

# Uracil detektálása a DNS-ben fluoreszcensen jelölt UNG fehérjével

Zsótér Soma, Vegyész MSc I. évfolyam

Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont Enzimológia Intézet

Témavezetők: **Prof. Vértessy G. Beáta**, MTA doktora, egyetemi tanár

**Róna Gergely**, PhD hallgató

MTA TTK Enzimológia Intézet

Kutatómunkám célja egy olyan jelölt enzim előállítása és jellemzése volt, amellyel sejtekben és szövetekben lehetne vizsgálni a DNS-ben előforduló uracil eloszlásának mintázatát. Erre a feladatra a DsRed nevű fluoreszcens fehérjével fuzionált, katalitikusan inaktív hUNG2-t (D145N és H268N mutáció) szeretném használni. A konstrukt génjét hordozó rekombináns DNS kész állapotban állt a rendelkezésemre.

A kísérleteim első része a fehérjeexpresszió optimalizálásából, majd ezt követően a szükséges mennyiségű fehérje előállításából és tisztításából tevődött össze. SDS-PAGE és mikroszkópos eredmények alapján az enzim termelését *E. coli* BL21 ung- sejtípussal végeztem, 20°C-os hőmérsékleten, 16 órán keresztül. A fehérjét Ni-NTA töltetű oszlopon tisztítottam gradiens elúciót alkalmazva. Western blot segítségével kimutattam, hogy a tisztított preparátumban lévő szennyezők jelentős része a célfehérje degradációjából származik.

A kísérleteim második része az előállított fehérje tesztelése volt. Irodalmi adatokból ismert, hogy a D145N és H268N pontmutációk hatására a jelöletlen hUNG2, az uracil kötő képességének megtartása mellett, képtelenné válik a  $\beta$ -N-glikozid kötés hidrolízisére. Kérdés azonban, hogy a DsRed-el történő kapcsolás után megmaradnak-e ezek a tulajdonságok. Ennek eldöntésére a fehérje aktivitását agaróz-assayvel, a DNS kötő képességét pedig elektroforetikus mobilitás teszttel (EMSA) ellenőriztük. Az agaróz-assay és az EMSA alapján megállapítottuk, hogy a konstrukt katalikusan inaktív és rendelkezik DNS kötő képességgel. A rekombináns fehérje uracil tartalmú DNS-re mutatott specificitását dot-blot technikával ellenőriztem. Az optimalizálás után bebizonyosodott, hogy az enzim szelektív az uracil tartalmú DNS-re. A megfelelő kalibráló egyenest felvéve a módszer kvantitatív uracil-meghatározásra is alkalmas.

Jelenlegi munkám során FdUR-el kezelt, fixált MEF ung-/- sejteket festek az előállított fehérjével. A konfokális mikroszkóppal készült felvételeken látható különbség van az FdUR-el kezelt és nem kezelt minták között.

Jövőbeli terveim között szerepel a festési eljárás optimalizálása és olyan további konstruktok előállítása, amelyekkel még nagyobb érzékenység érhető el a nem kívánatos fehérje-fehérje kölcsönhatások megszüntetése mellett.