B 5556

A COLICIN E7 NUKLEÁZ DOMÉN, MINT EGY LEHETSÉGES MESTERSÉGES METALLONUKLEÁZ ALAPJA

Doktori értekezés tézisei

Czene Anikó

Témavezető: Dr. Gyurcsik Béla

Szegedi Tudományegyetem
Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék
Kémia Doktori Iskola

Szeged
2013

SZTE Klebelsberg Könyvtár SZEGED 13.

Bevezetés és célkitűzés

A nukleázok a nukleinsavak foszfodiészter kötéseinek hidrolitikus hasítását elősegítő enzimek. Ezen az élet szempontjából nagy jelentőséggel bíró folyamatban mind specifikus, mind nem-specifikus nukleinsav-szekvenciákat felismerő enzimek részt vesznek a célnak megfelelően. A rekombináns DNS technológia felismerve a nukleázokban rejlő lehetőségeket, főleg a specifikus enzimeket alkalmazza, legelterjedtebben pl. a természetben is előforduló bakteriális restrikciós endonukleázokat. Ezen az enzimek segítségével számos, rájuk jellemző DNS szekvencia célzott hasítása vált lehetővé. Hátrányuk azonban, hogy a célszekvenciák viszonylag rövid DNS szakaszok, illetve nem választhatóak meg tetszőlegesen. Ily módon egy nagyobb méretű DNS, mint pl. a humán kromoszóma célzott kezelésére, nem alkalmasak. Tanulmányozásuk azonban jó kiindulópontot szolgáltatott olyan új mesterséges enzimek tervezéséhez és létrehozásához, melyek általunk meghatározott szekvenciák felismerésére és hasítására képesek.

Az ilyen enzimek jelentősége a DNS, illetve gének módosításában, hibás gének javításában, azaz génterápiás alkalmazásban rejlik, ami miatt a mesterséges nukleázok fejlesztése a tudományos érdeklődés középpontjában áll. Kimutatták ugyanis, hogy a sejtek DNS javító mechanizmusainak működése indukálható a DNS kettős szálú hasítása révén. Amennyiben ez utóbbi reakció egy hibás szekvenciával rendelkező DNS szakaszon (öröklött genetikai betegség, vagy rákos megbetegedést okozó génmódosulás) vagy annak közelében történik, és jelen van egy ép szekvenciájú DNS molekula is, akkor az ún. homológ rekombináció révén a sejt a hibás szekvenciát kijavíthatja.

Ilyen célra potenciálisan alkalmas, ún. kimer mesterséges nukleázt állítottak elő a FokI restrikciós endonukleáz önállóan funkcionáló nukleáz doménjéből egy specifikus DNS szekvenciát felismerő ún. cink-ujj fehérjéhez fűzve azt. Ezek a cink-ujj nukleázok az elmúlt 15 évben számos genetikai jellegű kísérlet alapját képezték, melyek sikereinek következtében a humán terápiás alkalmazásokig is eljutottak. Sajnos ebben a fázisban az cink-ujj nukleázok nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket, azaz hogy genetikai megbetegedések kezelésében, ill. gyógyításában hatékonyan működhetnek. Ennek oka a kezelések után egyes esetekben kialakult rákos megbetegedésre emlékeztető tünetek megjelenése volt, amit valószínűleg a mellékreakcióként lejátszódó nem specifikus DNS hasítások eredményezhettek.

Továbbra is igény mutatkozik tehát olyan mesterséges nukleázok tervezésére, amely biztonságos humán terápiás alkalmazást tehet lehetővé, nem kívánt mellékhatások nélkül. Ehhez egy olyan új nukleáz kialakítása vezethet el, mely szabályozott módon működik. Tudjuk, hogy a természetes FokI enzimben a nukleáz domén allosztérikus gátlás alatt áll, mely funkció a DNS-kötő domént cink-ujjakra cserélve megszűnik – így magyarázható, hogy a nukleáz domén képes lehet nemspecifikus DNS hasításra is, ami a cink-ujj-részlet esetleges sérülése következtében egyre nagyobb gyakorisággal játszódhat le. Munkám kiindulópontjaként ezért egy olyan új nukleáz domént kerestem, mely az evolúció során jól megőrződött, és a fenti hátrányos tulajdonságoktól mentes. Ebből kiindulva doktori értekezésemben egy olyan új nukleáz domén kiválasztásának és részletes tanulmányozásának folyamatát és eredményeit foglalom össze, amely alkalmas lehet biztonságosan működő mesterséges nukleázok alapját képezni.

Egy biztonságos mesterséges nukleáz, mely a DNS lánc specifikus szekvenciájának felismerését követően az adott helyen elhasítja azt, nagy jövőbeli jelentőséggel bír, génterápiás távlatokat nyitva meg. Az ilyen enzimek kialakítására két fő stratégia ismert: meglévő, specifikus szekvenciát felismerő enzimek irányított módosítása, vagy kimer enzimek előállítása specifikus DNS szekvenciát felismerő fehérjék és önálló funkciós egységet kialakító nukleáz domének összefűzése révén. A manapság legelterjedtebben használatos mesterséges nuklázok egy specifikus szekvencia felismerésére alkalmas fehérjéből (cink-ujj fehérje) és a FokI restrikciós endonukleáz nukleáz doménjéből állnak. Mivel ezen enzimek a mellékreakcióként lejátszódó nem specifikus hasítások miatt sejtmérgező hatással is rendelkeznek, elengedhetetlenül fontos egy olyan mesterséges nukleáz kifejlesztése, amely szabályzott módon képes működni. Ezért doktori munkám céljául tűztük ki egy olyan új nukleáz domén keresését, mely allosztérikus aktiválás alatt működhet, és így a sejtekben lejátszódó esetleges degradáció következtében a nukleáz aktivitását elveszítve nem hasítaná el a DNS szálat a célszekvenciától eltérő helyeken. Egy ilyen nukleáz kialakítására találtuk potenciálisan alkalmasnak a HNH motívumot, mint jól megőrződött katalitikus egységet, és így az ilyen aktív központot a C-terminális végén tartalmazó Colicin E7 metallonukleáz részletes tanulmányozását tűztük ki célul.

A fentiek megvalósítása érdekében doktori munkám első lépéseként a Colicin E7 bakteriális toxin fehérje nukleáz doménben (NColE7) található aktív központ előállítását és

vizsgálatát terveztük. E fehérjemolekula C-terminális végén egy számos enzimben jól megőrzött szerkezetű ββα-fémionkötő részlet, ún. HNH motívum található. E motívumban (**HH**X_{14}**N**X_8**H**X_3**H**) három hisztidin oldallánchoz egy Zn^{2+}-ion koordinálódik. A megőrzött szekvenciákhoz általában valamilyen fontos biológiai szerep rendelhető: a HNH motívum nukleáz aktivitásért lehet felelős. **Elsőként tehát e 42 aminosavból álló HNH motívum előállítását, illetve tulajdonságainak vizsgálatát tűztük ki célul, hogy választ kapjunk arra, vajon e fehérjerészlet önmagában rendelkezik-e nukleáz aktivitással.**

Mint azt az első pontban kitűzött vizsgálatok alapján kimutattuk, a katalitikus aktivitás létrejöttéhez szükség lehet az NColE7 DNS-kötő szekvenciájára is. Munkám második szakaszában így a minimális méretű működőképes egység keresésére fektettük a fő hangsúlyt, melyhez az NColE7 N-terminális végen megrövidített fehérjemutánsainak előállításán keresztül terveztünk eljutni. E mutánsok tanulmányozásán keresztül a domén egészét érintő kölcsönhatásokat, szerkezeti összefüggéseket próbáltuk megismerni, melyek hatással lehetnek az aktivitásra, illetve az aktív központban történő Zn^{2+}-kötésre, valamint a DNS, mint szubsztrát megkötésére. **Ehhez a ΔN69-NColE7, ΔN45-NColE7, ΔN25-NColE7 és ΔN4-NColE7 fehérjék előállítását, valamint az utóbbi két fehérje tisztítását és fémion, illetve DNS-kötő tulajdonságainak tanulmányozását tűztük ki célul gélelektroforézist, tömegspektrometriát, cirkuláris dikroizmus és fluoreszcencia spektroszkópiát felhasználva. E vizsgálatokból választ reméltünk arra, hogy milyen molekulán belüli kölcsönhatások játszanak fontos szerepet a nukleáz aktivitásban.**

Munkám harmadik szakaszában ΔN4-NColE7 mutáns fehérje pontos térszerkezetének meghatározását terveztük. A röntgen-diffrakció alapján a fehérje kristályszerkezetére, míg az NMR spektrumokból a fehérje oldatbeli szerkezetére nézve nyerhetünk információt. A fehérje egykristály előállítása meglehetősen időigényes és bonyolult feladat: a fehérje kifejezésének és tisztításának optimalizálása mellett számos különböző kristályosítási körülmény kipróbálása és ezek optimalizálása tartozik ide. A szerkezet meghatározására szintén alkalmas NMR mérésekhez ilyen célra megfelelő ^{13}C, ^{15}N izotópokkal dúsított fehérje előállítása és tisztítása szükséges. **Az előző fejezetben elvégzett részletes vizsgálatok mélyebb megértését a teljes szerkezet meghatározása teszi lehetővé. Ezért a ΔN25-NColE7 és ΔN4-NColE7-C* fehérjék kristályosítását és a ΔN4-NColE7* fehérje előállítását tűztük ki célul ^{13}C, ^{15}N izotópokkal dúsítva. A ΔN4-NColE7-C* fehérje sikeresen meghatározott**

kristályszerkezetének elemzése az NColE7-re rendelkezésre álló szerkezetekkel történő összehasonlítás révén információval szolgálhat a hiányzó rész fontosságáról, illetve kölcsönhatásainak jelentőségéről a katalitikus aktivitás kialakításában. Ezen ismeretek reményeink szerint egy jövőbeli mesterséges metallonukláz tervezésének kiindulópontjaként szolgálhatnak.

Alkalmazott mószerek:

A különböző Colicin E7 mutáns fehérjéket a rekombináns DNS technológia módszereit alkalmazva állítottuk elő baktériumsejtekben (PCR, agaróz gélelektroforézis, bakteriális hordozóba ligálás, baktériumsejt transzformálás). A fehérjék tisztítását ioncsere-, affinitás- és méretkizárásos kromatográfiás eljárásokkal végeztük, majd tisztaságukat gélelektroforézis, illetve MS mérésekkel támasztottuk alá. A fehérjék nukleáz aktivitását, Zn^{2+}-, illetve DNS kötését MS, CD, fluoreszcencia spektroszkópiával, valamit a gélmobilitás meghatározásának követésével vizsgáltuk. Az N-terminális végen 4 aminosavval megrövidített mutáns térszerkezetének meghatározásához fehérje egykristályt állítottunk elő, majd annak röntgen diffraktogramján keresztül meghatározott szerkezetét elemeztük. ^{13}C, ^{15}N izotóp-dúsított fehérjét állítottunk elő, hogy NMR méréseken keresztül a fehérje oldatbeli szerkezetére nézve is információt nyerhessünk.

Új tudományos eredmények

A HNH motívum előállítása és tulajdonságainak vizsgálata

1. Ubikvitin-fúziós fehérjeként sikeresen előállítottuk a vizsgálatainkhoz kiválasztott Colicin E7 HNH motívumot. Erre a fehérjére új tisztítási eljárást dolgoztunk ki, melynek eredményeképpen 25 mg tiszta fehérjét kaptunk 1 L tápoldatból.

2. Az Ub-HNH Zn^{2+}-kötése az MS és CD mérések alapján viszonylag gyengének bizonyult. Még nagy Zn^{2+}-felesleg esetén sem képes a fehérje a fémion kvantitatív megkötésére.

3. Sikeresen előállítottunk magát a HNH motívumot fúziós fehérje eltávolításával. Ezen fehérje tisztítására újabb eljárást dologztunk ki, mely 2,5 mg fehérjét eredményezett 1 L tápoldatból.

4. Az önálló motívum Zn^{2+}-kötését is megvizsgáltuk (CD, MS), melynek során szintén gyenge fém-kötést tapasztaltunk. Ez egyben bizonyítja azt is, hogy az Ub fúziós fehérje zavaró hatása elhanyagolható. A HNH motívum szerkezete változik a fémion-koordináció hatására, de a CD spektrum és a kristályszerkezet összehasonlítás alapján a várt szerkezet csak részben alakul ki.

5. Kimutattuk, hogy a HNH motívum nem rendelkezik sem DNS-kötő, sem nukleáz aktivitással.

Különböző Colicin E7 mutánsok előállítása és tulajdonságaik vizsgálata

6. A Colicin E7 nukleáz domén alapján 4 különböző N-terminálsi végen rövidített mutáns fehérjét állítottunk elő, amelyekről bebizonyítottuk, hogy citotoxikus aktivitással nem rendelkeznek.

7. A mutáns fehérjék közül kettőre (ΔN25-NColE7, ΔN4-NColE7) tisztítási eljárást dolgoztunk ki, melynek alapján e fehérjéket nagymennyiségben állítottuk elő és tisztítottuk 8 mg tiszta fehérje / 1 L tápoldat kitermeléssel.

8. Ezen két mutáns Zn^{2+}-kötésében eltérést tapasztaltunk (MS, CD, Fluorimetria). A rövidebb mutáns gyengébben kötötte a fémiont (ΔN25-NColE7), míg a hosszabb mutáns (ΔN4-NColE7-C*) még a tisztítás során is végig képes kötésben tartani azt. Ez igazolta, hogy az N-terminális hurok stabilizálja a C-terminális katalitikus központ szerkezetét, azaz elősegíti a

Zn^{2+}-ion megkötését. Továbbá azt is bebizonyítotja, hogy az enzim endogén fémionja a Zn^{2+}-ion.

9. A két mutáns DNS kötésében is eltéréseket detektáltuk. A ΔN4-NColE7-C* fehérje erősebb kölcsönhatás kialakítására képes a DNS-sel azonban nem képes azt elhasítani a tesztcsőben kialakított kialakított körülmények között sem. Ezen eredményekből következik az is, hogy a Colicin E7 nukleáz doménjében az N-terminális pozitív töltésekkel rendelkező aminosavaknak kulcsszerepe van a C-terminális részen zajló katalitikus folyamatban. Ezt a tulajdonságot egy allosztérikus szabályozás kialakítására használhatjuk fel egy mesterséges metallonukleáz tervezése során.

A ΔN4-NColE7-C* fehérje térszerkezetének meghatároza

10. Colicin E7 nukleáz domén általunk előállított ΔN4-NColE7-C* N-terminális mutánsából egykristályt előállítottunk elő. Ezen kristály Röntgen-diffrakciója alapján 1,6 Å felbontással megkaptuk a fehérje szerkezetét.

11. A kristályszerkezet vizsgálata alapján kimondhatjuk, hogy az N-terminális aminosavak szerkezet-stabilizáló szereppel bírnak, amelyek az aktív központ HNH motívumával kiterjedt hidrogénkötés rendszert alakítanak ki.

12. Az NcolE7 kristályszerkezetével történő összehasonlítás alapján azt javasoljuk, hogy az N-terminális Arg valószínűleg mozgékony protonforrásként vesz részt a katalízisben, azaz általános savként protonálja a távozó csoportot.

13. A ΔN4-NColE7 mutáns előállítására NMR mérések céljából egy új fehérjekifejezési és tisztítási eljárást optimalizáltunk, majd 1 L erre alkalmas tápoldatból 2,7 mg jelzett fehérjét állítottunk elő.

14. A jelzett fehérje NMR spektrumainak mérése és értelmezése folyamatban van.

Közlemények

A doktori értekezéshez kapcsolódó impakt faktorral rendelkező közlemények listája:

1. B. Gyurcsik, A. **Czene**: Towards artificial metallonucleases for gene therapy: recent advances and new perspectives.
Future Med. Chem., 3, 1935–1966 (2011)
IF = 2,522

2. A. **Czene**, E. Németh, I.G. Zóka, N.I. Jakab-Simon, T. Körtvélyesi, K. Nagata, H.E.M. Christensen and B. Gyurcsik: On the role of the N-terminal loop in the function of colicin E7 nuclease domain.
J. Biol. Inorg. Chem., 18, 309-321 (2013)
IF = 3,289

3. B. Gyurcsik, A. **Czene**, H. Barát-Jankovics, N.I. Simon-Jakab, K. Ślaska-Kiss, A. Kiss and Z. Kele: Cloning, purification and metal binding of the HNH motif from colicin E7
*Protein Exp. Pur.*89, 210-218 (2013)
IF = 1,587

4. A. **Czene**, E. Tóth, B. Gyurcsik, H. Otten, J.-C.N. Poulsen, Leila Lo Leggio, S. Larsen, H.E.M. Christensen and K. Nagata: Crystallization and preliminary crystallographic analysis of an E. coli selected mutant of the nuclease domain of Colicin E7 metallonuclease.
*Acta Cryst. Sect F.*69,551-554 (2013)
IF = 0,510

5. **A. Czene**, E. Tóth, B. Gyurcsik, H. Otten, J.-C.N. Poulsen, S. Larsen, H.E.M. Christensen and K. Nagata: The crystal structure of a mutant of the nuclease domain of Colicin E7 metallonuclease exhibits an introverted N-terminus.
Acta Cryst. Sect D. (2013) előkészületben

ΣIF = 7,908

Konferencia proceeding:

1. B. Gyurcsik, A. **Czene**, E. Endreffy, and K. Nagata: Chimeric metallonucleases for gene therapy
Insights Into Coordination, Bioinorganic, And Applied Inorganic Chemistry, Monograph Series of the International Conferences on Coordination and Bioinorganic Chemistry held periodically at Smolenice in Slovakia, Ed.: M. Melník, P. Segľa, M. Tatarko, ISBN 978-80-227-3085-3, ISSN 1335-308X, Slovak Technical University Press, Bratislava, 2009, 9, 81-88.

Konferencia előadások és poszterek:

1. A. **Czene**, B. Gyurcsik, E. Endreffy, K. Nagata: Novel diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy

Graduate School on Metal Ions in Biological systems (MIBS) – Current Trends and Methods in Bioinorganic Chemistry, 7-10 September, Søminestationen – Holbæk, Denmark, (2009) – poszter + előadás

2. B. Gyurcsik, N.I. Jakab, A. **Czene**, E. Endreffy, K. Nagata: Artificial Metallonucleases For Gene Therapy
10th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC 10). Sept. 25-28, 2009, Debrecen, Hungary (2009) - előadás

3. B. Gyurcsik, A. **Czene**, E. Endreffy, K. Nagata: Chimeric metallonucleases for gene correction.
The Tokyo Tech-UNESCO Fellows Symposium for Development of Human Resources and Research Network in Science and Technology, 10-11th December, 2009, Tokyo, Japan (2009) - poszter

4. B. Gyurcsik, A. **Czene**, A. Jancsó: The effect of metal ions on the SRCD spectral pattern of peptides and proteins.
ISA/ASTRID User Meeting, Aarhus, Denmark, 28th-29th January (2010), - poszter.

5. A. **Czene**, I.N. Jakab-Simon, B. Gyurcsik, K. Nagata, H.E.M. Christensen: New type of chimeric metallonucleases for gene therapy, *DTU Bioinorganic Chemistry Meeting*, Lyngby Denmark, 28th-29th March (2010), - poszter

6. B. Gyurcsik, G. Nagy, A. **Czene**, T. Körtvélyesi: Design of a new type zinc-finger chimeric nuclease, *EUROBIC10 - 10th European Biological Inorganic Chemistry Conference*, Thessaloniki, Greece, June 22 - June 26, 2010. - poszter

7. B. Gyurcsik, A. **Czene**, N.I. Simon, E. Németh, I.G. Zóka, G. Nagy, T. Körtvélyesi, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Study on the HNH motif as a possible component of a controlled zinc-finger nuclease. *International Conference on Gene Targeting*, Vienna, Austria, 9-12th February (2011), - előadás

8. B. Gyurcsik, A. **Czene**, N.I. Simon, E. Németh, I.G. Zóka, G. Nagy, T. Körtvélyesi, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Study on the HNH motif as a possible component of a controlled zinc-finger nuclease. *New Trends in Coordination, Bioinorganic and Applied Inorganic Chemistry; XXIII. International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry*, Smolenice, Slovak Republic, 5-10th June (2011), - előadás

9. B. Gyurcsik, A. **Czene**, I.N. Simon, E. Németh, I.Gy. Zóka, T. Körtvélyesi, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Allosteric control in the nuclease domain of colicin E7. *QBIC-3 3rd Quantum Bioinorganic Chemistry Conference*, Cesky Krumlov, Czech Republic, 25-28 June, (2011) - poszter

10. A. **Czene**, B. Gyurcsik, E. Endreffy, K. Nagata: Novel diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *4th European Conference on Chemistry for Life Sciences (4ECCLS)*, Budapest, Hungary, August 31- September 3 (2011) - poszter

11. B. Gyurcsik, A. **Czene**, N.I. Simon, E. Németh, I.G. Zóka, T. Körtvélyesi, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Study on the HNH motif as a possible component of a controlled

zinc-finger nuclease. *4th European Conference on Chemistry for Life Sciences (4ECCLS)*, Budapest, Hungary, August 31- September 3 (2011) - előadás

12. B. Gyurcsik, A. **Czene**, I.N. Simon, E. Németh, I.Gy. Zóka, T. Körtvélyesi, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Allosteric control in the nuclease domain of colicin E7, International Workshop on Metal Containing Drugs, Szeged, Hungary, 30-31 August (2011) - előadás

13. B. Gyurcsik, A. **Czene**, N.I. Simon, E. Németh, I.G. Zóka, T. Körtvélyesi, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Design of a novel artificial nuclease based on the HNH.
ISABC11 - 11th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, Barcelona, Spain, 2-5 December (2011)-poszter

14. A. **Czene**, E. Németh, I.G. Zóka, N.I. Simon, B. Gyurcsik, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Mutant Colicin E7 proteins reveal the conditions for allosteric control of the enzymatic action.
ISABC11 - 11th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, Barcelona, Spain, 2-5 December (2011)-poszter

15. B. Gyurcsik, A. **Czene**, E. Németh, I.G. Zóka, E. Endreffy, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Targeting the breakpoint in duchenne muscular dystrophy.
Nobel75, 75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award, Szeged, Hungary, 22-25 March (2012) - előadás

16. A. **Czene**, B. Gyurcsik, E. Endreffy: A simple carrier detection method in Duchenne muscular dystrophy affected families.
IIIrd HuRo conference - Genetic diagnostic method developments, Szeged, Hungary, 27th April (2012) - előadás

17. B. Gyurcsik, A. **Czene**, E. Németh, I.G. Zóka, E. Endreffy, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Targeting the breakpoint in Duchenne Muscular Dystrophy
ISMEC 2012, International Symposia on Metal Complexes, Lisbon, Portugal, June 18th – 22nd, ISMEC Acta, Vol. 2, p.111 (2012)-poszter

18. B. Gyurcsik, A. **Czene**, E. Németh, I.G. Zóka, E. Endreffy, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Targeting the breakpoint in Duchenne Muscular Dystrophy by an artificial metallonuclease.
EUROBIC11, 11th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Granada, Spain September 12-16 (2012) - poszter

19. B. Gyurcsik, A. **Czene**, E. Németh, I.Gy. Zóka, E. Endreffy, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Design of a novel artificial metallonuclease for targeting the breakpoint in Duchenne Muscular Dystrophy.
The 3rd Leading Graduate Schools International Conference, Tsukuba, Japan, November 1-2 (2012), - előadás

20. E. Endreffy, A. **Czene**, B. Gyurcsik: Carrier diagnostics with different molecular genetic methods in dystrophinopathy.
Newborn screening and molecular diagnostics of inherited disorders - HuRo conference Szeged, January 25, (2013)-Lecture

21. **Czene** A., Gyurcsik B.: A Duchenne féle izomdisztrófia újfajta diagnosztikája
XXXI. Kémiai Előadói Napok, 2008. október 29-29, Szeged – előadás

22. Németh E., Zóka I.Gy., **Czene** A., Jakab-Simon I.N., Gyurcsik B., Körtvélyesi T., Nagata K., Christensen H.E.M.: A colicin E7 fehérje nukleáz doménjének vizsgálata.
MKE, 1. Nemzeti konferencia, Sopron 2011. május 22-25 - előadás

23. **Czene** A., Gyurcsik B.: A Duchenne-féle izomdisztrófia újfajta diagnosztikája
MKE, 1. Nemzeti konferencia, Sopron 2011. május 22-25 - poszter

24. Zóka I. Gy., Gyurcsik B., **Czene** A., Németh E.: A colicin E7 nukleáz N-terminális végén rövidített mutáns fehérjéinek vizsgálata.
XXXIV. Kémiai Előadói Napok, Szeged, 2011. November 2-4 - előadás

25. Gyurcsik B., **Czene** A., Németh E., Tóth E., Zóka I.Gy.: Aktiváló allosztérikus szabályozás kialakításának lehetősége egy Colicin E7 alapú mesterséges metallonukleázban.
46. Komplexkémiai Kollokvium és az MTA Koordinációs Kémiai Munkabizottság ülése, 2012. május 21-23, Mátrafüred - előadás

26 **Czene** A., Gyurcsik B., Christensen H.E.M.: Colicin E7 metallonukleáz fehérje mutánsainak előállítása szerkezetmeghatározás céljából.
46. Komplexkémiai Kollokvium és az MTA Koordinációs Kémiai Munkabizottság ülése, 2012. május 21-23, Mátrafüred - előadás

27 Tóth E., **Czene** A., H. Otten, J.-Ch. Navarro-Poulsen, S. Larsen, Gyurcsik B.: A ΔN4-NColE7 metallonukleáz mutáns kristályszerkezete.
46. Komplexkémiai Kollokvium és az MTA Koordinációs Kémiai Munkabizottság ülése, 2012. május 21-23, Mátrafüred – előadás