



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Tudományos diákköri dolgozat

**Cinkujj fehérje-DNS kölcsönhatások vizsgálata sejten
belül**

KÉSZÍTETTE:

Fazekas Bettina

Vegyész Msc szak, II. évfolyam

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Gyurcsik Béla, egyetemi docens

Hajdu Bálint, tudományos segédmunkatárs

Szeged

2022

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	1
2	Irodalmi áttekintés	2
2.1	Cinkujj fehérjék	2
2.2	Cinkujj fehérjék csoportosítása	3
2.3	Cinkujj fehérjék tervezése	7
2.4	Cinkujj nukleázok	9
2.5	Toxikus fémionok hatása cinkujj fehérjékre	10
2.6	I-Block rendszer	11
3	Célkitűzés	14
4	Kísérleti anyagok és módszerek	15
4.1	Rekombináns DNS technológia	15
4.1.1	DNS hasítás	15
4.1.2	DNS ligálás	16
4.1.3	DNS defoszforilálás	16
4.1.4	DNS foszforilálás	17
4.1.5	Kompetens sejt készítés	17
4.1.6	Transzformálás	18
4.2	Plazmid szaporítás, tisztítási módszerek	18
4.3	Gélelektroforézis	20
4.4	UV-VIS spektrofotometria	21
4.4.1	Palte reader	21
4.5	DNS tisztítási módszerek	21
4.5.1	Fenol-kloroform extrakció	21
4.5.2	Gél extrakció	22
4.6	β -galaktoziáz aktivitásának meghatározása	22
4.7	Polimeráz láncreakció	23
4.8	Olvadáspont becslése	25
4.9	Szekvenálás	26
4.10	QuikChange TM eljárás	27
5	Eredmények	29

5.1	Primer tervezés 1MEY-alapú plazmidokhoz	29
5.2	pdUA-LacI _N -S1, -N0 és -N3 DNS-hordozók előállítása.....	30
5.3	Szekvenálási eredmények.....	39
5.3.1	pdUA-LacI _N -N3 szekvenálásának eredménye.....	39
5.3.2	pdUA-LacI _N -N0 szekvenálásának eredménye.....	40
5.3.3	pdUA-LacI _N -S1 szekvenálásának eredménye	40
5.4	I-Block kísérlet pdUA-LacI _N -S1 és -N0 DNS hordozókkal	41
5.5	Primer tervezés 1MEY-alapú plazmidokhoz 2. próba	44
5.6	pdUA-LacI _{NE} -S1a, -S1b és -S1c DNS-hordozók előállítása.....	45
5.7	I-Block kísérlet pdUA-LacI _{NE} -S1a, -S1b és -S1c DNS hordozókkal	49
5.8	Primer tervezés 1MEY-alapú plazmidokhoz 3. próba	51
5.9	pdUA-LacI _{NE} -T3e és pdUA-LacI _N -S1* DNS-hordozók előállítása	52
5.10	I-Block kísérlet pdUA-LacI _{NE} -T3e és pdUA-LacI _N -S1* DNS hordozókkal ...	53
5.11	β-galaktozidáz aktivitásának mérése oldatban	55
5.12	Toxikus fémionok hatásának vizsgálata I-Block tesztrendszer segítségével ...	57
6	Összefoglalás	60
7	Irodalomjegyzék.....	62
8	Rövidítések.....	66
9	Köszönetnyilvánítás	67
10	Függelék	68
10.1	pBAD24-His-1MEY# DNS hordozó sokszorosítása	68

1 Bevezetés

Az elmúlt 50 évben nagy figyelmet fordítottak olyan mesterséges nukleázokkal kapcsolatos kutatásokra, amelyek különböző genetikai eredetű betegségek (öröklődő betegségek vagy rák) kezelésére, illetve gyógyítására orientálódtak.

A nukleázok a nukleotidok között kialakult foszfodiészter kötéseket hasítják el, ezáltal aktiválva a DNS önjavító mechanizmusát. A sejtben ezután bekövetkezhet sejthalál, vagy az elhasadt végek összeragadhatnak, de történhet homológ rekombináció is, amennyiben a hibás DNS szál mellett van egy hibátlan templát is. Ez utóbbi folyamat, az eukarióta sejtekben nagyon kis hatékonysággal, mindössze 10^{-6} – 10^{-7} valószínűséggel játszódik le, viszont gyakorisága megnövelhető, ha a DNS szálát a hibás szekvenciánál hasítjuk el egy nukleázzal.

A jelenleg ismert DNS hasító enzimek a meganukleázok, a TALE nukleázok, a cinkujj-FokI, illetve a CRISPR-Cas9. Utóbbi rendszer pontos leírásáért 2020-ban ítelték oda a kémiai Nobel díjat. Felfedezésük után ezeket a nukleázokat mikroorganizmusokban, növényekben, állatokban, valamint humán sejtekben, sőt a klinikai vizsgálatokban is alkalmazták génmódosítás céljából. Ezen nukleázok a DNS mindkét szálát hidrolitikusan elhasítják a célzott régióban. Kiderült azonban, hogy a célszekvencián kívül történő hasítások miatt mellékhatás is felléphet, így még mindig nem kellően specifikusak a humán gyógyászatban történő felhasználásra.

Ahhoz, hogy egy nukleáz sikerrel alkalmazzunk a gyógyászatban, arra van szükség, hogy ténylegesen csak a kívánt régióban hasítsa el a humán géneket. Kutatócsoportunk egyik fő célja ilyen, többszörösen szabályozott cinkujj-alapú nukleázok kifejlesztése, ahol a hasításért a Colicin E7 nukleáz doménje, ATCUN motívum, vagy egyéb rövid peptid részletek felelősek. Az eddigi *in-vitro* eredmények tükrében indokoltnak tűnt továbblépni, így elhatároztuk, hogy egy olyan rendszert alakítunk ki, amelyben már *in vivo* – sejteken belül – is tanulmányozhatók a potenciális nukleázok. Ehhez be kell építeni a tanulmányozott enzimek által felismert DNS szakaszokat egy olyan bakteriális rendszerbe, ahol a fehérje-DNS kölcsönhatások módosítják a sejt valamely funkcióját, és ez kívülről is detektálható.

2 Irodalmi áttekintés

A transzkripció – azaz a DNS RNS-sé való átíródása – , a DNS replikáció és rekombináció folyamatainak szabályozott lejárásáért legtöbbször egy adott DNS szekvencia és egy szabályozó fehérje között kialakuló kölcsönhatás felelős. Ezeket a fehérjéket a szerkezetükben megtalálható motívumok szerint különböző osztályokba lehet sorolni. A fehérje motívumok egy DNS-felismerő hélixet tartalmaznak, amely a molekula felületén található, így a DNS nagyárában specifikus kölcsönhatást alakíthatnak ki a nukleobázisokkal. Azonban egyetlen DNS-felismerő hélix nem lép interakcióba elegendő bázispárral ahhoz, hogy ez egyedi DNS szekvenciát jelentsen egy adott génben. Ezt a problémát úgy lehet orvosolni, hogy a különböző DNS-t felismerő motívumokat egy polipeptidlánccá kapcsoljuk össze. Minden modul csak egy rövid szakaszt ismer fel a DNS szekvenciájából, viszont ha ezeket linkerek segítségével összekapcsoljuk, akkor a kialakuló lánc hosszúsága és specifikitása is megnő. Ilyen módon tudjuk használni pl. a cinkujj fehérjéket a DNS egy adott szakaszának specifikus felismerésére és ezzel együtt, különböző folyamatok szabályozására. [1]

2.1 Cinkujj fehérjék

A cinkujj fehérjéket először 35 évvel ezelőtt mutatták ki a dél-afrikai karmosbéka transzkripciós faktorában (TFIIIA), amelyről megállapították, hogy egy Cys₂His₂ típusú fehérje. Ez a fehérje több Zn²⁺-iont is megköt, viszont fémionok hiányában inaktiválódik. Azóta megállapították, hogy a cinkujj fehérjék az eukarióta sejtek egyik legnépesebb fehérjecsaládja. [2] Szerkezetük és funkciójuk rendkívül sokszínű, például egyes típusok a DNS szekvenciájának felismerésében vesznek részt, mások az apoptózist, más néven sejthalált szabályozzák vagy a fehérjék feltekeredését segítik elő. A cinkujj fehérjék szerkezete ugyanolyan változatos, mint a funkciójuk. Az eltérő szerkezet az oka a különféle funkcióknak, illetve ez határozza meg azt is, hogy DNS-sel, RNS-sel, valamilyen kismolekulával vagy másik fehérjével alakítanak ki kölcsönhatást. Viszont mindegyikben közös tulajdonság, hogy a Zn²⁺-ion stabilizálja a szerkezetet. [1] [3] Erre azért kiválóan alkalmas a Zn²⁺-ion, mivel nem vesz részt redoxireakciókban, átmeneti hard-soft értékkel rendelkezik és erős koordinatív kötések kialakítására képes, főként tetraédres geometriában. [4]

A cinkujj motívumokat az eddigi kutatások során 8 osztályba sorolták (1. ábra). Ennek alapja a cink-kötő egység másodlagos szerkezetének változatossága. A cinkujj motívumokban eltérő mennyiségben találhatunk ciszteint és hisztidint, amik a Zn²⁺-ionhoz

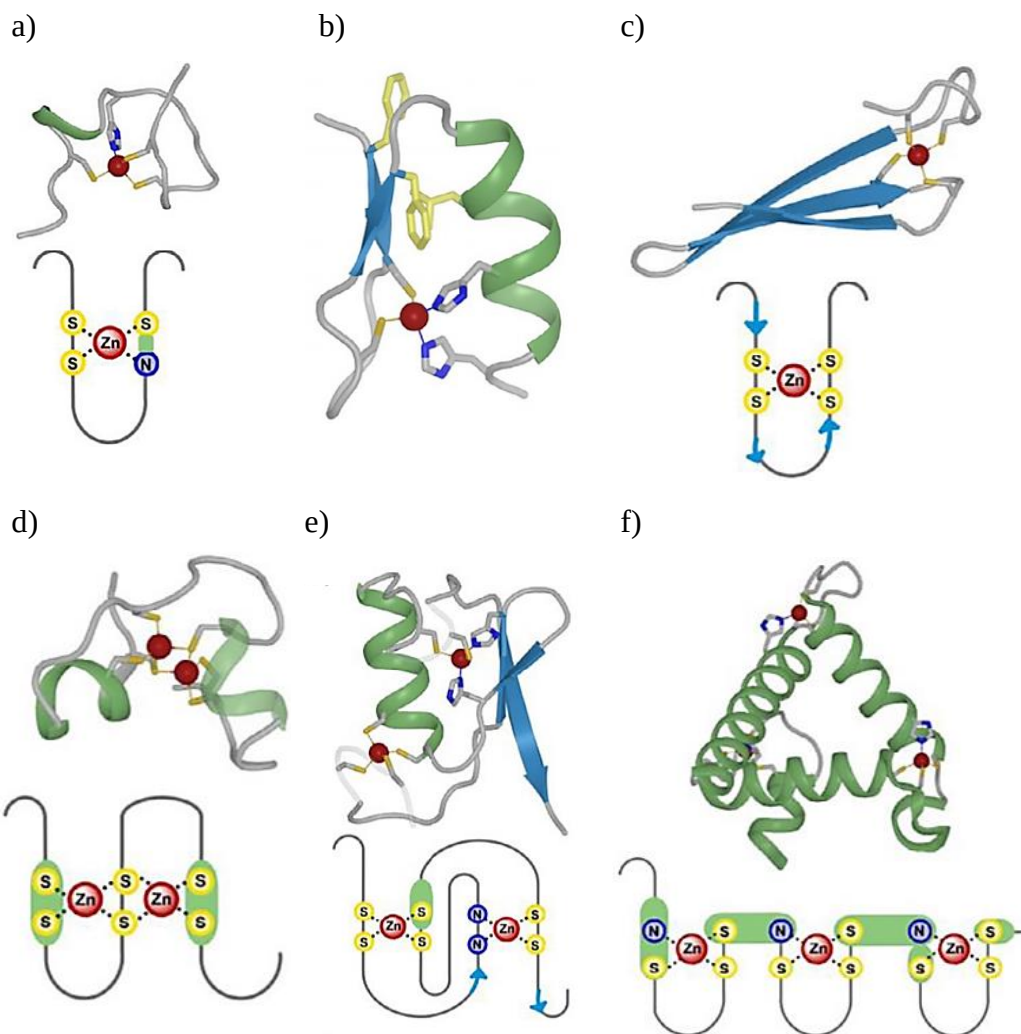
koordinálódva stabilizálják a 3D-s szerkezetet. Laity és társai definíciója alapján a cinkujj domének olyan kisméretű fehérjék, amelyeknek legalább egy Zn^{2+} -ionhoz kell koordinálnuk, hogy a funkciójukat el tudják látni. [2]

2.2 Cinkujj fehérjék csoportosítása

Az úgynevezett Gag-csukló (1. ábra a) 20 aminosavból épül fel. A szerkezetben egy β -kanyar kapcsolódik össze két rövid β -redővel, ami után pedig egy α -hélix található. Ezt a motívumot $\text{Cys}_2\text{HisCys}$ szekvenciának is nevezik, mert a Zn^{2+} -ion a β -kanyar N-terminális végén két ciszteinhez, míg a C-terminális végen egy ciszteinhez és egy hisztidinhez kapcsolódik. A Gag-csukló motívum megtalálható például a HIV vírus fehérjéjében vagy az RNS-polimeráz II-ben. [5]

A violinkulcs cinkujj motívumok (1. ábra e) két Zn^{2+} -ion megkötésére képesek. Az ebbe a csoportba tartozó molekulák szekvenciája és funkciója igen változatos. További 6

alcsoportra oszthatók az alapján, hogy a szerkezetben lévő 8 koordinálódni képes aminosav oldallánc hány ciszteint, hisztidint tartalmaz és milyen térbeli elrendeződésben.



1. ábra: Cinkujj fehérjék típusai. A Zn^{2+} -ion piros, az α -hélix zöld, a β -redő kék színnel van jelölve. [6]

A következő osztályba a cink-szalagok tartoznak (1. ábra c). Ez a motívum található meg a legtöbb cinkujj fehérjében. A cink-szalagok közös tulajdonsága, hogy szerkezetük két β -kanyart és három β -redőt tartalmaz. [7]. A Zn^{2+} -ionnal általában a cisztein oldalláncok alakítanak ki kötést, viszont egyes esetekben hisztidin is szerepelhet ligandumként.

A Zn_2Cys_6 motívumokban (1. ábra d) a hat cisztein két Zn^{2+} -iont köt meg. Két nagy csoportra oszthatók, az egyik csoportba tartoznak a transzkripciót szabályozó, dupla cinkujjak, a másik csoportot a rézre érzékeny egy cinkujjal rendelkező transzkripciós faktorok alkotják. [8]

A TAZ2-szerű motívumok (1. ábra f) spirális szerkezetét – ami a hidrofób magot tartalmazza – három Zn^{2+} -ion stabilizálja. A központi fémionok mindegyikéhez egy hisztidin

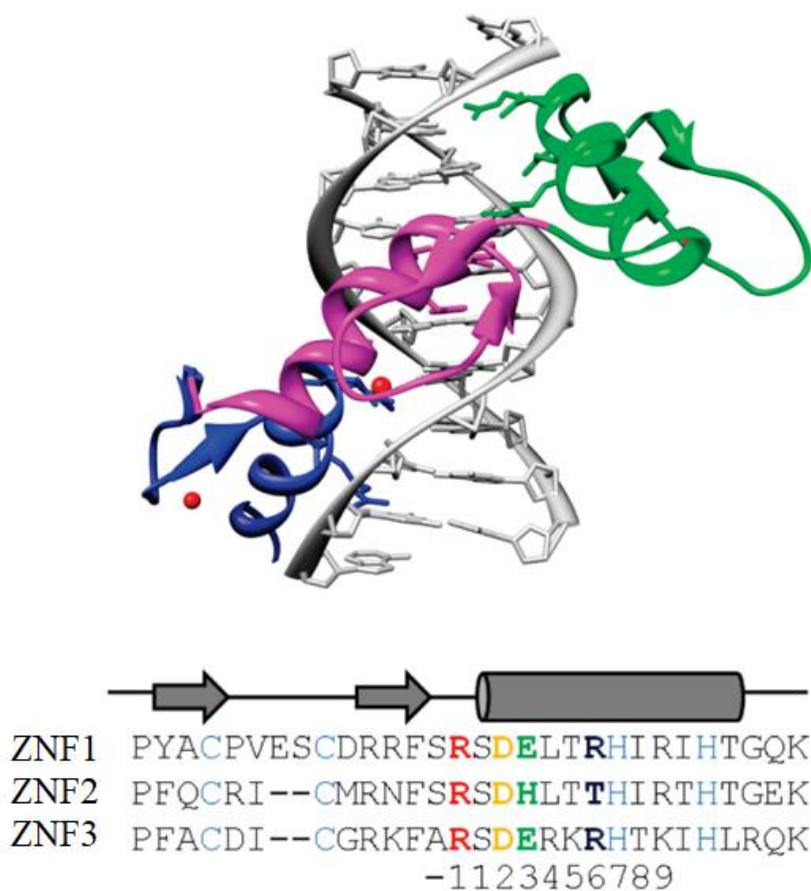
és három cisztein kötődik. Minden Zn^{2+} -ion két antiparallel lefutású α -hélix között helyezkedik el. [9] [10]

A Cys_2His_2 motívumban (1. ábra b) a Zn^{2+} -ionhoz két cisztein és két hisztidin koordinálódik tetraédes geometriában. A Cys_2His_2 típusú cinkujj fehérjék alkotják a transzkripciós faktorok legnépesebb családját mind az emlősökben, mind a növényekben. Emellett az eddigi kutatások alapján a Cys_2His_2 az egyik, ha nem a legigéretesebb tervezhető, DNS és RNS felismerő motívum. Wright és munkatársai vizsgálták először NMR (mágneses magrezonancia) spektroszkópiával ezt a típusú cinkujj motívumot. Egy ilyen monomer ~30 aminosavat tartalmaz az alábbi szekvenciában: X-Cys- $\text{X}_{2/4}$ -Cys- X_3 -Phe- X_5 -Leu- X_2 -His- $\text{X}_{3/5}$ -His, ahol X helyén bármilyen aminosav lehet. A cink átmeneti hard-soft sajátosságokkal rendelkezik, így koordinációja mind a nitrogén-, mind a kéntartalmú ligandumokhoz kedvezményezett. Emiatt Cys_2His_2 típusú fehérjék a Zn^{2+} -iont nagy affinitással kötik, a disszociációs állandó átlagosan 10^{-9} – 10^{-12} tartományban van. [11] A fémkötő motívum másodlagos szerkezete két antiparallel β -redőt és egy α -hélixet tartalmaz. A C-terminális részén található az α -hélix a két hisztidinnel, míg az N-terminális részen a két β -redő helyezkedik el. [12] Ezzel szemben a fémmentes apo fehérje rendezetlen szerkezetet mutat.

Az emlősökben is előforduló Zif268 cinkujj fehérjével kapcsolatos kiterjedt vizsgálatok nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy a Cys_2His_2 típusú cinkujj fehérjék DNS kötő képességét még jobban megértsük. A cinkujj egységek mindegyike 3 nukleotidot ismer fel a DNS szekvenciában hidrogénkötések révén. A motívumban az α -hélix kezdetétől számított –1, 3 és 6-os pozícióban lévő aminosavak felelősek a három nukleotid felismeréséért (2. ábra). A –1-es helyzetben lévő aminosav a DNS szál 3'– végével alakít ki kölcsönhatást. A 3-as pozícióban lévő aminosav, a DNS szál közepén lévő nukleotidhoz kötődik hozzá, a 6-os pozícióban lévő aminosav a DNS szál 5'– végével alakít ki kötést, ami általában guanin. A 2-es pozícióban lévő aminosav ismerheti fel a negyedik nukleobázist a DNS komplementer szálán. [13] [14]

Megállapították, hogy egyetlen cinkujj egység nem képes elég nagy affinitással és specifikusan kötődni a hozzátartozó DNS szekvenciához. A kellően erős kölcsönhatás eléréséhez legalább két motívumot kell összekapcsolni, míg ahhoz, hogy specifikus legyen a DNS felismerés, további motívumok is szükségesek lehetnek. A cinkujj egységek összekapcsolása peptid-linkerek segítségével történik. A monomereket általában 5 aminosav választja el egymástól. A Zif268 fehérjében a szomszédos cinkujjakat úgynevezett Krüppel-típusú linkerek kötik össze. [15] Ezek jellegzetes szekvenciája a következő:

TGE(R/K)P(Y/F) (ahol T: treonin, G: glicin, E: glutaminsav, R: arginin, K: lizin, P: prolin, Y: tirozin F: fenilalanin), ami az egyik monomer utolsó hisztidinjét köti össze a következő ujj első, aromás aminosavával. [16]



2. ábra: A Zif268-DNS komplex szerkezete. Mindegyik ujj-motívum különböző színű, az első ujj zöld, a második lila, a harmadik pedig kék. A piros gömbök jelölik a Zn^{2+} -ionokat. A DNS-sel kialakított kölcsönhatásért felelős aminosavak félkövér betűvel és eltérő színnel vannak megjelenítve a pozíciójuknak megfelelően: a –1-es pozíciójú piros, a 2-es sárga, a 3-as zöld, a 6-os helyzetű vastag fekete. [17]

2.3 Cinkujj fehérjék tervezése

A cinkujj fehérjék előző alfejezetben említett moduláris felépítése lehetőséget teremt rá, hogy az egységek kombinálásával elméletben bármilyen tetszőleges DNS-szekvenciát megcéloznunk. Mindemellett az emberi szervezetben is előfordulnak – a humán genom 2 – 3%-át alkotják – , így alkalmazásuk mesterséges fehérjékként nem rejt jelentős kockázatot. [18] [19] Az előbb említett tulajdonságaik miatt előszeretettel alkalmazzák őket a génmódosítási kísérletekben, DNS-felismerő doméneként.

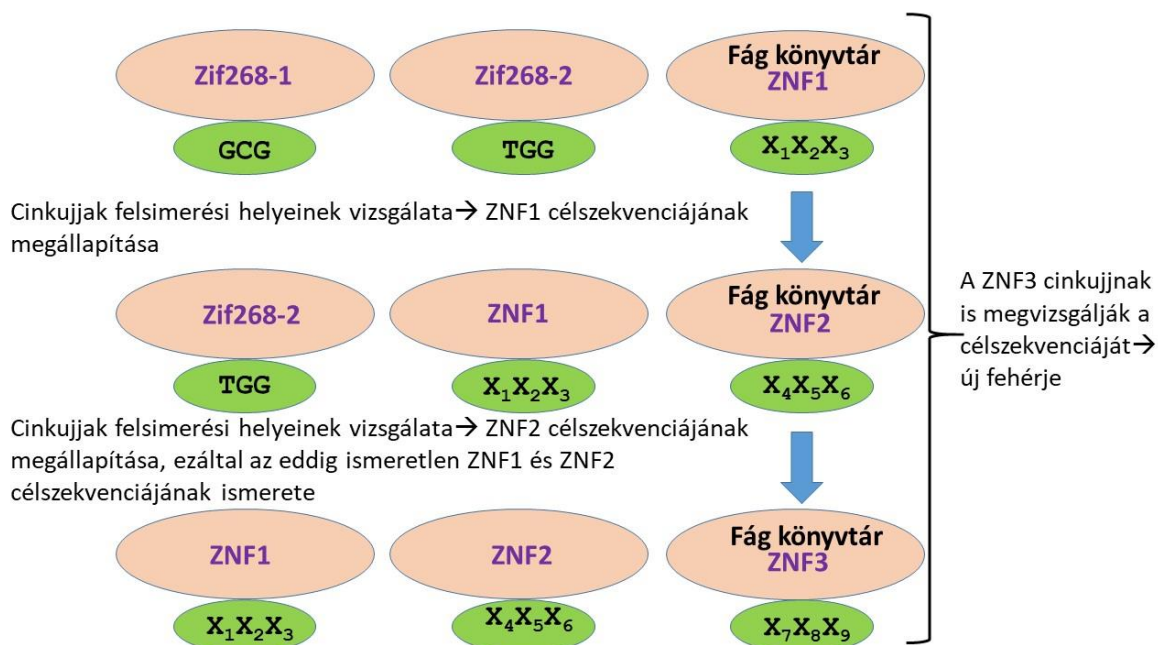
Több motívum összekapcsolásával a DNS-felismerés specifitása növelhető, azonban a mesterséges fehérjékben több cinkujj motívum egymáshoz való kötődése során szerkezeti feszültségek is felléphetnek, csökkentve a kölcsönhatás erősségét. Ennek kiküszöbölésére egyrészt olyan makromolekulákat tervezhetünk, amelyek párban kötődnek a DNS megfelelő részeihez vagy olyan hosszabb linkereket is alkalmazhatunk, amelyek révén a cinkujj domének a DNS-szál különböző részeihez képesek hozzákötődni. Az összekapcsolt motívumok együttműködése a DNS kismértékű konformáció-változásának is a következménye, amit fehérjében lévő harmadik ujj indukál. A szerkezet megváltozása hozzájárul ahhoz, hogy a fehérje erős hidrogénkötéseket tudjon kialakítani a DNS nagyárákában. [17] [20]

A mesterséges cinkujj fehérjék tervezésének alapfeltétele, hogy rendelkezésre álljanak olyan építőelemek, amelyek elég nagy affinitással és specifitással ismerik fel és kötődnek hozzá a felhasználó által kiválasztott bármely 3 nukleotidhoz. A fő cél ezen a területen, hogy a 64 féle bázishármas kombináció felismeréséhez szükséges összes cinkujj alegységet azonosítsák. [21]

Amennyiben rendelkezésre állnak a szükséges alegységek, nem biztos, hogy az ezekből összeépített fehérje megfelelően fog működni. Számolni kell azzal, hogy a mesterséges cinkujj fehérje nem csak a megfelelő szekvenciákhoz tud hozzákötődni. Számos kísérlet bizonyította, hogy ezeknek a molekuláknak a DNS guaninban gazdag részéhez van nagy affinitásuk. Azt tapasztalták a vizsgálatok során, hogy ha a fehérjével olyan célszekvenciát akarunk felismertetni, amely az előbb említett nukleobázist kisebb mértékben tartalmazza, akkor nem jön létre olyan erős kölcsönhatás a DNS és a cinkujj domén között. Ennek két oka van, az egyik, hogy a legerősebb fehérje-DNS kölcsönhatás a nagyárokban, a DNS guaninja és a cinkujj fehérje argininja közt alakul ki, a másik pedig az, hogy jelentős, stabilis kötés jön létre, ha a felismerni kívánt szekvenciában, a 3-as pozícióban is guanin van. A cinkujj fehérje számára a legkönnyebben felismerhető nukleotid-szekvencia a következő: 5'–GNNGNNGNNGNNK–3', ahol N tetszőleges nukleotidot jelöl (ideális

esetben mind guanin), a K helyén pedig guanin vagy citozin található. A tervezéskor fontos az is, hogy olyan célszekvenciát jelöljünk ki, amely egyedi és a vizsgált sejt DNS-ében csak kevés hasonló szekvencia fordul elő. Amennyiben a célszekvencián kívül van egy másik DNS szakasz, amelynek szekvenciája egyetlen nukleotid eltérést mutat, nem kizárható, hogy ehhez is hozzákötődhet a fehérje. Ez a jelenség különösen abban az esetben áll fent, amennyiben a nukleotidhármas harmadik helyén A/T csere történik. [22]

Mesterséges cinkujj fehérjék tervezéséhez Greisman és társai kifejlesztettek egy olyan rendszert, ahol a Zif268 trimer cinkujj fehérje első két cinkujját – amelyeknek DNS célszekvenciáját ismerték – rögzítették, viszont a harmadik alegységet véletlenszerűen módosították. Az így módosított fehérjék kölcsönhatását vizsgálták nagyszámú rövid DNS-sel, ily módon meghatározva a harmadik alegység nukleobázis preferenciáját. Ezt követően a Zif268 második cinkujját változtatták véletlenszerűen és megvizsgálták ezen fehérjék DNS-felismerését. Ezt a folyamatot addig ismételték, amíg egy új fehérjét nem kaptak, mely a kiválasztott DNS szakaszt ismerte fel nagy affinitással. Ezzel a módszerrel egy adott fehérjéhez meghatározható az általa felismert DNS célszekvencia. Egy másik eljárásban véletlenszerűen kapcsoltak össze cinkujj alegységeket, majd ezek kölcsönhatását vizsgálták adott DNS célszekvenciákkal. Ezek a módszerek lehetővé tették, hogy a legtöbb bázishármas kombinációjához megtalálják az azt felismerő cinkujj motívumot. [23]



3. ábra: Egy új cinkujj fehérje tervezés lépései

Ma már léteznek olyan programok, amelyek megkönnyítik a tervezés folyamatát: pl. Zinc Finger Tools, ZiFiT. [21] [24] Ezek az előbb felsorolt kutatások eredményeit

felhasználva adnak becslést az optimális cinkujj fehérje aminosav összetételére, amely az általunk kiválasztott DNS szekvenciát a legnagyobb szelektivitással képes felismerni.

2.4 Cinkujj nukleázok

A cinkujj fehérjék a DNS egy jól meghatározott szakaszát ismerik fel és hozzá is kötődnek. Azonban ha egy cinkujj fehérje N- vagy C-terminális végéhez úgynevezett nukleázokat kapcsolunk, akkor a DNS mindkét szálának hasítását előidézhetjük. Ilyen esetekben figyelembe kell venni azt is, hogy a hasítás szempontjából nem előnyös számunkra, ha sok guanin vagy citozin van a hasítani kívánt szekvenciában, mert ekkor nehezebb szétválasztani a DNS két szálát, mivel a guanin és a komplementere között három hidrogén kötés van, ellenben az adenin-timin párossal, ahol csak két hidrogénkötés létesül.

A FokI endonukleáz volt az első enzim, amelynek katalitikus doménjét cinkujj nukleázok felépítésére, majd génmódosítási kísérletekben sikeresen használták. Számos endonukleáz homodimer enzim, ami azt jelenti, hogy 2 azonos fehérjéből áll össze a funkcionális fehérje. Ezek meghatározott nukleotidokat ismernek fel és sokszor palindrom¹ szekvenciánál hasítják el a DNS-t. Ilyenek például a II-es típusú restriktációs endonukleázok. A FokI nukleáz monomerként is képes a nukleotidok felismerésére, azonban ahhoz, hogy effektíven el tudja hasítani a DNS két szálát, már dimerként kell funkcionálnia. [25] A felismerő domén Mg^{2+} -ion jelenlétében hozzákötődik a DNS-hez a következő szekvenciáknál: 5'-CATCC-3', illetve ennek komplementere 3'-GTAGG-5'. Ezt követően fog megtörténni a DNS foszfodiészter kötéseinek hasítása 9, illetve a komplementer szálon 13 bázispárral a célszekvenciája után. [26] A mesterséges nukleázként történő alkalmazása során a FokI enzim előbb említett DNS felismerő doménjét cserélték ki 3-4 alegységből felépülő cinkujj fehérjére. Két ilyen mesterséges nukleáz molekula kialakításával egy tetszőleges, $2 \times 9-12$ bázispár hosszúságú DNS szakaszt célozhattak meg. [27] Habár elméletben a FokI nukleáz csak homodimerként képes kétszálú hasítást végrehajtani, azonban egyes esetekben megfigyelhető, hogy monomerként is aktiválódik. Ekkor a felismert DNS szekvencia már csak 9-12 bázispár hosszúságú, így keletkezhetnek nem kívánt hasítások is, amik a kísérletek során észlelhető citotoxikusságért felelősek. [28]

A colicin E7 (ColE7) egy nem specifikus endonukleáz, amit az *Escherichia coli* toxinjai közé sorolnak, mivel stressz hatására – ami a tápanyag hiányában lép fel – képesek elpusztítani a szomszédos coli baktériumokat. Miután a ColE7 belépett a sejtbe a különböző

¹ . Palindrom szekvenciának nevezzük azt, amikor egy DNS szakasz alsó és felső szálának 5'-3' irányú olvasatával ugyanazt a szekvenciát kapjuk.

kötő doménjei segítségével, elhidrolizálja a sejt DNS-ét vagy RNS-ét és ez sejthalálhoz vezet. Viszont a gazdasejtet megvédi a nukleáz mellett kifejeződő Im7 nevű fehérje, amely a nukleázhoz kötődve megakadályozza annak működését, így megvédi a sejtet az enzim toxicitásától. [29] A különböző osztályokba tartozó colicinek aktivitása eltérő. A ColE2, ColE7, ColE8 és ColE9 DNáz, azaz DNS bontó, míg a ColE3, ColE4 és ColE6 RNáz vagyis RNS bontó aktivitással rendelkeznek. A DNáz aktivitás az úgynevezett H-N-H motívumnak köszönhető, ami a fehérje C-terminális végén helyezkedik el. A 34 aminosav hosszú domén szerkezetében 4 hisztidin található, ezek közül három komplexet képez a fémionnal, de a negyedik is segíti a DNS hidrolízisét. A ColE7 a DNS kettős szálának hasítását csak Zn^{2+} -ion jelenlétében tudja katalizálni, viszont Ni^{+} -ion segítségével képes csak egyetlen szálát elhasítani a DNS kettős hélixéből. [30] A ColE7 működése során a C- és az N-terminális végek együttműködnek a DNS hidrolízisének megvalósítása érdekében. A nukleáz enzim N-terminális végén egy ~40 aminosav hosszúságú hurok helyezkedik el, amely nem rendelkezik jól definiált másodlagos szerkezeti elemekkel. Azonban ha valami változás következik be az N-terminális végén, akkor az, a ColE7 destabilizációjához, ezáltal a DNS-hez való affinitás csökkenéséhez vezet. Ennek köszönhetően az N-terminális vég jelenlétével vagy hiányával, esetleg módosításával szabályozható ez a nukleáz. Cinkujj fehérjékkel összekapcsolva pedig a specifikussága is kialakítható. [31] [32]

2.5 Toxikus fémionok hatása cinkujj fehérjékre

A korábban ismertetett funkciókat a cinkujj fehérjék csak $Zn(II)$ -telített formában képesek ellátni, azonban az élő szervezetben számos egyéb fémion van jelen, amelyek szintén koordinálódhatnak a cinkujj alegységekhez, ezzel csökkentve, gátolva vagy akár módosítva az eredeti funkciót. A szervezetbe kerülő toxikus fémionok például $Cd(II)$ és $Hg(II)$ még nagyobb veszélyt jelentenek, mivel a $Zn(II)$ -vel azonos csoportban helyezkednek el, így kémiai tulajdonságaik is hasonlóak.

Jól ismert jelenség hogy a soft karakterű $Hg(II)$ az emberi szervezetre mérgező hatást gyakorol mind szerves mind szervetlen formában, amely leginkább a májat károsítja. [33] A $Hg(II)$ nem közvetlen a génexpresszióra van hatással, ezért epigenetikus tumorképzőnek tekintik. Fiziológiai körülmények között, az elvégzett egyensúlyi vizsgálatok, arra engednek következtetni, hogy a $Zn(II)$ és a $Hg(II)$ affinitása a Cis_2His_2 motívumhoz hasonló, azonban Cl^{-} -ionok hiányában, már a nehézfémion alakít ki erősebb kölcsönhatást a motívumban a ciszteinekhez való nagyobb affinitása miatt. Egyes kutatások alapján $Hg(II)$ jelenlétében a Ros87 és Sp1 cinkujj fehérjék másodlagos szerkezete összeomlik és nem képes felismerni

DNS célszekvenciáját. [34] [35] Ezzel szemben található olyan publikáció, ahol nem tapasztalták a Hg(II) jelenlétben a TFIIIA fehérje funkciójának csökkenését. [36]

A Cd(II) cinkujj fehérjékre gyakorolt hatásában még nagyobb ellentmondások találhatók a szakirodalomban. Modellpeptidekkel végrehajtott vizsgálatok alapján a Cis₂His₂ típusú motívumok a Zn(II) sokkal erősebben kötik, mint a Cd(II)-t, viszont a Cis₄ fehérjék már a nehézfémeket kötik erősebben. A TFIIIA fehérjével elérhetőek olyan publikációk, ahol a Cd(II) képes volt gátolni annak funkcióját, [37, 38] és olyan is, ahol nem. [39] Az Sp1 fehérje esetén is hasonló a helyzet, a Cd(II) jelenléte gátolja a cinkujj fehérje-DNS kötését több publikációban is, [40, 41] de itt is vannak ellenpéldák, [42] sőt olyan eset is, ahol a fehérje Cd(II) komplexe is képes volt megkötni a DNS célszekvenciát változatlanul. [35]

Utóbbival egyező eredmény született a Ros87 nevű cinkujj fehérje vizsgálata során: ha a cink helyett kadmium köt a komplexbe, akkor a kialakult „kadmiumujj” fehérje szerkezete csak kismértékben változik meg. A kismértékű szerkezetváltozás nem befolyásolta a fehérje DNS-felismerését [43]

2.6 I-Block rendszer

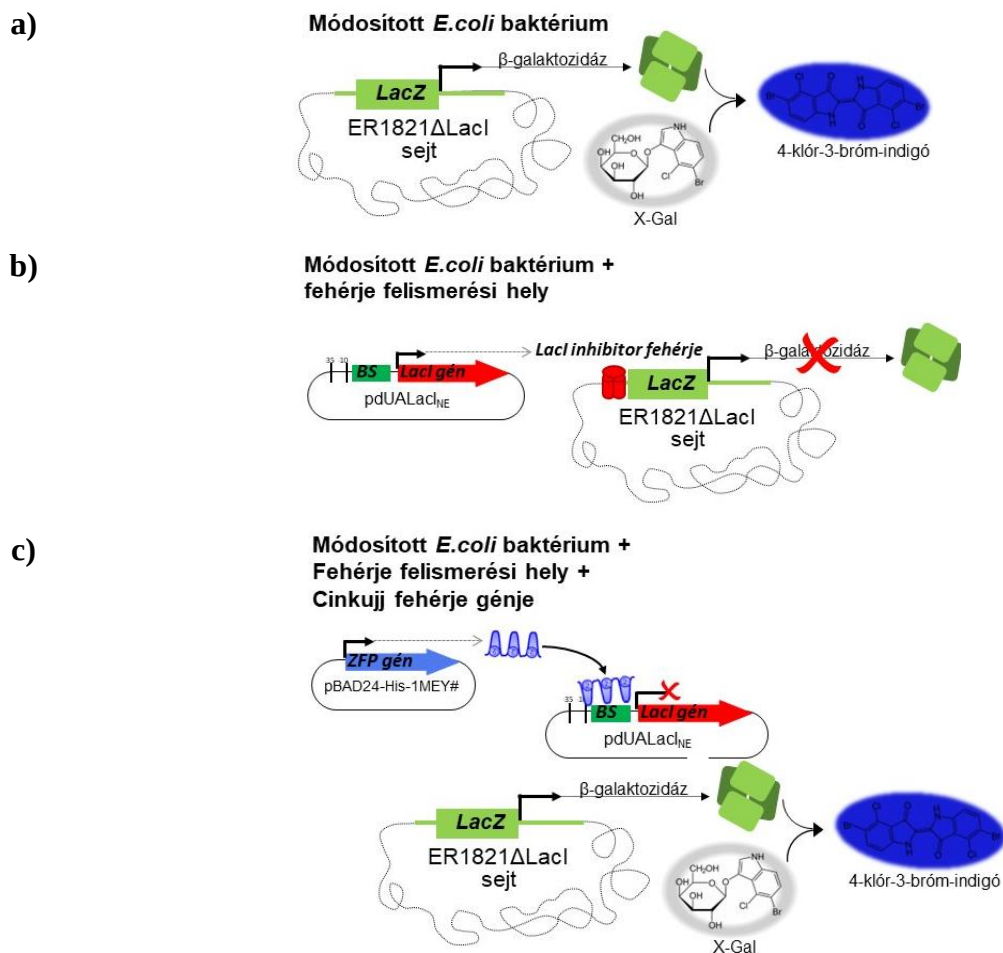
Azokban a kísérletekben, amelyekben DNS felismerő fehérjét alkalmaznak, elengedhetetlen, hogy megvizsgálják a DNS-fehérje kölcsönhatás erősségét, specifitását, illetve azt, hogy a kialakult kölcsönhatás okoz-e valamilyen változást a két makromolekula szerkezetében. Ezek a vizsgálatok jellemzően *in-vitro* történnek és szükséges hozzájuk a fehérje előállítása, tisztítása, valamint az optimális reakciókörülmények meghatározása. Az I-Block rendszerben *in vivo* lehetséges vizsgálni DNS-fehérje kölcsönhatást, anélkül, hogy a fehérje tisztítására szükség lenne.

Az I-Block tesztrendszerben, a sejteken belül megállapítható, hogy DNS szekvencia-specifikus kötés jött-e létre a DNS és fehérje között, a sejtben termelődött β -galaktozidáz mennyiségének meghatározása révén. Ahhoz, hogy tanulmányozni tudjuk a szekvencia-specifikus kötést, olyan módosított *E. coli* baktériumokra van szükségünk, amelyek nem tartalmazzák a *lac represszor* gént. Ez a baktérium a működéséhez szükséges energiát, elsődlegesen a glükóz lebontásából nyeri. Viszont, ha ez az elsődleges energiaforrása nem áll rendelkezésre, vagy kevés van belőle, akkor képes a környezeti feltételekhez alkalmazkodni és önmagának tápanyagot szintetizálni, amely folyamatokat az adott körülményeknek megfelelően tud szabályozni. Abban az esetben, ha kevés glükóz áll rendelkezésre akkor képesek a laktózt elhidrolizálni galaktózzá és glükózzá. A *lac operon*

egy olyan közös szabályozó rendszer a sejtben, amely három olyan fehérjét kódol, amelyek a laktóz lebontását szabályozzák. A β -galaktozidáz a laktóz lebontásáért felelős, a diszacharidra egy transzferáz enzim, az úgynevezett transzacetiláz egy acetilacsoportot kapcsol, míg a laktóz transzportjáért a permeáz enzim felelős. Ezen fehérjék hiányában, vagy bármely fehérje kifejeződésének hiányában a baktérium nem képes a laktóz feldolgozására. Az előbb említett fehérjék termelődésének első lépése a transzkripció, amely során a fehérjéket kódoló DNS szakaszból RNS íródik át. A folyamatért az RNS polimeráz felelős, ami az úgynevezett promóter régióban kezdi meg az átírást. A sejt normál működésekor glükózfelesleg esetén az *operátor* régióba bekötődő *represszor* fehérje gátolja a β -galaktozidáz termelődését, azonban, ha ez hiányzik egy baktériumból, vagy a *represszor* génhez laktóz kötődik, akkor a fehérje átíródás megkezdődhet, hiszen a diszacharid *represszor*hoz való kötődése megakadályozza, hogy az *operátor* régióhoz kötődjön, így a β -galaktozidáz is termelődni fog. [44]

Az I-Block rendszer a sejt anyagcserefolyamatainak ezen szabályozó mechanizmusát használja fel, a sejten belüli kölcsönhatások detektálására. Ehhez szükség van egy olyan *E. coli* baktériumra, amely genomiális DNS-éből hiányzik a *LacI represszor*, így folyamatosan termeli a β -galaktozidázt. Ebbe két körkörös bakteriális DNS hordozót juttathatunk be. Az egyik vektor olyan *NheI* hasítási hellyel kell rendelkezzen, amely a *LacI promóter* régióban (ahová az RNS polimeráz köt) lett kialakítva és hordozza a *LacI* gént, így visszaállítjuk a természetes sejtműködést egy mesterséges DNS hordozó segítségével. Emellett tartalmaznia kell a fehérje felismerési szekvenciát, amelyet az *NheI* restrikciós endonukleáz segítségével tudunk beépíteni. A másik plazmid pedig annak a fehérjének a génjét tartalmazza, amelynek felismerési szekvenciáját a másik DNS hordozóba építettük be. Tehát, az első DNS hordozó sejtbe juttatása, a *lac represszor* képződését fogja előidézni, amely a *lac operon* fehérjéinek termelődését, így a β -galaktozidáz termelődését is akadályozni fogja. Azonban, a második plazmid által hordozott fehérje, sejtbe történő bejuttatásakor, kifejeződésekor és a célszekvenciájához kötődésekor a β -galaktozidáz mennyisége növekedni fog, a *LacI* fehérje termelés rovására. Az X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozidáz) vegyülettel a *lac operon* működése kimutatható, mivel amennyiben az *operon* aktívan működik, a rendszerben β -galaktozidáz fog termelődni, amely az előbb említett molekulában egy β -glikozidos kötést fog elhasítani. Ezáltal galaktózzá és oldhatatlan kék pigmentekké (4-klór-3-bróm-indigo) fog elbomlani, ami hatására a képződött sejtelepek kéknek, ellenben azokkal a telepekkel, amelyekben nem történik szekvencia-specifikus fehérje-DNS kötés, hiszen nem fog termelődni az a fehérje, amely az X-gal glikozidos kötését elhasítását

idézne elő. Az I-Block rendszert megvizsgálták 18 bp-t felismerő cinkujj fehérjékkel, illetve CRISPR-dCas9 DNS felismerő fehérjékkel, melyek esetében sikeresen működött a kidolgozott rendszer. [45]



4. ábra: Az I-Block rendszer működése. A módosított baktérium a represszor hiányában β -galaktozidázt termel, ami az X-galt elbontja. **(a)** A pdUA-LacI_N plazmid *LacI* represszor fehérje génjét hordozza. Amikor ezt a plazmidot bejuttatjuk egy olyan baktériumsejtbe, aminek a *lac* promóter régiója aktivált, megakadályozzuk abban a β -galaktozidáz termelődését, így nincs vegyület, ami a festéket kék pigmentekre bontaná. **(b)** Azonban, ha a pdUA-LacI_N plazmidba beépítjük egy DNS szakaszt felismerő fehérje célszekvenciáját és egy másik plazmiddal e fehérje génjét is bejuttatjuk a baktériumsejtbe, akkor a DNS-kötő fehérje termelődése megakadályozza a *LacI* represszor fehérje képződését. Ezáltal viszont β -galaktozidáz fog termelődni a sejtekben, a *LacI* represszor fehérje hiányában, ez kék sejteket fog eredményezni. **(c)**

Az I-Block tesztrendszert azonban nem csak Petri-csészére kikent sejtekkel, hanem sejtszuszpenziókban is végre lehet hajtani. Ekkor X-Gal helyett az o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (ONPG) vegyület használható, amelynek hidrolízise során vízzeloldható sárga színű o-nitrofenol képződik, ennek megjelenését pedig spektrofotometriásan lehet követni. [45]

3 Célkitűzés

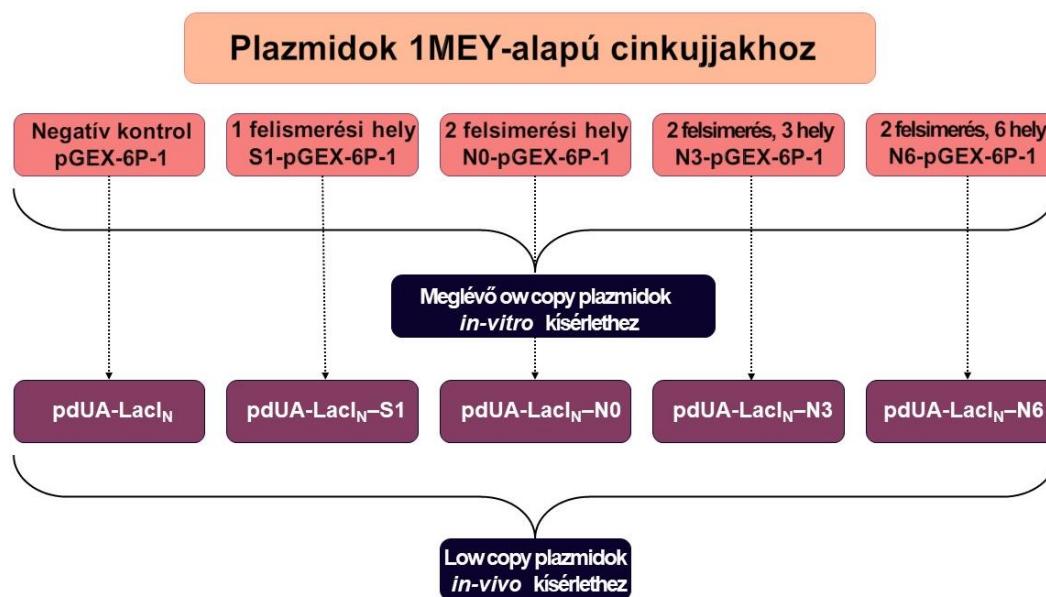
Kutatócsoportunkban az elmúlt években már számos *in-vitro* fehérje-DNS kölcsönhatás vizsgálatot folytattak 1MEY-alapú cinkujj-fehérjékkel, melyek mind egy mesterséges DNS-szakaszt ismertek fel: 5' –GAGGCAGAA–3'.

Tudományos diákköri dolgozatomban célul tűztem ki, hogy:

- (1) Kialakítsak olyan DNS molekulákat, amelyek tartalmazzák az előbb említett 1MEY# cinkujj fehérje DNS felismerési helyét és kompatibilisek az I-Block rendszerrel.
- (2) A megtervezett DNS hordozókat sejteken belül vizsgáljam az I-Block-alapú tesztrendszerben, csoportunk korábban tervezett 1MEY#-alapú cinkujj fehérjével, hogy valóban detektálhatóak-e a DNS-cinkujj fehérje kölcsönhatások.

Ezáltal a rákos sejtek elpusztítására tervezett mesterséges cinkujj nukleázok DNS-kötését és funkcióját, a fehérjék körülményes, időigényes tisztítása nélkül is tanulmányozhatjuk a jövőben.

Emellett további célom volt, hogy megvizsgáljam, az I-Block tesztrendszer alkalmas lehet-e cinkujj fehérjék és toxikus fémionok kölcsönhatásainak tanulmányozására.



5. ábra: Megtervezendő plazmid DNS-ek 1MEY-alapú cinkujj fehérjékhez.

4 Kísérleti anyagok és módszerek

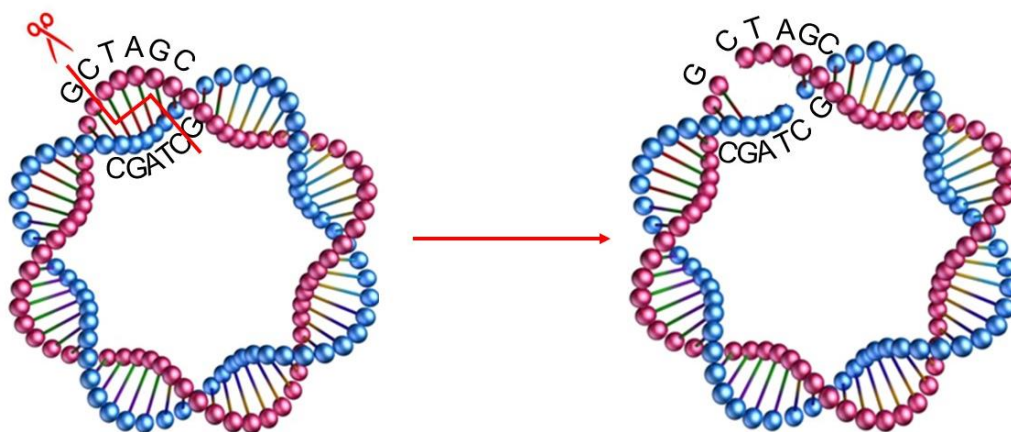
4.1 Rekombináns DNS technológia

Rekombináns DNS technológia alatt olyan folyamatok összességét értjük, melyek segítségével különböző DNS szakaszokat építhetünk össze, majd ezt bejuttatva egy élőlénybe, új genetikai információt hozunk létre [46].

4.1.1 DNS hasítás

Az összeépítendő DNS szakaszok a legtöbb esetben, egy másik génszakaszban már megtalálhatók, így nulladik lépésként ki kell vágni őket eredeti helyükről. Ezt restrikciós endonukleázok alkalmazásával érhetjük el, amelyek specifikusan képesek adott DNS szakaszok hasítására. Minden enzim egy meghatározott szekvenciát ismer fel és két meghatározott nukleotid között hidrolizálja el a foszfodiészter kötések. Amennyiben a hasítás egymással szemben történik meg, mindkét szálon topma végeket „blunt end” kapunk, míg átlós hasítás esetén, mindkét DNS szálon hátramarad néhány bázisnyi túlnyúlás, amit ragadós végeknek „sticky end” neveznek (6. ábra). Kísérleteink során alkalmazott Thermo ScientificTM BamHI, NheI, NcoI, EcoRI és HindIII enzimek mind ragadós végeket hagynak maguk után.

NheI restrikciós endonukleáz



6. ábra: NheI restrikciós endonukleázzal történő hasítás sematikus ábrája.

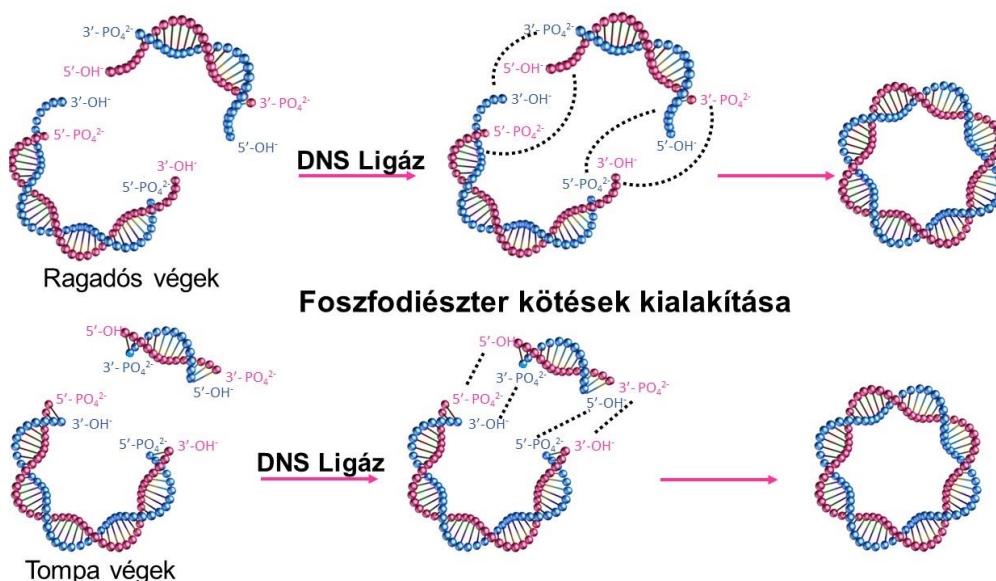
Kísérleteink során átlagosan 200-500 ng DNS-t hasítottunk, 5 Unit² enzim jelenlétében 20 µl végtérfogóban. Az ily módon összeállított elegyeket 37 °C-on inkubáltuk

² Restrikciós endonukleázok esetén 1 Unit jelenti azt az enzim mennyiséget, amely képes 1 µg DNS templatot 1 óra alatt 37 °C-on 50 µl reakciótérfogóban 100%-ban elhasítani.

2-3 órán keresztül. Az *NheI*, *NcoI*, *EcoRI* enzimeket 65 °C-os, 20 perces inkubációval, míg a *HindIII* és *BamHI* endonukleázokat 80 °C-os, 20 perces inkubációval inaktívtuk.

4.1.2 DNS ligálás

Az elhasított DNS molekulákat ezt követően ligáz enzim segítségével lehet „összeragasztani”. Fontos megjegyezni, hogy tompa végek esetében bármilyen két DNS molekula összeilleszthető, azonban ragadós végek esetében csak olyanok, amelyek túlnyúlásai egymás komplementerei (7. ábra).



7. ábra: Plazmidba történő ligálás ragadós és tompa végű DNS szálak esetén.

Munkánk során Thermo Scientific™ T4 DNA Ligase enzimet használtunk. A QuikChange reakciók tompa végű "blunt-end" ligálása 50 µl ligálási elegyekben, 0,07 Unit/µl³ enzim segítségével, 1 órán keresztül 37 °C-on történt. A ligáz inaktiválása 65 °C-on 10 percig zajlik. Egyéb ligálásaink esetén ragadós végű DNS fragmenseket kellett összeilleszteni, ezek optimalizálását az eredmények közt mutatjuk be.

4.1.3 DNS defoszforilálás

Az előző alfejezetben tárgyalt ligálás a valóságban egy sokkal bonyolultabb, ugyanis amennyiben két DNS szakaszt szeretnénk összeilleszteni, fennáll a kockázata annak, hogy a DNS szakaszok saját magukkal kapcsolódnak össze a másik DNS molekula helyett. Ez a jelenség valószínűesszámítási okokra vezethető vissza: ahhoz, hogy egy DNS szál önmagával ligálódjon össze, egy sikeres ligálási reakcióra van csak szükség, míg két DNS

³ 1 Unit/µl koncentráció: 1 µl oldatban található ligáz mennyiség, amely 1 nmol ³²P-jelölt pirofoszfátot ATP-vé alakít 20 perc alatt 37 °C-on 66 mM Tris-HCl pH 7,6 6,6 mM MgCl₂ 10 mM DTT 66 µM ATP pufferben.

szakaszból körkörös DNS csak két sikeres ligálás esetén jöhet létre. Ez a probléma kiküszöbölhető, ha eltávolítjuk az egyik DNS szál végeiről foszfátcsoportjait, mivel a T4 ligáznak legalább egy foszforilált DNS szálra szüksége van, hogy katalizálja a reakciót.

Ehhez a Thermo ScientificTM FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase enzimet alkalmaztuk 1 Unit⁴ mennyiségben. A DNS defoszforilálásához 10 percig, 37 °C-on kell inkubálni az elegyet, míg az inaktiváláshoz 75 °C-on, 5 percig.

4.1.4 DNS foszforilálás

Szilárdfázisú oligonukleotidszintézis segítségével előállított DNS-ek esetén a módszerből adódóan a nukleinsavszálak 5'– végein nem találhatók foszfátcsoportok. Klasszikus ligálási reakciók esetén ez előnyös, (az előző alfejezetben leírtak miatt) ám amennyiben a ligálandó DNS molekulának egyik végén sincs foszfátcsoport az ilyen típusú DNS-t kináz enzimmal kell kezelni. A reakció során az enzim ATP-ről viszi át a foszfát csoportokat a DNS 5'– végére. Kísérleteink során 10 Unit⁵ Thermo ScientificTM T4 Polynucleotide Kinase enzimet alkalmaztunk 1 μ M ATP, illetve a megfelelő puffer jelenlétében, 45 μ g lineáris DNS foszforilálásához. Az elegyeket 20 percig 37°C-on inkubáltuk, majd az enzim inaktiválását 75 °C-on 10 percig végeztük.

4.1.5 Kompetens sejt készítés

A kísérleteink során a plazmidok baktériumsejtekbe juttatása érdekében az átjárható sejtfallal rendelkező kompetens sejteket a következő módon készítettük: először antibiotikummentes LB-agar táptalajon szaporítottuk el a sejteket egy éjszakán át 37 °C-on inkubálva, majd egy sejttelepet 5 ml antibiotikummentes LB tápoldatban szaporítottunk 37 °C-on 150-200 rpm-en rázatva, amíg a sejtkultúra zavarossága el nem érte az ~1 OD értéket. A sejteket átoltottuk 50 ml antibiotikummentes LB tápoldatba, majd azonos körülmények közt 3 órán át inkubáltuk szintén ~1 OD értékig. Ezt követően az oldatot átjuttattuk falkon csőbe és jégen hűtöttük 10 percig, majd 10 percig 4000 g-n centrifugáltuk és a felülúszót dekantáltuk. Ezután 25 ml jéghideg 0,1 M CaCl₂ oldatban szuszpendáltuk a sejteket és 1 órán át jégen tartottuk, hogy fellazuljon a sejtfal. Ezt újabb ülepités és dekantálás követte az előbb említett körülmények közt, végül a sejteket 4 ml 0,1 M CaCl₂

⁴ Alkalikus foszfatáz esetén 1 Unit jelenti azt az enzim mennyiséget, amely képes 1 μ g DNS 5'– végeiről 10 perc alatt 37 °C-on 100%-ban eltávolítani a foszfát csoportokat.

⁵ T4 Polinukleotid Kináz esetén 1 Unit jelenti azt az enzim mennyiséget, amely képes 1 nmol DNS-t foszforilálni 30 perc alatt 37 °C-on.

15% (V/V) glicerint tartalmazó oldatába szuszpendáltuk, majd eppendorf csövekbe szétosztva a kompetens sejteket felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

4.1.6 Transzformálás

A ligálási reakciót követően egy olyan vegyes elegyünk van, amely optimális esetben legalább egy, általunk tervezni kívánt DNS molekulát tartalmaz. Ahhoz, hogy ezt kiválasszuk és megsokszorozzuk a legegyszerűbb módszer, ha baktériumokba juttatjuk, majd ezeket szaporítjuk el. Ez a transzformálás, amely során az előző fejezetben részletezett kompetens sejtekbe bejuttatjuk a plazmidokat.

Kísérleteink során $50\text{ }\mu\text{l}$ DH5 α és ER1821 Δ LacI kompetens sejtet használtunk, a DNS-ből pedig $\sim 100\text{ ng}$ -ot. A szuszpenziót előbb jégen hűtöttük 1 órán át, majd hirtelen $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra melegítettük 1-2 percig és ezután hirtelen jégre helyezve a kompetens sejt pórusait lezártuk, ezzel biztosítva, hogy a plazmid DNS a baktériumsejtekben maradjon. Ezt követően 60 percig $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on rázattuk a mintákat, $50\text{--}100\text{ }\mu\text{l}$ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os antibiotikummentes LB tápoldatot hozzáadva az elegyhez. Végül $50\text{--}150\text{ }\mu\text{l}$ szuszpenziót LB-agar Petri-csészére szélesztettünk, ami már antibiotikumot is tartalmazott, a sokszorosítani kívánt DNS szakasz pedig egy antibiotikum rezisztenciáért felelős génszakaszt kódolt. Ennek köszönhetően minden olyan baktériumsejt elpusztul, amely nem tartalmazza a számunkra fontos plazmid DNS-t. Az LB-agar táptalaj az eltérő plazmidok esetében vagy $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ ampicillint, vagy $50\text{ ng}/\mu\text{l}$ kanamicint tartalmazott, de esetenként mindkét antibiotikumom hasonló koncentrációban jelen volt a táptalajon. Az egyszeresen transzformált, azaz egy vektort tartalmazó baktériumokat csak egy antibiotikumot tartalmazó, míg a dupla transzformálások termékeit ampicillin és kanamicin tartalmú Petri-csészékre vittük fel. A szélesztést követően a baktériumokat tartalmazó Petri-csészéket $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, fejjel lefelé, egy éjszakán át inkubáltuk.

4.2 Plazmid szaporítás, tisztítási módszerek

Az (4.1.6) leírtak alapján a transzformálás után a Petri-csészéről kiválasztottunk egy olyan baktériumtelepet, amely jól elkülönült a többitől és átoltottuk 5 ml antibiotikum tartalmú LB tápoldatba. Ezt $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, $150\text{--}200\text{ rpm}$ -en rázatva inkubáltuk, amíg a sejt kultúra zavarossága el nem érte az $\sim 1\text{--}2\text{ OD}$ értéket (A tapasztalataink alapján a minta genomiális DNS szennyezése alacsonyabb volt, amennyiben csak 1-es OD-ig szaporítottuk a kultúrát).

Ezen a ponton célszerű „glycerol stockot” készíteni a mintákból, ami megkönnyíti a későbbi újbóli szaporítást, mivel nem szükséges ismételt transzformálni, közvetlenül

kikénthető a stock egy Petri-csészékre. Kísérleteink során 500 µl-baktériumszuszpenzióból 20 v/v% végkoncentrációjú glicerolos szuszpenziót készítettünk, majd tároltuk –75°C-on.

Amennyiben nagymennyiségű plazmid DNS kinyerése volt a célunk „large scale”, ezen a ponton a glycerol stock készítés után megmaradt ~4,5 ml baktériumkultúrából 100-100 µl-t átoltottuk n×250 ml antibiotikum tartalmú LB tápoldatba, majd 180-200 rpm-en 37 °C-on inkubáltuk átlagosan 8 órán keresztül, amíg elértük az ~1 OD értéket. Kis mennyiségű DNS előállítása esetén „small scale” ez az újabb átoltási lépés kimaradt és a ~4,5 ml baktériumkultúrát közvetlenül feldolgoztuk.

A szaporítás során általában 1 liter baktériumokat tartalmazó tápoldatból 3-5 g sejt nyerhető ki, aminek kevesebb, mint 3%-a a felhasználni kívánt plazmid. Először a sejteket leüleptítjük centrifugálással („small scale” 12000 g, 2 perc vagy „large scale” 4000 g, 15 perc 4 °C), majd a felülúszót dekantáljuk. Ezt követi a sejtek RNáz A tartalmú oldattal való reszuszpendálása, ami elbontja a baktérium RNS molekuláit, majd a lízis folyamata következik, ami felbontja a sejtfalat. Ehhez alkalikus lízis esetén 0,1 M NaOH és 1% SDS⁶ (nátrium-dodecil-szulfát) tartalmú oldatokat használunk. Azonban lúgos közegben a DNS két szála elválik egymástól, így szükség van arra, hogy a semleges pH-t visszaállítsuk, amin a DNS két szála újra össze fog tudni hibridizálódni, ezt kálium-acetát oldattal tudjuk elérni. Eközben, viszont a genomiális DNS két szála nem tud összehibridizálni és kicsapódik az oldatból, illetve az SDS is kicsapódik és felületén fehérjéket és egyéb sejtalkotókat köt meg. Ezekről centrifugálással lehet megszabadítani („small scale” 12000 g, 2 perc vagy „large scale” 20000 g, 30 perc 4 °C). A plazmid tartalmú felülúszót ezt követően egy anioncserélő oszlopra visszük fel, amin a plazmid DNS enyhén savas közegben megkötődik, a többi még jelenlévő szennyező pedig nem. Ezeket etanol és izopropanol tartalmú oldatokkal tudjuk lemosni az oszlopról. Végül pedig a tiszta plazmid DNS-t eluáljuk le az oszlopról, amit steril desztillált vízzel, vagy 1×TE pufferrel szoktunk elvégezni.

A kísérleteink során a kis mennyiségben (5 ml tápoldatban) szaporított sejtek tisztításához a ZR Plasmid MiniprepTM-Classic készletet használtuk, míg az 1 L sejteket tartalmazó tápoldatot a Thermo ScientificTM GeneJet Plasmid Maxiprep Kit-tel, illetve a GeneaidTM Maxi Plasmid DNA Kit-tel tisztítottuk meg.

⁶ 1 g SDS 100 ml oldatban

4.3 Gélelektroforézis

A gélelektroforézis egy széles körben alkalmazott módszer, amely során fehérjéket vagy DNS molekulákat molekulatömegük (méretük) alapján választunk el egymástól elektromos térben. Az eltérő molekuláknak eltérő tömegük, alakjuk és töltésük van, ami miatt eltérő a vándorlásuk sebessége is elektromos térben. A nagy negatív vagy pozitív töltéssel rendelkező, kis méretű és minél inkább cirkuláris/gömb alakú molekulák vándorlása a leggyorsabb a gélben. A gél koncentrációjának növelésével lecsökken a pórusméret, ezáltal a kisebb molekulatömegű minták elválasztása hatékonyabbá tehető, de az effektív elválasztást befolyásolja az alkalmazott feszültség nagysága is. Általában a plazmid DNS keverékek elválasztásához agaróz gélelektroforézist használunk, míg a 100 bp-nál kisebb minták esetén poliakrilamid gél. Mivel a DNS a foszfodiészter csoportjain negatív töltéseket hordoz, ezért az anód felé fog vándorolni. A plazmid DNS-ek három formáját különböztetjük meg: a szuperhelikális, cirkuláris és a lineáris formát. A szuperhelikális DNS egy kompakt módon feltekeredett cirkuláris DNS. Ennek a formának az egyszálú hasítása a cirkuláris, míg a kétszálú hasítása a lineáris DNS-t eredményezi. A gél pórusain leggyorsabban a szuperhelikális forma, leglassabban pedig a cirkuláris forma tud átjutni. Ahhoz, hogy a DNS-t ki tudjuk mutatni, a gélbe etídium-bromidot juttatunk, ami a DNS nukleotidjai közé ékelődik be (interkaláció) és ezáltal UV fény hatására fluoreszkál.

Kutatásom során plazmid DNS-ek vizsgálatára 1%-os⁷, 150 bp-os PCR termékek vizsgálatára 2%-os agaróz gél, ~20 bp-os oligoduplexek vizsgálatára 15%-os⁸ poliakrilamid gél használtam, a gélre 20-150 ng DNS keveréket vittem fel, 5-20 µl mintatérfogatban. Összehasonlító mintaként, GeneRuler 1kb Plus-t, GeneRuler 100 bp-t és GeneRuler Ultra Low Range markereket használtunk, melyek ismert méretű DNS molekulák keverékei. A mintafelvétel megkönnyítése érdekében a DNS elegyeket glicerol tartalmú 6×LD-vel (Loading Dye) kevertük össze 5:1 arányban. Az LD glicerol mellett brómfenol kéket és xilén cianolt is tartalmaz, ezek segítséget nyújtanak a mintafeltöltés során és jelzik a futtatás előrehaladását. Az elektroforézist agaróz gél esetében 100 V-on 40-60 percig végeztük, horizontális elhelyezkedésű Cleaver Scientific futtatókádban 20 cm elektródtávolsággal, míg poliakrilamid gél esetén 1 órán keresztül 100 V-on Bio-Rad Mini Protean II cellában 30 perces előfuttatással. A poliakrilamid géleket futtatás után 15 percre 100 ng/µl EtBr oldatba áztattuk. A DNS sávokat UV átvilágító segítségével vizualizáltuk.

⁷ 1 g agaróz 100 ml 40 mM TRIS, 20 mM jécecet, 1 mM EDTA 100 ng/µl EtBr oldatban

⁸ 14,5 g akrilamid 0,5 g bisz akrilamid 100 ml 89 mM Tris, 89 mM bórsav, 2 mM EDTA oldatban

4.4 UV-VIS spektrofotometria

A DNS mennyiségének meghatározására az egyik bevett módszer az abszorbanciájának mérése, mivel ismert, hogy 50 ng/μl koncentrációjú DNS elnyelése 1 cm-es fényúton, 260 nm-en, 1. A DNS tisztaságának meghatározására előszeretettel alkalmazzák a 260 és 280 nm-en mért abszorbanciák hányadosát. Egy maximális tisztaságú DNS minta ezen értéke 1,8 és 2 közt mozog. 1,8-as érték alatt fehérjeszennyezésre lehet gyanakodni, mivel a fehérjéknek 280 nm-en található egy lokális elnyelési maximumuk. 2-nél magasabb érték RNS szennyezésre utal.

Rutinméréseink során a Thermo Scientific™ NanoDrop™ Lite Spectrophotometer készülékkel dolgoztunk, amelyre elegendő 1,5-2 μl mintát felvinni a pontos méréshez.

4.4.1 Palte reader

Az oldatfázisban végrehajtott I-Block kísérleteket plate reader segítségével tanulmányoztuk. Kutatásom során a BMG LABTECH CLARIOstar™ PLUS készüléket használtam abszorpciós üzemmódban.

A készülékben a fény vertikálisan halad át a mintán a klasszikus UV-Vis spektrofotométerben megszokott horizontális módhoz képest. Ebből adódóan a fényút a mintatérfogathoz függvényében változik. A platereader nagy előnye, hogy a mintákat küvetta helyett 96-, vagy akár 384-lyukú mikroplatekben tudjuk vizsgálni. A mintafelvételt követően a mérés automatikus, így a módszer nagy áteresztőképességű. További előny, hogy akár 50-100 μl mintatérfogathoz is elegendő. A mérések során nagy teljesítményű xenon villanó lámpa működik, amely a folytonos halogén lámpákhoz képest nagyobb intenzitású. Ez a 220-1000 nm-es hullámhossz tartományt foglalja magába, a felbontás 1-16 nm között változtatható. Kutatásom során 350 μl térfogatú mintákat vizsgáltunk 420, 550 és 600 nm fix hullámhosszokon 10 nm-es ablakban.

4.5 DNS tisztítási módszerek

Egyes esetekben a plazmid tisztítás során kinyert DNS minták tartalmazhatnak még egyéb szennyezőket, amiket az alábbi módszerekkel tudtuk kinyerni ezekből a mintákból.

4.5.1 Fenol-kloroform extrakció

Az eljárást a fehérje szennyezések eltávolítására használjuk. A módszer során a fehérjéket az apoláris oldalláncuk végett a szerves fázisba, míg a nukleinsavakat a vizes fázisba tudjuk juttatni. Ezt általában etanolos kicsapás követi, mivel a hosszabb DNS és RNS molekulák nem képesek sokáig etanolos oldatban maradni.

1. táblázat A fenol-kloroform extrakció lépéseit összefoglaló táblázat

1. lépés	1:1 térfogat arányú fenol-kloroform hozzáadása a mintához
2. lépés	30 s vortex
3. lépés	centrifugálás 13500 g-n, 5 percig, 5 °C-on
4. lépés	felső fázis összegyűjtése
5. lépés	1:10 térfogat arányú 3 M-os NaOAc hozzáadása az oldathoz
6. lépés	30 s vortex
7. lépés	2,5:1 térfogat arányú 100 v/v%-os EtOH hozzáadása az oldathoz
8. lépés	30 s vortex
9. lépés	15 s folyékony nitrogénnel fagyasztás
10. lépés	centrifugálás 13500 g-n, 15 percig, 4 °C-on
11. lépés	felső fázis összegyűjtése
12. lépés	200 µL hideg 70 v/v% EtOH
13. lépés	30 s vortex
14. lépés	centrifugálás 13500 g-n, 5 percig, 4 °C-on
15. lépés	felső fázis eltávolítása
16. lépés	vákuumszáritás
17. lépés	szilárd DNS-es visszaoldása steril desztillált vízbe

4.5.2 Gél extrakció

Az agaróz gélen megfuttatott, méret szerint elvált DNS fragmentumokat lehetséges visszanyerni gélből történő kivágással, miközben a nem kívánt komponensektől garantáltan megszabadulhatunk. A megfelelő sávot tartalmazó géldarabot, olyan oldatban oldjuk fel, amiben az agaróz feloldódik, ehhez általában 50-55 °C-os inkubálást is alkalmazunk, a felhasznált készlettől függően. Ezt követően az oldatot és a benne feloldódott gélt egy anioncserélő oszlopra visszük fel, amin a DNS megkötődik, a többi szennyezőt pedig etanolos oldattal mossuk le az oszlopról, majd a DNS-t steril desztillált vízben vagy 1×TE oldatot tartalmazó elegybe oldjuk vissza. A kísérleteink során a Thermo Scientific™ GeneJET Gel Extraction Kit-et illetve a FastGene™ Gel/PCR Kit-et használtuk.

4.6 β-galaktoziáz aktivitásának meghatározása

Az I-Block rendszerben használt cirkuláris DNS hordozóink felhasználhatóságáról nem csak szekvenálással és magával a tesztrendszer elvégzésével kapott sejtek színeiből bizonyosodtunk meg, de a mintáink arabinózzal, glükózzal illetve mérgező fémionokkal történő indukálását követően a β-galaktozidáz enzim aktivitását is megvizsgáltuk. Ehhez a 4.4 és 4.4.1 fejezetben bemutatott műszereket használtuk fel. A kísérleteinket az úgynevezett Miller-protokoll szerint hajtottuk végre (2. táblázat).

2. táblázat: Miller protokoll, a β -galaktozidáz aktivitásának meghatározásához.

1. lépés	sejtek felnevesztése a mikroplaten antibiotikum tartalmú LB oldatban
2. lépés	sejtek indukálása 0,1%-os arabinózzal, vagy glükózzal
3. lépés	a sejtek további növesztése 30 °C-on 8 órán át
4. lépés	a sejtek OD ₆₀₀ értékének feljegyzése
5. lépés	5 μ l sejt új mikroplatere történő átvitele
6. lépés	az 5 μ l sejt kultúrához 45 μ l permeabilizáló oldat hozzáadása
7. lépés	a minták inkubálása 30 °C-on, 20-30 percig
8. lépés	300 μ l szubsztrát oldat hozzáadása az elegyhez
9. lépés	OD rögzítése 420 és 550 nm-en, 1 órán át, 10 perces intervallumokban.
10. lépés	Miller indexek kiszámítása a következő módon: $1000 \times (A_{420} - 1,75 \times A_{550}) / (A_{600} \times V_{(minta)} \times t_{(reakció)})$

A táblázatban említett permeabilizáló és szubsztrát oldat az alábbi módon készítettem el.

3. táblázat: Permeabilizáló és szubsztrát oldatok elkészítéséhez szükséges anyagok, és azok mennyisége.

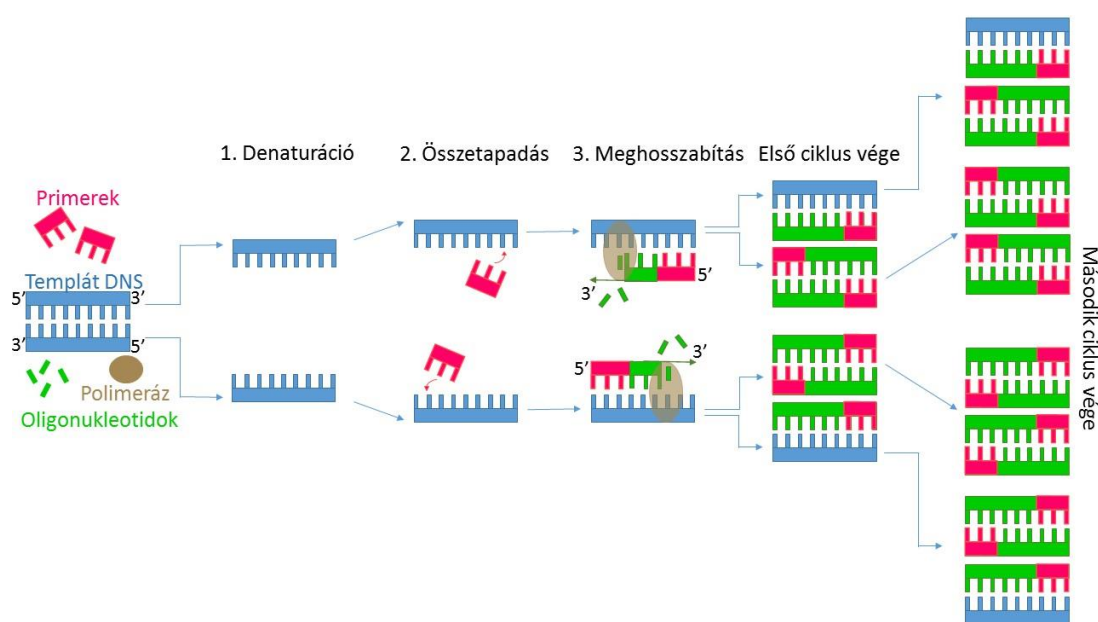
Permeabilizáló oldat		Szubsztrát oldat	
Na ₂ HPO ₄	100 mM	ONPG	1 mg/ml
KCl	20 mM	Na ₂ HPO ₄	60 mM
MgSO ₄	2 mM	NaH ₂ PO ₄	40 mM
CTAB	0,8 mg/ml	β -mertkaptoetanol	2,7 μ l/ml
dezoxiklórsav	0,4 mg/ml		
β -mertkaptoetanol	5,4 μ l/ml		

4.7 Polimeráz láncreakció

A PCR (polimeráz láncreakció) lehetővé teszi, hogy bármilyen eredetű DNS molekula kiválasztott szakaszát sokszorosítsuk. A módszer olyan természetes replikációt végző polimerázok alkalmazását követeli, amelyek hőtűrőek. Ez azért fontos, mert a PCR egyes lépéseiben akár akár 98 °C-ot, illetve 30-40 °C különbséget is el kell viselnie az enzimnek denaturálódás nélkül. Ilyen enzim a Taq polimeráz, melyet hőtűrő baktériumokból izoláltak. A reakció alkalmazásának másik feltétele, hogy a sokszorosítani kívánt DNS szakasz mindkét végén 15–25 nukleotid sorrendjét ismerjük, mivel a sokszorosításhoz olyan oligonukleotid primerek szükségesek, amelyek az elváló két szál 5'–végével azonosak, ezáltal indító szekvenciaként funkcionálnak a másik szál 3'– végéhez tapadva. Ezen felül szükség van dezoxi-nukleozid-trifoszfátokra, amelyek az új DNS építőelemeiként szolgálnak, illetve Mg²⁺-ion tartalmú pufferre, amely a megfelelő kémiai környezetet biztosítja a polimeráz számára.

A folyamat a PCR készülékben zajlik, amellyel a ciklusszerűen ismétlődő lépésekhez szükséges hőmérsékletek gyorsan és szabályozottan beállíthatók. A reakció egy ciklusa

három lépésből áll. Első lépésként 94-98 °C-ra hevíti a készülék a reakcióelegyet, ahol a sokszorosítandó (templát) DNS két szálának szétválása történik meg, a nukleotidok között lévő hidrogénkötések felszakadásával. A következő lépés hőmérsékletét a primerek olvadáspontja szabja meg, ettől ± 2 °C-kal térhetünk el. Ezen a hőmérsékleten fognak az oligonukleotidok hozzákapcsolódni az egyszálú DNS-ekhez. A harmadik lépésben történik a primerek által kijelölt szakaszon a hosszabbítás 5'→3' irányba, a hőmérséklet az alkalmazott polimeráztól függően 64-72 °C lehet. A primerek által kijelölt sokszorosított DNS molekulák száma exponenciálisan nő a ciklusok számával, viszont a nem megfelelő hosszúságú szakaszok száma csak lineárisan növekszik. A három lépést harmincszor ismételve ez utóbbiak aránya már nem számottevő.



8. ábra: PCR sematikus ábrája

Kísérleteink során a reakcióelegyek ~160 ng templát DNS-t, 0,2 mM dNTP-t, 0,5-0,5 μ M forward és reverz primert és 1 Unit⁹ Thermo Scientific™ DreamTaq DNA Polymerase enzimet tartalmaztak a megfelelő reakciópufferben, 50 μ l-es térfogatban. A reakciót 4. táblázat alapján hajtottuk végre.

⁹ DreamTaq polimeráz esetén 1 Unit jelenti azt az enzim mennyiséget, amely 10 nmol dNTP-t polinukleotidlánccá alakít 30 perc alatt 74 °C-on

4. táblázat: PCR reakció körülményei 150 bp-os fragmens sokszorozítása esetén.

Folyamat	T (°C)	t(sec)
Első denaturálás	95	120
Ciklikus denaturáció	95	30
Összetapadás	62,6	30
Hosszabbítás	72	30
Végső hosszabbítás	72	200

30×ism

A rövid DNS-ek hibridizációja során is PCR készüléket alkalmaztunk. Ekkor 98 °C-ra melegíti fel a készülék az elegyet, majd percenként 1 C-kal lehűti egészen 10 °C-ig. A reakcióelegyek 50 µl térfogatúak voltak, bennük 5-5 µM oligonukleotiddal.

A kísérletek során MJ Research PTC-150 PCR készüléket használtunk.

4.8 Olvadáspont becslése

A primerek tervezése során, figyelembe kellett venni azok olvadáspontját azért, hogy a két oligonukleotid a PCR során azonos hőmérsékleten tudjon összehibridizálni a templát DNS molekulák megfelelő szakaszával. Leggyakrabban két módszert alkalmaznak, az eltérő formulák használatát a primerek hossza fogja meghatározni. Abban az esetben, ha a tervezett szekvenciák hossza rövid, azaz 14 bázispárnál kevesebb, akkor az úgynevezett Marmur Doty formulát használjuk.

$$T_m = 2(A + T) + 4(C + G) - 7$$

1. egyenlet ahol: T_m = olvadási hőmérséklet; A = szekvenciában előforduló adenin nukleotidok száma; T = szekvenciában előforduló timin nukleotidok száma; G = szekvenciában előforduló guanin nukleotidok száma; C = szekvenciában előforduló citozin nukleotidok száma; -7 = oldatok esetén korrekciós faktor.

Amennyiben a tervezett oligonukleotidok hossza 15-120 bázispár, akkor a közeli szomszédok (nearest neighbors) módszert alkalmazzuk, ami az előző technikát tekintve pontosabb, mivel egy primer esetében nemcsak a nukleotid-összetételt veszi figyelembe, hanem a nukleotidok sorrendjét is. Ezen kívül számolnunk kell a termodinamikai tényezőkkel is, amelyek a primerek olvadáspontját befolyásolhatják, mint például az entrópia változás, amely az oligonukleotidok rendezetlenségét befolyásolja vagy az entalpia változás, amely az oligonukleotidok által kibocsátott vagy elnyelt hőt veszi figyelembe. A számoláshoz használt formula a következő:

$$T_m = \frac{\Delta H}{A + \Delta S + R \ln \left(\frac{c}{4} \right)} - 273,15 + 16,6 \log [Na^+]$$

2. egyenlet ahol: T_m = olvadási hőmérséklet; ΔH = entalpia változás; A = konstans, amelynek értéke 0,0108 kcal/Kmol; ΔS = entrópia változás; R = egyetemes gázállandó; c = oligonukleotid koncentráció mol/dm³ megadva; $[Na^+]$ = nátrium-ion koncentráció mol/dm³-ben megadva

Számolásainkhoz az *OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator* programot használtuk, amely ezen két egyenlet alapján számítja ki a szükséges adatokat [47].

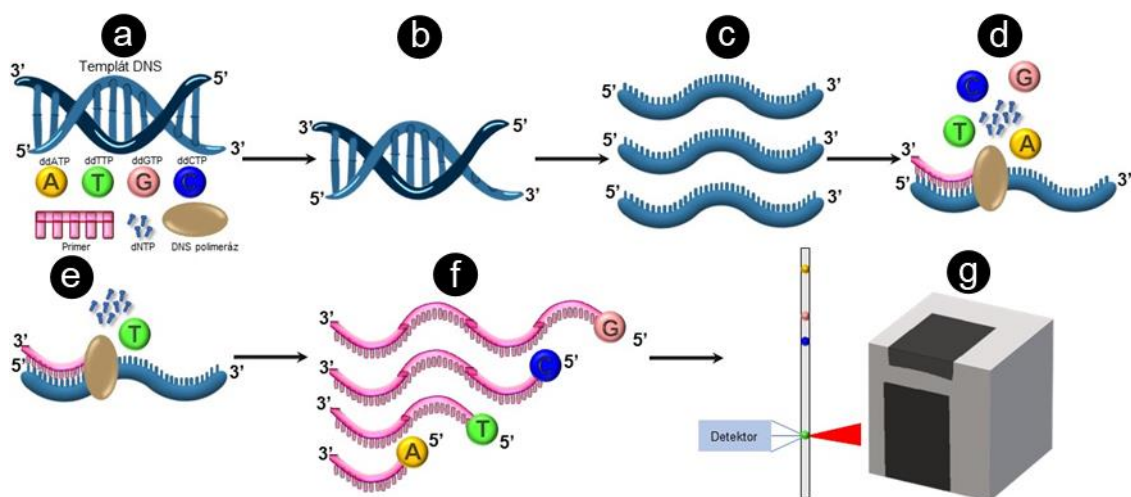
4.9 Szekvenálás

A DNS molekulák pontos szekvenciájának – azaz a nukleobázisok sorrendjének – birtokában megismerhetjük azok tulajdonságait, funkcióját. Amennyiben rekombináns DNS technológiák (4.1) segítségével módosítottunk egy DNS molekulát, elengedhetetlen a termékek szekvenciájának meghatározása, hogy eldönthessük sikeres volt-e a reakció.

Napjainkban a Sanger féle szekvenálást alkalmazzuk. Ennek első lépéseként a vizsgálni kívánt DNS-ből a meghatározni kívánt régiót fogják sokszorozítani *in vitro*. Ehhez, a polimeráz láncreakcióhoz hasonlóan szükség van DNS polimerázra, a négy féle dNTP-re, templát DNS-re, viszont csak egy primert tartalmazhat a reakcióelegy, azaz csak az egyik DNS szál kerül másolásra/sokszorozításra. Emellett az elegynek tartalmaznia kell didezoxi nukleotidokat, amelyekhez kovalens kötással olyan eltérő színű molekulákat, ún. fluorofórokat kapcsolnak, amelyek fénnel történő gerjesztés hatására önmaguk is fényforrássá válnak, azaz fényt fognak kibocsátani.

A fent említett komponenseket a reakció megkezdéséhez össze kell keverni, azonban a festékekkel jelölt didezoxi nukleotidokat jelentősen kisebb mennyiségben kell az oldathoz adni, mint a nem megjelölt dNTP-ket. Először a reakcióelegyet felmelegítik, hogy a DNS denaturálódjon és a két szál el tudjuk válni egymástól. (9. ábra c,) Ezt követően lehűtik az oldatot, hogy a primer hozzá tudjon kapcsolódni az egyszálú templáthoz, majd a hőmérsékletet újra felemelik, hogy a DNS polimeráz a primertől indulva az új szál szintézisét meg tudja kezdeni. (9. ábra d,) A folyamat eddig hasonlóan zajlik a polimeráz láncreakcióhoz, de ebben az esetben az enzim csak addig működik, amíg a szekvenciában egy didezoxi nukleotid épül be. Ekkor a reakció leáll, mivel ezek a fluorofórokkal megjelölt DNS fragmensek a 3' végükön nem tartalmaznak OH⁻ csoportot, ami miatt a következő nukleotid foszfát csoportja nem tud kapcsolódni. (9. ábra e,) Ez a folyamat egymás után több cikluson keresztül le fog játszódni, ezért mire befejeződik az egész reakció, csak nem biztosak lehetünk abban, hogy legalább egy ciklusban a DNS adott pozíciójába beépült egy didezoxi nukleotid. Azaz a reakciócső, különböző hosszúságú DNS fragmentumokat fog tartalmazni, amelyek legutolsó nukleotidja festékekkel lesz megjelölve. (9. ábra f,) Ezt az

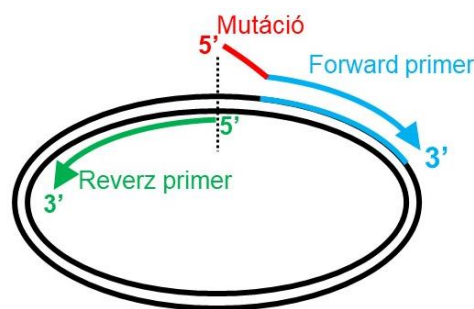
elegyet kapilláris elektroforézis segítségével méret szerint szétválasztják. (9. ábra g.) A folyamat működése a korábban már jellemzett gélelektroforézishez hasonló, a rövidebb DNS molekulák gyorsabban mozognak, az egyre nagyobb méretű és molekulatömegű részecskék pedig egyre később fogják elérni a detektort. A detektorban a didezoxi nukleotidokhoz kapcsolt fluorofórok gerjesztési hullámhosszán sugárzódik be a minta. Időben követve a négy fluorofór emissziós hullámhosszain mért intenzitásokat a kromatogrammból kirajzolódik a szekvenált DNS nukleobázis sorrendje.



9. ábra: Szekvenálási reakció mechanizmusa.

4.10 QuikChange™ eljárás

A QuikChange™ reakciót más néven helyspecifikus mutagenézisnek is nevezik, hiszen az eljárás során *in vitro* lehet előidézni pontmutációt, deléciót vagy inszerciót egy plazmid DNS-ben. A folyamat lejátszódásához olyan primereket tervezünk, amelyek esetében a forward primer az 5'– végén tartalmazza a mutációt, míg a reverz primert úgy tervezzük meg, hogy annak 5'– vége pont ott kezdődjön, ahol a másik szálon a forward primer 5'– vége (10. ábra).



10. ábra: Általunk alkalmazott QuikChange primertervezési koncepció. A zölddel és késsel jelölt primerrészletek szekvenciája megegyezik a plazmid 1-1 részletével, míg a forward primer pirossal jelölt szakasza nem.

Ebben az esetben a DNS eltérő régióihoz köt hozzá a két primer, viszont ekkor a mutációt nem tartalmazó DNS is keletkezik, de ez elhanyagolható mennyiségben, mivel ezeknek száma csak lineárisan, míg a mutációt tartalmazó szekvenciák száma exponenciálisan fog nőni. Fontos az is, hogy a primerek GC tartalma 40% körül mozogjon és a 3'– végükön minimum egy guanin vagy citozin legyen, az 5'–végeket pedig foszforilálni kell. A reakcióelegyet a mutációt tartalmazó primerekkel, a megfelelő pufferrel, polimerázzal és dezoxi-nukleozid-trifoszfátokkal összekeverik, majd a PCR készülékben játszódik le a DNS sokszorosítása és a megfelelő komponenseinek cseréje. A képződött plazmid DNS nem metilált és a szekvenciájában tartalmazza a mutációt. A többi metilált kiindulási plazmidot szelektíven eltávolítják, mivel ezekre a továbbiakban már nincs szükség.

A QuikChange reakciót is PCR készülékben végeztük el, a következő körülmények között. A mutációt az 5'-cctCGGCCTAGCATGCCATACCGC-3' és az 5'-cagaaGGAGGGCTAGCGCCCGGAA-3' oligonukleotidok segítségével hajtottuk végre, melyek végkoncentrációja 0,5-0,5 μM volt. Emellett a minta tartalmazott ~50 ng templát DNS-t, 0,2 mM dNTP-t, és 1 Unit Thermo Scientific Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase enzimet, 1×Phusion HF puffer mellett. A reakcióelegyek végtérfogata 50 μl volt.

5. táblázat: Quikchange reakció körülményei

Folyamat	T (°C)	t(sec)	} 30×ism
Első denaturálás	94	120	
Ciklikus denaturáció	98	15	
Összetapadás	65	30	
Hosszabbítás	72	30	
Végző hosszabbítás	72	200	

5 Eredmények

5.1 Primer tervezés 1MEY-alapú plazmidokhoz

Kísérleti munkám során első célom az volt, hogy olyan DNS-hordozókat készítsek, amelyek tartalmazzák a kutatócsoportunk által széleskörben alkalmazott 1MEY cinkujj fehérje felismerési helyét l: 5'–GAGGCAGAA–3' és kompatibilisek legyenek az I-Block rendszerben használt sejtekkel. A hordozó plazmid így csak a Kiss Antal kutatócsoportja által optimalizált kis kópiaszámú pdUA-LacI_N lehetett, amelyben NheI restrikciós hasítási helyre kell beépíteni a DNS célszekvenciákat. Ezekhez terveztük meg a szükséges oligonukleotidokat, amelyek NheI hasítási hellyel, továbbá 1MEY cinkujj fehérje felismerési hellyel rendelkeztek. A két szálon vagy csak egy felismerési hely van, vagy a két szálon az 1MEY felismerési helyei között 0 (N0), 4 (N3) vagy 7 (N6) bázisnyi távolsággal rendelkező primereket terveztünk, amelyekben az 1MEY felismerési helye: 5'–GAGGCAGAA–3', az NheI hasítási helye pedig: 5'–G▼CTAGC–3'. A tervezés ezen pontján felvetődött, hogy számos előnyünk származhatna a későbbiekben abból, ha a megtervezett rövid DNS szekvenciák tartalmaznának egy további restrikciós hasítási helyet is, a hordozóvektorba történő beépítéshez elengedhetetlen NheI-en kívül. Egyfelől így könnyen ellenőrizhetővé válna, hogy sikerült-e az adott rövid DNS-t beépíteni a hordozóvektorba, mivel csak abban az esetben lehetne elhasítani a hordozóvektort az adott restrikciós enzimmel, ha megtalálható lesz benne az enzim felismerési helye. Másfelől amennyiben a kutatócsoportunkban tervezett cinkujj nukleázokkal próbálnánk meg a DNS-eket elhasítani, lenne egy kontroll, ezáltal tudnánk azt, hogy hogyan kellene kinéznie a plazmidoknak, ha elhasadnak.

Az S1 DNS esetében az extra restrikciós hely beépítésére nem adódott lehetőség, azonban a két felismerési helyet is tartalmazó DNS-ekben a két hely közti linker régió nukleotidjainak változtatásával igen.

Alaposabban megvizsgálva a DNS szekvenciákat megállapítottuk, hogy az N0-pdUA-LacI_N-be kialakításának köszönhetően már eleve tartalmaz egy 5'–G▼AATTC–3' szekvenciát, ami az EcoRI hasítási helye és ez a szekvencia nem fordul elő az eredeti pdUA-LacI_N vektorban. Az N3-pdUA-LacI_N és N6-pdUA-LacI_N primerekbe pedig HindIII 5'–A▼AGCTT–3' hasítási helyet terveztünk, amely szintén nem fellelhető a hordozóvektorban. A tervezett szekvenciák a következők:

6. táblázat: Megtervezett rövid DNS szakaszok nevei és szekvenciája. Zöld színnel jelöltük az NheI hasítási helyet, rózsaszínnel (illetve aláhúzva) az 1MEY fehérje felismerési helyét. Sárga színnel az EcoRI hasítási helyet, kékkel pedig a HindIII restrikciós enzim hasítási helyét jelöltük. A névben az F illetve R betű azt jelöli, hogy a DNS melyik szálát fogja alkotni a hibridizációt követően az adott oligonukleotid (Forward vagy Reverz)

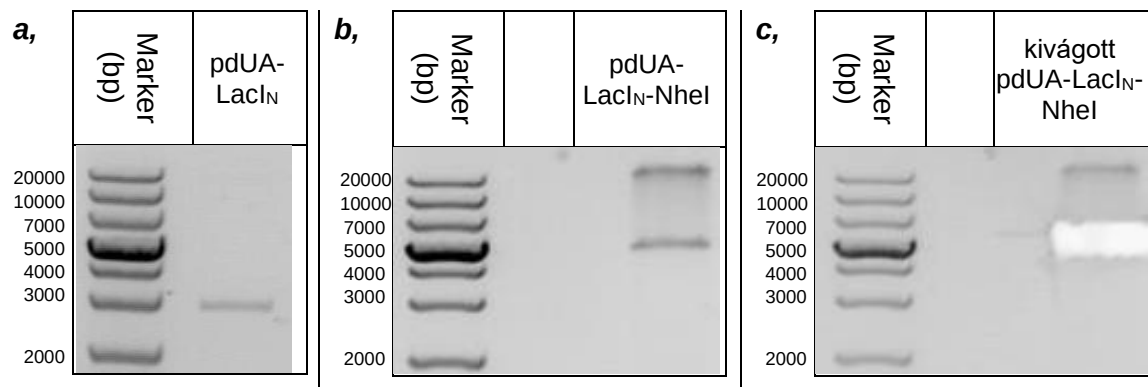
Név	Szekvencia
S1-pdUA-LacI_N/F	5' –CTAGCA <u>GAGGCAGAA</u> AG–3'
S1-pdUA-LacI_N/R	5' –CTAGCTTTCTGCCTCTG–3'
N0-pdUA-LacI_N/F,R	5' –CTAGC <u>GAGGCAGAA</u> TTCTGCCTCG–3'
N3-pdUA-LacI_N/F,R	5' –CTAGC <u>GAGGCAGAA</u> AGCTTCTGCCTCG–3'
N6-pdUA-LacI_N/F	5' –CTAGC <u>GAGGCAGAA</u> AGCTTAAGTTCTGCCTCG–3'
N6-pdUA-LacI_N/R	5' –CTAGC <u>GAGGCAGAA</u> CTTAAGCTTCTGCCTCG–3'

Az N0 és N3 verziók esetében nem volt szükség reverz primerre, hisz a két szál DNS szekvenciája palindrom és képes önmagával dimerizálódni az oligonukleotid.

5.2 pdUA-LacI_N-S1, -N0 és -N3 DNS-hordozók előállítása

A pdUA-LacI_N plazmidot Kiss Antalék kutatócsoportja bocsátotta rendelkezésünkre MDS66 baktériumban. Mivel ezzel az E. coli törzzsel nem voltak tapasztalataink, így első lépésként kinyertük belőlük a plazmid DNS-t. Ehhez 5 ml 50 µg/ml kanamicin tartalmú LB (Luria-Bertani) tápoldatba volt szükség, amibe átoltottunk egy telepet és egy éjszakán át 30 °C-on ráztuk. OD_{600 nm} ~2 elérését követően a baktériumos oldat egy részletéből glicerolos törzsoldatot készítettünk, majd a további részleteit EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kit segítségével feldolgoztuk és kinyertük a sejtekben található plazmid DNS-t. Ezt követően a pdUA-LacI_N plazmiddal a laboratóriumunkban használt DH5α kompetens sejteket transzformáltuk, majd (4.2) szerint sokszorozítottuk, tisztítottuk.

A 250 ml tápoldatból kinyert és 500 µl 10 mM Tris pH 8,5 pufferben visszaoldott pdUA-LacI_N plazmid 260 nm-en mért abszorbanciája alapján koncentrációja 14,3 ng/µl. Ez a mérsékelt kitermelés annak tudható be, hogy kis kópiaszámú (low-copy) plazmiddal dolgoztunk. Mindemellett a 260 és 280 nm-en mért abszorpciójának hányadosa 1,84, így a minta RNS és fehérje szennyezése elhanyagolható.



11. ábra: **a,** szuperhelikális és **b,** lineáris pdUA-LacI_N plazmid DNS 1 m/v %-os agaróz gélen vizsgálva. **c,** hátramaradt gél a lineáris DNS sáv kivágását követően Marker: Gene Ruler 1kb Plus. A linearizálás NheI-el történt az (4.1.1.) fejezetben leírtak szerint. A géltre 500 ng marker, illetve ~20 ng plazmid DNS-t vittünk fel.

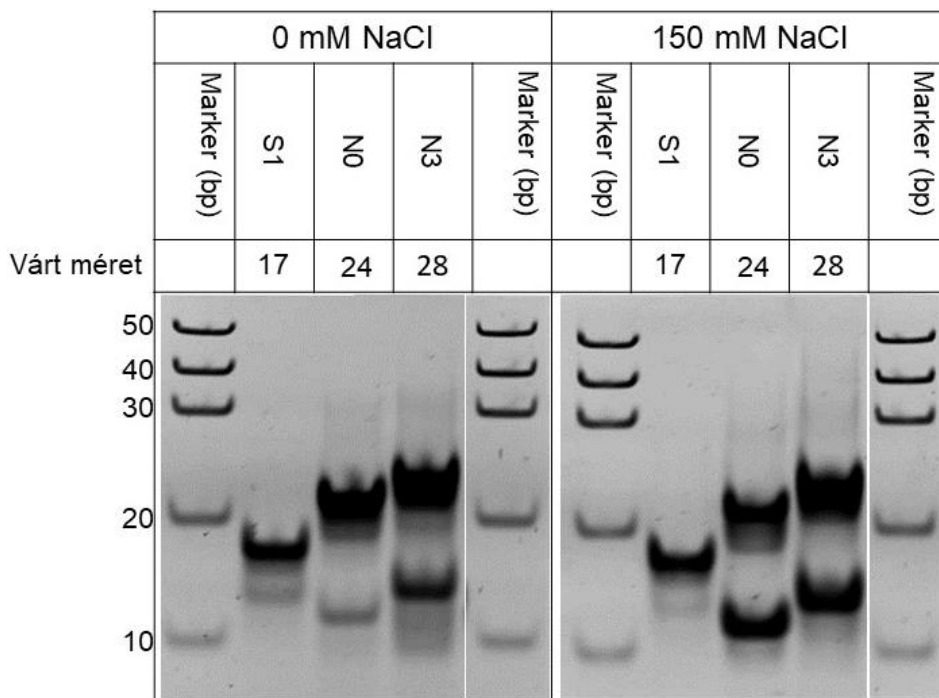
Agaróz gélelektroforézis segítségével megállapítottuk, hogy a kinyert DNS ~3000 bp mérettartományban található (11. ábra a). Emellett NheI enzimmal linearizálva ~5000 bp-nál kapunk egy új sávot (11. ábra b). Utóbbi jó egyezést mutat a plazmid 4849 bp-os elméleti méretével és ez alapján a ~3000 bp-nál található sáv a plazmid kompakt szuperhelikális formáját jelöli. Így összességében kijelenthető, hogy a kívánt plazmidot optimális konformációban sikerült előállítanunk.

Az 11. ábra b) esetében 20000 bp felett észlelhető sáv feltehetően kis mennyiségű genomiális DNS szennyezére utal. Annak érdekében, hogy ez ne zavarjon be a későbbi ligálási kísérletek során a gélből kivágtuk a lineárizált pdUA-LacI_N plazmid sávját, amint az az 11. ábra c) részén látható. Ezt követően a kivágott lineáris DNS fragmenst Thermo Scientific™ GeneJET Gel Extraction Kit-tel visszanyertük az agaróz gélből.

Az így kapott elegy egy részletét alkalikus foszfáttal kezeltünk az (4.1.3) fejezetben bemutatott módon. Erre azért volt szükség, mivel enélkül nagy eséllyel a linearizált plazmidot a ligáz újra összekapcsolta volna körkörös plazmiddá anélkül is, hogy az általunk beépítendő szakaszok bármelyike is beépült volna. Annak érdekében, hogy ellenőrizhessük a ligáz enzim működését, a linearizált pdUA-LacI_N plazmid egy másik részletét kezelés nélkül hagytuk.

Ezzel párhuzamosan az (6. táblázatban) bemutatott primereket a PCR készülékben összehibridizáltuk oly módon, hogy 96 °C-ra felmelegítettük az elegyeket, majd percenként 1 °C-al csökkentettük a hőmérsékletet egészen 10 °C-ig. A hibridizációt megvizsgáltuk 0 és 150 mM NaCl-tartalmú közegben is. Utóbbira azért volt szükség, mivel nem lehettünk benne biztosak, hogy a foszfodiészter csoportokon található negatív töltések miatt nem taszítják-e a szálak egymást, kis ionerősségű közegben. Mivel a várt termékek mérete ~10-20 bp volt, így poliakrilamid gél (4.3) használtunk a reakciók ellenőrzésére. Minden DNS esetében

sikerült a hibridizáció, a tapasztalt és a várt méretek közelítőleg megegyeznek (12. ábra). A várakozásainknak megfelelően az N0 és N3 esetében önhibridizáció is történt, mivel ezekben az oszlopokban két-két sáv is észlelhető és az alsó fele akkora, mint a várt méret. Meglepő módon az önhibridizáció jelentősebb volt 150 mM NaCl alkalmazásakor, azonban még ez esetben is a fő termék a megfelelő módon dimerizálódott DNS volt.



12. ábra: Hibridizált oligonukleotidok vizsgálata 15%-os poliakrialmid gélen. Marker: 5 µl GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder, ready-to-use. Minden zseb ~25 pmol DNS-t tartalmaz. 30 perc előfuttatás 100 V, 1 óra futtatás 100 V. Előhívás 100 ng/µl EtBr oldtban 15 percig.

Így már rendelkezésünkre álltak a beépítendő rövid DNS szálak és az a hordozóvektor is, amelybe be akartuk illeszteni azokat. A nukleinsav szálak összekapcsolása azonban összetett folyamat, hatékonysága függ a linearizált plazmid és a beépítendő rövid DNS szakasz mennyiségétől, molarányuktól, az összekapcsolásért felelős ligáz enzim koncentrációjától, az alkalmazott hőmérséklettől és reakcióidőtől. Emellett a folyamatot elősegítheti, ha zsúfolt közeget hozunk létre polietilén-glikol (PEG) hozzáadásával, mivel ennek hatására energetikailag kedvezőbbé válhat két molekula összeépülése, sőt akár a hidrolízist végző enzimek működését is megfordíthatja [48]. Előkísérletünk során ezért megpróbáltuk optimalizálni ezt a sokparaméteres kémiai reakciót. Erre a célra egy pGEX plazmidot használtunk fel, amelyet elhasítottunk BamHI restrikciós enzimmal (4.1.1). fejezetben leírtak szerint, majd T4 ligáz felhasználásával vizsgáltuk az összeépülés hatásfokát (7. táblázat).

A legjobb eredményt – amikor a linearizált DNS ~20%-a alakult vissza körkörös vektorrá – 0,02 Unit/μl ligáz enzim hatására, polietilén-glikol mentes közegben sikerült elérni, így a továbbiakban ezt a körülményt igyekeztünk tartani ligálásaink során. Fontos megjegyezni, hogy habár több kiindulási DNS esetén több baktériumtelepet kaptunk a transzformálást követően, azonban a kettő közti összefüggés telítés jellegű, így a gyakorlatban nincs értelme ~200 ng-nál több kiindulási DNS-t a mintába rakni. Az is jól látható, hogy habár a ligáz enzim optimális működéséhez 37 °C-ra van szükség, rendre magasabb telepszámot kaptunk 22 °C-on, ugyanis ilyenkor az elhasított DNS szálak 4 bázis hosszúságú egyszálú végei – amelyeket a BamHI enzim hasítás után hátrahagy – nagyobb eséllyel képesek összehibridizálódni, így megkönnyítve a ligáz enzim feladatát.

7. táblázat: Baktériumtelepek száma különböző ligálási körülmények közt. Felhasznált DNS: BamHI linearizált pGEX-6p-1-Z3 25 μl ligálási elegyek, felhasznált ligáz: Thermo Scientific™ T4 DNA Ligase, ligálás időtartama: 2 óra, ligáz inaktiválás: 65 °C 10 perc. A ligálási reakcióelegyekből 5 μl-t transzformáltunk 50 μl DH5α kompetens sejtekbe (4.1.6) fejezetben leírtak szerint, majd 75 μl-t szélesztettünk ampicillin tartalmú LB-Agar táptalajra és egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. A kontroll lemezen ~1000 telep képződött 100 ng/μl DNS felhasználásával. A baktériumtelepek számát szabad szemmel, illetve ImageJ programmal számoltuk meg. [49]

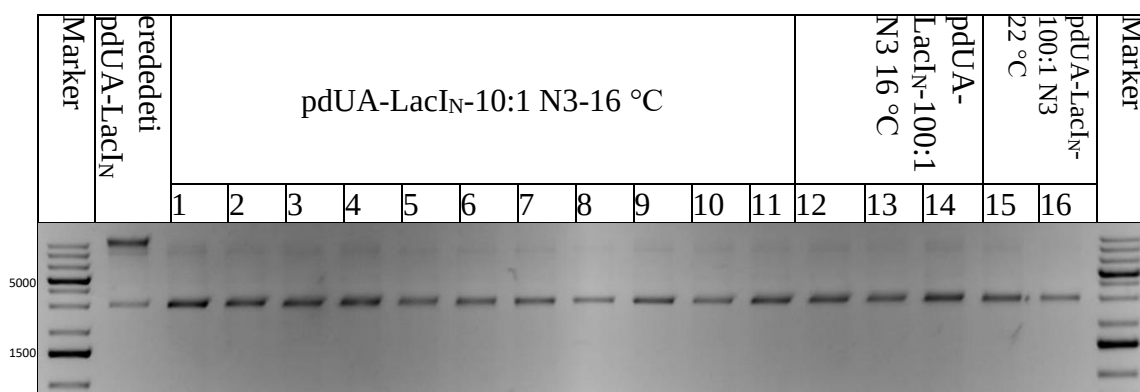
Ligáz „koncentráció” (Unit/μl)	0,02						0,1					
PEG m/v %	0%			5%			0%			5%		
DNS koncentráció (ng/μl)	10	100	1000	10	100	1000	10	100	1000	10	100	1000
Telepszám 22 °C-on	50	190	1000	50	100	700	20	155	350	0	60	300
Telepszám 37 °C-on	36	60	200	9	26	400	25	140	270	0	115	250

A ligálási reakció optimalizálását követően a dimerizált N3 inzert (12. ábra) beépítésével próbálkoztunk meg a korábban linearizált pdUA-LacI_N hordozóba (11. ábra). Az előző bekezdésben részletezett paramétereket annyiban egészítettük ki, hogy 16 °C-os egy éjszakán át tartó ligálással is megpróbálkoztunk, hogy tovább fokozzuk a hatékonyságát a reakcióinknak. Különböző molarányokat is megvizsgáltunk a linearizált plazmid DNS és a beépítendő DNS közt.

7. táblázat: 16 °C-on és 22 °C-on történő ligálási elegyek transzformálása során keletkezett telepek száma. Inzert: 2-200 nM 150 mM NaCl oldatban hibridizált N3 DNS. plazmid: 2 nM (130 ng) NheI linearizált, gélből kivágott pdUA-LacI_N ligálási térfogat: 20 µl, 0,05 Unit/µl ligáz: Thermo Scientific™ „T4 DNA Ligase”, inaktiválás: 65 °C 10 perc, A ligálási reakcióelegyekből 5 µl-t transzfomráltunk 50 µl DH5α kompetens sejtekbe (4.1.6) fejezetben leírtak szerint, majd 150 µl-t szélesztettünk kanamicin tartalmú LB-Agar táptalajra és egy éjszakán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. A kontroll lemezen ~100 telep képződött 100 ng/µl DNS felhasználásával.

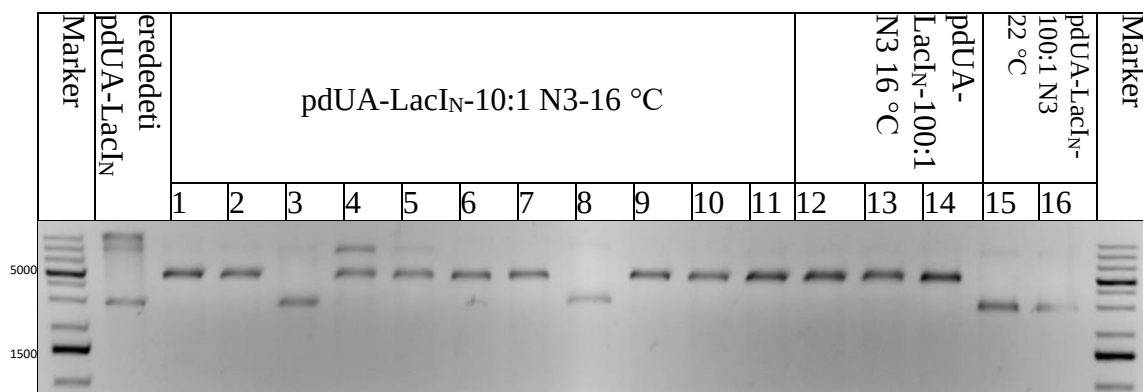
Inzert:plazmid arány:	Ligálási körülmények:	
	16 °C ~20 óra	22 °C ~2 óra
1:1	0	0
5:1	0	0
10:1	11	0
100:1	3	2

Az eredmények alapján 10:1 izert:plazmid molaránynál 16 °C-os, ~20 órás inkubációt követően kaptuk a legtöbb telepet. Ettől függetlenül mindegyik telepet átoltottuk, elszaporítottuk, majd kinyertük belőle a plazmid DNS-t (4.2) fejezetekben leírtak szerint, majd agaróz gélen megfuttattuk a mintákat (4.3). Mind a 16 esetben az eredeti pdUA-LacI_N-nel megegyező méretű szuperhelikális DNS sávot kaptunk az agaróz gélen. Mivel a beépítendő DNS szakasz hossza csupán 28 bp, a plazmid pedig 4849 bp, így az inzert beépülése által okozott méretnövekedést ilyen módon nem lehet megállapítani, csupán a DNS tisztítás sikeressége volt ellenőrizhető.



13. ábra: A kitisztított pdUA-LacI_N-N3 ligálási elegyek vizsgálata 1%-os agaróz gélen, 1 kbp-os Gene Ruler Plus markert használtunk. A markerek zsebeiben 200-200 ng DNS található, a minták zsebeibe pedig ~100 ng DNS-t vittünk fel, az eredeti plazmid esetében pedig csak 50 ng-ot. A gélt 40 percig, 100 V-on futtattuk.

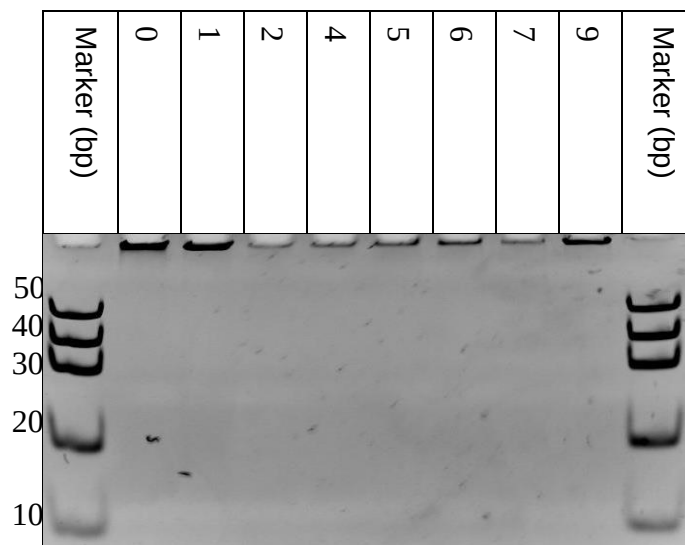
Mivel azonban az N3 oligonukleotidba a tervezés során beépítettünk egy HindIII hasítási helyet, ezért ezzel az enzimmal (4.1.1) fejezetben leírtakkal megegyezően elhasítva a plazmidokat megállapíthattuk, hogy mely esetekben sikerült beépíteni az N3 inzertet.



14. ábra: Az N3 inzerteket tartalmazó minták HindIII-as linearizálásának vizsgálata 1%-os agaróz gélen. Marker: GeneRuler 1 kb Plus, amelyből 200 ng DNS-t vittünk fel, a hasított minták esetében is ~200 ng DNS-t töltöttünk fel a zsebekbe. A gélt 40 percig, 100 V-on futtattuk.

Amint a 14. ábra látható a plazmidok elhasítása a 3-as, 4-es, 8-as, 15-ös és 16-os minta esetében nem volt sikeres, ami azt jelenti, hogy nem épültek be az inzertek. Kiemelendő, hogy a 22 °C-os minták közül egyik sem tartalmazta az N3 inzertet, az elhasított plazmid alakult vissza a ligálás során körkörös formájúvá. Ez arra utalhat, hogy az alkalikus foszfáttal történő kezelés (4.1.3) nem ment végbe 100%-osan és maradtak az elegyben olyan plazmidok, melyek képesek voltak öncirkularizációra.

Az elhasadt plazmidok esetében biztosak lehetünk benne, hogy beépült az N3-as inzert, azonban azt nem tudhatjuk, hogy pontosan hány darab. Ennek megállapítására az elegyet poliakrilamid gélen is megvizsgáltuk, mivel ha több inzert is található egy plazmidban, az azt jelenti, hogy legalább 2 HindIII hely is található benne, így a plazmidot az enzimmal elhasítva egy 28 bp-os lineáris fragmenst is kapnunk kellene. A gélen nem látható ilyen fragmens, ám sajnálatos módon nem lehetünk benne biztosak, hogy ez valóban azt jelenti-e, hogy csak 1 inzert van a plazmidokban vagy egyszerűen a DNS mennyiség volt túl alacsony ahhoz, hogy etídium-bromiddal kimutatható legyen.



15. ábra: Elhasított plazmidokba beépült inzertek számának vizsgálata. Marker: 10 µl GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder. A minták esetében ~200 ng DNS-t vittünk fel a gélre. 30 perc előfuttatás 100 V, 1 óra futtatás 100 V. Előhívás 100 ng/µl EtBr oldtban 15 percig.

Annak érdekében, hogy egyértelműen eldönthessük hány darab inzert épült be terveztünk két olyan primert, amely segítségével a pdUA-LacI_N plazmidból PCR reakció során egy 154 bp-os hosszúságú szakasz sokszorosítható. Ilyen mérettartomány esetén már akár 2%-os agaróz gélen is elválaszthatóak lesznek a 154 bp-os (0 inzert épült be) a 182 bp-os (1 inzert épült be) és az ennél hosszabb DNS termékek, illetve ezek segítségével a minták szekvenálása is megvalósíthatóvá válik.

8. Táblázat: a, pdUA-LacI_N plazmidhoz tervezett primerek. a primerek által PCR reakció során sokszorosított szekvencia b, módosítatlan pdUA-LacI_N c, módosított pdUA-LacI_N-N3 plazmidot használva templátként. Forward primer: **Narancssárga**, Reverz primer: **Sárga**, NheI hasítási hely: **zöld**, HindIII hasítási hely: **kék** 1MEY# cinkujj fehérje felismerési hely: **rózsaszín**

a,

Név	Szekvencia
pdUA-F	5' - TCGTCTTCACCTCGAGATCTATCG - 3'
pdUA-R	5' - CACCCTGAATTGACTCTCTTCCG - 3'

b,

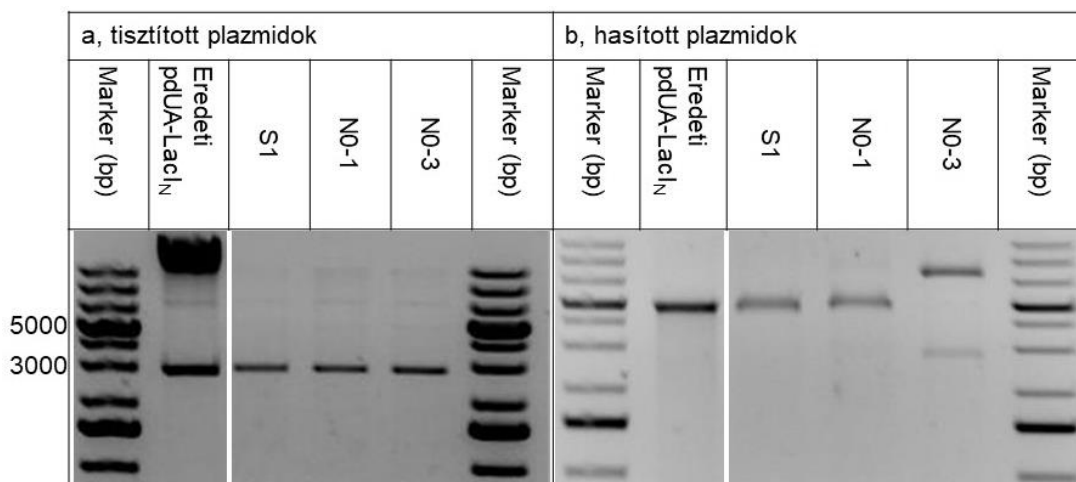
Sokszorosított szekvencia:
5' -
TCGTCTTCACCTCGAGATCTATCG ATGCATGCCATGGTACCTATTCTGGTGGCCGGAAGGCGAA
GCGGCATGCATTTACGTTGACACCATCGAATGGCGCAAAACCTTTTCGCGGTATGGCAT GCTAGC
GCC CGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTG - 3'

c,

Sokszorosított szekvencia:
5' -
TCGTCTTCACCTCGAGATCTATCG ATGCATGCCATGGTACCTATTCTGGTGGCCGGAAGGCGAA
GCGGCATGCATTTACGTTGACACCATCGAATGGCGCAAAACCTTTTCGCGGTATGGCAT GCTAGC
GAGGCAGAAAGCTT TCTGCCTC GCTAGC GCC CGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTG - 3'

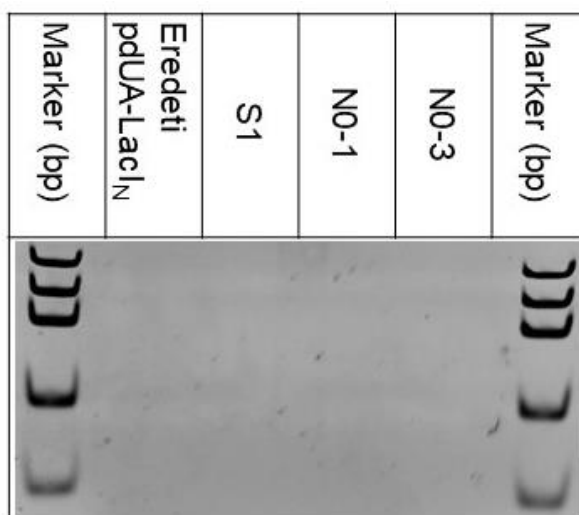
Ezzel párhuzamosan az N3-as ligálás során tapasztalt legideálisabb körülményt (16 °C ~20 óra 10:1 inzert:plazmid arány) alkalmazva végrehajtottuk a reakciót a további megtervezett és hibridizált rövid DNS szakaszokat felhasználva, majd a korábbiakkal azonos módon transzformáltuk a reakcióelegyeket. A pdUA-LacI_N plazmidba a ZFA inzertet beépítve 1 telep lett, hasonlóan az S1 inzertet tartalmazó plazmid esetében, az N0 mintával 3, a ZFB inzerttel pedig 2 telep keletkezett. A sejteket (4.2) alapján felszaporítottuk, amely az N0-1 telep kivételével minden esetben sikerült, majd kinyertük a bennük található plazmid DNS-eket.

Agaróz gélen megfuttattuk a reakciótermékeket és ebben az esetben is a pdUA-LacI_N szuperhelikális sávjához hasonló sávokat kaptunk, természetesen az esetleges sikeres beligálódás itt sem látható (16. ábra a). Az inzertek beépülésének ellenőrzése csak N0 esetében ellenőrizhető könnyedén ugyanis ebben a szakaszban megtalálható EcoRI restriktációs enzim felismerési helye. Amint látható az N0-2 mintát sikeresen elhasítottuk, míg az N0-3-as verziót nem, így az előbbiben legalább egy darab N0 inzert sikeresen beépült.



16. ábra: **a,** Az eredeti és inzerteket tartalmazó pdUA- LacI_N plazmidok vizsgálata 1%-os agaróz gélen. Az eredeti plazmidból 50 ng-ot vittünk fel, a többi minta esetében minden zseb ~100 ng DNS-t tartalmaz. **b,** A plazmidok hasítása restrikciós enzimekkel. A pdUA-LacI_N és S1 esetekben NheI-el, az N0-2 N0-3 esetében EcoRI-el történt hasítás (4.1.1)-szerint. A gél 40 percig, 100V-on futtattuk.

A további plazmidoknál nem lehetett kialakítani extra restrikciós helyet a beépítendő inzertben a tervezés során, ezek csak NheI-el hasíthatók el. Amennyiben azonban bármelyik mintába sikerrel beépült az inzert, abban az esetben elhasítva a képződött plazmidot, biztosan kapunk kell egy inzerttől függően 13-24 bp hosszúságú fragmenst is, amelyeket ez esetben is megpróbáltunk poliakrilamid gélen detektálni.



17. ábra: Elhasított plazmid vizsgálata 15%-os poliakrilamid gélen. Marker: 5 µL GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder, ready-to-use. Mindegyik mintával kb 200 ng DNS-t juttatunk fel a gélre. 30 perc előfuttatás 100 V, 1 óra futtatás 100 V. Előhívás 100 ng/µl EtBr oldatban 15 percig.

Mivel itt sem tudtuk detektálni a beépült inzerteket, így bebizonyosodott, hogy ez a módszer nem kellően érzékeny a fragmensek kimutatására, ezeknél a plazmid termékeknél is a PCR-reakcióval sokszorosított 154 bp-os fragmens vizsgálata lehet a megoldás.

5.3 Szekvenálási eredmények

Az általam előállított S1, N0 és N3 inzerteket tartalmazó pdUA-LacI_N cirkuláris DNS-ek az előkísérletek alapján feltehetően helyesnek bizonyultak, azonban egyszerű gélelektroforézissel nem tudtuk megmondani, hogy ténylegesen beépültek-e a megfelelő fragmensek a plazmid DNS-be, illetve, ha be is épültek, akkor hány darab és milyen szekvenciával. Ehhez polimeráz láncreakcióval sokszorítottuk az általunk vizsgálni kívánt inzertek régióit. Ehhez az előbbiekben említett pUA-pdUA-R (5' – CACCCTGAATTGACTCTCTTCCG–3') és pdUA-F (5' – TCGTCTTCACCTCGAGATCTATCG–3') primereket használtunk és a (4.7) fejezetben leírtak szerint hajtottuk végre a reakciót. Erre azért volt szükség, mert a szekvenálási folyamatok nagy mennyiségű DNS-t igényelnek, azonban a felhasznált plazmid kis kópiaszámú, azaz csak kis mennyiségű DNS felszaporítására és kinyerésére alkalmas.

A szekvenciák pontos ellenőrzéséhez a PCR során keletkezett termékeket fenolkloroform extrakcióval (4.5.1) kitisztítottuk, majd a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban a (4.9) pontban leírtak szerint végezték el mintáinkon a szekvenálást.

5.3.1 pdUA-LacI_N-N3 szekvenálásának eredménye

Az N3-at tartalmazó DNS hordozó szekvenciájának megállapításához, 4 minta szekvenálását végezték el. Mind a 4 esetben, ugyan azt az eredményt kaptuk. A várakozásainknak megfelelően csak egy N3 inzert épült be a vektorba. Azonban mindegyik esetben a HindIII hasítási hely szekvenciáját követően hiányzik egy citozin. A 4 szekvenálásból 1-nek a minősége kevésbé jó, viszont a többi 3 minősége tökéletes az adott régióban, így a hiányzó bázis nem mérési vagy kiértékelési hibának tudható be, feltehetően a megrendelt rövid DNS szakasz szintézise során történt hiba. Mivel a hiányzó citozin, az átellenes szálon egy cinkujj fehérje felismerési helyet kódolt, így ezt a rövid DNS szakaszt tartalmazó plazmidot nem tudjuk felhasználni a DNS-fehérje kölcsönhatás *in vivo* vizsgálatához.

Várt szekvencia	5'-AGGCGAAGCGGCATGCATTTACGTTGACACCATCGAATGGCGCAAAACCTTTTCGCGGTATGGCATGCTAGCGAGGCAGAGAGCTTTCTGCTCGCTAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTG-3'
Kapott szekvencia	N3_6 5'-AGGCGAAGCGGCATGCTATGTTACGTTGACACCATCGAATGGCGCAAAACCTTTTCGCGGTATGGCATGCTAGCGAGGCAGAGAGCTTTCTGCTCGCTAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTG-3'
	N3_7 5'-AGGCGAAGCGGCATGCATTTACGTTGACACCATCGAATGGCGCAAAACCTTTTCRMGGWATGGCATGCTAGCGAGGCAGAGAGCTTTCTYYYCGCTAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGA-3'
	N3_9 5'-CCTTTTTTTTCGCGGTATGGGCATGCTAGCGAGGCAGAGAGCTTTCTGCTCGCTAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGA-3'
	N3_10 5'-AGGCGAGCGGCATGCATTTACGTTGACACCATCGAATGGCGCAAAACCTTTTCGCGGTATGGCATGCTAGCGAGGCAGAGAGCTTTCTGCTCGCTAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGA-3'

18. ábra: pdUA-LacI_N-N3_6, 7, 9 és 10 mintákra kapott szekvenciák összehasonlítása a várt értékekkel., Reverz primer: lila, 1MEY cink-ujj fehérje felismerési hely: rózsaszín kiemelés, HindIII felismerési hely: kék, NheI felismerési hely: zöld, N3 oligonukleotid szekvenciája: fekete aláhúzás, kiesett nukleotidok: zöld kiemelés, eltérő nukleotidok: türkizkék kiemelés

5.3.2 pdUA-LacI_N-N0 szekvenálásának eredménye

Ebben az esetben egy darab sértetlen N0 inzert épült be és nem történt elváltozás a cinkujj fehérje felismerési szekvenciájában, így ez a DNS felhasználható a DNS-fehérje kölcsönhatások sejtbeli tanulmányozásához.

Várt szekvencia	5'-AGGCGAAGCGGCATGCATTTACGTTGACACCATCGAATGGCGCAAAACCTTTTCGCGGTATGGCATGCTAGCGAGGCAGAGCTTTCTGCTCGCTAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTG-3'
Kapott szekvencia	5'-AGGCGAAGCGGCATGCATTTACGTTGACACCATCGAATGGCGCAAAACCTTTTCGCGGTATGGCATGCTAGCGAGGCAGAGCTTTCTGCTCGCTAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGA-3'

19. ábra: pdUA-LacI_N-N0_2 várt és kapott szekvenciájának összehasonlítása. Reverz primer: lila, 1MEY cink-ujj fehérje felismerési hely: rózsaszín, EcoRI felismerési hely: citromsárgával kiemelt, NheI felismerési hely: zöld, N0_2 oligonukleotid szekvenciája: fekete aláhúzás, a szekvenciából kiesett nukleotidok: zöld kiemelés, eltérő nukleotidok: türkizkék kiemelés

5.3.3 pdUA-LacI_N-S1 szekvenálásának eredménye

A hordozó szekvenciájába a várakozásainknak megfelelően egy darab S1 inzert épült be, azonban a szekvenciából kiesett egy guanin a második NheI hasítási hely szekvenciájából. Mivel a számunkra fontos cinkujj fehérje felismerési hely szekvenciájában ez semmilyen változást nem okozott ezért felhasználható további kísérleteink során a körkörös DNS hordozó.

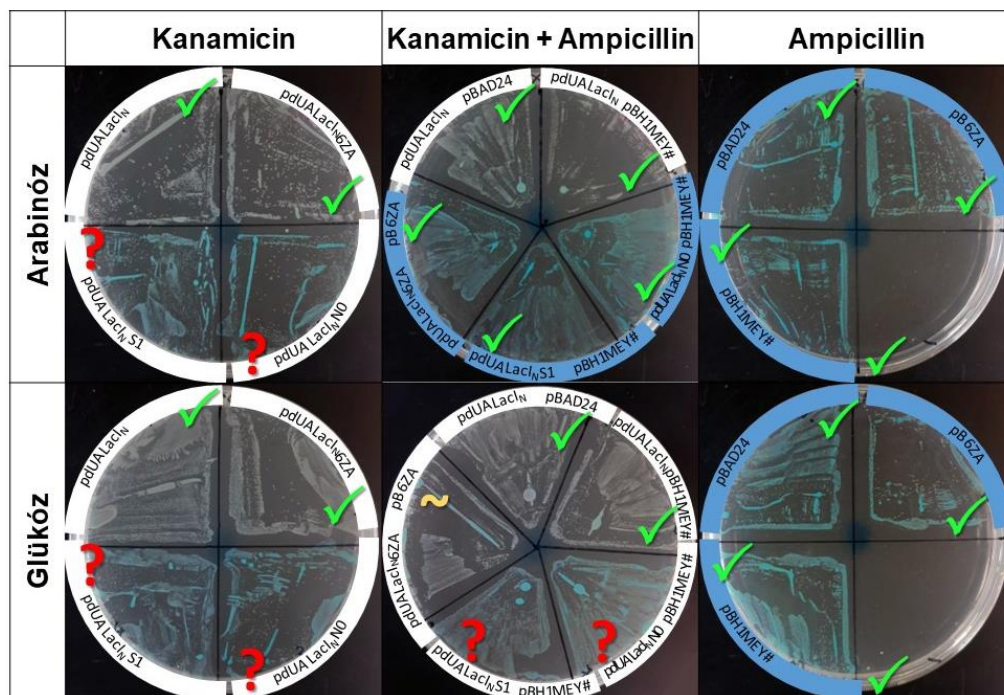
Várt szekvencia	5' -AGGCGAAGCGGCATGCATTTACGTTGACACCATCGAATGGCGCAAACCTTTTCG CGGTATGGCATCTAGCAGAGGCAGAAACTAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGG GTG-3'
Kapott szekvencia	5' -AGGCGAAGCGGCATGCATTTACGTTGACACCATCGAATGGCGCAAACCTTTTCG CGGTATGGCATCTAGCAGAGGCAGAAACTAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGG GTA-3'

20. ábra: pdUA-LacI_N-S1 várt és kapott szekvenciájának összehasonlítása. Reverz primer: **lila**, 1MEY cink-
ujj fehérje felismerési hely: **rózsaszín**, NheI felismerési hely: **zöld**, S1 oligonukleotid szekvenciája: fekete
aláhúzás, a szekvenciából kiesett nukleotidok: **zöld kiemelés**

5.4 I-Block kísérlet pdUA-LacI_N-S1 és -N0 DNS hordozókkal

Miután szekvenálással megbizonyosodtunk arról, hogy melyik rövid DNS szakaszokat tartalmazó körkörös DNS hordozókat használhatjuk fel a DNS-fehérje kölcsönhatás vizsgálatához, elvégeztük az I-Block vizsgálatot Petri-csészében. A sikeres teszthez természetesen a cinkujj fehérje DNS felismerési helyét tartalmazó hordozó mellett szükséges a cinkujj fehérje génjét tartalmazó bakteriális hordozó is, amelyet kutatócsoportunk tagja Horvát Melinda állított elő munkája során.

A tényleges I-Block kísérlet során a His-1MEY# fehérje génjét tartalmazó pBAD24 DNS hordozót és a pdUA-LacI_N-S1 vagy -N0 DNS hordozót egyszerre juttattuk be az ER1821ΔLacI kompetens sejtbe dupla transzformálás segítségével, amit a (4.1.6) pontban leírtak szerint végeztünk el, annyi különbséggel, hogy két plazmidot használtunk fel, de mindkettőből hasonló mennyiséget tettünk a reakcióelegybe. A kontroll kísérletekben csak egy plazmidot juttattunk a sejtekbe, ezután az elegyeket Petri-csészére szélesztettük szintén (4.1.6) alfejezet szerint. A folyamat során felnövekedett baktériumtelepeket, – amelyek vagy egy vagy két plazmidot tartalmaztak ezen a ponton – ezután 5 ml-es tápoldatban szaporítottuk, majd a baktériumos elegyből 20 %-os glicerines oldatot készítettünk (4.2) szerint. Ennek az elegynek egy részletét 100-szorosára hígítottuk fel desztillált vízzel, majd az I-Block kísérletben alkalmazott Petri-csészékre szélesztettük, amelyek arabinózt vagy glükózt, antibiotikumot és X-gal vegyületet (5-bróm-4-klór-3-indolil-β-D-galaktopiranozid) tartalmaztak. Az elegyeket egy éjszakán keresztül inkubáltuk 37 °C-on.



21. ábra: Fehérje-DNS kölcsönhatásának vizsgálata az I-Block rendszer alapján. A két párhuzamos kísérletből, az egyszerűség kedvéért, csak az egyik mérést mutatjuk be.

A kísérletet elvégeztük arabinóz illetve glükóz tartalmú táptalajokon is, ugyanis a pBAD24-His-1MEY# fehérje kifejeződése arabinózzal indukálható. Jól látható, hogy a pdUA-LacI_N arabinóz és glükóz tartalmú Petri-csészéken is fehér sejttelepeket nöttek, ezek az I-Block tesztrendszer alapján jó eredmények, ugyanis a pdUA-LacI_N plazmid hordozza a *lac* represszort, ami a β -galaktozidáz termelődését akadályozza, így az X-galt nincs, ami elhasítaná és kék bomlásterméket eredményezzen.

A Kiss Antal csoportja által rendelkezésünkre bocsájtott és referenciaként alkalmazott pdUA-LacI_N-6ZA vektorok a 6ZA cinkujj fehérje felismerési helyekét tartalmazták a *lac* represszor fehérje génjét megelőzően, így a fehér színű telepek ismét arra utalnak, hogy β -galaktozidáz nem termelődött, sem a glükóz, sem pedig az arabinóz tartalmú táptalajon.

A pdUA-LacI_N-6ZA és pB6ZA arabinózt tartalmazó táptalajon kék színű sejtenyészetet adott. Az előbbi plazmid a *lac* represszort, illetve a fehérje felismerési helyet tartalmazta, míg a pB6ZA pedig a cinkujj fehérje génjét. Ebben a plazmidban a 6ZA gén transzkripcióját az araBAD promóter régió irányítja és arabinózzal indukálható. Ennek köszönhető, hogy az arabinóz-tartalmú táptalajon kék színű telepeket kapunk, míg a glükóz-tartalmú táptalajon fehéreket, hiszen itt nincs jelen az arabinóz, ami a fehérje termelődését

indukálná, így a kontroll kísérletek sikeresek voltak. A glükóz-tartalmú perti csészén látható keskeny kék csík általános jelenség, amennyiben túl tömény sejttenyészet.

Amennyiben a sejtek csak a fehérjét hordozó pBAD24 körkörös DNS-t, vagy ezeknek a módosított verzióit tartalmazzák, minden esetben kék telepekre számítunk, ugyanis ez a plazmid nem tartalmazza a *lac represszort*, így nem tudja gátolni a β -galaktozidáz termelődését, ami elbontja az X-gal festéket. A várakozásoknak megfelelően a pBAD24, pBAD24-His-1MEY# és pB6ZA-plazmid-tartalmú sejtek telepei kékek voltak.

Amennyiben a felismerési hely nélküli pdUA-LacI_N és fehérje gén nélküli pBAD24 vektorokat együtt juttattuk be az ER1821 Δ LacI sejtbe fehér telepeket kaptunk, mivel a *lac represszor* génjét a pdUA-LacI_N plazmiddal bejutattuk, de nincs olyan fehérje, ami ezt gátolni tudná, és ha lenne is, nincs beépítve gátolható célszekvencia a *lac represszor* génjét megelőzően. Ugyanezt az eredményt kapjuk, ha az üres pBAD24 plazmid helyett a pBAD24-His-1MEY# DNS hordozót juttatjuk be a pdUA-LacI_N hordozóval együtt, hiszen ebben az esetben, habár számíthatunk fehérjekifejeződésre, azonban továbbra sincs a cinkujj fehérjének olyan célszekvenciája, amihez képes lenne koordinálódni, és ezzel gátolni a *lac represszor* fehérje kifejeződését, így ezek a kontrollok is megfelelően működtek.

Az általunk tervezett pdUA-LacI_N-S1 és -N0 hordozó DNS-eket használva mindkét esetben kék sejtek figyelhetők meg annak ellenére, hogy csak a fehérje felismerési szekvenciáját juttattuk be a plazmidba, a fehérje génjét nem, ezért a β -galaktozidáznak sem szabadna termelődnie és elhasítania az X-gal glikozidos kötését. Mivel ezek a DNS hordozók önmagukban kék telepeket okoztak az elvárt fehérek helyett, így innentől kétséges, hogy a pdUA-LacI_N-N0; pBAD24- His-1MEY# illetve pdUA-LacI_N-S1; pBAD24- His-1MEY# duplatranszformálások során tapasztalt kék szín minek tulajdonítható.

Eredeti pdUALacI_N



Módosított pdUALacI_N-S1 vagy -N0



22. ábra: Sikertelen I-Block kísérlet lehetséges magyarázata sematikusán ábrázolva. Beépített cinkujj fehérje köthőhely: zölddel jelölve. *LacI represszor* fehérje és gén: pirossal jelölve.

Két azonos eredményt adó I-Block kísérlet elvégzése után azt a következtetést vontuk le, hogy miután a cinkujj fehérje felismerési helye a pdUA-LacI_N plazmidba, majd ezzel együtt a sejtbe bekerül, a *lac* represszor fehérje kifejeződése megszűnt (22. ábra). Ennek számos oka lehet. Elsősorban arra gondolhatnánk, hogy a pdUA-LacI_N vektorba nem jól épültek be az inzertek, viszont ezt, a már elvégzett szekvenálások eredményei kizárták. Így két lehetőség merül fel: vagy tartalmaz az ER1821ΔLacI sejt genomiális DNS-e olyan DNS-kötő fehérjét kódoló gént, ami az általunk módosított pdUA-LacI_N-S1 és -N0 DNS hordozóhoz képes hozzákötni (ennek igen kicsit a valószínűsége), vagy olyan nagy mértékben módosítottuk az eredeti DNS szekvenciát a beépített extra DNS részlettel, hogy az RNS polimeráz már nem képes áthaladni a szekvencián és a *lac* represszor transzkripciója leáll.

5.5 Primer tervezés 1MEY-alapú plazmidokhoz 2. próba

Mivel a korábbi I-Block kísérletben feltehetően túl nagy mértékben módosítottuk a pdUA-LacI_N szekvenciáját, így az újra tervezésnél Arra törekedtünk, hogy a hordozó vektorok nukleotid sorrendjét a lehető legkisebb mértékben módosítsuk. Ehhez új vektort bocsájtott rendelkezésünkre Kiss Antalék kutatócsoportja, amelye nem csak NheI, de EcoRI hasítási helyet is tartalmaz. Ezáltal nem csak egy rövid DNS szakasz beépítését tudjuk megtenni – ami méretnövekedéssel jár lásd (23. ábra) –, hanem ki is tudjuk cserélni az adott régiót, ezáltal a méret nem, vagy csak nagyon kis mértékben fog változni. Ennek a plazmidnak az előállításához először a ragadós végű oligonukleotidok hibridizációja, szükséges, majd ezt követi, az NheI és EcoRI enzimekkel elhasított pdUA-LacI_{NE}-be történő ligálás.

Régi szekvencia	pdUA-LacI _N	5' -CATGCTAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTG-3'
Új szekvencia	pdUA-LacI _{NE}	5' -CATGCTAGCGCCCGGAAGAGAGTGAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAAC-3'
Régi szekvencia	pdUA-LacI _N -S1	5' -CATGCTAGCAGAGGCAGAACTAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTG-3'
Új szekvenciák	pdUA-LacI _{NE} -S1a	5' -CATGCTAGCGCAGAGGCAGAAAGTGAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAAC-3'
	pdUA-LacI _{NE} -S1b	5' -CATGCTAGCAAAGAGGCAGAAAGTGAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAAC-3'
	pdUA-LacI _{NE} -S1c	5' -CATGCTAGCGCCCGGAAGAGGCAGAAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAAC-3'

23. ábra: Az új I-Block kísérletekhez szükséges átalakítások a plazmidban. A táblázat tartalmazza az régi vektorok és az újak szekvenciáit is. NheI: zöld, EcoRI: sárga kiemelés, 1MEY# felismerési hely: rózsaszín aláhúzás

Látható, hogy az eredeti pdUA-LacI_N hordozó szekvenciájában, csupán annyit változás történt, hogy az új EcoRI hasítási helyet is megjelent a pdUA-LacI_{NE} körkörös

DNS-ben. Az S1a, b, c verziók már tartalmazzák az 1MEY# cinkujj fehérje felismerési szekvenciáját, de igyekeztünk úgy megválasztani ennek pozícióját, hogy a lehető legkevesebb nukleotidcsere történjen az eredeti pdUA-LacI_{NE} szekvenciához képest. Ügyeltünk rá, hogy a transzkripció szempontjából lényeges +1-es pozícióban guanint tartalmazzanak a DNS-ek, mivel itt indul meg az RNS-átíródás. Az S1b szekvenciájában az S1a-hoz képest továbbá kicseréltük a fehérje kötőhely előtti két nukleotidot. Ennek oka, hogy a cinkujj fehérje kedveli a guaninban és citozinban gazdag szekvenciákat viszont, ha több ilyen régió található a DNS-ben, félő, hogy a fehérje nem a megfelelő helyre fog odakötni. Emiatt az előbb említett 2 nukleobázist kicseréltük két adeninre, hogy biztosan oda kössön be a fentebb említett molekula, ahol a felismerési helye található. Az S1c szekvenciájából feltüntetett rövid DNS szakaszban megfigyelhető, hogy a fehérje felismerési helye és az EcoRI restriciós endonukleáz célszekvenciája átfed egymással.

Ahhoz, hogy az új DNS szakaszokat megkapjuk olyan primereket terveztünk, amelyek egyik vége NheI, másik EcoRI ragadós végeket eredményez hibridizációt követően:

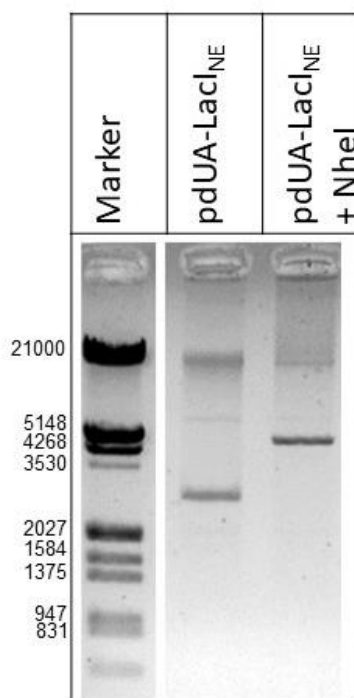
S1a-F	5' -CTAGCGCGAGGCAGAAAGTG-3'
S1a-R	5' -AATTCACTTTCTGCCTCGCG-3'
S1b-F	5' -CTAGCAAGAGGCAGAAAGTG-3'
S1b-R	5' -AATTCACTTTCTGCCTCTTG-3'
S1c-F	5' -CTAGCGCCCGGAAGAGGCAG-3'
S1c-R	5' -AATTCGCTCTTCCGGGCG-3'

24. ábra: A pdUA-LacI_{NE} plazmidba történő beligáláshoz tervezett primerek szekvenciája. NheI: zöld, EcoRI: sárga kiemelés, 1MEY# felismerési hely: rózsaszín aláhúzott.

5.6 pdUA-LacI_{NE}-S1a, -S1b és -S1c DNS-hordozók előállítása

A cirkuláris DNS hordozóba történő beépítéshez először a megtervezett primerek forward és reverse szálainak összehibridizálására van szükség, amit a korábbiakkal azonos módon hajtottunk végre. Az összeállított reakcióelegyeket a Bio-Rad iCycler iQ™ műszerben 96 °C-ról 10 °C-ra hűtöttük le, 1 °C/ perc csökkentéssel.

A primerek összehibridizálását követően a pdUA-LacI_{NE} plazmid elhasítására volt szükség, hogy ezt követően az inzerteket be tudjuk építeni. A (4.1.1) fejezetben lévő protokollhoz képest most kisebb mennyiséget alkalmaztunk a restrikciós endonukleázokból, ugyanis azt tapasztaltuk, hogy a reakció ezen arányokkal hatékonyabban megy végbe, illetve a duplahasítást két körben végeztük. A cirkuláris DNS hordozó vektort először az NheI enzimmal hasítottuk el, amit agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.



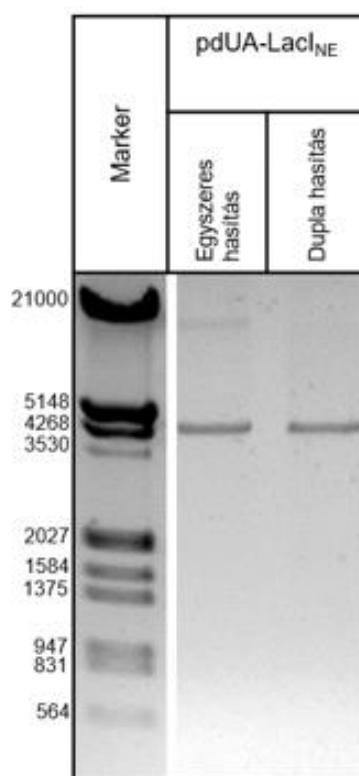
25. ábra: pdUA-Lac_{NE} plazmid NheI restrikciós endonukleázzal történő hasításának ellenőrzése 1%-os agaróz gélen. A futtatást 50 V-on végeztük 1 órán keresztül. Markerként 5 µl λ EcoRI HindIII markert használtunk, a plazmidokból 1-1 µl-t vittünk fel a gélre. Ehhez 4 µl vizet és 1 µl 6×LD festéket adtunk.

A gél eredményéből jól látható, hogy az NheI endonukleázzal sikerült elhasítani a plazmidot. Ezt követően a fennmaradó linearizált DNS mintát fenol-kloroform extrakcióval tisztítottuk, a kapott DNS tisztasága és koncentrációja is megfelelőnek bizonyult (9. táblázat).

9. táblázat: NheI-hasított pdUA-Lac_{NE} DNS hordozó koncentrációja és tisztasága NanoDrop mérés alapján fenol-kloroform extrakciót követően.

	pdUALac _{NE}
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1,86
Koncentráció (ng/µl)	66,2

A tisztítást követően az immár lineáris hordozóvektort EcoRI enzimmel is elhasítottuk, és habár itt nem számítottunk rá, hogy detektálható lesz a ~4500 bp-os DNS ~20 bp-os méretcsökkenése, mégis megvizsgáltuk a terméket 1 %-os agaróz gélen, hogy megbizonyosodjunk róla, az EcoRI nem hajtott végre nemkívánt fragmentációt (26. ábra).



26. ábra: EcoRI restrikciós endonukleázzal történő hasítás ellenőrzése 1%-os agaróz gélen. A mintából 1 μ l-t, vízből 4 μ l-t a 6 $\times$ LD-ből szintén 1 μ l-t vittünk fel a géltre, amit 50 V-on 50 percig futtattunk. Markerként a λ EcoRI HindIII marke-t használtuk.

Ezt követően a dupla hasított DNS mintá teljes részletét, agaróz gélen megfuttattuk, majd a gélből a FastGene™ Gel/PCR kit segítségével a kivágott géldarabból visszanyertük a számunkra fontos DNS-t. A tisztítást a (4.5) fejezetben leírtak alapján végeztük el, a minta tisztasága megfelelő volt, a kinyert mennyiség elegendőnek bizonyult a ligálási reakciókhoz (10. táblázat).

10. táblázat: NheI és EcoRI-hasított pdUA-LacI_{NE} DNS hordozó koncentrációja és tisztasága NanoDrop mérés alapján gél extrakciót követően.

	pdUALacI _{NE}
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1,81
Koncentráció (ng/ μ l)	6,8

Ezek után megkezdtük a rövid, S1a, S1b és S1c DNS szakaszok beépítését a kétszeresen elhasított DNS hordozóba. Ezek a rövid DNS szakaszok az 5'- végükön nem tartalmaztak foszfát csoportot, így nem is voltak képesek a ligálási reakció során egymással összekapcsolódni csak a linearizált plazmiddal. Ebből kifolyólag ezeket a DNS szakaszokat, a plazmidhoz képest nagy feleslegben lehetett alkalmazni, ugyanis így, ezen inzertek beépülésének esélye sokkal nagyobb volt. A hordozó vektorból 13,6 ng-ot használtunk fel a

reakció során, amely mellett 300-szoros inzertfelesleget alkalmaztunk. Az S1a, S1b és S1c inzerteket tartalmazó minták mellett volt csak kétszeresen hasított és egyszeresen hasított plazmidot tartalmazó ligálási elegy is, előbbivel a dupla hasítás, utóbbival a ligáz megfelelő működését teszteltük. A reakcióelegyeket 60 percig 16 °C-on inkubáltuk (4.1.2) alapján, majd az elegyekkel DH5 α kompetens sejteket transzformáltunk, az elegyeket peteicsészékre szélesztettük a korábbiakkal analóg módon.

Az inkubálást követően azt tapasztaltuk, hogy az egyszeresen hasított mintából számot baktériumtelep nőtt, azaz a ligáz működött, azonban volt néhány telep a csak kétszeresen hasított plazmidot tartalmazó elegyben is, ami csak akkor lehetséges, ha nem volt 100%-os hatásfokú az EcoRI-es hasítás. Ettől függetlenül az inzerteket is tartalmazó elegyekből sokkal több telep nőtt, mint a negatív kontroll esetében így azt feltételeztük, hogy volt olyan DNS hordozó, ahol sikerült a dupla hasítás, majd sikerült beépülnie az összehibridizált oligonukleotid szakaszoknak. Azért, hogy erről megbizonyosodjunk, minden minta esetében két sejttelvet átoltottunk 5 ml antibiotikum tartalmú LB oldatba, majd a sejtenyészetekből kinyertük a plazmid DNS-t, arról PCR-ben sokszorozítottuk a vizsgálni kívánt szekvenciát és ezek felhasználásával szekvenálást hajtottunk végre az 5.2 és 5.3 alfejezetekkel azonos módon. A szekvenálási reakciók alapján mindhárom pdUA-LacI_{NE} verzióból sikerült találni olyan telepet, amelyben a helyes módon épült be a rövid DNS szakasz, a kapott szekvenciák 100%-ban egyeznek az elméleti adatokkal.

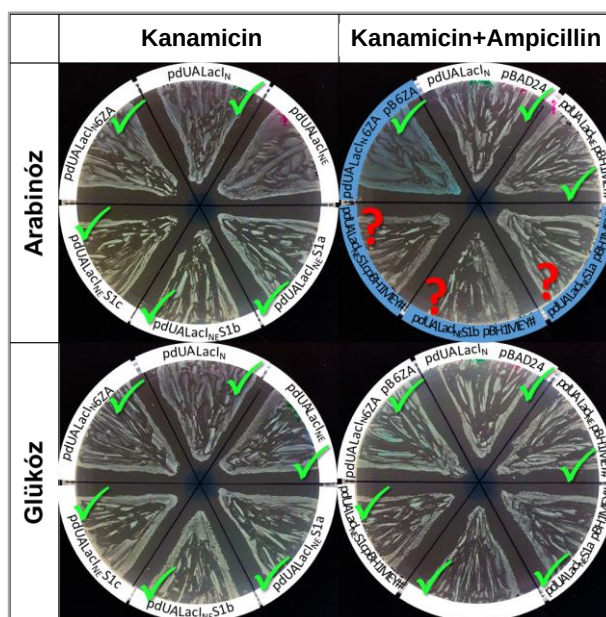
Várt szekvencia (pdUA-LacI _{NE} -S1a)	5' - CATGCTAGCGCGAGGCAGAAAGTGAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAG - 3'
Kapottszekvencia (pdUA-LacI _{NE} -S1a)	5' - CATGCTAGCGCGAGGCAGAAAGTGAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAG - 3'
Várt szekvencia (pdUA-LacI _{NE} -S1b)	5' - CATGCTAGCAAGAGGCAGAAAGTGAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAG - 3'
Kapottszekvencia (pdUA-LacI _{NE} -S1b)	5' - CATGCTAGCAAGAGGCAGAAAGTGAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAG - 3'
Várt szekvencia (pdUA-LacI _{NE} -S1c)	5' - CATGCTAGCGCCCGGAAGAGGCAGAAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAG - 3'
Kapottszekvencia (pdUA-LacI _{NE} -S1c)	5' - CATGCTAGCGCCCGGAAGAGGCAGAAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAG - 3'

27. ábra: A szekvenálási reakciók által kapott eredmények. A PCR termékekből 1 μ l-t használtunk fel, amelyek koncentrációja 27 és 28 ng/ μ l között voltak, amiket TE-ben oldottunk vissza. NheI: zöld, 1MEY# felismerési hely: rózsaszín aláhúzás, EcoRI hasítási hely: sárga kiemelés.

5.7 I-Block kísérlet pdUA-LacI_{NE}-S1a, -S1b és -S1c DNS hordozókkal

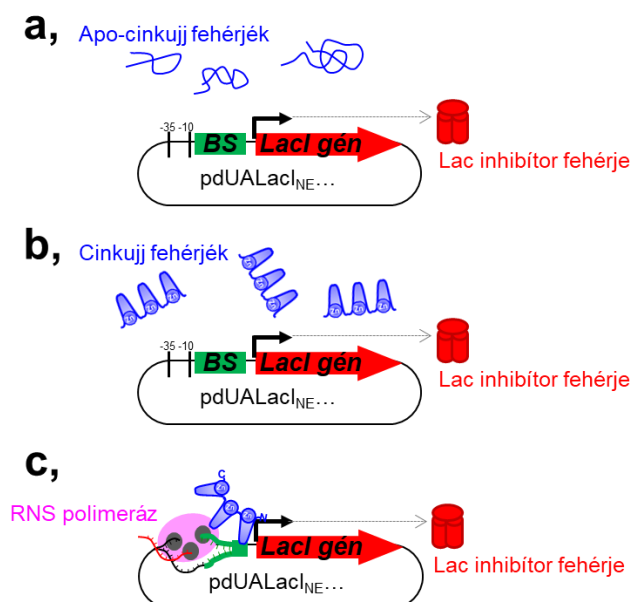
A szekvenálás alapján sikeresen előállítottuk a módosított DNS hordozókat, amelyek tartalmazzák az 1MEY# cinkujj-fehérje felismerési helyét, így a korábbival (5.4) azonos módon hajtottuk végre az I-Block kísérletet, immáron az új pdUA-LacI_{NE}-S1a, -S1b és -S1c plazmidokat felhasználva. A folyamat során az összes előzőleg említett kontroll kísérletet végrehajtottuk, ezek az elvárható eredményt adták. Az üres (cinkujj fehérje DNS-felismerési hely nélküli) NheI és EcoRI hasítási helyet tartalmazó pdUA-LacI_{NE} plazmid a csak NheI restriktációs endonukláz helyet tartalmazó pdUA-LacI_N DNS-sel azonos módon viselkedett, az ezeket tartalmazó baktériumtelepek fehérek maradtak minden esetben. A korábbiaktól eltérően most azok a baktériumtelepek is fehérek a Petri-csészéken, amelyek csak a cinkujj fehérje felismerési helyeket tartalmazó pdUA-LacI_{NE} DNS hordozókat tartalmazzák a fehérje génjétől mentesen. Ez egyértelmű bizonyíték, hogy a korábbi alkalommal nem azért kékültek be a baktériumtelepek, mert a sejtek genomiális DNS-e tartalmazna olyan DNS-kötő fehérje gént, ami képes hozzákapcsolódni az 1MEY# cinkujj fehérje felismerési helyéhez, hiszen ebben az esetben most is kék telepeket kellett volna kapnunk.

A negatív kontrollok mellett ebben a kísérletben a tényleges tesztreakcióknál is fehér baktériumtelepeket láthatunk, ahol az arabinózt tartalmazó Petri-csészére szélesztettük a pdUA-LacI_{NE}-S1a, -S1b vagy S1c és pBAD24-His-1MEY# DNS hordozókkal transzformált ER1821ΔLacI sejteket, holott amennyiben a fehérje kifejeződik, és hozzáköt a DNS-felismerési helyéhez, ennek nem lett volna szabad bekövetkeznie (28. ábra).



28. ábra: Megismételt Fehérje-DNS kölcsönhatás vizsgálat az I-Block rendszerben a pdUA-LacI_{NE}-S1a, pdUA-LacI_{NE}-S1b vagy pdUA-LacI_{NE}-S1c DNS hordozókat és a pBAD24-His-1MEY# cinkujj fehérjét felhasználva.

Ennek a meglepő eredménynek három magyarázata lehetséges. A His-1MEY# cinkujj fehérje kifejeződik a pBAD24-His-1MEY# plazmidról az arabinóz hatására, azonban nincs elegendő Zn(II) a sejten belül amit a fehérje fel tudna venni, és mint ismert a cinkujj fehérjék DNS-célszekvenciájukat csak holo-formában képesek megkötni (2.2 alfejezet) (29. ábra a). Ennek a feltevésnek ellentmond, hogy korábbi tapasztalataink alapján amikor cinkujj fehérjét állítottak elő kutatócsoportunkban, akkor rendszerint a tisztítási folyamat végén már Zn(II)-kötött formában sikerült megkapni a fehérjét. Csoportunkban azt is meghatározták továbbá, hogy a tanulmányozott 1MEY# cinkujj fehérje minden egyes kötőhelye fiziológias körülmények között *in vitro* pM-os affinitással képes megkötni a Zn(II)-t ($\lg\beta'_{\text{pH } 7,4} = 12,2$), emellett pedig a kontrollként Kiss Antal kutatócsoportjától kapott ZFA is egy cinkujj fehérje, amivel a reakció látszólag működik. Egy másik lehetőség, hogy habár a kifejeződött fehérjék Zn(II)-telített formában vannak jelen a sejten belül, azonban nem képesek hozzákötődni a DNS célszekvenciájukhoz, így nem is zavarják meg a *lac* represszor fehérje szintézisét (29. ábra b.). Ezt a lehetőséget szintén a kutatócsoportunk *in vitro* vizsgálatai árnyalják, ugyanis számos kísérletben igazolták már kutatótársaim, hogy az 1MEY# cinkujj fehérje hisztidin toldalékkal és anélkül is képes felismerni DNS célszekvenciáját. A His-toldalék nélküli fehérje-DNS komplex $\lg\beta'_{\text{pH } 7,4} = \sim 8$ stabilitású, ami egybevág több élő szervezetben is előforduló természetes cinkujj fehérje DNS affinitásával.



29. ábra: Sikertelen I-Block kísérlet lehetséges magyarázata sematikusán ábrázolva. Beépített cinkujj fehérje kötőhelye: zölddel, *lac* represszor fehérje és gén pirossal, RNS polimeráz rózsaszínnel, Cinkujj fehérjék kékkel jelölve.

Egy harmadik lehetőség, hogy habár képes megkötni a cinkujj fehérje a DNS célszekvenciát, azonban ez a kölcsönhatás nem elég erős, vagy a ~14 kDa-os cinkujj fehérje nem elég nagy ahhoz, hogy gátolja az RNS polimerázt (vagy a transzkripció egyéb résztvevőjét) működésében és az enzim lelöki a cinkujj fehérjét a kötőhelyéről, miközben végighalad a DNS szálon transzkripció során, amint ezt a 29. ábra c, része sematikusán ábrázolja.

5.8 Primer tervezés 1MEY-alapú plazmidokhoz 3. próba

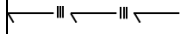
A második körben végrehajtott I-Block kísérletnél nem tudjuk teljesen biztosan megállapítani, hogy mi a probléma a rendszerünkkel, így több irányba is elmozdulhatunk megoldást keresve. Amennyiben a cinkujj fehérje túl kicsi, vagy a kölcsönhatás túl gyenge, megoldást jelenthet, ha több cinkujj alegységet kapcsolunk össze, mivel ezzel jelentősen növelhető a cinkujj fehérjék specifitása, és affinitása DNS célszekvenciájukhoz (2.3 fejezet). Az 1MEY# cinkujj fehérje három alegységből épül fel, míg a kontrollként alkalmazott 6ZA 6 alegységből. Egy cinkujj fehérje újratervezése igen bonyolult folyamat, továbbá az *in vitro* méréseink mind arra utalnak, hogy az 1MEY# cinkujj fehérje is funkcionális, így mielőtt ennek módosítására szánnánk el magunkat célszerű egyéb, könnyebben megvalósítható lehetőségeket is mérlegelni.

Ha a fehérje mérete vagy esetleg DNS-kötő affinitása lenne a probléma, megoldást jelenthet, ha több cinkujj fehérje felismerési helyet építünk be a pdUA-LacI_{NE} plazmidba egymást követően. Valójában az első DNS-hordozó verziók tervezésekor is voltak ilyen verziók (pdUA-LacI_N-N0, -N3, -N6), elképzelhető, hogy az pdUA-LacI_{NE} hordozóba beépítve már működőképesek lehetnek.

Az első körben tervezett DNS-ek annyira sok módosítást tartalmaztak, hogy már önmagukban megszüntették a *lac represszor* transzkripcióját, míg a második körös verzióban annyira minimalizáltuk a módosítások számát, hogy lehet pont ezért maradt túl stabilis a transzkripciót végző rendszer. Elméletben volna lehetőség olyan DNS-felismerési helyeket tervezni, amik pont annyi módosítást tartalmaznak, hogy DNS-kötő cinkujj fehérje hiányában még éppen képes az RNS polimeráz végrehajtani a transzkripciót, de a fehérje jelenlétében a folyamat már megszűnik.

Két koncepciót vizsgáltunk meg következő körben: az egyik esetben (pdUA-LacI_{NE}-T3e), a beépített rövid DNS szakasz az átellenes szálon 3 darab 1MEY# fehérje felismerési helyet és 2 darab HindIII hasítási helyet is tartalmaz. Mivel továbbra is a pdUA-LacI_{NE} DNS hordozót használtuk, így a 3 cinkujj fehérje felismerési hely beépítése ellenére a szekvencia hossza nem változott oly mértékben, mint a pdUA-LacI_N-S1 vagy pdUA-LacI_N-N0 DNS-ek

esetében. A másik koncepcióban (pdUA-LacI_N-S1*) abból indultunk ki, hogy a kontrollként jól funkcionáló pdUA-LacI_N-6ZA DNS hordozóban feltételezhetően optimális a szekvenciamódosítás értéke, így elképzelhető, hogyha ebben a DNS hordozóban alakítjuk ki pontmutáció segítségével az 1MEY# fehérje felismerési helyét, a rendszerünk működőképes lehet.

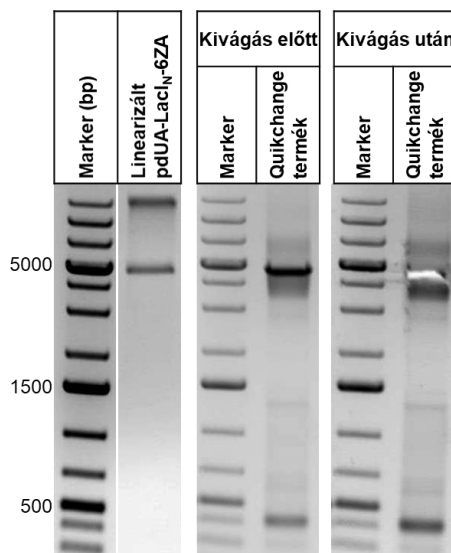
pdUA-LacI _N -T3e 	5' -CATGCTAGTTCTGCTCAAGCTTCTGCCTCAAGCTTCTGCCTCAATTCAGGGTGGTGAATGTG-3'
pdUA-LacI _N -S1* 	5' -CATGCTAGGCCGaGGCaGaaGGAGGGCTAGCGCCCGGAAGAGAGTCAATTCAG...GTG-3'

30. ábra: Az új cirkuláris DNS szekvenciája. HindIII hasítási hely: **kék kiemelés**, 1MEY# felismerési hely: **rózsaszín aláhúzás**, +1. bázis: **szürke kiemelés**.

5.9 pdUA-LacI_N-T3e és pdUA-LacI_N-S1* DNS-hordozók előállítása

A T3e verzió esetében a beépítendő rövid DNS szakaszt az 5' -CTAGTTCTGCCTCAAGCTTCTGCCTCAAGCTTCTGCCTC-3' és 5' -AATTGAGGCAGAAGCTTGAGGCAGAAGCTTGAGGCAGAA-3' oligonukleotidok hibridizálásával állítottuk elő 5.2 alfejezetben leírtak alapján, majd a ligálási reakciót az 5.6 alfejezettel azonos módon hajtottuk végre.

A pdUA-LacI_N-S1* DNS linearizált formáját a referencia pdUA-LacI_N-6ZA DNS Quikchange-típusú pontmutációjával állítottuk elő 4.10 alfejezet alapján. A reakció sikeres volt, a linearizált pdUA-LacI_N-6ZA DNS-sel azonos ~5000-bp-os mérettartományban látható a Quikchange minta fő terméke (31. ábra), azonban emellett ~1000 és ~400 bp környékén is észlelhetők további halvány sávok, így a fő reakcióterméket gélextrakcióval tisztítottuk meg (4.5.2 alfejezet).



31. ábra: NheI-linearizált pdUA-LacI_N-6ZA DNS összehasonlítása a quikchange reakció termékével gélből történő kivágás előtt és után 1%-os agaróz gélen vizsgálva. Marker: GeneRuler 1 kb Plus. A gélt 45 percig, 100 V-on futtattuk.

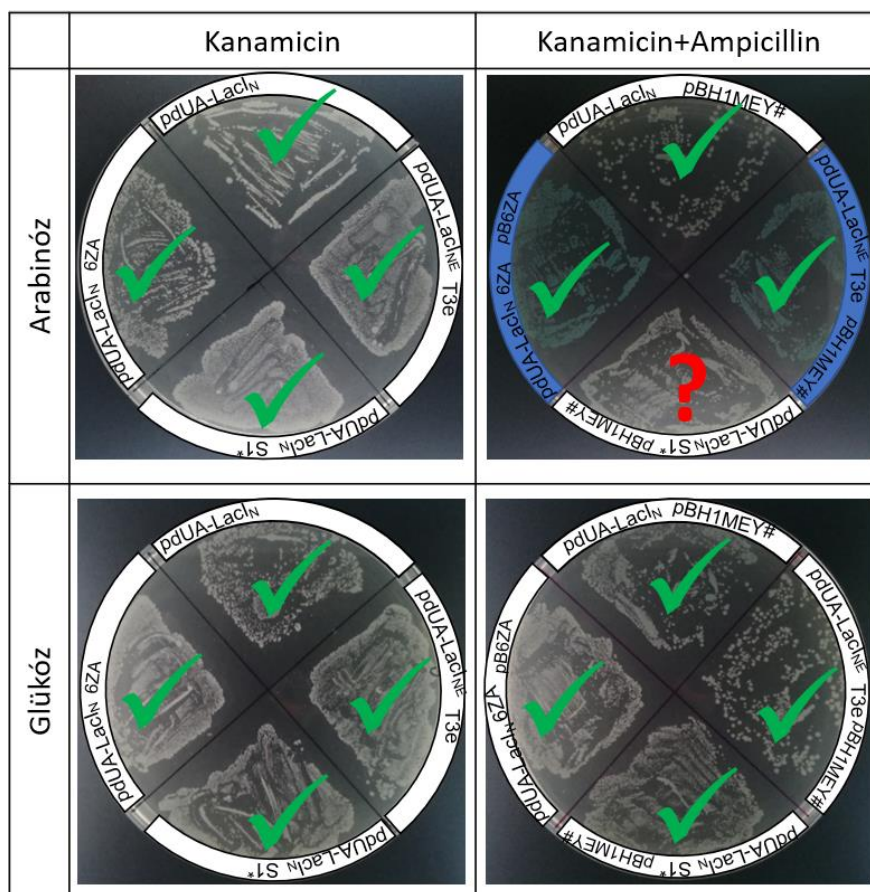
A tisztítást követően a DNS koncentrációjáról és tisztaságáról Nanodrop mérés segítségével győződünk meg. A 260 és 280 nm-en mért abszorbanciák hányadosa 1,71-nek bizonyult, így a ligálási reakcióhoz elfogadható tisztaságú DNS-t sikerült előállítanunk, melynek koncentrációja 9,7 ng/μl volt. A ligálást 4.1.2 alfejezetben leírtaknak megfelelően hajtottuk végre.

Mindkét DNS esetében sikeresek voltak a ligálási reakciók a szekvenálási eredmények alapján, amelyeket a 4.9 fejezetben leírtakkal analóg módon hajtottunk végre, így tovább haladhattunk az I-Block kísérletekkel.

5.10 I-Block kísérlet pdUA-LacI_{NE}-T3e és pdUA-LacI_N-S1* DNS hordozókkal

Mivel az 5.7 fejezetben végrehajtott kísérletben az S1a, S1b és S1c sejtek fehérek maradtak így a T3e, új DNS hordozó mellett, az S1* mintával is, illetve egy kontrollal is végrehajtottuk a tesztrendszer.

A DNS vektorok sejtekbe történő transzformálását (4.1.6) követően mindegyik mintából 10 μl-t kivettünk és 990 μl desztillált vízzel hígítottuk fel. Ezekből 20-20 μl-t vittünk fel a kifejezetten I-Block tesztrendszerhez készített Petri-csészék megfelelő részére.



32. ábra: A harmadik I-Block kísérlet eredménye.

A glükóz-tartalmú táptalajon látható eredmények mindegyike sikeresnek tekinthető, ugyanis ennek a cukornak a jelenlétében a fehérje kifejeződés gátolva van, így abban az esetben sem lehet kék a sejttelep, hogyha tartalmazta a fehérje génjét. Az arabinóz és kanamycin tartalmú táptalajon növesztett kontroll, a pdUA-LacI_N-6ZA és a pdUA-LacI_N-S1* is jól működő rendszereknek bizonyultak, mivel a telepek fehérek maradtak, ugyanis csak a cinkujj fehérje felismerési helyet tartalmazták szekvenciájukban, aminek köszönhetően a *lacI inhibitor* fehérje kifejeződik és a β -galaktozidáz nem termelődik, így nincs, ami elhasítaná az X-galt. Ugyan ezen a Petri-csészén látható pdUA-LacI_N, szekvenciájában nem tartalmaz mást, csak a *lac represszor* fehérje génjét, így ezt a DNS hordozót bejuttatva a módosított *E.coli* baktériumba fehér telepeket fogunk kapni, mivel ezáltal a *lac represszor* is jelen lesz a rendszerben, aminek hatására a β -galaktozidáz termelődése gátolva lesz. Szintén ezen a Petri-csészén található a pdUA-LacI_{NE}-T3e minta is. A vektor három cinkujj fehérje felismerési helyet is tartalmaz, amivel már elég jelentős mértékben módosítottuk a DNS szekvenciáját a kiindulási pdUA-LacI_{NE} DNS hordozóhoz képest, de ennek ellenére a rendszer még megfelelően működött, a sejttelpek fehér színűek maradnak.

A kanamicint, apmicillint és arabinózt tartalmazó Petri-csészéken a kontroll és a pdUA-LacI_{NE}-T3e+ pBAD24-His-1MEY# DNS-t tartalmazó baktériumok kék színt adtak, mivel szekvenciájukban megtalálható volt a fehérje felismerési hely, és maga a cinkujj fehérje génje is, így a β -galaktozidáz kifejeződött, és az X-gal glikozidos kötése elhasadtak. A másik két esetben a telepek fehérek maradtak, amely a pdUA-LacI_N + pBAD24-His-1MEY# minta esetében sikeresnek mondható, hiszen nincs olyan felismerési hely a DNS-ben, ahova a kifejeződő cinkujj fehérje képes lenne odakötni, így a festék sem bomlott el. Ezzel szemben a pdUA-LacI_N-S1* + pBAD24-His-1MEY# DNS-tartalmú sejtek telepeinek kék színűnek kellett volna lennie, hiszen elméletben az 1MEY# fehérjének fel kellett volna ismernie a pdUA-LacI_N-S1* DNS hordozóban található S1 fehérje felismerési helyet, ezzel gátolva a *lacI* inhibitor kifejeződését.

Mivel a T3e esetében láthatóak kék telepek, így biztosan megvalósult a cinkujj fehérje kifejeződése, és feltehetően ez ugyanúgy a pdUA-LacI_N-S1* mellett is bekövetkezik, így a sikertelen kísérlet oka nagy valószínűséggel, hogy a fehérjének nem sikerült kellő erősséggel hozzákötődni a célszekvenciájához. Ezek alapján a 29. ábra c, hipotézise tűnik helytállónak: egy fehérje önmagában nem volt képes kellő erősséggel koordinálódni ahhoz, hogy gátolja a *lacI* inhibitor gén transzkripcióját, de 3 fehérje együttes effektusa már elegendő volt. A jövőben ebből a tapasztalatból kiindulva további konstrukciókat is tervezünk kipróbálni, ahol 2 fehérje felismerési hely kerül beépítésre a pdUA-LacI_{NE} hordozóba, hogy jobban megérthessük a rendszer pontos működését.

5.11 β -galaktozidáz aktivitásának mérése oldatban

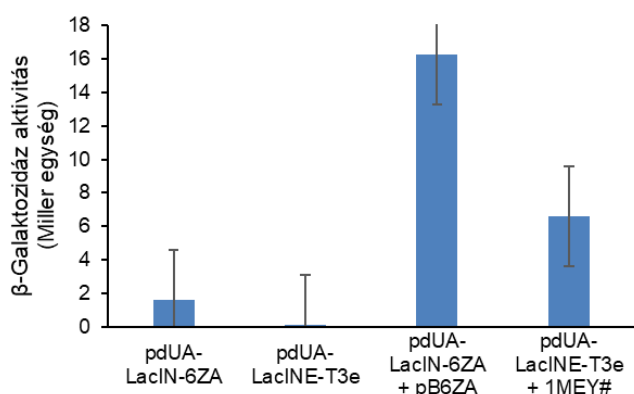
Miután sikerült előállítanunk egy olyan DNS hordozót (pdUA-LacI_{NE}-T3e), amivel kimutatható volt a fehérje-DNS kölcsönhatás a Petri-csészéken, megvizsgáltuk a sejtek viselkedését oldatban is.

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy valóban van enzim aktivitás az I-Block rendszerben, ezért a pdUA-LacI_{NE}-T3e cirkuláris DNS hordozót tartalmazó baktériumok mellett a pdUA-LacI_N-6ZA kontroll DNS-t tartalmazó baktériumokkal is megvizsgáltuk. Ehhez a minták glicerolos törzsoldatából kis mennyiséget 5 ml LB oldatban szaporítottunk, majd a 4.6 pontban leírtak szerint kezeltük a sejteket és követtük a minták fényelnyelésének változását 420, 550 valamint 600 nm-en.

11. táblázat: A β -galaktozidáz aktivitás mérésére felhasznált 4 minta.

	Inzertet tartalmazó plazmidok neve
1	pdUA-LacI _N -6ZA
2	pdUA-LacI _{NE} -T3e
3	pdUA-LacI _N -6ZA pB6ZA
4	pdUA-LacI _{NE} -T3e pBAD24-His-1MEY#

A mérések során kapott abszorbancia értékeket, úgynevezett Miller egységekre kellett átszámolni. Ezt a mértékegységet használják a β -galaktozidáz aktivitásának mérésére, ONPG jelenlétében. Az így kapott eredményeink a következők lettek.



33. ábra: β -galaktozidáz aktivitás mérésének eredménye.

A pdUA-LacI_N-6ZA DNS-t tartalmazó kontroll sejtek esetében gátolva van az ONPG-t bontó β -galaktozidáz enzim termelődése, ezáltal aktivitása is csak csekély értéket mutatott. Amennyiben a sejt tartalmazza a pB6ZA kontrol cinkujj fehérje génjét is, akkor a feltételek adottak ahhoz, hogy a β -galaktozidáz kifejeződjön és az oldatban lévő ONPG-t hidrolizálja. A megnövekedett enzimaktivitás a diagramon is jól látható, hiszen abban az esetben, amikor a fehérje DNS felismerési helye csak önmagában volt jelen a sejtben 2-es Miller egység körüli volt az enzim aktivitása, amely 17-as értékre növekedett, miután mindkét plazmid megtalálható volt a sejtben.

A kutatócsoportunk által előállított T3e inzertet tartalmazó sejtek esetében is szemmel látható az enzim aktivitásának növekedése a cinkujj fehérje génjének jelenlétében. Amíg a pdUA-LacI_{NE}-T3e sejtek esetében (32. ábra) fehér telepeket kaptunk, ezt a plate

reader eredményével összevetve azt mondhatjuk, hogy a kettő egymással összhangban van hiszen a szinte 0 Miller egység arra utal, hogy a β -galaktozidáz termelődésének mértéke elhanyagolható, így sem a Petri-csészéken, sem pedig oldatban nincs jelen az enzim, ami az X-Gal, vagy az ONPG-t elbontaná. Amint a módosított sejt, nem csak a T3e DNS szakaszt tartalmazza, hanem a cinkujj fehérje génjét is (pdUA-LacI_{NE}-T3e + pBAD24-His-1MEY#), akkor nem fejeződik ki a *lac represszor* fehérje, ami megakadályozná a β -galaktozidáz termelődését, így a Petri-csészéken kapott kék sejttelpeknek az oka, a diagramon látható 8-as Miller egységű enzimaktivitás. Érdemes megjegyezni, hogy habár a T3e felismerési helyet tartalmazó pdUA-LacI_{NE} DNS hordozó esetében tapasztalható enzimaktivitás oldatban, de ennek értéke hozzávetőleg fele a kontrollként alkalmazott 6ZA rendszerének. A jövőben alaposabban körbejárjuk a rendszert, hogy megbizonyosodjunk az itt tapasztalt aktivitások tekinthetőek-e kvantitatívnak, és valóban fele akkor aktivitása van az 1MEY# cinkujj fehérjének, mint a 6ZA variánsnak.

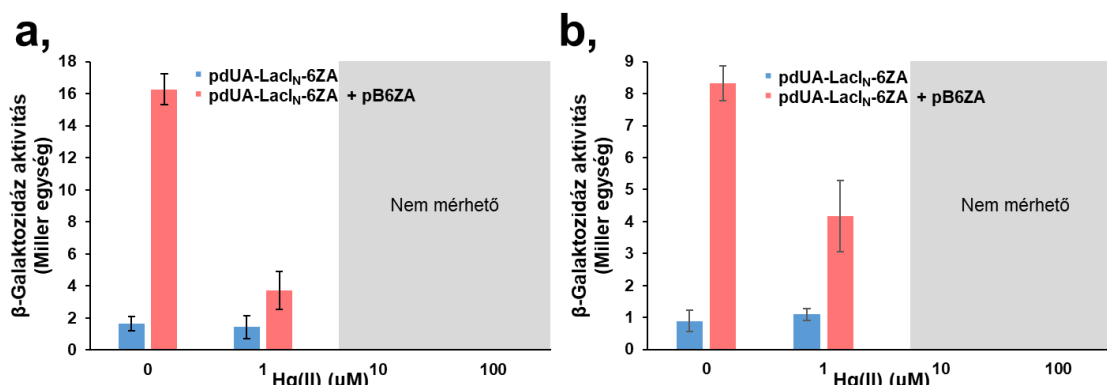
5.12 Toxikus fémionok hatásának vizsgálata I-Block tesztrendszer segítségével

Azzal párhuzamosan, hogy sikeresen kialakítottunk olyan DNS-hordozót, amely segítségével a kutatócsoportunk által fejlesztett cinkujj fehérjék és potenciális cinkujj-alapú mesterséges nukleázok tanulmányozhatók lehetnek sejten belül, megkíséreltük feltérképezni, hogy milyen egyéb alkalmazási lehetőségei vannak az I-Block tesztrendszernek. Amint azt az irodalmi áttekintésben is említettük, a cinkujj fehérjék megfelelő funkciójához elengedhetetlen a Zn(II) koordinációja, amit egyéb esszenciális, illetve a szervezetbe kerülő toxikus fémionok képesek lehetnek gátolni. Elméletben az I-Block rendszer lehetőséget biztosíthat rá, hogy a toxikus fémionok és cinkujj fehérjék kölcsönhatását akár sejten belül is vizsgálhassuk, ami nagy lehetőségeket rejthet magában, hiszen a téma szakirodalma igen hiányos, és sok az ellentmondás az egyes eredmények között (2.5 alfejezet).

A vizsgálatok során elsőként a Kiss Antalék kutatócsoportja által rendelkezésünkre bocsájtott pdUA-LacI_N-6ZA és pB6ZA DNS hordozókat tanulmányoztuk, mivel ezek kontrollként minden esetben megfelelően működtek akár a Petri-csésze alapú, akár az oldatban végrehajtott I-Block kísérletekben.

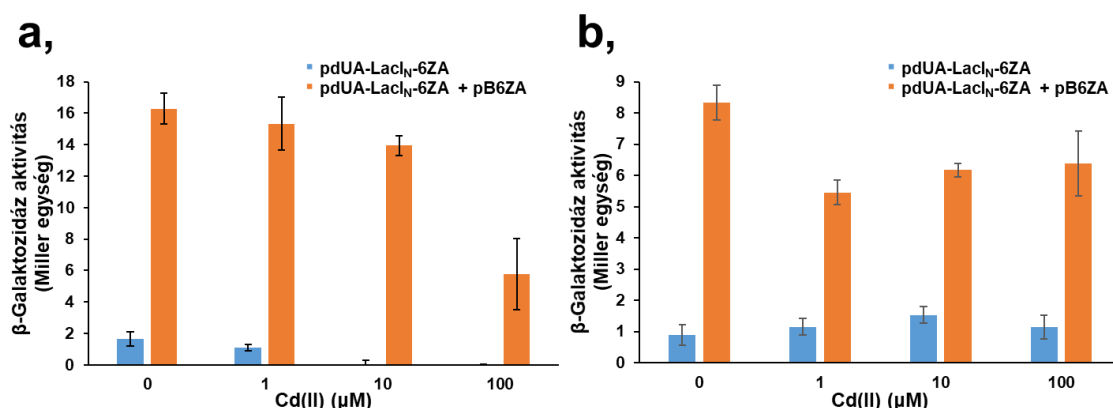
A sejteket kémcsőben, illetve tesztcsővekben szaporítottuk majd, amikor a baktérium szuszpenziók elérték a ~0,1 OD₆₀₀ értéket indukáltuk a mintákat a megfelelő cukorral 6 mM végkoncentrációban. Ekkor adtuk a mintákhoz a Cd²⁺-, vagy Hg²⁺-ionok törzsoldatát is 0, 1, 10 és 100 μ M végkoncentrációban, Ezt követően a baktérium kultúrákat még ~8 órán

keresztül inkubáltuk 30 °C-on, majd a Miller protokoll alapján (4.6) folytattuk az elegyek előkészítését a méréshez.



34. ábra: a, Testcsövekben és **b,** mikroplaten növesztett sejtek β -galaktozidáz aktivitásának mérése növekvő $\text{Hg}(\text{Cl})_2$ -koncentráció függvényében. Minden pont 3-3 ismétlés átlaga, a mérést platereaderben hajtottuk végre.

A pdUA-LacI_N-6ZA és pB6ZA DNS-eket tartalmazó sejtek esetében már 1 μM $\text{Hg}(\text{II})$ végkoncentráció hatására is csökkenés mutatkozott a β -galaktozidáz aktivitásban (34. ábra, rózsaszín oszlopok), habár tapasztalható némi eltérés a kémcsőben és mikroplaten szaporított sejtekkel végzett mérések között. A csak fehérje felismerési helyet (pdUA-LacI_N-6ZA) tartalmazó sejtek β -galaktozidáz aktivitása eközben végig egy relatíve konstans alap értéket mutatott, ami megfelel a várakozásoknak (34. ábra, kék oszlopok). 10 μM koncentrációnál nem volt detektálható β -galaktozidáz aktivitás, azonban itt érdemes megemlíteni, hogy ezesetben értelmezhető mértékű sejtnövekedést sem tapasztaltunk a fémion hatására, az inkubálást követő optikai denzitás gyakorlatilag megegyezett az indukciót megelőző értékkel ($\sim 0,1$ OD). A jövőben így érdemes lehet a kísérletet egyéb körülmények között is megismételni, ahol a $\text{Hg}(\text{II})$ -t nagyobb OD értéknél adjuk csak a mintákhoz, illetve ezt követően rövidebb indukálási időtartamot hagyunk a sejteknek. Ezzel információt nyerhetünk arról, hogy a higany ilyen koncentrációban csak a sejtek szaporodását gátolja, vagy a már meglévő sejteket is elpusztítja.



35. ábra: a, Testcsövekben és **b,** mikroplaten növesztett sejtek β -galaktozidáz aktivitásának mérése növekvő Cd(II)₂-koncentráció függvényében. Minden pont 3-3 ismétlés átlaga.

A Cd(II) a higanyal ellentétben nem volt képes gátolni a sejtek növekedését. Még 100 μ M koncentráció mellett is hozzávetőleg azonos ~ 1 OD optikai denzitást mértünk az inkubációs időszak végeztével. A Hg(II)-hoz hasonlóan a csak fehérje felismerési helyet (pdUA-LacI_N-6ZA) tartalmazó elegyek esetében a β -galaktozidáz aktivitás viszonylag alacsony. A növekvő Cd(II)-koncentráció függvényében a pdUA-LacI_N-6ZA és pB6ZA DNS-eket is tartalmazó sejtek β -galaktozidáz aktivitása némileg csökkent, habár a tendencia nem egyértelmű a két párhuzamos mérés között, így a jövőben ezeket a méréseket is meg fogjuk ismételni eltérő körülmények között. Ettől függetlenül az adatok azt sugallják, hogy a Cd(II) nem képes olyan mértékű gátló hatást gyakorolni a 6ZA cinkujj fehérje DNS-felismerésére, mint a Hg(II), ami egybevághat kutatócsoportunk *in-vitro* méréseivel.

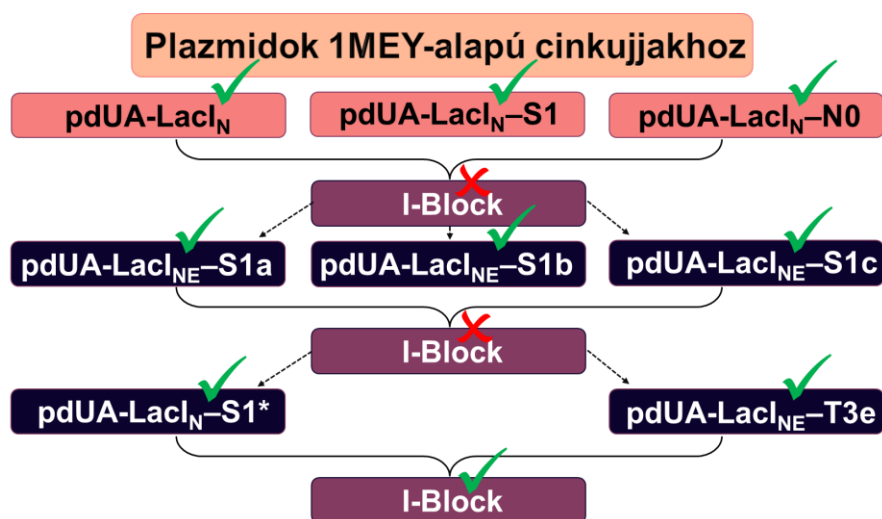
Összességében kijelenthető, hogy habár még számos kísérleti körülményt lehet és kell is optimalizálni, de az I-Block rendszer alkalmas lehet cinkujj fehérjék fémfüggések tanulmányozására is, így a jövőben tovább vizsgáljuk ezt az alkalmazási módot a 6ZA és a kutatócsoportunk által előállított 1MEY# cinkujj fehérjével is.

6 Összefoglalás

Kutatómunkám során elsődleges feladatomban olyan DNS-ek megtervezése volt, amelyekkel a kutatócsoportunk a jövőben átfogó vizsgálatokat folytathat az általunk tervezett potenciális cinkujj nukleázokkal akár *in vitro* akár *in vivo*.

Elsőként az 1MEY cinkujj fehérje DNS felismerési helyét terveztem át egy hatékonyabb hordozóvektorba. A terveket többszörösen újraértékelve optimalizáltam a DNS szekvenciákat, hogy azok a lehető leghatékonyabbak lehessenek mind a beépítés, mind a vizsgálatok során.

A komplex ligálási reakciók optimalizálása céljából előzetes kísérleteket végeztem el a pGEX plazmidal, majd a körülményeket sikeresen felhasználtam a pdUA-LacI_N plazmid esetében. Munkám során nagy valószínűséggel sikerült az N0-ás és N3-as inzertet beépíteni ebbe a hordozóvektorba 10:1 molarányú inzert:plazmid arány mellett, 16 °C-os, 20 órás inkubálást alkalmazva. Az S1 inzert esetén is lettek sikeres ligálási reakciók, ezeket szekvenálással alaposabban tanulmányoztam, hogy megállapítsam sikerült-e a kívánt szekvenciát beépíteni a plazmidba. Ezekhez a vizsgálatokhoz megterveztem az optimalizált detektálási módszert, amely alapja, egy 154 bp hosszúságú PCR fragmens sokszorosítása a mutált régióról. Így nem csupán az állapítható meg, beépült-e a fragmens, de az is, hogy hány darab.



36. ábra: Plazmid DNS tervek az 1MEY-alapú cinkujj fehérjékhez. A ✓-val jelölt terveket sikeresen megvalósítottuk és felhasználtuk az I-Block kísérlet végrehajtásához. Az ✗-el jelölt terveket azonban nem tudtuk a további kutatásaink során felhasználni. Az I-Block kísérleteknél szereplő ✗ a sikertelen, míg a ✓ a sikeres kísérleteket jelöli.

A szekvenálási reakciók eredményének sikeressége a 19. ábra 20. ábra látható. Ebből adódóan az S1 és N0 mintákkal elvégeztük az I-Block kísérletet többször is, ám arra a

következtetésre jutottunk, hogy a rendszer optimalizálására és a beépített rövid oligonukleotidok koncepciójának újratervezésére van szükség, a plazmid DNS kisebb mértékű módosításának céljából. Ezeket rövid DNS szakaszokat is sikeresen bejuttattuk cirkuláris DNS hordozóba, azonban ez egy plusz hasítási helyet is tartalmazott szekvenciájában. Az új DNS szakaszokat tartalmazó pdUA-LacI_{NE} esetében is végrehajtottuk az I-Block kísérletet, azonban ebben az esetben olyan kis mértékben módosítottuk a szekvenciát, hogy a transzkripcióért felelős rendszer túl stabil maradt.

Emiatt további cirkuláris DNS hordozókat terveztünk, amelyek a pdUA-LacI_{NE}-T3e és pdUA-LacI_N-S1* nevet kapták. A harmadik I-Block kísérletben az S1* inzertet tartalmazó rendszerek esetén, a fehérje és a célszekvenciája között nem alakult ki elég erős kölcsönhatás, azonban a T3e rövid DNS szakaszt tartalmazó baktériumokkal működőképes rendszer kaptunk. Ennek sikerességét nem csak Petri-csészén, hanem az oldatfázisban elvégzett β -galaktozidáz aktivitás méréssel is igazoltuk.

A továbbá az enzim aktivitást megvizsgáltuk olyan toxikus fémionok jelenlétében, mint a Hg(II) vagy Cd(II) ionok. Ezek alapján a Cd(II) a fehérje funkcióját kisebb mértékben gátolta, mint a Hg(II), azonban jövőben célunk, hogy az I-Block rendszer és a toxikus fémionok között kialakuló kölcsönhatásokat eltérő körülmények között is tanulmányozzuk, nem csak a kontroll, de a kutatócsoportunk által előállított 1MEY# cinkujj fehérjével is.

7 Irodalomjegyzék

- [1] R. Dutnall, D. Neuhaus és D. Rhodes, „The solution structure of the first zinc finger domain of SWI5: a novel structural extension to a common fold,” *Structure*, pp. 599-611, 1996.
- [2] J. H. Laity, B. M. Lee és P. E. Wright, „Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity,” *Structural Biology*, p. 39–46, 2001.
- [3] J. Miller, A. Klug és A. McLachlan, „Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes,” *The EMBO Journal*, pp. 1609-1614., 1985..
- [4] Y.-m. Lee és C. Lim, „Physical Basis of Structural and Catalytic Zn-Binding Sites in Proteins,” *J Mol Biol.*, pp. 545-53., 2008..
- [5] A. Sigel, E. Freisinger és R. Sigel, *Metal Ions in Life Science*, Berlin: Walter de Gruyter GmbH, 2020.
- [6] K. Kluska, J. Adamczyk és A. Krezel, „Metal binding properties, stability and reactivity of zinc fingers,” *Coordination Chemistry Reviews*, pp. 18-64, 2018.
- [7] S. S. Krishna, I. Majumdar és N. V. Grishin, „Structural classification of zinc fingers,” *Nucleic Acids Research*, pp. 532-550., 2003..
- [8] R. Gamsjaeger, C. Kong Liew, F. E. Loughlin, M. Crossley és J. P. Mackay, „Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs,” *TRENDS in Biochemical Sciences*, 2006.
- [9] R. De Guzman, H. Liu, M. Martinez-Yamout, H. Dyson és P. Wright, „Solution structure of the TAZ2 (CH3) domain of the transcriptional adaptor protein CBP,” *Journal of Molecular Biology*, pp. 243-253, 2000.
- [10] S. Dames, M. Martinez-Yamout, R. De Guzman, H. Dyson és P. Wright, „Structural basis for Hif-1 α /CBP recognition in the cellular hypoxic response,” *PNAS*, pp. 5271-5276, 2002.
- [11] J. Hanas, J. Larabee és J. Hocker, „Zinc Finger Interactions with Metals and Other Small Molecules,” in *Zinc Finger Proteins: From Atomic Contact to Cellular Function*, New York, Kluwer Academic / Plenum Publisher, 2010, pp. 39-46.
- [12] G. Malgieri, L. Russo, S. Esposito, I. Baglivo, L. Zaccaro, E. Pedone, B. Di Blasio, C. Isernia, P. Pedone és R. Fattorusso, „The prokaryotic Cys2His2 zinc-finger adopts a novel fold as revealed by the NMR structure of *Agrobacterium tumefaciens* Ros DNA-binding domain,” *PNAS*, pp. 17341-17346, 2007.
- [13] H. Takatsuji és T. Matsumoto, „Target-Sequence Recognition by Separate-type Cys2/His2 Zinc Finger Proteins in Plants,” *Journal of Biological Chemistry*, pp. 23368-23373, 1996.
- [14] A. Fedotova, A. Bonchuk, V. Mogila és P. Georgiev, „C2H2 Zinc Finger Proteins: The Largest but Poorly Explored Family of Higher Eukaryotic Transcription Factors,” *Acta Nature*, pp. 47-58, 2017.
- [15] S. Wolfe, E. Ramm és C. Pabo, „Combining structure-based design with phage display to create,” *Structure*, pp. 739-750, 2000.

- [16] E. Peisach és C. O. Pabo, „Constraints for Zinc Finger Linker Design as Inferred from X-ray Crystal Structure of Tandem Zif268-DNA complexes,” *Journal of Molecular Biology*, pp. 1-7., 2003..
- [17] J. Lee, J. Kim és C. Seok, „Cooperativity and Specificity of Cys2His2 Zinc Finger Protein-DNA Interactions: A Molecular Dynamics Simulation Study,” *The Journal of Physical Chemistry B*, pp. 7662-7671, 2010.
- [18] J. D. Sander, M. L. Maeder, D. Reyon, D. F. Voytas, J. K. Joung és D. Dobbs, „ZiFiT (Zinc Finger Targeter): an updated zinc finger engineering tool,” *Nucleic Acids Research*, pp. 462-468, 2010.
- [19] S. Negi, M. Imanishi, M. Matsumoto és Y. Sugiura, „New Redesigned Zinc-Finger Proteins: Design Strategy and Its Application,” *Chemistry—A European Journal*, pp. 3236-3249, 2008.
- [20] S. Wolfe, L. Nekludova és C. Pabo, „DNA Recognition by Cys2His2 Zinc Finger Proteins,” *Annual Review of Biophysics*, pp. 183-212, 2000.
- [21] J. G. Mandell és C. F. Barbas III., „Zinc Finger Tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases,” *Nucleic Acids Research*, pp. 516-623, 2006.
- [22] M. Isalan, „Zinc-finger nucleases: how to play two good hands,” *Nature Methods*, pp. 32-34, 2011.
- [23] D. Davis és D. Stokoe, „Zinc Finger Nucleases as tools to understand and treat human diseases,” *BMC Medicine*, 2010.
- [24] J. D. Sander, L. M. Maeder, D. Reyon, D. F. Voytas, J. K. Joung és D. Dobbs, „ZiFiT (Zinc Finger Targeter): an updated zinc finger engineering tool,” *Nucleic Acids Research*, pp. 462-468, 2010.
- [25] J. Smith, M. Bibikova, F. G. Whitby, A. R. Reddy, S. Chandrasegaran és D. Carroll, „Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains,” *Nucleic Acids Research*, pp. 3361-3369, 2000.
- [26] D. A. Wah, J. A. Hirsch, L. F. Dorner, I. Schildkraut és A. K. Aggarwal, „Structure of the multimodular endonuclease FokI bound to DNA,” *Nature*, pp. 97-100, 1997.
- [27] S. Durai, M. Mani, K. Kandavelou, J. Wu, M. H. Porteus és S. Chandrasegaran, „Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells,” *Nucleic Acids Research*, pp. 5978-5990, 2005.
- [28] M. Szczepek, V. Brondani, J. Büchel, L. Serrano, D. J. Segal és T. Cathomen, „Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases,” *Nat Biotechnol.*, pp. 786-93, 2007.
- [29] Y. S. Cheng, K.-C. Hsia, L. G. Doudeva, K.-F. Chak és H. S. Yuan, „The Crystal Structure of the Nuclease Domain of Colicin E7 Suggests a Mechanism for Binding to Double-stranded DNA by the H–N–H Endonucleases,” *Journal of Molecular Biology*, pp. 227-236, 2002.
- [30] G. Papadakos, J. A. Wojdyla és C. Kleanthous, „Nuclease colicins and their immunity proteins,” *Quarterly Reviews of Biophysics*, pp. 57-103, 2011.
- [31] E. Németh, M. N. Asaka, K. Kato, Z. Fábán, C. Oostenbrink, H. E. Christensen, K. Nagata és B. Gyurcsik, „Chemical Approach to Biological

- Safety: Molecular-Level Control of an Integrated Zinc Finger Nuclease,” *Chembiochem*, pp. 66-75, 2018.
- [32] E. Németh, G. K. Schilli, G. Nagy, C. Hasenhindl, B. Gyurcsik és C. Oostenbrink, „Design of a colicin E7 based chimeric zinc-finger nuclease,” *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, pp. 841-850, 2014.
- [33] R. Zefferino, C. Piccoli, N. Ricciardi, R. Scrima és N. Capitanio, „Possible Mechanisms of Mercury Toxicity and Cancer Promotion: Involvement of Gap Junction Intercellular Communications and Inflammatory Cytokines,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.
- [34] G. Makowski, S. Lin, S. Brennan, H. Smilowitz, S. Hopfer és F. Sunderman, „Detection of two Zn-finger proteins of *Xenopus laevis*, TFIIIA, and p43, by probing western blots of ovary cytosol with $^{65}\text{Zn}^{2+}$, $^{63}\text{Ni}^{2+}$, or $^{109}\text{Cd}^{2+}$,” *Biological Trace Element Research*, %1. kötet29, pp. 93-109, 1990.
- [35] J. Kuwahara és J. E. Coleman, „Role of the zinc(II) ions in the structure of the three-finger DNA binding domain of the Sp1 transcription factor,” *Biochem*, %1. kötet29, %1. szám37 <https://doi.org/10.1021/bi00489a019>, pp. 8627-8631, 1990.
- [36] J. S. Hanas és C. G. Gunn, „Inhibition of Transcription Factor IIIA-DNA Interactions by Xenobiotic Metal Ions,” *Nucleic Acids Res*, %1. kötet24, %1. szám5 <https://doi.org/10.1093/nar/24.5.924>, pp. 924-930, 1996.
- [37] M. Huang, D. Krepiy, W. Hu és D. H. Petering, „Zn-, Cd-, and Pb-transcription factor IIIA: properties, DNA binding, and comparison with TFIIIA-finger 3 metal complexes,” *J. Inorg. Biochem.*, %1. kötet98, %1. szám5 <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.01.014>, pp. 775-785, 2004.
- [38] D. H. Petering, M. Huang, S. Moteki és C. F. Shaw, „Cadmium and lead interactions with transcription factor IIIA from *Xenopus laevis*: A model for zinc finger protein reactions with toxic metal ions and metallothionein,” *Mar. Env. Rev.*, %1. kötet50., %1. szám1-5 [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00099-4](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00099-4), pp. 89-92., 2000..
- [39] D. Krepiy, H. F. Försterling és D. H. Petering, „Interaction of Cd^{2+} with Zn Finger 3 of Transcription Factor IIIA: Structures and Binding to Cognate DNA,” *Chem. Res. Toxicol.*, %1. kötet17, %1. szám7 <https://doi.org/10.1021/tx030057+>, pp. 863-870, 2004.
- [40] R. Kothinti, A. Blodgett, N. M. Tabatabai és D. H. Petering, „Zinc Finger Transcription Factor Zn^{3+} -Sp1 Reactions with Cd^{2+} ,” *Chem. Res. Toxicol.*, %1. kötet23, %1. szám2 <https://doi.org/10.1021/tx900370u>, pp. 405-412, 2010.
- [41] R. K. Kothinti, A. B. Blodgett, D. H. Petering és N. M. Tabatabai, „Cadmium down-regulation of kidney Sp1 binding to mouse SGLT1 and SGLT2 gene promoters: Possible reaction of cadmium with the zinc finger domain of Sp1,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, %1. kötet244, %1. szám3 <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.12.038>, pp. 254-262, Toxicol Appl Pharmacol.
- [42] D. Bittel, T. Dalton, S. L. A. Samson, L. Gedamu és G. K. Andrews, „The DNA Binding Activity of Metal Response Element-binding Transcription Factor-1 Is Activated in vivo and in Vitro by Zinc, but Not by Other Transition

- Metals*,” *J Biol Chem*, %1. kötet273, %1. szám12 <https://doi.org/10.1074/jbc.273.12.7127>, pp. 7127-7133, 1998.
- [43] G. Malgieri, M. Palmieri, S. Esposito, V. Maione, L. Russo, I. Baglivo, I. de Paola, D. Milardi, D. Diana, L. Zaccaro, P. V. Pedone, R. Fattorusso és C. Isernia, „Zinc to cadmium replacement in the prokaryotic zinc-finger domain,” *Metallomics*, %1. kötet6, %1. szám1 <https://doi.org/10.1039/c3mt00208j>, pp. 96-104, 2014.
- [44] J. Dr. Barna, K. Dr. Lengyel, K. Dr. Vellainé Takács, V. Billes, T. Kovácsné Dr. Sigmond, M. Dr. Varga, P. Dr. Horváth, E. Dr. Ari és T. Dr. Vellai, *Genetikai gyakorlatok*, 2011.
- [45] S. Szentes, N. Zsibrita, M. Koncz, E. Zsigmond, P. Salamon, Z. Pletl és A. Kiss, „I-Block: a simple Escherichia coli-based assay for studying sequence-specific DNA binding of proteins,” *Nucleic Acids Research*, 2020.
- [46] P. Nambisan, „Recombinant DNA Technology and Genetically Modified Organisms,” in *An Introduction to Ethical, Safety and Intellectual Property Rights Issues in Biotechnology*, Academic press, 2017, pp. 83-126.
- [47] W. A. Kibbe és R. H. Lurie, „Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator,” Feinberg School of Medicine, Northwestern University, 1996. [Online]. Available: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>. [Hozzáférés dátuma: 26. 04 2021].
- [48] B. R. Somalinga és R. P. Roy, „Volume Exclusion Effect as a Driving Force for Reverse Proteolysis,” *The Journal of Biological Chemistry*, p. 43253–43261, 2002.
- [49] „ImageJ,” National Institutes of Health and the Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, [Online]. Available: <https://imagej.nih.gov/ij/>. [Hozzáférés dátuma: 21. 05. 2021.].

8 Rövidítések

bp	Bázispár
RNáz	RNS molekulát hasító enzim
DNáz	DNS hasító enzim
plazmid	Cirkuláris DNS hordozó
pdUA-LacI _N	Low copy/ kis kópiaszámú plazmid, kanamicin rezisztens
tompá végek	DNS hasítás az 5' és 3' végen ugyan ott történik
ragadós végek	DNS hasítás az 5' és 3' végen nem ugyan ott történik
rpm	Percenkénti fordulatszám (revolution per minute)
Tris	Trisz(hidroximetil)-aminometán
1×TE	10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8
PCR	Polimeráz láncreakció, DNS sokszorozásra alkalmas
Escherichia coli	Kólibaktérium, röviden <i>E.coli</i>
DH5α	<i>E.coli</i> baktériumtörzs
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> -ből származó restrikciós endonukleáz
EcoRI	<i>E.coli</i> baktériumól származó restrikciós endonukleáz
NheI	<i>Neisseria mucosa heidelbergensis</i> baktériumból izolált restrikciós endonukleáz
HindIII	Olyan rekombináns <i>E.coli</i> baktérium amely a <i>Haemophilus influenzae</i> génjét tartalmazza
NcoI	<i>Nocardia corallina</i> baktériumból izolált restrikciós endonukleáz
Taq polimeráz	<i>Thermus aquaticus</i> hőtűrő baktériumból kinyert enzim
T4 DNA ligáz	T4 bakteriofágból (amely <i>E.coli</i> baktériumot tud fertőzni) kinyert ligáz enzim
DTT	Ditiotretol
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát
PEG	Polietilén-glikol
LB	Luria-Bertani
X-gal	5-bróm-4-klór-3-indolil-β-D-galaktopiranozidáz
ONPG	orto-nitofenil-β-D-galaktopiranozid
CTAB	hexadecil-trimetil-ammónium-bromid

9 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Dr. Gyurcsik Bélának, amiért lehetőséget biztosított rá, hogy tudományos diákköri dolgozatomat a Bioszervetlen Kémia Kutatócsoport tagjaként írjam meg.

Köszönöm Hajdu Bálintnak, hogy minden egyes nap türelmesen állt hozzám és hogy lelkesedésével mindig motivált. Emellett szeretném megköszönni azt a rengeteg időt és energiát, amit rám fordított. Köszönettel tartozom neki a kísérletek során nyújtott segítségéért és a szakmai tanácsaiért, amikkel a kutatómunkám során ellátott.

Szeretném megköszönni a kutatócsoport másik PhD hallgatójának Nafae Zeyad Hasan Abdullahnak is a kutatásomban nyújtott segítséget.

Köszönettel tartozom Kiss Antalék kutatócsoportjának, akik a megtervezett primerjeinket leszintetizálták és a szükséges plazmidokat rendelkezésünkre bocsátották.

Végül szeretném megköszönni Dr. Enyedy Évának, a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékvezetőjének, hogy lehetővé tette, hogy a kutatásaim során a tanszéken dolgozhassak.

10 Függelék

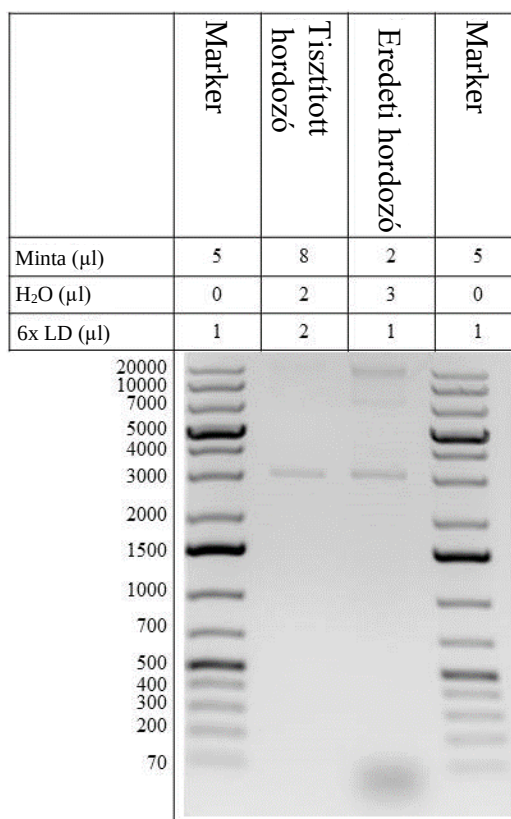
10.1 pBAD24-His-1MEY# DNS hordozó sokszorosítása

Azonban ahhoz, hogy a fehérje génjét tartalmazó DNS-eink is legyenek, ehhez először a pBAD24-His-1MEY# hordozót sokszorozására volt szükség, amit a vektor glycerol-stockjából készítettem el 4.2 fejezetben leírtak szerint. Az egy éjszakán át tartó inkubálást követően a sejtes elegyeket a GeneJET Plasmid Maxiprep Kit-tel tisztítottam meg és 500 µl 1x-es TE oldatban oldottam vissza. Ezt követően a DNS tisztaságát vizsgáltam meg.

12. táblázat: A megtisztított DNS NanoDrop vizsgálata.

A260/280	1,91
C (ng/µl)	110,8

A fényelnyelésből látható, hogy valamilyen fehérje szennyeződés maradhatott a mintában, mivel a tiszta DNS 260 és 280 nm-en mért fényelnyelésének aránya 1,8, azonban a kapott érték 1,9. Ezért polietilén-glikollal tisztítottam meg a mintát a szennyeződésektől. Ezt követően a megvizsgáltam az eredeti és az általam sokszorozított DNS-eket gélelektroforézis segítségével.



37. ábra Az eredeti és az általam sokszorozított minták gélelektroforézis eredménye. A mintákat 15 %-os poliakrilamid gélen 100 V-on, 1 órán át futtattam. Markerként a GeneRuler 1 kb Plust használtam. A gél zsebei ~ 50 ng DNS-t tartalmaznak.