



*Kitináz enzimek vizsgálata és génjeik transzformációs
lehetőségei probiotikus E.coli baktériumba*

TUDOK előadás
2014/15. tanév

készítette:

Marton Ákos

Nikolényi Gergő

Szegedi Radnóti Miklós Kísérleti Gimnázium

UT-2014/15-0023

Tisztelt Zsűritagok, tisztelt hallgatóság!

Marton Ákos vagyok és a Szegedi Radnóti Miklós Kísérleti Gimnáziumból érkezünk társammal Nikolényi Gergővel, hogy bemutassuk a Crohn-betegség tüneteinek egy lehetséges kezelési módjának kifejlesztésére végzett kutatási projektünket. Az előadásunkban bemutatásra kerülő kutatási projektünket eredetileg a bostoni MIT szintetikus biológiai versenyére, az iGEM-re készülő kezdtük el. Az iGEM versenyen öt kontinens több mint 50 csapata indult a tavalyi tanévben, mindannyian azzal a céllal, hogy egy orvosi, műszaki vagy környezetvédelmi célra tervezzenek és hozzanak létre egy mikroorganizmust.

Iskolai csapatunk három terv közül választotta ki azt, amelyiket a rendelkezésre álló fél év alatt megpróbáltunk megvalósítani. A radioaktivitást elektromossággá alakító baktérium alapú rendszer valamint egy élesztőből és kólibaktériumból álló, mérgező gombák jelzésére alkalmas rendszer mellett végül úgy döntöttünk, hogy a Crohn-betegség potenciális kezelésére alkalmas probiotikus baktérium tervezésébe és kivitelezésébe fogunk bele.

A Crohn betegség és más gyulladásoos bélbetegségek egyre több fiatal ember életét keserítik meg. Súlyos tüneteik közé a hasi fájdalom mellett a nem múló hasmenés, hányinger, fekélyek és vérszegénység is társul. Hazánkban közel 20 ezer, az USA-ban több mint fél millió embert érint a betegség, de ennél sokkal többen maradnak diagnosztizálatlanul.

A betegség molekuláris etiológiája, így gyógymódja is egyelőre ismeretlen, de a magas prevalencia értékek miatt számos tudományos kutatás indult a tünetek enyhítését célzó kezelések kifejlesztésére. Ezek közül itt két példát említenék. Az egyik kutatásban eredményesen használtak IL-27-t termelő probiotikus Lactococcus Crohn beteg egér-modellekben a gyulladás csökkentésére, igazolva, hogy genetikailag módosított probiotikus baktériumok alkalmazhatók a betegség kezelésére. A másik cikkben táplálék kiegészítőként alkalmazott N-acetil-glükózamin bizonyult a tünetek csökkentésére alkalmasnak Crohn-beteg fiatalokban.

Az NAG a kitin monomerje, előállításában azonban drága és önálló adagolása sem kifizetődő, hiszen jelentős része felszívódik a vékonybélben a hatás kifejtése előtt. A kitin lebontását, azaz NAG-ná a természetben endo- és exokitinázok végzik. A tápcsatorna mirigysejtjei szekernálnak exokitinázt, amely azonban csak a kisebb méretű kitin-oligomereket képes NAG-ná bontani. A kitin oligomerekké alakítását csak a bélben eredetileg nem termelő endokitinázok helyben való termelésével lehetne elérni. Kitint használva táplálék kiegészítőként, az NAG termelődése így épp az elérni kívánt hatás helyén valósulhatna meg.

A fentiek alapján kirajzolódott projektünk lényege: egy olyan probiotikus baktérium tervezése, ami természetes, de emelt kitintartalmú táplálék fogyasztása mellett a vastagbélben védő hatású NAG koncentrációt hozhat létre.

A projekt kivitelezéséhez ki kellett tehát választanunk a megfelelő probiotikus baktériumot, a megfelelő transzformálandó endokitináz gént és vektort, valamint meg kellett oldanunk a kitináz termelő baktériumok hatékonyságának mérését is.

A kitináz aktivitás vizsgálatához két módszert is használtunk.

A természetes kitináz-aktivitás megmérése céljából készítettük koloid kitint tartalmazó táptalajt. (Vetítésben esetleg egy flow-chart a készítés módjáról??) Majd ezeken a táptalajokon tenyésztettünk különböző helyekről származó talajmintákat. Az ezekben a mintákban található mikroorganizmusok – ezek lehetnek mind gombák, mind baktériumok – által termelt kitináz enzim aktivitásának hatására a Petri-csészén feltisztulások láthatóak. A képen egy, a Tisza-folyó partjáról és egy virágágyásból származó minta mikroba-faunájának kitin bontásának hatása látható.

A kutatásban használt baktériumok által termelt kitináz aktivitását egy másik módon is megvizsgáltuk. Ehhez a Sigma-Aldrich Chitinase Assay Kit-et rendeltük meg, és így a korábban bemutatott kutatásokhoz képest eltérő módon, kolorimetrikusan tudtuk vizsgálni az enzimaktivitást KVANITITATÍV ADATOK !!! Az assay alapja, hogy az enzim működésének hatására a szubsztrát átalakulása során p-nitrofenol szabadul fel, amelyet 405 nm-en microplate-reader-rel tudunk vizsgálni. A csomag két különböző szubsztrátját használtuk két különböző mérésben és *Bacillus thuringiensis*, *Chromobacterium violaceum*, *Trichoderma viride* baktérium-törzsek kitináz enzimeit vizsgáltuk. Ez utóbbi az assay kontrollja.

Az elsőben egy exokitináz enzimekhez alkalmas enzimet használtunk. Az exokitinázok a kitinmolekulákat csak a végükön hasítják fel dimerekre. A 96 zsebes microplate-en való elrendezés itt látható. Az ábrán pirosan kiemelt részen (kép) látható, hogy a *Bacillus thuringiensis* 01262-es törzsének, amelyet egy éjszakán át ráztunk rázva volt, az enzime megfelelő aktivitást mutatott. Ez alapján a matematikai formula alapján (kép) számolva ennek a tenyészetnek az enzimaktivitása 2.08 Units/mL lett.

Második kísérletünkben endokitinázok működéséhez alkalmas szubsztrátot használtunk. Az endokitináz a molekula láncának a NAG-ok közötti láncon belüli kötéseket szakítja fel. Ezen a módon nem sikerült megfelelő eredményt kapnunk. Ezek alapján a *Bacillus thuringiensis* kitináz enzime az exokitinázok csoportjába tartozik.

Azért, hogy megvizsgáljuk, hogy a kitináz enzimek hogyan működnek a béltraktus sejtjeinek jelenlétében, Whisker patkányok bélkivonatát is hozzáadtuk az assay-hez. Eredményeink azt mutatták, hogy a bélkivonatnak sem gátló, sem serkenő hatása nincs a kitinázra nézve. Továbbá érdemes kiemelni, hogy a megfelelően működő enzimet termelő baktérium tenyészetek egész éjszakás rázáson estek túl, és ez a mozgás valamint, az assay 37°C-os hőmérséklete és kb. 5-ös pH-ja megfelel a béltraktus belső környezetének.

A manapság egyre fontosabbá váló bioinformatika, együtt a folyamatosan fejlődő adatbázisokkal, nagy segítségünkre volt kutatásaink kezdetén: megvizsgáltuk, hogy milyen információ lelhető fel az általunk alkalmazni kívánt kitinázzal kapcsolatban.

A keresés során kiderült, hogy majdnem 40,000 DNS és több mint 32,000 fehérje szekvencia hozható összefüggésbe a kitináz enzimekkel kapcsolatban. Az általunk használt, a *Chromobacterium violaceum* Cv2935 génjéről rendelkezésre álló adatokból kiderült, hogy az általában nagyméretű kitináz kódoló szekvenciákkal ellentétben ez a DNS szakasz mindössze 1320 bázispár, aminek köszönhetően viszonylag könnyen transzformálhatónak tűnt.

A további lépésekben a kutatás némi akadályokba ütközött, de összességében ígéretesen végződött.

Az IDT-től megrendelt DNS szakasz a guanin-citozin gazdagsága miatt nehezen megszintetizálhatónak bizonyult, így más forrásból kellett azt beszerezni: egy német vállalattól rendeltünk teljes *Chromobacterium violaceum* genomot, melyből a megfelelő primerek segítségével vontuk ki a kitináz gént. Az ehhez használt grádiens PCR-rel a megfelelő annealing hőmérsékletet határoztuk meg, különböző polimerázok alkalmazásával pedig a 3' overhang-ek elkerülése mellett szaporítottuk fel a DNS szakaszt, valamint a kiválasztott chloramphenicol rezisztenciát tartalmazó plazmidot.

A PCR-ok termékeit gélelektroforézissel ellenőriztük. A többé-kevésbé sikeres PCR-ok gélképei szerint, bár primer dimerek halmozódhattak fel, a DNS szakaszt sikerült felszaporítani.

Ezt követően a gélekből kivontuk a gént és a plazmidot, amit e két termék EcoRI és PstI-gyel való emésztése és ligálása követett.

A kitináz génjét tartalmazó plazmidot elektroporálással valamint hő-sokk módszerrel is transzformáltuk *E.coli*-ba. A transzformálások eredményét colony PCR-rel, továbbá a baktériumok különböző – kolloid kitint, LB-t valamint LB-t és kloramfenikolt tartalmazó - táptalajokra való leoltásával vizsgáltuk. A colony PCR termékeinek gélképein, az ismét akkumulálódott primer dimerek felett halványan megjelent a plazmid is. A kenetek esetében a kolloid kitint tartalmazó agaron nem, míg az LB és LB+kloramfenikol tartalmú táptalajokon megjelentek telepek. Ezek azt bizonyítják, hogy a baktérium a kitint vagy származékait nem képes hasznosítani, valamint hogy a plazmidot sikeresen transzformáltuk.

Összegzés

Kísérleteink alapján a következő eredményre jutottunk:

- Sikerült megfelelő kolloid kitint tartalmazó táptalaj receptet kidolgoznunk a kitináz aktivitás kvalitatív szemléltetésére.
- Sikerült igazolnunk, hogy a Sigma Aldrich cég kitináz assay kitje a tápoldatban tenyésztett baktériumok által exportált kitináz aktivitás mérésére is alkalmas.
- In vitro igazoltuk, hogy a bakteriális eredetű kitinázok aktivitásukat a vastagbélben uralkodó körülmények között is megőrzik.
- Sikerült igazolnunk, hogy a Chromobacterium violaceum endokitináz génje alkalmas felszporításra és transzformációra is.
- Sikeres transzformációt hajtottunk végre az MIT iGEM projektjének pSB1C3 plazmidjával E.coli DH5 alpha törzsében.

A projekt folytatása

- Ebben a tanévben elsősorban a bemutatott kitináz assay alkalmazhatóságát szeretnénk vizsgálni a baktérium által exportált kitinázok kinetikai tulajdonságainak (K_m és V_{max}) mérésére.
- A következő tanévben pedig mi vagy fiatalabb diáktársaink folytatnák a projektet a szintetikus biológiai nehézségek megoldására.

iGEM:

Az MIT iGEM versenyén a HUNGENIOUS csapatunkkal a következő produktumokat mutattuk be 2014. júniusában:

- A Chromobacterium violaceum Cv2935-ös kitináz génjét tartalmazó szintetikus konstruktot (BBa_K1293022 sz. BioBrick).
- A tevékenységünket bemutató angol nyelvű közleményt, amelyet itt is szívesen adjuk a jelenlévőknek.
- A módszereket és protokollokat részletesen tartalmazó szöveget.
- Egy 5 perces rövidfilmet a projektről, amely a youtube oldalon is elérhető.
- A Biosafety előírások betartásáról szóló jelentést.
- A társadalmi kapcsolatainkat bemutató összefoglalót
- A felhasznált szakirodalom gyűjteményét.
- Egy posztert és egy előadást, amelyeket az MIT-n mutattunk be.
- A fentieket egy közös helyen összegyűjtő, az iGEM verseny által üzemeltetett angol nyelvű honlapot.

<http://2014hs.igem.org/Team:HUNGENIOUS>

Társadalmi kapcsolataink:

- Interjúkat készítettünk gyakorló orvosokkal
- Egy internetes kérdőív segítségével felmértük kortársaink véleményét a GMO-k egészségügyi alkalmazásával kapcsolatban
- Bemutattuk projektünket az iskolánkba látogató Aaron Chiecanover Nobel-díjas kutatónak
- Megismerkedtünk a londoni Imperial College előző évi iGEM csapatának tagjaival.
- Munkánkat bemutattuk az SZTE Szentgyörgyi programjának konferenciáján

Szakmai támogatóink:

- Társaink akikkel együtt csináltuk a projekt egyes részeit
- Iskolánk, a Szegedei Radnóti Miklós Kísérleti Gimnázium biológia szaktanárai
- Nyerges Ákos, Borbola Andrea és ...(nemtudom) Bálint az SZBK Biokémiai Intézetének fiatal kutatói
- Az SZTE-TTIK Összehasonlító Élettani, Anatómiai és Idegtudományi Tanszékének laboratóriumi személyzete

Pénzügyi támogatóink:

- Magyar Biológianárok Országos Egyesülete (MABITE)
- Nemzeti Tehetségprogram
- Az iskolánkban létrejött Természettudományos Laboratórium TÁMOP-3.1.3-10/2-2010-0003
- A Biocenter Kft., a KÉSZ Zrt, a Tisza-Maros Víziközmű Üzemeletető Kft. és a Compexlab Kft. nevű cégek
- *Az Út a tudományhoz 2014/15-0023. sz. pályázat*