

SZINTETIKUS OLIGONUKLEOTIDOK FELHASZNÁLÁSA
MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI PROBLÉMÁK MEGOLDÁSÁRA

különös tekintettel a csirke porc mátrix fehérje gén
promoter közeli 5' végi szabályozó régiójának vizsgálatára

DOKTORI DISSZERTÁCIÓ

RÁKHELY GÁBOR

MTA Szegedi Biológiai Központ
Biofizikai Intézete
Biokémiai Intézete
SZEGED
1994

TARTALOM

	oldal
BEVEZETÉS	1
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
I. SZINTETIKUS OLIGONUKLEOTIDOK	
ELŐÁLLÍTÁSA	3
I.1. Rövid történeti áttekintés	3
I.1.1. Foszfáttíriészter módszer.I	3
I.1.2. Foszfátíriészter alapú szintézis	4
I.1.3. Foszfáttíriészter módszer II.	5
I.1.4. Foszfíttíriészter kémia	6
I.1.5. Foszforamidit módszer	7
I.1.6. H-foszfónát kémia	9
I.1.7. Szilárd hordozó használata	10
I.1.8. Védőcsoportok a szintézis során	11
I.1.9. A DNS szintézis automatizálása	13
I.1.10. Oligoribonukleotidok szintézise	14
I.2. Módosított oligonukleotidok előállítása	14
II. A DNS SZEKVENCIA MEGHATÁROZÁSI ELJÁRÁSOK	
RÖVID ÁTTEKINTÉSE	18
II.1. Enzimatiszus módszerek	18
II.2. Kémiai módszerek	19
II.3. Egyéb, kevésbé elterjedt technikák	20
II.4. A Sanger-féle szekvencia analízis	
változatai, fejlődési irányai	20
III. AZ EUKARIOTA GÉNEXPRESSZIÓ SZABÁLYOZÁSA	21
III.1. Az expresszió szabályozásának szintjei ...	21
III.2. A transzkripció szabályozása	22
III.2.1. Általános megjegyzések	22
III.2.2. RNS polimeráz II transzkripcionális	
iniciációs komplex	23
III.2.3. Enhancerek, silencerek,	
aktivátorok, represszorok	25
III.2.4. A transzkripciós faktorok	
DNS-felismerő szerkezeti motívumai	27
III.3. Nukleoszóma, hisztonok, transzkripció	29
IV. A PORCSZÖVET	31
IV.1. Általános jellemzés	31
IV.2. A porc mátrix makromolekulái	32
IV.2.1. Kollagének	33
IV.2.2. Proteoglikánok	33
IV.2.3. Nem kollagénszerű fehérjék	34
IV.2.4. Csirke porc mátrix fehérje, és génje ..	34
IV.3. Chondrogenesis	38
V. CÉLKITŰZÉS	40
VI. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	43
VI.1. ANYAGOK	43
VI.2. MÓDSZEREK	46
VI.2.1. Oligonukleotidok szintézise	
automata DNS szintetizátoron	46
VI.2.2. Az oligonukleotidok utókezelése	
és tisztítása	46
VI.2.3. Enzim-oligonukleotid konjugátumok	
szintézise	49
VI.2.4. DNS klónozással kapcsolatos módszerek .	51

VI.2.5.	Tranziens expressziós kísérletek	54
VI.2.6.	CEF sejtmagi kivonat készítése, a fehérjék részleges tisztítása	54
VI.2.7.	A DNS-fehérje kölcsönhatás tanulmányozásával kapcsolatos módszerek	56
VII.	EREDMÉNYEK	62
VII.1.	Torma peroxidáz- és alkalikus foszfatáz- oligonukleotid konjugátumok előállítása HIV-1 kimutatására	62
VII.1.1.	A HIV vírus rövid jellemzése, a próbák tervezése	62
VII.1.2.	Az enzim-oligonukleotid konjugátumok szintézisének stratégiája	63
VII.1.3.	A szintézis menete	64
VII.1.4.	A komplexek jellemzése	67
VII.2.	DNS szekvencia meghatározási eljárás hőstabil polimerázzal	70
VII.2.1.	Egylépéses szekvencia meghatározási eljárás Taq DNS polimerázzal, egyszálú DNS templáton. Az optimális körülmények kiválasztása .	71
VII.2.2.	A szekvencia analízis menete	76
VII.3.	A csirke CMP gén egy negatív szabályozó elemének jellemzése szintetikus oligonukleotidok segítségével	78
VII.3.1.	Az SI szövetspecifitása tranziens expressziós kísérletekben	79
VII.3.2.	Az SI szövetspecifitása <i>in vitro</i> körülmények között	80
VII.3.3.	Az SI régió és a minimál promoter DNázI footprint analízise	82
VII.3.4.	Az SI összehasonlítása ismert transzkripció faktorok kötődési helyeivel	84
VII.3.5.	Az SI és SII komplexek összehasonlítása DNS-fehérje gélelektroforézis kísérletekben	85
VII.3.6.	A kölcsönhatás természetének kétértékű kation függése	88
VII.3.7.	Az SI és SII metilációs interferencia képe	90
VII.3.8.	UV keresztkötési kísérletek	94
VII.3.9.	Supershift kísérletek	97
VII.3.10.	Mutációkat hordozó oligonukleotidok .	98
VIII.	AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	102
VIII.1.	Nemradioaktív AIDS diagnosztikai próbák	102
VIII.2.	DNS szekvencia analízis hőstabil DNS polimerázzal	103
VIII.3.	A CMP gén SI és SII elemeinek és a hozzá kapcsolódó faktorok jellemzése ...	104
IX.	ÖSSZEFOGLALÁS	111
IRODALOMJEGYZÉK		

BEVEZETÉS

A molekuláris biológia az utóbbi húsz-harminc évben óriási fejlődésen ment keresztül, s ebben nem kis része volt az oligonukleotid-szintézis módszereinek rohamos fejlődésének. Szintetikus oligonukleotidokat ma már a legkülönbözőbb célokra használnak, és nyugodtan mondhatjuk, hogy számos alapvető felfedezés ezek nélkül nem jöhetett volna létre. DNS diagnosztika, szekvencia analízis, polimeráz lánc reakció, mutációk felderítése, vagy előidézése, DNS-fehérje kölcsönhatások, s ezen keresztül a sejtekben végbemenő bonyolult szabályozási mechanizmusok tanulmányozása mind komoly mértékben oligomerek használatán alapulnak. A szintetikus oligonukleotidok viszonylag rövidek, könnyen kezelhetőek, s ily módon lehetővé teszik a DNS-hez kapcsolódó folyamatok részletes, molekuláris szintű tanulmányozását. Könnyen módosíthatók, ezért speciális célokra is alkalmazhatók egészen a gyógyászati felhasználásig.

A dolgozatban a szintetikus oligonukleotidok molekuláris biológiában történő alkalmazásának széles tárházát szeretném bemutatni konkrét feladatok megoldásán keresztül. Kutatásaink során három olyan fő témakörre koncentráltuk a figyelmünket, amelyek a molekuláris biológiai alkalmazások különböző területeivel vannak kapcsolatban.

1. DNS diagnosztika.

A különböző vírusok, baktériumok, és egyéb mikroorganizmusok által okozott fertőzések közvetlen kimutatása *nem-radioaktívan* jelölt szintetikus oligonukleotidok segítségével. Az értekezés első részében a HIV-1 kimutatására tervezett módosított oligonukleotidok szintézisét ismertetem.

2. DNS szekvencia analízis.

Az enzimátikus DNS szekvencia meghatározási módszerek is használnak oligonukleotidokat. Ezzel összefüggésben bemutatok egy új, *termostabil DNS polimeráz* használatán alapuló DNS szekvencia meghatározási eljárást, amely gyors, egyszerű, és lehetővé teszi bizonyos nehezen vizsgálható régiók analízisét.

3. DNS-fehérje kölcsönhatások molekuláris szintű tanulmányozása

Az eukariota génexpresszió szabályozásának megértéséhez nagy segítséget nyújtanak a szintetikus oligonukleotidokon alapuló módszerek. Az értekezés harmadik, fő része a csirke porc mátrix fehérje gén transzkripcionális szintű regulációjának vizsgálatát tárgyalja. Számos, szinte kizárólag oligonukleotidokon alapuló technika segítségével jellemeztünk egy, a *gén regulációjában fontos szerepet játszó elemet és a hozzá kötődő fehérjét.*

Ehhez szorosan kapcsolódik egy eljárás továbbfejlesztésének leírása, mely a DNS-kötő fehérjék molekulatömegének meghatározására szolgál.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

I. SZINTETIKUS OLIGONUKLEOTIDOK ELŐÁLLÍTÁSA

I.1. Rövid történeti áttekintés

Mióta Avery felfedezte, hogy a biológiai lényekben rejlő információt a DNS hordozza, s Watson és Crick megalkotta elméletét a kettős spirálról, teljesen jogosan merült fel a kérdés, hogy lehet-e szintetizálni nukleinsavakat. A válasz 1955 óta igen, amikor Sir Alexander Todd és A.M. Michelson megszintetizálta az első dinukleotidot. Az általuk kifejlesztett technika az ún. foszfátríészter módszer, s azóta sok egyéb kémiai eljárást fejlesztettek ki, amelyeket megpróbálunk röviden áttekinteni.

Az alkalmazott kémiai reakció típusától függően alapvetően 5 különböző szintézis stratégia létezik kifejlesztésük időrendi sorrendjében:

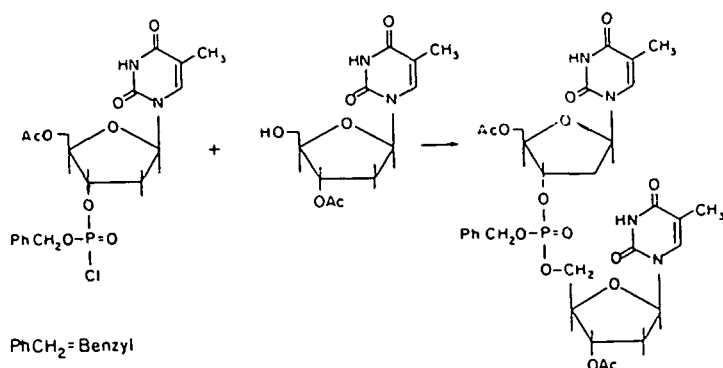
- foszfátríészter
- foszfátdiészter
- foszfitríészter
- foszforamidit
- H-foszfónát

módszer. Napjainkban már csak az utolsó kettő használatos, de a jobb megértés és a történeti hűség kedvéért talán érdemes röviden áttekinteni a kezdeti próbálkozásokat. Lehetséges még a szintéziseket a szerint is csoportosítani, hogy szilárd hordozón avagy folyadék fázisban zajlik a reakció, illetve hogy lépésenként felépítve vagy ún. blokk módszerrel történik a szintézis, de ez a csoportosítás napjainkra már aktualitását veszítette, mivel korunk DNS szintetizátorai szilárd hordozón, 3' - 5' irányban kapcsolják a nukleotidokat.

I.1.1. Foszfátríészter módszer I.

Az első szintetikus dinukleotid megszintetizálása Michelson és Todd nevéhez fűződik [113], akik biológiailag aktív ditimidint állítottak elő. A reakcióban 3'-O-acetil-timidint reagáltattak el 5'-dibenzil-foszfotimidin- 3'-(benzil-foszfokloridát)-tal (1.ábra). A terméket anioncserélő oszlopon tisztították, s a dinukleotid

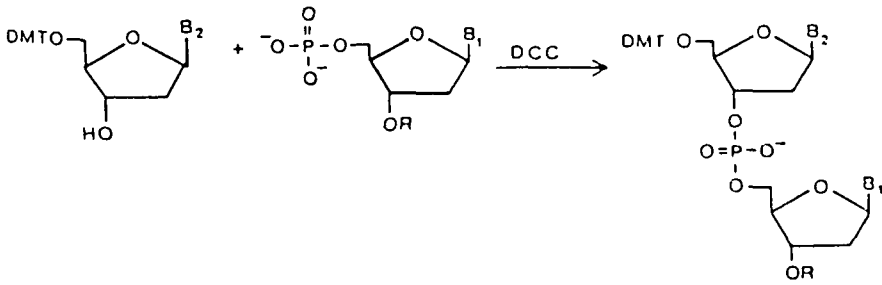
DN-ázzal emészthető volt. A szintézist oldatfázisban végezték, több napig tartott, s a sok mellékreakció miatt a kitermelés rendkívül alacsony volt. Mindenesetre a DNS szintetikus előállítás területén forradalmian új eredmény volt. Később a módszert továbbfejlesztették (erre még kitérünk), de előbb át kell tekintenünk a Khorana és mtsai [53] által alig három évvel később kifejlesztett foszfátdiészter módszert, amely közel húsz évig a legjobb technikának számított.



1. ábra. A foszfátdiészter módszer reakció sémája.

I.1.2. Foszfátdiészter alapú szintézis

Az 50-es évek végére Gilham és Khorana kifejlesztett egy másik módszert [53], amellyel a biológiai mintákkal azonos értékű dinukleotidot sikerült szintetizálni. Ez az ún. foszfátdiészter módszer, s az eredeti változatában 5'-O-trityl-timidint reagáltattak 3'-O-acetyl-timidin-5'-foszfáttal DCC (diciklohexil-karbodiimid) jelenlétében, ami a peptidszintézisből illetve az észteresítési reakciókból jól ismert vízelvonó szer (2. ábra). A reakció meglehetősen hosszú (18-48h), s a kitermelés 50-60% körül volt. A termékeket ioncserés folyadékkromatográfiával tisztították. A kitermelést javítani lehetett olyan katalizátorokkal, mint aril-szulfonilkloridok, 2,4,6-triizopropil-benzol-szulfonil-klorid (TPS) [86, 121, 125], s így a tirozin szupresszor tRNS gén szintézisének a



2. ábra. A foszfátdiészter kémia kapcsolási elve.

B1, B2: nukleozid bázisok, DMT: dimetoxitritil, R: acetyl csoport, DCC: diciklohexil-karbodiimid.

kapcsolásonkénti hatásfok 90% volt [86]. Bár megelőzte ezt az élesztő alanin tRNS génjének a szintézise (77 bázispár hossz) [85], ez tekinthető a módszer csúcsteljesítményének (126 bp struktúrgén + 207 bp szabályozó régió).

Mindazonáltal a foszfodiészter módszer hatékonysága nem kielégítő, a komponenseket rendkívül nagy feleslegben kell alkalmazni, a tisztítási eljárás fáradalmas, és hosszadalmas. Ez sarkallta a kutatókat arra, hogy visszatérjenek a foszfátrieszter módszerhez, és megpróbálják azt versenyképpé, illetve jobbá tenni, mint amit a foszfodiészter kémia tud.

I.1.3. Foszfátrieszter módszer II.

Bár a tirozin szupresszor tRNS génjének szintézise 1972-ben jelent meg, a 60-as évek közepétől a figyelem ismét a foszfátrieszter technika fejlesztésére irányult. Az eredeti Todd féle módszernél a nagy munkaigényességen és a hosszú reakcióidőn kívül problémát jelentett az is, hogy a végső reakcióelegy a nem megfelelő foszforilációs reakció miatt sok mellékterméket, 3'-3', 5'-5' kapcsolt dinukleotidot tartalmazott [121]. Ezt kiküszöbölendő a kiindulási foszfátdiészter helyett teljesen észteresített foszfátriesztert vagy foszfokloridátot használtak reagensként. Reese és Shaffhill timidin 5'-fenil-foszokloridátot használt *in situ* foszforilálás után reagensként [135], míg Catlin és Cramer módszerében a kiindulási nukleotidon a foszfátcsoportot β-cianoetil- és β',β',β'-triklór-etil védőcsoporttal látták el. A kapcsolandó nukleotid β-cianoetil csoportjának helyére lép be az előző nukleotid 5'-OH csoportja [22]. Az eredmény egy tetranukleotid, ami végsősoron blokk-kondenzációval

készült, ami az jelenti, hogy az első reakcióban 2 dinukleotidot szintetizáltak, majd ezeket kapcsolták össze tetranukleotiddá.

Általában az eddigi módszerek - beleértve a diészter kémiát is - a blokk stratégiát [116] használták, így ugyanis párhuzamosan lehetett dolgozni. Ennek alternatívája a lépésenkénti láncnövelés, amire a szilárd fázisú szintéziseknél látunk példát.

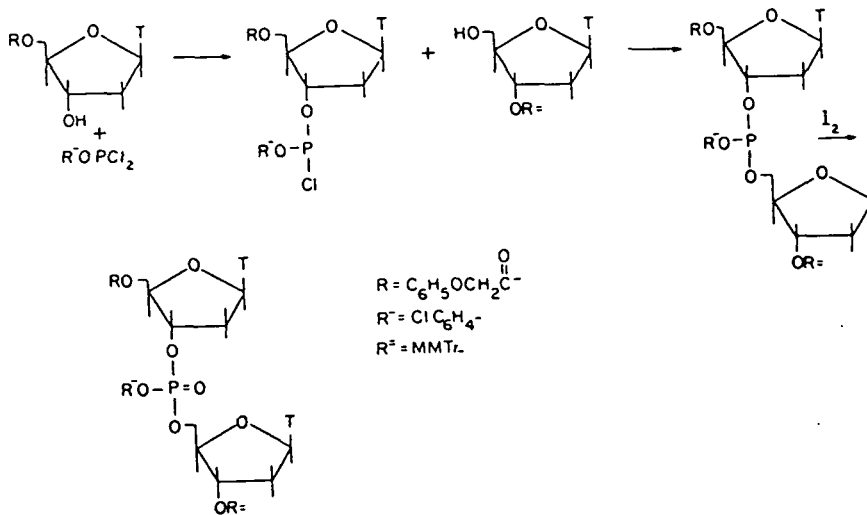
A másik fő probléma a kapcsolószerek használata, ugyanis a diészter technikában használt aril-szulfonil-kloridok nem használhatóak triészterekre, mert a szer jelentős mértékben szulfonálja a kívánt terméket [122, 125]. A nagy áttörést a Narang és mtsai által bevezetett triazolszármazékok jelentették [122], a következő minőségi ugrást pedig a Reese és Ubasawa által ajánlott MSNT (1-(meztitilén-2-szulfonil)-3-nitro-1,2,4-triazol) eredményezte, ahol már 95%-os kapcsolási hatásfokról számoltak be (a reakcióidő 45 perc volt) [136, 75]. Efimov és mtsai egy kombinált kapcsolószert használtak [38], aril-szulfonil-kloridot N-metil-imidazol jelenlétében, s a módszerrel sikeresen szintetizáltak oldat fázisban egy 32 bázis hosszúságú oligonukleotidot. Később további eredményekről számoltak be [39], miszerint N-oxidált piridin és kinolin származékok drámaian megnövelnék a kapcsolás hatékonyságát. Ezt más tapasztalatok nem nagyon támasztották alá [37].

I.1.4. Foszfittriészter kémia

A következő állomás a mai DNS szintetizátorokhoz vezető úton Letsinger és Lunsford munkásságához kötődik, akik kifejlesztették a ma legelterjedtebb amidit kémia előfutárának tekinthető foszfittriészter módszert [100]. A szerzők 5'-O-fenoxi-acetil-timidint a 3'-hidroxil csoporton foszforileztek alkil-foszfodikloridit-tel, és a kapott vegyületet reagáltatták 3'-O-mono-p-metoxi-tritil-timidinnel (3. ábra). A reakció -78°C-on megy végbe 10-20 perc alatt. A kapcsolás hozama erőteljesen függött az oligonukleotid hosszától (a végső kitermelés dinukleotidra 95%, pentanukleotidra 69% volt).

A foszfitkémia a foszfátkémiánál sokkal rövidebb reakcióidőket tett lehetővé, de egy plusz lépést kellett beiktatni a szintézisbe, mert a kapcsolás után a dinukleotidban a foszfor csak 3 oxidációs állapotú. Ezt a szerzők I₂-os oxidációval oldották meg, ami még ma is bevált eljárás. A módszer másik nagy hátránya, hogy a

reakciót igen alacsony hőmérsékleten kellett végrehajtani a reagensek nagyfokú bomlékonysága miatt. Ez utóbbi probléma megoldását az amidit kémia kifejlesztése jelentette, annak ellenére, hogy leírtak foszfit módszeren alapuló automata DNS szintetizátort is [3] (ld. később). Mindamellett a fenti okok miatt ez az amidit kémia elterjedését alapvetően nem tudta megállítani.

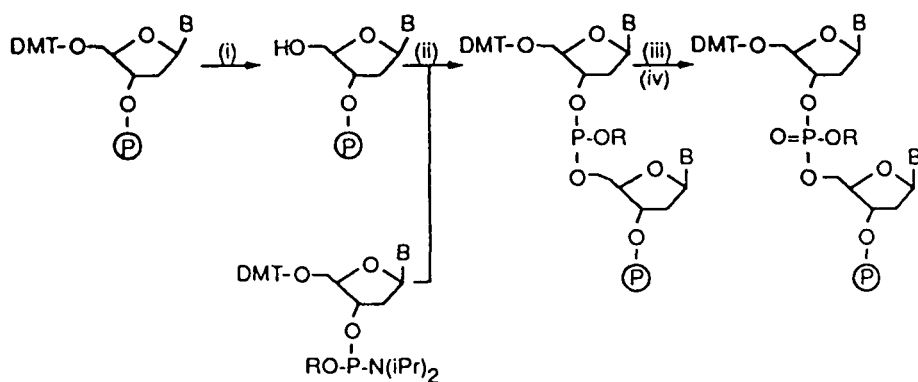


3. ábra. A foszfitkémian alapuló DNS szintézis elvi menete.

I.1.5. Foszforamidit módszer

1981-ben Beaucage és Caruthers egy olyan új nukleozid foszfit szintézisét közölte le, amely ma is a legelterjedtebb DNS szintetizálási eljárás [11] alapját képezi. A fő célkitűzés az volt, hogy laboratóriumi körülmények között tárolható alapanyagot állítsanak elő. Az első ilyen amidit a metil-N,N-diizopropil-foszforamidit volt. A szerzők szerint a vegyület szobahőmérsékleten inert atmoszférában (N_2) legalább egy hónapig stabil. Tesztelték a funkciós csoport reaktivitását is úgy, hogy ilyen timidin foszforamiditet 5'-O-dimetoxitritil-N-2-izobutiril-deoxiguanozinnal kapcsoltak össze 1H-tetrazol aktivátor jelenlétében (4. ábra). A háromértékű foszfort jóddoldattal oxidálták ötértékűvé. A kitermelés minden eddiginél jobb volt, 93-100%, s a termékeket kigyómeleg foszfodiészteráz a megfelelő mononukleotidokká hidrolizálta. Meg kell jegyezni, hogy ezek a szintézisek már szilárd hordozón készültek, amire később térünk ki.

A módszert azóta is javítgatják, elsősorban a foszfát-csoporton lévő funkciós csoportok tesztelésével. Sinha és mtsai [159] javasolták azt az amidit típust, amivel ma a legtöbb DNS szintetizátor dolgozik. Ez a β -cianoetil-N,N-diizopropil-foszforamidit (4.ábra). Mindamellett történtek még próbálkozások N,N-dialkil-morfolino származékkal [110] (ezt helyenként ma is használják), és egyéb NR_1R_2 csoportokkal, ahol R_1 és R_2 különböző alkil és allil csoportokat jelent [1, 35]. Dahl és mtsai szisztematikus vizsgálataikban méréseket végeztek, hogy meghatározzák a másik foszfát védőcsoport (Me, β -cianoetil, 1-metil-2-cianoetil, 1,1-dimetil-2-cianoetil, p-klorofenil) hatását is a reakciósebességre, s azt találták, hogy szterikus okok miatt a metil csoport esetén nagyobb reakciósebességet kaptak, mint a 2-cianoetil kapcsán, de elismerik, hogy kísérleti rendszerük nem fedti pontosan az automata szintetizátorokban lezajló folyamatokat [35]. Ugyanők leírták a reakció feltételezett mechanizmusát, amely szerint az 1H-tetrazol nukleofil támadást intéz a kapcsolandó amidit foszforatomja ellen, s egy reaktív tetrazolid szerepel, mint aktív intermedier a kapcsolásban.



4. ábra. A foszforamidit kémián alapuló szintézis menete. i. a DMT (dimetoxitritil) csoport eltávolítása, ii. a nukleotidok kapcsolása, iii. a foszfor oxidációja, iv. az el nem reagált csoportok acetilezése, "CAP"-pelés. R: pl. β -cianoetil csoport.

A reakció hatékonyságának növelésére Froehler és Matteucci 5-feniltetrazolt javasolt aktivátornak 1H-tetrazol helyett [44], s bár véleményük szerint jobb eredményeket kaptak, az anyag használata mégsem terjedt el igazán.

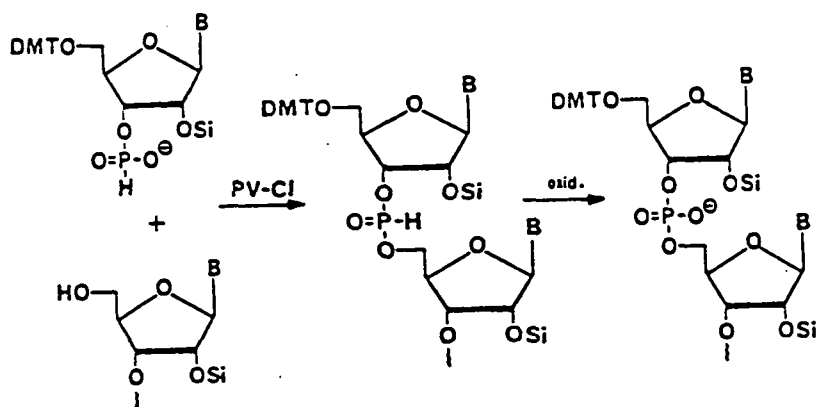
I.1.6. H-foszfónát kémia

Az amidit kémiát széles körben alkalmazzák ugyan, de a további kutatások új módszer megjelenését eredményezték. Ez az ún. H-foszfónát kémia, amelyet párhuzamosan, egymástól függetlenül fedezett fel két kutatócsoport: Garegg és mtsai [49, 50], valamint Froehler és Matteucci [46]. Érdekes megjegyezni, hogy az első H-foszfónátot, egy diribonukleotid vegyületet, Hall, Todd és Webb szintetizálta 1957-ben [67], s a módszer gyakorlati életbe való átültetéséhez csaknem 30 évet kellett várni. A reakció sémája a 5. ábrán látható egy oligoribonukleotid példáján. Garegg és mtsai megállapították, hogy míg az alkilfoszfónátok praktikusán alkalmatlan kiindulási anyagai az oligonukleotid szintézisnek, addig a H-foszfónátok majdnem az összes használt aktivátor fajtaival (TPS, ClPO(OAr)₂ és ezek tetrazollal illetve N-metilimidazollal való kombinációi) igen jó reakciókészséget mutatnak, kevésbé érzékenyek a rendszer víztartalmára, mint az amidit módszer, s a reakció kinetikai lefutása is gyorsabb, ami nem kedvez mellékreakciók lezajlásának [49, 50].

Froehler és Matteucci egész más jellegű aktivátorokat használt, s az ő érdemük a pivaloilklorid (trimetil-acetilklorid) aktivátorként való használata, amellyel 107 bázis hosszúságú oligonukleotidot tudtak szintetizálni [45]. Később Andrus és mtsai adamantánkarbonil-kloridot ajánlottak aktivátorként a pivaloil-klorid helyett, mert az utóbbit frissen kell desztillálni használat előtt, és nem tartható el sokáig [5]. Mindenestre elmondható, hogy napjainkban a H-foszfónát kémiában ez a két kapcsolószer az uralkodó.

A H-foszfónát kémiának a méltán népszerű amidit módszerrel szemben elviékben az előnye az, hogy gyorsabb, a reagensek könnyen, egy lépésben elkészíthetők (a megfelelően védett nukleozidot van Boom reagenssel, szalicilklorofoszfittal, elreagáltatva közvetlenül a H-foszfónát származékot kapjuk) [108], nem szükséges a lépések között a foszforatomokat oxidálni, keppelni (ld. később), és olcsóbb is.

Általában a DNS szintetizátorokat manapság úgy gyártják, hogy képesek legyenek mind a két fajta (az amidit és a H-foszfónát) kémia alapján dolgozni.



5. ábra. A H-foszfónát módszer egy kapcsolási lépése oligoribonukleotidok esetén. DMT: dimetoxitritil, Si: t-butil-dimetil-szilil csoport. PV-Cl: pivaloil-klorid.

I.1.7. Szilárd hordozó használata az oligonukleotidok szintézisében

Az eddigiekben nem foglalkoztunk azzal részletesen, hogy milyen fázisban mennek végbe a reakciók. A kezdeti próbálkozások mind oldatfázisban zajlottak le, s ez azzal járt, hogy gyakorlatilag minden lépés után ki kellett tisztítani a terméket, ami egyrészt nagyon fáradságos volt, másrészt anyagveszteséggel járt.

Nem sokkal azután, hogy Merrifield kifejlesztette a szilárd fázisú peptidszintézist, a nukleinsavak területén is megjelent a szilárd hordozó használata. Az első lépést Letsinger és Mahadevan tették meg, akik sztirol-divinil-benzol kopolimeren foszfátriészter technikával szintetizáltak dinukleotidot. Ettől kezdve általános törekvés volt szilárd fázison megoldani a szintézist, s a legkülönbözőbb hordozókat próbálták ki erre a célra. A foszfátriészter módszerrel poliamid [106], polisztirol kopolimer [76], szilikagél [91] és kontrollált pórusú üveggyöngy (CPG) [57, 93], a foszfitriészter kémiára pedig szilikagél [29] és CPG [94] használatát írták le. Mindezekről átfogó képet kaphatunk Narang munkájában [122].

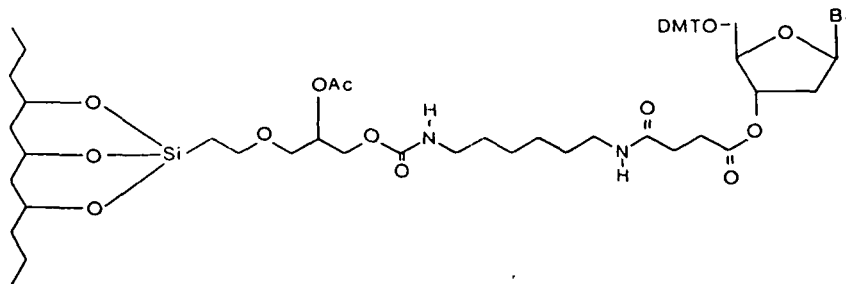
Milyen kritériumoknak kell megfelelni egy jó hordozónak?

Legyen

- inert a szintézis körülményei között;
- jó mechanikai ellenállóképessége;
- jól funkcionálizálható, nagy felülettel, felületi borítottsággal;
- könnyen kezelhető.

Ezeknek az elvárásoknak leginkább a kontrollált pórusú üveggyöngy (CPG) felel meg [93], és ma már a DNS szintézis területén a CPG egyeduralkodónak tekinthető.

A szilárd fázisú szintézis kiindulási anyaga a hordozóhoz - egy láncon keresztül - kapcsolt nukleozid, és ez lép kapcsolási reakcióba. A kötésnek olyannak kell lenni, hogy a szintetikus termék a reakció végén egy lépésben visszanyerhető legyen. Egy ilyen - magunk előállította hordozó - sematikus képét mutatja a 6. ábra.



6. ábra. A szilárd fázisú oligonukleotid szintézis során használt hordozó sematikus képe. B₁ tetszőleges nukleozid bázis. DMT: dimetoxitritil csoport.

A korábban említett blokk módszernél, ahol több nukleotidból álló alegységeket kapcsoltak össze, a szintézis stratégiától függően mindkét irányban haladt. Ezzel szemben, ha az első nukleozid rögzítve van, a szintézis egyirányúvá válik. Ez tette lehetővé, és szükségessé az ún. keppelés bevezetését.

"Cap"-pelés

A "cap"-pelés funkciója az, hogy a kapcsolási reakció során el nem reagált (mivel a reakciók nem 100%-osak) aktív csoportokat kvantitatívan blokkolják a következő kapcsolás előtt. Ez általában ecetsavanhidriddel való katalitikus acilezést jelent.

A szilárd hordozón való szintézis előnyeit nem lehet kellőképpen hangsúlyozni. Azon kívül, hogy a reagensek és a termékek rendkívül gyors szétválasztásával rengeteg tisztítási lépés válik szükségtelenné, a különböző kémiák kifejlesztése mellett ez tette lehetővé a szintézis automatizálását (ld. később).

I.1.8. Védőcsoportok a szintézis során

Az automata oligonukleotid szintézis alatt a nukleotidokon általában három helyen szerepel védőcsoport, amelyek közül kettő a kapcsolás során változatlan marad (a

foszforon, és a bázisokon), egy pedig ideiglenes védőcsoportként működik (dimetoxitritil a cukorgyűrű 5'-OH csoportján).

A foszfátgerinc csoportjai

A foszforatomon lévő védőcsoportokkal az előzőekben részletesen foglalkoztunk (a H-foszfónát kémia esetén ilyen nincs is), s csak annyit tennénk még hozzá, hogy a követelmény ezek iránt az, hogy a kapcsolás során a reakciót elősegítsék, de ne vegyenek részt benne, a szintézis egyéb lépéseinél pedig inert módon viselkedjenek. Az amidit kémia esetén a β -cianoetil csoport ilyen, s lévén észter, a reakciók savas-semleges körülményei között stabil, viszont a szintézis végén lúgos kezeléssel egy lépésben eltávolítható a foszfátgerincről.

A nukleozid bázisok védőcsoportjai

A kapcsolás során a nukleozid bázisokon található funkciós csoportok (amino, hidroxil) általában védőcsoport nélkül elreagálnának, nem kívánatos melléktermékek képződnének, ezért a reakciókba csak olyan nukleotid vihető be, amely megfelelő védőcsoportot hordoz, amit a szintézis befejeztével könnyen, és szelektíven el lehet távolítani. Mivel napjainkra, az alkalmazott kémiai eljárások igen nagy hányadánál ugyanazokat az anyagokat használják, ezért nem foglalkozunk részletesen a történeti háttérrel (részletes áttekintést ld. [4, 121, 122]). Ezek a következők:

a., timin: ez a legegyszerűbb, mert a ma általánosan alkalmazott körülmények között nem kell védeni.

b., citozin: a 4-es szénatomon lévő aminocsoportnak van nemkívánatos reakciókészsége, ezt általában benzoilcsoporttal blokkolják.

c., adenin: a 6-os szénatomon lévő aminocsoportot szükséges védeni, de a védőcsoport megválasztásánál figyelembe kell venni, hogy a puringyűrűk savas kezelés hatására (a dimetoxi-tritil csoport eltávolítása során) hajlamosak leválni a cukorról (depurinálás), s ezt a folyamatot az aminocsoport elreagáltatása általában erősíti. Alkalmasan megválasztott savas kezeléssel, és megfelelő védőcsoporttal ezt vissza lehet szorítani. Ez az adenin esetén is a benzoil csoport.

d., guanin: a 2-es pozícióban lévő amino és a 6-os szénatomon lévő oxigén egyaránt reaktív, de az aminocsoport izobutiril csoporttal történő acilálása mindkét csoport reaktivitását visszaszorítja. A depurinifikáció jelenségével itt is számolni kellett.

A fenti felsorolásból kiderül, hogy a jelenleg általánosan használt védőcsoportok az acilcsoportok, amelyek savasan stabilak, viszont alkalikus kezeléssel elhasadnak. Mivel a foszfáton lévő β -cianoetil is eltávolítható lúggal, valamint az első nukleozid is észterkötéssel kapcsolódik a hordozóhoz, ezért a szintézis végén egyetlen cc. NH_4OH -os kezeléssel mind a három feladat megoldható, s az oligonukleotid biológiailag aktív formájában lesz jelen, már csak meg kell tisztítani.

Primer 5'-OH csoport védeése

Az oligonukleotid szintézis hőskorában még mindkét irányú szintézis előfordult (ld. fent), de a szilárd hordozó megjelenése óta a szintéziseket gyakorlatilag mindig 3'-5' irányban hajtják végre. Ennek az oka a szerves kémiából ismert: az 5'-OH (primer hidroxil) csoportok igen jó szelektivitással reagálnak a nagy térkitöltésű trifenilmetil (tritol, Tr) csoporttal, s így ez a hidroxil védetté válik. Ezt nem lehetne ilyen könnyen megtenni a szekunder 3'-OH-val. Bár korunkban a szintetikus oligonukleotid kémiában gyakorlatilag mindenhol a Tr egy továbbfejlesztett változatát, a dimetoxitritil (DMTr) csoportot használják az 5'-OH védeésére, korábban történtek más irányú próbálkozások, amelyeknek ma már különösebb gyakorlati jelentősége nincs. (Összefoglalásuk: [4, 121, 122]).

A dimetoxitritil lúgosan stabil, enyhe savas kezelésre (pl. 2-4% diklórecetsav/diklórmétán) lehasad, ami lehetővé teszi a többi funkciós csoporttól való független kezelését, ez pedig a szintézis ciklusba szervezésénél óriási jelentőségű. Másik nagy előnye, hogy savas oldata narancssárga színű, spektrofotometriásan mérhető 498nm-en [20], s ezáltal az egyes kapcsolások hatásfoka ebből az értékből számítható.

I.1.9. A DNS szintézis automatizálása

A szintetikus DNS kapcsolási technika fejlődése, a szilárd hordozó megjelenése, a szintézis lépéseinek ciklusba szervezhetősége, valamint a megfelelő védőcsoportok elkülönült kezelhetősége lehetővé tette a DNS szintézis automatizálását. Az első gépeket foszfitkémiára tervezték [3], de azóta már gyakorlatilag csak amidit illetve H-foszfónát kémián alapuló szintetizátorok vannak a piacon.

I.1.10. Oligoribonukleotidok szintézise

Röviden megemlékezünk arról is, hogy lehetséges szintetikusan előállítani oligoribonukleotidokat is, de ebben az esetben a 2' OH csoportot is meg kell védeni, s a reagáló nukleotidra a szokásos szintézis körülmények között inert védőcsoportot kell felkötni (pl. benzoil, tetrahidropiranoil stb.) (Összefoglaló áttekintést ad pl. [122]). Egy ilyen példát a H-foszfónát módszer ismertetésekor mutattunk (5. ábra). Mindazonáltal ennek a tárgyalásába nem megyünk bele, mert nem tartozik a tárgyhoz, és nem is szintetizáltunk riboszármazékokat. Azt azért el lehet mondani, hogy a poliribonukleotid szintézisnek sokkal kisebb az irodalma, s általában komplikáltabb a kémiája, ezért nem olyan elterjedt, mint a deoxi változaté.

I.2. Módosított oligonukleotidok előállítása

A szintetikus DNS kémia fejlődésével nemcsak a természetben előforduló DNS-sel azonos értékű polinukleotidok előállítására merült fel az igény, hanem olyan módosított származékokra, amelyek speciális célra (biotechnológia, diagnosztika, kemoterápia, alap kutatások stb.) használhatók fel. Mostanában az antiszensz effektuson alapuló kemoterápiás irányú kutatások a legnépszerűbbek, amelyben a szintetikus oligonukleotidra a sejtbe juttatás megkönnyítésére pl. lipid láncot [157], koleszteril származékokat [101] kapcsolnak, vagy az anionos foszfátgerincet hidrofób csoporttal, pl. a metilfoszfónátok esetén metilcsoporttal [114] védik. A sejtben a DN-ázok miatt egy módosítatlan polinukleotid élettartama nem túl hosszú; ezt a problémát olyan ún. tioszármazékokkal szokták megoldani, ahol a foszfátgerincet nem oxigénnel, hanem kénnel oxidálják. Az ilyen tioszármazékok lényegesen rezisztensebbek az endonukleázokkal szemben, és potenciális vírusellenes szerek hatóanyagaiként szerepelhetnek, pl. az AIDS elleni küzdelemben is [21, 107]. Az ilyen típusú fejlesztésekkel a helyszűke miatt nem foglalkozunk részletesen (összefoglaló munkák nukleozid analógokra [129], polinukleotid analógokra [73]), hanem áttekintjük az oligonukleotidok olyan anyagokkal történő konjugálását, amelyek azok láthatóvá tételét célozzák.

A legáltalánosabban használt ilyen anyagok

- enzimek (alkalikus foszfatáz (AP), torma peroxidáz (HRP))
- biotin
- fluoreszcens anyagok

Bár az első ilyen jellegű próbálkozások a 70-es évek közepére tehetők, a gyakorlati jelentőségük csak később, a szintézis automatizálásával nőtt meg [139]. Ebben a munkában Renz és Kurz olyan rendszert fejlesztett ki, amelyben torma peroxidázt (HRP) illetve alkalikus foszfatázt (AP) polietiléniminnel kezeltek, majd az így kapott komplexet glutárdialdehiddel kapcsolták hozzá a megfelelő DNS-hez. Az így kapott komplexet hibridizáció után 3,3'-dianizidin/H₂O₂ (HRP-re), vagy NBT/BCIP rendszerrel hívták elő. Ez képezi a mai, Amersham cég által forgalmazott ECL (Enhanced Chemiluminescence) rendszer alapját.

Ehhez a módszerhez nem szükséges módosítani a DNS-t, viszont nem is nagyon alkalmas oligonukleotidokkal való kapcsolásra, mivel átlagosan 60 bázisonként kapcsol egy enzimet a DNS-hez.

Az oligonukleotidokhoz történő kapcsoláshoz általában az oligomeren egy vagy több olyan reaktív csoportot kell kialakítani, amelyen keresztül a kívánt anyag hozzákapcsolható. Ez történhet úgy, hogy a 3' vagy 5' végi OH-ra, a cukorfoszfatgerinre vagy valamelyik bázisra tesszük a funkciós csoportot. Smith és mtsai úgy szintetizáltak egy 5' végen aminált oligomert, hogy 5'-deoxi-5'-amino-timidint építettek be utolsó lépésként, s ehhez az 5' aminocsoporthoz kapcsoltak izotiocianát csoporttal funkcionalizált fluoreszcens anyagokat, mint fluoreszcein, Texas Red stb [162]. A fluoreszcensen megjelölt primereket szekvencia meghatározásra használták. Manapság a szekvencia analízis mellett a fluoreszcens primereket leggyakrabban PCR reakciókban használják. Chehab és mtsai [24] egy olyan új, fluoreszcens primereken alapuló technikát fejlesztettek ki, amelyben különböző fluoreszcens anyaggal (fluoreszcein, rodamin) jelölték meg a különböző mutáns allélokra tervezett PCR primereket, és egy amplifikációs reakcióban a termék színe alapján (agaróz gélelektroforézis után) meg tudták állapítani, milyen allélról van szó. Konkrétan: a cystic fibrosishoz, illetve a β -globinhez kapcsolódó deléciós mutációkat mutattak ki. Más munkacsoportok [28, 181] 6 szénatomos linkerrel keresztül kapcsolták a polinukleotid 5' végi nukleotidjához az aminocsoportot, ami szekvencia

meghatározásra kevésbé alkalmas, de ők nem is erre akarták használni, hanem biotin-N-hidroxiszukcinimiddel biotinilezték. Ez a linker a későbbi avidin kapcsolás esetén hasznos volt, s Southern blot kísérletekben bizonyították, hogy az így létrehozott komplex hibridizációs tulajdonságai gyakorlatilag megegyeznek a módosítatlan oligonukleotidéval [28]. A biotinilált rendszer előhívása úgy történt, hogy - mivel a biotin és az avidin között igen erős és specifikus kölcsönhatás van - AP-vel vagy HRP-vel konjugált avidint adtak biotinilált anyaghoz, majd a kapcsolás után a konjugált enzimek a szokásos reakciókkal előhívhatóak voltak. Biotinilált próbák előállítására alternatív megoldás a biotin-11-dUTP használata [141], de ezt enzimatikusan, terminális transzferáz alkalmazásával kell az oligonukleotid 3' végéhez csatlakoztatni.

Itt megemlítjük még, hogy lehetséges az oligomer belső nukleotidjait is funkciós csoporttal ellátni, mégpedig úgy, hogy a bázison megfelelően módosított amidittel a szekvenciában a megfelelő helyen elvégezzük a kapcsolást. Erre írt le módszert Haralambidis [69] és Gibson [52], akik 5-aminoalkilált 2'-deoxiuridin amiditszármazékát használták a szintézis során, s utána fluoreszcens anyagokat kötöttek fel az amino csoportra. A módszer előnye, hogy fluoreszcens anyagok több kópiában is beépíthetők, hátránya viszont az, hogy a bázisokon lévő funkciós csoportok a hibridizációs sajátságokra negatívan hatnak. Jablonski [77] 12 szénatomos aminált linkert használt szintén a 2'-deoxiuridinamidit 5. pozíciójában, és diszukcinimid-szuberáttal alkalikus foszfátot kapcsolt az oligonukleotidhoz. Ez volt az első olyan eset, ahol közvetlenül az oligomerhez kapcsolták az enzimet.

A másik általánosan használt funkciós csoport a tiol, vagy szulfhidril csoport, és ezen a területen is eltérő technikák alakultak ki. Pl. Zuckermann [192] olyan módszert fejlesztett ki, amelyben az oligonukleotid 3' végén egy linkeren keresztül SH csoportot alakított ki, majd ezt diszulfid kötésbe vitte 2-merkaptopiridinnel, s az így kapott komplexhez diszulfid cserereakción keresztül kapcsolta pl. a fluoreszcein tiolcsoportot hordozó származékát. A módszer enzimek kapcsolására nagy valószínűséggel alkalmatlan a fehérjékben szereplő diszulfid hidak miatt.

Enzim kapcsolására Li és mtsai [12] dolgoztak ki módszert, amelyben a 3' terminálisan szereplő szulfhidril csoporthoz előzetesen bromoacetilált alkalikus foszfátot

kapcsoltak. Az így kapott komplexet sikeresen használták klinikai kolóniahibridizációs kísérletekben.

Az eddigiekben ismertettünk néhány kialakult kémiai eljárást arra vonatkozóan, hogyan lehet biotint, fluoreszcens anyagokat, enzimeket kapcsolni szintetikus oligonukleotidokhoz. Ezek közül - mint Urdea [176] tanulmányából kiderül - az enzim rendszerek a legérzékenyebbek, legalacsonyabb a kimutatási határuk (attomol nagyságrend). Az eddigi technikák egyike sem alkalmas igazán enzimek kapcsolására, mert ha tiolszármazékot használunk, félő, hogy a lehetséges redoxi reakciók miatt az enzim másodlagos szerkezetét irreverzibilisen károsítjuk. Ezért fejlesztették ki Urdea és mtsai [175, 176] a p-fenilén-diizotiocianátos (DITC) módszert, amelyben N^4 -aminoalkil-deoxicitidin amidtszármazékát építették be a szintézis során az oligonukleotidba, és ezt a származékot keresztkötötték DITC-vel, majd HRP-vel és AP-vel. (Az így készült származékokkal végezték el az összehasonlító tanulmányukat biotinnel, fluoreszcens anyagokkal, izoluminollal (kemilumineszcens anyag) illetve a két enzimmel kapcsolatosan). Ennek a kapcsolásnak a kémiáját részletesen ismertetjük, mert módosításokkal mi is ezt a módszert választottuk.

A felsorolt módszereken kívül még számos eljárást fejlesztettek ki DNS detektálására, amelyek közül csak egyet említenénk meg, mert ennek a stratégiája merőben különbözik az előzőektől. Grzybowski [65] számos 2,4-dinitrofenil csoportot épített ki az oligonukleotidon a szintézis során, s az ez ellen a csoport ellen termeltetett ellenanyaggal, amelyet a szokásos enzimekkel (AP, HRP) kapcsolt össze, a hagyományos kolorimetriás módon tudott detektálni. Az érzékenység a biotinilált próbákéval azonos léptékű. Végül hasonló elven alapul a Boehringer Mannheim által ma is forgalmazott Dig kemilumineszcens kit, amelyben digoxigenin-11-dUTP segítségével jelölik meg a DNS-t (ez is csak enzimatikusan lehetséges terminális transzferáz, vagy DNS polimeráz segítségével), s megfelelő enzimekkel konjugált digoxigenin ellenes ellenanyaggal hívják elő a rendszert.

Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy az irodalomban számos olyan technikát találhatunk, amelyek különböző elvi alapokon, de lehetővé teszik a radioizotópok használatának elkerülését. A különböző eljárások más-más területen kerülnek hasznosításra:

a., a fluoreszcens primerek elsősorban automata DNS szekvenátorokban, illetve PCR-hoz kapcsolt diagnosztikai módszerekben,

b., a biotinilált próbák elsősorban diagnosztikai rendszerekben, illetve biotinilált oligonukleotidokkal végzett PCR segítségével szálspecifikus próbák, DNS affinitásoszlopok készíthetők,

c., enzimekkel konjugált oligonukleotidok felhasználása a DNS diagnosztikában, illetve egyéb alapkutatáshoz kapcsolt hibridizációs kísérletekben a legjelentősebb.

Mindamelletts hozzá kell tenni, hogy a kép távolról sem teljes. Rengeteg tennivaló van még hátra annak érdekében, hogy a radioaktív módszerek érzékenységét elérjük, a komplexek hibridizációs sajátságait javítsuk. A fenti ismertetőből kitűnik, hogy az enzim-DNS konjugátumok szintézisének egyetlen olyan próbálkozás sincs, amely kifejezetten arra törekedett volna, hogy a DNS 5' vagy 3' végét kösse össze a fehérje valamelyik végével. Ha figyelembe vesszük, hogy a DNS hibridizációs tulajdonságait valószínűleg az rontja legkevésbé, ha az enzim az oligomer végén helyezkedik el, és ha megfontoljuk azt is, hogy feltehetőleg az enzim működése szempontjából is az tűnik előnyösnek, ha csak a végeit módosítjuk, akkor ez látszik a legcélravezetőbb megoldásnak.

II. A DNS szekvencia meghatározási eljárások rövid áttekintése

II.1. Enzimatisz módszerek

A molekuláris biológiai kutatásokban nem csak az oligonukleotidok szintézise, hanem a DNS elsődleges szerkezetének, nukleotid sorrendjének meghatározása is olyan alapvető fontosságú, hogy nélkül el sem képzelhető ma már a kutatás. Ezen a téren a nagy áttörést Sanger és Coulson [150] munkássága jelentette 1975-ben, akik elsőként dolgoztak ki egy olyan módszert, ami nagyobb méretű DNS szekvencia meghatározására is alkalmas. A technika enzimatisz alapokon nyugszik, s az eredeti változat az ún. plusz-mínusz módszer, melynek elve a következő: ha 3' végén radioaktívan jelölt primer populációt olyan DNS polimerizációs reakcióba viszünk, amelyből az egyik nukleozid-trifoszfát hiányzik, akkor ennek a beépülési helyénél a reakció specifikusan megáll (mínusz), illetve, ha olyan exonukleáz kezelésnek vetjük alá, amelyben egy nukleozid-trifoszfátot a reakcióhoz

adunk, akkor az exonukleáz is megáll ellenkező (3') oldalról közelítve meg ezt a pontot (plusz). Mind a négy nukleotiddal megcsinálva az összes plusz-mínusz reakciót, s ezeket megfuttatva poliakrilamid gélen, olyan létrát kaptak, amelyből a szekvencia kikövetkeztethető. Nagy hátránya, hogy egy nukleotid fajta sorozatos előfordulása esetén a módszer elakadhat, s csak becslésekre szorítkozhatunk.

Lényeges javulást hozott az ugyanezen szerzők által bevezetett dideoxi terminációs módszer [151], amely ma is gyakorlatilag az enzimatikus szekvencia meghatározási eljárások elvi alapját képezik. Ebben az esetben mind a négy nukleotidra négy különböző reakcióelegyet állítanak össze, amelyek mind a négy dNTP-t tartalmazzák, illetve az egyik nukleozid-trifoszfát 2',3'-dideoxi származékát olyan koncentrációban, hogy a polimeráz reakció statisztikusan a szekvenálandó DNS szakasz minden megfelelő nukleotidjánál megálljon. Ha a szálakat radioaktívan megjelöltük, akkor a négy reakciót egymás mellett poliakrilamid gélen megfuttatva, majd autoradiografálva a szekvencia leolvasható. A szerzők a fenti két módszert alkalmazva meghatározták a Φ X174 bakteriofág teljes szekvenciáját (5386 bp) [125].

II.2. Kémiai módszerek

Ezzel párhuzamosan Maxam és Gilbert [111] kidolgozott egy teljesen más elvi alapokon nyugvó szekvencia meghatározási módszert, amelyben az 5' végjelölt DNS fragment bázisait specifikus módon, statisztikusan módosítják, majd alkalmas reagenssel a módosított bázisoknál elhasítják. A fentiekhez hasonlóan elektroforézis és autoradiográfia után a szekvencia leolvasható (ezt a tisztán kémiai módszert az Anyagok és Módszerek fejezetben részletesen ismertetjük).

Fő vonalaiban ez a két technika uralja ma is a területet, mindamellett számos egyéb próbálkozás is napvilágot látott.

II.3. Egyéb, kevésbé elterjedt technikák

Az egyik ilyen módszer [95] azon alapul, hogy ha DNS polimeráz segítőjével statisztikusan a megfelelő nukleozid α -tiotrifoszfát származékát építjük be a láncba, és exonuklázzal kezeljük, akkor a tioszármazéknál az enzim elakad, s így, mind a négy nukleotiddal végrehajtva ezt reakciót, szekvenáló létrát lehet létrehozni. E módszer kémiai testvérének tekinthető Gish és Eckstein [55] munkája, ahol a statisztikusan eloszló tiotrifoszfátot kötést alkalikusan hasítják, s ha a fragment valamelyik végén radioaktívan jelölve volt, a szekvencia a fentiekhez hasonlóan meghatározható. Teljesen eltérő elvi alapokon nyugszik a Grotjahn [62] által kifejlesztett tömegspektrometriás módszer, amely elsősorban oligonukleotidok szekvencia meghatározására alkalmas, de ez csak nagyon ritkán és elvétve használatos.

Lehetne még sorolni a különböző ötleteket, de ezek közül egy sem képes megszorítani sem a Sanger féle dideoxi-, sem a Maxam-Gilbert-féle kémiai eljárást.

II.4 . A Sanger-féle szekvencia analízis változatai, fejlődési irányai

Habár a dideoxi módszer elvi alapja a legtöbb, DNS polimerázt használó eljárás esetén ugyanaz, azonban a módszerek kivitelezési módjukat tekintve jelentős eltérést mutatnak. Ilyenek pl.:

- a szál jelölése a primer 5' végén történik, avagy a szintetizálódó szál belsejében,
- radioaktív vagy fluoreszcens a jelölés,
- használ-e a módszer ún. extenziós, kiterjesztési lépést,
- a polimeráz enzim fajtája (pl. Klenow, T4, T7, Taq polimeráz) tekintetében,
- egyszálú vagy kétszálú a templát DNS.

Napjainkban egyre több szekvencia adat lát napvilágot, s ezzel párhuzamosan merült, és merül fel az igény egyre jobb, gyorsabb, megbízhatóbb és kényelmesebb nukleotid-sorrend meghatározására irányuló módszerek iránt. Az egyik fő fejlesztési irány - amelynek nagy lökést adott a "Humán Genom Projekt" - a metodika automatizálása [6, 31, 163], amely nem-radioaktív, fluoreszcens detektálásra épül. A leggyakoribb változat az, hogy a primert 5' végén összekapcsolják valamilyen fluoreszcens festékkel (pl. fluoreszcein, Texas Red stb.),

és ezzel végzik el a reakciót. Az igazi automatizálás a futtatás során jelentkezik, mert a szekvenáló kád aljára egy lézerforrás-detektor rendszer van felszerelve, ami folyamatos detektálást tesz lehetővé a futtatás során.

Egy másik, ígéretes lehetőség a technika javítására alkalmasabb DNS polimerázokkal végezni a reakciót. A 80-as évek végén a termotabil enzimek elterjedése vetette fel annak a lehetőségét, hogy ilyen termotabil polimerázok segítségével a DNS-nek azok a szakaszai is megbízhatóan meghatározhatók, amelyek - a DNS szerkezetéből adódóan - korábban sok fejtörést okoztak.

Mielőtt azonban az ehhez a területhez kapcsolódó eredményeinket ismertetnénk, áttérünk egy másik fejezetre, amely irodalmi bevezetôt nyújt azokhoz az kutatásokhoz, amelyeket a csirke porc mátrix fehérje gén transzkripcionális szabályozása terén végeztünk.

III. Az eukariota génexpresszió szabályozása

III.1. Az expresszió szabályozásának szintjei

A molekuláris biológiában elfogadott centrális dogma szerint egy fehérje szintézise a következő útvonalon történik. A genomiális DNS-ről messenger RNS íródik át, s erről pedig a transzláció során a fehérje. Az eukariota gének felépítésüket tekintve bonyolultabbak, mint a prokarioták, mert az érett génterméket kódoló szekvenciákat (exonok), nemkódoló intronok szakítják meg. A gének 5', 3' végein olyan át nem íródó szekvenciák vannak, amelyek a transzkripció szabályozásában fontos szerepet játszanak. A primer átíródott RNS-ből komplex folyamatok eredményeképpen (splicing, poliadeniláció, 'sapka' képzés) képződik az érett mRNS, amelyről a riboszómán keletkezik a polipeptid.

A fehérjék jó részére a transzláció után különböző csoportok, molekulák kerülnek, s csak az így kialakult komplex mutat biológiai aktivitást.

Ennek megfelelően ebben a sorban nagyon sok olyan pont van, amely valamilyen szintű szabályozás alatt áll. Az egyik legtöbbet tanulmányozott terület a transzkripció során átírt RNS mennyiségének szabályozása, amit transzkripcionális regulációnak is szokás nevezni [30, 33]. Viszont a primer RNS képződése és a transzláció közötti folyamatok (splicing, poliadeniláció) is kontroll alatt állnak [161], ezek is jelentősen befolyásolják a

képződő fehérje minőségét, és mennyiségét. A legújabb eredmények szerint a transzkripció és a splicing koordináltan működik [61, 81, 188]. Nagyon fontos momentumként szerepel a mRNS stabilitása, hisz minél hosszabb élettartamú az RNS, annál több fehérje tud képződni róla (egy eukariota mRNS félélettartama 20 perc és 24 óra között van). A degradációs folyamat meglehetősen bonyolult, nagyon sok paramétertől függ, pl. a mRNS-en lévő poliA farok, 5',3' végi nem-transzlálódó régiók, 5' végi "sapka" szerkezet [9, 145]. Az eddig említetteket együttesen szokás pretranszlációs regulációnak is nevezni.

A kontroll következő szintje a transzláció során jelentkezik, s az ezt követő módosító reakciók olyan összetettek, hogy a szabályozásuk már csak az összetevők egyenkénti szabályozásának figyelembe vételével érthető meg. Az aggregan-komplex kialakulása során pl. 20-30 enzim szükséges a kapcsolódó poliszacharidok szintéziséhez, illetve a fehérje lánchoz kötéséhez [19].

A szabályozás transzkripciós vagy transzlációs jellege eldönthető azzal, ha megvizsgáljuk, hogy a mRNS szint változás illeszkedik-e a megfelelő fehérje mennyiségi viszonyaihoz (bár ebben az esetben is inkább csak pretranszlációs szabályozásról beszélhetünk, de ennek túlnyomó részét a transzkripció iniciációjának szabályozása teszi ki). Mivel a mi esetünkben is ez a helyzet, azaz a CMP gén mRNS szintje tükrözi a szintetizálódó fehérje mennyiségét, ezért csak a transzkripcionális szintű reguláció mechanizmusának áttekintésére térünk ki részletesebben.

III.2. A transzkripció szabályozása

III.2.1. Általános megjegyzések

Egy gén transzkripciójának elindításához nagyon sok feltételnek kell teljesülni. Szükségesek olyan speciális szekvenciák, amelyek nélkülözhetetlenek a transzkripció elindításához, ahol a DNS-függő RNS polimeráz a hozzá kapcsolódó faktorokkal az iniciációs komplexet képezi. Ezt a kb. 80-100 bp hosszúságú szakaszt promoternak nevezzük. A promoterhez kötődő komplex-szel kölcsönhatásba léphetnek egyéb faktorok, amelyek speciális DNS szekvenciához kapcsolódva pozitív vagy negatív irányban befolyásolják a transzkripció iniciációját (aktivátorok, represszorok). Ezek kombinált megjelenése, működése vezethet egy gén

fejlődési állapot-, illetve szövetspecifikus expressziójához.

Az érett mRNS kialakulásához még olyan motívumok is szükségesek, amelyek a 3' vég kialakításáért felelősek (poliadenilációs szignál). Az érett mRNS-ek általában egy transzlálódó régióból, 5', 3' végi nem-transzlálódó szekvenciákból illetve egy poliA farokból állnak.

A prokariota élőlényekkel szemben az eukariota szervezetekben három különböző RNS polimeráz van: I, II, III, amelyek közül a II felelős általában a mRNS-ek szintéziséért. Ezért csak az ezzel kapcsolatos szabályozásra térünk ki, annyi megjegyzéssel, hogy az RNS polimeráz III esetén is sokszor hasonló mechanizmust figyeltek meg [47, 184].

III.2.2. RNS polimeráz II transzkripcionális iniciációs komplex

Az RNS polimeráz II egy legalább 10 alegységből felépülő >500 kDa molekulatömegű enzimkomplex. Az alegységek funkcióját a prokariota enzim analógiájára derítették fel [30]. A három legnagyobb alegység látja el a funkciók többségét (templát-primer kötés, nukleozid-trifoszfát kötés), és alkotják a katalitikus centrumot. A kisebb alegységeknek szabályozó szerep jut, esetenként elhagyhatóak.

A legnagyobb alegység (220 kDa) C-terminális doménje (CTD) a komplex egyik legtöbbet vizsgált régiója. Egy szokatlan ismétlődő egységet tartalmaz: Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. Ez élőlénytől függően 25-52 kópiában fordul elő a doménben. A CTD képes nagymértékben foszforilálódni (IIO alak), illetve defoszforilálódni (IIA forma). Az RNS polimeráz II e két formájának szerepe van egyrészt a transzkripció iniciáció-elongáció stádiumainak kialakulásában, másrészt az aktivátor elemekkel való "kommunikációban" [30, 181].

Az enzimkomplex önmagában azonban nem képes elindítani a transzkripciót, hanem külső faktorok közreműködése szükséges. A legtöbb eukariota promoter központi magját egy ún. TATA box képezi, amely egy TATAA szekvencia elemből áll. Ehhez képest 5' irányban gyakran előfordulnak egyéb promoter elemek (ún. upstream promoter elemek, UPE), amelyeknek - a hozzájuk kötődő faktorok révén - a transzkripció iniciációjának elősegítése a funkciójuk. Így fejti ki aktiváló hatását pl. a CCAAT boxhoz kapcsolódó fehérjecsalád, vagy az Sp1, amely a

GGGCGG szekvenciaelem(ek)hez kötődik [17, 105]. Lehetséges az is, hogy egy génhez nem egy, hanem több - alternatív - promoter tartozik, ami feltehetően lehetővé teszi azt, hogy a gén különböző szövetekben más-más genetikai program szerint fejeződjön ki [154].

Az RNS polimeráz II valójában nem a templát DNS-t ismeri fel, hanem a promoterhez előzetesen hozzákötődött komplexet. A TATA motívumhoz egy TFIID nevű komplex kapcsolódik (a továbbiakban a TF rövidítés Transzkripció Faktort jelent). A TFIID egy sok komponensű fehérje együttes, amely méretéről igencsak megoszlanak a vélemények (300-750 kDa). Az egyik legfontosabb komponense a TBP ("TATA binding protein"), s valójában ez a protein kötődik a TATA motívumhoz (azonban olyan promoterhez is kötődhet, ahol TATA elem nem azonosítható) [30]. A TBP protein mérete nagy mértékben függ a származási sejttípustól (22-38 kDa). A TATA kötésért elsősorban a C-terminális doménje felelős, de ehhez a kapcsolódáshoz egyéb fehérjék is szükségesek, amelyeket összefoglalóan TAF-nak ("TBP Associating Factors") nevezünk. Ez egy nagyon heterogén család (28-95 kDa), és még ma is alapvetően megoszlanak a vélemények arról, hogy milyen faktorok nélkülözhetetlenek a TATA boxhoz való kötéshez [103, 167, 190].

Ezek után a 'preiniciációs komplex' keletkezése a következőképpen írható le. A TFIID komplexet képezve a TFIIA-val hozzákötődik a promoter TATA eleméhez, ezt a TFIIB felismeri, és hozzákapcsolódva kialakul a DAB (preiniciációs) komplex. Az RNS polimeráz II a TFIIF-fel kapcsolatba lép, majd az így kialakult együttes kötődik a preiniciációs komplexhez. Ezt követi a TFIIIE, -H, és -J kapcsolódása, majd a polimeráz II foszforilálódása után az elongáció elindulhat [30, 33, 189].

A TFIIA szerepét ma is vitatják (hogy egyáltalán szükséges-e a TATA kötéshez), de a TBP-vel biztosan kölcsönhatásban van. A TFIIB a pontos transzkripció iniciációjában játszhat szerepet, a TFIIF pedig az RNS polimeráz II-höz kapcsolódva juttatja el azt a preiniciációs komplexhez [30, 33, 189]. Mindazonáltal annak felderítése, hogyan fejtik ki hatásukat ezek a komponensek molekuláris szinten, a jövő feladata.

Érdekes megjegyezni, hogy - szemben az eddigi elképzelésekkel - a legújabb kutatási eredmények szerint a mRNS-ek szintézise a sejtmagban (a sejtmagvacskán kívül) úgy történik, hogy nem az RNS polimeráz II mozog a templát DNS-en, miközben a mRNS szintetizálódik, hanem a templát

DNS az enzimkomplexen. A transzkripciós komplex, amely tartalmazza a polimerázt is, rögzítve van a sejtmag állományában [78]. A szerzők szerint 300-500 ilyen "gyár" létezik egy sejtmagon belül, s mindegyik ilyen egység kb. 60 enzimet tartalmaz. A rendszer modellezését, a szabályozó fehérjék lehetséges szerepét, működési mechanizmusát is beleértve megtalálhatjuk Cook korábbi munkájában [32].

A fent vázolt transzkripciós iniciációs mechanizmust mindenképpen figyelembe kell vennünk ahhoz, ha meg akarjuk érteni a szabályozó fehérjék (aktivátorok, represszorok) működését, hiszen ezek a fenti folyamatok bármelyikének lezajlására (s ezen keresztül az egész transzkripcióra) drasztikus hatással lehetnek.

III.2.3. Enhancerek, silencerek, aktivátorok, represszorok

Ahhoz, hogy egy élőlény a megfelelő időben, a megfelelő helyen (szövetben), a megfelelő mennyiségű génterméket elő tudja állítani, olyan szabályozó elemekre van szükség, amelyek alkalomadtán ki vagy be tudják kapcsolni a gén működését, illetve képesek növelni vagy csökkenteni az átíródás sebességét. Nagyon sok esetben ez a szabályozás úgy történik, hogy a gén transzkripciós iniciációs pontjához képest *cisz* reguláló elemeihez olyan *transz* hatású fehérjék kapcsolódnak, amelyek valamilyen módon képesek hatást gyakorolni a transzkripció iniciációjára. Hatásuk szerint ezek két csoportba oszthatóak: a., **enhancerek**, amelyek olyan *cisz* helyzetű DNS szekvenciaelemek, amelyek orientációjuktól, és az iniciációs ponttól való távolságuktól függetlenül a transzkripció hatékonyságának növelésében működnek közre, b., **silencerek**, amelyeknek - hasonlóan az enhancerekhez - távolságtól és orientációtól függetlenül a gén aktivitásának csökkentésében, vagy gyakorlatilag kikapcsolásában van közvetítő szerepük. [105, 115]. Egy gén szabályozott ki- és bekapcsolásának két lehetséges alternatívája van: 1., a gén alapállapotban működik, s a megfelelő időben csökkenteni kell a génterméket, vagy ki kell kapcsolni a gént; 2., a gén alapállapotban "csendes", s alkalmanként van csak szükség a géntermékre, amikor el kell indítani a transzkripciót. E feladatokat a fenti elemekhez kapcsolódó transzkripciós faktorok megfelelő kombinációban képesek ellátni.

Az enhancerek alapvetően három osztályba sorolhatók a hozzájuk kapcsolódó faktor természetétől függően [105]:

- konstitutív enhancerek, amelyekhez folyamatosan, külső behatás nélkül kapcsolódnak a szabályozó fehérjék, mint pl. az Sp1, vagy a C/EBP.
- indukálható enhancerek, amelyekhez kapcsolódó fehérjék valamilyen külső behatásra aktiválódnak. Példaként szolgálhatnak a szteroid receptorokhoz, hőszokk fehérjékhez, metallotioneinekhez tartozó DNS-elemek.
- szövet illetve fejlődési állapot specifikus enhancerek. Erre a HNF-1 felismerési szekvenciája lehet egy példa a sok közül. (A szövetspecifitást az alternatív promoter használat is biztosíthatja (ld. fent).)

Az enhancerek csakúgy, mint a promoterek lehetnek moduláris felépítésűek, ahol minden modulhoz más-más transzkripciós faktor kapcsolódhat, ily módon biztosítva a szövetspecifikus vagy konstitutív kifejeződést (Az SV40 enhancer számos fehérje kötőhelyét tartalmazza) [105].

A protein oldalról közelítve meg a kérdést, a transzkripcióra gyakorolt hatásukat tekintve két csoportba oszthatjuk a fehérjéket:

Aktivátorok, amelyek enhancer elemekhez kötődve elősegítik a transzkripció iniciációját. Mindazonáltal legújabban kimutatták, hogy az enhancer hatás nemcsak a cisz elemeken keresztül jöhet létre, hanem van közvetlen transz aktiváció is [120], amely protein-protein kölcsönhatáson keresztül befolyásolja a transzkripció iniciációját.

A represszorok olyan faktorok, amelyek valamilyen módon gátolják az aktív génkifejeződést. Ez különböző úton-módon történhet. Pl. úgy, hogy a represszor fehérje verseng az aktivátorral a DNS-hez való kötődésben (NF-E vs. CP1), vagy két pozitív hatású fehérje túl közel kerülve egymás mellé represszor hatás tapasztalható [79], vagy például az NF-kappaB a citoplazmában egészen addig az I-kappa-B-hez kötött állapotban van, amíg valamilyen külső jel (citokin) ezt fel nem bontja, aminek hatására az NF-kappaB aktiválódik [138]. Egy komplikáltabb változatban a represszor nem kötődik a DNS-hez, és az aktivátor kötődését sem befolyásolja, hanem csak annak az aktivátor doménjét blokkolja. Ez a helyzet pl. az élesztő GAL4 esetén, ahol a GAL80 represszor fehérje fejt ki így a hatását [79]. Lehetne sorolni még a példákat, de a jelenleg ismert mechanizmusok közül már jó néhányat említettünk. Talán annyit érdemes még megjegyezni, hogy silencer illetve represszor hatású lehet az is, ha egy aktivátor fehérjéről eltávolítjuk az aktivátor domént.

A következőkben röviden áttekintjük, hogy a transzkripciós faktorokban milyen speciális szerkezeti domének ismeretesek.

III.2.4. A transzkripciós faktorok DNS-felismerő szerkezeti motívumai

A szabályozó fehérjék általában moduláris felépítésűek, azaz a DNS-kötő doménjük elkülönül a fehérje egyéb doménjeitől (aktivátor-, egyéb szubsztrát- kötő domén). A DNS-kötő egységek sokszor sajátos szerkezeti felépítést mutatnak, amely alapján a transzkripciós faktorok különböző osztályokba sorolhatóak. Ezek a következők:

Hélix-turn-hélix (HTH)

Két α -helikális doménből áll, amiket egy 'linker' választ el egymástól. A két domén majdnem merőleges egymásra, és a felismerési szekvencia mindkét oldalához kötődnek (az egyik modul egy kicsit a DNS fő árka fölött helyezkedik el az N-terminális véggel a DNS gerincénél, a másik rész éppen a fő árokba fekszik). A peptidgerincből kiálló "mellékágak" szekvenciaspecifikus kölcsönhatásba léphetnek a DNS-sel, s ezt a kapcsolatot H-kötések sokasága erősíti. Az ilyen fehérjék dimerizációra hajlamosak. A lambda represszor volt az első, amelyben ezt a motívumot leírták, azóta számos más példa létezik: Cro fehérjék, CAP stb. [16, 127]

Homeodomén

A homeodomént a *Drosophila* fejlődésében a testtájak kialakítását szabályozó fehérjékben mutatták ki először (ftz, eve, ubx). Kb. 60 aminosavból áll, amelyek közül a legkonzerváltabbak bázikusak, vagy hidrofóbok. Szerkezeti felépítését 2D NMR-rel állapították meg. Tartalmaz egy HTH motívumot, és három darab α -hélix-ből áll, amelyek közül a 3. a DNS nagy árkan keresztül létesíti a kötések többségét. A peptidből elágazó oldalláncok képezik itt is a szekvenciaspecifikus kölcsönhatások nagy részét. A másik két hélix antiparalell lefutású, és távolabbi kapcsolatban vannak a fő árokkal.

Néhány szerző szerint AT gazdag szekvenciákhoz kötődnek elsősorban. A homeodoménhez néha szorosan kapcsolódik egy másik jellegzetes motívum, a POU box, amely a homeodomén 5' illetve 3' végén képez jellegzetes szakaszokat. Lehetséges, hogy szerepük van a DNS-fehérje kapcsolaton kívül a protein-protein kölcsönhatásban. Jellegzetes képviselőjük pl. a Pit-1, Oct-2 [115, 127, 130].

"Leucin zipper"

Ezeknek a fehérjéknek igen fontos szerepük van a differenciációban és a fejlődésben. A teljes modul 60-80 aminosavból áll, de ez két szubdoménre oszlik, amelyből a leucin zipper rész a dimerizációért, míg a másik, bázikus rész a DNS kötésért felelős. A leucin zipper szubdomén minden hetedik aminosavja leucin, s gyakran fordulnak elő benne hidrofób aminosavak is, míg a bázikus domén argininben és lizinben gazdag. Nagyon sok, biológiailag igen fontos faktor tartalmaz ilyen motívumot: pl. AP1 (fos, jun), C/EBP, bZIP, CREB [115, 127].

"Zn finger" proteinek

Az egyik legnagyobb osztály, és az első ilyen elemet a *Xenopus* TFIIIA transzkripciós faktorában mutatták ki. Jellemző motívuma a Cys-X₂₋₄-Cys-(N)₁₂-Cys-Y₂₋₄-Cys-. Helyenként az egyik pár ciszteint hisztidin helyettesítheti (néhány szerzők ezért külön alosztályokat hoztak létre). A csoport a nevét onnan kapta, hogy a fenti szekvenciában a négy cisztein úgy helyezkedik el, hogy egy Zn²⁺-t koordinálnak. Ennek következtében a köztes 12 tagú rész ujjszerűen kinyúlik, s ez a szakasz fekszik bele a DNS nagy árkába. A teljes domén sokszor nem csak egy ilyen ujjat tartalmaz, hanem többet is (pl. a ZFY-nak 13 van). A szekvenciaspecifitásban a ciszteinek közvetlen környezetében lévő aminosavak döntő fontosságúak. Nagyon sok ilyen típusú fehérje van: TFIIIA, szteroid/tiroid receptor család, HNF4, EGR-1 stb. [84, 127].

Egyéb

A fentiekén kívül van még néhány jellemző struktúrális motívum, mint a β -sheet, hélix-loop-hélix, de ezek talán kisebb jelentőségűek, s nem foglalkozunk velük részletesen.

Meg kell jegyezni viszont azt is, hogy ebbe a csoportosításba távolról sem esik bele minden transzkripciós faktor, vannak olyanok, amelyek egyik kategóriába sem sorolhatóak: pl. CTF/NF-1, AP-2.

Az NF-I-nek ("nuclear factor 1") van még egy külön érdekessége, ami arra enged következtetni, hogy a transzkripció és a replikáció mechanizmusa tartalmaz közös elemeket [72]. Ugyanis az NF-1-t az adenovírus replikációját elősegítő faktorként fedezték fel [23, 58, 118], de azóta kiderült, hogy számos gén transzkripciójának szabályozásában is szerepet játszik [34, 179]. Valójában ma már jobb NF-1 fehérjecsaládról beszélni, mert még egyetlen organizmuson belül is több ilyen típusú fehérje létezik [59, 144], amelyek

molekulatömege meglehetősen heterogenitást mutat. Az NF-I erőteljesen konzervált aminoterminális doménjén keresztül kötődik a DNS-hez, a C-terminális régiója (lényegesen kevésbé konzervált) felelős a funkcionális sajátosságokért [58]. A karboxiterminális domén nagyfokú változatossága teszi lehetővé, hogy az NF-I típusú fehérjék a legkülönbözőbb feladatok ellátására képesek.

A fentiekben azokat a faktorokat jellemeztük, amelyek speciálisan kötődve valamilyen *cis*z elemhez, a transzkripció iniciációjára hatást gyakorolnak. Nem tettünk említést viszont egy másik, fontos tényezőről, amely nem annyira szekvencia specifikus, s mégis alapvetően befolyásolja a transzkripció hatékonyságát.

III.3. Nukleoszóma, hisztonok, transzkripció

A kromoszómák óriási méretük ellenére hihetetlen kis helyre vannak bezsúfolva a sejtmagban. Ez csak a magas fokú rendezettség elérésével lehetséges. A DNS transzkripcionálisan inaktív állapotban lévő része ún. nukleoszómákat képez, amely egy speciálisan tömörített szerkezet a DNS számára.

Transzkripció, illetve replikáció során a szerkezet fellazul, és pl. a *Drosophila melanogaster* nyálmirigyében található ún. politén kromoszómán az indukált transzkripció ún. puffok formájában jól megfigyelhető [8]. Ebből következik, hogy a kromatin alapállapotban nem megfelelő struktúra a transzkripció számára. Hogyan lehetséges akkor mégis átíródás?

A kromatin szerveződésének alapegysége a nukleoszóma, ami egy hiszton fehérjékből álló oktamer köré feltekeredett DNS szakasz. A hiszton mag úgy képződik, hogy a H3 és H4 hisztonok egy tetramert képeznek (ami egy stabil képződmény), és ehhez kapcsolódik 2-2db H2A és H2B hisztonfehérje. Az így kialakult oktamer köré egy 146 bp DNS szakasz tekeredik fel 1.8 fordulatot téve. A végén egy kb. 22 bp szakasz kapcsolódik a H1 hisztonhoz, amely párhuzamos a tekeredés tengelyének irányával, s a hurkok, illetve a nukleoszómák összekapcsolása a feladata [10, 64, 165, 187].

A hisztonok nagyon bázikus fehérjék, s így erős kapcsolatba tudnak lépni a DNS-sel, ezért nem csoda, ha a hisztonokat általános represszorokként tartották számon, ami igaz is. Ahhoz, hogy a mRNS szintézis elinduljon, kell lennie a promotertől 5' irányban egy UAS-nek (upstream activator sequence), amely a nukleoszóma szerkezetét

fellazítja. Az ún. háztartási (housekeeping) géneknél (amelyeknek folyamatosan kell működniük) ezért van szükség arra, hogy egy ilyen UAS folyamatosan nyitott állapotban tartsa a promoter körüli régiót. Ilyen nukleoszóma lazító tulajdonsága nem minden szabályozó fehérjének van, de ilyen pl. az Sp1, az élesztő GRF fehérje család stb [165, 187].

A TFIID-ről kimutatták, hogy képes kötődni a DNS-hez még akkor is, ha a promoter a nukleoszómán belül van, bár mindenképpen ez a kötődés lesz a sebesség-meghatározó lépés [187]. A egér emlő tumor vírus promoterében lévő CAAT szekvenciához a CTF/NF-I nem képes addig kötődni, amíg a glucocorticoid receptor hozzá nem kötődött a saját eleméhez, s ezáltal fel nem lazította a nukleoszómális szerkezetet [165, 187].

Hogy mi lazíthatja fel a nukleoszómák szerkezetét, arról egyenlőre csak feltételezések vannak. Annyi mindenesetre bizonyos, hogy a H4 hiszton N-terminális vége kiáll a nukleoszómából, s ehhez a savas jellegű aktivátor domének hozzá tudnak kapcsolódni [66], és megbontani a szerkezetet. Grunstein [63] bizonyos esetekben azt tapasztalta, hogy a H4 hiszton N-terminális doménje nélkülözhetetlen bizonyos gének átíródásához. Hasonlóan pozitív szerepe lehet a nukleoszómának abban, hogy a kooperatív aktivátor szekvenciákat a térben egymás mellé "csavarja" [165].

Mivel a DNS savas, ezért ha a hisztonokat acetiláljuk *in vivo*, akkor azt várhatjuk, hogy a hiszton-DNS kölcsönhatás lazul, s a transzkripció erősödik, mint ahogy azt Lee be is bizonyította [96].

Az átíródás során az RNS polimeráz II-nek meg kellene birkóznia a nukleoszóma szerkezettel. Ezt a természet - feltételezések szerint - úgy oldotta meg, hogy - mivel a nukleoszóma képződés számára a negatívan felcsavarodott DNS a kedvező - topoizomerázzal a templát szálát pozitív "supercoil"-lá alakítja, amelyen az enzim sokkal könnyebben haladhat. A polimeráz mögött egy másik topoizomeráz a DNS szálát visszaalakítja [117].

Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy a nukleoszóma szerkezet általában a transzkripció gátlását okozza, s ez lehet az egyik mechanizmus arra, hogy egy gén normális állapotban inaktív legyen, s csak a fejlődés bizonyos stádiumában, vagy csak bizonyos szövetekben megjelenő aktivátorok hatására kapcsoljon be.

Egy másik jelenség, amely befolyásolja a gének aktivitását: a DNS metiláció. Általános a vélemény azon

tekintetben, hogy a DNS metilációknak represszor hatása van a transzkripcióra, de ennek a pontos mechanizmusa még nem ismert [112, 170].

A fentiekből kitűnik, hogy a transzkripcionális szabályozás meglehetősen összetett probléma, amelynek értelmezésénél nemcsak a transzkripciós faktorok pozitív vagy negatív hatását, hanem a gének struktúráját, a kromatinban való előfordulásuk mikéntjét is figyelembe kell venni.

Az eukarióta génszabályozás, s ezen belül is a transzkripcionális reguláció részletes áttekintése után nézzük meg, hogyan lehet ezeket az ismereteket egy speciális területen, a porc mátrix fehérjék tanulmányozása terén hasznosítani. Ehhez azonban először röviden áttekintjük a porcszövettel, illetve a porc sejtközzötti állományában lévő makromolekulákkal kapcsolatos ismeretanyagot.

IV. A porcszövet

IV.1. Általános jellemzés

A porcszövet a gerincesek felépítésében igen fontos szerepet játszó támasztószövet, amelynek sokoldalú funkciója van. Szerepet játszik a szervek alakjának meghatározásában, szilárdításában, (pl. orr-, fülporc), s a csontok egymáson elmozduló felületeinek "kipárnázásával" jelentősen növeli a mozgékonyt, könnyíti a mozgást (pl. ízületi porcok).

A porcszöveteket tulajdonságaik, előfordulási helyük szerint három fő csoportba lehet osztani:

- hialin vagy üvegporc. Ez a leggyakrabban előforduló porcféleség, amelyben rostos szerkezet egyszerű eszközökkel nem mutatható ki. Pl. bordaporcokban, ízületekben, embrionális vázban stb. található meg.
- rugalmas porc. Ebben festési eljárásokkal már látszanak rostok, s olyan helyeken található meg elsősorban, mint a gégefő bejárata, fülkagyló.

- rostos porc. Mint a nevéből is kitűnik, rostos szerkezetű, ami már festés nélkül is jól látható, jelentős ellenállást mutat csavaró, nyíró erőkkel szemben, s leggyakrabban a csigolyaközi porckorongokban fordul elő.

A fentiekből kiderül, hogy a porcoknak két legfontosabb mechanikai tulajdonsága az ellenállóképesség különböző erőbehatásokkal szemben, illetve a rugalmasság. A dolog magyarázatát a szövet sajátos szerkezetében kell keresnünk. A porcszövetben a sejt közötti állomány, amelyet egy ún. extracelluláris mátrix (ECM) tölt ki, igen nagy a porcsejtek (chondrocyták) által elfoglalt térhez képest. Valójában ez az ECM (amelynek a makromolekuláit a chondrocyták termelik) a felelős a fenti mechanikai tulajdonságokért.

Érdekességgé mint még azt lehet megjegyezni, hogy a porcszövetet nem hálózzák be idegek, nyirok- és vérerek (sőt olyan anyago(ka)t termel, amelyek ezek kialakulását gátolja [19]). A sejtek táplálása a sejtközi folyadékban történő passzív diffúzióval, illetve, mint később látni fogjuk, a mechanikai terhelés következtében kialakuló aktív folyadékáramlással történik.

IV.2. A porc mátrix makromolekulái

A porc ECM-jét alkotó főbb fehérjéket három csoportba oszthatjuk:

- kollagének, amelyek szálak szerkezetűknél fogva a mátrixnak nagy húzó- és szakítószilárdságot biztosítanak,
- proteoglikánok, amelyek sajátos szerkezetet képezve biztosítják a porc rugalmasságát, nyomóerőkkel szembeni ellenállását,
- nemkollagénszerű fehérjék, amelyek funkciói csak részben ismertek, sok esetben a fenti nagy molekulású komponensek összekapcsolásában, hálózattá szervezésében játszanak szerepet.

Az alkotóelemek két kiterjedt makromolekuláris hálót képeznek, melyekhez a kisebb komponensek vagy csak egyszerűen hozzákötődnek, vagy pedig a két háló összekapcsolását biztosítják.

Az egyik ilyen makromolekuláris képződmény fő tömegét a II. típusú kollagénrostok, míg a másikat a proteoglikán-hialuronsav aggregátumok adják.

IV.2.1. Kollagének

Az eddig ismert 14 fajta kollagén közül a II., IX. és a X. kollagén található meg a porcszövetekben, habár a XI. típusút is kimutatták porc jellegű szövetekben, chondrosarcomában [2]. A kollagéneket általában tovább csoportosítják fibrilláris (II.) és nemfibrilláris (IX., X.) kollagénekre [149, 180]. A kollagének jellegzetes tulajdonsága, hogy három azonos vagy különböző polipeptidláncból hármass hélixet képeznek, s ezek a polipeptid láncok egy jellegzetes ismétlődő Gly-X-Y motívumból épülnek fel. Más fehérjékhez képest magas a prolin, lizin, alanin tartalmuk, és ezeken az aminosavakon viszonylag sok olyan poszttranszlációs módosítás zajlik le, mint pl. hidroxilálás, glükózilálás, keresztkötések stb. [180].

II. kollagén. A porcszövet egyik fő makromolekuláris egységét adó komponense. Három azonos, 1014 aminosav hosszúságú polipeptidlánc hármass hélixéből jön létre. A monomerek egy C-, és egy N-terminális telopeptid részből, valamint az ezek között elhelyezkedő helikális doménből épülnek fel. A kollagén szálak párhuzamosan, egymáshoz képest kb. 1/4 hosszal eltolva helyezkednek el, s a szálak között keresztkötések alakulhatnak ki. Ez biztosítja a kollagénrost nagy szakítószilárdságát.

IX. típusú kollagén. Nemfibrilláris jellegű heterotrimer, amelynek a hármass hélix doménjeit nem-hármass-hélix részek szakítják meg. Kb. 1-10%-át adja a porcban lévő teljes kollagén mennyiségnek. A feltételezések szerint a IX. kollagéennek szerepe van a II. kollagén rostok és a proteoglükán komplexumok összekapcsolásában [180].

X. típusú kollagén. Szintén nemfibrilláris jellegű kollagén, amelynek szintézise a chondrocyták késői stádiumára (hipertróf stádium) korlátozódik, s ez sejteti azt, hogy a porcszövet elcsontosodásában lehet valamilyen szerepe. Homotrimer felépítésű, mint a II. kollagén, de az aminosav tripleteket egy-egy eltérő szekvencia helyenként megszakítja.

IV.2.2. Proteoglükánok

A proteoglükánok jellegzetessége, hogy a központi polipeptid lánchoz legalább egy glükóz-aminoglükán oldallánc kapcsolódik. Méretük és tulajdonságaik alapján három fő csoportba oszthatók: (1) nagy, porcspecifikus

aggregálódó proteoglükán (aggrecan), (2) kis molekulatömegű proteoglükánok (decorin, biglükán stb.), (3) sejthez kapcsolt proteoglükánok [2]. Ezek közül a porcszövetben messze a legnagyobb jelentőségű az aggrecan, s a továbbiakban csak ennek a felépítésével, funkciójával foglalkozunk.

Az aggrecan a porc nedves súlyának akár 5-10%-át is kiteheti. A csupasz fehérje molekulatömege 220-250 kDa, s ez az N-terminális végével nem-kovalensen kapcsolódhat a hialuronsavhoz, s a komplex kialakulását a kapcsoló fehérje stabilizálja [2, 19, 70]. A hialuronsav egy β -(1,4) kapcsolású D-glükuronsav-N-acetil-glükózamin mükopoliszaharid. Egy hialuronsavhoz nagyon sok, akár száz aggrecan is kapcsolódhat, amely révén több tízmilliós molekulatömegű aggregátumok jöhetnek létre.

IV.2.3. Nem kollagénszerű fehérjék

Bár ezek a fehérjék is összességükben hasonló mennyiségben fordulnak elő a porcban, mint a proteoglükánok vagy a kollagének (max. 10%), mégis a szerepükről csak keveset lehet tudni, többnyire a mátrix stabilizálásában vesznek részt.

Kapcsoló fehérje (link protein, LP)

A kapcsoló fehérje szerepéről korábban szóltunk. Az aggrecan-hialuronsav nem-kovalens kötés stabilizálásában vesz részt. Egy ilyen aggrecan-kapcsoló fehérje komplex 10 monomernyi egységet foglal el a hialuronsav láncon. Maguk a kapcsoló fehérjék 40-50 kDa-os glükoproteinek, amelyek különböző mértékben glükozilálódhatnak.

A másik fontos nem kollagénszerű fehérje a porc mátrix fehérje (CMP), de erről részletesen szólunk, mert az értekezés harmadik részében a CMP gén transzkripcionális szintű szabályozásának kutatása során elért eredményeket kívánjuk bemutatni.

IV.2.4. Csirke porc mátrix fehérje (CMP, 54 kDa), és génje

A csirke porc mátrix fehérje szintén glükoprotein, enyhén bázikus, és homotrimereket képez. A cukor-komponense magas mannóz tartalmú, és N-glikozidos kötéssel kapcsolódik a fehérjéhez. A fehérje funkciója még nem teljesen tisztázott, de a legújabb eredmények szerint a CMP a II. típusú kollagén hármas hélixének végéhez kapcsolódik, lehetővé téve a kollagén szálak komplexebb

kapcsolódását, egy kiterjedtebb hálózat létrejöttét [186]. A szerzőknek sikerült kimutatniuk egy gyenge kölcsönhatást az aggregánnal is, s így ebben a minőségében a CMP a IX. típusú kollagénhez hasonlítana. Mindenesetre az eredmények nem tekinthetők lezártnak.

A fehérjét Paulsson és Heinegard tisztította először marha légcső porcból, a csoportunk munkatársai pedig jelentős szerepet töltöttek be a gén izolálása, szekvencia analízise, genomiális szerveződésének meghatározása terén [7, 87, 89]. A fehérje primer aminosav sorrendjének meghatározását a megfelelő cDNS analízise tette lehetővé. Az 7. ábra mutatja az 54 kDa-os fehérje szerkezetét, kapcsolatát a mRNS-ének felépítésével, illetve a genomiális szekvencia exon-intron szerkezetével. Ennek felderítésében a csoportunk vezetőinek oroszlánrészük volt [88, 90].

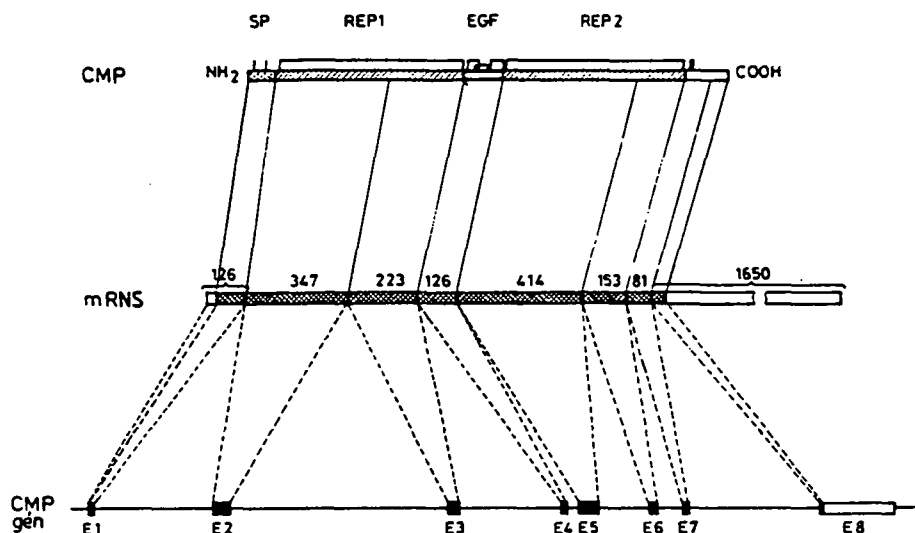
A fehérje modulokból épül fel, s az amino-terminális részen lévő rövid szignál szekvencia (23 as) után két olyan ismétlődő domén van (180 as), amelyeket egy rövid, EGF-fel homológ szekvencia választ el egymástól. A két nagy régió egymással és a von Willebrand faktor A doménjével [143] nagyfokú homológiát mutat, s hasonló egységek találhatók a leukocita integrinek α láncában, a komplement B, C faktorban és a VI. kollagén mindhárom láncában [90].

A gén a csirke genomban egy példányban fordul elő, 18kb hosszúságú, 8 exonból, és hét intronból áll. A két nagy modult két-két, az aminoterminalis szignálszekvenciát, és az EGF domént egy-egy exon kódolja.

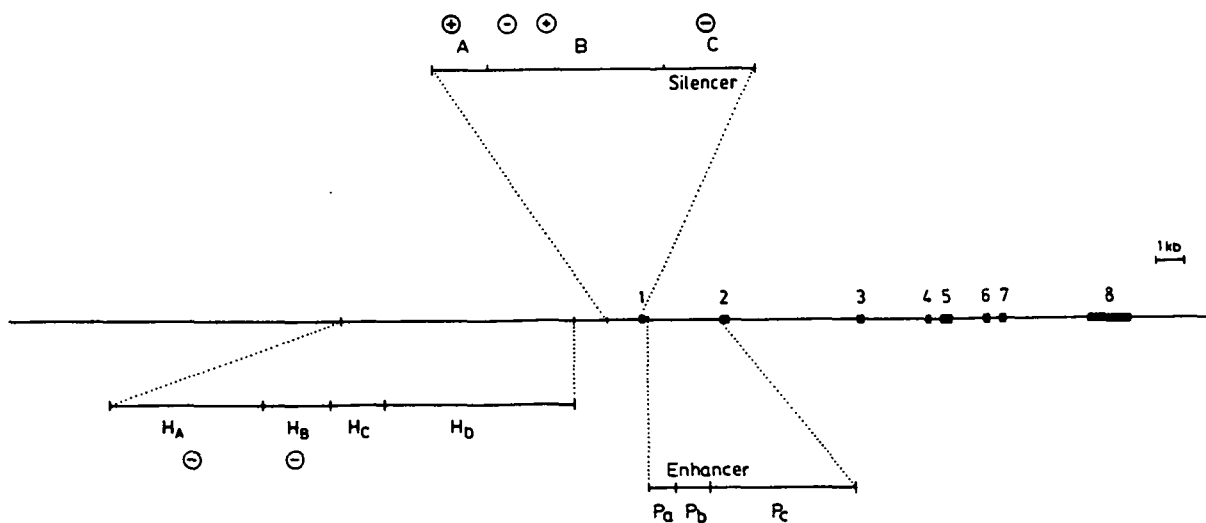
Munkacsoportunk tagjai már korábban el kezdték kutatni azokat a régiókat a CMP génben, illetve a környékén, amelyeknek szerepe lehet a gén kifejeződésének transzkripcionális szintű szabályozásában. A 8. ábrán a genomiális klónon belül feltüntettük azokat a régiókat, amelyekről tranziens expressziós kísérletekben kimutatták, hogy a transzkripció hatékonyságára pozitív vagy negatív hatással vannak [88, 89, 90, 137, 160].

Három fő régiót azonosítottak: egy távoli 5' régiót, amely négy szubdoménből áll (H_A, H_B, H_C, H_D). A középső a promotertől 5' irányban egy 1.2kb-os szakasz, amely szintén négy alapelemet tartalmaz, amelyek alternatívan pozitív illetve negatív hatásúak. A harmadik szabályozó régió az első intronban található, melynek a pontos térképezése folyamatban van.

Részletesen csak a középső, a promoterhez közeli 1.2kb-os fragmentummal foglalkozunk. A 9. ábrán a régió részletesebb térképe látható, amely a promotertől 5' irányban a -1137-es pozícióig terjed.



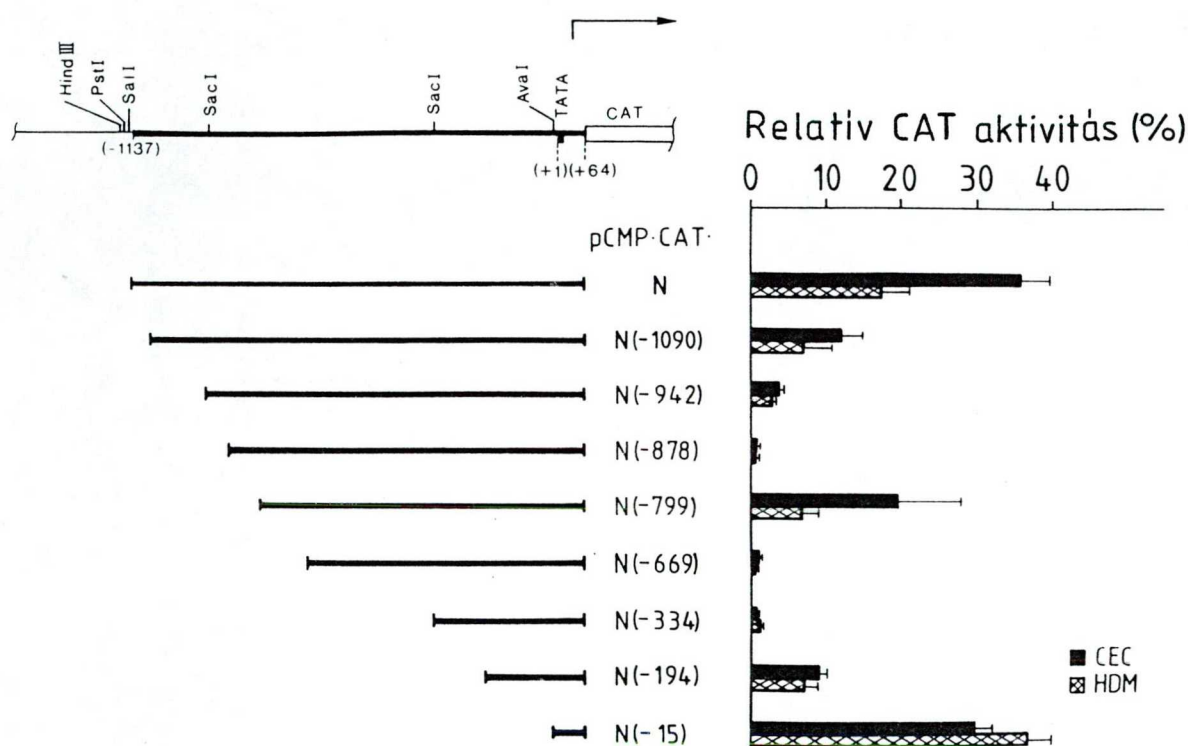
7. ábra. A CMP gén felépítése, kapcsolata a mRNS és a fehérje szerkezetével. SP: szignál peptid, REP1 és REP2 a két nagy, ismétlődő modul, EGF: az epidermális növekedési faktorról homológ domén. E1-8: a gén exonjai, méretük a mRNS felett látható bp-ban, üres téglalapok: nem transzlálódó régiók.



8. ábra A CMP gén reguláló régióinak elhelyezkedése.

1-8: a gén exonjai; a megfelelő betűk a különböző részekben található fragmentumokat jelölik. "+": enhancer, "-" silencer hatásra utal.

A számozás a TATA box első nukleotidjától indul. A szabályozó régiók felderítése úgy történt, hogy Bal31-es emésztéssel egy deléciós sorozatot hoztak létre, amelyet a CAT riporter gén elé klónozva különböző sejtekben (CEC, HDM, ld.10. ábra, s az ott található magyarázó szöveget) mérték a riporter gén aktivitását. Azt találták, hogy a (-15) pozícióig terjedő régió sejttypustól függetlenül képes a gén átíródását biztosítani, s ezt a régiót ezért minimál promoternek nevezték el. A továbbiakban pCMPN(-15) név alatt fogunk erre a konstrukcióra hivatkozni.



9. ábra A CMP promoter 5' végi régió deléciós sorozatának analízise tranziens expressziós kísérletekben. A baloldali rész a konstrukciókban szereplő fragmentumokat ábrázolja, feltüntetve az 5' végi pontok pozícióit a TATA box első T-jét tekintve 1-es sorszámmúnak. A jobboldali rész a CEC-ben illetve a HDM-ben mért CAT aktivitás adatokat mutatja (100%: a pSV2.CAT kontroll plazmid aktivitása) [137].

A 9. ábra negatív és pozitív régiók váltakozó előfordulását mutatja. A promotertől 5' irányban haladva egy erős negatív hatást észlelhetünk (NR1, (-334)-(-15) régió), amely mind a két sejttypusban egyaránt kifejeződik. Ezt követi egy pozitív hatású szakasz (PR1, (-799)-(-568)), amely lényegesen jobban működik CEC-ben,

mint HDM-ben. A (-878)-(-809) közötti tartomány (NR2) ismét lecsökkenti a gén aktivitását gyakorlatilag 0-ra, a fragment végén (PR2, (-1137)-(-944)) lévő elemek hatására a riporter gén aktivitása visszaáll az eredeti szintre a CEC esetén (egy kicsit meg is haladja), illetve kb. a felére HDM sejtekben. Ennek az 1.2 kb-os fragmentumnak a részletes analízisét is elkezdtek, és sikerült footprint analízis segítségével a promoterhez közeli régióban két védett szakaszt találni (SI, SII), amelyeknek a részletes jellemzését kívántuk mi elvégezni.

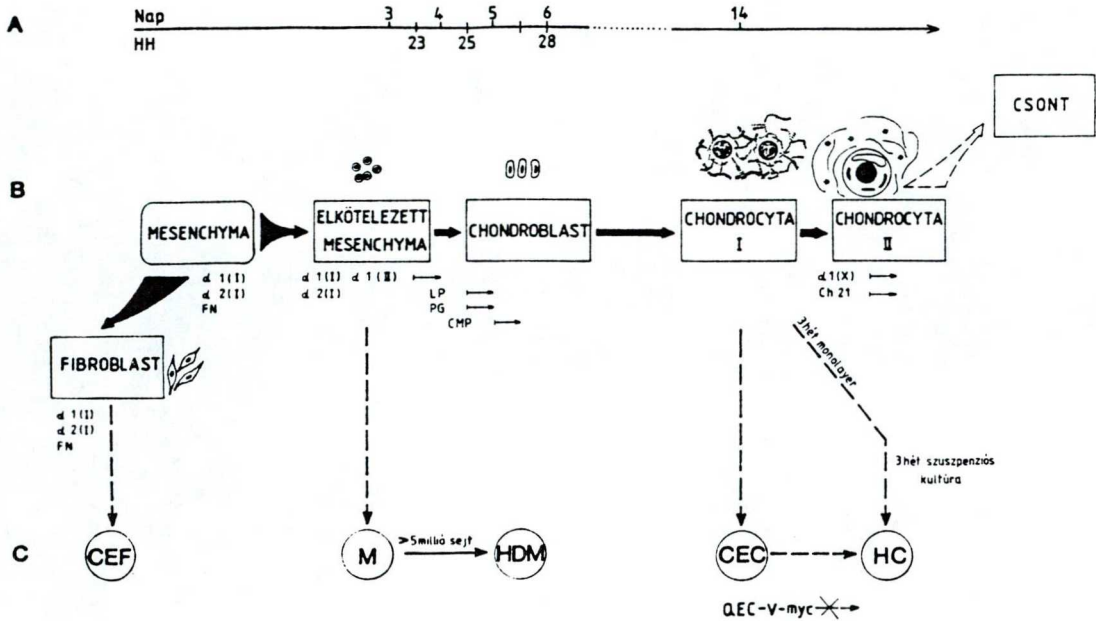
IV.3. Chondrogenesis

A porcszövet mesodermális eredetű, és kis számú mesenchymális sejtből alakul ki a differenciálódás során, és esetenként továbbalakul csontszövetté. A chondrogen differenciálódás legbehatóbban tanulmányozott modellje a végtagfejlődés tanulmányozása. A végtagkezdemények a mesoderma parietalis lemezéből alakulnak ki. Csirkében ez a 15. stádiumtól [68] indul, amely egy kb. 2.5 napos embrióknak felel meg (10. ábra). A végtagkezdeményeket ectodermális eredetű hám borítja. A chondrogen differenciálódás komplexitását növeli, hogy párhuzamosan zajlik a myogenesis és az idegek beépülése is [90]. A porcok általában a tér mindhárom irányában aszimmetrikus felépítésűek, ezért minden szöveten belül a különböző térbeli pozíciókban lévő sejteknek meghatározott program szerint kell működni.

A chondrogenesis szabályozására, térbeli aszimmetriájának magyarázatára számos lehetőséget tanulmányoztak [2, 13, 133, 173, 174]. Olyan anyagokat, faktorokat kerestek, amelyek *in vitro* képesek elősegíteni, vagy visszaszorítani a chondrogen differenciációt. Mivel a porcdifferenciálódás a mesenchyma sejtek kondenzációjával kezdődik, ezért pl. olyan anyagok, amelyek képesek elősegíteni a mesenchyma sejtek kondenzációját, chondrogen ágensként szerepelhetnek. Ilyen hatású pl. az activin, ami egy sok funkciós fehérje (porcszövetben is megtalálható), és képes előidézni a mesenchyma sejtek chondrogen kondenzálódását oly módon, hogy elősegíti bizonyos sejtadhéziós molekulák (fibronectin, NCAM stb.) expresszióját [173].

Végül, csak utalásképpen bemutatunk egy sematikus ábrát, amelyben összefoglalóan ábrázoljuk nagy lépésekben a chondrogen differenciálódás különböző stádiumait, valamint az *in vitro* vizsgálati rendszerekben használt szövettípusokat, sejtvonalatokat (10. ábra). Az ábra

szimbólumainak jelentését az ott szereplő szövegben ismertetjük. Részletesebb leírást pedig korábbi munkákban találhatunk [90, 137, 166].



10. ábra. A chondrogen differenciálódás folyamata és *in vitro* modellje. **A:** A csirke embrió porcok differenciálódásának időskálája napokban, és a Hamburger-Hamilton (HH) stádiumokban. **B:** A porc-differenciálódás főbb szakaszainak sémája a fenotípus alapján, a különböző gének aktiválódási pontjainak feltüntetésével. α1(I), α2(I), α1(II), α1(X) a különböző kollagén-láncokat jelöli. FN: fibronectin, CMP: porc mátrix fehérje, LP: kapcsoló fehérje, PG: aggrecan. **C:** *in vitro* modellrendszerek. CEF: csirke embrionális fibroblaszt kultúra, M: mesenchyma kultúra, HDM: nagy sejtsűrűségű porccá differenciálódó mesenchyma sejtvonal, CEC: csirke embrió chondrocyta kultúra, HC: hipertróf chondrocyta kultúra, QEC: transzformációval stabilizált chondrocyta sejtvonal.

V. CÉLKITŰZÉS

Az előzőekben ismertetett irodalmi bevezető a molekuláris biológiának számos területét öleli fel. Ha meggondoljuk, hogy a bemutatott eredményekhez nagy mértékben járult hozzá a szintetikus DNS kémia, akkor talán nem tűnik annyira szerteágazónak a bevezetés.

A szintetikus oligonukleotidokkal kapcsolatos munkánk során számos olyan probléma merült fel, amelyeknek vagy speciális alkalmazás-technikai vonatkozása van, vagy pedig az alap kutatásban került a felszínre. Ezekre keresve a megoldást a célkitűzéseinket három fő téma köré csoportosítjuk, amelyek közül az első kettő a 80-as évek végén jelentkező problémákra keresi a választ, és jelentőségük elsősorban az alkalmazott kutatásban jelentkezik. A harmadik, a csirke CMP gén szabályozásának kutatása pedig napjaink kérdése, és alapvetően tudományos alapkérdések tisztázására irányul.

A., Torma peroxidázzal, és alkalikus foszfatázzal jelölt oligonukleotidok szintézise HIV-1 kimutatására

A nemradioaktív DNS próbák előállítására vonatkozó irodalmi ismertetőből kiderült, hogy a nem-radioaktív DNS diagnosztika kifejlesztése szerte a világon az érdeklődés középpontjában volt. Az AIDS elterjedése világszerte szükségessé tette olyan próbák tervezését, amelyekkel a fertőzés korai stádiumban kimutatható. Egyesítve a két törekvést, olyan nemradioaktívan jelölt oligonukleotidok előállítását terveztük, amelyek nagy érzékenységgel és biztonsággal teszik lehetővé az AIDS diagnosztizálását a fertőzés korai szakaszában. A terv megvalósítása érdekében célul tűztük ki:

- olyan módosított oligonukleotidok szintézisét, amelyek szekvencia specifikusan a HIV-1 vírus nukleinsavához hibridizálnak,
- torma peroxidáz, illetve alkalikus foszfatáz hozzákapcsolását a módosított oligonukleotidok végeihez oly módon, hogy a hibridizációs tulajdonságok ne romoljanak,
- a szintézis határfokának, illetve a kapott komplexeknek a jellemzését,
- a próbák tesztelését hibridizációs kísérletekben.

*B., Egylépéses DNS-szekvencia meghatározási módszer
kifejlesztése termotabil polimeráz használatával*

Egy szintetikus gén előállításánál során került felszínre egy olyan probléma, ami nagyon sokszor jelentkezik klónozás során. A génnek voltak olyan régiói, amelyeknek a szekvenciája nagyon nehezen volt meghatározható. A termotabil enzimek elterjedésével merült fel a gondolat, hogy hőstabil DNS-polimerázok segítségével a probléma áthidalható. Ezért feladatunknak tekintettük:

- egy olyan egyszerű, egylépéses DNS-szekvencia meghatározási eljárás kifejlesztését, amely termotabil polimeráz felhasználásán alapul.

*C., A csirke CMP gén egy negatív szabályozó elemének
jellemzése szintetikus oligonukleotidok
felhasználásával*

Az értekezés harmadik célkitűzése a csirke porc mátrix fehérje transzkripcionális szabályozásához kapcsolódik. Az irodalmi bevezetőből kiderül, hogy az egyedfejlődés térben és időben mennyire bonyolult folyamat. Láthattuk azt is, hogy a gének szövet- és fejlődési állapot-specifikus működése már transzkripcionális szinten is milyen komplex szabályozást igényel. A porc mátrixát alkotó komponensek is differenciáltan jelennek meg az egyedfejlődés során, s az ezt szabályozó mechanizmus megismerése fontos lehet egyrészt a porcbetegségeket okozó jelenségek felderítésében, másrészt az eukarióta génszabályozás általános törvényszerűségeinek megállapításában.

A csirke porc mátrix fehérje gén térben és időben szabályozottan fejeződik ki, s a reguláció alapvetően transzkripcionális eredetű. A csoport korábbi munkája során azonosította a gént, jellemezte a CMP fehérje moduláris felépítését, illetve a gén 5' végi és intronális régióiban transzfekciós kísérletek segítségével azonosított néhány szabályozó elemet. A promoterhez közeli régióban (NR1) sikerült azonosítani két olyan szekvencia szakaszt, amely feltehetőleg felelős a gén inaktiválódásáért (SI, SII).

Célunknak tekintettük ezeknek az elemeknek a további vizsgálatát, valamint azt, hogy meghatározzuk az(oka)t a faktor(oka)t, amely(ek) az SI elemhez kötődnek olyan módszerek alkalmazásával, amelyek főként oligonukleotidok használatán alapulnak.

Ehhez a következő kísérleteket kívántuk elvégezni:

- 1., DNS-fehérje gélelektroforézis (EMSA) segítségével vizsgálni az SI elem szövetspecifitását.
 - 2., Az SI-hez és SII-höz kapcsolódó fehérjék összehasonlítását DNS-fehérje gélelektroforézis segítségével.
 - 3., Transzkripciós faktor adatbankból kiválogatni azokat a lehetséges fehérjéket, amelyek a szekvencia alapján számításba jöhetnek. Kompetíciós DNS-fehérje gélelektroforézis segítségével eldönteni, hogy a kutatott protein egy ilyen ismert faktor-e.
 - 4., Metilációs interferencia segítségével térképezni azokat a pontokat, amelyek a DNS-fehérje kölcsönhatásban nélkülözhetetlenek.
 - 5., UV kereszt kötési kísérletekben becslést tenni a kötődő fehérje molekulatömegére.
- Ettől a ponttól az eredményektől függően terveztük a további kutatást. Ha nem találunk ismert faktort, akkor a fehérje további jellemzése lenne a cél. Ha az eddigi ismeretanyag alapján azonosítható a fehérje, akkor:
- 6., Specifikus ellenanyag segítségével "supershift" kísérletekben igazolni, hogy valóban arról a fehérjéről (fehérjecsaládról) van szó.
 - 7., Mutációkat hordozó oligonukleotidokkal *in vitro* kísérletekben bizonyítani EMSA segítségével a kapott eredmények megalapozottságát.

VI. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

VI.1. ANYAGOK

A munkánk során felhasznált vegyszereket a legnagyobb gyakorisággal a következő cégektől szereztük be: SIGMA, MERCK, SERVA, FLUKA, MILLIPORE, és REANAL.

A restrikciós enzimek vagy házi készítésűek voltak (SzbK gyártmány), vagy a New England Biolabs, illetve a Fermentas volt a szállító. A T7 DNS polimerázt a USB, a Fermentas és a Pharmacia vállalatoktól, a polimeráz lánc reakcióhoz a Taq polimerázt a Perkin Elmer Cetustól szereztük be.

A radioaktív anyagokat az Amersham-tól valamint a Magyar Izotóp Intézettől vásároltuk. A footprinthez használt DNase-I a SIGMA D4263 katalógusszámú terméke, a tripszin forgalmazója a DIFCO volt.

Csirkevonalak

Rhode Island White, Bábolnai MgK.

Baktériumtörzsek

A leggyakrabban használt sejtvonalak, és genotípusuk a következők voltak:

JM101	(lac-proAB), thi ⁻ , strA, endA, hsd R, sbcB15, supE, [F', traD36, proAB ⁺ , lacI ^q Z M15].
JM109	recA1, endA1, gyrA96, thi ⁻ , hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺), supE44, relA1, lambda ⁻ , (lac-proAB), [F', traD36, proAB ⁺ , lacI ^q Z M15].
DH5α	F ⁻ ,, φ80dlacZ M15, (lacZYA-argF)U169, endA1, recA1, hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺), deoR, supE44, thi-1, lambda ⁻ , gyrA96, relA1
XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F ⁻ proAB, lacI ^q Z M15, Tn10(tet ^r)].
Sure TM	e14 ⁻ (mcrA), (mcrCB-hadSMR-mrr)171, endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, recB, recJ, sbcC, umuC:Tn5(kan ^r), uvrC, [F' proAB, lacI ^q ZM15, Tn10, (tet ^r)].

Plazmid- és fágvektorok, kész konstrukciók

M13mp18, mp19 (NEB).

pUC19 (NEB)

pBluescript (Stratagene)

pBluscribel9+ (Stratagene)

pCMP.CAT [90, 137, 166]

pTK.CAT [90, 137, 166].

T54/11 a ((-220)-(+127)) pozíciókkal határolt HinfI fragmentum Bluescribel9+ vektor HincII helyén.
A T54/11 klónban a régió 3' vége van a polilinker EcoRI helye felől [166].

Táptalajok bakteriális sejtekhez

A használt táptalajok, lemezek a Maniatis-féle kézikönyv alapján készültek (LB, 2YT, SOB, SOC + agar lemezeik). Az antibiotikumok (ampicillin, tetraciklin) alkalmazása is e szerint a mű szerint történt [147].

Oldatok, pufferek

PBS: 8g NaCl, 0.2g KCl, 1.81g Na₂HPO₄×2H₂O, 0.24g NaH₂PO₄×H₂O, 1l vízben oldva.

CMF-PBS 8g NaCl, 0.3g KCl, 0.178g Na₂HPO₄×7H₂O, 0.02g KH₂PO₄, 2g glükóz/1l víz, sterilre kell szűrni. (Ca²⁺-Mg²⁺ mentes)

Tripszin CMF-PBS 0.25% tripszin CMF-PBS-ben.

Glicerín CMF-PBS 60% glicerín CMF-PBS-ben.

Sejt lízisz puffer (Schibler) (SCLB) 10mM HEPES/KOH (pH=7.9), 1mM MgCl₂, 1mM MgCl₂, 0.5mM DTT, Gordox: 50 KallikreinU/ml (0.5mM aprotinin vizes oldata), 0.5mM PMSF, 0.1mM Benzamidin, 5-5µg/ml Leupeptin és Pepsztatin.

Sucrose grádiens oldatok (Schibler) 10mM HEPES/KOH (pH=7.9), 15mM KCl, 0.15mM Spermine, 0.5mM Spermidine, 0.5mM K₂H₂EDTA, 10% glicerín, 1.2M/1.4M sucrose, 0.5mM DTT, és ugyanazok a proteáz inhibitorok, mint az SCLB-ben.

Sejtmag tároló puffer (STP) 25mM HEPES/KOH (pH=7.9), 1mM MgCl₂, 25% glicerín, 0.1mM K₂H₂EDTA, 1mM EGTA, 5mM DTT.

Sejtmag dializáló puffer (SNDB) (Schibler) 10mM HEPES/KOH (pH=7.9), 50mM KCl, 0.1mM K₂H₂EDTA, 20% glicerín, 3.5mM DTT, 1mM PMSF.

2xSCEB	25% glicerin, 0.1mM K_2H_2EDTA , 1mM EGTA, 1060mM NaCl, 0.3mM spermine, 1mM spermidine, 2mM PMSF, 20mM Benzamidine, 100KIU/ml Gordox, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml pepsztatin.
SCDB	10mM HEPES/KOH (pH=7.5), 50mM NaCl, 1mM DTT.
CEB	25mM HEPES/KOH (pH=7.5), 10% glicerin, 100mM KCl, 0.1mM EDTA (pH=8.0), 0.1% Triton X-100, 1mM DTT, 50KIU/ml Gordox, 0.1mM PMSF, 0.1mM Benzamidine, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepsztatin.
4xRB	10mM HEPES/KOH (pH=7.5), 20mM Tris/HCl (pH=8.0), 20% glicerin, 200mM KCl, 0.5mM DTT.
5xOTF	100mM Tris/HCl (pH=8.0), 100mM KCl, 15.75mM DTT, 1mM EDTA, 20mM $MgCl_2$.
20xCa-Mg	160mM $MgCl_2$, 80mM $CaCl_2$.
DNáz STOP	0.1M NaCl, 50 μ g/ml tRNS, 50mM Tris/HCl (pH=7.9), 0.5% SDS.
TE	10mM Tris/HCl (pH=7.5), 1mM EDTA (pH=8.0).
APEP	0.1M Tris/HCl (pH=7.5), 0.1M NaCl, 0.01M $MgCl_2$, 0.1mM $ZnCl_2$.
10xUB	1M KOAc, 250mM Tris/HOAc (pH=7.6), 100mM $Mg(OAc)_2$, 5mM β -merkaptoetanol, 100 μ g/ml BSA
NET	0.15mM NaCl, 20mM Tris/HCl (pH=8.0), 0.1mM EDTA.
DMS RB	50mM nátrium-kakodilát (pH=8.0), 1mM EDTA.
DMS STOP	1.5M NaOAc (pH=7.0), 1M β -merkaptoetanol
HZ STOP	0.3M NaOAc (pH=7.0), 0.1mM EDTA, 25 μ g/ml tRNS.
10xNT	0.5M Tris/HCL (pH=7.5), 0.1M $MgSO_4$, 1mM DTT.
10xPNK	0.5M Tris/HCl (pH=7.6), 0.1M $MgCl_2$, 1mM spermidine, 1mM EDTA (pH=8.0)
PREHIB	5xDenhardt oldat [147], 0.5% SDS.
6xSET	0.9M NaCl, 0.18M Tris/HCl (pH=7.5), 6mM EDTA.
HIB	1xDenhardt oldat, 6xSET, 0.1% SDS.
10xPE	100mM Tris/HCl (pH=8.3), 500mM KCl, 15mM $MgCl_2$.
BrdU/dNTP	2mM dGTP, és BrdU, 0.5mM dATP és dCTP
5xSDS LB	250mM Tris/HCl (pH=6.8), 500mM DTT, 10% SDS, 10% glicerin, 0.005% brómfenolkék.

VI.2. MÓDSZEREK

VI.2.1. Oligonukleotidok szintézise automata DNS szintetizátoron

Az amidit kémián alapuló szintézis ciklikus menete a következő (ld. 4. ábrát is):

1. A hordozóhoz 3' végén kötött n. nukleotid 5' végéről 2% diklórecetsav/diklórmétán oldattal lehasítjuk a dimetoxitritil csoportot, ezáltal szabad, reaktív 5'-OH csoportot kapunk.

2. Az oszlop mosása után a kapcsolandó nukleotid 5' dimetoxitritilezett (a bázison is megfelelően védett) formáját az aktivátorral (tetrazol) kevert formájában reagáltatjuk el a hordozón levő, n hosszúságú oligonukleotiddal (n+1).

3. A hármas vegyértékű foszfor oxidálása jódos (víz:tetrahidrofurán:2,6-lutidin) oldattal.

4. Az el nem reagált OH csoportok acilezése ecetsavanhidriddel N-metilimidazol katalízise mellett, 2,6-lutidin, tetrahidrofurán oldatában.

Majd következik az első lépés, ahol az n. és az (n+1). dimetoxitritil színintenzitásokból (vagy spektrofotométerrel meghatározva) a kapcsolat hatékonysága megállapítható.

Egy ilyen ciklus a mai gépeken 4-8 percet vesz igénybe. A reakció oldószere acetonitril, s a hozzávetőlegesen 25mg/ml-es amidit oldatból egy kapcsoláshoz 5-10mg anyag szükséges. Meg kell jegyezni, hogy a szintézis extrém vízmentes acetonitrilt igényel (<5ppm), mert a legkisebb víztartalomtól is nagymértékben csökken a kapcsolat hatásfoka.

Általában három különböző mennyiségi skálára tervezik a szintetizátorokat: 0.2, 1.0, 15 μmol , ami a betöltött hordozón levő első nukleozid mennyiségét jelöli, s így 1-500 nmol oligonukleotid szintetizálható. Mi többnyire az 1 μmol os skálát használtuk.

VI.2.2. Az oligonukleotidok utókezelése és tisztítása

A szintézis befejeztével még olyan oligonukleotidunk van, amely a., a szilárd hordozóhoz van kötve

b., a foszfátcsoportokon (amidit kémia) és a bázisokon védőcsoportokat hordoz.

Mind a három kötéstípus lúgos kezelésre érzékeny, azaz alkalikusan egy lépésben elhasítható.

A legáltalánosabban használt módszer szerint koncentrált ammóniával kezeljük a hordozón levő anyagot szobahőmérsékleten 1 órát, hogy leszedjük az oligomert a hordozóról (mely során a foszfátcsoporton levő β -cianoetil csoport is lehasad), majd 55°C-ra tesszük 12-16 órára, hogy a bázisokon lévő védőcsoportokat is eltávolítsuk [20, 21]. Ily módon a kívánt oligonukleotid egy olyan alkalikus oldatban van, amely mindenféle szennyező anyag mellett az oligomer rövidebb változatait is tartalmazza, amelyekből sok esetben célszerű elválasztani. Nagyon sok olyan felhasználási mód van, amelynél - ha megfelelően nagy hatásfokkal működik a szintetizátor - akkor a rövidebb oligomerek kis mennyisége nem zavaró, s csak a szerves szennyezésektől és az ammóniától kell megtisztítani az oligonukleotidot.

Az ammónia eltávolítására két fajta módszert használtunk.

a., Az tiszta oldatot folyékony nitrogénben történt lefagyasztás után bepároljuk (liofilezés), majd alkalmasan választott térfogatú TE oldatban feloldjuk.

b., Az ammóniás oldatot Sephadex G-25 gélszűrő oszlopon (előzetesen TE oldattal egyensúlyba hozva) megsűrjük. Ennek előnye az, hogy a kis szerves szennyeződések is eltávolítja, hátránya viszont az, hogy viszonylag nagy térfogatban kapjuk vissza az anyagot.

A termék további tisztítására többfajta módszert lehet alkalmazni:

A., *Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)*

Denaturáló körülmények között (7M urea jelenlétében) az oligonukleotidok méret szerint jól elválaszthatóak [20, 74]. A különböző hosszúságú oligomerekre tartományonként különböző koncentrációjú akrilamid gélét szokás használni.

Hossz (bázis)	akrilamidkoncentráció (%)
6 - 20	18 - 20
20 - 40	10 - 12
>40	4 - 8

Mivel az oligonukleotidok 260nm-en elnyelik a fényt, a gélen az UV árnyékolási kép alapján azonosíthatók, onnan kivághatók, és eluálhatók (éjszaka 5 - 10 gélterefogat TE pufferben). Az így kapott oldat még nem tiszta, de anioncserés kromatográfiával (pl. DE52 oszlopon) könnyen megtisztítható, etanolos kicsapás, és vizes-alkoholos mosás után az oligonukleotid bármilyen molekuláris biológiai célra felhasználható.

B., HPLC

A nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC) megjelenésével kifejlesztettek olyan módszereket, HPLC oszlopokat, amelyek oligonukleotidok elválasztására alkalmasak [20, 74]. Anioncserés oszlopokkal olyan oligomerek választhatók el, amelyekről a legutolsó dimetoxitritil (DMTr) csoportot eltávolítottuk. Ha ezt rajta hagyjuk az oligonukleotidon akkor ún. reverz fázisú oszlopot kell használni (ez egy általában 18 szénatomszámú szénhidrogént hordozó oszlop), amely a DMTr csoport hidrofób tulajdonsága alapján teszi lehetővé az elválasztást. A tisztítást követően az utolsó DMTr csoport 80%-os ecetsavval eltávolítható [20].

A reverz fázisú oszlop, ha csak részlegesen van a hordozó felszíne lefedve a C_{18} láncsal, a DMTr eltávolítása után is használható a különböző hosszúságú oligomerek szétválasztására. Általában felvivő pufferként 0.1 M trietilammóniumacetátot (TEA) (pH=7.0), eluensként 0 - 50% acetonitril/0.1 M TEA (pH=7.0) használunk. Az összegyűjtött eluátumot alkohollal kicsapjuk, mossuk, és az így kapott anyag a legtöbb molekuláris biológiai célra közvetlenül felhasználható.

Az oligonukleotidok koncentrációjának meghatározása

A nukleozid bázisok 260nm környékén erőteljesen, de bázisonként különböző mértékben abszorbeálják a fényt. Ha eltekintünk a komponensek közötti kölcsönhatások okozta effektusoktól, akkor egy oligonukleotid eredő moláris dekadikus extinkciós koefficiensét (ϵ_{er}) a következő kifejezéssel kaphatjuk meg:

$$\epsilon_{er} = \sum n_i \cdot \epsilon_i \quad (i = A, C, G, T)$$

n_i az oligonukleotidban található megfelelő bázis száma, ϵ_i pedig a következő a különböző bázisokra:

bázis	ϵ_i ($\mu\text{mol}/(\text{cm}^2)$)
dA	15.4
dG	11.7
dC	7.5
dT	8.8

[20]. Az eredő koefficiens segítségével a Lambert-Beer törvény alkalmazásával a küvettában az oligonukleotid koncentrációja a következő:

$$c = A/\epsilon_{er} \quad (\mu\text{mol}/\text{cm}^3)$$

ahol A a 260nm hullámhosszon mért abszorbanca 1 cm-es fényút esetén. A kuvetta térfogatának és a hígítások ismeretében az eredeti koncentráció, illetve a teljes anyagmennyiség meghatározható.

Általában mi a tisztítási módszerek közül a PAGE-t alkalmaztuk, újabban a reverz fázisú HPLC-s technikát attól függően, hogy milyen célra kívántuk az anyagot felhasználni.

VI.2.3. Enzim-oligonukleotid konjugátumok szintézise

3' végen aminált oligonukleotidok előállítása

A szintetikus oligonukleotidokat a már korábban ismertetett foszforamidit kémia alapján szintetizáltuk azzal a különbséggel, hogy a hordozóra a 11. ábrán mutatott nem nukleozid típusú funkciós csoport volt felkötve. A szintézis befejezését követően a szokásos módon cc. NH_4OH -val eltávolítottuk a fentmaradt védőcsoportokat (55°C , egész éjszaka), valamint lehasítottuk az oligomert a hordozóról. Itt érdemes megjegyezni, hogy a szintézis alatt a hordozón lévő aminocsoportot védő Fmoc csoport lúgosan szintén hasítható, savas körülmények között stabil. Az ammóniát folyékony nitrogénes fagyasztás után vákuumban szobahőn lepároltuk 3-4 óra alatt (liofilezés).

A liofilezett anyagokat $200\mu\text{l}$ 0.3M NaOAc/HOAc ($\text{pH}=5.2$) oldatban feloldottuk, majd $750\mu\text{l}$ EtOH -val kicsaptuk. 70%-os alkohollal mostuk, majd vákuumban szárítottuk, és $150\text{--}150\mu\text{l}$ steril vízben oldottuk.

$50\text{--}50\mu\text{l}$ nyers oligomer elegyet tisztítottunk 10%-os denaturáló poliakrilamid gélen ($30\times 40\times 0.4\text{cm}$), 40W futtató teljesítmény mellett. A megfelelő sávokat 254nm-es UV árnyékolás alapján azonosítottuk, steril pengével kivágtuk, majd egész éjszaka 37°C -on eluáltuk 4 ml steril vízben.

Az eluátumot DE-52 oszlopon tisztítottuk úgy, hogy megfelelően előkezelt oszlopból 1ml-es töltetet készítettünk, mostuk steril vízzel, majd felvittük az eluátumokat. Mostuk $3\times 3\text{ml}$ vízzel, majd $4\times 1\text{ml}$ 1M NaCl oldattal eluáltuk. Az első 2ml frakcióhoz 1/10 térfogat 3M NaOAc/HOAc ($\text{pH}=5.2$) puffert adtunk, majd háromszoros térfogatú alkohollal kicsaptuk. A csapadékokat 70%-os alkohollal mostuk, majd szárítottuk, $110\mu\text{l}$ vízben

oldottuk, és 260nm-en mértük. Az anyagmennyiségeket az előző fejezetben leírtak alapján számoltuk.

Az aminált oligomer reagáltatása DITC-vel

A továbbiakban az oligonukleotidokról csak egyes számban beszélünk, mert mindegyikkel ezen a végső, kialakult módon jártunk el.

4.5-5.0 nmol aminált oligonukleotidot liofileztünk, majd 3.75 μ l 0.1M borát pufferben feloldottunk (pH=9.3). Ehhez hozzáadtunk 3mg DITC-t 75 μ l frissen desztillált dimetilformamidban oldva. (Ez kb. 3000-szeres felesleg a keresztkötések megakadályozására). Ezt az elegyet 2 órán keresztül inkubáltuk sötétben szobahőn, majd 0.45ml n-butanol és 0.45ml víz hozzáadása után extraháltuk az oldatot. A vizes fázissal dolgoztunk tovább és addig extraháltuk egyenlő térfogatú n-butanollal, amíg kb. 20 μ l nem lett a vizes fázis végtérfogata (8-10 lépés). Ebben a lépésben az aromás, el nem reagált DITC-t távolítottuk el, illetve koncentráltuk az oldatot. A maradék 20 μ l-t vákuumban bepároltuk.

A komplex fényérzékeny, s ezért lehetőség szerint sötétben kell tartani.

Torma peroxidáz kapcsolása az aktivált oligonukleotidhoz

1.5mg HRP-t feloldottunk 30 μ l 0.1M borát pufferben (pH=9.3), s ebben az oldatban feloldottuk az eppendorf csőben beszárított DITC-t hordozó oligonukleotidot, majd sötétben 25°C-on inkubáltuk egész éjszaka.

A komplexet 7%-os natív, azaz nemdenaturáló poliakrilamid gélen választottuk el (30x40x0.25cm gélen, P=18W, 2 óra). A gél nem tartalmazott az ureán kívül EDTA-t sem, s a futtatás sötétben történt. Ezen a módon jól elválasztható a komplex a szabad oligomertől és a kapcsolatlan enzimtől. A megfelelő sávot kivágtuk, s egy éjszaka eluáltuk 2ml 0.1M foszfát pufferben (pH=7.5), majd az eluátumot ugyanezzel a pufferrel szemben dializáltuk. A kapott oldatot vákuumban bepároltuk, s szilárd formában tároltuk -20°C-on.

A torma peroxidáz aktivitás tesztje

A HRP aktivitás tesztjét a szállító Boehringer Mannheim útmutatásai alapján végeztük, ami a

gvajakol/hidrogénperoxid rendszeren alapul. 3ml-es küvetába (1cm fényúthossz) mérjük be

- 3ml 0.1M káliumfoszfát oldatot (pH=7.0)
- 50 μ l 18mM gvajakolt (a fenti pufferben)
- 20 μ l alkalmasan hígított enzimoldatot

A reakciót 40 μ l 8mM H₂O₂ (A_{240nm}≈0.4) oldat hozzáadásával indítottuk, és percenként mértük az abszorbanciát 436nm-en. A térfogatosságot (TA), és a specifikus aktivitást (SA) a következő kifejezések alapján számoltuk:

$$\begin{aligned} TA &= (3.11 \cdot 4) \cdot (25.5 \cdot 1 \cdot 0.02)^{-1} \cdot (A_{t+1} - A_t) \\ &= 24.392 \cdot (A_{t+1} - A_t) \quad [U/ml] \end{aligned}$$

$$SA = TA \cdot \{\text{enzimkoncentráció (mg/ml)}\}^{-1} \quad [U/mg \text{ prot}]$$

A szorzatban szereplő számok a kísérleti rendszerhez tartozó paraméterek.

VI.2.4. DNS-klónozással kapcsolatos módszerek

DNS izolálás

(plazmidok, fágok kis mennyiségben)

A plazmidokat is és a fágokat is kis mennyiségben a Maniatis útmutatásai alapján tisztítottuk [147]. Plazmidok esetén mind az alkalikus-SDS-es feltáráson alapuló módszert, mind a sokkal gyorsabb STET pufferben oldott lizozimos eljárást egyaránt használtuk. Bármelyiket is alkalmaztuk, szekvencia analízisre alkalmas minőségű terméket kaptunk.

A fágok tisztítása a szokásos PEG-es kicsapáson és az ezt követő fenolos fehérje extrakción alapult. A kitermelést, valamint plazmidok esetén az RNS-mentességet agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

DNS (plazmid) tisztítása nagy méretben

Nagy mennyiségű plazmidot általában 11-es sejtkultúrából nyertünk klóramfenikolos amplifikáció után. A lefugált sejteket feltárást után extraháltuk fenol-kloroform (1:1) elegyével, RNáz kezeltük, majd CsCl gradiens ultracentrifugálással tisztítottuk tovább. A DNS koncentrációját 260nm-en való spektrofotometriás mérés után határoztuk meg (1OD megfelel ezen a hullámhosszon 50 μ g/ml plazmidnak).

Emésztés restriktációs endonukleázokkal

A DNS-t általában az enzimet gyártó cégek útmutatásai alapján, az általuk szállított pufferekben emésztettük 3-16 órát (függően attól, hogy milyen célra kívántuk tovább használni). Sokszor előfordult, hogy a Stratagene univerzális pufferében (10xUB, végeztük a reakciót. Minden esetben 100 μ g/ml BSA (vagy Ac-BSA) jelenlétében dolgoztunk.

DNS fragmentumok izolálása

Nagyobb, mint 200 bp-os fragmentumokat agaróz gélen való futtatás után DEAE NA-45 (Schleier&Schuell) membránba futtattuk be a kívánt DNS-t, ahonnan - egy rövid NET pufferes mosás után - 1.5M NaCl-ot tartalmazó NET pufferrel eluáltuk 65°C-on 45 percen keresztül. Az eluátumot alkoholos kicsapás után egyéb tisztítási lépések nélkül felhasználtuk.

A kisebb fragmentumokat nemdenaturáló poliakrilamid gélen futtatuk meg, majd az izolálandó sávot pengével kivágtuk, s 3-5ml TE-ben egész éjszaka enyhe rázatás közben inkubáltuk 37°C-on (passzív diffúzió). Az eluátumot aztán vagy csak egyszerűen kicsaptuk, vagy DE-52 oszlopon tisztítottuk.

A DNS fragment ragadós végeinek tompa véggé alakítása

Amennyiben 3' túlnyúló véget kaptunk a hasítás után, T4 DNS polimerázzal távolítottuk el az egyszálú részt 2mM dNTP jelenlétében (14°C-on 30 perc).

Az 5' túlnyúló szakaszt pedig Klenow polimerázzal töltöttük fel szintén dNTP jelenlétében, az elegyet 37°C-on 1 órán át inkubáltuk. Mindkét esetben a reakciót fenolozással állítottuk le, illetve így tisztítottuk a DNS-t [147].

5' vég foszforilezése illetve defoszforilezése

Ha a klónozási stratégia úgy kívánta, akkor a vektor 5' végein lévő foszfátcsoportot CIAP ("calf intestine alkaline phosphatase") kezeléssel távolítottuk el. Tompa végű DNS-ek esetén (1 μ g-ra számolva) 1U enzim hozzáadás után 15 percig inkubáltuk a keveréket 37°C-on, majd még 1U-ot adagoltunk, s ezután a reakciót 45 percig 55°C-on

tartottuk. Ezt követően fenoloztuk, s a szokásos módon kezeltük tovább [147].

Ha a klónozendő fragment nem tartalmazott a végein foszfátcsoportot, akkor T4 polinukleotid kináz enzimmel előzetesen foszforileztük 2mM ATP jelenlétében (ld 5' végjelölést is).

Ligálás

A klónozás során a vektor és az inszert mennyiségét általában mértük, ha ez nem volt lehetséges, akkor az agaróz gélen való képük alapján becsültük meg a mennyiségüket. A ligálást általában egész éjszaka végeztük 14°C-on 20µl végtérfogatban, s az inszert:vektor arány 3-50 között mozgott szándékunktól függően. A vektor mennyiségét 50ng körüli értékre választottuk.

Tompa végek ligálásánál figyelembe vettük Maniatis ajánlásait, és spermine-mentes pufferben, 0.5mM ATP jelenlétében végeztük a ligálást [147].

Transzformálás

Az E.coli sejtekbe a DNS-t a [193] transzformációs módszere alapján végeztük, amely a Hanahan féle eljárásnak egy optimalizált, s egyszerűsített változata.

Szükség, és lehetőség esetén IPTG, X-gal-os indukciót használtunk (a táplemezben ezek végkoncentrációjának 25µg/ml-nak kell lenni). A transzformáció kontrolljaként ismert koncentrációjú pBR322-t is transzformáltunk a transzformáció hatékonyságának megállapítására, s ez általában jobb volt, mint 10^7 transzformáns/(µg DNS). Ha foszforilált inszertet ligáltunk defoszforilált vektorba, akkor a vektort megpróbáltuk önmagához visszaligálni, s transzformálni. Ez volt a klónozás menetének negatív kontrollja.

Ha nem lehetett színszelekciót alkalmazni, és a defoszforilációs-foszforilációs trükköt kellett alkalmazni, akkor a pozitív klónokat hibridizáció alapján választottuk ki.

Kolóniahibridizáció

A transzformálás után a kapott pozitív klónokat néhány lemezre átszurkálva összegyűjtöttük, majd nitrocellulóz filterre blottoltuk (általában Millipore kat.szám.:HATF 082 25, illetve Amersham HybondC

membránokat használtunk). A filtereket a szokásos módon lúgosan kezeltük, semlegesítettük, szárítottuk és 80°C-on vákuumban sütöttük. Az előhibridizációt PREHIB pufferben végeztük a hibridizáció hőmérsékletén (általában 65°C-on) 1-2 óra hosszat, majd HIB pufferben hibridizáltunk 1-3*10⁶cpm DNS próba (jelölést ld. később) felhasználásával. A filtereket 2xSSC-0.5xSSC, 0.1%SDS oldatokkal mostuk először szobahőmérsékleten, majd a hibridizáció hőmérsékletén. A membránokat szárítás után exponáltuk.

Szekvencia analízis a dideoxi módszerrel

A klónozások eredményeképpen kapott plazmidok szekvencia analízisét többnyire a USB Corp. Sequenase Version 2.0 protokoll alapján végeztük T7 DNS polimeráz segítségével. A plazmidokat a fent említett módszerek bármelyikével tisztíthattuk, ha a denaturációt 0.4M NaOH-ban 65°C-on 30 perces inkubálással végeztük el. Talán ez az egyetlen említésre érdemes változtatás.

VI.2.5. Tranziens expressziós kísérletek

A transzfekciós kísérleteket Rencendorj Altancsimeg végezte, ezért ezzel a technikával kapcsolatban elsősorban az ő - közelmúltban benyújtott - kandidátusi dolgozatára hivatkozom [137]. Miután a megfelelő szabályozó elemet alkalmas expressziós vektorba klónoztuk, a plazmidot Ca-foszfátos módszerrel juttattuk CEC, CEF, HDM sejtvonalakba. A sejttenyésztés körülményeit szintén ld. [137].

VI.2.6. CEF sejtmagi kivonat készítése, a fehérjék részleges tisztítása

Csirke embrionális fibroblaszt (CEF) sejtmagi extraktum készítése

Az extraktokat többnyire J.Moitra kollégám készítette, s itt a protokoll hossza miatt csak a fő lépéseket fogjuk ismertetni.

Sejtmag preparátum készítése

10.5 napos csirke embriókat (100db) a fej, végtagok, nyak és zsigerek eltávolítása után CMF-PBS puffer alatt kis darabokra vágunk, majd tripszines kezelésnek vetjük alá (tripszin CMF-PBS). A felszabadított sejteket (a

nagyobb részek kiülepítése után centrifugáljuk (310rpm), majd DMEM-10%FCS-ben szuszpendáljuk, centrifugáljuk (310rpm), s mossuk kétszer CMF-PBS-sel. A sejteket 1.5ml CMF-PBS-ben szuszpendáljuk, majd 2x 0.5ml 60% glicerint tartalmazó CMF-PBS-t adunk hozzá, centrifugáljuk (1000rpm). A csapadékot SCLB-ben (lízis puffer) felsuszpendálva Braun típusú homogenizátorban homogenizáljuk (innen kezdve minden műveletet 0-4°C-on kell végezni!). A homogenizátum centrifugálása után (6000rpm), a csapadékot szuszpendáljuk 1.2M-os sucrose grádiens oldatban, és ezt 1.4M-os sucrose oldatra rétegezve grádiens centrifugálást végzünk (22.000rpm, 45min, 2°C). A csapadékot (sejtmag) STB-ben szuszpendáljuk, és folyékony nitrogénes fagyasztás után -80°C-on tároljuk.

Sejtmagi extrakt (NE) készítése

A lefagyasztott sejtmagokat gyors felolvasztás után 10ml-re egészítjük ki STB-vel (minden 0°C-on!), 10ml 2xSCEB-t adunk hozzá (extrakciós puffer), és óvatosan elszuszpendáljuk. 30perc jégen való kevertetés után a kromatint és a nukleáris mátrixot centrifugálással eltávolítjuk (25.000g). Az oldat tisztájához lassan NH_4SO_4 -t adunk 70%-os telítési koncentrációig, és centrifugáljuk 1-1.5 órán át (105.000g). A H1, H2 és H3 fehérjék kivételével az összes fehérjének ki kell csapódnia ennél az NH_4SO_4 koncentrációnál. A csapadékot SCDB-ben szuszpendáljuk, és dializáljuk SNDB oldattal szemben, amely az összes proteáz inhibítort tartalmazza (ld. oldatokban felsoroltakat). Mivel a dializálás során csapadék képződik, ezt 105.000g-n történő centrifugálással eltávolítjuk. A fehérjekoncentrációt Bradford módszerrel meghatározzuk, az oldatot Centricon-10-ben koncentrálnak, és 25 μ l-enként szétosztva folyékony nitrogénes fagyasztás után -80°C-on tároljuk (az így kapott fehérje oldat koncentrációja 2-3 μ g/ μ l).

Részleges tisztítás heparin-agarózon

A további tisztítási lépésként a heparin-agarózos kromatográfiát választottuk. A CEF NE-t dializáljuk CEB-bel szemben (az oszlop egyensúlyi puffere), s ezalatt az oszlopot is - néhányszori 100mM-os KCl-os mosás után - ezzel a pufferrel hozzuk egyensúlyba. Felvisszük a mintát, egész éjszaka recirkuláltatjuk, mossuk CEB-bel, és

0-1M KCl/CEB grádiens mellett eluáljuk. A minta felvitele utáni átfolyót is félrerakjuk. Néha az oszlopot a grádiens indítása előtt 100, ill. 200mM KCl-dal mossuk (Ezeket a frakciókat is félretesszük, és ugyanúgy kezeljük tovább). 10ml/min átfolyási sebesség mellett 2ml-es frakciókat szedünk, ezeket koncentráljuk, dializáljuk Centricon-10-ben. A koncentrátumokat szétosztjuk, és folyékony nitrogénes fagyasztás után -80°C-on tároljuk. A frakciók tesztelése EMSA-val illetve DNázI footprint segítségével történik.

VI.2.7. A DNS-fehérje kölcsönhatás tanulmányozásával kapcsolatos módszerek

Oligonukleotidok 5' végjelölése

Az oligonukleotidokat vagy szálspecifikusan vagy dupla szálú formájukban T4 polinukleotid kinázzal foszforileztük. Tipikusan 5-10 pmol oligonukleotidot 30-50 μ Ci 32 P-ATP jelenlétében foszforileztünk 20-25 μ l térfogatban 1xPNK pufferben (37°C-on 1 órát). Fenolozás után Sephadex G-50 oszlopon való géliszűrőssel távolítottuk el a be nem épült radioizotópot. Az anyag tisztaságát PAGE-val ellenőriztük, a kapott beépült aktivitás általában 5-30*10⁶cpm tartományban volt.

DNS fragmentumok 5' végjelölése Klenow feltöltéssel

Általában 35 μ g olyan plazmidből indultunk ki, amely tartalmazza a fragmentumainkat (többnyire Bl19+-ban). A DNS-t először restrikciós endonukleázzal linearizáltuk (feltölthető 5' véget kell adnia), majd - fenolozás, és kicsapás után - Klenow enzimmel 100 μ Ci α dXTP (X:A,C) jelenlétében 1xNT pufferben feltöltöttük. A reakcióelegyet úgy állítottuk össze, hogy tompa végeket kapjunk, azaz szükség esetén az ehhez hiányzó nukleozid-trifoszfátokat jelöletlen formában az elegyhez adtuk (1-2mM végkoncentrációban), hogy az egyensúlyt eltoljuk a beépülés irányába (sokszor az utolsó nukleotid dideoxi változatát adtuk az elegyhez). Megint fenoloztuk, alkohollal kicsaptuk. 100 μ l TE-ben oldva az elegyet Sephadex G-50 oszlopon tisztítottuk. Az alkoholos kicsapási lépések után a DNS-t alkalmasan választott másik restrikciós endonukleázzal is megemésztettük. A kapott, egyik végén jelölt fragmentet agaróz gélből DEAE NA45

membrán segítségével izoláltuk. A beépülés $20-50 \cdot 10^6$ cpm körül szokott lenni.

Maxam-Gilbert féle szekvencia meghatározás

A DNázI footprint analízishez, valamint a metilációs interferencia kísérletek kiértékeléséhez elengedhetetlen a Maxam-Gilbert féle szekvencia meghatározás [111]. Általában csak az A+G, és C+T reakciót végeztük el, mert ez elegendő a szekvencia azonosításához. Rendszerint 200.000 cpm, csak az egyik végén jelölt DNS-fragmentumból indultunk ki.

A reakcióelegyek a következők (a DNS anyagmennyiségek egyenlők):

G	A+G	C+T	C
193 μ l DMS RB	7 μ l 32 P-DNA	7 μ l 32 P-DNA	4 μ l 32 P-DNA
7 μ l 32 P-DNA	13.2 μ l cc.HCOOH	13 μ l víz	16 μ l 5MNaCl
1 μ l DMS		30 μ l HZ	30 μ l HZ
10min	7min	13min	13min
+40 μ l DMS STOP	+30 μ l víz (0°C)	+200-200 μ l HZ STOP	
+1 μ l 10mg/ml	+200 μ l HZ STOP		
tRNS			

Ezt követően mindegyiket kicsaptuk alkohollal, majd feloldva 0.3M-os NaOAc-ban (pH=7.0), kicsaptuk megint (kétszer), és ugyancsak kétszer mostuk 80%-os alkohollal. A száraz csapadékot 100 μ l 1M piperidinben oldottuk fel, és 90°C-on inkubáltuk 30 percig. Vákuumban beszárítottuk, feloldottuk 50 μ l vízben, és újra beszárítottuk, feloldottuk 10 μ l vízben, majd megint szárítás következett. Az anyagokat feloldva egyenlő aktivitású adagokat (10000-30000 cpm) vittünk fel a gélre.

DNS-fehérje gélelektroforézis (Electromobility Shift Assay (EMSA))

A technika elve a következő: ha radioaktívan jelölt DNS-t és megfelelő fehérje extraktumot alkalmas pufferben együtt inkubálunk, majd ezt egy nemdenaturáló akrilamid gélen megfuttatjuk, akkor - ha van a rendszerben olyan protein, amely felismeri a DNS szekvenciáját, és hozzákötődik - a gélen alacsonyabb mozgékonyaságú komplexként viselkedik, s az autoradiogramon eltolódott sávként jelentkezik. A kötődés nagyon sok paramétertől függhet (sókoncentráció, hőmérséklet, kompetitorok stb.).

Az eltolódás mértéke pedig többé-kevésbé arányos a komplexben szereplő fehérje molekulatömegével, illetve nagy mértékben függ a komplex konformációjától is, ezért általában kis illetve nagy mozgékonyaságú komponensekről szokás beszélni.

Egy tipikus reakciókeveréket mutatunk be, amely egy sima EMSA-nak tekinthető:

4xRB	5 μ l
1mg/ml poli(dI-dC)	1 μ l
SNDB	2 μ l
víz	7 μ l
CEF NE	3 μ l

Ezt inkubáltuk jégen 10 percig, majd 2 μ l (30000cpm) jelölt DNS próbát adtunk hozzá. Típelt óvatosan összekevertük, majd 30°C-on termosztáltuk 20 percig.

5%-os nemdenaturáló akrilamid gélen futtattuk 0.25xTBE pufferben (az akrilamid:bisz arány 29:1). A gélt futtatás után közvetlenül Whatmann 3MM papírra szárítottuk minden kezelés nélkül.

Kompetíciós EMSA esetén kompetitort is adtunk az előinkubált elegyhez úgy, hogy ez csak a hozzáadott víz térfogatának rovására mehessen.

DNázI footprint

A DNázI footprint egy igen széles körben alkalmazott módszer DNS-fehérje kölcsönhatás tanulmányozására [48]. Elve a következő: ha egyik végén radioaktívan jelölt DNS-t együtt inkubálunk egy fehérjepreparátummal (ami legalább részlegesen tisztított) lehetővé téve a proteinek hozzákötődését a nukleinsavhoz, majd ezt követően rövid ideig DNázI-gyel emésztjük a DNS-t, akkor az endonukleáz azon a helyen, ahol a fehérje hozzákötődik, nem képes elhasítani a DNS-t, s az elegyet denaturáló akrilamid gélen megfuttatva, majd autoradiografálva a védett régió láthatóvá tehető. A fehérje kapcsolódás pontos pozíciója megállapítható, ha a géltre párhuzamosan felviesszük a fragment szekvenciáját meghatározó Maxam-Gilbert féle reakcióelegyeket is.

Egy átlagos footprint reakciókeverék, amely az összes többinek alapjául szolgálhat a következő:

5xOTF	4 μ l
SNDB	5 μ l
0.5mg/ml poli(dI-dC)	1 μ l
víz	4 μ l
Végjelölt DNS fragmentum	1 μ l (30.000cpm)
fehérje frakció	5 μ l

	10 perc szobahőn (22°C-on)
1/3000 DNázI	1.5 μ l

	2 perc szobahőn (22°C-on)
DNázI STOP	200 μ l
fenol-kloroform (1:1)	200 μ l (egyszerre a STOP-pal)

A fenol-kloroformos extrakció felső fázisát kicsaptuk alkohollal, mostuk, majd szárítottuk, festékben feloldottuk és 6%-os poliakrilamid gélen megfuttattuk. Vigyázni kell, hogy egyforma aktivitás kerüljön a gél zsebeibe. Mellettük természetesen megfuttattuk a megfelelő Maxam-Gilbert féle reakciókat is.

A fenti reakciót sok esetben kell, és lehet módosítani (sótitrálás, nonspecifikus, specifikus kompetíció stb).

A DNázI enzimet minden esetben (minden DNS próbára) előzetesen titráltuk különböző (1/1000-1/5000) hígításokban 1xCa-Mg pufferben, és a legjobb képet adó hígítást használtuk.

G-metilációs interferencia

A módszer kiindulási alapjául Lemaire [98] eljárása szolgált, de néhány jelentős módosítást végeztünk rajta, ami az elvi részt nem nagyon érinti. A gondolatmenet lényege a következő: Ha az egyik végén jelölt DNS-t DMS-sel részlegesen metilálunk, és ezzel, mint próbával elvégzünk egy EMSA-t, akkor - a metilcsoport zavaró hatása miatt - az eltolódott sávban nem szerepelhet olyan DNS, amely a kölcsönhatásban fontos szerepet játszó nukleotidon módosult. Mivel a metilezett G-k piperidinnel elhasíthatóak, ezért az EMSA gélből izolált kötésben lévő, illetve szabad DNS hasítási képe különbözik akrilamid gélen való futtatás után. A kapcsolatban fontos szerepet játszó nukleotidoknak megfelelő sávok hiányozni fognak az autoradiogramon a komplexhez tartozó mintázatban. (A

metilációs interferencia nem ugyanaz, mint a metilációs védési kísérlet, ahol az EMSA megelőzi a metilezési reakciót!) A Maxam-Gilbert féle szekvenciameghatározást most is el kell végezni.

A metilációs interferenciához $\approx 1 \cdot 10^6$ cpm DNS próbából indultunk ki mind oligonukleotid, mind klónozott oligonukleotiddal előállított jelölt fragment esetén. Elvégeztük vele a G metilezési reakciót (ld. Maxam-Gilbert-féle szekvencia meghatározás) egészen a piperidin hasítást megelőző lépésig. Vízben oldottuk, majd egy 5-szörös léptékben felnagyított EMSA-t végeztünk el, megfuttattuk nemdenaturáló akrilamid gélen, nedvesen exponáltuk. A komplex illetve a kötetlen DNS sávjainak kivágása után ezeket 4ml TE-ben 37°C-on eluáltuk 14 órát. 100-100 μ l DE-52 szuszpenzió hozzáadásával megkötöttük a DNS-t, majd 1M NaCl oldattal eluáltuk. Az így kapott oldatot fenoloztuk, kicsaptuk alkohollal, mostuk, szárítottuk. Innen kezdve a piperidines hasítással ugyanúgy folytattuk, mint a Maxam-Gilbert féle módszer esetén. A gélre szigorúan (szcintillációs detektorban mért) egyenlő aktivitásokat vittünk fel reakciósorozatonként.

A fehérje-DNS komplex UV keresztkötése

BrDU-t hordozó, szálon belül jelölt DNS próba előállítása

A templát DNS Bl19+ HincII helyére klónozott oligonukleotid (a bemutatott példa szerint SI). Ezt az M13 fág klónozó rendszer "-40" illetve a "reverz" primerei segítségével amplifikáltuk.

A PCR reakció:

5.0 pmol/ μ l '-40' primer	10 μ l
5.0 pmol/ μ l 'reverz' primer	10 μ l
10xPE puffer	6 μ l
1mg/ml Ac-BSA	6 μ l
BrdU/dNTP	8 μ l
α - ³² PdATP	3.3 μ l (33 μ Ci)
α - ³² PdCTP	3.3 μ l (33 μ Ci)
templát DNS	5 μ l (1-5ng)
paraffin olaj	60 μ l
AmpliTag DNA pol.	2U

A programozható termosztát a következő ciklusokat hajtotta végre: 95°C: 1perc, 50x:(95°C:1perc, 48°C:1 perc, 72°C:3perc), 72°C:3perc, hűtés 14°C-ra.

A termékelegyet fenol-kloroform (1:1) keverékkel kétszer extraháltuk, a DNS-t kicsaptuk, mostuk, szárítottuk. A klónozó helyhez legközelebbi két enzimmal (PstI, XbaI) kivágtuk az inszertet, 10%-os natív poliakrilamid gélből izoláltuk a fragmentet, s alkoholos kicsapás, mosás, szárítás után közvetlenül felhasználtuk.

UV keresztkötés

Egy normál EMSA reakciót állítottunk össze, amely csak abban különbözött a fentitől, hogy 100.000cpm DNS próbát alkalmaztunk. Az inkubációs idő eltelte után 254nm-es hullámhosszú fénnel világítottuk meg az elegyet jégen. 1 μ l 500mM CaCl₂ hozzáadása után 4-5 μ l DNázI-gyel ($\approx$ 20 μ g) emésztettük 37°C-on 20 percig. 5xSDS LB hozzáadása után 12.5%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk meg a mintát (60-80V-tal). A gélét Whatmann 3MM papírra szárítottuk 60°C-on, és exponáltuk.

VII. EREDMÉNYEK

VII.1. Torma peroxidáz-, és alkalikus foszfatáz-oligonukleotid konjugátumok előállítására HIV-1 kimutatására

Az irodalmi bevezetőből kiderült, hogy olyan eljárás, amelyben szintetikus oligonukleotidokhoz kémiai módszerekkel kapcsolnak enzimeket viszonylag kevés van, s ami van, korántsem tökéletes.

Az AIDS világszerte történő elterjedésével egyre sürgetőbb lett olyan diagnosztikumokat kifejleszteni, amelyek lehetőleg minél korábbi stádiumban tudják detektálni a HIV vírust. Erre kiváló eszköznek tűnt a DNS diagnosztika, s a már korábban kifejlesztett ELISA módszerek mellett, jelent meg olyan közlemény, amely a HIV-1 ORF régiója környékére tervezett PCR primerekkel tudta detektálni a HIV-1 RNS-t [119]. A szerzők emellett hangsúlyozták azt is, hogy az addig kifejlesztett ELISA rendszerek nem 100%-osak, helyenként hibás eredményt adtak.

A fenti publikációtól függetlenül mi is megpróbáltunk kifejleszteni egy olyan rendszert, amely az HIV-1 vírus detektálására alkalmas, és közvetlen hibridizációs technikán alapszik.

VII.1.1. A HIV vírus rövid jellemzése, a próbák tervezése

A humán immunelégtelenség (AIDS) a világon ma az egyik legveszélyesebbnek tartott betegség, amelynek napjainkig sem találták meg az ellenszerét. A betegséget egy retrovírus, a "Human Immunodeficiency Virus" (HIV-1) okozza, és a fertőzést követően 5-7 év múlva halálos kimenetelű.

A retrovírusok olyan vírusok, amelyeknek a nukleinsav komponense RNS, amely a sejtbe jutva átíródik DNS-sé, s ez a kettős szálú DNS beépül a gazdasejt genomjába (provírus forma) (a HIV-1 meglehetősen hosszú ideig létezik ebben a formájában). A vírus szaporodása úgy történik, hogy - bonyolult szabályozó machanizmus hatására - erről a provirális DNS-ről a vírus felépítéséhez szükséges fehérjéket kódoló mRNS-ek íródnak át, amelyekből a megfelelő fehérjék képződnek, valamint a teljes RNS vírus genom. Ezek a sejthártyában épülnek össze érett virionná, majd kikerülnek a sejtből. Erre a részre csak azért

tértünk ki, mert ebből látszik, hogy a vírus kimutatása mind RNS, mind DNS formában lehetséges [119, 156].

A retrovírusok szerveződése nagyon hasonlít egymáshoz. Mivel nem túl sok humán retrovírus ismert (pl. humán T-limfotróp vírus (HTLV-I, II, Visna, HIV-2) [56], így célszerűnek látszott olyan szekvenciaelem kiválasztása, amely egyrészt a retrovírusokra jellemző (gag, pol, env), másrészt ezen belül csak a HIV-1-re.

A vírus genomjának szekvenciáját egyidejűleg több kutatócsoport is leköszölte (különböző vírus elnevezéseket használva), [135, 148, 182], amelyekről nagyfokú hasonlóság alapján az a vélemény alakult ki, hogy ugyanarról a vírusról van szó [109]. Ugyanakkor észre kell venni, hogy bizonyos fokú heterogenitás mindenképpen létezik. A részletesebb vizsgálatok azt mutatták, hogy ez a variabilitás elsősorban az env régióra térképezhető [134]. Ezért olyan oligonukleotidokat választottunk, amelyek nem erre, hanem, egyéb jellegzetes retrovíruselemre esnek. A következő oligonukleotidokat szintetizáltuk meg:

SK03	5' AATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAG 3'
	régió:gag, pozíció:928
SK19	5' ATCCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGAATG 3'
	régió:gag, pozíció:1588
SK31	5' ACCAGAGTCACACAACAGACGGGCACACAC 3'
	régió:LTR, pozíció:9642
P3-4	5' ATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACA 3'
	régi:pol, pozíció:2960

A felsorolásban feltüntettük azt, hogy melyik régióra esik a megfelelő szekvencia, illetve megadtuk a pontos pozícióját KO3455 leltári számú HIV-1 referencia szekvenciában (egyesített EMBL GenBank).

VII.1.2. Az enzim-oligonukleotid konjugátumok szintézisének stratégiája

Az irodalmi áttekintésben említettünk néhány módszert, amely alkalmas oligonukleotidok enzimekkel való összekapcsolására, s ezek közül Urdea [175] módszerét találtuk a legmegfelelőbbnek bizonyos módosításokkal. Szóltunk arról is, hogy nem túl szerencsés a bázisokon kialakított funkciós csoportokhoz kapcsolni ilyen nagy térkitöltésű fehérvérjű, mint az AP. Pedig a szerzők a lánc belsejében alakították ki funkciós csoportjukat (a citozin

4-es szénatomján lévő aminocsoporton), ami a hibridizációs tulajdonságokon ronthat. Az pedig teljességgel valószínűtlen, hogy egy polinukleotidra több enzimet is fel lehessen kötni, ami egyébként a módszer előnye lenne.

Nelson [123] közölt egy olyan módszert, amellyel a CPG-n egy olyan funkciós csoportot lehet létrehozni, amin el lehet kezdeni a DNS szintézist, s a végén úgy hasad el, hogy az oligonukleotid 3' végén aminocsoport marad (11. ábra). Ezzel a módszerrel a szintetizátoron belül igen könnyen lehet amino csoportot kapcsolni az oligomerre, s a továbbiakban - mivel az 5' vége szabad - kinázzal megjelölhető. Ezért nevezik a szerzők többfunkciós oligonukleotidnak.

A monofunkciós fenilizotiocianát, más nevén Edman reagens a fehérje szekvencia analízisben használatos reagens, és a terminális aminocsoportokkal reagál. Ez volt az oka, hogy ugyanilyen funkciós csoporttal rendelkező kapcsolószert választottunk, mert véleményünk szerint a terminális aminocsoportok elreagáltatásával a fehérje aktivitása gyakorlatilag nem változik. Bár a helyzet nem teljesen ez, hanem Urdea [175] szerint a reagens a lizinekkal is reakcióba lép, ez - mint az eredményekből kitűnik - alapvetően nem befolyásolja a fehérje funkcióképességét.

Mi is ilyen aminált CPG-ken szintetizáltuk meg a fent felsorolt szekvenciákat, majd az oligonukleotidoknál szokásos utókezelés és tisztítás után ezeket reagáltattuk el DITC-vel, s a termékek extrakciós tisztítása után az így kapott komplexeket kapcsoltuk össze HRP-vel illetve AP-vel. A konjugátumokat natív poliakrilamid gélen tisztítottuk, eluáltuk és koncentráltuk. A termékeket első körben UV spektroszkópiás módszerrel, illetve az enzimek specifikus aktivitásának meghatározásával jellemeztük.

VII.1.3. A szintézis menete

A szintézis lépéseinek részletes leírását az anyagok és módszerek fejezetben találhatjuk meg részletesen, és itt csak a végleges, kialakult változatot ismertetjük azokkal a tapasztalatokkal kiegészítve, amelyek esetleg tanulságul szolgálhatnak.

Az aminált oligonukleotidok kapcsolása DITC-vel

Két alternatíva kínálkozott a munka folytatásához. Az egyikben az enzimhez kapcsoljuk először a DITC-t, majd ezt követően konjugáljuk az oligonukleotiddal, a másikban fordítva. Mi ez utóbbi stratégiát választottuk az alábbi okok miatt. Ha az enzimet próbálnánk meg reagáltatni először, könnyen előfordulhatna - még nagy DITC felesleg esetén is -, hogy az enzim intramolekulárisan mindkét izotiocianát csoporttal reagál, mivel maga is több funkciós csoporttal rendelkezik. Ha oligonukleotiddal reagáltatjuk a DITC-t, akkor ez utóbbinak nagy feleslegben való alkalmazásával a dimerizáció kivédhető, és mivel az aminált oligomerek csak egy reaktív aminocsoporttal rendelkeznek, intramolekuláris reakció nem lehetséges. Vizsgálataink szerint a bázisokon lévő csoportok nem reagálnak el.

A másik előnye ennek a sorrendnek, hogy a reakciót követően a módosított oligomer a szabad DITC-től n-butanolos extrakcióval, viszonylag egyszerű technikai eljárással elválasztható, míg a komplex tisztításához komplikáltabb módszert (pl. gélszűrést) kellene alkalmazni.

Torma peroxidáz konjugálása az aktivált oligonukleotidokkal

A szintézis következő, s egyben utolsó lépése a torma peroxidáz (HRP) és az aktivált oligonukleotidok összekapcsolása. Ez lényegesen lassabb, mint az oligomer aktiválása DITC-vel (egész éjszaka 25°C-on). Ennek egyik oka az, hogy míg az előző reakcióban az aktivátort igen nagy feleslegben tudtuk alkalmazni, ebben az esetben viszont a reagenseket úgy mértük össze, hogy az enzim kb. 4-szeres feleslegben legyen. Ez azért szükséges, hogy elkerüljük az olyan mellékreakciókat, amelyekben egy enzimhez több oligonukleotid is kötődik. A reakció fényérzékeny, ezért sötétben kell végrehajtani. Az inkubációs idő letelte után natív poliakrilamid gélen választottuk el a komplexet a reagensektől szintén sötétben. Mivel a HRP viszonylag nem nagy molekulatömegű fehérje, a gél jól szét tudta választani a komponenseket.

Alkalikus foszfatáz kapcsolása az aktivált oligonukleotidhoz

A reakció menete gyakorlatilag ugyanaz, mint a HRP-vel, csak néhány technikai probléma lényegesen megnehezítette a szintézist. Mivel a próbák későbbi tesztelése során az ezekkel a komplexekkel kapott képeken igen erős volt a háttér, ezekkel nem foglalkozunk részletesen, csak néhány nehézséget említünk meg. A poliakrilamid gélelektroforézis során az AP nagy relatív molekulatömege (147000) miatt a szabad enzim elválasztása a komplextől eléggé bizonytalan. A gélből passzív elúcióval nem, hanem csak elektroelúcióval lehetett visszanyerni a komplexet, s az eluáló puffert is módosítani kellett kétértékű kationok alkalmazásával (APEP puffer). Ettől eltekintve a komplexek jellemzésénél az $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ arányt mérve [77] (ld. később) általában az irodalmi értékeket kaptuk meg (≈ 1.2).

További problémát jelentett, hogy a végső koncentrálásnál nagyon kellett vigyázni, hogy a vákuumos bepárlásnál ne fagyjon meg az oldat, mert akkor az enzim elveszti az aktivitását. Végül sikerült alkalikus foszfatáz konjugátumokat is szintetizálni. Mivel a hatékonyság rosszabb volt, valamint a hibridizációknál nagy volt a háttér, ezért ezekre az eredményekre csak utalásszerűen hivatkozunk.

VII.1.4. A komplexek jellemzése

Jablonski [77] nagyon kényelmes módszert ajánlott a fehérje-oligonukleotid konjugátumok (kvalitatív) becslésére. Ez pedig az $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ arány számítása, ami a szerzők szerint tiszta DNS-re 1.8, fehérjére 0.6, 1:1 komplexre pedig 1.2 körüli érték. Ez esetünkben a HRP-konjugátumokra 1.2-1.5 között, míg AP esetén 1.1-1.4 érték között mozgott. A poliakrilamid gélkép alapján a HRP-re biztosan, az AP-re kevésbé biztosan állíthatjuk, hogy a tiszta 1:1 komplexet tartalmazta. Ez utóbbi valószínűleg némi szabad enzimmal volt szennyezve, s ez okozta később a háttér.

A fent leírtakat figyelembe véve a 260nm-en illetve a 280nm-en mért abszorbanciákból 2db kétismeretlenes egyenlettel meg lehet határozni a komplex anyagmennyiségét. Ezt nem részletezzük, mert ha csak a hagyományos 260nm-es értéket vesszük figyelembe, akkor is 75-80%-os pontossággal meg lehet határozni a kapott anyag

menyiségét, a kitermelést, s ez a felhasználási mód figyelembevételével több, mint elég. A 2. táblázatban megtalálhatjuk ezeket az adatokat a HRP-konjugátumok esetére (az AP esetén a kitermelés ezeknek kb. a fele).

2. táblázat. Az oligonukleotid-HRP konjugátumok adatai.

HRP-konjugátum	anyagmenny. nmol	kiterm. %	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
SK03	2.54	54.2	1.27
SK19	1.70	49.2	1.12
SK31	2.10	46.6	1.50
P3-4	1.97	46.6	1.47

1. oszlop: a kapcsolásból visszanyert anyagmennyiségel,
2. oszlop: a reakció kitermelése a DNS-re, mint kiindulási anyagra vonatkozóan,
3. oszlop: a 260 és 280 nm-en mért abszorbanciák hányadosa.

Megmértük a komplexben szereplő enzimek fajlagos aktivitását is. Meg kell jegyezni, hogy ilyen irányú vizsgálatokat nem találtunk az irodalomban. A metodikát részletesen csak a peroxidáz esetén írjuk le (ld. Anyagok és Módszerek).

A kapott enzimaktivitás értékeket a 3. táblázatban tüntettük fel, s mellette azt is megadtuk, hogy az eredeti, kiindulási enzimaktivitásnak hány százaléka maradt meg. Látható, hogy a legrosszabb esetben is legalább 65%-a megmaradt az eredeti specifikus aktivitásnak, s ezzel nagyon meg voltunk elégedve. Az alkalikus foszfátáz esetén az eredeti specifikus aktivitás kb. 40-50%-át tudtuk visszanyerni a konjugátumokban, ami kielégítő, de szignifikánsan rosszabb, mint a peroxidázra kapott értékek.

3. táblázat. A HRP-konjugátumok enzim aktivitás adatai.

HRP-konjugátum	rel. mol. tömeg	spec.akt. (SA) (U/mg)	% SA
SK03	48946	144.6	65.7
SK19	49652	150.5	68.4
SK31	49499	178.5	81.1
P3-4	49614	217.0	98.6

1. oszlop: a konjugátumok relatív molekulatömegei,
2. oszlop: az enzim specifikus aktivitása a komplexben,
3. oszlop: az enzim %-os specifikus aktivitás adatai a konjugátumban a módosítatlan enzim értékéhez képest.

Hibridizációs kísérletek

A próbák további tesztelését Belgiumban a Eurogentec cégnél végezték. Ezekről csak vázlatosan tudunk beszámolni. A HIV-1 vírus jellemzésénél említettük, hogy a vírus genomja átíródás után beépül a gazdasejt kromoszómájába, s ott meglehetősen hosszú ideig maradhat. Ez adta a lehetőséget, hogy HIV-1 fertőzött sejteken genomikus Southern-blot kísérletekben ellenőrizték a próbák helyességét [156]. A kimutatási érzékenység meghatározására dot-blot kísérleteket végeztek, s HIV-1 fragmentumait megfelelő vektorokba klónozva, majd sejtekbe transzformálva az életszagúbb kolóniahibridizációban is tesztelték a próbákat. Ezeket a technikákat a hibridizációs lépésig a hagyományos módszerekkel [147] hajtották végre. A hibridizációt, illetve az előhívást Saiki [146] illetve Urdea [176] alapján végezték. Eredményeik szerint mindegyik próba HRP-vel összekapcsolva jól működött, s a kimutatási határ 100-500 attomol körül volt. A legjobb próbának a P3-4 bizonyult (100 attomol kimutatási határral). Kontrollként influenza vírust használtak.

Az alkalikus foszfátázzal érzékenyebb rendszert kaptak, de olyan nagy háttérrel, hogy ez jelentősen visszavetette az eredmények értékelhetőségét.

VII.2. DNS szekvencia meghatározási eljárás hőstabil polimerázzal

A dideoxi típusú nukleotid sorrend meghatározó eljárások a legkülönbözőbb forrásból származó DNS polimerázt használtak (DNS polimeráz I, ennek a Klenow fragmentje, T4, T7 DNS polimerázok stb.). Annak ellenére, hogy A. Chien [125] már 1976-ban leírta egy termostabil DNS polimeráz tisztítását *Thermus aquaticus*-ból, ennek gyakorlati alkalmazására csak a következő évtized második felében került sor, s a DNS szekvencia analízisben történő felhasználása az évtized végéig háttérben maradt.

Az 1980-as évek végére a termostabil DNS polimerázok hasznosítása az érdeklődés középpontjába került. Mi az oka ennek a nagy népszerűségnek? Az egyik közismert tény a polimeráz láncreakcióban ("polymerase chain reaction", PCR) történő alkalmazásuk, ahol használatuk óriási előnnyel bír, s gyakorlatilag nélkülözhetetlen (erről egy gyakorlati alkalmazás kapcsán később lesz szó).

A választ arra, hogy mi az előnye annak, hogy magas hőmérsékleten hajtsunk végre egy szekvenciázó reakciót, a DNS másodlagos szerkezetében kell keresnünk. Aki szekvencia meghatározással foglalkozik, az tudja, hogy a DNS-en belül vannak "nehezen analizálható" régiók. Ez sokszor azért van, mert a DNS olyan szekvenciaelem(ek)et tartalmaz, amely(ek) saját magukkal komplementer(ek), és így a szál egy bizonyos darabja kihurkolódhat. Lehetséges az, hogy az általunk használt enzim ezt nem veszi észre, és egyszerűen kihagyja ezt a szakaszt, s így hibás, hiányos szekvenciát olvashatunk le az autoradiogramról.

Ezen segít pl. a magas hőmérsékletet tűrő enzimek használata. Ha magas hőmérsékleten végezzük a reakciót, akkor ezeknek a másodlagos szerkezeteknek a jó része eltűntethető, a DNS templát szál "kisimíthető". Ez sarkallt bennünket is arra, hogy megpróbáljunk egy olyan gyors, egyszerű eljárást kidolgozni, amellyel megbízhatóan lehet a még olykor nehezen kezelhető régiók nukleotid sorrendjét megállapítani.

A tervünk az volt, hogy először egyszálú templátra fejlesztjük ki a rendszert, s a következőkben ennek a munkának a főbb lépéseiről számolok be.

VII.2.1. Egylépéses szekvencia meghatározási eljárás Taq DNS polimerázzal, egyszálú DNS templáton Az optimális körülmények kiválasztása

A Taq DNS polimeráz enzimet kezdetben a Promegától szereztük be (*Thermus aquaticus* törzsből, Pt#M186B). Ezt azért kell külön hangsúlyozni, mert ma már a legkülönbözőbb termofil törzsekből tisztítanak DNS polimerázt, mint pl. "Tth DNS pol."-t a *Thermus thermophilus*-ból (Boehringer), "Pfu DNS pol."-t a *Pyrococcus furiosus*-ból (Stratagene) stb. Modell DNS-ként az M13 mp19 fág a szintetikus HSA gén 3. nagy fragmentjét tartalmazó egyszálú DNS-ét [37], primernek pedig az ehhez a klónozó rendszerhez tartozó, általunk szintetizált ún. '-20' primert (LMB2) használtuk.

Az első néhány kísérlet során azokat a terminátor elegyeket, illetve nagy vonalakban azt a technikai menetet követtük, amelyet a Klenow enzimmel való reakciókhoz dolgoztak ki [147]. (Nem ismertetjük részletesen az összes lépést, amelyen keresztül a végső változatig eljutottunk, hanem csak néhány fontos momentumot emelünk ki).

Jelölő anyagként α - ^{35}S -dATP-t használtunk. A kísérlet menetébe extenziós periódust, s a végén "chase" lépést is beiktattunk. Az eredmény olyan terminációs létra volt, amely rengeteg nemspecifikus terminációt adott.

Az enzim tio-dATP érzékenysége.

Rengeteg lehetőséget kipróbáltunk a nemspecifikus sávok kiküszöbölésére, s végül arra a következtetésre jutottunk, hogy az α - ^{35}S -dATP okozhatja a fő problémát (miután végül a primer 5' végi jelölésével (^{32}P -vel) illetve α - ^{32}P -dATP jelöléssel végrehajtott reakciók esetén javuló képet kaptunk). Mivel azt az alternatívát, hogy az enzim érzékeny lenne a radioizotóp β -sugárzására a ^{32}P -vel végzett kísérletek kizárták, két további magyarázat kínálkozott: a., az enzimnek kevés az a mennyiségű dATP, amennyit a radioizotóppal bevittünk, illetve b., hogy az enzim nagyon érzékeny az α helyzetű kén jelenlétére. A két lehetőség közül a második bizonyult igaznak, s a 12. ábra (A) részén láthatunk egy olyan kísérletet, amelyben különböző mennyiségű "hideg" dATP hozzáadásának hatását vizsgáltuk a reakció specificitására. Bár a kép némileg halványodik, a nemspecifikus terminációból adódó sávok a α - ^{32}S -dATP adagolásával fokozatosan eltűnnek, és a valódi szekvencia

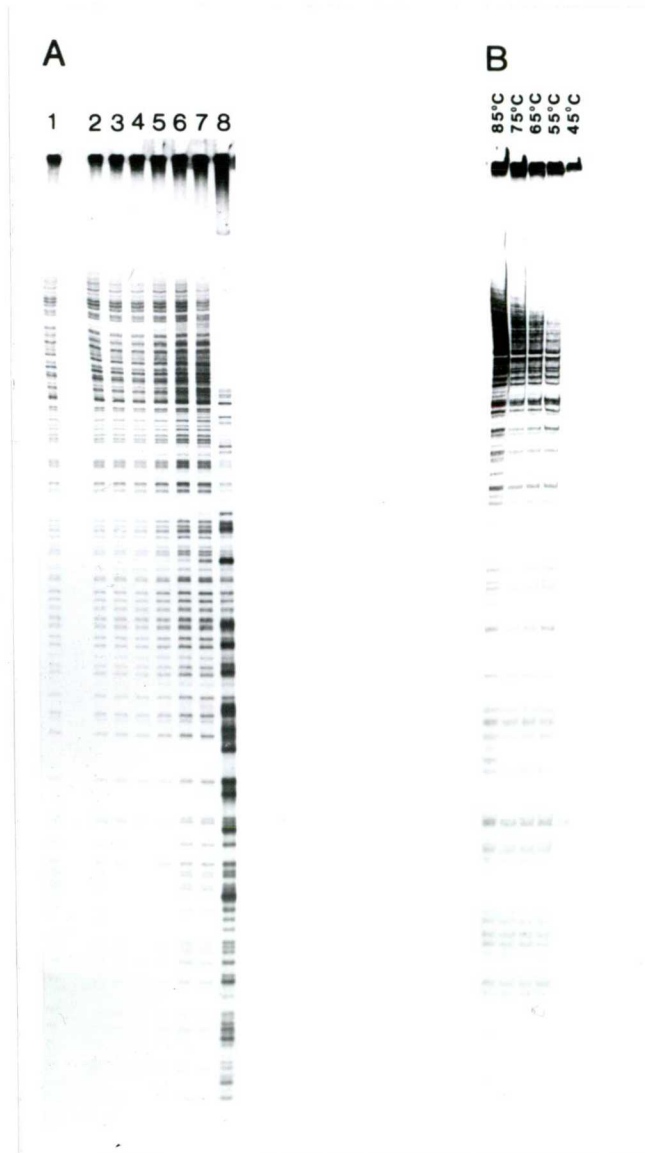
olvasható le. A kísérlet részletes ismertetését az ábra alatti szövegben találhatjuk.

Ez azonban még nem zárja ki annak a lehetőséget, hogy az enzim "éhezik" a dATP-re, s ezért elvégeztük azt a kísérletet is, amelyben a "hideg" dATP tioszármazékát (α - ^{32}S -dATP) adtuk a reakcióhoz. Bár a kép most is javult valamelyest, de még a legnagyobb mennyiségű (56pmol) α - ^{32}S -dATP hozzáadásánál is kaptunk nem specifikus sávokat, igaz, némileg halványabban. Mivel ennél sokkal kisebb dATP koncentrációnál tűnnek el a nemspecifikus sávok, ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy a Taq enzim tio-dATP beépítési képessége lényegesen rosszabb, mint a hagyományos dATP-é, s ez okozza a nemspecifikus terminációk megjelenését. A jelenséget úgy küszöböltük ki, hogy hozzávetőlegesen 2.5-szeres "hideg" dATP-vel hígítottuk a α - ^{32}S -dATP-t. A legtöbb polimeráz esetén egyébként hasonló jelenség figyelhető meg, de nem olyan mértékben, hogy ilyen trükköket kelljen alkalmazni.

*A primer koncentrációja és a templáthoz való
hibridizáció optimális körülményeinek kiválasztása*

A reakció megkezdése előtt minden szekvencia meghatározási eljárásban van egy lépés, amelyben a primert hozzáhibridizálják ahhoz a DNS templáthoz, amelynek szekvenciáját meg kívánják határozni (annealing). A hagyományosan használt primer mennyiség 0.25-1pmol (1-5 μg templáthoz). Mi is erre a régióra vizsgáltuk a rendszerünket, és azt tapasztaltuk, hogy a reakció nem nagyon érzékeny a primer koncentrációjára ebben a tartományban. Ez egy jól beállított módszertani leírással szemben követelmény is, hisz a jó nukleotid sorrend meghatározó eljárásoknak viszonylag nagy a "tűrésük" a templát koncentrációját (ld. később), illetve ebből kifolyólag a primer/templát arányt illetően.

Teszteltük a primer templáthoz való hibridizációjának hőmérséklet- és időfüggését is. Megfigyeléseink szerint egyáltalán nem szükséges a hibridizációhoz a hőmérsékletet megemelni, hanem szobahőmérséklet elegendő, és a szükséges idő sem túl hosszú, 10-20 perc inkubáció 25°C-on teljesen kielégítő eredményt ad. (A legrövidebb, 10 perces, és a leghosszabb, 60 perces, inkubációs idő után végrehajtott reakció eredménye között nincs észrevehető különbség.)



12/A. A Taq polimeráz α - ^{35}S -dATP érzékenységeinek bemutatása. Csak T reakció. $1\mu\text{l}$ α - ^{35}S -dATP-hez különböző mennyiségű "hideg" dATP-t adtunk. 1: 32, 2: 24, 3: 20, 4: 16, 5: 12, 6: 8, 7: 4, 8: 0 pmol hideg dATP-t adtunk. A reakció menete egyébként megfelel a végső változatban leírtaknak.

12/B. A szekvenciázó reakció hőmérséklet függése.

A reakciókat az ábrán jelzett hőmérsékleteken hajtottuk végre. Csak A reakció. Az többi paraméter a végső változatban leírtaknak felel meg.

A reakció hőmérsékletének, idejének és pufferének kiválasztása

Bár az eredeti cikk szerint [25] a *Thermus aquaticus*-ból tisztított termotabil polimeráznak 80°C körül van a hőmérsékleti optimuma, megvizsgáltuk, hogy ez a hőmérséklet optimális-e a szekvenciázó reakció szempontjából is. Mint a 12.ábra (B) részén bemutatott kísérletből kiderül, ez távolról sem igaz. 45, 55, 65, 75 és 85°C-on végrehajtva a reakciót, láthatjuk, hogy 45°C-on még nem működik igazán az enzim, 55-75°C között viszonylag jó mintázatot kapunk, azonban tovább emelve a hőmérsékletet, az enzim el kezd tévedni, és nonspecifikus terminációkat figyelhetünk meg. Ezért mi, az összes kísérlet tapasztalatait figyelembe véve, az 55-65°C-os tartományt tartjuk alkalmasnak a reakció végrehajtására. Mi általában 55°C-on dolgoztunk.

A reakció idejéről azt tudjuk elmondani, hogy a vizsgált tartományban (4-30 perc) a géleképeken különbség nem figyelhető meg, s a reakció 4-5 perc alatt gyakorlatilag befejezettnek tekinthető. Mi biztonsági és kényelmi okokból 10-13 percig szoktuk termosztálni a reakciót, s csak utána állítjuk le.

Az optimális reakció puffer kialakításakor kipróbáltuk a Promega által javasolt Taq polimeráz puffert (250mM Tris/HCl, pH=8.9, 50mM MgCl₂), s szekvenciaanalízis céljaira is megfelelőnek találtuk. Ha a pH-t bármelyik irányba eltoljuk, a szekvencia olvashatósága lassan romlik, a só (MgCl₂ koncentrációjának változtatásával pedig olyan hatást tudtunk elérni, mintha a terminátorok összetételét változtatnánk meg. (A rövidebb és hosszabb fragmentumok aránya gyengén eltolódik.) Ezek alapján a reakció pufferének meghagytuk a szállító cég által ajánlott puffert.

Az enzim és a templát DNS koncentrációjának hatása

A Taq DNS polimeráz fent említett tioérzékenységen kívül, a nem megfelelő mennyiségű enzim alkalmazása is nonspecifikus sávok megjelenéséhez vezet (13/A. ábra 3-5 minták). Az ábráról jól látszik: ha túl kevés enzimet adunk a reakcióhoz, akkor azon kívül, hogy a polimeráz a templáton nem jut túl messzire, nonspecifikus sávok is megjelennek, amelyek az enzim koncentrációjának növelésével fokozatosan eltűnnek. A minimálisan szükséges mennyiség tapasztalataink szerint 1.5-2 μ l (6-10U).

A primerrel foglalkozó fejezetben említettük, hogy a jó nukleotid sorrend meghatározó eljárás nem nagyon érzékeny a DNS templát mennyiségére és minőségére. Ezért a 13/A. ábrán (1-3.minta) az optimálisnak vélt DNS koncentrációhoz ($2.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) képest megdupláztuk illetve felére csökkentettük a templát koncentrációját. Meggyôző különbségeket nem nagyon lehet észrevenni, és ez azt jelenti, hogy a módszer egyaránt jól működik $1-5\mu\text{g}$ DNS templát jelenlétében.

A terminátorok optimális összetétele

Miután a reakció körülményeit beállítottuk, a terminációs elegyekben a megfelelő dideoxi- illetve deoxinukleozid-trifoszfátok arányát kellett optimalizálni.

4.táblázat. A terminátor elegyek összetétele

	T-term	C-term	G-term	A-term
ddTTP (10 mM)	15	-	-	-
dCTP (10 mM)	-	2	-	-
ddGTP (10 mM)	-	-	2	-
ddATP (10 mM)	-	-	-	6
dTTP (10 mM)	-	5	5	5
dCTP (10 mM)	5	-	5	5
dGTP (10 mM)	5	5	-	5
dTTP (0.5 mM)	20	-	-	-
dCTP (0.5 mM)	-	20	-	-
dGTP (0.5 mM)	-	-	10	-
víz	125	145	158	156

A táblázatban szereplő számok azokat a térfogatokat jelentik (μl -ben), amelyet a baloldalon szereplő oldatokból össze kell mérni.

A 4. táblázat összegzi a terminációs oldatok elkészítésének módját ahhoz, hogy a 10-400 nukleotid tartományban mindenhol jól olvasható képet kapjunk. Véleményünk szerint ezek az elegyek a primerhez közeli régiókra jól működnek, s ha valaki nagyon távoli régiókat akar vizsgálni, akkor értelemszerűen a saját céljainak megfelelően változtathatja az oldatokon belüli dideoxi/deoxi arányt.

A reakció leállítása

A polimerizációs reakciót a következő oldat hozzáadásával állítjuk le: 15mM NaOH, 1mM EDTA, 0.05% brómfenolkék, 0.05% xilencianol, 95% formamid (5 μ l). Erről csak azért teszünk külön említést, mert van a rendszernek egy sajátos vonása. Ez pedig az, hogy a különféle eljárások során, a fentihez hasonló összetételű oldat hozzáadása után néhány percig 90-100°C-on inkubáljuk a reakcióelegyeket, majd a gélre vitelig jégen tartjuk. A jégen rövidebb-hosszabb ideig eltarthatóak a minták. Az általunk javasolt módszer esetén a mintákat még jégen sem lehet hosszú ideig tárolni, s sokkal szebb képet kaptunk, ha nem jégre, hanem -20°C-os alkoholba raktuk a mintákat.

Arra, hogy ez miért van így, nem tudunk határozott választ adni, de feltételezésünk szerint az enzimnek van egy olyan "kötő" aktivitása még ilyen drasztikus körülmények között is, amely elősegíti a fragmentumok visszatapadását a templát DNS-re. Hozzá kell tenni, hogy ez csak spekuláció, határozott kísérletes bizonyítékok nem állnak rendelkezésünkre.

VII.2.2. A szekvencia analízis menete

A következőkben összegezzük a szekvencia meghatározás egyes lépéseit,, s a 12/b. ábrán bemutatjuk egy reprezentatív autoradiogram képét.

1. Primer hibridizáció:

Egy 1.5ml-es eppendorf csôbe mérjük össze

- 1.5 μ l szekvenciázó primert
- 5.0 μ l egyszálú DNS templátot (kb. 1pmol, 2.5 μ g)
- 4.0 μ l Taq polimeráz puffert
- 2.5 μ l Taq polimerázt (5U/ μ l)
- 17 μ l vizet

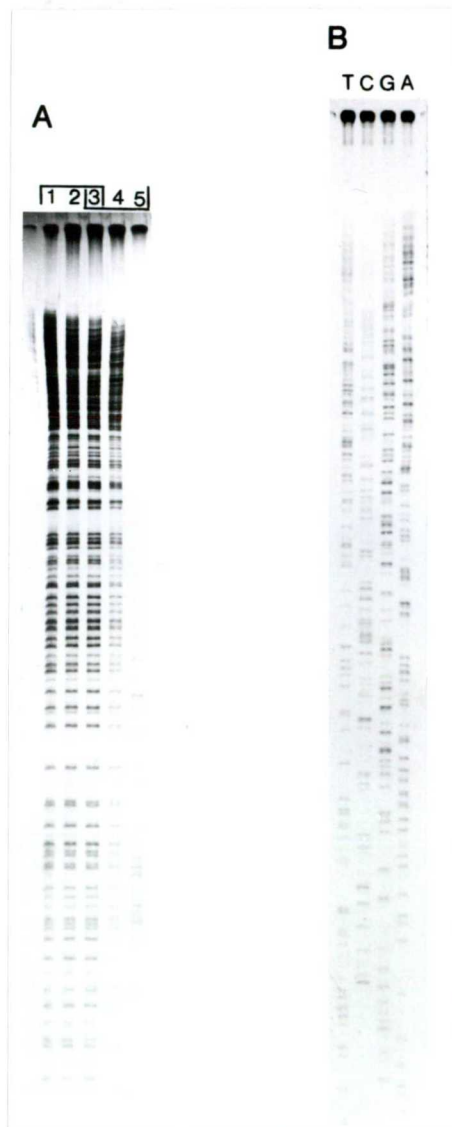
Keverjük össze és inkubáljuk szobahőmérsékleten 15-20 percig.

2. A reakció

A radioizotóp hígítása: 1.75 μ l α -³⁵S-dATP-hez mérjük 2.25 μ l 32 μ M-os dATP oldatot, s keverjük össze.

1.5ml-es eppendorf csövekben keverjük össze 1-1 μ l megfelelő terminátor elegyet (amelyek a fenti táblázat alapján készültek) 1-1 μ l hígított radioizotóp oldattal.

A fenti elegyből 2-2 μ l-t mérjük egy Greiner mikrotitráló lemez (Kat.no.726180) megfelelő lyukának oldalára.



13/A. ábra A reakció függése a templát DNS, és a Taq polimeráz koncentrációjától.

Csak T reakció. 1-3. minták esetén 1.25, 5, 2.5 μ g templát ssDNS-t, és 5U Taq polimerázt, 3-5 minták esetén 5 U, 1.5 U, 0.3 U enzimet használtunk 2.5 μ g ssDNS templát mellett. A többi paramétert a végső változatnak megfelelően állítottuk be.

13/B. ábra. A szekvenciázó módszer végső változata alapján készült autoradiogram képe. A kísérlet végrehajtásának menetét ld. VII.2.2. fejezetben.

A lyukak másik oldalára a fenti primer hibridizációs elegyből 6-6 μ l-t mérünk. Ráarakjuk a lemezre a tetejét, majd óvatos ütögetéssel a lyukakban lévő két-két oldatot egyesítjük. 55°C-os vízfürdőre tesszük 10-13 percig, majd 5-5 μ l STOP oldat hozzáadásával állítjuk le a reakciót. A mintákat 100°C-on tartjuk 3-5 percig, majd -20°C-os alkoholra tesszük, s innen visszük a poliakrilamid gélre, s a szokásos módon kezeljük. Az autoradiogramok általában 12-24 órás expozíciós idő elteltével előhívhatóak.

A reakciókat eppendorf csövekben is végezhetjük, de a fenti típusú Greiner lemezt mi sokkal jobbnak tartjuk, s főleg nagy számú minta esetén a használata szinte nélkülözhetetlen. Ezzel még igen nagyszámú minta is 30-60 perc alatt analizálható.

VII.3. A csirke CMP gén egy negatív szabályozó elemének jellemzése szintetikus oligonukleotidok segítségével

A szintetikus oligonukleotidok nélkül a génszabályozás kutatása ma már elképzelhetetlen. Bár első pillantásra úgy tűnik, hogy a következő fejezetek nem kapcsolódnak szorosan a DNS szintézis témaköréhez, de ha alaposan megnézzük a technikákat, akkor látni fogjuk, hogy gyakorlatilag majdnem mindegyik szintetikus oligonukleotidok használatán alapul, és ezek ma már nélkülözhetetlen eszközei a kutatásnak. Az EMSA, kompetíciós footprint, metilációs interferencia, PCR, UV keresztkötési kísérletek mind "oligonukleotid fogyasztók", és a kapott eredmények nagy mértékben ezek használatának köszönhetőek.

A következő fejezetekben ismertetni fogjuk azokat az eredményeket, amelyeket az SzBK Biokémiai Intézet Kötőszöveti Csoportjában végeztünk.

Az irodalmi bevezetőben már bemutattuk azokat a főbb ismereteket, amelyek a csoport tagjainak korábbi kutatásaiból származtak, és amelyek a mi munkánk alapjául szolgáltak. A génhez kapcsolódóan több olyan régiót azonosítottak, amelyek a transzkripció hatékonyságát képesek befolyásolni (8. ábra). Ezek közül a promoterhez 5' irányban elhelyezkedő 1.2kb-os fragmentumot vizsgálták behatóbban (9. ábra), s végül ebben a tartományban DNázi footprint technika segítségével két védett régiót mutattak ki (SI, SII), amelyek közül az SI-hez tartozó kölcsönhatás lényegesen erősebbnek, specifikusabbnak bizonyult. Ezért főként erre az elemre koncentrálnak.

VII.3.1. Az SI szövetspecifitása tranziens expressziós kísérletekben

Mivel az NR1 régió gyakorlatilag az összes vizsgált sejttípusban (CEC, CEF, HDM, (ezek mind mesenchymális eredetűek)) képes lecsökkenteni a gén aktivitását mind homológ (pCMPN(-15)), mind heterológ promoter (timidin kináz promoter) elé klónozva függetlenül attól, hogy milyen orientációban került beépítésre, ezért joggal merül fel a kérdés, hogy az SI elem is rendelkezik-e ezzel a tulajdonsággal. Ezért megszintetizáltuk az SI oligonukleotidot (a transzkripció irányának megfelelően felírva):

5' CAGGGGCTGG CCCCATGCCT CCCCGA 3'
3' GTCCCCGACC GGGGTACGGA GGGGCT 5'

A szintetikus oligonukleotidot a homológ illetve a heterológ promoter elé klónozva a különböző sejtekben kapott CAT aktivitásokat a 5. és 6. táblázatban tüntettük fel. A táblázatokban bemutatjuk az NR1 régióhoz tartozó CAT aktivitás értékeket is.

5. táblázat Az NR1 régió és az SI elem hatása a homológ promoter működésére különböző sejttípusok esetén

Konstrukció	Relatív CAT aktivitás (%)	
	CEC	CEF
pCMPN(-15)	100	100
NR1/pCMPN(-15)	4.6±1.4	8.8±3.3
SIN ^N /pCMPN(-15)	10.6±1.2	19.4±3.1
SIR ^R /pCMPN(-15)	21.3±9.8	20.4±9.9

SIN^N, és SIR^R az SI elem normál illetve reverz orientációját jelöli. A többi szimbólum jelentését ld. a szövegben.

6. táblázat Az NR1 fragment és az SI elem hatása a timidin kináz promoter aktivitására különböző sejttípusok esetén.

Konstrukció	Relatív CAT aktivitás (%)		
	CEC	CEF	HDM
pTK.CAT	100	100	100
NR1 ^N /pTK.CAT	38.0±1.9	40.6±6.4	44.2±11.8
NR1 ^R /pTK.CAT	9.9±1.6	13.3±0.2	28.2±0.4
SIN ^N /pTK.CAT	23.2±3.1	19.6±5.6	-
SIR ^R /pTK.CAT	35.3±4.1	33.7±2.5	-

Az N^N illetve az R^R a konstrukciókban a promoterhez képest normál illetve fordított orientációt jelöl.

Rögtön látszik, hogy igen nagy hányadban ez az elem okozza a gén aktivitáscsökkenését függetlenül attól, hogy milyen sejtbe történt a transzfekció, milyen promotert használtunk, vagy mi az oligonukleotid orientációja a promoterhez képest.

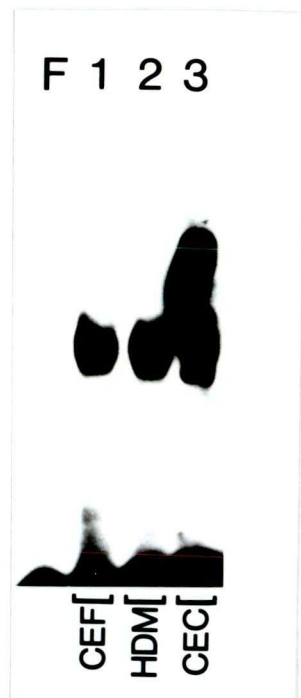
Ez a tény, hogy az NR1 régió belül az SI nagy mértékben járul hozzá a génaktivitás csökkentéséhez, indított bennünket arra, hogy azt feltételezzük, az SI elemnek döntő szerepe lehet abban, hogy silencerként, vagy represszorként a CMP gént a chondrogenesis megfelelő stádiumaiban inaktív állapotban tartja, s a gén csak a fejlődés bizonyos stádiumában, más faktorok hatására kapcsoljon be. Ugyanígy, olyan sejtekben, ahol a gén végig inaktív, lehetséges, hogy ezért az SI régió a felelős. Természetesen ez csak munkahipotézis, de ez adta az alapját annak, hogy részletesebb analízisnek vessük alá ezt a motívumot.

VII.3.2. Az SI szövetspecifitása *in vitro* körülmények között

Bár a transzfekciós eredmények tárgyalásánál már láttuk, hogy az SI mesenchymális eredetű szövetekben egyaránt képes csökkenteni a riporter génhez kapcsolt promoterek aktivitását, mégis szükséges bizonyítani, hogy ezért a hatásért ugyanaz a faktor felelős. Ezt EMSA-fehérje gélelektroforézis (EMSA) kísérletekkel végeztük el (ld. Anyagok és Módszerek).

A 14. ábrán CEF, HDM és CEC magi kivonatokkal (a továbbiakban NE: "nuclear extract") végzett EMSA kísérlet autoradiogramját mutatjuk be (részleteket illetően ld. az ábra alatti szöveget is). Mind a három sejttípusban azonos mértékben eltolódott sávokat figyeltünk meg, ami arra engedett következtetni, hogy azonos fehérjéről lehet szó. A CEC esetén egy kisebb mozgékonyágú elmosódott foltot is láthatunk, ami a fehérjekivonatot szennyező proteoglikánoknak tulajdonítható. A kísérlet két szempontból volt fontos. Az egyik elméleti jellegű, s arra ad választ, hogy az SI elem szövetspecifikus-e. A másik vonatkozása a kapott eredménynek az, hogy CEC-ből nagyon nehéz (s gyakorlatilag a mai napig megoldatlan probléma) magi extraktumot készíteni, és ha a kísérlet azt mutatja, hogy más sejtekben is ugyanaz a faktor kötődik az SI szekvenciához, akkor modellként, illetve a NE forrásaként ezt a szövettípust használhatjuk, feltéve, ha ebből

viszonylag egyszerű magi kivonatot készíteni. Ezen okok miatt a fenti kísérlet alapján, összhangban a tranziens expressziós kísérletekkel a továbbiakban fibroblaszt (CEF) sejtmagi kivonattal (NE), mint modellrendszerrel dolgoztunk tovább, és csak bizonyos, különösen fontos kísérletekben hasonlítottuk össze a CEC-ből kapott preparátumokkal. A NE készítésének módját az Anyagok és Módszerek fejezetben találhatjuk meg.



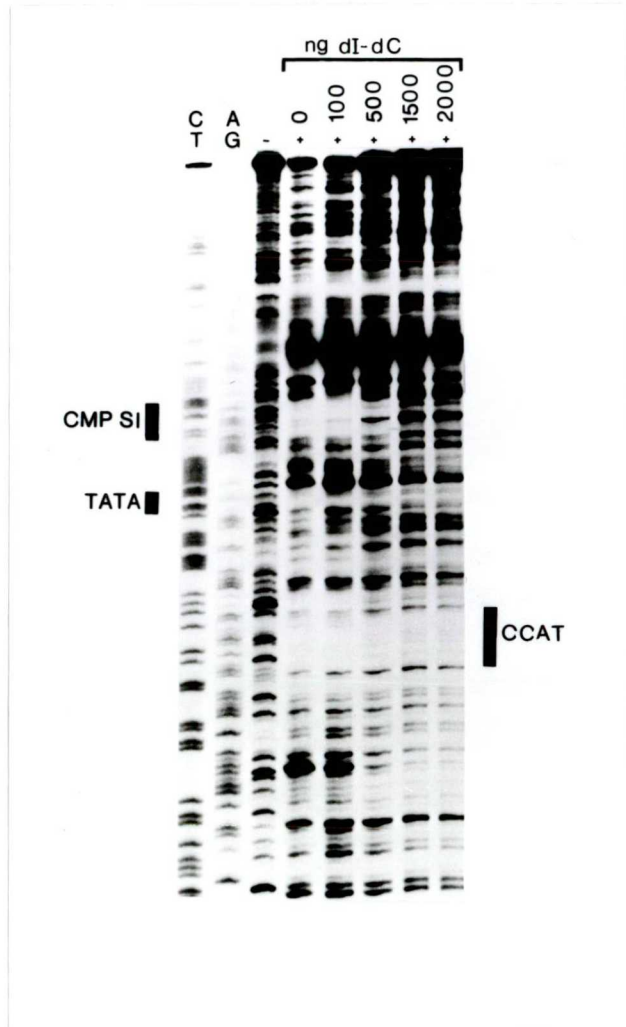
14. ábra Az SI szövetspecificitásának vizsgálata EMSA-val.
 30.000cpm SI próbához 500ng poli(dI-dC) nem specifikus kompetitor mellett 1: 10 μ g CEF NE-t, 2: 10 μ g HDM NE-t és 3: 2 μ g CEC NE-t adtunk.

VII.3.3. Az SI régió és a minimál promoter DNázI footprint analízise

Ahhoz, hogy meg tudjuk vizsgálni, a promoter közeli környezetében milyen szekvenciárészletekhez kapcsolódnak fehérjék a T54/11 (EcoRI*-HindIII) fragmentumot (a "*" 32p jelölést jelent, a klón leírását ld. Anyagok és Módszerek) használtuk a DNázI footprint analízisben. A 15. ábra egy olyan DNázI footprint kísérlet eredménye, amelyben nem specifikus DNS kompetitorral (8 tagú poli(dI-dC) oligomer) titráltuk a DNS fehérje kölcsönhatás erősségét. (Minél erősebb a kapcsolat, annál nagyobb feleslegben kell a nemspecifikus kompetitort használni. Ez a titrálás az EMSA kísérleteknél is bevált gyakorlat.) A footprint során a fehérjekomponens a CEF NE heparin agarózon tisztított, 0.4M KCl koncentrációnál eluálódó frakciójából származott, s ez egy részlegesen tisztított fehérje mintának tekinthető.

Jól kivehető az SI elemhez, a TATA boxhoz, valamint egy CCAT motívumhoz kapcsolódó védettség, amelyek különböző kompetitor koncentrációknál szűnnek meg. Az SI esetén is csak 1500x-os kompetitor felesleg esetén áll vissza az eredeti hasítási mintázat, a TATA box, és a CCAT szekvenciaelemek esetén még az alkalmazott legmagasabb p(dI-dC) koncentráció esetén is megmarad a védettség. A CCAT motívum értékelésénél figyelembe kell venni, hogy a CMP génnek két transzkripció start pontja van (a (+31) és a (+39) pozícióknál), és a CCAT szekvenciaelem első C-je pontosan a +31-es pozícióban van. Ezért elképzelhető, hogy ez a védettség a transzkripció iniciációs komplexnek tulajdonítható. Ennek eldöntése további kísérleteket igényel.

Az SI-hez való kötődés viszonylag alacsonyabb(?) (1500x) kompetitor koncentrációnál szűnik meg, a kölcsönhatás specifikus, és ezt alátámasztottuk olyan kompetíciós kísérletekkel, amelyben az SI szintetikus oligonukleotid szerepelt kompetitorként, s már 10x-es feleslegben megszüntette a régió védettségét. Az SII régió gyengébb kötődésről tanúskodik, s már 300-szoros nemspecifikus kompetitor is megszünteti a faktor kötődését (erről ábrát nem mutatunk).



15. ábra. A CMP gén promoter régiójának DNázI footprint képe. A kölcsönhatás specifitását polidI-dC) titrálással. A T54/11 klón EcoRI*-HindIII fragmentjét használtuk próbának, amely B119+/HincII helyén tartalmazza a (-220)-(+127) pozíciók közötti szakaszt a CMP génből. A protein komponens a CEF NE heparin agarózon részlegesen tisztított, 0.4 M KCl-dal eluálódó frakciójából származott (2-2 μ l). Az ábrán a feltüntetett, növekvő mennyiségű nem specifikus (polidI-dC)) kompetitort adtuk a reakció elegyhez.

VII.3.4. Az SI összehasonlítása ismert transzkripciós faktorok kötődési helyeivel

A transzkripciós faktorok általában meghatározott szekvenciaelemekhez kötődnek, s a következő lépés magától értetődően az volt, hogy az adatbázisban felkutattuk azokat a szekvenciaelemeket, amelyekhez ismert transzkripciós faktorok kötődnek [40].

Három olyan faktort találtunk az irodalomban, amely kötődési szekvenciája oly mértékben hasonlít az SI nukleotidsorrendjének egy részéhez, hogy lehetséges alternatívaként jöhettek számításba. Ezek az AP2 [183], HNF4 (vagy LFA1) [158, 160] illetve a Wilm's tumorhoz kapcsolt protein (WT1), amely az EGR-1 szekvenciát ismeri fel [104, 134]. Ezen szekvenciák mellett megszintetizáltuk az Sp1 felismerőhelyet tartalmazó oligonukleotidot, mint kontrollt [17]. Az Sp1 GC gazdag régiókhoz kötődik, viszont a kötődési szekvenciája nem hasonlít az SI-éhez. A következő oligonukleotidokat szintetizáltuk meg (dupla szálaban).

Sp1 5' AGCTGATCGGGGCGGGGCAGCT 3'

AP2 5' GAACTGACCGCCCCGCGGCCCGT 3'

HNF4 5' GCAGGTGACCTTTGCCCAGCGC 3'

WT1 5' TCGACGCCCTCGGCCCCGCGCCGG 3'

A szekvenciákon belül aláhúzással jelöltük a megfelelő fehérje kötődési szekvenciáját. Az oligonukleotidokat akrilamid gélen tisztítottuk.

A 16. ábrán mutatott kísérletben Sp1, AP2 és HNF4, dupla szálu oligonukleotidokat használtuk, mint kompetitorokat EMSA reakcióban, ahol az SI oligonukleotid 5' végén jelölt formája (ds) volt a próba, s CEF NE pedig a fehérje komponens. A kompetitor oligonukleotidokat a szóban forgó kísérletben igen nagy feleslegben (>5000-szeres) alkalmaztuk, azért, hogy tájékozódjunk arról, van-e egyáltalán kompetíció. A WT1 oligonukleotiddal végzett kísérlet eredményét a 17/B. ábrán láthatjuk (7-11. minták).

Az ábrákról azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az Sp1, AP2 és WT1 felismerőhelyet tartalmazó oligonukleotidok még nagy feleslegben sem kompetálnak, míg

az SI és HNF4 képes a kötésért versengeni. Ezért a következőkben ezeket részletes analízisnek vetettük alá (17. ábra). Különböző kompetitor koncentrációkkal elvégezve a kísérletet azt a megállapítást tehetjük, hogy a jelöletlen SI már 50-szeres, a HNF4 viszont 2000-szeres feleslegben képes eltüntetni az eltolódott sávot.

Összegzőképpen azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a megvizsgált oligonukleotidok közül a HNF4 felismerő helyet tartalmazó oligomeren kívül egyik sem szorította ki az SI elemet a komplexéből. A HNF4 oligonukleotid is csak viszonylag nagy feleslegben (≈ 2000 -szeres) képes teljesen eltüntetni az SI komplexhez tartozó sávot. Ha összevetjük ezt a homológ kompetícióból kapott értékkel (50-szeres), akkor ez túlságosan nagy feleslegnek tűnik, de a biztonság kedvéért még további kísérleteket is elvégeztünk. Előbb azonban vizsgáljuk meg, hogy a DNázI footprint segítségével azonosított SI és SII elemek és a komplexeik között van-e valami hasonlóság.

VII.3.5. Az SI és SII komplexek összehasonlítása DNS-fehérje gélelektroforézis kísérletekben

Ha összevetjük az SI és az SII elemeket, akkor a szekvenciák egy részén igen nagy fokú homológiát figyelhetünk meg.

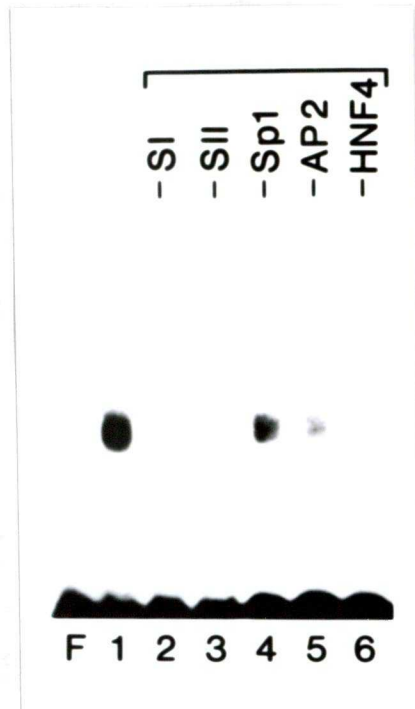
```

SII      5' GAGGGGCTGGCAGGGCTGGACGTCCA 3'
          xxxxxxxxxxxx
SI       5' CAGGGGCTGGCCCCATGCCTCCCCGA 3'

```

Ez a 10 bázis hosszon tartó azonosság vetette fel azt a lehetőséget, hogy esetleg az SI-hez és az SII-höz ugyanaz, vagy ugyanolyan típusú faktor kötődik. A kérdés tisztázása érdekében megszintetizáltuk az SII oligonukleotidot, és kompetíciós kísérletekben teszteltük, hogy képes-e kiszorítani az SI-t komplexéből.

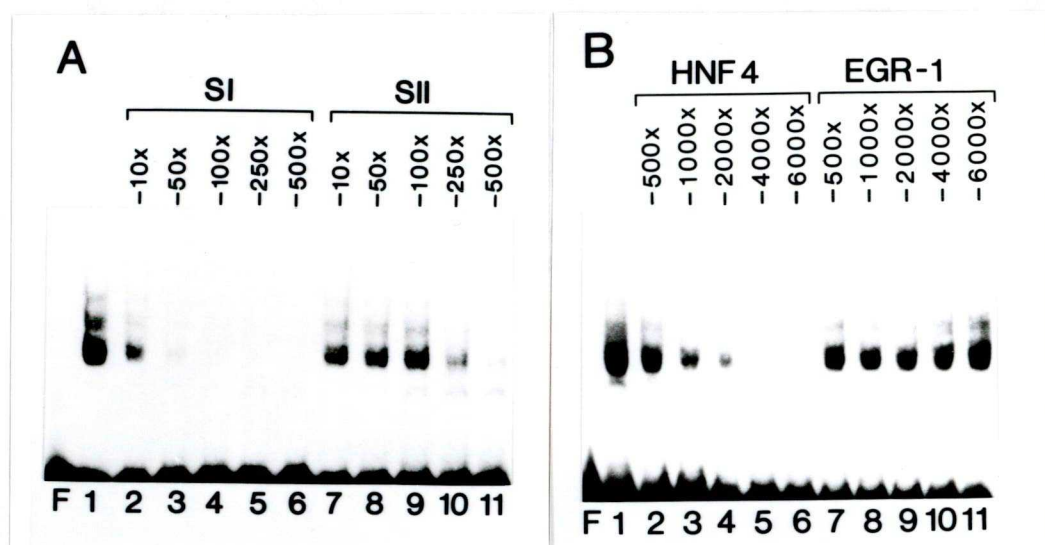
Az eredmény nagy feleslegben (>5000 -szeres) történő alkalmazás esetén pozitív, az SII képes eltüntetni az SI komplexhez tartozó sávot (16. ábra 3. minta). A részletesebb analízis érdekében különböző kompetitor koncentrációkkal is megismételtük a kísérletet (17/A. ábra 7-11. minták), és azt a megállapítást tehetjük, hogy



16. ábra SI-CEF NE gélelektroforézis képe különböző kompetitorok jelenlétében. 30.000cpm SI próbához 0.5mg poli(dI-dC) jelenlétében >5000-szeres feleslegben SII, Sp1, AP2, és HNF4 felismerőhelyet tartalmazó, duplaszálú, jelöletlen oligonukleotidot adtunk. A fehérje komponens 2.5 μ g CEF NE volt. Az F. mintához nem adtunk fehérjét, a 1. minta pedig nem tartalmazott oligomer kompetitort.

az SII kb. 250-szeres feleslegben teljesen kiszorítja az SI-t komplexéből. Ez az érték kb. ötször rosszabb, mint a homológ kompetícióhoz tartozó érték, a HNF4 oligonukleotid kiszorítási képességénél viszont négyszeresen jobb.

Elvégeztük a fordított irányú kísérletet is, amelyben az SII-t jelöltük meg radioaktívan, és hideg SII, SI valamint HNF4 hozzáadásával vizsgáltuk a komplex eltűnését (18. ábra). Érdekes, hogy a homológ oligomer és az SI ebben az esetben egyforma felesleg (250-szeres) alkalmazásával okozta a nagyobb mozgékonyságú komplex teljes eltűnését. Meg kell jegyezni, hogy az SII két eltolódott sávot ad, amelyekből a nagyobb mozgékonyságú ugyanabban a magasságban fut, mint az SI próba esetén, az alacsonyabb mobilitású sáv mibenlétéről nem sokat tudunk. Az azért látszik, hogy mind az SI, mind az SII, mint hideg kompetitor képes eltüntetni ezt a kisebb mozgékonyságú sávot kb. 100-szoros feleslegben adagolva.



17. ábra. Az SI, SII, a HNF4 és a WT1 felismerési szekvenciát tartalmazó oligomerek kompetíciós analízise. 30000cpm SI próbát, és 2.5 μ g CEF NE-t tartalmazó elegybe növekvő mennyiségű jelöletlen, duplaszálú oligonukleotidot adtunk az ábrán feltüntetett feleslegben, 0.5mg poli(dI-dC) jelenlétében. F. jelű minták nem tartalmaztak fehérjét, 1. sorszámúak pedig kompetitort.

A HNF4 oligomer kompetíciós sajátosságai a nagyobb mozgékonyaságú sáv esetén hasonló, mint amit az SI próbával elvégzett kísérletekben tapasztaltunk. Az viszont figyelemre méltó, hogy a HNF4 már 50-szeres alkalmazás esetén is teljes mértékben kiszorítja az SII-t a kisebb mozgékonyaságú komplexből, ez talán arra enged következtetni, hogy az SII-fehérje komplex képzésében a HNF4 fehérje is részt vehet.

Az SI és SII közötti keresztkompetíciós tesztek azt sejtetik, hogy az elemekhez kapcsolódó protein(ek) hasonló kötési tulajdonságokkal rendelkeznek.

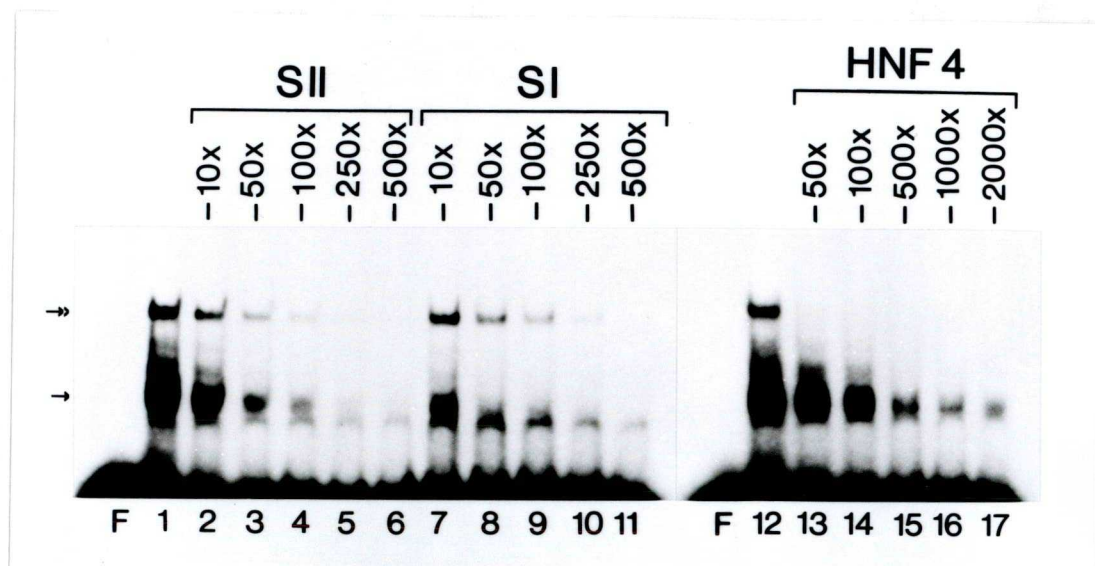
VII.3.6. A kölcsönhatás természetének kétértékű kation függése

A transzkripciós faktorokról írt bevezetőben említettünk, egy nagy családot, a "Zn-finger" proteineket, amelyek DNS kötésükhöz Zn^{2+} -t igényelnek. Emellett lehet tudni azt is, hogy a HNF4 egy Zn-finger típusú fehérje [160], (illetve a WT1 is az [134]). Ez sarkallt minket arra, hogy megnézzük EMSA reakcióban, hogy a különböző kétértékű kationoknak milyen a hatása a kötődésre. Ez annál is inkább szükségesnek látszott, mert a NE készítése során az oldatok gyakorlatilag mindvégig tartalmaztak EDTA-t, amely ezekkel az ionokkal nagy előszeretettel képez komplexeket. Ezért 0.3, 1.0 3.0mM, Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} jelenlétében is elvégeztük az EMSA-t, SI-t, mint próbát használva. A kísérletsorozat tartalmazott egy olyan reakciót is, amelyhez viszonylag nagy mennyiségű (5mM) EDTA-t adtunk. Az eredményt a 19. ábrán láthatjuk. A réz és a kobalt 1mM-os koncentrációjánál eltolódott sávot már nem figyelhetünk meg, a jel a gél zsebeinél maradt. A cinknek különösebb hatása nem volt, a magnézium szintén inertnek tűnt, míg a mangán és a kalcium megnövelte a DNS-fehérje kölcsönhatás erősségét (a mangán esetében 3mM-os koncentrációjánál a hatás kezdett visszafordulni). Érdekes az EDTA okozta változás. Olyan benyomást kelt, mintha elősegítené a kötés kialakítását, de ezt későbbi kísérleteink nem erősítették meg, s az EDTA-nak ebben a koncentráció-tartományban nincs befolyása a kölcsönhatásra.

Mivel az o-fenantrolinról ismert, hogy specifikus Zn^{2+} kelátképző, ezért elvégeztünk egy olyan kísérletet is, amelyben 0.3, és 3.0mM EDTA, o-fenantrolin, és ciszteín jelenlétében hajtottuk végre a reakciót (a ciszteint a Zn finger domén aminosavainak homológ kompetitoraként használtuk). Mivel egyik komplexképzővel sem kaptunk csökkenést az eltolódott sávok intenzitásában (s a cinknek sem tudtunk soha kimutatni intenzitás növelő hatását), ezért azt a következtetést vontuk le, hogy nem valószínű, hogy Zn-finger típusú faktorról van szó.

Érvek és ellenérvek a HNF4-gyel kapcsolatban

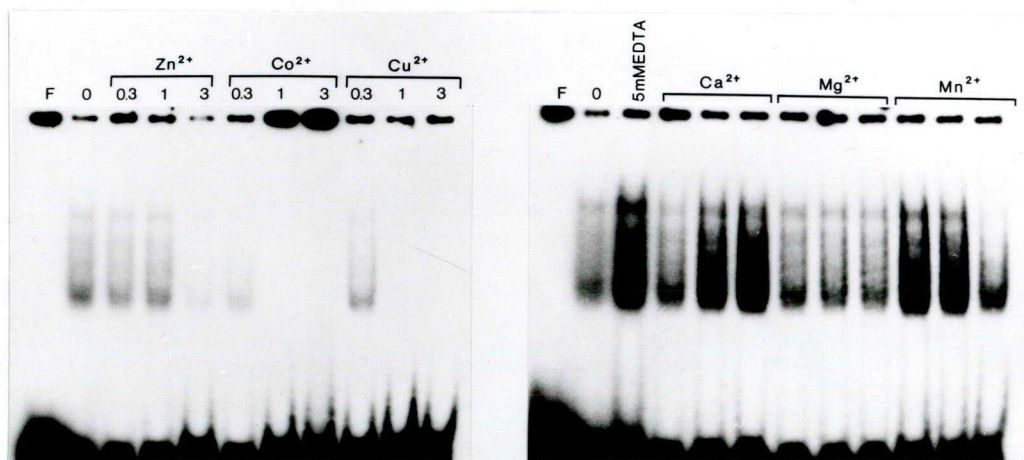
Ezek után joggal merül fel a kérdés, hogy az SI-hez kötődő fehérje HNF4 avagy sem. A fehérje mellett szól,



18. ábra. Az SII-(CEF NE) kölcsönhatás vizsgálata kompetíciós EMSA kísérletben. Minden reakció elegy 30000cpm SII-t, 2.5 μ g CEF NE-t (az F. jelűeket kivéve), 0.5mg poli(dI-dC)-t. 2-6., 7-11., és 13-17. minták növekvő mennyiségű SII, SI, és HNF4 felismerési szekvenciájú oligomereket tartalmaztak az ábrán feltüntetett feleslegben.

hogy az a szekvencia, amelyhez kötődik, verseng az SI-hez kapcsolódó fehérjéhez való kötésért. Igaz ez a kompetíció nem túl erős, de a többi oligonukleotidhoz képest mégiscsak létezik. Ellene szól az, hogy a HNF4-ről leírták, hogy Zn-finger típusú, s a fent bemutatott kísérletek nem utalnak a Zn^{2+} különös jelentőségére. Ugyanúgy problémát jelent az is, hogy a HNF4 funkcióját tekintve aktivátor, és nem represszor [158]. Azért, hogy végképp megbizonyosodjunk arról, hogy mégsem ez a fehérje képezi az SI elemmel a vizsgált komplexet elvégeztünk még néhány kísérletet, amelyeket csak nagy vonalakban ismertetünk.

A HNF4 forrás-szövege elsősorban a máj (hepatocyte nuclear factor 4), ezért J.Moitra patkány májból készített magi extraktot, és ezzel is elvégeztük az EMSA-t mind úgy, hogy az SI volt a próba, és úgy is, hogy a HNF4 oligonukleotidja volt a próba, s a protein oldalról a CEF NE valamint a patkány máj magi kivonat (RL NE) szerepelt. Az EMSA képek alapján kizárhatjuk, hogy a



19. ábra. Az SI és a CEF NE kölcsönhatás kétértékű kation függése. Az EMSA reakciókat az ábrán feltüntetett végkoncentrációjú kétértékű kationok, illetve 1 minta esetén EDTA jelenlétében hajtottuk végre (30.000cpm SI, 2.5µg CEF NE, 0.5mg poli(dI-dC)).

vizsgált SI komplex protein komponense a HNF4 fehérje. Ugyanezt a következtetést támasztják alá a protein molekulatömegének becslésére elvégzett kísérletek.

VII.3.7. Az SI és SII metilációs interferencia képe

Ezek után - mivel a transzkripciós faktor adatbankból kiválogatott faktorok egyikéről sem hisszük, hogy a tanulmányozott fehérje lenne - egy olyan technika alkalmazásába kezdtünk, amely segítségével részletesen lehet térképezni a DNS-en azokat a nukleotidokat (aktuálisan: G-ket), amelyek a fehérjével való kölcsönhatásban kulcsszerepet játszanak. A választás alapjául az szolgálhat, hogy az SI és SII is meglehetősen G gazdag, s ezért valószínű, hogy a kölcsönhatásban is elsősorban ezek vesznek részt. Kezdetben a DNS templát az SI duplaszálú oligonukleotid (egyik végén jelölve), s így tisztítatlan CEF NE-t tudtunk használni a reakcióban. Bár a módszert végül sikerült beállítani, sok technikai részlet problematikusnak bizonyult.

Ezért kitaláltunk egy olyan megoldást, amelyben a szintetikus oligonukleotidokat beépítettük B119+ HincII helyére, s a konstrukcióból a szokásos EcoRI és HindIII

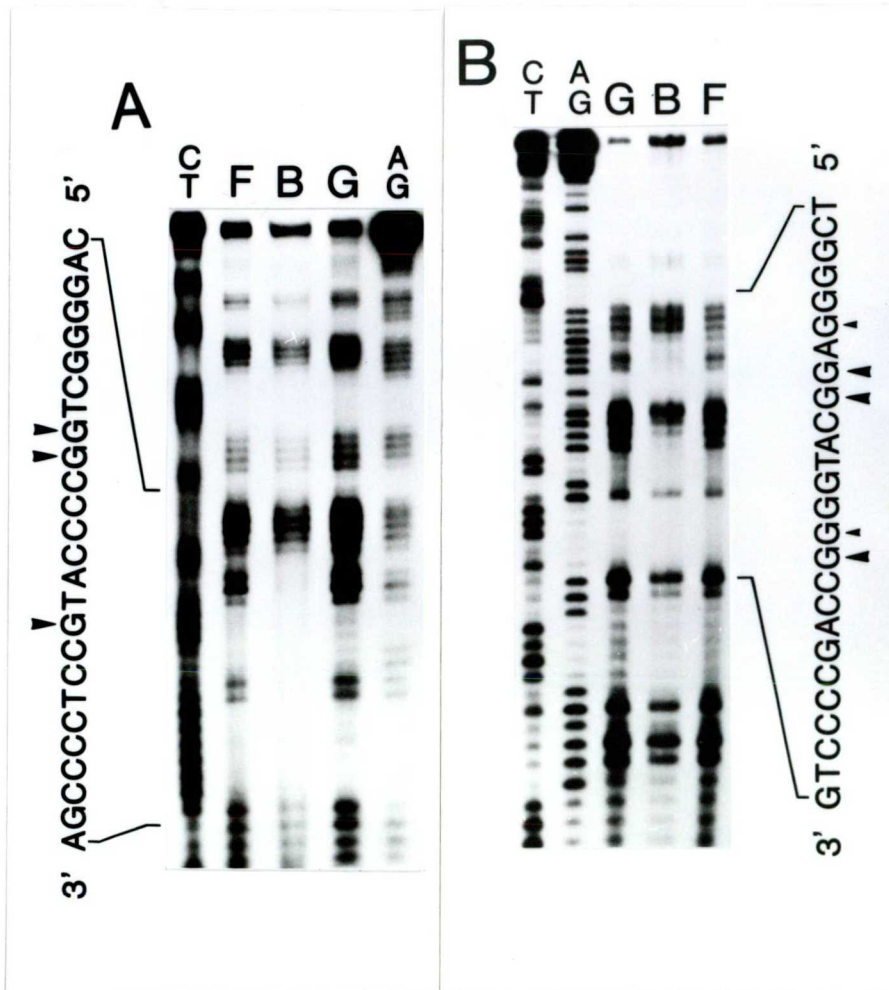
enzimeket használva szálspecifikusan végjelölt fragmentumokat állítottunk elő. Az így nyert DNS templáthoz minden további nélkül lehetséges NE-t használni. Hitünk szerint - az irodalomban leírt eljárásokat is beleértve - ez a változat a legjobb, mert lehetővé teszi magi fragmentumok használatát (nem kell tisztítani a fehérjét), a DNS fragment mérete alapján jól kezelhető, nincsenek a periférikus helyzet miatt nem jól látható nukleotidok, az akrilamid gélen való futtatás, és a gél utókezelése sokkal kényelmesebb, valamint a kapott kép is meggyőzőbb. Összehasonlításként mind klónozott oligomerrel, mind szintetikus oligonukleotiddal kapott eredményre közreadunk egy-egy példát.

A 20. ábrán a klónozott oligonukleotiddal végrehajtott metilációs interferenciaképet mutatjuk be az SI elemre, mind a két szál vonatkozásában. A 21. ábrán pedig a szintetikus SII oligonukleotiddal kapott interferencia mintázatot láthatjuk. Az ábrákon nyilakkal jelöltük azokat a pontokat, amelyek a kísérlet alapján a kötődési helyeknek bizonyultak.

A 22. ábrán összefoglalóan ábráztuk a silencer elemekben a fehérjével közvetlen kölcsönhatásba lépő G nukleotidoknak, a régióban található DNÁZI védett szakaszoknak és hiperszenzitív helyeknek a viszonyát. Az SI elem esetén - ha csak az erősen kötődő helyeket tekintjük - ezek a pontok egy palindrom szekvenciát alkotnak (GGC(N)₅GCC), míg az SII-re egy fél palindrom esik (GGC(N)₅G). Ez talán magyarázatot adhat arra, hogy bár az SII köt egy ugyanolyan mobilitású komponenst EMSA-ban, mint az SI, de kompetíciós tulajdonságai lényegesen rosszabbak (5-ször) az SI-énél. Ugyanis, ha a fél palindrom is elég a fehérje kötődéséhez, de valójában a teljes szekvencia a korrekt felismerési hely, akkor logikusnak tűnik a fenti jelenség.

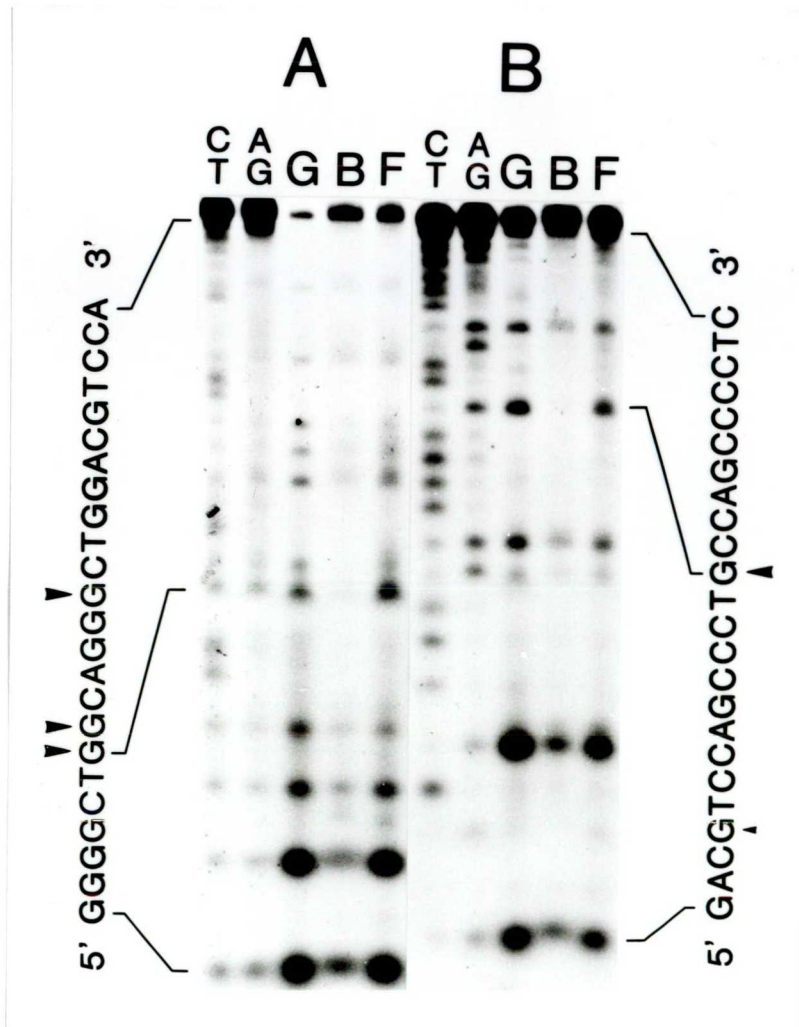
Ha a fent kapott szekvencia elem tartalmazza a főbb kötődési pontokat, akkor nem csodálkozhatunk rajta, hogy nem találtunk homológia kutatások alapján olyan transzkripciós faktort, amely beleillett volna a képbe, hisz egy ilyen szekvenciaelem merőben más paramétereket igényel a számítógépben.

Ezért nekirugaszkodtunk olyan DNS-kötő fehérje keresésének, amely a fenti metilációs interferenciaképet adja. A kutatás sikerrel zárult, mert a nuclear factor 1 (NF-I) a G nukleotidokat illetően teljesen hasonló mintázatot ad: GGC(N)₅GCC [179].



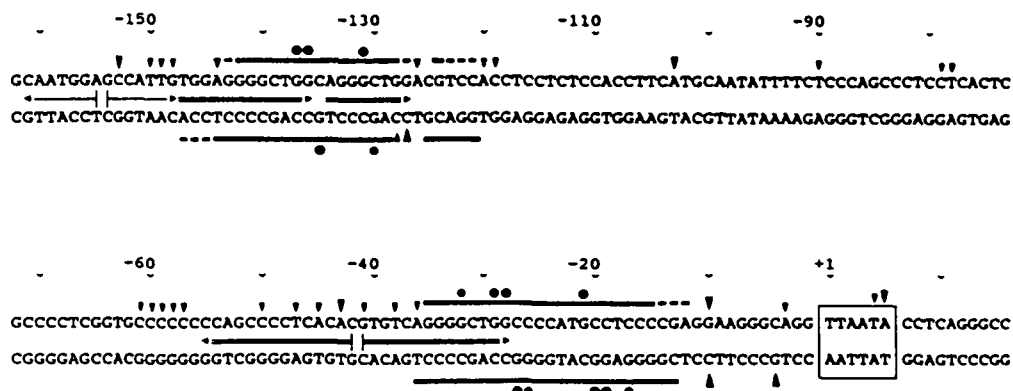
20. ábra. Az SI elem metilációs interferencia képe.

Az SI elemet Bl19+ HincII helyére klónozva, majd a polilinker **A**: HindIII helyén (kódoló szál), **B**: EcoRI helyén (nem kódoló szál) Klenow feltöltéssel megjelöltük, részlegesen metiláltuk, DNS-fehérje gélelektroforézis után a kötött és szabad DNS-t piperidinnel hasítottuk, majd azonos aktivitásokat PAGE-n megfuttattunk. AG, CT, G a megfelelő Maxam-Gilbert reakciókat jelöli, B: a komplexből származó, F: a kötetlen, szabad DNS mintát jelenti.



21. ábra. Az SII elem metilációs interferencia képe.

Az SII oligonukleotidot szálspecifikusan megjelöltük **A**: a kódoló szálán, **B**: a nemkódoló szálán. Részleges metilálás után ugyanazokat a lépéseket hajtottuk végre, mint amit a 20. ábra alatt leírtunk. A jelölések értelmezéséhez is arra szövegrészre hivatkozunk.



22. ábra. A CMP gén promoter környékének DNázI-gyel szemben védett régiói. Az ábrán vízszintes vonalakkal jelöltük a footprint analízis során védett régiókat, a nyilak a DNázI hiperérzékeny helyeket, a tömött, és üres karikák a fehérjéhez erősebben illetve gyengébben kötődő G-ket jelentik. Az ábra 5-6 párhuzamos kísérlet eredményét összegzi.

VII.3.8. UV keresztkötési kísérletek

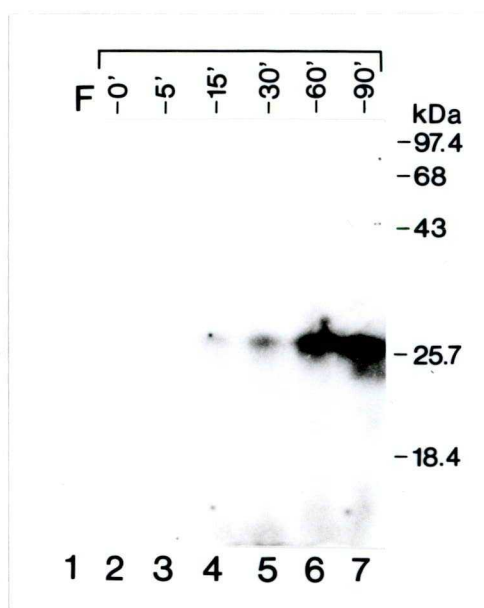
Eddig megtudtunk néhány dolgot a kutatott fehérje természetéről, de egy olyan fontos tulajdonságáról, mint a molekulatömege nem sokat sejtünk. Az EMSA kísérletekből az derül ki, hogy ez nem túlságosan nagy, de a technika nemigen alkalmas méret-meghatározásra. Ismert, hogy ha egy DNS-fehérje komplexet UV fénnel megvilágítunk kovalens kötés alakul ki közöttük. Ha a DNS dT helyett BrdU-t tartalmaz, akkor ennek a hatékonysága lényegesen megnövelhető, s ezáltal kialakítható egy olyan technika, amellyel a proteinek molekulatömegét meg lehet határozni. Az irodalomban úgy jártak el, hogy a vizsgálandó szekvencia szakaszt beklónozták valamilyen vektorba, primer extenzióval szál specifikusan építettek be α - ^{32}P -dXTP-t (X:A,C) illetve dTTP helyett BrdUTP-t használtak. Hogy csökkentsék a háttérrel általában a klónozó helyhez legközelebbi enzimekkel való hasítás után gélből izolálták a vizsgálandó fragmentumot, és ezt használták, mint DNS próbát a kísérleteikben [27]. Ezt mi

egyetlenegyszer sem követtük, hanem egy egészen más eljárást gondoltunk ki a próba előállítására, amely PCR alkalmazásán alapult.

A gondolatmenet lényege, hogy ha megfelelően beállítjuk a körülményeket, akkor amplifikációval sokkal nagyobb aktivitású próbákat lehet előállítani, mert csak egy bizonyos területre korlátozzuk a radioizotóp beépülését. Ugyanakkor, ha megfelelően közeli primereket választunk, akkor talán nincs is szükség a fragmentum gélből való izolálására (ami meglehetősen kellemetlen és veszélyes feladat), hanem közvetlenül felhasználható.

Ha van egy olyan DNS próbánk, ami elég nagy specifikus aktivitású, és dT helyett BrdU-t tartalmaz, akkor ezzel legalább két módon járhatunk el. Az egyik az ún. oldatfázisú reakció, amelyben egy hagyományos EMSA reakciót különböző ideig UV fénnel (366 nm) megvilágítjuk, majd nagy feleslegű DNázI-gyel a DNS-nek azt a részét, amely nem kötődött kovalensen a fehérjéhez leemésztjük. Ezt követően az elegyet fehérjegélen megfuttatjuk (SDS-PAGE) molekulaszúlymarkerek mellett. A másik, komplikáltabb módszer szerint a fentiek alapján előállított DNS próbával, és a NE-vel elvégzünk egy EMSA kísérletet, a gél nem szárítjuk be, hanem nedvesen exponáljuk. Az autoradiogram alapján a fehérje-DNS komplexet kivágjuk, eluáljuk, megvilágítjuk UV fénnel, kezeljük DNázI-gyel, s az így kapott elegyet futtatjuk meg fehérjegélen. Lehetséges az is, hogy a megvilágítást, és az endonukleáz emésztést *in situ* még a gélben hajtsuk végre, s csak ezután eluáljuk.

Mi az összes változatot megcsináltuk, de a 23. ábrán csak az oldatfázisú kísérlet eredményét mutatjuk be. A fehérje komponens a legtöbb esetben CEF NE volt. A DNS próbát úgy állítottuk elő, hogy az SI oligonukleotidot B119+ vektor HincII helyére klónoztuk, majd a "-20" illetve a reverz primerrel (M13 primerek) ^{32}P -jelölt, BrdU-t tartalmazó fragmentet állítottunk elő PCR reakcióval. A termékből a HincII helyhez legközelebb eső PstI és XbaI enzimekkel kivágtuk az SI elemet tartalmazó szakaszt, s ezt használtuk a reakcióban (az enzimeket nem zavarja a BrdU!). A különböző ideig való megvilágítás képét mutatja a 23. ábra, s ebből a protein molekulatömegét 28 kDa-ra becsültük.



23. ábra. Az SI és a CEF NE UV keresztkötési reakciója.

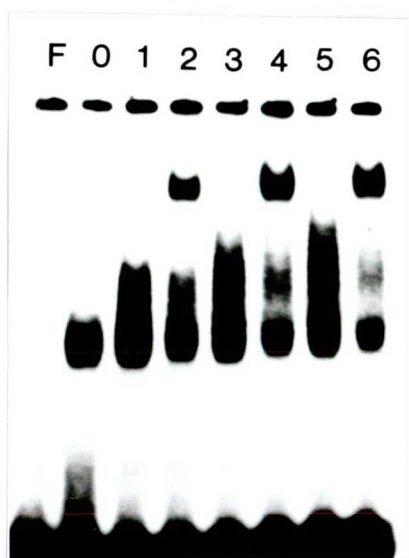
Bl19+ HincII helyére klónoztuk az SI oligomert, majd PCR segítségével olyan - szálon belül radioaktívan jelölt próbát - állítottunk elő, amely dT helyett BrdU-t tartalmazott. 120000cpm DNS próbát 10 μ CEF NE-vel keresztkötöttük 0.5mg poli(dI-dC) jelenlétében (EMSA körülmények között) UV fénnel való megvilágítással. Az ábra a különböző ideig tartó megvilágítás hatását mutatja.

Az, hogy az egyre hosszabb megvilágítás hatására csak a 28 kDa-os sáv intenzitása növekedett, más fő komponens nem jelent meg, arra utal, hogy ez kizárólagos kapcsolat. Az eredmény több elvégzett kísérlet alapján reprodukálható, ugyanazt a NE-t használva.

A módszert egyébként már úgy is kipróbáltuk, hogy a T3-T7 primerekkel a PCR reakcióban kapott terméket rövidítés nélkül használtuk fel, és eredményként ugyanezt a molekulatömeget kaptuk.

VII.3.9. Supershift kísérletek

A fenti kép alapján igen erőteljes volt a gyanúnk, hogy a fehérjénk az NF-I családba tartozik. Ezt még az is megerősítette, hogy az intronban találtunk egy olyan szekvencia elemet (+874-es pozíciónál), amely az SI-gyel csak az NF-I felismerő szakaszon homológ, illetve az SII-vel csak a fél palindromban (a továbbiakban ezt CMP874-nek fogjuk nevezni). Ez a szekvencia is igen erőteljesen köti a vizsgált fehérjét (normál, és kompetíciós EMSA kísérletekkel igazoltuk). Az igazi bizonyítékot azonban a specifikus ellenanyaggal végzett kísérletek jelentenék. Naoko Tanese-től kaptunk a CTF/NF-I [26] N-terminális (DNS-kötő) doménje ellen nyúlban termelt ellenanyagot, amellyel supershift kísérletekben bizonyítottuk, hogy kötődik a fehérjénkhez (24. ábra).



24. ábra. Az SI-fehérje komplex vizsgálata CTF/NF-I ellenes ellenanyaggal DNS-fehérje gélelektroforézis kísérletben. 2.5 μ g CEF NE-t (F. kivételével) 30.000cpm SI próbát és 0.5mg poli(dI-dC)-t tartalmazó EMSA reakció keverékhez 2: 1 μ l, 4: 3 μ l, 6: 5 μ l preimmun szérumot, illetve 3: 1 μ l, 5: 3 μ l, 7: 5 μ l a CTF/NF-I DNS-kötő doménje ellen termeltetett ellenanyagot adtunk. 1. sem ellenanyagot, sem szérumot nem tartalmazott.

A kísérlet egy hagyományos EMSA, csak a reakciókeverékhez adunk ellenanyagot is. Ha ez specifikusan felismeri a fehérjét, akkor ún. supershiftet (sokkal alacsonyabb mozgékonyaságú sávot) kapunk. Az ábrán szereplő kísérletben különböző mennyiségű ellenanyagot adtunk az elegyhez, s már a legkisebb mennyiség hozzáadása esetén is gyönyörű eltolódást kaptunk. Kontrollként preimmun szérumot használtunk, s párhuzamosan azonos mennyiségeket adtunk a reakciókeverékhez. Az NF- κ B fehérjék úgy épülnek fel, hogy az N-terminális doménjük ismeri fel a DNA-t, s ez meglehetősen konzervált, és a variábilis C terminális doménje pedig a replikációs illetve a transzkripcionális szabályozásért felelős. Mivel az SI-fehérje komplex reagált az NF- κ B DNA kötő doménje ellen termeltetett ellenanyaggal, ez arra enged következtetni, hogy az NF- κ B DNA kötő részével rokon domént hordoz, tehát az NF- κ B családba tartozik. További bizonyítékokat szolgáltatnak a mutációt hordozó oligonukleotidokkal elvégzett kísérletek.

VII.3.10. Mutációkat hordozó oligonukleotidok

A metilációs interferencia képből meghatározott fehérje kapcsolódási pontokat megváltoztattuk, és olyan oligonukleotidokat szintetizáltunk, amelyek különböző helyeken és mértékben eltérnek az eredeti szekvenciától. Ezeket EMSA-ban illetve kompetíciós EMSA-ban teszteltük. Az *in vitro* eredmények a 25., 26. ábrákon láthatóak. Az első mutáns oligonukleotidnak maga az SII számít, amely a teljes palindrom helyett csak a felét tartalmazza. Ezen kívül a következő mutációkat hordozó oligonukleotidokat terveztük meg (a könnyebb áttekinthetőség kedvéért a korábban bemutatott szekvenciákat is feltüntetjük):

SI 5' CAGGGGCTGGCCCCATGCCTCCCCGA 3'

SII 5' GAGGGGCTGGCAGGGCTGGACGTCCA 3'

Egyetlenegy nukleotidcsere:

M1 5' CAGGGGCTAGCCCCATGCCTCCCCGA 3'

A palindrom mindkét felében egy-egy pontmutáció:

M2 5' CAGGGGCTAGCCCCATGCTTCCCCGA 3'

Mindkét oldalon két-két pontmutáció:

M3 5' CAGGGGCTAAACCCCATGTTTCCCCGA 3'

Az első palindrom rész mutációja:

M4 5' CAGGGGCTAATCCCATGCCTCCCCGA 3'

A teljes palindromot érintő mutáció:

M5 5' CAGGGGCTAATCCCATATTTCCCCGA 3'

A GGC-CGG szekvenciát elválasztó szakasz rövidítése:

M6 5' CAGGGGCTGGCCATGCCTCCCCGA 3'

A palindromon belüli linkerben lévő nukleotidcserék:

M7 5' CAGGGGCTGGCCTTGTGCCTCCCCGA 3'

A HeLa NF-I-hez tartozó szekvencia [26]:

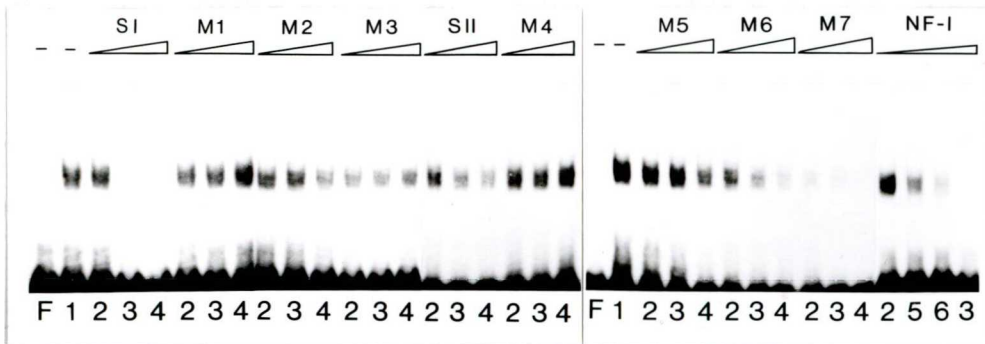
NF-I/o 5' TTTTGGCTTGAAGCCAATAT 3'

És végül a CMP gén első intronjában lévő szekvencia:

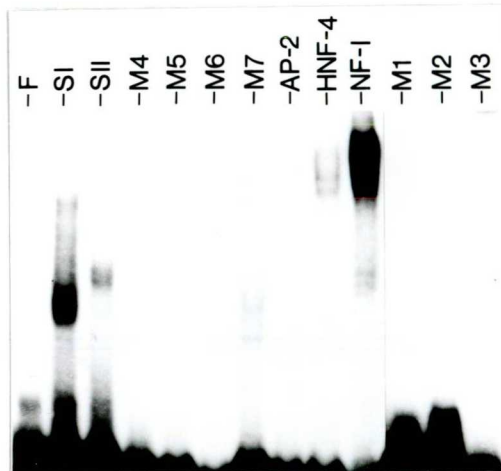
CMP874 5' CTCAATTCTGGCTTCATTCCACTTTG 3'

A szekvenciákon belül vastagítással jelöltük azokat a nukleotidokat, amelyek a fehérje azonosított kötődési pontjainak felelnek meg, és aláhúzással azokat, amelyek mutációként szerepelnek. Meg kell jegyezni, hogy minden fent említett mesterséges mutáció tranzíció. A 25. ábrán a mutációt hordozó, dupla szálú oligonukleotidokat, mint jelöletlen kompetitorokat használtuk, s azt állapíthatjuk meg, hogy egyedül csak az M7 volt képes kiszorítani a jelölt SI-t a komplexből nagy feleslegben.

Ezzel összhangban van a 26. ábra, ahol az összes eddig tesztelt oligonukleotidot (az Sp1 kivételével) az 5' végükön megjelöltük, és elvégeztük az EMSA-kat. Jól látható, hogy a mesterséges mutációt hordozó oligonukleotidok közül (M1-7) csak az M7 köt némi proteint, de lényegesen kevesebbet, mint a vad típusú szekvencia, a többi mutánshoz nem kapcsolódik semmilyen fehérje sem. Ki kell térnünk még a HeLa NF-I felismerőhelyet tartalmazó (NF-I/o) illetve a CMP gén első intronjában található CMP874 oligonukleotidok tulajdonságaira is (27. ábra). Mind a kettő igen erős kötődést mutat (CEF NE-vel szemben), és ha kompetíciós EMSA kísérletet végzünk velük úgy, hogy az SI szerepel, mint jelölt próba, akkor azt tapasztaljuk, hogy az intronális szakasz erősebben kötődik a fehérjéhez, jobban kompetál, mint az SI maga.

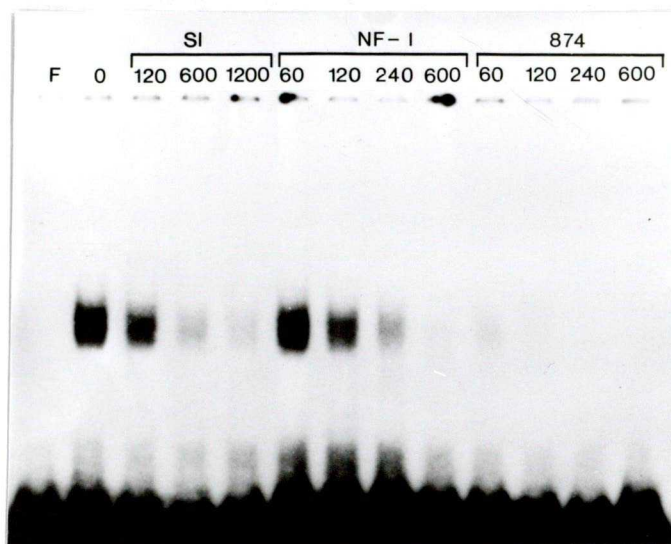


25. ábra Az SI elemen belül különféle mutációkat hordozó oligomerek kompetíciós sajátosságai az SI-(CEF NE) kölcsönhatással kapcsolatban. DNS-fehérje gélelektroforézis. Az F. minták nem tartalmaztak proteint, 1. sorszámúak pedig kompetitort. A reakcióelegyek 30.000 cpm SI oligonukleotidot, 2.5 μ g CEF NE-t, 0.5mg poli(dI-dC)-t és 2: 60 fmol, 3: 600 fmol, 4: 6000 fmol kompetitort tartalmaztak. M1-7. oligomerek, SII, NF-I (=NF-I/o) leírását, szekvenciáját ld. a szövegben.



26. ábra. Az SI elemen belül mutációkat hordozó oligomerek CEF NE-vel való kölcsönhatásának vizsgálata EMSA-ban.

Minden minta 60.000 cpm az ábra felső részén feltüntetett oligonukleotid próbát, 2.5 μ g CEF NE-t (kivéve F-t), 0.5mg poli(dI-dC)-t tartalmazott. F-ben SI volt a jelölt DNS. A szimbólumok jelentését ld. a szövegben.



27. ábra. Az SI, NF-I és CMP874 oligomerek kompetíciós sajátosságainak összehasonlítása az SI-(CEF NE) kölcsönhatással kapcsolatosan. EMSA. 30.000 cpm radioaktívan jelölt SI oligomert, 2.5 μ g CEF NE-t és 0.5mg poli(dI-dC)-t tartalmazó elegyekhez 60, 120, 240, 600 fmol - az ábra felső részén látható - duplaszálú oligonukleotidokat adtuk. F minta nem tartalmazott magi kivonatot, a 0. jelű minta pedig kompetitort.

Az NF-I/o nagyjából ugyanolyan erősen kapcsolódik, mint az SI. Ez utóbbi természetesnek tűnik, de a CMP874 ily mértékű affinitása meglepő, és bizonyosan további vizsgálatokat igényel.

VIII. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A következőkben összegezni fogjuk azokat az eredményeket, amelyeket az előző három fejezetben elértünk. Megpróbáljuk ezzel kapcsolatosan a további lehetőségeket, perspektívákat is felvázolni.

VIII.1. Nemradioaktív AIDS-diagnosztikai DNS-próbák.

1989-ben sikerült az HIV-1 vírus ellen olyan nemradioaktívan jelölt szintetikus oligonukleotid próbákat szintetizálni, amely néhány stratégia kombinált alkalmazásán alapult. A kapott konjugátumokat jellemeztük a szintézis hatékonysága, valamint az enzim aktivitás vesztése oldaláról (ilyen jellegű leírást az irodalomban nem találtunk). DNS oldalról nézve HRP-re hozzávetőlegesen 50%-os, AP-re 25%-os kitermeléssel sikerült szintetizálni enzim-oligonukleotid konjugátumokat úgy, hogy az enzimek legalább 65% (HRP) illetve 40% (AP) mértékben megtartották specifikus aktivitásukat. A próbák kimutatási határa a legjobb irodalmi értékeknek megfelelő [176].

Az alkalikus foszfatáz-konjugátumok szintézise és alkalmazása problematikus az enzim mérete miatt (147 kDa), pedig felhasználásuk azzal az előnnyel jár a HRP-vel szemben, hogy az eddig tesztelt összes AP 65°C-on stabilan megőrzi aktivitását, így a hibridizációt magas hőmérsékleten lehet végezni. A HRP-re ez a hőmérséklet 42°C. Valószínűleg lényeges javulást lehetne elérni olyan alkalikus foszfatázzal, amely mérete lényegesen kisebb. Halobacterium cutirubrum-ból Fitt [41] 15.5 kDa-os alkalikus foszfatázt tisztított homogenitásig, de ilyen jellegű kísérletekhez már nem tudtunk hozzákezdeni.

Másik lehetőség egyéb, kis méretű enzim keresése, mely termotabil, és nagy érzékenységgel detektálható. Ilyen pl. a biolumineszcens aequorin [131], melynek ún. riporter génként való alkalmazása az eukariota génszabályozás kutatásában kezd elterjedni az utóbbi időkben [168].

Az előzőekhez kapcsolódva annyi kiegészítést szeretnénk tenni, hogy - a fentiekhez hasonlóan - szintetizáltunk Salmonella illetve Listeria monocytogenes kimutatására is nemradioaktív próbákat, de ezek részletes tárgyalásába nem bocsátkozunk.

Végezetül csak utalásszerűen megemlítjük, hogy 5' aminált oligonukleotidokból szintetizáltunk fluoreszceinnel jelölt primereket szekvencia analízishez,

de - mert Magyarországon abban az időben még nem volt automata DNS szekvenátor - ezt a gyakorlatban nem tudtuk kipróbálni (ezzel együtt felkérésre készült). A szekvencia analízisnek viszont egy más vonatkozású fejlesztését végeztük el, amit a VI. fejezetben ismertettünk, s most összefoglalunk.

VIII.2. DNS szekvencia analízis hőstabil DNS polimerázzal.

A fent bemutatott eljárást abban az időben fejlesztettük ki, amikor az ilyen irányú kutatások iránt nagyon nagy volt az érdeklődés. Sok versenypartnerünk volt (az előző fejezetekben utaltunk rájuk), de úgy érezzük, hogy az általunk kifejlesztett módszer megállja közöttük a helyét. Az eljárás nagy előnye a többiekkel szemben, hogy gyors, egyszerű, sok minta egyidejű analízise is lehetséges vele. A gyorsasága abban rejlik, hogy nem szükséges a jelölési reakciót és a terminációs reakciót szétválasztani, hanem a kettő egy lépésben történik. Ez - tapasztalataink szerint - nem növelte észrevehetően a szükséges exponálási időt.

Ugyanakkor a módszer kielégíti azokat az általános elvárásokat, amelyek a laboratóriumi munka során jelentkeznek. Nem érzékeny a primer-templát koncentrációra, valamint más forrásból származó termotabil enzimekkel is végrehajtható. Igaz, hogy ez utóbbiról nem ejtettünk szót, de mi kipróbáltuk a Boehringer által forgalmazott Taq polimerázt is, és legalább olyan jó eredményt kaptunk, mint a Promegától beszerzett enzimmel.

A módszer kidolgozása során felismertük, hogy az enzim a várakozáson felül érzékeny az α -S-dATP jelenlétére. A velünk párhuzamosan, ugyanilyen témán dolgozó Vizard és mtsai [177] is hasonló következtetésre és megoldásra jutottak, azzal a különbséggel, hogy ők dCTP-t használtak, és két lépésben hajtották végre a reakciót.

Végezetül csak annyit tennénk még hozzá, hogy - bár úgy érezzük jó úton haladtunk - a dupla szálú DNS-re történő adaptációval bizonyos okok miatt egy kicsit elkéstünk, s az ezzel kapcsolatos eredmények publikálásában mások megelőztek bennünket [185]. Ezért figyelmünk más irányba: a szintetikus oligonukleotidoknak a gének transzkripcionális szabályozásának kutatásában történő felhasználása felé fordult.

VIII.3. A CMP gén SI és SII elemeinek és a hozzá kapcsolódó faktorok jellemzése.

Az VII. fejezetekben ismertettünk néhány olyan eredményt, amelyet a csirke porc mátrix fehérje gén transzkripció szabályozásának kutatása során elértünk. A következőkben megpróbáljuk összegezni az adatokat, és az ezekhez kapcsolódó következtetéseket.

A. Az SI elem szövetspecifitása

Miután a szintetikus SI oligonukleotidot megfelelő vektorokba klónoztuk, tranziens expressziós kísérletekben bizonyítottuk, hogy az NR1 régió belül található SI elem a különböző mesenchymális eredetű szövetekben egyaránt képes kifejteni a hatását. Ez az effektus nagy mértékben független volt az SI orientációjától, és heterológ promoteren (timidin kináz) is érvényesült (5., 6. táblázat). Összevetve az SI-gyel kapott CAT aktivitás értékeket az NR1 megfelelő adataival, azt láthattuk, hogy az SI majdnem ugyanolyan mértékben képes volt csökkenteni a riporter gén aktivitását, mint a teljes, 1.2kb-os szakasz. Ez alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a régió szabályozó aktivitásáért elsősorban az SI elem a felelős.

In vitro kísérleti körülmények között is megvizsgáltuk az elem szövetspecifitását (14. ábra). Eredményeink szerint az SI-hez kötődő fehérje a DNS-hez kapcsolódva ugyanolyan mozgékonyágú komplexet adott EMSA-ban a különböző szövetféleségek esetén. Ez képezte az alapját annak, hogy a továbbiakban a csirke fibroblaszt magi kivonatot használtuk modellként, mert ennek preparálása lényegesen egyszerűbb, jobban megoldott volt.

Az, hogy az SI elem silencerként működött a különféle mesenchymális sejtvonalakban, a kollagén II. gén szabályozásától eltérő mechanizmusra utal. Savagner [153] a patkány kollagén II. gén vizsgálatakor két olyan *szövetspecifikus* silencer elemet azonosított, amelyeknek - véleménye szerint - a gén térben és időben való regulációjában fontos szerepük van.

B. Az SI elemhez kapcsolódó faktor jellemzése

A további részletekbe menő vizsgálatokat *in vitro*, szintetikus oligonukleotidok felhasználásán alapuló technikák segítségével végeztük.

Transzkripció adatbankban való kutatás eredményeképpen kiválasztottunk néhány olyan faktort, amelyeknek DNS szekvencia felismerő helyei nagy fokú hasonlóságot mutattak az SI szekvenciájával. Ezek közül kompetíciós EMSA kísérletekben csak a HNF4 volt képes kiszorítani az SI-t komplexéből (16., 17/B. ábra). Később behatóbb vizsgálatok azt mutatták, hogy a HNF4 nem lehet a szóban forgó komplexben szereplő fehérje.

Az utóbbi évek során nagyon sok olyan módszer alakult ki, amely a DNS és fehérje kölcsönhatás természetét részletekbe menően, molekuláris szinten próbálja megfejteni. Ezek közül a legtöbb a DNS-en azoknak a pontoknak a meghatározására törekszik, amelyeken keresztül a protein kapcsolódik [12, 18, 43, 71, 98, 128, 132], s kevesebb foglalkozik a kölcsönhatásban résztvevő aminosavak azonosításával [14]. A fenti, nem részletezett módszerek közül mi metilációs interferenciával azonosítottuk azokat a G-ket, amelyek szerepet játszhatnak a fehérjével való érintkezésben. A választás alapjául az szolgált, hogy az SI és SII is meglehetősen G gazdag, s ezért valószínű, hogy a kölcsönhatásban is elsősorban ezek a nukleotidok vesznek részt.

Az eredmény (20., 22. ábra) egy fordítottnan ismétlődő szekvencia GGC(N)₅GCC, amely nagyfokú hasonlóságot mutatott az NF1 kötődési pontjaival [179].

Annak a lehetőségét, hogy a tanulmányozott fehérje valóban az NF1 családba tartozik, részletesen tanulmányoztuk. A HeLa NF1 felismerési szekvenciáját megszingetizálva kimutattuk, hogy ez a szekvencia elem ugyanolyan mértékben képes kiszorítani az SI-t a komplexéből, mint a homológ kompetitor (27. ábra).

A CTF/NF1 DNS kötő doménje ellen termeltetett ellenanyag segítségével, "supershift" kísérletekben igazoltuk, hogy ez az ellenanyag képes felismerni az SI komplexben szereplő fehérjét (24. ábra). Ezen adatok alapján azt a megállapítást tettük, hogy a tanulmányozott komplexben szereplő protein az NF1 fehérjecsaládba tartozik.

C. Az SI komplexben szereplő protein molekulatömegének meghatározása

A továbbiakban megpróbáltuk meghatározni az SI elemhez kapcsolódó fehérje molekulatömegét. Ehhez - általunk jelentősen javított formában - az UV keresztkötési technikát alkalmaztuk. A protein molekulatömege azonos CEF NE esetén 28 kDa-nak bizonyult (23. ábra), ami némileg kisebb az irodalomban közzétett értékeknél. Azonban ez nem elég erős ellenérv azzal szemben, hogy a vizsgált fehérje az NF1 családba tartozik, mert az NF1 fehérjék molekulatömegei meglehetősen heterogenitást (30 - 66 kDa) mutatnak [54, 59, 144]. Mindazonáltal ez a tény egy lehetséges alternatívát kínál a represszor működés mechanizmusát illetően (az aktivátor domén hiányzik, ld. később).

D. Elvi megfontolások az NF1 fehérjecsaládról

Az irodalmi bevezetőben már ismertettünk néhány dolgot az NF1 családról. Ez egy meglehetősen heterogén osztály, amely tagjai két fő szempontból mutatnak azonos viselkedést:

- serkentik az adenovírus replikációját,
- a DNS felismerési szekvenciájuk nagyon hasonlít egymáshoz, bár a konszenzus szekvenciát illetően némi eltérés tapasztalható, pl. (TGGA/C(N)₅GCCAA [82], vagy TGG(N)₇CCA [54]. Az általunk vizsgált fehérje azonosított érintkezési pontjai megfelelnek az irodalomban közzétett adatoknak.

Noha az NF1-t adenovírus replikációját serkentő faktorként fedezték fel [23, 179], később arra is fény derült, hogy a transzkripció iniciációjára is hatással van [34, 179]. Ez a legtöbb esetben aktivátor hatás, de ezen a téren némi bizonytalanság tapasztalható. Pl. a nukleoszómáknak a transzkripcióra gyakorolt hatásánál említettük, hogy a CTF/NF-I nem képes a DNS-hez kötődni akkor, ha a felismerési szekvencia a nukleoszóma belsejében van.

Egy más esetben Rossi [142] a kollagén I. gén transzkripciójának tanulmányozásakor azt találta, hogy az NF-I a TGF- β aktiváló hatását közvetíti. Nem világos azonban, hogy az NF-I-nek mi a szerepe TGF- β nélkül.

A kollagének (pl. I, II, III, IV) génjeihez kapcsolódva egyébként elég nagy gyakorisággal találunk NF-I elemet vagy a promoter környékén, vagy az 1. intronban

[149], ami azt sugallja, hogy ezek a fehérjék általában részt vesznek az extracelluláris mátrix génjeinek a szabályozásában.

Korábban már említettük, hogy az NF-I N-terminális doménje, amely a DNS felismerésért felelős, meglehetősen konzervált, s a C-terminális rész erőteljes heterogenitást mutat, ami vélhetően a fehérje funkcionális sajátosságait hordozza. Ennek a doménnek a változatossága pedig a funkció sokféle módját sejteti.

Végül még azt az észrevételt tennénk, hogy az NF-I, mint a (virális) replikációt elősegítő faktorként vált ismertté, s a CMP gén elsősorban a proliferatív chondrocytákban fejeződik ki. Nem lehetetlen, hogy a két esemény (replikáció, transzkripció) összehangolásában ilyen közös faktorok játszanak szerepet.

E. AZ SI-hez hasonló elemek a CMP génben

Az SII és az SI régiók összehasonlítása

A DNÁZI footprint kísérletekben nemcsak az SI-t sikerült azonosítani, hanem egy másik hasonló hosszúságú szakaszt (SII) is. A két elem 10 bp hosszon 100%-os homológiát mutat (ld. korábban). Ezért kompetíciós EMSA kísérletekben vizsgáltuk, hogy a két elemhez kötődik-e hasonló jellegű fehérje. Bebizonyosodott, hogy az SII képes kiszorítani az SI-t komplexéből, igaz kevésbé, mint a homológ kompetitor (17/A. ábra). Fordítva elvégezve a kísérletet (az SII a próba) az SI és SII kompetíciós sajátosságai megegyeztek. Ez nagy mértékben arra utal, hogy hasonló faktorról van szó.

Az SII-re is elvégeztük a metilációs interferencia analízist, és azt tapasztaltuk, hogy a kötésben szereplő G nukleotidok az SI-re kapott palindrom szekvenciának a felét képezik (21., 22. ábra). Mivel ismert, hogy az NF-I képes kötődni a fél szekvenciához is [54], ezért kézenfekvő volt a következtetés, hogy ehhez az elemhez is NF-I kapcsolódik, csak lényegesen gyengébben.

Az SII DNS-fehérje gélelektroforézis képe némileg bonyolultabb, mint az SI-é, mert tartalmaz egy kisebb mozgékonyságú sávot is (18. ábra). Ez mind SII-vel, mind SI-gyel, mint "hideg" kompetitorral eltüntethető. Érdekes megjegyezni, hogy a HNF4 felismerési szekvenciáját tartalmazó oligonukleotid is viszonylag kis moláris felesleg esetén képes volt kiszorítani az SII-t a komplexből, továbbá EDTA adagolásával ez a sáv eltűnik.

Bár a fenti megfigyelések sejtetik a HNF4 kötődését, ez azonban még további közvetlen bizonyítékokat igényel.

Az SII tranziens expressziós kísérletekben való vizsgálata jelenleg folyamatban van, és az előzetes eredmények azt sejtetik, hogy az SI-nél gyengébb, de silencer aktivitása van.

Az intronális CMP874 régió

Az intronban lévő transzkripcionális elemek azonosítása nem tartozott kifejezetten a mi feladatkörünkhöz, egy bizonyos ok miatt azonban mégis szót ejtünk róla. Ha összevetjük a metilációs interferencia kísérlet alapján azonosított G nukleotidokat ennek a szakasznak a szekvenciájával meglepődve tapasztalhatjuk, hogy ez a régió is tartalmaz NF-I felismerési szekvenciát. A homológia gyakorlatilag csak az érintkezési pontokra terjed ki:

```
SI          5' CAGGGGCTGGCCCCATGCCTCCCCGA 3'
                XXXXX  XXX XX X
CMP874      5' CTCAATTCTGGCTTCATTCCACTTTG 3'
```

Kompetíciós EMSA kísérletek támasztották alá, hogy a sejtésünk igaz. Sőt - mint kiderült - a CMP874 oligonukleotid hamarabb kiszorítja az SI-t a komplexből, mint maga az SI, ami arra utal, hogy a kötődése is erősebb (27. ábra). Tehát csakúgy, mint több kollagén gén esetén a CMP gén 1. intronjában is találtunk olyan elemet, amelyhez vélhetően NF-I kapcsolódik.

Hasonlóan az SII-höz a tranziens expressziós kísérletek folyamatban vannak ezzel a szekvencia részlettel is.

A közeljövőben szándékunkban áll mindkét elemmel (SII, CMP874) UV keresztkötési, valamint specifikus ellenanyaggal, "supershift" kísérleteket is elvégezni. A CMP874-re vonatkozó metilációs interferencia analízis is a közeljövő feladata.

F. Egyéb ECM génekhez tartozó szabályozó elemek

Mivel a CMP funkciója más extracelluláris mátrix elemekkel kölcsönhatásban fejeződik ki, ezért lehetséges, hogy ezek transzkripcionális szintű regulációjában is találunk hasonlóságokat.

Korábban említettük, hogy a patkány II. típusú kollagén génnel kapcsolatban azonosítottak két, szövetspecifikusan működő silencer elemet. Ez teljesen más

jellegű transzkripcionális szabályozást valószínűsít [153].

A VI. típusú kollagén promoterének jellemzése is az utóbbi idők eredménye [92]. A szerzők nem tudtak azonosítani a génhez tartozó TATA motívumot, s ez jelentős eltérésnek számít a többi, ismert kollagén promoterhez (amelyek többnyire tartalmaznak TATA elemet [149]), valamint a CMP génhez képest is.

Általában a kollagén génekre jellemző, hogy van TATA boxuk, s emellett sokszor előfordul a CCAAT motívum is [15, 149]. Mint korábban említettük gyakran tartalmaznak NF-I típusú szekvencia elemeket, amelyek közül az I. kollagén esetén bizonyították, hogy a TGF- β aktivátor hatásának közvetítésében van szerepe.

A kapcsoló fehérje promoterének jellemzése során [140] a CMP gén "+64" pozíciójától indulva találtak egy 13 bp-os homológ szakaszt, de ez vizsgálataink szerint a transzkripció szabályozásában nem játszik szerepet.

Összefoglalóan azt mondhatjuk, hogy a felsorolt példák egyikében sem találtunk meggyőző hasonlatosságot az általunk kapott eredményekhez.

G. Néhány lehetséges mechanizmus az SI működésére vonatkozóan. Szükséges bizonyítékok

Mivel az SI régió a tranziens expressziós kísérletekben egyedül is erőteljes mértékben csökkentette a CAT gén aktivitását, ezért feltételezhetjük, hogy ennek a szakasznak a silencer hatása nincs összefüggésben a többi említett elemmel. A represszor hatás magyarázatára több lehetőség kínálkozik (a jelenlegi ismeretanyag alapján, a teljesség igénye nélkül):

1. Rögtön egy olyan alternatívával kezdjük, amelyre már végeztünk ellenőrző kísérleteket, s ez nem valószínűsíti ezt a változatot. Több ízben hivatkoztunk rá, hogy a CTF/NF-I nem képes felbontani a nukleoszóma struktúráját. Ezért felvetődött a gondolat, hogy a represszor hatást a hisztonok okozzák, alapállapotban a gén ezek miatt "csendes", s a kapcsolódó fehérjének más funkciója van. A H1 hiszton ellenes ellenanyaggal elvégezve néhány "supershift" kísérletet, nem sikerült ezt az elképzelést alátámasztani. A másik kísérletes tény, ami szintén ez ellen az elképzelés ellen szól az, hogy - habár a genomikus felismerő szekvenciához a CTF/NF-I nem képes hozzákötődni - a kívülről bejuttatott DNS-hez igen [165]. Ez alapján talán kizárhatjuk, hogy a hisztonoknak

tulajdonítható a megfigyelt represszor hatás. Perdöntő bizonyítéknak szánjuk a részlegesen tisztított fehérje tesztelését *in vitro* transzkripció rendszerben. Ezt is a közeljövőben tervezzük végrehajtani.

2. A fehérje komponens egy olyan csonka, NF-I családba tartozó protein, amelynek működésképtelen vagy hiányzik a C-terminális aktivátor doménje, és ezért represszorként működik. Ezt az elképzelést támasztaná alá az, hogy a fehérje becsült molekulatömege kisebb a szokásosnál. Valódi bizonyítékot erre valószínűleg csak a fehérje primer szerkezetének a felderítése jelenthet.

3. A protein C-terminális doménje olyan elemet tartalmaz, amely csak indukció esetén aktiválódik. Erre láttunk egy példát, amelyben az NF-I közvetíti a TGF- β aktiváló hatását a kollagén I. gén esetében. Ennek alátámasztása szintén komplex vizsgálatokat igényel.

4. Utoljára egy olyan eshetőséget említünk, amelyben az NF-I nem egyedül, hanem egy másik faktorral való kapcsolat következtében működik represszorként. Bár vannak ebbe az irányba mutató jelek is, ebben a pillanatban a kérdést eldönteni nem tudjuk.

Számtalan más mechanizmus is lehetséges, de talán nincs értelme tovább boncolgatni, mert kísérletes bizonyítékok nem állnak rendelkezésre. Mi a fent bemutatott 2., 3. vagy 4. közül valamelyik változatot tartjuk elképzelhetőnek.

A további elképzelések egy részéről már szóltunk, de talán érdemes az *in vitro* transzkripció rendszer beállításának tervét kiemelni. Ezzel a technikával reményeink szerint lehetővé válik a fehérje funkcionális tesztelése. Hasonlóképpen vizsgálhatók olyan esetleges kölcsönhatások, amelyek befolyásolják a transzkripció hatékonyságát. El szeretnénk dönteni azt is, hogy a minimál promoteren belül a TATA boxon kívül vannak-e olyan szakaszok, amelyek nélkülözhetetlenek a transzkripció iniciációjához. Ilyen pl. az iniciációs pont környékén lévő CCAT szekvencia, amely DNázi footprint kísérletekben védettnek bizonyult.

IX. ÖSSZEFOGLALÁS

A molekuláris biológia fejlődésének nagy segítséget nyújtott a szintetikus DNS kémia kibontakozása. A biológia törvényeinek alaposabb megértéséhez sokszor olyan, molekuláris szintű kutatásokat kell végezni, amelyekben elengedhetetlen a szintetikus oligonukleotidok használata. Értekezésemben az oligonukleotidoknak a molekuláris biológiában történő számos alkalmazását mutattam be, konkrét feladatok megoldásán keresztül.

A dolgozat három fő részre tagolódik, a problémák jellegének megfelelően. Az első részben a DNS diagnosztika területéhez kapcsolódva, enzimekkel jelölt oligonukleotidokat állítottunk elő. Ennek a köznapi gyakorlatban van jelentősége, amennyiben lehetővé teszi a páciensekben fertőző organizmusok kimutatását.

A második rész egy szintetikus gén előállításában közben előálló problémára keresve a megoldást, egy új, hőstabil enzim használatán alapuló DNS szekvencia meghatározási eljárást ismertetett. Az egyre jobb szekvencia analízis eljárásoknak az alapkutatásokban van igen nagy jelentősége.

A harmadik rész pedig a csirke CMP génjének promotere előtt elhelyezkedő silencer elemeinek jellemzését foglalta magába, szinte kizárólag olyan technikák alkalmazásával, amelyek oligonukleotidok használatán alapultak. Ezek a fejezetek elsősorban elméleti, alapkutatásban fontos kérdések megválaszolását célozták. Ezen belül két eljárás területén jelentős fejlesztéseket, módosításokat végeztünk.

Torma peroxidázzal és alkalikus foszfatázzal jelölt szintetikus oligonukleotid próbák előállítása HIV-1 kimutatására

Az értekezésben ismertettük az HIV-1 kimutatására alkalmas négy oligonukleotid szintézisét, és ezeknek torma peroxidázzal (HRP) és alkalikus foszfatázzal (AP) való összekapcsolását. Tudomásunk szerint ez volt az első (vagy legalábbis az elsők között) olyan diagnosztikum, amelyben az enzim nem valamelyik nukleotid bázison lévő funkcióhoz csoporthoz, hanem az oligonukleotid végére szintetizált reaktív csoporthoz kapcsolódik.

Jellemeztük a szintézis hatékonyságát a DNS reagensre nézve. Ez az érték HRP-re átlagosan 50%, míg AP-re 25% volt.

Megvizsgáltuk a reakció hatását az enzim aktivitás vesztésére, és HRP esetén a legrosszabb esetben is az eredeti aktivitás 65%-át vissza tudtuk nyerni. AP esetén ez némileg rosszabb: 40-50% volt.

Belga kooperációban hibridizációs kísérletekben teszteltük a próbákat, és a kimutatási határuk a legjobb irodalmi értékeknek megfelelő 100attomol körül volt.

Új DNS szekvencia meghatározási módszer kidolgozása

Kidolgoztunk egy új, hőstabil enzim használatán alapuló egylépéses DNS szekvencia meghatározási eljárást. A hőstabil polimerázok alkalmazásának előnye az, hogy segítségükkel a DNS másodlagos szerkezetéből adódó - egyébként nehezen analizálható - régiók szekvenciáját magas hőmérsékleten nagy biztonsággal lehet meghatározni. A technika gyors, egyszerű, lehetővé teszi nagyszámú minta egy időben történő analízisét. A hőstabil enzimeknek a DNS szekvencia analízisbe való bevezetésében az elsők között voltunk a világon.

A csirke porc mátrix fehérje gén promoter 5' végi közeli silencer elemeinek jellemzése

A csirke porc mátrix fehérje gén transzkripcionális szabályozásának kutatása terén, a kutatócsoportunk más tagjaival szoros együttműködésben, a korábban footprint analízissel azonosított SI, SII elem részletes analízisét tűztük ki célul. Szinte kizárólag oligonukleotidokon alapuló technikákat alkalmazva a következő eredményeket értük el:

Tranziens expressziós kísérletekben bizonyítottuk, hogy az SI elem mesenchymális eredetű szövetekben egyaránt silencer hatású.

DNS-fehérje gélelektroforézis (EMSA) segítségével igazoltuk, hogy a különböző mesenchymális sejtvonalakból származó magi kivonatokból az SI ugyanolyan mozgékonyaságú komplexet képez.

Kompetíciós EMSA segítségével teszteltük, hogy milyen transzkripció faktor felismerési szekvenciája képes az SI-t kiszorítani a komplexéből.

EMSA segítségével megállapítottuk, hogy az SI-komplex esetén nem "Zn-finger" típusú fehérjéről van szó.

Metilációs interferencia kísérletekben azonosítottuk a fehérje-kötésben nélkülözhetetlen G nukleotidokat. Mivel az eredmény a következő palindrom szekvencia részlet volt: GGC(N)₅GCC), ez alapján feltételeztük, hogy NF-I típusú fehérjéről van szó. Közben kialakítottunk egy új,

véleményünk szerint jobb stratégiát a kísérlet végrehajtására.

Becslést végeztünk a komplexben szereplő protein molekulatömegére UV keresztkötési kísérletekben (28 kDa). Ehhez szorosan kapcsolódva, olyan új módszert dolgoztunk ki DNS próba előállítására, amely PCR alkalmazásán alapult, nagy specifikus aktivitású, fehérjével UV keresztköthető terméket eredményezett.

CTF/NF-I DNS kötő doménje ellen termeltetett ellenanyag segítségével alátámasztottuk, hogy az SI komplexben szereplő fehérje az NF-I családba tartozik.

Mutációkat hordozó oligonukleotidokkal elvégzett direkt és kompetíciós EMSA kísérletekkel további bizonyítékokat szereztünk annak bizonyítására, hogy NF-I típusú fehérje kötődik az SI elemhez.

Kompetíciós EMSA-ban vizsgáltuk, hogy az SI és SII elemhez kötődő fehérjék hasonló viselkedésűek-e. Eredményeink szerint az SII képes kiszorítani az SI-t komplexéből, és fordítva. Megfigyeléseink alapján az SII kötődése a fehérjéhez nem olyan erőteljes.

Metilációs interferencia kísérletben meghatároztuk az SII-n lévő, a proteinnel való kölcsönhatásban fontos G-keket. Megállapítottuk, hogy kötődési pontok megfelelnek az SI-gyel kapott palindrom szekvencia egyik felének. Ez alapján arra következtetésre jutottunk, hogy az SII is köt NF-I jellegű fehérjét, csak lényegesen gyengébben.

A gén első intronjában egy szekvencia szakaszcól kiderítettük, hogy igen erősen kötődik az SI-hez kapcsolódó fehérjéhez, és valószínűleg ez is NF-I családhhoz tartozó felismerési szekvencia. Végül néhány lehetséges alternatív modellt mutattunk be az SI működésének hatásmechanizmusát illetően.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni:

- Dr. Kovács Kornélnak, jelenlegi főnökömnek, akinek a vezetése, szakmai irányítása alatt a DNS szekvencia meghatározási eljárást, valamint a nemradioaktív DNS diagnosztikai próbákat kifejlesztettük, s akinek okos tanácsai, bölcs vezetői tulajdonságai példaértékűek maradnak számomra.

- Dr. Dobi Albertnek, aki a DNS szekvencia meghatározási eljárás kidolgozásában és a nemradioaktívan jelölt oligonukleotidok tervezésében szerzett magának kimagasló, élévülhetetlen érdemeket, s aki, mint "kis főnök" mindvégig rendkívüli segítőkészségéről tett tanúbizonyságot.

Köszönetet szeretnék mondani:

- Dr. Kiss Ibolyának, akinek a csoportjában megismerkedtem az eukariota génexpresszió szabályozásával kapcsolatos elméleti és gyakorlati problémákkal, s akinek az irányítása alatt, a dolgozat harmadik részeként tárgyalt, a csirke porc mátrix fehérje transzkripciós szabályozására vonatkozó kutatásokat végeztük.

- Jaideep Moitrának (JOY), Ph.D, akivel a harmadik fejezetben ismertetett munka során végig nagyon jó együttműködést tudtunk kialakítani; Rencendorj Altanchimegnek (Csimge), aki a transzfekciós kísérletek végrehajtásában jeleskedett, Bachrati Csanádnak, a számítógépes kutatásokkal kapcsolatos segítségért.

Megköszönöm

- Dr. Vigh Lászlónak, a Biokémiai Intézet igazgatójának segítőkész magatartását, akinek aktív támogatása nagy előrelépést jelentett a dolgozat elkészüléséhez.

Köszönetet mondok asszisztenseinknek: Halasi Szilveszternének, Simon Ferencnek, Fekete Ildikónak, Vörös Andreának szorgalmas munkájukért, Borka Andrásnak és Tóth Sándornának az ábrák igényes elkészítéséért.

Hálás vagyok feleségemnek Perei Katalinnak áldozatkész magatartásáért.

Végül, de nem utolsósorban, köszönetet mondok a "Magyar Tudományért Alapítvány"-nak támogatói segítségért.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Adams, S.P., K.S.Kavka, E.J.Wykes, S.B.Holder, G.R.Galuppi
J.Am.Chem.Coc. 105, 661 (1983).
- [2] Adolphe, M (szerk.)
Biological regulation of the chondrocytes
CRC Press, Boca Raton, 1992.
- [3] Alvarado-Urbina, G., G.M.Sathe, W.-C.Liu, M.F.Gillen, P.D.Duck, R.Bender, K.K.Ogilvie
Science 214, 270 (1981).
- [4] Amarnath, V., A.D.Broom
Chem.Rev. 77, 183 (1977).
- [5] Andrus, A., J.W.Efcavitch, L.J.McBride, B.Giusti
Tetrahedron Lett. 29, 861 (1988).
- [6] Ansorge, W., B.Sproat, J.Stegemann, C.Schwager, M.Zenke
Nucleic Acids Res. 15, 4593 (1987).
- [7] Argraves, W.S., F.Deák, K.J.Sparks, I.Kiss, P.F.Goetinck
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84, 464 (1987).
- [8] Ashburner, M.
Cell 61, 1 (1990).
- [9] Atwater, J.A., R.Wisdom, I.M.Verma
Annu.Rev.Genet. 24, 519 (1990).
- [10] Baldwin, J.P.
Curr.Op.Struct.Biol. 2, 78 (1992).
- [11] Beaucage S.L., M.H.Caruthers
Tetrahedron Lett. 22, 1859 (1981).
- [12] Ben-Hattar, J., P.Beard, J.Jiricny
Nucleic Acids Res. 17, 10179 (1989).
- [13] Benya, P.D., S.R.Padilla
Exp.Cell Res. 204, 268 (1993).
- [14] Blatter, E.E., Y.W.Ebright, R.H.Ebright
Nature 359, 650 (1992).
- [15] Bornstein, P., H.Sage
Progr.Nucl.Ac.Res. 37, 67 (1989).
- [16] Brennan, R.G.
Curr.Op.Struct.Biol. 2, 100 (1992).
- [17] Briggs, M.R., J.T.Kadonaga, S.P.Bell, R.Tjian
Science 234, 47 (1986).

- [18] Brunelle, A., R.F.Schleif
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84, 6673 (1987).
- [19] Caplan, A.I.
Sci.Am. 10, 82 (1984).
- [20] Caruthers, M.H., A.D.Barone, S.L.Beaucage,
D.R.Dodds, E.F.Fisher, L.J.McBride, M.Matteucci,
Z.Stabinsky, J.-Y.Tang
Methods in Enzymol. 154, 287 (1987).
- [21] Caruthers, M.H., G.Beaton, J.V.Wu, W.Wiesler
Methods in Enzymol. 211, 3 (1992).
- [22] Catlin J.C., F.Crammer
J.Org.Chem. 38, 245 (1973).
- [23] Challberg, M.D., S.V.Desiderio, T.J.Kelly,JR.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77, 5105 (1980).
- [24] Chehab, F.F., J.Wall, Y.W.Kan
Methods in Enzymol. 216, 135 (1992).
- [25] Chien, A., D.B.Edgar, J.M.Trela
J.Bacterology 127, 1550 (1976).
- [26] Chodosh, L.A., A.S.Baldwin, R.W.Carthew, P.A.Sharp
Cell 53, 11 (1988).
- [27] Chodosh, L.A., R.W.Carthew, P.A.Sharp
Mol.Cell.Biol. 6, 4723 (1986).
- [28] Chollet, A., E.H. Kawashima
Nucleic Acids Res. 13, 1529 (1985).
- [29] Chow F., T.Kempe, G.Palm
Nucleic Acids Res. 9,2807 (1981).
- [30] Conaway, R.C., J.W.Conaway
Ann.Rev.Biochem. 62, 161 (1993).
- [31] Conell, C., S.Fung, C.Heiner, J.Bridgham,
V.Chakerian, E.Heron, B.Jones, S.Menchen,
W.Mordan, M.Raff, M.Recknor, L.Smith, J.Springer,
S.Woo, M.Hunkapiller
BioTechniques 5, 342 (1987).
- [32] Cook, P.R.
Eur.J.Biochem. 185, 487 (1989).
- [33] Corden, J.L.
Curr.Op.Genet.Dev. 3, 213 (1993).
- [34] Courtois, S.J., D.A.Lafontaine, F.P.Lemaigre,
S.M.Durviaux, G.G.Rousseau
Nucleic Acids Res. 18, 57 (1990).

- [35] Dahl, B.H., J.Nielsen, O.Dahl
Nucleic Acids Res. 15, 1729 (1987).
- [36] Deák, F., E.Barta, S.Mestric, M.Biesold, I.Kiss
Nucleic Acids Res. 19, 4983 (1991).
- [37] Dobi, A.L.
A Humán Szérum Albumin gén IV. nagy fragmentjének
kémiai szintézise és klónozása
Egyetemi doktori értekezés. 1990. JATE Szeged.
- [38] Efimov, V.A., S.V.Reverdatto, O.G.Chakhmakhcheva
Nucleic Acids Res. 10, 5675 (1982).
- [39] Efimov, V.A., O.G.Chakhmakhcheva, Yu.A.Ovchinnikov
Nucleic Acids Res. 13, 3651 (1985).
- [40] Faisst, S., S.Meyer
Nucleic Acids Res. 20, 3 (1992).
- [41] Fitt, P.R., P.I.Peterkin
Biochem. J. 157, 161 (1976).
- [42] Franzen, A., D.Feinegard, M.Solursh
Differentiation 36, 199 (1987).
- [43] Friedmann, T., D.M.Brown
Nucleic Acids Res. 5, 615 (1978).
- [44] Froehler, B.C., M.D.Matteucci
Tetrahedron Lett. 24, 3171 (1983).
- [45] Froehler, B.C., P.G.Ng, M.D.Matteucci
Nucleic Acids Res. 14, 5399 (1986).
- [46] Froehler, B.C., M.D.Matteucci
Tetrahedron Lett. 27, 469 (1986).
- [47] Gabrielsen, O.S., A.Sentenac
Trends in Biochem. Sci. 16, 412 (1991).
- [48] Galas, D.J., A.Schmitz
Nucleic Acids Res. 5, 3157 (1978).
- [49] Garegg, P.J., I.L.T.Regberg, J.Stawinski,
R.Strömberg
Tetrahedron Lett. 27, 4055 (1986).
- [50] Garegg P.J., T.Regberg, J.Stawinski, R.Strömberg
Chemica Scripta 26, 59 (1986).
- [51] Gerstenfeld, L.C., W.J.Landis
J.Cell Biol. 112, 501 (1991).
- [52] Gibson, K.J., S.J.Benkovic
Nucleic Acids Res. 15, 6455 (1987).

- [53] Gilham, P.T., H.G.Khorana
J.Am.Chem.Soc. 80, 6212 (1958).
- [54] Gil, G., J.R.Smith, J.L.Goldstein, C.A.Slaughter,
K.Orth, M.S.Brown, T.F.Osborne
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85, 8963 (1988).
- [55] Gish, G., F.Eckstein
Science 240, 1520 (1988).
- [56] Gonda, M.A., F.Wong-Staal, R.C.Gallo,
J.E.Clements, O.Narayan, R.V.Gilden,
Science 227, 173 (1985).
- [57] Gough, G.R., M.J.Brunden, P.T.Gilham
Tetrahedron Lett. 22, 4177 (1981).
- [58] Gounari, F., R.De Francesco, J.Schmitt,
P.C.van der Vliet, R.Cortese, H.Stunnenberg
The EMBO J. 9, 559 (1990).
- [59] Goyal, N., J.Knox, R.M.Gronostajski
Mol.Cell.Biol. 10, 1041 (1990).
- [60] Greenblatt, J.
Nature 360, 16 (1992).
- [61] Greenleaf, A.L.
Trends in Biochem. Sci. 18, 117 (1993).
- [62] Grotjahn, L., R.Frank, H.Blöcker
Nucleic Acids Res. 10, 4671 (1982).
- [63] Grunstein, M.
Trends in Genet. 6, 395 (1990).
- [64] Grunstein, M.
Sci.Amer., 40 (1992).
- [65] Grzybowski, J., D.W.Will, R.E.Randall, C.A.Smith,
T.Brown
Nucleic Acids Res. 21, 1705 (1993).
- [66] Hahn, S.
Cell 72, 481 (1993).
- [67] Hall, R.H., Sir A.Todd, R.F.Webb
J.Chem.Soc. 3291 (1957).
- [68] Hamburger, V., H.L.Hamilton
J.Morphol. 88, 49 (1951).
- [69] Haralambidis, J., M Chai, G.W.Tregar
Nucleic Acids Res. 15, 4857 (1987).
- [70] Hardingham, T.E., A.J.Fosang
FASEB J. 6, 861 (1992).

- [71] Hayashibara, K.C., G.L.Verdine
Biochem. **31**, 11265 (1992).
- [72] Heintz, N.H.
Curr.Op.Cell Biol. **4**, 459 (1992).
- [73] Hélène, C., J.-J.Toulm  
Biochem.Biophys.Acta **1049**, 99 (1990).
- [74] Horvath, S.J., J.R.Firca, T.Hunkapiller,
M.W.Hunkapiller, L.Hood
Methods in Enzymol. **154**, 314 (1987).
- [75] Itakura, K., J.J.Rossi, R.B.Wallace
Annu.Rev.Biochem. **53**, 323 (1984).
- [76] Ito, H., Y.Ike, S.Ikuta,K.Itakura
Nucleic Acids Res. **10**, 1755 (1982).
- [77] Jablonski, E., E.W.Moomaw, R.H.Tullis, J.L.Ruth
Nucleic Acids Res. **14**, 6115 (1986).
- [78] Jackson, D.A., A.B.Hassan, R.J.Errington, P.R.Cook
The EMBO J. **12**, 1059 (1993).
- [79] Jackson, M.E.
J. Cell Sci. **100**, 1 (1991).
- [80] Jacob, T.M., H.G.Khorana
J.Am.Chem.Soc. **86**, 1630 (1963).
- [81] Jiménez-Garcia, L.F., D.L.Spector
Cell **73**, 47 (1993).
- [82] Jones, K.A., J.T.Kadonaga, P.J.Rosenfeld,
T.J.Kelly, R.Tjian
Cell **48**, 79 (1987).
- [83] Kaplan, B.E., K.Itakura
DNA Synthesi on Solid Support and Automation
'Synthesis and Applications of DNA and RNA'
ed. Narang, S.A. Academic Press, Inc., 1987.
- [84] Kaptein, R.
Curr. Op. Struct. Biol. **2**, 109 (1991).
- [85] Khorana, H.G., K.L.Agarwal, H.Büchi,
M.H.Caruthers, N.K. Gupta, K.Kleppe, A.Kumar,
E.Ohtsuka,
U.L.RajBhandary, J.H.van de Sande, V.Sgaramella,
T.Terao, H.Weber, T.Yamada
J.Mol.Biol. **72**, 209 (1972).
- [86] Khorana, H.G.
Science **203**, 614 (1979).
- [87] Kiss, I., F.Deák, T.Lukacsovich
Nucleic Acids Res. **16**, 1211 (1988).

- [88] Kiss, I., F.Deák, R.G.Holloway Jr., H.Delius,
K.A.Mebust, E.Frimberger, W.S.Algraves,
P.A.Tsonis, N.Winterbottom, P.F.Goetinck
J.Biol.Chem. 264, 8126 (1989).
- [89] Kiss, I., Zs.Bôsze, P.Szabó, R.Altanchimeg,
E.Barta, F.Deák
Mol.Cell.Biol. 10, 2432 (1990)
- [90] Kiss I.
Porcfelhérje gének szerkezete és működésének
szabályozása
Tézises doktori értekezés 1993.
- [91] Kohli, V., A.Balland, M.Wintzerith, R.Sauerwald,
A.Staub, J.P.Lecocq
Nucleic Acids Res. 10, 7439 (1982).
- [92] Köller, E., B.Trueb
J.Biochem. 208, 769 (1992).
- [93] Köster, H., A.Stumpe, A.Wolter
Tetrahedron Lett. 24, 747 (1983).
- [94] Köster, H., J.Biernat, J.McManus, A.Wolter,
A.Stumpe, Ch.K.Narang, N.D.Sinha
Tetrahedron 40, 103 (1984).
- [95] Labeit, S., H.Lehrach, R.S.Goody
DNA 5, 173 (1986)
- [96] Lee, D.Y., J.J.Hayes, D.Pruss, A.P.Wolffe
Cell 72, 73 (1993).
- [97] Leegwater, P.A.J., W.van Driel, P.C.van der Vliet
The EMBO J. 4, 1515 (1985).
- [98] Lemaire, P., C.Vesque, J.Schmitt, H.Stunnenberg,
R.Frank, P.Charnay
Mol.Cell.Biol. 10, 3456 (1990).
- [99] Letsinger, R.L. V.Mahadevan
J.Am.Chem.Soc. 87, 3526 (1965).
- [100] Letsinger R.L., W.B.Lunsford
J.Am.Chem.Soc. 98, 3655 (1976).
- [101] Letsinger, R.L., G.Zhang, D.K.Sun, T.Ikeuchi,
P.S.Sarin
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86, 6553 (1989).
- [102] Li, P., P.P.Medon, D.C.Skingle, J.A.Lanser,
R.H.Symons
Nucleic Acids Res. 15, 5275 (1987).
- [103] Lieberman, P.M., A.J.Berk
Genes and Dev. 5, 2441 (1991).

- [104] Madden, S.L., D.M.Cook, J.F.Morris, A.Gashler, V.P.Sukhatme, F.J.Rauscher III.
Science 253, 1550 (1991).
- [105] Maniatis, T., S.Goodbourn, J.A.Fischer
Science 236, 1237 (1987).
- [106] Markham A.F. M.D.Edge, T.C. Atkinson, G.R.Heathcliffe, C.R.Newton, D.Scanlon
Nucleic Acids Res. 8, 5193 (1980)
- [107] Marshall, W.S., M.H.Caruthers
Science 259, 1564 (1993).
- [108] Marugg, J.E., M.Tromp, E.Kuyl-Yeheskiely, G.A.van der Marel, J.H. van Boom
Tetrahedron Lett. 27, 2661 (1986).
- [109] Marx, J.L.
Science 227, 503 (1985).
- [110] McBride, L.J., M.H.Caruthers
Tetrahedron Lett. 24, 245 (1983).
- [111] Maxam, A.M., W.Gilbert
Methods in Enzymol. 65, 499 (1980).
- [112] Meehan, R., J.Leewis, S.Cross, X.Nan, P.Jeppesen
J.Cell Sci, Suppl. 16, 9 (1992).
- [113] Michelson, A.M., Sir A.R.Todd
J.Chem.Soc. (1955) 2632.
- [114] Miller, P.S.
Methods in Enzymol. 211, 54 (1992).
- [115] Mitchell, P.J., R.Tjian
Science 245, 371 (1989).
- [116] Miyoshi, K., T.Huang, K.Itakura
Nucleic Acids Res. 8, 5491 (1980).
- [117] Morse, R.H.
Trends in Biochem. Sci. 17, 23 (1992).
- [118] Mul, Y.M., C.P.Verrijzer, P.C. van der Vliet
J.Virol. 64, 5510 (1990).
- [119] Murakawa, G.J., J.A.Zaia, P.A.Spallone, D.A.Stephens, B.E.Kaplan, B.Wallace, J.J.Rossi
DNA 7, 287 (1988).
- [120] Müller, H.-P., W.Schaffner
Trends in Genet. 6, 300 (1990).
- [121] Narang, S.A.
Tetrahedron 39, 3 (1983).

- [122] Narang, S.A.
Development of Chemical Synthesis of
Polynucleotides
'Synthesis and Applications of DNA and RNA'
ed. Narang, S.A. Academic Press, Inc., 1987.
- [123] Nelson, P.S., R.A.Frye, E.Liu
Nucleic Acids Res. 17, 7187 (1989).
- [124] Ogilvie K.K., M.J.Nemer
Tetrahedron Lett. 21, 4145 (1980).
- [125] Ohtsuka, E., M.Ikehara, D.Shöll
Nucleic Acids Res. 10, 6553 (1982).
- [126] Ohtsuka, E., S. Iwai
Chemical Synthesis of RNA
'Synthesis and Applications of DNA and RNA'
ed. Narang, S.A. Academic Press, Inc., 1987.
- [127] Pabo, C.O., R.T.Sauer
Ann.Rev.Biochem. 61, 1053 (1992).
- [128] Papavassiliou, A.
Nucleic Acids Res. 21, 757 (1993).
- [129] Périgaud, C., G.Gosselin, J.-L.Imbach
Nucleosides and Nucleotides 11, 903 (1992).
- [130] Pomerantz, J.L., T.M.Kristie, P.A.Sharp
Genes and Dev. 6, 2047 (1992).
- [131] Prasher, D., R.O.McCann, M.J.Cormier
Bichem.Biophys.Res.Comm. 126, 1259 (1985).
- [132] Pu, W.T., K.Struhl
Nucleic Acids Res. 20, 771 (1992).
- [133] Quarto, R., G.Campanile, R.Cancedda, B.Doizin
J.Cell Biol. 119, 989 (1992).
- [134] Rabson, A.B., M.A.Martin
Cell 40, 477 (1985).
- [135] Ratner, L., W.Haseltine, R.Patarca, K.J.Livak,
B.Starcich, S.F.Josephs, E.R.Doran, J.A.Rafalski,
E.A.Whitehorn, K.Baumeister, L.Ivanoff,
S.R.Petteway Jr, M.L.Pearson, J.A.Lautenberger,
T.S.Papas, J.Ghrayeb, N.T.Chang, R.C.Gallo,
F.Wong-Staal
Nature 313, 277 (1985).
- [134] Rauscher III., F.J., J.F.Morris, O.E.Tournay,
D.M.Cook, T.Curran
Science 250, 1259 (1990).

- [135] Reese C.B., R.Saffhill
Chem.Comm. 767 (1968).
- [136] Reese, C.B., A.Ubasawa
Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 7, 5 (1980).
- [137] Rencendorj Altancsimeg
A csirke porc mátrix fehérje gén regulációja:
a promoter előtti és introni reguláló régiók
kölcsonhatása
Kandidátusi értekezés 1993.
- [138] Renkawitz, R.
Trends in Genetics 6, 192 (1990).
- [139] Renz, M., C.Kurz
Nucleic Acids Res. 12, 3435 (1984).
- [140] Rhodes, C., P.Savagner, S.Line, M.Sasaki,
M.Chirigos, K.Doege, Y.Yamada
Nucleic Acids Res. 19, 1933 (1991).
- [141] Riley, L.K., M.E.Marshall, M.S.Coleman
DNA 5, 333 (1986).
- [142] Rossi, P., G.Karsenty, A.B.Roberts, N.S.Roche,
M.B.Sporn, B.de Crombrughe
Cell 52, 405 (1988).
- [143] Ruggeri, Z.M., J.Ware
FASEB J. 7, 308 (1993).
- [144] Rupp, R.A.W., U.Kruse, G.Multhaup, U.Göbel,
K.Beyreuther, A.E.Sippel
Nucleic Acids Res. 18, 2607 (1990).
- [145] Sachs, A.B.
Cell 74, 413 (1993).
- [146] Saiki, R.K., Chu-An Chang, C.H.Levenson,
T.C.Warren, C.D.Boehm, H.H.Kazazian, H.A.Erlich
The New Engl.J.Medicine 319, 537 (1988).
- [147] Sambrook, J., E.F.Fritsch, T.Maniatis
Molecular Cloning. A laboratory manual
Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA 1989.
- [148] Sanchez-Pescador, R., M.D.Power, P.J.Barr,
K.S.Steimer, M.M.Stempien, S.L.Brown-Shimer,
W.W.Gee, A.Renard, A.Randolph, J.A.Levy, D.Dina,
P.A.Luciw
Science 227, 484 (1985).
- [149] Sandell, L.J., C.D.Boyd
Extracellular Matrix Genes
Biology of Extracellular Matrix: A Series
Szerk.: R.P.Mecham, Acad.Press, Inc. (1990).

- [150] Sanger, F., A.R.Coulson
J.Mol.Biol. 94, 441 (1975).
- [151] Sanger, F., S.Nicklen, A.R.Coulson
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 5463 (1977).
- [152] Sanger, F., A.R.Coulson, T.Friedmann, G.M.Air,
B.G.Barrell, N.L.Brown, J.C.Fiddes, C.A.Hutchison
III, P.M.Slocombe, M.Smith
J.Mol.Biol. 125, 225 (1978).
- [153] Savagner, P., T.Miyashita, Y.Yamada
J.Biol.Chem. 265, 6669 (1990).
- [154] Schibler, U., f. Sierra
Ann.Rev.Genet. 21 237 (1987).
- [155] Sequenase
Step-By-Step Protocols For DNA Sequencing With
Sequenase™, USB. Corp.
- [156] Shaw G.M., M.E.Harper, B.H.Hahn, L.G.Epstein,
D.G.Gajdusek, R.W.Price, B.A.Navia, C.K.Petito,
C.O'Hara, J.E.Groopman, E.-S. Cho, J.M.Oleske,
F.Wong-Staal, R.C.Gallo
Science 227, 177 (1985).
- [157] Shea, R.G., J.C.Marsters, N.Bischofberger
Nucleic Acids Res. 18, 3777 (1990).
- [158] De Simone, V., R. Cortese
Biochem.Biophys.Acta 1132, 119 (1992).
- [159] Sinha, N.D., J.Biernat, H.Köster
Tetrahedron Lett. 24, 5843 (1983).
- [160] Sladek, F.M., W.Zhong, E.Lai, J.E.Darnell Jr.
Genes Dev. 4, 2353 (1990).
- [161] Smith, C.W.J., J.G.Patton, B..Nadal-Ginard
Annu.Rev.Genet. 23, 527 (1989).
- [162] Smith, L.M., S. Fung, M.Hunkapiller,
T.J. Hunkapiller, L.E.Hood
Nucleic Acids Res. 13, 2399 (1985).
- [163] Smith, L.M., J.Z.Sanders, R.J.Kaiser, P.Hughes,
C.Dodd, C.R.Conell, C.Heiner, S.B.H.Kent, L.E.Hood
Nature 321, 674 (1986).
- [164] Stirpe, N.S., P.F.Goetinck
Development 107, 23 (1989).
- [165] Svaren, J., W.Hörz
Curr. Opinion Genet.Dev. 3, 219 (1993).

- [166] Szabó P.
A csirke porc mátrix fehérje gén szövetspecifikus működése: a promoter és a silencer régió azonosítása és analízise
Egyetemi doktori dolgozat 1992.
- [167] Takada, R., Y.Nakatani, A.Hoffmann, T.Kokubo, S.Hasegawa, R.G.Roeder, M.Horikoshi
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89, 11809 (1992).
- [168] Tanahashi, H., T.Ito, S.Inouye, F.I.Tsuji, Y.Sakaki
Gene 96, 249 (1990).
- [169] TaqTrack™ Sequencing Systems,
Technical Manual, Promega Corp., (Cat.no.Q5500).
- [170] Tate, P.H., A.P.Bird
Curr.Opinion Genet.Dev. 3, 226 (1993).
- [171] Thein, S.L., R.B.Wallace
'The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders'
'Human Genetic Disease' A Practical Approach
ed. K.E.Davies, 33-50 old., IRL Press, Oxford
- [172] ThermalBase™ Taq polymerase Sequencing Kit,
Instruction Manual, Stratagene (Cat.no. #200320).
- [173] Ting-Xin Jiang, Jian-Ru Yi, Shao-Yao Ying, Cheng-Ming Chuong
Dev.Biol. 155, 545 (1993).
- [174] Tschan, T., K.Böhme, M.Conscience-Egli, G.Zenke, K.H.Winterhalter, P.Bruckner
J.Biol.Chem. 268, 5156 (1993).
- [175] Urdea, M.S., J.A.Running, T.Horn, J.Clyne, L.Ku, D.Warner
Gene 61, 253 (1987).
- [176] Urdea, M.S., B.D.Warner, J.A.Running, M.Stempien, J.Clyne, T.Horn
Nucleic Acids Res. 16, 4937 (1988).
- [177] Vizard, D., M.Hadman, D.Bianca, D.Manzer
BioTechniques 8, 430 (1990).
- [178] de Vries, E., W. van Driel, M.Tromp, J. van Boom, P.C. van der Vliet
Nucleic Acids Res. 13, 4935 (1985).
- [179] de Vries, E., W. van Driel, S.J.L. van den Heuvel, P.C. van der Vliet
The EMBO J. 6, 161 (1987).

- [180] Vuorio, E., B.de Crombugghe
Annu.Rev.Biochem. 59, 837 (1990).
- [181] Wachter, L., J.-A.Jablonski, K.L.Ramachandran
Nucleic Acids Res. 14, 7985 (1986).
- [182] Wain-Hobson, S., P.Sonigo, O.Danos, S.Cole,
M.Alizon
Cell 40, 9 (1985).
- [183] Williams, T., A.Admon, B.Lüscher, R.Tjian
Genes Dev. 2, 1557 (1988).
- [184] Willis, I.M.
Eur.J.Biochem. 212, 1 (1993).
- [185] Winship, P.R.
Nucleic Acids Res. 17, 1266 (1989).
- [186] Winterbottom, N., M.M.Tondravi, T.L.Harrington,
F.G.Klier, B.M.Vertel, P.F.Goetinck
Dev.Dynamics 193, 266 (1992).
- [187] Workman, J.L., A.R.Buchman
Trends in Biochem. Sci. 18, 90 (1993).
- [188] Xing, Y., C.V.Johnson, P.R.Dobner, C.B.Lawrence
Science 259, 1326 (1993).
- [189] Zawel, L., D.Reinberg
Prog.Nucl.Ac.Res. 44, 67 (1993).
- [190] Zhou, Q., T.G.Boyer, A.J.Berk
Genes Dev. 7, 180 (1993).
- [191] Zon, G., K.A.Gallo, C.J.Samson, K.Shao,
M.F.Summers, R.A.Byrd
Nucleic Acids Res. 13, 8181 (1985).
- [192] Zuckermann, R., D.Corey, P.Schultz
Nucleic Acids Res. 15, 5305 (1987).
- [193] Hiroaki Inoue, Hiroshi Nojima, Hiroto Okayama
Gene 96, 23-28 (1990).