



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar

TDK-dolgozat

Egyidejű többszínű fluoreszcens jelölés optimalizálása fehérjestruktúrák vizsgálatára

Készítette:

Biró Adrienn

Msc II. évfolyamos hallgató

Témavezető:

Dr. Németh Krisztina

Tudományos főmunkatárs

Természettudományi Kutatóközpont

Szerves Kémiai Intézet, Kémiai Biológia Kutatócsoport

Budapest, 2022.

Tartalomjegyzék

1. Rövidítésjegyzék.....	2
2. Bevezetés	3
3. Irodalmi áttekintés	5
3.1. Konfokális mikroszkópia	5
3.2. Szuper-felbontású mikroszkópia.....	6
3.3. Specifikus fluoreszcens jelölések	8
3.4. Bioortogonális kémia	11
3.5. Fluoreszcens kémiai jelölők.....	12
3.6. Többszínű jelölések és többszínű STED lehetőségei.....	13
3.7. Választott struktúrák és fehérjék.....	14
4. Célkitűzés.....	17
5. Eredmények és értékelésük.....	19
5.1. Plazmidok elkészítése	19
5.2. Az elkészített plazmidok kipróbálása, célfehérjék expressziója, fluoreszcens jelölése és mikroszkópos vizsgálata	24
5.3. A jelölt sejtek fixálásának optimalizálása	29
5.4. Háromszínű jelölések kivitelezése	30
5.5. Szuper-felbontású mikroszkópiás képalkotás	33
6. Módszerek.....	35
6.1. Inzert klónozása	35
6.2. Agaróz gélelektroforézis és gélből tisztítás	35
6.3. Vektor és inzert hasítása	36
6.4. Vektor és inzert összekapcsolása (ligálása)	36
6.5. Transzformálás, plazmid felszaporítás, plazmid tisztítás	36
6.6. Emlős sejtkultúrák és passzálásuk	37
6.7. Sejtek növesztése Ibidi kamrára	38
6.8. Transzfekció Lipofectamine 3000 reagenssel.....	38
6.9. Sejtek jelölése	38
6.10. Sejtek fixálása	38
6.11. Konfokális mikroszkópia	39
7. Összefoglalás	40
8. Köszönetnyilvánítás.....	41
9. Irodalomjegyzék	42
10. Függelék.....	46

1. Rövidítésjegyzék

CF – célfehérje

COS-7 – *Ceropithecus aethiops* (zöld majom) vese sejt

CLIP-4PheKum – ((6aR,7R,7aS)-1-(4-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-kromén-4-il)fenil)-4-metil-6,6a,7,7a,8,9-hexahidro-5H-ciklopropa[5,6]ciklookta[1,2-d]piridazin-7-il)metil (4-(((4-aminopirimidin-2-il)oxi)metil)benzil)karbamát

DMSO – dimetil-szulfoxid

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EDTA – etilén-diamin-tetraecetsav

FBS – *Fetal Bovine Serum*

HaloAtto – 4-((2-(2-(((6-klorhexil)oxi)etoxi)ethyl)karbamoil)-2-(1,22,4,8,10,10,11-oktametil-10,11-dihidro-2H-pirano[3,2-*g*:5,6-*g*']diquinolin-1-ium-6-yl)benzoát

Halo-Cy3 – 1-(6-((2-(2-(((7-klórhexil)oxi)etoxi)etil)amino)-6-oxohexil)-3,3-dimetil-2-((E)-3-((Z)-1,3,3-trimetilindolin-2-ilidén)prop-1-én-1-il)-3H-indol-1-ium bromid

HEK – *Human Embryotic Kidney* (sejtkultúra)

HeLa – *Human cervicalis adenocarcionma* sejtvonal

HEPES – 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav

PALM – *Photoactivated Localization Microscopy*

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PFA – paraformaldehid

SIM – *Structured Illumination Microscopy*

SNAP-Cy5 – 1-(6-(((4-(((2-amino-7H-purin-6-il)oxi)metil)benzil)amino)-6-oxohexil)-3,3-dimetil-2-((1E,3E)-5-((Z)-1,3,3-trimetilindolin-2-ilidén)penta-1,3-dién-1-il)-3H-indol-1-ium formiát

STED – *Stimulated Emission Depletion*

STORM – *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*

2. Bevezetés

A sejtekben zajló folyamatok követéséhez, megismeréséhez elengedhetetlen fontosságú a makromolekulák kölcsönhatásának és kolokalizációjának vizsgálata, melyre az egyik leggyakrabban alkalmazott technika, a fluoreszcens (konfokális) mikroszkópia. Ahhoz, hogy a molekulák sejten belüli helyzetét minél pontosabban megfigyelhessük, a Nobel-díjjal jutalmazott szuper-felbontású mikroszkópia ad lehetőséget, mely az Abbe-féle diffrakciós limit meghaladásával lehetővé teszi a 200 nm-nél kisebb struktúrák részletgazdag detektálását is¹⁻³. E módszerek esetében elvárás, hogy a jelölési folyamatok biokompatibilisek, szelektívek és helyspecifikusak legyenek, valamint, hogy a jelzés háttérmentes detektálást tegyen lehetővé. A kémiai biológia terén elért eredmények lehetőséget biztosítanak élő sejtek jelölésére, például önjelölő enzim-címkék (HaloTag, SNAP-Tag, CLIP-Tag) alkalmazásával, vagy bioortogonális módosítás útján. Ez utóbbi eredményességét az idei évben odaítélt Nobel-díj is bizonyítja⁴. A jelölési technikák fejlődésével lehetővé vált többszínű jelölések alkalmazása, így több makromolekula együttes lokalizációja és működése élő sejtekben is követhető. A további fejlődés sarokköve, hogy minél több és megfelelőképpen kombinálható fluoreszcens jelölőmolekula, illetve minél több, egymásra nézve is szelektív, így egyidejűleg is alkalmazható jelölési módszer váljon elérhetővé. A jelölő molekulák alkalmazhatóságának kritériuma, hogy spektrális tulajdonságaik jól összehangolhatóak legyenek, például STED mikroszkópia esetén, ha egy kioltó lézer áll rendelkezésre, akkor az emissziós hullámhosszok mindegyikének kissé át kell fednie azon lézer hullámhosszával.

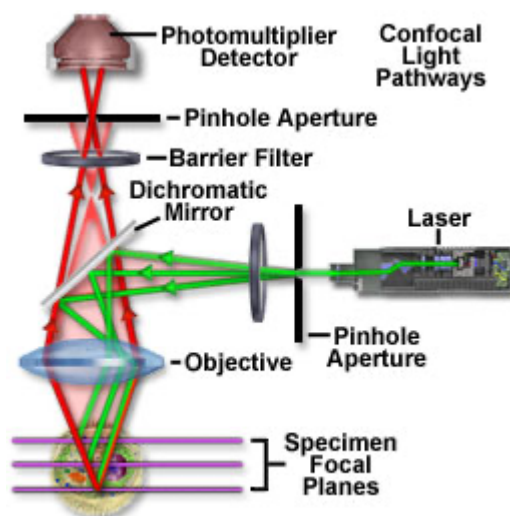
Annak érdekében, hogy szélesítsük az elérhető kismolekulás jelölők tárházát, kutatócsoportunkban olyan fluoreszcens festékeket állítanak elő, melyek irányában elvárás, hogy bioortogonális jelölésre és szuper-felbontású mikroszkópiára egyaránt alkalmasak legyenek⁵⁻⁷. Hosszabbtávú tervként egy olyan platform létrehozását tűztük ki célul, mely alkalmas az előállított fluoreszcens jelzővegyületek tesztelésére és egyidejű többszínű jelölés kivitelezésére. Ennek részeként egy folyamatosan bővülő plazmid-tárat hoztunk létre, melyeknek elemei olyan fehérjéket kódolnak, melyeket bioortogonális módosítással pl. bioortogonalizált önjelölő enzimek szubsztrátjainak segítségével vagy a genetikai kód kiterjesztésével nem-természetes aminosavak beépítésével, szelektíven, helyspecifikusan, nagy sebességgel és biokompatibilis módon tudunk jelölni élő sejtekben. A jó minőségű, mikroszkópos felvételek elkészítéséhez a jelölés egyes lépéseinek optimalizálása is elengedhetetlen.

TDK munkám során e plazmid-tár olyan irányú bővítését tűztük ki célul, ahol potenciális terápiás célpontnak tekinthető fehérjéket címkézünk fel önjelölő enzimmel. Annak érdekében, hogy sikeresen meg tudjuk valósítani a többszínű jelölést, az egymás mellett szelektíven működni képes HaloTag, SNAP-Tag és CLIP-Tag enzimeket építettük be a plazmidokba, a különböző variációk mindegyikét létrehozva, így egy flexibilisen alkalmazható tárat hozva létre. Az elkészült és szekvenálással ellenőrzött elemek egyedi alkalmazhatóságát emlős sejtekbe történő transzfektálással és mikroszkópos képalkotással terveztük vizsgálni. Következő lépésként a három különböző önjelölő enzimet kódoló plazmid segítségével egyidejű háromszínű fluoreszcens jelölések vizsgálatát céloztuk meg. Ezek a jelölések a fehérjék kolokalizációjának vizsgálatához és a sejtbeli folyamatok nyomon követéséhez kifejezetten hasznosak. Annak ellenére, hogy a jelölések megvalósíthatók és vizsgálhatók élő sejteken, a minták eltarthatósága miatt a jelölési lépést követően a minták fixálását terveztük, így ennek optimalizálása is szükséges. A jelölések kivitelezéséhez szorosan együttműködtünk csoportunkban dolgozó szerves vegyészekkel, akik a kismolekulás fluoreszcens festékekkel kovalensen módosított önjelölő enzim szubsztrátokat állították elő. Ezeket a jelölőket Unyi Zsombor készítette Dr. Cserép B. Gergely témavezetésével, és a **„Fluoreszcens vegyülettár tervezése és szintézise önjelölő fehérjék vizsgálatához”** című TDK-dolgozatában mutatja be őket.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Konfokális mikroszkópia

A sejten belüli szerkezetek és folyamatok, illetve ezek el- és megváltozásának megismeréséhez és nyomon követéséhez az emberiség egyik leghasznosabb találmánya a mikroszkóp. Ez az idők során óriási fejlődésen ment keresztül, egészen napjainkig, amikor már pár nanométeres struktúrák is vizsgálhatóvá váltak⁸. A fluoreszcens mikroszkópok között az epifluoreszcens mikroszkópok a legegyszerűbb felépítésűek, mivel itt az objektíven keresztül az egész látóteret széles spektrumú és nagy intenzitású gerjesztő fényforrással világítják meg, amely általában higanygőz vagy fémhalogén lámpa. Az objektíven keresztül történik a fluoreszcens fény detektálása is (innen az elnevezés), amelyet a gerjesztő fénytől dikroikus tükröt tartalmazó színszűrő használatával választanak el. Mivel a vizsgált minta a teljes vastagságában meg van világítva, a fókuszsíkon kívülről emittálódó fényt is detektálják, ezért a kép homályos, háttérrel lehet⁹. Ennek kiküszöbölését szolgálja a Marvin Minsky által 1955-ben kifejlesztett¹⁰ konfokális fluoreszcens mikroszkóp¹¹.

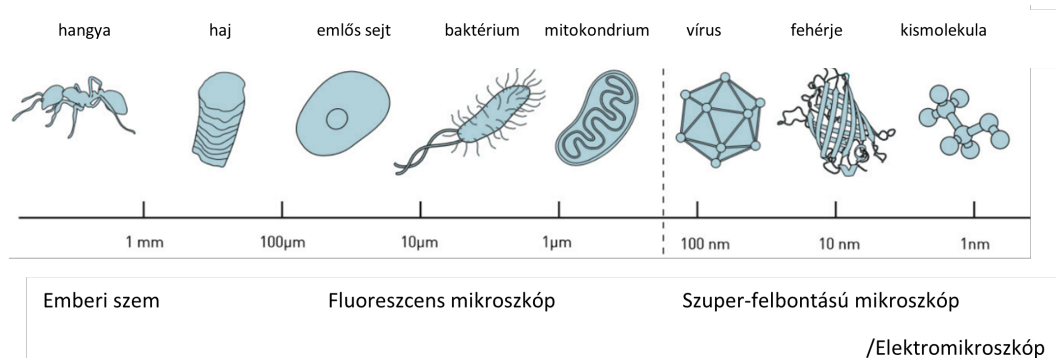


1. ábra A konfokális mikroszkóp elrendezése¹⁰

Ahhoz, hogy a mikroszkóp a minta egy adott síkjáról élesebb képet tudjon alkotni, Minsky egy-egy konfokális rést épített a fényforrás és a detektor elé, mely a mintából érkező fény útjában helyezkedik el (1. ábra). Ez kizárja vizsgált (fókusz) sík alatti és feletti mintarészből érkező fényt, így jobb felbontású, kevésbé háttérrel keletkezik. A dikroikus tükrök alkalmazása miatt ezt az elrendezést egy objektívvel is ki lehetett alakítani. Az objektíven át megvilágított pont (x-y koordinátarendszerben) mozgásával az adott sík végigpásztázható, a különböző fókuszsíkok egymásra rétegezésével (z tengelyen) háromdimenziós kép is alkotható⁸.

3.2. Szuper-felbontású mikroszkópia

A fénymikroszkópiás technikák fejlődésével egyre részletesebb képek készülhettek, azonban az elérhető maximális felbontást meghatározza a diffrakciós limit, melyet először Ernst Abbe írt le 1873-ban. A hagyományos mikroszkópiás módszerek esetében – megfigyelései alapján, a felbontóképesség – azaz két elkülöníthető pont közötti legkisebb távolság a fényszórás miatt nem lehet kisebb a megvilágító fény hullámhosszának felénél³ (2. ábra). Ez a gyakorlatban nagyjából 200 nm-nek felel meg.



2. ábra Az Abbe-féle diffrakciós limit által definiált felbontási korlátok³

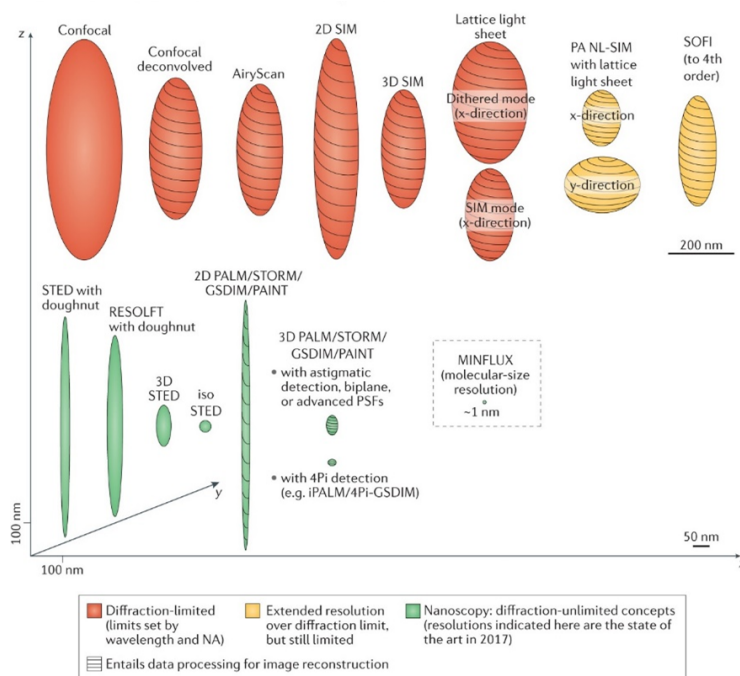
Abbe mérései szerint a felbontás:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \theta} = \frac{\lambda}{2NA}$$

Ahol d a legkisebb távolság két elkülöníthető pont között, λ a fény hullámhossza, n a közeg refraktív indexe, θ a fókuszált fény kúpjának szöge, NA pedig az objektív numerikus apertúrája¹². A diffrakciós limit miatt a közelmúltig nem volt lehetséges 200 nm alatti felbontás elérése optikai mikroszkópokkal, azonban innovatív stratégiáknak köszönhetően már nagyobb felbontás is elérhető.

A hagyományos fluoreszcens mikroszkópia esetében a diffrakciós limit meghaladása, azaz a szuper-felbontású mikroszkópia megalkotása Stefan W. Hell, Eric Betzig és William E. Moerner munkásságához fűződik, amiért 2014-ben Nobel-díjat kaptak² (3. ábra). A szuper-felbontású mikroszkópos technikák alapvetően két csoportra oszthatók, a sztochasztikus (pl.: STORM, PALM) és a determinisztikus módszerekre (pl.: STED, SIM)⁸. Mindkét módszer alapelve, hogy a fluoreszcensen gerjesztett vagy fluoreszcens fényt kibocsátó molekulák számát csökkentik térben, illetve időben. A sztochasztikus módszerek esetében feltétel, hogy az egyedi fluoreszcens molekulák – a módszer nevének megfelelően – véletlenszerűen villanjanak fel,

ezeokról sok ezer felvételt készítenek egymásután, majd ezeket egymásra vetítik. Amennyiben ezek a felvillanások a diffrakciós limitnél nagyobb távolságra helyezkednek el egymástól, a fényforrások pozíciója jól lokalizálható az egyes felvételeken. A másik csoport, a determinisztikus módszerek, a minta strukturált megvilágításán alapulnak, a látóteret pontról pontra haladva detektálják. Ezek közé tartozik például a stimulált emisszió kioltás (stimulated emission depletion, STED) jelenségén alapuló technika is¹³. Itt egyszerre két lézer fénynyalábot alkalmaznak a detektálás során. Az első a gerjesztő lézer, mely a fluoroforokat gerjesztett állapotba hozza, míg a másik, a kioltó lézer, az előző lézernyalábot fánk alakban körülveve, egyező fókusz síkban és területen szelektíven deaktiválja a gerjesztett molekulákat (koordináta-targetált nanoszkópia). Minél szűkebb a „fánk közepén a lyuk”, mely a kioltó lézer intenzitásával szabályozható, annál kisebb területen emittálnak a molekulák detektálható fényt, és annál jobbá válik a felbontóképesség¹⁴. A legfejlettebb STED mikroszkópok alkalmazásával akár 20-50 nm-es felbontás is elérhető, így a hagyományos fluoreszcens mikroszkópiával a sejten belüli, elmosódott, részlet-szegény, struktúrák is megfigyelhetővé váltak^{8,15–17}. A módszer – 3D STED – háromdimenziós detektálásra is alkalmas, a felbontás a z tengely mentén is javítható (3. ábra). Itt a fánk-alakú fényfókusz a z tengely mentén képes a gerjesztett fluoroforok kioltására, így a tengely menti felbontás közelítheti a laterálisat.



3. ábra A különböző mikroszkópiás módszerek detektálási tartományai¹⁴

3.3. Specifikus fluoreszcens jelölések

A biológiai folyamatok nyomon követéséhez szükséges háttérmentes és kontrasztos mikroszkópos felvételek készítése. Az elérhető felbontás további javításához az eszközök és a diffrakciós limit meghaladását célzó módszereken túl olyan fluoreszcens jelölőkre van szükség, amelyek membrán permeábilisak és szelektíven, helyspecifikusan jelölnek, ezen felül fényesek, fotostabilak, nem toxikusak, és lehetőleg fluorogének. A háttérfluoreszcencia kiküszöbölésére tett erőfeszítések eredményeként alkalmazott festékeknek a fluorogenicitás azt jelenti, hogy a fluoreszcens jelölő nem vagy gyengén emittáló formában van jelen egészen addig, amíg nem kötődik a célmolekulához, amikor is a fluoreszcencia tompítása megszűnik és megnő az intenzitása. A vizsgált minta természetes fluoroforjaitól (pl. aromás aminosavak) származó, UV gerjesztésre bekövetkező homogén háttérsugárzás (autofluoreszcencia), valamint az UV fény fototoxicitása miatt előnyösebb a természetes fluoroforokat kevésbé gerjesztő, mélyebb rétegekbe is behatoló vörös vagy közeli infravörös (NIR) hullámhosszúságú fényt emittáló fluoroforok alkalmazása^{5,18}. A biomolekulák *in cellulo* fluoreszcens jelölése számos módszerrel megvalósítható. Az alábbiakban csak nagy vonalakban, a teljesség igénye nélkül mutatom be a fehérjék jelölésének lehetőségeit. A módosítások fajtái több szempont alapján is csoportosíthatók¹⁹:

1. A módosítás megvalósítása szerint, azaz a módosítás lehet genetikailag kódolt fúziós címke, továbbá történhet kovalensen vagy nem-kovalensen (pl.: az affinitás-próbák), ezek közül az első esetben a módosítás sebessége, az utóbbinál a kötődés erőssége fontos paraméter.
2. A módosítás kizárólag fixált permeabilizált sejten lehetséges vagy megvalósítható élő sejten is.
3. A jelölés helyének szelektivitása szerint.
4. A jelölés során alkalmazott fluoreszcens jelölő mérete szerint.
5. Aszerint, hogy mennyire befolyásolja a jelölés a vizsgálandó fehérje struktúráját, funkcióját.

Az affinitás alapján történő jelölések csoportjában tartozik az immunfestés, ahol jelölt elsődleges vagy másodlagos antitest alkalmazásával jeleníthető meg a vizsgálandó molekula¹⁴. A kötődés erőssége nagy ($K_d < 1$ nM). A nagyon szelektív, megfelelően kontrasztos és nem háttérrel jelölés ellenére a módszernek több hátránya is van. A nanoszkópiás alkalmazásoknál viszonylag nagy jelentősége van a jelölő méretének, az IgG mérete (kb. 10 nm) összemérhető

a jelölt molekula méretével, így pl. 20 nm-es felbontás esetében már jelentős hibát (linkage error) okozhat. További hátrány, hogy a módszerrel intracelluláris jelölés csak fixált és permeabilizált sejteken valósítható meg. Szintén az affinitás alapján történő jelölések családjába tartoznak a receptor-ligandum kölcsönhatáson alapuló jelölések, ahol a ligandum eleve fluoreszcensen módosított. A jelölő molekula általában kicsi, a jelölés a kölcsönhatás erősségétől függ, több nagyságrend-tartományt átöl az erőssége. Az affinitás alapú csoportba tartoznak ezen felül, a citoskeletális elemeket jelölő molekulák, például az aktin filamentumokat fluoreszcens falloidinnel, míg a tubulint taxol származékokkal lehet jelölni. Az első esetben a falloidin nem membrán-permeabilis, így csak fixált és permeabilizált sejten történhet a jelölés, míg a taxol-származékok membrán-permeabilisak, így a jelölés élő sejten is történhet. A kötődés nagyságrendje gyenge-közepes, K_d : 10-100 nM tartományba esik. A molekulák mérete közepes-kicsi, mivel rövid peptidekről van szó.

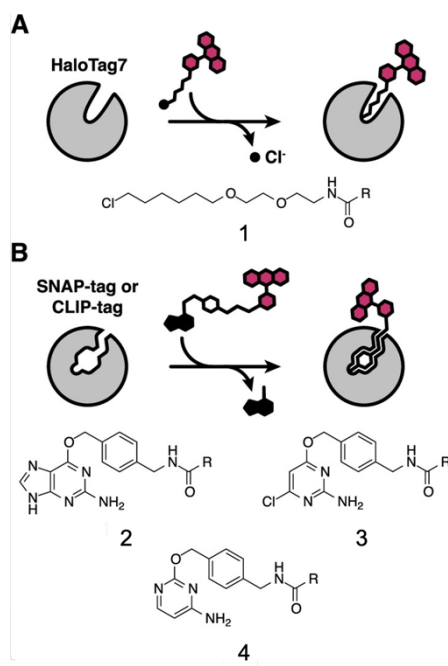
A genetikai módosítással bevitt fluoreszcens jelölések közé tartozik a fluoreszcens fehérjékkel (FP), mint fúziós címkével való módosítás. Ma már a spektrum teljes tartományát lefedik a fúziós címkéként alkalmazható protein-„tag”-ek. Mivel méretük 20-30 kDa, nagyságuk kb. 5 nm, mely az antitesteknél jóval kisebb, de még mindig összemérhető a vizsgálandó fehérjével⁵.

Ugyancsak fúziós címkék a biotin vagy avidin/streptavidin, (mely szintén affinitás alapú jelölés, de nagyon erős a kötődés), vagy az önjelölő enzimek, melyek mérete szintén az előző nagyságrendbe tartozik (~5 nm).

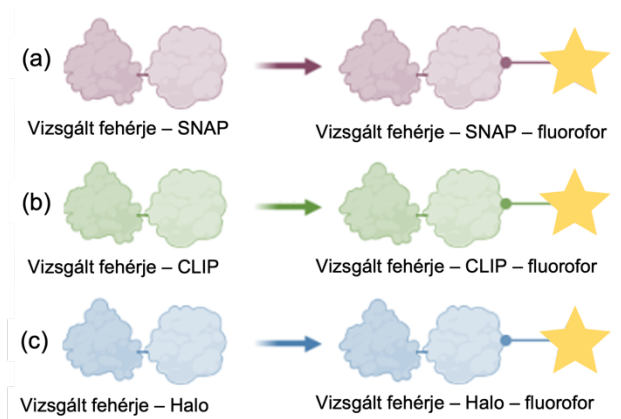
Az önjelölő enzim rendszerek (HaloTag, SNAP-Tag, CLIP-Tag) egy külsőleg hozzáadott szintetikus ligandum irreverzibilis kovalens kapcsolódását katalizálják^{20,21}. Ezen enzimfehérjék esetében szükséges, hogy termodinamikailag stabilak legyenek, nagy jelölési sebességgel és nagy szubsztrát specifitással rendelkezzenek. Ezek közül a HaloTag²² (Promega) egy bakteriális haloalkán dehalogenáz, mely irreverzibilisen reagál primer alki-halogenidekkel. A jelölések során a HaloTag alkalmazása előnyös, mivel a továbbiakban bemutatott önjelölő enzimekhez képest reakciósebessége nagyságrendekkel nagyobb. A SNAP-Tag²³(NEB) a humán O⁶-alkilguanin-DNS-alkiltranszferáz továbbfejlesztett változata, mely nagyobb jelölési kinetikával és specifitással rendelkezik a szubsztrátjára, az O⁶-benzilguaninra nézve. A CLIP-Tag²⁴ (NEB) a SNAP-Tag-ből továbbalakított önjelölő címke, melyet eleve úgy fejlesztettek, hogy a SNAP-Tag-gel párhuzamosan kétszínű jelölésre lehessen használni. Mivel a SNAP-Tag és a CLIP-Tag 20 kDa, a HaloTag 33 kDa mérete miatt a címkézett fehérje natív működését zavarhatja, így ügyelni kell a megfelelő linker hosszúságra, az expressziós szintre és a címke

C- vagy N-terminális helyzetére, azonban a módszer nagy előnye, hogy élő sejten is alkalmazható, így a sejten belüli makromolekula mozgások valós időben is nyomon követhetőek^{25–29}. A reakció sémák a 4. ábrán, a fluorofor bevitel sémája az 5. ábrán látható.

A legkisebb méretű módosítást kismolekulás fluoreszcens jelölőkkel lehet végrehajtani. Erre két lehetőség adódik, az első esetben a fehérjék egyes aminosavainak (lizin, cisztein, tirozin) szelektíven módosítható oldallánc-funkcióját (amino, tiol, hidroxil) támadjuk kovalens módosítókkal. Ez a legtöbb esetben kémiai szempontból szelektív, azonban a fehérjén (és főleg a sejten) belül rengeteg módosítható funkció van jelen, a módosítás nem lesz fehérje, illetve helyspecifikus³⁰. Helyspecifikus jelölés valósítható meg, ha a fehérjéhez pl. tetracisztein motívumot viselő FlaSH-tag-et fuzionáltatunk (genetikailag). Ebben az esetben tiol-szelektív reagens a módosító. Itt a specifitás nem teljeskörű, mely háttérsebb jelölést eredményez, további hátrány, hogy itt is csak a polipeptidlánc N- vagy C-terminálisára tehetjük a címkét. A helyspecifikus jelölés megvalósításának másik módszere, amikor a genetikai kód kiterjesztése révén a fehérje egyik aminosava helyére építünk be kovalens módosításra alkalmas (pl. bioortogonális) funkcióval rendelkező nem-természetes aminosavat (nt-AS). Bár ez több molekuláris biológiai munkával jár, elméletileg egy fehérje bármely aminosava lecserélhető nem-természetes aminosavra^{31,32}. Ennek megfelelően a fehérje bármely pontján lehetővé válik a helyspecifikus jelölés, így van lehetőség a fehérje funkcionalitásának megőrzésére és módosítására is.



4. ábra Az önjelölő enzimek reakció sémái és szubsztátjaik⁶²

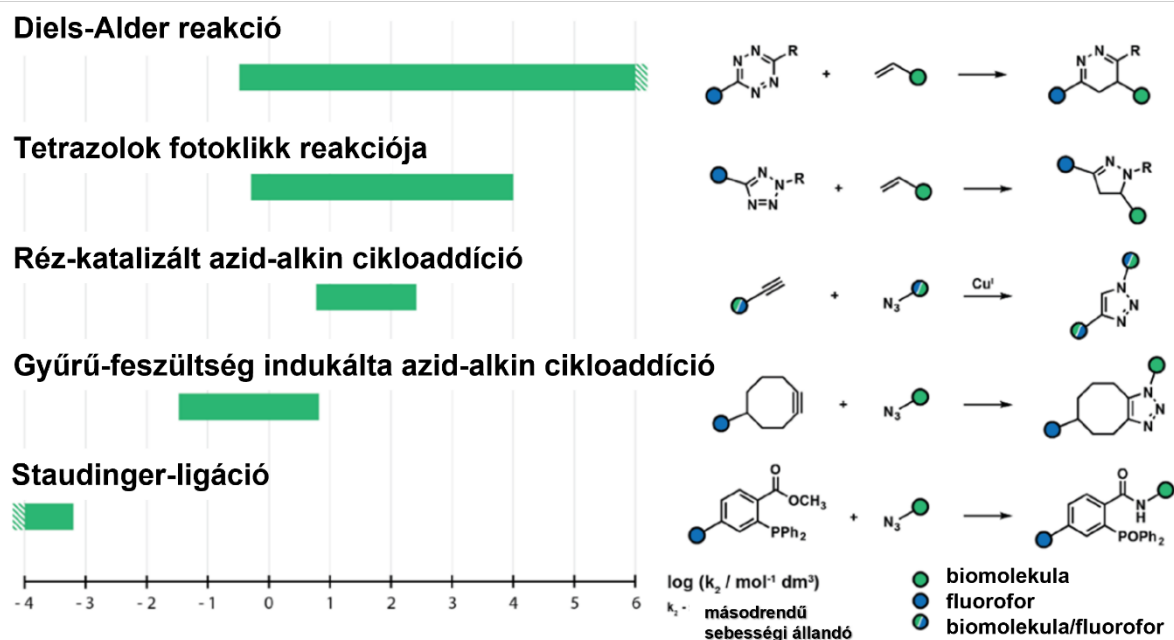


5. ábra Fehérje címkén keresztüli fluorofor bevitel²⁵.

3.4. Bioortogonális kémia

A bioortogonális kémia azon klikk reakciókat foglalja magában, melyek szerkezetidegen, biokompatibilis funkciós csoportok között játszódnak le nagy szelektivitással, fiziológiás körülmények között, kovalens kötést létrehozva, toxikus melléktermékek keletkezése nélkül³³. Mind a klikk kémia, mind a biológiai közegben használható formája forradalmi újításnak minősül, ezért jutalmazták Nobel-díjjal⁴ legnevesebb kidolgozóit, akik Carolyn R. Bertozzi³⁴, Morten Meldal³⁵ és K. Barry Sharpless³⁶. A legtöbb bioortogonális jelölési reakció kétlépcsős sémát követ, melyek közül az első a cél-biomolekula módosítása bioortogonális funkciós csoporttal, kémiai, enzimatis vagy metabolikus úton. A második lépés során az így bioortogonalizált rendszert szelektíven megcélozhatjuk egy komplementer bioortogonális funkciót hordozó reagenssel. Az alkalmazott bioortogonális reakciók a következők: tetrazinok és feszült gyűrűs alkének, mint például a fordított elektronigényű Diels-Alder (iEDDA) reakció. Ennek a reakciónak előnye, hogy a többi reakcióhoz képest kisebb fluorofor-koncentrációt igényel, így alkalmazása esetén kisebb a háttérzaj. További bioortogonális reakciók: Diels-Alder reakció, tetrazolok és alkének közötti fotoklikk reakció, azid-alkin cikloaddíció és az azidok, valamint elektrofil csapdát tartalmazó foszfánok közti Staudinger-Bertozzi reakció (6. ábra). A fenti kétlépcsős sémát az önjelölő enzimekkel történő jelölések során is lehet alkalmazni. Ebben az esetben az önjelölő enzim szubsztrátja bioortogonális funkciós csoporttal van módosítva, a második komponens pedig a komplementer bioortogonális reakciós partnerrel összekapcsolt kismolekulás fluoreszcens jelölő. A kétlépcsős módosítás előnye, hogy nem kell a különböző önjelölő címkéknek megfelelő szubsztráttal kapcsolt jelölőket külön elkészíteni, a bioortogonális reakció lehetővé teszi a nagyfokú kombinálhatóságot. Azonban jelenleg több, egyidejű bioortogonális jelölés még nehezen valósítható meg, mivel jelenleg az egyetlen élő

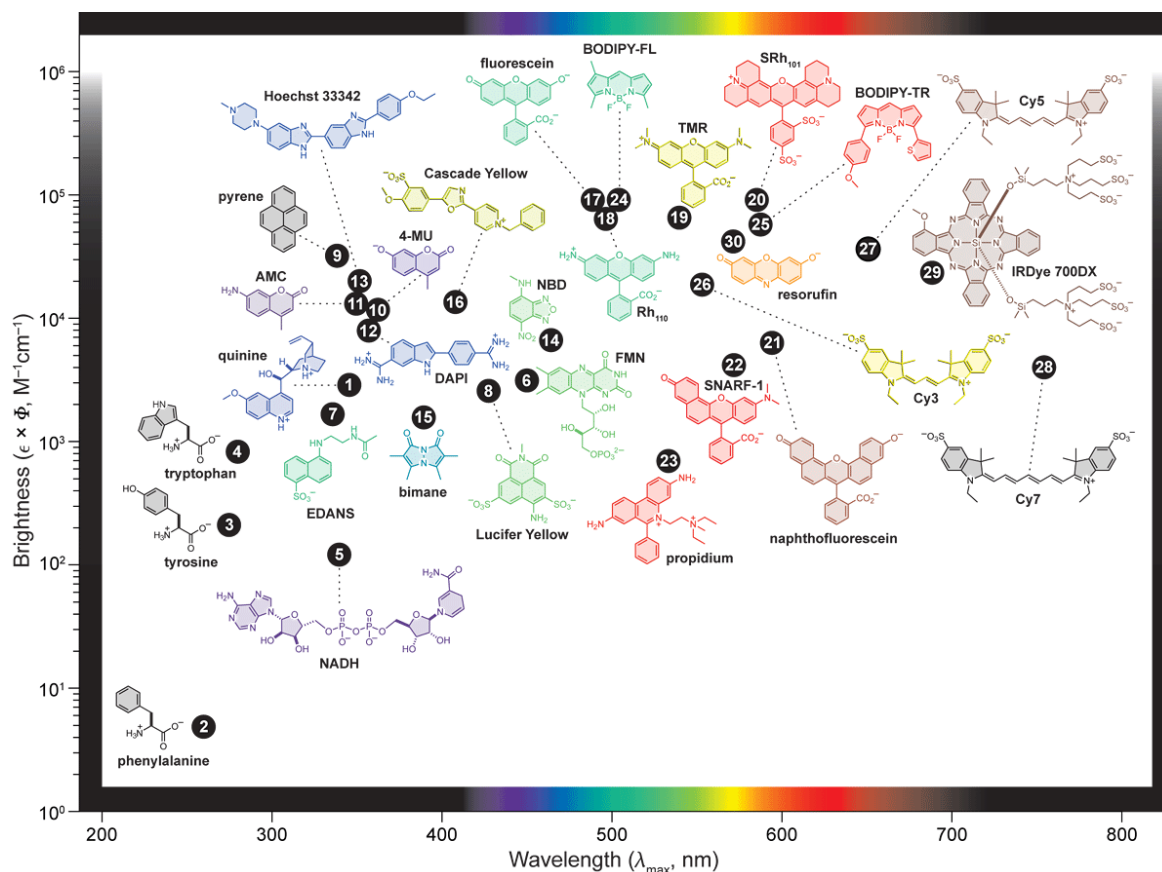
sejtek esetében igazán jól alkalmazható reakció típus (a teljes bioortogonalitása és különösen a nagy reakciósebessége miatt) az iEDDA reakció^{25,37}.



6. ábra Bioortogonális reakciók típusai és sebességi állandóik³³

3.5. Fluoreszcens kémiai jelölők

A kisméretű fluoreszcens festékeknek több előnyös tulajdonságuk van a többi jelölési módszerrel szemben, például kevésbé befolyásolják a célfehérje tulajdonságait. A legtöbb fluoreszcens festékben található π -kötés, illetve gyakran aromás vegyületek, így könnyen gerjeszthetőek. Moláris tömegük jellemzően 200-2000 g/mol. Manapság a legnépszerűbb fluoreszcens festékek között szerepel az Atto molekulacsalád és a rodamin-származékok, de ezeken kívül még nagyon sok festék létezik, melyekre több példát láthatunk az 7. ábrán³⁸. Ezeket a molekulákat folyamatosan fejlesztik, mely fejlesztések célja a nagyobb kvantumhatásfok, kisebb pH-függés, nagyobb fotostabilitás, és nagyobb Stokes-eltolódás elérése.



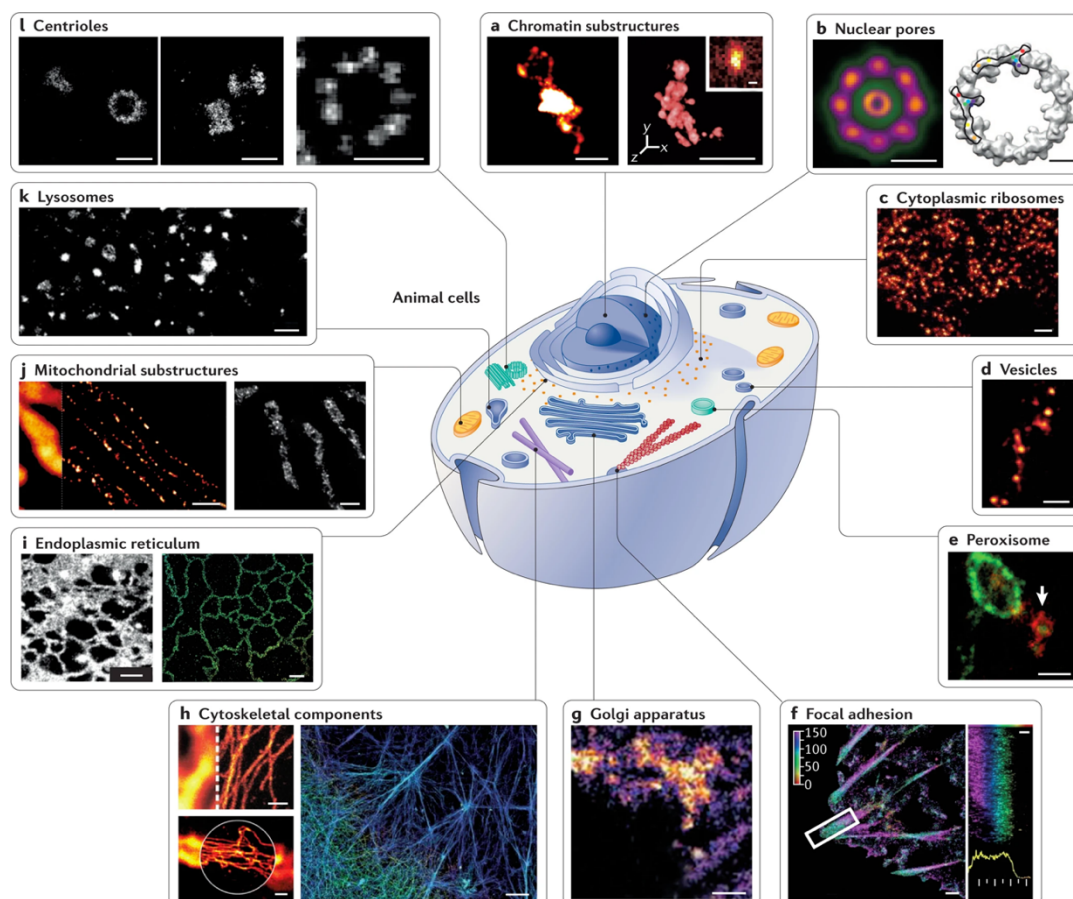
7. ábra Fluoreszcens kismolekulák emissziós maximuma és fényessége³⁸

3.6. Többszínű jelölések és többszínű STED lehetőségei

A szuper-felbontású mikroszkópos technikák – köztük a STED mikroszkópia – fejlődése megteremtette a lehetőséget a sejtbeli struktúrák részletgazdag megfigyelésére, azonban a további fejlesztéseket, különösen a többszínű jelölések kialakítását, jelen pillanatban a megfelelő jelölési rendszerek hiánya korlátozza^{21,39}. További nehézséget jelent, hogy az amúgy is drága mikroszkópok felszereltsége általában egy kioltó lézerre korlátozódik, így ennek megfelelően kell kiválasztani az egyidejűleg használni kívánt festékkombinációkat. Ezen jelölések kialakításához sok jellemzőt figyelembe kell venni, például a fluoreszcens jelölők spektrális tulajdonságait, mivel a STED mikroszkópia esetében különösen fontos a jelölők spektrális elválasztása két vagy több gerjesztési, illetve detektálási csatornára^{5,20,40}. A nagy Stokes-eltolódással rendelkező fluoroforok kifejezetten hasznosak, mivel egyszerűsítik a többszínű képalkotást a detektálási csatornák számának, és a jelölők csatornák közötti áthallásának csökkentésével^{6,39}. További nehézséget okoz a többszínű jelölések során, hogy a célmolekulákat szelektíven kell módosítani, és a párhuzamosan alkalmazható módosítások száma korlátozott élő sejtekben⁴¹.

3.7. Választott struktúrák és fehérjék

A konfokális és szuper-felbontású mikroszkópos technikák szinte minden eukarióta sejtalkotó megfigyelését lehetővé teszik^{17,42–44}. Az irodalmi példákban leggyakrabban a citoszkeletont, mitokondriumokat, vezikulumokat, a magmembrán vagy a plazma fehérjét, illetve a DNS részleteket vizsgálják. Ezeket az 8. ábra foglalja össze.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

8. ábra Célfehérjék szuper-felbontású mikroszkópiás alkalmazásokhoz¹⁴

A következő fehérjéket választottuk a munkám során (9. ábra):

Hisztón H2B: Evolúciósan erősen konzervált 126 aminosav hosszúságú fehérje. A sejtmagon belüli körülmények között pozitív töltésű, mely lehetővé teszi kötődését a negatív töltésű DNS-hez. A H2A, H3 és H4 fehérjékkel (2-2 db) oktamert alkot, melyre 147 bázispár hosszúságú DNS szakasz tekeredik fel (bal mentesen, 1,67-szer) a DNS konzerválódás első szintjén. Ekkor a nukleoszómákat, azaz a DNS-sel körülvett hiszton oktamereket, 10-80 bp hosszúságú DNS szakasz köti össze. A nukleoszómák akadályozzák a DNS átíródását, segítik a kromatin rögök kialakulását. A hiszton fehérjék acetilálódása esetén a pozitív töltésük, így a DNS-hez való

kötődésük erőssége csökken, a szerkezet fellazul, így a DNS transzkripcionálisan aktívvá válik^{45,46}. Epigenetikai kutatások egyik fontos célpontja.

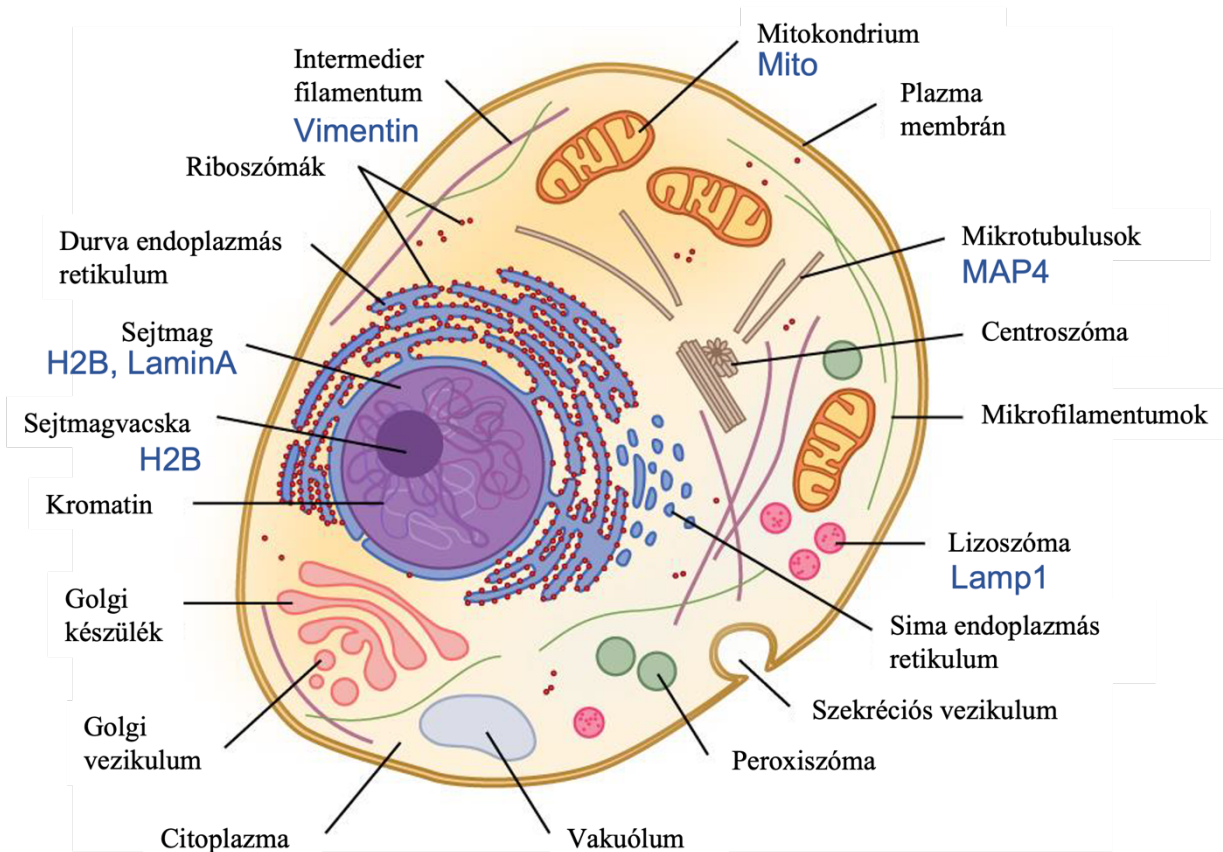
LaminA: A belső maghártya belső felét borító, kétdimenziós intermedier filamentumokból álló hálót, a nukleáris laminát alkotó fehérjék egyike a LaminB és LaminC mellett. Ezek közül a LaminB tapad ki a magmembránhoz, míg a többi a hálózat kialakításához szükséges. A háló megfelelő felületet biztosít a kromoszómák, illetve kromatin rögök kitapadásához, továbbá a sejtmag alakjának biztosításán túl a DNS replikációban és javításban is szerepe van. A nukleáris lamina minden egyes sejtsztódás során lebomlik, majd a leánysejtekben újra alakul, ezt a Lamin fehérjék foszforiláltsága szabályozza⁴⁷. Mutációi összefüggésbe hozhatók számos betegséggel, mint például a progeria, a kardiomiopátia és az Emery-Dreifuss izomdisztrófia.

Lamp1: Lizoszóma-asszociált membrán (gliko)protein 1 és Lamp2 a lizoszómák membránfehérjéinek 50%-át teszik ki. Felelősek a lizoszóma pH és a katabolizmus fenntartásáért. Feladatuk külön-külön nehezen meghatározható, mivel az egyik hiánya esetén a másik magasabb koncentrációban termelődik⁴⁸. A lizoszómák apró szabálytalan alakú sejtorganellek, amelyek az endocitózissal (főleg pinocitózissal, ritkábban fagocitózissal) felvett anyagok sejten belüli emésztésért felelősek. A belsejükben savas pH található, melyen proteázok, lipázok és egyéb biopolimer bontó enzimek aktívak. Amikor a belsejükben lévő közeg már túl savas az enzimek működéséhez reziduális testté alakulnak, majd a belsejükben maradó, a sejt számára nem hasznosítható anyagokkal együtt exocitózis során távoznak a sejtől. Az autofágiában is szerepet kapnak az előregedett sejtalkotók emésztésével⁴⁷.

Mito: A mitokondrium belső membránjához kapcsolódó citokróm-c oxidáz egyik alegysége, ami az elektronszállító lánc egyik eleme. A citokróm-c elsődleges szerkezete nagyjából 100 aminosavból álló lánc, mely nagyon konzervált az eukariótákban, ennek megfelelően hasznos a kladsztika tanulmányozásában. Az apoptózisban korai fázisában is szerepe van, ugyanis a sejtbeli kalcium szint növekedésével egy komplex részeként leválik a mitokondrium membránjáról, a citoplazmába jut, majd az endoplazmás retikulum (ER) egy receptorához kötődve növeli az ER kalcium kibocsátását, ami növeli a mitokondriumból történő citokróm-c felszabadulást is. Így egy pozitív visszacsatolási hurkon keresztül a szerepe van a citotoxikus kalcium szint elérésében a citokróm-c-nek is, továbbá a nagyarányú felszabadulása aktiválja a sejt elpusztításáért felelős kaszkádot⁴⁹. Mivel az egész citokróm-c fehérje 100 aminosav hosszúságú a Mito alegység is nagyon rövid, mindössze 28 aminosav, melynek kódoló DNS-e 84 bázispár hosszúságú⁴⁴.

Vimentin: Az intermedier filamentumok egyik alkotó fehérjéje, melyek a sejtvázatot alkotják a mikrotubulusok és a mikrofilamentumok mellett. A vimentin támasztja és rögzíti a sejtalkotókat a citoszolban, azaz csatlakozik a sejtmaghoz, az endoplazmás retikulumhoz és a mitokondriumokhoz is. A helikális szerkezetű vimentin monomerekből álló szálak dinamikus rendszert alkotnak, mely a sejt integritásának fenntartását szolgálja⁵⁰.

MAP4: A Mikrotubulus Asszociált Protein 4 (MAP4), egy fontos nem-neurális fehérje, ami a mikrotubulus szálakhoz kapcsolódik. Ez a fehérje elősegíti a mikrotubulusok összeépülését, a sejtosztódás interfázisában rögzíti a mikrotubulusokat, megakadályozza a dinamikus változó rendszer szétesését. Ubikvitinezett formája a mitotikus orsó kialakulásában és pozícionálásában játszik fontos szerepet, így jelölésével a sejtvázatot alkotó mikrotubulusok vizsgálatán túl a sejtosztódás folyamatai is vizsgálhatóak⁵¹.



9. ábra Az általunk választott sejtalkotók elhelyezkedése

4. Célkitűzés

A kutatócsoportunkban célul tűztük ki az előállított fluoreszcens vegyületek vizsgálatához olyan plazmid-tár létrehozását, melyben szempont volt, hogy lehetővé váljon minél több olyan modell célfehérje jelölése melyek struktúrája alkalmas szuper-felbontású mikroszkópos vizsgálatra. Ezen felül további elvárás volt a fehérjék kiválasztásánál, hogy patofiziológiás folyamatokban részt vegyenek így egyszersmind lehetséges gyógyszerhatóanyag célpontok is legyenek. A plazmid-tárral olyan platformot kívántunk létrehozni, ahol többfajta elven megvalósítható jelölésre alkalmas célpontok vannak, mint például önjelölő enzim címkék, fúziós riporter fluoreszcens fehérjék és legfontosabb elemként nem-természetes aminosavak (nt-AS beépítésére szolgáló mutációk. Az nt-AS beépítés a genetikai kód kiterjesztésével, amber stop-kodon szuppressziós eljárás útján kivitelezhető és a frissen Nobel-díjjal jutalmazott bioortogonális fluoreszcens jelölések megvalósításának egyik lehetséges módja. A plazmid-tár kialakítását elsősorban azért kezdeményeztük, hogy egyidejű többszínű jelöléseket tudjunk kivitelezni, és vizsgálni, nem csak konfokális, hanem szuper-felbontású mikroszkópos technikával is. A plazmid-tár korábbiakban elkészített elemei a fenti sémákat követik, egy részük esetében a célfehérjéhez – megfelelő hosszúságú linker szakasszal – kapcsolt HaloTag önjelölő enzimen keresztül valósítható meg a jelölés. Az önjelölő enzim, fúziós címkeként, a H2B hiszton, LaminA nukleáris lamina, Vimnetin citoszeletális fehérje és Lamp1 lizoszóma fehérjék jelölését teszik lehetővé.

Jelen TDK-dolgozatomban célul tűztük ki a plazmid-tár olyan irányú bővítését, mely részben magában foglal újabb önjelölő enzimeket (SNAP-Tag, CLIP-Tag), illetve további terápiás célpontként szolgáló fehérjéket (MAP4 mikrotubulus asszociált fehérje és Mito mitokondrium fehérje) kódoló szakaszok beépítésével kialakított vektorok elkészítését.

Céljaink között szerepelt a plazmidok tesztelése, melynek során egyenként emlőssejtekbe transzfektáljuk azokat, majd az önjelölő enzim fluoreszcens jelölővel konjugált szubsztrátja segítségével megfestjük a célfehérjéket és konfokális fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáljuk a kifejeződést.

Következő lépésként a kibővített plazmid-tár különböző elemeinek kombinációjával kivitelezett egyidejű többszínű fluoreszcens jelölések kidolgozását és optimalizálását tűztük ki úgy, hogy a folyamat élő sejtekben is megvalósítható legyen. A fluoreszcens kismolekulás jelölők használata különösen alkalmassá teszi a módszert a sejtekben lejáró folyamatok

nyomon követésére és fehérjék kolokalizációjának vizsgálatára. A metodika fejlesztése során az önjelölő enzimek kismolekulás fluoreszcens jelölőkkel konjugált szubsztrátjait tervezzük használni, és bár a jelölés élő sejteken zajlik, az optimalizálás időszakában a mikroszkópos vizsgálatokat fixált sejteken végezzük – a minta hosszabb idejű vizsgálatát és tárolhatóságát biztosítva –, így a fixálás körülményeinek kidolgozása is szükségessé válik.

A későbbi céljaink között szerepel a szuper-felbontású mikroszkópiára alkalmas többszínű jelölések kivitelezése is. A felbontás növelése esetünkben egyetlen kioltó STED lézer alkalmazásával történne, de ez a festék kombinációk megválasztásánál nagy kihívást jelent.

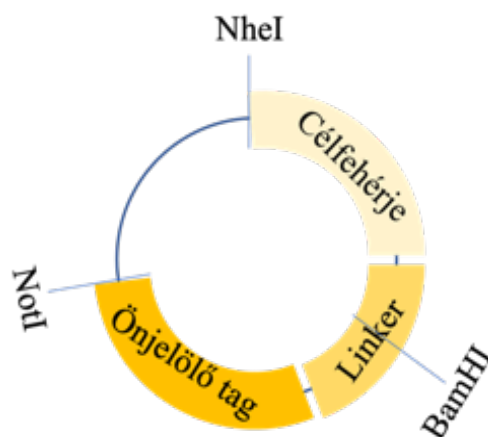
5. Eredmények és értékelésük

5.1. Plazmidok elkészítése

A korábban már ismertetett célfehérjék (CF) (melyek a citoskeletáris Vimentin, a mikrotubulus asszociált MAP4, a lizoszóma membránban elhelyezkedő LAMP1, a H2B hiszton, a mitokondrium fehérje (a citokróm C alegység), Mito és a sejtmagmembránt belülről támasztó nukleáris lamina egyik alkotója, a LaminA), valamint az önjelölő enzimek (HaloTag, SNAP-Tag, CLIP-Tag) kiválasztása után megrendeltük a következő kiindulási vektorokat az Addgene⁵²-től: pSNAP-Tag (#101135)⁵³, pCLIP-Tag (#101136)⁵⁴, pAG506-mito-frFAST (#160057)⁵⁵. Ezeken felül a plazmid-tár már meglévő, elemeit is felhasználtuk, melyek a H2B-HaloTag, Lamp1-HaloTag, Lamin-HaloTag⁵⁶⁻⁵⁸ korábbi munkám során készített plazmidok, továbbá a MAP4-GFP^{TAG}, melyet Kereszty Réka készített Dr. Szatmári Ágnes témavezetésével, illetve a Vimentin-HaloTag melyet Dr. Szatmári Ágnes készített. A kiindulási plazmidok plazmid térképei a függelékben találhatók (19-20. ábra és 22-24. ábrák).

A plazmidok elkészítése során témavezetőmmel figyeltünk arra, hogy az elkészülő plazmidok modulonként könnyen cserélhető inzertek formájában tartalmazzák a célfehérjét és a fúziós címkét, azért, hogy a későbbiekben egy újabb CF-et vagy önjelölő enzimet restrikciós endonukleázokkal történő hasítást követő ligálással ki lehessen cserélni a plazmid-tár meglévő elmeiben, így a tár flexibilitásának megőrzése mellett további bővítése is egyszerűbb lesz. Ebből eredően a munkám során törekedtünk a költség és időbeli hatékonyságra, azaz, hogy a lehető legkevesebb PCR reakció futtatása legyen szükséges.

A kiindulási plazmidjaink legtöbb esetben rendelkeztek a szükséges NheI és BamHI hasítóhellyel a célfehérje, illetve BamHI és NotI hasítóhellyel az önjelölő enzim kódoló szakaszának beillesztéséhez. Azonban az SNAP-Tag, CLIP-Tag és Mito kódoló plazmidjain nem volt ilyen, így a megfelelő hasítóhelyeket tartalmazó primerekkel szükséges volt a kódoló DNS szakaszok felszaporítása. Ehhez az önjelölő enzimek reakciójához „többfunkciós” forward primert terveztünk, melyek két restrikciós endonukleáz hasítóhelyet is tartalmaznak, míg a reverz primert és pAG506-mito-frFAST PCR reakciójához az alábbi (10. ábra) sémának megfelelő hasítóhely-párt tartalmazó primereket terveztünk.



10. ábra Az elkészítendő plazmidok sematikus képe

1. táblázat A primer tervezéshez használt szekvenciák

Primer részletek	
Flanking régió	Primer 5' végén 3-6 nukleotid hosszú szakasz
NheI hasítóhely	GCTAGC szekvencia
BamHI hasítóhely	GGATCC szekvencia
AgeI hasítóhely	ACCGGT szekvencia
NotI hasítóhely	GCGGCCGC szekvencia
Fehérje eleje	A klonóizandó fehérje első vagy utolsó néhány (15-25) nukleotidja a primer 3' végén, amivel a templát DNS-hez tud tapadni
Fehérje vége	
Távtartó szakasz	Linker szakasz, amivel a kereteltolódás mutáció kiküszöbölhető és a két fúziós fehérjének a megfelelő mozgékonytságot biztosítja

2. táblázat A Mito, a SNAP-Taget és a CLIP-Taget kódoló inzertek felszaporításához tervezett primerek. A színek az 1. táblázatban szereplő régiók szinkódjával megfeleltethetők.

Primer	Szekvencia	Hosszúság (nt)	Olvasás-pont (°C)	GC tartalom (%)
Mito forward	TTATT GCTAGC GCTACCGGACTCAG	25	66	52
Mito reverse	ATTAAT GGATCC AAGGCGGTG GCAGATCTCAACGAATGG	39	74	49
SNAP-forward	TTATT GGATCC ACCGGTGGCGGTG ATGGACAAAGACTGCGAAATGAAGC	49	79	51
SNAP-reverse	ATTAAT GCGGCCGC TTA ACCCAGCCCAGGCTTGCC	35	79	60
CLIP-forward	TTATT GGATCC ACCGGT GGCGGTCTA ATGGACAAAGACTGCGAAATGAAGC	49	79	51
CLIP-reverse	ATTAAT GCGGCCGC TTA ACCCAGCCCAGGCTTGCC	35	79	60

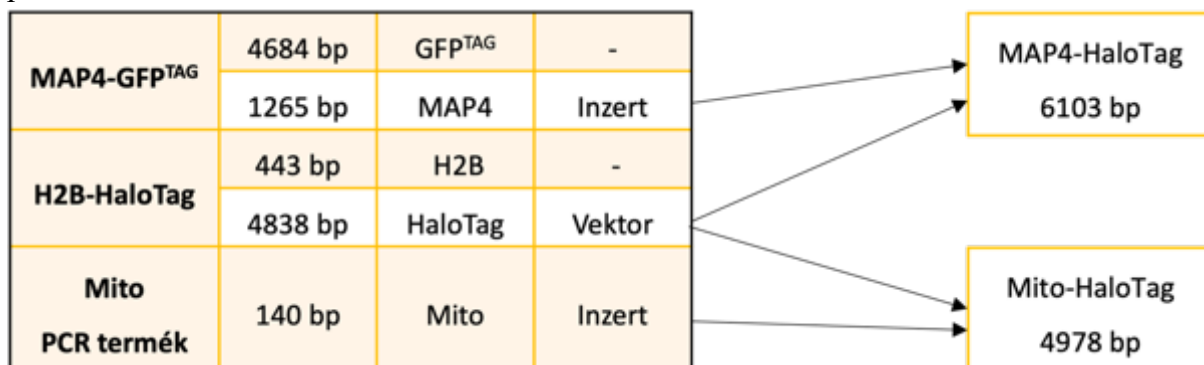
A szükséges primerek megtervezéséhez az 1. táblázatban összefoglalt elemeket használtuk, míg a felhasznált primerek szekvenciái a 2. táblázatban szerepelnek. A PCR termékek szekvenciái a függelék 21. ábráján láthatók.

Mint az a táblázatban látható a Mito primerek csak nagy vonalakban felelnek a primer párokkal szemben támasztott elvárásoknak (jelentősen eltér a reverse és forward irányú primerek hossza, így az olvadáspontjuk is), azonban a felszaporítandó szekvencia kis mérete miatt, nem volt lehetőség megfelelőbb primerek tervezésére. A SNAP-Tag és CLIP-Tag PCR reakciók elegyhez a magas olvadáspontok miatt 3% DMSO-t adtunk, és az összes reakcióelegyhez a magas GC%-hoz ideális puffert használtuk. A Mito esetében 55 °C-on, a SNAP-Tag és CLIP-Tag esetében 65 °C-on zajlott a primerek betapadása. Az előbbi táblázatban található adatok a teljes primerre vonatkoznak, azonban a PCR reakció körülményeinek meghatározása során csak a DNS templáthoz illeszkedő szakaszokat szokás figyelembe venni, így a hosszú túlnyúló 5' végek miatt a gyakorlatban használt olvadáspontok alacsonyabbak.

A SNAP-Tag és CLIP-Tag termékek tisztítása az általánosan használt metodika (Módszerek részben leírtak) szerint történt, míg a Mito PCR termék tisztításánál ezt a metodikát finomítani kellett, a PCR termék hosszának rövidege miatt, így ugyanezzel a plazmid tisztító készlettel, azonban a rövid (100-300 bp hosszúságú) DNS szakaszokhoz ajánlott módon végeztük. Ez főként alacsonyabb hőmérsékletre történő melegítéseket (50 °C a 65 °C helyett), illetve rövidebb és alacsonyabb sebességű centrifugálási lépéseket (fél perc, 7200 RPM) foglalt magában. A PCR reakciók lefutása és a termékek tisztítása után már lehetőségünk volt az összes szükséges konstrukciót – a 10. ábrán bemutatott séma szerint – összeállítani restrikciós endonukleázokkal történő hasítás és ligálás módszerével.

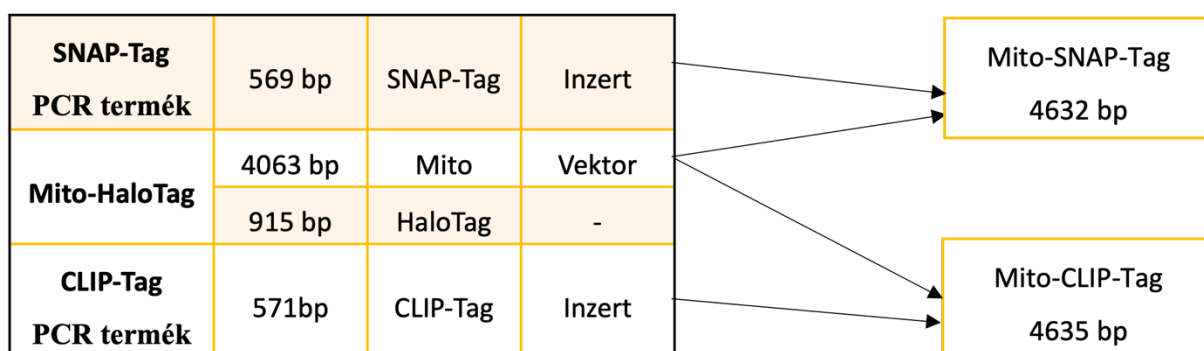
Elsőként a HaloTag-címkét tartalmazó plazmid-sorozat hiányzó elemeit készítettük el. Ehhez NheI és BamHI restrikciós endonukleázokkal hasítottuk a Mito PCR terméket és a MAP4-GFP^{TAG} plazmidot az inzertek, illetve a H2B-HaloTag plazmidot a vektor elkészítéséhez. Majd az alábbi kombinációk szerint ligáltuk őket a Módszerekben leírtaknak megfelelően (3. táblázat).

3. táblázat Hasítással kapott szakaszok és ligálással kapott HaloTag önjelölő enzimet kódoló plazmidok



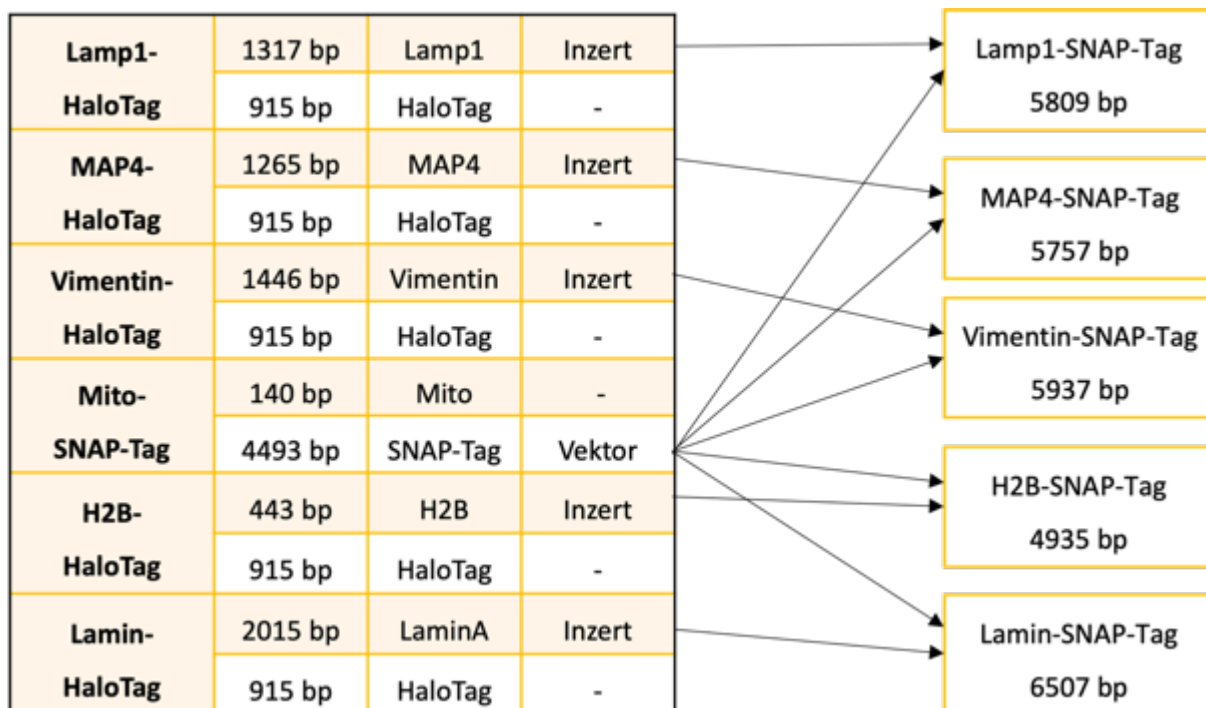
Ezt követte a SNAP-Tag és CLIP-Tag önjelölő címkét hotdozó plazmidok előállítás. Ehhez először a Mito-HaloTag vektorban a HaloTag önjelölő enzimet kódoló szakaszt cseréltük a SNAP-Tag és CLIP-Tag kódoló DNS-ére BamHI és NotI restriktions endonukleázokkal és ligálással (4. táblázat). Ez a vektorváz fog alapul szolgálni, és a többi célfehérjét kódoló szakaszt fogjuk a Mito helyére beilleszteni. Azért a Mito célfehérjével kezdtük az újabb önjelölő enzimet kódoló plazmidok elkészítését, mert ez rendelkezik a legrövidebb kódoló DNS szakasszal, így ennél a legegyszerűbb szekvenálással ellenőrizni a megfelelő szakaszok lecserélésének sikerességét.

4. táblázat Hasítással kapott szakaszok és ligálással kapott Mito célfehérjét kódoló plazmidok

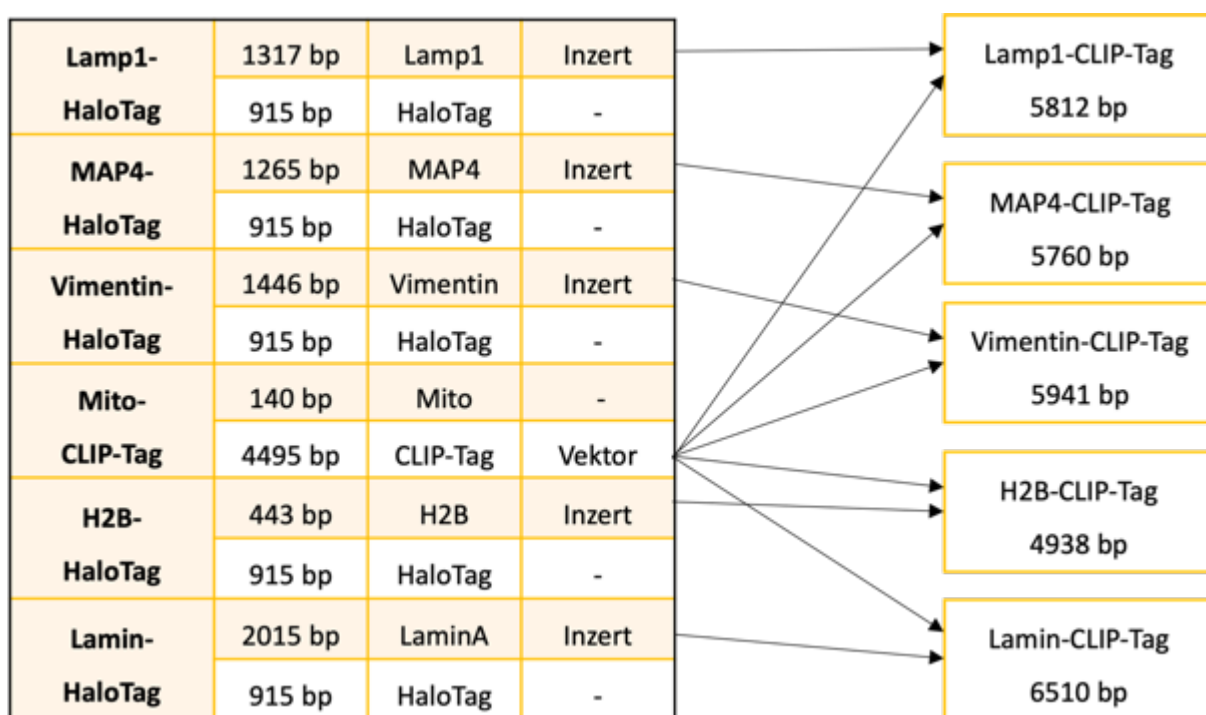


Ezen lépések eredményeképpen kezünkben volt három olyan vektorváz (Mito-HaloTag, Mito-SNAP-Tag, Mito-CLIP-Tag), melyekben a választott CF-eket könnyen le tudtuk cserélni NheI és BamHI restriktions endonukleázzal történő hasítással majd a megfelelő szakaszok ligálásával. (5. és 6. táblázat). Így végül 14 db új plazmid konstrukciót állítottunk elő sikeresen, amit a szekvenálások eredménye is alátámasztott.

5. táblázat Hasítással kapott szakaszok és ligálással kapott SNAP-Tag önjelölő enzimet kódoló plazmidok



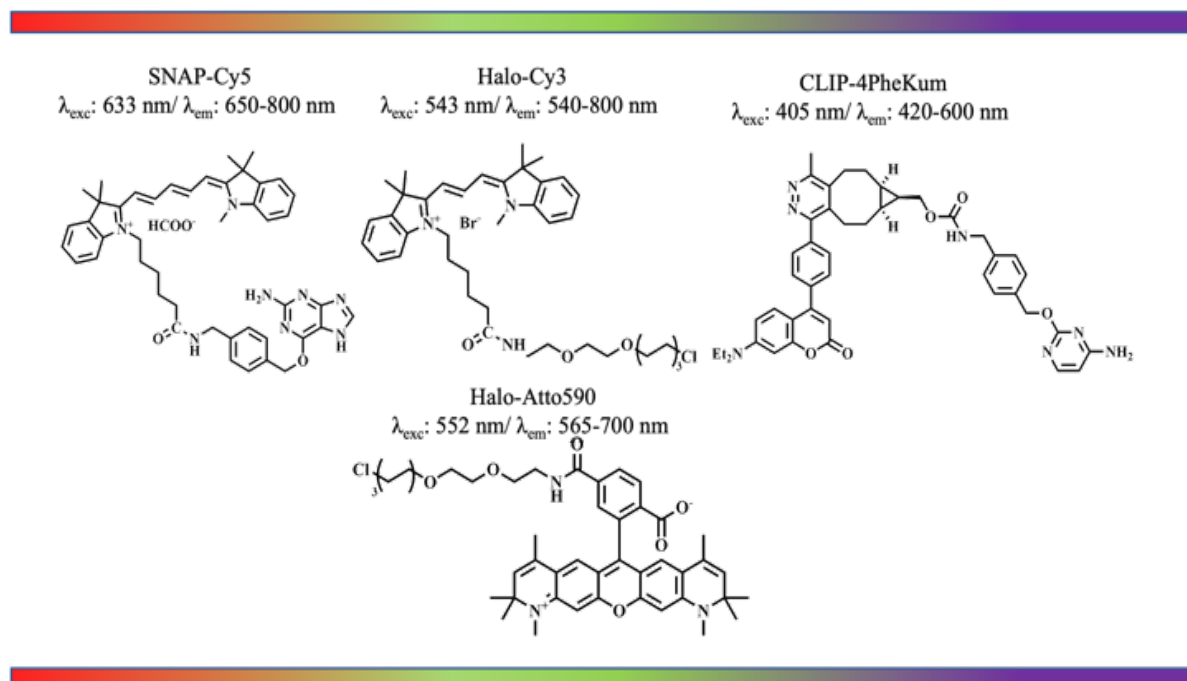
6. táblázat Hasítással kapott szakaszok és ligálással kapott CLIP-Tag önjelölő enzimet kódoló plazmidok



5.2. Az elkészített plazmidok kipróbálása, célfehérjék expressziója, fluoreszcens jelölése és mikroszkópos vizsgálata

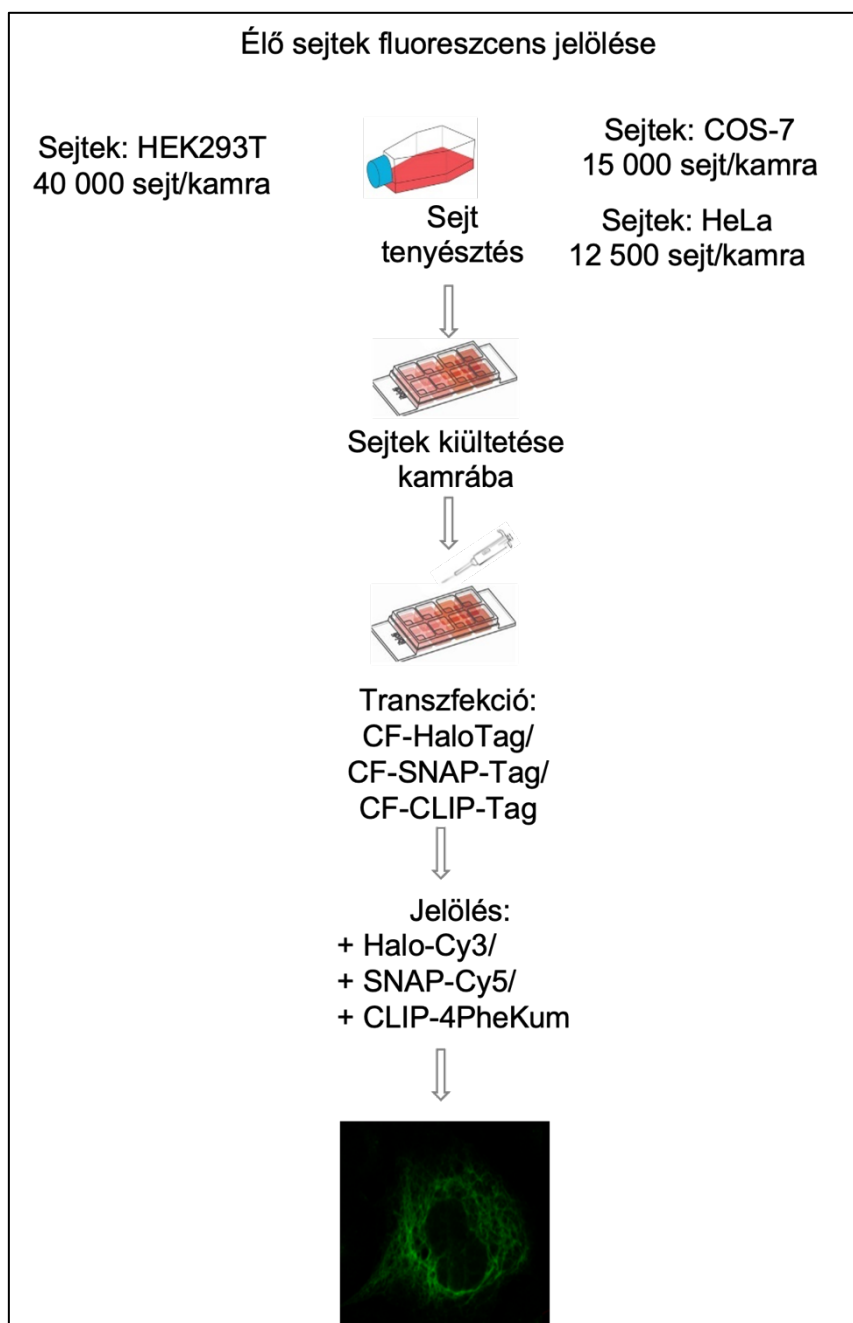
Első lépésként az elkészített plazmidokat egyesével transzfektáltuk, majd a kifejeződés mértékét és az egyes fluoreszcens jelölések hatékonyságát konfokális mikroszkópos felvételek készítésével ellenőriztük. A folyamat az 12. ábrán látható séma szerint zajlott. (A kísérletek során a sejtek transzfektálását és jelölését én végeztem, míg a mikroszkópos felvételeket témavezetőm készítette.)

Ennél a lépésnél a különböző célfehérjékhez úgy választottuk ki a megfelelő célsejteket, hogy a citoplazmában található sejtalkotók jelöléséhez (Vimentin, MAP4, Lamp,1 Mito kivételével) COS-7 sejteket (13. ábra), míg a sejtmagi jelölésekhez és a jobb transzfekciós hatékonyság miatt a mitokondrium jelöléséhez (H2B, LaminA és Mito fehérjék) HEK293T sejteket (14. ábra) transzfektáltuk. Ennek az oka, a sejtvonalak eltérő sejtmag/citoplazma aránya, a sejtmagi jelölések jobban láthatók a magasabb, nagyobb sejtmaggal rendelkező HEK293T sejtekben, míg a citoplazmabeli struktúrák – különösen a sejtíváz – megfigyeléséhez előnyösebb a laposabb, jobban elterülő, arányaiban kisebb sejtmaggal de nagyobb citoplazmával rendelkező COS-7 sejtívonal.

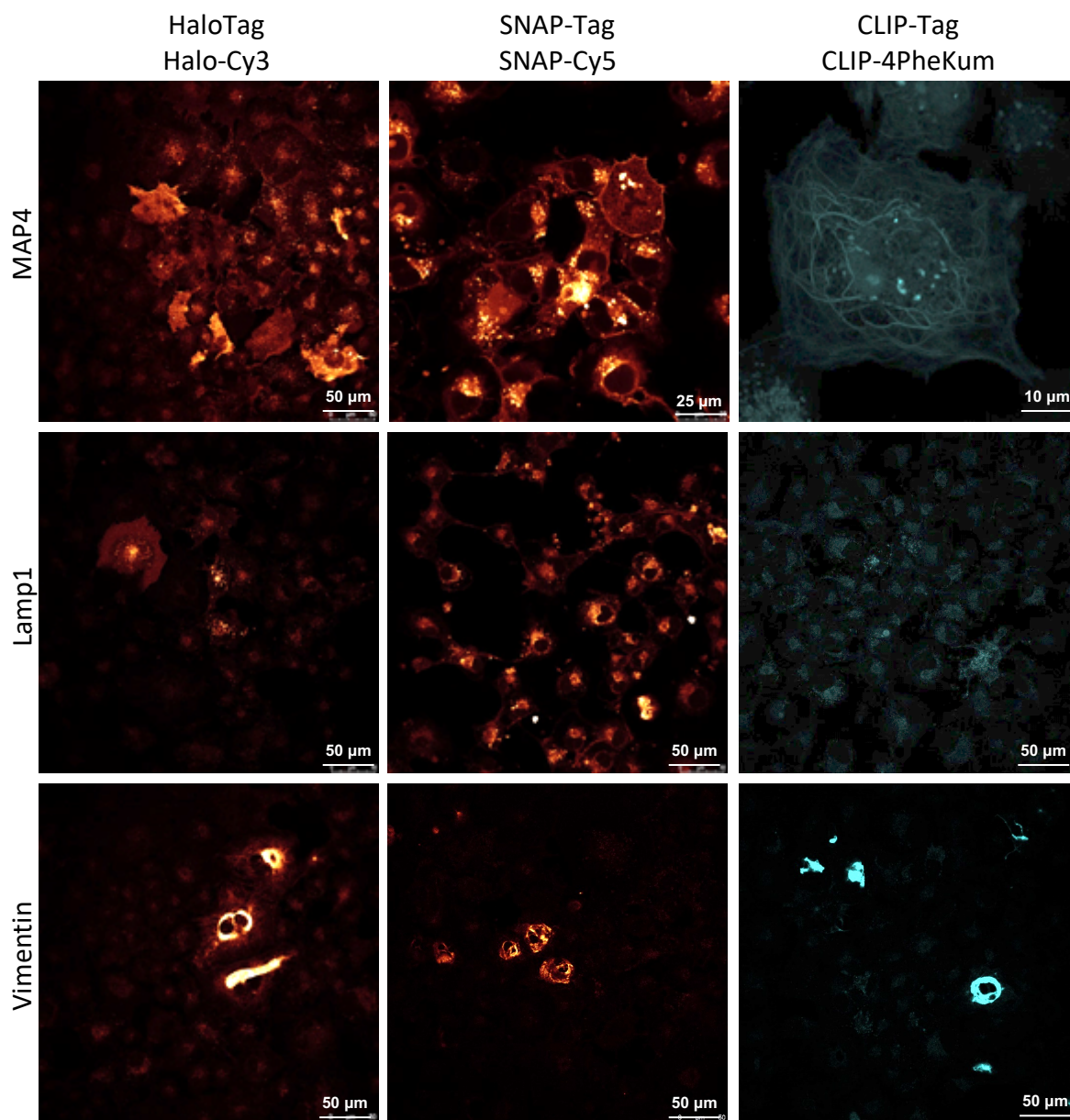


11. ábra A dolgozatban bemutatott jelölések során használt fluoreszcens jelölők és spektrális tulajdonságaiknak megfelelő mikroszkópos gerjesztési hullámhossz és detektálási hullámhossz-tartomány.

A fluoreszcens jelöléseket élő sejteken végeztük, olyan kismolekulás jelzővegyületek segítségével melyeket az önjelölő enzim szubsztrátjával a jelölés előtt kovalensen összekapcsolták (11. ábra). A TDK munka során felhasznált jelölőket Unyi Zsombor, illetve témavezetője, Dr. Cserép B. Gergely készítették a számunkra.



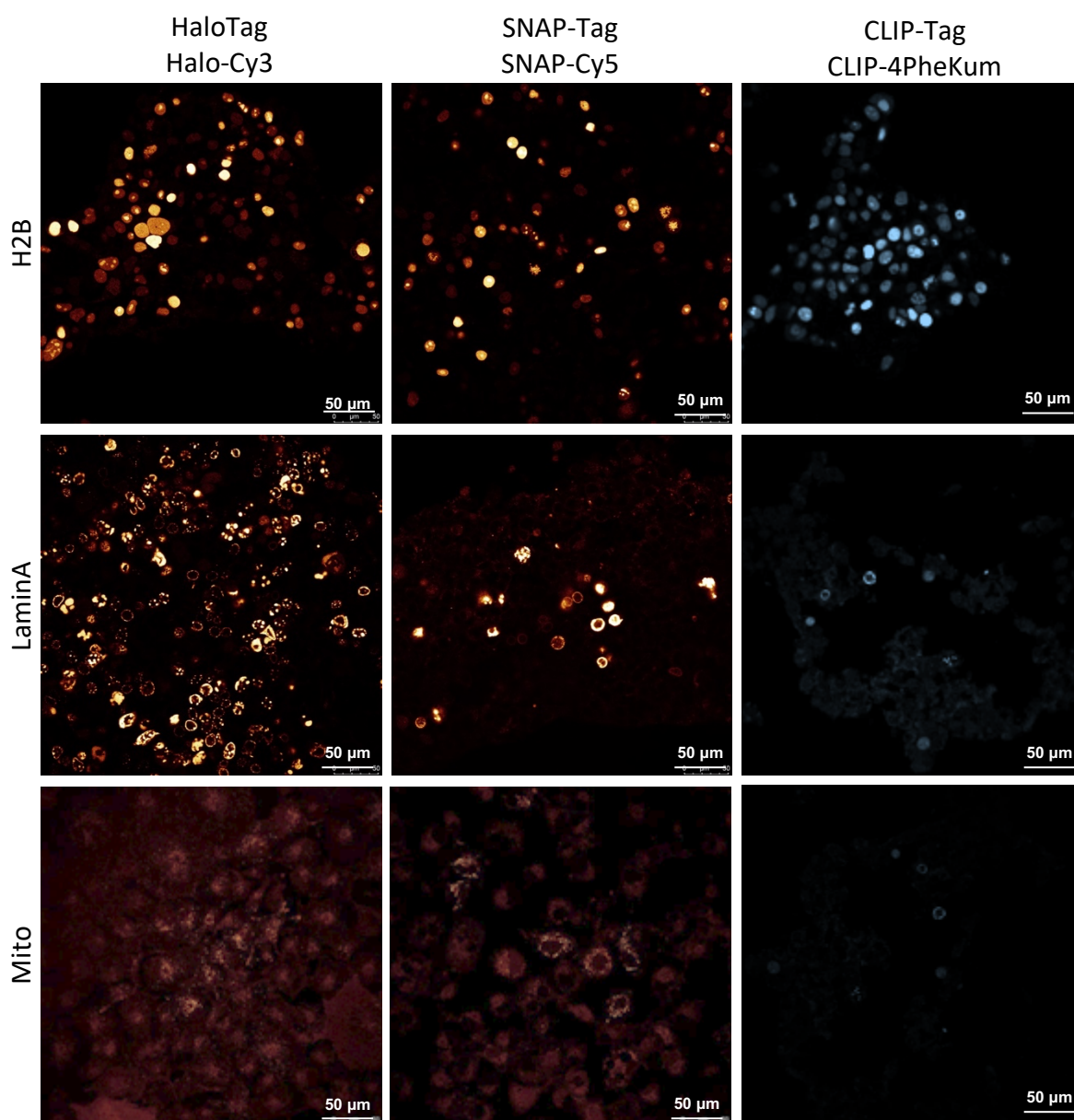
12. ábra Élő sejtek jelölésének sematikus folyamatábrája



13. ábra Fluoreszcensen jelölt COS-7 sejtek konfokális mikroszkópos felvételei. A MAP4, Lamp1 és Vimentin célfehérjék jelölése önjelölő enzimen keresztül. HaloTag, SNAP-Tag, illetve CLIP-Tag szubsztráttal kapcsolt Halo-Cy3 (λ_{exc} : 543 nm/ λ_{em} : 540-800 nm), SNAP-Cy5 (λ_{exc} : 633 nm/ λ_{em} : 650-800 nm) és CLIP-4PheKum (λ_{exc} : 405 nm/ λ_{em} : 420-600 nm) jelölőkkel. A 90 perces jelöléseket 3 μ M koncentrációjú jelölőkkel végeztük élő sejteken.

Fontos megjegyezni, hogy a dolgozatban látható ábráknál nem törekedtünk a színek helyességére, a képek színezése során a struktúrák átláthatósága, illetve a detektált jelölések különböző intenzitásának hangsúlyozása volt a célunk. A 13. és a 14. ábra esetében a különböző színű felvételek eltérő mikroszkópon készültek, a pirosas felvételek Leica TCS SP8 mikroszkópon, míg a kék felvételek Zeiss LSM710 mikroszkópon készültek.

A 13. ábra alapján a MAP4 célfehérje esetében a CLIP-4PheKum-mal jelölt MAP4-CLIP-Tag konstrukció igazán szép képet adott, látható a szálak struktúra, a többi jelöléstől eltérően. A Lamp1 fehérjék esetében a SNAP-Cy5-tel jelölt Lamp1-SNAP-Tag konstrukció volt a legszebb, míg a CLIP-Tag-es jelölés esetében lényegében nem látszódnak jelölt fehérjék. A Vimentin célfehérje esetében a Halo-Cy3-mal jelölt Vimentin-HaloTag konstrukció adta a legszebb struktúrát, bár ennek szerkezete is kevésbé nyújtott, inkább zsugorodott, mint vártuk volna.



14. ábra Fluoreszcensen jelölt HEK293T sejtek. A H2B, LaminA és Mito célfehérjék jelölése önjelölő enzimen keresztül. HaloTag, SNAP-Tag, illetve CLIP-Tag szubsztráttal kapcsolt Halo-Cy3 (λ_{exc} : 543 nm/ λ_{em} : 540-800 nm), SNAP-Cy5 (λ_{exc} : 633 nm/ λ_{em} : 650-800 nm) és CLIP-4PheKum (λ_{exc} : 405 nm/ λ_{em} : 420-600 nm) jelölőkkel. A 90 perces jelöléseket 3 μ M koncentrációjú jelölőkkel végeztük élő sejteken.

A 14. ábrán látható, hogy H2B célfehérje esetében mind a három konstrukció jó jelölést biztosított, nem volt jelentős eltérés közöttük. A LaminA célfehérje esetén a SNAP-Cy5-tel jelölt Lamin-SNAP-Tag konstrukció esetében volt a legjobb a jel/zaj arány és a legszebb a szerkezet, a HaloTag-es konstrukció szintén erős jelölést adott, azonban a sejtmagot körülvevő struktúra több esetben kisebb darabokra esett szét. Ezekkel szemben a Mito célfehérje egyik konstrukció alkalmazásával sem jelölődött ideálisan.

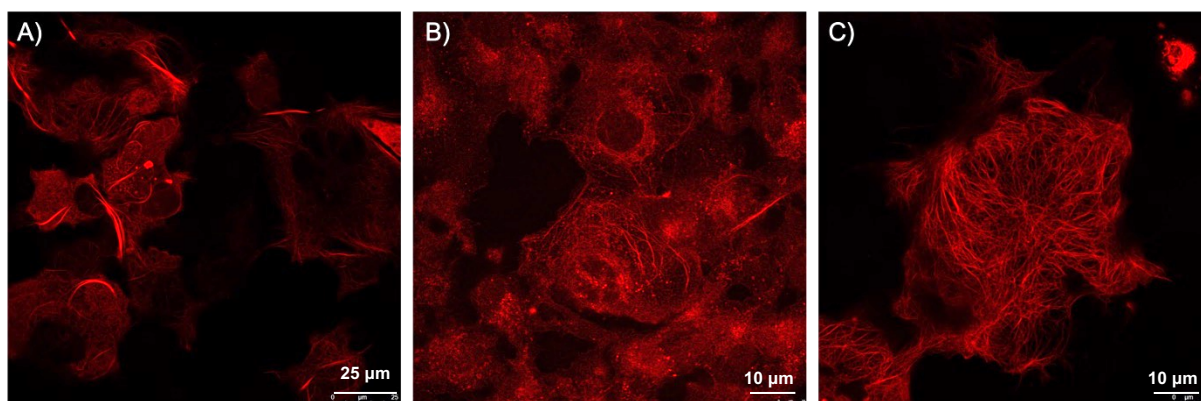
Az előbbi ábrákon látható mikroszkópos felvételekkel bebizonyosodott, hogy a szekvenáltatással korábban már ellenőrzött plazmidokon kódolt fehérjék transzfekció után a várakozásainknak megfelelően fejeződtek ki. A legtöbb esetben szelektív volt a jelölés, jó jel/zaj arány mellett. Ez alól a Mito fehérjét kódoló plazmid-csoport volt a kivétel, mivel ezek transzfekciós-expressziós hatékonysága nem felelt meg az elvárásainknak (csak 10-20%), és a jelölt mitokondrium struktúrák sem rajzolódtak ki szépen. Ezért a Mito célfehérjét kódoló konstrukciókat nem használtuk a további lépések során.

A kísérleteink során más-más hatékonysággal transzfektálódtak a plazmidok, és íródtak át róluk a célfehérjék, bár mind a négy fehérje esetében ugyanazt a CMV promótert használtuk, és a transzfekció során alkalmazott DNS mennyisége is állandó volt. A transzfekciós-expressziós hatékonyságot az egyes kamrák végigpásztázásával határoztuk meg. Ideális esetben a látótérben lévő sejtek legalább 60-80%-a mutat jelölést, azaz transzfektálódott, és expreszálta a CF-et. Ez a hatékonyság célfehérjénként és önjelölő enzim címkénként is eltért. Azt tapasztaltuk, hogy bizonyos célfehérje-önjelölő címke párosok jobb jelölést tettek lehetővé.

A citoskeletális fehérjék esetében sem voltunk teljesen megelégedve a kapott szerkezetekkel. Például a MAP4 fehérje esetében a CLIP-Tag-es konstrukcióhoz hasonló képet vártunk volna a többi plazmidnál is, azaz a sejtmagtól a sejtmembránig tartó szálak szerkezetet. Azonban a HaloTag és SNAP-Tag önjelölő enzimeket kódoló konstrukciók esetében a mikrotubulus szálak összezsapzódtak. Ezért úgy döntöttünk, hogy nem csak az eddig általunk rutinszerűen alkalmazott 4% formaldehides fixálási eljárást alkalmazzuk, hanem több fixálási módszert is kipróbálunk, a kedvezőbb eredmény elérése érdekében.

5.3. A jelölt sejtek fixálásának optimalizálása

A mikrotubulus szerkezet ilyen módon történő szétesése a nem megfelelő fixálási módszer miatt is kialakulhat, ennek megfelelően a jelölések optimalizálásának első lépéseként az alkalmazott fixálási módszert vizsgáltuk meg. Az előző kísérletsorozatnál a fixálást a Módszerekben is leírt 4% formaldehidet (PFA) tartalmazó PBS oldattal végeztük. Ezután paclitaxel citosztatikummal történő előkezelést alkalmaztunk, mely a mikrotubulus szálak stabilizálása (a depolimerizáció gátlása) által fejt ki hatását. Azonban ez nem hozta meg a kívánt eredményt, a paclitaxel használatával a mikrotubulus szálak kötegekbe rendeződtek, és elvesztettük a finom szálú struktúrát (15. ábra). Ezt követően – szintén a Módszerek fejezetben részletesen leírt – jéghideg metanolos fixálást végeztük. Ennek a segítségével már sikerült mikroszkópos felvételt készíteni szép mikrotubulus struktúrákról. Azt is megfigyeltük, hogy a sejtváz alkotóinak fixálása során elengedhetetlen a sejteket folyamatosan 37 °C-on (inkubátorban, termosztáton vagy melegítő párnán) tartani, mivel a legkisebb lehűlés hatására (például a steril fülke fém lapjával érintkezve) a szálak struktúrák szétesnek. A fixálás optimalizálásának eredményei a következő ábrán láthatók (15. ábra). Az A) képen az látható, ahogy a mikrotubulusok vastag kötegekbe rendeződtek az előkezelés hatására, a B) ábrán előkezelés nélküli, nem melegítőpárnán tartott, jéghideg metanollal fixált sejtek szerepelnek, a C) felvételen látható a legszebb struktúra, ez előkezelés nélküli, végig 37 °C-on tartott, jéghideg metanollal fixált sejtekről készült.



15. ábra Különböző fixálási módszerek hatása a tubulin struktúra megjelenésére COS-7 sejtekben, konfokális mikroszkópos felvételeken. A) Paclitaxellel előkezelt, jéghideg metanollal fixált sejtek; B) előkezelés nélküli, nem melegítőpárnán tartott, jéghideg metanollal fixált sejtek C) előkezelés nélkül, végig 37 °C-on tartott, jéghideg metanollal fixált sejtek; C. A) és C) MAP4-HaloTag konstrukción keresztül Halo-Atto (λ_{exc} : 552 nm/ λ_{em} : 565-700 nm) jelölővel végeztük, a B) esetben MAP4-SNAP-Tag konstrukción keresztül SNAP-Cy5 (λ_{exc} : 633 nm/ λ_{em} : 650-800 nm) jelölővel végeztük. A 90 perces jelöléseket 3 μ M koncentrációjú jelölőkkel végeztük élő COS-7 sejteken. Mérce: 25 μ m (A); 10 μ m (B, C).

Miután a MAP4 fehérjéken keresztül sikeresen jelöltük a mikrotubulusokat, és a jeges-metanolos fixálás, valamint megelőzőleg a konszans 37 °C közeg megtartotta a struktúrát, azt is ellenőriznünk kellett, hogy a többi struktúra hogyan viselkedik ugyanilyen kezelés hatására. A tapasztalatinkat a következő, 7. táblázatban foglaltam össze. Itt az angyal a sikeres és szép jelölést jelenti, ahol arany szegélye van, ott szebb a szerkezet a másik fixálási módnál. Például a H2B CF-ek esetében a PFA-s fixálás szebb képet adott, de metanolos fixálás esetén is kifejezetten jó felvétel készíthető, míg a LaminA fehérjéknél ez pont fordítva történt, és a Lamp1 fehérjék esetén nem volt jelentős különbség. A Vimentin fehérjék esetében nem volt teljes a siker, mivel mindkét fixálás esetén a sejtek egy részénél a szálak szerkezet helyett összezsugorodott, sérült struktúrát láttunk, azonban a metanolos fixálással szebb felvételek készültek. A MAP4 fehérje esetében a síró arc a szétesett, összezsugorodott struktúrát jelöli. Ez alapján a metanolos fixálás alkalmazható a további kísérletek során is, mivel minden választott célfehérjénk struktúrája ezzel a módszerrel megfelelő rajzolatú, és meg is őrződik a mikroszkópos képalkotásig.

7. táblázat Különböző fixálások hatása a jelölendő struktúrákra

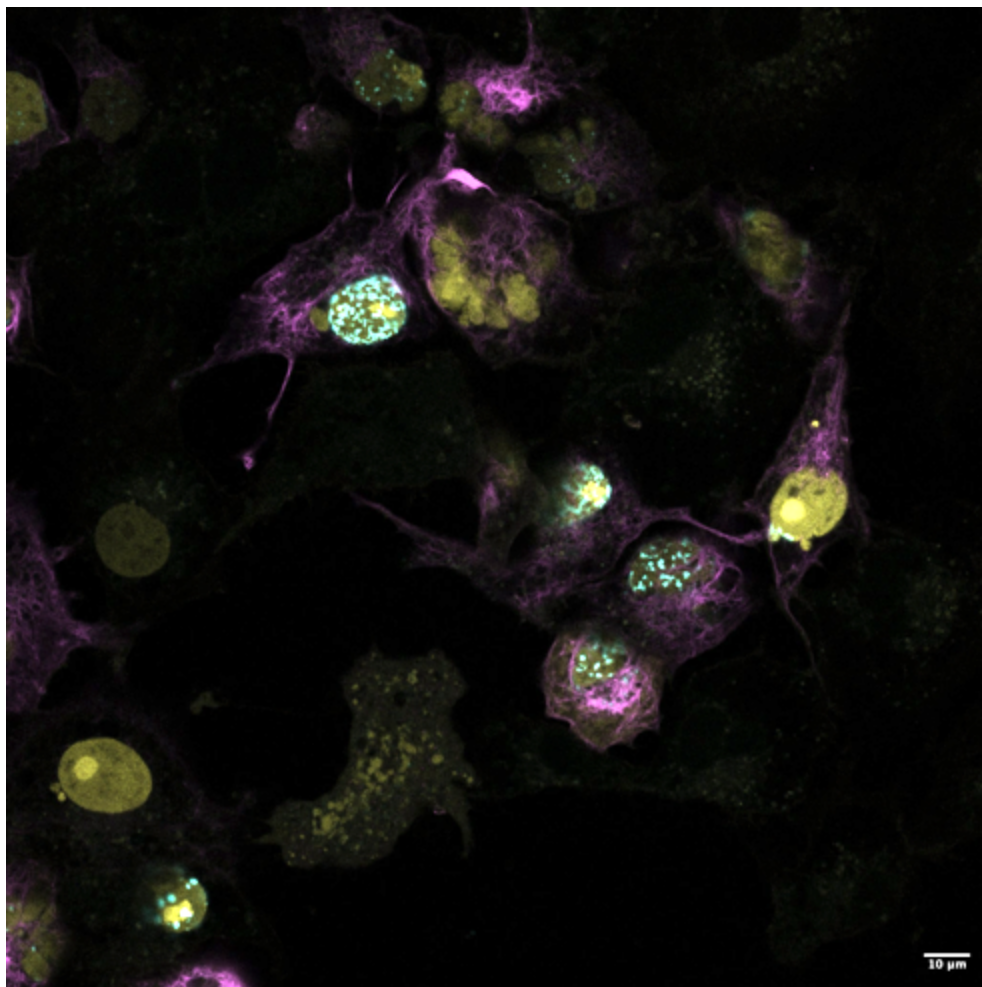
Célfehérjék:	H2B	LaminA	Lamp1	Vimentin	MAP4
Metanolos fixálás				 	
PFA-s fixálás				 	

5.4. Háromszínű jelölések kivitelezése

A többszínű jelölések kivitelezése is az 9. ábrán látható séma szerint, az egyszínű jelölésekhez hasonló módon történt. Itt is ügyeltünk arra, hogy a három különböző célfehérjét és önjelölő enzimet kódoló plazmidot összesen maximum 500 ng mennyiségben adjuk a sejtekhez a transzfekció során. Az inkubálási idők is megegyeztek a Módszerek fejezetben írtakkal. Mind a transzfekció, mind a fluoreszcens jelölés a három komponens esetében egyszerre zajlott.

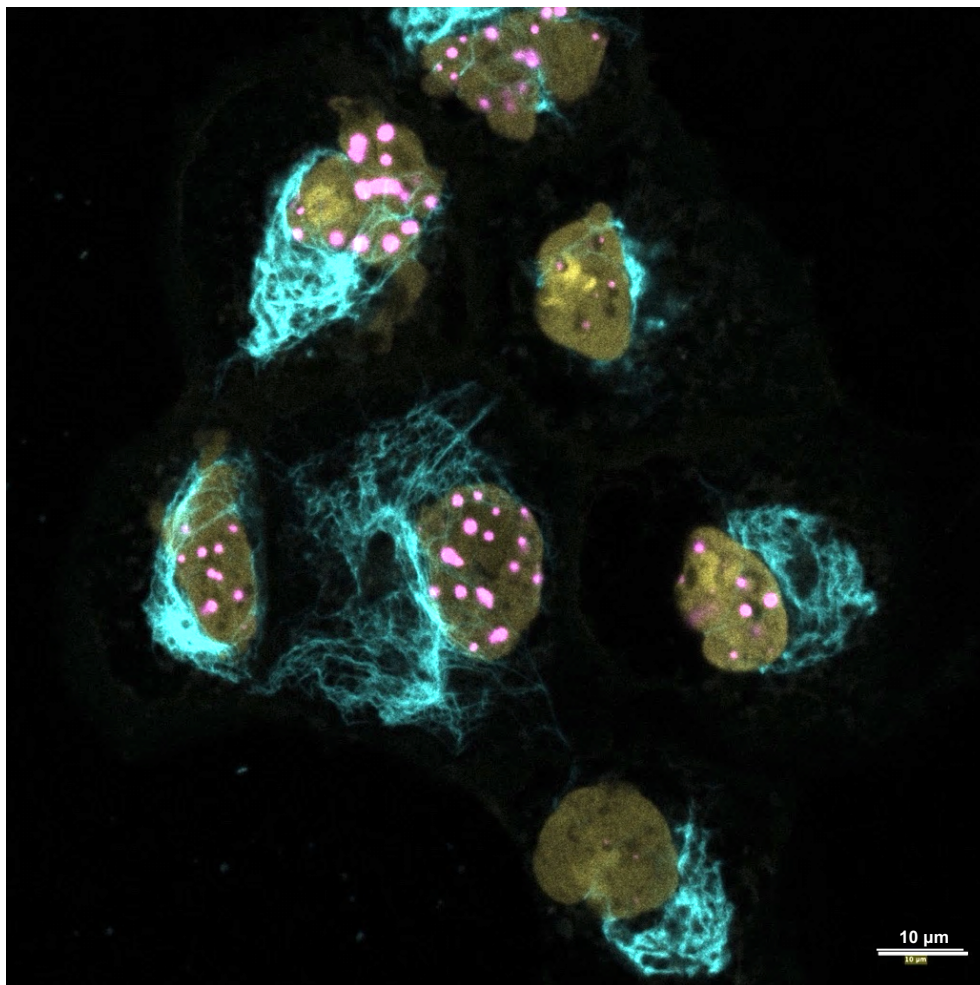
A mikroszkópos képalkotás során azt tapasztaltuk, hogy az egyszerre transzfektált három plazmid transzfekciós-expressziós hatékonysága nagyjából megegyezett az plazmidok ellenőrzése során külön-külön meghatározott transzfekciós-expressziós hatékonysággal. Továbbá azok a sejtek, amelyek a transzfekció során felvettek egy plazmidot, azok nagy

eséllyel több különböző plazmidot is felvettek, így általában egy látótéren belül több sejten is megvalósult a többszörös jelölés. Itt is megfigyelhető volt, hogy bizonyos célfehérje-önjelölő enzim kombinációk hatékonyabbak a többinél. A 16. és 17. ábrán a többszínű jelölések közül egy-egy reprezentatív példát mutatok be. Azért ezeket a felvételeket választottam, mert mind a két ábrán ugyanazokat a struktúrákat jelöltük, azonban különböző önjelölő enzimeket párosítottunk ezekhez. Mind a két ábrán szelektívek voltak a jelölések, jól láthatóak a fehérjék által kirajzolt szerkezetek, és így azt is meg lehet figyelni, hogy mennyire számít, hogy az adott fehérjét melyik önjelölő enzimen keresztül jelöltük meg. A következőkben a magenta színnel a HaloTag + Halo-Cy3, sárgával a SNAP-Tag + SNAP-Cy5 és késsel a CLIP-Tag + CLIP-4PheKum jelölést ábrázoltam.



16. ábra Háromszínű jelölés élő COS-7 sejteken. Vimentin-HaloTag fluoreszcens jelölése 1 μM Halo-Cy3 (λ_{exc} : 543 nm/ λ_{em} : 540-800 nm) Lamin-CLIP-Tag jelölése 0,3 μM CLIP-4PheKum (λ_{exc} : 405 nm/ λ_{em} : 420-600 nm) és H2B-SNAP-Tag fluoreszcens jelölése 3 μM SNAP-Cy5 jelölővel (λ_{exc} : 633 nm/ λ_{em} : 650-800 nm)

A 16. ábrán Halo-Cy3-mal jelölt Vimentin-HaloTag, CLIP-4PheKum-mal jelölt Lamin-CLIP-Tag és SNAP-Cy5-tel jelölt H2B-SNAP-Tag konstrukciók láthatók COS-7 sejteken. A H2B fehérjék az elvárásoknak megfelelően kirajzolják a sejtmagot, és bennünk sötétebb sárga foltként a sejtmagvacskát. A LaminA fehérjék körül veszik a H2B-vel jelölt sejtmagot, emiatt bizonyos síkban karikaként látszanak, míg a kép síkjában – a legtöbb sejt esetében – a sejtmag teteje látható, ezért takarják a LaminA jelölések a H2B jelöléseket. A képen a nukleáris lamina szerkezete nem egybefüggő, ezt a töredezettséget a fehérjék overexpressziója is okozhatja, illetve a nukleáris lamina dinamikus szétesése is sejtosztódás során.



17. ábra Háromszínű jelölés COS-7 sejteken. Lamin-HaloTag fluoreszcens jelölése 1 μM Halo-Cy3 (λ_{exc} : 543 nm/ λ_{em} : 540-800 nm) Vimentin-CLIP-Tag jelölése 0,3 μM CLIP-4PheKum (λ_{exc} : 405 nm/ λ_{em} : 420-600 nm) és H2B-SNAP-Tag fluoreszcens jelölése 3 μM SNAP-Cy5 jelölővel (λ_{exc} : 633 nm/ λ_{em} : 650-800 nm). Mércé 10 μm .

A 17. ábrán Halo-Cy3-mal jelölt Lamin-HaloTag, CLIP-4PheKum-mal jelölt Vimentin-CLIP-Tag és SNAP-Cy5-tel jelölt H2B-SNAP-Tag konstrukciók láthatók COS-7 sejteken. Ennél a jelölésnél – a H2B CF kivételével, mivel a 14. ábrán igazán szép volt, – megcseréltük CF-

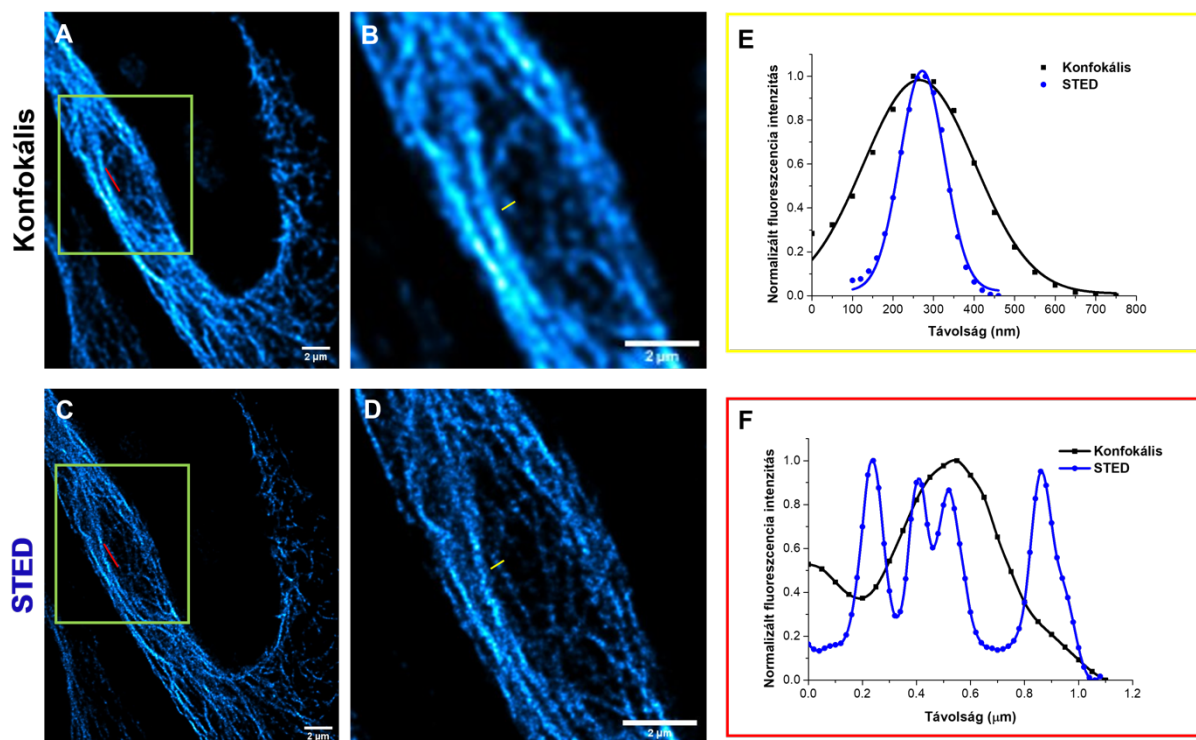
önjelölő enzim párosításokat, hátha így jobban kirajzolódnak a struktúrák. Az ábrán egyértelműen a várt struktúrák jelölődtek. A kék színű Vimentin szálak fényesebbek a CLIP-Tag szubsztráttal kapcsolt jelölővel, azonban a magenta színnel jelölt LaminA fehérjék még jobban szétestek HaloTag-en keresztül jelölve, mint az előző esetben. Ebből is látható, hogy bizonyos esetekben befolyásolja a jelölések minőségét a célfehérje-önjelölő enzim párosítás többszínű jelölések esetében is.

Összességében mind két jelölés és felvétel esetében jelölések detektálása szinte teljesen háttérmentes, és az egyes csatornák jól elkülönülnek, nincs áthallás közöttük. A háromszínű jelölések további optimalizálása során a jelölt célfehérjék, és az alkalmazott jelölők újabb kombinációit is tervezzük kipróbálni, ami még részletgazdagabb felvételeket eredményezhet, illetve további sejtvonalakon is végzünk majd jelöléseket.

5.5. Szuper-felbontású mikroszkópiás képalkotás

Ahhoz, hogy adott struktúra részletgazdagságát jobban be tudjuk mutatni STED (szuper-felbontású mikroszkópiás) felvételeket is készítettünk. Ehhez megfelelő tulajdonságú festékekre van szükség. A legtöbb STED mikroszkóp egy kioltó lézerrel van felszerelve (a mi esetünkben is) ehhez kell megválasztani a megfelelő jelölő párosításokat, melyek esetében peremfeltétel, hogy ne gerjesztődjenek, de legyen – legalább 2-5% – emisszójuk a kioltó lézer hullámhosszán, továbbá ne legyen átfedés az egyes festékek jele között. Éppen ezért, a megfelelő jelölő-kombináció kiválasztása nagy kihívást jelent felhasználóknak. A feltételek egyidejű teljesüléséhez általában – legalább – egy nagy Stokes-eltolódású jelölőre van szükség. A mi esetünkben is még tart a megfelelő jelölő kombináció elemeinek szintézise.

Dolgozatomban azt be tudom mutatni (18. ábra), hogy az egyik lehetséges komponens esetében mennyivel nagyobb felbontású felvételt eredményezett a STED technika alkalmazása. A 18. ábrán élő HeLa sejtekben végzett MAP4-HaloTag jelölés látható Halo-Atto jelölővel konfokális, illetve STED felvételen. Egyértelműen látható, hogy a STED felvétel részletgazdagabb, a mikrotubulus szálak jobban elkülönülnek és vékonyabbak. A vonal-diagramokon számszerűsítve is látható az elért felbontás növekedése.



18. ábra MAP4-HaloTag konfokális (A, B) és STED (C, D) mikroszkópos felvétele HeLa sejtekben. Fluoreszcens jelölés 3 μM Halo-ATTO (λ_{exc} : 561 nm/ λ_{em} : 580-620 nm). Mércse 2 μm . A B és D ábra az A és C képen kijelölt területének nagyítása. Az E ábrán a B és D ábrán lévő sárga vonal diagrammja, az F ábrán az A és C ábrán lévő piros vonal diagrammja. Feketével jelöltük a konfokálishoz, kézzel a STED-hez tartozó felbontást. Az E ábrán az konfokális felvétel vonaldiagramjának félértékszélessége 325 nm; a STED-é 129 nm. A felvételek Abberior Expert Line mikroszkóppal készültek.

6. Módszerek

6.1. Inzert klónozása

A plazmidok tervezéséhez és megjelenítéséhez a SnapGene szoftvert és az Addgene honlapon található alkalmazásokat használtuk. A primerek karakterizálásához a IDT OligoAnalyzer Tool⁵⁹-t, az Oligo Calc⁶⁰ és a NEB Tm Calculator⁶¹ online alkalmazást választottuk.

A kiválasztott fehérjét kódoló DNS szakaszokat a kiindulási plazmidból polimeráz-láncreakcióval (PCR) dúsítottuk fel. A PCR kiindulási reakciókeverékét PCR csőben az alábbiak összemérésével készítettük el: 3-3 µl 5 µM reverse és forward primer, 100-250 ng DNS templát, 0,6 µl Phusion DNS polimeráz enzim (2U/µl, Thermo Scientific #F-530), 6 µl 5x Phusion puffer (Thermo Scientific), 6 µl 2,5 mM dNTP mix (Thermo Scientific #R0241). Ezt desztillált vízzel 30 µl össztérfogatra egészítettük ki.

A PCR reakcióhoz a következő programot használtuk (BIO-RAD #1851145 készüléken):

2 min 98 °C, majd 30-szor ismétlődő ciklusban: 20 sec 98 °C, 30 sec 56-70 °C (a hőmérsékletet az adott primerek olvadáspontjának megfelelően változtatva), 1 min 72 °C (az időtartamot a klonozandó inzert hosszának megfelelően változtatva; 2000 bázis/perc), az ismétlődő ciklusok végén: 10 min 72 °C, 10 min 4 °C.

Ezután a terméket agaróz gélelektroforézissel választottuk el, majd gélből tisztítottuk.

6.2. Agaróz gélelektroforézis és gélből tisztítás

Az 1%-os gél öntéséhez agarózból (Sigma) 0,3 g-ot forraltunk 30 ml TAE-pufferben (40 mM TRIS, 40 mM borát, 1 mM EDTA, pH=8,3), 3 µl Gel green DNS festéket (Biotum #41004) adtunk hozzá. A minták méretének meghatározásához 200-10000 bázispár tartományú molekulasúly markert/DNS-létrát (Thermo Scientific #SM031) használtunk. A minták előkészítéséhez 6-szoros töménységű TriTrack loading festéket (Thermo Scientific #R1161) adtunk. A mintákat 120 V-on futtattuk 30 percig (BIO-RAD #1640303) TAE pufferben. Ezután a tisztításhoz kék fény (400 nm) alatt a megfelelő sávot szikével kivágtuk a gélből, tárazott eppendorf csőbe tettük, majd a gélből tisztítást a NucleoSpin Gel and PCR Clean-up készlettel (MN #740609.50), az ahhoz megadott gyári metodika alapján végeztük el.

6.3. Vektor és inzert hasítása

A vektor hasításához 5 µl 10-szeres töménységű CutSmart puffert (NEB #B7204), 3000U (1,5-2,5 µl-t a 20000U törzsből) restrikciós endonukleáz hasítóenzimeket és 5 µg DNS vektort mértünk össze, majd 50 µl össztérfogatra hígítottuk desztillált vízzel. Az 50 µl térfogatú tisztított inzert hasítását ugyanilyen körülmények között végeztük. A keverékeket 37 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át. Másnap reggel a vektorhoz 0,5 µl FastAP alkalikus foszfatazt adtunk (1 U/µl, Thermo Scientific #EF0651), és 30 percen át inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezután a hasított DNS darabokat agaróz gélelektroforézissel választottuk el egymástól, a megfelelő méretű egységeket gélből tisztítottuk az előző fejezetben leírt módon. Az inzert esetében az egész éjszakai inkubálás után futtatás nélkül végeztük el a tisztítási lépést, mivel mindössze néhány bázispárt hasítottak le az enzimek.

6.4. Vektor és inzert összekapcsolása (ligálása)

A ligálási arányok meghatározásához a vektort és az inzert(ek)et kis térfogatban (5 µl minta, 1 µl 6-szoros töménységű Loading puffer) egymás mellett futtattuk agaróz gélen (a korábban leírt módon), majd a kapott sávokat összehasonlítva állapítottuk meg a bemérési térfogatosokat, úgy, hogy a befogadó vektorhoz képest háromszoros moláris feleslegben legyen az inzert, illetve több inzert esetén ez egyenként teljesüljön.

A ligálási arálynak megfelelő mennyiségű hasított vektort és inzert(ek)et 4 µl össztérfogatban összemértünk, majd 0,5 µl T4 DNS ligáz enzimet (400 U/µl, NEB #M0202) és 0,5 µl 10-szeres töménységű T4 DNS ligáz puffert (NEB #B0202) adtunk hozzá. Ezután 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. A ligálási kontrollok elkészítéséhez minden vektorhoz minden különböző ligálási arányban desztillált vizet adtunk inzert helyett.

6.5. Transzformálás, plazmid felszaporítás, plazmid tisztítás

Ligálás után közvetlenül az 5 µl plazmidhoz csövenként 40 µl kompetens *Escherichia coli* sejtet (XL1Blue), 8 µl KCM-et (0,5 M KCl, 0,25 M MgCl₂ és 0,15 M CaCl₂) és 80 µl össztérfogathoz szükséges steril desztillált vizet adtunk. Ezután 20 percig jégen, 10 percig szobahőmérsékleten, majd 100 µl LB (Duchefa Biochemie #L1704) tápfolyadék hozzáadása után 60-90 percen át 37 °C-on inkubáltuk a sejteket. Ezután előre megöntött szilárd, megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB-agar (1%, Duchefa Biochemie #L1706) táptalajokra szélesztettük a 180 µl térfogatú sejtszuszpenziókat, majd egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk. Másnap 3-3 telepet

antibiotikus LB tápfolyadékba oltottunk, majd rázatva inkubáltuk egy éjszakán át 37 °C-on. Másnap a plazmidot NucleoSpin Plasmid mini kittel (MN #740588) vagy ZymoPure Plasmid Miniprep készlettel (Zymo research #D4210) a megadott metodika alapján tisztítottuk. A plazmidok koncentrációját, tisztaságát nanodrop módszerrel határoztuk meg, majd szekvenálással ellenőriztük a plazmidba beépített megfelelő kódoló szakaszok jelenlétét (Microsynth, Sanger sequencing).

6.6. Emlős sejt kultúrák és passzálásuk

A kísérletekhez HeLa (ATCC #CCL-2), COS-7 (Sigma #87021302) és HEK293T (ATCC #CRL-3216) sejt kultúrákat használtunk. A sejtek növesztését 37 °C-on, 5% CO₂ atmoszférában végeztük, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies #4165-039) tápoldatban, melyhez 10% FBS-t (Fetal Bovine Serum, Gibco 10500-064), 1% penicillin-sztreptomocint (Gibco #15140-122), 1% Glutamax (Gibco #35050-061) és 1% nátrium-piruvátot (Life Technologies #11360) adtunk. A sejtek passzálását 25 cm² Nunc sejtenyésző flaskában (Thermo Fischer) végeztük 3-4 naponta, 80 %-os borítottságnál, legfeljebb 20 passzálságig.

HeLa és COS-7 sejtek passzálása

A 25 cm² Nunc sejtenyésző flaskában (Thermo Fischer) található sejtekről eltávolítottuk a tápoldatot, majd PBS-sel mostuk (pH=7,4; 37 °C, Gibco) a szérumban található tripszin inhibitor eltávolítása miatt. Ezután 1 ml tripszin-EDTA komplexszel (0,05% Gibco #25300-054) kezeltük a sejteket, hogy a tenyésztő flaska aljáról a letapadásért felelős fehérjék emésztésének segítségével szuszpendáljuk fel őket. Ezután 5 percig 37 °C-on 5% CO₂ atmoszférában inkubáltuk, majd 5 ml tápfolyadékot (37 °C) adtunk hozzá. Utolsó lépésként egy új Nunc sejtenyésző flaskába 5 ml tápoldatot és 1 ml sejtet téve 37 °C-on 5% CO₂ atmoszférában tenyésztettük tovább a sejteket.

HEK293T sejtek passzálása

A COS-7 sejtek passzálásához képest az eltérés az, hogy 1 ml tripszinnel 3 percig végeztük az inkubálást, valamint az új Nunc sejtenyésző flaskába körülbelül 0,3 ml sejtet tettünk.

6.7. Sejtek növesztése Ibidi kamrára

Mikroszkópos vizsgálathoz a sejteket nyolc lyukú üvegalapú μ -Slide Ibidi high precision #1.5H ($170\ \mu\text{m}/\pm 5\ \mu\text{m}$) lemezre (Ibidi #80827) növesztettük. A sejtek koncentrációját a plate-re helyezés előtt Bürker-kamra segítségével határoztuk meg, majd annak megfelelően hígítottuk, hogy milyen sejtkultúrát szerettünk volna növesztetni: HeLa sejtek esetén 12500 sejt, COS-7 sejtek esetén 15000 sejt, HEK293T sejtek esetén pedig a 40000 sejt ideális kamránként. A kihígított sejtuszuspenzióból $250\ \mu\text{l}$ -t tettünk ki cellánként, majd a jó kitapadás érdekében $37\ ^\circ\text{C}$ -on 5% CO_2 atmoszférában, 40-48 órán keresztül inkubáltuk őket. A HEK293T sejtek lemezre helyezése előtt a tárgylemez felületét $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációjú poli-L-lizinnel (Sigma #P5899) kezeltük négy órán keresztül, majd lemostuk.

6.8. Transzfekció Lipofectamine 3000 reagenssel

Mind a három sejtvonal esetében a Lipofectamine 3000 kit-et használtuk a sejtek transzfektálásához. A transzfekciót a gyári protokollban leírt módon végeztük. Első lépésként a transzfekciós mixet készítettük el: $50\ \mu\text{l}$ Opti-MEM (ThermoFischer Scientific #31985062) médiumhoz hozzáadtunk egy vagy több általunk készített plazmidot kamránként összesen $0,5\ \mu\text{g}$ mennyiségben, illetve $0,5\ \mu\text{l}$ P3000 reagenst, majd $0,5\ \mu\text{l}$ Lipofectamine 3000 reagenst is (ThermoFischer Scientific #L3000001). A keveréket 15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd további $50\ \mu\text{l}$ Opti-MEM médiumot adtunk hozzá, végül a sejtekre tettünk. Ezután 4 órán át tartottuk a sejteket a transzfekciós elegyben $37\ ^\circ\text{C}$ -on, 5% CO_2 atmoszférában. Az inkubálási idő eltelte után a médiumot frissre cseréltük, és a másnapi jelölésig pihentettük a sejteket $37\ ^\circ\text{C}$ -on 5% CO_2 atmoszférában.

6.9. Sejtek jelölése

Élő sejtek jelöléséhez a kísérletek során $0,3$ - $10\ \mu\text{M}$ koncentrációjú fluoreszcens jelölőt adtunk a sejtekhez, 15-90 percig rajtuk hagytuk ($37\ ^\circ\text{C}$ -on 5% CO_2 atmoszférában), ezután a festékszubsztrát konjugátumot tartalmazó oldatot eltávolítottuk, majd festékmentes tápoldatban további 2 órán át mostuk azokat ($37\ ^\circ\text{C}$ -on 5% CO_2 atmoszférában).

6.10. Sejtek fixálása

A jelölt sejteket fixálását részben a következőképp végeztük: a tápfolyadék leszívása majd a sejtek kétszeri PBS oldattal történő mosása után 4% paraformaldehidet (PFA) tartalmazó PBS

oldattal végeztük, 10 percen át szobahőmérsékleten, majd a PFA tartalmú oldatot eltávolítottuk, és ismét kétszer mostuk a sejteket PBS-sel.

A másik fixálási módszer során a sejtekről leszívtuk a tápfolyadékot, majd 250 µl -20 °C-os metanolt adtunk a sejtekhez, majd 10 perc inkubálást követően a metanolt eltávolítottuk, és szintén kétszer mostuk a sejteket PBS-sel.

Mindkét fixálási módszer esetén a sejteket PBS oldószerben, hűtve tároltuk a mikroszkópozásig.

A többszínű jelölések optimalizálása során elvégzett változtatások az Eredmények és értékelésük részben találhatók.

6.11. Konfokális mikroszkópia

A jelölt sejtekről három különböző mikroszkóppal készített felvételeket a témavezetőm. Ezek a következők:

Zeiss LSM710 mikroszkóp, melynek objektíve PLAN-APOCHROMAT 40x/1,4 Oil volt. 405 nm-es, 488 nm-es, 543 nm-es, illetve 633 nm-es gerjesztő lézert használtunk. Ezen képek kiértékeléséhez Zen szoftvert és FIJI for ImageJ programot használtunk.

Leica TCS SP8 mikroszkóp Leica HC PL APO CS2 100x/1,40 olajimmerziós objektívvel. 488 nm, 552 nm és 638 nm hullámhosszúságú lézereket használtunk. A képeket FIJI programmal értékeltük ki.

A szuper-felbontású STED (stimulált emisszió-deplécio) mikroszkópiás felvételeket Abberior Expert Line mikroszkóppal készítettük, ami Nikon Ti2 vázra épült. Nikon CFI PL APO 100x/1,45 olajimmerziós objektívet használtunk spektrális detekcióval, amihez avalanche fotodiódát (APD) alkalmaztunk foton számoló üzemmódban. 560 nm és 640 nm hullámhosszúságú lézereket használtunk. A STED felvételeket pulzáló 775 nm-es kioltó lézer segítségével készítettük.

7. Összefoglalás

Jelen TDK-dolgozatomban 16 plazmid konstrukciót állítottunk elő, önjelölő enzimek (HaloTag, SNAP-Tag, CLIP-Tag) és terápiás célpontként szolgáló fehérjék (H2B, LaminA, Lamp1, Vimentin, MAP4, Mito) kódoló DNS szakaszainak felhasználásával, majd sikeresen alkalmaztuk specifikus és szelektív fluoreszcens jelölésekben. A jelölésekhez kutatócsoportunkban Unyi Zsombor és Dr. Cserép B. Gergely által készített jelölőket használtunk, melyek a *„Fluoreszcens vegyülettár tervezése és szintézise önjelölő fehérjék vizsgálatához”* című TDK-dolgozatban kerülnek részletesebb bemutatásra. Munkánk során arra is lehetőség volt, hogy tapasztalatainknak megfelelően újabb jelölők szintézisére tegyünk javaslatot. Ez a szoros együttműködés nagyon hasznosnak bizonyult. A fluoreszcens képalkotás során a célfehérjék által alkotott struktúrák szépen kirajzolódtak mind az egyszínű, mind a többszínű jelölések eredményeképpen.

A plazmidok felhasználásával – terveinknek megfelelően – a jelölések és a fixálás körülményeinek optimalizálása után az egyszerre jelenlévő struktúrák szerkezete egyformán szépen kirajzolódott, illetve sikerült egyidejű háromszínű fluoreszcenst jelölést is kiviteleznünk. A jelen dolgozatban még nem értük el, hogy háromszínű jelölés alkalmas legyen ugyanazon kioltólézer alkalmazó STED mikroszkópos felvételek elkészítésére, azonban munkám folytatásaként ezt új festékekkel és új önjelölő enzim-célfehérje kombinációkkal kíséreljük meg.

Jövőbeli terveink közé tartozik kutatócsoportunk folyamatosan bővülő plazmid-tárának (melynek elemei többek között a dolgozatban leírt plazmidok is) közzététele a nonprofit szervezetként működő plazmid repozitóriumban (Addgene). Ezen felül a TDK-dolgozatban bemutatott plazmidok és többszínű jelölések is alapját képezhetik több jövőbeli publikációnak, és megfelelő alapot biztosítanak a kutatócsoport által létrehozott újabb festékek teszteléséhez. A háromszínű jelölések továbbá lehetőséget adnak sejtalkotók egyidejű vizsgálatára, mely szintén alkalmassá teszi a rendelkezésünkre álló rendszert összetettebb folyamatok monitorozására is.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni a kutatócsoport vezetőjének, Dr. Kele Péternek, hogy a csoport tagja lehetek. Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Németh Krisztinának, aki mindig segített a munkám során felmerülő problémák megoldásában, és rengeteget tanultam tőle. Köszönöm Dr. Szatmári Ágnesnek és Kereszty Rékának a plazmidokat, melyek munkám kiindulási elemei voltak, illetve a segítséget a laboratóriumi munka során.

Köszönettel tartozom a Kémiai Biológia Kutatócsoport összes tagjának Különösen Dr. Cserép B. Gergelynek és Unyi Zsombornak hallgatónak, akik az önjelölő enzim-ligandumokat készítették.

Köszönöm Dr. Alexa Anitának és Dr. Reményi Attilának a plazmidok elkészítésében és az eszközök használatában nyújtott segítségért.

Köszönöm Török Györgynek, aki Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai intézetének munkatársa, a STED képalkotásban nyújtott segítségét.

Az anyagi támogatást (Kutató hallgató ösztöndíj) köszönöm a Richter Gedeon Nyrt. Centenárium Alapítványnak.

9. Irodalomjegyzék

1. Guo, Y. *et al.* Visualizing Intracellular Organelle and Cytoskeletal Interactions at Nanoscale Resolution on Millisecond Timescales. *Cell* **175**, 1430-1442.e17 (2018).
2. Nobel prize 2014.: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2014/summary/>
3. Gray, N. Knowing the limit. *Nat Cell Biol* **11**, S8–S8 (2009).
4. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2022/press-release/>.
5. Kozma, E. & Kele, P. Fluorogenic probes for super-resolution microscopy. *Org Biomol Chem* **17**, 215–233 (2019).
6. Németh, E. *et al.* A Bioorthogonally Applicable, Fluorogenic, Large Stokes-Shift Probe for Intracellular Super-Resolution Imaging of Proteins. *Biomolecules* **20**, 397 (2020).
7. Meimetis, L. G. *et al.* Ultrafluorogenic Coumarin-Tetrazine Probes for Real-Time Biological Imaging. *Angewandte Chemie International Edition* **53**, 7531–7534 (2014).
8. Hell, S. W. *et al.* The 2015 super-resolution microscopy roadmap. *J Phys D Appl Phys* **48**, 443001 (2015).
9. Epifluorescence microscope basics. <https://www.thermofisher.com/hu/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/imaging-basics/fundamentals-of-fluorescence-microscopy/epifluorescence-microscope-basics.html>.
10. Minsky, M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* **10**, 128–138 (1988).
11. <http://www.olympusconfocal.com/theory/>.
12. Diffraction limit. <https://svi.nl/DiffractionLimit>.
13. Vicidomini, G. *et al.* STED super-resolved microscopy. *Nat Methods* **15**, 173–182 (2018).
14. Sahl, S. J. *et al.* Fluorescence nanoscopy in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 685–701 (2017).
15. Galbraith, C. G. & Galbraith, J. A. Super-resolution microscopy at a glance. *J Cell Sci* **124**, 1607–1611 (2011).
16. Huang, B. *et al.* Super-resolution fluorescence microscopy. *Annual Review of Biochemistry* vol. 78 993–1016 (2009).
17. Phan, N. T. N. *et al.* Measuring synaptic vesicles using cellular electrochemistry and nanoscale molecular imaging. *Nat Rev Chem* **1**, 0048 (2017).

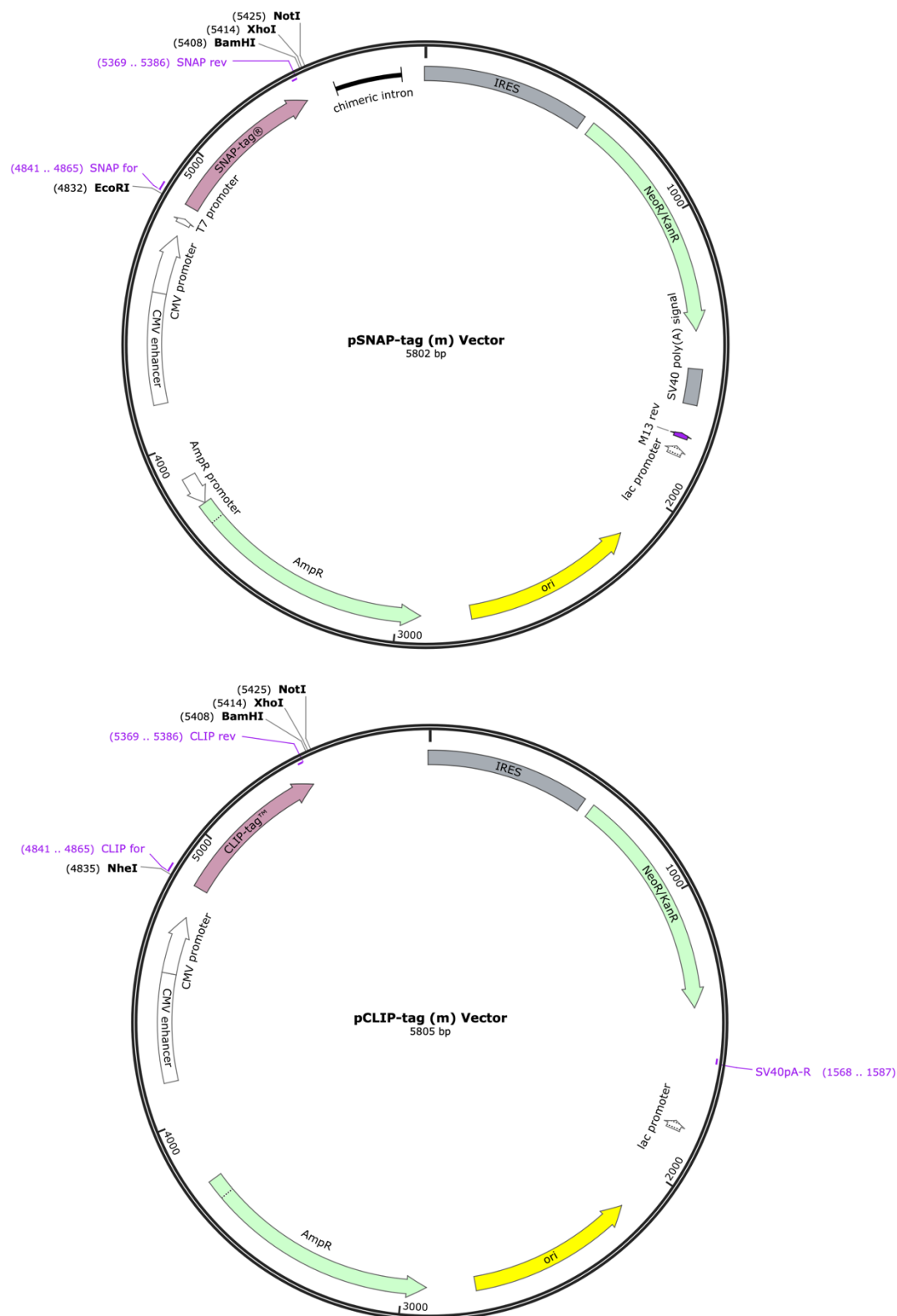
18. Kozma, E. *et al.* Bioorthogonal double-fluorogenic siliconrhodamine probes for intracellular super-resolution microscopy. *Chemical Communications* **53**, (2017).
19. Li, C. *et al.* Fluorogenic Labeling Strategies for Biological Imaging. *Int J Mol Sci* **18**, 1473 (2017).
20. Butkevich, A. N. *et al.* Two-Color 810 nm STED Nanoscopy of Living Cells with Endogenous SNAP-Tagged Fusion Proteins. *ACS Chem Biol* **13**, 475–480 (2018).
21. Müller, T. *et al.* STED Microscopy and its Applications: New Insights into Cellular Processes on the Nanoscale. *ChemPhysChem* **13**, 1986–2000 (2012).
22. Los, G. v. *et al.* HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis. *ACS Chem Biol* **3**, 373–382 (2008).
23. Liss, V. *et al.* Self-labelling enzymes as universal tags for fluorescence microscopy, super-resolution microscopy and electron microscopy. *Sci Rep* **5**, 17740 (2015).
24. Keppler, A. *et al.* A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat Biotechnol* **21**, 86–89 (2003).
25. Macias-Contreras, M. *et al.* SNAP/CLIP-Tags and Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloaddition (SPAAC)/Inverse Electron Demand Diels–Alder (IEDDA) for Intracellular Orthogonal/Bioorthogonal Labeling. *Bioconjug Chem* **31**, 1370–1381 (2020).
26. Hoelzel, C. A. & Zhang, X. Visualizing and Manipulating Biological Processes by Using HaloTag and SNAP-Tag Technologies. *ChemBioChem* **21**, 1935–1946 (2020).
27. Wang, L. *et al.* Small-Molecule Fluorescent Probes for Live-Cell Super-Resolution Microscopy. *J Am Chem Soc* **141**, 2770–2781 (2019).
28. Erdmann, R. S. *et al.* Labeling Strategies Matter for Super-Resolution Microscopy: A Comparison between HaloTags and SNAP-tags. *Cell Chem Biol* **26**, 584–592.e6 (2019).
29. Boutureira, O. & Bernardes, G. J. L. Advances in Chemical Protein Modification. *Chem Rev* **115**, 2174–2195 (2015).
30. Chen, X. & Wu, Y.-W. Selective chemical labeling of proteins. *Org Biomol Chem* **14**, 5417–5439 (2016).
31. Lim, S. & Kwon, I. Bioorthogonal Modification of Proteins Using Genetically Encoded Non-Natural Amino Acids. *Curr Org Chem* **20**, 1232–1242 (2015).
32. Thorn, K. Genetically encoded fluorescent tags. *Mol Biol Cell* **28**, 848–857 (2017).
33. Cserép, G. B. *et al.* Bioorthogonal fluorescent labels: a review on combined forces. *Methods Appl Fluoresc* **3**, 042001 (2015).

34. Bertozzi, C. R. A Decade of Bioorthogonal Chemistry. *Acc Chem Res* **44**, 651–653 (2011).
35. Meldal, M. & Schoffelen, S. Recent advances in covalent, site-specific protein immobilization. *FI000Res* **5**, 2303 (2016).
36. Finn, M. G. *et al.* Click chemistry connections for functional discovery. *Nature Synthesis* **1**, (2022).
37. Kozma, E. *et al.* Bio-orthogonal Fluorescent Labelling of Biopolymers through Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactions. *ChemBioChem* **18**, 486–501 (2017).
38. Tóth, B. Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer rendszerek vizsgálata. (Szakdolgozat, ELTE-TTK).
39. Sednev, M. v *et al.* Fluorescent dyes with large Stokes shifts for super-resolution optical microscopy of biological objects: a review. *Methods Appl Fluoresc* **3**, 042004 (2015).
40. Leica: The Guide to STED Sample Preparation at: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-guide-to-sted-sample-preparation/>.
41. Török, G. *et al.* Large Stokes-shift bioorthogonal probes for STED, 2P-STED and multi-color STED nanoscopy. *Methods Appl Fluoresc* **9**, 015006 (2021).
42. Paudics, A. *et al.* Carboxylato-pillar[6]arene-based fluorescent indicator displacement assays for the recognition of monoamine neurotransmitters. *RSC Adv.* **9**, 1773–1780 (2019).
43. Dlasková, A. *et al.* 3D super-resolution microscopy reflects mitochondrial cristae alternations and mtDNA nucleoid size and distribution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1859**, 829–844 (2018).
44. Ježek, P. *et al.* Mitochondrial Nucleoids: Superresolution microscopy analysis. *Int J Biochem Cell Biol* **106**, 21–25 (2019).
45. József, S. *Molekuláris sejtbológia*. (Dialóg Campus Kiadó - Nordex Kft., 2014).
46. Morgan, D. O. The Cell Cycle. Principles of Control. (2007).
47. Alberts, B. *et al.* *Essential Cell Biology* (Garland Science, 2013). doi:10.1201/9781315815015.
48. Eskelinen, E.-L. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med* **27**, 495–502 (2006).
49. Boehning, D. *et al.* Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* **5**, 1051–1061 (2003).

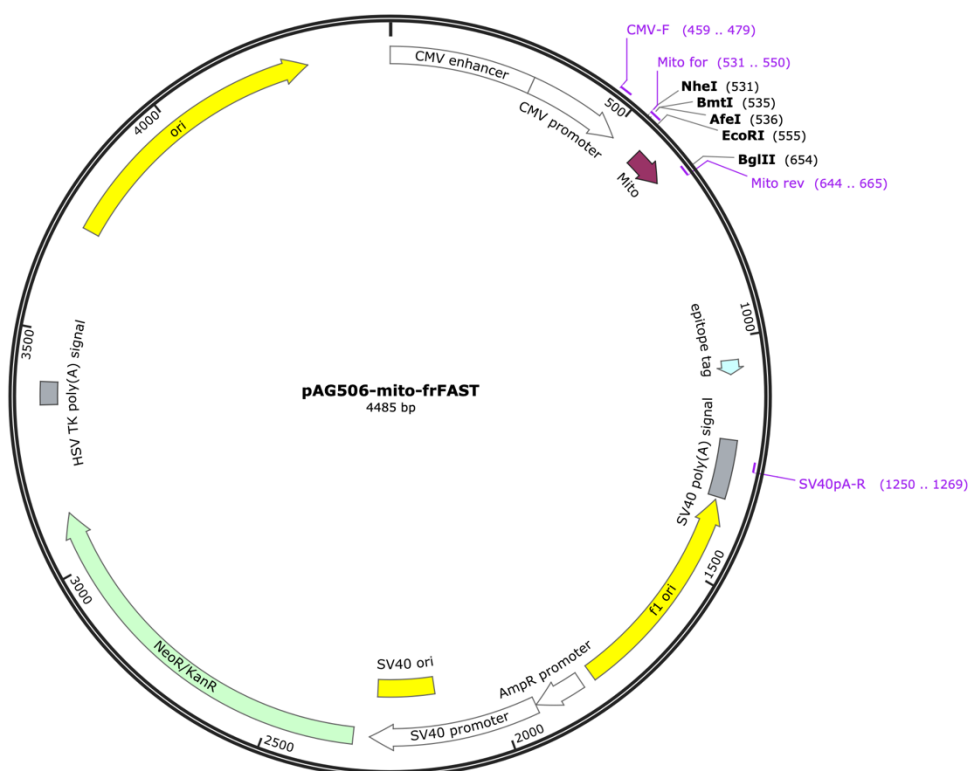
50. Eriksson, J. E. *et al.* Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *Journal of Clinical Investigation* **119**, 1763–1771 (2009).
51. West, R. R. *et al.* A model for microtubule-associated protein 4 structure. Domains defined by comparisons of human, mouse, and bovine sequences. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 21886–21896 (1991).
52. Addgene plazmid repozitórium: <https://www.addgene.org/>.
53. pSNAP-tag (m) Vector was a gift from New England Biolabs & Ana Egana (Addgene plazmid # 101135 ; <http://n2t.net/addgene:101135> ; RRID:Addgene_101135).
54. pCLIP-tag (m) Vector was a gift from New England Biolabs & Ana Egana (Addgene plazmid # 101136 ; <http://n2t.net/addgene:101136> ; RRID:Addgene_101136).
55. Li, C. *et al.* A Far-Red Emitting Fluorescent Chemogenetic Reporter for In Vivo Molecular Imaging. *Angewandte Chemie - International Edition* **59**, (2020).
56. Biró Adrienn: DNS plazmid-tár létrehozása nem-természetes aminosavak fehérjékbe építéséhez fluoreszcens mikroszkópiás és nanoszkópiás alkalmazásokhoz. (2020).
57. Szatmári, Á. *et al.* A genetically encoded isonitrile lysine for orthogonal bioorthogonal labeling schemes. *Molecules* **26**, (2021).
58. Albitz, E. *et al.* Bioorthogonal Ligation-Activated Fluorogenic FRET Dyads. *Angewandte Chemie - International Edition* **61**, (2022).
59. <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>.
60. <http://mcb.berkeley.edu/labs/krantz/tools/oligocalc.html>.
<http://mcb.berkeley.edu/labs/krantz/tools/oligocalc.html>.
61. NEB Tm Calculator: <https://tmcaculator.neb.com/>.
62. Wilhelm, J. *et al.* Kinetic and Structural Characterization of the Self-Labeling Protein Tags HaloTag7, SNAP-tag, and CLIP-tag. *Biochemistry* **60**, 2560–2575 (2021).

10. Függelék

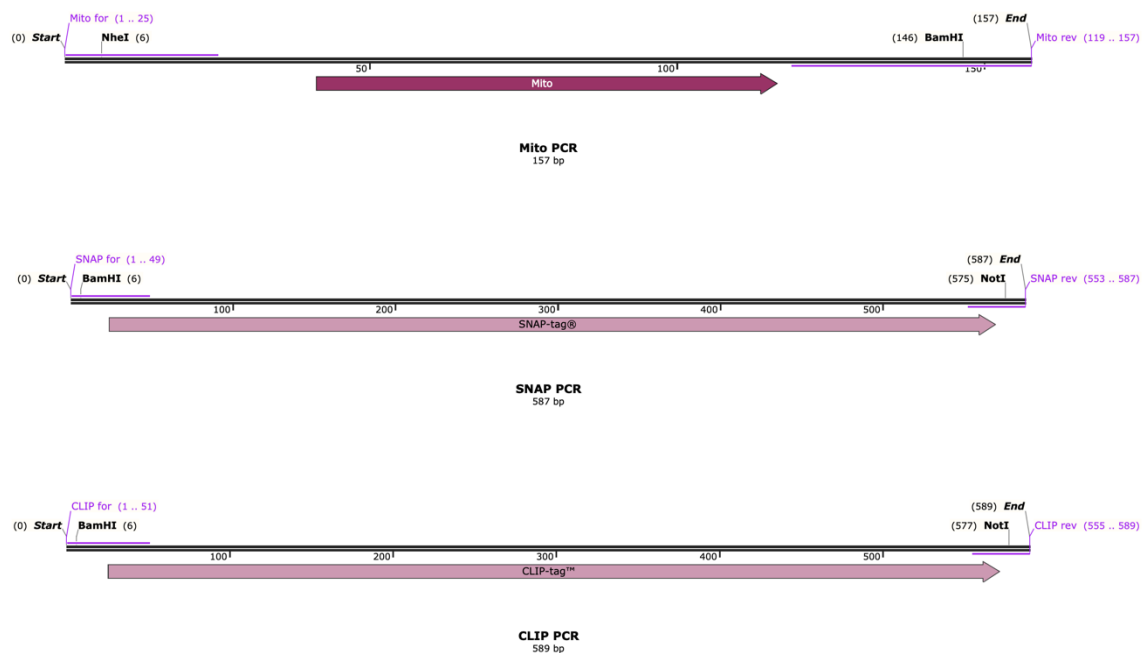
Kiindulási plazmidok térképei, melyeket az Addgene-től rendeltünk:



19. ábra Kiindulási SNAP-Tag és CLIP-Tag plazmidok

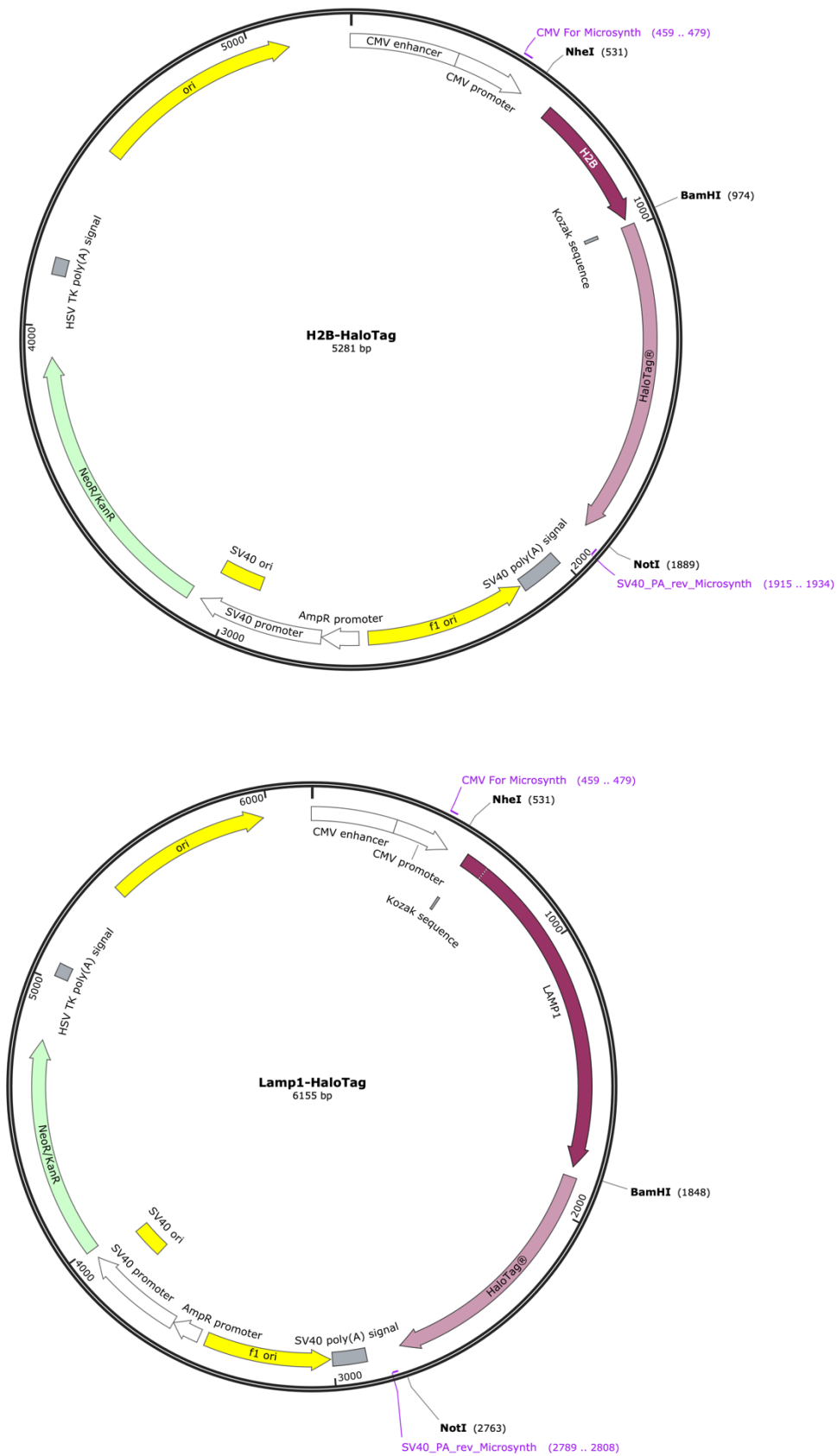


20. ábra A Mito CF-et kódoló kiindulási plazmid

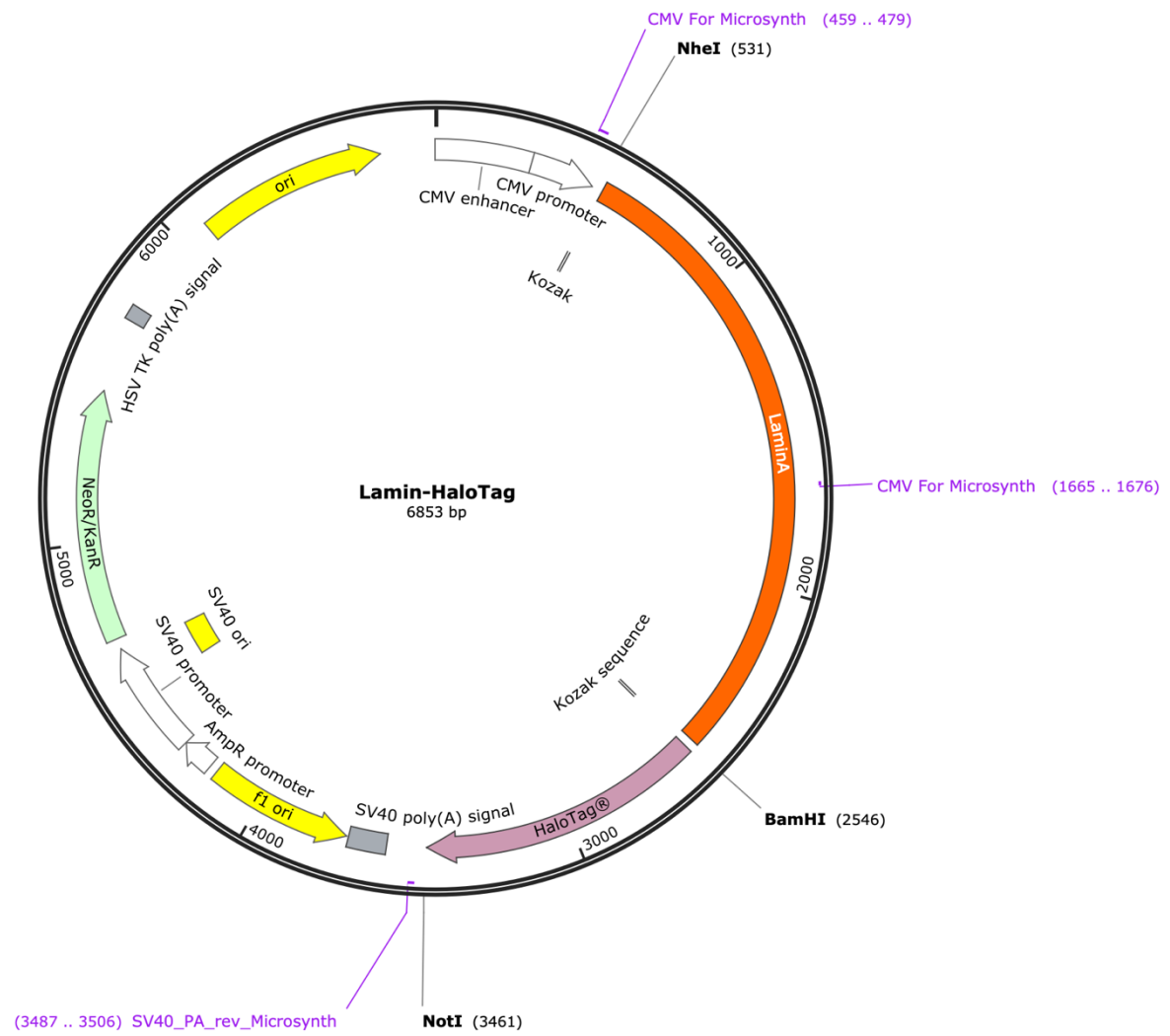


21. ábra Az elkészült PCR termékek

Az általam korábban elkészített plazmidok térképei:

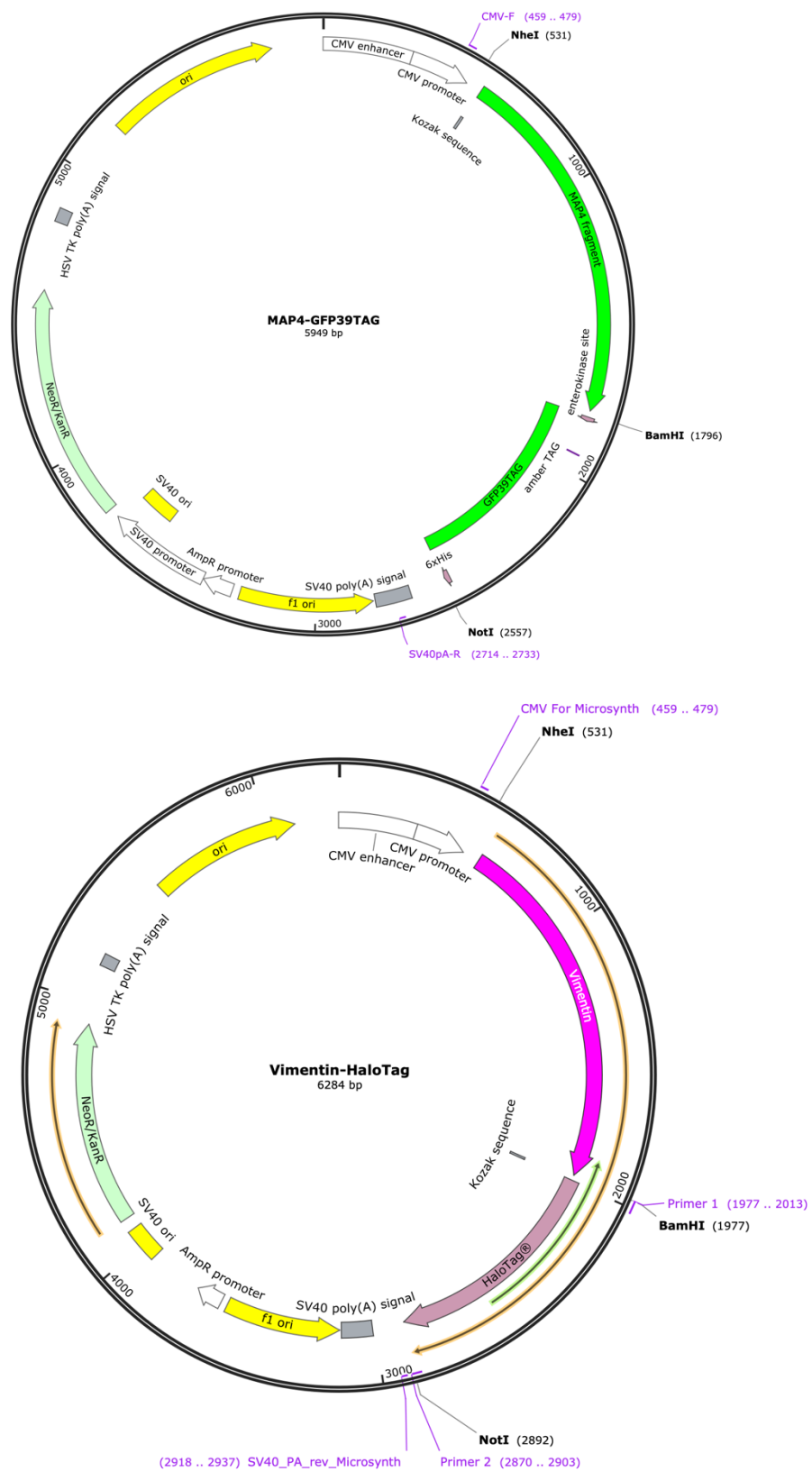


22. ábra H2B-HaloTag és Lamp1-HaloTag kiindulási plazmidok



23. ábra Lamin-HaloTag kiindulási plazmid

Kiindulási plazmidok, amiket Dr. Szatmári Ágnes és Kereszty Réka készített:



24. ábra MAP4 és Vimentin CF-et kódoló kiindulási plazmidok

Elkészült plazmidok térképei:

