

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A COLICIN E7 NUKLEÁZ DOMÉN ÁTALAKÍTÁSA
SZABÁLYOZOTT ÉS SPECIFIKUS MESTERSÉGES ENZIMMÉ**

NÉMETH ESZTER

Témavezetők:

DR. GYURCSIK BÉLA

Egyetemi docens

DR. KÖRTVÉLYESI TAMÁS

Egyetemi docens



Kémia Doktori Iskola

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

**Fizikai Kémiai és Anyagtudományi
Tanszék**

**Természettudományi és Informatikai
Kar, Szegedi Tudományegyetem**

2014.

I. BEVEZETÉS

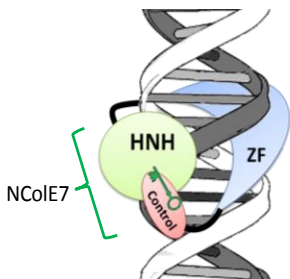
A DNS elhasítása egy tetszőleges szekvencia közelében a géntechnológia és génterápia egyik aktuális problémája. A kromoszomális DNS elhasítása egy betegséghez kapcsolódó génhiba közelében ugyanis aktiválja a sejt saját javítómechanizmusait, és ezt a betegség gyógyítására lehet felhasználni. A nukleinsavak hasítása egészséges sejtben is fontos része a sejtműködésnek, és ezt a feladatot a nukleázok végzik el. Ezekkel az enzimekkel azonban csak kevés DNS szekvencia célozható meg, korlátozva a génterápiai alkalmazást, melynek során pontosan a betegség által meghatározott DNS részlet felismerése szükséges. Annak érdekében, hogy lehetséges legyen a DNS elhasítása egy tetszőleges szekvencia mentén, új nukleázok tervezésére van szükség.

A fenti célokra elsősorban cinkujj-nukleázokat terveztek. Ezek egy nemspecifikus katalitikus központból (a FokI bakteriális enzim nukleáz doménjéből) valamint egy hangolható DNS-felismerő doménből (három vagy négy cinkujj motívumból) állnak. A cinkujjak azon aminosavainak mutációja, melyek a nukleobázisokkal alakítanak ki kölcsönhatásokat, megváltoztatja a felismerési szekvenciát. Az ilyen enzimeket már széles körben alkalmazták. A tapasztalt kismértékű citotoxicitás azonban korlátozza bevezetésüket a humán terápiába.

Jelen doktori értekezés egy új típusú cinkujj-nukleáz tervezését mutatja be. Ennek során a leggyakrabban alkalmazott FokI katalitikus központ helyett a colicin E7 fehérje nukleáz doménjét (NColE7) használjuk. A választás alapja azon korábbi kutatási eredmény, mely szerint az N-terminális végen rövidített NColE7 fehérje inaktív. Azt feltételeztük, hogy az aktivációhoz szükséges N-terminális szekvenciát felhasználhatnánk egy új, allosztérikus szabályozási mechanizmus kialakítására. Ezt az elképzelést sikeresen megvalósítottuk, és így a Ph.D. munkám során elért eredmények hozzájárulhatnak egy olyan új tervezési stratégia kifejlesztéséhez, amely általánosan alkalmazható a mesterséges nukleázok tervezésében.

II. CÉLKITŰZÉS

Jelen PhD értekezésben bemutatott kutatás célja olyan új cinkujj-nukleázok tervezése, melyek szabályozott módon működnek. Az építőkövek között egy három cinkujj-motívumból álló fehérje és az NCoIE7 nemspecifikus bakteriális nukleáz szerepelnek. Ez a munka az első példa az NCoIE7 kimér mesterséges nukleáz részeként történő alkalmazásra. Elsőként az NCoIE7 működésének jobb megértését tűztük ki célul, amit a fehérje áttervezése és az NCoIE7-alapú cinkujj-nukleázok modelljének felépítése, végül ezek kísérleti vizsgálata követ. Az elképzelést az 1. ábra szemlélteti szematikusan. Ennek alapján az NCoIE7 fehérje két kiválasztott részletét a cinkujj-fehérje ellentétes végeihez fűzzük hozzá. Ez a szerkezet biztosítja a katalitikus folyamat szabályozását: az NCoIE7 részei önállóan nem működőképeseek, funkciójukat csak akkor nyerik vissza, ha a cinkujj-fehérje DNS-hez történő specifikus kötődése révén egymáshoz közel kerülnek.



1.ábra Az NCoIE7-alapú szabályozott cinkujj-nukleáz tervezésének szematikusan ábrája. A cinkujjak (kék) specifikus módon kötődnek a DNS-hez, és a HNH-motívum (az NCoIE7 katalitikus központja) a szabályozó N-terminális véggel (zöld) együtt felelős a hasításért.

1. Az NCoIE7 tanulmányozása pontmutációk révén, különös tekintettel az N-terminális vég szerepére és a fémion-kötésre.

Az NCoIE7 fehérjét széles körben tanulmányozták az irodalomban, azonban az N-terminális vég lehetséges szabályozó szerepét még nem írták le. Mivel az NCoIE7 egy fémion-tartalmú fehérje, terner komplexet képez a fémionnal és a DNS-szubsztráttal. A mutációk megváltoztathatják a fémion-kötő tulajdonságokat, így a kutatás egy összetett bioszervetlen kémiai problémához vezet. Mivel korábbi eredmények alapján az első négy aminosav (446-KRNN-449) elengedhetetlen a nukleáz aktivitás kifejtéséhez, ezek szerepét mutációik révén terveztük feltárni. A következő kérdésekre kerestük a választ:

- Hány pozitív töltésű oldallánc szükséges az N-terminális végen a nukleáz aktivitáshoz?
- Megszűnik-e a nukleáz aktivitás, ha mindhárom pozitív töltésű oldallánc hiányzik, de a fehérjegerinc jelen van?
- Képes-e a két lizin (K446 és K449) az R447 hiányában a reakció elősegítésére?

2. A legjobb lehetőség keresése az NColE7 szabályozására

Annak érdekében, hogy az N-terminális szegmenst felhasználhassuk az NColE7 szabályozására, fontos megérteni, hogy milyen módon tudjuk a HNH motívum, mint katalitikus központ működését befolyásolni. Ehhez számítógépes modellezés révén határozzuk meg a 25 aminosav hosszú N-terminális lánc szerkezeti stabilitását legnagyobb mértékben meghatározó oldalláncokat. Ezt követően a kiválasztott aminosavakat alaninra cseréljük, és kísérleti úton tanulmányozzuk a mutációk hatását a fehérje működésére.

A következő kérdéseket tettük fel:

- Mi a 25 aminosavból álló N-terminális lánc szerepe? Felelős-e ez a szegmens a KRNK motívum megfelelő térállásáért?
- Hogyan befolyásolják e látszólag érdektelen részben történő mutációk a nukleáz aktivitást?
- Amennyiben az N-terminális lánc kölcsönhatásainak mutációja révén sikerül csökkenteni annak kölcsönhatását a fehérje többi részével, és ez befolyásolja a katalitikus aktivitást is, van-e mód a funkció visszanyerésére?

3. NColE7-alapú nukleázok tervezése számítógépes modellezzéssel

A következő célkitűzés a cinkujj-NColE7 molekulák tervezése az előző eredmények alapján. A tervezés a cinkujj-fehérje és az NColE7-fehérje DNS-sel alkotott komplexeinek elérhető kristályszerkezeteiből indul ki, és a következő elemeket tartalmazza:

- Egy kezdeti modell megalkotása, melynek során az NColE7-et közelítjük a cinkujjakhoz miközben mindkét fehérje a DNS-molekulához kötődik.
- Az NColE7 felosztása két részre: a C-terminális szegmens, mint inaktívált katalitikus domén és az N-terminális szabályozó elem kiválasztása.
- Rövid linkerszekvenciák tervezése, melyek alkalmasak arra, hogy a választott NColE7-részeket a cinkujj fehérjéhez kapcsolják.
- A kialakított modellek tanulmányozása MD szimulációk révén.

4. A tervezett cinkujj-nukleázok kísérleti tanulmányozása

A jelen kutatás fő célja a választott, tervezett mesterséges nukleázok kifejezése baktériumsejtekben, melyet a fehérjék tisztítása és tanulmányozása követ. Az áttervezés jelentősen befolyásolhatja a fehérjék szerkezetét, fémion-kötő tulajdonságait és reaktivitását, így az új fehérjéket a következő szempontok alapján terveztük vizsgálni:

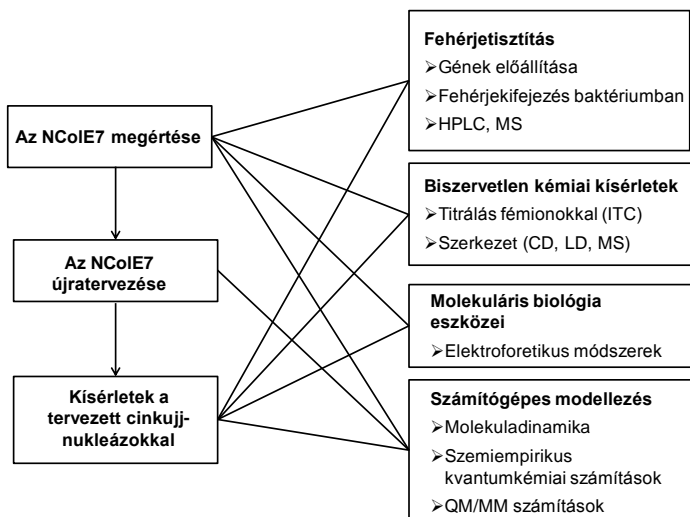
- Megtartják-e a cinkujjak a specifikus DNS-kötő képességüket az NCoIE7 részekkel történő összekapcsolás után?
- Tapasztalunk-e mérhető nukleáz aktivitást? Ha igen, ez specifikus-e, illetve egyszálú vagy kétszálú hasítás történik?
- Megfelelő-e a modell arra, hogy optimalizálás után egy gyakorlatban is alkalmazható, szabályozott mesterséges nukleáz alakíthassunk ki?

III. ELŐZMÉNYEK

A jelen munkát megelőzően az N-terminális végen rövidített NCoIE7-fehérjéket (Δ N4-NCoIE7 és Δ N25-NCoIE7) vizsgáltuk [6]. Ezek közül egyik fehérje sem rendelkezik nukleáz aktivitással, ami felhívja a figyelmet az N-terminális vég fontos szerepére. A kísérleti és számítások eredményei azt mutatták, hogy a Δ N4-NCoIE7 szerkezete és fémion-kötése változatlan, szemben a Δ N25-NCoIE7 fehérjével. Ezek az eredmények inspirálták az N-terminális lánc további tanulmányozását.

IV. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Az értekezés alapját szolgáló kutatásban számos, a bioszervetlen kémia tárgyköréhez kapcsolódó módszert alkalmaztunk, amelyet számítógépes modellezéssel egészítettünk ki. A 2. ábra szemlélteti a kutatás sémáját a módszerek megjelölésével.



2.ábra A disszertációhoz kapcsolódó kutatás munkamenete.

Kísérleti módszerek

A mutáns és tervezett fehérjéket egyaránt bakteriális kifejezés révén nyertük. A fehérjéket FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) segítségével tisztítottuk, majd SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) és ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry) segítségével azonosítottuk.

A fehérjék fémion-kötését ITC (Isothermal Titration Calorimetry) segítségével határoztuk meg. A fémionkötéssel kapcsolatos szerkezeti változásokat SRCD (Synchrotron Radiation Circular Dichroism) spektroszkópia és ESI-MS kísérletekben vizsgáltuk.

A nukleáz aktivitást és DNS-kötést gél elektroforézis kísérletekkel és FLD (Flow Linear Dichroism) spektroszkópia valamint AFM (Atomic Force Microscopy) segítségével követtük. Az egyszálú hasítások kimutatására PCR-t (Polymerase Chain Reaction) is alkalmaztunk.

A DNS- és fémion-kötést továbbá egy NCoIE7 mutáns DNS-sel együtt történő kristályosítása, és a kristályszerkezetek megfejtése révén tanulmányoztuk.

Számítógépes módszerek

A fehérjék szerkezetét szemiempirikus kvantumkémiai számítások és molekuladinamikai szimulációk segítségével modelleztük. A DNS-kötést hibrid QM/MM számítások segítségével is tanulmányoztuk.

Az NCoIE7-alapú cinkujj-nukleázok kiindulási modelljeit szerkezet alapú illesztés segítségével alkottuk meg. A linkereket, amelyek az NCoIE7 egyes részeit a cinkujjakhoz kapcsolják, fehérjehurok adatbázisok segítségével terveztük, mely során a fehérjestabilitást empirikus alapú módszerekkel becsültük. A négy kiválasztott modellt molekuladinamikai szimulációkban tanulmányoztuk részletesen.

V. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. NCoIE7 mint egy szabályozott mesterséges nukleáz lehetséges alkotóeleme: N-terminális pontmutációk

- 1.1. Az NCoIE7 és mutánsainak génje a pGEX-6P-1 plazmidba történő klónozás során citotoxicitást mutatott. A klónozás csak az Im7 inhibitor fehérje génjével együtt volt sikeres. [4]
- 1.2. Sikeresen előállítottuk az NCoIE7 fehérjét és négy mutánsát, melyekben az eredeti KRNK N-terminális szekvenciát KGNK, KGNG, GGNK vagy GGNG-re cseréltük. ESI-MS mérések alapján az előállított fehérjék molekulatömege megfelel a vártaknak, és képesek a cinkion kötésére. [1]
- 1.3. Vizsgáltuk az új mutánsok nukleáz aktivitását és az azt befolyásoló tényezőket.
 - 1.3.1. A nukleáz aktivitást agaróz gélelektroforézis és áramlásos lineáris dikroizmus spektroszkópia segítségével követtük. Megállapítottuk, hogy a mutáns fehérjék nukleáz aktivitása alacsony és a következő sorrendet követi: KRNK >> KGNK > KGNG ~ GGNK > GGNG. [1]
 - 1.3.2. A CD-mérések szerint a mutációk nem befolyásolják jelentősen a fehérjék oldatszerkezetét. [1]
 - 1.3.3. ITC mérések alapján a Zn^{2+} -affinitás nem változott: az NCoIE7/ Zn^{2+} komplexre jellemző K_d értékhez ($16.6 \pm 3.5 \mu M$) hasonló állandókat határoztunk meg a mutáns fehérjékre is ($\sim 13 \pm 3 \mu M$). [1]
 - 1.3.4. Az MD szimulációk során a fehérjék dinamikus sajátságai kismértékű eltérést mutattak, és az eredmények azt sugallták, hogy a K446 oldallánc képes az R447 szerepének részleges ellátására. [1]
 - 1.3.5. A fehérjék PM6 szempiempirikus kvantumkémiai szinten optimalizált szerkezetében tapasztalt kismértékű változások arra utaltak, hogy a mutánsok DNS-kötési módja eltérhet az NCoIE7-től. [1]
 - 1.3.6. Egy rövid, 13 bázispáros kétszálú DNS-sel végzett elektroforézis kísérletek kimutatták, hogy a pozitív töltésű oldallancok számát csökkentő mutációk nem befolyásolták jelentősen a fehérjék DNS-affinitását. [1]
 - 1.3.7. A DNS-kötést hibrid QM/MM módszerrel modellezve kimutattuk, hogy az R447 oldallánc hiánya kismértékű változásokat okoz a DNS-kötésben, melyek vezethetnek az aktivitás csökkenéséhez. Kimutattuk

annak lehetőségét, hogy a Zn^{2+} -ionhoz egy vízmolekula is kötődhet, optimális helyzetben ahhoz, hogy részt vehessen a reakcióban. [2]

1.3.8. A KGNK fehérjét egy 18 bázispáros kétszálú DNS-molekulával együtt kristályosítottuk. Meghatároztuk a KGNK/DNS valamint a KGNK/DNS/ Zn^{2+} komplexek szerkezetét.

1.3.9. A DNS-kötést hosszabb DNS molekulákkal (188, 306, 777 bázispáros) is tanulmányoztuk gél elektroforézis és AFM kísérletekben. Kimutattuk, hogy az NCoIE7 kooperatív módon kötődik a DNS-hez és ez a jelenség a mutánsok esetén kevésbé egyértelmű.

1.4. Az eredmények alapján azt a következtetést vontuk le, hogy az N-terminális vég alkalmas arra, hogy egy szabályzási mechanizmust alakíthassunk ki az NCoIE7-ben. [1]

2. Az N-terminális vég szerepe változtatható: további mutációk az N-terminális láncban

2.1. Számítógépes alanin teszt segítségével azonosítottuk az N-terminális lánc azon aminosavait, melyeknek kitétetett szerepe lehet a fehérje szerkezeti stabilitásában. Kísérleteinkhez a T454A, K458A és W464A mutációkat választottuk ki. [3]

2.2. A fenti mutációk különböző kombinációi alapján a TKW [3], TK, TW, és W fehérjék génjeit állítottuk elő, majd kifejeztük és tisztítottuk a fehérjéket. Az SDS-PAGE és ESI-MS kísérletek segítségével azonosítottuk a fehérjéket.

2.3. A W464A mutánsok (TKW [3], TW és W) csökkent nukleáz aktivitással rendelkeznek. Ennek okait részletesen tanulmányoztuk.

2.3.1. A CD-spektroszkópiai mérések alapján a nukleáz aktivitás csökkenése a fehérjeszerkezet változásával párosult. [3]

2.3.2. A megváltozott szerkezetű fehérjék Zn^{2+} -affinitása három nagyságrenddel csökkent az NCoIE7-hez képest. Ez azt mutatja, hogy a fémkötőhely, a HNH-motívum szerkezete is megváltozott. [3]

2.3.3. A mutánsok oldatszerkezete visszanyerhető a DNS-szubsztráttal vagy az Im7 fehérjével való kölcsönhatás révén. [3]

2.3.4. Az indukált szerkezettel bíró fehérjék (Im7 jelenlétében) visszanyerik Zn^{2+} -kötő képességüket. Ezzel bebizonyítottuk, hogy az NCoIE7 fémionkötő helye oldatszerkezetben preorganizált.

- 2.4. Az eredmények alapján megértettük, hogyan tudjuk az NCoIE7 fehérje aktivitását és fémion-kötő képességét befolyásolni. [3]

3. Új típusú cinkujj-nukleázok tervezése számítógépes modellezés segítségével

- 3.1. A kezdeti modelleket szerkezet alapú illesztés segítségével hoztuk létre a PyMol programban. Ezek tartalmazzák az NCoIE7 fehérjét, a cinkujj fehérjét (3 cinkujj-motívum), melyek egyaránt egy közös DNS-szubsztráthoz kötődnek. A DNS molekula tartalmazza a cinkujj fehérje felismerési szekvenciáját. [4]
- 3.2. Fehérjehurok adatbázisok segítségével terveztünk olyan linker (összekötő) szekvenciákat, amelyek az NCoIE7 választott pontjait a cinkujj fehérjéhez kapcsolják. A négy választott modell tartalmazza az NCoIE7 N-terminális és C-terminális részeit (NX és NY, ahol X és Y az NCoIE7 modellben szereplő aminosavainak számát jelenti), valamint a cinkujj-fehérjét. Ilyen módon három NX-ZF-CY típusú modellt (N4-ZF-C105, N4-ZF-C45 és N46-ZF-C45), ill. egy fordított, CY-ZF-NX típusú (C123-ZF-N7) modellt alakítottunk ki. [4]
- 3.3. Molekuladinamikai szimulációk alapján a négy modell közül az N4-ZF-C105 és a C123-ZF-N7 mutat a célnak leginkább megfelelő tulajdonságokat. [4]

4. Az NX-ZF-CY típusú tervezett cinkujj-nukleázok kísérleti tanulmányozása

- 4.1. Előállítottuk a tervezett fehérjék génjeit, majd azok alapján baktériumsejtekben kifejeztük a fehérjéket és FPLC segítségével tisztítottuk őket. Az ESI-MS mérések megerősítették, hogy a fehérjék molekulatömege pontos. [5]
- 4.2. Elektroforetikus mozgékonyág kísérletek alapján a három vizsgált fehérje nagy affinitással és specifikusan kötődik a cinkujjak felismerési szekvenciájának megfelelő DNS-szubsztráthoz. [5]
- 4.3. DNS-hasítási kísérleteket végeztünk egy olyan plazmid DNS mintával, melybe előzetesen beillesztettük a cinkujj fehérje felismerési szekvenciáját. Egyszálú hasítást tapasztaltunk, és primer-meghosszabbítási kísérletek segítségével bizonyítottuk, hogy ez a hasítás a számítógépes modellnek megfelelő szekvenciánál és láncon következik be. [5]
- 4.4. Kialakítottunk egy új stratégiát, amelynek segítségével NCoIE7-alapú mesterséges nukleázok tervezhetők. Ezek a fehérjék bármely kiválasztott DNS szekvencia hasítására alkalmazhatók. Az itt bemutatott eljárás új utat nyithat a génterápiás célokra tervezett biztonságos nukleázok fejlesztésében.

VI. PUBLIKÁCIÓS LISTA

Magyar Tudományos Művek Tára (MTMT) azonosító: 10040185

Az értekezéshez kapcsolódó tudományos közlemények

- [1] **E. Németh**, T. Körtvélyesi, P.W. Thulstrup, H.E.M. Christensen, M. Kožíšek, K. Nagata, A. Czene, B. Gyurcsik: Fine tuning of the catalytic activity of colicin E7 nuclease domain by systematic N-terminal mutations. *Protein Sci.*, 23, 1113–1122 (2014)
IF = 2,861
- [2] A. Czene, E. Tóth, **E. Németh**, H. Otten, J.-C.N. Poulsen, H.E.M. Christensen, L. Rulišek, K. Nagata, S. Larsen, B. Gyurcsik: A new insight into the zinc-dependent DNA-cleavage by the colicin E7 nuclease: a crystallographic and computational study. *Metallomics*, (2014); DOI: 10.1039/c4mt00195h
IF = 3,978
- [3] **E. Németh**, T. Körtvélyesi, M. Kožíšek, P.W. Thulstrup, H.E.M. Christensen, M. Asaka, K. Nagata, B. Gyurcsik: Substrate binding activates the designed triple mutant of the colicin E7 metallonuclease. *J. Biol. Inorg. Chem.*, (2014); DOI 10.1007/s00775-014-1186-6
IF = 3,164
- [4] **E. Németh**, G.K. Schilli, G. Nagy, C. Hasenhindl, B. Gyurcsik, C. Oostenbrink: Design of a colicin E7 based chimeric zinc-finger nuclease. *J. Comp-Aid. Mol. Des.*, 28, 841–850 (2014)
IF = 2,782
- [5] **E. Németh**, M. Asaka, K. Nagata, C. Oostenbrink, B. Gyurcsik: Specific nicking of DNA by a colicin E7 based zinc finger nuclease - a new design strategy. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2014) – benyújtva

ΣIF = 12,785

További tudományos közlemények nemzetközi folyóiratokban

- [6] A. Czene, **E. Németh**, I.G. Zóka, N.I. Jakab-Simon, T. Körtvélyesi, K. Nagata, H.E.M. Christensen and B. Gyurcsik: On the role of the N-terminal loop in the function of colicin E7 nuclease domain.
J. Biol. Inorg. Chem., 18, 309-321 (2013)
IF = 3,164
- [7] T. Körtvélyesi, K. E. Kövér, **E. Németh**, B. Penke, L. Szilágyi, M. Kasperkiewicz, A. Orosz: Study of the Binding Peptide-Derivatives on HSP90 Protein which have Anti-Cancer and Autoimmune Inhibitor Effects,
Int. J. Drug. Des. Discov., 5, 1308-1317 (2014)

ΣΣIF = 15,949

Impakt faktoralal rendelkező konferencia összefoglalók

1. **E. Németh**, C. Oostenbrink, B. Gyurcsik: Design of a novel type of enzymatic control in NColE7-based zinc finger nucleases.
J. Biol. Inorg. Chem., 19, S833–S852 (2014 - S838–S839)
IF = 3,164

Hazai folyóiratban megjelent tudományos közlemények

1. Németh Eszter: Áramlásos lineáris dikroizmus spektroszkópia alkalmazása nukleázok tanulmányozására. Magyar Kémikusok Lapja, 2014. február

Nemzetközi konferencia részvétel

1. **E. Németh**, B. Gyurcsik, A. Czene, I.N. Simon, I.Gy. Zóka, T. Körtvélyesi, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Allosteric control in the nuclease domain of colicin E7. *QBIC-3 3rd Quantum Bioinorganic Chemistry Conference*, Cesky Krumlov, Czech Republic, 25-28 June, (2011) – poszter
2. B. Gyurcsik, A. Czene, I.N. Simon, **E. Németh**, I.Gy. Zóka, T. Körtvélyesi, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Allosteric control in the nuclease domain of colicin E7, International Workshop on Metal Containing Drugs, Szeged, Hungary, 30-31 August (2011) – előadás
3. **E. Németh**, B. Gyurcsik, T. Körtvélyesi, P. W. Thulstrup, H.E.M. Christensen: Computational design, expression and spectroscopic study of a mutant NColE7 metallo-nuclease. *XII International Symposium on Inorganic Biochemistry, Collaboration and Beyond*, Wrocław, Poland, August 28 – September 1 (2013) - előadás

4. **E. Németh**, T. Körtvélyesi, P. W. Thulstrup, H.E.M. Christensen, B. Gyurcsik: Fine tuning of the catalytic activity by the positively charged residues at the N-terminus of the ColE7 nuclease. *6th Central Europe Conference - Chemistry towards Biology*, Trieste, Italy, September 10-13 (2013) – előadás
5. **E. Németh**, C. Oostenbrink, B. Gyurcsik: Design of a novel type of enzymatic control in NColE7-based zinc finger nucleases. *EUROBIC12, 12th European Biological Inorganic Chemistry Conference*, Zürich, Switzerland, August 24-28 (2014) – poszter
6. **E. Németh**, J. Kopniczky, E. Balázs, B. Gyurcsik: Cooperative DNA-binding of the colicin E7 nuclease domain. *Significance of Knotted Structures for Function of Proteins and Nucleic Acids - Biophysical Society meeting*, Warsaw, Poland, September 17-21 (2014) – poszter
7. **E. Németh**, M. Asaka, K. Nagata, C. Oostenbrink, B. Gyurcsik: Redesign of the colicin E7 nuclease domain into a controlled and specific artificial enzyme. *Tsukuba Global Science Week 2014*, Tsukuba, Japan, September 28-30 (2014) – meghívott előadás

Nemzetközi konferencia részvétel társszerzőként

1. B. Gyurcsik, A. Czene, N.I. Simon, **E. Németh**, I.G. Zóka, G. Nagy, T. Körtvélyesi, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Study on the HNH motif as a possible component of a controlled zinc-finger nuclease. *International Conference on Gene Targeting*, Vienna, Austria, 9-12th February (2011) – előadás
2. B. Gyurcsik, A. Czene, N.I. Simon, **E. Németh**, I.G. Zóka, G. Nagy, T. Körtvélyesi, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Study on the HNH motif as a possible component of a controlled zinc-finger nuclease. *New Trends in Coordination, Bioinorganic and Applied Inorganic Chemistry; XXIII. International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry*, Smolenice, Slovak Republic, 5-10th June (2011) – előadás
3. B. Gyurcsik, A. Czene, N.I. Simon, **E. Németh**, I.G. Zóka, T. Körtvélyesi, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Study on the HNH motif as a possible component of a controlled zinc-finger nuclease. *4th European Conference on Chemistry for Life Sciences (4ECCLS)*, Budapest, Hungary, August 31-September 3 (2011) – előadás
4. B. Gyurcsik, A. Czene, N.I. Simon, **E. Németh**, I.G. Zóka, T. Körtvélyesi, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Design of a novel artificial nuclease based on the HNH. *ISABC11 - 11th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry*, Barcelona, Spain, 2-5 December (2011) – poszter

5. A. Czene, **E. Németh**, I.G. Zóka, N.I. Simon, B. Gyurcsik, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Mutant Colicin E7 proteins reveal the conditions for allosteric control of the enzymatic action. *ISABC11 - 11th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry*, Barcelona, Spain, 2-5 December (2011) – poszter
6. B. Gyurcsik, A. Czene, **E. Németh**, I.G. Zóka, E. Endreffy, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Targeting the breakpoint in duchenne muscular dystrophy. *Nobel75, 75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award*, Szeged, Hungary, 22-25 March (2012)-előadás
7. B. Gyurcsik, A. Czene, **E. Németh**, I.G. Zóka, E. Endreffy, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Targeting the breakpoint in Duchenne Muscular Dystrophy *ISMEC 2012, International Symposia on Metal Complexes*, Lisbon, Portugal, June 18th – 22nd, ISMEC Acta, Vol. 2, p.111 (2012) – poszter
8. B. Gyurcsik, A. Czene, **E. Németh**, I.G. Zóka, E. Endreffy, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Targeting the breakpoint in Duchenne Muscular Dystrophy by an artificial metallonuclease. *EUROBIC11, 11th European Biological Inorganic Chemistry Conference*, Granada, Spain September 12-16 (2012) – poszter
9. B. Gyurcsik, A. Czene, **E. Németh**, I.Gy. Zóka, E. Endreffy, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Design of a novel artificial metallonuclease for targeting the breakpoint in Duchenne Muscular Dystrophy. *The 3rd Leading Graduate Schools International Conference*, Tsukuba, Japan, November 1-2 (2012) – meghívott előadás
10. K. Borsos, **E. Németh**, B. Gyurcsik: The interaction between a truncated mutant of NColE7 nuclease and its immunity protein. *13th Edition of Academic Days Timisoara - New trends and strategies in the chemistry of advanced materials with relevance in biological systems, technique and environmental protection*, Timisoara, Romania, June 13-14 (2013) – poszter
11. B. Gyurcsik, A. Czene, **E. Németh**, I.G. Zóka, E. Endreffy, H.E.M. Christensen, K. Nagata: The nuclease domain of colicin E7 as a potential template for artificial nuclease design. *13th Edition of Academic Days Timisoara - New trends and strategies in the chemistry of advanced materials with relevance in biological systems, technique and environmental protection*, Timisoara, Romania, June 13-14 (2013) – plenáris előadás
12. B. Gyurcsik, **E. Németh**, P. W. Thulstrup, M. Kožíšek, H.E.M. Christensen, K. Nagata: Fine tuning of the allosteric activation in the nuclease domain of colicin E7. *Global Science Week 2013 - 'Integration of Chemistry and Life Science'*, Tsukuba, Japan, October 2-4 (2013) – meghívott előadás

13. **E. Németh**, G. Schilli, C. Koncz, A. Czene, M. Kožíšek H.E.M. Christensen, K. Nagata, B. Gyurcsik: The effect of the metal ions on the active centre of colicin E7 nuclease. *ISMEC 2014, International Symposium on Metal Complexes*, Pavia, Italy, June 08-12 (2014) – előadás
14. **E. Németh**, C. Oostenbrink, M. Asaka, K. Nagata, B. Gyurcsik: Novel zinc finger nucleases based on colicin E7 nuclease domain. *CTB 2014 - 7th Central Europe Conference Chemistry Towards Biology*, Katowice, Poland, September 9-12 (2014) – előadás

Hazai konferencia részvétel

1. Roósz B., **Németh E.**, Hoffmann A. E., Körtvélyesi T.: Kukurbit[7]uril "host-guest" komplexeinek elméleti vizsgálata. KeMoMo-QSAR szimpózium, Szeged (2010) – poszter
2. **Németh E.**, Keserű Gy. M.: A Caco-2 permeabilitás in silico predikciója. A Magyar Tudomány Ünnepe, Szeged (2010) – előadás
3. **Németh E.**, Keserű Gy. M.: A Caco-2 permeabilitás in silico predikciója, XXXIII. Kémiai Előadói Napok, Szeged (2010) - előadás
4. **Németh E.**, Zóka I.Gy., Czene A., Jakab-Simon I.N., Gyurcsik B., Körtvélyesi T., Nagata K., Christensen H.E.M.: A colicin E7 fehérje nukleáz doménjének vizsgálata. *MKE, I. Nemzeti konferencia*, Sopron 2011. május 22-25 – előadás
5. **Németh E.**, Gyurcsik B., Körtvélyesi T.: Allosztérikus kontroll a Colicin E7 fehérje nukleáz doménjében. *XXXIV. Kémiai Előadói Napok*, Szeged, 2011. November 2-4 – előadás
6. **Németh E.**, Schilli G., Gyurcsik B., Körtvélyesi T.: Pontmutációk tanulmányozása a colicin E7 fehérje nukleáz doménjében. *46. Komplexkémiai Kollokvium és az MTA Koordinációs Kémiai Munkabizottság ülése*, 2012. május 21-23, Mátrafüred – előadás
7. **Németh E.**, Gyurcsik B., Körtvélyesi T.: A colicin E7 metallonukleáz domén finomhangolása. *XXXVI. Kémiai Előadói Napok*, 2013. október 28-30. Szeged – előadás
8. **Németh E.**, Czene A., Gyurcsik B.: Egy fehérjealapú mesterséges metallonukleáz szabályozásának lehetősége. *MTA Koordinációs Kémiai és Peptidkémiai Munkabizottság közös ülése*, 2013. október 28, Budapest – előadás.

Hazai konferencia részvétel társszerzőként

1. Zóka I. Gy., Gyurcsik B., Czene A., **Németh E.**: A colicin E7 nukleáz N-terminális végén rövidített mutáns fehérjéinek vizsgálata. *XXXIV. Kémiai Előadói Napok*, Szeged, 2011. November 2-4 – előadás
2. Gyurcsik B., Czene A., **Németh E.**, Tóth E., Zóka I.Gy.: Aktiváló allosztérikus szabályozás kialakításának lehetősége egy Colicin E7 alapú mesterséges metallonukleázban. *46. Komplexkémiai Kollokvium és az MTA Koordinációs Kémiai Munkabizottság ülése*, 2012. május 21-23, Mátrafüred – előadás
3. **Németh E.**, Czene A., Borsos K., P.W. Thulstrup, Gyurcsik B.: A colicin E7 metallonukleáz aktivitásának hangolása az N-terminális végen kialakított pontmutációk révén. *47. Komplexkémiai Kollokvium és az MTA Koordinációs Kémiai Munkabizottság ülése*, 2013. május 29-31, Mátraháza – előadás.

Schilli G., **Németh E.**, Gyurcsik B.: Egy mutáns NColE7 metallonukleáz előállítására *XXXVI. Kémiai Előadói Napok*, 2013. október 28-30. Szeged – előadás