



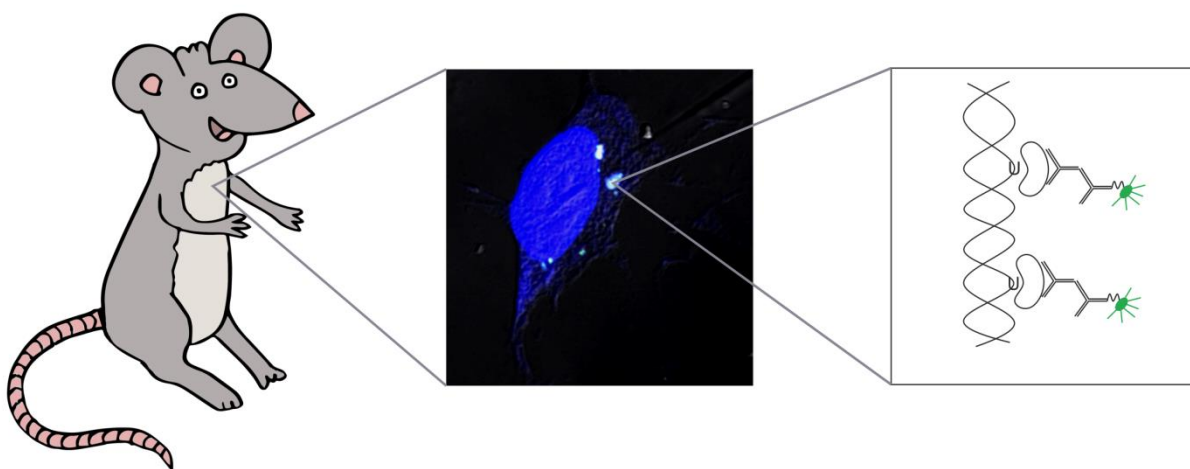
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék

Tihanyi Gergely

Vegyészmérnök szakos hallgató, BSc. II. évfolyam



Egy uracil szenzor *in vitro* és *in vivo* alkalmazási lehetőségei

XXXII. OTDK Kémiai és Vegyipari Szekció

Témavezető: Dr. Vértessy G. Beáta egyetemi tanár

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék

MTA TTK Enzimológia Intézet

Konzulens: Róna Gergely tudományos segédmunkatárs

MTA TTK Enzimológia Intézet

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	2
1. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	4
2. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	5
3. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
3.1 A DNS-MOLEKULA	7
3.2 A DNS-BEN ELŐFORDULÓ HIBÁK	9
3.2.1 A DNS-HIBÁK TÍPUSAI	9
3.2.2 A DNS-HIBÁK OKAI	10
3.3 A DNS-HIBÁK JAVÍTÁSA	11
3.4 URACIL MEGJELENÉSE A DNS-BEN CITOZIN DEZAMINÁCIÓ HATÁSÁRA	12
3.5 URACIL MEGJELENÉSE A DNS-BEN REPLIKÁCIÓ SORÁN	14
3.6 A TIMIDILÁT BIOSZINTÉZIS	16
3.7 URACIL A DNS-BEN TERMÉSZETES MÓDON	17
3.8 AZ UDG ENZIMCSALÁD TAGJAI	18
3.9 URACILKVANTIFIKÁLÁS AZ IRODALOMBAN	19
4. CÉLKITŰZÉS	21
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	22
5.1 REKOMBINÁNS FEHÉRIJT KÓDOLÓ PLAZMID TRANSZFORMÁLÁSA <i>E. COLI</i> SEJTEKBE	22
5.2 REKOMBINÁNS FEHÉRJE EXPRESSZIÓJA	22
5.3 SEJTEK FELTÁRÁSA	23
5.4 REKOMBINÁNS FEHÉRJE TISZTÍTÁSA AFFINITÁS KROMATOGRÁFIÁVAL	24
5.5 NÁTRIUM-DODECILSZULFÁT POLIAKRILAMID GÉLELEKTROFORÉZIS	25
5.6 <i>E. COLI</i> ÉS MEF DNS TISZTÍTÁSA	25
5.7 AGARÓZ GÉLELEKTROFORÉZIS	25
5.8 DNS KONCENTRÁCIÓJÁNAK MEGHATÁROZÁSA NANO DROP SPEKTROFOTOMÉTERREL	26
5.9 ELISA MÓDSZER	26
5.9.1 ELŐHÍVÁS OPD SZUBSZTRÁTTAL	28
5.9.2 ELŐHÍVÁS QUANTA RED SZUBSZTRÁTTAL	28
5.10 PET-20B EXPRESSZIÓS VEKTORBAN KÓDOLT REKOMBINÁNS FEHÉRJE LÉTREHOZÁSA	29
5.11 PLAZMIDDAL TRANSZFEKTÁLT MEF SEJTEK <i>IN VIVO</i> VIZSGÁLATA	31
5.12 SEJTVONALAK FENNTARTÁSA	33
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	34
6.1 <i>HIS-3xFLAG-ΔUNG</i> FEHÉRJE TERMELÉSE ÉS TISZTÍTÁSA	34
6.2 AZ ELISA MÉRÉSEKHEZ HASZNÁLNI KÍVÁNT GENOMI DNS-PREPARÁTUM TISZTASÁGÁNAK ELLENŐRZÉSE	35
6.3 AZ ELISA MÓDSZER OPTIMALIZÁLÁSA	36
6.3.1 AZ ILLESZTETT EGYENES MEREDKSÉGÉNEK SZEREPE	36
6.3.2 A PLATE-RE FELVITT DNS MENNYISÉGÉNEK OPTIMALIZÁLÁSA	37
6.3.3 A MÁSODLAGOS ANTITEST MENNYISÉGÉNEK, ILLETVE AZ INKUBÁCIÓS IDŐ OPTIMALIZÁLÁSA	39
6.3.4 AZ ASPECIFIKUS ANTITEST-KIKÖTÖDÉS TESZTELÉSE	41
6.3.5 INKUBÁCIÓS IDŐ OPTIMALIZÁLÁSA A QUANTA RED SZUBSZTRÁTTAL	42
6.4 KEZELT ÉS KEZELETLEN <i>E. COLI</i> DNS-MINTÁK URACILTARTALMÁNAK MEGHATÁROZÁSA	43
6.4.1 A MÉRÉSI EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE	44
6.5 KEZELT ÉS KEZELETLEN MEF DNS-MINTÁK URACILTARTALMÁNAK MEGHATÁROZÁSA	46
6.5.1 A MÉRÉSI EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE	47
6.6 A <i>1xFLAG-ΔUNG-DsRED-HIS</i> KONSTRUKT LÉTREHOZÁSA MEF SEJTEK <i>IN VIVO</i> VIZSGÁLATAIHOZ	50

6.6.1 AZ EMÉSZTETT PET-20B PLAZMID IZOLÁLÁSA AGARÓZ GÉLBŐL	50
6.6.2 A LIGÁLANDÓ DNS-EK INTAKTSÁGÁNAK ELLENŐRZÉSE	51
6.7 PLAZMIDDAL TRANSZFEKTÁLT MEF SEJTEK <i>IN VIVO</i> VIZSGÁLATA	52
7. ÖSSZEFOGLALÁS	55
8. IRODALOMJEGYZÉK	56

1. Köszönetnyilvánítás

Először is köszönettel tartozom Dr. Vértessy G. Beátának, témavezetőmnek, akitől lehetőséget kaptam arra, hogy kutatócsoportja tagja legyek, munkámat figyelemmel kísérte és segítette.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Buday Lászlónak, amiért intézetében dolgozhattam, melynek infrastruktúrája nélkül nem jöhetett volna létre ez a munka.

Továbbá köszönettel tartozom Róna Gergelynek, konzulensemnek, amiért bevezetett a témába, és rengeteg technikai, valamint elméleti kérdésemre választ adott.

Ezenfelül köszönettel tartozom Scheer Ildikónak és Nagy Kingának, akiknek Róna Gergellyel végzett korábbi munkája alapjául szolgált a jelen dolgozatnak, illetve tanácsaikkal rengeteget segítettek munkám során.

Köszönöm Tihanyi Rékának, aki segített a címlapkép létrehozásában.

Végezetül szeretném megköszönni a kutatócsoport minden további tagjának, akik szintén készségesen segítettek, bármilyen jellegű kérdéssel is fordultam hozzájuk.

2. Rövidítésjegyzék

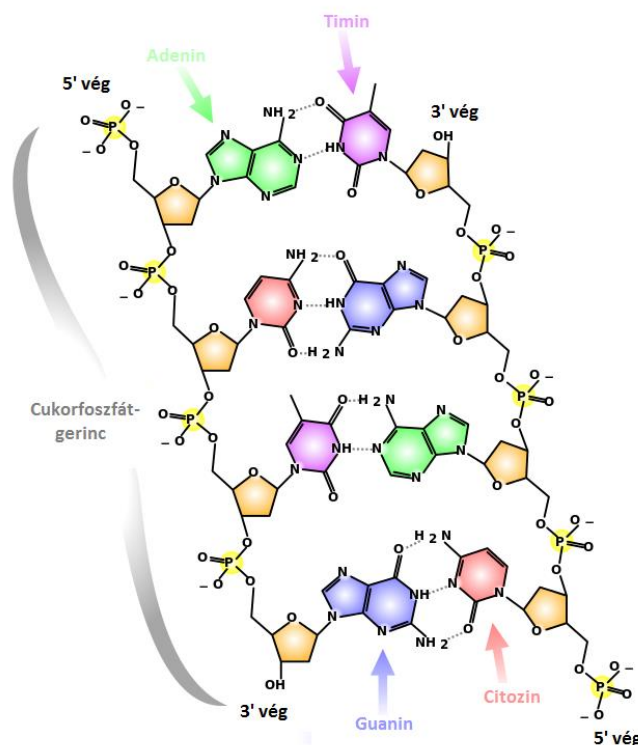
5FdUR	5-fluoro-2' dezoxiuridin
5FU	5-fluorouracil
A	adenin
AID	aktiválás indukált dezamináz (activation-induced deaminase)
AP site	bázismentes hely (apurinic/apyrimidinic site)
APE	AP endonukleáz
BA	benzamidin
BER	báziskivágáson alapuló javítás (base excision repair)
bp	bázispár
BSA	marhaszérum albumin (bovine serum albumin)
C	citozin
CPD	ciklobután-pirimidin-dimer
C-terminális	karboxi-terminális
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DIC	differenciális interferencia kontraszt
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNMP	dezoxiribonukleotid-monofoszfát
dNTP	dezoxiribonukleotid-trifoszfát
dTMP	dezoxitimidin-monofoszfát
DTT	ditiotreitol
dTTP	dezoxitimidin-trifoszfát
dUR	dezoxiuridin
dUMP	dezoxiuridin-monofoszfát
dUTP	dezoxiuridin-trifoszfát
dUTPáz	dezoxiuridin-trifoszfát-pirofoszfatáz
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FACS	fluoreszcencia aktivált sejtszortírozó berendezés
FBS	marha magzati szérum (fetal bovine serum)
FGS	kecske magzati szérum (fetal goat serum)
G	guanin
HEPES	N-(2-hidroxietyl)-piperazin-N'-etánszulfonsav
His-tag	polihisztidin-címke
HRP	torma peroxidáz (horseradish peroxidase)

HS	magas sókoncentráció (high salt)
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
LB	Luria Bertani tápoldat
LS	alacsony sókoncentráció (low salt)
MBD4	methyl-CpG-binding domain protein 4
MEF	egér embrionális fibroblaszt (mouse embrional fibroblast)
MS	tömegspektrometria (mass spectrometry)
NEB	New England Biolabs
NTA	nitrilo-triecetsav
N-terminális	amino-terminális
OD	optikai denzitás
OPD	orto-feniléndiamin
PBS	izotóniás foszfát puffer (phosphate buffered saline)
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polimeráz láncreakció (polimerase chain reaction)
PMSF	fenilmetánszulfonil-flourid
qPCR	kvantitatív real time PCR
RNS	ribonukleinsav
RPA	replication protein A
SDS	nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
SMUG	single-strand-selective monofunctional uracil-DNA-glycosylase
T	timin
TAE	tris-acetát-EDTA puffer
TDG	T/U hibáspár DNS glikoziláz
TS	timidilát-szintáz
TRIS	2-amino-2-hidroximetilpropán-1,3-diol
U	uracil
UDG	uracil-DNS glikoziláz
UGI	uracil-DNS glikoziláz inhibitor
UNG	uracil-DNS N-glikoziláz
UV	ibolyántúli (ultraviola) fény
VHS	nagyon magas sókoncentráció (very high salt)

3. Bevezetés és irodalmi áttekintés

3.1 A DNS-molekula

Az élővilágban rendkívül fontos, hogy a genetikai információ, amely kódolja az élőlény szervezetét felépítő összes fehérjét, biztonságosan legyen tárolva. Ezen fontos funkciót a DNS (dezoxiribonukleinsav) látja el, amely egy hosszú helikális makromolekula. Építőkövei (monomerjei) a nukleotidok, amelyek három részből épülnek fel: dezoxiribóz (2-dezoxi-D-ribóz), ortofoszforsav, és nitrogéntartalmú heterociklusos bázis. A nitrogéntartalmú bázis lehet pirimidinszármazék (uracil, timin, citozin), vagy purinszármazék (adenin, guanin). A nukleotidban a szénhidrát-molekula 5-ös szénatomját a foszforsav észteresíti, 1-es szénatomjával pedig a bázishoz csatlakozik β -N-glikozidkötéssel. A következő nukleotid foszforsav része az öt megelőző nukleotid cukormolekulájának 3-as szénatomját észteresíti, egészen a DNS-lánc végéig, tehát a makromolekula alapja a cukorfoszfátgerinc. A normál DNS-molekula két antiparalel lefutású szálból épül fel, tehát a szálak párhuzamosak, de irányítottaságuk ellentétes. A két szál a cukorfoszfát-gerincben található kötőszögek miatt egymás köré csavarodik, ezért a DNS kettős hélix szerkezetű. A szálak belsejében találhatóak a bázisok, melyek egymással szigorú rendszer szerint képesek kapcsolódni, azaz többszörös hidrogénkötést kialakítani. Az adenin a timinnel 2, a citozin a guaninnal 3 hidrogénkötés kialakítására képes, így ezen bázisok a két szálból mindig egymással szembe helyezkednek el, a DNS két szála tehát komplementer. Az uracil a timinnel analóg szerkezetű bázis (csupán egy metilcsoportban térnek el) a ribonukleinsav (RNS) természetes építőeleme [1, 2]. A DNS szerkezetét az **1. ábra** mutatja be.

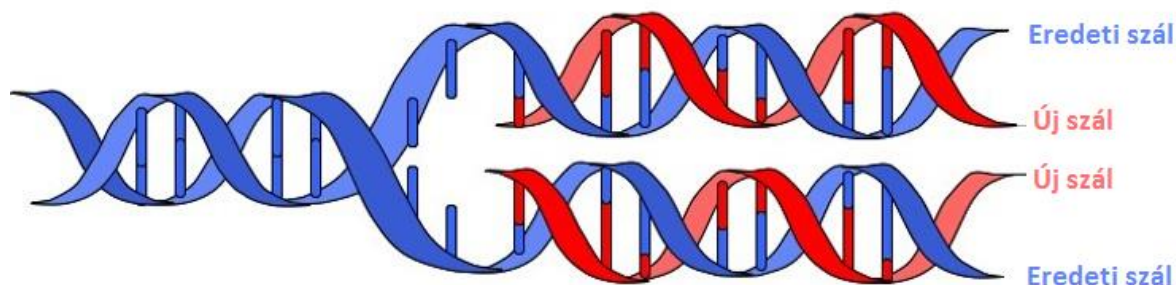


http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e4/DNA_chemical_structure.svg

1. ábra
A DNS szerkezete

A DNS kettős hélixét két egymással antiparalel lefutású cukorfoszfát-lánc alkotja, melyhez glikozidkötéssel kapcsolódnak a nitrogéntartalmú bázisok, szigorú bázispárosodási szabályok szerint.

A DNS megkettőződése során a két szál rövid ideig elválk egymástól, és a DNS-polimeráz enzim az eredeti szálakhoz komplementer szálakat szintetizál. A létrejövő új DNS egyik szála az eredetiből származik, másik szála viszont újonnan szintetizált, ezért a replikáció szemikonzervatív módon megy végbe [1, 2]. A DNS megkettőződését a **2. ábra** szemlélteti.



http://www.ib.bioninja.com.au/_Media/semi_conservative_med.jpeg

2. ábra

A DNS-replikáció

A DNS-replikáció során az eredeti szálakhoz új komplementer szálak szintetizálódnak, így az új DNS kettős hélix eredeti és új szálát is tartalmaz, a replikáció szemikonzervatív.

A DNS a benne található bázisok szekvenciáján keresztül képes az információ tárolására. A transzkripció során mRNS (hírvivő-RNS) másolat készül a DNS egyik száláról, majd ezt felhasználva a riboszómákon megtörténik a transzláció, vagyis az mRNS-ben kódolt információ szerint fog a szintetizálódó fehérje aminosav-szekvenciája létrejönni. Ezt a törvényt a centrális dogma mondja ki, tehát, hogy az információáramlás iránya az élőlényekben szinte mindig DNS → RNS → fehérje. Kivételt képeznek a retrovírusok, melyekben RNS-ből keletkezik DNS a reverz-transzkriptáz enzim hatására.

A DNS szerkezetéből és méretéből adódóan kémiai és fizikai hatásokkal szemben nem inert. Ezen hatásokra a bázisok kémiai módon módosulhatnak, a bázis-szekvencia megváltozhat, illetve a cukorfoszfát-lánc eltörhet. Az efféle folyamatok termékei általában hibaként jelennek meg a DNS-ben.

3.2 A DNS-ben előforduló hibák

3.2.1 A DNS-hibák típusai

Az élő szervezetek DNS-ében rengeteg fajta hiba megjelenhet, ezeket csoportosíthatjuk aszerint, hogy az adott hiba milyen jellegű változást okoz a genomban.

A pontmutáció során a megfelelő bázis helyett egy másik bázis épül be a DNS-be. Ennek leggyakoribb oka az, hogy a DNS-polimeráz nem hiba nélkül szintetizálja az új DNS-szálat. A pontmutációkat az adott génszakasz által kódolt fehérjére való hatás alapján a következő csoportokba sorolhatjuk.

Sense (csendes) mutáció esetén, a DNS egy bázisa olyan bázisra cserélődik, amely az eredetivel megegyező aminosavat kódolja. A DNS kódrendszere ugyanis degenerált, azaz több bázishármas is kódolhatja ugyanazon aminosavat.

Neutrális (semleges hatású) mutáció esetén a báziscsere miatt a kódolt fehérjében aminosavcsere következik be, azonban ez nem változtatja meg a fehérje funkcionalitását. Legtöbbször olyan aminosavak cserélődnek ki, melyek oldallánca hasonló karakterű (savas, bázikus, apoláris), vagy melyek nem a fehérje funkciója számára fontos régióban találhatók.

Missense (megváltozott értelmű) mutáció hatására is aminosavcsere történik, azonban ez a fehérje funkciójának megváltozásával jár. Ez lehet funkcióvesztés, vagy funkciómódosulás is, amely lehet evolúciós szempontból előnyös, vagy hátrányos is az organizmusra nézve.

Nonsense (értelmetlen) mutáció esetén a megváltozott bázishármas már nem aminosavat fog kódolni, hanem STOP kodont. Emiatt az átíródott fehérje rövidebb lesz, így térszerkezete jelentősen megváltozhat, és ez általában teljes funkcióvesztéshez vezet.

A pontmutációk közt igen gyakori a már beépült bázisok aminocsoportjának spontán hidrolízise, a dezamináció. A természetes körülmények közt is lejátszódó reakcióban a bázis aminocsoportja oxocsoportra cserélődik, azonban a reakciósebesség jelentősen megnő, ha a sejt oxidatív stressz alatt áll. A dezamináció leggyakoribb termékei az uracil, amely citozinból, a hipoxantin, amely adeninből és a xantin, amely guaninből keletkezik. A dezaminációval létrejött módosult bázisokról a dolgozat keretein belül még értekezek, mivel ezen bázismódosulások később, a replikáció során mutációt okoznak.

Az egy vagy több bázist egyszerre érintő mutációk a beékelődés (insertion) és a kiesés (deletion). Beékelődés hatására új génszakasz épül be a DNS-be, ami tehát új aminosavakat képes kódolni. Kiesés esetén egy génszakasz törlődik a DNS-ből, így a kódolt fehérje rövidebb lesz. Ezen mutációk járhatnak a fehérje funkciójának pozitív megváltozásával, ám legtöbbször megváltoztatják a kodonok olvasási keretét (reading frame shift). Ennek hatására a kódoló bázishármasok elcsúsznak, így a DNS az eredetitől teljesen eltérő fehérjét fog kódolni, amely általában képtelen feladatát elvégezni.

A DNS-hibák az adott szakaszon átíródó fehérje megváltozását okozhatják. Azonban a hibák jellegét csak akkor érthetjük meg, ha azok kialakulásának okairól alapos ismereteink vannak [2, 3].

3.2.2 A DNS-hibák okai

DNS-hiba keletkezhet természetes módon, illetve belső (endogén) vagy külső (exogén) hatásra. Ezek eredménye általában a bázisok kémiai módosulása, mely gyakran káros a szervezetre [1].

Természetes hibák keletkezhetnek a DNS-replikáció során, mivel a polimeráz enzimek néha nem a megfelelő bázist építik be a szintetizálódó szálba. Továbbá hiba keletkezhet spontán dezamináció során is.

A leggyakoribb DNS-hibát okozó endogén hatás a metabolizmus melléktermékeként keletkező reaktív gyökök. Ezek főleg a még be nem épült nukleotidok bázisait támadják meg, ugyanis a kettős hélix belsejében található bázisok a hélix által védve vannak. A reakció módosított bázisokat generál, melyek közül a leggyakoribb a 2-hidroxi-adenin, és a 8-hidroxi-guanin [4, 5]. Ezek később beépülhetnek a DNS-be a replikáció során.

A gyökök azonban képesek a már beépült nukleotidokat is megtámadni, mégpedig a DNS-replikáció alatt, mivel a folyamat során a DNS rövid ideig egyszálú, ezáltal a bázisok hozzáférhetővé válnak, és reakciókba léphetnek.

A leggyakoribb exogén hatások az UV-sugárzás, az ionizáló sugárzások és a vegyi anyagok. UVA-sugárzás hatására reaktív gyökök keletkezhetnek, amelyek a fent leírt módon képesek károsítani a DNS-t.

UVB-sugárzás hatására keresztkötések jöhetnek létre az azonos szálon lévő szomszédos pirimidin bázisok közt. A fotokémiai reakció termékei ciklobután-pirimidin-dimerek (CPD) vagy 6-4 fototermékek lehetnek. Ezek a DNS-replikációt és a transzkripciót is gátolják, tehát mutagén és citotoxikus hatásúak [6].

Az ionizáló sugárzások, mint a radioaktív vagy a röntgensugárzás, a DNS cukorfoszfát-gerincét károsíthatják. Az egyes száltörés javítása közben pontmutáció vagy kereteltolódás történhet. Kettős száltörés esetén DNS-szakasz törik le a hélixről, amely javítás hiányában genomi átrendeződéshez vezethet.

A vegyi anyagok közül legfőképp az aromás vegyületek okozhatnak DNS-károsodást. A benzol például, természetes metabolitjai (1,4-benzokinon és 1,4-hidrokinon) révén hidrogén-peroxid keletkezését idézi elő, amely oxidatív DNS-károsodást okozhat [7].

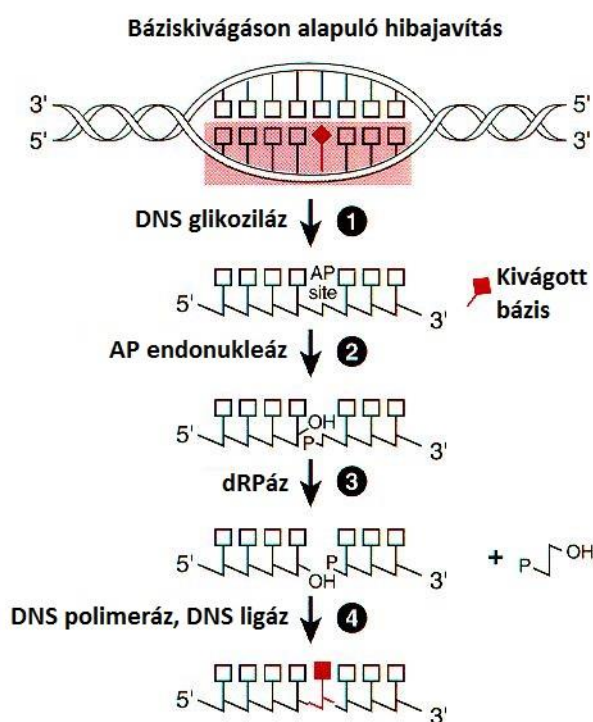
Látható, hogy a genom számos károsodást szenvedhet, amelynek hatására gyakran a fenotípus is megváltozik. Az élőlények öfenntartásához ezért szükségszerűen hozzátartozik a DNS-hibák javítása.

3.3 A DNS-hibák javítása

A hibajavítás történhet a mutációhoz vezető kémiai reakció ellentétes irányú folyamatában, amely során visszaalakul a bázis. Ebben az esetben közvetlenül a hibás bázis javítódik, ezért ezt a folyamatot közvetlen hibajavításnak (direct repair) nevezzük.

Számos hibajavító útvonal ismert, mint az össze nem illő bázispárok javítása (mismatch repair) és a nukleotidkivágáson alapuló javítás (nucleotid excision repair). Ha a DNS kettős szál törést szenved, akkor a nem homológ végek összekapcsolásával vagy homológ rekombinációval történhet a javítás [1-3].

A hibajavítás egy másik formája során a hibás bázist a szervezet enzimatikusan kivágja, és a helyes bázist visszahelyezi a DNS-be, ez a BER útvonal (base excision repair). A hibajavítás a hibás bázis kivágásával kezdődik, melyet a különböző hibákra specifikus DNS-glikozilázok végeznek el. A folyamatban bázismentes helyek (AP site) jönnek létre, melyeket az AP endonukleázok felismernek, és elvágják a cukorfoszfát-gerinc észterkötését. A dezoxiribóz-foszfátáz (dRPáz) képes eltávolítani a bázismentes cukorfoszfát-molekulát, majd a DNS-polimeráz a másik szállal komplementer nukleotidot beépíti a megfelelő helyre. Végül a DNS-ligáz enzim összeköti a DNS szabad végeit [8]. Számunkra kiemelt fontosságú ez a hibajavítási útvonal mivel a DNS-ben található uracil javítása így megy végbe, ezt a következő oldalakon ismertetem. Az útvonal a **3. ábrán** látható.



<http://jonlieffmd.com/wp-content/uploads/2013/12/Base-Excision-Repair.jpg>

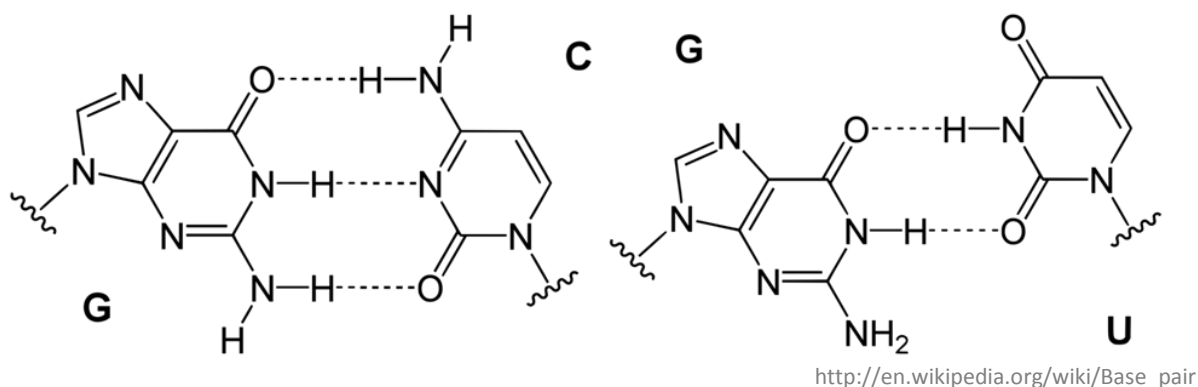
3. ábra

A báziskivágáson alapuló hibajavítás (BER)

A BER kezdő lépéseként egy DNS-glikoziláz enzim kivágja a hibás bázist a DNS-ből (1). Ezután AP endonukleáz elvágja a cukorfoszfát-láncot az abázikus helynél (AP site) (2), majd egy dRPáz enzim eltávolítja a bázist nem tartalmazó cukorfoszfát-molekulát (3). Végül DNS-polimerázok a DNS másik szála alapján nukleotid-trifoszfát felhasználásával beépítik a helyes nukleotidot, és a DNS-ligáz összeköti a DNS szabad végeit (4).

3.4 Uracil megjelenése a DNS-ben citozin dezamináció hatására

Az uracil normál esetben nem alkotója a DNS-molekuláknak, azonban mégis gyakran megtalálható bennük. Megjelenhet a DNS-ben a citozin oxidatív dezaminációjának termékeként. Fiziológiás körülmények között ez a reakció az egyik leggyakrabban lezajló spontán folyamat, ezenfelül oxidatív reagensek (nitrogén-oxidok, reaktív oxigénszármazékok) a reakció sebességét jelentősen megnövelik [9-11]. Továbbá nő a dezamináció valószínűsége, ha a DNS egyszálú, vagyis a replikáció és a transzkripció során. A citozin és az uracil bázispárosodási mintázata eltér, azonban 2 hidrogénkötés így is kialakulhat guanin és uracil közt, ahogy ez a **4. ábrán** látható.

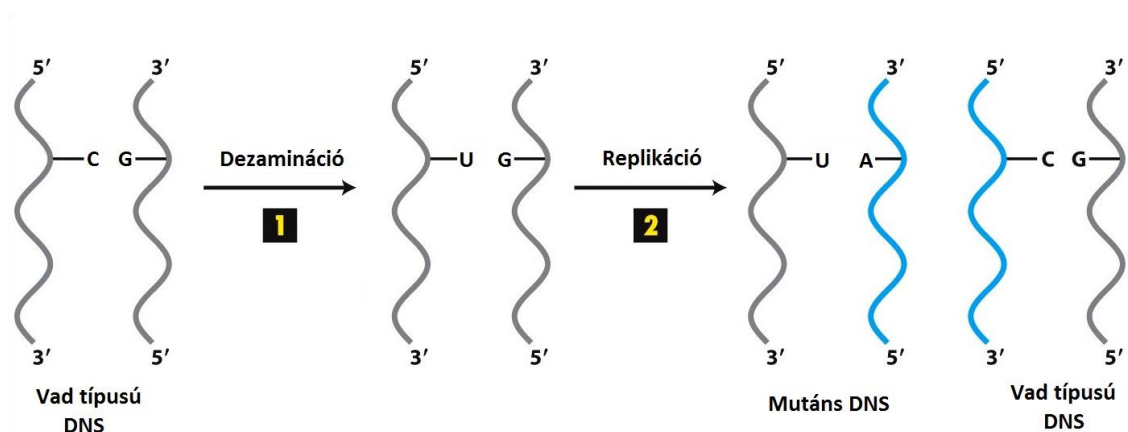


4. ábra

A guanin (G) citozin (C), és a guanin (G) uracil (U) bázispárok

A guanin normál esetben citozinnal 3 hidrogénkötést alakít ki a DNS-ben (bal). Azonban a citozin oxidatív dezaminációja során keletkező uracil is képes hidrogénkötések kialakítására guaninnal, bár a citozintól eltérő a bázispárosodási mintázata (jobb).

Az így létrejövő uracil mutagén hatású, mivel a későbbi replikáció során nem guanin épül be vele szemben (ahogy az citozin esetén történne), hanem adenin. Ez stabil pontmutációt okoz a genomban, mely megváltoztathatja a génszakasz által kódolt fehérje aminosav-szekvenciáját, így akár funkcióvesztéshez is vezethet. A dezamináció mutagén hatását az **5. ábra** szemlélteti.



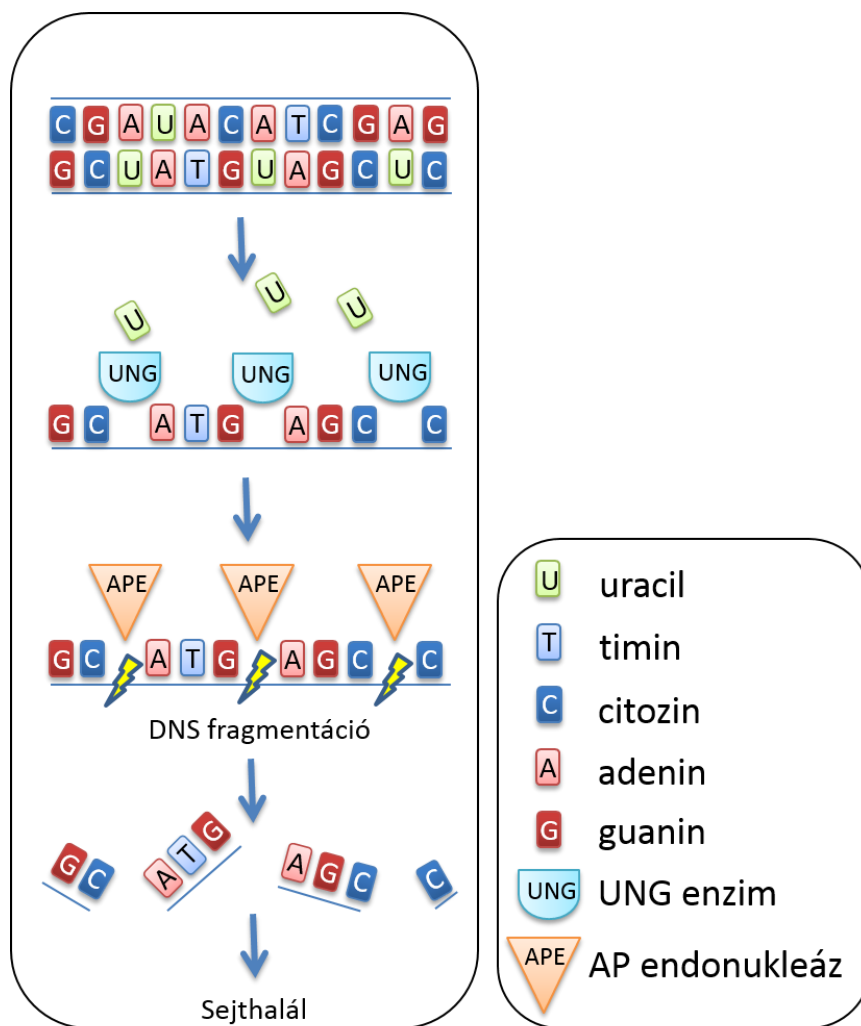
<http://www.bio.miami.edu/tom/courses/protected/MCB6/ch04/4-35.jpg>

5. ábra

A citozin dezamináció mutagén hatása

A citozin dezamináció során keletkező uracil (1), a DNS-replikáció során adenint eredményez (2), így stabil pontmutáció alakul ki.

Az élő szervezetek számára elengedhetetlen, hogy a guaninnal szemben álló uracilt a DNS-ből eltávolítsa. Ez a báziskivágáson alapuló útvonalon megy végbe, melynek első lépése az uracil felismerése és kivágása [12, 13]. A feladatot az uracil-DNS-glikoziláz (UDG) enzimes család tagjai végzik el, melyek a DNS mentén haladva keresik az uracilt, majd specifikusan kötődnek hozzá, és kivágják azt. Az UDG enzimek általában a guaninnal és az adeninnel szemközti uracilt is eltávolítják a DNS-ből. A sejtek genomjának nagymértékű eluracilosodása azért is veszélyes, mert az UDG enzimek hatására létrejött abázikus helyek jelentősen csökkentik a DNS-molekula stabilitását. Ez akár a DNS feldarabolódásához is vezethet, mely erősen citotoxikus hatású. A folyamatot a **6. ábra** szemlélteti.



Az ábra dr. Horváth András ábrája alapján készült.

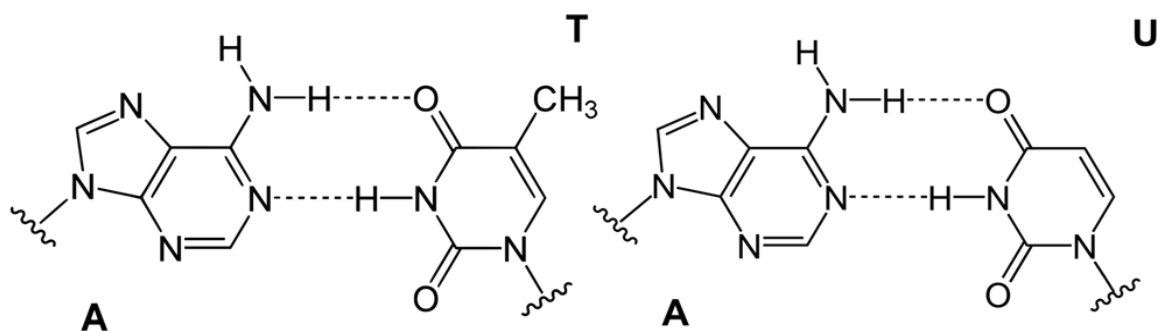
6. ábra

Nagy mennyiségű uracil beépülése a BER útvonal túlműködéséhez, így sejthalálhoz vezethet

A DNS-be beépült uracil aktiválja a BER útvonalat, mely során az UNG enzim kivágja az uracilt, majd AP endonukleázok (APE) elvágják a DNS-szakaszt az abázikus helynél. Azonban nagy mennyiségű uracil esetén ez a DNS instabilitásához, akár fragmentációjához is vezethet, amely erősen citotoxikus hatású, így sejthalált okoz.

3.5 Uracil megjelenése a DNS-ben replikáció során

Az uracil nem csupán a spontán dezamináció következtében jelenhet meg a genomban, hanem beépülhet timin helyett a DNS-polimerázok által. Ennek oka, hogy a timinnel analóg szerkezetű, csupán egy metilcsoportban térnek el egymástól. A metilcsoport nem képes hidrogénkötést kialakítani, ezért a két molekula bázispárosodási mintázata megegyezik, mindkettő előfordulhat adeninnel szemben. A kétféle bázispárt a **7. ábra** szemlélteti.



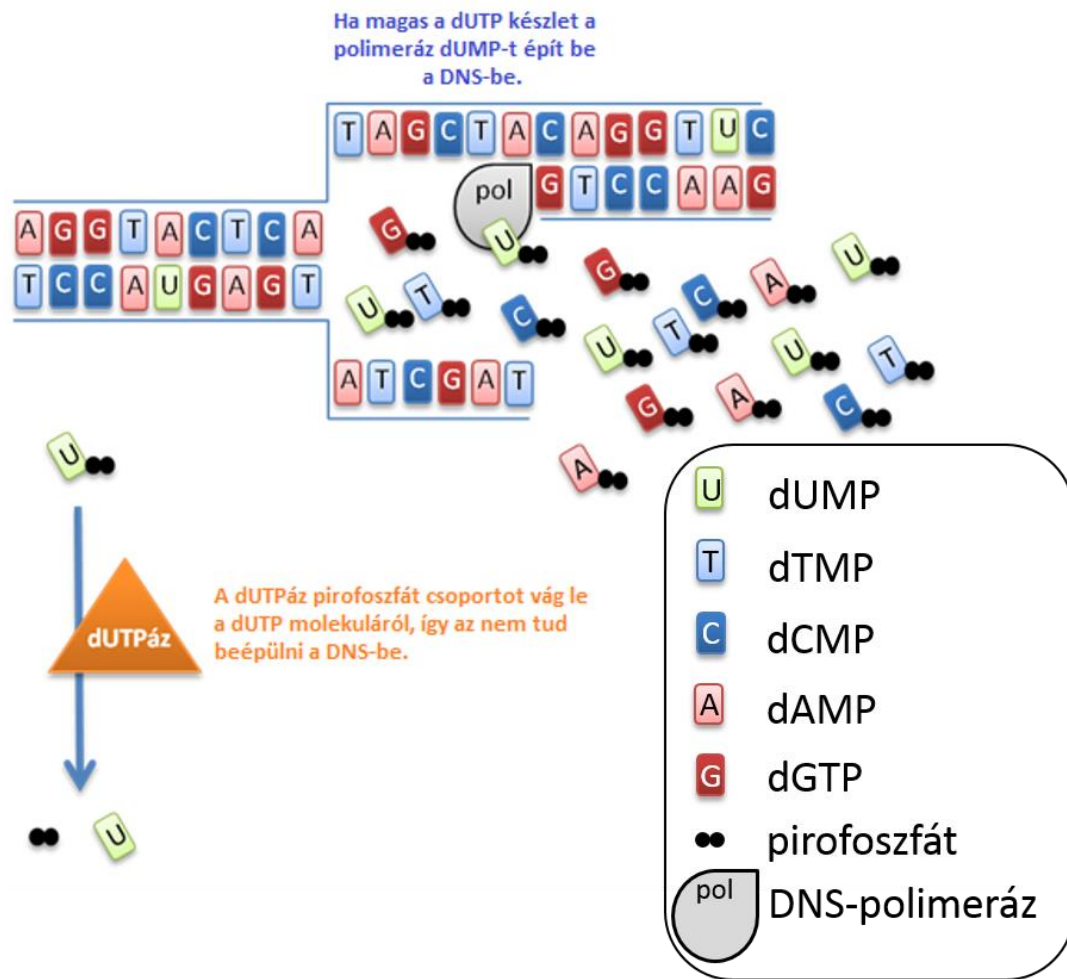
http://en.wikipedia.org/wiki/Base_pair

7. ábra

Az adenin (A) timin, és az adenin (A) uracil (U) bázispár

Az adenin normál esetben timinnel alakít ki 2 hidrogénkötést a DNS-ben (bal). Azonban a DNS-polimerázok nem képesek különbséget tenni a timin és a vele analóg szerkezetű uracil közt, így az beépülhet a DNS-be. Az uracil bázispárosodási mintázata megegyezik a timinével, 2 hidrogénkötést létesít adeninnel szemben (jobb).

Az uracil és a timin közti eltérés olyan kis mértékű, hogy a legtöbb DNS-polimeráz nem képes különbséget tenni közöttük, így dUTP-t (dezoxiuridin-trifoszfát) felhasználva uracilt építhet be a DNS-be. Az uracil beépülésének mértéke a sejtmagban lévő dUTP-koncentrációval arányos, így a sejt számára fontos a dUTP/dTTP (dezoxitimidin-trifoszfát) arány alacsonyan tartása. Ezt a feladatot a dUTPáz enzim látja el, amely dUMP (dezoxiuridin-monofoszfát) és pirofoszfát csoporttá hidrolizálja el a dUTP-t [14-16]. A dUTPáz szerkezetét tekintve a legtöbb organizmusban egy homotrimer enzim, amelynek hiánya számos fajban bizonyítottan az élettől összeegyeztethetetlen [17, 18]. A nukleotidok nem szubsztrátjai a polimerázoknak, így a dUMP nem tud beépülni a DNS-be, tehát a dUTPáz enzim preventív módon tartja alacsonyan a DNS uracilszintjét [18]. A dUTPáz enzim hatását szemlélteti a **8. ábra**.



Az ábra dr. Horváth András ábrája alapján készült.

8. ábra

A dUTPáz enzim működése

A DNS-polimerázok nem tudnak különbséget tenni a dUTP és a dTTP közt, így magas dUTP/dTTP arány esetén uracil épül be. A dUTPáz enzim pirofoszfát-csoportot hidrolizál le a dUTP-ről, a keletkező dUMP már nem tud beépülni a DNS-be.

A replikáció során beépülő uracil nem mutagén hatású, mivel tökéletes timin-analóg, azonban mégis káros lehet a szervezet számára. A DNS uracil tartalma aktiválja a báziskivágáson alapuló javítómechanizmust, melynek túlműködése a DNS feldarabolódásához vezethet. Továbbá különböző DNS-kötő fehérjék affinitása nagyobb a timint tartalmazó DNS felé, ezért ha a DNS uracilszintje magas, akkor ezen fehérjék DNS-kötő képessége lecsökken. A transzkripció faktorok közt találhatunk ilyen tulajdonságú fehérjéket, tehát a sejt expressziós mintázatát is befolyásolhatja a DNS uraciltartalma [19]. A dUTPáz enzim működése során keletkező dUMP, a *de novo* timidilát szintézis prekurzora, ezért a dUTPáz enzim két módon is segíti a dUTP/dTTP arány alacsonyan tartását.

3.6 A timidilát bioszintézis

A dezoxinukleotid-trifoszfát (dNTP) bioszintézis minden élőlény számára elengedhetetlen, mivel a replikáció során a polimeráz enzimek ezen molekulákat képesek beépíteni a DNS-be. A timidilát (dezoitimidin-monofoszfát, dTMP) bioszintézis azonban különbözik a többi dNMP metabolizmusától annyiban, hogy nincs megfelelő ribonukleotid prekursora, így a szervezetek csak deoxiuridin-monofoszfáton (dUMP) keresztül állíthatják elő [18].

A dUTPáz enzim hatására keletkező dUMP a *de novo* timidilát szintézis prekursora, ugyanis a timidilát-szintáz (TS) enzim a dUMP metilálásával dTMP-t hoz létre. A reakció általában folát típusú kofaktorok jelenlétében megy végbe. A dTMP foszforilálásával keletkező dTTP már timinként beépülhet a DNS-be [20].

Mivel a timidilát-szintáz a genom integritását fenntartó, és ezzel a sejt életben maradásához elengedhetetlen folyamatot katalizál, ezért kedvelt célpontja kemoterápiás szereknek. Az 5-fluorouracil (5FU) és származékai az élő szervezetekben 5-fluorodezoxiuridinné (5FdUR) alakulnak, amely irreverzibilisen kötődhet a timidilát-szintázhoz. Ezzel az enzim katalitikus funkcióját elveszíti, és így jelentős dUMP-felhalmozódás keletkezik, továbbá csökken a dTMP-koncentráció. A dUMP a többi dNMP-hez hasonlóan enzimek hatására foszforilálódhat, és a keletkező dUTP beépülhet a DNS-be. Ezért timidilát-szintáz-gátolt sejtek esetén uracilintegráció következhet be, amelynek mértéke tovább növekszik, amennyiben a dUTPáz enzim is gátolva van, vagy alulexpresszálódik. Ebben az esetben a timinmentes sejthalál apoptikus útvonal aktiválódhat. 5FU-t tartalmaznak hatóanyagként az Adrucil, a Carac és az Efudex kemoterápiás szerek [21]. A kemoterápiás szerek egy másik csoportja a folát-ciklust zavarja meg, és ezzel gátolja a TS helyes működését (metotrexát, raltitrexed) [22].

Vizsgálataim során olyan sejtek DNS-ének uracilszintjét kíséreltem meghatározni, amelyek TS működése 5FdUR hatására gátolt. Ahhoz, hogy a kemoterápiás szer tényleges hatását kimutathassam, szükségem volt kezeletlen sejtekből származó mintákra is. Ezeken felül olyan sejtvonalak DNS-ét is vizsgáltam, amelyekben a genomba beépült uracil kivágásáért felelős UNG enzim nem expresszálódott, így a BER útvonalon jelentősen csökkent a hibajavítás sebessége, ezért a normális sejtekhez képest magasabb uraciltartalomra számítottam. Ilyen típusú sejtvonalak a MEF DR14, illetve az *E. coli* BL21 (DE3). Ezen felül *in vitro* vizsgálataim során olyan *E. coli* sejtvonal DNS-ét is felhasználtam, melyben az UNG fehérje mellett a dUTPáz fehérje expressziója sem megy végbe (dut-, ung- *E. coli*). Ezen sejtek DNS-ének uracilszintjét tekintettem a standardnak, mivel a dut-, ung-sejtek uracilszintjét több irodalmi forrás is hasonló tartományba helyezi. Ezen irodalmi adat felhasználásával képes voltam más minták uraciltartalmának kvantifikálására [23-25].

Az élővilágban azonban ismertek olyan fajok, melyek képesek tolerálni az uracil beépülését DNS-ükbe.

3.7 Uracil a DNS-ben természetes módon

Az élővilágban kevés fajról ismert, hogy tolerálják az uracilt a genomjukban timin helyett, legismertebb példák a különböző baktériumokat fertőző vírusok.

A *Bacillus subtilis* fertőző PBS1 és PBS2 bakteriofágok DNS-e elhanyagolhatóan kevés timint tartalmaz, helyette uracil épült be a genomba. A *B. subtilis* uracil-DNS glikoziláz enzimeji a vírus DNS-ét elbonthatná, a fertőzés ideje alatt. Azonban a bakteriofág indukálja az uracil-DNS glikoziláz inhibitor (UGI) expresszióját a baktériumban, így a virális DNS nem fog degradálódni. Ezen kívül több más enzim expresszióját is indukálja a fágfertőzés, melyek perturbálják a gazdasejt dezoxinukleotid metabolizmusát. Amennyiben ezen fehérjék szintézisét gátolják, a fágfertőzés hatékonysága jelentősen csökken [26, 27].

Az elmúlt évtizedben egy másik bakteriofágról is kimutatták, hogy DNS-e uracilt tartalmaz timin helyett. Ezek a vírusok (ϕ R1-37) több *Yersinia* baktériumfajt is képesek megfertőzni. A fágok DNS-ét nukleáz enzimekkel bontották nukleotidokig, majd folyadék-kromatográfia-tömegspektrometriai módszerrel vizsgálták összetételét. Így a virális DNS uracilszintjét 33%-nak mérték [28].

Magasabb rendű organizmusokban természetes módon csupán átmenetileg keletkezhet uraciltartalmú DNS. Bizonyos sejtek az uracilszintjük növelésével szándékosan mutációt hoznak létre genomjukban. Ennek gyakorlati szerepe az osztályváltó rekombináció és a szomatikus hipermutáció folyamatában jelentős, melyek fontos szerepet töltenek be az immunsejtek érésében [29]. A humán B-limfociták DNS-ében található citozint az aktiválás indukált citozin-dezamináz (AID) enzim uracillá alakítja, ezzel citozin-uracil tranzíció történik. Az enzim működése helyspecifikus, ezért a sejtek genomjának csak egy dedikált szakaszán megy végbe dezamináció. A hibás G:U bázispárból, a replikáció során helyes G:C, és hibás A:U pár is keletkezik, tehát a változás mutációhoz vezet. Ezenfelül DNS-beli uracil hatására megkezdődik a BER útvonalon történő hibajavítás, mely során nem megfelelő bázispár is beépülhet a genomba. Ennek oka, hogy az új nukleotidot nem klasszikus DNS-polimerázok építik be a DNS-be, hanem módosult, úgynevezett transzléziós polimerázok, melyek csökkent nukleotidspecifitással rendelkeznek [30]. A megnövekedett uracilszint tehát ebben az esetben is mutációhoz vezet, ám ez az élőlények számára hasznos, az adaptív immunitás kialakulásához elengedhetetlen folyamat. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy az immunsejtek érési folyamatainak részletei a mai napig nem teljesen ismertek, ezek felderítése kiemelten fontos kutatási terület.

Összességében kijelenthetjük, hogy normális körülmények közt a DNS-beli uracilt az élőlények javítani igyekeznek, hogy esetleges mutagén hatását elkerüljék. A javításra több rokon enzim jött létre, melyek az uracil-DNS glikoziláz (UDG) enzimcsaládba tartoznak.

3.8 Az UDG enzimcsalád tagjai

Az uracil-DNS glikoziláz (UDG) enzimek felelősek a DNS-beli uracil eltávolításáért. Az enzimek a DNS mentén haladva specifikusan felismerik a kötött uracilt, és elvágják a dezoxiribózzal létesített β -N-glikozid-kötést. A javítás a báziskivágáson alapuló (BER) útvonalon játszódik le ezután. Az emlős szervezetekben több UDG enzim is megtalálható, ezek közül a legismertebbek: UNG, SMUG, TDG, MBD4.

Az *ung* génről két különböző enzim is átíródhat alternatív promóterhasználat révén. Az UNG1 a mitokondriumban, az UNG2 a sejtmagban található meg, a két fehérje csupán az N-terminális szakaszban tér el egymástól [11]. Mindkét izoformának szubsztrátja az egyes és a kettős szálú DNS, továbbá képesek kivágni az uracilt az A:U, és a G:U bázispárokból is. Humán sejtekben az UNG enzimek a legaktívabbak az uracil eltávolítása szempontjából, fiziológiás Mg^{2+} -ion-koncentráció mellett, kettős szálú DNS-en $k_{cat}=603 \pm 29$ 1/perc, $K_m=2,09 \pm 0,4$ μM [31]. Az UNG N-terminálisán található aminosavak segítségével képes a PCNA és RPA fehérjékhez kötődni, melyek a DNS-replikáció elengedhetetlen fehérjéi. Az UNG tehát a PCNA-val együtt halad végig a DNS-en replikáció során, és a timin helyett hibásan beépült, illetve a citozin dezaminálásával keletkezett uracilt eltávolítja a DNS-ből [32]. A hibajavítás ezen típusa azért jelentős, mivel a replikáció során létrejövő egyes szálú DNS-ben, több uracil keletkezik, ugyanis a dezaminációs reakció sebessége ilyen körülmények közt jelentősen megnő.

Létrehoztak egy olyan kettős pontmutációt hordozó UNG2 enzimet (D154N, H277N), mely az uracilhoz specifikusan kötődik, ám nem vágja ki azt a DNS-ből [11, 33, 34]. Kutatómunkám során a módosított UNG2 enzimet más fehérjékkel fuzionálva felhasználtam, hogy *in vitro*, illetve *in vivo* uracilt jelöljek különböző organizmusokban.

A SMUG enzimet először csupán egyes szálú DNS-en aktív fehérjeként írták le, azonban kettős szálú DNS-ből is képes kivágni az uracilt. Ezen kívül a SMUG-nak az 5-hidroximetiluracil (HmU) is szubsztrátja, és feltehetően ez az enzim felel ezen hiba javításáért az emlős szervezetekben. A SMUG a báziskivágást követően erősen kötődik az abázikus helyhez, amely azért előnyös, mert megvédi a DNS-t a további károsodástól, amíg a BER útvonal következő enzime lokalizálja a hibát [35].

A TDG képes uracilt és timint is kivágni a hibás guaninnal képzett bázispárokból, azonban az U:G párral szemben nagyobb az affinitása. A SMUG-hoz hasonlóan kötődik az abázikus helyekhez, azonban a SMUG-gal ellentétben expressziója sejtciklus-regulált [35].

Az MBD4 képes uracilt kivágni a CpG szigetekből (citozint guanin követi ugyanazon a szálon) a citozin dezaminációját követően. Illetve metilált citozin esetén a dezamináció során létrejövő timint is képes eltávolítani. Az MBD4 enzimnek feltehetően szerepe van a hibáspár-javító mechanizmusokban (mismatch repair) [35].

Az enzimek funkcióit és szubsztrátjait az **1. táblázatban** foglaltam össze.

Enzim	Funkció
UNG	U:A, U:G hibáspárok javítása, szubsztrát: egyes, kettős szálú DNS
SMUG	U:A, U:G hibáspárok és HmU javítása, kötődik a létrejövő abázikus helyhez, szubsztrát: egyes, kettős szálú DNS
TDG	U:G hibáspárok javítása, kötődik a létrejövő abázikus helyhez, szubsztrát: egyes, kettős szálú DNS
MBD4	U:G, T:G hibáspárok javítása dezaminált CpG, mCpG szigetekből, hibáspár-javító mechanizmusok, szubsztrát: egyes, kettős szálú DNS

1. táblázat
Az UDG enzimes család tagjai

3.9 Uracilkvantifikálás az irodalomban

Számos módszert fejlesztettek ki, hogy különböző organizmusok DNS-ének uraciltartalmát meghatározzák. A kísérletek során normál sejtek DNS-én kívül olyan sejtvonalakból izolált DNS-eket is vizsgáltak, amelyeknél az UDG enzimek egy része, vagy egésze csendesítve volt. Így sikerült uracilszint-növekedést kimutatni az UDG-t normálisan expresszáló sejtekhez képest. A jelenlegi irodalmi adatok alapján a DNS uraciltartalmának mérése történhet kvantitatív PCR-en (qPCR) [36], vagy tömegspektrometrián (MS) alapuló módszerrel [37-40].

A qPCR módszer során a genom egy 500–1000 bázispár hosszú részletét polimeráz láncreakcióban felsokszorozítjuk két különböző DNS-polimerázt alkalmazva. A *Pyrococcus furiosus* faj vad típusú polimeráz enzime egy dezaminált bázisokra specifikus kötőhely hatására megszünteti a DNS-szintézist, amennyiben uracil vagy hipoxantin bázisokhoz ér a replikáció során. Azonban a kötőhely egy aminosavának kicserélése után (V93Q, valint glutaminra cserélve) a specifikus kikötődés megszűnik, és a polimeráz folytatja a szintézist uraciltartalmú DNS esetén is. Amennyiben ugyanolyan körülmények közt végzünk el két PCR reakciót, csupán egyikben a vad típusú, másikban a mutáns polimerázt használjuk, a reakció végén kapott DNS-mennyiségek arányából következtethetünk a minta uraciltartalmára. A módszer jól alkalmazható több organizmusból származó kemoterápiás droggal kezelt és kezeletlen sejtek DNS-e esetén is. A módszer validálását radioaktív izotópos jelöléssel végezték, mely során a DNS-be beépült és jelölt uracil mennyiségét detektálták és hasonlították össze a qPCR-rel mért adatokkal. Azonban egy PCR reakcióban nem sokszorozható fel egy élőlény egész genetikai állománya, a genom vizsgált részletét a mérés során használt primerek határozzák meg. A részletben mért uracilmennyiséget felhasználva extrapolálással megállapítható a teljes genom uraciltartalma, azonban ehhez fel kell tennünk, hogy az uracil genomi eloszlása egyenletes [36].

Jelenlegi irodalmi adatok azonban azt mutatják, hogy ez a feltételezés nem feltétlenül helyes. Az uracil lokalizációját is feltérképező módszerhez a DNS-mintát – uracil-specifikusan a BER útvonalon keresztül, illetve aspecifikusan mechanikai hatásra – felhasították polinukleotid

szakaszokra. Az uraciltartalmú szakaszokat PCR-rel felszaporították, szekvenálták, és egy szekvencia-könyvtár segítségével meghatározták a szakaszok lokalizációját. *Escherichia coli* sejtek DNS-ét vizsgálva azt találták, hogy a replikációs origó körülbelül 200 kilobázisos környezetében alacsonyabb az uracilszint, mint a genom más területein. Megfigyelték továbbá azt is, hogy egy DNS-szakasz uraciltartalma összefüggésben áll azzal, hogy a szakasz replikációja az S fázis mely szakaszában történik. Arra a következtetésre jutottak, hogy a beépült uracil mennyiségét a dUTP/dTTP arány időbeli változása szabályozza [41].

A genom teljes uraciltartalmának meghatározásához létrehoztak, egy tömegspektrometrián alapuló módszert. A mérés során a tisztított genomi DNS-t nukleáz és foszfatáz enzimekkel nukleozidokra bontották, majd nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC) segítségével tovább tisztították. A minták dezoxiuridin-tartalmát tömegspektrométerrel mérték. Úgy vélték, hogy az MS módszeren alapuló eddigi irodalmi adatok mind felülbecslik a DNS valódi uraciltartalmát, ugyanis a minták előkészítése és mérése során olyan folyamatok játszódhatnak le, amelyek uracilt termelnek. Erre példa a dezoxicitidin dezaminációja, melynek sebessége 3 nagyságrenddel nagyobb a szabad bázis esetén, mint a kettős szálú DNS-nél. Továbbá feltételezik, hogy sejten belüli dNMP-k a DNS-sel együtt eluálódhatnak kromatográfiás módszereknél, így megváltoztatva a kvantifikálás eredményét. Az uracil mennyiségének meghatározása ezzel a módszerrel igen jól reprodukálható, azonban a folyamat időigényes, és költséges berendezések szükségesek az elvégzéséhez [40].

4. Célkitűzés

Az uracil detektálása és kvantifikálása jelenleg is fontos téma az irodalomban. Az eddigi eredmények nem mindig összehasonlíthatóak, az idő múlásával újabb kritikai ellenvetések merülnek fel a mérésekkel szemben. Ezért kutatómunkám célja egy érzékeny, megbízható és könnyen alkalmazható módszer kidolgozása volt, amely segítségével *Escherichia coli* és egér embrionális fibroblaszt (MEF) sejtek DNS-én kívántam kvantitatív méréseket végezni. A módszer a katalitikusan inaktív UNG fehérje, és a hozzá fuzionált epitóp tag ellenanyagos jelölése segítségével teszi lehetővé az uracilmeghatározást. Céлом volt vizsgálni továbbá, hogy a *de novo* timidilát bioszintézist gátló kemoterápiás szer, az 5-fluoro-2'-deoxiuridin (5FdUR), valamint az *E. coli* sejtekben mesterségesen létrehozott UNG deficiencia milyen hatással van a genom uracilszintjére.

Az ELISA módszer létrehozása azért kiemelt fontosságú, mivel így egyszerű laboratóriumi műszerek segítségével és kis mennyiségű DNS felhasználásával megbízhatóan mérhető a minta uraciltartalma.

További célom volt az *in vitro* kvantifikálás mellett, *in vivo* uracilt jelölni a módosított UNG fehérje és egy piros fluoreszcens protein (DsRed) fúziójával létrehozott konstrukttal. Az *in vivo* vizsgálatok során uracildúsított extrakromoszómiális plazmiddal transzfektált MEF sejteket kívántam immunocitokémiai módszerekkel jelölni, amely megalapozza, hogy a jövőben közvetlen genomi DNS-en végzett festéseket is lehessen végezni.

Az itt létrehozott módszer egyszer talán diagnosztikai célból is felhasználható lesz, annak eldöntésére, hogy a kezelt betegek mennyire reagálnak jól a timidilát bioszintézist gátló kemoterápiás szerekre.

5. Anyagok és módszerek

5.1 Rekombináns fehérjét kódoló plazmid transzformálása *E. coli* sejtekbe

A DNS-beli uracil vizsgálatához egy kettős pontmutációt hordozó (D154N, H277N) humán UNG2-t használunk, mely katalitikusan inaktív, tehát nem vágja ki az uracilt a DNS-ből, de ahhoz specifikusan kötődik. A konstrukt ezen kívül tartalmaz His-taget a fehérje affinitás kromatográfiás tisztításához, továbbá Flag-taget antitesttel való detektáláshoz. A fehérjét kódoló plazmidot *Escherichia coli* BL21 (DE3) ung-151 kémiaiailag kompetenssé tett sejtekbe transzformáltam. Ennek a törzsnek a genomja nem kódolja az UNG fehérjét, így a transzformált sejtek csak a rekombináns UNG fehérjét fogják expresszálni, a vad típusú endogén formát nem.

A transzformálás során a kompetens sejtekhez 14,23 mM koncentrációban β -merkaptotetanolt, valamint 100 ng plazmid DNS-t adtam, majd 30 percet hagytam jégen állni. A hősokk 1 percen keresztül 42 °C-os vízfürdőben zajlott, ennek hatására megtörtént a sejtfalon megkötődött DNS felvétele, utána újra jégen hűtöttem a sejteket 2 percig. Aszeptikus körülmények között 200 μ l steril Luria Bertani (LB) tápoldatot adtam a sejtekhez, majd 1 órán keresztül 37 °C-os rázó-termosztátba helyeztem őket. A sikeresen transzformált sejtek szelekciójára klóramfenikolt (a törzs antibiotikum szelektációs markere) és karbenicillint (a rezisztencia génjét a plazmid kódolja) használhatunk, ezért a sejteket a két antibiotikumot tartalmazó agarózos lemezre szélesztettem (50 ml LB, 0,75g agaróz, 33,9 μ g/ml klóramfenikol; 50 μ g/ml karbenicillin). 16 órán keresztül 37 °C-on növesztettem a sejteket, majd a lemezről oltókacccsal 5 ml LB-be oltottam át a sejteket, és egy éjszakán át felszaporítottam őket 37 °C-on. Majd négy részre osztottam őket és 500 ml-es lombikban addig növesztettem, amíg az oldat optikai denzitása (OD) 0,8-es értéket el nem érte. Az OD mérést WPA CO 8000 (Biochrom) sejtdenzitásmérő eszközzel végeztem. A sejtdenzitással arányos abszorbanciát 600 nm-en követtem.

5.2 Rekombináns fehérje expressziója

Az *E. coli* baktériumokba transzformált vektorban (pET-20b vektorban kódolt His-3xFlag- Δ UNG2 fúziós fehérje) a fehérjénk szekvenciája előtt T7 promóter régió található, így a transzkripció akkor indul meg, amikor jelen van a T7 RNS-polimeráz. A felhasznált baktériumtörzs genomjába mesterségesen be van építve a T7 RNS-polimeráz génje, ám ennek átírását egy lac operátor szabályozza (DE3 kazetta). A lac operátor szakaszhoz kötődik egy, a sejt által folyamatosan termelt represszor fehérje (lacI), amely viszont laktóz vagy laktóz-analóg molekulák hatására elengedi a DNS-t. Ezért ha IPTG-t (egy stabil laktóz-analóg) adunk a sejtekhez, akkor a represszor fehérje leválik a DNS-ről, így megkezdődik a T7 RNS-polimeráz szintézise, amely pedig elvégzi a fehérjénket kódoló gén transzkripcióját.

A sejteket 0,6 mM-os IPTG-vel (izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid) indukáltam, majd 24 órán keresztül 19 °C-on expresszáltattam a fehérjét. Ezután centrifugáltam a sejtszuspenziót 4000 x g-vel 20 percen keresztül 4 °C-on, és megszabadultam a felülúszótól.

5.3 Sejtek feltárása

A sejteket lízis puffer segítségével tártam fel, mely összetevőinek feladata, hogy a fehérjék degradálása és denaturációja nélkül permeabilizálja a baktérium sejtfalát, elbontsa a DNS-t és az RNS-t. A magas sókoncentráció hipertóniás közeget hoz létre, amely hozzájárul a sejtek feltáródásához. Az EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) erős kelátkomplexet képez fémionokkal, így gátolja a metalloproteázokat. Triton X-100 nemionos detergens a sejtmembránt megbontja, átjárhatóvá teszi. A PMSF és a BA gátolja a szerin-proteázokat. A Complete EDTA-free tabletta (Roche) egyszerre több proteáz működését gátolja. A β -merkaptotanol redukzív környezetet biztosít, ezért akadályozza ciszteinek közti diszulfid-hidak kialakulását, melyek számos fehérje aggregációját okozhatnák. A lizozim bontja a sejtfalat alkotó poliszacharidokat. A DNáz és az RNáz enzimatikusan hidrolizálja a sejtek nukleinsavait, az oldat viszkozitásának lecsökkentése érdekében.

A pelletet mechanikus potter segítségével 50 ml lízis pufferben (50mM TRIS.HCL, 300 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 5 mM BA, 1x Complete EDTA-free tabletta, 10 mM β -merkaptotanol, 0,1 mg/ml lizozim, 0,1 mg/ml DNáz, 0,01 mg/ml RNáz A, pH=8,0) szuszpendáltam fel. Ám az oldat továbbra is elég viszkózus maradt, ezért szonikáltam, ami a kavitáció segítségével tovább bontotta a nukleinsavakat, törte a sejtfalat. Az oldatokat 25 ml-enként 2-szer 30 másodpercen keresztül, majd a teljes mennyiséget egyszer 30 másodpercig szonikáltam Bandelin Sonopuls HD 2070 berendezéssel. A szonikálások közt 10 másodperces visszahűtési periódust tartottam, hogy ne melegedjen túl az oldat, amely a fehérjék degradációjához vezethetne. Kis mennyiségű oldatot félretettem a későbbi SDS-PAGE gélelektroforézisre. Ezután 22 000 x g-vel 30 percen keresztül 4 °C-on centrifugáltam az oldatot, a felülúszót tiszta fugacsőbe pipettáztam át, majd 30 mM imidazolt és 2 mM $MgCl_2$ -ot adtam hozzá.

5.4 Rekombináns fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával

A rekombináns fehérjénket affinitás kromatográfiás módszerrel tisztítjuk meg a szennyezőktől, legyen az nukleotid, lipid vagy más fehérje. Az elválasztás azon alapszik, hogy a hisztidin aminosavak, melyek a fehérjénk C-terminálisán található His-tag részei, képesek az agarózhoz kötött nikkel-ionokat magas specifitással és affinitással megkötni.

A Ni-NTA Agarose (Qiagen) oldatot 10 ml-es oszlopformában megöntöttem, majd ekvibráltam lízis pufferrel. A lízis pufferben található imidazol a fehérjénkkal kompetitív módon kötődik a nikkel-ionokhoz, ezáltal csökkenti az aspecifikus fehérjekikötődést. A gyantát felfuszpendáltam az előbbi oldat egy újabb részletével, majd a fehérjénket tartalmazó oldathoz adtam. A kikötődési reakció 1 órán keresztül 4 °C-on zajlott, majd oszlopra vittem az oldatot. A megöntött oszlopot, amelyhez már specifikusan kötődik a His-tagelt fehérjénk, egyre növekvő sókoncentrációjú oldatokkal mostam. Így az aspecifikusan kötött szennyezők lemoshatóak az oszlopról. Az oldatok sorrendben: low salt (LS) puffer, high salt (HS) puffer, very high salt (VHS) puffer, valamint a mosó puffer. Végül elúciós puffert adtam az oszlophoz, amelyben olyan magas az imidazol koncentrációja, hogy megszakítja a hisztidin-nikkel-ion-kötést. Az elúció időbeli lefolyását Bradford reagenssel követtem. Az oszlopról lefolyó pufferekből kis részleteket félretettem későbbi SDS-PAGE elektroforetikus vizsgálatra. A magas imidazol koncentráció nem kedvez a fehérje hosszabb távú tárolásának, ezért egy kedvezőbb pufferkomponensű oldattal dialízist végeztem. A dialízis membránokat előkészítettem, majd egy éjszakán át 1 liter dialízis pufferben, illetve reggel még 1,5 órán keresztül újabb 1 liter dialízis pufferben dializáltam. A kész fehérjeoldatot felhasználásig -80 °C-on tároltam.

A rekombináns fehérje tisztítása során felhasznált pufferek összetétele:

<u>LS puffer:</u> 50 mM HEPES, 30 mM KCl, 5 mM β -merkaptoetanol, pH=7,5	<u>HS puffer:</u> 50 mM HEPES, 300 mM KCl, 5 mM β -merkaptoetanol, pH=7,5	<u>VHS puffer:</u> 20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 5 mM β -merkaptoetanol, 40 mM imidazol, pH=7,5
<u>mosó puffer:</u> 50 mM HEPES, 30 mM KCl, 5 mM β -merkaptoetanol, 50 mM imidazol, pH=7,5	<u>elúciós puffer:</u> 50 mM HEPES, 30 mM KCl, 10 mM β -merkaptoetanol, 350 mM imidazol, 0,1 mM PMSF, 0,5 db Complete EDTA-free tabletta, pH=7,5	<u>dialízis puffer:</u> 30 mM TRIS.HCL, 140 mM NaCl, 0,01% Tween-20, 1mM EDTA, 15 mM β -merkaptoetanol, pH=7,4

5.5 Nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézis

A nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) egy széles körben alkalmazott vizsgálati módszer a fehérjék molekulatömeg szerinti meghatározására és szétválasztására.

Az elektroforézist a fehérjetermelés és -tisztítás során vett mintákból futtattam. A sejttartalmú oldatokat 15 000 x g fugáltam, majd a csapadékot Laemmli puffer (250 mM TRIS.HCL, 50% glicerín, 0,05% brómfenolkék festék, 10% SDS, 250 mM DTT, pH=7,8) és desztillált víz 1:5 arányú keverékében oldottam fel. A csak fehérjét tartalmazó oldatokhoz fugálás nélkül adtam Laemmli puffert, 1:5 arányban. A mintákat 95 °C-on száraz termosztátban denaturáltam 5 percig, közben összeállítottam a futtató készüléket (BioRad), és feltöltöttem SDS-PAGE futtató pufferrel (25mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS, pH=8,5). A mintákat és a fehérjelétrát (Fermentas) Hamilton pipettával betöltöttem a zsebekbe, és 200 V feszültségen 45 percig futtattam. Ezután a gél desztillált vízzel mostam, és Coomassie Brilliant Blue festékkel megfestettem. A gél desztillált vízzel differenciáltattam, majd Uvidoc készülékkel fotóztam le.

5.6 *E. coli* és MEF DNS tisztítása

Az élő sejtekben a DNS fehérjékhez kötve található meg, ezért izolálásához nem elég a sejthártyát valamely detergenssel megbontani, szükség van fehérjebontó enzimre (Proteináz K), továbbá RNS-bontó enzimre (RNáz A) is. A DNS oldatban tartása mellett ezen törmelékeket ki kell csapni, így centrifugálással eltávolíthatók lesznek. Ezután az oldott DNS-t csapjuk ki olyan vegyszerrel, amely hidrátburkának elvesztését idézi elő (esetemben izopropanollal), és centrifugálás után a pellet visszaoldásával kapjuk a tiszta DNS-t tartalmazó oldatot.

A sejtek DNS-ét először MasterPure DNA Purification Kit-tel (Epicentre), majd Genomic DNA Clean & Concentrator kit-tel (Zymo Research) is tisztítottam a gyártói protokollok szerint. Az Epicentre kit-tel való tisztítás után nagy arányú nukleotid szennyezést figyeltem meg, ezért alkalmaztam a Zymo Research kit-et. A kit-ben található szilikagél-oszlop a genomi DNS-t megköti, az oligonukleotidokat viszont átengedi, így később a genomi DNS tisztán eluálható. Az elúciót TE pufferrel (10 mM TRIS.HCL, 1 mM EDTA, pH=8,0) végeztem.

5.7 Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz gélelektroforézis a DNS-fragmensek azonosítására, elválasztására és tisztítására szolgáló módszer. A gélben a DNS a foszfátcsoportok negatív töltésének hatására a pozitív pólus felé vándorol, minél nagyobb méretű, annál lassabban.

A gél 0,75 vegyesszázalék agarózt tartalmaz, amit meleg TAE pufferben (40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA, pH=8,0) oldottam fel. A gél GelRed (Biotium) interkaláló festékkel festettem meg, a festéket 10000X hígításban alkalmazva. A festék UV-fény gerjesztésre a látható tartományban emittál. A DNS méretének mérésére DNS-létrát (Fermentas) is felvittem a gélre, amely ismert méretű DNS-fragmensek keveréke. A gél zsebeibe, a NanoDrop készülék által meghatározott koncentráció alapján, elméletileg ugyanakkora mennyiségű DNS-t helyeztem, így azt vártam, hogy a megjelenő csíkok vastagsága és intenzitása azonos lesz. A futtató feszültség 100 V, a futtatási idő 30 perc volt.

5.8 DNS koncentrációjának meghatározása NanoDrop spektrofotométerrel

A DNS-oldatok koncentrációját UV-spektrumuk segítségével határoztam meg. Az ultraibolya spektrumot NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) spektrofotométerrel vettem fel. A DNS jellemző elnyelési maximuma 260 nm, a fehérjék elnyelési maximuma 280 nm. Így a két hullámhosszon mért abszorbancia hányadosa jellemzi a DNS-oldat tisztaságát, értéke 1,8-2,0 körül optimális. A koncentrációmérés a Lambert–Beer-törvényen alapszik, miszerint az oldat abszorbanciája egyenesen arányos az optikai úthossz és a koncentráció szorzatával. A koncentrációméréshez az alapvonalat TE pufferben vettem fel.

5.9 ELISA módszer

Az ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) egy széles körben alkalmazott módszer, amely során antitestekkel specifikusan kimutatható egy antigén jelenléte. A módszer az antigén kvantifikálására is alkalmas, ha az adott minta mért értékeit – amely lehet az oldat abszorbanciája, vagy a gerjesztésre emittált fény erőssége – egy már korábban kvantifikált standard sor mért értékeivel hasonlítjuk össze.

Az ELISA kísérletek során használt *E. coli* sejtek DNS-ét kemoterápiás droggal való kezeléssel próbáltam meg eluracilosítani. A logaritmikus növekedési fázisban lévő ($A_{600nm} = 0,5$) sejtekből mintát vettem, és flaskában 16 órán át növesztettem 20 μM 5FdUR vagy 20 μM dUR (2'-dezoxiuridin) tartalmú, illetve ezek keverékét tartalmazó, valamint ezektől mentes oldatokban. A 20 μM koncentrációban alkalmazott 5FdUR, uracilfelhalmozódást okoz a genomban, viszont még nem vezet nagy arányú letalitáshoz. A dUR egy sejtporózó dezoxinukleozid, melyet a sejtek képesek dUTP-vé (dezoxiuridin-trifoszfáttá) foszforilálni, ez pedig beépülhet a genomba a DNS polimerázok révén. Három különböző sejtvonalat használtam fel: XL1 Blue; ung- BL21 (DE3); és dut-, ung- CJ236. Az XL1 Blue egy olyan *E. coli* törzs, amiben funkcionálisak az UNG és dUTPáz enzimek, az ung- sejtekben ki van ütve az UNG enzimet kódoló génszakasz, a dut-, ung- sejtekben pedig a dUTPáz enzimet, és az UNG enzimet kódoló génszakasz is ki van ütve.

A kísérletek végén a plate-ek beolvasását minden esetben EnSpire Plate Reader (PerkinElmer) segítségével végeztem. A műszer képes kolorimetriás, és fluorimetriás mérések elvégzésére is. Vizsgálataim során 96 Well Clear Flat Bottom Polystyrene High Bind Microplate (Corning) plate-eket használtam.

Az ELISA kísérletekhez használt MEF sejtek DNS-ét kemoterápiás droggal való kezeléssel próbáltam meg eluracilosítani. Vizsgálataimhoz olyan egér embrionális fibroblaszt (MEF DR14) sejtvonalat használtam fel, melyből biallélikusan ki van ütve az UNG fehérjét kódoló szakasz. A sejteket 4 napig 20 μM 5FdUR tartalmú médiumban növesztettem, úgy, hogy a sejtek denzitása a negyedik napon se haladja meg a 90%-os konfluenciát, annak érdekében, hogy a sejtek mindvégig képesek legyenek osztódni.

Az ELISA módszer nem képes az abszolút uracilmennyiséget meghatározni, a kvantifikáláshoz szükség van valamilyen standard értékekre, melyekhez hasonlítható az ismeretlen minták mért értéke. Ezért standard sornak olyan sejtek DNS-ét választottam, melyek uraciltartalmát az irodalomban már többször meghatározták, és a kapott eredmények jól összehasonlíthatóak. Ezen szempontnak legjobban a kemoterápiás droggal nem kezelt dut-, ung- *E. coli* sejtekből származó genomi DNS felelt meg, így a kvantifikálások során ehhez hasonlítottam a különböző minták mért értékeit.

A mérést 96 lyukú plate-en végeztem, egy 7 tagú hígítási sort használva, felező vagy kétharmados hígítást alkalmazva. A mérés során fontos volt, hogy minden lyukban ugyanakkora tömegű DNS legyen, hogy az eltérő mennyiségű DNS-ekből származó hibát elkerüljem. Ezért a hígítási sor minden tagját lazac sperma DNS-sel egészítettem ki, amelynek uracilszintje elhanyagolható. A hígítási sorokat 8-as PCR cső stripekbe készítettem el, majd 95 °C-on előkezeltem a DNS-eket egy PCR készülékben (Applied Biosystems) 5 percen keresztül, majd gyorsan jeges hűtésnek vettem alá. A folyamat során a DNS másodlagos szerkezete relaxálódik, amely elősegíti a DNS kikötését a 96 lyukú plate aljára. Minden felhasználandó plate-lyukba DNA Coating Solution-t (Thermo Scientific) pipettáztam, amely aspecifikusan alakít ki kötést az oldatokban található DNS és a plate alja közt. Majd 8 csatornás pipettával (Eppendorf) átmértem a DNS-oldatokat a plate-re, és felfuszpendáltam, hogy homogén legyen a rendszer. A kikötődés 24 órán keresztül zajlott, ami alatt a plate-et lassan mozgattattam 3D Mini-Shaker-en (Biosan).

A következő nap az oldatot lemértem a plate-ről. Ezt követően 8 csatornás pipettával rájuk mértem a blokkoló oldatot (ETBS-T puffer, 5 vegyesszázalék tejpor, 10 mM β -merkaptóetanol), illetve a tejporban található fehérjék elfedik a plate-en található aspecifikus fehérjekötő helyeket (a DNS-en is) így lecsökkentik az aspecifikus UNG-kikötődés valószínűségét, és ezzel a végső mérés háttérét. A blokkolást 2 órán keresztül végeztem, majd lemértem az oldatot, ETBS-T-vel mostam a lyukakat, majd rámértem a kettős mutáns UNG-ot tartalmazó oldatot (ETBS-T puffer, 5 vegyesszázalék tejpor, 10 mM β -merkaptóetanol, 100 μ g/ml lazac sperma DNS, 1:50 His-3xFlag- Δ UNG2 fehérjeoldat). Az oldatban található nagy mennyiségű lazac sperma DNS-hez az UNG, annak inherens DNS-kötő képessége miatt, kötődni tud. Azonban nagyobb az affinitása a plate-re kikötött DNS-ben található uracilhoz, ezért döntő mennyiségben azok az UNG fehérjék kötődnek a vizsgált DNS-hez, amelyek ténylegesen uracilt kötnek, a többi a lazac sperma DNS-hez kötődik, így eltávozik a későbbi mosás során, és a mérés pontosabbá válik. A katalitikusan inaktív UNG kikötése egy éjszakán át tartott 4 °C-on lassú himbáltatás mellett.

Ezt követően az oldatokat lemértem, majd ETBS-T-vel mostam a lyukakat, és rámértem az elsődleges antitestet tartalmazó oldatot, amelyet egerekben fejlesztettek ki a Flag-tag ellen (ETBS-T puffer, 5 vegyesszázalék tejpor, Anti-Flag M2 klón 1: 1250 (Sigma)). Az ellenanyagos jelölés 1 órán át tartott, majd lemértem az oldatokat, és mostam a lyukakat ETBS-T-vel. Ezután rámértem a másodlagos antitestet tartalmazó oldatot (ETBS-T puffer, 5 vegyesszázalék tejpor, HRP-vel konjugált anti-egér ellenanyag 1:5000 (Sigma)). A HRP (horseradish peroxidase, torma-peroxidáz) a torma gyökereiben fellelhető enzim, amelyet széles körben hasznosítanak biokémiai vizsgálatok során, mert képes megfelelő oxidálószer hatására oxidálni kemolumineszcens vagy kromogén szubsztrátokat. Mivel az enzim fényérzékeny, ezért a plate-et alufóliával fedtem le az oldat hozzáadása után. A másodlagos ellenanyaggal is 1 órán keresztül zajlott a reakció, majd az oldatokat lemértem és a lyukakat mostam ETBS-T, és végül ETBS pufferekkel.

A számos ELISA mérés során két különböző módszerrel hívtam elő az eredményt: a kolorimetrikus OPD-vel (orto-feniléndiamin, Thermo Scientific), vagy az egyszerre kolorimetrikus és fluorimetrikus QuantaRed (Thermo Scientific) szubsztrát segítségével. A módszer optimalizálása során szükségem volt egy megbízható, megfelelő érzékenységgű és olcsó szubsztrátra, ezért választottam az OPD-t. Ám miután sikerült az optimalizálás, áttértem az érzékenyebb fluorimetrikus QuantaRed szubsztrátra, mellyel pontosabb eredményeket tudtam elérni, és a mérés érzékenyebb lett.

5.9.1 Előhívás OPD szubsztráttal

Az előhívást a gyártói protokoll alapján végeztem. A reakció 30 percen keresztül zajlott sötétben, majd 2,5 M-os kénsavval megállítottam. Ekkor az eredmény szemmel is látható volt, az első oszlopban sötétebb citromsárga oldat, majd a következőben világosabb és így tovább, a szinte átlátszó oldatig a 8. oszlopban. Az oldatok abszorbanciáját EnSpire Plate Reader-rel (PerkinElmer) mértem 490 nm-en. A műszer által megadott értékek az abszorbanciával arányosak, ám skálájuk 0-tól 6-ig terjed (a továbbiakban értelmezzük az abszorbanciát a műszer szerint).

5.9.2 Előhívás QuantaRed szubsztráttal

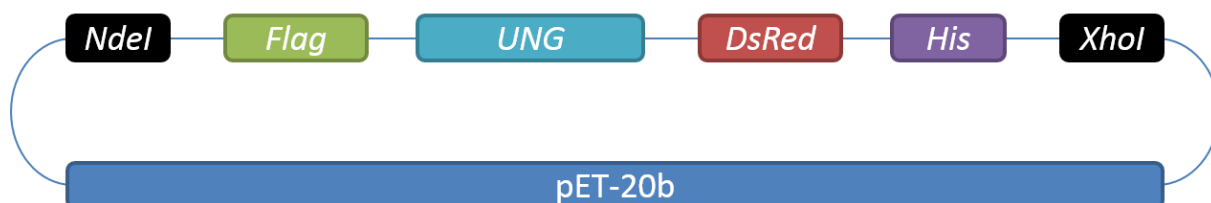
Az előhívást a gyártói protokoll alapján végeztem. A reakció 10 percen keresztül zajlott sötétben, majd a kit-hez tartozó Stop Solution-nal megállítottam. Ekkor az eredmény szemmel is látható volt, az első oszlopban sötétebb lila oldat, majd a következőben világosabb és így tovább, a szinte átlátszó oldatig a 8. oszlopban. A szubsztrát kolorimetriás és fluorimetriás mérést is lehetővé tesz, ezért mindkét mérést elvégeztem ugyanazon a plate-en az EnSpire Plate Reader-rel. A kolorimetriás eredményhez az oldatok abszorbanciáját mértem 576 nm-en, a fluorimetriás eredményhez az oldatokat 570 nm hullámhosszú fénnel gerjesztettem, és 585 nm-en mértem az emissziót. A plate-beolvasó relatív fluoreszcens egységekben (relative fluorescence units, RFU) adja meg a minta által kibocsátott fény mennyiségét.

Az ELISA mérés során felhasznált pufferek:

<u>TE puffer:</u> 10 mM TRIS.HCl, 1 mM EDTA, pH=8,0	<u>ETBS-T puffer:</u> 25 mM TRIS.HCl, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,05% Tween-20, pH=7,4	<u>ETBS puffer:</u> 25 mM TRIS.HCl, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH=7,4
--	--	---

5.10 pET-20b expressziós vektorban kódolt rekombináns fehérje létrehozása

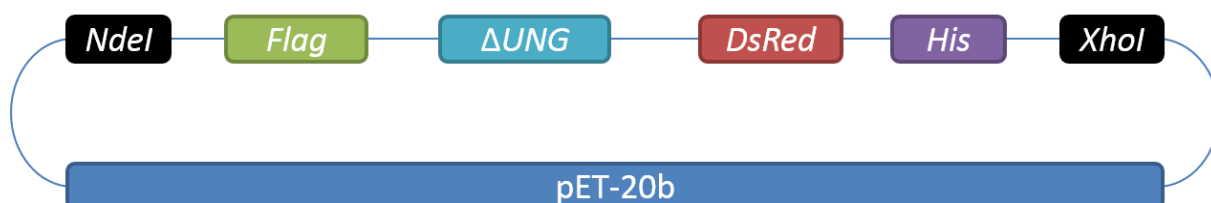
A laboratóriumban korábban létrehozott pET-20b plazmidban kódolt 1xFlag-UNG-DsRed-His konstrukció a rendelkezésemre állt, ám az UNG fehérje első 84 aminosava PCNA és RPA fehérje kötőhelyeket tartalmaz, amely kölcsönhatások az immunocitokémiai festések során jelentős háttérjelet adhatnak. Ezt a konstruktot korábban laboratóriumi munkatársaim sikertelenül próbálták felhasználni immunocitokémiai festésekre, ezért az első 84 aminosavat kódoló DNS-szakasz törlésével újraterveztem a konstruktot. Így hoztam létre a pET-20b plazmidban kódolt 1xFlag- Δ UNG-DsRed-His konstruktot, amely nem lép interakcióba a PCNA és RPA fehérjékkel. A konstrukt végén található His-tagre a plazmidról átíródott fehérje affinitás kromatográfiás tisztítása céljából van szükség. Az expressziós vektorokat a 9. és 10. ábra szemlélteti.



9. ábra

Az eredeti pET-20b plazmid

A pET-20b expressziós vektorban található konstrukt eredetileg a teljes UNG2 fehérjét kódolta, amely első 84 aminosava PCNA és RPA kötőhelyeket tartalmaz. Ezek az immunocitokémiai festés során jelentős háttérrel adhattak volna, ezért klónozással létrehoztam a 10. ábrán látható konstruktot.



10. ábra

Az általam létrehozott új pET-20b plazmid

Az eredeti expressziós vektorból PCR, restrikciós emésztés és ligálás segítségével létrehoztam az immunocitokémiai festésekhez használt konstruktot, amely nem kódolja az UNG fehérje első 84 aminosavát.

A PCR (polimeráz láncreakció) egy széles körben alkalmazott módszer egy adott DNS-szakasz felszorzására. A reakcióhoz szükség van a kérdéses DNS-szakaszt tartalmazó mintára (templát), és a szakasz két végén kitapadó primerekre, továbbá dezoxinukleotidokra, amelyekből épülnek fel az új DNS szálak, valamint polimeráz enzimre. A reakció elején a templát DNS-t magas hőmérsékleten megolvasztjuk (denaturálás), majd olyan hőfokra hűtjük, amelyen a primerek már képesek kitapadni a templáthoz (annealálás). Ezután a polimerázhoz optimális hőmérsékleten zajlik a DNS-szakasz másolása (elongálás), majd ha ez befejeződött, újra kezdődik a ciklus, és így exponenciálisan nő a kívánt DNS-szakasz mennyisége az oldatban.

Az eredeti plazmidból PCR-rel (Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2700) felszaporítottam az Δ UNG-DsRed-régiót egy olyan forward primerrel, amely az UNG fehérjét kódoló szakasz megfelelő helyén tapad ki (253. bázistól kezdve), tartalmaz egy Flag-taget, valamint egy restrikciós enzim (NdeI) hasító helyet. A reverz primer a DsRed fehérjét kódoló szakaszon tapadt ki, és tartalmazott egy restrikciós enzim (XhoI) hasító helyet. Mindkét primer ezeken felül tartalmazott egy néhány nukleotidból álló szakaszt az 5' végén, hogy a későbbi restrikciós emésztés kellő hatékonysággal végbemehessen. A primerek szekvenciáját és jelentésüket a **11. ábra** mutatja 5'–3' irányban.



11. ábra

A PCR-hez használt forward és reverz primer

A polimeráz láncreakcióhoz felhasznált forward primer (felül) az UNG fehérjét kódoló szakasz 253. bázisától kezdve tapadt ki. A Flag epitóp tag segítségével festettem a sejteket immunocitokémiai módszerekkel. A konstruktot később NdeI restrikciós enzimmel emésztettem, hogy 5' vége ligálható legyen az expressziós vektorba. A reverz primer (alul) a DsRed fúziós fehérjét kódoló szakaszon tapadt ki, amely az UNG-ot kódoló szakasz után található. A restrikciós emésztés során XhoI enzimmel is emésztettem a konstruktot, hogy 3' vége ligálható legyen. A reverz primert konvenció szerint reverz komplementer formában adtam meg.

A PCR-hez 0,25 μ M forward primert, 0,25 μ M reverz primert, 0,2 μ M dNTP-t, 50 ng templát plazmidot és 2 unit Q5 polimerázt mértem össze, majd az oldatot 100 μ l-re egészítettem ki nukleázmentes vízzel. Az első denaturálás 98 °C-on zajlott 30 másodpercig, majd 30-szor játszódtott le a következő ciklus: denaturálás 98 °C-on 15 másodpercig, annealálás 66 °C-on 30 másodpercig, elongálás 72 °C-on 45 másodpercig. Végül még 10 percig 72 °C-on elongáltam, hogy minden DNS szál szintézis teljes legyen, és ne maradjanak ragados végek, majd -20 °C-on tároltam az oldatot a további felhasználásig. A PCR után a terméket PCR Purification Kit-tel (Qiagen) tisztítottam, a gyártói protokoll szerint. Ezután az üres pET-20b plazmidot (Novagen), valamint az inszertet ugyanazon restrikciós enzimek általi emésztésnek vettem alá, így a két terméket később majd össze lehet ligálni. A PCR termék emésztéséhez 1 μ l NdeI (New England Biolabs), 1 μ l XhoI (New England Biolabs), 5 μ l puffer (CutSmart) és 43 μ l PCR terméket tartalmazó oldatot mértem össze. A plazmid emésztéséhez 1 μ l NdeI, 1 μ l XhoI, 5 μ l puffer (CutSmart) oldatokat mértem össze, majd hozzáadtam 3 μ g pET-20b plazmidot, és 50 μ l-re egészítettem ki az oldatot desztillált vízzel. Az emésztés 12 órán át zajlott 37 °C-on, majd 80 °C-on hőinaktiváltam a restrikciós enzimeket 20 percen keresztül, és -20 °C-on tároltam az oldatokat további felhasználásig. Az emésztés után az inszertet tartalmazó oldatot PCR Purification Kit-tel (Qiagen) tisztítottam, a gyártói protokoll szerint. Az emésztett plazmidot agaróz gélen megfuttattam, és gélből tisztítottam Gel Extraction Kit-tel (Qiagen), a gyártói protokoll szerint.

A ligálás előtt NanoDrop készülékkel megmértem a DNS-koncentrációt az oldatokban, illetve agaróz gélen ellenőriztem a ligálandó DNS-ek intaktságát. A ligáláshoz 6 µl inszert és 2 µl plazmid oldatot mértem össze, 70 °C-on 5 percig inkubáltam, majd jégen tartottam 2 percig. Ezután 1 µl ligáz puffert (Fermentas) és 1 µl T4 ligázt (Fermentas) adtam hozzá, és 37 °C-on 1 órán keresztül ligáltattam. A kész terméket XL1 Blue kompetens sejtekbe transzformáltam, majd 50 µg/ml karbenicillint tartalmazó agaróz LB plate-re kentem ki. A karbenicillin rezisztencia génjét a plazmid kódolja, így csak a sikeresen transzformált sejtek nőnek ki a plate-en. Általam kiválasztott kolóniákból előkultúrát indítottam, majd 16 óra elteltével Plasmid Miniprep Kit-tel (Sigma) izoláltam a plazmid DNS-t. A klónozás eredményességét DNS-szekvenálással ellenőriztem (Eurofins MWG Operon által). A plazmidot az 5.1 pontban leírtak szerint transzformáltam *Escherichia coli* BL21 (DE3) ung-151 sejtekbe, expresszáltam, majd a fehérjét izoláltam affinitás kromatográfiával.

5.11 Plazmiddal transzfektált MEF sejtek *in vivo* vizsgálata

A kezeletlen egér embrionális fibroblaszt (MEF-DR14) sejteket 24 lyukú plate-re helyeztem, úgy, hogy a sejtek konfluenciája 80% körüli legyen. Négy különböző kezelést kívántam megvizsgálni a sejteken: uracilos plazmiddal transzfektált; uracilos plazmiddal transzfektált és UGI enzimmal kezelt; normális plazmiddal transzfektált; nem transzfektált. Ehhez uracildúsított plazmiddal és normális plazmiddal transzfektált sejteket készítettem, illetve néhány lyuk esetén nem végeztem transzfekciót. Miután a sejtek kiterültek a plate-en, FuGENE HD (Promega) transzfekciós reagenst használtam a plazmidok bejuttatására, a gyártó által javasolt protokollt követve.

A transzfekciós elegyet 6 óráig tartottam a sejteken, majd tripszin-EDTA-s oldat sejttségével átpasszáltam a sejteket egy másik 24 lyukú plate-re, amelyben óráüvegek is voltak. 24 óra elteltével a lyukakat (bennük a kiterült sejtekkel) 500 µl 37 °C-os PBS pufferrel mostam. Fixálásként Carnoy oldatot alkalmaztam, amit -25 °C-ra hűtöttem és rámértem a plate-re. A fixálás 4 °C-on 20 percig tartott, amely során a fehérjéket dehidratálás révén denaturáljuk, így valamennyi sejtbeli folyamat befagy. Ezután rehidratáltam a sejteket, először 50% etanolt tartalmazó PBS-oldattal 3 percig, majd 30% etanolt tartalmazó PBS-oldattal 3 percig, végül tiszta PBS-oldattal 3 percig. Feltárási oldatot (2N sósav, 0,5% Triton X-100) adtam a sejtekhez, melynek célja az epitóp feltárás, azaz a DNS denaturálása (vagyis az egyszálú DNS-t hozzáférhetővé tenni), valamint a heterokormatin- és a kromatinállomány fellazítása. A reakció 30 percig zajlott, majd a sejteket háromszor mostam 500 µl PBS pufferrel, a pH normalizálása végett. A lyukakra mértem a blokkoló oldatot (5 vegyesszázalék tejpor, TBS-T pufferben), és 15 percig blokkoltam. Ezután lazac sperma DNS-t is tartalmazó blokkolót adtam a sejtekhez (5 vegyesszázalék tejpor, 200 µg/ml lazac sperma DNS, TBS-T pufferben) és 45 percig rajta tartottam. A blokkolás célja, hogy a sejtekben a fehérjék aspecifikus megkötésére alkalmas helyek telítődjenek a vizsgálat szempontjából inert fehérjékkel, így csökkentik az ellenanyag aspecifikus kikötődésének esélyét.

Az általam tervezett és létrehozott 1xFlag-ΔUNG-DsRed-His konstrukciót használtam fel immunocitokémiai vizsgálataimhoz, amely detektálható közvetlenül a DsRed fluorofórnak köszönhetően, valamint közvetve a Flag-tag antitestes jelölésével is. Az UNG enzim specifikusan gátolható az uracil-DNS glikoziláz inhibitor (UGI) fehérjével. Az UGI képes reverzibilisen kötődni az UNG-hoz és gátolni az uracil-kötő képességét. Ezért az olyan oldatokban, melyekben az UGI és az UNG egyszerre van jelen, az UNG nem képes az uracilhoz kötődni, így ezen minták várhatóan nem fognak jelet adni, ideálisak negatív kontrollnak.

A lyukakra mértem a rekombináns UNG-ot tartalmazó oldatot (5 vegyesszázalék tejpor, 200 µg/ml lazac sperma DNS, 1:250 1xFlag-ΔUNG-DsRed-His, TBS-T puffer), néhány lyukra azonban UGI (NEB) és UNG fehérjét egyszerre tartalmazó oldatot mértem (1:250 1xFlag-ΔUNG-DsRed-His, 1:25 UGI). A reakció 16 óráig tartott 4 °C-on, enyhe rázatás mellett. Ezután mostam a plate-et, hogy a nem kötődő ellenanyagot eltávolítsam, először TBS pufferrel kétszer 15 percig, majd TBS-T pufferrel kétszer 15 percig, végül 200 µg/ml lazac sperma DNS TBS-T pufferben készült oldatával 30 percig. A plate-re mértem az elsődleges ellenanyagot tartalmazó oldatot (5% FGS (fetal goat serum), 3% BSA (bovine serum albumin), 1:2000 Anti-Flag M2 egér klón (Sigma), PBS-T puffer), a reakció 1 órán keresztül zajlott. Ezután mostam a plate-et PBS-T pufferrel kétszer 15 percig, majd PBS pufferrel kétszer 15 percig. A sejtekre mértem a másodlagos antitestet tartalmazó oldatot (5% FGS, 3% BSA, 1:1000 Anti-Mouse Alexa 488 (Molecular Probes), PBS-T puffer), a reakció 1 órán keresztül zajlott, majd mostam a plate-et PBS-T pufferrel egyszer 15 percig, illetve PBS pufferrel háromszor 15 percig. A sejtmagok megfestésére DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) festéket használtam, amely erősen kötődik a DNS A-T gazdag régióihoz. A festéköldatot (0,1 µg/ml DAPI, PBS puffer) 5 percig hagytam a sejteken, majd mostam PBS-T pufferrel 10 percig, és PBS pufferrel 5 percig.

Az előkészítés során használt oldatok:

<u>Carnoy fixáló:</u> 60 V/V% etanol 30 V/V% ecetsav 10 V/V% kloroform	<u>PBS puffer:</u> 138 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,31 mM NaH ₂ PO ₄ 8,69 mM Na ₂ HPO ₄ pH=7,4	<u>PBS-T puffer:</u> 138 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,31 mM NaH ₂ PO ₄ 8,69 mM Na ₂ HPO ₄ 0,05 V/V% Triton X-100 pH=7,4
<u>TBS puffer:</u> 50 mM TRIS.HCl 137 mM NaCl 2,7 mM KCl pH=7,4		<u>TBS-T puffer:</u> 50 mM TRIS.HCl 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 0,05 V/V% Triton X-100 pH=7,4

Az óralemezeket a lyukak aljáról felszedtem és tárgylemezre helyeztem át őket, melyre előzőleg beágyazó gyantát, FluorSave Reagent (Merck Millipore) oldatot cseppentettem. Az oldat elősegíti a minták kisebb mértékű kiégését mikroszkópos vizsgálatok során. A tárgylemezen lévő mintákat konfokális mikroszkóppal (Zeiss CLSM 710) vizsgáltam, mindhárom fluorofórt figyelembe véve. A lézeres gerjesztési és emittálási hullámhosszokat a **2. táblázat** tartalmazza.

Fluorofór	Gerjesztési hullámhossz	Detektálási hullámhossz
DAPI	405 nm	410-470 nm
Alexa 488	488 nm	495-540 nm
DsRed	543 nm	545-700 nm

2. táblázat

A különböző fluorofórok gerjesztési és emittálási hullámhosszai

5.12 Sejtvonalak fenntartása

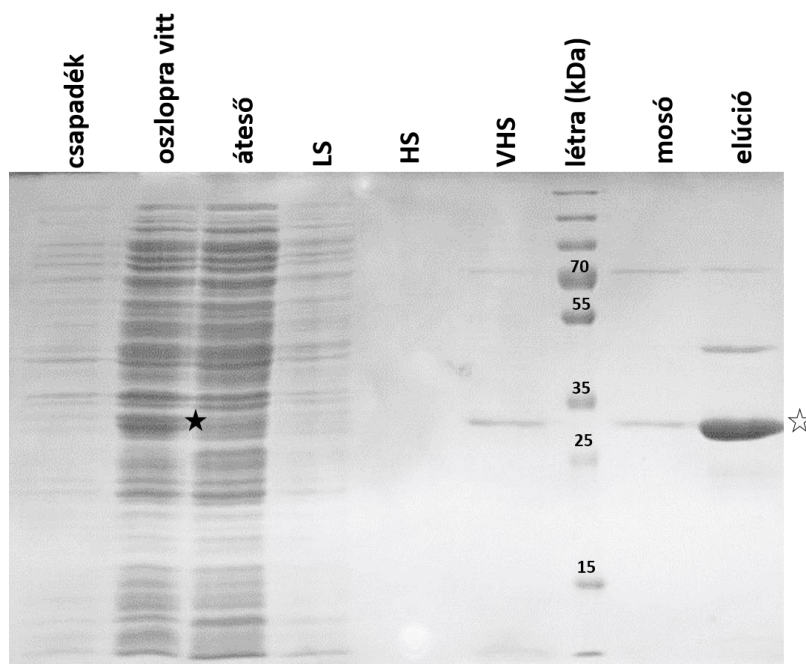
Az ELISA kísérletekhez, illetve a konfokális mikroszkópiás mérésekhez használt MEF sejtvonal fenntartása, passzálása és kemoterápiás droggal (*5-fluoro-2'-deoxiuridin* (5FdUR)) való kezelése szintén feladatomból volt. A sejteket T25-ös tenyésztő flakában növesztettem, DMEM/F12 (Gibco) médiumban, amelyhez 50 µg/ml penicillint, 1 V/V% nem esszenciális aminosav keveréket (Sigma), 10 V/V% FBS-t (fetal bovine serum) adtam. A sejteket 37 °C-on termosztáltam Galaxy 170 R (New Brunswick) termosztátban 5 V/V% CO₂-ot tartalmazó légkörben.

A sejtvonalak passzálását (friss tápoldatba való áttöltését) 4 naponta végeztem el. A flakák aljáról Tripszin-EDTA (Sigma) oldattal szedtem fel a sejteket, majd új flakába mért friss tápoldatba pipettáztam át a sejtek nagyjából 20%-át.

6. Eredmények és értékelésük

6.1 His-3xFlag-ΔUNG fehérje termelése és tisztítása

Az ELISA méréseknél használt His-3xFlag-ΔUNG rekombináns fehérjét (32 kDa) az 5.2 pontban leírtak szerint ung- *E. coli* baktériumokban termeltettem. A fehérjét affinitás kromatográfia segítségével tisztítottam, mely során vett mintákat nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézis elválasztás technikával futtattam meg az 5.5 pontban leírt módszerrel. Céлом a rekombináns fehérje termelődésének bizonyítása volt, illetve az affinitás kromatográfiás tisztítás nyomon követése. Az elektroforézis eredményét a **12. ábra** mutatja.



12. ábra

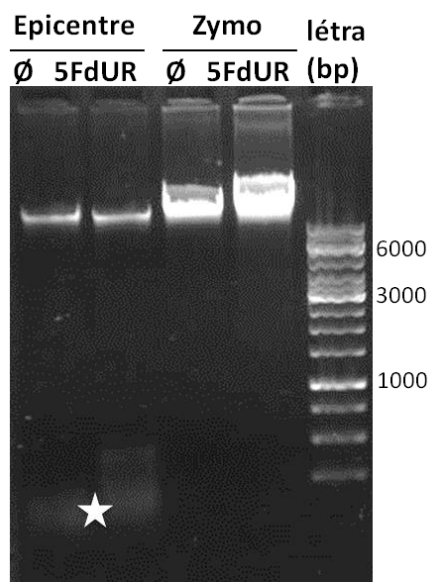
A rekombináns fehérje termelése és tisztítása során vett minták SDS-PAGE gélképe

A gélképen a következő sorok figyelhetők meg: a feltárást követő centrifugálás utáni csapadékból (csapadék), illetve felülúszóból (oszlopra vitt) vett minták. A kikötődési reakció után az oszlopról lefolyó oldat (áteső), az LS puffer, a HS puffer, és a VHS puffer rámerése után lefolyó oldat (LS, HS, VHS). Fehérjelétra, a mosó puffer és az elúciós puffer rámerése után lefolyó oldat (létra, mosó, elúció). Az oszlopra vitt és az áteső sorok közti különbség fekete csillaggal, a tiszta rekombináns fehérje fehér csillaggal van megjelölve.

Jól látható, hogy a csapadékban kevés fehérje található, tehát a sejtek feltárása sikeres volt. Az oszlopra vitt sor, és az áteső sor közt jól látható a különbség a rekombináns fehérjénk magasságában (fekete csillag). Ennek oka, hogy a fehérje a His-tag segítségével kikötődött az oszlopra. Az aspecifikusan kötött fehérjék az LS puffer hatására eluálódtak, a HS puffer sorában nincs megfigyelhető csík. A VHS puffer hatására már kissé megindult a fehérjénk elúciója, azonban más molekulatömegnél is látható jel, tehát további szennyezők eluálódtak az oszlopról. A fehérjetisztítás sikeresnek mondható, az oldat legalább 90%-os tisztaságban tartalmazza a fehérjénket (fehér csillag), amely a várt 32 kDa-os molekulatömegnél fut.

6.2 Az ELISA mérésekhez használni kívánt genomi DNS-preparátum tisztaságának ellenőrzése

Az 5.7 pontban leírtak szerint agaróz gélt öntöttem, és megfuttattam az Epicentre kit-tel tisztított, illetve a Zymo Research kit-tel tovább tisztított *E. coli* és egér embrionális fibroblaszt (MEF) DNS-t. Az elektroforézis célja volt, hogy ellenőrizzem, a DNS-minták nem tartalmaznak-e nukleotid vagy más eredetű szennyezést.



13. ábra

A DNS-preparátumok agaróz gélképe

A zsebek kezeletlen sejtekből (Ø), illetve 20 µM 5FdUR-nel kezelt MEF sejtekből (5FdUR) izolált DNS-t tartalmaznak. Az első két sor az Epicentre kit-tel tisztított, a második két sor a Zymo Research kit-tel tovább tisztított genomi DNS-t tartalmaz, az ötödik sor DNS-létra. A nukleotid törmeléket és szennyezést tartalmazó régió csillaggal van jelölve.

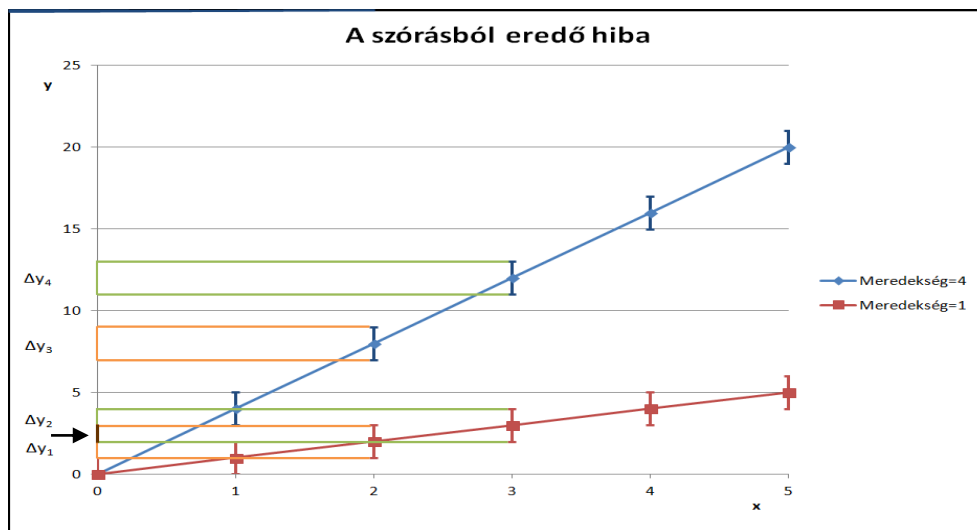
A **13. ábrán** látható gél minden zsebébe – a koncentrációmérés alapján – azonos mennyiségű (200 ng) DNS-t pipettáztam. Látható, hogy az első két sorban – az Epicentre kit után – a csíkok jóval vékonyabbak, amely annak a jele, hogy kisebb mennyiségű DNS volt a zsebekben. Ez azzal magyarázható, hogy a kit nagy arányú nukleotid szennyezést hagyott a DNS-oldatban, amelyet a spektrofotométer nem tud elkülöníteni a genomi DNS-től, így a valódi genomi DNS-koncentrációnál nagyobb értéket adott eredményül. A nukleotid, és egyéb kis molekulású DNS-szennyezés látható is a gélképen, egy-egy elkenődött régióként a genomi DNS-ek alatt (csillaggal jelölve). A második két sorban – a Zymo Research kit után – viszont két jóval intenzívebb csíkot látunk, egymáshoz viszonyított mennyiségük hasonló, illetve nem látható a szennyezésekkel azonos magasságban jel. Ezért megállapítható, hogy valóban szennyező-mentes és pontos koncentrációjú DNS-oldat készítéséhez szükséges mindkét kit-tel tisztítani a genomi DNS-t. Az *E. coli* sejtekből származó DNS-preparátummal hasonló eredményre jutottam, ezért a MEF mintákkal azonos módon tisztítottam azokat.

6.3 Az ELISA módszer optimalizálása

Célom az volt, hogy az ELISA módszer segítségével különböző DNS-minták uracilszintje mérhető legyen, amelyekről irodalmi adatok alapján ismertem, hogy megközelítőleg milyen tartományba esik az uraciltartalmuk. Ezért úgy kellett optimalizálnom az ELISA-t, hogy annak lineáris tartományán belül legyen a minták vélt uracilszintje. További célom volt, hogy ez a lineáris tartomány a lehető legnagyobb DNS-koncentráció tartományt átfogja, illetve a kapott görbe meredeksége nagy legyen. Számos optimalizáló kísérletet végeztem el, melyek során több különböző mérési paramétert változtattam. Az 5.9 pontban az ELISA módszer optimalizált protokollját ismerttettem.

6.3.1 Az illesztett egyenes meredekségének szerepe

Célom volt olyan mérést létrehozni, ahol a kapott egyenes meredeksége lehetőleg nagy, mivel így a mért értékek szórása kisebb hibát fog okozni a számított uraciltartalomban. A későbbi kvantifikáció során a standard sorok mért értékeire egyenest (vagy egyszerű polinomiális függvényt) illesztettem, majd ennek egyenletéből számoltam vissza a mintákra, tehát kihasználtam, hogy a függvény kölcsönösen egyértelmű. Ám alacsony meredekségnél ez nagy számolási hibával lett volna terhelve. Ennek oka, hogy ha egy függvény meredeksége nagyobb, akkor az y érték szórása ellenére is megbízhatóan elkülöníthetők a különböző x pontok függvényértékei egymástól, így a függvény továbbra is kölcsönösen egyértelmű hozzárendelés marad. Viszont kis meredekség esetén az y szórási tartományok összeérnek, így nem lehet megmondani, hogy melyik x értékhez tartozik az adott y érték. A **14. ábrán** látható, hogy a meredekebb függvény esetén nem fednek át a Δy szórási tartományok (zöld és narancssárga nem érintkezik). Azonban a kevésbé meredek függvény esetén a Δy tartományok összeérnek (zöld és narancssárga érintkezik), és azon y értékekhez, melyek ezen szakaszra esnek (barna szakasz, nyíllal megjelölve), nem lehet megmondani, hogy milyen x érték társul.



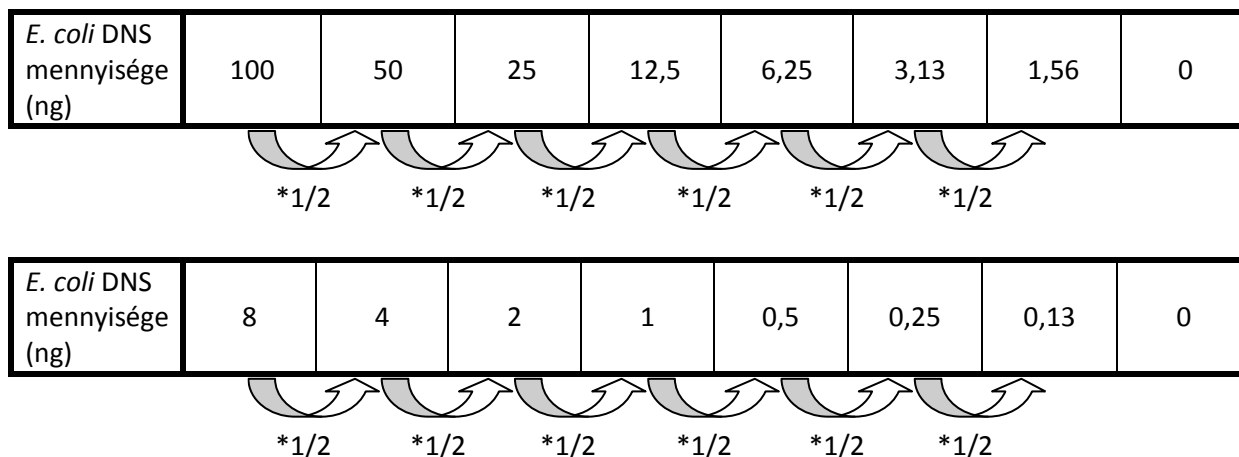
14. ábra

A mért értékek szórásából eredő hiba szemléltetése

A meredekebb függvényhez (Meredekség=4) tartozó Δy_3 és Δy_4 szórási tartományok nem fednek át, tehát a függvény a szórással együtt is kölcsönösen egyértelmű. A kevésbé meredek függvénynél (Meredekség=1) viszont, a Δy_1 és Δy_2 szórási tartományok átfednek, ezért a barna tartományon lévő y értékekhez nem lehet egyértelműen x értéket társítani.

6.3.2 A plate-re felvitt DNS mennyiségének optimalizálása

Laborcsoportomban dolgozó Róna Gergely, Scheer Ildikó és Nagy Kinga által kifejlesztett dot-blot módszer protokollját használtam fel az ELISA protokoll kidolgozásához. Ebben a felező hígítási sor első tagja 100 ng *E. coli* DNS-t tartalmazott, illetve hogy azonos legyen az összes DNS mennyiség minden lyukban, lazac sperma DNS-t is adtak hozzá. Ezért az első ELISA mérést ezen mennyiségekkel végeztem el, *E. coli* dut-, ung- (CJ236) sejtek genomi DNS-ét felhasználva, melyet duplikált hígítási sorban vittem fel a plate-re (1. és 2. standard sor). Az optimalizálás során a lyukakba mért DNS mennyiségét a **15. ábra** mutatja, egy cella egy lyukat jelöl.

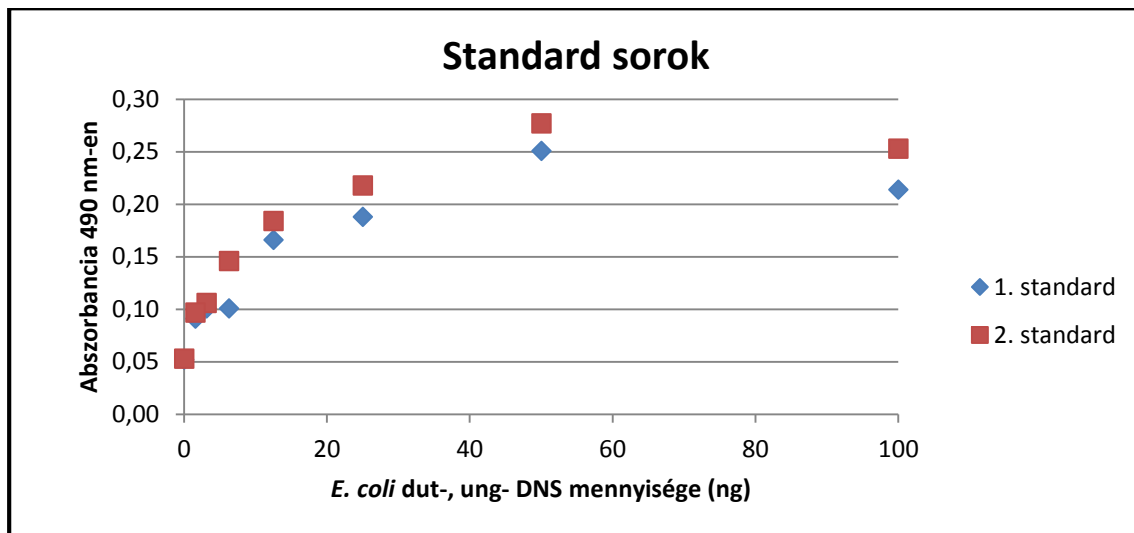


15. ábra

A DNS mennyiségének optimalizálása során felhasznált DNS-mennyiségek

A felső sorban látható az első ELISA mérés (16. ábra) során használt lyukankénti *E. coli* DNS mennyisége. A felező hígítási sor első tagja 100 ng. Alsó sorban látható az optimalizált ELISA mérés során használt lyukankénti *E. coli* DNS mennyisége. A felező hígítási sor első tagja 8 ng. Mindkét esetben az utolsó lyukba csak lazac sperma DNS került. Az értékeket két tizedesjegyre kerekítettem.

A mérés során az elsődleges antitestet (Anti-Flag M2 klón) 1:2500, a másodlagos antitestet (HRP-vel konjugált anti-egér ellenanyag) 1:40000 hígításban alkalmaztam a gyártói protokoll alapján. A mérés eredménye a **16. ábrán** látható. A DNS mennyisége és a mért abszorbanciaérték közötti összefüggés alacsony DNS-mennyiségnél jó közelítéssel lineáris. Ez alapján arra következtettem, hogy a mérés helyes eredményt hozott, csupán a lineáris tartománya jóval alacsonyabb DNS-mennyiségnél van, mint a dot-blot méréseké, azaz a módszer érzékenyebb.

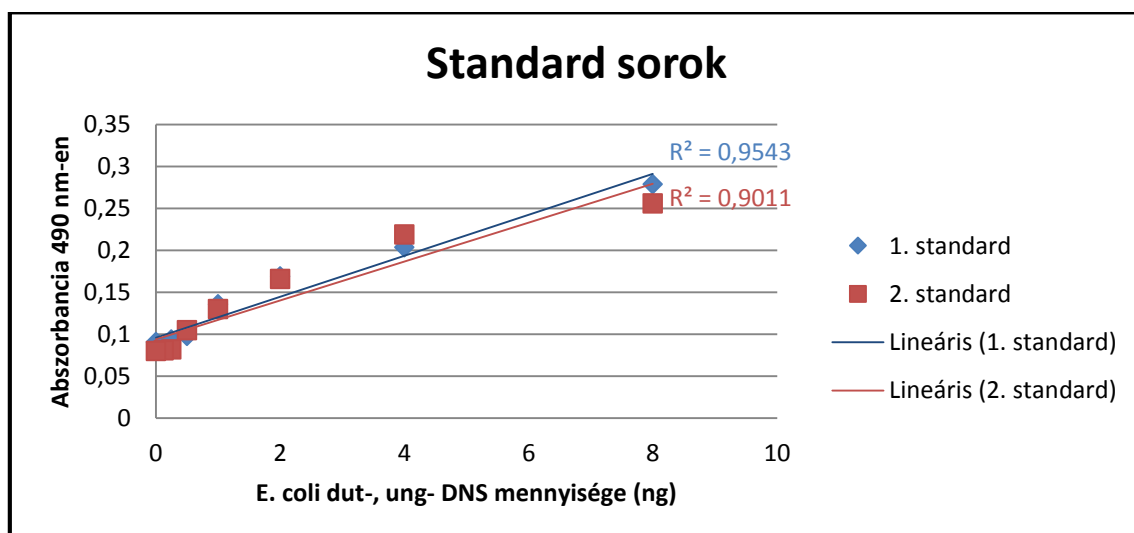


16. ábra

A tömegoptimalizáló ELISA mérés eredménye

A mérés során a hígítási sor első tagja 100 ng *E. coli* DNS volt.

Ezért a következő mérés során a hígítási sor első tagja csupán 8 ng *E. coli* DNS-t tartalmazott (lazac sperma DNS mellett). A **17. ábrán** látható függvény jó közelítéssel lineáris (R^2 értéke a diagramon látható), a két standard sor mért értékei is hasonlóak. Ezért ezt a DNS mennyiséget alkalmaztam a továbbiakban. Az ELISA módszer tehát működőképes, és valóban érzékenyebb, mint a korábbi dot-blot mérések.



17. ábra

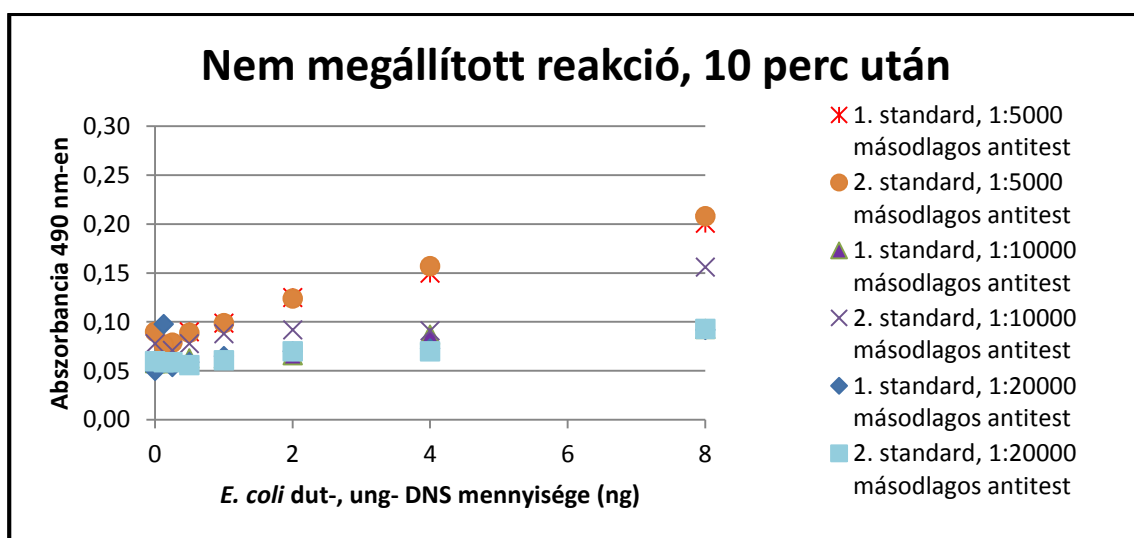
A tömegoptimalizáló ELISA mérés eredménye

Az ELISA mérés során a hígítási sor első tagja 8 ng *E. coli* DNS volt.

6.3.3 A másodlagos antitest mennyiségének, illetve az inkubációs idő optimalizálása

Meg kívántam vizsgálni, hogy a másodlagos antitest (HRP-vel konjugált anti-egér ellenanyag (Sigma)) felhasznált mennyisége, illetve az OPD szubsztráttal való inkubálási idő hossza miként változtatja meg a kapott egyenes meredekségét, így a módszer érzékenységét.

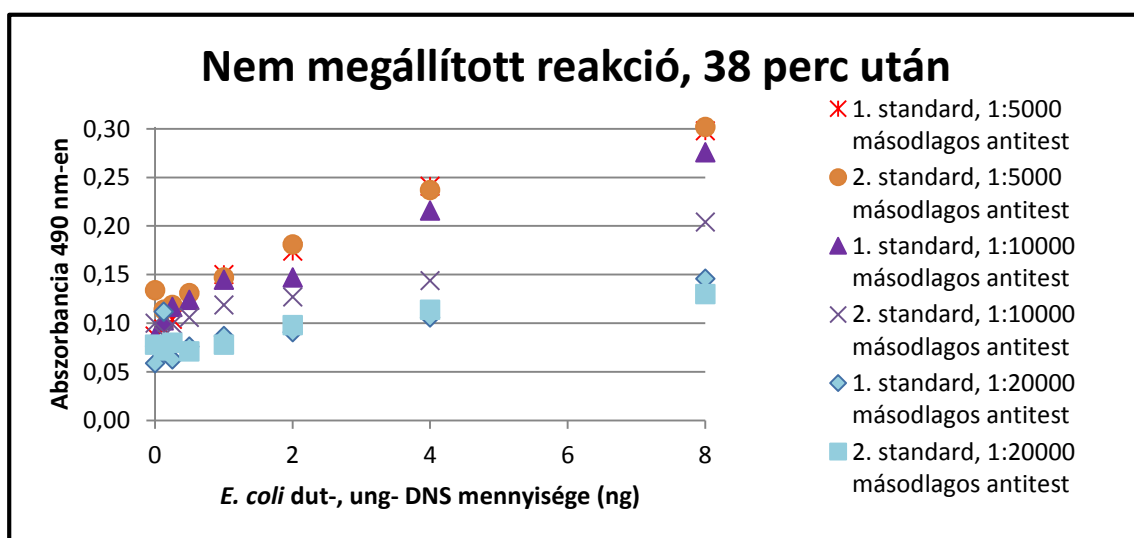
Az OPD szubsztrát színreakciója beolvasható a reakció megállításával, vagy anélkül is. Nem megállított reakció esetén 450 nm-en mértem az oldatok abszorbanciáját 10, 15, 25, és 38 perc után (csak a 10 és 38 perc utáni mérések eredményeit közlöm). A reakciót 2,5 M-os kénsav hozzáadásával állítottam meg (gyártói protokoll alapján) 40 perc elteltével, és az abszorbanciát 490 nm-en mértem. A mérések eredményeit a 18., 19., és 20. ábrák mutatják.



18. ábra

Az időoptimalizáló ELISA mérés eredménye

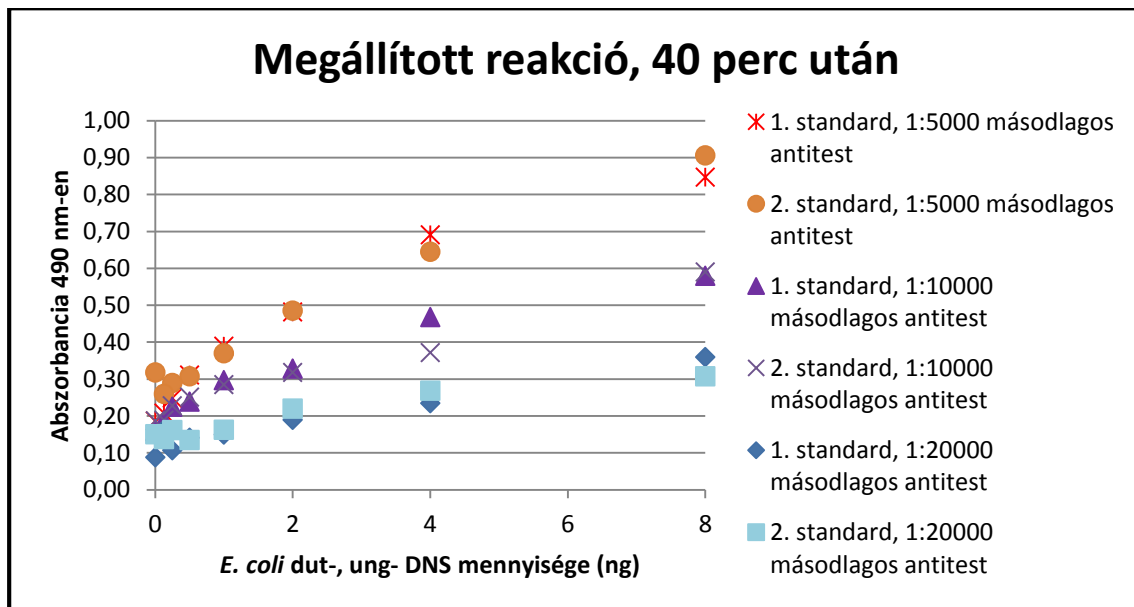
Az inkubálási idő 10 perc volt, a különböző minták mért értékei nem válnak egymástól.



19. ábra

Az időoptimalizáló ELISA mérés eredménye

Az inkubálási idő 38 perc volt, a minták mért értékei már elkülönülnek.



20. ábra
Az időoptimalizáló ELISA mérés eredménye

A reakciót 40 perc inkubálási idő után megállítottam, a minták mért értékei elkülönülnek, az egyenesek meredeksége megfelelő.

Jól látható, hogy a nem megállított reakciók esetén a 38 perc utáni meredekség jóval nagyobb, így célszerű hosszabb ideig inkubálni a reakciót OPD-vel. Továbbá jól látható az is, hogy a másodlagos antitestet érdemes magas koncentrációban alkalmazni (legjobb az 1:5000 hígítás), mivel így nagyobb az egyenesek meredeksége. Ezért a későbbiekben 1:5000 hígításban alkalmaztam a másodlagos antitestet. A megállított reakció esetén könnyebben kivitelezhető a mérés, ezért ezt alkalmaztam. Azonban a gyártói protokoll maximum 30 perc inkubálási időt ajánl, ezért a későbbiekben 30 perc után megállítottam a reakciót. A mérési eredmények alapján a jelerősség és a jelek közti különbség már megfelelő volt ennyi idő után is.

6.3.4 Az aspecifikus antitest-kikötődés tesztelése

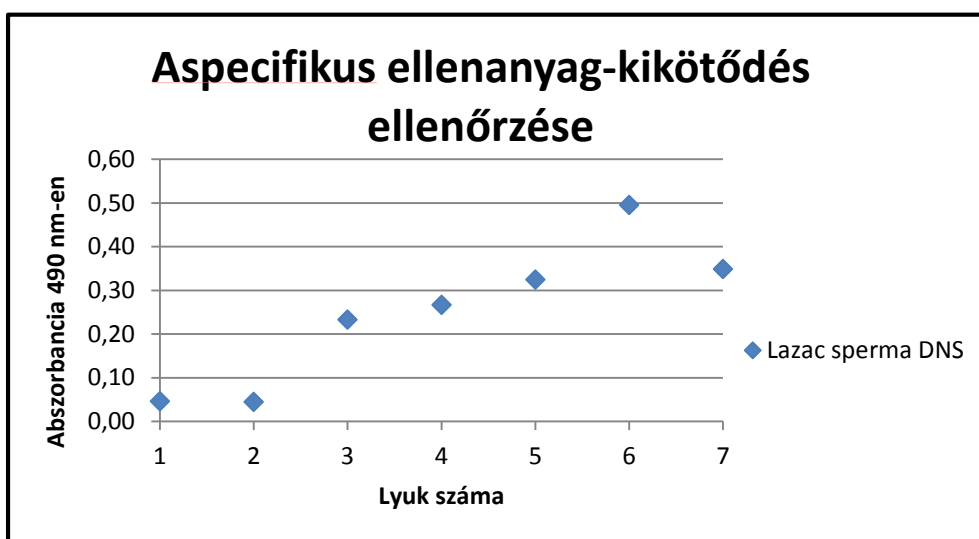
Az elsődleges antitest (Anti-Flag M2 klón) a rekombináns UNG fehérjén található Flag epitóp tag-hez kötődik specifikusan. A másodlagos antitest (HRP-vel konjugált anti-egér ellenanyag) az egérben termelt elsődleges antitesthez kötődik specifikusan. Azonban ezen antitestek kötődhetnek aspecifikusan a minta valamely részletéhez vagy a plate aljához is, és ezzel a mérés eredményét jelentősen befolyásolnák. Annak érdekében, hogy megvizsgáljam, hogy az elsődleges és másodlagos antitestek nem kötődnek ki aspecifikusan, kontroll ELISA méréseket végeztem. A **3. táblázat** mutatja a különböző mérési elrendezéseket, a **21. ábrán** látható a mérés eredménye.

Oldat	1. lyuk	2. lyuk	3. lyuk	4. lyuk	5. lyuk	6. lyuk	7. lyuk
UNG	–	+	+	+	+	+	+
Elsődleges	+	–	+	+	+	+	+
Másodlagos	+	+	+	+	+	+	+

3. táblázat

A kontroll ELISA mérések elrendezése

Az ELISA mérés során az 1. lyukra nem mértem UNG oldatát, a 2. lyukra nem mértem elsődleges antitestet (–). A többi lyukra mindkét oldatot rámértem (+), illetve minden lyukra mértem másodlagos antitestet is.



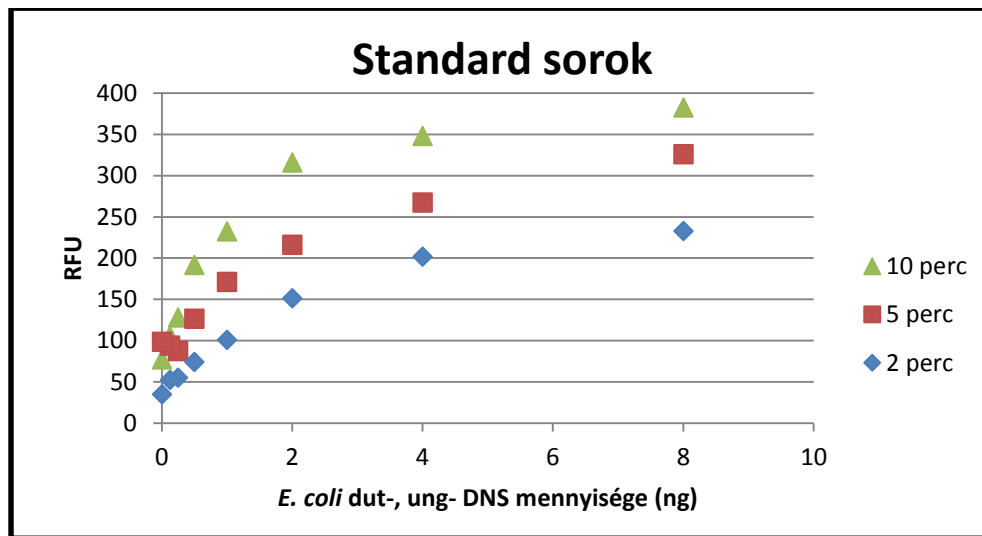
21. ábra

A negatív kontroll ELISA mérés eredménye

A 1. lyuk esetében az elsődleges antitest, a 2. lyuk esetében a másodlagos antitest nem tud specifikusan kikötődni, ezért lemosódott a későbbi mosási lépések során. Jól látható, hogy e két lyuk esetén a jelerősség elhanyagolható a többihez képest, értéke kevesebb, mint ötöde a legkisebb valódi jelnek (3. lyuk). Megállapíthatjuk tehát, hogy az ELISA módszerrel elhanyagolható az aspecifikus antitest-kikötődésből származó hiba. A többi lyuk abszorbanciájának szórása abból eredhet, hogy a lyukak csak lazac sperma DNS-t tartalmaztak, és a módszer képtelen pontosan detektálni ennek nagyon alacsony uraciltartalmát.

6.3.5 Inkubációs idő optimalizálása a QuantaRed szubsztráttal

Miután sikerült megfelelően pontos ELISA méréseket véghezvinni az OPD szubsztrát segítségével, áttértem a QuantaRed szubsztrát használatára. A szubsztrát alkalmas fluoreszcens detektálásra, így lineáris tartománya a kolorimetrikus mérésnél is alacsonyabb DNS-szintnél várható, tehát a mérés érzékenyebb lehet, mint OPD-vel. A szubsztrát gyártói protokollja alapján olyan kísérletet folytattam, mely során nem megállított reakcióban (2 és 5 perc után), valamint megállított reakcióban (10 perc után) mértem az oldat fluoreszcenciáját. A standard sorokat most triplikátumban vittem fel a plate-ra, köztük csupán az inkubációs idő terjedelmében volt különbség a mérés során. A mintákat 570 nm hullámhosszú fénnel gerjesztettem, és 585 nm-en mértem az emissziót. A mérés eredménye a **22. ábrán** látható.



22. ábra

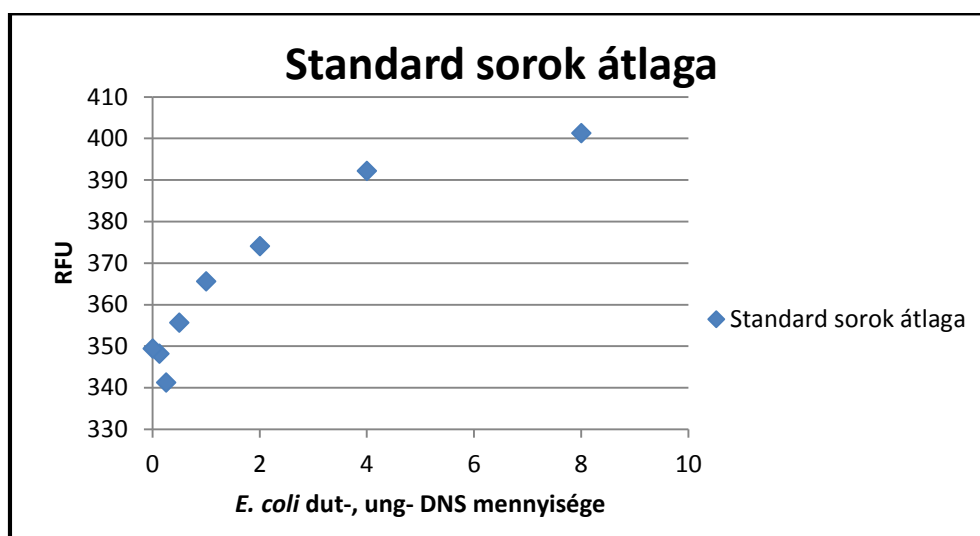
A QuantaRed szubsztrát inkubálási idejének optimalizációja

A kezdeti lineáris szakasz meredeksége 10 perc inkubálási idő után a legnagyobb.

A görbék lefutása meglehetősen hasonló, viszont a minta fluoreszcenciája az inkubációs idővel nő. Mivel a lineáris tartomány meredeksége 10 perc után, a megállított reakció esetében a legnagyobb, ezért további kísérleteim során ezt alkalmaztam. Az is megfigyelhető, hogy a görbék már 4 ng DNS környékén telítésbe mennek, ezért kijelenthetjük, hogy a szubsztrát lineáris tartománya ténylegesen alacsonyabb DNS-mennyiségnél található, így a mérés érzékenyebbé vált, mint OPD szubsztráttal.

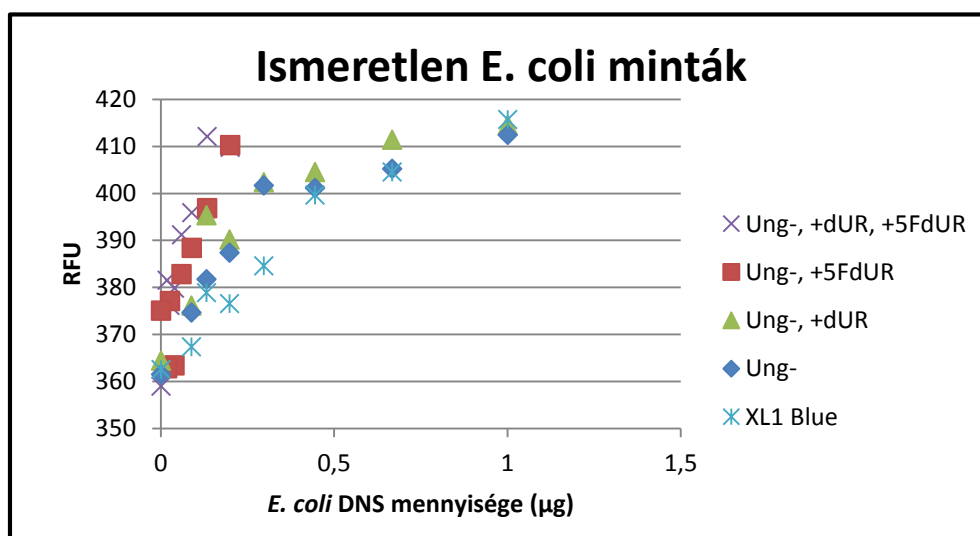
6.4 Kezelt és kezeletlen *E. coli* DNS-minták uraciltartalmának meghatározása

Az optimalizált protokollt felhasználva különböző módon kezelt *E. coli* sejtek DNS-ében található uracil mennyiségét határoztam meg. Vizsgálataim során XL1 Blue, valamint UNG deficiens (ung-) *E. coli* sejtek DNS-ével foglalkoztam. Az UNG deficiens sejtek három módon lettek kezelve: 20 μ M 5-fluoro-2'-dezoxiuridin (+5FdUR), 20 μ M 2'-dezoxiuridin (+dUR), valamint mindkét kezelést egyszerre alkalmazva (+dUR, +5FdUR). Az 5FdUR számos kemoterápiás kezelés hatóanyaga, amely a sejtekben gátolja a *de novo* timidilát szintézist. A dUR egy uraciltartalmú dezoxinukleozid, mely sejtporéabilitásának köszönhetően bejuthat a sejtekbe, és foszforilálációt követően bekerülhet a DNS-be is a polimerázok által. A kezelt sejtek DNS-e mellett kezeletlen sejtekből izolált DNS-t is vizsgáltam. A felhasznált DNS-ek uraciltartalmát már többen is próbálták kvantifikálni az irodalomban, ám a mérési eredmények nem teljesen egybevághóak. Ezért a különböző DNS-mintákat ismeretlen mintáknak neveztem el.



23. ábra

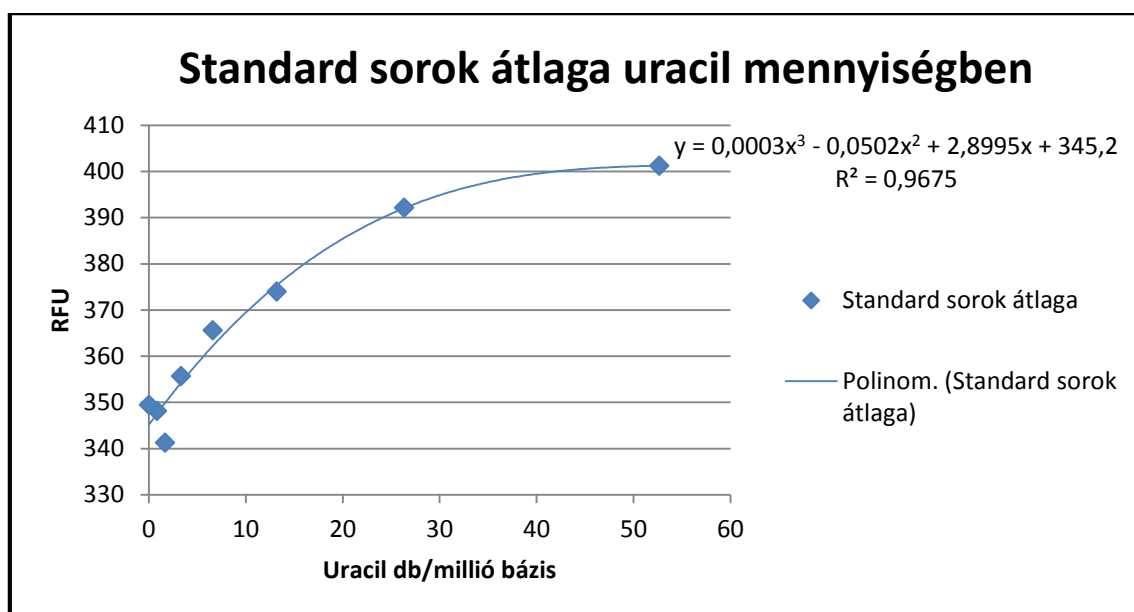
A standard sorok mért RFU értékeinek átlaga az ismeretlen *E. coli* minták kvantifikálásához



24. ábra

Kezelt és kezeletlen *E. coli* sejtek DNS-ének mért RFU értékei

A **23. ábrán** látható a standard sorok mért RFU értékeinek (relative fluorescence unit) átlaga, illetve a **24. ábrán** az ismeretlen minták mért RFU értékei. Látható, hogy a kemoterápiás droggal való kezelés ténylegesen növeli a DNS uraciltartalmát. Az 5FdUR kezelt mintákból szándékosan kevesebb mennyiséget vittem fel a plate-re, hogy a mérés ne menjen telítésbe. A dUR kezelés láthatóan nem igazán hatásos, mivel a mindkét szerrel kezelt (+dUR, +5FdUR) minták jelerőssége nem sokkal nagyobb, mint a csupán 5FdUR-nel kezelt minták jelerőssége. Azonban látható a különbség az ung- és az XL1 Blue sejtek DNS-e közt, tehát kijelenthetjük, hogy az UNG deficiencia *E. coli* baktériumokban detektálható uracilszint-növekedést idéz elő. Az eredmények kvantifikálásához szükséges diagramot a **25. ábra** mutatja.



25. ábra

A standard sorok mért RFU értékeinek átlaga, a lyukakban található uracil mennyiségének függvényében

A standard sorok uraciltartalma és a mért RFU értékek átlaga közötti összefüggés az ábrán látható.

6.4.1 A mérési eredmények kiértékelése

A mérés kiértékeléséhez Microsoft Excel programban végeztem el a szükséges számításokat. Az azonos tömegnél mért RFU értékeket átlagoltam a standard sorok esetében. A lyukakban megtalálható DNS tömegét és az irodalomban közölt uracilmennyiséget (6580 db/millió bázis *E. coli* dut-, ung- DNS-ben) felhasználva, függvényt képeztem a lyukakban található uraciltartalom (db/millió bázis) és a mért RFU értékek közt. Ezt a függvényt ábrázoltam, és egy harmadfokú görbét illesztettem rá, mivel ez volt a legkisebb komplexitású görbe, amely megfelelően illeszkedett a pontokra. A harmadfokú görbe egyenlete segítségével kiszámoltam az ismeretlen mintákat tartalmazó lyukak uraciltartalmát (db/millió bázis). A kapott értékekből átlagot vontam, illetve kiszámoltam a standard hibát. A számított értékeket a **4. táblázat** tartalmazza.

DNS-minta	Ung-, +dUR, +5FdUR	Ung-, + 5FdUR	Ung-, +dUR	Ung-	XL1 Blue
Uracil mennyisége (db/millió bázis)	385 ± 52	318 ± 53	171 ± 23	128 ± 11	88 ± 10

4. táblázat

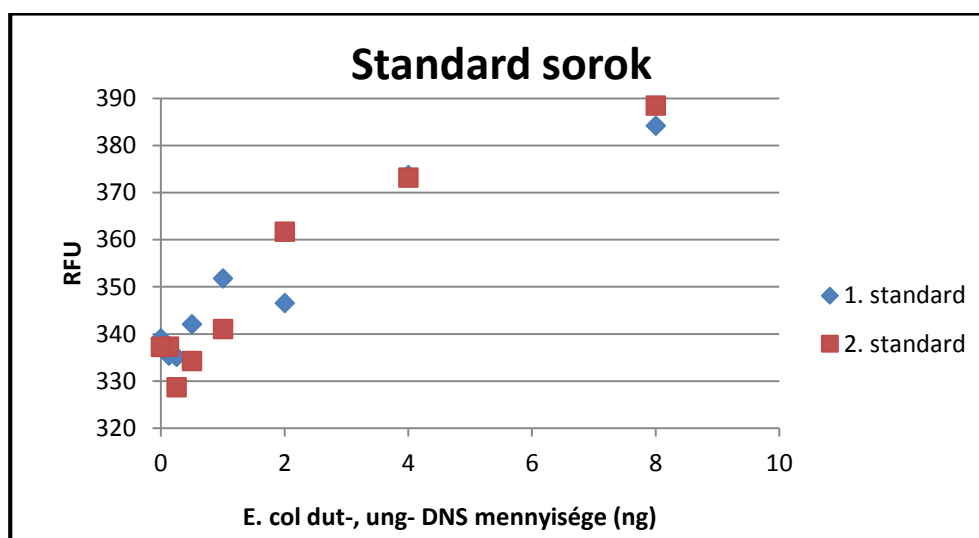
Kezelt és kezeletlen *E. coli* sejtek DNS-ének uraciltartalma

Az *E. coli* sejtek uraciltartalmát a QuantaRed szubsztrát fluorimetrikus detektálásával határoztam meg.

Látható, hogy az 5FdUR-kezelés jelentősen megnöveli a DNS uraciltartalmát. A dUR-kezelés is növeli a genom uraciltartalmát, ahogyan az látható a dUR-kezelt és kezeletlen ung- minták közti különbségen. Azonban ennek mértéke jóval kisebb, mint 5FdUR esetén, amely egyértelműen látszik, ha összehasonlítjuk az Ung-, + 5FdUR sejtek (318 ± 53 uracil/millió bázis) és Ung-, +dUR sejtek (171 ± 23 uracil/millió bázis) számított uracil mennyiségét. Az UNG-deficiencia kimutatható uracilszint-növekedést okoz *E. coli* sejtekben, mivel az XL1 Blue minták uraciltartalma az Ung- mintáknál mértnél alacsonyabb. Ezen eredmények jól összehasonlíthatóak az irodalomban közölt adatokkal, a qPCR (kvantitatív PCR) módszerrel mért értékek: BL21 (DE3) ung- sejtek: 537 ± 37 uracil/millió bázis; $30,7 \mu\text{M}$ 5FdUR-nel kezelt ung- sejtek: 653 ± 55 uracil/millió bázis. A különbség oka lehet, hogy a qPCR mérés helyspecifikus, azaz a genom csupán egy kis részletében méri az uracilszintet, és a mért értékből következtet a teljes genom uraciltartalmára. A legfrissebb kutatási eredmények azonban azt mutatják, hogy a genomi uracileloszlás nem egyenletes, a replikációs origók környékén jóval alacsonyabb az uracilszint. Az ELISA mérés a teljes genomot vizsgálja, így az eloszlás egyenlőtlenségéből származó hibával nincs terhelve.

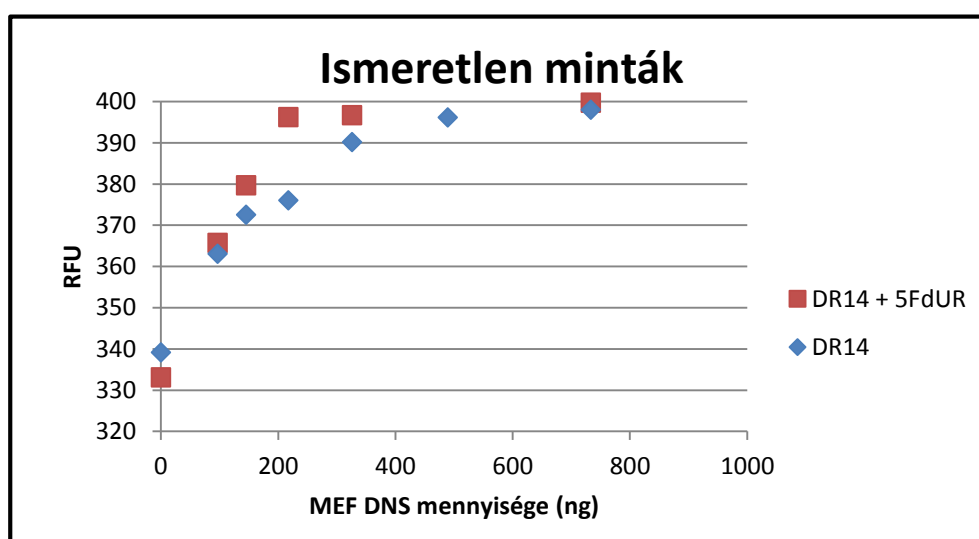
6.5 Kezelt és kezeletlen MEF DNS-minták uraciltartalmának meghatározása

Az ELISA módszert teszteltem egér embrionális fibroblaszt sejtek DNS-én is. Vizsgálataimhoz 5FdUR-nel kezelt, és kezeletlen MEF (DR14) sejtekből izolált DNS-t használtam, a standard sorokat továbbra is *E. coli* dut-, ung- sejtek DNS-e alkotta. A mérés előtt nem volt bizonyos, hogy az ELISA módszer képes-e a kezelt és a kezeletlen egérsejtek DNS-ének uracilszintje között különbséget tenni. Ennek oka, hogy az irodalomban eddig csak körülményes módszerekkel tudták kimutatni a kismértékű uracilszint-különbséget ezen minták között. Emellett nem ismertem a mérés lineáris tartományát sem ezen minták esetén, ezért úgy döntöttem, hogy hasonló mennyiségű DNS-t viszek fel a plate-re, mint az ismeretlen *E. coli* minták esetén. A mérés eredménye a **26.**, és **27. ábrákon** látható.



26. ábra

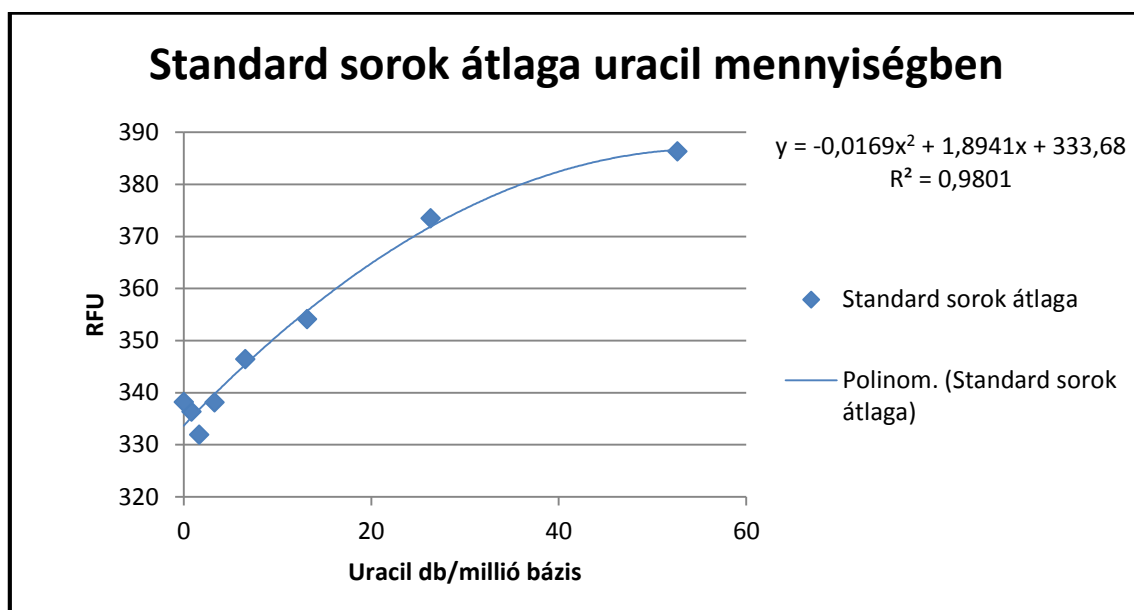
A standard sorok mért RFU értékei az ismeretlen MEF minták kvantifikálásához



27. ábra

Kezelt és kezeletlen MEF sejtek DNS-ének mért RFU értékei

A mérés sikeresnek mondható, hiszen a mérési pontok jól illeszkednek egy görbére, bár a mérés egyértelműen telítésbe ment. Látható, hogy a kezelt és a kezeletlen MEF DNS közt van különbség, tehát ez az egyszerű módszer alkalmas kismértékű uracilszint-növekedés kimutatására is. Az eredmények kvantifikálásához használt görbét a **28. ábra** mutatja.



28. ábra

A standard sorok mért RFU értékeinek átlaga a lyukakban található uracil mennyiségének függvényében

A standard sorok uraciltartalma és a mért RFU értékek átlaga közötti összefüggés az ábrán látható.

6.5.1 A mérési eredmények kiértékelése

Az ismeretlen *E. coli* mintákhoz hasonló módon végeztem a számításokat, ebben az esetben egy másodfokú görbét illesztettem a standard sorok mért RFU értékei és az uracil mennyisége közti függvényre, amelyet a **28. ábra** mutat. A görbe egyenletét felhasználva kiszámoltam az egyes DNS-minták uraciltartalmát (db/millió bázis), illetve a standard hibát. A számított eredményeket az **5. táblázat** mutatja.

DNS-minta	MEF DR14 +5FdUR	MEF DR14
Uracil mennyisége (db/millió bázis)	231 ± 16	174 ± 16

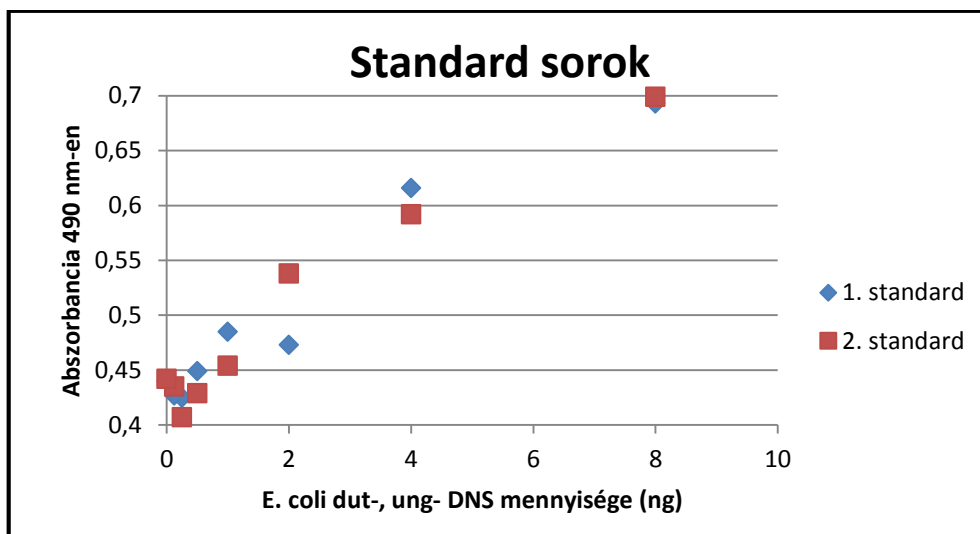
5. táblázat

Kezelt és kezeletlen MEF sejtek DNS-ének uraciltartalma

A MEF sejtek uraciltartalmát a QuantaRed szubsztrát fluorimetrikus detektálásával határoztam meg.

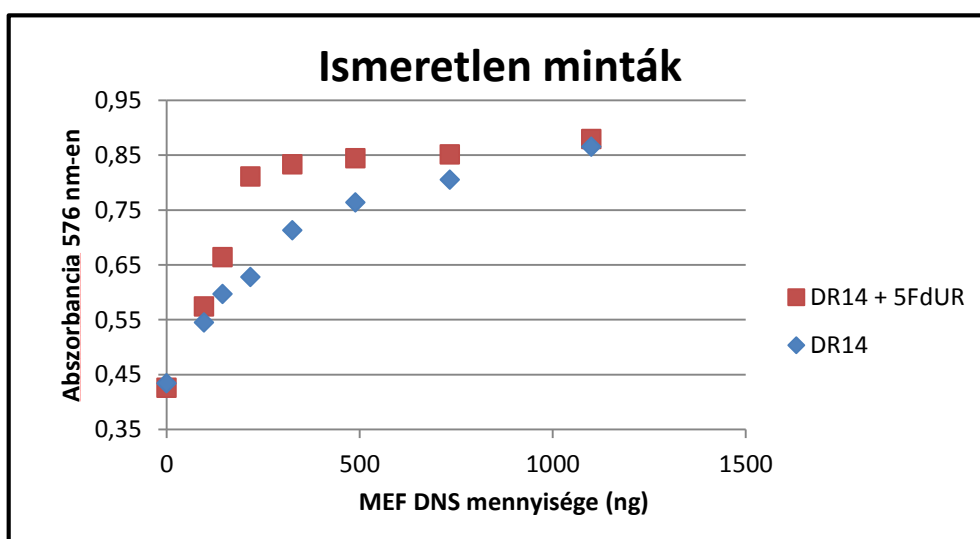
A kezelt és nem kezelt sejtek DNS-e közti különbség tehát számszerűen is kimutatható a módszerrel. Az irodalomban az ELISA-val mért értékeknél valamivel magasabb, de hasonló nagyságrendű uracilkoncentráció található 20 μ M 5FdUR-nel kezelt MEF (DR14) sejtek esetén (429 ± 24 uracil/millió bázis). Az irodalmi adattól való eltérés feltehetően a genomi uracileloszlás egyenlőtlenségéből ered.

Ugyanezen ELISA mérés során kolorimetrikusan is detektáltam a QuantaRed szubsztrátot, hogy ellenőrizzem, a detektálás módszere nem változtat-e a mérés végeredményén. A mérés eredménye és kiértékelése a 29., 30. és 31. ábrákon, valamint a 6. táblázatban látható.



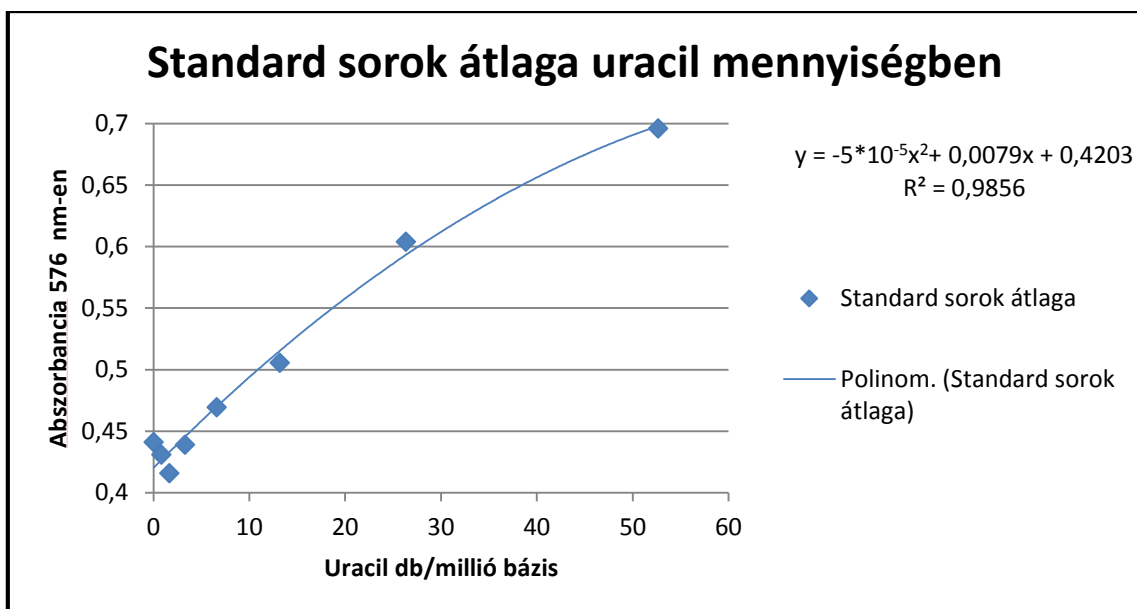
29. ábra

A standard sorok mért abszorbancia értékei az ismeretlen MEF minták kvantifikálásához



30. ábra

Kezelt és kezeletlen MEF sejtek DNS-ének mért RFU értékei



31. ábra

A standard sorok mért abszorbancia értékeinek átlaga a lyukakban található uracil mennyiségének függvényében

A standard sorok uraciltartalma és a mért abszorbancia értékek átlaga közötti összefüggés az ábrán látható.

DNS-minta	MEF DR14 +5FdUR	MEF DR14
Uracil mennyisége (db/millió bázis)	263 ± 27	175 ± 11

6. táblázat

Kezelt és kezeletlen MEF sejtek DNS-ének uraciltartalma

A MEF sejtek uraciltartalmát a QuantaRed szubsztrát kolorimetrikus detektálásával határoztam meg.

Látható, hogy a detektálás megváltoztatása a mérési eredményt nem befolyásolta érdemben. A görbék lefutása azonos, és a számított uracilmennyiségek is egymás hibahatárain belül esnek.

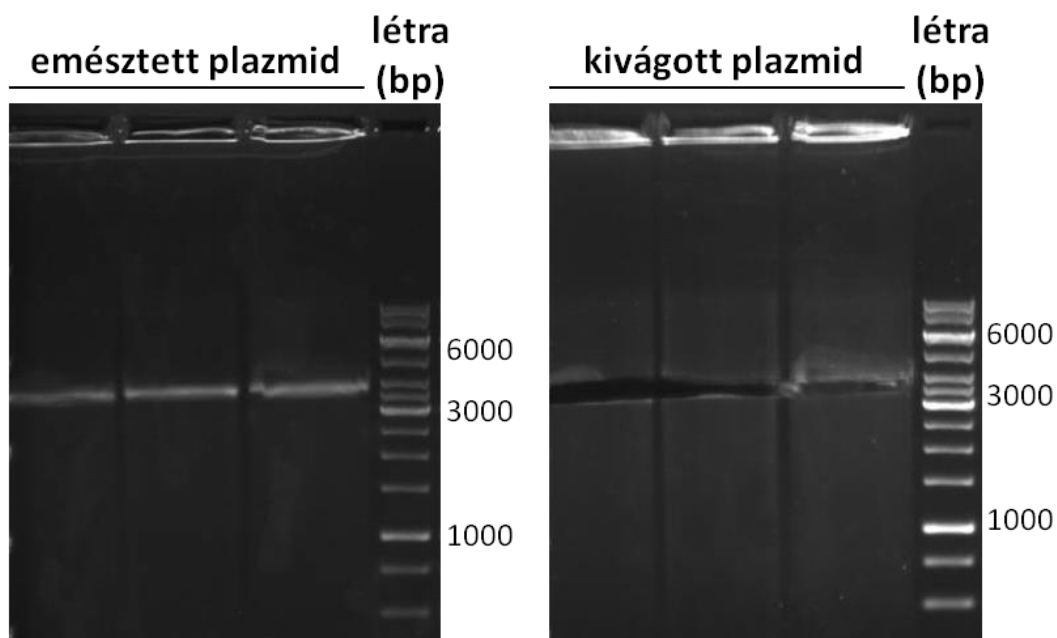
Kijelenthetjük, hogy az ELISA módszer képes volt kvantitatívan kimutatni a kemoterápiás droggal kezelt, és nem kezelt MEF sejtek DNS-ének uraciltartalma közti különbséget. További vizsgálatok szükségesek azonban, hogy a DNS-beli uracilmennyiség tényleges értékét elfogadjassuk, ezért a MEF sejtek DNS-ére alkalmazott ELISA módszer további optimalizálása – például a felvitt DNS mennyiségének beállítása – tervem a közeljövőre.

6.6 A *1xFlag-ΔUNG-DsRed-His* konstruktt létrehozása MEF sejtek *in vivo* vizsgálataihoz

Az *in vivo* vizsgálatokhoz szükségem volt egy olyan katalitikusan inaktív UNG konstruktra, amely detektálható közvetlenül is, nem csupán ellenanyagos jelölés segítségével, hogy a lehető legkisebb háttére legyen a módszernek. Erre a célra hoztam létre a pET-20b expressziós vektorban (3716 bázispár) kódolt ***1xFlag-ΔUNG-DsRed-His*** konstruktot, mely DsRed fúziós fluoreszcens fehérjével van ellátva (1695 bázispár). Ennek fluoreszcenciája közvetlenül is vizsgálható, nem kell feltétlenül antitesthez kötött fluorofórt használni. Így az immunocitokémiai vizsgálataim nem terheltek az aspecifikus ellenanyag jelölésből származó háttérrel. A konstruktt létrehozásához különböző klónozási technikákat használtam fel, az 5.10 pontban leírt módokon.

6.6.1 Az emésztett pET-20b plazmid izolálása agaróz gélből

Az 5.10 pontban leírt restrikciós emésztés után, a pET-20b plazmidot 0,75 vegyesszázalék agarózt tartalmazó gélen futtattam meg izolálás céljából. Az elektroforézis eredményét a **32. ábra** mutatja.



32. ábra

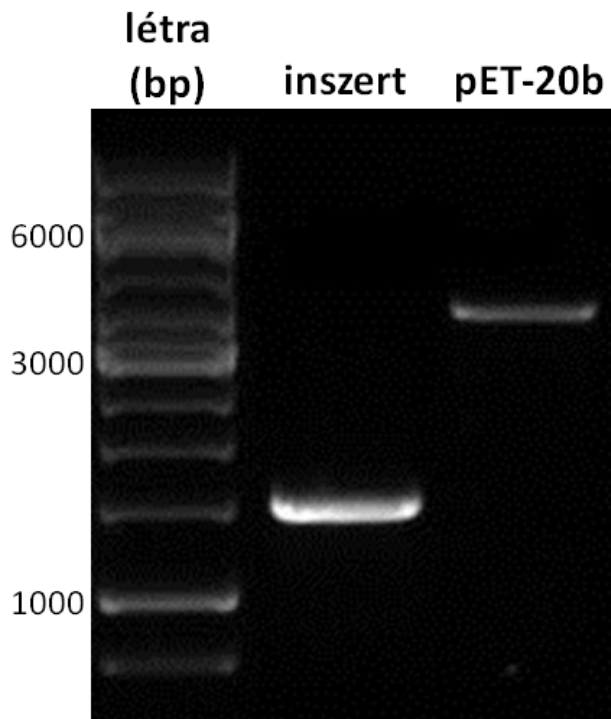
Az emésztett plazmid agaróz gélképe

Az emésztett plazmidot agaróz gélen megfuttattam (bal), a zsebek tartalma megegyezik. A plazmidot tartalmazó régiót a gélből kivágtam (jobb), és izoláltam belőle a plazmidot.

Az első gélképen látható három azonos magasságban futó csík az emésztett, lineáris plazmid. A sorok közt nincs különbség, csupán azért választottam szét több részre a plazmidot, mert egy zsebbe nem fért volna el a mennyisége. A restrikciós emésztés sikeres volt, mivel az emésztett, és ezáltal linearizált plazmid a várt magasságban futott. A második képen látható, hogy a plazmidot tartalmazó gélrészleteket kivágtam. Ezeket utána Gel Extraction Kit-tel (Qiagen) tisztítottam meg a gyártói protokoll szerint. A negyedik sor mindkét képen DNS-létrát tartalmaz.

6.6.2 A ligálandó DNS-ek intaktságának ellenőrzése

Az 5.10 pontban leírt ligálás előtt agaróz gélen ellenőriztem a ligálandó DNS-ek intaktságát, illetve szennyezőmentességét, hogy a ligálást követően létrejöhessen a pET-20b expressziós vektorban kódolt **1xFlag-ΔUNG-DsRed-His** konstrukt. Az elektroforézis eredménye a **33. ábrán** látható.



33. ábra

A ligálás előtti minták agaróz gélképe

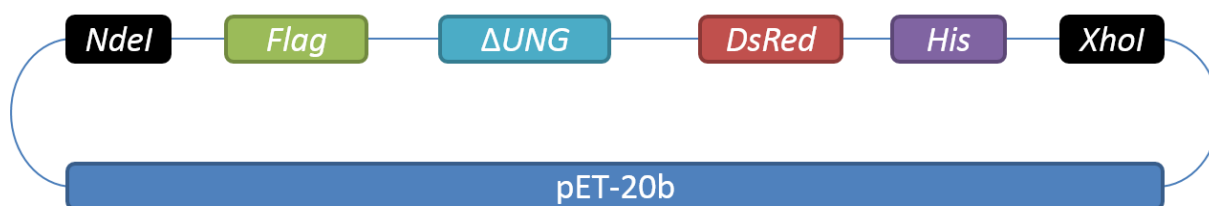
A képen az emésztett inszert és az ugyanazon restrikciós enzimekkel emésztett plazmid látható. Az első sor DNS-létra.

Az inszert, és az ugyanazon restrikciós enzimekkel emésztett pET-20b vektor látható módon intakt, szennyezés nem figyelhető meg a gélképen, ezért a ligálás megkezdhető. Az első sor egy DNS-létrát tartalmaz.

6.7 Plazmiddal transzfektált MEF sejtek *in vivo* vizsgálata

Az 5.11 pontban leírt módszer szerint készítettem el az uracildúsított, valamint uracilmentes plazmiddal transzfektált MEF sejteket. A felhasznált **1xFlag- Δ UNG-DsRed-His** konstruktnak köszönhetően két különböző módon is detektálni lehet az uracilos plazmidot: a Flag epitóp tag ellenanyagos jelölésével, melynél jelerősítő funkciója van a fluorofór konjugált antitestnek, illetve a DsRed fluorofór közvetlen gerjesztésével, amellyel ki lehet szűrni az aspecifikus antitest-kikötődésből származó háttérrel.

A mérés során három különböző negatív kontrollt használtam. A sejtek egy részét nem transzfektáltam plazmiddal, hogy az egész festési eljárás háttérét teszteljem. Az uracilmentes plazmiddal (timines plazmid) transzfektált sejteket arra használtam fel, hogy ellenőrizsem az UNG aspecifikus DNS-kötő képessége nem generál-e jelet. Illetve készítettem olyan uracilos plazmiddal transzfektált sejteket, melyeknél a rekombináns UNG fehérje oldatához UGI fehérje oldatát adtam (uracilos plazmid + UGI). Mivel az UGI specifikusan gátolja az UNG-ot, ezért az nem tud kikötődni, azonban elképzelhető, hogy a konstruktnak egy másik részletén keresztül is képes aspecifikus kikötődésre, amelynek jele látható lesz a képeken. A detektálás alapja, hogy a tranziens transzfekció során keletkező műtermékek – amelyekben sok transzfektált plazmid található közel egymáshoz – által generált jel már elég intenzív, hogy látható legyen a mikroszkópos felvételen. Az *in vivo* vizsgálatokhoz létrehozott konstruktot a **34. ábra** mutatja.

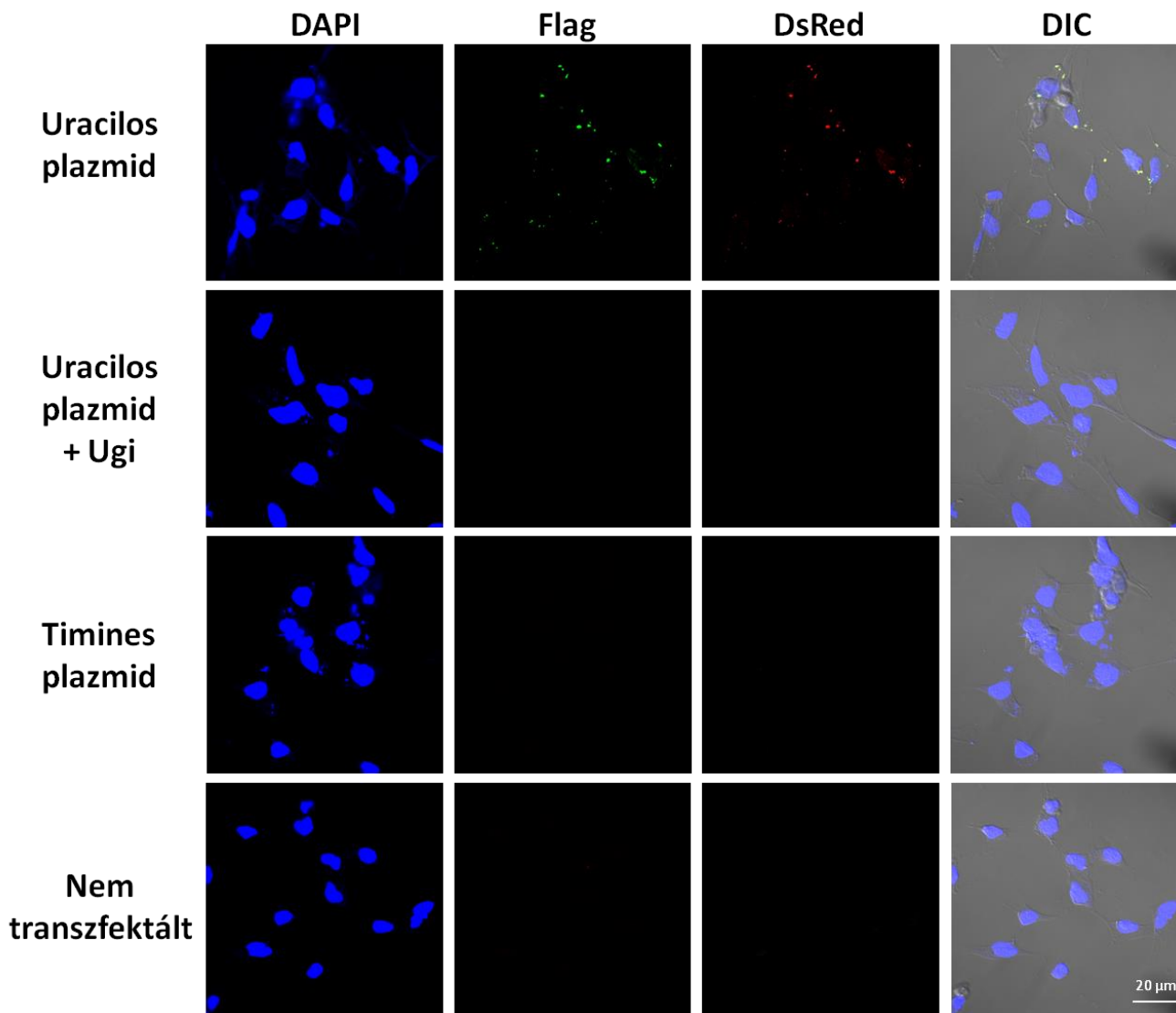


34. ábra

A pET-20b vektorban kódolt immunocitokémiai festésekhez használt konstruktnak

Különböző klónozási technikák segítségével létrehoztam egy olyan pET-20b expressziós vektort, amely tartalmazza **1xFlag- Δ UNG-DsRed-His** konstruktot kódoló DNS-t. A konstruktnak detektálható közvetlenül a DsRed fúziós fehérje gerjesztésével, illetve közvetve a Flag epitóp tag ellenanyagos jelölésével.

A **35. ábrán** látható konfokális mikroszkóppal készített képeken egyszerre több MEF sejt látható különböző kondíciók közt. A sejteket uracildúsított plazmiddal transzfektáltam. Megfigyelhetjük, hogy a Flag-taghez kötődő Alexa 488 (ábrán Flag), illetve a DsRed fluorofórok jele átfedi egymást, tehát a rekombináns fehérje funkcionált. Ezen jelek nem megfigyelhetők a sejtmagban, ami gyakorlatilag a DAPI festésen látható nagy jel, viszont átfedésben vannak a DAPI képen látható gyengébb jelekkel, amelyek magas plazmid-tartalmú aggregátumok.



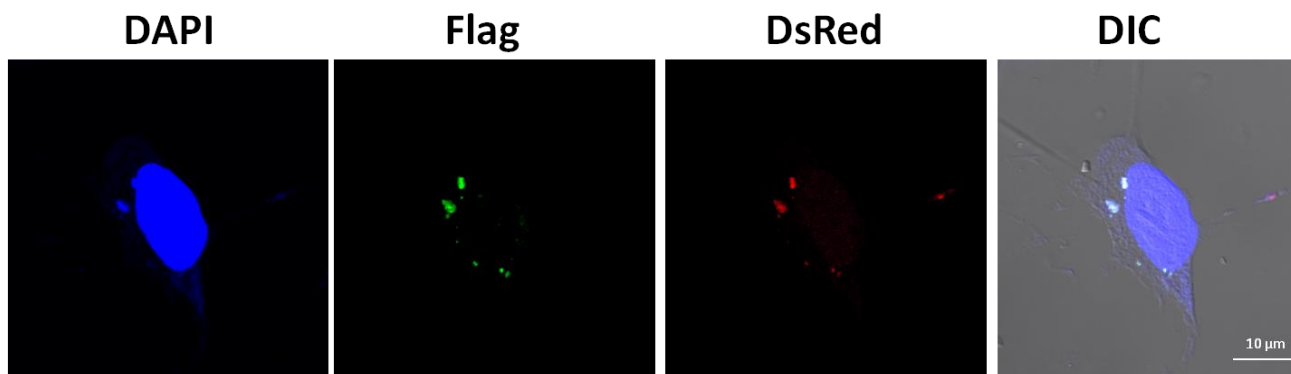
35. ábra

MEF sejtek *in vivo* vizsgálata immunocitokémiai módszerekkel

Az első sorban uracilos plazmiddal transzfektált sejtek láthatóak. A második sorban olyan uracilos plazmiddal transzfektált sejtek láthatóak, melyekhez UGI fehérje oldatát is adtam. A harmadik sorban normális plazmiddal (timines plazmid) transzfektáltam a sejteket. A negyedik sorban nem transzfektált sejtek láthatóak. A DAPI a sejtek DNS-ét, a Flag, és a DsRed a konstruktból származó jelet jeleníti meg. A negyedik oszlopban differenciális interferencia kontraszt (DIC) mikroszkópiával készült képek láthatóak. A jobb alsó sarokban látható a képek léptéke.

Jól látható, hogy a festés specifikus volt, mivel semmilyen háttér nem fedezhető fel sem az Alexa 488 fluorofórt, sem pedig a DsRed-et gerjesztve, a negatív kontrollok esetében. Tehát, a konstrukt nem kötődik aspecifikusan a DNS-hez, sem az UNG-on, sem más részletén keresztül. Továbbá a Flag-tag ellenanyagos jelölése is specifikus volt, mivel az Alexa 488 jel minden esetben átfed a DsRed jellel.

A **36. ábrán** bemutatott képeken ugyanazon MEF sejt látható nagyobb nagyításban.



36. ábra
MEF sejtek vizsgálata immunocitokémiai módszerekkel

Az ábrán látható konfokális mikroszkóppal készített képek ugyanazon MEF sejtet mutatják. A sejt uracilos plazmiddal lett transzfektálva, melyek aggregátumai láthatóak a Flag és DsRed képeken. A Flag és DsRed jelek átfedik egymást, jelentős háttér nem megfigyelhető. A jobb alsó sarokban látható a képek léptéke.

Jól látható a nagyobb nagyítás mellett is, hogy a Flag-tag antigén-antitest-reakciójából és a DsRed fluorofórból származó jelek átfedik egymást, jelentős háttér nem figyelhető meg. A látható jelek a transzfektált uracilos plazmidból képződött aggregátumokból származnak, az egyedi molekulákból származó jel nem detektálható.

Megállapítható, hogy az általam tervezett és létrehozott **1xFlag-ΔUNG-DsRed-His** konstruktt segítségével sikerült specifikusan jelölni uracildúsított plazmiddal transzfektált MEF sejteket *in vivo*. A módszer érzékenyítése, illetve a sejtek genomi DNS-ének jelölése tervem a közeljövőre.

7. Összefoglalás

Kutatómunkám során célom volt egy új, ELISA módszeren alapuló, kvantitatív, DNS-beli uracilkimutatási eljárás kidolgozása és optimalizálása. A módszerrel különböző organizmusokból származó DNS-mintákban mérhető a genomi uracil mennyisége. Az eljárás során egy olyan kettős pontmutációt hordozó (D154N, H277N), ezért katalitikusan inaktív UNG enzimet használtam, amely specifikusan kötődik az uracilhoz a DNS-ben. A felhasznált enzim ezenfelül tartalmaz Flag epitóp taget az antitesttel való érzékeny detektáláshoz, valamint His-taget a fehérje affinitás kromatográfiás tisztítása érdekében. Az ELISA módszerem antigén-antitest-reakciókon alapul, amelynek végeredményét a minta abszorbanciájának vagy fluoreszcenciájának mérésével kaptam.

A módszer létrehozása, optimalizálása és alkalmazása sikeres volt, méréseim végeredménye jól összehasonlítható az eddig ismert irodalmi adatokkal. Az ELISA alapú módszer több szempontból túlmutat az irodalomban eddig használt uracilmeghatározásra alkalmas technikákon. A qPCR-en alapuló méréssel ellentétben, módszerem eredményét nem befolyásolja a genomi uracil egyenlőtlen eloszlása, illetve a szekvenáláson alapuló mérésekhez képest módszerem anyagköltsége elenyésző. A tömegspektrometrián alapuló módszerek szintúgy költséges berendezéseket igényelnek, melyek nem elérhetőek minden laboratórium számára. Az általam kifejlesztett technikával ellentétben, az imént felsorolt módszereket bizonyos szennyező anyagok, mint egyes detergensok, membránlipidek vagy fehérjék erősen zavarják, valamint a vizsgált DNS mérete is befolyásolja azok használhatóságát. Kijelenthetem tehát, hogy a munkám eredményeként létrehozott ELISA mérés gyors, egyszerű és megbízható eredményt ad több organizmusból izolált DNS-minták esetén.

Tervünk a jövőre a mérés további optimalizálása, és alkalmazása további fajokból származó DNS-mintákra.

Az *in vitro* kvantifikálás mellett célom volt *in vivo* festések segítségével uracilt detektálni. A detektáláshoz ugyanazon kettős pontmutáns UNG fehérje, a Flag epitóp tag és egy fluoreszcens fehérje (DsRed) fúziójából létrehozott konstruktot használtam fel. Az uracil kimutatása, ilyen módon történhet a Flag-tag ellenanyag jelölésével (a jelamplifikáció érdekében), valamint közvetlenül a DsRed fluorofór gerjesztésével (a különösen alacsony háttér érdekében). A konstrukt létrehozásához szükséges tervezést, és a klónozási feladatokat szintén elvégeztem. Vizsgálataim során uracildúsított, illetve normál (timint tartalmazó) plazmidokkal transzfektált egér embrionális fibroblaszt (MEF DR14) sejteket használtam fel. Több különböző negatív kontroll kísérlet segítségével bizonyítottam, hogy a jelölés uracilspecifikus, a látható jelek csupán a bejuttatott uracildúsított plazmidból képződő aggregátumokból származnak.

Tervünk a közeljövőre, hogy az *in vivo* vizsgálatok során használt konstrukt segítségével jelöljünk kemoterápiás droggal kezelt, illetve kezeletlen sejteket, majd ezek fluoreszcenciáját FACS berendezéssel mérjük. Így rövid idő alatt számos sejt fluoreszcenciája meghatározható lenne, amelyből következtethetnénk a sejtek DNS-ének uraciltartalmára.

Az *in vivo* festéseket ezenfelül is több irányban célunk továbbfejleszteni. A fúziós fehérje felhasználásával genomi uracil is jelölhető olyan organizmusok DNS-ében, melyeknél jelentős uracilfelhalmozódás figyelhető meg. Terveink közt szerepel ezért a konstruktot dut-, ung- *E. coli* baktériumokon vizsgálni. A konstrukt továbbfejlesztésével akár a normál genomi DNS uraciltartalmának jelölése is lehetséges. Ezért célunk egy kvantum-dot fuzionált UNG konstrukt létrehozása, mely kellőképpen ellenálló erős lézerrel való gerjesztésnek, és lehetővé teszi egyedi molekulák detektálását is sejtekben. Az így jelölt minták detektálásához szuper-rezolúciós mikroszkópia szükséges, ami akár 20 nm-es optikai felbontást is lehetővé tenne. Ezáltal elsőként tudnánk a genomi uracil eloszlását vizualizálni *in vivo*.

8. Irodalomjegyzék

1. Jeremy M. Berg, J.L.T., Lubert Stryer, *Biochemistry*. 2012.
2. Bruce Alberts, A.J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, *Molecular Biology of the Cell*. 2007.
3. John, A.J.F.G.S.W.S.B.C., *Introduction to Genetic Analysis*. 2012.
4. Klungland, A. and S. Bjelland, *Oxidative damage to purines in DNA: role of mammalian Ogg1*. DNA Repair (Amst), 2007. **6**(4): p. 481-8.
5. Russo, M.T., et al., *Different DNA repair strategies to combat the threat from 8-oxoguanine*. Mutat Res, 2007. **614**(1-2): p. 69-76.
6. Setlow, R.B., *Cyclobutane-type pyrimidine dimers in polynucleotides*. Science, 1966. **153**(3734): p. 379-86.
7. Hiraku, Y. and S. Kawanishi, *Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites*. Cancer Res, 1996. **56**(22): p. 5172-8.
8. Kim, Y.J. and D.M. Wilson, 3rd, *Overview of base excision repair biochemistry*. Curr Mol Pharmacol, 2012. **5**(1): p. 3-13.
9. Lindahl, T., *Instability and decay of the primary structure of DNA*. Nature, 1993. **362**(6422): p. 709-15.
10. Pearl, L.H. and R. Savva, *The problem with pyrimidines*. Nat Struct Biol, 1996. **3**(6): p. 485-7.
11. Krokan, H.E., F. Drablos, and G. Slupphaug, *Uracil in DNA--occurrence, consequences and repair*. Oncogene, 2002. **21**(58): p. 8935-48.
12. Lindahl, T., *DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/aprimidinic sites, and base excision-repair*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1979. **22**: p. 135-92.
13. Krokan, H.E., et al., *Base excision repair of DNA in mammalian cells*. FEBS Lett, 2000. **476**(1-2): p. 73-7.
14. Toth, J., et al., *Kinetic mechanism of human dUTPase, an essential nucleotide pyrophosphatase enzyme*. J Biol Chem, 2007. **282**(46): p. 33572-82.
15. Pecsí, I., et al., *Nucleotide pyrophosphatase employs a P-loop-like motif to enhance catalytic power and NDP/NTP discrimination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(35): p. 14437-42.
16. Barabas, O., et al., *Catalytic mechanism of alpha-phosphate attack in dUTPase is revealed by X-ray crystallographic snapshots of distinct intermediates, 31P-NMR spectroscopy and reaction path modelling*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(22): p. 10542-55.
17. Takacs, E., et al., *Molecular shape and prominent role of beta-strand swapping in organization of dUTPase oligomers*. FEBS Lett, 2009. **583**(5): p. 865-71.
18. 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.
19. Rogstad, D.K., et al., *Endogenous DNA lesions can inhibit the binding of the AP-1 (c-Jun) transcription factor*. Biochemistry, 2002. **41**(25): p. 8093-102.
20. 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.
21. Papamichael, D., *The use of thymidylate synthase inhibitors in the treatment of advanced colorectal cancer: current status*. Oncologist, 1999. **4**(6): p. 478-87.
22. Jackman, A.L. and A.H. Calvert, *Folate-based thymidylate synthase inhibitors as anticancer drugs*. Ann Oncol, 1995. **6**(9): p. 871-81.
23. Kunkel, T.A., K. Bebenek, and J. McClary, *Efficient site-directed mutagenesis using uracil-containing DNA*. Methods Enzymol, 1991. **204**: p. 125-39.
24. Nilsen, H., et al., *Uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication*. Mol Cell, 2000. **5**(6): p. 1059-65.
25. Nilsen, H., et al., *Gene-targeted mice lacking the Ung uracil-DNA glycosylase develop B-cell lymphomas*. Oncogene, 2003. **22**(35): p. 5381-6.

26. Tomita, F., *Changes in DNase activities in Bacillus subtilis infected with bacteriophage PBS 1*. J Virol, 1975. **15**(5): p. 1073-80.
27. Katz, G.E., A.R. Price, and M.J. Pomerantz, *Bacteriophage PBS2-induced inhibition of uracil-containing DNA degradation*. J Virol, 1976. **20**(2): p. 535-8.
28. Kiljunen, S., et al., *Yersiniophage phiR1-37 is a tailed bacteriophage having a 270 kb DNA genome with thymidine replaced by deoxyuridine*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 12): p. 4093-102.
29. Durandy, A., *Activation-induced cytidine deaminase: a dual role in class-switch recombination and somatic hypermutation*. Eur J Immunol, 2003. **33**(8): p. 2069-73.
30. Waters, L.S., et al., *Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance*. Microbiol Mol Biol Rev, 2009. **73**(1): p. 134-54.
31. Kavli, B., et al., *hUNG2 is the major repair enzyme for removal of uracil from U:A matches, U:G mismatches, and U in single-stranded DNA, with hSMUG1 as a broad specificity backup*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39926-36.
32. Otterlei, M., et al., *Post-replicative base excision repair in replication foci*. EMBO J, 1999. **18**(13): p. 3834-44.
33. Krusong, K., et al., *A comparative study of uracil-DNA glycosylases from human and herpes simplex virus type 1*. J Biol Chem, 2006. **281**(8): p. 4983-92.
34. Zharkov, D.O., G.V. Mechetin, and G.A. Nevinsky, *Uracil-DNA glycosylase: Structural, thermodynamic and kinetic aspects of lesion search and recognition*. Mutat Res, 2010. **685**(1-2): p. 11-20.
35. Visnes, T., et al., *Uracil in DNA and its processing by different DNA glycosylases*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009. **364**(1517): p. 563-8.
36. Horvath, A. and B.G. Vertessy, *A one-step method for quantitative determination of uracil in DNA by real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(21): p. e196.
37. Atamna, H., I. Cheung, and B.N. Ames, *A method for detecting abasic sites in living cells: age-dependent changes in base excision repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 686-91.
38. Mashiyama, S.T., et al., *Uracil in DNA, determined by an improved assay, is increased when deoxynucleosides are added to folate-deficient cultured human lymphocytes*. Anal Biochem, 2004. **330**(1): p. 58-69.
39. Chango, A., et al., *Simultaneous determination of genomic DNA methylation and uracil misincorporation*. Med Princ Pract, 2009. **18**(2): p. 81-4.
40. Galashevskaya, A., et al., *A robust, sensitive assay for genomic uracil determination by LC/MS/MS reveals lower levels than previously reported*. DNA Repair (Amst), 2013. **12**(9): p. 699-706.
41. Bryan, D.S., et al., *High resolution mapping of modified DNA nucleobases using excision repair enzymes*. Genome Res, 2014. **24**(9): p. 1534-42.