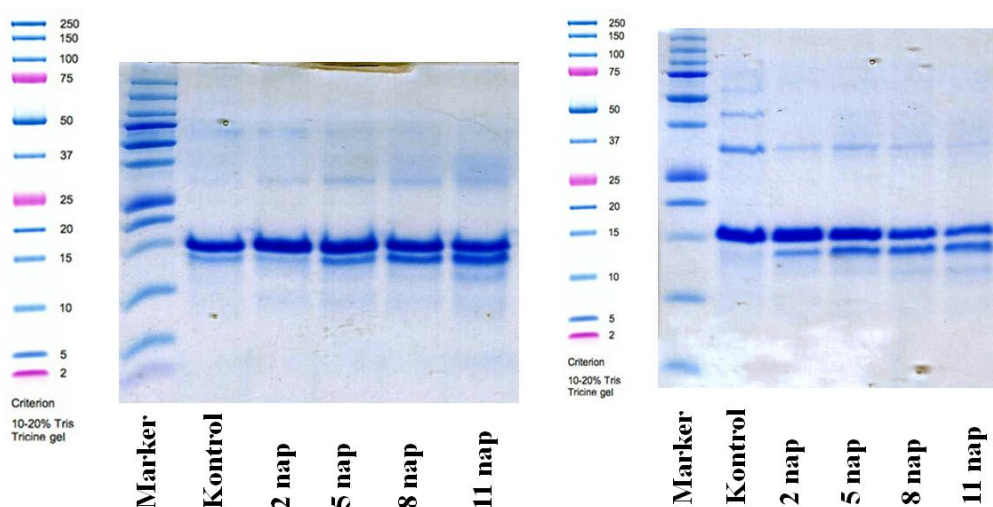
Az inkubálást mindkét fehérje esetében a fent ismertetett módon legalább még egyszer megismételtük. Minden esetben megfutattuk a mintákat Tricin SDS géleken, és tapasztaltuk 1MEY esetében a két, míg 1MEY# esetében az egy új sáv kialakulását (a mutáns esetében ugyanis csak az N-terminális Hisztidin-toldalék felől van egyetlen nikkel(II) hasítási hely).



5.9.ábra. A Tricin SDS gékép a mutáns 1MEY# fehérje Ni^{2+} -ionok okozta hidrolízisééről. Bár a kontrol mintában is látható némi degradáció, mégis jól megfigyelhető, hogy az idő múlásával egy hidrolízis termék dominál. $\{c_{\text{fehérje}}=30 \mu\text{M}, c_{\text{Zn(II)}}=100 \mu\text{M}, c_{\text{Ni(II)}}=300 \mu\text{M}; \text{HEPES pufferben (100 mM, pH 8,2), } 37^\circ\text{C}\}$

5.4. Fehérje hidrolízisére irányuló kísérletek – pH 7,4

Mint az már említésre került, az ATCUN motívummal rendelkező fehérjék új lehetőséget jelentenek a génterápiában. Ennek megfelelően, ha egy cinkujj fehérjéből Ni^{2+} -ionokkal kialakított mesterséges nukleázt később ilyen célokra szeretnének használni, akkor fontossá válik annak tanulmányozása fiziológias körülmények között. Ezért a hidrolízist 37 °C-on és 7,4-es pH-n is nyomon követtük ezúttal hosszabb ideig (11 napig), ami során a vártak megfelelően, azt tapasztaltuk, hogy a reakció sebessége jelentősen lecsökkent. Tehát nem csak a hőmérséklet, de a pH kis változása is nagyban befolyásolja a sebességet.



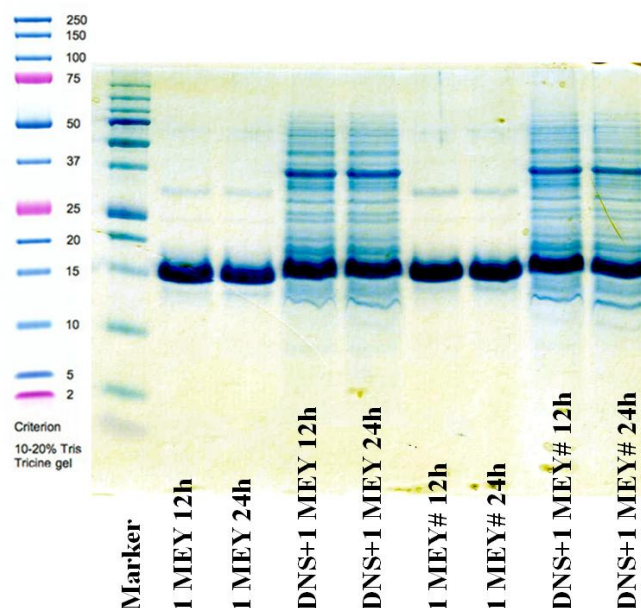
5.10.ábra. A Tricin SDS gékép az eredeti (IMEY, bal oldal) és mutáns (IMEY#, jobb oldal) fehérje Ni^{2+} -ionok okozta hidrolízisééről. $\{c_{\text{fehérje}}=30 \mu\text{M}, c_{\text{Zn(II)}}=100 \mu\text{M}, c_{\text{Ni(II)}}=300 \mu\text{M}; \text{HEPES puffereben (100 mM, pH 8,2), } 37^\circ\text{C}\}$

Mivel fiziológias körülmények között a hidrolízis sebessége nagyon lecsökken, ezért kevésbé szembetűnő a különbség a két fehérje esetén. Úgy tűnik, hogy a hőmérséklet csökkenése a szukcesszív hasítási folyamatok lejátszódását ennyi időn belül megakadályozta.

5.5. A fehérjék hidrolízisének vizsgálata nukleinsav jelenlétében:

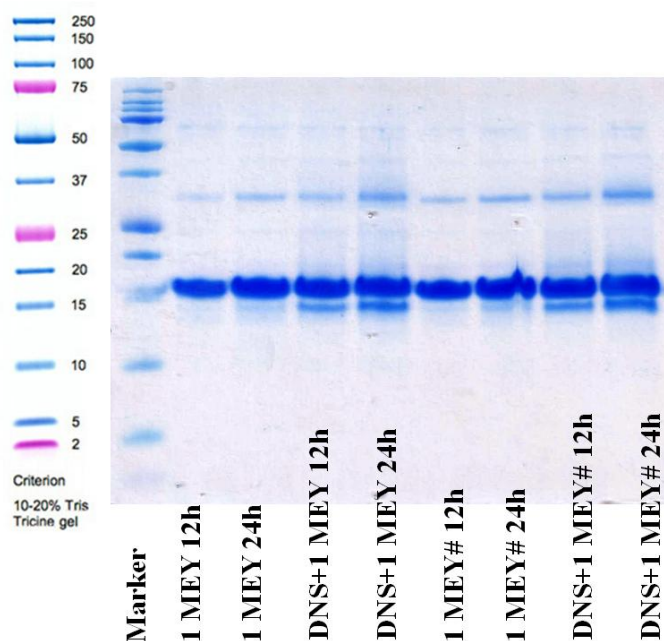
Következő lépésben azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a fehérje Ni^{2+} -ionok okozta hidrolízisét az, ha a rendszerben nukleinsav is jelen van. Ennek eldöntéséhez plazmid DNS, illetve rövid DNS fragmens jelenlétében is végeztünk kísérletet. A felhasznált DNS molekulák a fentiekben leírtak szerint specifikus kötőhelyet tartalmaznak a fehérjék számára. A fehérje minden esetben 50× feleslegben szerepelt a

plazmid, ill. PCR fragmens koncentrációjához képest. Előbbi kísérlet eredménye az 5.11. ábrán látható.



5.11.ábra. A plazmid DNS-t is tartalmazó minták Tricin SDS gélképe $c_{\text{fehérje}}=15 \mu\text{M}$, $c_{\text{plazmid}}=0,3 \mu\text{M}$, $c_{\text{Ni(II)}}=150 \mu\text{M}$; HEPES pufferben (100 mM, pH 8,2), 37°C

A Tricin SDS gélen kontrollként magát a fehérjét vittük fel 12 és 24 óra inkubálás után, mint ahogy korábban is. Ezúttal sem tapasztaltunk számottevő degradációt a kísérlet körülményei között (37°C , 8,2 pH, 100 mM HEPES). A plazmid DNS-t is tartalmazó mintáknál azonban sok, egymástól élesen elvált, új sávot figyeltünk meg a fehérje sávja alatt és felett is. A fehérje sávja felett megjelent új sávokat azzal magyarázzuk, hogy a plazmid oldat RNS-t is tartalmazott a tisztítási eljárás után, amihez szintén kötődni képes a cinkujj fehérje, a kialakult RNS-fehérje komplex pedig képes az akrilamid gélben migrálni. Mivel a komplex tömege nagyobb, mint a fehérje tömege, így a gélben mozgása akadályozottabb, azaz a fehérje sávja fölött jelenik meg. A fenti gélképből azonban nem egyértelmű, hogy a fehérje sávja alatt elhelyezkedő új sávok hidrolízistermékek-e, ezért ugyanezt a kísérletet egy 332 bázispáros DNS fragmenssel is elvégeztük, mivel ez PCR készülékben lett előállítva, így biztosan nem tartalmaz RNS szennyeződést. Ennek eredménye az 5.12. ábrán látható.



5.12.ábra. A 332 bp DNS fragmenst is tartalmazó minták Tricin SDS gélképe $\{c_{\text{fehérje}}=30 \mu\text{M}, c_{\text{fragmens}}=0,6 \mu\text{M}, c_{\text{Ni(II)}}=300 \mu\text{M}; \text{HEPES pufferben (100 mM, pH 8,2), } 37^\circ\text{C}\}$

Erről a gélképről már megállapítható, hogy a Ni^{2+} -ion koordinálódása a fehérjéhez, majd a peptidkötés hasadása nukleinsav jelenlétében is megtörténik, azonban a korábbi csak fehérjét tartalmazó elegyekkel összevetve sebességcsökkenés tapasztalható. Vizsgáltuk továbbá azt is, hogy mennyiben befolyásolja a komponensek összekeverésének sorrendje a reakció lejátszódását: készítettünk egy olyan oldatot, amelyben először a DNS-t és a fehérjét, majd fél órás szobahőmérsékletű inkubálás után a Ni^{2+} -ionokat kevertük össze, és egy olyan oldatot, melyben a fehérjéhez először adtuk a Ni^{2+} -ionokat, majd a fél órás inkubálás után a DNS-t. Ezeket is Tricin SDS gélen futtattuk meg, és azt tapasztaltuk, hogy a sávok mindkét elegykészítés esetében ugyanúgy néztek ki.

6.Összefoglalás

Tudományos Diákköri dolgozatom elkészítése során egy korábban már jellemzett, specifikus DNS kötő tulajdonsággal bíró cinkujj fehérje (1MEY) reakcióját vizsgáltam Ni^{2+} -ionokkal. A kiválasztott fehérje három, Ni^{2+} -ionok megkötésére alkalmas szekvenciát tartalmaz, melyekben a fémion síknégyzetes komplexben való koordinálódása során egy meghatározott peptidkötés elhasad. Mivel a háromból két nikkell(II)-kötőhely a specifikus nukleinsav szekvencia felismerésért felelős ujjdomének egyikében található, ezért a munka megkezdése előtt egy olyan mutánst is terveztünk (1MEY#), ami ezeket a kötőhelyeket nem tartalmazza. A fehérjéket tíz hisztidinből álló His-toldalékkal állítottuk elő, ami könnyű tisztítási lehetőséget biztosított nikkell-affinitás kromatográfiával. Ezután helyspecifikus mutagenezissel beépítettük a fehérjék által specifikusan felismert kilenc bázispáros szekvenciát egy plazmid DNS-be, amit baktériumokban felszaporítottunk, és megtisztítottunk, illetve PCR segítségével egy rövidebb DNS fragmenst is előállítottunk.

A Ni^{2+} -ionok okozta hidrolízist 8,2-es és 7,4-es pH-n, 50 és 37°C-on vizsgáltuk, az eredményeket Tricin SDS PAGE módszerrel követtük nyomon. Az 1MEY fehérje esetében az eredeti fehérje sávja alatt két új sáv képződését figyeltük meg az idő előrehaladtával, míg a mutáns fehérjénél csak egy új sávot tapasztaltunk. Mindez az elsődleges szerkezet ismeretében egyezik a vártakkal. A hidrolízistermékeket fordított fázisú HPLC eljárással választottuk el egymástól. A fehérjék aminosav sorrendjének ismeretében a www.expasy.com oldalon található „Protparam” funkcióval kiszámoltuk az egyes hidrolízis termékek molekulatömegét, majd ezeket összevetettük a TOF-MS által szolgáltatott adatokkal, így sikerült beazonosítani az egyes termékeket.

A sikeres hidrolitikus kísérletek után azokat egy specifikus kötőhelyet tartalmazó nukleinsav (plazmid DNS és rövid DNS fragmens) jelenlétében ismételtük meg, hogy megvizsgáljuk, befolyásolják-e a hidrolízis lejárásodását. A plazmid DNS esetében a tisztítás után is fellelhető RNS szennyeződés miatt nem kaptunk egyértelmű eredményt, de PCR fragmenssel végzett kísérletek bebizonyították, hogy a hidrolízis DNS jelenlétében, ugyan kisebb sebességgel, de lejátszódik.

A továbbiakban tervezzük annak a vizsgálatát, hogy mi okozza nukleinsav jelenlétében a hidrolízis sebességének csökkenését: ugyanis előfordulhat, hogy csak a DNS-hez nem kötődő fehérje hasad el a fémion hatására, ami a későbbi DNS roncsolási kísérletek eredményét alapvetően befolyásolhatja. Célul tűztük ki továbbá a fehérjében kialakuló síknégyzetes nikkell(II)-komplex DNS roncsoló hatásának feltérképezését a plazmid DNS-sel az RNS szennyeződés eltávolítása után. Vizsgálni szeretnénk, hogy a DNS egyszálú vagy kétszálú hasadása játszódik le, és hogy mindez milyen specifikussággal történik.

7. Irodalomjegyzék

- [1] Kiss T., Gajda T., Gyurcsik B.: Bevezetés a bioszervetlen kémiába, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2007)
- [2] C.A. Kim, J.M. Berg: A 2.2 Å resolution crystal Structure of a designed zinc finger protein bound to DNA. *Nature Struct. Biol.*, 3, 940-945 (1996)
- [3] Potential Carriers of Toxic Effects of Ni(II) Ions in Humans: Histatin 5, 3rd Zinc Finger of the SP1 Transcription Factor and Carbonic Anhydrase II. Ewa Sylwia Kurowska, Warsaw, 2012.
- [4] Hambidge, K. M. and Krebs, N. F. (2007). "Zinc deficiency: a special challenge". *J. Nutr.* 137 (4): 1101–5
- [5] Kiss T., Gajda T., Gyurcsik B.: Bevezetés a bioszervetlen kémiába, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2007)
- [6] F.D. Urnov, E.J. Rebar, A. Reik, P.P. Pandolfi: Designed transcription factors as a structural functional and therapeutic probes of chromatin *in vivo*. *EMBO Reports*, 3, 610-615 (2002).
- [7] S.H. Mishra, C.M. Shelley, D.J. Barrow, M.K. Darby, M.W. Germann: Solution structures and characterization of human immunodeficiency virus rev responsive element IIB RNA targeting zinc finger proteins. *Biopolymers*, 83, 352–364 (2006).
- [8] T. Mino, T. Mori, Y. Aoyama, T. Sera: Cell-permeable artificial zinc-finger proteins as potent antiviral drugs for human papillomaviruses. *Arch. Virol.*, 153, 1291–1298 (2008).
- [9] M.G. Di Certo, N. Corbi, G. Strimpakos, A. Onori, S. Luvisetto, C. Severini, A. Guglielmotti, E.M. Batassa, C. Pisani, A. Floridi, B. Benassi, M. Fanciulli, A. Magrelli, E. Mattei, C. Passananti: The artificial gene Jazz, a transcriptional regulator of utrophin, corrects the dystrophic pathology in mdx mice. *Hum Mol Genet.*, 19, 752-760 (2010).
- [10] C. Passananti, N. Corbi, A. Onori, M.G. Certo, E. Mattei: Transgenic mice expressing an artificial zinc finger regulator targeting an endogenous gene. *Methods Mol Biol.*, 649, 183-206 (2010).
- [11] M. Imanishi, T. Nakaya, T. Morisaki, D. Noshiro, S. Futaki, Y. Sugiura: Metal-stimulated regulation of transcription by an artificial zinc-finger protein. *Chembiochem*, 11, 1653-1655 (2010).
- [12] S. Stolzenburg, A. Bilsland, W.N. Keith, M.G. Rots: Modulation of gene expression using zinc finger-based artificial transcription factors. *Methods Mol. Biol.*, 649, 257-270 (2010).
- [13] D. Jantz, B.T. Amann, G.J. Gatto, J.M. Berg: The design of functional DNA-binding proteins based on zinc finger domains: *Chem. Rev.*, 104, 789-799 (2004).

- [14] Y. Shiraishi, M. Imanishi, T. Morisaki, Y. Sugiura: Swapping of the beta-hairpin region between Sp1 and GLI zinc fingers: significant role of the beta-hairpin region in DNA binding properties of C2H2-type zinc finger peptides. *Biochemistry*, 44, 2523-2528 (2005).
- [15] M. Dhanasekaran, S. Negi, M. Imanishi, Y. Sugiura: DNA-Binding Ability of GAGA zinc finger depends on the nature of amino acids present in the β -hairpin. *Biochem.*, 46, 7506-7513 (2007).
- [16] E. Peisach, C.O. Pabo: Constraints for zinc finger linker design as inferred from X-ray crystal structure of tandem Zif268–DNA complexes. *J. Mol. Biol.*, 330, 1–7 (2003).
- [17] E.M. Händel, S. Alwin, T. Cathomen: Expanding or restricting the target site repertoire of zinc-finger nucleases: the inter-domain linker as a major determinant of target site selectivity. *Mol. Ther.*, 17, 104-111 (2009).
- [18] P.V. Benos, M.L. Bulyk, G.D. Stormo: Additivity in protein-DNA interactions: how good an approximation is it? *Nucl. Acids Res.*, 30, 4442-4451 (2002).
- [19] W. Nomura, Y. Sugiura: Design and synthesis of artificial zinc finger proteins. *Methods Mol Biol.*, 352, 83-93 (2007).
- [20] M. Dhanasekaran, Sh. Negi, Y. Sugiura: Designer Zinc Finger Proteins: Tools for creating artificial dna-binding functional proteins. *Acc. Chem. Res.*, 39, 45-52 (2006).
- [21] J.G. Mandell, C.F. Barbas: Zinc Finger Tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases. *Nucl. Acids Res.*, 34, W516-W523 (2006).
- [22] D.J. Segall, C.F. Barbas: Custom DNA-binding proteins come of age: polydactyl zinc-finger proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12, 632-637 (2001).
- [23] M.S. Bhakta, D.J. Segal: The generation of zinc finger proteins by modular assembly. *Methods Mol. Biol.*, 649, 3-30 (2010).
- [24] M. Minczuk: Engineered zinc finger proteins for manipulation of the human mitochondrial genome. *Methods Mol. Biol.*, 649, 257-270 (2010).
- [25] C.L. Ramirez, J.E. Foley, D.A. Wright, F. Müller-Lerch, S.H. Rahman, T.I. Cornu, R.J. Winfrey, J.D. Sander, F.Fu, J.A. Townsend, T. Cathomen, D.F. Voytas, J. K. Joung: Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat. Methods.*, 5, 374-375 (2008).
- [26] J.G. Mandell, C.F. Barbas III : Zinc Finger Tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases. *Nucl. Acids Res.*, 34, W516-W523 (2006)
- [27] M. Szczepek, V. Brondani, J. Büchel, L. Serrano, D.J. Segal, T. Cathomen: Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnol.*, 25, 786-793 (2007)

- [28] C. Harford, B. Sarkar: Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-Binding (ATCUN) Motif of Proteins and Peptides : Metal Binding, DNA Cleavage, and Other Properties. *American Chemical Society*, 30, 123-13, (1997)
- [29] M. Nagaoka, M. Hagihara, J. Kuwahara, Y. Sugiura: A Novel Zinc Finger-Based DNA Cutter : Biosynthetic Design and Highly Selective DNA Cleavage. *American Chemical Society*, 116, 4085-4086 (1994)
- [30] E. Kurowska, J. Sasin-Kurowska, A. Bonna, M. Grynberg, J. Poznanski, L. Knizewski, K. Ginalska and W. Bal: The C2H2 zinc finger transcription factors are likely targets for Ni(II) toxicity. *Metallomics*, 3, 1227-1231 (2011)
- [31] Nature Protocols 1, -16 - 22 (2006)

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Kiss Tamás tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette számomra, hogy a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken Tudományos Diákköri dolgozatom elkészítsem.

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Gyurcsik Bélának, aki érdekesebbnél érdekesebb molekuláris biológiai témákba kalauzolt el. Köszönet illeti továbbá japán együttműködő partnereinket a Tsukbai Egyetemről, kiváltképp Masamitsu Asakat, és a Lengyel Tudományos Akadémia Biofizika és Biokémia Intézetében Wojciech Bal vezetésével működő kutatócsoport minden egyes tagját.

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

8.Függelék

8.1.1 Az 1MEY cinkujj fehérje aminosav és DNS szekvenciája:

HMLEPGEKPYKCPECGKSFSQSSNLQKHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSDLQKHQRT
HTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLSRHQRTHTGKKT

catatgctggaaccggggcgaaaagccgtataaatgccagaatgcggtaaatcttttag
tcaaagcagcaaccttcagaaacaccagcgtaaccacacaggcgaaaaaacgtataagt
gtccggaatgtggtaaatcattctcgcagtccttcggacttgagaaacatcaacgcacc
cataccggcgaaaaaacgtataaatgtcccgaatgcgggaagtcatcttccgcagcga
tcacctgagtcgccatcagcgtaccatactggtaaaaaaacctcttaaggatcc

8.1.2 Az 1MEY# cinkujj fehérje aminosav és DNS szekvenciája:

HMLEPGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRT
HTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGKKTS

catatgctggaaccgggcgaaaagccgtataaatgccagaatgcggtaaatcttttag
tcaaagcagcaaccttcagaaacaccagcgtaccacacaggcgaaaaaacgtataagt
gtccggaatgtggtaaatcattctcgcagcttctcggaacttgcagaaacatcaacgcacc
cataccggcgaaaaaacgtataaatgtcccgaatgcgggaagtcatTTTTCCGcagcga
taacctgggttcgccatcagcgtaccataactggtaaaaaaacctcttaaggatcc

8.1.3 A pET16b hordozó vektor bázisszekvenciája:

[illegible]

8.1.4 A pET30a(+) hordozó vektor bázisszekvenciája:

42

GGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTT
CAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAAACCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTG
GTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGT
ATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGC
GGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACG
CTCAGTGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTA
TGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCTAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCG
CGATAATGTCCGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGT
AGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTCCGACCATCAAGCATTATCC
GTACTCTGATGATGATGCTGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGA
AAATATGTTGATGCGCTGGCAGTGTCTGCGCCGGTTGCATTCGATTCTGTTTGTAAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTT
CGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGTGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAAC
AAGTCTGGAAAGAAATGCATAAATTTTGCCATTCTCACCAGATTGATGCTGCTCACTCATGGTGATTTCTCAGTTGATAACCTTATTTT
TGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACAGGATCTTGCCATCTATGGAAGTGC
CTCGGTGAGTTTCTCCTTATTACAGAAACGGCTTTTCAAAAATATGGTATGATAATCCTGATATGAATAAATTGAGTTTCATT
TGATGCTCGATGAGTTTCTAAGAATTAATTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGC
GCACATTTCCCGGAAAGTGCCACCTGAAATTGTAACGTTAATATTTGTTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATT
TTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAGAAATCCCTTATAAATCAAAAGAAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAC
AAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCAC
CCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCGGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAA
GCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTA
ACCACCACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCA

8.1.5 Az 1MEY és 1MEY# cinkujj fehérjékhez tartozó specifikus DNS szekvencia:

GGGTTCTGAATTGGAACCGCCATGGAAACCTTGATCAACGTTTTCCACGCTCACTCTGGTAA
GGAAGGTGACAAGTACAAGTTGTCTAAGAA**GGAATTGAAGGAGGCAGAGA**AATTGTT**GC**AAA
CCGAATTGTCTGGTTTTCTAGACGCCGAGAAGGACGTTGATGCCGTCGATAAGGTCATGAAGG
AATTGGACGAGAACGGTGACGGTGAAGTTGATTTCCAAGAATACGTTGTCTTGGTTGCTGCTT
TGACCGTTGCAATGAACAACCTTTCTGGGAAAACCTTTCTCGTCATTGGAACCGAAGCTT**GC**
GGCCGCACTCGAGCACC

Kékkel a fragmens előállításához használt primereket jelöltem. Pirossal a cinkujj fehérjék kötőhelye szerepel.

8.2 Alkalmazott módszerek

8.2.1 Polimeráz láncreakció

Egy általunk alkalmazott tipikus PCR elegy összetétele öt reakcióra:

DNS templát	5 µl
primer Up (10 µM)	12,5 µl
primer Down (10 µM)	12,5 µl
dNTP keverék (2 mM)	10 µl
puffer	25 µl
polimeráz enzim (1 egység/µl)	2,5 µl
steril H ₂ O	182,5 µl
össztérfogat:	250 µl

A 332 bp hosszú fragmens esetén alkalmazott PCR-program (a paraméterek az aktuális primerek olvadáspontjától függően változhatnak):

1. 95°C 2 min
2. 95°C 30 sec
3. 53°C 30 sec
4. 72°C 1 min
5. vissza a 2-es lépéshez, 30×ismétlés
6. 95°C 30 sec
7. 53°C 30 sec
8. 72°C 15 min
9. 4°C
10. vége

8.2.2 Tisztítás PCR elegyből

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

8.2.3 Transzformálás

50-100 µl kézmeleg kompetens sejthez 2 µl-t mértem a plazmidot tartalmazó oldatból. Összemérés után 10 percig jégen tartottam az elegyeket, majd 2 perce 42°C-os vízfürdőbe tettem. Ezután azonnal jégre kerültek újabb 1 percre, majd 37°C-ra melegített rázóinkubátorba tettem őket egy órára 1 ml kézmeleg steril LB tápoldat hozzáadásával előszaporítás gyanánt. Ezután lemezekre öntött, antibiotikum tartalmú táptalajra kentem ki változó mennyiséget, majd egy éjszakán át 37°C-on inkubáltam, hogy telepek nőhessenek.

8.2.4 TENS

Az éjszaka felszaporított baktériumkultúrából 10×1,5 ml-t steril eppendorf csövekbe töltöttem, és 14000 rpm-en 1 percig centrifugáltam. A tápoldatot leöntöttem úgy, hogy 50-100 µl maradjon a sejteken, és ebben újra felkevertem őket. Ezután csak jégen dolgoztam: 300 µl TENS puffert adtam a csövekhez, majd 10 másodpercig kevertem őket, ezután 150 µl 3M Na-acetát oldatot (pH 5,2) adtam hozzájuk és ismét 10 másodpercig kevertettem őket. Ezután 5 percet várahoztam, majd 14000 rpm-en, 4°C-on 7 percig centrifugáltam az oldatokat. Ezután óvatosan leszívtam a tiszta felülúszót, és 900 µl jéghideg abszolút etanolt adtam hozzá. 2-3 óra várakozás után, ami alatt -80°C-ra tettem a csöveket, 30 percig 14000 rpm-en és 4°C-on centrifugáltam a mintákat, majd leszívtam róluk a felülúszót, és 1 ml jéghideg 70%-os etanolt pipettáztam a kicsapott DNS-re. Ezután 10 percig centrifugáltam 14000 rpm-en, majd leszívtam a folyadékot és steril fülkében szárítottam a DNS-t. Végezetül steril vízben, vagy TE-ben oldottam fel.

8.3 A felhasznált gélek leírása:

8.3.1 Agaróz gél

A DNS nagyságától függően 1%, 1,7% ill. 3%-os töménységű gélét öntöttem úgy, hogy 2 g/ 3,4 g/ 6 g szilárd agarózt 200 ml 0,5% TBE oldatban oldottam melegítve, majd mikor kézmelegre hűlt 20 µl etídium-bromidot adtam hozzá. Ezután a formába öntöttem és beletettem a fésűket. Mindvégig vigyáztam, hogy buborékok ne képződjének a gélben.

8.3.2 Tricin SDS gél

RÉTEGZŐ
TÖMÖRÍTŐ
ELVÁLASZTÓ

Elválasztó gél: (40 mm)
(16,5 % T / 3% c)

Akrilamid (49,5%)	4 ml
Gél Puffer	4 ml
Glicerol/ H ₂ O	4 ml
APS (10%)	45,2 µl
TEMED	4,5 µl

Tömörítő gél:(13 mm)

Akrilamid (49,5%)	0,6 ml
Gél Puffer	1 ml
H ₂ O	1,4 ml
APS (10%)	24 µl
TEMED	2,4 µl

Rétegző gél:

Akrylamid (49,5%)	0,4 ml
Gel Buffer	1,25 ml
H ₂ O	3,36 ml
APS (10%)	44 µl
TEMED	4,4 µl

A két alsó gélhez összekevertem a fent ismertetett hozzávalókat jégen. A polimerizációt inicializáló anyagok (TEMED, APS) hozzáadása után még egyszer alaposan elkevertem az elegyeket, majd a formába előre befogott, alkohollal tisztára törölt üveglapok közé pipettáztam először az elválasztó, majd a tömörítő gél megfelelő mennyiségét. Hogy vízszintes legyen a gél, vizet rétegeztem rá, és 20 percig hagytam polimerizálódni. A rétegző gél is a leírásnak megfelelően elkészítettem, majd az alsó gél megszilárdulása után a vizet leöntöttem róla, rárétegeztem a gél, amibe beletettem a zsebket kialakító ún. fésűt, és újabb 20 percig vártam, hogy megszilárduljon.

8.3.3 Natív gél

Nagy gélöntő formára vonatkoztatva:

6%-os gél (felső 2/3): 50 ml térfogatra
27,5 ml víz

10 ml 30%-os akril-amid törzsoldat
12,5 ml gél puffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)
250 µl APS, 25 µl TEMED

10%-os gél (alsó 1/3): 30 ml térfogatra

12,6 ml víz
9,9 ml 30%-os akril-amid törzsoldat
7,5 ml gél puffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)
150 µl APS, 15 µl TEMED

Először az alsó gél készítetttem el, jégen dolgozva, majd az üvegek közé rétegeztem és vizet töltöttem rá. Miután a gél megszilárdult, a felső gél is elkészítetttem, a vizet leöntöttem, majd az alsó gélre rétegeztem, és beletettem a zsebeket kialakító fészűt.