



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM

Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar

XXXII. OTDK

Kémiai és Vegyipari Szekció

***Staphylococcus aureus* patogenicitási szigeteinek kifejeződését
szabályozó fehérje-DNS és fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálata**



Készítette: Kőhegyi Bianka Kitti
BSc IV. évfolyam, biomérnök szakos hallgató

Témavezető: Dr. Vértessy Beáta
egyetemi tanár

Konzulens: Nyíri Kinga
PhD hallgató

Budapest, 2014.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Vértessy G. Beátának, aki lehetővé tette számomra, hogy a kutatócsoportjában dolgozhassak és hasznos tanácsaival segítette a munkámat.

Köszönöm Nyíri Kingának türelmét és mindenre kiterjedő figyelmét, miközben segítette és irányította munkámat.

Köszönettel tartozom Szabó Judit Eszternek, hogy megtanított az enzimaktivitás mérésre, és annak kiértékelésére.

Szeretném megköszönni Róna Gergőnek, hogy minden felmerülő kérdésemre készségesen válaszolt, és segítséget nyújtott a PCR módszerek használatához.

Végül köszönöm a csoport minden tagjának a sok segítséget, támogatást és a munka közben teremtett jó hangulatot.

Tartalomjegyzék

Bevezetés	1
1 Irodalmi áttekintés.....	3
1.1 A <i>Staphylococcus aureus</i> egészségügyi vonatkozásai	3
1.2 A <i>Staphylococcus aureus</i> patogenicitási szigetek.....	4
1.3 Az Stl és a λ bakteriofág CI fehérjéjének hasonlóságai	5
2 Célkitűzés	9
3 Anyagok és módszerek.....	11
3.1 Fehérjék előkészítése.....	11
3.1.1 PCR alapú klónozás, restrikciós emésztés és ligálás.....	11
3.1.2 Helyspecifikus mutagenézis	12
3.1.3 Plazmidok transzformálása, szaporítása és tisztítása	14
3.1.4 Agaróz gélelektroforézis.....	15
3.1.5 Expresszió	15
3.1.6 Sejtfeltárás	16
3.2 Fehérjevizsgálati módszerek	17
3.2.1 Fehérjék tisztítása.....	17
3.2.1.1 Ioncserés kromatográfia	17
3.2.1.2 Gélszűréses kromatográfia.....	18
3.2.1.3 Affinitás kromatográfia	19
3.2.2 Koncentrációmérés.....	20
3.2.3 Elektroforetikus mobilitás eltolódási vizsgálat (EMSA).....	21
3.2.4 SDS-PAGE	22
3.2.5 Natív PAGE	23
3.2.6 Enzimaktivitás mérés	24
4 Eredményeim és értékelésük	25
4.1 A fehérje domén-szerkezetének feltérképezése	25
4.1.1 Tervezés: a Phyre2 modell.....	25
4.1.2 Az Stl fehérje C-terminális szegmensét kódoló plazmid előállítása	26
4.1.3 Az Stl fehérje C-terminális szegmensének előállítása, tisztítása	28

4.1.4	Az Stl fehérje C-terminális szegmens DNS-kötésének vizsgálata.....	30
4.1.5	dUTPáz előállítása és tisztítása	31
4.1.6	Az Stl fehérje C-terminális szegmens dUTPáz kötésének vizsgálata.....	32
4.2	A DNS kötő domén részletesebb feltérképezésére tett kísérletek.....	35
4.2.1	HTH motívum jóslása.....	35
4.2.2	HTH motívum mutációjának tervezése	36
4.2.3	A HTH mutánst kódoló plazmid előállítása	37
4.2.4	A HTH mutáns előállítása, tisztítása	38
4.2.5	A HTH mutáns fehérje DNS-kötésének vizsgálata.....	39
Összefoglalás.....		41
Irodalomjegyzék		43
Függelék.....		45

Rövidítés jegyzék

APS	ammónium perszulfát
C-terminális	karboxi-terminális
DNáz	Dezoxiribonukleáz
DTT	DL-ditiotreitol
dUDP	dezoxiuridin-difoszfát
dUMP	dezoxiuridin-monofoszfát
dUTP	dezoxiuridin-trifoszfát
dUTPáz	(dezoxiuridin-trifoszfát)-nukleotid hidroláz
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay, elektroforetikus mobilitás eltolódás vizsgálat
GST	Glutation S-transzferáz
HEPES	N-(2-hidroxietyl)piperazin-N'-etánszulfonsav
HTH	hélix-turn-hélix
IPTG	izopropil-tiogalaktozid
LB	Luria-Bertrani tápoldat
MGE	mobilis genetikai elem
MRSA	meticillin rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i>
N-terminális	amino-terminális
OD	optikai denzitás
ON	overnight (egész éjszaka)
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PCR	polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
Rnáz	Ribonukleáz
SaPI	<i>Staphylococcus aureus</i> pathogenicity island <i>Staphylococcus aureus</i> patogenicitási sziget
SDS	nátrium (sodium)-dodecil szulfát
TBE	Tris-Bórsav-EDTA
TCEP	Tris-(2-karboxi-etyl)-foszfin
TEMED	NNN'N'-tetra-metil-etylén-diamin
TRIS	trisz-(hidroximetil)-aminometán

Bevezetés

A Genom Metabolizmus kutatócsoport Dr. Vértessy G. Beáta vezetésével évek óta tanulmányozza a genomi uracil előfordulását, és az ezzel kapcsolatos hibajavító mechanizmusokat. Mivel az uracil jelenléte a DNS-ben hibás bázispárosodást eredményezhet (ha a citozin dezaminálásának eredményeként keletkezik), ennek eliminálására többféle mechanizmus is kialakult. Egyrészt egy enzim, az uracil-DNS-glikoziláz kivágja a DNS-ben található uracilt, másrészt a dUTPáz nevű enzim csökkenti a sejtben lévő dUTP arányát azáltal, hogy lebontja a molekulát, így megelőzve annak a DNS-be történő épülését. Mivel a fehérje a genetikai integritás megőrzésében meghatározó szerepet játszik, fontos gyógyászati célpont. 2014-ben került klinikai fázisba egy olyan rákellenes szer, mely a humán dUTPázt gátolja [1]

A közelmúltban felfedezték, hogy bizonyos fág eredetű dUTPázok egy speciális másodlagos funkcióval is rendelkeznek, nevezetesen, hogy a *Staphylococcus aureus* patogenicitási szigeteket (SaPI) szabályozó fehérjével komplexet alkotnak, leszorítva a DNS-ről a SaPI élelciklust szabályozó represszort [2]. Kutatócsoportunk is bekapcsolódott ezen regulációs folyamat tanulmányozásába. Mivel a kialakuló fehérje-fehérje komplexben a dUTPáz fehérje enzimatis funkciója gátolt, részletesen vizsgáltuk az inhibíció enzimkinetikai jellemzőit, valamint az egyik ilyen fág eredetű dUTPáz szerkezetét is publikáltuk [3], [4]. Ezen kutatásokba kapcsolódtam be 2013 júniusában Nyíri Kinga irányítása alatt.

A *S. aureus* patogenicitási szigetek vizsgálata kiemelkedő jelentőséggel bír, hiszen ezen mobilis genetikai elemek különböző antibiotikum rezisztenciáért, illetve virulenciáért felelős géneket hordozhatnak.

Munkám célja az volt, hogy molekuláris szinten megismerjem az egyik ilyen patogenicitási szigetet szabályozó fehérje (Stl_{SaPIbov1}) szerkezetét és funkcióját, gátló hatását a dUTPáz enzim aktivitására. Vajon a fehérje mely részei felelősek a DNS-sel, és melyek az enzimmel való kölcsönhatás kialakításáért? Elkülöníthető-e egyértelműen ez a két domén, anélkül, hogy teljesen elvesztené funkcióját (eredeti szerkezetét)? Mely aminosavak alakítják ki a DNS-kötő motívumot, ezek megváltoztatásával elérhető-e, hogy ezt a

funkcióját teljes mértékben elveszti, míg a másik megmarad? Munkám során ezen kérdéseket igyekeztem megválaszolni.

Ehhez különböző mutációkat terveztünk, majd hoztunk létre az Stl fehérjében, és az előállított mutánsokat számos különböző módszerrel (enzimaktivitás gátlásának mérése, elektroforetikus eltolódási vizsgálat, natív poliakrilamid gélelektroforézis) vizsgáltuk.

1 Irodalmi áttekintés

1.1 A *Staphylococcus aureus* egészségügyi vonatkozásai

A *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus* nemzetségbe tartozó opportunistá patogén Gram-pozitív baktérium [5], [6]. Gyakran a normál flóránk egyik alkotója, rendszerint az orr nyálkahártyáján képez telepeket, ez hozzávetőlegesen az emberek 30%-ára jellemző. Ezen kívül előfordulhat a bőrünkön, és egyéb nyálkahártyákon [7], [8].

Mindazonáltal a *S. aureus* kiemelkedő figyelmet igénylő kórokozó. Az általa okozott betegségek súlyossága széles skálát ölel fel, az enyhe lefolyású bőrbetegségektől az életveszélyes fertőzésekig [9]. Ez utóbbiak közé tartozik például a szívbelhártya gyulladása, az agyhártyagyulladás, a vérmérgezés; illetve a toxinok okozta megbetegedések: a toxikus sokk szindróma (TSST = toxikus sokk szindróma toxin), vagy a szövetelhalással járó tüdőgyulladás (PVL = Panton-Valentine leukocidin) [7].

Ezen túlmenően komoly problémát jelent a baktérium gyors alkalmazkodóképessége. A tiszta penicillin előállítását követően (1940) pár évvel később már izoláltak penicillináz enzimmel rendelkező rezisztens törzset. 1961-ben már azonosítottak meticillin rezisztens *S. aureus* (MRSA) törzseket, melyek ellenállóak az összes β -laktám típusú antibiotikummal szemben. Kezdetben az MRSA törzseket kizárólag nosocomiális kórokozóként tartották számon (HA-MRSA = hospital-acquired MRSA), ám az 1990-es években elterjedt egy másik típusuk, mely az egészséges, főleg fiatal egyéneket is megtámadja (CA-MRSA = community-acquired MRSA) [7], [9].

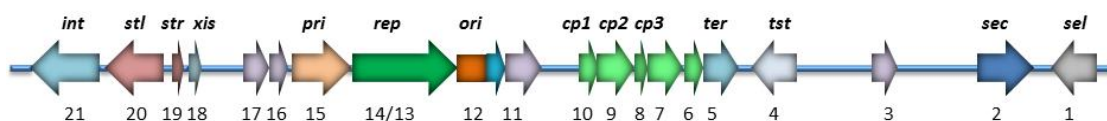
További gondot jelent, hogy több állat is hordozhat meticillin rezisztens *S. aureus*-t. Előfordulhat a haszonállatokban (ló, szarvasmarha, disznó, baromfi), de a házi kedvencek is hordozhatják [10]. Ez nemcsak gazdasági problémát jelent, de lehetséges fertőzésforrás is, igaz, ez igen ritka [9].

1.2 A *Staphylococcus aureus* patogenicitási szigetek

A baktériumok világában az új, kedvező tulajdonságok kialakítását, megszerzését külső információ felvétele, illetve mutáció teszi lehetővé, utóbbi azonban funkcióvesztéssel is járhat, ami gyakran nem előnyös. Ennek köszönhetően evolúciójukban jelentős szerep jutott a horizontális géntranszfernek: genomjuk körülbelül 20 százaléka másik organizmustól származik. Ennek nagyjából a felét a mobilis genetikai elemek (MGE-k) teszik ki [2]. Ezek többségében antibiotikum rezisztenciát, virulencia faktorokat, szuperantigéneket, metabolikus funkciót kódoló és a környezethez való alkalmazkodásért felelős géneket tartalmaznak, melyek megismerésében jelentős szerepet játszott a *Staphylococcus aureus* patogenicitási szigetek (*Staphylococcus aureus* pathogenicity island – SaPI) kutatása [2],[11].

A SaPI-k életciklust szabályozó, konzervált szakaszai nagyon hasonlóak bizonyos fág génekhez. Például a SaPI 5'-végén található gén homológ a fágok *int* (integrált kódoló) génjével, ezt követi két fontos transzkripciót szabályozó promóter: az *stl* (left, bal oldalon), illetve *str* (right, jobb oldalon), melyek a *cI* és *cro* génekhez hasonlóak. Az *str*-től 3'-irányban található a *xis* gén, ami a kivágódásért felelős enzimet kódolja (1. ábra). Emellett a SaPI-k olyan géneket hordozhatnak, melyek például a toxikus sokk szindróma toxint vagy a *Staphylococcus enterotoxin B*-t kódolják. Előfordulnak természetesen olyanok is, melyek nem hordoznak szuperantigén géneket [2].

SaPIbov1



1. ábra: A SaPI-k konzervált génjeinek elhelyezkedése a SaPIbov1 példáján

Forrás: [2], [11] alapján saját készítés

A *Staphylococcus* genom hat különböző régiót is tartalmaz, mely képes a SaPI befogadására (*attC*), így egy baktérium akár több SaPI-t is tartalmazhat egyszerre. Ahhoz, hogy a SaPI integrálódni tudjon a genomba, rendelkeznie kell *attS* inzerációs szekvenciával, ami megfelel az *attP*, bakteriofág inzerációs régiójának; illetve működő *int* génnel [2],[11].

A már integrálódott SaPI a profágokhoz hasonlóan stabilan helyezkedik el a baktérium genomjában: nem vágódik ki és nem replikálódik. Ezért az Stl fehérje a felelős, amely represszorként az *stl* és *str* promóterek között helyezkedik el, és a tőle 3'-irányba eső gének, többek közt a *xis* gén expresszióját gátolja. A tőle 5'-irányba eső *int* ugyan átíródik, de sokkal kisebb mértékben, mint az *stl*, és mivel DNS kivágódás a Xis fehérje hiányában nem történik, funkcióját sem látja el [2], [12]. A SaPI-k kivágódását a temperált fágokkal ellentétben elsősorban nem az SOS válasz váltja ki, hanem a helper fágok általi fertőzés. Ilyenek például a $\Phi 11$ és a 80α bakteriofágok. Az *stl* génszakasz deléciójakor (SaPI_{bov1} Δstl) az Stl expressziója nélkül nincsenek gátolva az *str*, *xis* és *rep* gének, a SaPI-k spontán kivágódnak, replikálódnak. Ennek következtében elmondható, hogy a helper fágok az Stl általi represszió feloldásáért felelősek [11]. Tehát az Stl repressziójának megszűnése után a *xis* és *int* gének kifejeződnek, és a keletkező géntermékek lehetővé teszik a SaPI kivágódását. Ezután a kivágódott duplaszálú DNS szakasz megsokszorozódik és fág kapszid fehérjékbe csomagolódik, így lehetővé válik számára, hogy más baktériumba átkerüljön [13]. A fent leírt jelenséget, melyben egy mozgó genetikai elem fágok fehérjéit használja fel terjedéséhez, azaz egy élősködőn élősködik, a szakirodalomban molekuláris kalózkodásnak is nevezik (molecular piracy) [14].

Közvetett módon az SOS-válasz is kiválthatja a SaPI kivágódását a gazda genomjából. Például ha a baktérium genomjában profágként jelenlévő $\Phi 11$ bakteriofág a baktérium SOS szignáljának hatására átlép a lizogén állapotból a lítikus ciklusba. Az ekkor termelődő fágfehérjék kölcsönhatásba lépve az Stl-lel, feloldják a SaPI génszakasz represszióját, ezáltal elindul a fent említett kivágódási és csomagolási folyamat [15].

1.3 Az Stl és a λ bakteriofág CI fehérjéjének hasonlóságai

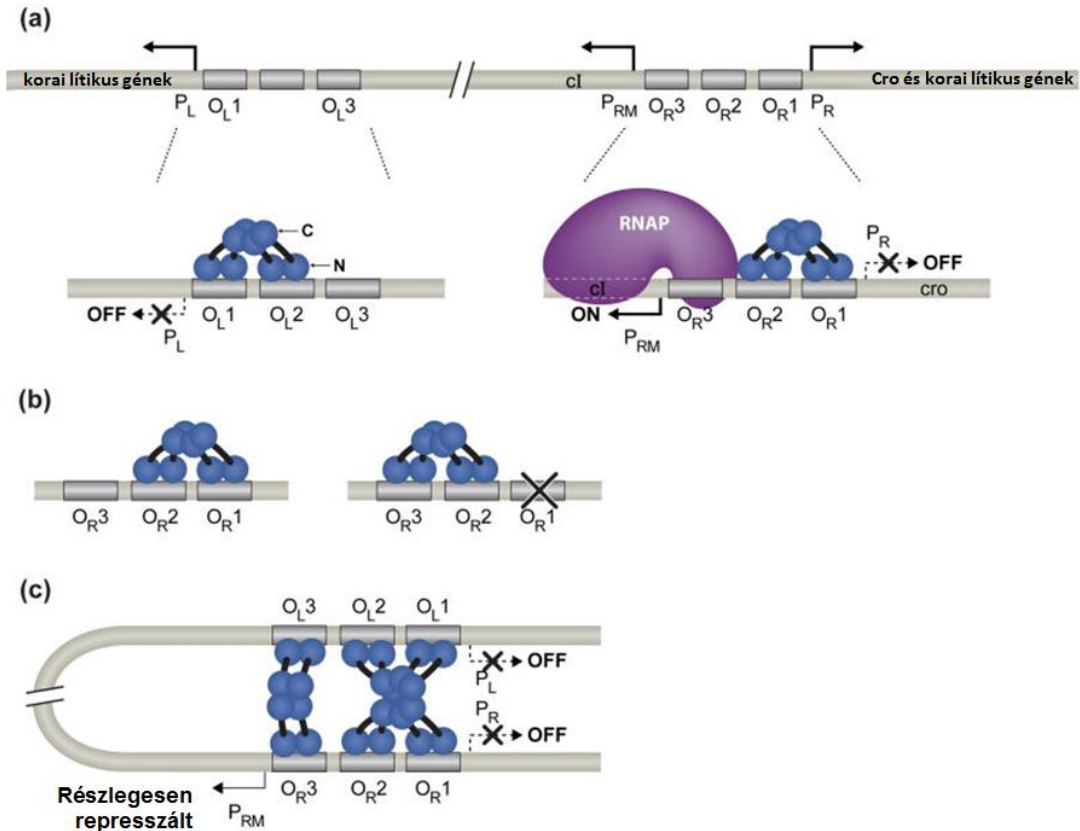
Mivel a SaPI-k hasonlóan viselkednek, mint a temperált fágok, elképzelhető, hogy az Stl fehérje esetleg bizonyos hasonlóságokat mutat a λ bakteriofág CI fehérjével [11]. A CI egy gyakran előforduló, jól ismert represszor a temperált fágok körében, mely a lizogén ciklusban tartja a vírust, amíg a körülmények nem teszik szükségessé a lítikus ciklusba való átlépést.

Az alábbiakban bemutatom a CI fehérje szerkezeti doménjeinek szerepét és a represszió mechanizmusának modelljét, mely támpontként szolgálhat az StI fehérje megismeréséhez.

Az *Escherichia coli*-t megtámadó lambda fág CI fehérje az egyik elsőként izolált transzkripciós represszor, így általános mintaként szolgált a génregulációs mechanizmusok megismeréséhez.

A lambda fág genomja mindkét szabályozó (O_L és O_R) régióban három-három, azaz összesen hat operátor szakasszal rendelkezik, melyekhez a CI fehérje kötődni képes. Az O_L régióban az O_{L1} , O_{L2} , O_{L3} operátorok és egy promóter, a P_L található, mely a korai lítikus gének átírását szabályozza. Az O_R szakaszon az O_{R1} , O_{R2} , O_{R3} operátorok találhatók, melyeket közrefog két promóter: a P_R és P_{RM} , előbbi a P_L -hez hasonlóan a korai lítikus géneket, utóbbi pedig a *cI* gént regulálja. A represszor fehérje dimerként kötődik a DNS szakaszokhoz, és ezek a dimerek is képesek egymással kölcsönhatásba lépni, és tetramert alkotva együttesen kötődni a szomszédos helyekre a két szabályozó régióban. A CI affinitása különböző az egyes operátorokhoz, a legnagyobb az O_{R1} -hez és O_{L1} -hez. Az O_{R1} -hez kötött dimer segíti, stabilizálja a második dimer kötését az O_{R2} -höz, hasonlóképpen az O_{L1} és O_{L2} operátorok esetében (kooperatív kötés). Ezzel gátolja a P_L és P_R lítikus gének átíródását; illetve az O_{R2} -höz kötött dimer aktiválja a transzkripciót a P_{RM} -ről (2. ábra, a).

Kimutatták, hogy egyszerre csak kettő szomszédosan kötődő dimer képes kapcsolódni, egy O_{R1} , O_{R2} , O_{R3} operátorokat tartalmazó DNS szakaszon. Emellett igazolták, hogy a fehérje csak akkor kötődik O_{R3} -hoz (melyhez legkisebb a kötődési affinitása) ha DNS- mutáció létrehozásával az O_{R1} -hez való kötési affinitást csökkentik, ekkor a CI dimer pár az O_{R2} -höz és O_{R3} -hoz köt (2. ábra, b). Azonban a fág genomban kialakulhat egy úgynevezett hajtúszerű struktúra, amikor az O_{R1} -hez és O_{R2} -höz kötött CI dimer pár kölcsönhatásba lép az O_{L1} -hez és O_{L2} -höz kötött dimer párral, ezzel egy oktamer komplexet alkotva (2. ábra, c). Ebben az esetben az O_{L3} és O_{R3} operátorok közel kerülnek egymáshoz, ez pedig egy harmadik dimer pár DNS-hez való kötését teszi lehetővé. Ez utóbbi oligomer kialakulásához tehát szükséges a hajtúszerű komplex, illetve a CI fehérje magas koncentrációja. A CI dimer hozzákötődése az O_{R3} -hoz gátolja a transzkripciót a P_{RM} promóterről, melynek következtében a *cI* gén terméke nem keletkezik. Ilyen módon valósul meg a represszor negatív autoregulációja [16], [17] (2. ábra, c).



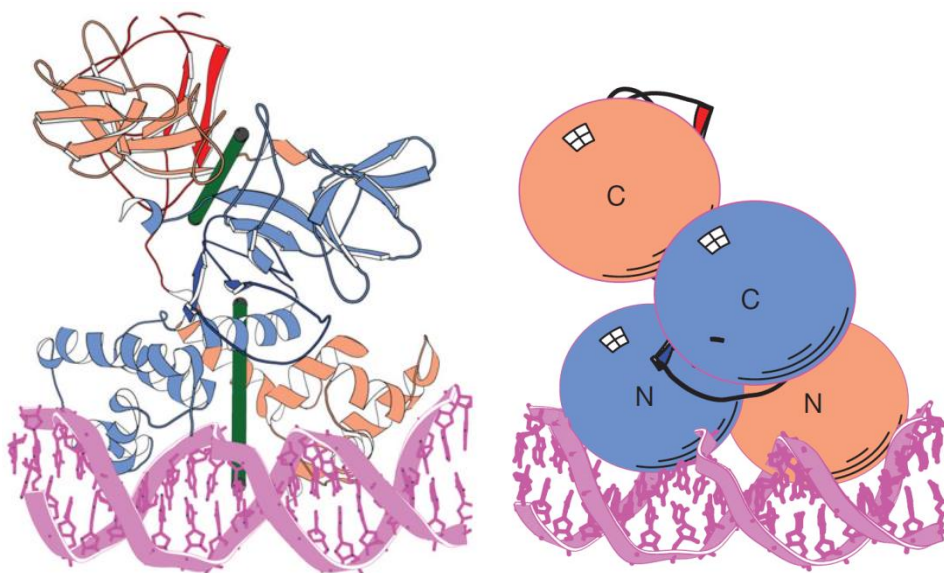
2. ábra: A lambda CI represszor működése
Forrás: [16]

A fehérjék oligomerizációs állapota és a szabályozás mechanizmusa mellett egy másik lényeges kérdés, hogy a regulátor fehérje mely része(i) vesznek részt a DNS-sel való kölcsönhatásban és melyek a fehérje-kötésben.

A CI fehérje két jól elkülöníthető doménnel rendelkezik. A túlnyomó részt α -helikális N-terminális domén (1-92 aminosav) tartalmazza a hélix-turn-hélix motívumot, ami a DNS-kötésben vesz részt, illetve egy kis része az RNS-sel is kölcsönhatásba léphet, így aktiválva a transzkripciót [18]. A C-terminális doménje (132-236 aminosav) β -redőket tartalmaz, a fehérje ezen része a dimer kialakításáért, és a magasabb rendű dimer-dimer kölcsönhatásokért felelős. A két domént egy proteáz szenzitív összekötő szakasz kapcsolja össze (93-101 aminosav) [16], [18], [19]. Stresszhelyzetben a baktérium egyik aktivált fehérjéje, a RecA* szintén a C-terminális doménhez köt, és ezzel aktiválja a CI önhasító, autoproteolitikus reakcióját. Az önhasító reakció aktív helye a C-terminális felszínén helyezkedik el, ahol két, a hasítás szempontjából kulcsszerepet játszó aminosav található: a

Ser149 és Lys192. A hasítás az Ala111 és a Gly112 között történik, ezt követően a széthasadt fehérje két doménje szeparálódik egymástól [18].

A CI dimer a kristályszerkezete alapján (PDB ID: 3BDN) két szimmetriatengellyel rendelkezik, melyek közel merőlegesek egymásra. Az egyik a C-terminális doménéknél található, a másik pedig a két N-terminális domén között (3. ábra) [16].



3. ábra: A lambda represszor szimmetriája

Forrás: [16], [18]

2 Célkitűzés

A *Staphylococcus aureus* komoly egészségügyi problémát jelent társadalmunk számára, egyrészt gyors alkalmazkodó képessége, másrészt az általa okozott sokszor súlyos betegségek miatt. Az antibiotikumokkal szemben könnyen kialakuló rezisztenciája eddig nem ismert mechanizmusok azonosítását sürgeti, melyek segíthetnek csökkenteni a baktérium fertőzőképességét. Ennek megvalósításához elengedhetetlen a baktérium virulenciát, illetve antibiotikum rezisztenciát hordozható mobilis genetikai elemeinek tanulmányozása, ezek szabályozásának megismerése.

Munkám során az egyik *Staphylococcus aureus* patogenicitási szigetet szabályozó StI fehérje (StI_{SaPIbov1}) szerkezetének vizsgálatát végeztem több egymástól független módszerrel. Célunk volt a fehérje esetleges doménjeinek azonosítása és funkciójuk meghatározása. Fontos volt számunkra, hogy molekuláris szinten is megismerjük a fehérje DNS-kötésért, illetve fehérje-kölcsönhatásért felelős részeit, mely eredmények több területeken is felhasználhatók (dUTPáz gátlása fertőzések, rákos megbetegedések esetén; a *S. aureus* virulenciájának csökkentése).

Ennek érdekében először létrehoztunk egy deléciós mutánst a fehérje egyik szegmensének teljes törlésével. Ezután kisebb szerkezeti változást okozó mutációt tartalmazó fehérjét állítottunk elő, melynek felhasználásával igyekeztünk feltérképezni a fehérje egyes részeinek funkcióit.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Fehérjék előkészítése

3.1.1 PCR alapú klónozás, restrikciós emésztés és ligálás

A fehérje részletet kódoló DNS előállításához a polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction, PCR) nyújtotta lehetőségeket használtuk. A módszer alapelve, hogy a magas hőmérsékleten denaturálódott, egyszálú DNS-hez specifikusan letapadnak az általunk megtervezett primerek, majd hőtűrő DNS-polimeráz (pl. Taq, Phusion) átírja a kívánt nukleinsav részletet.

Ennek megfelelően első lépésben magas hőmérsékleten (92-98°C) denaturáltuk a kettős szálú DNS-t. Ezután lehűtöttük az elegyet olyan hőmérsékletre (anellációs hőmérséklet), amelyen a primerek képesek voltak letapadni az egyszálú DNS-hez (anelláció). Következő lépésben a hőtűrő polimeráz hozzákötött a primerhez, és ettől kezdve átírta a nukleinsavat a 3' irányban. Ekkor még a kívátnál hosszabb nukleinsav keletkezett, de a következő ciklusban az újonnan termelt DNS szálhoz az ellentétes primer (forward-reverse) tapadt le, így a célszekvenciát kaptuk meg, ami az ezt követő ciklusokban megsokszorozódott.

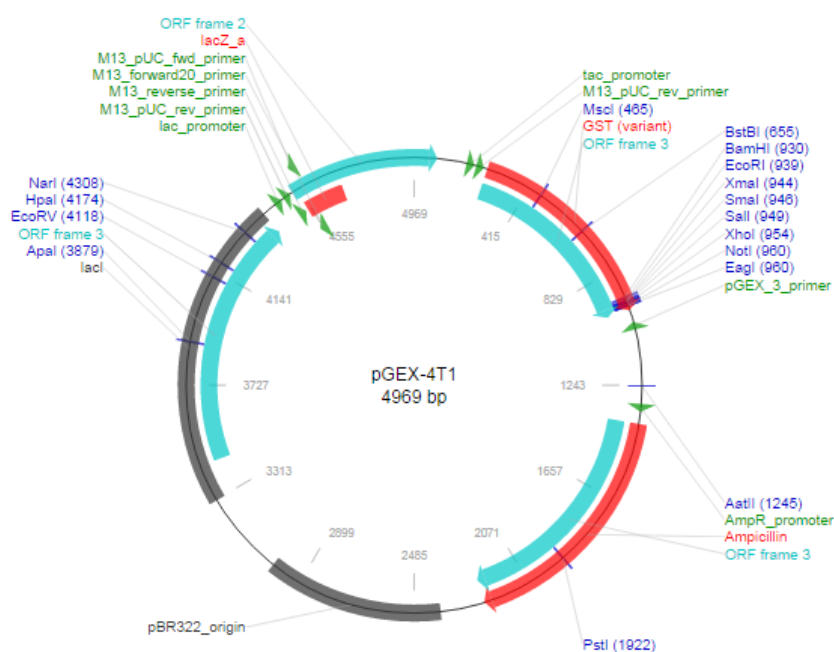
100 μ l (2*50 μ l) reakcióelegy 1 μ l Phusion DNS-polimerázt (végső koncentráció 0,02 U/ μ l), 0,2 μ M forward és reverse primert, 0,2 mM dNTP keveréket és 0,3 ng/ μ l templátot tartalmazott. A klónozáshoz használt primereket és a PCR során alkalmazott hőmérséklet értékeket a 4.1.2. fejezetben foglaltam össze.

Az elkészült nukleinsavat ezután egy hordozó DNS molekulába klónoztuk. Ehhez pGEX-4T-1 vektort alkalmaztunk, ami lehetővé tette az előállítani kívánt fehérje affinitás kromatográfiával való tisztítását (4. ábra). Első lépésben restrikciós endonukleázokkal (EcoRI, XhoI) emésztettük a vektort és a PCR-rel előállított inzertet. Az emésztést 8 órán keresztül 37°C-on 0,4 U/ μ l enzimkoncentráció mellett végeztük. Ezt követően 20 percen keresztül 65°C-on termosztáltuk az elegyet, így inaktiválódtak az enzimek. A restrikciós

termékeket agaróz gélen megfuttattuk, majd izoláltuk a megfelelő DNS-t. Az izoláláshoz a QIAGEN Gel Extraction Kit-et használtuk, követve a hozzá tartozó protokollt¹.

Ezt követően 50 µl elegyhez 1 µl alkalikus foszfatáz enzimet (NEB Antarctic Phosphatase) hozzáadva a vektor 5'-végéről eltávolítottuk a foszfát-csoportot, megelőzve a vektor önzáródását.

Végül a tisztított, ragadós végű inszertet és vektort az inszert ötszörös feleslegében elegyítettük és 5 percig 65°C-on termosztáltuk, majd 2 percig jégen tartottuk. Ezután a T4 DNS-ligáz 16°C-on egy éjszakán keresztül elvégezte a szakaszok összekapcsolását, ligálását. Az így keletkezett plazmidokat transzformáltuk *E. coli* XL1Blue sejtekbe.



4. ábra: A pGEX-4T-1 vektor géntérképe

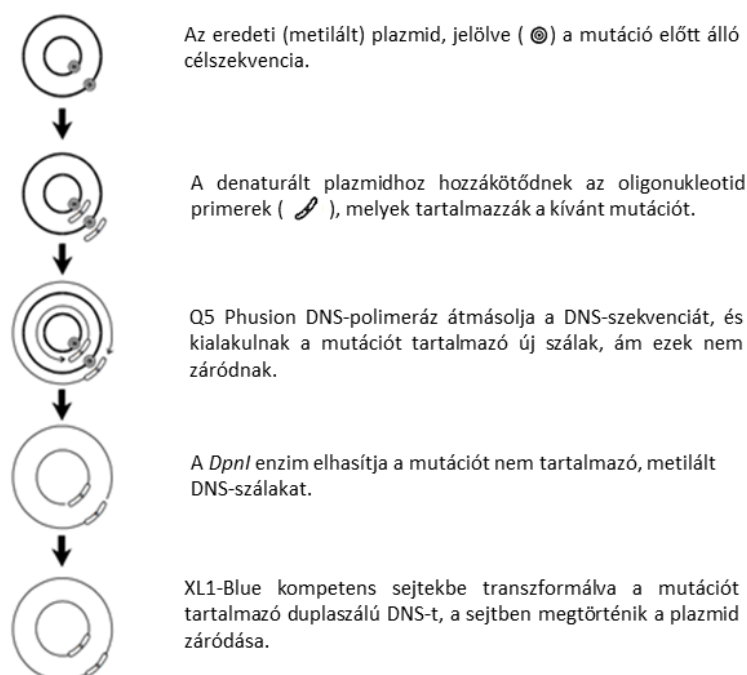
Forrás: <http://www.addgene.org/vector-database/2876/>

3.1.2 Helyspecifikus mutagenézis

Az Stl fehérje funkciójának megismerése érdekében különböző mutánsokat vizsgáltunk, a pontmutációt (bázis triplet-csere) a Stratagene által kifejlesztett QuikChangeTM irányított mutagenézissel hoztuk létre, melynek lépéseit az 5. ábra mutatja.

¹ A részletes protokoll megtalálható a http://sites.bio.indiana.edu/~chenlab/protocol_files/agarose_gel_extraction.pdf honlapon.

Először megterveztük a mutációt hordozó magas olvadáspontú primert (bővebben a 4.2.2. fejezetben látható).



5. ábra: A QuikChange™ mutagenézis lépései

Forrás: http://web.physics.ucsb.edu/~deborah/pro/pro_pdf/Stratagene%20QuikChange.pdf
felhasználásával saját készítés

A mutagenézist konzulensem, Nyíri Kinga végezte el. Ehhez összemérte a PCR-hez szükséges komponenseket: nukleázmentes vizet, a reakcióhoz szükséges puffert, dNTP-t (0,3 mM), forward-, és reverse primereket (0,5-0,5 µM), az eredeti gént tartalmazó plazmidot (80 ng), és Q5 Phusion DNS-polimerázt (1 µl). A PCR reakció egyes lépéseit az 1. táblázat foglalja össze.

Denaturáció	98°C	30 másodperc
	98°C	15 másodperc
Primerek letapadása	*	45 másodperc
Polimerizáció	72°C	4 perc
Hosszabbítás	72°C	10 perc

1. táblázat: A PCR reakció lépései

* Ötféle hőmérséklet, ezek 55°C; 57,8°C; 60,4°C; 62,9°C; 64,9°C. A ciklus harmincszor ismétlődött, majd a folyamat végén megvártuk, míg szoba hőmérsékletre hűl az elegy.

3.1.3 Plazmidok transzformálása, szaporítása és tisztítása

A transzformálás során a kívánt plazmidot juttatjuk előzetesen kompetenssé tett *E. coli* sejtekbe. Ezeket úgy hozhatjuk létre, hogy CaCl_2 -t tartalmazó oldatban inkubáljuk a sejteket, ami segíteni fogja a DNS hozzátapadását a baktérium sejtfalához. Én már a kész kompetens sejteket használtam, melyek hősokk hatására képesek a környezetükben található DNS felvételére. Attól függően, hogy a plazmidot, vagy már a fehérjét akartuk előállíttatni a baktérium sejttel, használtunk XL1 Blue, illetve a BL21 (DE3) Rosetta sejteket.

Bármelyik sejtet választottuk a kettő közül, első lépésként 1 μl 1,4 M-os β -merkaptóetanolt adtam 100 μl sejthez, mely segíti a plazmid felvételét, ezt követően 5 percig jégen tartottam. Második lépésben hozzáadtam a sejtekhez 50-150 ng plazmidot, majd 30 percig jégen álltak. Ezt követte a hősokk: 42°C-on termosztáltam a sejteket 40-50 másodpercig. A sejtek regenerálása érdekében ezt a lépést két perces jégen történő inkubáció követte. Majd 200 μl steril LB-t adtam hozzá, és 1 órán keresztül, 37°C-on rázattam a sejteket. Ezután különbözőképpen jártam el a kétféle sejt esetében.

A plazmid-termelő sejteket (XL1Blue) először töményítettem: 1 percig centrifugáltam, majd a felülúszónak körülbelül a felét (150 μl -t) pipetta használatával leszívtam, s a maradékban a sejteket felszuszpendáltam. Ebből a szuszpenzióból cseppentettem szelekciós antibiotikumot (12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tetraciklin - baktériumszelekció, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ karbenicillin-plazmidszelekció) tartalmazó táptalajra, s ezt szélesztettem. Végül aerob körülmények között, 37°C-on inkubáltam a sejteket, amíg a táptalajon ki nem nőttek a baktériumtelepek (kb. 1 nap).

A kinőtt telepeket steril pipettahegy segítségével átoltottam folyékony, antibiotikumot tartalmazó tápoldatba, majd overnight (egész éjszakán keresztül) növesztettem. A felnőtt sejtekből a plazmidot a Sigma Aldrich GenElute™ Plasmid Miniprep Kit használatával izoláltam, a kit-hez adott protokollt követve². Végül ellenőrzésként, hogy a preparátum valóban a kívánt plazmidot tartalmazta, a minta egy részét elküldtük szekvenáltatni.

A fehérje-termelő sejteket (BL21 (DE3) Rosetta) steril, megfelelő szelekciós antibiotikumot (bővebben lsd. 3.1.5. fejezetben) tartalmazó tápoldatba tettem, majd overnight, 37°C-on rázattam.

² A részletes protokoll megtalálható a www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/pln70bul.pdf oldalon.

3.1.4 Agaróz gélelektroforézis

Mivel a nukleinsavak állandó töltéssel rendelkeznek, elektroforetikus úton előkezelés nélkül elválaszthatók. Az agaróz gél viszonylag nagy pórusmérettel rendelkezik, amin a nagyméretű nukleinsavak is keresztüljuthatnak.

A minták számára ideális töménységű (általában 0,75-1%-os) gél készítéséhez kimértem az agaróz port, majd ezt 25 ml TAE pufferbe tettem, és mikrohullámú sütőben addig melegítettem, amíg a por teljesen feloldódott a pufferben. A 60°C alá hűtött oldatot, 2,5 µl DNS festék (Gel Red) hozzáadása után, egy vízszintes öntő kádba töltöttem (horizontális gélelektroforézis), behelyeztem a fésűt, és a fényérzékeny DNS festék miatt letakarva megvártam, míg megszilárdult a gél. Ezt követően a mintákat a zsebekbe pipettáztam, és a gél 30 percen keresztül 100 V-on futtattam. Végül UV-fényben detektálható volt a kísérlet eredménye.

3.1.5 Expresszió

Expressziós rendszernek az előzőekben említett BL21 (DE3) Rosetta sejteket használtam. A transzformációt követően a sejt-szuszpenziót (kb. 300 µL) 5 mL folyékony, antibiotikumot tartalmazó (34 µg/ml chloramfenikol - baktériumszelekció, 50 µg/ml karbenicillin-plazmidszelekció) tápoldatban overnight növesztettem. Ebből a sejt kultúrából 2,5 ml-t adtam 500 ml steril LB (Luria Bertrani) mediumhoz. Ezután 37°C-on, folyamatos rázatás közben inkubáltam a sejteket, az osztódási folyamatot rendszeresen ellenőriztem. Ezt az oldat optikai denzitásával (OD) lehet jellemezni, amit spektrofotométerrel, 600 nm hullámhosszon mértem, referenciaként steril LB-t használtam. A szuszpenzió megfelelő sűrűségét a vizsgált esetben az $OD_{600}=0,6$ körüli értéke jelentette. A baktérium-szuszpenzió sűrűségét 1,5-2 óra elteltével ellenőriztem először, s a kapott értéknek megfelelően inkubáltam tovább a sejteket, annak tudatában, hogy a Rosetta sejtek generációs ideje az exponenciális növekedési szakaszban körülbelül 20 perc. Miután a sejtenyészlet felnőtt, IPTG-t adtam a szuszpenzióhoz, úgy, hogy a végső koncentrációja 0,5 mM legyen. Ez egy laktóz analóg molekula, mely ebben az expressziós rendszerben indukálja a fehérje termelést. Az IPTG hozzáadása után körülbelül 4 óráig 200 rpm-en rázódtak a sejtek. Ezt követően 25-30 percen keresztül, 4°C-on, 5000 rpm-en centrifugáltam a szuszpenziót, majd a sejtpelletet folyékony nitrogénben lefagyasztottam, és -80°C-on tároltam a további felhasználásáig.

3.1.6 Sejtfeltárás

Első lépésben a frissen készített vagy a felolvasztott sejtpelletet 30 ml lízis pufferben szuszpendáltam³, majd Potter-Elvehjem homogenizátorral mechanikai roncsolásnak is alávettem a sejteket. Ezután folyamatos keverés és hűtés közben az elegyhez hozzáadtam: DNáz illetve RNáz enzimeket (2 µg/ml), EDTA-t nem tartalmazó proteázgátló tablettát (cOmplete ULTRA Tablet), redukálószer (Stl esetében DTT-t (2 mM), míg dUTPáz esetében β-merkaptotetanolt (10 mM)), és az Stl esetében detergensként Triton-X-et, úgy, hogy az oldat végső koncentrációja 1 % legyen.

Az RNáz és DNáz enzimek a nukleinsavak emésztését végzik, melyek működéséhez nélkülözhetetlenek azok a fémionok, melyekkel az EDTA komplexet képezne, emiatt fontos, hogy a proteázgátló tabletta ne tartalmazzon EDTA-t. Az említett tabletta többféle proteázgátló keveréke, így megakadályozza, hogy a sejtfal megbontásával a reguláció alól felszabaduló proteázok lebontsák a számunkra értékes fehérjét. A redukálószer a diszulfid hidakat redukálja, és természetesen védi a fehérjét minden egyéb oxidációtól. Végül a detergens elősegíti a sejtfeltárást, és ezen felül segít oldatban tartani a fehérjét.

A proteázgátló tabletta feloldódását követően (10-15 perc) négyszer 1 percig szonikáltam a szuszpenziót, vagyis ultrahang felhasználásával elősegítettem a sejtek további lízist. Fontos volt, hogy az oldat ne melegedjen fel, mivel az az oldatban még előforduló proteázok aktivitásának növekedéséhez, illetve a fehérje denaturálódásához vezethet; így a mintát jégen tartva, a keletkezett hő eloszlása érdekében a ciklusok között az oldatot megkeverve végeztem ezt a műveletet. Majd az átlátszóvá vált oldatot 4°C-on, 10000 rpm-en centrifugáltam 30 percig, és a felülúszóban található fehérjét kromatográfias módszerekkel tovább tisztítottam.

³ A lízispuffer összetétele a kinyerni kívánt fehérje tulajdonságaitól függően különböző volt az egyes fehérjék esetében.

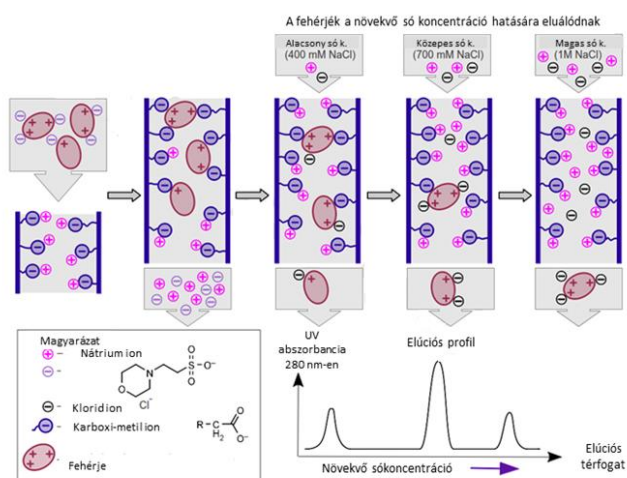
3.2 Fehérjevizsgálati módszerek

3.2.1 Fehérjék tisztítása

3.2.1.1 Ioncserés kromatográfia

A dUTPáz enzimet kromatográfias módszerek egymás utáni alkalmazásával tudtuk nagymértékben megtisztítani (> 90%). Ehhez elsőként ioncserés kromatográfiát használtunk, melyhez 40 mg fehérje megkötésére alkalmas 5 ml-es Q Sepharose oszlopot alkalmaztunk AKTÅ rendszerben.

Ezzel az eljárással nagyon hatékonyan lehet töltéssel rendelkező molekulákat, így a fehérjéket is, elválasztani egymástól. Az oszlop töltete olyan oldhatatlan hordozó, mely felszínéhez töltéssel rendelkező csoportok kovalensen kapcsolódnak. Vizes oldatban ezekhez ellentétes töltésű ionok vándorolnak, melyek reverzibilisen kicserélődhetnek (6. ábra).



6. ábra: Ioncserés kromatográfia

Forrás: <http://www.reachdevices.com/Protein/ProteinPurification.html> alapján saját készítés

Az ioncserés tisztítási folyamat a következő négy lépésre bontható: az oszlop mosása, a minta felvitele, az elúció (esetünkben sógradiens alkalmazása), s végül az oszlop regenerálása. Az első lépésnél az úgynevezett induló pufferrel (ami megegyezett a sejt feltárásakor is használt pufferrel, ebben az esetben az „A puffer”) átmostuk az oszlopot, ekkor a könnyen elmozdítható kloridionok vándoroltak a töltet felszínéhez. Következő lépésben felvittük a mintát az oszlopra, ahol az oldatban található negatív töltésű ionok (így

az értékes fehérje is)⁴ reverzibilisen kötődtek. Ezután az induló pufferrel addig mostuk az oszlopot, amíg minden nem kötődött szennyezőt elimináltunk a rendszerből. Ezt a kromatogramon nyomon követtük, majd amikor az alapvonalat megkaptuk, következett az elúciós lépés, melyhez úgynevezett ionerő gradienst alkalmaztunk. Azaz a rendszerben lévő puffer ionerősségét az induló, A pufferétől (100 mM NaCl) folyamatosan növeltük a végső, B puffer (1000 mM NaCl) ion koncentrációig. Kezdetben a gyengébben kötődő, kis töltésű ionok jelét lehet látni a kromatogramon, majd fokozatosan, az egyre jobban kötődő molekulákét is. Végül a regenerálás során B pufferrel, ezután A pufferrel, desztillált vízzel mostuk az oszlopot, majd 20%-os etanolba átmosva tettük el.

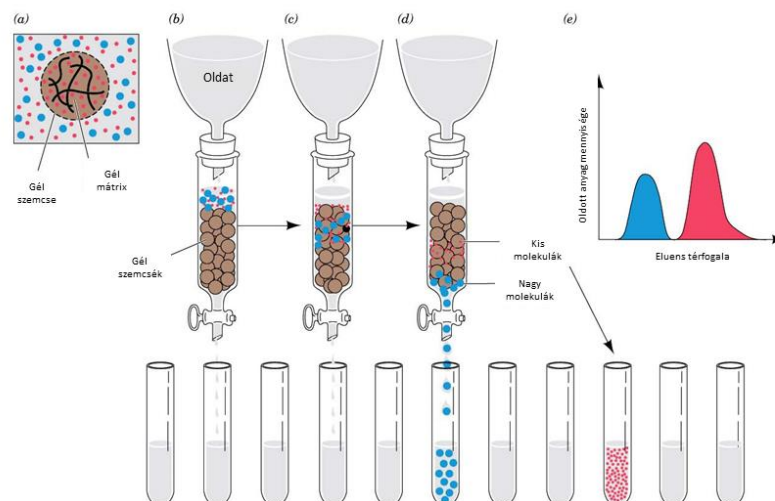
A folyamat nyomon követéséhez és a beállításokhoz az UNICORN 5.11. nevű szoftvert használtuk.

3.2.1.2 Gélszűrési kromatográfia

A gélszűrési, vagy méret szerinti kizárásos kromatográfia (röviden gélszűrés) a nevéből adódóan a molekulák méret szerinti elválasztására alkalmas⁵. A kromatográfiás oszlop töltetét apró meghatározott pórusmérettel rendelkező gélszemcsék alkotják. Ezek belső folyadékterébe a méretüktől függően a molekulák bejuthatnak, több-kevesebb időt töltenek ott és emiatt különböző frakciókba szedhetők. Azok a nagyobb méretű molekulák, melyek nem férnek be a pórusokba gyorsabban végighaladnak az oszlopon és az úgynevezett kizárási térfogatban eluálódnak (7. ábra).

⁴ A pufferek pH-ját úgy állítottuk be, hogy a fehérje negatív töltésű legyen ($\text{pH} \geq \text{pI}+2$).

⁵ Méretük mellett bizonyos esetben a molekulák alakja is szerepet játszhat az elválasztásban. Ezt globuláris fehérjék esetében általában elhanyagoljuk.



7. ábra: Méretkizárásos kromatográfia

Forrás: <http://bricker.tcnj.edu/tech/F06-09.jpg> felhasználásával saját készítés

Ezt a módszert alkalmaztuk az ioncserés kromatográfiával már részben megtisztított dUTPáz enzim preparátum tisztaságának további növelésére. Ehhez az AKTÄ rendszert használtuk, az elúciós puffer 20 mM Hepes-t, 100 mM NaCl-t és 0,5 mM TCEP-t tartalmazó, 7,5-ös pH-jú oldat volt.

Az így kapott nagy tisztaságú fehérje oldatokat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és -80°C-on tároltuk a felhasználásukig.

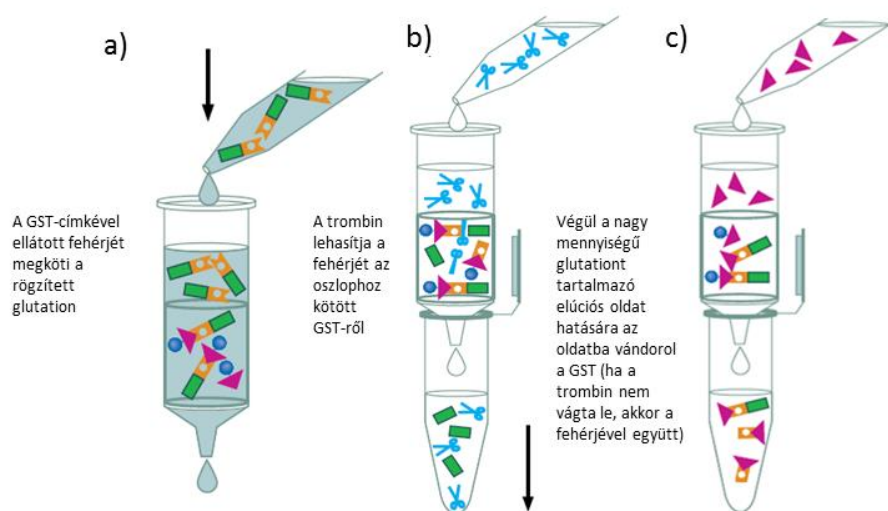
3.2.1.3 Affinitás kromatográfia

Az affinitás kromatográfia a molekulák biológiai funkcióján, vagy szerkezetén alapuló elválasztási módszer, ezért nagy szelektivitást biztosító technika. Az általunk vizsgált Stl fehérje N-terminális láncvége rendelkezett glutation-S-transzferáz (GST) fúziós fehérjével, így nagy tisztaságú fehérjeoldatot kaptunk, amikor olyan oszlopon tisztítottuk, melynek mátrixához glutationt rögzítettek.

Először átmostam az oszlopot azzal a pufferrel, melyben a fehérje feltárását is végeztem, majd 30 percen keresztül a tisztítandó fehérjeoldatot az oszlop töltetével rázattam. Ekkor a glutation és a GST között kialakult kölcsönhatást kihasználva eliminálni tudtam az egyéb szennyezőket az oszlop mosásával. Ezt követően felvittem az oszlopra 3 ml 80 egységnyi (Unit) trombint tartalmazó puffert, és egész éjszakán keresztül (14-16 óra) 18°C-on rázatva inkubáltam ezeket. Ez alatt a trombin lehasította a GST-címkét az Stl fehérje láncvégéről, így másnap már az oldatban volt a számomra érdekes fehérje. Az oldat

össze gyűjtése után még kétszer 2 ml pufferrel mostam az oszlopot, hogy a szemcsék között maradt fehérjét is kioldjam.

Az oszlop regenerálásához kétszer 10 percig forgattam 3-3 ml elúciós oldatban, mely 100 mM redukált glutationt (illetve 50 mM Tris, pH=8,0) tartalmazott, ennek hatására a GST az oldatba vándorolt (8. ábra).



8. ábra: Affinitás kromatográfia, GST-glutation kölcsönhatást kihasználva

Forrás:

<http://www.personal.psu.edu/users/z/c/zcl1/lab/protocols/GST%20Gene%20Fusion%20System.pdf>
felhasználásával saját készítés

3.2.2 Koncentrációmérés

A fehérjék, a DNS és a nukleotidok koncentrációjának méréséhez Nanodrop spektrofotométert (Thermo Scientific Nanodrop 2000 UV-VIS Spectrophotometer) használtam. A fehérjék aromás oldalláncai 280 nm-en, míg a nukleotidok 260 nm-en fényelnyelési maximumot mutatnak, így a Lambert-Beer törvény alapján a fényelnyelés alapján meghatározható ezen vegyületek koncentrációja (1. egyenlet).

$$A = \lg \frac{I}{I_0} = \varepsilon * c * L$$

1. egyenlet

A	abszorbancia
I	áteresztett fény
I_0	beeső fény
ε	extinkciós koefficiens
c	koncentráció
L	a fény úthossza

Az extinkciós koefficienseket az Expasy ProtParam program (<http://web.expasy.org/protparam/>) segítségével határoztam meg. Ez a program a megadott szekvencia alapján meghatároz egy extinkciós koefficiens értéket. Mivel ez egy becsült paraméter, abszolút értékben okozhat eltérést, de a relatív értékek pontosak.

3.2.3 Elektroforetikus mobilitás eltolódási vizsgálat (EMSA)

A fehérje-nukleinsav kölcsönhatást úgynevezett elektroforetikus mobilitás eltolódás vizsgálat (Electrophoretic mobility shift assay = EMSA) azonosítottuk. Az EMSA módszer alapelve, hogy egyenáram hatására a fehérje-DNS komplex lassabban mozog a poliakrilamid gélben, mint a szabad nukleinsav, ami a gél UV-aktív festékkel történő festését követően detektálható. A laborban különböző töménységű géleket használunk (8, 12, 16 %-os), attól függően, hány bázispárból áll a vizsgált DNS.

A mintáknak megfelelő töménységű gélhez a 2. táblázat adatainak megfelelően összemértem a vizet, a TBE puffert, és a 40%-os akrilamidot, majd közvetlenül az öntés előtt tetrametilén-etiléndiamint (TEMED) és frissen készített 10%-os ammónium-perszulfát (APS) oldatot adtam hozzá iniciátorként. Ezt követően Pasteur-pipettával a két üveglap közé öntöttem ezt az oldatot a kisebbik üveglap tetejéig, majd belehelyeztem a fésűt. A megszilárdult gél 1xTBE pufferben 1 óráig 100 V-on előfuttattam.

1xTBE (8%) PA gél		1xTBE (12%) PA gél		1xTBE (16%) PA gél	
ddH ₂ O	5,25 ml	ddH ₂ O	4,5 ml	ddH ₂ O	3,75 ml
10xTBE	0,75 ml	10xTBE	0,75 ml	10xTBE	0,75 ml
40% akrilamid	1,50 ml	40% akrilamid	2,25 ml	40% akrilamid	3,00 ml
10% APS	50 µl	10% APS	50 µl	10% APS	50 µl
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl	TEMED	5 µl

2. táblázat: Az EMSA-hoz szükséges, különböző töménységű 1xTBE poliakrilamid gélek összetétele

500 µl-es eppendorf mikrocövekbe bemértem a puffereket (0 mM és 200 mM NaCl tartalmú 1xTBE pufferekkel beállítjuk a kívánt só-koncentrációt (100-200 mM között)), az EDTA-t (etiléndiamin-tetraacetát), a DNS-t, a fehérjét, majd a Loading Dye-t. Ez utóbbi szükséges ahhoz, hogy a gél futtatása alatt nyomon követhessük a frontvonalat.

Az előfuttatás után Hamilton-fecskendővel beinjektáltam a mintákat a zsebekbe, majd 1 óra 10 percig 150V-on futtattam a gélét. Ezután körülbelül 20 perc alatt desztillált vízben kioldottam a gélből a Loading Dye-t, majd UV-aktív GelRed oldatban áztattam további 20 percig fénytől elzárva, mivel ez a festék fényérzékeny. A DNS festése után Uvi-Tec gélbeolvasó készülék használatával, UV-fényben, nagy expozíciós időt alkalmazva beolvastam a gélét.

3.2.4 SDS-PAGE

A poliakrilamid gélelektroforézis során egyenáram hatására a fehérjék méretüktől, relatív töltésüktől, és alakjuktól függően különböző sebességgel mozognak a gélben. Mivel ezt a sebességet több tényező is befolyásolja, nehéz lenne megmondani, hogy a keresett fehérje megtalálható-e a mintában. Azonban ha denaturálószer alkalmazunk, jelen esetben nátrium-dodecil-szulfátot (sodium dodecyl sulphate = SDS), akkor ez az eljárás alkalmas a fehérjék méret szerinti elválasztására.

Az általam használt a technika a diszkontinuus elektroforetikus módszerek közé tartozik, vagyis kétféle koncentrációjú gél, és három különböző puffer szükséges hozzá, melyek összetételét a Függelékben részletezem. A futtató, vagy elválasztó gél felett helyezkedik el a koncentráló, vagy tömörítő gél, melynek az akrilamid koncentrációja olyan alacsony, hogy az elválasztó hatás nem is érvényesül, a tömörítő gél szerepe a fehérjék viszonylag frontvonalra rendezése.

Első lépésben az EMSA módszernél említetthez hasonlóan elkészítjük a poliakrilamid gél, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben először az elválasztó gél öntjük a két üveglap közé, majd erre izopropanolt rétegzünk azért, hogy egyenletes legyen a gél felszíne. Amikor a gél megszilárdult, szűrőpapírral leitatjuk az alkoholt, majd rárétegezzük a tömörítő gél, és ebbe helyezzük a fésűt, és megvárjuk, hogy megszilárduljon.

A vizsgálathoz szükséges a mintát előkészíteni: 16 µl mintához 4 µl kezelőoldatot (mintakotél) adtam, amely tartalmazott SDS-t, redukálószer, illetve a futási frontot jelző festéket. A negatív töltéssel rendelkező SDS bevonja a fehérjeláncot, ami azt eredményezi, hogy a fehérjék molekulatömegre vonatkoztatott relatív töltése megegyezik; míg a redukálószer a fehérjében található diszulfid-hidakat bontja. Ezután 4 percig 98°C-on termosztáltam a mintákat, így denaturálódtak a fehérjék. Az így kezelt mintákat 200 V-on 35-40 percig futtattam. A molekulatömeg meghatározásához a minták mellett minden géltre különböző molekulatömegű fehérjék keverékét tartalmazó fehérje-létrát (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder) is felvittem.

Végül a frontot jelző festék kiáztatását követően Coomassie Brilliant Blue festékkel tettem láthatóvá a fehérjék helyzetét a gélen.

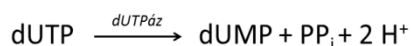
3.2.5 Natív PAGE

A natív poliakrilamid gélelektroforézis elsősorban abban különbözik az előbb említett technikától, hogy sem a gél, sem az úgynevezett mintakotél nem tartalmaz denaturáló ágenst, az eljárás során a fehérjék megtartják eredeti térszerkezetüket. Ezáltal egy megfelelő kötési-erősségű fehérjekomplex az elektroforézis során stabil marad, a fehérjekomponensek együtt mozognak a gélben, így összehasonlítva az egyes komponensekkel, detektálható a komplex létrejötte.

Az elkészített natív gél (összetétele a Függelékben látható) futtatópufferben 1-1,5 órán keresztül 100 V-on, folyamatos hűtés közben előfuttattam. Az előkészített mintákat (20 µl fehérje oldat + 5 µl mintakotél) a denaturáció elkerülése érdekében szintén hűtés közben, 2-2,5 órán keresztül 150 V-on futtattam. Végül a 3.2.4. pontban is említett Coomassie Brilliant Blue festékkel tettem láthatóvá a fehérjéket.

3.2.6 Enzimaktivitás mérés

A dUTPáz által katalizált reakció pH változással jár (2. egyenlet), mely megfelelő indikátor alkalmazásával nyomon követhető. A mérésekhez egy igen kis puffer kapacitású (1mM Hepes tartalmú), fenolvörös sav-bázis indikátort tartalmazó puffert használtam, mely a reakció előrehaladását színváltozással jelezte. A színváltozás, megfelelő hullámhosszon mérve abszorbancia változással jár együtt, melyet UV/VIS spektrofotométerrel (JASCO-V550 spektrofotométer) mértem, az eredményeket a WinASPECT segítségével értékeltem ki.



2. egyenlet

A méréseket 559 nm hullámhosszon, 20°C-on termosztálva végeztem, referenciaként az üres küvétát tekintettem. Mivel vizsgálataim során az enzim gátlására voltam kíváncsi, különböző mennyiségű gátlószert (Stl fehérjét) adtam a reakcióelegyhez. A reakciót gátló fehérje oldatának jelentősebb a puffer kapacitása, mint a mérő puffernek. Ezt a lehetséges hibaforrást megfelelő puffer hozzáadásával küszöböltem ki, gondosan ügyelve arra, hogy a reakcióelegy puffer kapacitása mindig ugyanakkora legyen. A méréseket az enzim szubsztrátja, a dUTP hozzáadásával indítottam. A kezdeti reakciósebességet a kapott görbe alakjától függően a görbe első 10-15%-ára illesztett egyenes meredekségéből határoztam meg a 3. egyenlet alapján.

$$V_0 = \frac{m \cdot [S]}{[E] \cdot \Delta A}, \text{ ahol}$$

3. egyenlet

V_0	a kezdeti sebesség (1/s)
m	a görbére illesztett egyenes meredeksége (1/s)
$[S]$	a szubsztrát (dUTP) koncentrációja (mol/dm^3)
$[E]$	az enzim (dUTPáz) koncentrációja (mol/dm^3)
ΔA	a reakció kezdő-, és végpontja közötti abszorbancia különbség

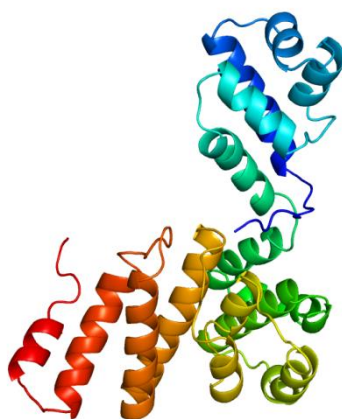
4 Eredményeim és értékelésük

4.1 A fehérje domén-szerkezetének feltérképezése

4.1.1 Tervezés: a Phyre2 modell

Az Stl_{SaPIbov1} fehérje térszerkezete jelenleg nem ismert, de a bioinformatika nyújtotta lehetőségekkel és *in vitro* kísérletekkel körüljárható, hogy a fehérje bizonyos részei mely funkciókért felelősek, illetve egy modell alkotható, mely a pontos szerkezeti ismeretek hiányában támpontul szolgálhat a további kutatásokat illetően.

A fehérje *in silico* térszerkezeti modelljének előállításához a Phyre2 (protein homology/ analogy recognition engine) nevű programot használtam, mely az általam megadott szekvenciát (ez a Függelékben megtekinthető) összehasonlítja ismert szerkezetű fehérjék aminosav sorrendjével és a számomra érdekes fehérjével leginkább hasonló fehérjék szerkezete alapján épít egy 3D-homológia modellt (9. ábra). A program a Structural Classification of Proteins (SCOP) és a Protein Data Bank (PDB) adatbázisokban található fehérjeszerkezeteket használja fel a modellezéshez [20].



9. ábra: A Phyre2 program által készített modell az Stl_{SaPIbov1} fehérjére. PyMol programmal a fehérje N-terminális végétől a C-terminális végéig úgynevezett rainbow (szivárvány) színezés

Emellett a szerkezet felderítéséhez kiindulópontként szolgáltak az Stl-hez feltehetően nagyon hasonló CI fehérjéről meglévő ismereteink is. Ahogy azt az irodalmi összefoglalóban részletesen bemutattam, ennek a represszornak az N-terminális része felelős

a DNS-sel való kölcsönhatásért, míg a C-terminális szegmense a fehérje-kölcsönhatásért. Ez, illetve a Phyre2 modell alapján az Stl két elkülöníthető doménnel rendelkezik (9. ábra).

Ezen eredmények, illetve a 4.2.1. pontban részletesen kifejtett HTH-motívum predikciója alapján a teljes N-terminális domén eltávolítását terveztük, s az így kapott fehérje részlettől azt vártuk, hogy nem alakít ki kölcsönhatást a DNS-sel, viszont a dUTPáz enzimmel igen.

4.1.2 Az Stl fehérje C-terminális szegmensét kódoló plazmid előállítása

Az előzetes modellek alapján a C-terminális fehérje előállításának első lépéseként a Phyre2 modell alapján megterveztük, hogy a fehérje „kettévágása” lehetőleg olyan helyen történjen, ami nem rendelkezik funkcióval. Mivel a mutáns fehérjét klónozással állítottuk elő, ehhez szükséges volt a megfelelő primerek használata.

A primerek tervezésénél figyelembe vettük, hogy az úgynevezett olvadási hőmérsékletük (T_m =melting point) 55-65°C közé essen, de a két primer (*forward*, *reverse*) különbsége ne legyen nagyobb 2°C-nál. Fontos szempont, hogy ne legyenek egymás komplementerei, illetve ne alakuljanak ki bennük másodlagos struktúrák (például hajtókanyar). Ezen kívül a forward primer esetében az 5'-végén, a reverse primer esetében a 3'-végén egy-egy restrikciós endonukleáz hasítóhely került, mely nélkülözhetetlen a vektorba épüléshez. A mutáció létrehozásához használt primereket a 3. táblázat foglalja össze.

<i>forward primer</i>	5'- <u>TATTGAATTC</u> AGCCCGACCCTGAACG-3'
<i>reverse primer</i>	5'-CATCAGAAAAAATTATTCTGGAAAAAGATACCAACTAACTCGAG <u>GACC</u> -3'

3. táblázat: A C-terminális Stl előállításához használt primerek. Az aláhúzott szakaszok a restrikciós endonukleázok hasítóhelyeit jelölik (EcoRI, XhoI)

Ezeket a primereket használva az Stl-t kódoló plazmidról (templát) PCR alkalmazásával (4. táblázat) előállítottuk a kívánt C-terminális szakaszt kódoló nukleinsavat (inszert). Ahhoz, hogy ezt fel tudjuk használni, szükséges, hogy egy vektorba, egy speciális hordozó DNS molekulába kerüljön, mely a fehérje szabályozható kifejeződését is lehetővé teszi. Erre a célra az Stl esetében már jól bevált pGEX-4T-1 vektort (4. ábra) használtuk,

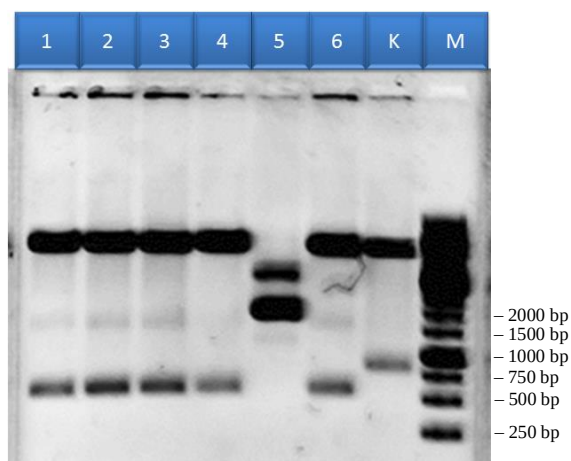
aminek az a különlegessége, hogy a termeltetni kívánt fehérje N-terminális végéhez a glutation-S-transzferáz fehérje fúzionál.

Denaturáció	98°C	30 másodperc
	98°C	10 másodperc
Primerek betapadása (anelláció)	*	20 másodperc
Polimerizáció	72°C	20 másodperc
Hosszabbítás	72°C	2 perc

4. táblázat: A PCR reakció lépései, a ciklus harmincöttször ismétlődött
***Hőmérséklet gradiens alkalmazása**

Mind a vektor, mind az inszert átesett az EcoRI, illetve az XhoI restriktációs endonukleázok általi emésztésen, így kialakultak a ragadós végek, melyekkel később össze tudtak kapcsolódni. Azonban a ligálást megelőzően a vektor 5'-végéről az alkalikus foszfatázzal eltávolítottuk a foszfát-csoportot, megelőzve a vektor önzáródását, így kiküszöbölve egy lehetséges hibaforrást.

Ezt követően *in vitro* a DNS-ligáz összekapcsolta az inszertet és a vektort a megfelelő ragadós végüknél. Az így keletkezett plazmidot *E.coli* XL1Blue sejtekbe transzformáltuk, majd a rekombináns klónokból steril pipettahegy segítségével néhányat LB tápoldatba oltottunk, majd a 3.1.3. pontban ismertetett módon izoláltuk a plazmidokat a sejtéből. Ezeket ismételten EcoRI és XhoI enzimekkel kezeltük, agaróz gélen megfuttattuk ezt a mintát, ellenőrizve, hogy az izolált plazmid valóban tartalmazta az inszertet. Pozitív kontrollként a teljes hosszú StI fehérjét tartalmazó plazmidot használtuk. Ennek eredményét mutatja a 10. ábra, melyen jól látszik, hogy egy kivételével a felvett klónok megfeleltek az elvárásainknak, mivel megjelenik a kontrollnál alacsonyabb tömegnél az inzert DNS sávja.



10. ábra: A rekombináns klónok agaróz gél képe

Magyarázat: 1-6-minták (sejtből izolált plazmidok EcoRI és XhoI enzimekkel történő emésztést követően), K-pozitív kontroll (teljes hosszú Stl fehérjét kódoló plazmid), M-DNS létra

A plazmidot az expressziós rendszerbe történő transzformálása előtt elküldtük szekvenáltatni, így megbizonyosodtunk arról, hogy sikerült létrehozni a kívánt mutációt.

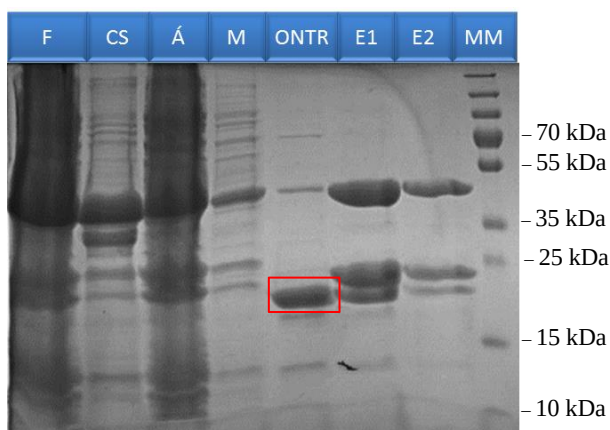
4.1.3 Az Stl fehérje C-terminális szegmensének előállítása, tisztítása

A szekvenálás eredménye után a megfelelő plazmidot BL21 (DE3) Rosetta sejtekbe transzformáltam, majd expresszáltattam a fehérjét. Ezek után a C-terminális Stl-ben gazdag sejteket a 3.1.6. fejezetben leírtak szerint tártam fel. Mivel ez a konstrukt tartalmazott GST-címkét, affinitás kromatográfiával tisztítottam a fehérjét, melyet a 3.2.1.3 pontban részleteztem. A sejtfeltárás és tisztítás során a fontosabb lépéseknél 20 µl mintát vettem, hogy nyomon tudjam követni a fehérje tisztaságát és hozzávetőleges mennyiségét. Elsőként a sejtek centrifugálását követően ellenőriztem, hogy a felülúszóban és a csapadékban megtalálható-e a fehérje⁶. Ezt követően a kromatográfiás oszlopon minden egyes átesett frakcióból mintát vettem. Ideális esetben a trombinos emésztés utáni frakcióban fordult elő a legtöbb, általunk vizsgált fehérje.

Minden mintához adtam SDS-t is tartalmazó kezelőoldatot, majd a 98°C-os termosztálás után poliakrilamid gélen ellenőriztem a mintákat (3.2.4. fejezet). A C-terminális Stl esetében a 11. ábrán látható egy tisztítás eredménye.

⁶ A csapadékot a feltárási pufferben szuszpendáltam.

A képen megfigyelhető, hogy bár tekintélyes mennyiség megtalálható a várt, trombinos emésztés utáni mintában (ON-TR), az emésztés közel sem volt tökéletes, mivel jelentős volt az elúciós oldatokban, illetve az átesőben megjelenő GST-címkével rendelkező Stl mennyisége. Ennek megfelelően kevesebb sejt-csapadék feltárásával, és több trombin használatával hatékonyabb kitermelést érhattünk volna el.



11. ábra: A C-terminális Stl fehérje tisztítását ellenőrző poliakrilamid gél képe
Magyarázat: F-felülúszó, CS-csapadék, Á-áteső (az oszlopról elsőként lekerült frakció),
M-mosó (a trombinos emésztés előtt az oszlop mosása), ONTR-trombinos emésztés utáni
frakció (overnight trombin), E1-első elúció, E2-második elúció, MM-fehérje létra
C-terminális Stl fehérje mérete: 22,8 kDa

Ezután az ON-TR oldatnak, és az oszlop első mosását követő frakciónak Nanodrop spektrofotométerrel megmértem a koncentrációját, kiporcióztam 200-500 µl-es frakciókra, majd lefagyasztottam.

Minden vizsgálathoz szükség volt pozitív kontrollra, azaz a vad típusú Stl fehérjére. Ennek tisztításánál hasonlóképpen jártam el, mint az előbb említett mutáns fehérje esetében. Mivel nagy mennyiségű fehérjére volt szükségem a sokféle kísérlethez, illetve ezek sokszor többszöri megismétléséhez és egy tisztítással körülbelül 3 ml 1-1,5 mg/ml-es fehérjét tudunk kinyerni, több tisztítást is végeztem. Egyik ilyen tisztítás eredményét a 12. ábra szemlélteti.

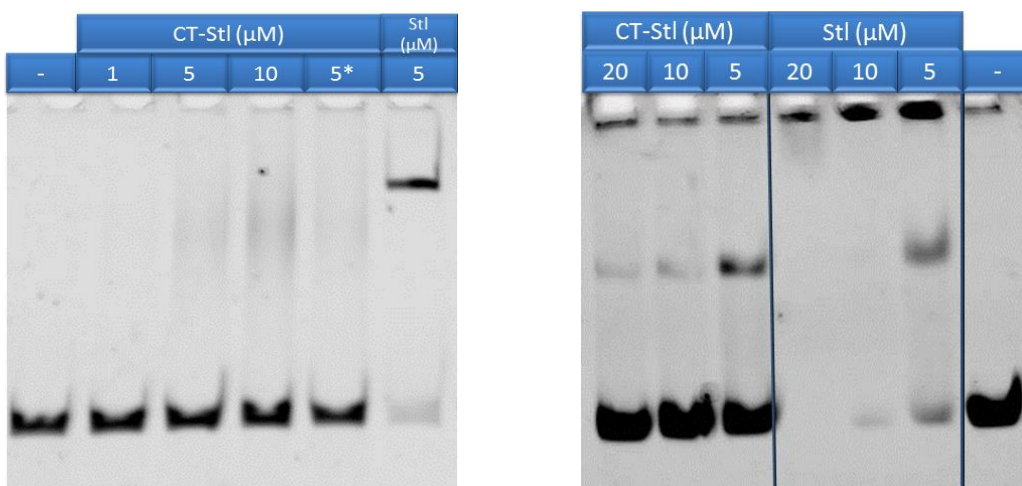


12. ábra: Az Stl tisztításának SDS-PAGE képe

Magyarázat: F-felülúszó, CS-csapadék, Á-átelő, M0-trombinos emésztés előtti mosás az oszlopnak, ONTR-trombinos emésztés utáni átelő, M1-trombinos emésztés utáni első mosás, M2-emésztés utáni második mosás, E1-első elúció, E2-második elúció, MM-fehérje létra
Stl fehérje mérete: 32,8 kDa

4.1.4 Az Stl fehérje C-terminális szegmens DNS-kötésének vizsgálata

Először a tisztított C-terminális domén DNS-kötő képességét vizsgáltam, mivel az előzetes modellek alapján azt vártuk, hogy egyáltalán nem alakul ki kölcsönhatás. Ehhez a 3.2.3. fejezetben ismertetett EMSA módszert használtam. Hígítási sort alkalmaztam mind a mutáns, mint a vad típusú fehérje esetében, a pontos koncentráció értékek a gélekpről leolvashatók. Minden zsebbe 100 ng DNS került.



13. ábra: A C-terminális domén DNS-sel való kölcsönhatásának vizsgálata EMSA módszerrel

Az a) ábrán látható kísérlet konzulensem, Nyíri Kinga munkája

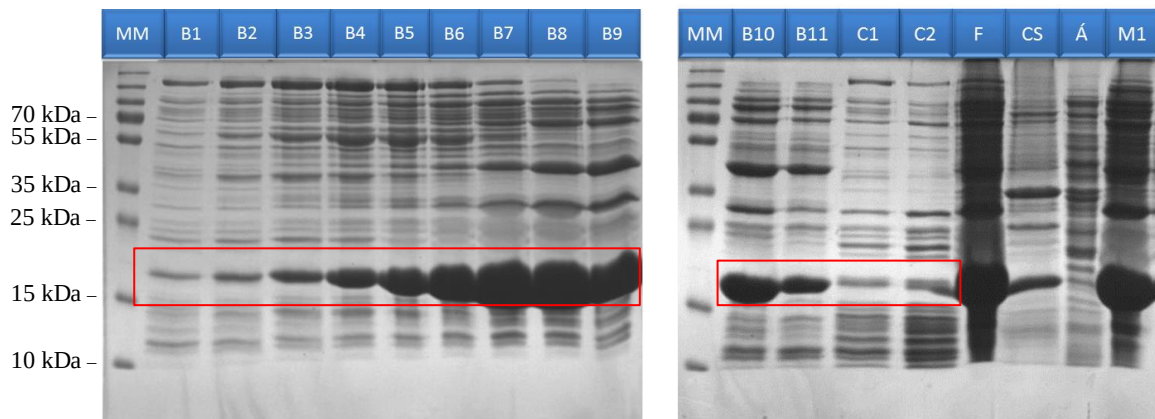
***10 μ M dUTPáz-t is tartalmazott a minta**

Az *Stl* fehérje C-terminális szegmensével végzett kísérletekben a DNS mind kis, mind nagy fehérje koncentrációnál számottevően a szabad DNS-nek megfelelő sávban jelent meg (13. ábra). Ez alapján elmondható, hogy nem a fehérje C-terminális doménje felelős a DNS-kötés kialakításáért, jöllehet, kismértékű, feltehetően aspecifikus kölcsönhatás létrejöhet (13. ábra, b).

4.1.5 dUTPáz előállítása és tisztítása

A hipotézis igazolásához, miszerint a CI represszorhoz hasonlóan az *Stl* esetében is a fehérje C-terminális doménje felelős a fehérjével való kölcsönhatásért, szükségünk volt tiszta dUTPáz-ra is.

Ehhez Zagyva Imre által elkészített, $\Phi 11$ bakteriofág dUTPáz enzimében gazdag sejteket tártam fel, majd az így kinyert fehérjét tisztítottuk. Első lépésként az enzimben gazdag felülúszót anioncserés kromatográfiás oszlopra vittük fel, majd a kromatogramon ígéretesnek tűnő frakciók fehérjetartalmát SDS gélen ellenőriztem (14. ábra). Ez alapján két frakciót (a képen B8, és B9-cel jelzett) méret kizárásos kromatográfiával tovább tisztítottunk, a többit lefagyasztottuk a további felhasználásig.

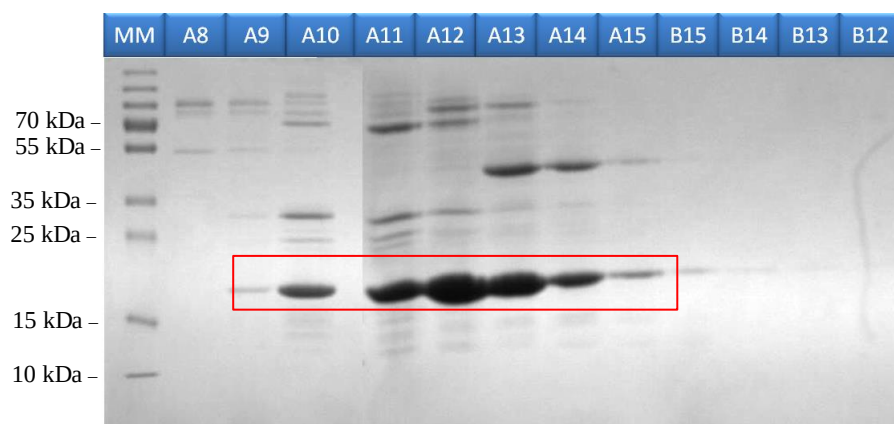


14. ábra: $\Phi 11$ dUTPáz tisztítása ioncserés kromatográfiával

Magyarázat: Az egyes frakciók (B1-C2) nevei megfelelnek a szedő helyzetének a folyamat során, F-felülúszó, CS-csapadék, Á-áteső, M1-mosás (a folyamat végén az oszlop mosása)

$\Phi 11$ dUTPáz fehérje mérete: 19,9 kDa

A méret kizárásos kromatográfiával sikerült tiszta fehérjeoldatokat kapnunk, melyek koncentrációit Nanodrop spektrofotométerrel mértem meg (5. táblázat).



15. ábra: A dUTPáz méret kizárásos kromatográfiás tisztításának eredménye
Az egyes frakciók nevei megfelelnek a szedő helyzetének a folyamat során
Φ11 dUTPáz fehérje mérete: 19,9 kDa

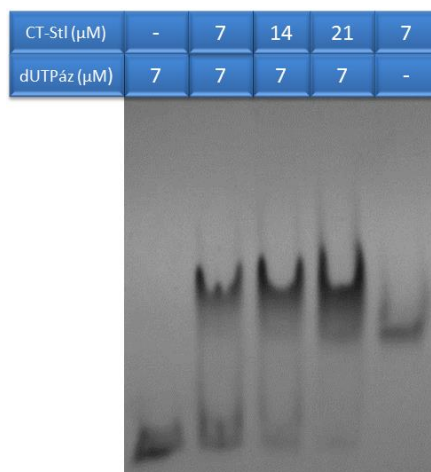
Φ11 dUTPáz gélszűrés frakciók	mért koncentrációk (mg/ml)
A10	0,44
A11	0,83
A12	1,53
A13	1,06
A14	0,38

5. táblázat

A további vizsgálatokat ezekkel az oldatokkal végeztem.

4.1.6 Az Stl fehérje C-terminális szegmens dUTPáz kötésének vizsgálata

Az Stl fehérje C-terminális domén dUTPáz-zal kialakuló kölcsönhatását kétféle módszerrel ellenőriztem. Elsőként natív gélen figyeltem meg, hogy kialakul-e a két fehérje komplexe. Amennyiben kialakul, akkor a gélen csak egy helyen tűnik elő a jel, míg ha nem alakul ki, akkor mindkét fehérjének külön-külön, a nekik megfelelő helyen látható a két folt.



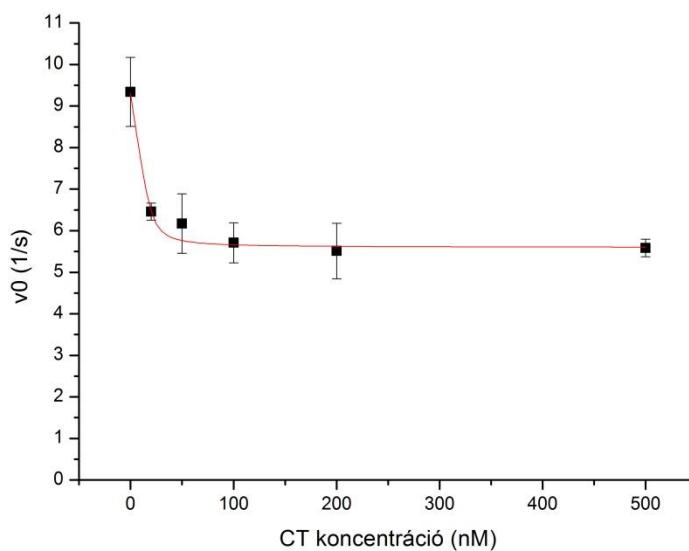
16. ábra: Az Stl fehérje C-terminális szegmens (CT-Stl) és a dUTPáz kapcsolatának vizsgálata natív poliakrilamid gélen

A kísérlet egyértelműen bebizonyította (16. ábra) hogy kialakult a két fehérje komplexe, mivel az enzimnek megfelelő „folt” növekvő C-terminális Stl koncentrációnál eltűnt, illetve a két egyedüli fehérje futási pozíciójához egy új helyen jelent meg a jel, amikor mindkét fehérje jelen volt a mintában.

Ismert, hogy a vad típusú (teljes hosszúságú) Stl gátolja a dUTPáz működését, így a következő lépésben azt vizsgáltam meg, hogy ez igaz-e az általunk tanulmányozott mutáns fehérjére is. Ezt a 3.2.6. pontban ismertetett aktivitásméréssel tettem. Ez a módszer igen kis koncentrációkat igényel, így a fehérjeoldatokat szükséges volt hígítani. Ez a hirtelen változás kedvezőtlenül hatott a fehérjékre, ezért az első méréssorozathoz az eredmények nagymértékben szórtak. A második alkalommal a probléma kiküszöbölésére a mérések előtt 3 percig 4°C -on 6000 rpm-en centrifugáltam az oldatot. A mérés elindítása előtt a fenolvörös puffer pH-ját beállítottam 7,5-re, és megvártam, míg szobahőmérsékletű lesz, mivel ennek elmulasztása ismételtelen a kezdeti mérések nagy szórását eredményezte volna.

Ezután a dUTP kivételével összemértem az adott mérés minden szereplőjét, és az első három alapján megállapítottam az inkubációs időt. Ez egy stabil alapvonal beállítást jelentette, minden alkalommal 5 perc volt. Egy-egy mérés addig tartott, amíg az elegyhez hozzáadva a dUTP-t, az abszorbancia változása megszűnt. Mind az enzim, mind a nukleotid koncentrációja változatlan volt, a gátlószer koncentrációját fokozatosan növeltem, minden inhibitor koncentrációnál három párhuzamos mérést végeztem. A beállításokat és a kapott adatokat a Függelékben foglaltam össze. Az eredmények kiértékelését a már említett

WinASPECT programmal végeztem, míg az ábrázolást, és a görbe illesztést az Origin 8.5 nevű szoftverrel.



17. ábra: A dUTPáz aktivitásának gátlása növekvő C-terminális Stl (CT) koncentráció hatására. A görbét a 4. egyenlet alapján illesztettem

$$y = S + \frac{A * [(c + x + K_d) - \sqrt{(c + x + K_d)^2 - 4 * c * x}]}{2 * c}$$

4. egyenlet

S a gátolatlan enzim kezdeti sebessége

A az amplitúdó

c az enzim koncentráció

K_d a féltelítési állandó

A 17. ábra alapján megfigyelhető a jelentős mértékű gátlás, számszerűen a C-terminális Stl a normál érték 58-60%-ára csökkenti a dUTPáz aktivitását.

Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a fehérje C-terminális doménje részt vesz a fehérjével való kölcsönhatásban, míg a DNS-kötés kialakításában nincs szerepe.

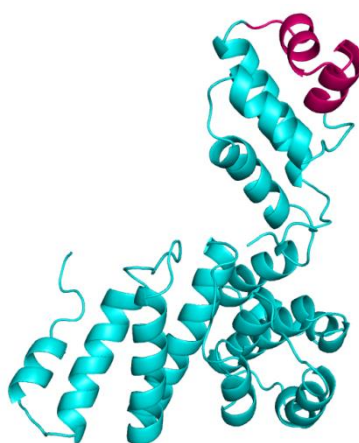
4.2 A DNS kötő domén részletesebb feltérképezésére tett kísérletek

Az előző kísérletekben kiderült, hogy a DNS-kötésért a fehérje N-terminális része lehet a felelős. Ennek feltérképezésére pontmutánsokat terveztünk a predikációs programok által jóslott HTH motívum területén, és azt vártuk, így jelentősen gyengül a fehérje DNS-kötő képessége. Ez, a szerkezet felderítésén túl, különösen nagy jelentőséggel bírna, mivel az így létrehozott Stl mutáns fehérjét felhasználhatnánk dUTPáz enzim gátlására anélkül, hogy attól kellene tartani, hozzáköt a DNS-hez.

4.2.1 HTH motívum jóslása

A fehérje aminosav-szekvenciájának ismeretében a 4.1.1. fejezetben is ismertetett módon modellezhető a fehérje másodlagos illetve harmadlagos szerkezete, emellett a DNS kötő HTH motívumok predikációjára is van lehetőség.

A DNS-kötő motívum helyének jóslására az Institute of Biology and Chemistry of Proteins intézet Pôle BioInformatique Lyonnais Lyon-Gerland csoport által fejlesztett HTH-predictort használtam. Ez a program készít egy mátrixot, aminél az egyes szegmensek aminosavait pontozza azok helyzete alapján, úgy, hogy összehasonlítja az alapkészletének („master set”) konzervált aminosavaival. A legtöbb pontot kapott szegmens lesz a legnagyobb valószínűséggel a kérdéses DNS-kötő motívum, feltéve, hogy a vizsgált fehérje tartalmaz hélix-turn-hélix motívumot [21].



18. ábra: A Phyre2 által megadott modellen PyMol segítségével rózsaszínnel jelölve a jóslott HTH motívum

Általános esetben elmondható a HTH motívumokról, hogy 22 aminosav hosszúak, a 11. glicin, a 6. és 17. nem rendelkezik töltéssel, valamint az 5-10. és 17-22. aminosavak között nincs prolin. Ez természetesen nem szigorúan vett szabályszerűség, de jellemző, mivel ezek a motívumok viszonylag konzervált szekvenciák [22].

A szerkezeti modell alapján a HTH-motívum nagy valószínűséggel jósolható. Az említett programmal kapott eredmény a 18. ábrán látható, illetve táblázatosan is megtekinthető a Függelékben.

4.2.2 HTH motívum mutációjának tervezése

Az Stl fehérjében a predikciós program által jósolt HTH motívumot összehasonlítottuk ismert DNS-kötő fehérjék (lambda CI, Cro) HTH motívumával. Ezen túlmenően, az Stl_{sapibov1} jósolt szerkezetét illesztettük a CI és a Cro fehérjék szerkezetére, ez alapján a DNS-kötő rész helyzete a motívumon belül nagyjából megegyezik a három fehérjében. Ezeknek a fehérjéknek (CI, Cro) a specifikus DNS-kötő része a második hélixben található, jellemző, hogy a motívum 14. aminosavja glutamin, a 15. Szerin (19. ábra).

Stl	LTQSKLSERTGFSQNTISNHEN
CI	LSQESVADKMGMGQSGVGALFN
Cro	FGQTKTAKDLGVYQSAINKAIH

19. ábra: Az Stl fehérje jósolt, és ismert szerkezetű fehérjék (CI, Cro) HTH- motívumának illesztése, kiemelve a szövegben említett aminosavak

Mindezek alapján egy olyan konstrukció létrehozását terveztük, melynél az Stl_{sapibov1} jósolt HTH motívumában a 14. helyen lévő glutamint, és a 15. helyen lévő aszparagint, mely a szerinhez és glutaminhoz hasonlóan hidrofíl jellegű aminosav, kicseréljük hidrofób jellegű alaninra. Ezzel a mutációval valószínűleg csökkenteni tudjuk a fehérje DNS-kötő képességét.

Ehhez a mutációhoz terveztünk primert. Elsőként a <https://eu.idtdna.com/CodonOpt> honlapon megnéztük, hogy az alanin melyik kodonja fordul elő leggyakrabban az *E.coli*-ban és a honlap által elsőként javasolt kodonokra cseréltük a glutamint és az aszparagint kódoló tripleteket. Ezután a két módosított kodon előtt és után úgy választottuk meg a bázisokat, hogy lehetőleg mindkettőnek a végén C és G legyen, ami a biztosabb letapadást biztosítja

azáltal, hogy a citozin és guanin között három H-híd alakul ki. Ügyeltünk arra, hogy mindkét résznek az olvadáspontja 60°C körül legyen, illetve a két szakasz olvadáspontjának különbsége, ha lehet, ne legyen 1,5°C-nál nagyobb. Ezen kívül fontos szempont, hogy a primer olvadáspontja magas, 78°C felett legyen. A várható olvadáspontokat kétféle predikciós programmal is megnéztük. Az így kapott primer:

5'-CGCACCGGCTTTAGC**GCAGCG**ACCATTAGCAACCATGAAAACG-3'.

A tervezett primer két, a mutációt hordozó kodonoktól 3'-, illetve 5' irányban elhelyezkedő szakaszának várható olvadáspontját a 6. táblázat foglalja össze.

Honlap	Génszakasz	Becsült olvadáspont
http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/	ACCATTAGCAACCATGAAAACG	63,9°C
	CGCACCGGCTTTAGC	61,1°C
https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/tm-calculator	ACCATTAGCAACCATGAAAACG	61°C
	CGCACCGGCTTTAGC	61°C

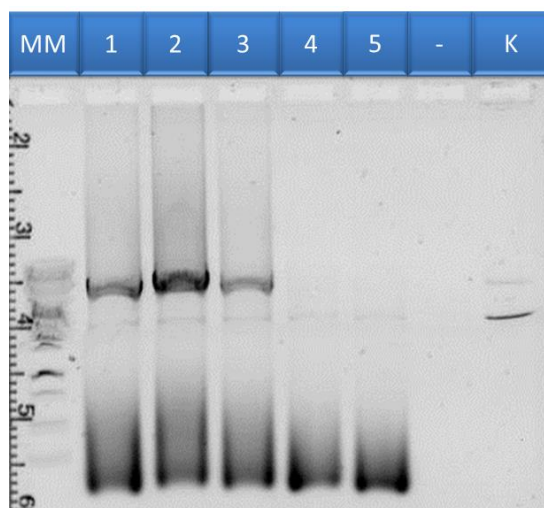
6. táblázat

Az így kapott primert összehasonlítottuk az eredeti szekvenciával, ellenőrzésképpen, hogy csak a tervezett mutációnál van-e különbség.

Végül ellenőriztük a <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> honlapon található programmal, várható-e, hogy ebben a tervezett oligonukleotidban kialakul "hajtűkanyar", ami megakadályozhatná a primer letapadását.

4.2.3 A HTH mutánst kódoló plazmid előállítása

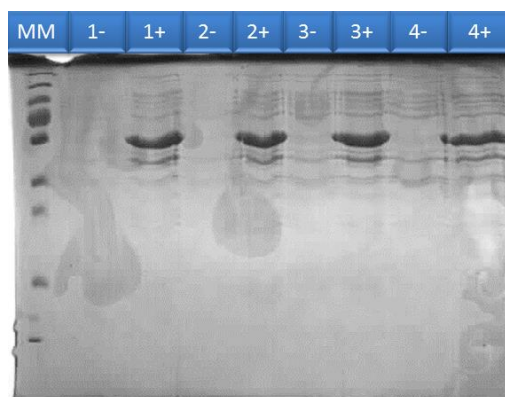
A pontmutáció előállításához a QuikChangeTM mutagenézis protokollt használtuk (3.1.2. fejezet). Ennek során a mutációt tartalmazó primer hozzákötött az eredeti plazmidhoz, és az újonnan szintetizált DNS tartalmazta a kívánt pontmutációkat. Ezután az eredeti DNS szálát 37°C-on, 1 órán keresztül DpnI restriktív enzim emésztette el, így elméletileg csak a kívánt plazmidot transzformáltuk az *E.coli* XL1Blue sejtekbe. Az így létrehozott plazmidot izoláltam és elküldtük szekvenálni, melynek eredménye alapján megbizonyosodtunk, hogy a konstrukt valóban tartalmazta a kívánt mutációt.



20. ábra: Az Stl(AA) mutációt kódoló plazmid DpnI enzim által végzett emésztés utáni gélképe
Magyarázat: MM-DNS létra, 1-5-minták, K-kontrol

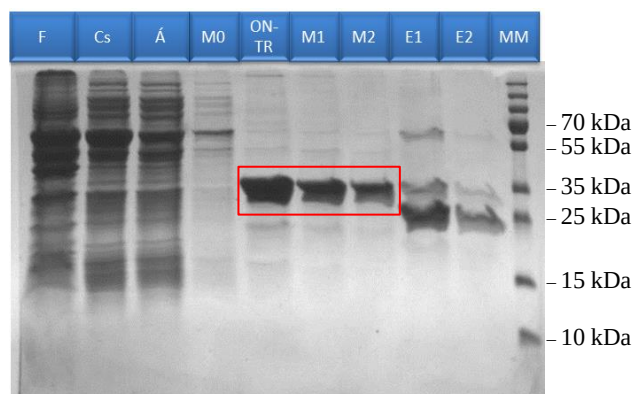
4.2.4 A HTH mutáns előállítása, tisztítása

Az AA mutánst kódoló plazmidot ezután BL21 (DE3) Rosetta sejtekbe transzformáltam (az eljárás a 3.1.3. pontban olvasható). A szelekciós táptalajon felnőtt sejteket 500ml LB tápoldatba oltottam, és IPTG hozzáadása következtében a sejtek sikeresen expresszálták az előállítani kívánt fehérjét (3.1.5. fejezet) (21. ábra).



21. ábra: Az Stl(AA) mutáns expressziójának SDS-PAGE gélképe
Magyarázat: MM-fehérje létra, szám- az adott kolónia, - : IPTG nélküli, + : IPTG hozzáadása után

A pontmutáns fehérjében gazdag sejtekből ezek után izoláltam a fehérjét (3.1.6. fejezet), majd affinitás kromatográfiával tisztítottam, ugyanúgy, mint a vadtypus és a C-terminális Stl esetében. Ennek eredményét a 22. ábra szemlélteti: két frakció is gazdagon tartalmazta a vizsgálni kívánt fehérjét.

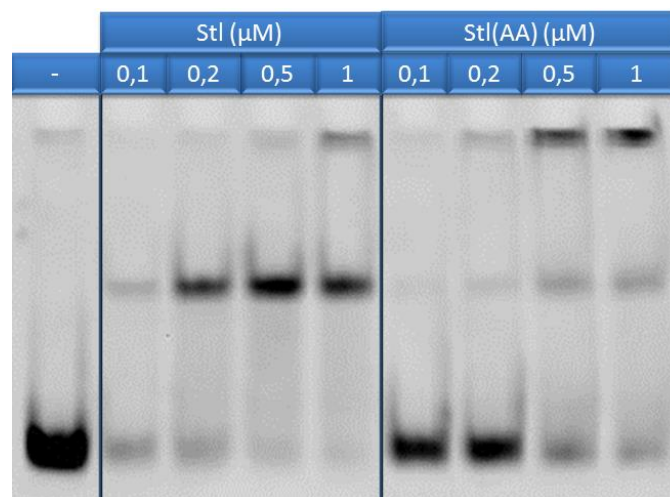


22. ábra: Az Stl(AA) mutáns fehérje tisztításának gélképe

Magyarázat: F-felülúszó, CS-csapadék, Á-átéső, M0-trombinos emésztés előtti mosása az oszlopnak, ONTR-trombinos emésztés utáni áteső, M1-trombinos emésztés utáni első mosás, M2-emésztés utáni második mosás, E1-első elúció, E2-második elúció, MM-fehérje létra
Stl(AA) fehérje mérete: 32,7 kDa

4.2.5 A HTH mutáns fehérje DNS-kötésének vizsgálata

Az elképzelésünk szerint a fehérjének azon részén hajtottuk végre a báziscserét, mely a DNS-szekvencia felismerésért, a specifikus DNS-kötésért felelős. Ennek megfelelően arra számítottunk, hogy a kölcsönhatás jelentősen gyengül a nukleinsav és a fehérje között. Ezt EMSA módszerrel próbáltam meg igazolni. Ehhez hígítási sort készítettem (0,1 μM , 0,2 μM , 0,5 μM , 1 μM) az Stl(AA) és a vad típus esetében is, majd minden mintához 90 ng DNS-t adtam. A kísérlet igazolta a hipotézist. A 23. ábra látható, hogy a pontmutáns fehérje esetében is kialakul a DNS-sel való kölcsönhatás. Ugyan a DNS-kötő képesség nem szűnt meg, az egyértelműen látszik, hogy sokkal gyengébb kölcsönhatás, mivel a vad típus már a 0,2 μM -os fehérjekoncentráció esetében is kialakítja a DNS-sel való kölcsönhatást, míg az Stl(AA) mutáns ekkor látható módon még nem. A mutáns fehérje esetében a magasabb koncentrációknál valószínű, kicsapódott a minta, aggregátumok alakultak ki, amik nem is léptek be a gélbe, ezért a kísérletet meg kell majd ismételni. De ettől függetlenül már ez az eredmény is jól mutatja, hogy a kicserélt két aminosav fontos szerepet játszik a DNS-sel való kölcsönhatás kialakításában, hiszen mutáció hatására jelentősen gyengül a DNS-kötés.



23. ábra: Az Stl(AA) mutáns fehérje DNS-kötő képességének vizsgálata EMSA módszerrel

Összefoglalás

Munkám során az $Stl_{SaPIbov1}$ *Staphylococcus aureus* patogenicitási sziget (SaPI-t) szabályozó fehérje molekuláris szintű szerkezetének felderítése, és funkcióinak meghatározása volt a célom. Ehhez *in silico* módszerek segítségével megalkottuk a fehérje modelljét, ez alapján létrehoztuk különböző mutánsait, majd ezeket vizsgáltuk különböző technikákkal.

Első lépésben eltávolítottuk az egész feltételezett DNS-kötő domént, és az így kapott fehérjétől azt vártuk, a dUTPáz enzimmel, a vadtypushoz hasonlóan, kialakít kölcsönhatást, míg a DNS-kötő képessége megszűnik. Ez utóbbi feltételezést elektroforetikus mobilitás próbával (EMSA) sikerült igazolni. Míg a vadtypus esetében már egészen kis koncentráció értékeknél (0,2-0,5 μ M) is detektálható volt a fehérje-DNS komplex, addig a C-terminális mutáns nagy koncentrációjánál (5-10 μ M) is a szabad DNS jelent meg a gélen.

Sikerült választ kapnunk arra a Bevezetőben megfogalmazott kérdésre, hogy az Stl fehérje egyes szegmensei önállóan feltekeredő doméneket alkotnak-e, legalábbis a fehérje C-terminális része ilyen. Több módszerrel is bebizonyítottuk, hogy a C-terminális domén szerepet játszik a fehérje-kölcsönhatás kialakításában. Először natív poliakrilamid gélen láthatóvá tettük a komplexet, majd az enzimaktivitás mérés optimalizálását követően kimutattuk, a fehérje jelentősen gátolja a dUTPáz működését.

A fehérje szerkezetének finomabb feltérképezése céljából létrehoztunk két pontmutációt a jósolt hélix-turn-hélix motívumban, amitől azt vártuk, jelentősen gyengíti a fehérje DNS-kötő képességét. Ezt a hipotézist elektroforetikus mobilitási próbával igazoltuk. A pontmutációt hordozó fehérje ugyan kialakított kölcsönhatást a DNS-sel, ez a várakozásoknak megfelelően határozottan gyengébb volt, mint a vadtypus esetében. Elmondható, hogy a kicserélt két aminosavnak (glutamin és aszparagin) fontos szerepe van a DNS-kötés kialakításában, azonban jelenlétük nem létfontosságú a kölcsönhatás létrejöttéhez.

Eredményeinket összefoglalva, sikerült azonosítani az $Stl_{SaPIbov1}$ fehérje DNS-kötő doménjét, illetve valószínűsítettük a HTH motívum helyzetét az aminosavláncban. Bebizonyítottuk, hogy a C-terminális domén részt vesz a fehérje-kölcsönhatásban, ám a dUTPáz aktivitását kevésbé gátolja, mint a teljes hosszú fehérje.

Ezek az eredmények hozzájárulnak, hogy megértsük a SaPI-k szabályozását, ezáltal megakadályozzuk ezek terjedését, ami kiemelkedő orvosi biológiai jelentőséggel bírna, hiszen ezek a genetikai elemek gyakran hordoznak virulenciáért, illetve antibiotikum rezisztenciáért felelős géneket, és a nosocomiális megbetegedések jelentős részéért a *S. aureus* a felelős. Ezen kívül a dUTPáz enzimet gátló fehérje részlet tanulmányozása más betegségek (pl. daganatos megbetegedések) gyógy módjának kidolgozásában is szerepet játszhat.

Eddig egyetlen Stl fehérje térszerkezete sem ismert, ezért távlati terveinkben arra is összpontosítani fogunk, hogy ezt meghatározzuk. Ennek felderítésére a fehérjekrisztallográfia eszközeit használjuk a vad típusú Stl_{SaPIbov1} és a dolgozatomban említett mutáns fehérjék esetében is.

Ezen kívül a jóssolt HTH motívum mutációjával bizonyítani (vagy cáfolni) szeretnénk, hogy valóban azok az aminosavak felelősek a DNS-kötés kialakításáért, létrehozva egy olyan konstruktot, mely nem képes a DNS-sel kölcsönhatni, azonban a dUTPáz-t azonos mértékben gátolja, mint a vad típusú fehérje.

Tervezzük továbbá az Stl mutánsok *in vivo* tesztelését *Mycobacterium smegmatis*-ban egy a laboratóriumunkban fejlesztés alatt álló riporter rendszerben.

Irodalomjegyzék

- [1] K. Saito, H. Nagashima, and K. Noguchi, “First - in - human , phase I dose - escalation study of single and multiple doses of a first - in - class enhancer of fluoropyrimidines , a dUTPase inhibitor (TAS - 114) in healthy male volunteers,” pp. 577–583, 2014.
- [2] R. P. Novick, G. E. Christie, and J. R. Penadés, “The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no. 8, pp. 541–51, 2010.
- [3] I. Leveles, V. Németh, J. E. Szabó, V. Harmat, K. Nyíri, Á. Á. Bendes, V. Papp-Kádár, I. Zagyva, G. Róna, O. Ozohanics, K. Vékey, J. Tóth, and B. G. Vértessy, “Structure and enzymatic mechanism of a moonlighting dUTPase,” *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, vol. 69, no. Pt 12, pp. 2298–308, 2013.
- [4] J. E. Szabó, V. Németh, V. Papp-Kádár, K. Nyíri, I. Leveles, A. Á. Bendes, I. Zagyva, G. Róna, H. L. Pálincás, B. Besztercei, O. Ozohanics, K. Vékey, K. Liliom, J. Tóth, and B. G. Vértessy, “Highly potent dUTPase inhibition by a bacterial repressor protein reveals a novel mechanism for gene expression control,” *Nucleic Acids Res.*, pp. 1–9, 2014.
- [5] R. P. Novick, P. Schlievert, and A. Ruzin, “Pathogenicity and resistance islands of staphylococci,” pp. 585–594, 2001.
- [6] K. Hiramatsu, Y. Katayama, M. Matsuo, T. Sasaki, Y. Morimoto, a Sekiguchi, and T. Baba, “Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy,” *J. Infect. Chemother.*, vol. 20, no. 10, pp. 593–601, 2014.
- [7] T. Yamamoto, A. Nishiyama, T. Takano, S. Yabe, W. Higuchi, O. Razvina, and D. Shi, “Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: community transmission, pathogenesis, and drug resistance,” *J. Infect. Chemother.*, vol. 16, no. 4, pp. 225–54, 2010.
- [8] European Food Safety Authority, “Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA),” 2011. [Online]. Available: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mrsa.htm>.
- [9] G. K. Paterson, E. M. Harrison, and M. a Holmes, “The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,” *Trends Microbiol.*, vol. 22, no. 1, pp. 42–7, 2014.
- [10] M. Morgan, “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis?,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 62, no. 6, pp. 1181–7, 2008.

- [11] C. Ubeda, E. Maiques, P. Barry, A. Matthews, M. A. Tormo, I. Lasa, R. P. Novick, and J. R. Penadés, “SaPI mutations affecting replication and transfer and enabling autonomous replication in the absence of helper phage,” *Mol. Microbiol.*, vol. 67, no. 3, pp. 493–503, 2008.
- [12] I. Mir-Sanchis, R. Martínez-Rubio, M. Martí, J. Chen, Í. Lasa, R. P. Novick, M. Á. Tormo-Más, and J. R. Penadés, “Control of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island excision,” *Mol. Microbiol.*, vol. 85, no. 5, pp. 833–45, 2012.
- [13] G. Ram, J. Chen, K. Kumar, H. F. Ross, C. Ubeda, P. K. Damle, K. D. Lane, J. R. Penadés, G. E. Christie, and R. P. Novick, “Staphylococcal pathogenicity island interference with helper phage reproduction is a paradigm of molecular parasitism,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 40, pp. 16300–16305, 2012.
- [14] G. E. Christie and T. Dokland, “Pirates of the Caudovirales,” *Virology*, vol. 434, no. 2, pp. 210–21, 2012.
- [15] T. Ganguly, M. Das, A. Bandhu, P. K. Chanda, B. Jana, R. Mondal, and S. Sau, “Physicochemical properties and distinct DNA binding capacity of the repressor of temperate *Staphylococcus aureus* phage phi11,” *FEBS J.*, vol. 276, no. 7, pp. 1975–85, 2009.
- [16] A. Hochschild and M. Lewis, “The bacteriophage λ CI protein finds an asymmetric solution,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 79–86, 2009.
- [17] A. D. Johnson, B. J. Meyer, and M. Ptashne, “Interactions between DNA-bound repressors govern regulation by the λ phage repressor,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 76, no. 10, pp. 5061–5065, 1979.
- [18] S. Stayrook, P. Jaru-Ampornpan, J. Ni, A. Hochschild, and M. Lewis, “Crystal structure of the lambda repressor and a model for pairwise cooperative operator binding,” *Nature*, vol. 452, no. 7190, pp. 1022–5, Apr. 2008.
- [19] T. Maniatis, M. Ptashne, K. Backman, D. Kield, S. Flashman, a Jeffrey, and R. Maurer, “Recognition sequences of repressor and polymerase in the operators of bacteriophage lambda,” *Cell*, vol. 5, no. 2, pp. 109–13, 1975.
- [20] L. a Kelley and M. J. E. Sternberg, “Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server,” *Nat. Protoc.*, vol. 4, no. 3, pp. 363–71, 2009.
- [21] I. B. Dodd and J. B. Egan, “detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 18, no. 17, pp. 5019–5026, 1990.
- [22] R. G. Brennan and W. Matthews, “Binding Motif,” vol. 264, no. 4, pp. 22–25, 1989.

Függelék

Pufferek, oldatok összetétele

1x TBE (pH=8,3)

89mM Tris bázis

89 mM Borát

2mM Na₄EDTA

Fenolvörös puffer (pH=7,5)

1 mM Hepes,

5 mM MgCl₂

40 µM fenolvörös

150 µM KCl

GelRed oldat (50 ml)

15 µl GelRed,

292 mg (100mM) NaCl

Stl feltáró puffer (pH=7,5)

50 mM Hepes

1 M NaCl

LB

10 g/l tripton

5 g/l élesztő kivonat

10 g/l NaCl

1xTAE (pH=8,4)

40 mM Tris bázis

20 mM Ecetsav

1 mM EDTA

„A” puffer (pH=7,5)

20 mM Hepes

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

10 mM β-merkaptotanol

0,1 mM PMSF

„B” puffer (pH=7,5)

20 mM Hepes

1000 mM NaCl

5mM MgCl₂

10 mM β-merkaptotanol

0,1 mM PMSF

Mintakoktél (pH=6,8)

62,5 mM Tris/HCl

25 % glicerin

2 % SDS

0,01 % brómfenolkék

350 mM DTT

Poliakrilamid gélek összetétele

	Elválasztó gél (6%)	Tömörítő gél (4%)
ddH ₂ O	3 ml	1,63 ml
Elválasztó/Tömörítő puffer	1,25 ml	0,625 ml
40% Akrilamid	0,75 ml	0,244 ml
10% APS	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl

7. táblázat Natív poliakrilamid gél összetétele

Elválasztó puffer: 375 mM Tris/HCl, pH = 8.8

Tömörítő puffer: 125 mM TRIS/HCl pH = 6.8

	Elválasztó gél (8%)	Tömörítő gél (4%)
ddH ₂ O	2,7 ml	1,63 ml
Elválasztó/Tömörítő puffer	1,25 ml	625 µl
40% Akrilamid	1 ml	244 µl
10% SDS	50 µl	25 µl
10% APS	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl

8. táblázat SDS poliakrilamid gél összetétele

Elválasztó puffer: 375 mM Tris/HCl, pH = 8.8

Tömörítő puffer: 125 mM TRIS/HCl pH = 6.8

1xTBE (8%) PA gél		1xTBE (12%) PA gél		1xTBE (16%) PA gél	
ddH ₂ O	5,25 ml	ddH ₂ O	4,50 ml	ddH ₂ O	3,75 ml
10xTBE	0,75 ml	10xTBE	0,75 ml	10xTBE	0,75 ml
40% akrilamid	1,50 ml	40% akrilamid	2,25 ml	40% akrilamid	3,00 ml
10% APS	50 µl	10% APS	50 µl	10% APS	50 µl
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl	TEMED	5 µl

9. táblázat 1xTBE poliakrilamid gél összetétele

Szekvenciák

ATG TCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTTTT
GGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAATGGC
GAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTATTATATTGATGGTGAT
GTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACTGTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGG
TGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGAT
ACGGTGTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGC
AAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTTGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGG
TGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACATGG
ACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAAATTAGTTTGTTTTAAAAACGTATTGAAGCTATC
CCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTCAGGGCTGGCA
AGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCCGG
AATTC CATCATCATCATCATCAGGCAGCATGGAAGGCGCGGGCCAGATGGCGGAACCTGCCG
ACCCATTATGGCACCATTATTAAAACCCTGCGCAAATATATGAACTGACCCAGAGCAAACCT
GAGCGAACGCACCGGCTTTAGCCAGAACACCATTAGCAACCATGAAAACGGCAACCGCAACA
TTGGCGTGAACGAAATTGAAATTTATGGCAAAGGCTTGGGCATTCCGAGCTATATTCTGCAT
CGCATTAGCGATGAATTTAAAGAAAAAGGCTATAGCCCGACCCTGAACGATTTTGGCAAATT
TGATAAAATGTATAGCTATGTGAACAAAGCGTATTATAACGATGGCGATATTTATTATAGCA
GCTATGATCTGTATGATGAAACCATTAACTGCTGGAACCTGCTGAAAGAAAGCAAAATTAAC
GTGAACGATATTGATTATGATTATGTGCTGAAACTGTATAAACAGATTCTGAGCACCGATAC
CGAAAAAAGCATTATTAACCTATGAAACCCTGGCGAACACCCGCAAAAGCAGCGATAAAAAAC
GCGAAGTGACCATTGAAGAAATTGGCGAATTTTATGAAAAATATCTGAACTGCTGTTTACC
AACCTGGAAACCCATAACGATCGAAAAAAGCGCTGGCGGAAATTGAAAACTGAAAGAAGA
AAGCATTTATCTGGGCGAAAAACTGCGCCTGGTGCCGAACCATCATTATGATGCGATTAAAG
GCAAACCGATGTATAAACTGTATCTGTATGAATATCCGGATCGCCTGGAACATCAGAAAAAA
ATTATTCTGGAAAAAGATACCAACTAACTCGAG

1. szekvencia: A vad típusú S11 bázis sorrendje

Jelmagyarázat: kék – GST-címke; zöld – trombin hasítóhely; lila – His-címke;
sárga – start kodon; piros – stop kodon

MSPI LGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEHLIERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGD
VKLTQSMALIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRISYKDFETLKVDFLS
KLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI
PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPEFH HHHHHH GSMEGAGQMAELP
THYGTIIKTLRKYMKLTSKLSERTGFSQNTISNHENGRNIGVNEIEIYGKGLGIPSYILH
RISDEFKEKGYSPTLNDGFKFDKMSYVNKAYYNDGDIYSSYDLYDETIKLELLKESKIN
VNDIDYDYVLKLYKQILSTDTEKSIINYETLANTRKSSDKKREVTIEEIGEFHEKYLKLLFT
NLETHNDRKKALAEIEKLKEESIYLGEKLRLVPNHHDYDAIKGKPMYKLYLYEYPDRLEHQKK
IILEKDTN*

2. szekvencia: A vad típusú S11 aminosav sorrendje

Jelmagyarázat: kék – GST-címke; zöld – trombin hasítóhely; lila – His-címke;
sárga – start kodon; csillag – stop kodon

ATG TCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTTTT
 GGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAATGGC
 GAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTATTATATTGATGGTGAT
 GTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACTGTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGG
 TGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGAT
 ACGGTGTTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGC
 AAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTTGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGG
 TGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACATGG
 ACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAATTAGTTTGTTTTAAAAACGTATTGAAGCTATC
 CCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCA
 AGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCCGG
 AATTC CATCATCATCATCATCAC GGCAGCATGGAAGGCGCGGGCCAGATGGCGGAACGCGG
 ACCCATTATGGCACCATTATTTAAACCCTGCGCAAATATATGAAACTGACCCAGAGCAAAC
 GAGCGAACGCACCGGCTTTAGC GCAGCG ACCATTAGCAACCATGAAAACGGCAACCGCAACA
 TTGGCGTGAACGAAATTGAAATTTATGGCAAAGGCTTGGGCATTCCGAGCTATATTCTGCAT
 CGCATTAGCGATGAATTTAAAGAAAAAGGCTATAGCCCGACCCTGAACGATTTTGGCAAATT
 TGATAAAATGTATAGCTATGTGAACAAAGCGTATTATAACGATGGCGATATTTATTATAGCA
 GCTATGATCTGTATGATGAAACCATTAACTGCTGGAAGTCTGAAAGAAAGCAAAATTAAC
 GTGAACGATATTGATTATGATTATGTGCTGAAACTGTATAAACAGATTCTGAGCACCGATAC
 CGAAAAAAGCATTATTAACCTATGAAACCCTGGCGAACACCCGCAAAAGCAGCGATAAAAAAC
 GCGAAGTGACCATTGAAGAAATTGGCGAATTTATGAAAAATATCTGAAACTGCTGTTTACC
 AACCTGGAAACCCATAACGATCGCAAAAAAGCGCTGGCGGAAATTGAAAACTGAAAGAAGA
 AAGCATTTATCTGGGCGAAAACTGCGCCTGGTGCCGAACCATCATTATGATGCGATTAAAG
 GCAAACCGATGTATAAACTGTATCTGTATGAATATCCGGATCGCCTGGAACATCAGAAAAAA
 ATTATTCTGGAAAAAGATACCAACTAACTCGAG

3. szekvencia: A pontmutációkat tartalmazó Stl bázis sorrendje (Stl (AA))

Jelmagyarázat: kék – GST-címke; zöld – trombin hasítóhely; lila – His-címke;
 sárga – start kodon; piros – stop kodon; aláhúzott – mutagenézis primer letapadási helye,
 piros betűszín, félkövér – mutációt hordozó kodon

MSPILGWYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGD
 VKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRISYKDFETLKVDFLS
 KLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI
 PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPEFH HHHHHHGSMEGAGQMAELP
 THYGTIIKTLRKYMKLTQSKLSERTGFSAAATISNHENGNRNIGVNEIEIYGKGLGIPSYILH
 RISDEFKEKGYSP TLNDFGKFDMYSYVNKAYYNDGDIYSSYDLYDETIKLELLKESKIN
 VNDIDYDYVLKLYKQILSTDTEKSIINYETLANTRKSSDKKREVTIEEIGEFHEKYLKLLFT
 NLETHNDRKKALAEIEKLKEESIYLGEKRLRVPNHHYDAIKGKPMYKLYLYEYPDRLEHQKK
 IILEKDTN*

4. szekvencia: A pontmutációkat tartalmazó Stl aminosav sorrendje (Stl (AA))

Jelmagyarázat: kék – GST-címke; zöld – trombin hasítóhely; lila – His-címke;
 piros – start kodon; csillag – stop kodon; piros betűszín, félkövér – mutáció a fehérjében

ATG TCCCC TATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTTTT
 GGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAATGGC
 GAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTATTATATTGATGGTGAT
 GTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACTGTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGG
 TGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGAT
 ACGGTGTTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGC
 AAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTTGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGG
 TGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACATGG
 ACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAATTAGTTTGTTTTAAAAACGTATTGAAGCTATC
 CCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCA
 AGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCCGG
 AATTCAGCCCGACCCTGAACGATTTTGGCAAATTTGATAAAATGTATAGCTATGTGAACAAA
 GCGTATTATAACGATGGCGATATTTATTATAGCAGCTATGATCTGTATGATGAAACCATTAA
 ACTGCTGGAAGTCTGAAAGAAAGCAAAATTAACGTGAACGATATTGATTATGATTATGTGC
 TGAAACTGTATAAACAGATTCTGAGCACCGATACCGAAAAAGCATTTATTAAGTATGAAACC
 CTGGCGAACACCCGCAAAAGCAGCGATAAAAAACGCGAAGTGACCATTGAAGAAATTGGCGA
 ATTTTCATGAAAAATATCTGAAACTGCTGTTTACCAACCTGGAAACCCATAACGATCGCAAAA
 AAGCGCTGGCGGAAATTGAAAAACTGAAAGAAGAAAGCATTTATCTGGGCGAAAAACTGCGC
 CTGGTGCCGAACCATCATTATGATGCGATTAAAGGCAAACCGATGTATAAACTGTATCTGTA
 TGAATATCCGGATCGCCTGGAACATCAGAAAAAAATTATTCTGGAAAAAGATACCAACTAA

5. szekvencia: Az Stl fehérje C-terminális szegmensének bázis sorrendje

Jelmagyarázat: kék – GST-címke; zöld – trombin hasítóhely; sárga – start kodon;
 piros – stop kodon; aláhúzott – klónozó primerek letapadási helye

MSPIILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQ
 SMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMF
 DRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAW
 PLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSP EFSPTLNDFGKFDKMYSYVNKAYYNDGDIYYSSYDLYDETI
 KLELLKESKINVNDIDYDVLKLYKQILSTDTEKSIINYETLANTRKSSDKKREVTIEEIGEFHEK
 YLKLFTNLETHNDRKKALAEIEKLKEESIYLGKELRLVPNNHYDAIKGKPMYKLYLYEYPDRLEHQ
 KKIILEKDTN*

6. szekvencia: Az Stl fehérje C-terminális szegmensének aminosav sorrendje

Jelmagyarázat: kék – GST-címke; zöld – trombin hasítóhely; sárga – start kodon;
 csillag – stop kodon

Jósolt HTH-motívumok

SaPIbov1	MEGAGQMAELPTHYGTIIKTLRKYMK LTQSKLSERTGFSQNTISNHEN GNRNIGVNEIE IYGKGLGIPSYILHRISDEFKEKGYSPTLNDFGKFDKMYSYVNKAYYNDGDIYYSSYDL YDETIKLELLKESKINVNDIDYDVLKLYKQILSTDTEKSIINYETLANTRKSSDKKRE VTIEEIGEFHEKYLKLLFTNLETHNDRKKALAEIEKLKEESIYLGEKLRLVPNNHHYDAIK GKPMYKLYLYEYPDRLEHQKKIILEKDTN
SaPI3	MRTNDEIITIKTSMKEQN MSLSELARRVGVAKSAVSRYLN LTREFPLNRAEDFAKVLG IKTEYLLGFAEREESTKQDTIAAHLDDGDFTEELIEI-RKYAELVRKAHRNQ
SaPImw2	MIIFRLKEIMEEKN LKISDLHEQTGISRNSISLLN GKTRGIQFDLTLEKITLALNVDVADL FKNVFNELIILDDISKVETRYRSKFKFEKKNIVKKYAVNCDLIEDNDLKKGFIPEYISI ELNPNPEIEIKIQFDYSNLFNYLIKFLCDCNNFKLLLVNYLSKKIYCLNKRINEIKSFYSI PDEKVYILSSFPGIFIRPLRDNNGIFENIELNKIINELNFNSNYNYTYSQITLTHKNKK
SaPIbov2	MILCTLKNYMKLFG ATQSQISEQTGITRPTLLSLIR NENKNIKYDTIDELCNFFGIQLKDL LIYSPVKIKQKSFNIKTIEEYEHINESWKTYGVSIAYEINNEDFIFEGSIDPIDLTKTFKNKK FENGTLYLNCNCFIEKDNYENLLKAGFSKEFFDLYNDLNQIKNKIVDKLPFELDSDDLIF NIFNVNRNAPSLEEYKEELQFLPTDSLVDLKNEIDKYLK (csak 90% a valószínűsége, hogy a fehérje tartalmaz HTH motívumot)
SaPI2*	MIRNRLSELLSERGL LKISRVAKDVKIARSSLTMAQ NDSEMIRYDAIDKLCSYLHISPSE FFEHNPIFDFTFDEEPNYKINDVFEGFEVTANITHAFSIENFDIEILVDVELDNRQKLN DLVDVSYKETEKITNSQHRFIFTIKNEDENIGLKKYVDSL SAGLKNLLFKKINQKLSGYVS EIIIVKNIDDIELFPNKGKSTTLHKEILQTDSRLSSDIFKEY
SaPI1	MIYMTFGEILKKERVSWK LSVKELSTLSGVSQTYISKLEN GKRNFPSETIFNLLIGFKT HIEYKMGSESPFYEINNNSYLDEILIMFINSSNSTISDRDPNELITQFNEYDVTIKKKQNE NSKIESDIFSNIKIKLVKGTTKKEVIEKPYFDLNLWLLTQNEYEVFFDRSFLLDNNFLNKK HFTEKDMYYYNVLNDNDLKTIKDLIVVFLLNKYNYIKNKDDFFNIFTNSED DKTKRDA LYKILYETD
SaPIbov3	MKFSEMLKKYRTKEN LSINKLAKLSGVSTTYISKLEK NDRSYPTVEIIFNLAYGIIMKIK EKYDGIENSDDFLYPQIEEIISSFATSEDSNLDEENKNTIIDD FIMFMERKEKEFLNKSFG DNKEIYENKIALVSNSMNYKKTDPYFDLKWLLSQNNFEV FYGRDFITNFATIEDSKLN TKSMYFYNILDKEDLKTIQRLIEVYLESKYPKIKDKDDFFVLATDKQNRKNTIDWYNI N
SaPI4	MVESNDELKKELGRFLKSIRKQKG KTASEISKMQYSQGHISGIEN GVKSFPSPNKLIESY LMNIKDTNEEYNFYVDEIAKITKNKVKLNVSNVTNKMEIIDRMMDIPYSREFISFDDN NEKSFTIFNISINDLHFHLQDINNYKFYKGIRLTDNDKNNIDKILNNYFENKSVIHKENTK TLRDKNENWEQLVKLSYIDDKLDKKN
SaPImw4*	MEEFGEKFTHKAHSIVSKWEKGLTKPSN ERLKEIAKLGNISVHQLIYGDF LGLLESIA NEEIKFILD TNMCANNSFLANELSSSVSRFISY YERGKENFNENLFRKLLQHYLQLELD LGNRDLESLTYFAYQRTINAQELVVDY YEDSKAKEFLKDESIDFLTTISNKYFDLLEYI DDYRVKHDLEKISEE

* DNS-kötő motívumra javasolt szekvenciát a program valószínűtlennek tartja

10. táblázat: A különböző Stl fehérjék, a pirossal jelölve a jóslott HTH motívumok

Aktivitásmérés

	Összetétel	Merekség (*1000)	y ₁	y ₂	ΔA=y ₁ -y ₂	ΔA/ΔS	$v_0 = \frac{M/1000}{[E] \cdot [\Delta A/\Delta S]}$	v ₀ átlag
1	20nM DUT, 20μM dUTP	-0,2307	0,8238	0,7993	0,0245	0,00123	9,4163	9,3400
2	20nM DUT, 20μM dUTP	-0,2385	0,8225	0,7977	0,0248	0,00124	9,6169	
3	20nM DUT, 20μM dUTP	-0,2714	0,8212	0,7910	0,0302	0,00151	8,9868	
4	20nM DUT, 20μM dUTP	-0,2437	0,8053	0,7739	0,0314	0,00157	7,7611	
5	20nM DUT, 20μM dUTP, 50nM CT	-0,2308	0,8038	0,7718	0,0320	0,00160	7,2125	6,7763
6	20nM DUT, 20μM dUTP, 50nM CT	-0,2306	0,8036	0,7609	0,0427	0,00214	5,4005	
7	20nM DUT, 20μM dUTP, 50nM CT	-0,2259	0,8025	0,7693	0,0332	0,00166	6,8042	
8	20nM DUT, 20μM dUTP, 50nM CT	-0,2121	0,7826	0,7388	0,0438	0,00219	4,8425	
9	20nM DUT, 20μM dUTP, 50nM CT	-0,2102	0,7870	0,7537	0,0333	0,00167	6,3123	
10	20nM DUT, 20μM dUTP, 100nM CT	-0,1748	0,7973	0,7749	0,0224	0,00112	7,8036	5,7093
11	20nM DUT, 20μM dUTP, 100nM CT	-0,2022	0,8030	0,7669	0,0361	0,00181	5,6011	
12	20nM DUT, 20μM dUTP, 100nM CT	-0,1886	0,8040	0,7745	0,0295	0,00148	6,3932	
13	20nM DUT, 20μM dUTP, 100nM CT	-0,2033	0,7924	0,7560	0,0364	0,00182	5,5852	
14	20nM DUT, 20μM dUTP, 100nM CT	-0,2082	0,8044	0,7648	0,0396	0,00198	5,2576	
15	20nM DUT, 20μM dUTP, 200nM CT	-0,1964	0,7959	0,7602	0,0357	0,00179	5,5014	5,1963
16	20nM DUT, 20μM dUTP, 200nM CT	-0,1777	0,7836	0,7561	0,0275	0,00138	6,4618	
17	20nM DUT, 20μM dUTP, 200nM CT	-0,2016	0,7909	0,7510	0,0399	0,00200	5,0526	
18	20nM DUT, 20μM dUTP, 200nM CT	-0,1878	0,7808	0,7435	0,0373	0,00187	5,0349	
19	20nM DUT, 20μM dUTP, 20nM CT	-0,1881	0,7786	0,7518	0,0268	0,00134	7,0187	6,4594
20	20nM DUT, 20μM dUTP, 20nM CT	-0,1992	0,7894	0,7536	0,0358	0,00179	5,5642	
21	20nM DUT, 20μM dUTP, 20nM CT	-0,1951	0,7765	0,7476	0,0289	0,00145	6,7509	
22	20nM DUT, 20μM dUTP, 20nM CT	-0,1827	0,7890	0,7602	0,0288	0,00144	6,3437	
23	20nM DUT, 20μM dUTP, 20nM CT	-0,1856	0,7823	0,7535	0,0288	0,00144	6,4444	
24	20nM DUT, 20μM dUTP, 20nM CT	-0,1814	0,7907	0,7619	0,0288	0,00144	6,2986	
25	20nM DUT, 20μM dUTP, 500nM CT	-0,1534	0,7775	0,7488	0,0287	0,00144	5,3449	5,5853
26	20nM DUT, 20μM dUTP, 500nM CT	-0,1475	0,7912	0,7655	0,0257	0,00129	5,7393	
27	20nM DUT, 20μM dUTP, 500nM CT	-0,152	0,7893	0,7625	0,0268	0,00134	5,6716	

11. táblázat: A dUTPáz enzim aktivitásának gátlása növekvő C-terminális Stl koncentráció hatására

Stl fehérje tisztítása



24. ábra: Stl tisztításának poliakrilamid gélképe

Magyarázat: F-felülúszó, CS-csapadék, Á-áteső, M0-trombinos emésztés előtti mosása az oszlopnak, ONTR-trombinos emésztés utáni áteső, M1-trombinos emésztés utáni első mosás, M2-emésztés utáni második mosás, E1-első elúció, E2-második elúció, MV-az oszlop végső mosása, MM-fehérje létra

A 24. ábrán látható trombinos emésztés utáni mintában három vonal jelent meg, ami a nem megfelelő proteáz gátlásnak köszönhető. Kezdetben kizárólag PMSF-t alkalmaztunk a fehérjék védelme érdekében, ám az nem bizonyult elegendőnek. A proteáz gátló tabletta megoldotta ezt a problémát.