



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

**Cinkujj fehérjéket kódoló DNS szekvenciák tervezése
sejteken belüli fehérje-DNS kölcsönhatás
tanulmányozása céljából**

KÉSZÍTETTE:

Horvát Melinda

Számítógépes és kognitív idegtudomány MSc, I. évfolyam

Eötvös Loránd Tudományegyetem

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Gyurcsik Béla, egyetemi docens

Hajdu Bálint, tudományos segédmunkatárs

Szeged

2022, november

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	4
2	Irodalmi áttekintés	5
2.1	DNS szerkesztés nukleázokkal – fontossága és módszerek	5
2.2	Cinkujj fehérjék	6
2.2.1	Cinkujj fehérjék felépítése	7
2.2.2	Cinkujj-DNS kölcsönhatás.....	8
2.3	Cinkujj nukleáz enzimek	9
2.3.1	1MEY# cinkujj nukleáz	10
2.4	Szekvenciaspecifikus DNS–fehérje kölcsönhatás vizsgálata	11
3	Célkitűzés	13
4	Kísérleti anyagok és módszerek	14
4.1	Gélelektroforézis.....	14
4.1.1	Agaróz gélelektroforézis	15
4.1.2	Poliakrilamid gélelektroforézis	16
4.2	UV-VIS spektrofotometria	16
4.3	Rekombináns DNS technológia.....	16
4.3.1	DNS hasítás restrikciós endonukleázzal	17
4.3.2	Enziminaktiválás.....	18
4.3.3	Ligálás – DNS végek összekapcsolása ligáz enzimmel.....	18
4.3.4	Alkalikus foszfatáz alkalmazása	19
4.4	Polimeráz láncreakció	19
4.5	Baktériumsejtek transzformálása, táptalajra szélesztése	20
4.5.1	Glicerines törzsoldat készítése	22
4.5.2	Sejtfeltárás szonikálással	22
4.6	Tisztítási módszerek	23
4.6.1	Thermo Scientific™ gélextrakciós készlet	23
4.6.2	Zymo Research Plasmid Miniprep-Classic.....	24
4.6.3	PEG kicsapás	25
4.6.4	Fenol-kloroform extrakció	26

4.7	Fehérjeszintézis indukálása arabinózzal	26
5	Eredmények	27
5.1	Rekombináns pBAD24-His-1MEY# plazmid DNS létrehozása	27
5.1.1	pBAD24 és pET16b-His-1MEY# hasítása	28
5.1.2	pBAD24 vektor és His-1MEY# DNS inszert ligálása	30
5.1.3	DH5 α kompetens sejtek transzformálása	31
5.1.4	pBAD24 vektor és His-1MEY# fehérjét kódoló DNS inszert ligálási sikerességének vizsgálata	33
5.2	Rekombináns pBAD24-1MEY# DNS kialakítása	35
5.2.1	Az 1MEY# DNS szekvencia sokszorosítása PCR-ben	36
5.2.2	Rekombináns DNS létrehozása a PCR terméket felhasználva	38
5.2.3	Cinkujj fehérjék kifejeződésének ellenőrzése	41
5.3	Rekombináns pBAD24-acc-MSGH-1MEY# DNS kialakítása	43
5.3.1	Az acc-MSGH-1MEY# DNS szekvencia sokszorosítása PCR-ben	43
5.3.2	Rekombináns „acc” DNS létrehozása a PCR terméket felhasználva	45
5.3.3	Újabb kísérlet a cinkujj fehérje túltermelésére	47
6	Összefoglalás	49
7	Irodalomjegyzék	50
8	Köszönetnyilvánítás	52

„A végtelenül kicsinek végtelenül nagy a szerepe.”

Louis Pasteur

1 Bevezetés

Számos genetikai eredetű (daganatos vagy öröklött) betegség létezik, melyek kezelése a mai napig kihívást jelent. Ahhoz, hogy ne csak a tüneteket orvosoljuk, ismernünk kell a probléma forrását, a hibás genetikai kódrészletet, és kísérletet kell tennünk ennek eliminálására/kijavítására. A javítást úgy indukálhatjuk, hogy a problémás szakasz közelében elhasítjuk a DNS-t, majd ezt követően a sejt beillesztheti a helyes szekvenciát, vagy úgy módosíthatja a nukleotidok sorrendjét, hogy helyreáll a sejt megfelelő működése, de legalábbis ahhoz közeli állapot.

A DNS specifikus hasítása nukleázokkal valósítható meg. A jelenleg ismert lehetőségek a cinkujj nukleázok, TALE nukleázok illetve a CRISPR/Cas9 génszerkesztési módszer. Egy génszerkesztő komplex specifikus helyen hasítja a nukleotidok közötti kötést. Ezt követően beindul a DNS önjavító mechanizmusa helyreállítva a DNS molekula épségét. A mesterségesen kifejlesztett eljárások azonban még nem tökéletesek, ugyanis részleges degradáció esetén (oxidáció, részek leszakadása vagy kapcsolódása), nem inaktiválódnak az enzimek, hanem nem tervezett helyeken szabdalják fel a DNS-t, azaz off-target hasításokat végeznek. Kutatócsoportunk a már meglévő tudományos eljárásokra alapozva, de az említett problémát orvosolni igyekezve, olyan mesterséges metallonukleázok kialakításán dolgozik, melyek teljesen biztonságosan használhatóak a DNS szerkesztés során, akár a humán gyógyászatban is.

Az általunk kialakított és vizsgált nukleázok felismerési és hasítási régióból állnak. A felismeréshez szükséges domént, az egy vagy több cinkiont tartalmazó nyúlványszerű részekre utalva, cinkujj fehérjének nevezzük. Ezekről a fehérjékről elmondhatjuk, hogy specifikusak a felismerési hely tekintetében, tehát csak egy bizonyos DNS szekvenciához kötődnek, és ezt jól szabályozott körülmények között végzik. Koncepcióinkban a DNS hasításért egy ATCUN motívum vagy a Colicin E7 nukleáz doménje felelős.

Az eddigi kísérletek *in-vitro* körülmények között ígéretesnek bizonyultak, így megterveztük a szükséges eljárásokat a fehérje-DNS kölcsönhatások sejten belüli tanulmányozásához is. Ehhez a nukleázok génjét sejtekkel kompatibilis DNS-hordozóba kell átültetni, majd a gén sikeres beépülését követően a fehérjetermelődés mértékét és azok DNS-felismerési specifikusságát vizsgáljuk sejtekben.

2 Irodalmi áttekintés

A DNS örökítőanyag felfedezése és szerepének tisztázása óta már eljutottunk a közel teljes humán genom szekvencia meghatározásáig nukleotidok szintjén, és több tízezer igazolt biológiai funkcióval rendelkező gén is azonosításra került. Az eredmények nagyban megkönnyítették az örökölt vagy szerzett genetikai eredetű betegségek okának tanulmányozását is.[1] Továbbá ismeretessé váltak olyan enzimek, melyek DNS szerkesztő tulajdonsággal bírnak, kiemelve a restrikciós nukleázokat és a polimerázokat. Emellett az elmúlt évtizedekben sikerült azonosítani moduláris felépítésű DNS-felismerő fehérjéket is. Mindezen felfedezések elvezettek a mai kor jelenleg is fejlődő génszabályozási módszereihez.[2] Az említett, természetben is előforduló DNS-felismerő és DNS-hasító fehérjék kombinálásával mesterségesen is tervezhető és előállítható enzimeket hozhatunk létre, melyek csak a célzott helyen hasítják el a DNS-t.

2.1 DNS szerkesztés nukleázokkal – fontossága és módszerek

A fehérjék kifejeződéséhez szükséges gének átírása (transzkripció) jól szabályozott körülmények között történik. Azt, hogy egy sejtnek éppen milyen fehérjékre van szüksége a belső és külső környezete határozza meg. Ez azt jelenti, hogy a gének egy része működik, másik része pedig kikapcsolt állapotban van egy adott időpillanatban. Ennek megvalósításához szükség van egy géncapcsoló mechanizmusra, valamint arra, hogy a sejt észlelni tudja a környezetének változását. Az utóbbit, a transzkripciós folyamatok szabályozásán keresztül, olyan szabályozó fehérjék teszik lehetővé, melyek a gén közelébe kötődve gátló vagy aktiváló hatással bírnak a kódolt fehérjék termelődésére (expresszió). A géncapcsoló funkciót általában egy represszor fehérje tölti be. Amikor egy ilyen fehérje hozzáköt a gén promóter régiójához vagy annak közelébe, a transzkripció gátolt. Viszont, ha valamilyen indukálószer kapcsolódik a represszor fehérjéhez, akkor az már nem tudja a promóter régióhoz kötve gátló hatását kifejteni, így a transzkripció folyamata lehetővé válik. Jól láthatóan már a fehérjekifejeződés elindításánál is számos kölcsönhatás áll fenn a DNS és különféle fehérjék között.[3] Majd ezt követi maga az átírás és a transzláció folyamata. Azonban, ha a gén helye a DNS-en (lókuszon) sérül, felbomlik a rend és különféle nem kívánt jelenség lép fel, mint a kódolt fehérje túl-, vagy alultermelődése, vagy funkciójukat betölteni nem képes fehérjék képződése. Ez pedig az életminőséget csökkentő betegségektől kezdve az akár halált okozó kórok megjelenését is jelentheti.[4]

Ilyen esetekben a betegségek megszüntetése csak a hibás DNS szekvenciák helyreállításán keresztül lenne megvalósítható. Ehhez be kell juttatni a sejtmagba egy ép

DNS részletet, valamint egy specifikus nukleázt, amely a hibás rész környékén elhasítja a gént. A sérülés aktiválja a sejt önjavító mechanizmusait, és a javítás során optimális esetben a bejuttatott ép DNS szakasz - homológ rekombináció révén - beépül a gazdaszervezet génállományába. A legfontosabb erre a célra alkalmazható nukleázok a cinkujj nukleázok (ZFN-ek), a transzkripciós aktivátor-szerű effektor-alapú nukleázok (TALEN) és a 2020-ban Nobel-díjat nyert CRISPR/Cas9 génszerkesztési módszer. Az utóbbi génszerkesztő komplex egy irányító RNS részt és a Cas9 endonukleáz enzimet tartalmazza, mely molekuláris ollóként funkcionál, és specifikus helyen hasítja a nukleotidok közötti kötést, míg az előző két rendszerben a DNS felismerést is fehérjedomén végzi.[5]

A CRISPR eljárás ígéretesnek mutatkozott laboratóriumi körülmények között, így a humán embriókon történő kísérletek is engedélyt kaptak, persze szigorú feltételek betartása mellett, és nem fejlődhet belőlük magzat. Mindezek ellenére 2018-ban illegális CRISPR génmódosítási eljárást hajtottak végre embriókon, majd a terhességből leányikrek születtek. A tervezett szerkesztés mellett több, felnőttkori betegséget eredményező génmódosulás történt, ezeket pedig tovább örökíthetik utódjaikra.[6] *In vivo* kísérletek tekintetében az említett eseten kívül eddig legfeljebb növények és állatok az alanyok. A cinkujj nukleázokat régebb óta alkalmazzák, ezek esetében, ugyan nem tipikusan, de előfordult felnőtt embereken történő kezelés. Minden esetben csak testi sejtek génállományában, ezek azonban sikeresnek bizonyultak.

2.2 Cinkujj fehérjék

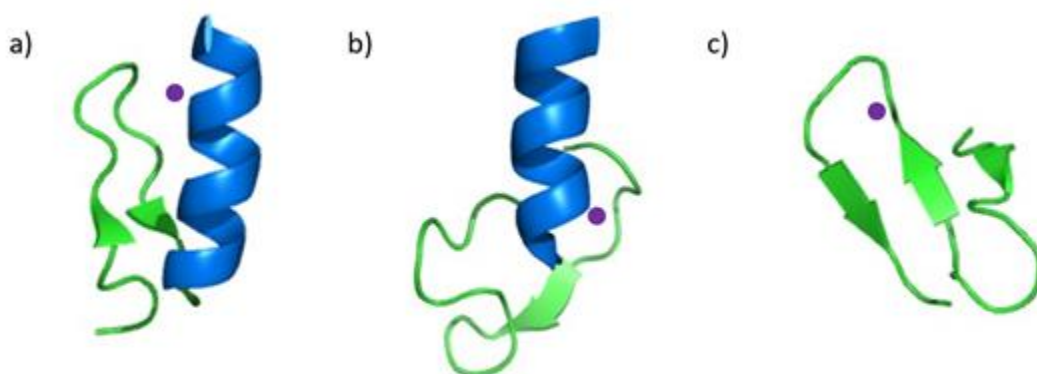
A cinkujj fehérjék számos eukarióta szervezetben megtalálhatóak. Az első felfedezett típus a Cys2His2 fehérje, melyet a dél-afrikai karmosbéka TFIIIA transzkripciós faktorában mutattak ki 1985-ben.[7] A fehérje cinkujj motívumokból épül fel. Minden cinkujj specifikus aminosavsorrenddel rendelkezik, ennek köszönhetően különböző, de meghatározott nukleotidokat ismernek fel a DNS-en.[8] A fehérje cinkionokat köt meg, ezek hiányában inaktiválódik. Mesterséges körülmények között ez jól szabályozható enzimműködést jelent. A cinkujj fehérjék nem csak szerkezeti megjelenésüket tekintve sokrétűek, de számos betöltött funkciójuk is ismeretes. Többek között DNS-felismerő mechanizmussal rendelkeznek, transzkripciós aktivitást szabályoznak, részt vesznek fehérjék térszerkezetének kialakításában és elősegítik a sejthalál (apoptózis) mechanizmusát.[9]

2.2.1 Cinkujj fehérjék felépítése

A cinkujj fehérjék, mint már említettük, legalább egy cinkujj motívumot tartalmaznak. Minden cinkujj rész általánosan 28-30 aminosavból épül fel, ezek között eltérő a hisztidin és a cisztein mennyisége. Ez azért fontos, mert egy cinkion a két említett aminosavhoz tud elsősorban koordinálódni. Megkötése pedig a cinkujj szerkezetváltozását, azaz térszerkezetének stabilitását adja. A cink közel 300 enzimtípus alkotórésze, nem vesz részt redoxireakciókban és erős koordinatív kötések kialakítására képes. Így érthető, miért a legalkalmasabb egy fehérje szerkezetének stabilizálására.[10] Aszerint, hogy a cinkujj doménjei mennyi Zn^{2+} -ionnal alakítanak ki kötést, és ezt a szerepet pontosan mely aminosav tölti be a kettő közül, több csoportba sorolhatjuk a cinkujj fehérjéket.

A már említett elsőként felfedezésre került Cys2His2 motívumban két cisztein és két hisztidin köti meg a $Zn(II)$ -t tetraédes geometriában jellemzően pM-os affinitással. Egy ilyen monomer általános aminosav felépítése: X-Cys-X₂₋₅-Cys-X₃-Phe-X₅-Leu-X₂-His-X₃₋₅-His, ahol X bármilyen aminosav lehet. Szerkezetét két antiparalell β -redő és egy α -hélix adja, amit a $Zn(II)$ -koordinációja és a szekvencián belüli hidrofób aminosav oldalláncok közti kölcsönhatás stabilizál (1. a) ábra). Ez a típus az emlősökben megtalálható szabályozó fehérjék legnépesebb családját alkotja.[11]

A violinkulcsos cinkujj motívumok az 1. b) ábrán láthatóan a C-terminális részen egy β -redőt, míg az N-terminális részen egy α -hélixet tartalmaznak, ezek két-két ligandummal járulnak hozzá a cink megkötéséhez. A cink-szalag cinkujjak egy cinkionnal alakítanak ki kötést, jellemzően cisztein oldalláncokhoz koordináltan, három β -redő alakítja a szerkezetét (1. c) ábra).[12]



1. ábra: a) Cys2His2 domén α -hélix (kék) és két β -redő (zöld) komponensei, lilával a cinkion (1mey.pdb, PyMOL program) b) violinkulcsos domén α -hélix és β -redő egységei (2w0t.pdb, PyMOL program) c) cink-szalag domén három β -redő egysége (6agg.pdb, PyMOL program).

2.2.2 Cinkujj-DNS kölcsönhatás

Egy cinkujj fehérje több cinkujj motívumot is tartalmazhat. Kutatások igazolják, hogy egy cinkujj egység nem alakít ki megfelelő erősségű kölcsönhatást a DNS-sel, ahhoz legalább két motívum szükséges. A cinkujj egységek összekapcsolása peptid-linkerek segítségével történik. A cinkujj-DNS kölcsönhatások megértéséhez nagyban hozzájárultak a ZIF268 cinkujj fehérjével kapcsolatos kiterjedt vizsgálatok.[13] Minden egyes cinkujj három egymást követő nukleotidot ismer fel a DNS szekvencián belül hidrogénkötéseken keresztül. Több cinkujj domén esetén a második alegység a következő bázishármashoz kapcsolódik. A hidrogénkötés a DNS bázisaival alakul ki, ezért a fehérje a nukleinsav nagyárkába köt, hogy könnyebben hozzáférjen a kettős spirál belső részéhez. A három nukleotid felismeréséért az α -hélix kezdetétől számított -1., 3. és 6. pozíciókban lévő aminosavak felelősek. A DNS komplementer szálán egy negyedik nukleotiddal történő kölcsönhatás is felléphet, ezt a kötést az α -hélix kezdetétől számított 2. helyen lévő aminosav alakítja ki.[14] Ugyan specifikusan meghatározhatjuk, egy cinkujj domén mely aminosavai felelősek a DNS nukleotidjainak felismeréséért és kötődéséért, némely más aminosav is befolyásoló hatással bírhat.[15]

A cinkujj fehérjék moduláris felépítése lehetőséget teremt a kutatók számára, hogy az egységek kombinálásával tetszőleges DNS szekvenciát célozzanak meg. A DNS felismerés specifikitása növelhető az összekapcsolt motívumok számával. Azonban négynél több cinkujj domén összekapcsolása során szerkezeti feszültségek léphetnek fel, ezek csökkenthetik a kölcsönhatás erősségét. A probléma kiküszöbölése érdekében több makromolekula egyidejű, helyileg egymást követő kötődése tervezhető, vagy hosszabb fehérjék esetében a domének a DNS-szál különböző részeihez kötődhetnek.[16]

A cinkujj fehérjék a DNS guaninban gazdag részeivel alakítanak ki erősebb kölcsönhatásokat. Ez másként megfogalmazva azt jelenti, hogy ha a felismerési szekvencia kisebb mértékben tartalmaz guanin nukleobázist, akkor a fehérje-DNS kölcsönhatás erőssége csökkenhet. Ha olyan doméneket kapcsolnak össze, melyek főként az említett bázishoz kötődnek, akár jóval hosszabb, stabilan kötődő fehérjék tervezése is lehetővé válik.[17] Mindezek ismeretében megfelelően nagy DNS affinitással és specifikitással rendelkező cinkujj fehérjéket tervezhetünk tetszőlegesen kiválasztott nukleotidszekvenciák felismerésére. Számos kutatás folyik a 4 féle nukleotid 64 különböző hármas kombinációit felismerő cinkujj alegységek azonosítása céljából. Csak ezek ismeretében tudhatjuk biztosan az összeállított cinkujj fehérjék felismerési képességét. A gyakorlatban igen nehéz az összes lehetőséget megvizsgálni, így jelenleg nincs olyan cinkujj domén könyvtár, mely az összes

lehetőséget tartalmazza. Léteznek azonban olyan programok, amik becslést adnak az optimális cinkujj fehérje aminosav összetételére ahhoz, hogy az általunk kiválasztott DNS szekvenciát a legnagyobb szelektivitással ismerje fel. (pl. Zinc Finger Tools)[18]

2.3 Cinkujj nukleáz enzimek

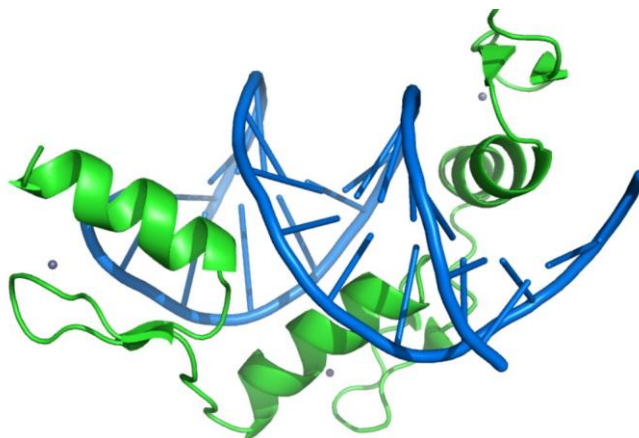
A cinkujj nukleázok olyan mesterséges molekulák, melyek egy cinkujj fehérje és egy nukleáz részből épülnek fel. A klasszikus cinkujj nukleázok hasító doménjeként a FokI restrikciós endonukleáz hasító doménjét alkalmazták a cinkujj fehérjéhez fűzve. Ezek a mesterséges enzimek felismerik a DNS egy jól meghatározott szakaszát, hozzákötődnek, majd mindkét szálon hasítást végeznek. A cinkujj nukleázok által vezérelt génszerkesztés magas hatékonyságot mutat. Kutatások szerint a hasítás hatékonyságát tovább növeli, ha azt két egyedi tervezésű cinkujj nukleáz fehérjével valósítjuk meg, melyek a DNS megkötésekor heterodimerizálódnak a FokI nukleáz doménjükön keresztül, és így egy katalitikusan aktív nukleáz komplexet képeznek.[19] A DNS kötődés erősségét ugyan erősíti ha guaninban gazdag részt ismer fel a cinkujj domén, azonban a hasítás eredményességét csökkentheti, hiszen a guanin és a citozin között három hidogénkötés van, míg az adenin és timin bázispárt csak két kötés stabilizálja.

Mesterséges cinkujj nukleázok tervezésénél alkalmazható az amino terminális fémkötő (ATCUN) fehérje motívum is. Ez a Cu^{2+} - és Ni^{2+} -ionokat megkötni képes részlet a természetben is fellelhető számos eukarióta szervezetben. A humán szérum albumin fehérjében (HSA) azonosították elsőként, ahol számos feladata mellett réz(II) ionok szállítását végzi.[20] Egy ATCUN motívum jellemző síknégyzetes szerkezetének kialakulása fémionok hatására jön létre, ehhez szükség van a fehérje közbeeső részén két deprotonálható peptidcsoport jelenlétére. Felépítését tekintve egy szabad N-terminális aminocsoportot és egy harmadik helyen található hisztidin aminosavat tartalmaz.[21] Korábbi ismeretek alapján a motívum réz/nikkel komplexe képes a DNS nem specifikus hasítására, ezáltal cinkujj egységgel való kombinálás esetén mesterséges metallonukleázként funkcionálhat.[22][23]

A Colicin E7 bakteriális toxin nukleáz doménje szintén egy lehetséges mesterséges metallonukleáz kialakítására alkalmas fehérje.[24] A motívum C-terminális részén található a Zn^{2+} -iont tartalmazó katalitikus központja, mely a DNS nemspecifikus hasításáért felelős. A katalitikus központ három hisztidinje (H544, H569, H573) koordinálódik a Zn^{2+} -ionhoz, míg annak negyedik koordinációs helyén vízmolekula helyezkedik el. Ebből alakulhat ki a nukleofil OH^- részecske, ami a DNS hidrolíziséért felelős. Az N-terminális részén

elhelyezkedő arginin szintén részt vesz a hasítási folyamatban, a cinkionnal együtt megkötik és aktiválják a hasítandó foszfodiészter kötés foszfát csoportját. A két központi egység a DNS megkötése során kerül közel egymáshoz és együttesen végzik a DNS hidrolitikus hasítását.

2.3.1 1MEY# cinkujj nukleáz



2. ábra: Az 1MEY cinkujj fehérje a DNS nagyárákában – kristályszerkezet (1mey.pdb, PyMOL program).

Az általam vizsgált és módosított 1MEY# cinkujj fehérje az 1MEY PDB kóddal ellátott fehérje-DNS kristályszerkezetben található cinkujj fehérje egy módosított változata.[23] Cinkujj doménjeinek felépítése a Cys2His2 csoportnak (2. ábra) felel meg, szekvenciája nagyban hasonlít a CP1 modellpeptidre, amit a cinkujj alegységek modellezésére használtak oldatkémiai vizsgálatok során. Génjének nukleotid szekvenciája és a kódolt aminosav sorrend, valamint a három cinkujj domén a 3. ábrán zöld színnel kiemelve látható. Megfigyelhető a Cys2His2 motívumnak megfelelő aminosav szekvencia.

```
atgggccatcatcatcatcatcatcatcatcacagcagcgcccatatcgaaggctcgatcatgtctggaaccgggcgaa
M G H H H H H H H H H S S G H I E G R H M L E P G E
aagccgtataaatgccagaatgcggtaaatcttttagtcaaagcagcaaccttcagaaacaccagcgtagccacacaggc
K P Y K C P E C G K S F S Q S S N L Q K H Q R T H T G
gaaaaaccgtataagtgtccgaatgtggtaaatcattctcgcagtccttcggacttgagaaacatcaacgcacccatacc
E K P Y K C P E C G K S F S Q S S D L Q K H Q R T H T
ggcgaaaaaccgtataaatgtccgaatgcgggaagtcatcttccgcagcgataacctggttcgccatcagcgtagccat
G E K P Y K C P E C G K S F S R S D N L V R H Q R T H
actggtataaaaaacctcttaa
T G K K T S -
```

3. ábra: 1MEY# cinkujj fehérje DNS szekvenciája (Expasy.org fordító).

Egy cinkujj domént 21 aminosav épít fel, ezek között 7 aminosav hosszú linker szekvencia található. A DNS hasításért felelős fehérjerészlet a Ser-Gly-His-Ile aminosav szekvencia (kék színnel kiemelve a 3. ábrán). Az ez előtt található dekahisztidin rész a fehérje tisztítását segíti elő, de Ni(II)-által indukált proteolízis során ez a szakasz specifikusan hidrolizál és az N-terminális végén a fehérjének a Ser-Gly-His-Ile szakasz marad hátra, ami így ATCUN motívumként funkcionál, képes Cu(II) és Ni(II) megkötésére.

Az általam vizsgált 1MEY# cinkujj nukleáz 9 nukleotidot felismerő DNS szekvenciája a következő: 5' - GAGGCAGAA - 3'

2.4 Szekvenciaspecifikus DNS–fehérje kölcsönhatás vizsgálata

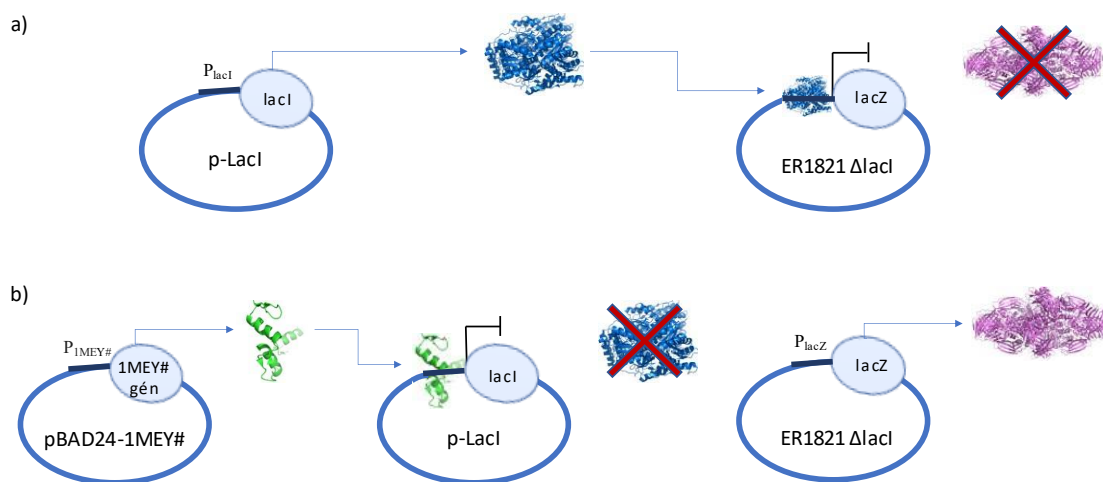
DNS-felismerő illetve hasító fehérjék tervezése/alkalmazása során elengedhetetlen a kölcsönhatás meglétének, erősségének és specifitásának vizsgálata. A szekvenciaspecifikus DNS–fehérje kölcsönhatások során szerkezetváltozás is történhet a makromolekulákban, ez befolyással lehet a kötés erősségére.[25] Ezeket a mechanizmusokat mindenképp érdemes feltérképezni a további kísérletek tervezéséhez.

A korábban említett 1MEY# cinkujj fehérje DNS-kötési tulajdonságait kutatócsoportunk karakterizálta, és nukleáz aktivitási vizsgálatok is folynak csoportunkban. Az ilyen *in vitro* vizsgálatokkal kapcsolatban számos kutatás található, [26][27] hátrányuk azonban, hogy tisztított fehérje felhasználása szükséges, ez pedig idő-, és energiaigényes eljárássá teszi a folyamatot. Léteznek baktériumsejtekben történő vizsgálatok is, ezekben fehérje fuzionálását idézik elő az RNS-polimeráz egy alegységéhez.[28] Ez az eljárás már sejtekben történik, de ugyanúgy technikai bonyodalmakba ütközik. Szegedi kutatók nemrégiben kidolgoztak egy I-Block nevű módszert, mely *Escherichia coli* sejtekben mutatja ki viszonylag egyszerűen a DNS–fehérje kötés erősségét/specifikusságát anélkül, hogy bármilyen todalékot kellene a vizsgálandó fehérjéhez kapcsolni kovalensen. Az eljárás a laktóz operon¹ szabályozó mechanizmusán alapul. A laktóz hasznosítását biztosító mechanizmust jól ismerjük, hiszen a bakteriális génműködés szabályozásának első legrészletesebb leírását a *lac* operon szerveződése és szabályozásának megismerése tette lehetővé, azóta csak tovább bővültek az ismereteink.[29] A Lac-represszor fehérjét kódoló gén (*lacI*) a baktérium genomiális DNS-en közel helyezkedik el a *lac* operon szabályozása alá eső *lacZYA* gének területéhez. A *lacI* transzkripciójának blokkolásával nem termelődik a represszor fehérje, az nem köt a *lac* operon operátor régiójához, azaz nem gátolja a

¹ operon – több gént tartalmazó, közös szabályozású transzkripció egység

transzkripciót, ezáltal az operon szabályozása alatt álló fehérjék termelődése aktív. A *lacZ* gén a β -galaktozidáz enzimet kódolja, így az említett felállás esetében ez a fehérje is termelődik. Az I-Block rendszer ennek a folyamatnak a mesterséges manipulációjával működik, folyamatosan detektálva a β -galaktozidáz enzimaktivitást.

Az eljárás során felhasznált baktérium kromoszomális DNS-éből eltávolították a Lac-represszor fehérjét kódoló gént. A represszor fehérje hiányában a *lac* operon folyamatosan aktív, ezzel együtt a β -galaktozidáz enzim termelődése a lehető legnagyobb. A baktériumba két hordozó DNS-t juttatnak be. Az egyik a *lacI* gént tartalmazza, valamint a gén *placI* promóter régiójába NheI restrikciós endonukleáz segítségével beépíthető az a specifikus szekvencia, ahová a vizsgált DNS-kötő fehérje kapcsolódni képes. A másik hordozó magát a DNS felismerő fehérjét kódoló gént tartalmazza, ez cinkujj fehérje is lehet. A *lacI* génről átíródó represszor fehérje megszünteti a β -galaktozidáz eddig konstans szintézisét. Azonban, az általunk tanulmányozott DNS-kötő fehérje, ha az megfelelő erősséggel és specifitással képes kötődni a felismerési szekvenciájához, ezzel képes gátolni a *lacI* gén transzkripcióját. Emiatt újra magasabb β -galaktozidáz enzimaktivitás mérhető.[30] Az enzim aktivitásának detektálásával következtetni lehet a vizsgált szekvenciaspecifikus DNS-fehérje kölcsönhatás erősségére. A 4. ábrán az általam vizsgált 1MEY# cinkujj fehérje I-Block rendszerben történő elméleti megvalósíthatóságának ábrázolása látható.



4. ábra: a) A kék színnel ábrázolt Lac-represszor fehérje (forrás: 4rzt.pdb, PyMOL program) termelődése aktív. A *lac* operon operátor régiójához kötődve megakadályozza a lila színnel ábrázolt β -galaktozidáz fehérje (forrás: 3vdb.pdb, PyMOL program) kifejeződését. **b)** A zöld színnel ábrázolt 1MEY# cinkujj fehérje (forrás: 1MEY.pdb, PyMOL program) termelődik és hozzákötődik a *lacI* gén promóter régiójához. Ezzel megakadályozza a Lac-represszor fehérje termelődését. Ekkor viszont kifejeződhet a β -galaktozidáz fehérje.

3 Célkitűzés

A cinkujj nukleázok kutatásáról széleskörben olvashatunk az irodalomban. Rendkívül hasznos fehérjekomplexek, specifikus sejten belüli DNS hasítást tervezhetünk általuk. Kutatócsoportunk régóta foglalkozik ilyen nukleázok tervezésével és vizsgálatával. Számos potenciális nukleáz ígéretesnek bizonyult az *in vitro* kísérleteken, így csoportunk elhatározta, hogy sejteken belül, *in vivo* is tanulmányozzuk ezeket az enzimeket az I-Block rendszer segítségével. Ez azért is célszerű, mert a fehérjék előállítása, majd azok tisztítása igen időigényes és körülményes feladat, továbbá az enzimek nem feltétlenül működnek azonosan tesztcsőkísérletekben és az élő szervezetekben.

Kutatási munkám során célul tűztem ki, hogy a korábban *in vitro* tanulmányozott hisztidin toldalékkal ellátott 1MEY# cinkujj fehérje génjét olyan pBAD DNS hordozóba építem át, ami kompatibilis az I-Block tesztrendszerrel, azt sejtekbe juttatva stabilan sokszorozódik, hosszútávon fennmarad és a cinkujj fehérje képes kifejeződni róla. Amennyiben megállapítom, hogy ezen feltételek teljesülnek, a DNS hordozó alkalmas a hisztidin toldalékos cinkujj fehérje DNS-kötésének vizsgálatára.

Emellett megkísérlem oly módon megtervezni az 1MEY# gén beépítését az I-Block rendszer DNS hordozójába, hogy a fehérje kifejeződése során annak N-terminális végén kialakuljon az ATCUN motívum. Amennyiben ezt sikerül megvalósítani, elképzeléseink alapján nem csak a fehérje DNS-kötését, de annak nukleáz aktivitását is tanulmányozhatnánk az I-Block tesztrendszerben.

4 Kísérleti anyagok és módszerek

Munkám során számos sejt- és génmanipulációs, valamint biológiai analitikai módszer megismerésére, gyakorlására tehettem szert. A következő fejezetekben részletesen ismerettem ezen eljárások menetét, felvezetve kutatásaink eredményének bemutatását.

4.1 Gélelektroforézis

A gélelektroforézis különböző alakú, méretű, töltéssel rendelkező makromolekulák elválasztására, hosszuk meghatározására alkalmas módszer. Gyakran alkalmazzuk a következő fejezetekben részletesebben taglalt DNS rekombinációs eljárások sikerességének vizsgálatára, DNS fragmensek azonosítására, de tisztítási módszerként is megfelelő. Az eljárás azon a tényen alapszik, hogy elektromos erőterben a molekulák az össztöltésükkel ellenkező töltésű elektród felé vándorolnak. Ismeretes, hogy a DNS molekula a foszfátcsoportjai révén, semleges kémhatású ($\text{pH} \sim 7$) oldatban, negatív össztöltésű. Ennek köszönhetően a gélelektroforézis során a nukleinsavak automatikusan az anód felé fognak vándorolni. Azonban az elektroforézist gyakran fehérjék szétválasztására is használjuk, melyeknél az össztöltés kérdése nem ilyen egyszerű, azt az aminosav-felépítés és az alkalmazott pH határozza meg. A probléma kiküszöbölése érdekében megelőző lépésként negatív töltésekkel látjuk el a futtatni kívánt fehérjemolekulákat. Erre egyik alkalmas vegyület a nátrium-dodecil-szulfát, röviden SDS. A dodecil-szulfát anionok a fehérje molekulára adszorbeálódva negatív össztöltésű molekulakomplexet eredményeznek. Továbbá, a molekula denaturálódik, és a kialakuló egységes "pálcika" alak megkönnyíti az eredmény kiértékelhetőségét. Gyakran alkalmazunk denaturáló eljárást elektroforézis előtt, természetesen ez is céltól függő. Ha viszont a szétválasztásnál csak a molekulák hosszát szeretnénk alapul venni, akkor mindenképp szükséges lépés.

A bakteriális cirkuláris DNS molekuláknak (plazmidoknak) többféle alakú formája ismert. A nyílt cirkuláris forma lassabban halad a gélben, mint a lineáris forma, de gyorsabban, mint a multimer vagy konkatemer DNS – utóbbi két említett forma több plazmid összekapcsolódásával keletkezik. Leggyorsabb a superhelikális DNS, mely egy kompakt – cirkuláris, de többszörösen feltekeredett – könnyebben migráló molekulát jelent. Láthatóan a molekulák alakja is befolyással lehet a gélben való haladás sebességére, így e szerint is szétválhatnak az alkotók. A gél az említett formák esetleges előfordulását figyelembe véve vizsgálhatjuk. DNS fragmentumok hosszának összehasonlításához mindenképp érdemes a lineáris formákat alkalmazni. Ekkor egyértelműen elmondható, hogy egy nagyobb

molekulatömegű, azaz hosszabb DNS szál lassabban halad a gél mátrixában, mint egy rövidebb társa.

A gélelektroforézis összeállításáról általánosan elmondhatjuk, hogy egy gélmátrixot készítünk zsebekkel, melyet egy pufferoldatot tartalmazó futtatókádba helyezünk. A zsebekbe felvisszük a vizsgálni kívánt mintát, melyet célszerű mikropipettával végezni. A körülményekhez igazított – általában 100 V körüli – feszültség alkalmazásával fél-egy órán keresztül futtatjuk a mintákat. A vizsgálni kívánt minták mellé ismert DNS komponenseket tartalmazó marker is felvitelre kerül, ezzel összehasonlítva értékeljük az eredményt.

4.1.1 Agaróz gélelektroforézis

Általában a cirkuláris vagy nagyobb molekulatömegű lineáris DNS-t tartalmazó keverékek szétválasztására 1%-os² agaróz gélelektroforézist állítunk össze. Kisebb DNS fragmentumok hatékony elválasztásához töményebb gél³ készítünk az alkalmas pórusméret kialakítása céljából. Az elegyet vízszintezett öntőformába vesszük, és az erre alkalmas eszközzel kialakítjuk a zsebeket. A gél, elkészítését követően, a futtatókádba kerül, ekkor a zsebekbe felvihetjük az előkészített mintákat ügyelve arra, hogy későbbi vándorlási irányuk biztosított legyen a megfelelő elektród felé. A rendszer horizontális kialakítású. A mintaelőkészítés része, hogy 6×LD³ festékanyagot mérünk minden oldathoz. A kék szín elősegíti a minta követését az elektroforézis során, valamint az elegy glicerint is tartalmaz, mely nagy sűrűsége miatt lehetővé teszi a DNS mintáknak a gél zsebeiben tartását az elektroforézis megkezdéséig – a DNS molekulák így nem diffundálnak ki a zsebekből a pufferoldatba.

A recept szerint a gélkészítés során etídium-bromid hozzáadása is szükséges. A vegyület egyik tulajdonsága, hogy az elektroforézis folyamata alatt beékelődik a vándorló DNS molekulák bázispárjai közé. Emiatt kiemelten vigyáznunk kell a használatakor, ugyanis a saját DNS molekuláinkba is interkalálódhat – védőkesztyű használata kötelező a munka során. Azonban ez a tulajdonság teszi lehetővé a DNS érzékeny detektálását is, mivel a DNS-be ékelődött etídiumionok UV fénnel megvilágítva fluoreszcenciát mutatnak. Az elektroforézist követően tehát UV fény segítségével vizsgáljuk a gél³, ekkor határozottan elkülönülő, lilás színben fluoreszkáló sávokat láthatunk. Minden ilyen sáv várhatóan azonos méretű, hosszúságú és alakú DNS komponenseket tartalmaz, melyek kevés sáv esetén

² A szakirodalomban %-ként tüntetik fel, ezért mi is így használjuk. A valóságban azonban 1g agarózt oldanak fel 100 ml vizes oldatban, mely 2ml 50×TAE (Tris-acetát-EDTA) puffert és esetenként 100 µl 500 µg/ml koncentrációjú EtBr (etídium-bromid) oldatot tartalmaz.

³ 6×Loading Dye - kék festékanyag, 1:5 festék-minta térfogatarányban alkalmazzuk.

azonosíthatók a marker sávjaival összevetve, illetve azok mérete alapján egy ismeretlen DNS mérete becsülhető. Érdekes fotóval dokumentálni az eredményeket.

Az agaróz gélelektroforézissel vizsgált minták mellett $5 \times \text{dil}^4$ 1 kbp GeneRuler Plus markert futtattam, ezt általában a géleképek bal oldalán láthatjuk majd.

4.1.2 Poliakrilamid gélelektroforézis

Fehérjék és a néhány tíz-száz bázispár hosszú DNS-ek vizsgálatához *PAGE*⁵ eljárást alkalmazunk. Itt egy vertikális kialakítású rendszerben a minták lefelé haladnak a mátrixban. A kevesebb, mint egy milliméter vastagságú gél két üveglap között alakítjuk ki. Fehérjék vizsgálata során SDS-t is alkalmazunk a fentiekben leírtak miatt. Kék festőanyaggal vizuálisan észlelhetővé tesszük a fehérjesávokat, majd a marker segítségével kDa⁶-ban fejezzük ki a fehérjék becsült molekulatömegét.

4.2 UV-VIS spektrofotometria

Egy oldatban lévő DNS vagy fehérje koncentrációját meghatározhatjuk annak fényelnyelési képességének vizsgálatával. 260 nm hullámhossz és 1 cm fényút alkalmazásával 50 ng/μl DNS abszorbanciája 1. Ennek alapján számol az általunk használt NanoDropTM mérőműszer DNS vizsgálata esetén. Azt, hogy éppen milyen mintát mérünk, megadhatjuk a menüpontok kiválasztásával. 280 nm hullámhosszon a fehérjéknek fényelnyelési maximuma van, ezt felhasználva a spektrofotométer egy DNS tisztaságára utaló értéket is ad, melyet a 260 és 280 nm-en mért abszorbancia értékek hányadosából számol. Az érték optimális tisztaság esetében 1,8. Ennél alacsonyabb értéknél fehérjeszennyezésre, míg magasabb szám esetén DNS szennyeződésre következtethetünk.

A mérés nulladik lépéseként beállítjuk a háttérrel a mérendő minta tiszta puffer oldatára. 1,5-2 μl térfogatú minta felvitele javasolt.

4.3 Rekombináns DNS technológia

Rekombinációnak nevezzük a DNS nukleotid szintű törését, majd az azt követő újraszerveződését. A rekombináció a természetben is folyamatosan lejátszódó folyamat, egyik fő célja a hibajavítás. A legtöbb fajnál megfigyelhető az utópopuláció változatossága, ezt a homológ rekombináció folyamata eredményezi, mely közel azonos szekvenciák között zajlik, és közben nem keletkezik, de nem is vesz el információ.

⁴ diluted – 1:5 arányban hígított

⁵ poliakrilamid gélelektroforézis

⁶ dalton (Da) - atomi tömegegység

Laboratóriumi körülmények között, a természetben is jól bevált módszer szerint, restriktációs endonukleázokkal és ligázokkal végezzük a rekombináció folyamatát.

Gyakran alkalmazzák rekombinációs kísérletekben hordozóként a pBAD24 cirkuláris DNS, mely 4542 bázispárból áll, tartalmaz minden vektorra jellemző régiót, így számos nukleáz hasítási helyet is. Kísérleteimben én is ezt a vektort alkalmaztam, a reakciókhoz 190 ng/μl koncentrációjú DNS-oldat állt rendelkezésemre. A célfehérjét kódoló, pBAD24 hordozó DNS-be beépítendő, rövid DNS szakasz (inszer) a pET16b-His-1MEY# cirkuláris DNS-ben található. Ebből 200 ng/μl koncentrációjú mintával dolgoztam.

4.3.1 DNS hasítás restriktációs endonukleázzal

Gyakran egy DNS szálnak csak bizonyos részét szeretnénk vizsgálni, vagy egy cirkuláris DNS linearizált formájával szeretnénk dolgozni, más esetben az a célunk, hogy összekapcsolható DNS fragmenseket hozzunk létre – mindegyik esetben az első fő lépés a nukleázzal történő DNS hasítás. A nukleázok olyan fehérjék, melyek a nukleinsavak emésztését teszik lehetővé. Az endonukleázok a DNS láncon belül hasítanak, míg az exonukleázok a láncvégi nukleotidokat hasítják le. A restriktációs endonukleázok olyan enzimek, melyek specifikus helyeket – általában 4-8 nukleotid részt – ismernek fel a DNS molekulán, hozzákötnek, majd mindkét szál foszfodiészter kötését meghatározott helyen hasítják hidrolízis révén.[2] Kísérleteim során restriktációs endonukleázok alkalmazása volt indokolt, melyek felismerési helye leggyakrabban palindrom⁷ szekvencia. Ha a hasítási hely a szimmetria középpontban van, akkor tompa (*blunt*) végek, más esetben ragadós (*sticky*) végek képződnek. A ragadós végek kialakítása hatékonyra és irányítottá teszi az emésztést követően a végek ligáz enzimmel történő összekapcsolását.

A restriktációs hasítás *in-vitro* körülmények között minden esetben egy optimalizált koncentrációban bemért komponensekből összeállított elegy elkészítésével valósítható meg, megfelelő hőmérsékleti és pH viszonyok mellett, a szükséges reakcióidő meghatározásával. Az ideális környezeti tényezők megteremtéséhez ismernünk kell az adott enzim enzimaktivitását, melyet *unit*-ban⁸ fejezzük ki.

A kísérleteimben felhasznált cirkuláris DNS-ek hasítását HindIII és NcoI restriktációs endonukleázok együttes alkalmazásával végeztem. Mindkét enzim megfelelő működéséhez szükséges reakciókörülmények megteremtése érdekében a gyártó által biztosított útmutatás

⁷ kettős rotációs szimmetriával rendelkező

⁸ 1 unit (u) az az enzim mennyiség, amely 1 μg DNS 60 perc alatt történő teljes emésztéséhez szükséges 37°C-on, 50 μl térfogatban.

alapján a Tango fantázianeveű pufferoldatot alkalmaztam reakcióközegként. Az elegyeket 2 órán át 37°C-on szükséges inkubálni.

A ligálási reakciók ellenőrzésekor NdeI restrikciós endonukleázt alkalmaztam, ami az 5'-CA^vTATG-3' szekvenciát hasítja. 20 µl végtérfogóban ~100-200 ng DNS-t kevertem össze 0,5 µl 20 U/µl NdeI enzimmel (NEB) és 2 µl 10×Orange pufferrel. A mintákat 2 órán át 37°C-on inkubáltam, az NdeI enzimet 65 °C-on 20 percig inaktiváltam.

4.3.2 Enziminaktiválás

Az enzimek általános feladata, hogy katalizálják az egyébként spontán végbemenő folyamatokat, csak általuk átláthatóbb reakcióidőben gondolkodhatunk. A reagensek csökkenésével az enzimaktivitás is jelentősen csökken, azonban még sokáig nem szűnik meg, ezért a legtöbb enzimreakciót előre eltervezett, pontosan kiszámolt és betartott időkorláttal végezzük. Ha ez az idő letelik, az enzimeket inaktiválni szükséges, hogy ne történjen nem kívánt reakció.

Az enzimek fehérjék, így természetes körülmények között is nagyon érzékenyek a pH vagy a hőmérséklet megváltozására és mechanikai hatásra is. Az inaktiváláshoz alkalmazhatók különféle kémiai denaturálószerke, de mi a legtöbb kísérletünk során hőkezelést alkalmaztunk. Néhány hőstabil enzim kivételével ezt könnyedén megtehetjük a reakcióelegy felmelegítésével 65-80°C hőmérsékletre. Ekkor a fehérje térszerkezete szétesik, denaturálódik, ami jellemzően aktivitásvesztést okoz.

A HindIII és NcoI enzimek esetében 80°C-on történő 10 perces inaktiválást alkalmaztam a használati utasításban leírtak szerint.

4.3.3 Ligálás – DNS végek összekapcsolása ligáz enzimmel

Ligálás során két DNS szál összekapcsolásával egy újat hozunk létre. A két fragmensnek illeszkedő (komplementer) túlnyúlással (ragadós véggel) vagy tompa véggel szükséges rendelkeznie. Ezt a fragmenseknek az ugyanolyan restrikciós endonukleázzal való hasítása révén érhetjük el. A ligáz enzim ATP felhasználásával észterkötést hoz létre az 5' foszfát-, és a 3' hidroxilcsoportok között. Az általunk alkalmazott T4 ligáz ezen felül képes olyan esetben is eredményesen összekapcsolni két DNS fragmenst, amennyiben csak az egyik fragmens 5' végén helyezkedik el foszfát csoport, míg a másik szálon mindkét összeillesztendő rész –OH csoporttal végződik. Amennyiben egyik fragmentum sem tartalmaz foszfát csoportot, a ligálás nem megy végbe. Az enzim ezen tulajdonságát kihasználva elősegíthető a sikeres ligálási reakció, amennyiben az inszert végeit defoszforiláljuk (lásd 4.3.4) majd nagy mértékű moláris felesleget alkalmazunk belőle a

linearizált hordozó DNS-sel szemben. Ekkor ugyanis a nagy inszert felesleg ellenére azok nem képesek egymással összekapcsolódni, csakis a hordozó DNS-sel, utóbbi reakciónak így megnő a valószínűsége.

Egy tipikus 20 μ l végtérfogatú ligálási reakció összeállításakor 2 μ l 10 $\times$ T4 ligáz puffert és 0,5 μ l 5 U/ μ l enzimaktivitású T4 ligáz enzim oldatot mértem össze 50-100 ng linearizált DNS hordozóval és a hordozóhoz képest 5-10-szeres mólarányú inszerttel. Ügyeltem rá, hogy a 10 $\times$ T4 ligáz puffer teljesen kiolvadjon, majd használat előtt homogenizáltam. A munkám során összemért ligálási reakciónál 16 °C hőmérsékleten *overnight* történő inkubálást alkalmaztam. Azért választottam a 16 °C-t, mert, ugyan az enzim lassabban működik, de ez a hőmérséklet optimálisabb a ragadós végek közötti hibridizáció kialakulásához.

4.3.4 Alkalikus foszfatáz alkalmazása

Az alkalikus foszfatáz egy hidroláz enzim, azaz vízfelvétellel molekulák lebomlását katalizálja. DNS rekombinációs eljárások során végbontó enzim szerepe van. Kísérletek igazolják, hogy egy restrikciós endonukleázzal történő kezelést követően az elhasadt DNS fragmensek vége között spontán reakciók folyamán ismét kialakulhat a kémiai kötés, úgynevezett önzáródás történhet. Ezt elkerülendő, alkalikus foszfatáz enzimmal kezeljük az elhasított hordozó DNS-t (vektort). Az enzim a korábban említett végbontó funkcióját a DNS 5' végén lévő foszfát-csoport eltávolításával tölti be. A folyamatot defoszforilálásnak nevezzük.

Kísérleteimben a beépíteni kívánt DNS-t tartalmazó mintát FastAp alkalikus foszfatáz enzimmal kezeltem, 10 $\times$ FastAp puffer hozzáadásával, 5 perc inaktiváási időt alkalmazva.

4.4 Polimeráz láncreakció

A polimeráz láncreakció a molekuláris biológia egyik legismertebb DNS sokszorosító módszere. Rendkívül egyszerű, hatékony és jól reprodukálható eljárás. *In vitro* tetszőleges DNS darabokat szaporíthatunk fel PCR eljárás során. Ezek a DNS részek nem lehetnek túl hosszúak és ismernünk kell a DNS szálat két oldalon határoló rövid kódrészletet. Az eljáráshoz szükséges egy minta DNS szakasz (templát), a DNS polimeráz enzim, valamint dNTP-k, mint a DNS építőkövei. A polimerizáció kiindulási, illetve végpontjait a DNS egyik, illetve másik szálával komplementer szekvenciájú oligonukleotid primerekkel határozzuk meg. A primerek megválasztásával vagy tervezésével lehetőség nyílik a sokszorosított DNS szálvégi módosítására is.

Az eljárás különböző hőmérsékleten lezajló lépésekből tevődik össze, melyek ciklusosan ismétlődnek. Az első lépés a DNS kettős spirál szálainak szétválasztása, azaz a makromolekula denaturációja. A második lépésben az egyszálú templát és a primerek hibridizálódnak. Ez a lépés jelöli ki a polimerizáció kezdőpontját, *annealing*-nek nevezzük. A harmadik, elongációs lépésében a polimeráz enzim a primerektől kiindulva dNTP-k felhasználásával szintetizálja a komplementer láncot 5'→3' irányba. Az így képződő kétszálú DNS a következő ciklusban új templátot szolgáltat. Az eljárás során szintetizált termék mennyisége a 2 hatványaival növekszik, ez az elméleti elvárás. A gyakorlat során ennél valamivel kisebb a termékképződés hatékonysága.

Primertervezés során ügyelnünk kell néhány szabály betartására. Minél rövidebb oligonukleotidot tervezzünk, csökkentve ezzel a szintézis során a hibalehetőségeket. A guanin-citozin tartalom maradjon 60% alatt, ugyanis nagyobb arány esetében a három hidrogénhid kialakítása miatt a szintézis reakcióideje kevésbé lenne kiszámítható. A két primer optimális tapadási (hibridizációs) hőmérséklete legyen egymáshoz minél közelebbi értékek. Ha új szekvenciárész beépítését célozzuk meg a PCR-ben, akkor az első lépésben a primer nem tapad teljes mértékben a templáthoz, azonban mindenképp érdemes minél nagyobb arányban tapadó részt tervezni. A PCR termékéből restrikciós endonukleázzal ligálásra alkalmas DNS fragmentumot tudunk előállítani.

4.5 Baktériumsejtek transzformálása, táptalajra szélesztése

A rekombináns DNS vektor replikációját baktérium sejtekben végezzük *in vivo* sokszorozás céljából. Ehhez először a baktériumsejteket a vektorral transzformáljuk – azaz bejuttatjuk az újonnan létrehozott cirkuláris DNS-t a baktériumsejtekbe. Az eljárás elvégzéséhez kompetens sejtekre van szükség, melyek képesek befogadni a bejuttatni kívánt nukleinsavat. A kompetens sejteket specifikusan kiválaszthatjuk a célnak legmegfelelőbb tulajdonságokkal, leggyakrabban a *Escherichia coli* törzs különböző fajait alkalmazzák a laboratóriumi kísérletek során. Többek között egy baktériumsejt lehet nagyfokú DNS replikációs, vagy akár gyors és nagy mennyiségű fehérjekifejező képességű. Ahhoz, hogy egy baktériumsejt kompetenssé váljon, elő kell készíteni. A sejtfal permeabilizálása (átjárhatóvá tétele) CaCl_2 -oldat hozzáadásával történik, majd a sejteket folyékony nitrogénnel fagyasztva -75°C -on tároljuk. A baktériumsejtek így hibernált állapotban túlélnek, a sejtfalukon pedig apró lyukak keletkeznek, mely utat teremt a transzformálás során használt makromolekulának.

Baktériumsejtek transzformálási folyamatánál többféle módszert alkalmazhatunk. A legtöbb eljárás azon alapszik, hogy a baktériumok stresszhelyzetben plazmidokat vesznek fel a környezetükből, hátha azok segítik túlélésüket. Az általam alkalmazott összeállításokban 50 µl kompetens sejthez ~100 ng DNS-t szükséges hozzáadni, ezért fontos a minták előzetes koncentrációjának vizsgálata. Óvatosan összekeverjük mikropipettával, majd 1 órán át jégen inkubáljuk. Ezt követően a sejteket hirtelen előzetesen 42°C-ra melegített vízfürdőbe helyezzük át 2 perc inkubálási idő erejéig. Ezalatt a cirkuláris DNS molekulák bejutnak a kompetens sejtekbe, majd visszatesszük jégre 1-2 percre. Ekkor a sejtfal bezáródik.

Az eljárást követően valószínűsíthető, hogy megfelelő mennyiségű DNS jutott be a sejtekbe, így elkezdődhet azok felélesztése és szaporítása. Az ehhez szükséges körülményeket az úgynevezett LB-tápoldattal teremtjük meg, mely többek között élesztőkivonatot és NaCl-ot tartalmaz. Beállítja az optimális kémhatást és tartalmazza a baktériumok metabolizmusához szükséges anyagokat. A néhány perces jégen inkubálást követően a mintákhoz 100 µl tápoldat kerül és vízfürdőben 1 órán át rázatjuk a sejteket.

Az általam alkalmazott pBAD24 hordozó DNS ampicillin rezisztenciát is kölcsönöz a sejteknek a benne kódolt β-laktamáz enzimnek köszönhetően. Ezáltal tudjuk vizsgálni a transzformálás sikerességét, ugyanis ampicillint tartalmazó táptalajon petricsészékben szélesztettem a sejteket, ahol azok csak úgy tudnak túlélni, ha rendelkeznek a beépített DNS által kódolt rezisztens tulajdonsággal. A folyamat során Agar-Agar táptalaj⁹ tartalmú petricsészékre igazítjuk el a szuszpenziót. A szélesztés fülke alatt történik, a kenőpálcát pedig etanolba mártva, majd azt tűzben elpárologatva sterilizáljuk. A mintákat tartalmazó lemezek mellett kontroll csoportokat is készítünk. (1) Az üres kontrollra nem kerül minta – ezzel ellenőrizzük a steril körülményeket. Itt nem nőhet baktériumtelep. (2) A negatív kontroll esetén életképtelen (az alkalmazott antibiotikumra nem rezisztens, azaz nem transzformált) sejteket juttatunk a táptalajra, ezzel ellenőrizve, hogy a bakteriális DNS biztosan nem tartalmazza az ellenálló képességhez szükséges információt. Ezzel az antibiotikum hatásosságáról is megbizonyosodhatunk. (3) Pozitív kontrollt olyan transzformált sejtekkel végzünk, melyekbe nem az újonnan előállított rekombináns DNS-t juttatjuk, hanem az eredeti hordozó DNS-t, amely biztosan tartalmazza a rezisztens gént. Ha minden reakciókörülmény megfelelő, itt biztosan nőnek baktériumtelepek.

⁹ 100 ml Ampicillin tartalmú LB-Agar lemezhez szükséges oldat: 1 g tripton, 0,5 g élesztőkivonat, 1 g NaCl, 1,5 g Agar-Agar por, 100ml-re MilliQ H₂O kiegészítésével; 15 perc sterilizálás magas hőmérsékleten és nyomáson; kézmeleg hőmérsékleten 100 µl Ampicillin

A petricsészéket 37°C hőmérsékletű levegőn 1 éjszakán át fejjel lefelé fordítva inkubáljuk. Ezalatt olyan baktériumtelepek nőnek, amin belül a sejtek azonos génállománnyal rendelkeznek, és ha nem számolunk a kis eséllyel előforduló mutációkkal, akkor szaporodásukkal hosszútávon replikálják az általunk bejuttatott rekombináns DNS-t is. A baktériumok az említett körülmények megteremtése mellett 20 percenként osztódnak, azaz számuk exponenciálisan nő mindaddig, míg elegendő tápanyaghoz jutnak. Nem szabad engedni, hogy a telepek túl nagyokra nőjenek, mert ez megnehezíti a kiértékelhetőséget és a további munkát, valamint a környezetükben elbontott antibiotikum miatt egyéb szatellittelepek is nőhetnek nem rezisztens baktériumokból kiindulva.

4.5.1 Glicerines törzsoldat készítése

A transzformált baktériumsejteket szeretnénk hosszú távon is eltárolni úgy, hogy ne szaporodjanak, viszont ne is pusztuljanak el. Ezt glicerines törzsoldat készítésével valósíthatjuk meg. A glicerint a fagyasztás során meggátolja, hogy az oldatban jégkristályok keletkezzenek, amelyek szétroncsolnák a sejteket. Egy ilyen törzsoldat készítésénél 200 µl 65%-os glicerint adunk 500 µl sejthez. A laboratóriumban 87%-os glicerinsó-oldat áll rendelkezésemre, ezért ebből 136 µl-t mértem a mintákhoz. Homogenizálás után -75°C-on tároljuk a sejteket. Ezzel a módszerrel akár évekig is épségben túlélnek a baktériumok.

4.5.2 Sejtfeltárás szonikálással

Fehérjét túltermelő baktériumsejtekből a fehérje tisztításának első lépése a sejtfal roncsolása. Ennek egyik jól bevált módszere a szonikálás, azaz ultrahangos szövet homogenizálás. Ennek során kisfrekvenciájú, nagy intenzitású ultrahang hullámokkal kezeljük a sejteket, miután azokat reszuszpendáltuk 1 ml 1×Binding Buffer-ben. A puffer 5 mM imidazolt, 0,5 M NaCl-ot (meggátolja, hogy a fehérje a negatív össztöltésű DNS-hez kössön), 100 mM Hepes (pH 8,2 - kémhatás beállításához, a fehérje megfelelő közegének) puffert, valamint 0,1% triton detergenst tartalmaz, mely elősegíti a baktériumok sejtfalának bontását.

A szonikálás folyamatában szétroncsoljuk a sejteket. A hőfejlődés miatt érdemes a mintákat közben jégen tartani, elkerülve ezzel a fehérjék denaturálódását. Az eljárás során vékony titánfejet alkalmaztam. Az Eppendorf csövet úgy helyezzük el a jégben, hogy az stabilan álljon és párhuzamos legyen a szonikáló-műszer fejjel, melyet állványhoz rögzítve állíthatunk be szintén megfelelő pontossággal, ami azt jelenti, hogy érjen bele a mintába, de ne engedjük a cső aljáig, valamint nem érhet a cső falához sem, mert a rezgések megolvastanák azt, és elfolya a minta. A mintát és a cső stabilitását folyamatosan figyeljük

a szonikálási fázisok alatt. Ha a minta habosodni kezd, azonnal meg kell szakítani az eljárást. A kísérleteim során alkalmazott szonikálási folyamatban 2 részletben sikerült elérni a szükséges 9 kört a következő beállítások szerint: 50% amplitúdón 30 s + 1 perc szünet beállítással 5 kör hajtható végre. Majd 3×5 perc 1000 rpm centrifugálás, hogy megszűnjön a buborékosodás, ezt követően ismét 4 kör szonikálás a korábban leírtak szerint. Az eljárást addig folytatjuk, amíg a baktériumszuspenzió áttetszővé válik.

20 µl mintavétellel a TOTAL (TOT) teljes fehérjetartalmat vizsgáltam. A többi mintát centrifugáltam 4°C-on 10000 g-n 5 percig. Ezáltal a sejtalkotók kiülepedtek, a felülúszóból pedig a SOLUBLE (SOL) oldható fehérjeminta nyerhető. A centrifugálás üledékét ismét 1 ml 1×Binding Buffer-ben felfuszpendáljuk, akkor UNSOLUBLE, oldhatatlan fehérjemintát is vizsgálhatunk. Mi ezt nem végezzük el, mert a korábbi tapasztalatok azt mutatták, hogy ebben már nagyon kevés a kimutatható fehérje.

4.6 Tisztítási módszerek

Sokszor nem tudjuk elég hatékonyan felhasználni a mintánkat, vagy nem végezhetünk specifikus vizsgálatokat, mert az nem elég tiszta. Ez a szennyeződés sokféle lehet, ha sejtekkel dolgozunk: genomiális DNS, RNS, fehérjék, de más molekulák is, mint a cukrok. A DNS tárolása tekintetében is célszerűbb minél tisztább mintát fagyasztani. A következő néhány fejezetben a kísérleteim során leggyakrabban használt tisztítási eljárásokat mutatom be.

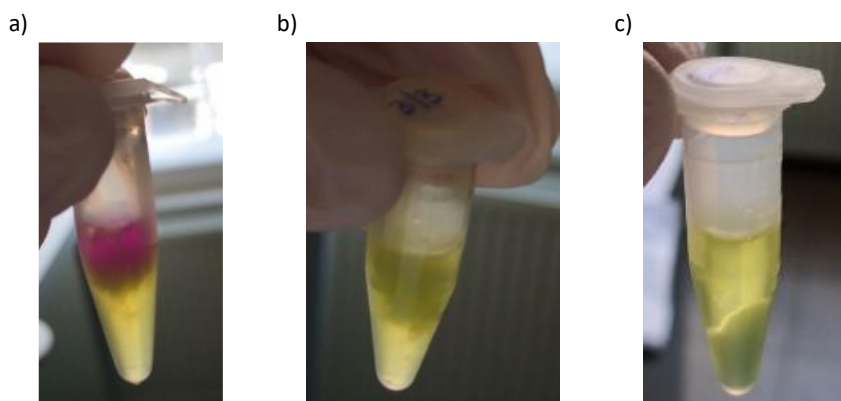
4.6.1 Thermo Scientific™ gélextrakciós készlet

A gélextrakciós tisztítási módszer használata gélből való kivágás esetén igen hasznos, ugyanis megtisztíthatjuk a DNS mintánkat a gél-szennyeződéstől. A használati utasítás szerint a géldarabkákat tartalmazó Eppendorf csövekhez 1:1 arányban sárga színű Bindig Buffer oldat hozzáadása történik. Ebben oldjuk fel a gél anyagát 1 perc melegítés, majd vortex eszközzel rázatás, majd még 2-3 perc melegítés alatt. Mini oszlopkromatográfiás eljárással történik a tisztítás. Ez töltésekkel ellátott szilikát tartalmaz, anioncserélő oszlopként funkcionál, így köti a negatív töltésű DNS-t. A mintafelvétel után 14500 rpm, 1 perc centrifugálás következik, az átfolyó részt kiöntjük. Az oszlopra újabb 100 µl Binding Buffer kerül és a mintákat 1 percig centrifugáljuk 14500 rpm fordulaton. Az átfolyó részt szintén eltávolítjuk. A szilikára 700 µl etanollal hígított Wash Buffer kerül, a mintákat ismét centrifugáljuk. Az oszlopra 30 µl 10 mM Tris (pH 8,5) puffer kerül. 1 perc inkubálás után 1 percig centrifugáljuk. Fontos, hogy itt már úgy kezeljük a mintát, hogy a DNS az átfolyó részbe kerül.

4.6.2 Zymo Research Plasmid Miniprep-Classic

A sejtekben sokszorozott rekombináns DNS-tisztítására többnyire gyártói készleteket alkalmazunk. Első lépésben a centrifugált sejteket tartalmazó üledéket visszaszuszpendáljuk oldatba. Erre alkalmas a piros színű P1 puffer, melyből 200 µl-t mérünk be. Ekkor még sejtes mintákkal dolgozunk, így alufólián végezzük a műveletet és minden egyes minta után (m)etanollal tisztítjuk a pipettát és a felületet. Vortex-szel segítjük az üledék szuszpendálását, majd, ha teljesen homogén lesz az elegy, átpipetázzuk Eppendorf csőbe. A kék színű P2 puffer következik, melyből szintén 200 µl-t mérünk be. A puffer SDS detergenst (poláros és apoláros résszel is rendelkezik – roncsolja a sejtmembránt, megtörténik a lízis), valamint pH ~ 12 kémhatást biztosító NaOH-t (hatására kicsapódik a fehérje, az erősen lúgos közegben szétválnak a DNS szálai) tartalmaz. Ebben a lépésben a cső óvatos fordítgatásával elkeverjük az elegyet, míg homogén lila színt nem látunk, ez 1-2 percet vehet igénybe, majd közvetlen utána kerül bele a P3 puffer. Ha több mintával dolgozunk, érdemes egyesével elvégezni a P2 és P3 puffer adagolását. A P2 pufferrel történő kezelést követően már nem beszélünk sejtes közegről.

A sárga színű P3 puffer tartalmaz RNáz enzimet is, így ezt hűtőben tároljuk. Jégecetet és kálium-acetátot is tartalmaz, mely pH ~ 5 szintet állít be pufferhatás révén, így a DNS szálak újra összeállnak, valamint kicsapódik a detergens, amire a genomiális DNS is ráaggregálódik, mert az nem tud újra összeállni a molekula túl nagy mérete miatt. Ebből 400 µl-t mérünk a mintára. Az Eppendorf csövet addig mozgatjuk/forgatjuk, míg teljesen eltűnik a lila szín (5. a) ábra), ekkor már szépen láthatóvá válik a kicsapott detergens - genomiális DNS aggregátum és az egyéb kicsapódott rész (5. b) ábra).



5. ábra: a sejtek kicsapódott és kiülepített tartalma (fotó: Horvát Melinda, 2021).

14500 rpm fordulaton 4 percig centrifugáljuk a mintát, hogy a szilárd törmelék leülepedjen. Így a felülúszóban nagyrészt csak DNS maradt az 5. c) ábrán láthatóan. A mintákat azonban tovább szükséges tisztítani a cukrok és egyéb molekulák elválasztása céljából. Ez a tisztítási rész mini oszlopkromatográfiával történik. Ügyeljünk arra, hogy az oszlopokra csak a felülúszó kerüljön rá, majd fél percig centrifugáljuk magas fordulaton. Az átfolyó részt leöntjük és rávisszük az oszlopra a 200 µl Endo-Wash puffert. Szintén fél perc centrifugálás történik, az átfolyó részt kiöntjük. Rákerül az etanolos 400 µl Plasmid-Wash puffer, ezt követően is fél perces centrifugálás szükséges, majd leöntjük az átfolyó részt.

A DNS leoldásához a kiserelésben DNA Elution Buffer néven található puffer, de ez 0,1 mM EDTA-t is tartalmaz – ez nem alkalmas számunkra a kísérleteink során, mert a későbbiekben hasítani tervezzük majd a kitisztított DNS-t – így ehelyett 10 mM Tris (pH 8,5) puffert alkalmazunk 30 µl részletekben. Miután felvittük a puffert, 1-2 percig inkubáljuk a mintákat, majd újabb fél perc centrifugálás következik. Az átfolyó elegy már csak a tiszta DNS-t tartalmazza.

4.6.3 PEG kicsapás

Cirkuláris DNS vektorok genomiális DNS-től történő tisztítására alkalmas eljárás a PEG kicsapás. Az eljárás polietilén-glikol (PEG) által történő vízelvonáson alapszik, erről kapta a nevét is. A folyamat során azt várjuk, hogy a PEG a genomiális DNS-sel alakít ki erős kölcsönhatást, a DNS vektor pedig kicsapódik. A PEG vízben és etanolban is jól oldódik. A PEG-6000 oldatot 1:1 térfogatban mérjük hozzá a tisztítani kívánt mintához. Rövid, 30 s rázatást követően jégen inkubálást alkalmazunk. Kevés genomiális DNS szennyeződés esetén hosszabb inkubálási időt szükséges hagynunk, ez nagyjából 10 órát jelent. Az inkubálást követően vortexes rázatás történik, majd centrifugálás 13500 rpm fordulattal 4°C-on 1 percig. Megjegyezzük, hogy hogyan helyeztük be az Eppendorf csöveket, mert a centrifugális erő hatására a cső külső részére tapad a DNS csapadék. A centrifugálást követően ez megkönnyíti a felső fázis biztonságos eltávolítását. Teljes mértékben ezt nem tudjuk megtenni, így előfordulhat, hogy maradt még PEG a mintánkon, ezt etanollal oldjuk. 200 µl 70 v/v% -20°C etanol alkalmazása javasolt. A -20°C hőmérsékleten tartás azért fontos, mert ezen a hőmérsékleten folyékony kell, hogy legyen az etanol, ha megfagyott, akkor elpárolgott belőle az etanol a nem megfelelő tárolás miatt és így nem tudjuk felhasználni. 5 perc rázatás után ismét centrifugálás történik 13500 rpm fordulaton 25°C hőmérsékleten 6 percig. Óvatos pipetázással eltávolítjuk a felülúszót. A szilárd csapadékot nemigen lehet látni, de bízunk benne, hogy a szükséges mennyiség az

alkalmazott csőben maradt. Szabad levegőn 30 perc szárítás történik. Érdeemes fóliával letakarni, hogy csökkentjük a szennyeződés lehetőségét. Ezt követően még vákuumos vízsugár-szivattyúval segíthetjük az esetlegesen még megmaradt etanol elpárologtatását. A mintákat visszaoldjuk 20 µl steril dH₂O oldatba. Az eljárást követően nagy mértékben csökken a mintánk genomiális DNS szennyeződése.

4.6.4 Fenol-kloroform extrakció

A fenol-kloroform extrakció egy folyadék-folyadék elválasztási (tisztítási) módszer, ahol nukleinsavakat és fehérjéket különíthetünk el oldhatóságuk alapján.

Első lépésben 1:1 térfogatarányban fenol-kloroformot mérünk a mintához. Majd vortexszeljük 30 másodpercig. Már ekkor látható a fázisok különválása. Értelemszerűen az alsó fázisban található a fehérje, ez sárgás színű, a felső fázisban pedig a DNS. A felső vizet fázist óvatosan eltávolítjuk. 2,5:1 térfogatarányban 100% EtOH-t mérünk a különválasztott felső fázisra és ezt is 30s vortexszeljük.

Második lépésben -150°C-ra hűtjük a mintát, ezt folyékony nitrogénnel tesszük. Ezt követően 15 percig 4°C-on 13500 rpm fordulaton centrifugálást végzünk. Közvetlen ezután 200 µl hideg 70% EtOH-t mérünk a mintákra, ezt is vortexelés követi. A felülúszót eltávolítjuk és vákuum berendezés segítségével még tovább szárítjuk a mintát, ezt követően alkalmas térfogatba oldhatjuk a DNS-t.

4.7 Fehérjeszintézis indukálása arabinózzal

Az arabinóz cukor lebontásának szabályozása sokban hasonlít a laktózéhoz. Az *ara* opreon tartalmazza az *araBAD* géneket, melyek az arabinóz lebontásában részt vevő fehérjéket kódolják. A lebontó enzimek termelődésével összehangoltan expresszálódik az általam vizsgált pBAD24-His-1MEY# hordozó DNS-ben az His-1MEY# cinkujj fehérje is. Ezért a fehérje termelődésének indukálását arabinózzal végeztem a kísérleteim során.

A szakirodalom szerint az arabinózt 0,1%-os (valójában 0,1 g/100 ml) koncentrációban ajánlatos alkalmazni. Ez a rendelkezésemre álló 200 mg/ml arabinóz törzsoldatból 6,66 mM moláris koncentrációt jelent. A számításainknak megfelelően 23 µl törzsoldatot szükséges bemérni 4,5 ml sejtkultúrába. 37°C-on 3 órán át történik a reakcióelegyek inkubálása. Ezt követően három részletben centrifugáljuk a mintáinkat 14000 rpm fordulaton 5 percig, a felülúszót mindig eltávolítjuk, összegyűjtjük, amit sterilizálni szükséges. A sejteket fagyasztva tároljuk további felhasználásig.

„Nem akkor alkottál tökéleteset, ha már nem tudsz mit hozzátenni, hanem ha már nem tudsz mit elvenni belőle.”

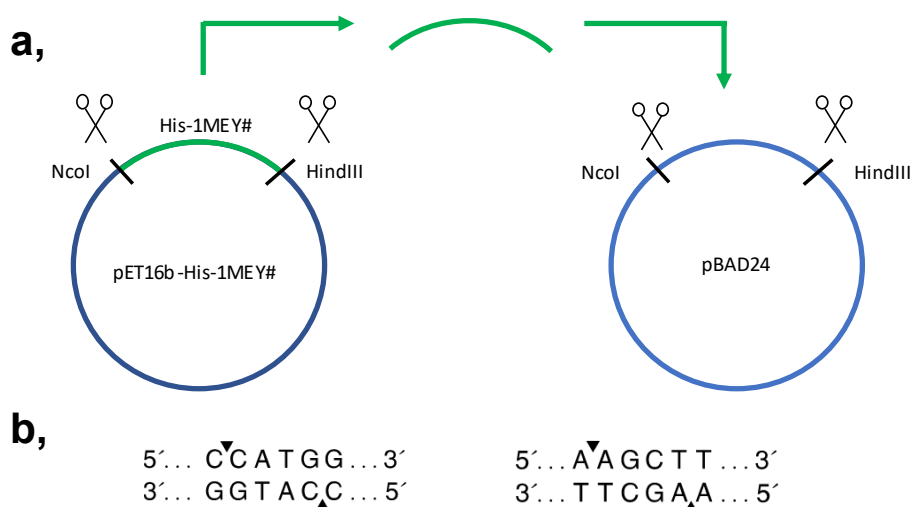
Antoine de Saint-Exupéry

5 Eredmények

A rendelkezésemre álló idő alatt elsőként a kísérletek megtervezése, majd a szükséges anyagok beszerzése következett, melyet a kutatócsoportunk biztosított számomra. A reakciók elvégzése a laboratórium-használati szabályzat ismeretében, a munkavédelmi biztonság betartásával, steril körülmények között zajlott.

5.1 Rekombináns pBAD24-His-1MEY# plazmid DNS létrehozása

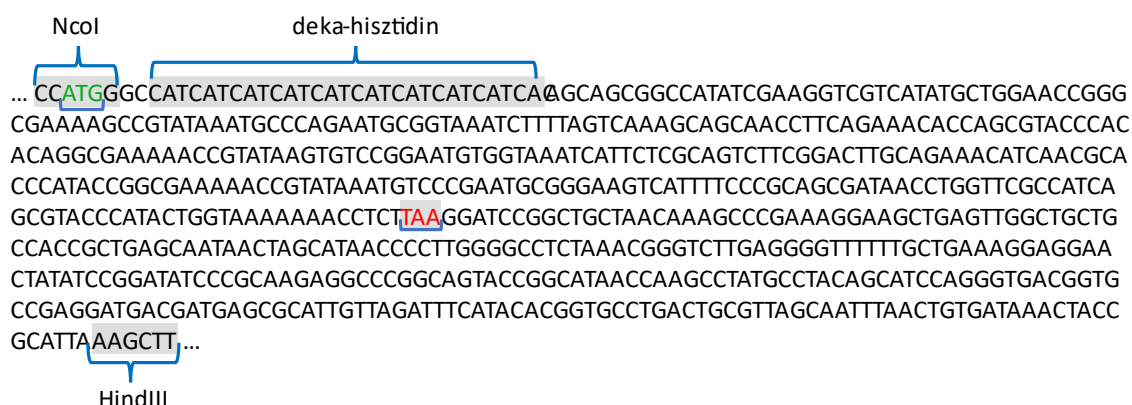
Kutatómunkám során egyik fő célom egy olyan *in vivo* körülmények között stabilan fennmaradó rekombináns DNS létrehozása volt, mely tartalmazza az 1MEY# cinkujjfehérjét kódoló DNS szekvenciát, és alkalmazható az *in vivo* fehérje–DNS kölcsönhatások tanulmányozására. Az I-Block tesztben cirkuláris DNS hordozóként erre a célra a pBAD24 vektort használják.



6. ábra: **a,** His-1MEY# inszert áthelyezése a pBAD24 DNS hordozóba (2022, PowerPoint program) **b,** balra az NcoI és jobbra a HindIII endonukleázok felismerési és hasítási helye (forrás: international.neb).

A 6. a, ábrán látható a tervezett folyamat vázlatos rajza, ahol a His-1MEY# szekvenciát tartalmazó inszert még a pET16b cirkuláris DNS hordozóban helyezkedik el. Ezt kell restriktációs endonukleázzal kivágni és a pBAD24 vektorba áthelyezni ligáz enzim segítségével. A folyamat elvégzéséhez az említett hordozót is hasítanunk kell. A hasítási reakciók tervezésénél az első lépés a cirkuláris DNS szekvenciák részletes vizsgálata volt.

A 7. ábrán látható a pET16b vektorból a His-1MEY# fehérjét kódoló inszert nukleotid sorrendje, melynek tartalmát elemeztem. A 6. b, ábrán található NcoI endonukleáz felismerési és hasítási helyét a 7. ábrán feltüntetett szekvencia 5' vége felől találtam meg. Ez magában foglalja a zöld színnel jelölt ATG START kodont¹⁰ is. Így ezt a hasítási helyet választva a fehérje átírásának megkezdése biztosított lesz. A cinkujj fehérje átírásának befejezéséért felelős piros színnel jelölt TAA STOP kodont követő első hasítási hely, ami a pBAD24 vektorban is megtalálható, a szintén 6. b, ábrán bemutatott HindIII endonukleázé. A kiemelt dekahisztidin toldalékot kódoló szekvencia indokolja a His-1MEY# elnevezést. Ez a későbbi kísérleteim során alkalmazott hisztidin toldalékot kódoló szekvencia nélküli inszerttől való megkülönböztetést is szolgálja. A hisztidin toldalék szekvenciáját követően helyezkedik el a potenciális ATCUN motívum szekvenciája a génben (3. ábra), azonban mivel a fehérjeszintézis az ATG bázishármasztól indul meg, így a hisztidin toldalék elfedi a potenciális nukleáz aktivitást kifejteni képes ATCUN motívumot. Ebből adódóan ezzel a pBAD24-His-1MEY# DNS hordozóval csak a cinkujj fehérje sejten belüli DNS-kötését tudjuk vizsgálni, a nukleáz aktivitását nem.



7. ábra: His-1MEY# fehérjét kódoló DNS-t tartalmazó pET16b részlet nukleotidsorrendje.

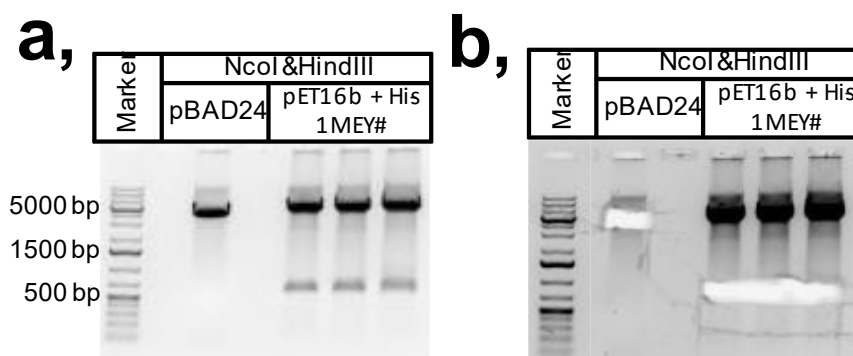
5.1.1 pBAD24 és pET16b-His-1MEY# hasítása

A cirkuláris DNS-ek hasításához az endonukleáz enzimeket tehát úgy kellett megválasztanom, hogy a hasítási régiókat mindkét vektor tartalmazza, hiszen csak így végezhető el később a hasított termékek végeinek összeépítése. Így az ábrákon látottak szerint HindIII és NcoI enzimekkel állítottam össze a hasítási reakciókat. A pET16b-His-

¹⁰ kodon - három egymást követő nukleotidból álló DNS részlet, amely egy aminosavat kódol

1MEY# hordozóból kivágott NcoI-His-1MEY#-HindIII gént ezt követően alkalikus foszfatázzal kezeltem (4.3.4 fejezet alapján), ami eltávolítja a DNS 5' végein elhelyezkedő foszfát csoportokat – ennek a ligálási reakció során lesz jelentősége.

A véghezvitt reakciók sikerességét 1m/V% agaróz gélelektroforézissel vizsgáltam. A mintákat több zsebbe szétosztva vittem fel. Az eredményt ennek megfelelően elemeztem.



8. ábra: a, A hasítási reakciók 1 m/V%-os Agaróz gélen vizsgálva; 20µl pBAD24 (~3100 ng DNS), 34,5 µl pET16b + His-1MEY# (6900 ng DNS); 1 kbp GeneRuler Plus Marker; 1 óra futtatási idő 100V-on
b, Gélkép a kivágott minták helyeivel (fotó: Horvát Melinda, 2021).

A pBAD24 HindIII és az NcoI hasítási helye között 43 bázispár van, ami az emésztési reakció során kihasad. Ez nem változtatja meg szignifikánsan a DNS eredeti hosszát. Így a 8. a, ábrán a gélen látható sávok alapján, a pBAD24 vektor hasítása sikeres volt: egy intenzív, ~4–5000 bp körül megjelenő sávot láthatunk. Továbbá szépen elkülönül a hasított lineáris vektor 6000 bp körül, valamint az 1MEY# fehérje kódját is tartalmazó kivágott DNS szakasz 700 bp környékén. A 7. ábrán korábban bemutatott hasítási helyek között lévő szekvencia 650 bp hosszú, így az elektroforézis során kapott eredmény nagy valószínűséggel igazolja a sikeres hasítási reakciót a pET16b-His-1MEY# cirkuláris DNS esetében is.

Tisztítás céljából a gélből kivágásra kerültek a már lineáris pBAD24 és a foszfatáz enzimmel kezelt His-1MEY# DNS sávokat tartalmazó gél darabkák. A mintavesztés elkerülése céljából a kivágást követően újra megvizsgáltam a gél. A 8. b, ábrán egyértelműen megállapítható, hogy a gélből sikeresen kivágtam a minták meghatározó részét.

A minták kinyerése a gélből a Thermo Scientific gélextrakciós készlet segítségével történt (4.6.1 alfejezet). Ennélfogva csak az előírástól eltérő vagy specifikus részeket emelem ki. Mindkét csőbe Binding Buffer hozzáadása történt a gél tömegéhez viszonyított 1:1 arány szerint, majd megtörtént a gél darabkák feloldása. A leírás szerint megvizsgáltam

az oldatok színét és megállapítottam, hogy a hasított hordozó DNS-t tartalmazó csőben lévő oldat nem mutatja az előírt sárga színt. Ez azt jelezte, hogy nem optimális az oldat kémhatása a DNS megkötéséhez, ezért 10 µl 3 M nátrium-acetátot adtam hozzá. A His-1MEY# DNS-t tartalmazó mintához 50 µl izopropanolt mértem be, elősegítve ezzel a rövidebb fragmensek megkötődését az oszlopkromatográfiás eljárás során. A negatív töltésű DNS megkötődik az anioncserélő oszlopon, így további centrifugálási és mosási lépések során megtisztítottam a DNS mintákat. Végül 30 µl 10 mM Tris (pH 8,5) pufferoldattal steril Eppendorf csövekbe eluáltam a DNS fragmentumokat.

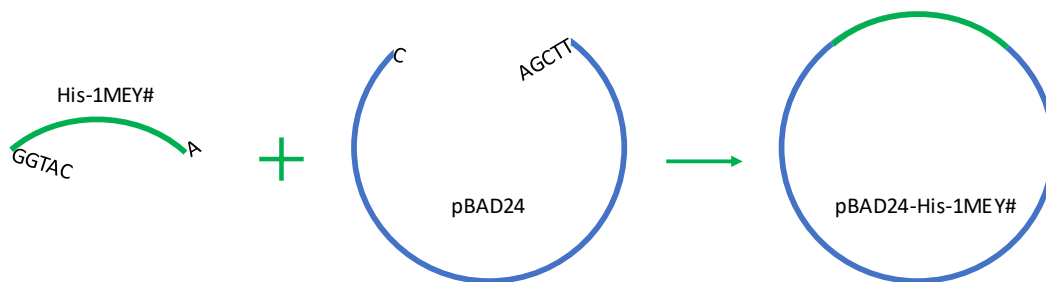
A tisztítási eljárás sikerességét az oldatok abszorbanciájának mérésével igazoltam, az eredmények az 1. táblázatban láthatóak. Mindkét minta tartalmaz DNS-t, valamint az értékek alapján megállapíthatjuk, hogy a minták tisztasága megfelelő.

1. táblázat: A DNS fragmentumok koncentrációjának és tisztaságának Nanodrop mérése során kapott eredmények. Az FA jelölés a His-1MEY# DNS részlet alkalikus foszfatáz kezelésére utal.

	pBAD24	FA-His-1MEY#
ρ [ng/µl]	30,1	16,8
A_{260}/A_{280}	1,58	1,75

5.1.2 pBAD24 vektor és His-1MEY# DNS inszert ligálása

A ligálási reakciókat a 4.3.3 fejezetben ismertetett módon hajtottam végre, a folyamat vázlatos bemutatása a 9. ábrán látható, ahol a hasítást követően létrejött túlnyúló végeket is szemléltetem. Olyan reakcióelegy is összeállításra került, melybe 0,12 mM ATP is került, mivel a pufferoldatban lévő ATP idővel képes elbomlani.



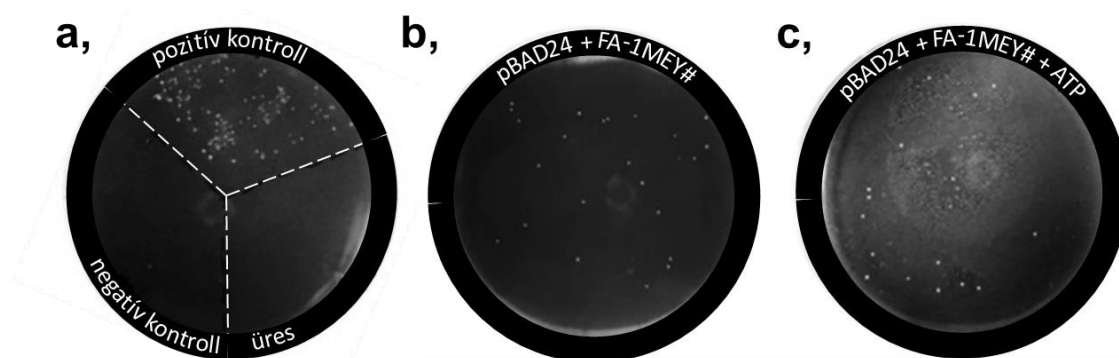
9. ábra: A His-1MEY# inszert és pBAD24 DNS hordozó ragadós végeinek illesztése (2022, PowerPoint program).

A mintákban jelentősen több az inszert DNS tartalom, mint a linearizált vektor mennyisége, ezzel is növelve a beépülés esélyét: az anyagmennyiségek aránya 1:10 vektor:inszert körüli. Az NcoI-His-1MEY#-HindIII DNS szakasz alkalikus foszfatázzal történő kezelése itt nyer értelmet, mivel a foszfátcsoportok eltávolításának köszönhetően,

hiába lesz a ligálási elegyekben jóval nagyobb arányban jelen az inszert, mint a hordozó DNS, mégsem lesz képes a ligáz két inszertet egymással összekapcsolni (4.3.3). A ligálás sikerességét a sejtek transzformálása, majd a bennük történő DNS sokszorosítása után vizsgálhattam, ezért az eredmény a későbbi fejezetekben kerül bemutatásra. Azt várjuk, hogy a His-1MEY# fehérje kódja beépül a pBAD24 vektorba. Előfordulhat azonban az is, hogy a vektorok kapcsolódnak össze egymással.

5.1.3 DH5 α kompetens sejtek transzformálása

A ligálási idő letelte után és az enziminaktiválást követően, a mintákat jégre helyeztem, hogy az inkubálás hőmérsékletéről lehűljenek 0°C-ra, majd a 4.5 fejezetben ismertetettek alapján az elegyekkel elvégeztem a kompetens sejtek transzformálását. A szélesztés során kontroll kísérleteket is végeztem: üres (minta nélküli), negatív (transzformálás nélküli DH5 α sejtek) és pozitív kontroll (38 ng pBAD24 DNS-sel transzformált DH5 α sejt). A megfelelő inkubálási idő elteltével megvizsgáltam az Agar lemezeket és a 10. ábrán látható eredményeket kaptam.



10. ábra: A transzformálást követő inkubálás után a táptalajokon nőtt baktériumtelepek vizsgálata. **a**, kontroll **b**, pBAD24 + FA-1MEY# **c**, pBAD24 + FA-1MEY# + ATP (fotó: Horvát Melinda, 2021).

A kontroll minták vizsgálata a 10. a, ábra alapján történt. Az "üres" részen nem nőttek baktériumtelepek. Így biztos lehettem benne, hogy sterilek voltak a felhasznált petricsészék. A negatív kontroll esetén sem nőttek telepek. A kompetens sejtek transzformálás nélkül nem tartalmazták az ampicillin rezisztencia kialakításáért felelős gént, így a felvitelt követően elpusztultak, azaz az antibiotikum hatásos volt. A pozitív kontroll kísérletben sok telep nőtt, ami megfelelt a vártnak. Ezzel a transzformálás jelentősebb körülményeit ellenőriztem. A ligálási elegyek mind ATP hiányában, mind jelenlétében számos telepet eredményeztek (10. b, c, ábra) a táptalajon, az ATP hozzáadása látszólag nem változtatott a ligálási reakció sikerességén.

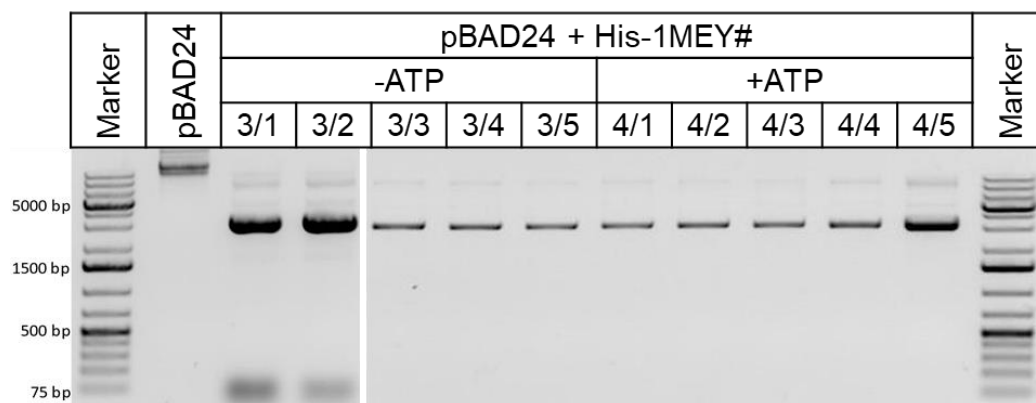
A sikeres transzformálást követően a *b*, és *c*, jelölésű petricsészékről kiválasztottam 5-5 baktériumtelepet és átoltottam 100 µg/ml végkoncentrációjú ampicillin antibiotikumot tartalmazó 5 ml térfogatú LB tápoldatba. Az inkubálás során a szuszpenziók zavarosodásával követhető a baktériumok szaporodása. A megfelelő OD₆₀₀ érték elérését követően a sejteket lecentrifugáltam, majd a Zymo Research Plasmid Miniprep-Classic készlettel végeztem a DNS kinyerését (4.6.2 fejezet). Csupán annyiban tértem el a leírástól, hogy az RNáz A enzimet tartalmazó P3 puffer után a 2. táblázatban látható 3/1 és 3/2 mintáknál 2 perc, míg az összes többinél 1 óra inkubálási időt hagytam. A tisztítást követően a tíz DNS minta 30-30 µl 10 mM Tris pufferoldatba került. A spektrofotométerrel mért eredmények kiértékelését a 2. táblázatban foglaltam össze. A 3. és 4. minta a rekombináns pBAD24-FA-His-1MEY# DNS ATP nélküli és hozzáadott mintáit jelöli.

2. táblázat: A DNS minták koncentrációja és a tisztaságra jellemző abszorbancia arányok

minta	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	4/1	4/2	4/3	4/4	4/5
ρ [ng/µl]	312,8	249,1	68,1	74,2	66,1	65,0	73,0	76,9	85,0	90,3
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	2,06	2,02	1,84	1,84	1,85	1,84	1,85	1,83	1,86	1,84

Már a mért koncentráció és A₂₆₀/A₂₈₀ értékeket elemezve is valószínűsíthető volt, hogy a 3/1 és 3/2 minták RNS szennyeződést tartalmaznak, ezért is hagytam a többi mintánál hosszabb inkubációs időt az RNS bontó enzimet tartalmazó puffer oldatban. Az ezt követően mért értékek igen ígéretesek mind tisztaság, mind DNS koncentráció tekintetében. A minták tisztításának és a cirkuláris DNS kinyerésének sikerességét 1 m/V% agaróz gélelektroforézissel vizsgáltam.

A 11. ábrán a 3/1 és 3/2 minták gélképe igazolta a várakozásomat: 75 bázispár körül kis intenzitású sávok láthatóak, ez valószínűleg a már említett RNS szennyeződésnek tulajdonítható, ugyanis az ezt követő 3/3...4/5 mintánál már nem mutat szennyeződést a rövidebb mérettartományban, így a hosszabb RNáz A kezelés hatásos volt.



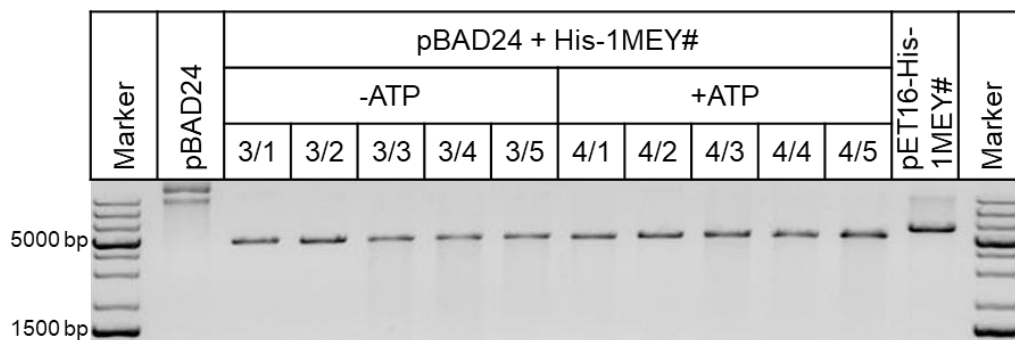
11. ábra: Ligálási reakciót követő pBAD24-His-1MEY# DNS-ek vizsgálata 1 m/V %-os Agaróz gélen. A 3/1 és 3/2 mintából 5-5, míg a többi mintából 2 µl lett a gélbe töltve. Marker: 1 kbp GeneRuler Plus; 100V-on futtatva 30 percig Referenciaként az eredeti pBAD24 DNS hordozót alkalmaztuk

Minden minta esetében intenzív sávokat látunk 3000 bp környékén, ezek feltehetően szuperhelikális formájú rekombináns DNS vektorok. Enyhe sáv látszik szintén minden minta esetében 5000 bp (lineáris konformáció) és 10000-20000 bp (nyílt cirkuláris konformáció) környékén.

5.1.4 pBAD24 vektor és His-1MEY# fehérjét kódoló DNS inszert ligálási sikerességének vizsgálata

A korábbi gélképeken a különféle megjelenési alakok miatt nem tudtam megfelelően vizsgálni a vektorokat, ezért linearizáltam azokat. Erre többféle módszer is alkalmas. Én azt választottam, hogy egy, csak az 1MEY# fehérje génjét tartalmazó inszert részben jelenlévő hasítási helyen, NdeI restrikciós endonukleázzal hasítottam minden mintát. Ezt követően láthattam, hogy az inszert valóban beépült a hordozóba vagy sem, hiszen, ha nem hasad el, akkor a DNS az 1MEY# fehérje génjét sem tartalmazza. Ezenkívül még hasíthatnánk olyan helyen is, ami az eredeti pBAD24 vektorban és az 1MEY# részben is jelen van, így 2 lineáris fragmentumot láthatnánk. Lehetett volna ismét hasítani a HindIII és NcoI enzimekkel, akkor is 2 lineáris fragmentumot kapnánk, és ezzel visszanyerném a 650 bp hosszú inszertet is, ha az beépült. Továbbá PCR módszerrel is vizsgálhatnánk a mintákat, ehhez viszont primereket szükséges tervezni.

Az NdeI hasítási reakciókban 12. ábrán láthatóan a minták mellett a pET16b-His-1MEY# pozitív kontrollként szerepel, mert az biztosan tartalmazza a kiválasztott hasítási helyet, a pBAD24 pedig a negatív kontroll, mert az biztosan nem.



12. ábra: Ligálási reakciót követő NdeI enzimmel kezelt pBAD24-His-1MEY# DNS-ek vizsgálata 1 m/V %-os Agaróz gélen. Marker: 1 kbp GeneRuler Plus; A futtatás 45 percig 100 V-on történt.

A pBAD24 vektor nem hasadt el, ugyanúgy 20000 bp felett látunk multimer/konkatemer DNS sávokat. A pET16b-His-1MEY# vektor elhasadt, így ennek lineáris formáját 6000 bp (5985 bp) körül látjuk. A 3/3 mintáktól kezdődően kissé fragmentálódott állapot látható. Az összes mintánál megfigyelhető az 5000 bp körüli intenzív sáv. Ez arra enged következtetni, hogy az általam vizsgált összes telepet olyan baktériumsejtek alkották, melyeknél sikeres volt a rekombináns DNS beépülése, és ebbe szintén sikeresen épült be az inszert.

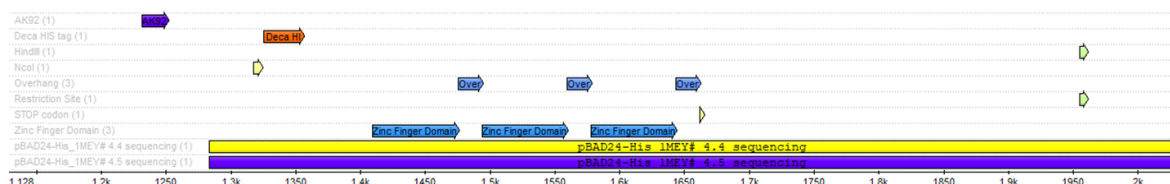
A mintákat tovább tisztítottam PEG-kicsapással (4.6.3 fejezet), hogy a lehető legkevesebb genomiális DNS maradjon bennük. Ezt végeztem. A tisztítást követő DNS koncentrációk a 3. táblázatban láthatók:

3. táblázat: A minták koncentrációja és tisztasága a PEG kicsapást követően

minta	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	4/1	4/2	4/3	4/4	4/5
ρ [ng/ μ l]	47,0	61,2	28,4	37,0	31,8	35,6	39,5	51,8	62,9	72,1
A_{260}/A_{280}	1,78	1,75	1,69	1,71	1,7	1,76	1,7	1,78	1,82	1,73

A minták tisztasága megfelelő, és láthatóan mindegyik tartalmaz DNS-t. Szekvenálásra a 4/4 és 4/5 mintákat küldtük el, mert a méréseim azt mutatták, hogy ezekben van a legtöbb rekombináns cirkuláris DNS. A szekvenáláshoz a pBAD24 DNS hordozóhoz tervezett AK92 primert használtuk, ami az NcoI hasítási hely előtt 64 bp-ral helyezkedik el, így ideális a reakció szempontjából. Az eredmények alapján mindkét szekvenálás 100%-os egyezést mutatott a várt szekvenciával (13. ábra). A kromatogram értelmezhető tartománya 40 bp-ral az NcoI hasítási helyet megelőzően, és 70 bp-ral a HindIII hasítási hely után ér véget, így a teljes beépített szakasz épségéről megbizonyosodhattunk. A továbbiakban a 4/5

mintával dolgoztam és ezt nevezem innentől pBAD24-His-1MEY#-nek, a belőle kifejeződő fehérjét pedig His-1MEY#-nek.



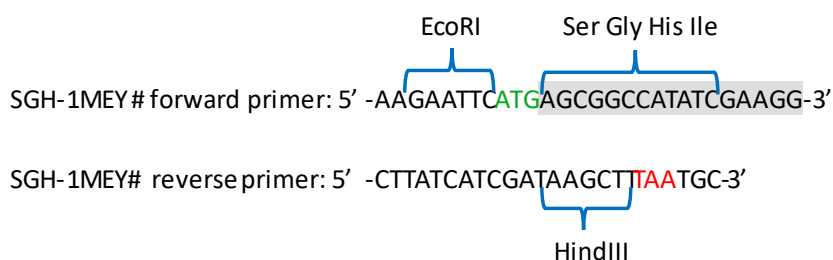
13. ábra: A pBAD24-His-1MEY# DNS hordozó vektor térképe UGENE programban ábrázolva. Sárga háttér: 4/4 minta szekvenálása, lila háttér: 4/5 minta szekvenálása.

5.2 Rekombináns pBAD24-1MEY# DNS kialakítása

A már említett dekahisztidin toldalék a His-1MEY# fehérjében „elfedi” az ATCUN motívumot, ami a nukleáz szerepét tölti be az 1MEY# cinkujj fehérjében, ezért írtuk azt korábban, hogy ez a konstrukció csak a cinkujj fehérje DNS kötésének tanulmányozására lehet alkalmazható. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai során igazolta, hogy lehetséges szelektíven hidrolizálni a His-toldalékot a már kifejezett His-1MEY# cinkujj fehérjéről Ni^{2+} -ionokkal, ezzel kialakítva az ATCUN motívumot, de ez a reakció tesztcsökísérletben 50 °C-on és pH 8,2-n játszódik le hatékonyan, fiziológias körülmények közt a 100%-os konverzió elérése 7 napnál tovább tartott.[23] Mivel nem tudjuk mekkora valószínűsége van annak, hogy a Ni(II) -indukált szelektív peptid hidrolízis hatékonyan lejátszódik sejten belül, így elhatároztuk, hogy megkíséréljük oly módon áttervezni a fehérje génjét, hogy a kifejeződés során közvetlenül az ATCUN motívummal induljon a szekvencia. Amennyiben ezt meg tudjuk valósítani, csak akkor lehetséges, hogy a nukleáz aktivitását is közvetlenül teszteljük sejten belül az 1MEY# fehérjének. Amint az irodalmi áttekintésben említettem, egy peptidszekvenciát akkor nevezhetünk ATCUN motívumnak, amennyiben az N-terminális végtől számított 3. pozícióban hisztidin található. Habár elsőre nem tűnik bonyolultnak egy ilyen gén kialakítása, azonban figyelembe kell vennünk, hogy a fehérjék kifejeződése mindig metioninnal indul az ATG start kodontól. Ezt a metionint a sejt poszttranszlációs módosítás során képes lehasítani, de ez nem minden esetben következik be, és nincs általános szabály arra, hogy milyen fehérjeszekvenciáknál marad rajta a fehérjén. Az 1MEY# cinkujj fehérjében az ATCUN motívumot az SGHI szekvencia alkotja és szakirodalmi adatok alapján az esetek 80%-ban lehasad a fehérjekifejeződést követően a metionin, amennyiben az azt követő aminosav szerin, így elsőként olyan terveket dolgoztunk ki, ahol a fehérje szekvenciája MSGHI-vel indul.[31]

5.2.1 Az 1MEY# DNS szekvencia sokszorosítása PCR-ben

PCR segítségével terveztem a His-1MEY# fehérjét kódoló DNS szekvenciájának módosítását. Ehhez először forward és reverse primereket terveztem, melyek egyike a pET16b-His-1MEY# vektorban a kifejezendő fehérje nukleáz funkciót kódoló DNS részéhez köt, ezáltal a polimeráz enzim onnan kezdhette a sokszorosítást. Az eredeti pET16b-His-1MEY# szekvenciából a dekahisztidin és a kezdeti szerin aminosav kódjai között lévő 3 nukleobázis is kiesett, és egy START kodont (metionint) terveztem a helyére. Valamint a forward primerbe tervezésre került egy EcoRI (5' – G*AATTC – 3') hasítási hely, ugyanis ez jelen van a pBAD24 vektorban is, így lehetővé válik a későbbi ligálás. A reverse primert teljes mértékben tapadó nukleotidtartalommal terveztem HindIII (5' – A*AGCTT – 3') hasítási helyet és a STOP kodont is beleértve. A leírtaknak megfelelően a tervezett primerek a 14. ábrán láthatóak. A forward primer tapadó részét szürke háttérrel emeltem ki.



14. ábra: A tervezett oligonukleotid primerek szekvenciája.

A primerek jellemző adatait az OligoCalc weboldalon ellenőriztem. Ezeket a 4. táblázatban foglaltam össze. A forward primer esetében a tapadó részre és a teljes primerre külön-külön számoltam optimális tapadási hőmérsékletet és G-C tartalmat.

4. táblázat: A PCR reakcióhoz tervezett primerekre jellemző releváns tulajdonságok

	MSGH-1MEY# forward	MSGH-1MEY# reverse
hossz [nt]	28	24
GC tartalom [%]	59-46	33
tapadási hőm. [°C]	49,5-59,9	50,6
tapadó rész hossza [nt]	17	24
extra rész hossza [nt]	11	-

A primerekből 10 µM koncentrációjú vizes oldatot készítettem. A PCR-hez a Phusion polimeráz enzimet választottam, mely kiemelkedő pontossággal másol a TAQ

polimerázhoz képest, így elméletileg ugyanazt a bázissorrendet kell visszakapnunk az eljárás végeztével sokszorosított DNS-ben. Mivel a Phusion polimeráz enzim jól viseli a magas hőmérsékletet, nem inaktiválható hőkezeléssel. Az enzim 30 másodperc alatt körülbelül 1000 nukleotidot képes másolni, ennek megfelelően kell beállítani az elongációs lépés idejét. A PCR elegy összeállítása az 5. táblázatban, míg a reakciókörülmények a 6. táblázatban láthatóak. Mindkét primer számára legoptimálisabb tapadási hőmérsékletet a ThermoFisher Scientific weboldalon számoltam ki a forward primer teljes hosszával.

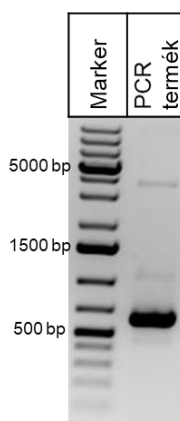
5. táblázat: A PCR elegy összeállítása.

bemérendő minta	térfogat [μ l]
st. dH ₂ O	30
Phusion Buffer HF	10
dNTP mix	4
forward primer	2,5
reverse primer	2,5
pET16b-1MEY# vektor	0,5
Phusion polimeráz	0,5
ÖSSZ	50

6. táblázat: PCR reakciókörülmények

fázis	lejátszódó folyamat	hőm. [$^{\circ}$ C]	idő [sec]	ismétlés
1.		98	30	1
2.	denaturáció	98	10	30
3.	primertapadás	54	30	
4.	polimerizáció	72	30	
5.	ismétlés 2-4 fázisokat			
6.	final extension	72	240	1
7.		10	∞	

A *final extension* lépésnél még befejeződik a már elkezdett termékek polimerizációja. A 7. lépésnél a készülék 10 $^{\circ}$ C-on tartja a mintákat kikapcsolásig. A PCR eredményét gélelektroforézissel vizsgáltam. A minták 100 V-on 30 percig futottak, az eredmény a 15. ábrán látható.



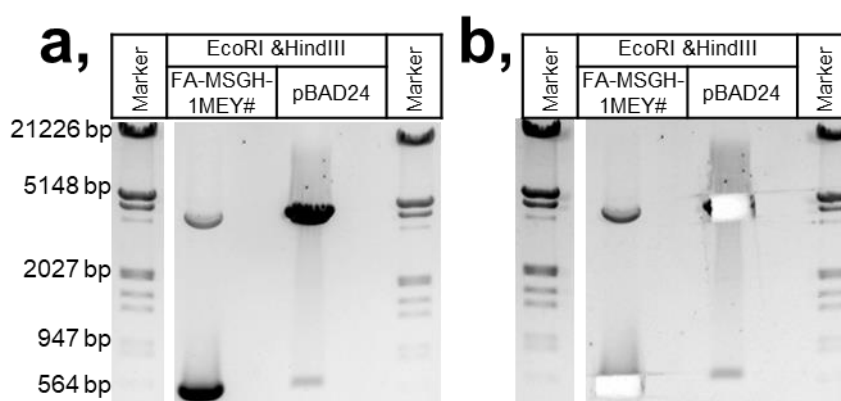
15. ábra: PCR reakció eredménye 1 m/V %-os agaróz gélen vizsgálva Marker: 1 kbp GeneRuler Plus; A futtatás 45 percig 100 V-on történt.

Jól látható, hogy a PCR sikeres volt, és legnagyobb mennyiségben a 600-650 bp körüli sokszorosított DNS fragmensek vannak jelen. Ez megfelel a várakozásomnak, a mintával folytathattam a további kísérleteket. A gélen egyébként 4000 bp környékén

megfigyelhető a kiindulási DNS superhelikális változata, illetve láthatunk 1100 bp és 450 bp körül is kis intenzitású sávokat.

5.2.2 Rekombináns DNS létrehozása a PCR terméket felhasználva

A sikeres PCR-t követően a terméket és a pBAD24 vektort HindIII és EcoRI restrikciós endonukleázokkal hasítottam. A PCR terméket alkalikus foszfáttal kezeltem, hogy elkerüljem a több inszert összekapcsolódását. A hasítás sikerességét 1% agaróz gélelektroforézissel vizsgáltam (16. ábra).



16. ábra: a, A PCR termék és a pBAD24 vektor HindIII és EcoRI enzimekkel történő hasítást követő b, gélből kivágást követő gélképe 1 m/V %-os agaróz gélen vizsgálva Marker: λ EcoRI HindIII marker; A futtatás 45 percig 100 V-on történt.

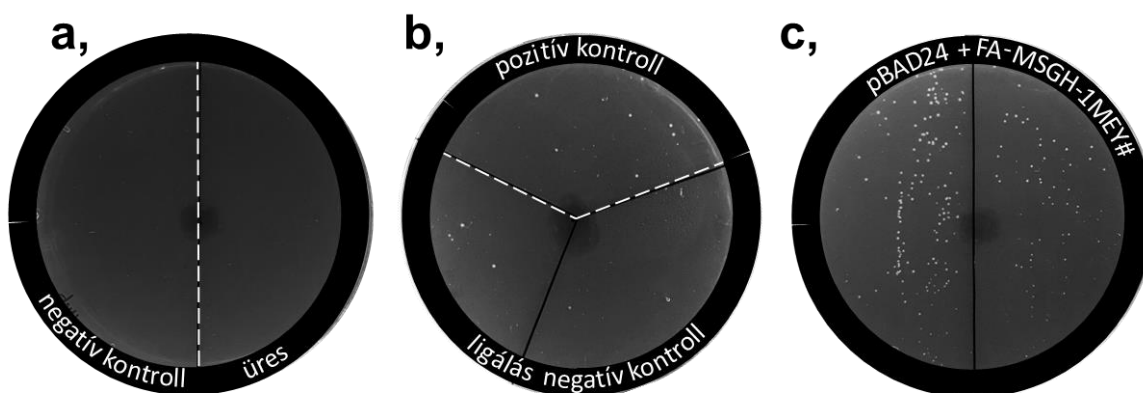
Láthatjuk a PCR terméket tartalmazó zsebnél az MSGH-1MEY# fehérjét kódoló szakaszt 650 bp környékén. A pBAD24 vektor hasítása sikeres volt, a legintenzívebb ~ 4500 bp sáv a lineáris formához rendelhető. A DNS mintákat kivágtam a gélből, majd gélextrakciós tisztítást hajtottam végre. A mintákat 20 μ l 10 mM Tris pH 8 pufferben eluáltam az oszlopról. A tisztítást követően a 7. táblázatban összefoglaltak szerint spektrofotométerrel ellenőriztem a minták DNS tartalmát, valamint a DNS tömegkoncentrációkból moláris tömeget és moláris koncentrációt számoltam.

7. táblázat: DNS koncentrációk és tisztaságuk; a számolt moláris tömeg és moláris koncentráció

	FA-MSGH-1MEY#	hasított pBAD24
ρ [ng/ μ l]	42,1	33,6
A_{260}/A_{280}	1,87	1,85

A linearizált pBAD24 DNS hordozót és az inzertet 1:5 molarányban ligáltam a korábbiaknak megfelelő protokoll alapján, majd 5-5 μ l részletekkel transzformáltam DH5 α kompetens sejteket, és a sejtszuszpenziókat ampicillin antibiotikumot tartalmazó táptalajra

szélesztettem. Negatív kontrollként üres DH5 α sejtet, pozitív kontrollként pBAD24 plazmidot, ligálási negatív kontrollként inzert nélküli dupla hasított pBAD24 DNS hordozót is alkalmaztam. (17. ábra)



17. ábra: A transzformálást követő **a**, DH5 α és üres kontroll; **b**, pozitív kontroll és ligálás negatív kontroll; **c**, pBAD24 + FA-EcoRI-MSGH-1MEY#-HindIII ligálási reakció.

A 17. a, ábrán látható kontroll részek a vártan megfelelően alakultak, míg a b, részen a ligálási negatív kontrollon nőtt néhány telep. Ebből arra következtethetünk, hogy a dupla hasítás nem volt 100%-os, így lehet a reakcióelegyben néhány egyszeresen elhasított pBAD24 DNS hordozó is. A tényleges ligálási reakció számos telepet eredményezett, ezek közül kettőt átoltottam ampicillin-tartalmú LB tápoldatba, mindkét mintából készítettem glicerines törzsoldatot, majd a sejtekből kinyertem a DNS hordozókat a korábbiaknak megfelelően. A minták koncentrációjának és tisztaságának vizsgálata során a 8. táblázatban kapott értékeket mértem.

8. táblázat: Tisztított minták koncentrációjának ellenőrzése.

	pBAD24-MSGH-1MEY#	
minta	1. transzformálás	2. transzformálás
ρ_{pBAD24} [ng/ μ l]	74,5	57,6
A_{260}/A_{280}	1,89	1,89

A ligálás sikerességét PCR-sokszorozítással ellenőriztem a korábban szekvenáláshoz már felhasznált AK92 és AK155 primerek segítségével. Kontrollként az eredeti pBAD24 DNS hordozóról is sokszorozítottam fragmenst. A PCR reakcióelegy összeállítása a 9. táblázatban, a reakciókörülmények pedig a 10. táblázatban láthatóak.

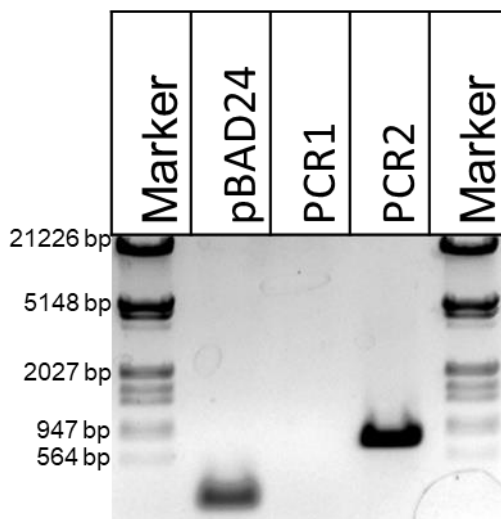
9. táblázat: A PCR reakcióelegy összeállítása

bemérendő minta	térfogat [μl]
st. dH ₂ O	35
5x DreamTaq Buffer	5
dNTP mix 10 mM	5
forward primer (AK92)	2
reverse primer (AK155)	2
pBAD-MSGH-1MEY# vektor	0,5
DreamTaq polimeráz	0,5
ÖSSZ	50

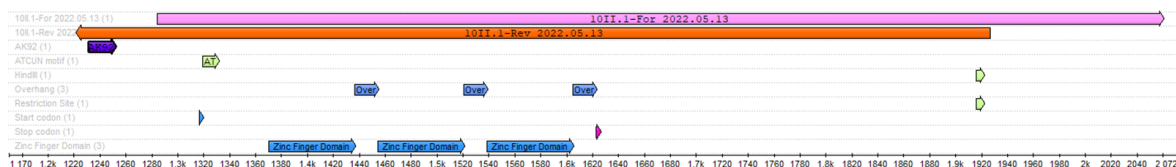
10. táblázat: PCR reakciókörülmények

fázis	lejátszódó folyamat	hőm. [°C]	idő [sec]	ismétlés
1.		95	120	1
2.	denaturáció	95	30	30
3.	primertapadás	52	30	
4.	polimerizáció	72	60	
5.	ismétlés 2-4 fázisokat			
6.	final extension	72	240	1
7.		10	∞	

A PCR termékeket 1% agaróz gélelektroforézissel vizsgáltam (18. ábra). A pBAD24-ről az elvárt 150 bp-os fragmens sokszorozódott, míg az első mintában nem látható sokszorosítás. A második mintáról sokszorozódott PCR termék hossza 700 bp környékén mozog, ami megfelel az elvárásainknak, így ezt a mintát megvizsgáljuk szekvenálással is.

**18. ábra:** PCR-ben sokszorosított termékek vizsgálata 1 m/V %-os agaróz gélen. Marker: λ EcoRI HindIII marker; A futtatás 30 percig 100 V-on történt. A PCR1. és PCR2. minták a két transzformálást jelölik.

Ebben az esetben forward és reverz irányban is elvégeztük a szekvenálási reakciót ugyancsak az AK92 és AK 155 primereket használva (19. ábra). Mindkét esetben értékelhető kromatogramot kaptunk a teljes tartományában a beépített inszertnek, és mindkét esetben 100%-os egyezés volt az elméleti DNS szekvenciával, így kijelenthető, hogy sikerült előállítani a pBAD24-MSGH-1MEY# DNS hordozót is.

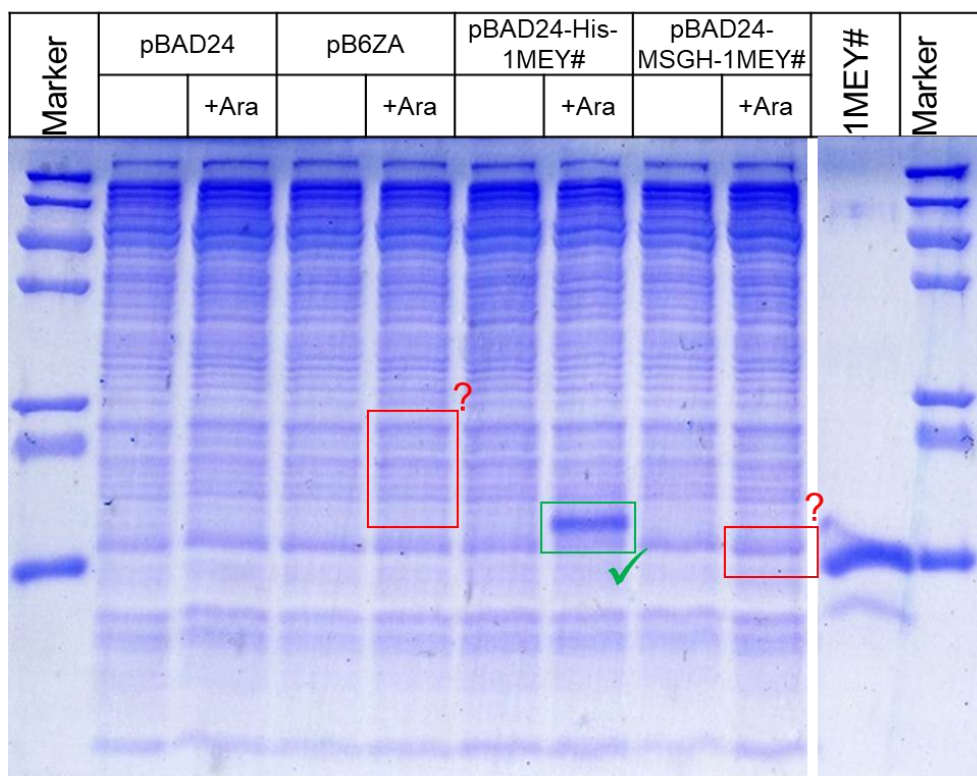


19. ábra: A pBAD24-MSGH-1MEY# DNS hordozó vektor térképe UGENE programban ábrázolva. Rózsaszín háttér: forward szekvenálás, narancssárga háttér: Reverz szekvenálás

5.2.3 Cinkujj fehérjék kifejeződésének ellenőrzése

Miután mindkét DNS-t sikeresen előállítottuk, megvizsgáltuk, hogy lehetséges-e a fehérjék túltermeltetése az I-Block rendszerben használatos ER1821ΔLacI sejtekben. Első lépésben transzformáltuk a sejteket az előállított DNS-ekkel (4.5 fejezet), majd a sejtszuszpenziókat ampicillin tartalmú petricsészéken egy éjszakán át inkubáltuk. Ezt követően 1-1 telepet áttoltunk 5 ml antibiotikum tartalmú tápoldatba és $OD_{600} \sim 0,3$ érték eléréséig inkubáltuk a mintákat 37°C -on. Miután kellően bezavarosodtak a tápoldatok 0,1% arabinózzal indukáltam a fehérjeszintézist, majd 4 órán keresztül rázattuk 150 RPM-en 37°C -on az elegyeket. Kontrollnak megvizsgáltuk az üres pBAD24 DNS hordozót, a pB6ZA nevű I-Block pozitív kontroll DNS-t, amivel Kiss Antalék kutatócsoportjának sikerült fehérje-DNS-kölcsönhatást kimérniük.

Az indukálás után a sejteket centrifugálással üleptettem, reszuspendáltam $1\times$ Binding Buffer oldatba, majd jégen történő szonikálással megkezdtem a feltárást. Az oldhatatlan sejtalkotókat ezután centrifugálással üleptettem, és mintát vettem a felülúszóból (soluble) melyeket 16,5 m/V% SDS-poliakrilamid gélen elektroforézissel vizsgáltam (20. ábra). A $2\times$ CB (Cracking Buffer) oldat SDS detergenst (fehérjék denaturálására alkalmas) és β -merkaptotanol redukálószer (a fehérjeszerkezetben előforduló cisztin-hidak megszüntetéséhez) tartalmaz. A mintákat 5 percig 95°C -on inkubáltam, majd 2 perc centrifugálás után felvittem azokat a gélre. A futtatásnál Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Markert alkalmaztam. További kontrollként korábban már kinyert és tisztított 1MEY# cinkujj fehérjét is felvittem a minták mellé a gélre, hogy az eredmény kiértékelésénél legyen viszonyítási alap. A futtatás 70 V-on fél órán át, majd 120 V-on 4 órán keresztül történt.

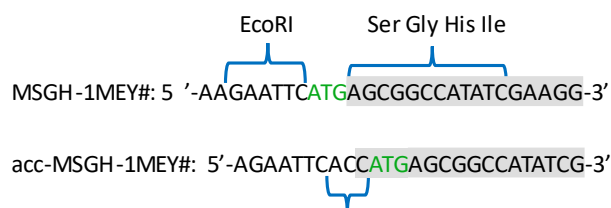


20. ábra: Fehérje túlermeltesítés ER1821ΔLacI sejtekben 16.5 m/V %-os Tricin-SDS-poliakrimalid gélen vizsgálva. Marker: Unstained protein marker Referencia: Ni-NTA tisztított 1MEY#

A gélképen jól megfigyelhető a His-1MEY# fehérje túlermelődése arabinóz jelenlétében, azonban a pBAD24-MSGH-1MEY# DNS-hordozóról nem látható intenzív fehérjesáv a referenciaként használt 1MEY# fehérjével azonos mérettartományban. Ami ennél még meglepőbb, hogy a pozitív kontrollnak szánt pB6ZA DNS hordozóról sem sikerült megfigyelni a 6ZA cinkujj fehérje túlermelődését, pedig Kiss Antal kutatócsoportja ezt alkalmazza pozitív kontrollnak az I-Block kísérletek során. Ez alapján elképzelhető, hogy kis mennyiségű fehérje kifejeződik, csak a túlermelődés nem látható. Ettől függetlenül nagy valószínűséggel a tapasztalt jelenség nem a pBAD24 DNS hordozó optimális működésére utal, aminek feltehetően az az oka, hogy túl rövidre terveztük meg az MSGH-1MEY# esetben a promóter után a metionin indító szekvenciát.

5.3 Rekombináns pBAD24-acc-MSGH-1MEY# DNS kialakítása

A korábbi kísérletsorozatunk eredménye alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy szükségessé vált egy olyan rekombináns DNS kialakítása is, melynél hosszabbra hagyjuk a metionin indító DNS szekvenciát. Ezért három nukleotid (21. ábra: acc rész) hosszúságú DNS szekvenciát építünk be a fehérjekifejeződést indító nukleotidhármas elé, mivel a hisztidin todalékkal ellátott fehérje ilyen konstrukcióban sikeresen kifejezhető és túltermeltethetőnek bizonyult.

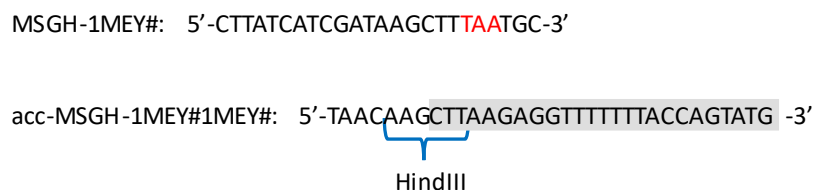


21. ábra: pBAD24-MSGH-1MEY# és pBAD24-acc-MSGH-1MEY# DNS hordozók promóter régiójának összehasonlítása

Amennyiben ezzel a tervezett módosított DNS-sel sikerül fehérje túltermelődést előidézni, megkíséreljük gélből kivágni a kapott terméket, és tömegspektrometriás vizsgálatokkal detektálni, hogy a várakozásainknak megfelelően lehasadt-e a fehérjéről a metionin, azaz kialakult-e a fehérje N-terminális végén az ATCUN motívum. Amennyiben ezt sikerül igazolnunk, a kialakított DNS alkalmas lesz sejten belüli kísérletekben a nukleáz aktivitás vizsgálatára.

5.3.1 Az acc-MSGH-1MEY# DNS szekvencia sokszorozítása PCR-ben

Első lépésben polimeráz láncreakcióban sokszorozítottam a módosított inszert DNS szekvenciát. Ehhez a 21. ábrán látható acc-MSGH-1MEY# forward primert és a korábbi rekombináns DNS kialakításához tervezett reverse primerből kiindulva a HindIII hasítási hely után néhány bázispár beépítésével kialakított primert terveztem meg és használtam fel a reakció során.



22. ábra: pBAD24-MSGH-1MEY# és pBAD24-acc-MSGH-1MEY# kialakításához szükséges reverse primerek összehasonlítása

A primerek jellemző adatait az 5.2.1 fejezetben már említett módon, az OligoCalc weboldalon ellenőriztem. Ezeket a 11. táblázatban foglaltam össze.

11. táblázat: A PCR reakcióhoz tervezett primerekre jellemző releváns tulajdonságok

	acc-MSGH-1MEY# forward	acc-MSGH-1MEY# reverse
hossz [nt]	26	32
GC tartalom [%]	50-59	31-32
tapadási hőm. [°C]	60-50	56,7-51,1
tapadó rész hossza [nt]	17	25
extra rész hossza [nt]	9	7

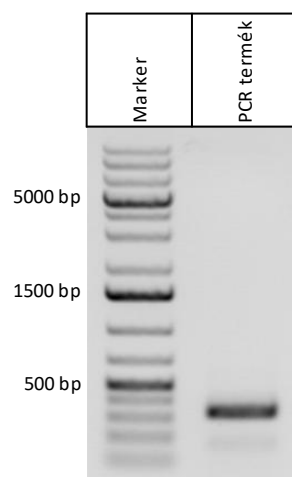
A primerekre jellemző adatok alapján és a 2.5.1 fejezetben részletezett okokból választott polimeráz enzimmel összemértem a PCR elegyet (12. táblázat), az alkalmazott reakciókörülményeket pedig a 13. táblázatban láthatjuk. Mindkét primer számára legoptimálisabb tapadási hőmérsékletet ez esetben is a ThermoFisher Scientific weboldalon számoltam ki a forward primer teljes hosszával. A reakció sikerességét agaróz gélelektroforézissel vizsgáltam. (23. ábra)

12. táblázat: A PCR elegy összeállítása.

bemérendő minta	térfogat [μl]
st. dH ₂ O	29,5
5xPhusion Buffer HF	10
2,5 mM dNTP mix	4
10 μM forward primer	2,5
10 μM reverse primer	2,5
pBAD24-MSGH-1MEY#	1
Phusion polimeráz HF	0,5
ÖSSZ	50

13. táblázat: PCR reakciókörülmények

fázis	lejátszódó folyamat	hőm. [°C]	idő [sec]	ismétlés
1.		94	240	1
2.	denaturáció	98	15	30
3.	primertapadás	55	30	
4.	polimerizáció	72	30	
5.	ismétlés 2-4 fázisokat			
6.	final extension	72	240	1
7.		10	∞	



23. ábra: PCR reakció eredménye 1 m/V %-os agaróz gélen vizsgálva Marker: 1 kbp GeneRuler Plus; A futtatás 30 percig 100 V-on történt.

A gélképen intenzív sávként jelenik meg 300-400 bázispár között a sokszorozódott DNS szakasz. Ez megfelel a várakozásunknak, ugyanis a tervezettek szerint az így létrehozott új inszert DNS hossza 327 bp. A mintán fenol-kloroform extrakcióval tisztítási lépéseket végeztem el a 4.6.4 fejezet alapján. Nanodrop méréssel pedig megállapítottam a minta DNS tartalmát, ez $\rho = 102,8 \text{ ng}/\mu\text{l}$, a tisztaságra vonatkozó abszorbancia hányados pedig $A_{260}/A_{280} = 1,81$.

5.3.2 Rekombináns „acc” DNS létrehozása a PCR terméket felhasználva

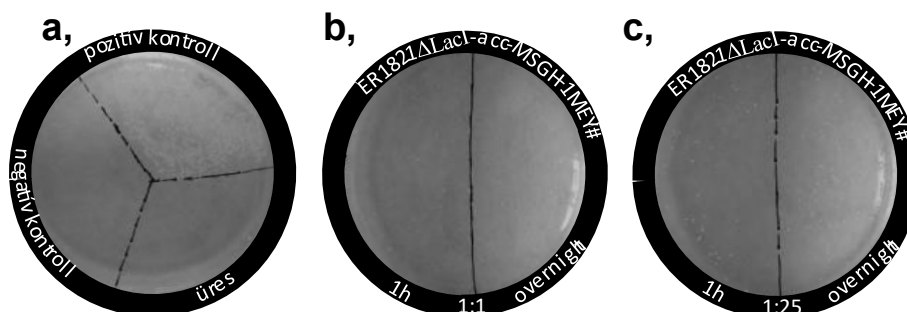
A sikeres PCR-t követően kettős hasítást végeztem az új mintán. A HindIII és az EcoRI hasításokkal lehetővé tettem az inszert hordozó DNS-be történő beépítését. A reakciókörülmények kioptimalizálásával a két restrikciós endonukleázzal egyidejűleg végeztem a reakciót, majd a már jól bevált módszerrel, FastAP jelenlétével, defoszforiláltam a hasított DNS fragmensek végeit, hogy alkalmas legyen a ligálási reakcióban történő felhasználásra.

14. táblázat: DNS koncentrációk és tisztaságuk; a számolt moláris tömeg és moláris koncentráció

EcoRI és HindIII hasított DNS	FA-acc-MSGH-1MEY#	pBAD24 vektor
$\rho \text{ [ng}/\mu\text{l}]$	102,8	249
$c \text{ [nM]}$	480	85
A_{260}/A_{280}	1,81	1,83

A 14. táblázatban feltüntetett adatok alapján 1:1 és 1:25 molarányban összeállítottam a ligálási reakciót 20 μl végtérfogattal. A mintákat ketté osztva az inkubálási idő 22°C-on 1

órán át, valamint a másik mintasorozathnál 16°C-on *overnight* történt. Ezt követően a négy féle mintával 5-5 µl részletekkel ER1821ΔLacI kompetens sejteket transzformáltam. A szuszpenziókat ampicillin antibiotikumot tartalmazó táptalajra szélesztettem, majd megvizsgáltam a pléteket. (24. ábra)



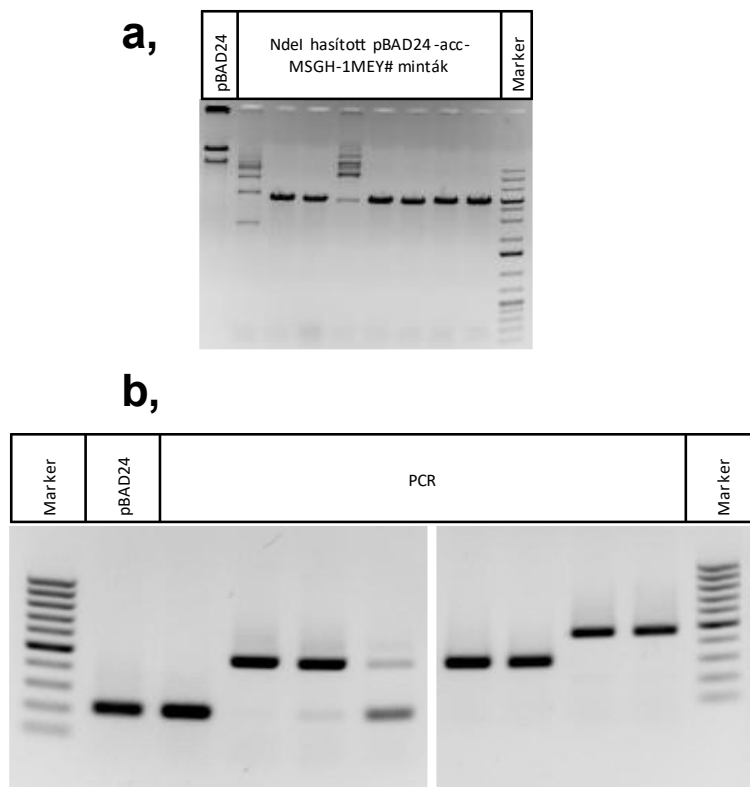
24. ábra: A transzformálást követő **a**, DH5α és üres kontroll, pozitív kontroll és negatív kontroll; **b**, ER1821ΔLacI + FA-EcoRI-acc-MSGH-1MEY#-HindIII 1:1 molarányú ligálási reakció; **c**, ER1821ΔLacI + FA-EcoRI-acc-MSGH-1MEY#-HindIII 1:25 molarányú ligálási reakció.

A kontroll pléteket rendben találtam. A ligálási negatív kontroll részen nőtt néhány telep, ott előfordulhat, hogy a vektor DNS többszörösen önmagával ligálódott. 2-2 telepet oltottam át. A megfelelő OD értéket elérve a mintákból glicerol stock-ot készítettem, a bakteriális minták fennmaradó részét pedig a 4.6.2 fejezetben leírtak szerint Zymo Research Plasmid Miniprep-Classic készlettel tisztítottam. Az eredmény a 15. táblázatban látható.

15. táblázat: Tisztított minták koncentrációjának ellenőrzése.

	pBAD24-acc-MSGH-1MEY#							
Ligálási arány	1:1				1:25			
Inkubációs idő	1h		overnight		1h		overnight	
ρ_{pBAD24} [ng/µl]	147,5	154	205,8	115,9	131,8	113,8	156,1	146,1
A_{260}/A_{280}	2,01	1,78	1,89	1,98	1,9	1,95	1,85	1,79

A ligálási reakciók sikerességét PCR-ben és NdeI hasítással is ellenőriztem.



25. ábra: a, NdeI hasított 1 kb Gene Ruler plus Markerrel és **b,** PCR-ben sokszorosított termékek vizsgálata 100 bp Gene Ruler Markerrel 1 m/V %-os agaróz gélen.

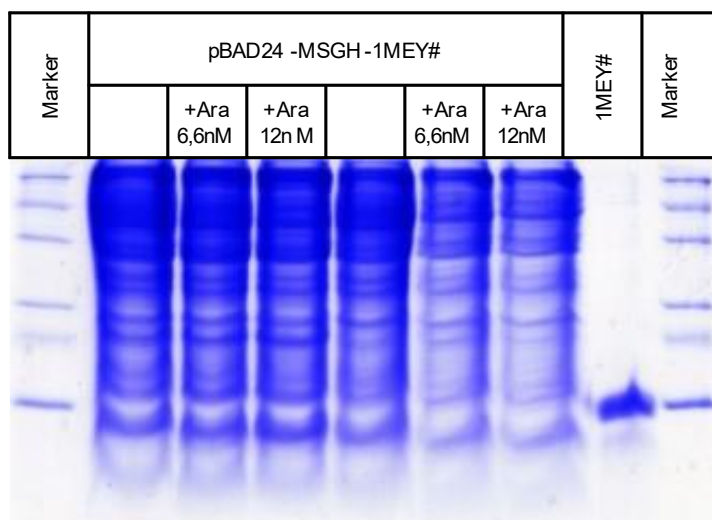
A PCR-en a középső (300 bp-os) sávok nem egyértelműek, az egyes minta a kiindulási plazmiddal megegyező, valószínűleg ez nem hasadt el teljesen. A négyes az egy olyan multimer lehet, amiben van félig elhasadt plazmid és teljesen elhasadt is inszettel együtt. A 2, 3, 7, 8, minták megfelelőnek tűnnek a PCR gélkép alapján, és ezt igazolja az NdeI-es hasítás is.

Plazmid DNS tisztítást végeztem a PEG kicsapás eljárásával a megfelelőnek látott mintákon. Ezeket elküldtük szekvenálásra, ahol egy minta százszázalékos megfelelőséget mutatott, azaz sikeresen előállítottam a pBAD24-acc-MSGH-1MEY# rekombináns DNS-t.

5.3.3 Újabb kísérlet a cinkujj fehérje túltermelésére

A sikeresen módosított DNS-hordozó kialakítása után megkezdtem a fehérjekifejeződés vizsgálatát. A tömény Glicerol stockból ampicillines tápoldatban felszaporítottam a baktérium sejteket. Az optikai denzitásuk a vártan megfelelően növekedett, így megfeleztam a szuszpenziókat és 6,6 mM valamint 12 mM végkoncentrációjú Arabinózzal, indukáltam a fehérje termelődését. A mintákat 32°C-on egy éjszakán keresztül inkubáltam.

A sejt minták feltárását szonikálással végeztem a 4.5.2 fejezetben ismertetettek alapján. Sejtalkotókkal együtt „TOTAL” mintavételezés nem történt, mert a tapasztalatok alapján a centrifugálást követően a fehérje jelentős része az oldható fázisban „SOLUBLE” marad. Az eredményt SDS-page eljárással vizsgáltam. (26. ábra)



26. ábra: Fehérje túltermelés ER1821ΔLacI sejtekben 16.5 m/V %-os Tricin-SDS-poliakrimalid gélen vizsgálva. Marker: Unstained protein marker Referencia: Ni-NTA tisztított 1MEY#

A gélképen elég sűrűn követik egymást a fehérje sávok, ez annak, a következménye, hogy a lehető legtöbb mintát szeretnénk volna felvinni a gélzsebekbe. A korábbi kísérleteimhez hasonlóan most sem látszik a fehérje túltermelés abban a tartományban, ahol a kontrollként felvitt előzőleg tisztított 1MEY# fehérje sávja látható. Ez a jelenség ezen a ponton kifejezetten érdekes, mivel a hordozó DNS és az ebből elméletben kifejeződő fehérje is teljes mértékben azonos a hisztidin toldalékot leszámítva a korábban már vizsgált pBAD-His-1MEY# DNS hordozóval és az ebből kifejezhető His-1MEY# fehérjével. Így arra következtetésre jutottuk, hogy az 1MEY# cinkujj fehérje esetében a hisztidin affinitástoldalék képes fehérjetúltermelődést okozni. A jövőben tovább tanulmányozzuk a pBAD-acc-MSGH-1MEY# DNS hordozót, hogy kimutassuk, lehetséges-e olyan kísérleti körülményt találni, ahol legalább kismértékű fehérje kifejeződést sikerül kimutatnunk, vagy a hisztidin toldalék hiányában a fehérje kifejeződése teljes mértékben gátolva van.

6 Összefoglalás

Kutatómunkám során elsődleges célom olyan cinkujj fehérjét kódoló DNS-ek létrehozása volt, amellyel a kutatócsoportunk *in vivo* vizsgálatokat végezhet a jövőben.

Elsőként a His-1MEY# cinkujj fehérjét kódoló DNS szakaszt építettem át egy olyan DNS hordozóba, a pBAD24 vektorba, melyet az ún. I-Block tesztben lehet majd felhasználni a további kísérletekben fehérje–DNS kölcsönhatás vizsgálata céljából. Az így keletkező cirkuláris DNS-sel kompetens sejteket transzformálva a DNS stabilan fennmarad és replikálódik. Szekvenálás segítségével igazoltuk, hogy a DNS szekvenciája helyes.

Munkám során felmerült a szükségessége egy olyan módosított 1MEY# cinkujj fehérjét kódoló DNS létrehozásának, amely nukleotid sorrendje már nem kódol hisztidin toldalékot. Ezzel egy olyan *in vivo* kifejeződő fehérjéhez juthatnánk, amivel már a fehérje nukleáz aktivitását is tanulmányozhatjuk. A megvalósításhoz a célfehérjét kódoló DNS szekvenciát PCR reakcióban sokszorozítottam. Az eljárás elvégzéséhez olyan oligonukleotid primereket terveztem, amelyek a hisztidin-toldalék elhagyásával indítják az új DNS szintézist. Rekombináns DNS technológia alkalmazásával polimeráz láncreakció folyamán sikeresen előállítottam a módosított célszekvenciát, amit beültettem a pBAD24 hordozóba. A reakció eredményességet PCR sokszorozítással és szekvenálással is ellenőriztem, a kapott szekvencia 100%-ban megegyezik a tervezett 1MEY# génjével.

Ezt követően megvizsgáltam a fehérjék kifejezhetőségét az I-Block rendszerrel használt ER1821ΔLacI baktériumsejtekben. Megalapítottam, hogy a His-1MEY# fehérje túltermeltethető arabinóz jelenlétében, így kutatócsoportunk megkezdheti a fehérje–DNS kölcsönhatások tanulmányozását.

A pBAD24-MSGH-1MEY# DNS hordozóról nem sikerült kimutatni az 1MEY# potenciális cinkujj nukleáz kifejeződését, aminek oka lehet, hogy túl rövidre terveztük a DNS szekvenciában a promóter régió és az első aminosav közti szakaszt.

Megkísértem kijavítani a pBAD24-MSGH-1MEY# DNS feltételezett hibáját és visszaépíteni 3 nukleobázist a DNS szekvenciába a metionin kódja elé, ezért kialakítottam egy újabb rekombináns DNS-t, a pBAD24-acc-MSGH-1MEY# DNS-t. A várakozásunkkal ellentétben ebben az esetben sem volt túltermelhető az 1MEY# fehérje. A jövőben megkíséréljük felderíteni, hogy hisztidin affinitástoldalék hiányában csak a fehérje túltermelése nem lehetséges, vagy annak kis mértékű kifejeződése is gátolva van.

7 Irodalomjegyzék

- [1] R. A. Gibbs, “The Human Genome Project changed everything,” *Nat. Rev. Genet.* 2020 2110, vol. 21, no. 10, pp. 575–576, Aug. 2020
- [2] A. Anita *et al.*, “Géntechnológia és fehérjemérnökség,” Budapest: ELTE TTK Biológiai Intézet, 2013.
- [3] K. Ogata, K. Sato, and T. Tahirov, “Eukaryotic transcriptional regulatory complexes: cooperativity from near and afar,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 13, no. 1, pp. 40–48, Feb. 2003
- [4] S. E. Antonarakis, “Diagnosis of Genetic Disorders at the DNA Level,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 320, no. 3, pp. 153–163, Jan. 1989
- [5] V. Hudacsek and B. Györfy, “A CRISPR-Cas9 rendszerrel végzett genomszerkesztés módszere és onkológiai alkalmazásai,” *Magy. Onkológia*, vol. 62, pp. 119–127, 2018.
- [6] M. V. Zuccaro *et al.*, “Allele-Specific Chromosome Removal after Cas9 Cleavage in Human Embryos,” *Cell*, vol. 183, no. 6, pp. 1650–1664.e15, Dec. 2020
- [7] A. D. Frankel, J. M. Berg, and C. O. Pabo, “Metal-dependent folding of a single zinc finger from transcription factor IIIA,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 14, pp. 4841–4845, 1987
- [8] S. S. Krishna, I. Majumdar, and N. V. Grishin, “Structural classification of zinc fingers SURVEY AND SUMMARY,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 2, pp. 532–550, Jan. 2003
- [9] J. H. Laity, B. M. Lee, and P. E. Wright, “Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 11, no. 1, pp. 39–46, Feb. 2001
- [10] K. Szentmihályi, P. Vinkler, J. Fodor, J. Balla, and B. Lakatos, “The role of zinc in the homeostasis of human organism,” *Orv. Hetil.*, vol. 150, no. 15, pp. 681–687, Apr. 2009
- [11] G. Malgieri *et al.*, “The prokaryotic Cys2His2 zinc-finger adopts a novel fold as revealed by the NMR structure of *Agrobacterium tumefaciens* Ros DNA-binding domain,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 44, pp. 17341–17346, Oct. 2007
- [12] K. Kluska, J. Adamczyk, and A. Krężel, “Metal binding properties, stability and reactivity of zinc fingers,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 367, pp. 18–64, Jul. 2018
- [13] N. P. Pavletich and C. O. Pabo, “Zinc Finger-DNA Recognition: Crystal Structure of a Zif268-DNA Complex at 2.1 Å,” *Science (80-.)*, vol. 252, no. 5007, pp. 809–817, May 1991
- [14] M. Elrod-Erickson, T. E. Benson, and C. O. Pabo, “High-resolution structures of variant Zif268-DNA complexes: implications for understanding zinc finger-DNA recognition,” *Structure*, vol. 6, no. 4, pp. 451–464, Apr. 1998
- [15] M. Dhanasekaran, S. Negi, M. Imanishi, and Y. Sugiura, “DNA-Binding ability of GAGA zinc finger depends on the nature of amino acids present in the beta-hairpin,” *Biochemistry*, vol. 46, no. 25, pp. 7506–7513, Jun. 2007
- [16] S. A. Wolfe, L. Nekludova, and C. O. Pabo, “DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins,” *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 29, pp. 183–212, 2000
- [17] J. M. Berg, “Sp1 and the subfamily of zinc finger proteins with guanine-rich binding sites,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, no. 23, p. 11109, 1992
- [18] J. G. Mandell and C. F. Barbas, “Zinc Finger Tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. suppl_2, pp. W516–W523, Jul. 2006
- [19] J. C. Miller *et al.*, “An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific

- genome editing,” *Nat. Biotechnol.* 2007 257, vol. 25, no. 7, pp. 778–785, Jul. 2007
- [20] C. Harford and B. Sarkar, “Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-Binding (ATCUN) Motif of Proteins and Peptides: Metal Binding, DNA Cleavage, and Other Properties,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 30, no. 3, pp. 123–130, 1997
- [21] C. Harford, S. Narindrasorasak, and B. Sarkar, “The designed protein M(II)-Gly-Lys-His-Fos(138-211) specifically cleaves the AP-1 binding site containing DNA,” *Biochemistry*, vol. 35, no. 14, pp. 4271–4278, Apr. 1996
- [22] Y. Jin, M. A. Lewis, N. H. Gokhale, E. C. Long, and J. A. Cowan, “Influence of stereochemistry and redox potentials on the single- and double-strand DNA cleavage efficiency of Cu(II)- and Ni(II)-Lys-Gly-his- derived ATCUN metalloptides,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 26, pp. 8353–8361, Jul. 2007
- [23] A. Belczyk-Ciesielska *et al.*, “Nickel(ii)-promoted specific hydrolysis of zinc finger proteins,” *Metallomics*, vol. 10, no. 8, pp. 1089–1098, Aug. 2018
- [24] A. Czene, “A colicin E7 nukleáz domén, mint egy lehetséges mesterséges metallonukleáz alapja,” Jun. 2013
- [25] P. H. Von Hippel and J. D. McGhee, “DNA-Protein Interactions,” <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.41.070172.001311>, vol. 41, no. 10, pp. 231–300, Nov. 2003
- [26] J. Liu and G. D. Stormo, “Combining SELEX with quantitative assays to rapidly obtain accurate models of protein–DNA interactions,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 17, pp. e141–e141, Sep. 2005
- [27] T. A. Vickers and S. T. Crooke, “Development of a Quantitative BRET Affinity Assay for Nucleic Acid-Protein Interactions,” *PLoS One*, vol. 11, no. 8, p. e0161930, Aug. 2016
- [28] S. Durai, A. Bosley, A. Abulencia, S. Chandrasegaran, and M. Ostermeier, “A Bacterial One-Hybrid Selection System for Interrogating Zinc Finger- DNA Interactions,” *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, vol. 9, no. 4, pp. 301–311, Apr. 2006
- [29] “Microscopic modeling and simulation of lactose operon in Escherichia coli - ProQuest.” <https://www.proquest.com/openview/5395aaafcf65b29ab6b10483dbbb169/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y> (accessed May 13, 2022).
- [30] S. Szentes *et al.*, “I-Block: a simple Escherichia coli-based assay for studying sequence-specific DNA binding of proteins,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 48, no. 5, p. E28, Mar. 2020
- [31] F. Sherman, J. W. Stewart, and S. Tsunasawa, “Methionine or not methionine at the beginning of a protein,” *BioEssays*, vol. 3, no. 1, pp. 27–31, Jul. 1985

*„Ha távolabbra láttam másoknál, azt azért tehettem,
mert óriások vállán álltam.”*

Isaac Newton

8 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Gyurcsik Bélának, amiért lehetőséget biztosított rá, hogy a TDK kutatásomat a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport tagjaként végezzem, továbbá szakmai tanácsaiért és fáradhatatlan segítségéért.

Köszönöm Hajdu Bálintnak a laboratóriumi kísérleteim során nyújtott segítségét, szakmai tanácsait, sok türelmét és biztatását.

Szeretném megköszönni Nafae Zeyad Hasan Abdullahnak is a kutatásomban nyújtott segítségét.

Végül szeretném megköszönni Dr. Enyedy Éva Annának, a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék tanszékvezetőjének, hogy lehetővé tette, hogy a kutatásaim során a tanszéken dolgozhassak.