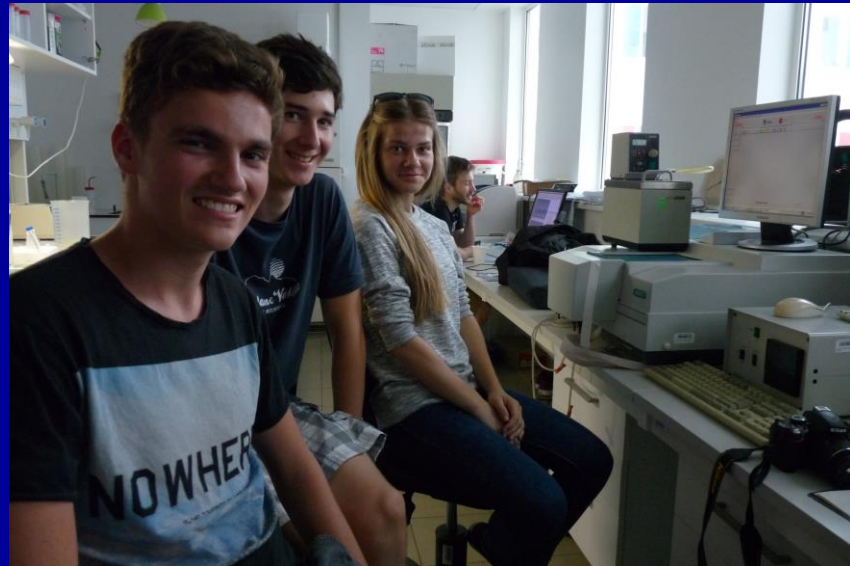


A DNS replikációban kulcsszerepet játszó PCNA fehérje variánsok előállítása és rekombináns DNS technológia segítségével való kifejezése

„PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)”



Csiszár Mónika, Kós Tamás, Polgár Patrik

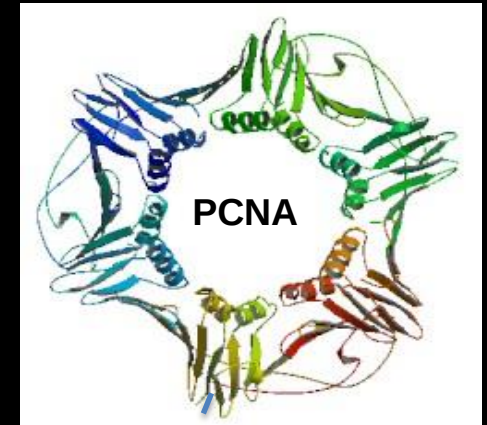
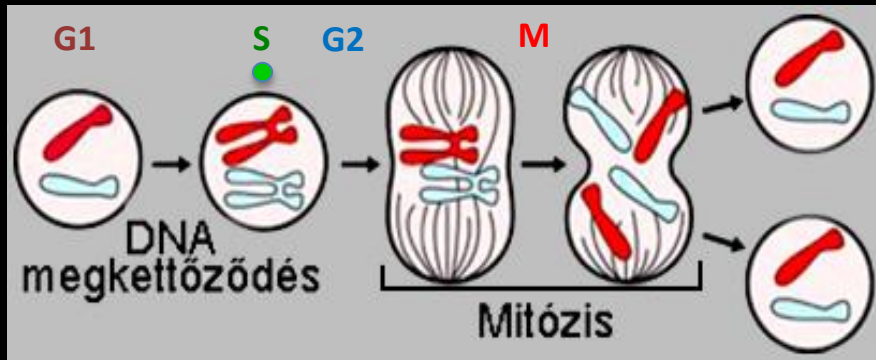
A nyolcadik „AKI Kíváncsi Kémikus” kutatótábor

Budapest, 2016. 06. 26 - 07. 01.

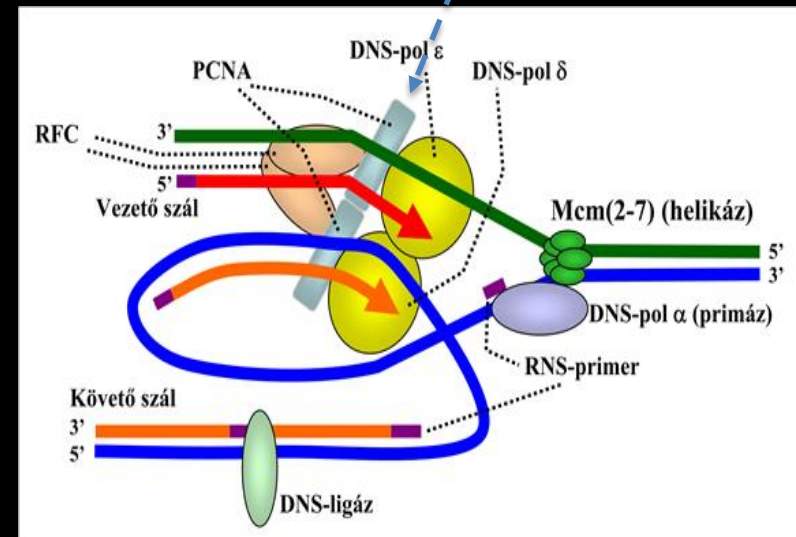
Témavetető: Dr. Szeltner Zoltán

A PCNA fehérje biológiai szerepe

A sejtek osztódását megelőző DNS megkettőződés (replikáció) egyik kulcsmolekulája

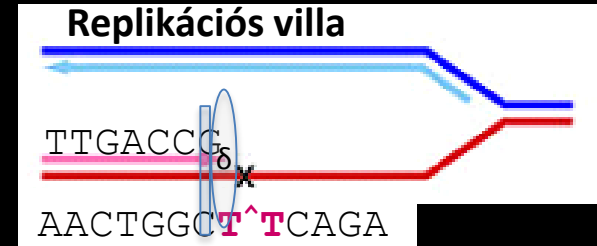


1. A DNS szintézisét polimerázok végzik, melyek hatékony működését a PCNA fehérje teszi lehetővé.
 - Gyűrűt formál a DNS lánc körül
 - A polimerázokat a DNS-hez köti
 - A polimerázok ezért a DNS-hez kötve maradnak, hatékonyabbá válnak.
2. A PCNA részt vesz a DNS károsodások detektálásában és a DNS-javító fehérjék toborzásában is.

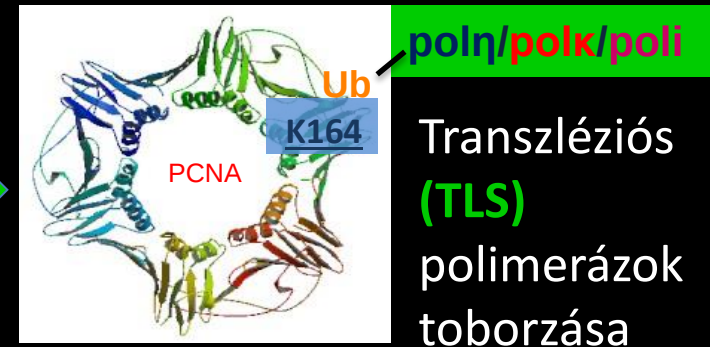
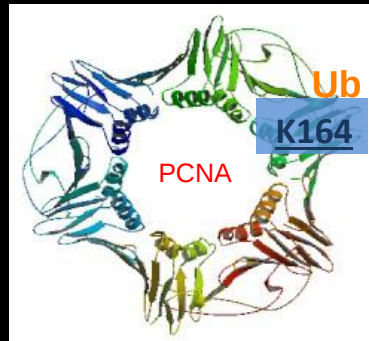


A PCNA szerepe a DNS léziók detektálásában

DNS léziók → replikációs villa elakadása →
(pl. a CPD T⁺T UV fototermék)

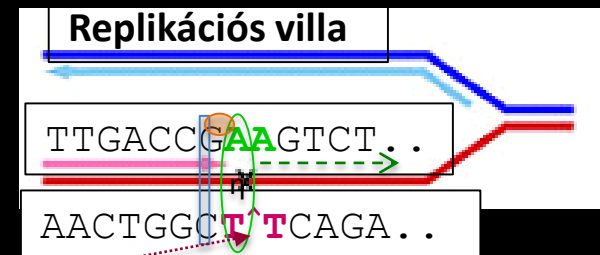


→ PCNA **ubikvitinációja**
(K164)

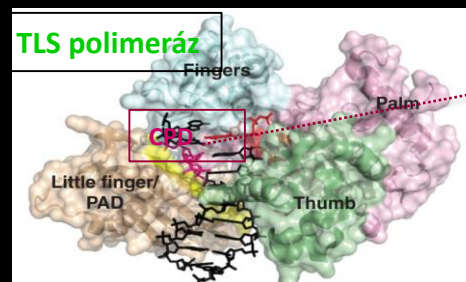


→ polimeráz váltás (replikációs/ **TLSpolimeráz**)

- ✓ képesek befogadni a léziót, nem akadnak el
 - ✓ nukleotidokat tudnak beszúrni a lézióval szemben
- Folytatódhat a DNS átírása (AAGTCT..)



A polη aktív centruma egy CPD T⁺T-UV lézióval



In vitro replikáció a TLS vizsgálatában

A DNS replikációja (másolása) sejten kívül (*in vitro*) is vizsgálható:

Szükségesek hozzá:

- **Sejtextrakt** (fontos fehérje faktorokkal)
- **Plazmid DNS** (beépített **DNS-léziókkal** (= a templát, amit replikálunk)
- **A DNS építőkövei** (dezoxi nukleotid trifoszfátok, dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- **T antigén** (a replikáció elindítását végzi)
- **ATP** (az energiát szolgáltatja a replikációhoz)

+ tisztított **mutáns PCNA variánsok** hozzáadása az ubikvitináció TLS-re való hatásának tesztelésére

Mutáns PCNA variánsok

- i. Vad típusú PCNA (ubikvitinilálódhat az extraktban) → képes lehet TLS-re
- ii. PCNA K164R mutáns (nem képes ubikvitinilálódni) → TLS képtelen mutáns
- iii. ubikvitin fehérje toldatot kódoló mutáns PCNA-Ub fúzió) → maximálisan TLS képes

(célunk volt ennek a mutációnak a bevitele, és a mutáns fehérje kifejezése)

(célunk volt ennek a fehérjének a kifejezése is)

Részvételünk a munkában

DNS munka

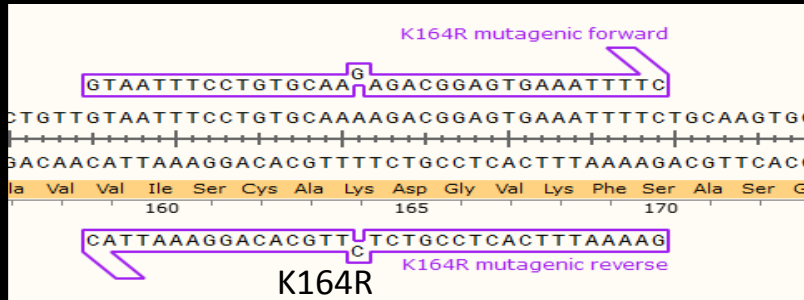
A PCNA K164R mutáció bevitele „Quick Change” mutagenézissel

Fehérje munka

1. A PCNA variánsok DNS-einek bejuttatása *E. coli* BL21 (DE3) sejtekbe (transzformáció) fehérje termelés céljából).
2. A Coli baktériumok megtermelték a fehérjét
3. A baktérium sejteket ultrahanggal feltártuk, mintákat készítettünk
4. SDS gélelektroforézis
 - *SDS gél öntése*
 - *Minták felvitele és futtatása*
 - *Az ezüst festési eljárással a megtermelt fehérjék kimutatása.*

A PCNA K164R mutáció bevitele Quick Change mutagenézissel

1. Komplementer oligonukleotid pár



2. PCR reakció

20 ng eredeti DNS (PCNA) 0,5 µl
Puffer 5 µl
125 ng „forward” primér 1,15 µl
125 ng „reverse” primér 1,15 µl
2 uM-os dNTP keverék 5 µl
Víz 49 µl-re kiegészítve
Felfűtés 95 percre és 1 µl pFu turbo polimeráz hozzáadása

Összesen: 50 µl

15 ciklus 95 °C 30 s (denaturáció)
55 °C 60 s (annelláció)
68 °C 6 min 30 s (polimerizáció)

3. A reakció lejárta után: 1 µl Dpn I restrikciós enzimet adtunk
Inkubáltuk: 1 órán keresztül

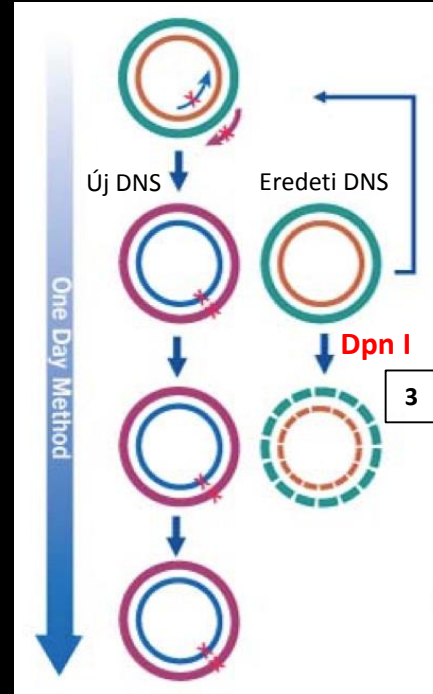
4. A Dpn I emésztett anyagból 5 µl-t transzformáltunk 100 µl E. Coli Top10 kompetens sejtbe

5. A transzformációs elegyből 100 µl-t Ampicillines lemezre kentünk ki.

6. A kinőtt telepekről 2-öt felszaporítottunk és DNS-t izoláltunk belőle (plasmid miniprep)

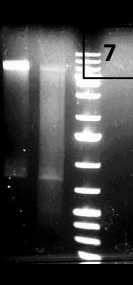
7. Restrikciós emésztéssel ellenőriztük a PCNA inzertjének jelenlétét a vektorban (Nde I-BamH I emésztés)

• Az inzertet tartalmazó klónoknál a mutáció jelenlétét szekvenálással fogják a későbbiekben ellenőrizni.



Az újonnan szintetizált szálak DNS-e nem metilált, és ezek tartalmazzák a mutációt.

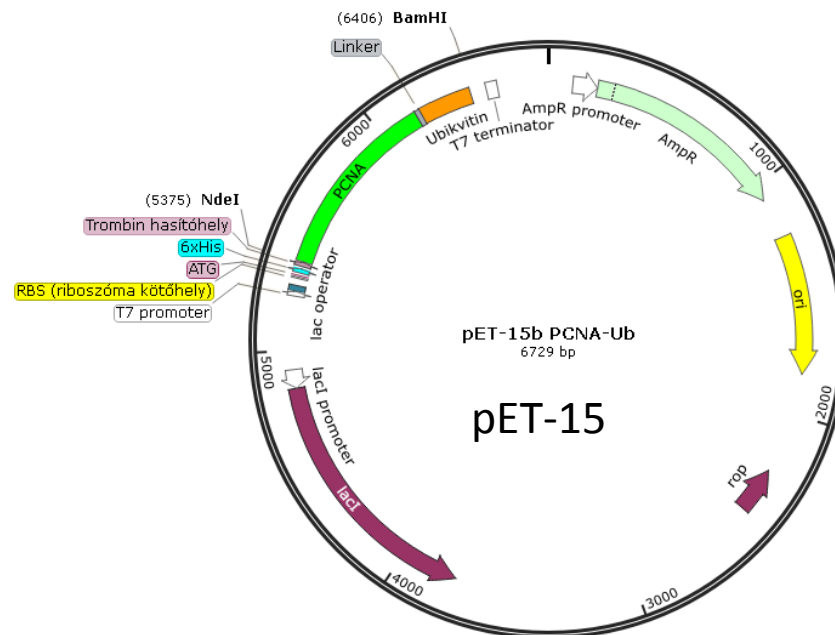
A Dpn I darabokra hasítja az eredeti metilált templátot.



Fehérje munkák: A **PCNA K164R** (és a PCNA-Ub) fehérjék kifejezése

Created with SnapGene®

1. A klónok DNS-eit transzformáltuk BL21 (DE3) E. coli sejtbe (T7 polimeráz alapú pET rendszer)
2. A lemezet inkubáltuk „overnight” 37 °C-on) → telepek kinőttek



3. 1-1 telepet leoltottunk 50-50 ml LB (Luria Bertani Broth) táptalajba (+ampicillin) → növesztettük $OD_{600} = 0,7$ -ig.
4. IPTG-vel (0,5 mM) indukáltuk a fehérjék termelődését → reggelig növesztettük 27 °C-on.
5. Mintákat vettünk (1-1 ml) → mintákat lecentrifugáltuk.
7. A baktériumokat ultrahanggal feltártuk, centrifugálással különválasztottuk a szolubilis és az inszolubilis frakciókat.
8. Mintákat készítettünk SDS és DTT tartalmú mintakóktól hozzáadásával.
9. A mintákat 95 °C-on 5 percig hőkezeltük.

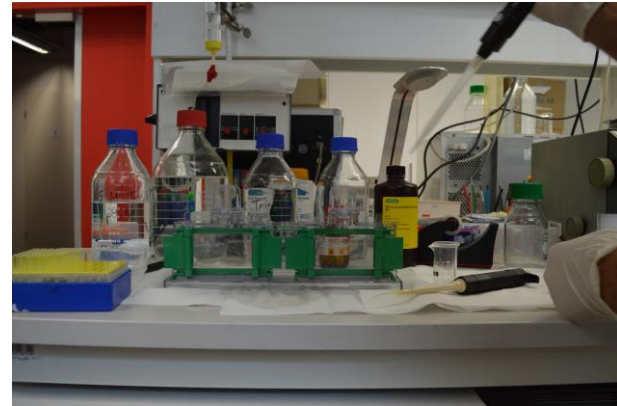


SDS poliakrilamid gélelektroforézis

- Az SDS kitekeri a fehérjéket (+ egységes negatív töltés)
- A mintákhoz adott DTT megszünteti a diszulfid hidakat
- A denaturálódott fehérjék molekulatömegük szerint válnak el a poliakrilamid gélen

Gélöntés:

15 %-os géleket készítettünk a Bio-RAD Mini Proteán gélöntő berendezésen (az egyi kifolyt ☹, a másik megsérült ☹)



Minták felvitele:

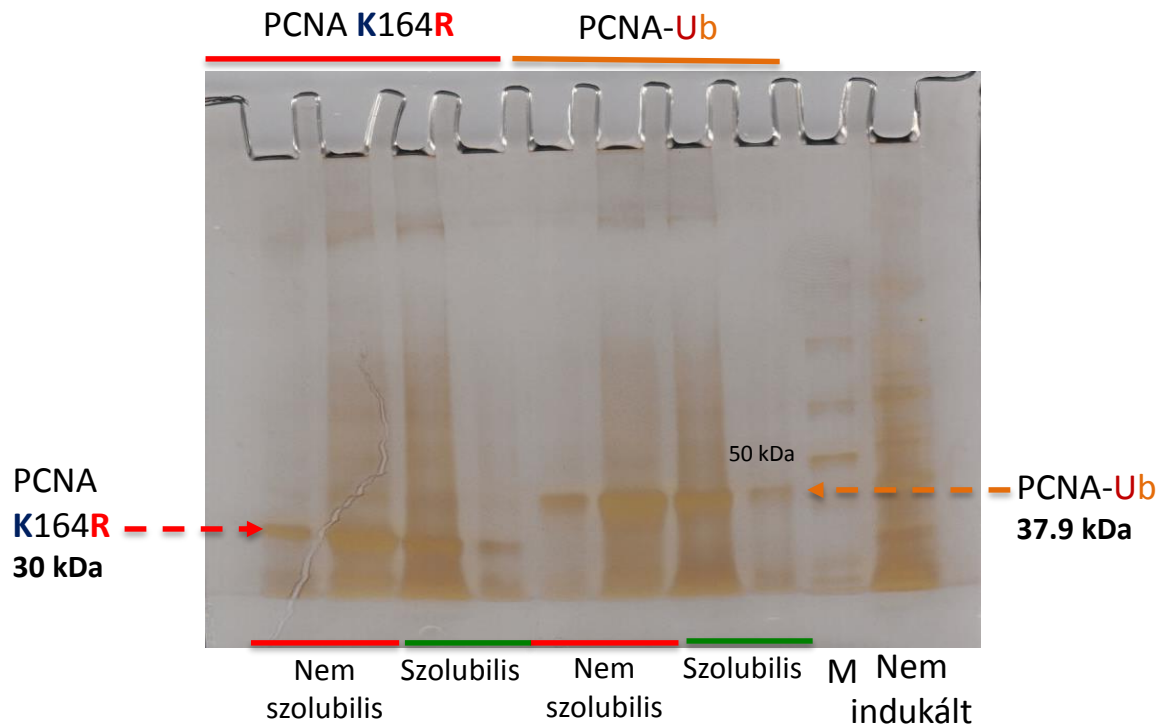
- Két géltre vittünk mintákat (saját megsérült 15 %-os és gyári 7,5 %-os)
- Felvittük mind a **szolubilis**, mind az **inszolubilis** frakció mintáit **hígan** és **10-szer töményebben** is.
- Molekula tömeg standardot is injektáltunk a 9-es zsebbe.
- A géleket 100 V-on futtattuk Laemmli futató pufferben.



A fehérjék vizualizálása ezüst festéssel

- A fehérjék ezüstöt kötnek, mely folyamat redukáló környezetben felerősíthető
- Ezüst-nitrát oldatból a fehérjékre barna fém-ezüst kolloid csapódik le.

- Gél fixálása (ecetsav/metil alkohol/víz)
- Mosása (metanol/víz majd víz)
- Gél érzékenyítése (nátrium tiosulfát) + vizes mosás
- Gél kezelése ezüst-nitrát oldattal + vizes mosás
- Előhívás nátrium karbonát/formaldehid oldattal
- Reakció terminálása 5%-os ecetsavval
- Gél szkennelése



A fehérjék valóban termelődtek



Összefoglalás

A TLS in vitro kísérletekben való tanulmányozására egy mutáns PCNA klónt (PCNA K164R) készítettünk „Quick Change” mutagenézis alkalmazásával.

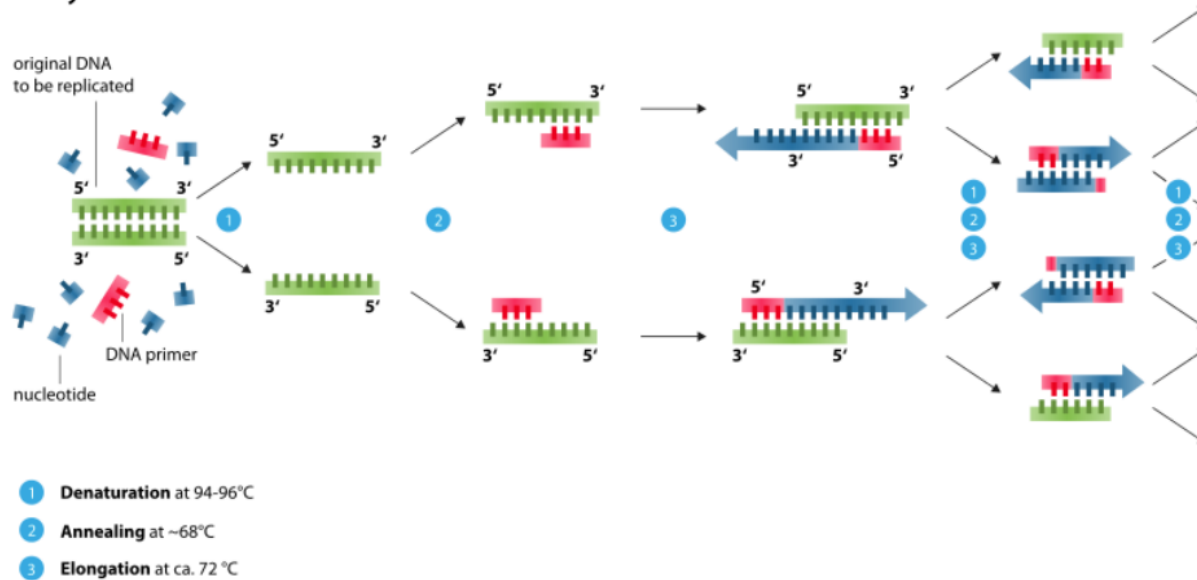
Ezután sikeresen kifejeztük a mutáns fehérjénket, illetve egy másik fehérjét is (PCNA-Ub) *E. coli* expressziós rendszerben.

A fehérjék termelődését SDS gélelektroforézissel és ezüst festési eljárás alkalmazásával mutattuk ki.

Köszönjük a figyelmet!

A PCNA és a PCNA-Ub gének amplifikálása PCR (Polymerase Chain Reaction) segítségével

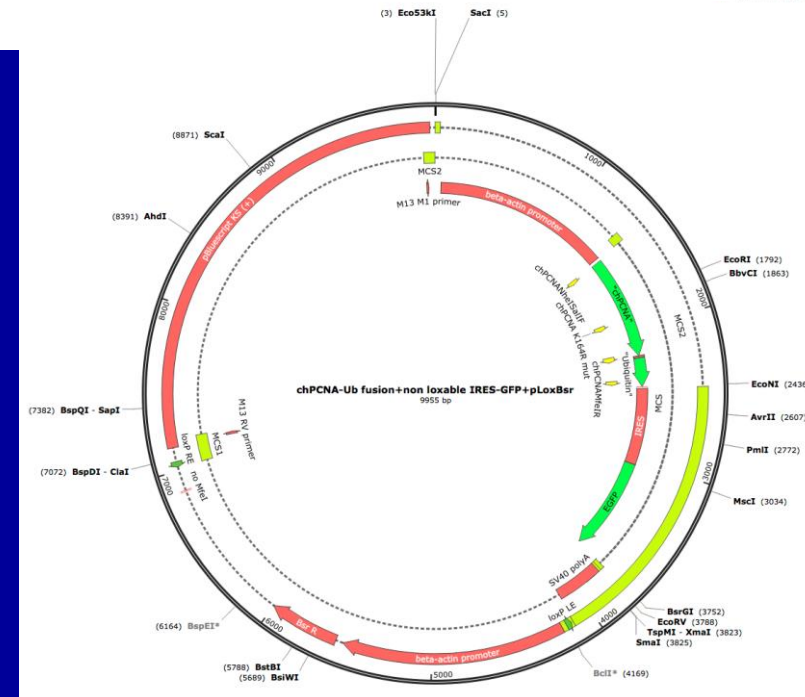
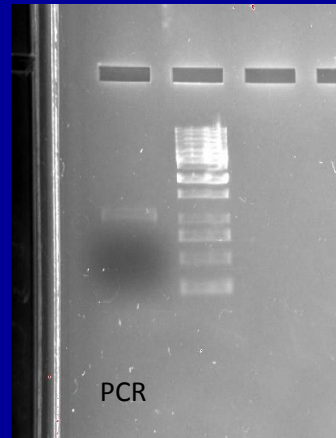
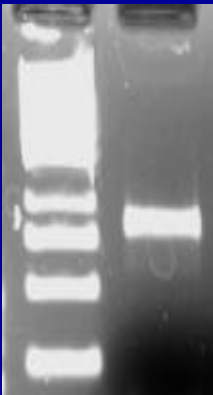
Polymerase chain reaction - PCR



A donor vektor (templát)

Agaróz gél elektroforézis

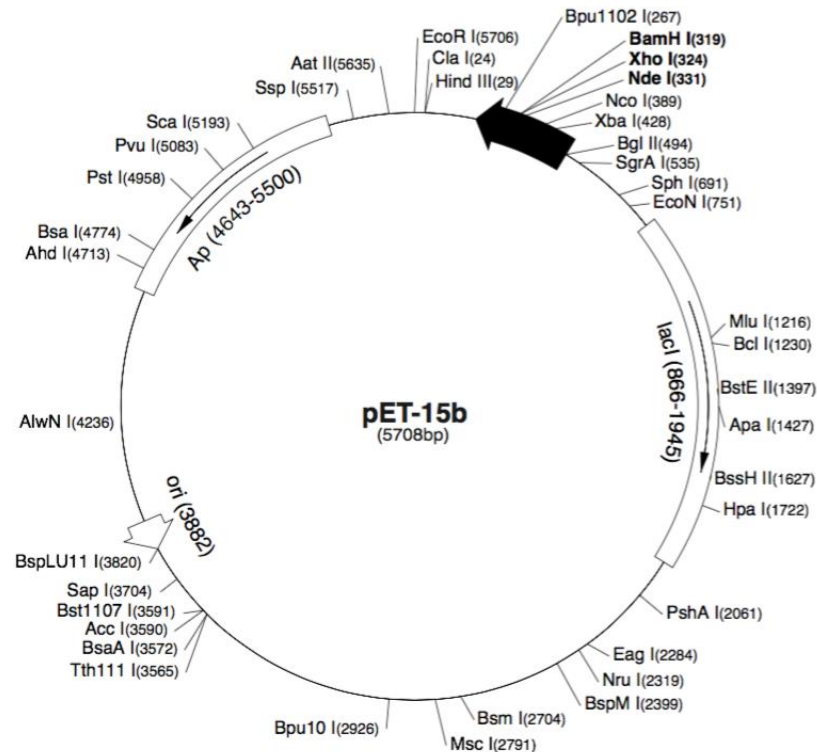
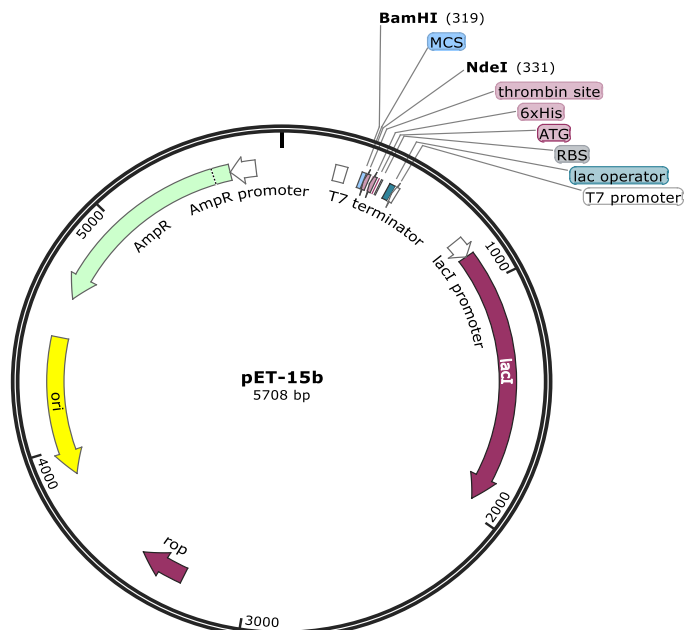
Az amplifikált PCNA és PCNA-Ub gének



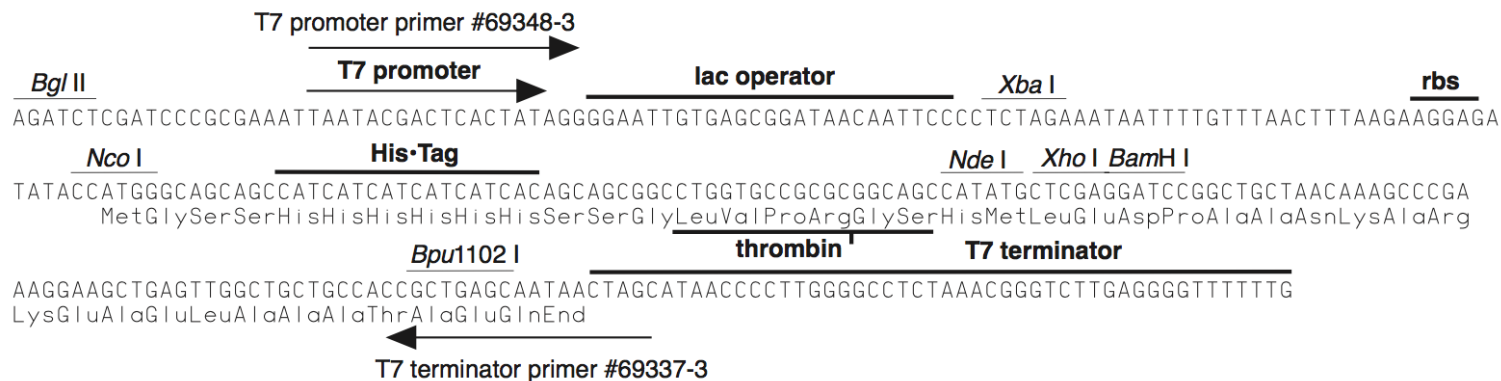
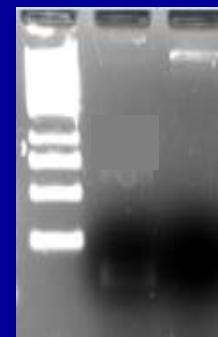
A befogadó vektor

pET-15b sequence landmarks

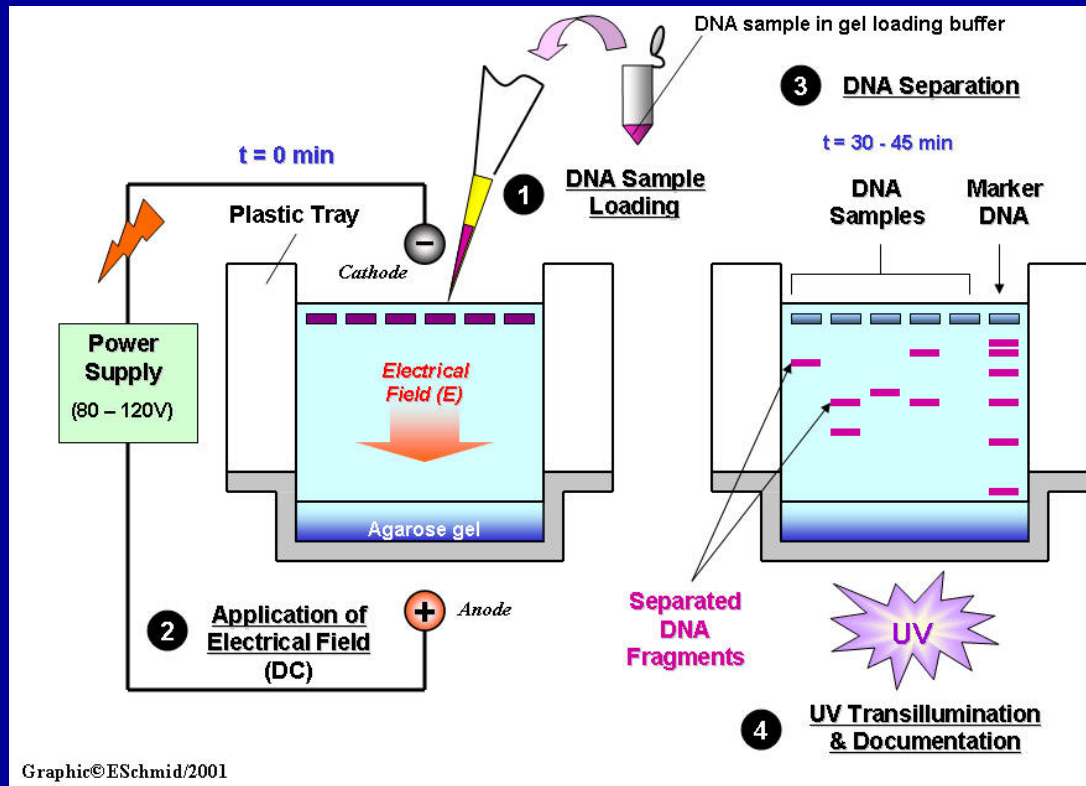
T7 promoter	463-479
T7 transcription start	452
His•Tag coding sequence	362-380
Multiple cloning sites (<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
<i>lac</i> I coding sequence	(866-1945)
pBR322 origin	3882
<i>bla</i> coding sequence	4643-5500



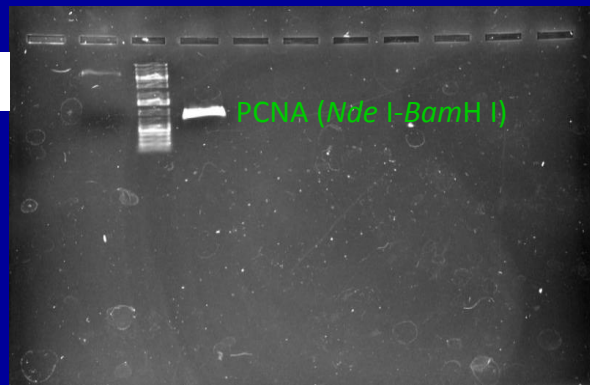
Emésztett vektor



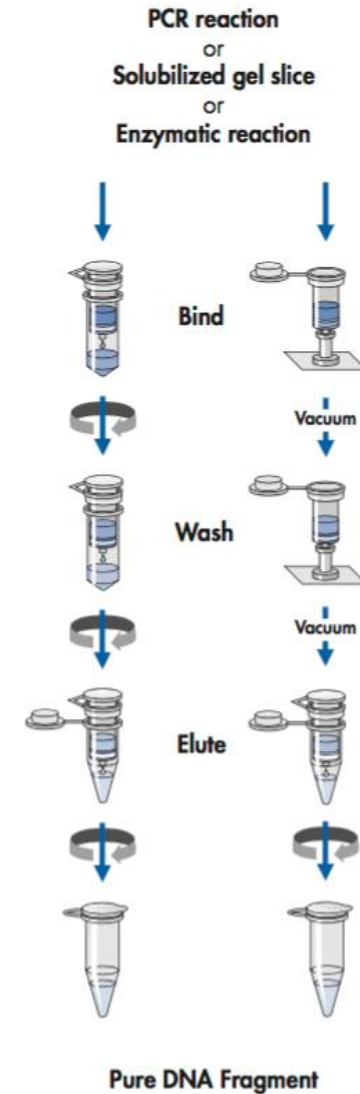
Agaróz gélelektroforézis és DNS tisztítása gélszeletből



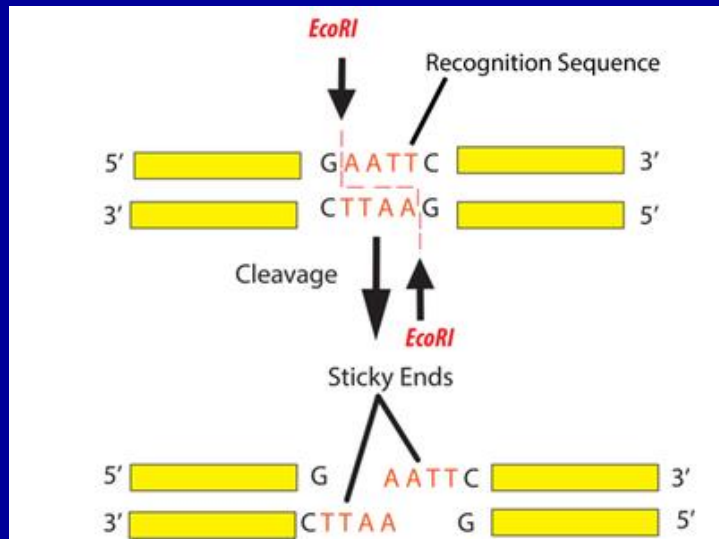
pET15b (Nde I-BamH I)



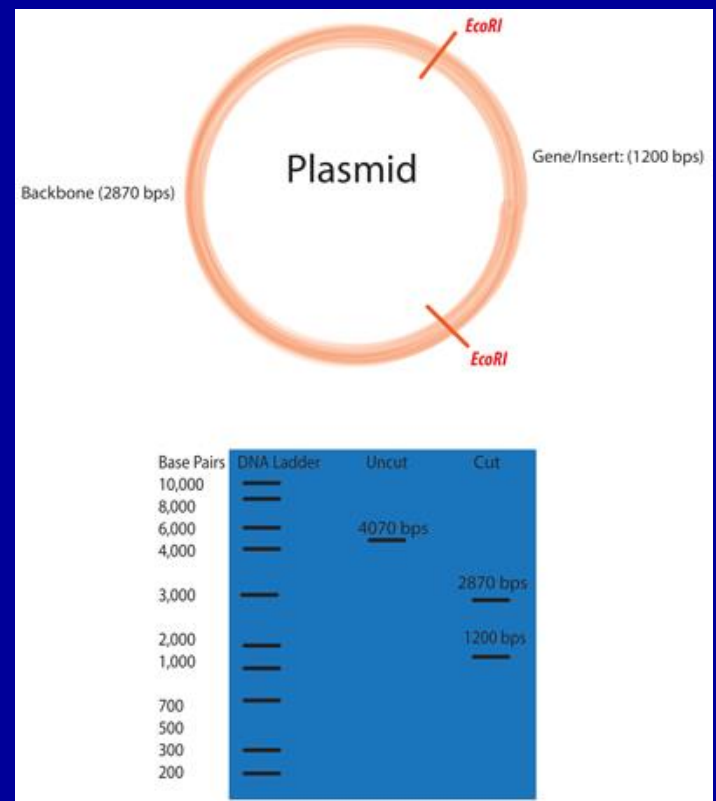
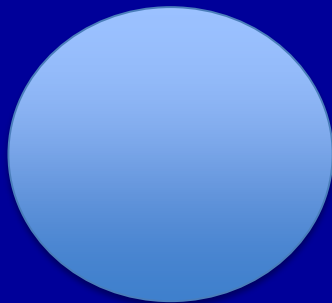
The QIAquick Spin Purification Procedure



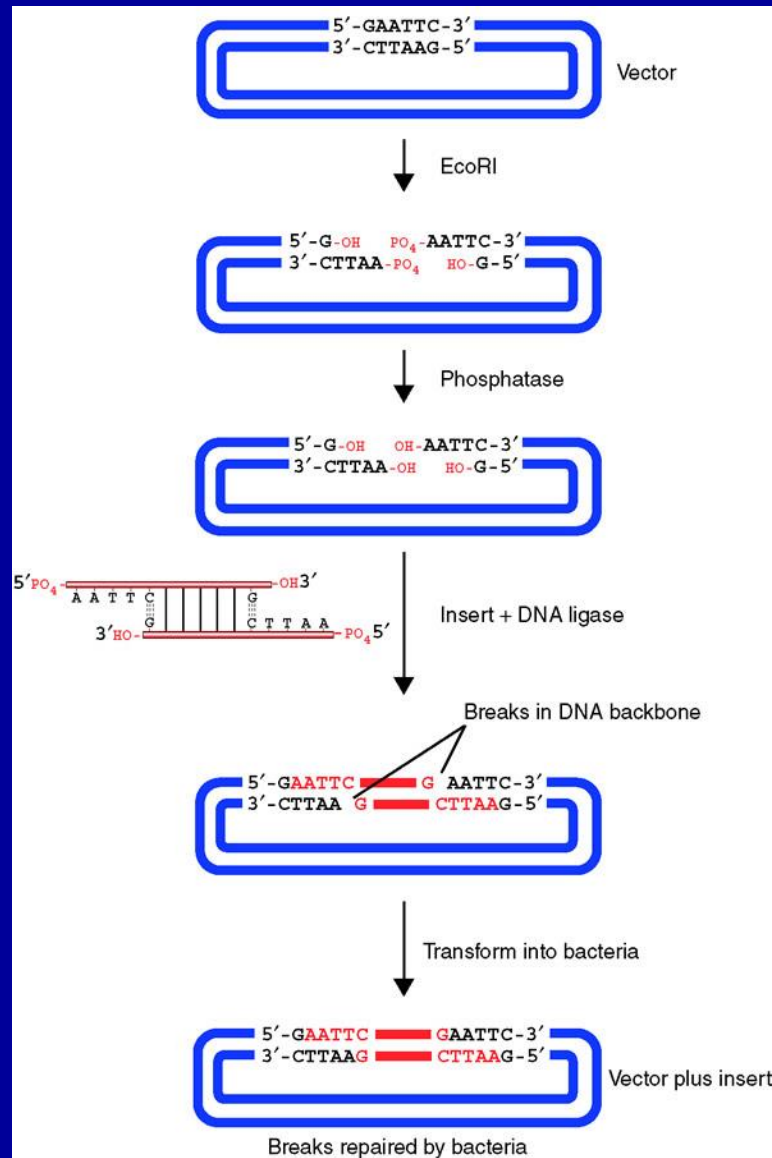
Restriktíós emésztés



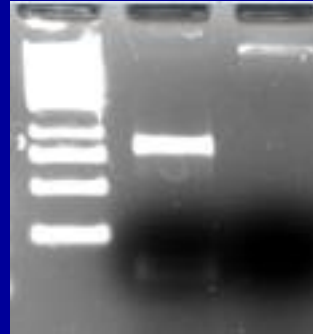
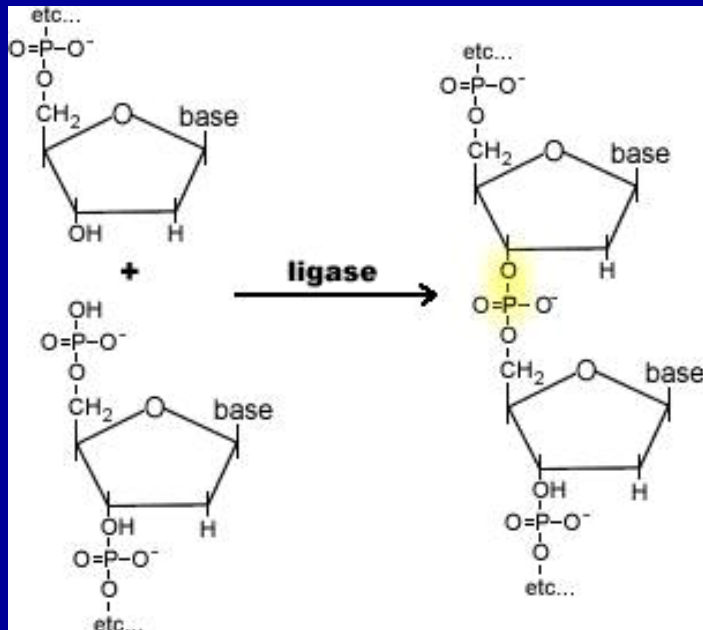
- DNA
- Restriction Enzyme(s)
- Buffer
- BSA (if recommended by manufacturer)
- dH₂O up to total volume



A vektor foszfatázos emésztése



Ligáció



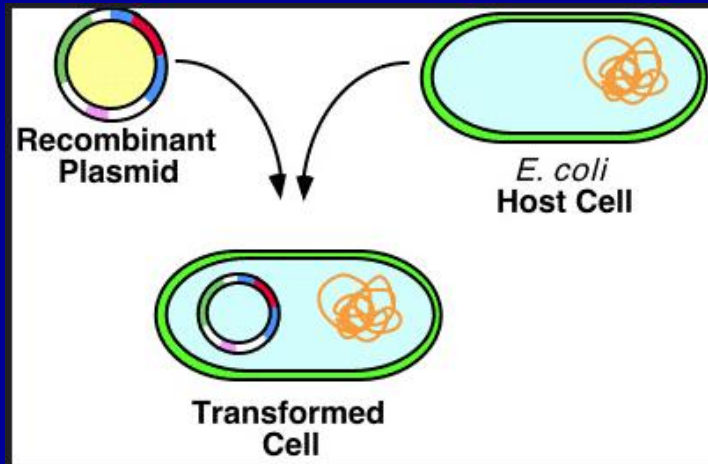
Ligációs elegy pET15b + PCNA)

pET15b (NdeI-BamHI)	5,0
PCNA Enzert	1,0
10X Ligáz Buffer	1,0
T4 Ligáz	1,0
H ₂ O	2,0
Összesen:	10,0

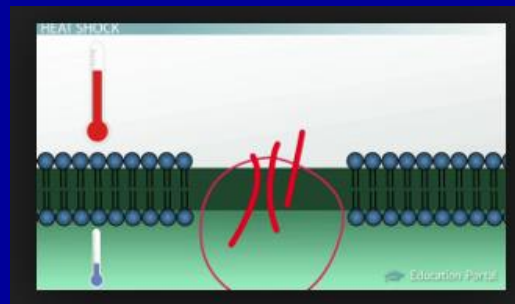
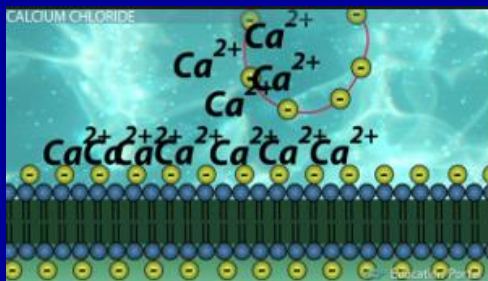
Kontrol elegy 1 (pET15b)

pET15b (NdeI-BamHI)	5,0
10X Ligáz Buffer	1,0
T4 Ligáz	1,0
H ₂ O	3,0
Summa:	10,0

Transzformáció



Kompetens sejt készítése transzformációhoz-transzformáció



TFB1	Concentration	FW
Rubidium Chloride	100 mM	120.92
Manganese Chloride (MnCl ₂ H ₂ O)	50 mM	197.91
Potassium Acetate	30 mM	98.14
Calcium Chloride (CaCl ₂ H ₂ O)	10 mM	147.02
Glycerol	15%*	
Adjust to pH 5.8 with dilute (0.2%; 1.0 M) acetic acid.		

TFB2	Concentration	FW
MOPS	10 mM	209.3
Rubidium Chloride	10 mM	120.92
Calcium Chloride	75 mM	147.02
Glycerol	15%	
Adjust pH to 6.5 with KOH.		

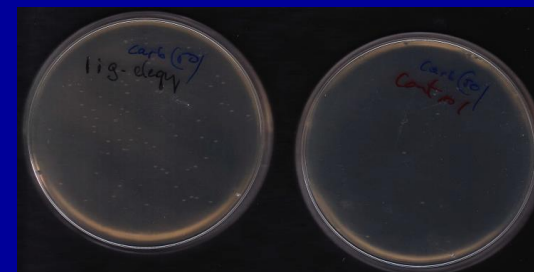
Baktérium kultúra felnövesztése

Baktériumok kezelése a permeabilizáló oldatokkal (kezelések előtt és között centrifugálás)

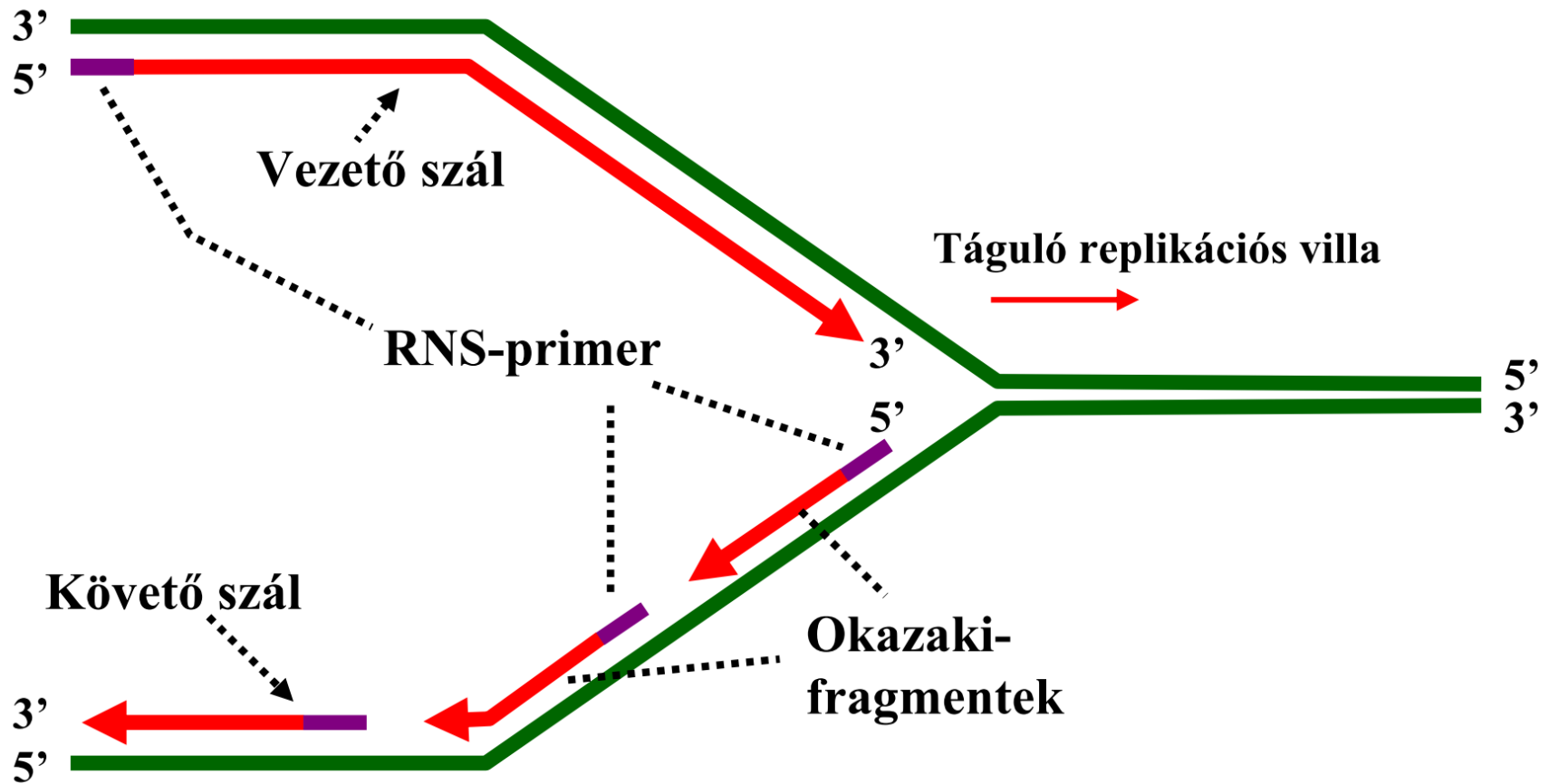
Kezelt baktériumol összegyűjtése centrifugálással, majd szétosztása és lefagyasztásaú

TRANSZFORMÁCIÓ (folyt.):

- DNS (a ligációs és a kontroll elegyekből) hozzáadása 1-1 felolvasztott kompetens sejthez
- Fél óra inkubálás
- Hő sokk (42 fokon, 2 perc)
- LB táptalajjal való kiegészítés
- 1 óra inkubálás
- Antibiotikumos lemezekre való kikenés
- Inkubálás éjszakán keresztül
- A telepekből néhányad felszaporítunk, DNS izolálás, **inzerit kimutatása restrikciós emésztéssel**
- **A fehérje kifejezéséhez a jó klónok valamelyikéből transzformálunk BI21 (DE3) E. coli sejtbe (ezen sejt vonal T7 polimerázt kódol, és ennek segítségével íródik át a PCNA génje).**



Extra info



Extra info

