

A genomi DNS-ben megjelenő uracil kimutatása különböző betegmintákban és betegségmodellekben

Batka András

Pannonhalmi Bencés Gimnázium és Szakkollégium

Témavezető: Dr. Békési Angéla

BME, VBK, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi
Tanszék

Hun-Ren TTK Enzimológiai Intézet, Genom Metabolizmus
Kutatócsoport

I. Tartalomjegyzék

I. Tartalomjegyzék.....	1
II. Köszönetnyilvánítás.....	3
III. Rövidítésjegyzék.....	4
IV. Bevezetés.....	6
V. Irodalmi áttekintés.....	8
1. A DNS-ről általában.....	8
2. A DNS károsodása és hibajavítása.....	9
2.1. Spontán citozin dezaminálódás és javítása.....	9
2.2. Enzim katalizálta citozin dezaminálódás a DNS-ben és ennek biológiai szerepe.	11
3. Timint helyettesítő uracil beépülésének elkerülése - “preventív DNS javítás”	12
4. A timidilát bioszintézis gátlása, mint rákterápiás stratégia.....	14
5. Nukleotid anyagszere zavarok különböző betegségek hátterében.....	14
6. Enzimatiszitozin dezaminálás kontrollálatlan aktiválódása kemoterápiában.....	16
VI. Célkitűzés.....	18
VII. Anyagok és módszerek.....	20
1. Vizsgált minták és alkalmazott uracil-DNS szenzorok.....	20
1.1. Gemcitabinnal kezelt mutáns (apobec3c, apobec3d, ung génkiütött (KO)) hasnyálmirigyrák sejtvonalból izolált genomi DNS (Grant Brown & Tajinder Ubhi, Torontói Egyetem, Kanada).....	20
1.2. Betegminták: jóindulatú vastagbél szöveti daganatok, és ugyanezek egészséges biopsziás mintái, valamint teljes egészségnek örvendő egyének ugyanilyen biopsziás szövetmintái (Molnár Béla, SOTE, Belgyógyászati Klinika & 3DHisTech Kft.).....	21
1.3. Uracil-DNS szenzorok.....	22
1.3.1. Inaktív UNG alapú konstruktok: flag-ΔUNG és (biotin)Avitag-ΔUNG.....	23
1.3.2. Udgx alapú konstruktok: flag-UdgX és (biotin)Avi-UdgX.....	24
2. Uracil-DNS szenzorok előállítása.....	25
2.1. Avi-ΔUNG konstrukttisztítása AVB101 (Avidity) törzsben termelve.....	25
2.2. Ung- BL21 törzsben termelt Avitag-ΔUNG tisztítása és in vitro biotinilálása.....	27
2.3. GST-Avi-UdgX tisztítása Bl 21 törzsben termelve.....	28
3. SDS-PAGE.....	29
4. Western blot.....	30
5. Uracil-DNS mennyiségi meghatározása.....	30
5.1. DNS gélelektroforézis.....	30
5.2. DNS koncentráció meghatározása (UV spektrum (NanoDrop), Qubit fluoreszcens esszék).....	31
5.3. Uracil csepp blot.....	33
VIII. Eredmények és értékelésük.....	39
1. AVB101 sejtekben termeltetett és in vivo biotinilált Avi-ΔUNG fehérje konstruktt előállítása (március 13-14, Andris).....	39
2. Avi-ΔUNG illetve GST-Avi-UdgX konstruktok tisztítása és in vitro biotinilálása.....	41

3. Az előállított szenzorok tesztelése alacsony uracil tartalmú mintákon csepp bloton.....	46
4. Betegminták uraciltartalmának vizsgálata: jóindulatú vastagbél szöveti daganatok és egészséges biopsziás mintapárok, valamint teljes egészséges egyének biopsziás mintáiból izolált genomi DNS (Molnár Béla, SOTE, Belgyógyászati Klinika & 3DHisTech Kft.)...50	
5. Gemcitabinnal kezelt mutáns (apobec3c, apobec3d, ung génkiütött (KO)) hasnyálmirigyrák sejtvonalból izolált genomi DNS (Grant Brown & Tajinder Ubhi, Torontói Egyetem, Kanada).....	53
IX. Összegzés.....	55
X. Irodalomjegyzék.....	56
XI. Függelék.....	59
1. A használt konstruktok szekvenciái:.....	59
1.1. A vad típusú UNG szekvenciája:.....	59
1.2. 3XFLAG-ΔUNG.....	59
1.3. Avitag-ΔUNG.....	59
1.4. Avitag-UdgX.....	59
1.5. His-FLAG-UdgX:.....	60
1.6. GST-Avitag-FLAG-UdgX:.....	60
2. Pufferoldatok:.....	60
2.1. LB média:.....	60
2.2. Lizis puffer.....	60
2.3. Wash puffer.....	61
2.4. High Salt (HS) puffer.....	61
2.5. Elució puffer.....	61
2.6. Dialízis puffer.....	61
2.7. CAPS puffer.....	62
2.8. TBS puffer.....	62
2.9. TBS-T puffer.....	62
2.10. Western blot blokkoló puffer.....	62
2.11. UNG puffer.....	62
2.12. ETBS puffer.....	62
2.13. ETBS-T puffer.....	63
2.14. Dot blot blokkoló puffer.....	63
2.15. TE puffer.....	63
2.16. PBS puffer.....	63
2.17. A puffer.....	63

II. Köszönetnyilvánítás

Megkülönböztetett hálás köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Békési Angélának, aki mindig mérhetetlenül nagy segítséget nyújtott számomra a laborban és azon kívül is.

Köszönöm Prof. Vértessy G. Beátának, hogy lehetőséget adott nekem, hogy kutatócsoportjában dolgozhattam.

Köszönöm Prof. Huszty Péternek, akit először sikerült megtalálnom, és összekötött Angélával.

Köszönöm a Genom Metabolizmus Kutatócsoport minden tagjának, hogy mindig segítségemre voltak, ha éppen szükségem volt rá, és fordulhattam hozzájuk a kérdéseimmel.

Köszönöm szüleimnek, és barátaimnak, akik elindítottak ebben a kutatási projektben, és végig motiválóan hatottak rám.

Végezetül pedig köszönöm barátaimnak is, hogy végig megértőek voltak velem, és ösztönöztek eddig is és most is a tanulmányi projektjeim haladására.

III. Rövidítésjegyzék

Rövidítés	Jelentés
5,10-MTHF	5,10-metiléntetrahidrofolát
AID	Aktiváció indukált citidin dezamináz
APOBEC	apolipoprotein B mRNA-szerkesztő enzim, katalitikus protein
CAPS puffer	3-ciklohexilamino-1-propánszulfonsav, puffer alapanyag
CRC	vastagbélrák (colon rectal cancer)
dCTP	dezoxi-citidin-trifoszfát
DNS	dezoxiribonukleinsav
dsDNS	kétszálú DNS
dTMP	dezoxi-timidin-monofoszfát
dTTP	dezoxi-timidin-trifoszfát
dUMP	dezoxi-uridin-monofoszfát
dUTP	dezoxi-uridin-trifoszfát
dUTPáz	dezoxi-uridin-trifoszfátáz
<i>E. coli</i>	<i>Escherchia coli</i>
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ETBS puffer	EDTA-s TBS puffer ("EDTA Tris Buffer Saline")
ETBS-T puffer	Tween-20 detergenst is tartalmazó EDTA-s TBS puffer
FLAG	bakteriális flagellin fehérjéből származó rövid peptid, affinitás címkeként használatos
GST	glutation-S-transzferáz
HRP	Torma peroxidáz ("Horse Radish Peroxidase")
Ni ²⁺ -NTA	nikkel-nitrilo-triecetsav
PBS	fiziológiás sókoncentrációjú foszfát puffer
PMSF	fenil-metil-szulfonil-klorid
RNS	ribonukleinsav
SDS-PAGE	Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
ssDNS	egyszálú DNS

TAE	Tris, acetát, EDTA puffer
TBS puffer	fiziológiás sókoncentrációjú Tris puffer
TBS-T puffer	Tween-20 detergenst is tartalmazó TBS puffer
TE puffer	EDTA tartalmú Tris puffer
TS	timidilát-szintáz
Tris	Tri-hidroximetil-aminometán
UDG	Uracil-DNS-glikoziláz enzimcsalád
UdgX	Mikobaktériumban azonosított sajátos UDG
UNG	Uracil-N-DNS-glikoziláz, a fő UDG enzim

IV. Bevezetés

A dezoxiribonukleinsav (DNS) minden élő szervezetben a genetikai információ tárolására, és tovább örökítésére szolgál. Alapvetően 4 féle bázisból áll, ezek a timin (T), az adenin (A), a citozin (C) és a guanin (G), melyek sorrendisége hordozza a genetikai információt. Ellenben minden szervezet DNS-e folyamatosan mutálódik, változik, károsodik. Ez természetes, hiszen a DNS-t sok behatás éri akár a környezetéből, akár direkt enzimatikus hatásokból.

Ebben a kutatásban mi a DNS uracil tartalmát vizsgáltuk. A DNS előbbi rövidke ismertetéséből is kiolvasható, hogy a DNS szabály szerint nem tartalmaz uracilt. Ellenben különböző hatásokra, mint például oxidatív ágensek hatására keletkezhet uracil spontán is a DNS-ben, amelyet aztán a hibajavító mechanizmusok megpróbálnak az eredetire visszaállítani. A leggyakoribb ilyen mutáció a citozin dezaminálódás, amely bekövetkezhet mind spontán, mind enzim katalizált módon. Ha ez később nem korrigálódik, ez pontmutációhoz vezethet, hiszen a citozin a guaninnal képez bázispárt, míg az uracil a timinhez hasonlóan az adeninnel.

Ugyanakkor ez a változás lehet “szándékos” is. Ilyen a “szándékosságot” figyelhetünk meg az adaptív immunválasz során bekövetkező hipermutáció során. Az adaptív immunválasz célja, hogy minél hamarabb megtalálja a megfelelő specifikus antitestet az adott kórokozó antigénjeivel szemben. Ilyen esetben rendkívül hasznos egy ilyen katalizált mutáció sorozat bekövetkezése, amely nagyon sokféle specifitású antitestet fog eredményezni, melyekből klonálisan kiválasztódhatnak azok, amelyek ténylegesen specifikusan felismerik az immunválasz során bemutatott antigéneket.

A fenti folyamatban nagy katalizátorként nagy szerepet betöltő activation induced DNA cytosine deaminase (AID), szintúgy mint az enzim családjának többi tagja, az Apolipoprotein B mRNA Editing Cytosine deaminase (APOBEC) enzimek, szabályozott működése hasznos, ellenben kontrollálatlan aktivitásuk, akár rákos elfajulás vagy további tumorevolúció melegágya is lehet. A rákos betegekből származó genomszekvenálási adatokban kimutatható ezen enzimekhez köthető mutációs mintázat (1). Illetve arra is van kísérletes adat, hogy a széleskörben alkalmazott rákellenes kemoterápiás szerek bizonyos helyzetekben képesek az APOBEC enzimesalád tagjait rendellenes módon aktiválni, ami az amúgy is szétesett szabályozású tumorsejtekben további mutációkhoz, így felgyorsult tumorevolúcióhoz, áttétképződéshez, vagy akár gyógyszerrezisztencia megjelenéséhez is vezethet (2).

Az uracil tartalmú DNS azonban még más síkokban is összefüggésbe hozható a rákos megbetegedésekkel. Egyrésztől régóta elterjedten alkalmazott rákterápiás eljárás a timidilát bioszintézisének gátlása, amelyen keresztül így megnő a sejtbeli deoxiuracil-trifoszfát (dUTP) / deoxitimin-trifoszfát (dTTP) arány a sejtben, hiszen lecsökken a dTTP szintézise, amely egyébként dUTP-ből keletkezik. Azonban lévén, hogy az uracil a timin analógjaként tud viselkedni így a dTTP-ben hiányt szenvedő sejt timin helyett uracil épít be a DNS-be, így jelentősen megnövelve annak uracil tartalmát. A túlzott uracil szint felerősített mértékű aktivizációját eredményezi a javító mechanizmusoknak. Így tehát a DNS-szintézis akadályozása mellett, a túlzott javítások miatt felszaporodó száltöréses köztitermékek programozott sejthalált váltanak ki a sejtéből. Tudván, hogy a rákos sejtek különösen gyorsan osztódnak, így érthető, hogy ez a stratégia miért is igazán hatékony ezek szaporodásának gátlására.

Másrésztől azonban ismert, hogy a rákos sejtvonalak DNS-e jellemzően alulmetilált. Ez visszavezethető a sejtbeli metildonorok alacsony szintjére, vagy akár általános hiányukra. Lehetséges így akár az is, hogy emiatt a timidilát bioszintézis is kárt szenved, hiszen ehhez a folyamathoz is szükség van metildonorra, és ez gyakoribb genomi uracil beépüléshez vezet

Ebben a kutatásban két kollaborációs projektből származó DNS minták uracilosodását vizsgáltam. Az egyikben kemoterápiás szerrel kezelt hasnyálmirigy rák sejtvonalban a kezelés során rezisztenciát mutató sejtekben az APOBEC-ek indukálódását mutatták ki - ezek nyomán a DNS-ben megjelenő uracil többletet szeretnénk volna kimérni. A másik esetben hiper-homociszteinémiát mutató betegek DNS mintáin vizsgáltuk az esetleges uracilosodást.

A DNS-beli uracil kimutatásához egy megfelelően hatékony detektálási eljárásra van szükség, amire a csoport évek óta fejleszt különböző szenzorfehérjéket. Ezeket gyógyszerkezelt rákos sejtekben megemelkedett uracil-szintek esetén sikerrel alkalmazták (3,4). Azonban a most vizsgált minták pontos vizsgálatához érzékenyebb szenzorfehérjék szükségeltetnek, amelyek termelése sem teljesen optimalizált még. Ezért kutatásom a szenzorfehérjék előállítására és tesztelésére is kiterjedt. A kimutatáshoz szükséges bioszenzorok a sejt hibajavító enzimek közül elmutált, és a Prof. Vértessy Beáta kutatócsoportjában eddig is használt uracil-DNS-glikozilázok (UDG-k) közül valók.

V. Irodalmi áttekintés

1. A DNS-ről általában

A DNS egy polimer molekula, amely az élővilágban az genetikai információ tárolására, és örökítésére szolgál.

Monomere, a nukleotid három további részre bontható: központi dezoxiribóz molekulára, egy foszfátcsoportra, és egy nitrogén tartalmú szerves bázisra. A polimer gerincét a dezoxiribóz-foszfát lánc adja. Minden monomer cukrának 5'-OH csoportja által észterezett foszfátcsoport a következő monomer 3'-OH csoportjával képez foszfodiészter kötést, így kialakítva a híres kettős spirális szerkezetet, amelyben a két cukor-foszfát gerinc egymással ellentétes irányban fog elhelyezkedni, tehát ahol az egyiknek az 5' vége található, ott a másik 3' vége, és fordítva.

Azonban mind a szerkezetét, hát még a feladatát tekintve fontos a 3. alkotórész, a nitrogén-tartalmú szerves bázis. Ez a purin, vagy pirimidin vázas vegyület a dezoxiribóz 1' szénatomjához kapcsolódik ún. glikozidos kötéssel. A DNS-ben alapvetően 4 ilyen bázis található meg: a timin, a citozin (pirimidin vázasok), az adenin és a guanin (purin vázasok). Ezeknek szerkezetükből következően párosodási szabályaik vannak. A két szálon egy pirimidin bázissal szemben mindig purin bázis helyezkedik el. Ezen kívül a két szál összekapcsolódását hidrogénkötések stabilizálják. A timin és az adenin 2, míg a citozin és a guanin 3 hidrogénkötés kialakítására képes, így egy adott bázissal szemben konkrétan csak egy másik helyezkedhet el. Ezért a két szál bázissorrendje egymásnak komplementere lesz, pontosabban a cukor-foszfát gerinc ellentétes irányultságú lefutása miatt reverz komplementere. A DNS kettős hélix szerkezete fordulatonként 10 bázispárból áll, ennek hossza 3,4 nm.

A genetikai jelentést is ezeknek a bázisoknak a sorrendje fogja kódolni, amely információ aztán a centrális dogma szerint kifejeződik fehérjék funkciójában, melyek bonyolult biokémiai folyamatok láncolata révén biztosítják a sejt alapvető tulajdonságait, anyagcseréjét, sejtciklusát, ingerekre adott válaszreakcióit. A centrális dogma első lépése a transzkripció, amely során a DNS "értelmes" szálának egy szakaszáról (gén) átíródik a genetikai kód egy lényegesen rövidebb ribonukleinsav (RNS) molekulává, amely hasonló szerkezetű és felépítésű, mint a DNS, ugyanakkor egyes szálú. Az RNS-t is nukleotidok építik fel, de dezoxiribóz helyett ribóz a cukor egység, és a négy nitrogén tartalmú bázis közül a timint az uracil helyettesíti. Ezért az átíródás is a DNS-ben megismert bázispárképzés

szabályosságán alapul. Ezt fogja követni már a sejtmagon kívül a transláció, amikor a riboszómák a transzfer RNS-ek (tRNS) közvetítésével az RNS-ről olvasott információt lefordítják egy aminosav szekvenciára. A riboszómákon szintetizálódott polipeptid elsődleges szerkezete, az aminosav sorrendje tehát a genetikai információ alapján adott, míg a konkrét háromdimenziós szerkezetüket egy bonyolult feltekeredési folyamatban nyerik el. Az olyan másodlagos szerkezeti elemek, mint az alfa-hélix, már a riboszóma kivezető csatornájában kialakulnak, a harmadlagos térszerkezetüket pedig a riboszóma felszínén nyerik el, sokszor dajka fehérjék közreműködésével. A “kész” fehérjék funkcióit ezen túl is számos ún. poszt-transzlációs módosítás és más fehérjékkel való kölcsönhatás szabályozza. Így a sejtet tulajdonképpen tekinthetjük a makromolekulák és kismolekulák bonyolult társadalmának is. A képet tovább árnyalják a nem-kódoló RNS-ek is, melyeknek “saját jogon” is van valamilyen biokémiai funkciójuk, bár belőlük fehérje sohasem keletkezik. Ezek jelentősége mostanában bontakozik ki a tudomány számára.

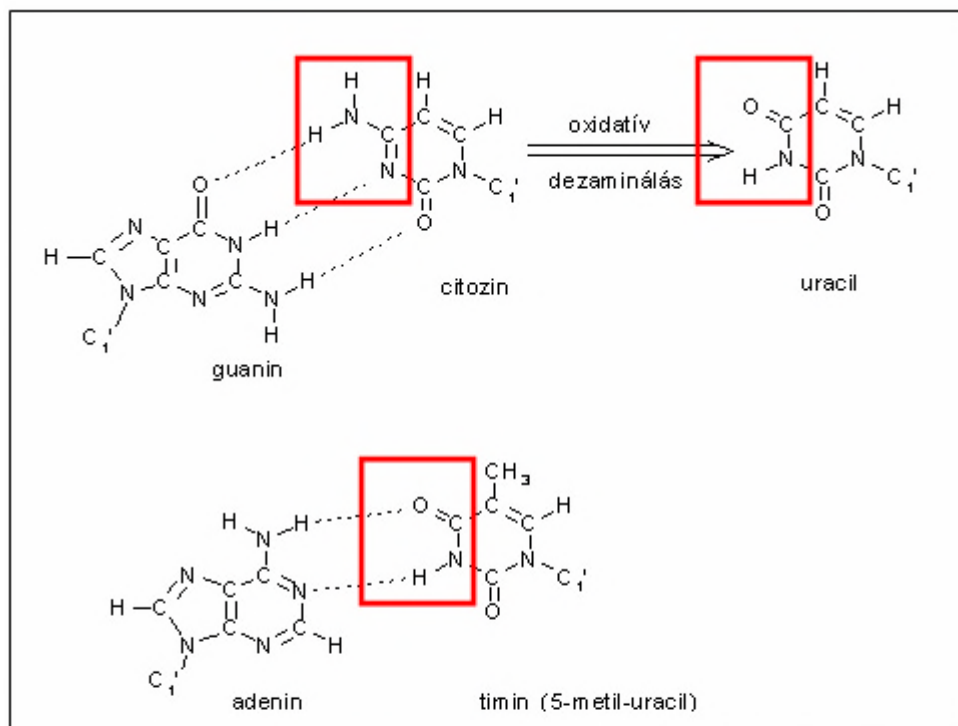
Az öröklődéshez elhanyagolhatatlan, hogy a DNS-t megkettőzzük. Ezt a folyamatot replikációnak nevezzük. A folyamat során a DNS kettős hélice felnyílik, és a két szálnak egy-egy mása képződik. Ezután a replikációs enzimek újra összezárják a replikációs villát, és a folyamat végére két különálló DNS molekulánk lesz, amelyek egymásnak (többé-kevésbé) pontos másai. A folyamat végére a két új DNS spirál csak egyik szála származik majd az eredetiből, a másik az újonnan szintetizálódott szál lesz. Ezért nevezzük ezt a folyamatot szemikonzervatív megkettőződésnek.

2. A DNS károsodása és hibajavítása

A DNS-t azonban számos behatás éri, amelyek esetlegesen változásokat is előidézhetnek benne. Itt beszélhetünk akár spontán a környezet hatására, akár enzim katalizálta folyamatokról, de akár a replikáció során is csúszhat hiba a rendszerbe. Mi a következőkben a DNS-ben megjelenő és ott kanonikusnak nem tekinthető uracil bázisra kihegyezve járjuk körbe a témát.

2.1. Spontán citozin dezaminálódás és javítása

Mind a citozin, mind az uracil, és a timin is pirimidin bázis, melyek szerkezete és a Watson-Crick bázispárokat kialakító H-kötéseik az 1. ábrán látható. Arról tehát könnyedén leolvasható, hogy a citozin átalakulása uracillá, avagy a metilcitozin átalakulása timinné pontmutációhoz vezet. Ez bekövetkezhet spontán, de enzim katalizált módon is.



1. ábra: A pirossal keretezett részek mutatják a Watson-Crick bázispárokat kialakító csoportok a pirimidin bázisokban. A szaggatott vonalak jelölik a H-kötéseket. Az nyíllal jelölt átalakulás mutatja a citozin dezaminálódását. Forrás: [Uracil a DNS-ben: hiba vagy jel? A dUTPáz szabályozása és egy újonnan azonosított U-DNS nukleáz a *Drosophila melanogaster*](#)

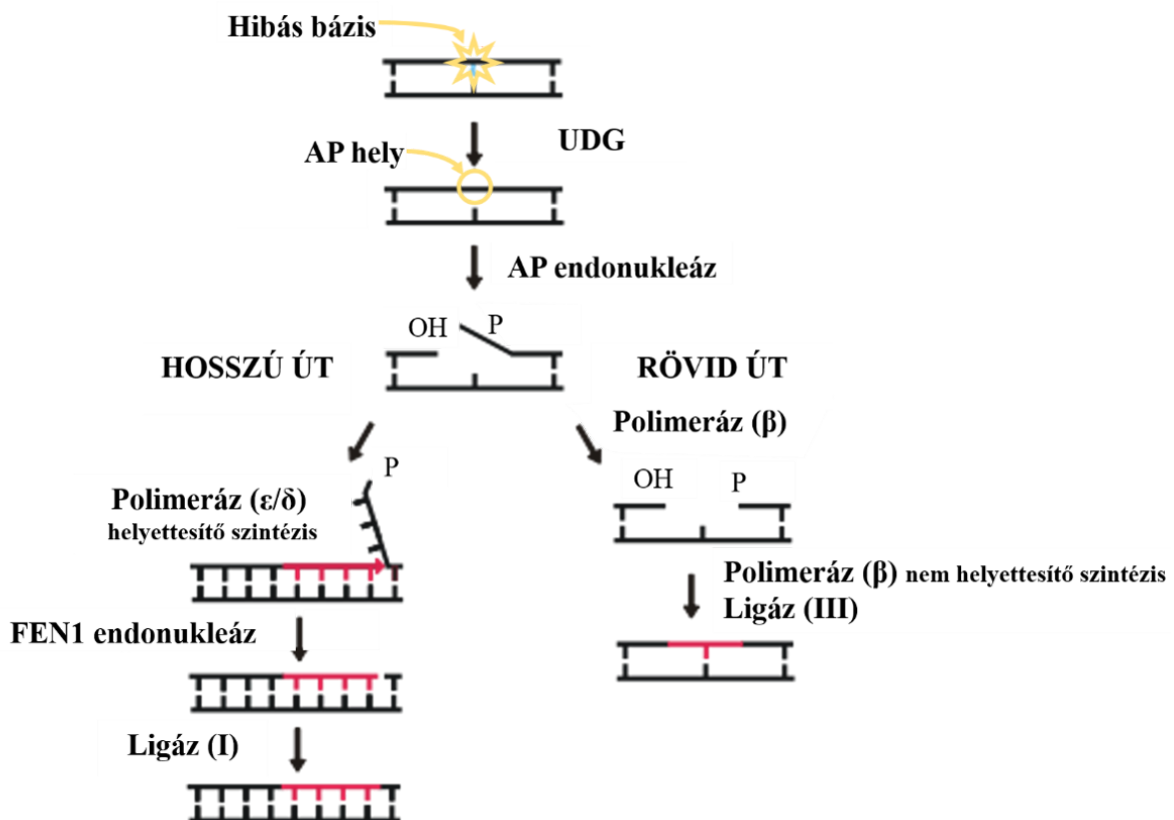
A citozin dezaminálódása aerob élőlényekben bekövetkezik oxidatív ágensek hatására. Ennek első lépéseként először a citozin módosul 5-hidroxicitozinná. Ezután további oxidatív hatásra dezaminálódik, és így keletkezik belőle 5-hidroxieuracil, ami már a korábbiakban bázispárosodási szabályok értelmében pontmutációhoz vezet.

Azonban más mód is van még az említett mutáció kialakulására. A hidrolitikus dezamináció során a citozinból uracil, míg ennek metilált változatából, az 5-metilcitozinból timin keletkezik. Ez gyakran lejátszódik spontán módon is, de az is előfordul, hogy enzim katalizáltan megy végbe.

A spontán citozin dezaminálódás gyakorisága lehetett az ok, ami miatt már az egyedfejlődés igencsak korai szakaszában egy hatékony uracil-DNS javítás fejlődött ki. Csaknem minden élőlényben baktériumtól az emberig megtalálható az uracil-DNS glikozilázoknak egy vagy akár több képviselője is.

Emberben 4 féle UDG található meg, amelyek mind kivágják a DNS-ből az uracilt, így iniciálva a báziskivágásos javítás (BER) mechanizmusát. A kivágás hatására egy abázikus hely jön létre (AP), amelynél a DNS 5' vége irányban az AP endonukleázok elvágják a DNS

szál gerincét. Ezután a folyamat kétféleképpen folytatódhat. Az ún. rövid út esetében egy β -polimeráz kivágja az adott dezoxiribóz-foszfát monomert, és beilleszt egy megfelelő monomert, a hátramaradó szakadást a cukor-foszfát gerincen pedig a Ligáz III “befoltozza”. A hosszú út során az AP helytől kezdve egy polimeráz (ϵ/δ) helyettesítő szintézissel 2-8 nukleotidot épít be újonnan a DNS szálba, majd a helyettesített leelőző szálat a FEN1 endonukleáz lehasítja. Ezt követően a Ligáz I pedig összeköti a DNS gerincét adó cukor-foszfát láncot.



2. ábra: A BER lehetséges útvonalai. Forrás: Holub Eszter: Genom szintű uracil beépülési mintázatok vizsgálatára alkalmas szenzorfehérje továbbfejlesztése és alkalmazásának finomítása (2020)

2.2. Enzim katalizálta citozin dezaminálódás a DNS-ben és ennek biológiai szerepe

Érdekes, hogy a citozin dezaminálódás mutagén jellege ellenére, eukariótákban több DNS citidin dezamináz enzim is megtalálható, melyek éppen ezt a folyamatot katalizálják. Ezek az AID/APOBEC enzimeszaládba tartoznak, és különféle sejtbeli funkciókat látnak el. Emberben 11 ebbe a családba tartozó fehérjét kódoló gén van: AID, A1, A2, A3A, A3B, A3C, A3D, A3F, A3G, A3H és A4 (5). Ezek mindegyike valamilyen módon az élőlény

védelmében fejtik ki a hatásukat, habár még nem mindegyik enzim funkciója van teljesen tisztázva. Például az AID-nek jelentős szerep jut az adaptív immunitás kialakításában. Az aktiválódott B-sejtekben az antitesteket kódoló DNS szakaszok elmutálásával javító mechanizmusokat indít be, amelyek esetleg még több hibát vétenek. Ez a jelen esetben igencsak előnyös, hiszen a B-sejtek célja minél többféle affinitású új antitestet kiültetni a membránjukra. Mivel ily módon rengeteg új antitest képződik, így az esély is megnő, hogy hamar meglesz a megfelelő antitest a bemutatott antigénre. A hatékony antigént bemutató B-sejt ezután klonálisan felszaporodik, és kezdetét veszi az antitest nagymértékű legyártása a kórokozó semlegesítése végett.

Az APOBEC enzimeket először RNS szerkesztő funkciójuk kapcsán azonosították, majd többjük esetén egyszálú DNS-en való aktivitásukat is kimutatták (5). Az RNS szerkesztési funkciójuk révén a genetikai információ változatosságát nem a DNS szinten öröklődő módon növelik, de átmeneti jelleggel, az adott sejt adott állapotában jelentkező kihívásaihoz rugalmasan alkalmazkodva teszik ezt. Az RNS szerkesztésben persze nem csupán csak az APOBEC enzimek, de más enzimesaládok is aktívan résztvesznek (6)

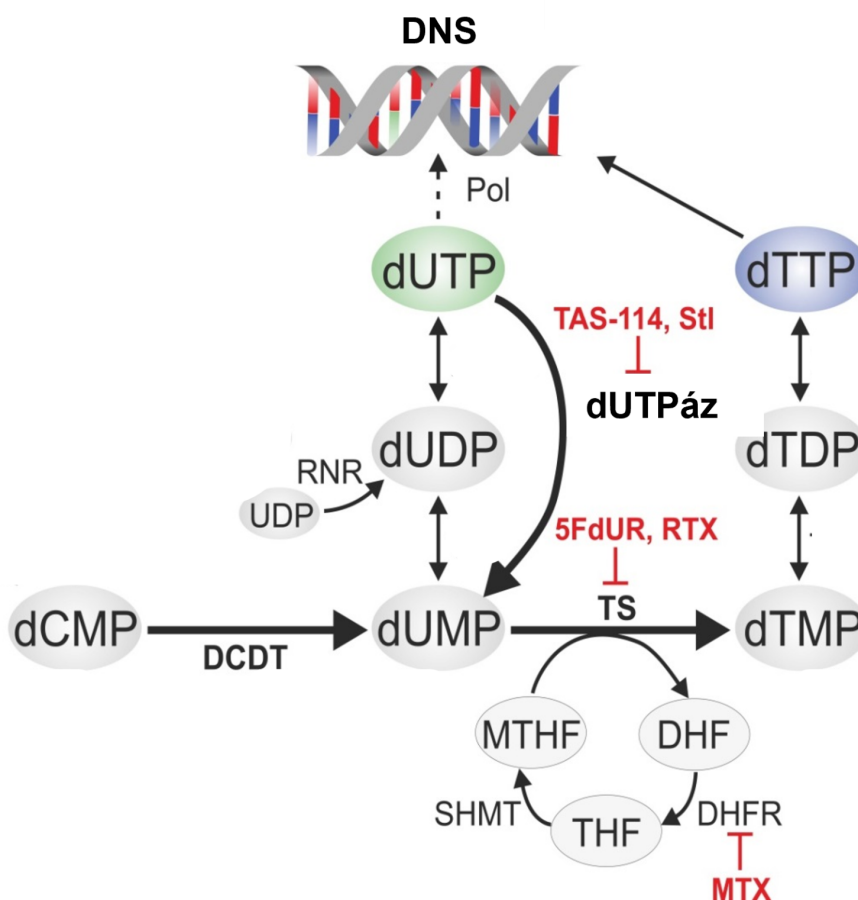
3. Timint helyettesítő uracil beépülésének elkerülése - “preventív DNS javítás”

Arról már esett szó, hogy az RNS-ben az uracil a DNS-beli timin analógjaként funkcionál. Tehát a DNS-be esetlegesen beleépülő uracil nem okozna jelentésváltozást, azonban ez normális körülmények között egyébként is csak nagyon ritkán eshet meg az alacsonyan tartott dUTP/dTTP arány miatt. Ezen arány kialakulása a timin bioszintéziséhez kapcsolódó két enzim, a timidilát-szintáz (TS) és a dezoxiuracil-trifoszfátáz (dUTPáz), működésének köszönhetően jön létre.

A dUTP/dTTP arány megfelelően alacsonyan tartásáért egyrészt a dUTPáz felel, amely katalizálja a dUTP elbomlását dUMP-vé és inorganikus pirofoszfáttá. A dUMP-t azután a TS metilálja 5,10-metiléntetrahidrofolát (MTHF, 3. ábra) metildonorról származó metil-csoporttal, így létrehozva a dTMP-t. Az MTHF ebben a reakcióban ún. ko-szubsztrát, ami azt jelenti, hogy ugyanúgy átalakul, mint a “fő” szubsztrát, és a recirkularizációjához további enzimek szükségesek (vö. folátciklus, 3. ábra) (9). Ezt ezután a bázisfüggetlen kinázok átalakítják dTTP-vé (dTDP-n keresztül), amely már így kész a DNS-be való beépülésre. Az előbbi folyamattal meg természetesen egyensúlyt tart a bázisfüggetlen

foszfátázok defoszforiláló működése, tehát ezek bontják el a dTTP-t dTDP-re, majd azt dTMP-re.

Azonban ha az uracil mégiscsak beépülne (mert például valamilyen oknál fogva megemelkedik a dUTP/dTTP arány), akkor habár analóg bázisnak minősül, de mégis az uracil-N-DNS-glikoziláz (UNG), és feltehetően még az egyszálú DNS szelektív egyfunkciós DNS glikoziláz (SMUG1) aktivitása miatt hibaként értelmeződik, és ezek iniciálják a javító mechanizmusokat.



3. ábra (10): A timidilát bioszintézis és kapcsolt útvonalai.

Az ábrán látható, hogy a cukor redukálódása az UDP ribózával fog megtörténni. Ez a ribonukleotid redukáz (RNR) enzim hatására alakul át majd dezoxiribózzá, így dUDP-t képezve. Az ábrán minden nyíl valamilyen enzim hatására lejátszódó átalakulást jelöl. A nem jelölt nyilak, azok az egymással egyensúlyt tartó abázikus foszfátázokat és kinázokat jelölik. A dUDP-ből dUTP, illetve dUMP keletkezhet. A dUTP jelentős része a dUTPáz enzim hatására átalakul dUMP-vé. Ellenben az sem kizárt, hogy ez beépül a DNS-be egy polimeráz segítségével. A dUMP a fentiek mellett még keletkezhet dCMP-ből is egy dCMP dezamináz (DCDT) hatására. A dUMP-ből a TS katalízisa által keletkezik dTMP, ami azután két lépésben átalakul dTTP-vé. A TS működéséhez azonban szükség van az 5,10-metiléntetrahidrofolát (MTHF) metildonorra. Ez a kozubsztrát dihidrofoláttá (DHF) alakul át

a reakció során. Ez a dihidrofolát reduktáz (DHFR) hatására alakul át tertrahidrofoláttá majd az tovább alakulva a hidroximetil transzferáz közreműködésével újra 5,10-MTHF-t képez. A pirossal jelölt anyagok az adott enzimek gátlószerei, ezek közül csak a methotrexát (MTX) van klinikai alkalmazásban.

A Genom metabolizmus kutatócsoportban már régóta foglalkoznak a dUTPázal. Vizsgálták az enzim szerkezetének és funkciójának összefüggéseit, elsősorban egy hatékony szelektív gátlószert kifejlesztésének céljából (11–13). Emelett a TS legátálásával uracilosabbá váló DNS uraciltartalmának mennyiségi meghatározásával és az uracilosodás eloszlásával a sejtmagban is foglalkoztak (4).

4. A timidilát bioszintézis gátlása, mint rákterápiás stratégia

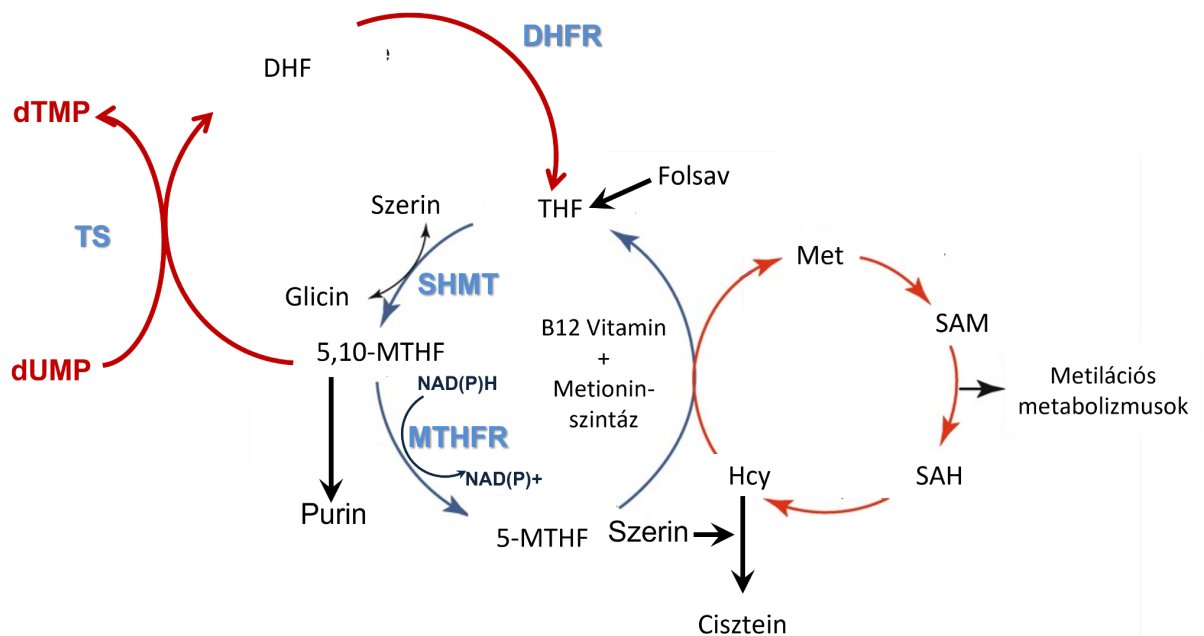
Amint az előzőekben láthattuk, a DNS-beli uracil a javító mechanizmusok aktiválódását váltja ki. Ezek túlműködése viszont a genom integritását veszélyezteti: emelkedett dUTP/dTTP arány esetén az uracilbeépülés a javító szintézis során megismétlődik, a száltöréses köztitermékek felhalmozódnak, ami idővel a sejtet programozott sejthalál útján jó eséllyel elpusztítja. Ezért régóta használt rákterápiás stratégia az, hogy a DNS uracil szintjét megnöveljük a dUTP/dTTP arány megnövelésével. Ezt pedig a két kulcsenzim valamelyikének, vagy mindkettő együttes gátlásával érhetjük el (3. ábra). Hiszen a TS gátlásával egyszerűen nem metilálódik a dUMP, és így a dTMP hiánya révén hamar a dTTP mennyisége is lecsökken. A dUTPáz gátlásával pedig a dUMP szintje csökken, s egyúttal több dUTP is marad, és ezért csak kevés dUMP-ből képződhet dTMP, tehát a természetesnél megint csak kevesebb lesz a dTTP mennyisége a sejtben.

A klinikai gyakorlatban elterjedten használt TS gátló szere a nukleotid analóg fluoro-uracil származékok, ill. az antifolát raltitrexed (14,15). Ezenkívül alkalmazzák még a folát ciklust általánosabban gátló antifolátokat is, ilyen például a methotrexát (16).

5. Nukleotid anyagcsere zavarok különböző betegségek hátterében

Már elhangzott, hogy például a timin szintéziséhez szükségeltetik egy metil-donor (ld. 3. ábra, MTHF, folát ciklus). A sejtbeli metildonor anyagcsere egy komplex rendszer, számos bioszintetikus útban fontos szerepet játszik, így egyes aminosavak és nukleinsav bázisok (purinok és a timin) bioszintézisében, valamint a DNS metilációban is (4. ábra). Ezért az ebbéli zavar a sejt normális homeosztázisának felborulását eredményezi, így például a

dUTP/dTTP arány felborulását is, vagy éppen a DNS alulmetiláltságát, ami a tumorokra különösen is jellemző (17,18). A metildonor anyagcsere egyfajta felborulását jelzi a homocisztein megemelkedett szintje, ezt a tünetegyüttest nevezzük hiper-homociszteinémiának.



4. ábra: A timidilát bioszintézis kapcsolata a metil-donor anyagcserével. A dUMP-ból a TS hatására keletkezik dTMP, amely enzimnek az 5,10-MTHF a kofaktora. Ez a folyamat során DHF-é alakul, amely aztán a DHFR hatására THF-é alakul. A THF folsavból (B₉ vitamin) kerül be a rendszerbe. A THF-t az SHMT alakítja át 5,10-MTHF-é, amivel kapcsolatosan egy szerinből glicint alakít. Az 5,10-MTHF azonban még fontos metil-donor a purin előállításában is. Azonban az 5,10-MTHF-t (ebben a ciklusban maradva) a metiléntetrahidrofolát reduktáz alakítja tovább 5-metiltetrahidrofoláttá, amely közben szüksége van egy nikotinamid adenin dinukleotid oxidálására (foszfát) (NAD(P)) is. Az 5-MTHF kapcsolatosan alakul át a homociszteinnel (Hcy) B₁₂ vitamin jelenlétében a metionin-szintáz hatására. Az előbbiből újból THF, míg az utóbbiból metionin (Met) képződik. Ez aztán (természetesen lépésenként enzimkatalízis hatására) először S-adenozil-metioninná (SAM), majd S-adenozil-homociszteinné (SAH) alakul át. Ezek is fontos metil-donorok például a DNS-metilációjában. A SAM azután visszaalakul Hcy-né. Ez utóbbi még kiindulási anyaga a cisztein képződésének, (amely szerin hatására megy végbe). Forrás részben innen: Paro R, Grossniklaus U, Santoro R, et al. Springer; 2021. Chapter 9, Epigenetics and Metabolism.

Ez sokféle betegséggel összefüggésben megjelenhet. Rákos tumorokban (19), szív- és érrendszeri megbetegedések kockázatát növeli (20–22), vesebetegségekkel is bizonyítottan összefüggésben áll (23), és súlyos COVID megbetegedések esetén is rizikófaktor

minősítették (24,25), de még az Alzheimer- és a Parkinson-kórral is asszociálható (26,27). Több esetében mint diagnosztizációs marker használható.

A hiper-homociszteinémia visszavezethető a B₆, a B₉ (5,10-metiléntetrahidrofolát(5,10-MTHF)) és a B₁₂ vitaminok hiányára. Ezek közül az 5,10-MTHF a kofaktora a TS-nek, ami miatt tehát könnyen érthető, hogy a timidilát bioszintézis működése is sérül, így elősegítve a DNS uracilosodását, hiszen megnő a dUTP/dTTP arány. Ez tovább mutálhatja a sejtet, vagy szélsőséges esetben annak halálát válthatja ki a már tárgyalt módon.

6. Enzimatiszitos citozin dezaminálás kontrollálatlan aktiválódása kemoterápiában

Mindazonáltal, hogy az AID/APOBEC enzimcsalád a sejt számára rengeteg esetben hasznos, és előnyt is biztosít ezáltal az élőlény számára, számos veszélyt rejt magában.

Érthető természetesen, hogy a különböző nukleinsavak információ tartalma feletti nagymértékű szerkesztési szabadságuk megfelelő szabályozás nélkül rendkívül veszélyes. Könnyedén előidézhetnek káros elváltozásokat, amely aztán mint egy öngerjesztő folyamat egyre több és több mutációt fog eredményezni, így kialakítva végül daganatokat, akár metasztázisokat is (1). Az öngerjesztést legjobban úgy érthetjük, hogy már egy amúgyis sérült szabályozású sejtben bekövetkező további elváltozások további szabályozatlan működést eredményezhetnek. Végezetül pedig minél több mutáció lép fel, annál nagyobb a valószínűsége egy rákos elváltozásnak. Az AID/APOBEC enzimek pedig ezt a tulajdonképpeni mikroevolúciót segítik, hiszen rendeltetésük is a nukleinsavak szerkesztése, de megfelelő reguláció nélkül, elszabadulva, csak újabb és újabb mutációkat fognak előidézni, amelyek által aztán az egyes tumorsejtek további előnyökre tesznek szert, és ezáltal elterjednek a tumorban, az “lemaradottabb” tumorsejteket kiszorítva.

A fentiekre bizonyíték a tumorokban fellelhető APOBEC-ekre jellemző mutációs mintázat (1). A mutációs mintázatokról készül adatbázisban, a [COSMIC](#) adatbázisban 4 olyan mintázat is található, amelyek feltehetőleg az AID/APOBEC enzimek aktivitásának következtében jönnek létre. Ezek a következők: SBS2, SBS13, SBS84 és SBS85 ([COSMIC | SBS - Mutational Signatures](#)).

Az előbb már beszéltem a tumorprogresszióban vállalt szerepükről az AID/APOBEC enzimcsaládba tartozó proteineknek. Legújabban azt is kimutatták, hogy egyes kemoterápiás

szerek hatására APOBEC enzimek is aktiválódnak (2). Ezen aktivációjuk nyomán gyógyszerrezisztencia alakul ki, a fentebb tárgyalt felgyorsított evolúciós út által.

Továbbá Grant Brown kollaboráló partnerünk és csoportja kimutatta, hogy az A3C és A3D feltehetőleg felelős a gemcitabin rákterápiás szerrel kezelt hasnyálmirigy rákos sejtekben a gyógyszerrezisztencia kialakulásáért (kézirat publikálás alatt). A kutatásuk során először észrevették, hogy gemcitabinra rezisztenssé váló hasnyálmirigyrákos (Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, PDAC) sejtekben az *apobec3c* és az *apobec3d* gének aktiválódnak. Másodjára rájöttek arra, hogyha ezeket a géneket kiütik, akkor megszűnik a gyógyszerrezisztencia. Ebből következtetve azt feltételezték, hogy a gemcitabin beépülése révén megállított replikációs villa újraindításának segítője lehet a citozin enzimatisz dezaminálásából származó uracil, amely a javítófolyamatok bekövetkeztét indukálja. Ezt alátámasztandó azt is kimutatták, hogy a rezisztenssé vált sejtekben az elakadt replikációs villák száma valóban lecsökkent. Az A3C és A3D enzimek nyomán a replikációs villákban megjelenő uracil kimérése volt a munkában a mi feladatunk, amiben a jelen TDK munka során részt vehettem.

VI. Célkitűzés

A DNS uracilosodása, mint az előbbiekben láttuk, számos esetben biológiai jelentőséggel bír. Azért fontos megértenünk ennek a hátterét, mert talán kulcsa lehet egyes megbetegedések megelőzésének, vagy megfelelő gyógyításának. A dolgozatban kétféle biológiai rendszerben vizsgáltam meg a genomi uracilosodást: egyrészt gemcitabin kezelésre rezisztenssé váló hasnyálmirigyrák sejtek esetén, ahol enzimátikus citozin dezaminálást feltételezték, másrészt vastagbélrákos páciensek szövetmintáiból izolált DNS-en, ahol hiper-homociszteinémia tünet általános metildonor hiányt feltételez. Azonban ezen esetekben nem várható túl nagy genomi uracilszint növekedést, ezért a megméréséhez szükséges egy hatékony uracil-DNS meghatározási módszer kialakítása. Prof. Vértessy Beáta Genom metabolizmus kutatócsoportjában előzőleg kifejlesztettek több uracil-DNS-t felismerő fehérje konstruktot is, amelyeket eddig is használtak magas uracilszintek mérésére. Továbbá jelenleg is folyik olyan konstruktok, illetve finomított csepp blot protokollok kidolgozása, amelyekkel érzékenyebben és specifikusan tudunk alacsony uraciltartalmú mintákat is mérni. Azonban ezen szenzorok előállítása és tisztítása korántsem optimális még..

TDK munkám során egyrészt a csoportban már uracil-DNS kimutatásra használt szenzor konstruktok hatékonyabb előállítását, kipróbálását, másrészt a kollaborációkban kapott betegmintákban és betegség modellekben a genomi uracil mennyiségi meghatározását tűztam ki célul.

- AVB101 sejtekben termeltetett és *in vivo* biotinilált Avi-ΔUNG fehérje konstrukt tisztítása.
- BL21 ung- sejtekben termeltetett Avi-ΔUNG, illetve GST-Avi-UdgX konstruktok tisztítása és *in vitro* biotinilálása
- Az előállított szenzorok tesztelése alacsony uracil tartalmú mintákon csepp bloton.
- Betegminták: jóindulatú vastagbél szöveti daganatok, és ugyanezek egészséges biopsziás mintái, valamint teljes egészségnek örvendő egyének ugyanilyen biopsziás szövetmintái (Molnár Béla, SOTE, Belgyógyászati Klinika & 3DHisTech Kft.)
- Gemcitabinnal kezelt mutáns (*apobec3c*, *apobec3d*, *ung* génkiütött (KO)) hasnyálmirigyrák sejtvonalból izolált genomi DNS (Grant Brown & Tajinder Ubhi, Torontói Egyetem, Kanada)

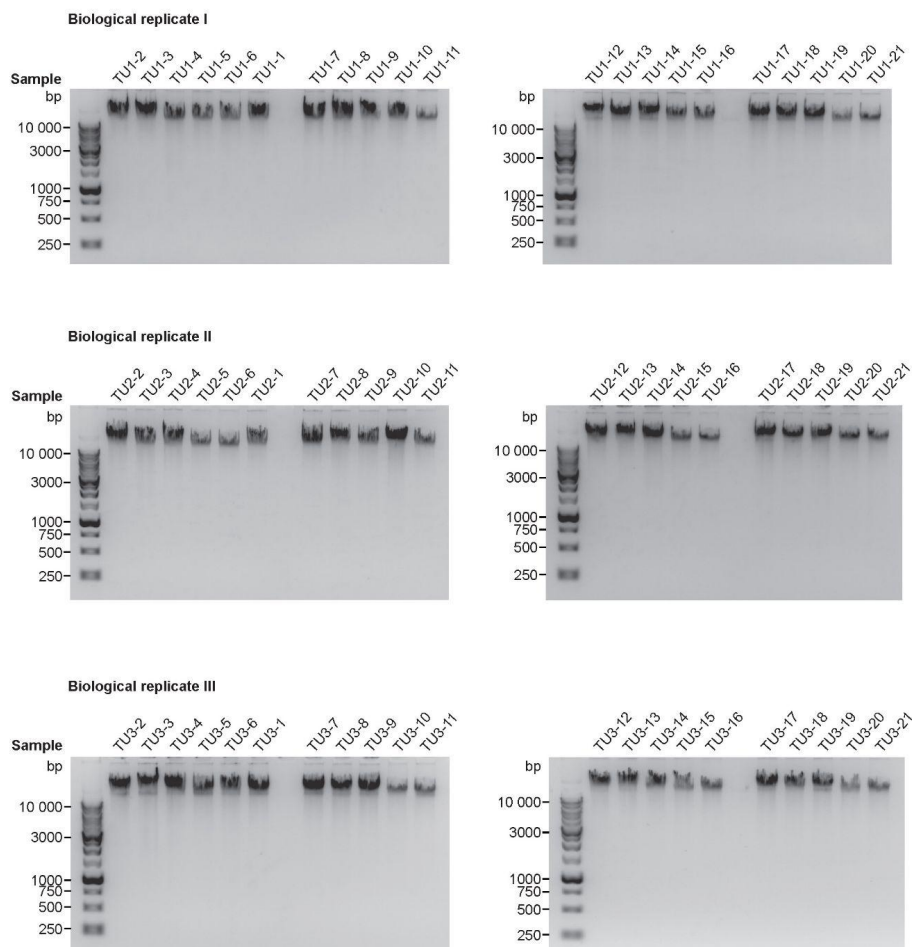
A kétféle mintarendszeren, a középiskolás TDK munka keretében konkrétan általam végzett csepp blot kísérletek természetesen nem fedik le a kérdések megválaszolásához

szükséges, illetve elvégzett blotok teljességét. A méréseimet ezért egy szélesebb összefüggésbe helyezve fogom tárgyalni, de minden esetben világosan jelzem, hogy hol volt saját a mérés, és hol mutatom más csoporttagok által végzett kísérletek eredményét.

VII. Anyagok és módszerek

1. Vizsgált minták és alkalmazott uracil-DNS szenzorok

- 1.1. Gemcitabinnal kezelt mutáns (*apobec3c*, *apobec3d*, *ung* génkiütött (KO)) hasnyálmirigyrák sejtvonalból izolált genomi DNS (Grant Brown & Tajinder Ubhi, Torontói Egyetem, Kanada)



5. ábra: A kollaboráló partnerünk a sejtvonalakból RNáz kezeléssel kiegészített ... (Quiagen) eljárással izolálta a genomi DNS mintákat, amelyek minőségét aztán 1% agaróz gélelektroforézissel jellemezte. A minták kezeletlen és gentamicin kezelt, génmódosított PDAC sejtvonalakból származnak, kétféle kezelési idő és dózis mellett (1. Táblázat). A négyféle génmódosításra (*ung*^{-/-}, *ung*^{-/-} *apobec3d*^{-/-}, *ung*^{-/-} *apobec3c*^{-/-}, *ung*^{-/-} *apobec3d*^{-/-} *apobec3c*^{-/-}) vonatkozóan a mintákat randomizáltan kaptuk összesen 3 biológiai replikátumban.

Minta	gyógyszer koncentráció	kezelési idő	genetikai háttér
Kezeletlen	0	0	<i>ung</i> ^{-/-}

Minta	gyógyszer koncentráció	kezelési idő	genetikai háttér
Kezeletlen	0	0	<i>ung</i> ^{-/-}
Gemcitabin kezelt	500 nM	24 h	<i>ung</i> ^{-/-}
Gemcitabin kezelt	1 µM	24 h	<i>ung</i> ^{-/-}
Gemcitabin kezelt	500 nM	72 h	<i>ung</i> ^{-/-}
Gemcitabin kezelt	1 µM	72 h	<i>ung</i> ^{-/-}
Kezeletlen	0	0	<i>ung</i> ^{-/-} <i>apobec3d</i> ^{-/-}
Gemcitabin kezelt	500 nM	24 h	<i>ung</i> ^{-/-} <i>apobec3d</i> ^{-/-}
Gemcitabin kezelt	1 µM	24 h	<i>ung</i> ^{-/-} <i>apobec3d</i> ^{-/-}
Gemcitabin kezelt	500 nM	72 h	<i>ung</i> ^{-/-} <i>apobec3d</i> ^{-/-}
Gemcitabin kezelt	1 µM	72 h	<i>ung</i> ^{-/-} <i>apobec3d</i> ^{-/-}
Kezeletlen	0	0	<i>ung</i> ^{-/-} <i>apobec3c</i> ^{-/-}
Gemcitabin kezelt	500 nM	24 h	<i>ung</i> ^{-/-} <i>apobec3c</i> ^{-/-}
Gemcitabin kezelt	1 µM	24 h	<i>ung</i> ^{-/-} <i>apobec3c</i> ^{-/-}
Gemcitabin kezelt	500 nM	72 h	<i>ung</i> ^{-/-} <i>apobec3c</i> ^{-/-}
Gemcitabin kezelt	1 µM	72 h	<i>ung</i> ^{-/-} <i>apobec3c</i> ^{-/-}
Kezeletlen	0	0	<i>ung</i> ^{-/-} <i>apobec3d</i> ^{-/-} <i>apobec3c</i> ^{-/-}
Gemcitabin kezelt	500 nM	24 h	<i>ung</i> ^{-/-} <i>apobec3d</i> ^{-/-} <i>apobec3c</i> ^{-/-}
Gemcitabin kezelt	1 µM	24 h	<i>ung</i> ^{-/-} <i>apobec3d</i> ^{-/-} <i>apobec3c</i> ^{-/-}
Gemcitabin kezelt	500 nM	72 h	<i>ung</i> ^{-/-} <i>apobec3d</i> ^{-/-} <i>apobec3c</i> ^{-/-}
Gemcitabin kezelt	1 µM	72 h	<i>ung</i> ^{-/-} <i>apobec3d</i> ^{-/-} <i>apobec3c</i> ^{-/-}
5-fluorouracil kezelt	50 µM	24 h	<i>ung</i> ^{-/-}

1. táblázat: Egy biológiai replikátumhoz tartozó minták jellemzői.

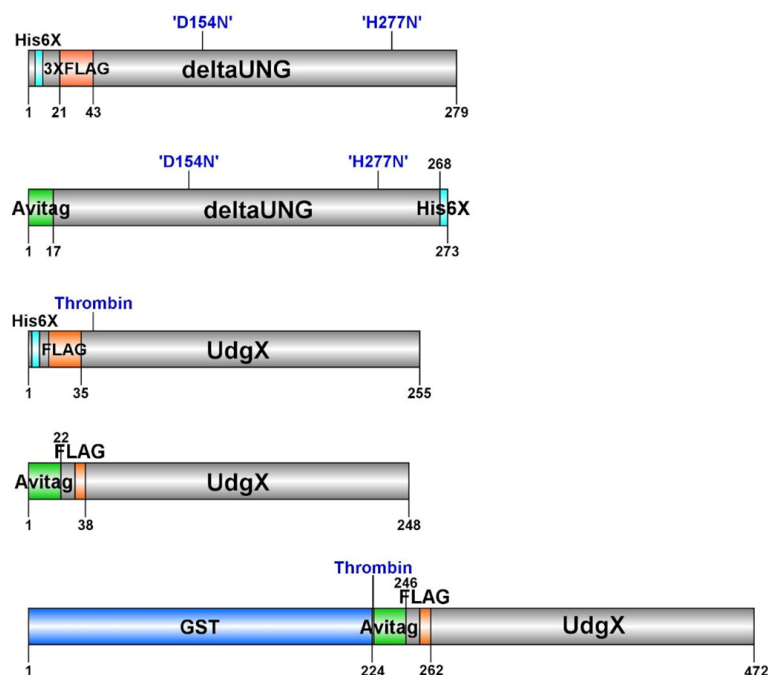
- 1.2. Betegminták: jóindulatú vastagbél szöveti daganatok, és ugyanezek egészséges biopsziás mintái, valamint teljes egészségnek örvendő egyének ugyanilyen biopsziás szövetmintái (Molnár Béla, SOTE, Belgyógyászati Klinika & 3DHisTech Kft.)

Minta név	Minta típus	Megjegyzés	Nanodrop			Qubit	
			ng/ul	260/280	260/230	ng/ul	2000 ng Qubit alapján
39 NEG	B DNS	egészséges biopszia	46,00	1,96	2,43	48	41,7
40 NEG	B DNS	egészséges biopszia	23,00	1,90	2,12	23	87,0
56 NEG	B DNS	egészséges biopszia	20,00	1,91	2,19	21	95,2
42 NAT	B DNS	NAT-AD pár	29,40	1,82	2,44	24	83,3
42 AD	B DNS		39,70	1,95	2,35	54	37,0
86 NAT	B DNS	NAT-AD pár	134,00	1,87	1,97	82	24,4
86 AD	B DNS		135,00	1,90	2,42	100	20,0
108 NAT	B DNS	NAT-AD pár	47,90	1,83	1,78	39	51,3
108 AD	B DNS		30,90	1,83	1,98	25	80,0

2. táblázat: A vizsgált minták általános jellemzői. A NAT-AD minta párok egy jóindulatú vastagbél-daganatos beteg (adenóma, AD) és egészséges (NAT) szöveteiből származó biopsziás minták.

1.3. Uracil-DNS szenzorok

A csoportban többféle bioszenzort is fejlesztettek, melyek a DNS uracil szintjének megmérésére használhatók. Ezek az élő sejtben is működő javító enzimek kissé megváltoztatott, mutáns formái, amelyek a DNS-ből immáron már nem vágják ki az uracilt, ellenben erősen hozzákötnek. Emellett tartalmaznak még különböző, a hatékony tisztításukhoz és kimutatásukhoz szükséges aminosav szekvencia részleteket, ún címkéket. Így együtt alkalmassá válnak a genomi DNS kvantitatív kimutatására.



6. ábra: Uracil-DNS szenzorok domén és szerkezeti ábra

A Δ UNG konstruktokon kék színnel van jelölve a két pontmutáció, és azok helye az eredeti fehérjében. (A vad típusú fehérje első 84 aminosavát, mely más fehérjével való kölcsönhatásért felelős, eltávolították, ezért a szenzor konstruktban már más a számozás)

A fehérjékben világoskékkel van jelölve a His-címke, a FLAG szekvencia narancssárgával, az Avitag pedig zölddel. Az utolsó UdgX fehérjén található egy GST címke (1-224). A FLAG címke ugyanezen a fehérjén a 262. aminosavnál fejeződik be, az egész konstrukt pedig 472 aminosav hosszúságú. Az 1. UdgX szenzor tartalmaz egy trombin vágó helyet, emellett egy trombin vágó hely található még a GST és az UdgX között is. A konstruktok szekvenciái a [Függelékben](#) találhatóak.

1.3.1. Inaktív UNG alapú konstruktok: flag- Δ UNG és (biotin)Avitag- Δ UNG

A csoportban már régóta foglalkoznak ezzel a szenzorral és magas uracil tartalmú mintákon sikerrel is alkalmazták ezeket (3,4).

Az eredeti fehérje N-terminálisától számított 84 aminosavból álló részét eltávolították, ez volt felelős többek között a replikációs fehérjével való kölcsönhatás kialakításáért. Ezzel a céljuk az volt, hogy csökkentsék a konstrukt aspecifikus kötődését más fehérjékhez. A Δ UNG-ban ezen felül kettő pontmutáció is megtalálható, amelyek a fehérje inaktivitásért felelnek, hogy ne vágják ki az uracilt a DNS-ből, hanem hogy ahhoz kötve ott maradjanak. Az eredeti proteinben a 154. helyen található aszpartátot aszparaginra (D154N), míg a 277.

aminosavként szereplő hisztidint is szintúgy egy aszparaginra cserélték (H277N) (a pontos szekvencia a [Függelékben](#) található).

Az 6. ábrán kétféle Δ UNG fehérje van feltüntetve, és én is foglalkoztam mind a kettő előállításával, eluálásával, alkalmazásával. Az első az N-terminális felé elhelyezkedve található egy His-címkét, amelynek a fehérje elválasztásakor az oszlopkromatográfiában lesz majd szerepe (Ni^{2+} -NTA gyanta). Szintén ezen a végen található még a 3x-FLAG címke, amely a fehérje felismeréséhez, és kimutatásához szükséges a csepp blot mérés során. Az eljárás keretében először egy egérben termeltetett anti-FLAG antitestet csatolunk majd ide, majd egy ezt felismerő másodlagos antitestet, amely egy ún. torna peroxidáz (HRP) enzimmel van konjugálva. Az így elkészített “szendvics” már készen áll a kimutatási reakcióra: a HRP megfelelő kismolekulás szubsztátok átalakításával ugyanis ún. kemilumineszcens fényjelet produkál, amit le tudunk fotózni.

A második Δ UNG fehérje Avitaggel van ellátva, amely az N-terminálison helyezkedik el. Az Avitag egy olyan szekvencia, amit a BirA nevű biotin ligáz enzim felismer, és a 15. pozíciójára egy biotint köt. A biotinizációt már megejthetjük az Avitag címkével ellátott fehérjék enzimátikus a baktériumsejtekben az expresszió folyamán. A biotinizált konstruk használata elviekben azért lenne előnyösebb, mert ehhez elegendő csak egy “ellenanyagot” (valamilyen avidin származékot) csatolni, nincs szükség másodlagos antitestre. Ez többek között kisebb méretet, eggyel kevesebb disszociációs lehetőséget, és ennél fogva jobb kötődést, kimagaslóbb pontosságot jelentene. Mindemellett a biotin-szteptavidin kötődése is meglehetősen erős ($K_d \sim 10^{-15}$ M). A 6 db hisztidint tartalmazó His-címke itt a C-terminálison kapott helyet.

1.3.2. Udgx alapú konstruktok: flag-UdgX és (biotin)Avi-UdgX

Az UdgX egy Mikobaktériumból izolált UDG-fehérje, mely eukariótákban, így emberben sem található meg (28). Ennek a fehérjének a specialitása az, hogy az uracilt kivágja, és helyére kovalensen odaköt a DNS-hez. Ez a csoport kutatásainak szemszögéből nézve igencsak előnyös tulajdonság, hiszen így nem kell számolni a szenzor DNS-ről való disszociációjával.

Az 6. ábrán az UdgX alapú szenzorok 3 változata látható. Az első N-terminálisán egy His-tag és egy 3x-FLAG-tag található, a 3x-FLAG- Δ UNG konstrukthoz hasonlóan. Ugyanakkor újabb publikációkban kimutatták, hogy a His-címkés fehérje Ni^{2+} -oszlopról imidazollal történő elúciója során inaktiválódhat (29). A csoportban előzőleg ilyen tisztításon átesett konstruk érzékenysége nem haladta meg a Δ UNG szenzorokét. Éppen ez motiválta a

második fehérje konstrukt létrehozását, új, alternatív tisztítási lehetőségek után kutatva. Ugyanakkor az új konstruktot az ígéretesebb, biotinilálható Avitag címke előnyeivel is el akarták látni. A tisztítást monomer-avidin agaróz gyantán tervezték megvalósítani, és szabad biotinnal kompetálva eluálni, ami egy meglehetősen drága, és kevésbé hatékony eljárásnak bizonyult. A FLAG címkét a biztonság kedvéért hagyták a konstruktban, ami nemcsak kimutatásra, de tisztításra is felhasználható, bár ez az eljárás is a monomer avidin agarózozshoz hasonlóan drága, és nagy mennyiségekre nem alkalmazható költséghatékony módon. Mind az Avitag, mind pedig a FLAG-címke ez esetben az N-terminális felőli végen található.

A [3. szenzorfehérje előállításával](#) én is foglalkoztam. Ebben a konstruktban a fenti Avitag-FLAG-UdgX N-terminálisán fuzionáltatva van egy, az eddigiek során még nem tárgyalt, ún. glutation-S-transzferáz (GST) fehérjével. Ennek több szempontból is előnyt kellene hajtania a protein számára. Egyrészt ez a tag általában megnöveli a fehérjék expresszióját és oldhatóságát is (30). Emellett másik előnye még, hogy lehetővé teszi a fehérje glutation oszlopon történő tisztítását, amelyet aztán majd trombinos elúció segítségével hozhatunk le az oszlopról. A trombin a GST-tag végénél, a 224. aminosav helyen vágja el a fehérjét, így a kötődést biztosító GST-taget az oszlopon hagyva.

2. Uracil-DNS szenzorok előállítása

A [fent ismertetett konstruktok](#) előállítását a csoportban már használt protokollok alapján kíséreltem meg. A konstruktokat először is egy bakteriális expressziós rendszerben termeljük, azaz *Escherichia coli* (*E. coli*) sejteket használunk, amelyekbe bejuttatjuk a rekombináns technikával előzőleg előállított plazmid DNS-t. Ez egy olyan kör alakú DNS molekula, mely egyrészt kódolja a tervezett fehérje konstruktot, illetve annak transzkripcióját lehetővé tévő egyéb elemeket, valamint még egy meghatározott antibiotikum rezisztenciát is. Tehát egyaránt *E. coli* sejtekkel állítottam elő az adott szenzort, majd a sejtekből kioldva, azok többi anyagától elválasztottam különböző módszerekkel, mint a centrifugálás és az oszlopkromatográfia.

2.1. Avi-ΔUNG konstrukt tisztítása AVB101 (Avidity) törzsben termelve

A fehérjét AVB101 *E. coli* törzsben termeltettük meg, amelyekben még lehetőség nyílt az *in vivo* biotinilálására is. A sejtörzs tartalmazott egy BirA biotin ligáz kódoló plazmidot is, amely emellett kloramfenikol (10 µg/ml) rezisztanciát is ad a sejtnak. A másik plazmid a

konstruktot kódolta, ez ampicillin (100 µg/ml) rezisztenciával járt együtt. Az antibiotikumokra mutatott rezisztenciára azért van szükség, mert amikor transzformáljuk a baktérium kultúrát ezekkel a plazmidokkal, akkor nem minden sejt fogja felvenni őket. A transzformálás során alkalmazott 42°C-os hő sokk után hagyunk nekik időt jégben állva, hogy ezt megtegyék, akkor a tápoldatukhoz hozzáadjuk még az előző kettő antibiotikumot is. Így biztosra mehetünk, hogy már csak olyan sejtek maradnak, amelyek felvették mind a kettő plazmidot. Mindkét plazmid LacI promotor régióval van ellátva, így aktiválásuk Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside-dal (IPTG-vel) indukálható. A tápoldathoz egyidejűleg hozzáadt biotint a sejtek felveszik, és azt a sejtben a konstruktunkkal együtt kifejeződő BirA enzim annak Avitag-jére kapcsolja, azaz a konstrukt enzimatikusan katalizált biotinilálása már a sejtben megtörténik.

A kultúrát LB-mediában növesztettük 37°C-on optikai denzitás (OD) = 0,5-ös értékig. A tápoldathoz már hozzáadtuk az antibiotikumokat is. Ezután elindítjuk az expressziót párhuzamosan a biotinilálással 1,5 mM IPTG és 50 µM biotin hozzáadásával. Ezután hagyjuk tovább nőni 4 órán keresztül 37°C-on.

Ezután a baktériumokat 4°C-on 4000 rpm-en 20 percen át centrifugálva gyűjtjük be, majd a kiülepedő sejt pelletet [PBS](#) pufferben újra eloszlatva (felszuszpendálva) újra lecentrifugáljuk 50 ml-es falcon csövekben. A felülúszót leöntjük, majd a sejt pellet ezután -80°C-on tárolhatóvá válik, amíg el nem kezdjük a konstrukt kinyerés folyamatát.

A kioldás (extrakció) folyamatának kezdő lépéseként [lízis](#) pufferben a sejt pelletet homogenizáljuk ún. potter homogenizátor segítségével. Ezután a maradék membránok eltávolítása végett szonikáltuk 15 egymást követő ciklusban 50%-os határfokon 2 percig, és minden 2 perc között másik 2 percig mágneses keverővel kevertük az oldatot végig jégben hűtve. Az eredményként kapott oldatot (homogenátum) 10500 rpm-mel 4°C-on legalább 35 percig centrifugáljuk. A felülúszót ezt követően 0,2 µm-es steril szűrőn is átszűrjük, hogy az esetleges lebegő részecskéktől (aggregátumok) megszabaduljunk.

Következő lépésként az oldatban lévő szenzor fehérjéket kell elválasztani az oldat többi részétől oszlopkromatográfiával, végül a szennyeződések eltávolítása után az oszlopról eluálni kell a fehérjét. A kromatográfiát a fehérjéken található His-címke által valósítjuk meg Ni²⁺-NTA gyanta segítségével. Ezt az eljárást Ni²⁺-affinitás kromatográfiának nevezzük. A gyanta előkészítése a következőképp ment végbe: Először egy üres oszlopba Ni²⁺-NTA gyanta szuszpenziót töltünk. Ezt követően 10 oszloptérfogatnyi desztillált vízzel átmoszuk a 20% etanolban tárolt gyantát, majd [lízis](#) pufferrel egyensúlyba hozzuk és 1 M imidazol oldattal is átmoszuk, ha esetleg lenne rajta valami szennyeződés, ami ezzel lejön, akkor az ne a fehérje

preparátumunkat szennyezze majd. Ezután [lízis](#) pufferrel újra egyensúlyba hoztuk, és benne is hagytuk. Az elválasztás folyamata 4°C-on történik. Először természetesen az elválasztandó fehérjét tartalmazó oldatot (extraktumot) adtam hozzá, pontosabban az előkészített gyantát adtuk az extraktumhoz, amit egy órán át csőforgatón, 4°C-on inkubáltunk. Ezután a csöveket óvatosan (500 rpm, 4°C, 15 perc) lefugáltuk, először a felülúszót töltöttük vissza az oszlopba, és hagytuk átfolyni rajta, majd a sűrűbb oszloptöltet szuszpenziót is az oszlopba töltöttük. Ezután következhetett a mosási eljárás, amely során a célunk a gyantában maradt nem-célfehérje anyagok kimosása. Először [lízis](#) pufferrel, majd [high salt](#), végül pedig [wash](#) pufferrel mossuk át. A gyantáról való leválasztását, azaz elúcióját a bioszenzornak a 350 mM imidazolt tartalmazó [elúciós](#) pufferrel valósítottuk meg. Az elúció hatékonyságát a lecsöpögő oldatból időnként egy-egy csepp mintát véve Bradford esszével követhetjük. A Bradford reagens barna oldat, ami fehérjéhez kötődve megkékül. Ismert koncentrációjú standard fehérje oldattal készített kalibrációval, lehetőséget ad az ismeretlen fehérje oldatok koncentrációjának spektrofotometriás meghatározására

2.2. *Ung*- BL21 törzsben termelt Avitag- Δ UNG tisztítása és *in vitro* biotinilálása

Kutatásom során egy társammal párhuzamosan megpróbálkoztunk az Avitag- Δ UNG konstrukt előállításával *ung*- BL21 *E. coli* törzsben. A sejtekkel felvetett plazmid ez esetben pAN4-es volt, amelyen ampicillin rezisztencia volt kódolva a sejtek transzformálás utáni szelektálása végett. Ezek a sejtek nagyobb expresszióra képesek, mint az AVB101 törzs tagjai, ugyanakkor le kellett így mondanunk az *in vivo* biotinilálás lehetőségéről.

A konstrukt biotinilálását a tisztítás közben két alkalommal kíséreltük meg. Először a homogenizálás során. Ez azért tűnt alkalmas időpontnak, hiszen ez egy viszonylag hosszadalmas eljárás, ezért ennek során juthatott idő a konstrukt biotinilálódására. Emellett a környezet is egész hasonló a citoplazmatikus viszonyokhoz. Ezért a módosított lízis pufferhez (a NaCl-ot kicseréltük KCl-ra a BirA előbbire való szenzitivitása miatt) hozzáadtunk még biotint, BirA enzimet, ATP-t és magnézium-acetátot, ezzel elvileg megteremtve a biotinilálódás lehetőségét.

A második lehetőség az oszlopkromatográfia során mutatkozott. Miután már minden szennyezőt eltávolítottunk a konstrukt mellől, az éjszakán át tartó inkubálás alatt a fenti négy anyagot újra hozzáadtuk a rendszerhez, most már azonban nagyobb mennyiségben. Itt amellet, hogy szintén jut idő a reakció végbemenetelére, az sem elfeljtendő, hogy az oszlop

tisztítottsága miatt itt van már a legkisebb esély arra, hogy valamely fehérje degradálódjon egy “elszabadult” proteáz által, habár ezt elkerülendő eddig is adtunk mindig proteázgátlót a rendszerhez.

A tisztítás többi lépése hasonlatos volt az [előzőekben](#) leírtakhoz.

2.3. GST-Avi-UdgX tisztítása BL 21 törzsben termelve

A konstruktot BL21 ung- *E. coli* baktériumtörzsben termeltettem meg. A fehérje a pGEX-4T-1 plazmidban volt kódolva.

A sejteket LB tápoldatban növesztettem 37°C-on OD=1 eléréséig. A médium már tartalmazza ekkor az antibiotikumokat, és 0,005 w%-ban FeCl₃-t. A folyamatot ezután 16°C-on folytatom. 0,6 mM IPTG hozzáadásával elindítom az expressziót, és 2 órán át hagyom munkálkodni a baktériumokat.

Másnap a kultúrát 4°C-on 3600-as fordulatszámom 20 percig lecentrifugálom. A kapott pelletet újra felfuszpendálom [PBS](#) pufferben, és 50 perces falkon csőben az előbbiekhöz hasonlóan újra lecentrifugálom. Ezután a végeredményképpen kapott pelletet lefagyaszthatom, és a további feldolgozásig -80°C-on tárolhatom.

A feltárás első lépése képpen potter homogenizátor segítségével homogenizálom a pelletet [lízis](#) pufferben. Ezután következik egy szonikálás, amely során 2 percig 50%-os hatásfokon szonikálom az oldatot, majd 2 percig mágneses keverővel kevertetem, mindezt jégben hűtve. A következő lépésként 4°C-on 11000 rpm-en 35 percig centrifugálom az oldatot.

Ezután előkészülök a glutation affinitás alapú oszlopkromatográfiához. Az oszlopot át kell mosni 3 oszloptérfogat [A](#) pufferrel. Az esetleg rajta lévő szennyeződések eltávolítása végett átmoszuk még 10 mM-os glutation oldattal is. (8-9) Ezután kezdetét veheti az oszlop átmosása. Először 5 oszloptérfogatnyi [dialízis](#) puffert engedünk át rajta, majd [A](#) puffert még 2 alkalommal.

Az elúciót 4°C-on éjszakán átnyúlóan valósítom meg, az oldatot rotátoron történő folyamatos forgatása mellett. A folyamatot trombin (40 µl/ 1 U/µl trombin per GST-Avi-UdgX 500 ml-es kultúrából) hozzáadásával inicializálom. Ezzel párhuzamosan ejtem meg az *in vitro* biotinilálást is. Ez 80 µM biotin, 160 µM ATP és 1 µg GSTBirA segítségével történik meg.

Az elúciót másnap 1 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) hozzáadásával állítom le, és az eluátumot még egyszer átmosom [A](#) pufferrel.

3. SDS-PAGE

A sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) során fehérjéket választhatunk el méretük alapján egy elektrolizáló cellában. A módszer lényege, hogy a különböző méretű fehérjéket denaturáljuk (, hogy az alakjuk ne zavarja a pontos mérés menetét), majd azonos mértékben negatívan polarizáljuk (ebből következőleg a pozitív pólus felé fognak majd vándorolni), így már csupán csak mérettől függő lesz egy-egy protein tényleges töltése. Végezetül tehát ugyanazon cellában töltésük alapján fognak elválni egymástól a különböző fehérjék, amely, mint már világos, egyértelmű összefüggésben van a méretükkel. A tényleges méret az egyik zsebbe töltött standard minta segítségével határozható meg, amelyben a fehérjék ismert méretűek.

A gél maga akrilamidból és bisz-akrilamidból álló polimer. A keletkező gél pórusos szerkezetű lesz, amely az összetevők arányának változtatásával állítható, az adott fehérjék méret tartományához illően, hogy a lehető legjobb felbontású képet kaphassuk az eljárás végén. A gél elkészítése során egy polimerizációs reakció megy végbe, amelyet ammónium-perszulfát iniciál. A reakció gyorsításához szükséges még katalizátort használni, amely szerep a tetrametil-etiléndiaminra (TEMED) jut. A reakció sebessége számos faktortól függ, ellenben ügyelni kell rá, hogy ne legyen túl gyors, máskülönben a pórusszerkezet nem lesz egyenletes. Ilyen befolyásoló tényezők a monomerek, illetve a katalizátor koncentrációja, de a hőmérséklet is, hiszen a reakció termodinamikailag exoterm.

A gél két alapvető részből áll: a tömörítő és a szeparáló gélből. A tömörítő gél feladata, hogy a zsebben található fehérjék egy vonalból, azonos helyről kezdhessék meg a méret szerinti szétválást. A gél futásának elején így az válik majd láthatóvá, hogy a minták szépen egy vonalban kezdik majd meg útjukat a szeparáló gélben. A szeparáló gél feladata, már nevéből következőleg is, a proteinek méret szerinti elválasztása.

A minták tartalmaznak brómfenolkék festéket is, amely segítségével könnyen nyomon követhető lesz az ún. fehérjefront haladása. Ez fontos, hiszen ez alapján látjuk, hogy még meddig kell folytatni a gélelektroforézist.

Amiután befejeztük az elektrolízist, a gél megfesthetjük coomassie kék festékkel, amely egy általános protein festék, ha nem specifikusan egy fehérjét (, vagy fehérje csoportot) szeretnénk kimutatni. A gél először desztillált vízben 3-szor 5 percig áztatjuk, így eltávolítjuk belőle a zavaró SDS-t. Ezután PageBlue™ coomassie festékben fél órán keresztül rázatjuk. A gél ezután a főösleges festék eltávolítása végett ideális esetben egy éjszakán keresztül hagyom desztillált vízben ázni. Ellenben, ha jobban szorít az idő, akkor egyes esetekben lehet

egy gyorsított eljárást alkalmazni. Ennek első lépéseként a desztillált vízbe ázó gél forrásig melegítem, majd 3-szor leöblítem újfent desztillált vízben. Ezt követően a festékekkel is az első buborékok megjelenéséig melegítem, de szigorúan lefedve, a felszabaduló metanol gőzök miatt. Ezt követően tovább áztatjuk desztillált vízben a gél, esetleg a festék felszívása végett tehetünk a vízbe zsebkendőt, vagy valamilyen hasonló nedvszívó anyagot. Ezt minnél tovább hagyjuk, annál részletesebb lesz a végleges gélkép. A kiértékelést ImageLab (BioRad) szoftverrel végzem el.

4. Western blot

A Western blot eljárás során immunfestéssel mutatunk ki előzőleg (SDS-gélen) méret szerint elválasztott fehérjéket. Jelen esetben én a szenzorok biotinizáltságának ellenőrzésére használtam ezt az eljárást.

Első lépésként az SDS-PAGE-en elválasztott proteineket átvisszük egy ún. polivinilidén-difluorid (PVDF) membránra. A blottolást MiniProtean blottoló apparátusban (Bio-Rad) vesszük végbe. Az apparátusba illesztendő két kazetta közé először 1-1 szivacsot, majd 1-1 filter papírt teszünk. Ezután a negatív pólus felőli oldalra tesszük a gél, a PVDF membránt pedig értelemszerűen a másik oldal felől úgy, hogy a membrán és a gél szorosan és buborékmentesen simuljon össze. A kazettát összecsukva betesszük a műszerbe, és az átviteli folyamatot [CAPS](#) pufferben, 350 mA-s áramerősséggel, 3 órán át, jéghűtés mellett végezzük.

Az antitestes festést megelőzve először [blokkoló](#) pufferben 1 órán keresztül ráztatás mellett áztatjuk a PVDF membránt szobahőmérsékleten. Ezután következhet az antitestes festés. Esetünkben azonban nem is antitesteket, hanem a biotint felismerő szterptavifin-HRP alkalmaztuk, amelyet 1:5000-es hígításban viszünk fel blokkoló pufferben a membránra, és inkubáljuk újabb 1 órán át. Ezután még a következő mosási lépéseket kell megejtenünk: 3*10 mp [TBS](#)-ben, 2*20 p [TBS-T](#)-ben és aztán újra 3*10 mp [TBS](#)-es mosás.

A fényjelek generálása végett ECL reagenseket használunk. A kapott jelek detektálását a Bio-Rad ChemiDocTM XRS+ készülékben végezzük el.

5. Uracil-DNS mennyiségi meghatározása

5.1. DNS gélelektroforézis

Az agaróz gélelektroforézis során DNS polimer darabokat választunk el egymástól méret szerint. Hasonlóképp a fehérjék méretbeli elválasztásához, itt is végezettel töltés és tömeg alapján fognak a különböző molekulák különböző sebességgel vándorolni a gélben. A

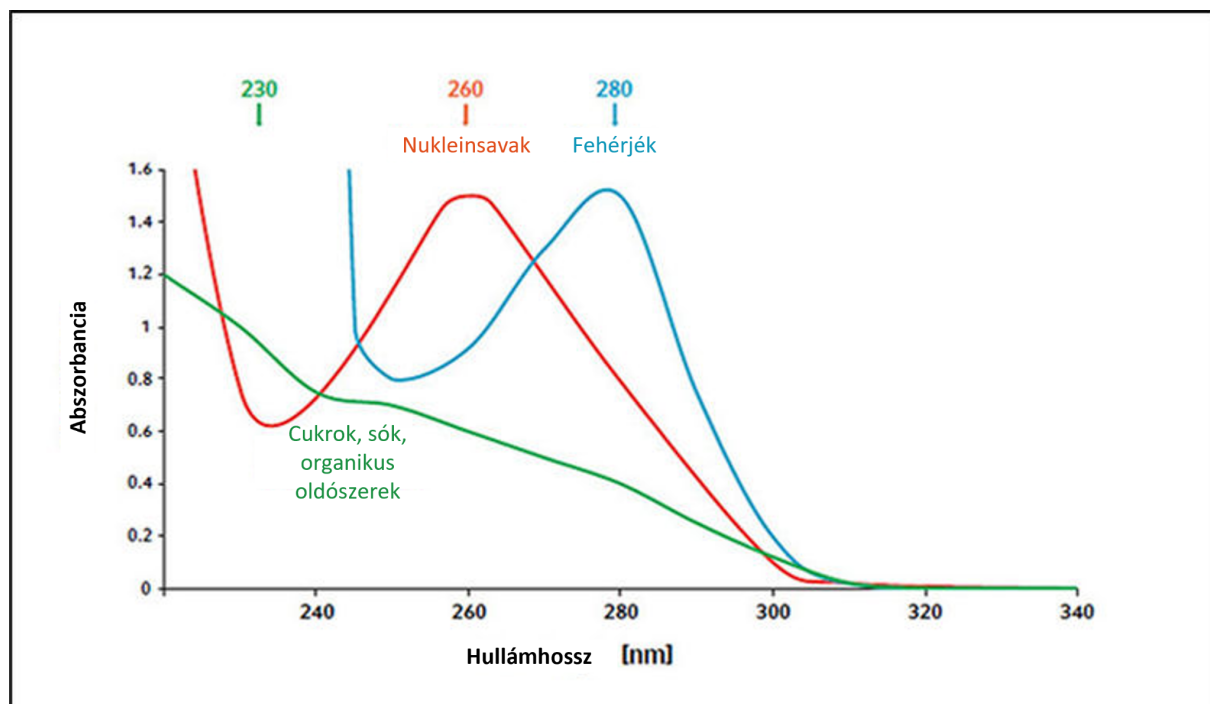
folyamat során azonban nincs szükség a molekulák polarizálására, hiszen ez már alapvetően adott a DNS molekulák negatívan töltött cukor-foszfát gerince révén. A DNS nagyobb méreténél fogva általában más felbontású gélt igényel, ezért ezeket (hacsak nem oligonukleotidok finom felbontású elválasztása a célunk) nem is poliakrilamid gélben, hanem nagyobb pórusméretű agaróz gélben valósítunk meg. 1% agaróz gél készítéséhez 0,3 g agarózt oldunk fel TAE pufferben forrásig melegítve, és a teljes oldódásig rázogattva. A kissé lehűlő oldathoz adunk 3 µl GelRed DNS festéket, a géltartó kádba töltjük, és behelyezzük a mintafelvívő helyeket kialakító fésűt. A gél megdermedése után a DNS mintákat 6X tömény mintafelvívő koktéllal (loading dye) keverjük össze és a TAE pufferrel feltöltött horizontális futtatókádba (Bio-Rad) helyezett gél mintazsebeibe pipetázzuk. A felvitt mintákat tartalmazó gél két végére feszültséget kapcsolva megkezdődik az elválasztás. A procedúra végén a használt standard minta segítségével könnyen lehet következtetni a molekulák méretére. A beolvasást Gel Doc XR+ géldokumentációs rendszerrel (Bio-Rad) vittük véghez. ImageLab (Bio-Rad) szoftverrel ki is értékelhetők a gélek: egyrészt a látszólagos molekulatömeg meghatározható, de denzitometriás értékeléssel a mennyiségi viszonyokra is következtethetünk.

5.2. DNS koncentráció meghatározása (UV spektrum (NanoDrop), Qubit fluoreszcens esszék)

A makromolekulák koncentrációjának meghatározására számos módszer létezik, de mindegyiknek megvannak sajnos a maga korlátai.

Az egyik általánosan elterjedt módszer, hogy az oldat UV/látható fényelnyelési spektrumából következtetünk a tiszta fehérje vagy nukleinsav oldat koncentrációjára. A nukleinsavaknak 260 nm-nél, míg az aromás oldalláncokat tartalmazó fehérjék 280 nm-nél adnak elnyelési maximumot (7.ábra). A spektrumokat spektrofotométerrel tudjuk rögzíteni. A hagyományos készülékekbe erre a célra készített speciális mintatartóba (ún. küvettába) kell viszonylag nagy mennyiségű mintát behelyezni (800 µl). Azonban az általunk mérendő minták rendszerint kis mennyiségben állnak rendelkezésre. De szerencsére az ilyen fehérje és nukleinsav minták megméréseire kifejlesztett NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific) készülékben (8A ábra) 2 µl mintából hígítás és küvetta tisztítási lépések nélkül közvetlenül meg tudjuk mérni az UV spektrumot. A DNS minták esetén a spektrum alakjából arra is következtethetünk, hogy mennyire tiszta nukleinsavval van dolgunk. Az A260/A280, illetve az A260/A230 arányok egyaránt 2 körül ideálisak. Az UV spektrummal viszont nem tudunk

különbséget tenni a hasonló elnyelést mutató anyagok között, így például a különböző nukleotidok között sem (DNS, RNS, szabad nukleotid).



7. ábra: Az UV-spektrum görbék lefutása különböző anyagcsoportok szerint. Forrás: [UV-Vis Spectrophotometry – Easy and Quick Quantification of Nucleic Acids - Eppendorf Handling Solutions](#)

A különböző nukleinsavak szelektív mérésére jobban megfelel egy fluorimetriás eljárás, ahol RNS-re, kettős szálú DNS-re (dsDNS), illetve egyes szálú DNS-re (ssDNS) specifikus fluoreszcens festéket használunk, és az erre kifejlesztett Qubit™ fluoriméterben (Thermo Fisher Scientific, 8B ábra) megmérjük ezek fluoreszcenciáját. Ezek a festékek a nukleinsavhoz kötődve fluoreszcensekké válnak, ami azt jelenti, hogy különböző hosszúságú fényre fognak egy más hullámhossz tartományban fényt leadni (emittálni), és az emittált fény intenzitása alapján meghatározhatjuk a mintában a különböző nukleinsavak koncentrációját.

Mi a DNS koncentráció meghatározására Qubit™ dsDNA Quantification Assay High-sensitivity Kit-et (Invitrogen™) használtuk. Itt a festékből először egy 200-szoros hígítást készítettünk a kitben adott pufferrel, majd ennek 199 µl-éhez egy 0,5 ml vékonyfalú PCR csőben 1-1 µl-DNS mintát adtunk, amelyet vortex-szel alaposan összekevertük, majd 2 percig szobahőn inkubáltuk, végül pedig a fluoriméterben a megfelelő programmal megmértük.

5.3. Uracil csepp blot

A csepp blot eljárás során egy blotra maximálisan 96 mintát vihetünk fel a Bio-Dot mikrofilter apparátus (Bio-Rad) segítségével (8C ábra). A 5 percig 95°C-on hődenaturált, majd hirtelen jégen lehűtött mintákat Hybond-N+ nylon membránra (Amersham) visszük fel, amelyen a vákuum általi rászívást és 10 perces száradást követően a mintákat 80°C-on 2 órán át immobilizáljuk.



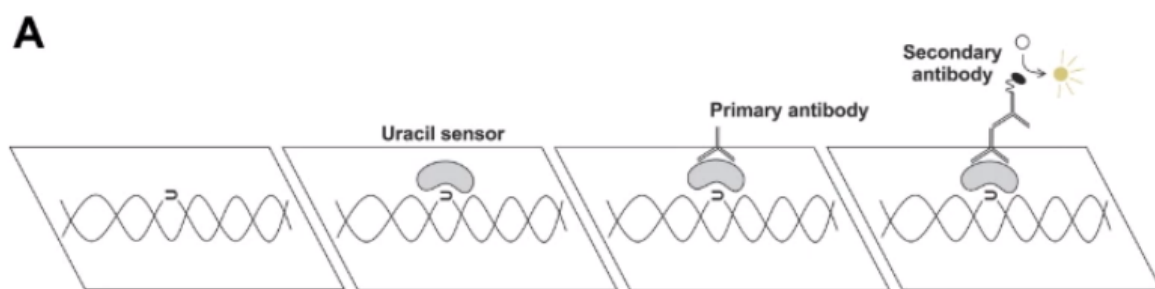
8. ábra: alkalmazott készülékek: A: NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) UV-spektrofotométer, B: Qubit 4 fluoriméter (Thermo Fisher Scientific), C: Bio-Dot mikrofilter apparátus (Bio-Rad). A fotók a gyártók honlapjáról, illetve brossúráiból származnak.

A vizsgált mintákból hígítási sorokat készítünk, amelyeket megelőző a standard mintasor. Ez egy *dut-/ung-* mutáns *E. coli*-ből származó magas uraciltartalmú DNS. Ebből egy hosszabb hígítási sort készítettünk, amelynek a utolsó tagja már a tiszta puffer. Ez utóbbi az abszolút minimumot hivatott meghatározni, amelynél kisebb vagy egyenlő értéket már nem lehet figyelembe venni (puffer általi háttér). A hígítási sor eredményeiből számítjuk majd a kalibrációs egyenest, amely segítségével majd a többi mintát fogjuk tudni meghatározni.

Ezek mellett minden mintából a hígítási sor első elemével megegyező mennyiségű mintából bemérési kontrollt (ún. “loading control”) készítünk, amellyel nem csak a hígítás pontosságát ellenőrizzük, de a különböző DNS minták esetlegesen eltérő immobilizálási hajlandóságát is. Egy ilyen loading kontrollal való korrekció majd mérések pontosságát fogja elősegíteni. A membránon immobilizált DNS-eket ekkor metilénkék festékkel festjük, majd a ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) készülékben a kolorimetriás módban fotózzuk, amit így a többi blothoz hasonlóan az ImageLab (Bio-Rad) szoftverrel tudunk denzitometriásan kiértékelni. Egy átlagos értéket egységnyinek véve, ahhoz hasonlítjuk a többi minta mennyiségét.

A blot fejlesztése során először a blokkoló oldatot visszük a membránra ([ETBS-T](#) + 5 w% tejpor, 10 mM β -merkaptóetanol; UdgX szenzor esetén csak 2 mM β -merkaptóetanol),

amelyhez hozzáadjuk a szenzor konstruktot is. A tejporra a membránhoz való aspecifikus kötődések megelőzése végett van szükség. Ezt azután egy éjszakán át egyenletes mozgattással (tálcában himbán, vagy csőben csőforgatón) 4 °C-on inkubáljuk. Ezután egy mosási procedúra következik. Ekkor a membrán 3*10 mp-ig, majd 3*10 percig hagyjuk ázni [ETBS-T](#) pufferben egyenletes mozgattás mellett. A következő lépés kétféle lehet a szenzor konstruktban lévő címkék szerint. Amennyiben a szenzor FLAG-taggal van ellátva, akkor egy egerben termeltetett anti-FLAG antitestet viszünk fel a membránra 1 w%-os tejporos oldatban 1:10000-szeres hígításban. Ha a konstrukton van biotinilált Avitag, akkor sztreptavidin-HRP-t viszünk fel a membránra ugyanúgy 1 w%-os tejporos oldatban, ugyanakkor ezt már sötétben tesszük meg a HRP-fényérzékenysége miatt. Mind a két esetben 1-1,5 óráig hagyjuk inkubálódni a membránt megintcsak folyamatos rázatás mellett. Ezután FLAG-tag használata esetében szükség van még egy antitestes festésre, amelyet megelőz az előbbihez hasonló [ETBS-T](#)-s mosás (3*10 mp, majd 3*10 p). Az anti-egér-Ig másodlagos antitestet, amely konjugálva van egy HRP-taggal, 1:80000-es hígításban 1 w%-os tejpor oldattal használjuk, és hagyjuk a membránt állni benne újabb 1-1,5 órán át. Persze ez is fénytől védetten történik már. Miután már a szendvics detektáló komplex (9. ábra) teljes egészében elkészült, a membránt újra átöblítjük 3*10 mp-ig [ETBS-T](#) oldattal, majd mossuk 3*10 percig. Ezután még szükséges a Tween-20 lemosása is a membránról, mert az gátolja a HRP enzim aktivitását, ezt 3*10 mp, majd még egyszer 10 p [ETBS](#)-s mosással valósítjuk meg.



9. ábra: Uracil-DNS detektálása csepp bloton. A membránon immobilizált DNS-ben található uracil (U) kötődik az U-DNS szenzor (babszem forma), aminek FLAG-címkéjét egy anti-FLAG antitest (primary antibody), majd azt egy HRP enzimmel konjugált anti-egér-Ig (secondary antibody) ismeri fel. A HRP enzim kemilumineszcens szubsztrátok hozzáadására fényjelet produkál. Az ábrát Róna Gergő cikkéből vettem (3).

Ezután már a membrán készen áll a beolvasásra. A kimutatás ECL-reagenssel ($\frac{1}{3}$ desztillált víz, $\frac{1}{3}$ - $\frac{1}{3}$ a két reagensből) történik, amely a HRP által katalizált reakcióban fény

jelet ad. A beolvasás ChemiDoc XRS+ készülékben történik, annak ún. “Chemi High Resolution Protocol”-ja szerint. Többféle exponálási időt használtam a megfelelő jelek beolvasása végett (ne is legyenek a jelek túl halványak, ugyanakkor kiégettek se).

A kiértékelés a Bio-Rad ImageLab szoftverével történt, az adatokat pedig Excel táblázatban foglaltam össze. Először a standard mintára kapott térfogati intenzitás értékek alapján kiszámoljuk a kalibrációs egyenes lefutását. Ez a minta egy korábbi független mérés alapján 6580 db uracilt tartalmaz millió bázisonként. Ezt megszorozva a tömeggel kapunk egy arányszámot, amely az egyenes y-tengelyéül fog szolgálni. Az x-tengely természetesen a feltöltött mintán mért intenzitás integrálja lesz. A minták uracil tartalmának meghatározása magától értetődően az előző visszafejtésével kaphatjuk meg. A kapott intenzitás érték alapján megkapjuk először a tömeg függvényében az uracilosodottság mértékét, majd mivel a tömeget is ismerjük, könnyedén ki tudjuk számolni az uracil előfordulását a DNS-ben egymillió bázisra vetítve. Ezután a kapott értékekből (az esetlegesen túlságosan kiugró értékeket kihagyva) átlagot és szórást számítunk. Ezeket az értékeket is már diagramban kimutatjuk, ugyanakkor készül egy másik diagram is, amelyben a loading control értékei alapján pontosított értékeket tüntetjük fel. Az utóbbinak a jobb összehasonlíthatóság végett van értelme, ha esetleg nem sikerült minden mintát azonos mennyiségben felvinni.

A TDK munkám során a szenzorok tesztelése mellett kettő, valódi biológiai minták uraciltartalmát mérő csepp blottot csináltam társaimmal együtt. Ezek a minták kollaborációs projektekből származtak. Az egyik sorozatban [gemcitabinnal kezelt mutáns hasnyálmirigyrák sejtvonalból](#) származó DNS-minták voltak, amelyek Grant Brown és Tajinder Uhbi kanadai kollaborációs partnerünktől származtak. Ezekben az APOBEC3C és APOBEC3D működését feltételezték. A másik mintasorozat [hiper-homociszteinémiás](#) tüneteket mutató, vastagbél adenómás betegek, illetve egészséges kontroll személyek biopsziáiból származó DNS-minták voltak. Ezek a minták Molnár Béla (SOTE) kutatócsoportjából származtak.

A két kísérleti elrendezést a 3. és a 4. (Molnár Béla kollaboráció), ill. az 5. és a 6. (Grant Brown kollaboráció) táblázatokban foglaltam össze:

DNS az első cseppben [μg]	Minták	c(start) [μg/μl] nanodrop	c(start) [μg/μl] Qubit	c(végső) [μg/μl]	oldat végső térfogata [μl]	minta térfogata [μl]	TE puffer [μl]	hígítás mértéke
0,005	<i>dut- ung- E. coli</i>	0,0229	0,0229	0,000125	528,0	2,88	525,1	2/3
0,5	39 NEG	0,046	0,048	0,0125	120,0	31,25	88,8	1/2
0,5	40 NEG	0,023	0,023	0,0125	120,0	65,22	54,8	1/2

DNS az első cseppben [µg]	Minták	c(start) [µg/µl] nanodrop	c(start) [µg/µl] Qubit	c(végső) [µg/µl]	oldat végső térfogata [µl]	minta térfogata [µl]	TE puffer [µl]	hígítás mértéke
0,25	56 NEG	0,02	0,021	0,00625	120,0	35,71	84,3	1/2
0,5	42 NAT	0,0294	0,024	0,0125	120,0	62,50	57,5	1/2
0,5	42 AD	0,0397	0,054	0,0125	120,0	27,78	92,2	1/2
0,5	86 NAT	0,134	0,082	0,0125	120,0	18,29	101,7	1/2
0,5	86 AD	0,135	0,1	0,0125	120,0	15,00	105,0	1/2
0,5	108 NAT	0,0479	0,039	0,0125	120,0	38,46	81,5	1/2
0,5	108 AD	0,0309	0,025	0,0125	120,0	60,00	59,5	1/2

3. táblázat: A Molnár Béla kollaborációs partnerunktól származó vizsgált minták számoláshoz szükséges jellemzői, és a blottal kapcsolatos adatai. A *dut*-, *ung*-, *E. coli* DNS-e a méréshez standardként szolgál. A NEG minták egészséges emberekből származó biopsziás szövetminták. A NAT és az AD minták párosával ugyanabból a személyből származó biopsziás szövetminták. Az AD minták a jóindulatú daganatokból (vastagbél adenómából) származnak, a NAT minták pedig ugyanennek a szövetnek az egészséges részéből. A c(start) a minták kiindulási koncentrációját jelzi két módszerrel is megmérve: a számoláshoz a Qubit esszével mért koncentrációkat használtuk, a NanoDroppal mért értékeket csak összehasonlításuként hagytuk benne a táblázatban.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<i>E. coli</i>		39 NEG	40 NEG	56 NEG	42 NAT	42 AD	86 NAT	86 AD	108 NAT	108 AD	
B												
C												
D												
E			39 NEG	40 NEG	56 NEG	42 NAT	42 AD	86 NAT	86 AD	108 NAT	108 AD	
F												
G												
H												

4. táblázat: A dot bloton a minták (mintasorok) elrendezési sorrendje. A 12. oszlop üres. A kék háttérű cellák a loading control-t jelölik, amelyet a membránon történő immobilizálást követően levágtunk a membrán többi részétől, és külön, metilénkézzel festettünk.

DNS az első cseppben [μg]	Minták	c(start) [μg/μl] nanodrop	c(start) [μg/μl] Qubit	c(végső) [μg/μl]	oldat végső térfogata [μl]	minta térfogata [μl]	TE puffer [μl]	hígítás mértéke
0,002	<i>dut- ung- E. coli</i>	0,018	0,018	0,00005	360,0	1,00	359,0	1/2
0,6	TU1-1	0,6179	0,386	0,015	120,0	4,66	115,3	1/2
0,6	TU1-2	0,3764	0,52	0,015	120,0	3,46	116,5	1/2
0,6	TU1-3	0,5997	0,414	0,015	120,0	4,35	115,7	1/2
0,6	TU1-4	0,3246	0,25	0,015	120,0	7,20	112,8	1/2
0,6	TU1-5	0,1832	0,26	0,015	120,0	6,92	113,1	1/2
0,6	TU1-6	0,173	0,139	0,015	120,0	12,95	107,1	1/2
0,6	TU1-7	0,8275	0,48	0,015	120,0	3,75	116,3	1/2
0,6	TU1-8	0,5497	0,422	0,015	120,0	4,27	115,7	1/2
0,6	TU1-9	0,5471	0,526	0,015	120,0	3,42	116,6	1/2
0,6	TU1-10	0,7378	0,272	0,015	120,0	6,62	113,4	1/2
0,6	TU1-11	0,5562	0,156	0,015	120,0	11,54	108,5	1/2
0,6	TU1-12	0,661	0,536	0,015	120,0	3,36	116,6	1/2
0,6	TU1-13	0,3712	0,426	0,015	120,0	4,23	115,8	1/2
0,6	TU1-14	0,4111	0,452	0,015	120,0	3,98	116,0	1/2
0,6	TU1-15	0,1878	0,232	0,015	120,0	7,76	112,2	1/2
0,6	TU1-16	0,1506	0,244	0,015	120,0	7,38	112,6	1/2
0,6	TU1-17	0,4025	0,404	0,015	120,0	4,46	115,5	1/2
0,6	TU1-18	0,2631	0,334	0,015	120,0	5,39	114,6	1/2
0,6	TU1-19	0,5677	0,334	0,015	120,0	5,39	114,6	1/2
0,6	TU1-20	0,1255	0,139	0,015	120,0	12,95	107,1	1/2
0,6	TU1-21	0,26	0,172	0,015	120,0	10,47	109,5	1/2

5. táblázat: A Grant Brown kollaborációs partnerünktől származó vizsgált minták számoláshoz szükséges jellemzői, és a blottal kapcsolatos adatai. A *dut-*, *ung-*, *E. coli* a DNS-e a méréshez standardként szolgál. TU1-1 pozitív mintaként szerepel, mely 5FdUR-rel kezelt UNG kiűtött sejtekből származó genomi DNS volt. A további mintákat részben összekeverve kaptuk: 5-ös csoportokban kezeletlen, alacsony, illetve magas koncentrációjú gemcitabin kezelés 24, illetve 72 órás mintái ebben a sorrendben szerepelnek, viszont azt nem adták meg számunkra, hogy melyik 5-ös csoport származik az *ung^{-/-}*, illetve az *apobec3c^{-/-} ung^{-/-}*, az *apobec3d^{-/-} ung^{-/-}*, vagy az *apobec3c^{-/-} apobec3d^{-/-} ung^{-/-}* sejtekből (vö. 1. táblázat).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<i>E. coli</i>	TU1 -1	TU1 -2	TU1 -3	TU1 -4	TU1 -5	TU1 -6	TU1 -7	TU1 -8	TU1 -9	TU1 -10	TU1 -11
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

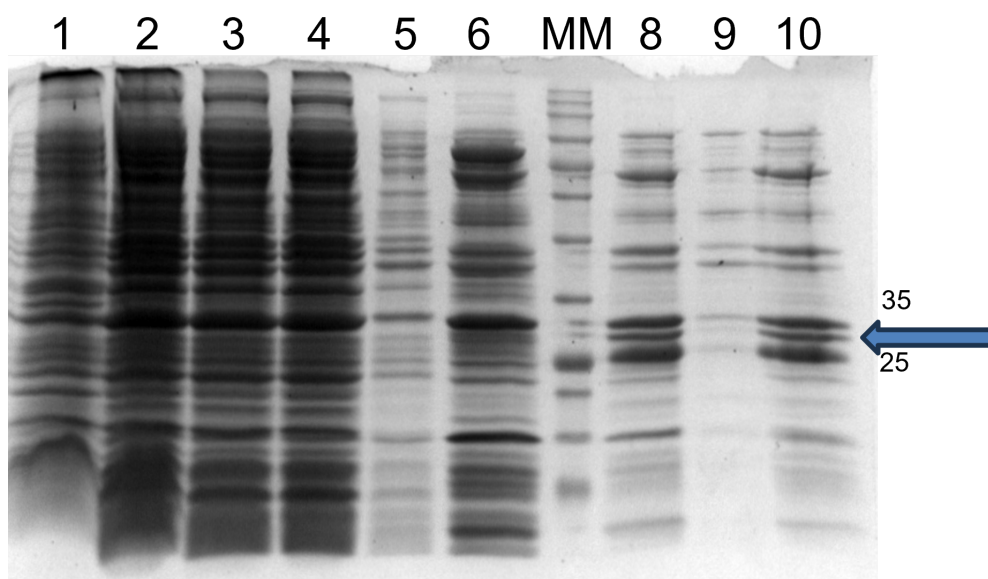
6. táblázat: A különböző mintákhoz tartozó hígítási sorok elrendezése a dot bloton. A hígítási sorokban a koncentrációk fentről lefelé csökkennek.

VIII. Eredmények és értékelésük

1. AVB101 sejtekben termeltetett és *in vivo* biotinilált Avi-ΔUNG fehérje konstrukt előállítása.

Első megközelítésben egy előzőleg letermelt és sejtben a feltehetőleg biotinilált Avi-ΔUNG szenzort szerettem volna előállítani. Ehhez a sejteket feltártam, majd a kioldható fehérjék közül a szenzor konstruktot a rajta lévő His-címkén keresztül Ni^{2+} -affinitás kromatográfiával szerettem volna tisztítani (ld. [protokoll](#)). Sajnos az Avi-ΔUNG előállítása koránt sem volt sikeres ebben a kísérleti összeállításban. Négy pont nevezhető meg problémaként, amelyeken megpróbáltunk javítani a következő próbálkozásakor.

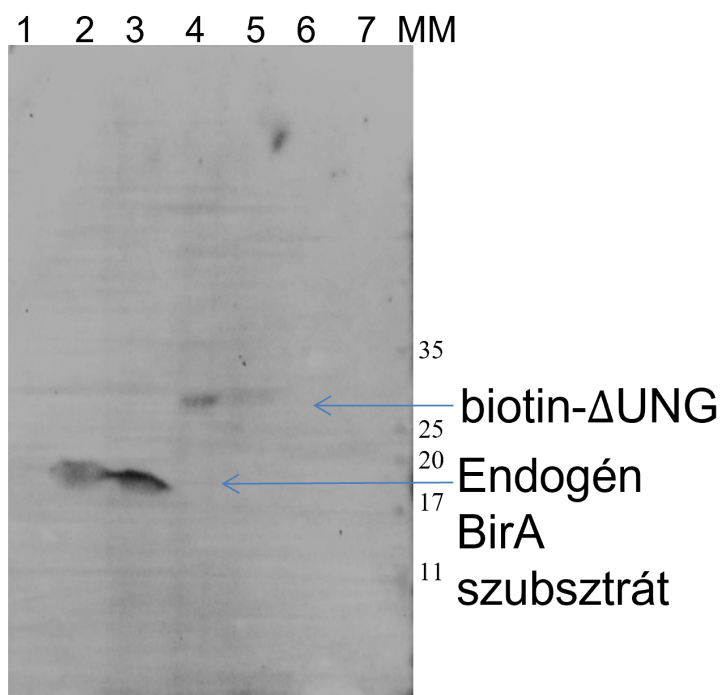
Az expresszálas és tisztítás különböző fázisait bemutató SDS-PAGE-n (10. ábra) jól észrevehető, hogy a 27 kDa látszólagos molekulatömeg körüli pozícióban várható szenzor fehérje nem tűnik elő markánsan a sejt többi fehérjeje közül (1-4 sávok), ami az expresszió igen kicsi voltára utal a sejtekben.



10. ábra: [SDS-PAGE](#) az előállítás különböző szakaszaiból. A minták sorrendje a következő: 1.: pellet, 2.: homogenizátum, 3.: extraktum, 4.: áteső, 5.: mosás, 6.: magas sós koncentrációs mosás, MM: marker, 8.: első elúció (350 mM imidazollal), 9.: második elúció (1 M imidazollal), 10.: dializált első elúció. Jobb oldalon a marker által jelölt két (a konstrukt szempontjából releváns) méret látható kDa-ban megadva. A kék nyíl jelöli a konstrukt helyének magasságát a gélben.

Az AVB101 sejtek előállították a BirA fehérjét is, amely *in vivo* lett volna hivatott biotinilálni a konstruktot a sejtáphoz adagolt biotinból. Egyéb biotinilálási módozatot ezért itt

nem alkalmaztunk. Azonban a mintákról készült Western bloton (11. ábra) látható, hogy a szenzor biotinilálódása nem igazán ment végbe. De az is lehetséges, hogy annyira kicsi volt az előállított konstruktt mennyisége, hogy még a bitoiniláltsága se volt kimutatható. Ehelyett az *E. coli*-ban kifejeződő endogén BirA szubsztrát jelent meg a szterptavidines festés során.

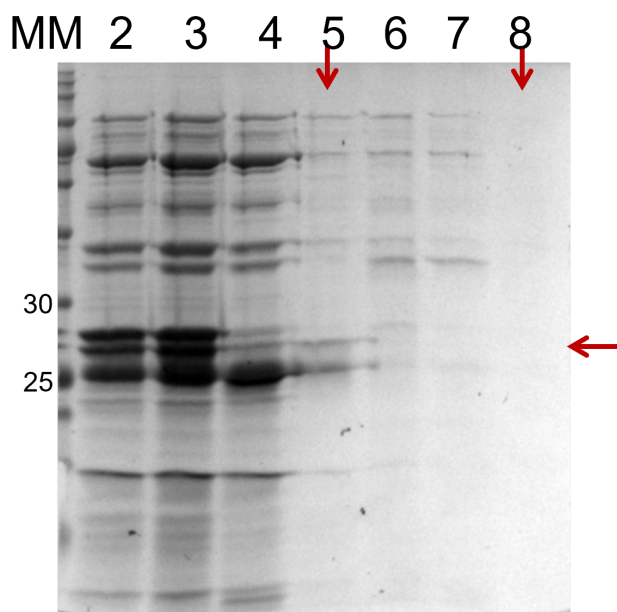


11. ábra: A biotiniláltságot ellenőrző sztreptavidin-HRP-s [Western blot](#). A minta sorrend a következő: 1.: pellet, 2.: homogenátum (itt kimutatható a maradék endogén BirA szubsztrát), 3.: extraktum (itt is kimutatható a maradék endogén BirA szubsztrát), 4.: 350 mM imidazolos elúció, 5.: 350 mM imidazolos elúció és a biotinos elúció, 6.: 1 M imidazolos elúció, 7.: 1 M imidazolos elúció és biotinos elúció. A kép mellett látható a marker által meghatározott méretek kDa-ban megadva.

Az SDS gélen (12. ábra) az is megfigyelhető, hogy az oszlopkromatográfiás elválasztás során az elúció sok más fehérjét is tartalmazott, mint az elválasztani kívánt konstruktt. A Ni^{2+} -NTA gyantás elválasztás feltételezhetően az alacsony expresszió miatt nem volt kellőképpen hatékony és specifikus. Mivel túl kevés volt a magas affinitású konstruktt az oldatban, emiatt marad hely a kevésbé erősen kötődő más egyéb fehérjék számára is, amelyek azután ugyanúgy leváltak az imidazolos mosással. Ezért sajnos az így kapott eluátum nem volt tiszta, ebben a formájában uracil-DNS mérésekben nem volt használható.

Pár nap elteltével a csoportban egy kollégám megpróbálta a konstruktt további tisztítását, most annak Avitag-jénél fogva Monomer avidin agaróz gyantán (Thermos Fisher). Ellenben ez a tisztítási kísérlet sem járt igazán sikerrel. Az ezen próbálkozás lépéseinek

állapotáról információt nyújtó SDS-gél (12. ábra) jól megmutatja, hogy az eluátum, már tisztább volt az előhöz viszonyítva. Ebben a lépésben az is megerősítést nyert, hogy az előző imidazolos elúciók (350 mM és 1 M) fehérjetartalmának sajnos csak kis töredéke a valóban a tisztítani kívánt biotinilált szenzorfehérje. A második, 1M imidazolos elúció gyakorlatilag nem tartalmaz már fehérjét. Ez a kromatográfiás eljárás sikertelensége is feltehetőleg az alacsony expresszió és/vagy biotiniláltság miatt léphetett föl.



12. ábra: A 3 nappal későbbi tisztítás lépéseit bemutató [SDS-PAGE](#). A gélnek két része volt, amelynek a másik fele blotként volt hasznosítva, ezért a markernél (MM) ketté lett vágva a gél. A minta sorrend a következő: MM: marker, 2.: dializált elúció, 3.: 350 mM imidazolos elúció 3 nappal később, 4.: 350 mM Monomer Avidin Agaróz (MA) áteső, 5.: 350 mM MA első elúció, 6.: 1 M imidazolos elúció 3 nap után, 7.: 1 M MA áteső, 8.: 1 M MA második elúció. A gél mellett a marker által meghatározott, a konstrukt szempontjából releváns méret van megadva kDa-ban. A sávokra mutató 2 piros nyíl az két elúció sávját hivatott kiemelni. A vízszintes piros nyíl a szenzor magasságának pozícióját jelöli.

Az eredményként kapott fehérje rendkívül kis mennyiségű lett, mérések végzéséhez nem elegendő mennyiségű.

2. Avi-ΔUNG illetve GST-Avi-UdgX konstruktok tisztítása és *in vitro* biotinilálása

Időközben a labor munkatársai további előrehaladásokat tettek a témában. Egyrészt az Avi-ΔUNG-His konstruktot átklónozták pET20b plazmidba, így megteremtve az erősebb

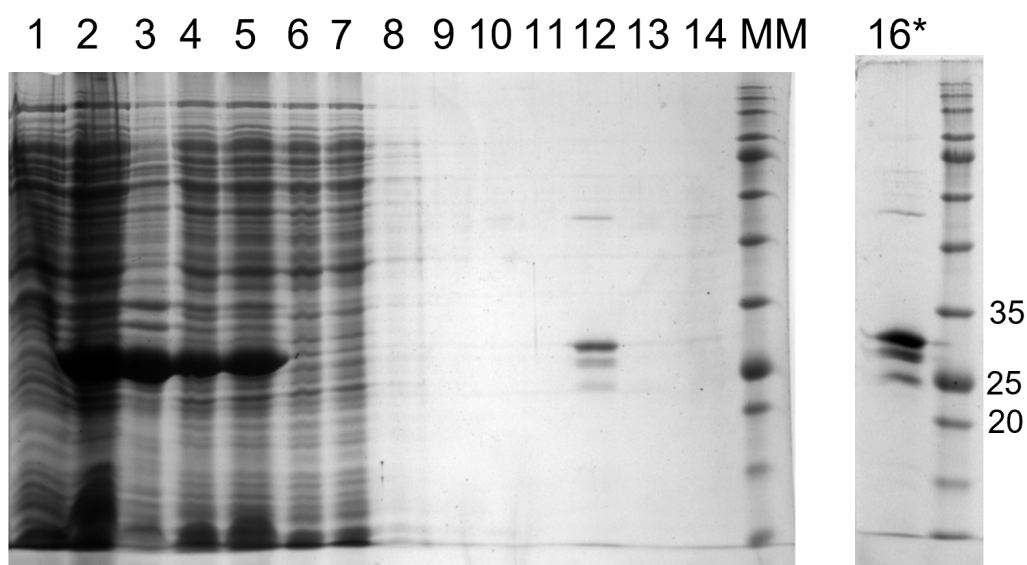
expresszió lehetőségét, de lemondva az *in vivo* biotinilálás előnyeiről. Másrészt a sok szempontból ígéretes UdgX alapú szenzorral kapcsolatban is azt találták, hogy az AVB101 sejtekben az Avitag-UdgX konstrukt hasonlóan gyenge expressziót mutat. Az UdgX esetében emellette lakarták kerülni a Ni-affinitás kromatográfiát, de legalábbis az imidazolos elúciót. A korábbi FLAG-UdgX konstruktot a laborban ugyanígy tisztították, de az időközben publikált eredmények szerint az imidazol tönkreteszi az UdgX egyszálú DNS-re szelektív, specifikus uracil-DNS-t kötő aktivitását (29). A fenti kettő szempontnak megfelelően ezért új konstruktot terveztek, melyben az Avitag-UdgX konstruktot GST-címke mögé klónozták, mert ezzel általában jól növelhető a problémásabb rekombináns fehérjék expressziója és oldhatósága is (30). Ezzel szemben az első kísérletekből világosan kiderült, hogy az expresszió ugyan hihetetlen mértékben megnőtt, a fehérje gyakorlatilag oldhatatlan maradt. Ezért a “kevesebb néha több” elvet követve, ugyanezen konstruktnak egy visszaszorítottabb termelésével próbálkoztak. Azonban még alacsony hőfokon (16 °C) is túl hosszúnak bizonyult az éjszakán átnyúló expresszálas, és az oldhatóság sem javult számottevően. Túl sok fehérjét termelt egy-egy sejt, így feltehetőleg nem volt képes ezek végleges térszerkezetét megfelelően kialakítani, és ezért elkülönítette azokat ún. “inclusion body”-kba. Ennek eredményeképp azt észlelték, hogy a szenzor nem volt jól oldható. Emelett a GST peptid által lehetővé tett glutation gyantás elválasztás a hagyományos, redukált glutationnal való elúcióval sem bizonyult megfelelőnek, mert tönkretette az UdgX aktivitását. A tönkretétel feltételezett oka valószínűleg a fehérjében lévő vas-kén klaszter redukálásából következhetett (a glutation egy redukálószer). Ezeket a tapasztalatokat felhasználva, az expressziós protokollt tovább módosítottuk, és erősebben felnövesztett sejtekben (OD=1), rövidebb ideig (2 órás) alacsony hőfokon (16 °C) fejeztettük ki a fehérjét.

A fenti két konstruktot egy társammal együtt párhuzamosan próbáltuk meg tisztítani.

2.1. BL21 *ung*- sejtekben termelt Avitag-ΔUNG tisztítása és *in vitro* biotinilálása

Az Avitag-ΔUNG konstrukt ekkori előállításában előrehaladás mutatkozott a korábbi próbálkozáshoz képest abban, hogy az expresszió most valóban sokkal erősebb volt. Az előállítás különböző fázisait bemutató SDS-PAGE-n is jól látható a háttérből egyértelműen kitűnő fehérje többlet (13. ábra, első 5 mintasáv). Azonban sajnálatos módon az is látható, hogy a centrifugálás utáni felülúszóban, az extraktban már nem található meg ez a jelentős konstrukt többlet. Feltételezhetően a konstrukt nem nyerte el teljes térszerkezetét a sejtben,

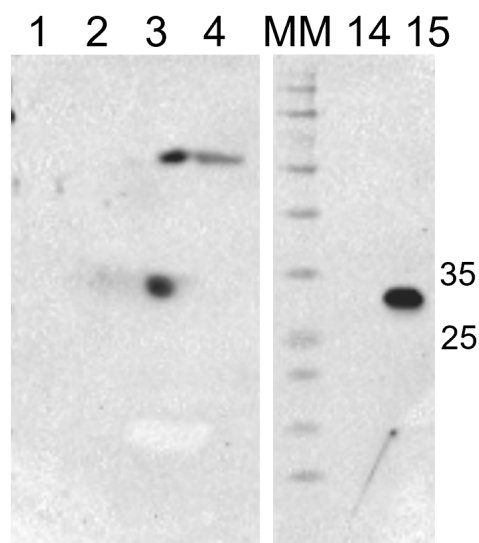
mivel túl sok fehérje szerkezetének helyes kialakítását (feltekeredését) a sejt nem tudta abszolválni. Emiatt a keletkezett hibás térszerkezetű fehérjéket “inclusion body”-kba különítette el, amelyek aztán a centrifugálás során a csapadékba kerültek. Ezt már sejtettük a tisztítás folyamán is, hiszen a homogenátum furcsa módon fehér színű volt, mint ahogyan a csapadék is. A mintáknak ezt a fehér színt az “inclusion body”-k jelenléte kölcsönözhetette. Ezzel együtt az affinitás kromatográfia révén sikerült összegyűjteni az oldatban lévő kis mennyiségű Avitag- Δ UNG fehérjét (13. ábra 12. mintasáv), melyet dialízis után még valamelyest tovább tudunk töményíteni (13. ábra 16. mintasáv).



13. ábra: Az Avi- Δ UNG tisztításáról készült SDS-PAGE, és a tisztítás eredményeképpen kapott koncentrált Δ UNG oldatról készült coomassie festéses membrán. A minta sorrend: 1.: indukció előtt, 2.: indukció után, 3.: pellet, 4.: homogenátum biotinilálás előtt, 5.: homogenátum biotinilálás után, 6.: extrakt, 7.: Ni-oszlopról áteső, 8.: első mosás (magas sós), 9.: 2. mosás (magas sós), 12.: áteső az oszlopon történt *in vitro* biotinilálási próbálkozás után (éjszakán át, 4°C), 11.: mosás, 12.: 1. elúció 350 mM imidazollal, 13.: 2. elúció 1M imidazollal, 14.: gyantán maradt frakció SDS mintakoktéllal leoldva, MM: marker, a másik membránon pedig (16) a dializált Δ UNG konstrukt látható. Jobb oldalon a szenzor szempontjából releváns marker által meghatározott méretek vannak feltüntetve, kDa-ban megadva.

Az Avi- Δ UNG BL21 sejtekben történő kifejezésével lemondunk az *in vivo* biotinilálás lehetőségéről. A biotinilálást tehát *in vitro* kívántuk megkísérelni, amit egyrészt a homogenizálás során, másrészt a Ni²⁺-oszlophoz kötött állapotban a rendszerhez adott tisztított BirA enzimmel, biotinnal és egyéb szükséges reagensekkel (ld. [protokoll](#)) kívántunk elérni. Azonban a folyamatról készített Western blot-on (14. ábra) jól látható, hogy sem a

homogenátumban, sem az oszlopkromatográfiás eljárás során nem sikerült biotinilálni a konstruktot.



14. ábra: A biotiniláltságot ellenőrző sztreptavidin-HRP-vel festett Western blot. A blotnak itt csak a releváns részletei vannak feltüntetve. A minta sorrend: 1.: homogenátum biotinilálás előtt, 2.: extrakt biotinilálás után, 3.: Ni-oszlopról áteső, 4.: első elúció 350 mM imidazollal, MM: marker, 14.: első koncentrált, dializált elúció, 15.: egy biotin pozitív minta. Jobb oldalon a szenzor szempontjából releváns marker által meghatározott méretek vannak feltüntetve, kDa-ban megadva. A konstruktot 27 kDa körül várjuk.

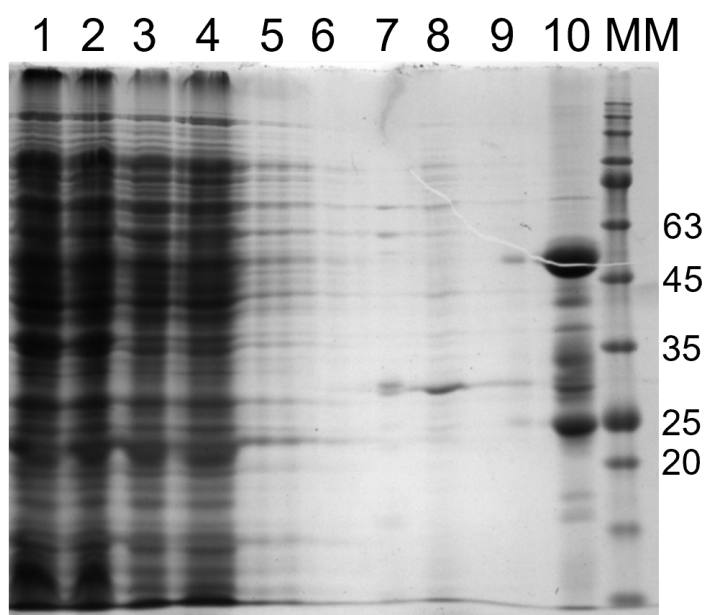
2.2. BL21 *ung*- sejtekben termelt GST-Avitag-UdgX tisztítása és *in vitro* biotinilálása

A GST-Avi-UdgX esetében is az expresszó sikeresnek titulálható. A folyamatról készült SDS-PAGE-n 50 kDa körül látható a vastagabb sáv, ami a GST-vel konjugált szenzornak felel meg (15. ábra, 1-4. mintasávok). Azonban sajnos az is megállapítható, hogy jelen esetben a GST továbbra sem növelte jelentősen az oldhatóságot. Ez következhet esetleg a fehérje túl nagy méretéből adódóan, de akár a teljes térszerkezet kialakulásának hiányából is.

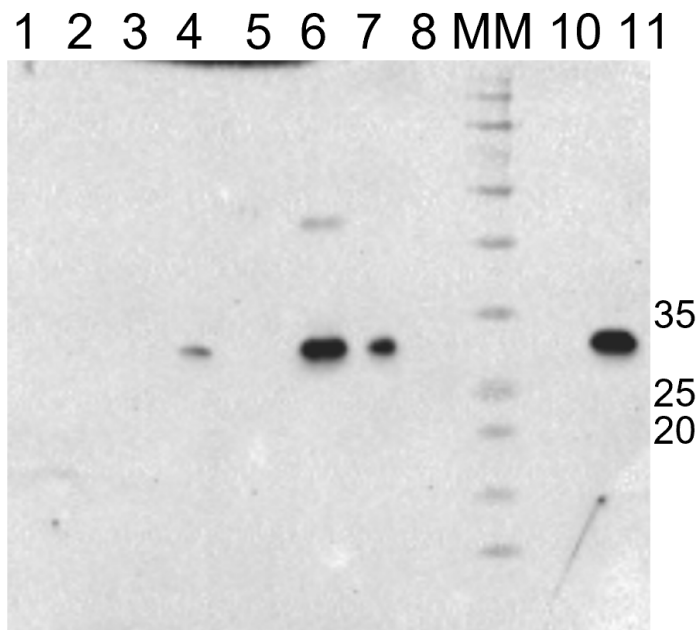
A fehérje tisztítását a fent leírt tapasztalatok tükrében úgy módosítottuk, hogy a glutation gyantáról való elúciót nem glutation oldattal, hanem a gyöngyökhöz kötött GST-fúziós konstruktot trombin proteázzal hasítottuk le specifikus módon (vö. [VII. 2.3 fejezet](#), 6. ábra). Ez esetben is *in vitro* próbálkoztunk meg a biotinilálással, amit az éjszakán át történő trombinos hasítási reakcióval egyidejűleg terveztünk megvalósítani, habár már a homogenizáláskor is adtunk reagenseket a biztosabb eredmény érdekében. A

homogenátumban ugyan ez esetben sem volt sikeres a biotinilálás, de a trombinos éjszakán át tartó elúcióval párhuzamos kísérletet siker koronázta (16. ábra).

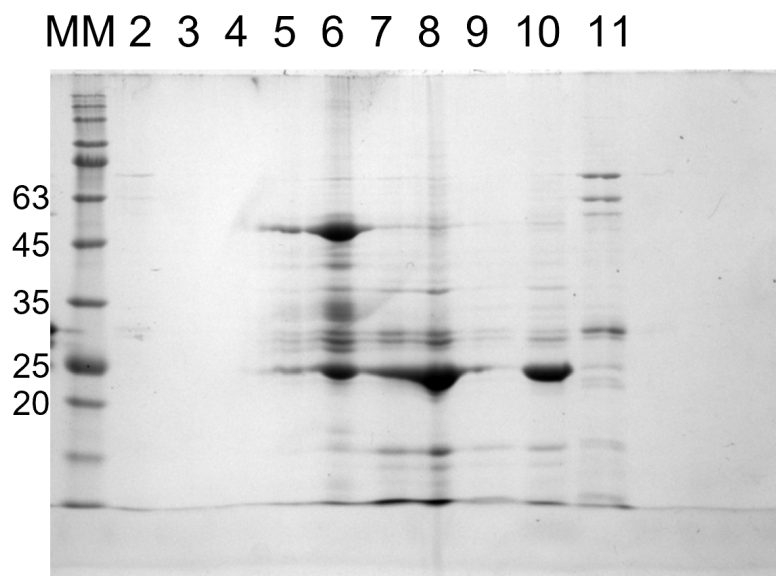
Az eljárásról készített első SDS-gélen (15. ábra) jól látható, hogy az első trombinos elúció nem volt teljes, sok fehérje még a GST-vel összeköttetésben a gyantához kötve maradt. Ezt látva a későbbiekben megpróbálkoztunk a trombinos elúciós lépések ismétlésével (17. ábra). Azonban látható, hogy csak lassacskán sikerült leválasztani a konstruktot a gyantáról, és az így kapott szenzor ráadásul nem is mutatkozott igazán stabilisnak az oldatban. Tehát a trombinos elúció elég körülményes volt és hosszúra nyúlt, nem a leghatékonyabb eljárás.



15. ábra: GST-Avi-UdgX tisztítását bemutató SDS-PAGE. A minta sorrend: 1.: homogenátum, 2.: csapadék, 3.: extrakt, 4.: áteső, 5.: mosás, 6.: mosás, 7.: mosás, 8.: elúció, 9.: mosás elúció után, 10.: gyanta maradék, MM: marker. A jobb oldalon a marker által meghatározott néhány méret érték látható kDa-ban.



16. ábra: A biotiniláltságot ellenőrző sztreptavidin-HRP festéses western blot. A minta sorrend: 1.: homogenátum biotinilálás előtt, 2.: extrakt, 3.: áteső a glutathion oszlopról, 4.: 1. elúció, 5.: 1. elúció mosás, 6.: glutation gyanta 1. kör után, 7.: 2. elúciós kör trombinnal, 8.: 3. elúciós kör trombinnal, MM: marker, 10.: egy biotin negatív minta, 11.: 1. elúció oszlopon és elúcióban biotinilálva, cc dializát frakció. A jobb oldalon a marker által meghatározott néhány méret látható kDa-ban megadva.



17. ábra: A GST-Avi-UdgX további trombinos elúcióiról készített SDS-PAGE. A minta sorrend: MM: marker, 2.: 1. elúció E1, 3.: üres, 4.: üres, 5.: 1. elúció mosás „E2”, 6.: gyanta maradék 1. elúció után, 7.: 2. elúciós kör trombinnal, 8.: gyanta maradék 2. elúció után, 9.: 3. elúciós kör trombinnal, 10.: gyanta maradék 3. elúció után, 11.: 1. elúció , cc dializát frakció. Sajnos a gél nem igazán volt jó

állapotú, ez kissé bizonytalanná teszi a kiértékelést (a szomszédos mintasávok átfolytak néhol egymásba). A bal oldalon a marker által meghatározott néhány méret látható kDa-ban megadva.

A fentiekben tehát láthattuk, hogy mind a kettő konstrukt esetében nehézségekbe ütköztünk azoknak oldhatóságával kapcsolatban. Ha és amennyiben sikerült oldatba vinni a fehérjéket, akkor is nehezen volt abban tartható. Ráadásul az Avitag- Δ UNG konstrukt *in vitro* biotinilálása sem működött valamilyen okból kifolyólag. Összességében a két szenzor tisztításából egyöntetűen az a következtetés vonható le, hogy az Avitag az N-terminálison feltételezhetően destabilizálja a fehérjéket. Ez könnyen belátható, hiszen mind a két konstruktban így helyezkedik el ez a szekvencia, és a többi részük pedig hasonló volt az eddig használt konstruktokéval, amelyek előállításánál ilyen problémák nem léptek fel. Sőt, az N-terminális FLAG-címkével kezdődő konstruktokat, még az UdgX-et is, hatékonyan lehet egészen magas koncentrációkig (20 mg/ml fölé is) töményíteni, ami azok kifejezetten jó stabilitására/oldhatóságára utal. Ezért a csoportban a közeljövőben új konstruktok klónozását tervezik, ahol a már bevált az N-terminális FLAG-címkét érintetlenül hagyva a C-terminálison helyezik el az Avitag-et.

3. Az előállított szenzorok tesztelése alacsony uracil tartalmú mintákon csepp bloton.

A szenzorok előállítását követően arra voltunk kíváncsiak, hogy mennyire hatékonyak ezek alacsony uracil-tartalmú mintákon. Ugyan ezen szenzorok kis mennyisége további méréseket nem enged már, de egy-egy uracil-DNS-t mérő csepp blot teszttel megpróbálkoztunk, amely méréseket két társam segítségével vittem véghez.

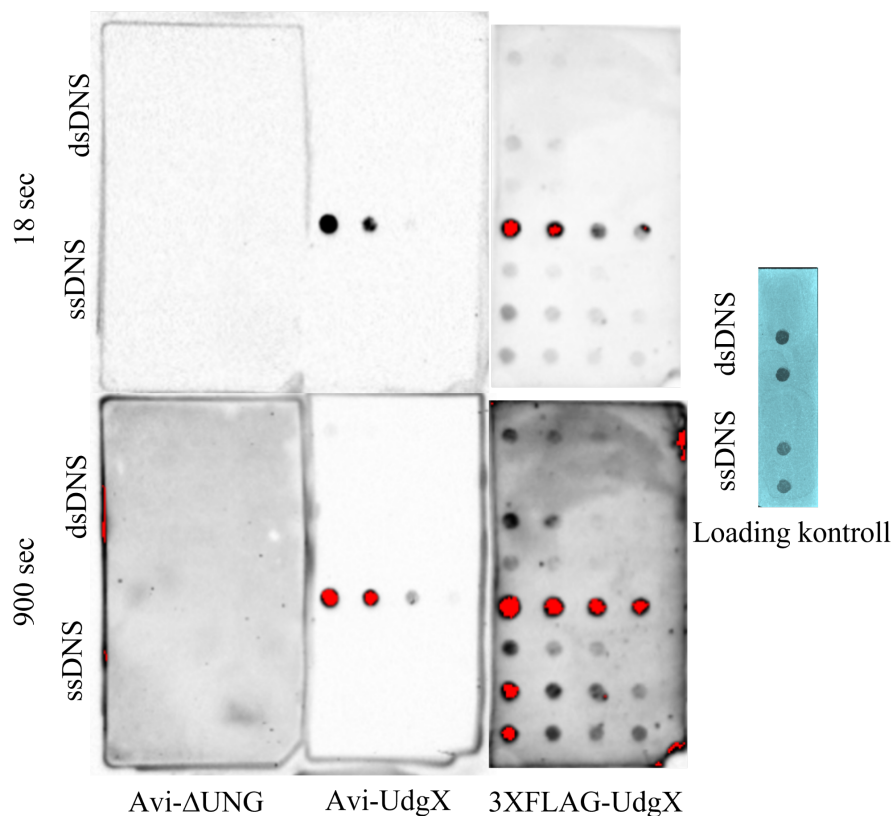
Az első esetben (18. ábra és 7. táblázat) a két újonnan előállított szenzor érzékenysége és specifikására voltunk kíváncsiak. Ezért ugyanazokon a mintákon teszteltük ezt a kettőt, és pozitív kontrollként (harmadik blot a 18. ábrán) használtunk egy FLAG-UdgX szenzort (vö. 6. ábra). A blotokon egyrészt a magas uraciltartalmú *ung- dut- E. coli* genomi DNS-éből, másrészt két humán biopsziából (vastagbélrák (CRC) és egészséges szövet (NAT)) származó, feltehetően alacsony uraciltartalmú genomi DNS mintából készítettünk hígítási sorokat (vö. 7. táblázat). Mindezt pedig úgy, hogy minden mintából készítettünk hődenaturálással egyszálúsított, illetve natív, azaz kétszálú DNS minta sorozatot is. A 18. ábrán jól láthatók a jelentős különbségek a szenzorok között.

Az Avitag-ΔUNG, mint azt már előzőleg a róla készített Western blot-ból is megtudhattuk nem biotinilálódott, így kimutathatatlan. Ennél fogva nem is érkezik a membránnak arról a részéről, amelyet ezzel kívátunk kimutatni, semmilyen jel. (Megjegyzés: Az uracil-DNS-t detektáló csepp blot készítésekor a Western blot eredménye még nem volt meg.)

Az Avitag-UdgX esetében egy erős specifitást kaptunk. Ez a szenzor csak az egyszálú és magas uraciltartalmú *E. coli* DNS-t mutatta ki, habár túlságosan gyors lefutással (18. ábra). Ez utóbbi talán következhetett egy nem teljes biotiniláltságból. Ha nem minden konstrukt lett biotinilálva, akkor habár mindegyik csatlakozik a DNS-hez, nem mindegyik ad jelet, így hibás információt közvetítve.

A FLAG-UdgX azonban sokkal kevésbé mutatkozott specifikusnak, mint az Avitag-gel ellátott párja. Ez is elsősorban az egyszálú DNS-t mutatta ki, de ezzel már számottevően érkezett a kevésbé uracilos beteg mintákból is jel. A kétszálú DNS-ről érkezett jelek ugyan itt is gyengébbek, mint ami az egyszálú párukról érkezett, de összehasonlításban a biotinossal fejtörésre adnak okot: vajon az imidazolt is látott FLAG-UdgX konstrukt uracil-DNS specifitása és/vagy ssDNS szelektivitása sérült-e, amint az az irodalmi adatok alapján feltételezhető.

Érdekes még megemlíteni azt a tényt, miszerint a kétszálú DNS legalább úgy, vagy még jobban immobilizálódik a membránon, mint az egyszálú. Ez jól látható a loading kontrollon (18. ábra). Ez egyben azt is jelenti, hogy a szenzorok az ssDNS mintákból érkező erősebb jelei nem az eltérő immobilizálási hatékonyságból erednek.



18. ábra: Az első teszt csepp blotjai. A blotokat két különböző expozíciós idővel rögzítve is mutatjuk (felső és alsó sor), hogy a relatív különbségek jobban láthatóak legyenek. Legjobbboldalt a 2 expozíciós időt feltüntettem. Alul az alkalmazott szenzorfehérjék jelölése (Avi=Avitag). ssDNS: hődenaturálással egyszálúsított DNS minták, dsDNS: “natív” kétszálú DNS minták. A minták elrendezését egyébiránt a 7. táblázat mutatja. A piros foltok az expozíció során telítésbe menő jeleket jelzi. A loading kontroll ugyanezen minták egy-egy cseppben történt felvitele utáni metilénkékes festéssel készült. Az *E. coli* minták jóval kisebb mennyiségük miatt ezzel a módszerrel nem látszódnak.

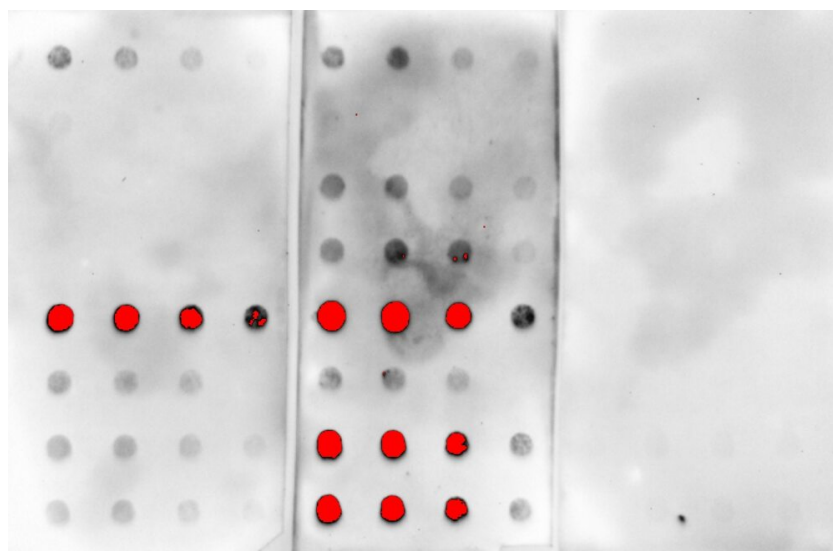
	1-4	5-8	9-12
A	<i>E. coli</i> st natív	<i>E. coli</i> st natív	<i>E. coli</i> st natív
B	<i>E. coli</i> st natív	<i>E. coli</i> st natív	<i>E. coli</i> st natív
C	NAT* natív	NAT* natív	NAT* natív
D	CRC* natív	CRC* natív	CRC* natív
E	<i>E. coli</i> st denaturált	<i>E. coli</i> st denaturált	<i>E. coli</i> st denaturált
F	<i>E. coli</i> st denaturált	<i>E. coli</i> st denaturált	<i>E. coli</i> st denaturált
G	NAT* denaturált	NAT* denaturált	NAT* denaturált
H	CRC* denaturált	CRC* denaturált	CRC* denaturált
	biotin-ΔUNG	biotin-UdgX	3XFlag-UdgX

7. táblázat: Az első dot blot mintáinak elrendezési rendje. Az *E. coli* st szolgál magas uracil tartalmú standard mintaként. A NAT, ill. a CRC minták Molnár Béla kollaborációs partnerünktől származik. A vastagbélrákos (CRC) szövetből származó biopsziás minta. A NAT ugyanennek a páciensnek az egészséges vastagbél szövetéből származó biopsziás minta. A mintákból az *E. coli* DNS esetén 7 tagú (két sorban), a CRC és NAT DNS-ekből 4 tagú felező hígítási sorokat készítettünk. Az első pontokban az *E. coli* DNS-ből 2 ng, a NAT és CRC DNS-ekből 0.3-0.3 µg mintát vittünk fel. A legalsó sorban látható, hogy melyik blotot melyik szenzorral mutattuk ki.

A 2. teszt (19. ábra és 8. táblázat) alkalmával a FLAG-címkés konstruktokkal való mérés lehetőségére, annak érzékenységére és specifikusságára, illetve a Δ UNG és az UdgX specifikáció közötti különbségekre voltunk kíváncsiak.

A FLAG-címke alapú detektálásból adódó esetleges aspecifikusságot úgy próbáltuk tesztelni, hogy a szenzorokat kihagyva, de ugyanazon antitestek inkubációját, illetve mosási lépéseket alkalmaztuk, mint az éles blotoknál. Így az első kérdésre hamar meg is kaptuk a választ. A jobb oldali membrán részlet (vö. 19. ábra, 9-12 oszlopok a 8. táblázatban) nem ad semmiféle jelet, még rendkívül hosszú expozíciós időnél sem, ahol a két szenzorral fejlesztett blot már bőven telítésbe megy. Tehát a FLAG-tag festése során nem beszélhetünk az antitestek aspecifikus kötődéséről.

A 3XFLAG- Δ UNG azonban a FLAG-UdgX-hez képest jelentősen kevesebb jelet produkál, mind az egyszálú, mind a kétszálú humán DNS mintákon. Érdekes azonban, hogy ez a magas uraciltartalmú *E. coli* DNS mintán egyáltalán nem olyan nyilvánvaló.



19. ábra: A második. teszt csepp blotjai. A minták teljesen megegyeznek a 18. ábrán bemutatott blottok mintáival. A bal oldali blotot 3XFLAG-deltaUNG, a középsőt pedig FLAG-UdgX szenzorral fejlesztettem, míg a jobboldali egy U-DNS szenzor nélkül, csak antitestekkel fejlesztett blot volt,

mellyel az antitestek aspecifikus kötődését akartam kizárni. Az ábrán 200 másodperces expozíciós időt használtunk. A piros foltok az expozíció során már telítésbe menő jeleket mutatnak.

	1-4	5-8	9-12
A	<i>E. coli</i> st natív	<i>E. coli</i> st natív	<i>E. coli</i> st natív
B	<i>E. coli</i> st natív	<i>E. coli</i> st natív	<i>E. coli</i> st natív
C	NAT* natív	NAT* natív	NAT* natív
D	CRC* natív	CRC* natív	CRC* natív
E	<i>E. coli</i> st denaturált	<i>E. coli</i> st denaturált	<i>E. coli</i> st denaturált
F	<i>E. coli</i> st denaturált	<i>E. coli</i> st denaturált	<i>E. coli</i> st denaturált
G	NAT* denaturált	NAT* denaturált	NAT* denaturált
H	CRC* denaturált	CRC* denaturált	CRC* denaturált
	3XFLAG-ΔUNG	flag-UdgX	anti-FLAG kontroll

8. táblázat: A második dot blot teszt mintáinak elrendezése. A dot blotot a minták elrendezése ugyanaz, mint ami a 7. táblázatban látható. A legelső sorban azt tüntettem fel, hogy melyik 4 oszlopot melyik szenzorral mutattuk ki. A 9-12 oszlopokra csak anti-FLAG antitestet vittünk fel, egy alapvető háttér feltérképezése végett.

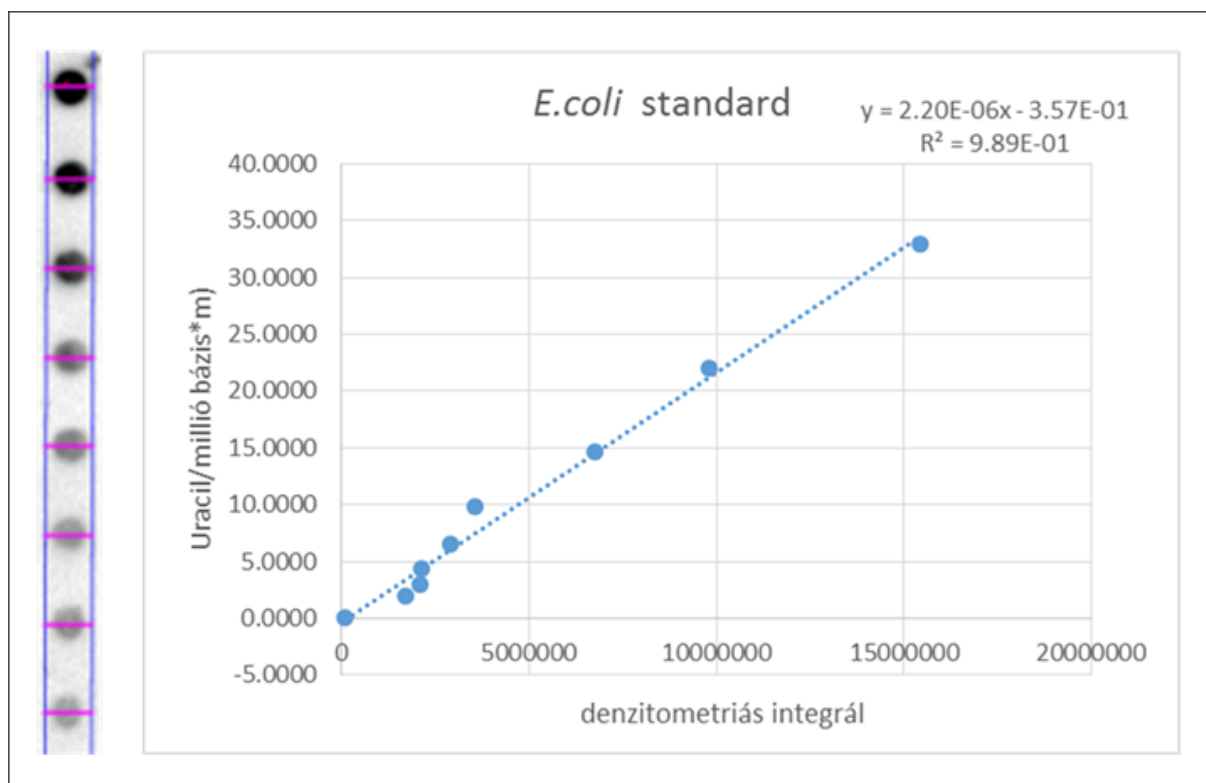
Konklúzióként a két tesztből levonható, hogy az UdgX (legalábbis az imidazollal eluált FLAG-UdgX) feltételezhetően kialakít az immobilizált DNS mintákkal valamiféle aspecifikus kötődést is, legalábbis bizonyos mintatípusok (pl.: humán biopsziából származó DNS) esetén. Sajnos arra még nincs nagyon ötlet, hogy vajon mi is lehet ez a kölcsönhatás, és mi okozza. Ugyanakkor az erősebb jelek akár nagyobb szenzitivitást is jelenthetnek, sőt akár még egy fordított helyzet is elképzelhető, hogy a kérdéses mintákban valamiért a ΔUNG alapú szenzor kötődése gátolt.

4. Betegminták uraciltartalmának vizsgálata

Molnár Béla (SOTE, Belgyógyászati Klinika & 3DHisTech Kft.) kollaborációs partnerünktől több [mintát](#) is kaptunk, hogy megmérjük azok uraciltartalmát. Ezek többek között jóindulatú vastagbél szöveti daganatok és egészséges biopsziás mintapárok, valamint teljes egészséges egyének biopsziás mintáiból izolált genomi DNS minták voltak.

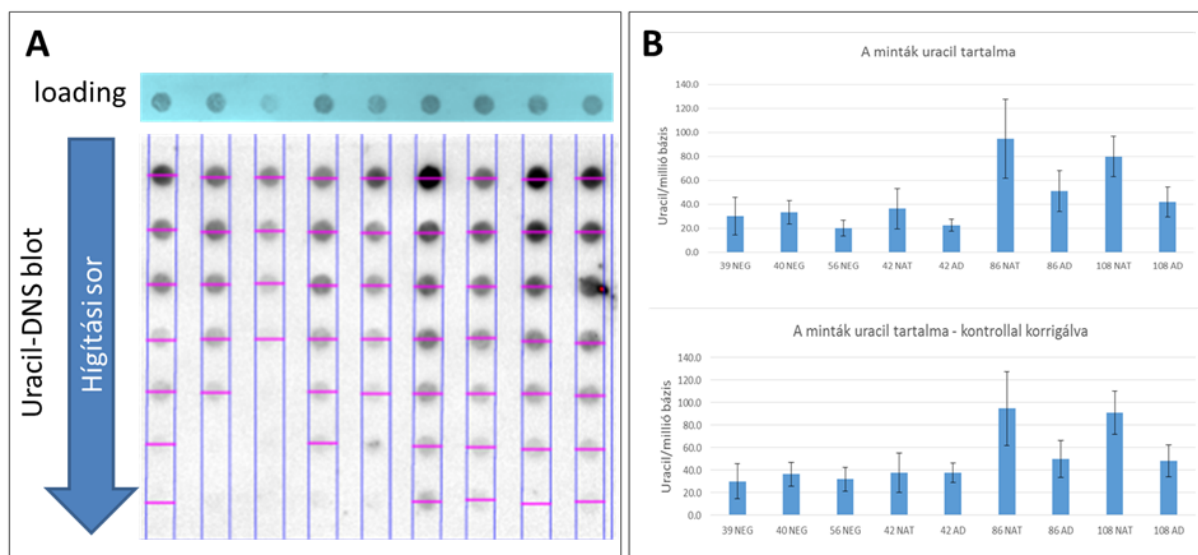
Jómagam egy társammal együtt egy ilyen csepp blot mérést végeztünk el. A kimutatáshoz [FLAG-UdgX](#) szenzort használtunk.

A [dot blot eljárás](#) már ismertetett menete alapján a számításaink a 20. ábrán látható standard egyenesből indultak ki. Az egyenes felállításához csak a látható pontokat vettük figyelembe és 0-ként a puffert kezeltük.



20. ábra: A standardként használt *E. coli* DNS blot és annak értékeléséből kapott kalibrációs egyenes. Balra a FLAG-UdgX szenzorral fejlesztett blot képe látható a denzitometriás értékeléshez definiált mintasáv területének (kék függőleges vonalak), illetve a foltok pozícióinak (rózsaszín vízszintes vonalak) feltüntetésével. A grafikon x-tengelyén szerepel a foltokban denzitometriásan mért intenzitás (denzitometriás integrál), az y-tengelyen pedig az uracilosodás mértéke millió bázisonként a tömeg függvényében. Az illesztett kalibráló egyenest használtuk az ismeretlen uaciltartalmú minták csepp blotjainak értékeléséhez.

A 21A ábrán látható a dot blot képe a kimutatási reakció után. (A felvitt minták mennyiségéről és elrendezéséről további részletek a 3. és 4. táblázatban találhatók) A kiértékelésben a 9. oszlop 4. sorában szereplő minta szennyeződött, így ezt értelemszerűen a kiértékelés folyamán nem vettük figyelembe. Emellett az 5. oszlopban szereplő 56 NEG mintából túl kevés állott rendelkezésre, ebből kifolyólag annak a hígítási sora eleve fele akkora mennyiségű minta bemérésével kezdődött (0,25 µg; 3. táblázat).



21. ábra: A betegmintákon készített uracil-DNS cseppblot és értékelése. **A:** A dot blot a 20. ábrán mutatott kalibrációs sorral egy membránon, FLAG-UdgX szenzorral egyszerre fejlesztve és ugyanúgy 83,6 mp-es hosszúságú exponálási idővel lett rögzítve. A denzitometriás értékeléshez definiált mintasáv területe (kék függőleges vonalak), illetve a foltok pozíciói (rózsaszín vízszintes vonalak) itt is feltüntetésre kerültek. A minták 0.5 µg DNS-ből induló felező hígítási sorban kerültek a membránra (kivéve a 3. oszlopban lévő, amiből csak 0.25 µg-ot tudtunk felvinni). A minták a különböző oszlopokban a következőképpen követik egymást: 39 NEG, 40 NEG, 56 NEG, 42 NAT, 42 AD, 86 NAT, 86 AD, 108 NAT, 108 AD. A bemérési kontroll (loading, fent) a második ponttal megegyező mennyiségű DNS minták metilénkéssel festett membránja.. **B:** A blot értékelése alapján a minták uraciltartalma millió bázisra vetítve. A fenti grafikonon a nyersadatokról, míg az alatta található a loading kontrollal korrigált adatokról számított értékek láthatóak.

A 21A ábrán felül látható a számításainkon pontosító bemérési (loading) kontroll. Itt is jól megfigyelhető, hogy a balról a 3. minta (56 NEG) bemérési koncentrációja jelentősen kisebb, mint a többieké. Számításaink során a 39 NEG (balról az első) mintából érkező jelet vettük 1-nek, ehhez viszonyítottuk a többi. Az előbb említett 56 NEG, amely 0,63-as arányszámot mutatott, mellett azonban még a 42 AD (balról 5.) minta is kisebb tömegben van jelen, itt az arány 0,60 volt.

A 21B ábrán látható a módszer ismertetésénél már leírt módon kiszámított uraciltartalom millió bázisra kivetítve oszlopdigramos elrendezésben. Sajnos a minták jelentős szórást mutatnak (nem egyenes lefutásúak, illetve másféle tendencia szerint változnak mint ami szerint a standardként használt *E. coli*). A másik oszlopdigramon (21B ábra, a loading kontrollal korrigált) is hasonló értékeket láthatunk az előzővel, talán kicsit jobban kiegyenlítettebbet egymáshoz képest.

A szórás az feltételezéseink szerint az UdgX szenzor valamiféle aspecifikus kötődéséből következhet. Az azonban eddig még nem ismert, hogy micsoda okozhatja ezt a pontatlanságot. Emellett vélhetőleg a standard *E. coli* DNS-ében is szerepelhet valami olyan tényező, amely az eukarióta beteg mintákban nincsen, avagy fordítva. Ez eredményezheti a tendenciák kevésbé összehasonlíthatóságát, és így a nagy szórást.

Ismerve a minták eredetét, nem lehet levonni messzemenő biológiai következtetéseket, a minták csekély száma miatt. Az jól látható, hogy az egészséges emberekből származó szövetekben a DNS-ben található uracil szintje elég alacsony. Ugyanakkor a három jóindulatú daganatos beteg közül is a 42-es számúnak mind a daganatos, mind az egészséges szövetéből származó DNS minták uraciltartalma az egészséges emberekéből származóval gyakorlatilag megegyeznek, míg a másik kettőben érdekes módon az egészséges szövetekben mutatható ki jelentősen több uracil, habár a daganatokban is megemelkedett ez a szám. Ezek az eredmények következhetnek egyedi sajátosságokból, amelyek kiértékeléséhez még sokkal több mintára lesz szükség. Ugyanakkor azt is szem előtt kell tartani, hogy a detektált különbségeket valamely független módon, vagy legalább egy másik uracil-DNS szenzorral is meg kell tudni erősíteni ahhoz, hogy hihető eredményeket kapjunk.

5. Különböző genetikai háttérű, gemcitabinnal kezelt hasnyálmirigyrák sejtvonalból izolált genomi DNS uraciltartalmának vizsgálata

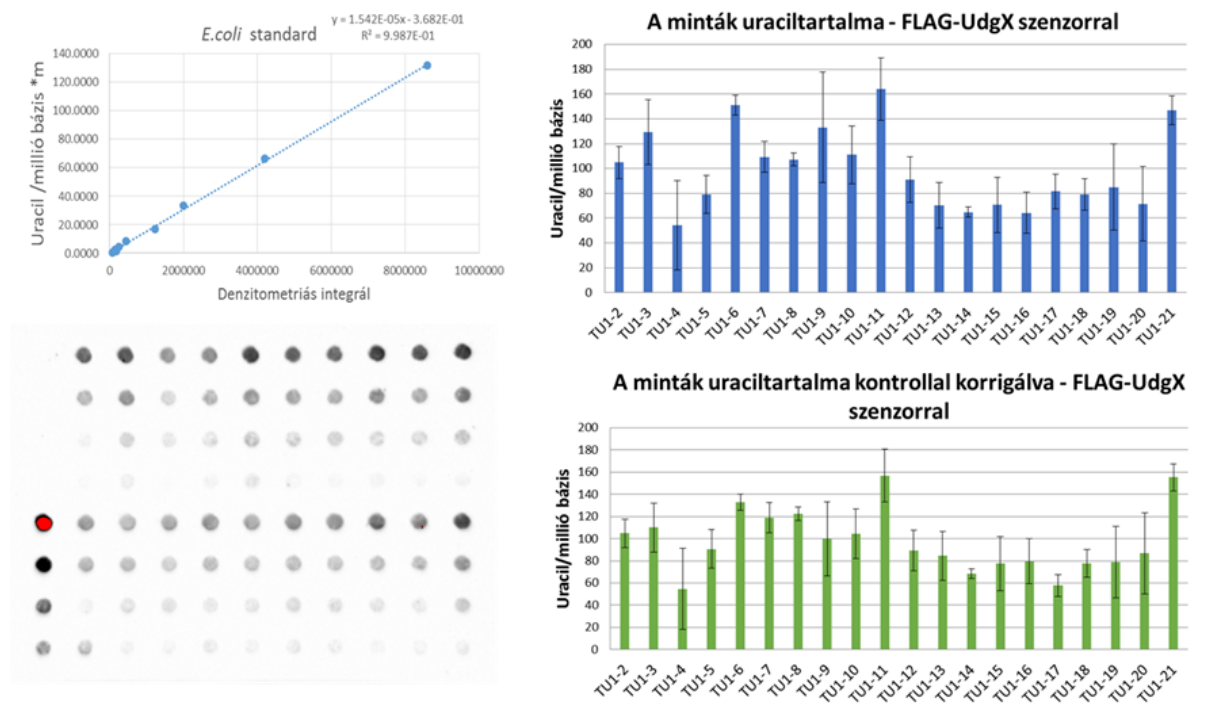
Grant Brown (Torontói Egyetem, Kanada) kollaborációs partnerunktől kapott gemcitabinnal kezelt mutáns (*apobec3c*, *apobec3d*, *ung* génkiütött (KO)) hasnyálmirigyrák sejtvonalból izolált genomi DNS (feltehetőleg alacsony uraciltartalmú minták) közül én is megmértem az egyik mintasort FLAG-UdgX szenzort használva. A mérés során azt akartuk kideríteni, hogy vajon van-e detektálható különbség a különböző mutációkkal rendelkező (ld. [mintaleírás](#)) sejtvonalak DNS-ének uraciltartalma között. Összesen négyféle genetikailag módosított sejtvonalból származó mintát kaptunk. A fő uracil-DNS glikozilázt kódoló *ung* gént mind a négyben kiütötték, hogy az APOBEC enzimek hatására citozinból kis mennyiségben keletkező uracil jobb eséllyel kimutathatóvá váljon. Az *ung* kiütésen kívül más módosítást nem tartalmazó sejtek (amelyek gemcitabinra rezisztensek és az A3C-t és D-t kifejezik) voltak a kontroll sejtek, míg a másik háromban a két APOBEC gén egyike, vagy mindkettő kiütésre került (ezekben a gemcitabinra mutatott érzékenység megnőtt). A végső összesítés kollaborációs partnerünk tudta csak megcsinálni, mivel mi a mintákat részben

kevert sorrendben kaptuk. A minták 5-ös csoportokban rendezetten szerepelnek (ld. 1. táblázat). Azt viszont nem adták meg számunkra, hogy melyik 5-ös csoport származik a különböző genetikailag manipulált sejtekből.

Az elkészült csepp bloton (22. ábra) a pozitív minta szépen kiemelkedik a többi minta közül. Azonban a kiértékelésben nem kaptunk semmilyen tendenciózus változást a minták között, mondhatni teljesen véletlenszerű eredmények érkeztek.

Emellett a kapott eredmények meglehetősen magasak is, irreálisnak tűnhetnek. Összehasonlításképp, a vad típusú UNG csendesítése mellett TS gátlóval kezelve érhető el egy 600 uracil / millió bázis körüli érték, ami a genom nagy részét érintő replikáció során timint helyettesítve épül be (4), szemben a jelen mintákkal, ahol az APOBEC enzimek hatása nyilvánvalóan az egyszálú DNS szakaszokra szorítkozik, amelyek meglehetősen limitáltak, leginkább az elakadt replikációs villákban van jelen ezekben a gemcitabinnal kezelt sejtekben. Emiatt nem tűnik valósnak a kezelés ismeretében az itt kapott érték, ennek nagy valószínűséggel alacsonyabbnak kell lennie.

A fentieken túl sajnos elég nagy szórást is mutattak a minták egy-egy hígítási soron belül, ami egybecseng a FLAG-UdgX szenzorral kapcsolatban kapott korábbi tapasztalatainkkal.



22. ábra: Grant Brown kollaborációs partnerunktől származó minták uraciltartalmának kimutatása

FLAG-UdgX szenzort használva. TU1-1 pozitív minta 5FdUR-rel kezelt, *ung* kiütött sejtekből származó genomi DNS. A többi mintával kapcsolatos részleteket az 1. táblázat tartalmazza. Balra fent

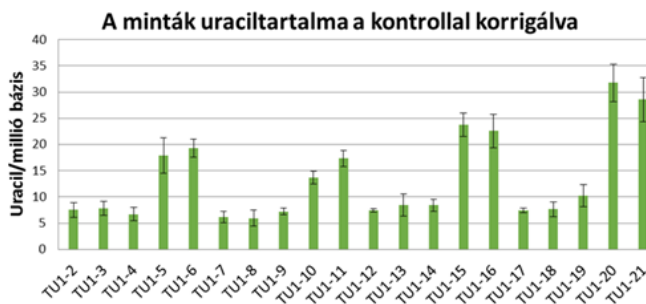
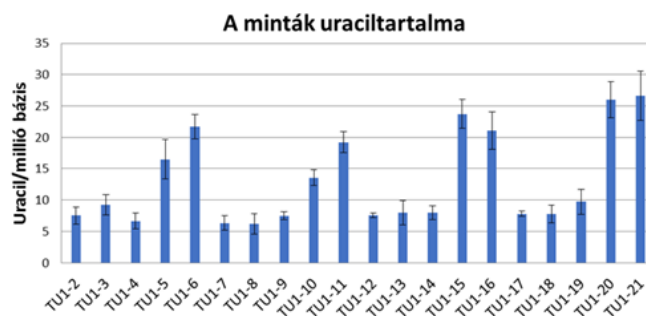
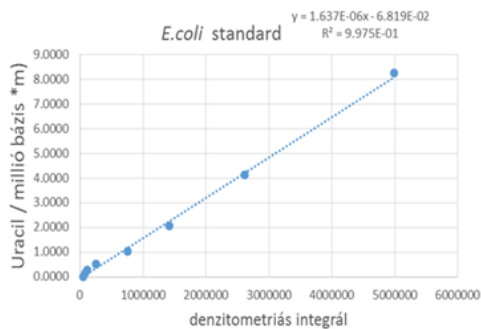
a *dut- ung- E. coli* DNS alapján felvett kalibrációs egyenes látható (vö. 20. ábra). Balra lent az előhívott uracil-DNS dot blot képe (a minták elrendezése ld. a 6. táblázatban). A két grafikonon a blot denzitometriás értékelésével kapott eredmények a nyers adatból (fent), illetve a külön membránon elkészített loading kontrollal korrigált értékek alapján (lent). A minták bemérési mennyiségei az 5. táblázatban találhatóak.

A kapott eredmények kevésbé meggyőző és értelmezhető volta miatt később a csoportban megismételték a mérést a kevésbé érzékeny, de lehet, hogy specifikusabb 3XFLAG-ΔUNG konstruktot használva is (23. ábra).

Ezesetben már egyértelmű tendencia mutatkozott a különböző minták között. Jól leolvasható mindkét oszlopdiagramról, hogy egy-egy csoportban a kezeletlenek és a 24 órás kezelésen átesett sejtvonalak esetében alacsony az uraciltartalom, gyakorlatilag megegyezik. Azonban 72 órás kezelés után már kimutatható a genomi uracil szint növekedése. Ezek mellett az is megállapítható, hogy a gemcitabin koncentrációja (500 nM vagy 1 μM) nem igazán játszik szerepet az uracil szint kialakításában.

Ezen mérés során már a nagy szórás sem jellemző annyira a hígítási sorokon belül, és a kapott értékek (5-30 uracil / millió bázis) is sokkal hihetőbb intervallumban mozognak.

Ez a két blot is azt a feltételezésünket támasztja alá, amelyet már láttunk a [szenzorok tesztelése](#) során is (19. ábra). Az UdgX konstrukt feltételezhetően valamiféle aspecifitással rendelkezik, és ebből következhetnek a kapott magasabb értékek, és a kevésbé tendenciózus eredmények.



23. ábra: Grant Brown kollaborációs partnerunktől származó minták kimutatása 3XFLAG-ΔUNG szenzorral. A jobb felső sarokban található a standard minta a rá illesztett kalibrációs egyenessel (vö. 20. ábra). A bal alsó sarokban a dot blot képe látható (minták elrendezése ld. a 6. táblázatban). A jobb oldalon fent a nyers adatokból számított értékek láthatóak, alatta pedig ugyanezek a loading kontrol értékeivel korrigálva.

Ezek a mérések természetesen nem fedik le a kollaborációs projekt teljes anyagát. A blotokat mindkét szenzorral további két biológiailag párhuzamos minta csoporton is megismételték a csoportban a nyár folyamán. A visszaküldött 3XFLAG-ΔUNG szenzorral készült eredmények alapján a kollaborációs partnerünk a következő ábrát készítette, amelyet bele tett a Nature Cancer folyóiratba visszaküldött átdolgozott kéziratba is (24. ábra).

IX. Összegzés

TDK munkámban a Genom metabolizmus kutatócsoport munkájába volt alkalmam bekapcsolódni, ahol egyrészt uracil-DNS szenzor fehérjék előállításában vettem részt, másrészt kétféle biológiai minta sorozaton végeztem uracil-DNS kimutatást. A munkám során megismerkedtem több molekuláris biológiai és fehérje kémiai módszerrel: rekombináns fehérje termeltetéssel, oszlopkromatográfiával, nukleinsav mérési és analizáló eljárásokkal, SDS-gélelektroforézissel és Western blot technikával, valamint a kutatócsoportban fejlesztett, a DNS uraciltartalmának mérésére szolgáló csepp blot módszerrel.

A munkám egyik célja az volt, hogy az alacsony uraciltartalmú genomi DNS minták méréséhez is elég érzékeny szenzor fehérjéket állítsak elő. Ehhez a laborban már klónozott újabb, Avitag címkén biotinilálható konstruktokat próbáltam bakteriális expressziós rendszerben kifejezni, majd kromatográfiás technikákkal tisztítani. Mind Δ UNG, mind pedig az uracilos DNS-t kovalensen kötő UdgX fehérjékből származtatott szenzorokkal dolgoztam. A sejtbeli biotinilálást biztosító AVB101 sejteket előzőleg már használták a laborban, de minden esetben nagyon kis mennyiségű fehérjét sikerült csak előállítani velük. Első lépésként én is ebben a rendszerben próbáltam a biotinilált Δ UNG szenzort előállítani, de ez továbbra sem adott kielégítő eredményt: az expresszió ezúttal még alacsonyabb volt, mint előzőleg. A munka második szakaszában már elérhető volt számomra a konstruktnak egy pET20b plazmidba átklónozott változata, ami alkalmassá tette, hogy a hatékonyabb BL21(DE3) expressziós sejteket használjam a fehérje termelésre, és ennek is egy olyan változatát, amelyből az endogén *ung* fehérje génje ki volt ütve. Itt a fehérjeexpresszió rendkívüli mértékben megnövekedett, viszont a fehérje oldhatósága nagyon kicsi volt, a legnagyobb része “inclusion body”-ba záródva a csapadékban maradt. Ráadásul a kismennyiségű kitisztított fehérje *in vitro* biotinilálása sem ment, aminek az okát valahol szintén a fehérje feltekeredésében, illetve ezen belül az Avitag címke elérhetőségében kereshetjük.

Ezzel párhuzamosan az UdgX alapú biotinilálható szenzorok közül egy az N-terminálison GST-címkével ellátott konstruktot próbáltam meg kifejeztetni és tisztítani. Itt az expresszió visszaszorítására is szükség volt, mert az előző tapasztalatok alapján a túlzott expresszió nagyon rossz oldhatósággal párosult. Ennek az UdgX szenzornak a tisztítása során el akartuk kerülni az imidazollal való találkozást, hogy kizárjuk az aktivitás és/vagy a specifikus sérülését (29). Továbbá a GST-címke révén glutation oszlopon történő tisztítás során el kellett kerülnünk az amúgy legkézenfekvőbb elúciós stratégiát, amelyben redukált

glutation oldattal szorítjuk le az oszlopon kötött GST-fúziós fehérjét. Ugyanis a glutation tönkretette a fehérje aktivitását, feltehetőleg az UdgX szerkezetében található vas-kén klaszter redukálása révén. Ezeket megfontolva a GST-Avitag-UdgX konstruktot sok sejtrel rövid ideig alacsony hőfokon (keveset és lassan) termeltettük, majd glutation oszlopon tisztítottuk, ahonnan a GST-címke trombinos hasításával eluáltuk a fehérjét. A trombinos hasítással párhuzamosan történt az *in vitro* biotinilálás is 4 °C-on éjszakán át, ami ezen konstrukt esetében sikeres is volt. Ugyanakkor a fehérje oldhatósága továbbra sem javult kielégítő módon, a trombinos elúciója nehézkes, a hasított fehérje oldatbeli stabilitása pedig kétséges volt. Mivel az N-terminálison FLAG-címkével ellátott konstruktok ennél jóval stabilabbak, és akár 20 mg/ml feletti koncentrációig is töményíthetőek, a jövőben egy másik stratégiát fogunk alkalmazni a biotinilálható konstruktok létrehozására: az Avitag címkét a konstruktok C-terminálisára klónozzuk, és az N-terminálist a már bevált konstruktokról mintázzuk. A kis mennyiségben előállított (GST)-Avitag-UdgX szenzort azért csepp bloton is teszteltük, és elgondolkodtató különbséget mutatott az imidazollal tisztított FLAG-UdgX-hez képest szenzitivitásban és specifitásban egyaránt.

A munka második felében a csoportban készen elérhető FLAG-címkés konstruktokat használtuk, elsősorban az érzékenyebbnek tűnő FLAG-UdgX-et. Két biológiai rendszerből származó mintasorozat uraciltartalmát vizsgáltuk, melyeket egyaránt kollaboráló partnereinktől kaptunk. Egyrészt megkíséreltük humán szöveti mintákból nyert DNS-ek vizsgálatát, melyeket jóindulatú vastagbél daganatos betegek beteg, illetve egészséges szöveteiből, valamint teljesen egészséges emberekből vett biopsziákból származtak. A FLAG-UdgX szenzorral kimutatott különbségek megerősítése, illetve értelmezése még további kutatás tárgyát képezi.

A másik mintarendszer kanadai kollaboráló partnerunktől, Grant Browntól (Torontói Egyetem) származik. Ők hasnyálmirigyrák sejtvonalon gemcitabin kemoterápiás szerre rezisztenssé váló klónokat izoláltak, és bennük kimutatták többek között az A3C és az A3D enzimek megnövekedett expresszióját. Ha ezekben a sejtvonalakban kiütötték ezt a két *apobec* gént egyesével, vagy mindkettőt, akkor a gyógyszerérzékenység valamelyest visszaállt. Ebből tehát arra következtettek, hogy az APOBEC-ek valamiképp elviselhetőbbé teszik, vagy fel tudják oldani a sejt számára problémát jelentő, a gemcitabin kezelés miatt elakadt replikációs villákat. A gemcitabin ugyanis egy olyan citidin nukleotid származék, amely beépülése esetén a polimeráznak egyszerűen nincs hol folytatnia a replikációt. Az APOBEC enzimek, DNS citozin dezaminázok lévén, ezeket a beépült nukleotidokat elérhetik és/vagy az elakadt villában hosszabb ideig jelenlevő egyszálú DNS-en lévő további

citozinokat is. A dezaminálással a DNS-ben megjelenő uracil aktiválja a lebontással és újraszintézissel járó javítást, ami az elakadt replikációs gépezet újraindításához hozzájárulhat. Ezt a hipotézist tudtuk az uracil-DNS szintek megméréseivel alátámasztani, amivel a már elbíralt kézirat átdolgozott verziójának visszaküldéséhez hozzájárultunk. A csoporttól kapott háromszor 21 mintán összesen 6 blotot végeztünk el, 3-at 3-at mindegyik szenzorral. Ezek közül én egy FLAG-UdgX szenzorral fejlesztett blotot készítettem el, mely eredménye egységes volt a másik két UdgX szenzoros blottéval. Habár ez az eredmény inkább negatív, és tovább erősíti a gyanúkat, miszerint az imidazollal tisztított UdgX (vagy az UdgX általában is) bizonyos mintákban az uracilon kívül valami mást is lát, ezzel a blottal, illetve a megelőző tesztekkel én is hozzájárultam a teljes kép kialakulásához és a két szenzor közti helyes választási döntés megszületéséhez.

X. Irodalomjegyzék

1. Petljak M, Alexandrov LB, Brammell JS, Price S, Wedge DC, Grossmann S, et al. Characterizing mutational signatures in human cancer cell lines reveals episodic APOBEC mutagenesis. *Cell*. 2019 Mar 7;176(6):1282-1294.e20.
2. Periyasamy M, Singh AK, Gemma C, Farzan R, Allsopp RC, Shaw JA, et al. Induction of APOBEC3B expression by chemotherapy drugs is mediated by DNA-PK-directed activation of NF- κ B. *Oncogene*. 2021 Feb;40(6):1077–90.
3. Róna G, Scheer I, Nagy K, Pálincás HL, Tihanyi G, Borsos M, et al. Detection of uracil within DNA using a sensitive labeling method for in vitro and cellular applications. *Nucleic Acids Res*. 2016 Feb 18;44(3):e28.
4. Pálincás HL, Békési A, Róna G, Pongor L, Papp G, Tihanyi G, et al. Genome-wide alterations of uracil distribution patterns in human DNA upon chemotherapeutic treatments. *eLife*. 2020 Sep 21;9.
5. Smith HC, Bennett RP, Kizilyer A, McDougall WM, Prohaska KM. Functions and regulation of the APOBEC family of proteins. *Semin Cell Dev Biol*. 2012 May;23(3):258–68.
6. Christofi T, Zaravinos A. RNA editing in the forefront of epitranscriptomics and human health. *J Transl Med*. 2019 Sep 23;17(1):319.
7. Sadeghpour S, Khodae S, Rahnama M, Rahimi H, Ebrahimi D. Human APOBEC3 variations and viral infection. *Viruses*. 2021 Jul 14;13(7).
8. Bogerd HP, Wiegand HL, Doehle BP, Lueders KK, Cullen BR. APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 10;34(1):89–95.
9. Zheng Y, Cantley LC. Toward a better understanding of folate metabolism in health and disease. *J Exp Med*. 2019 Feb 4;216(2):253–66.
10. Békési A, Holub E, Pálincás HL, Vértessy BG. Detection of genomic uracil patterns. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 9;22(8).
11. Nyíri K, Mertens HDT, Tihanyi B, Nagy GN, Kőhegyi B, Matejka J, et al. Structural model of human dUTPase in complex with a novel proteinaceous inhibitor. *Sci Rep*. 2018 Mar 12;8(1):4326.
12. Hirmondó R, Szabó JE, Nyíri K, Tarjányi S, Dobrotka P, Tóth J, et al. Cross-species inhibition of dUTPase via the Staphylococcal Stl protein perturbs dNTP pool and colony formation in Mycobacterium. *DNA Repair (Amst)*. 2015 Jun;30:21–7.
13. Kerepesi C, Szabó JE, Papp-Kádár V, Dobay O, Szabó D, Grolmusz V, et al. Life without dUTPase. *Front Microbiol*. 2016 Nov 14;7:1768.
14. Blackledge G. New developments in cancer treatment with the novel thymidylate synthase inhibitor raltitrexed ('Tomudex'). *Br J Cancer*. 1998;77 Suppl 2(Suppl 2):29–37.

15. Wilson PM, Danenberg PV, Johnston PG, Lenz H-J, Ladner RD. Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014 May;11(5):282–98.
16. Alqarni AM, Zeidler MP. How does methotrexate work? *Biochem Soc Trans*. 2020 Apr 29;48(2):559–67.
17. Van Tongelen A, Lorient A, De Smet C. Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Lett*. 2017 Jun 28;396:130–7.
18. Toraño EG, Petrus S, Fernandez AF, Fraga MF. Global DNA hypomethylation in cancer: review of validated methods and clinical significance. *Clin Chem Lab Med*. 2012 Oct 1;50(10):1733–42.
19. De Smet C, Lorient A. DNA hypomethylation in cancer: epigenetic scars of a neoplastic journey. *Epigenetics*. 2010 Apr 1;5(3):206–13.
20. Gospodarczyk A, Marczewski K, Gospodarczyk N, Widuch M, Tkocz M, Zalejska-Fiolkka J. Homocysteine and cardiovascular disease - a current review. *Wiad Lek*. 2022;75(11 pt 2):2862–6.
21. Shirode PS, Parekh AD, Patel VV, Vala J, Jaimalani AM, Vora NM, et al. Early detection of subclinical atherosclerosis: hyperhomocysteinemia as a promising marker in adolescents with vitamin B deficiency. *Cureus*. 2023 Jul 8;15(7):e41571.
22. Shah H, Jan MU, Altaf A, Salahudin M. Correlation of hyper-homocysteinemia with coronary artery disease in absence of conventional risk factors among young adults. *J Saudi Heart Assoc*. 2018 Oct;30(4):305–10.
23. ALSolami AA, Almalki AA, Alhedyan SY, Alghamdi A, Alzahrani SM, Dause WR, et al. Plasma Homocysteine Levels and Cardiovascular Events in Patients With End-Stage Renal Disease: A Systematic Review. *Cureus*. 2023 Jun 13;15(6):e40357.
24. Abu-Farha M, Al-Sabah S, Hammad MM, Hebbar P, Channanath AM, John SE, et al. Prognostic Genetic Markers for Thrombosis in COVID-19 Patients: A Focused Analysis on D-Dimer, Homocysteine and Thromboembolism. *Front Pharmacol*. 2020 Dec 9;11:587451.
25. Karst M, Hollenhorst J, Achenbach J. Life-threatening course in coronavirus disease 2019 (COVID-19): Is there a link to methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism and hyperhomocysteinemia? *Med Hypotheses*. 2020 Nov;144:110234.
26. Phokaewvarangkul O, Bhidayasiri R, Garcia-Ruiz P, Odin P, Riederer P, Müller T. Homocysteine, vitamin B metabolites, dopamine-substituting compounds, and symptomatology in Parkinson's disease: clinical and therapeutic considerations. *J Neural Transm*. 2023 Aug 21;
27. Moretti R, Caruso P, Dal Ben M, Conti C, Gazzin S, Tiribelli C. Vitamin D, homocysteine, and folate in subcortical vascular dementia and alzheimer dementia. *Front Aging Neurosci*. 2017 May 30;9:169.
28. Sang PB, Srinath T, Patil AG, Woo E-J, Varshney U. A unique uracil-DNA binding

- protein of the uracil DNA glycosylase superfamily. *Nucleic Acids Res.* 2015 Sep 30;43(17):8452–63.
29. Stewart JA, Schauer G, Bhagwat AS. Visualization of uracils created by APOBEC3A using UdgX shows colocalization with RPA at stalled replication forks. *Nucleic Acids Res.* 2020 Nov 18;48(20):e118.
 30. Young CL, Britton ZT, Robinson AS. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol J.* 2012 May;7(5):620–34.

XI. Függelék

1. A használt konstruktok szekvenciái

1.1. A vad típusú UNG szekvenciája

>sp|P13051|UNG_HUMAN Uracil-DNA glycosylase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UNG PE=1 SV=2

MIGQKTLYSFFSPSPARKRHAPSPEPAVQGTGVAGVPEESGDAAAIPAKKAPAGQEEP GT
PPSSPLSAEQLDRIQRNKAAALLRLAARNVPVGFGE SWKKHLSGEFGKPYFIKLMGFVAE
ERKH YTVYPPPHQVFTWTQMCDIKDVKVILGQDPYHGPNQAHGLCFSVQRPVPPPPSLE
NIYKELSTDIEDFVHPGHGDL SGWAKQGVLLLNAVLT VRAHQANSHKERGWEQFTDAVVS
WLNQNSNGLV FLLWGSYAQKKGSAIDRKRHHVLQTAHPSPLSVYRGFFGCRHFSKTNELL
QKSGKKPIDWKEL

His-tag, FLAG-tags, Avitag, TEV protease cleavage site, ALU-tag

1.2. 3XFLAG-ΔUNG

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKPLAARNVPVGFGE SWKKHL
SGEFGKPYFIKLMGFVAEERKH YTVYPPPHQVFTWTQMCDIKDVKVILGQNPYHGPNQAHG
LCFSVQRPVPPPPSLENIYKELSTDIEDFVHPGHGDL SGWAKQGVLLLNAVLT VRAHQANSH
KERGWEQFTDAVVS WLNQNSNGLV FLLWGSYAQKKGSAIDRKRHHVLQTAHPSPLSVYRGFF
GCRHFSKTNELLQKSGKKPIDWKELDTYRYI

1.3. Avitag-ΔUNG

MSG LNDIFEAQKIEWHEGAPSSRILENLYFQSAGPLAARNVPVGFGE SWKKHLSGEFGKPYF
IKLMGFVAEERKH YTVYPPPHQVFTWTQMCDIKDVKVILGQNPYHGPNQAHGLCFSVQRPV
PPPPSLENIYKELSTDIEDFVHPGHGDL SGWAKQGVLLLNAVLT VRAHQANSHKERGWEQFT
DAVVS WLNQNSNGLV FLLWGSYAQKKGSAIDRKRHHVLQTAHPSPLSVYRGFFGCRHFSKTN
ELLQKSGKKPIDWKELAGP HHHHHH

1.4. Avitag-UdgX

MSG LNDIFEAQKIEWHEGAPSSRILDYKDDDDKPMAGA QDFVPHTADLAELAAAAGECRGCG
LYRDATQAVFGAGGRSARIMMIGE QPGDKEDLAGLPFVGPA GRLLDRALEAADIDRDALYVT
NAVKHFKFTRAAGGKRRIHKTPSRTEVVA CRPWLIAEMTSVEPDVVLLGATAAKALLGNDF
RVTQHRGEVLHVDDVPGDPALVATVHPSSLLRGPKEERESAFAGLVDDL RVAADV RP

[vas-kén klaszter kialakításában fontos aminosavak](#)

katalitikus aktivitásban fontos aminosav

1.5. His-FLAG-UdgX

MAHHHHHVGTTGSNDDDDKSPDPNWELDYKDDDDKPS SGLVPRGSHMAGAQDFVPHTADLAE
LAAAAGECRGCGLYRDATQAVFGAGGRSARIMMIGE QPGDKEDLAGLPFVGPA GRLLDRALE
AADIDRDALYVTNAVKHFKFTRAAGGKRRIHKTPSRTEVVACRPWLIAEMTSVEPDVVLLG
ATAAKALLGNDFRVTQHRGEVLHVDDVPGDPALVATVHPSSLLRGPKEERESAFAGLVDDL R
VAADV RP

1.6. GST-Avitag-FLAG-UdgX

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGD
VKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLS
KLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI
PQIDKYLKSSKYIAWPLQG WQATFGGGDHPPKSDLVPRGSP EFQSGLNDIFE AQKIEWHEGA
PSSRI LDYKDDDDKPMAGA QDFVPHTADLAE LAAAAGECRGCGLYRDATQAVFGAGGRSARI
MMIGE QPGDKEDLAGLPFVGPA GRLLDRALEAADIDRDALYVTNAVKHFKFTRAAGGKRRIH
KTPSRTEVVACRPWLIAEMTSVEPDVVLLGATAAKALLGNDFRVTQHRGEVLHVDDVPGDP
ALVATVHPSSLLRGPKEERESAFAGLVDDL RVAADV RP

2. Pufferoldatok:

2.1. LB média:

pH=7

1000 ml H₂O

10 g tripton

10 g NaCl

5 g élesztő extrakt

sterilezés autoklávban

2.2. Lízis puffer

pH=7,5

50 mM TRIS-HCl

300 mM NaCl

0,5 mM EDTA

0,1% Triton-X100

1 mM PMSF

5 mM benzamidin

2 × cOmplete (EDTA-free) Protease Inhibitor Cocktail from Roche

10 mM β-merkaptoetanol

0,1 mg/ml lizozim
0,1 mg/ml DNáz
0,01 mg/ml RNáz A
5 mM β -merkaptotanol

2.3. Wash puffer

pH=7,5
50 mM Tris/HCl
300 mM NaCl
5 mM β -merkaptotanol

2.4. High Salt (HS) puffer

pH=7,5
50 mM Tris/HCl
500 mM NaCl
40 mM Imidazol
5 mM β -merkaptotanol

2.5. Elució puffer

pH=7,5
350 mM Imidazol
10 mM β -merkaptotanol
0,1 mM PMSF
0,5 mM benzamidine
dialízis pufferben

2.6. Dialízis puffer

pH=7,4
30 mM TRIS-HCl
140 mM NaCl
0,01% Tween-20
1 mM EDTA
15 mM β -merkaptotanol

2.7. CAPS puffer

pH=12

10 mM CAPS

10% metanol

2.8. TBS puffer

pH=7,5

20 mM TRIS

150 mM NaCl

2.9. TBS-T puffer

pH=7,5

20 mM TRIS

150 mM NaCl

0,1% Tween-20

2.10. Western blot blokkoló puffer

5% sovány tejpor

TBS-T pufferben

2.11. UNG puffer

pH=7,4

30 mM TRIS-HCl

140 mM NaCl

0,01% Tween-20

1 mM EDTA

15 mM β -merkaptoetanol

1 mM PMSF

5 mM benzamidin

2.12. ETBS puffer

pH=7,4

25 mM TRIS-HCl

2,7 mM KCl
137 mM NaCl
1 mM EDTA

2.13. ETBS-T puffer

pH=7,4
25mM TRIS-HCl
2,7 mM KCl
137 mM NaCl
1 mM EDTA
0,05% Tween-20

2.14. Dot blot blokkoló puffer

5 % sovány tejpor
10 mM β -merkaptóetanol
ETBS-T pufferben

2.15. TE puffer

pH=8.0
10 mM TRIS-HCl
1 mM EDTA

2.16. PBS puffer

0,137 M NaCl
0,0027 M KCl
0,01 M Na_2HPO_4
0,0018 M KHPO_4

2.17. A puffer

pH=7.5
20 mM Tris
500 mM NaCl
10 % glicerin