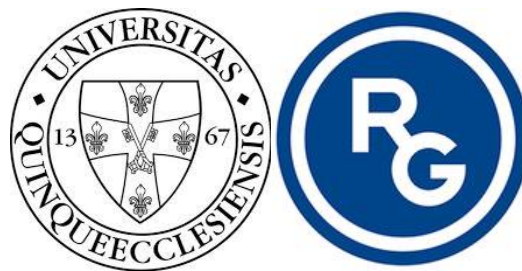


PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
Kémia Doktori Iskola

Doktori (PhD) értekezés

Salamon Pál



PÉCS, 2022

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

Doktori (PhD) értekezés

Salamon Pál

Témavezető:
Prof. Dr. Albert Beáta

Doktori Iskola vezető:
Prof. Dr. Kilár Ferenc

PÉCS, 2022

Rekombináns fehérjék bioszintézisének
fejlesztése prokarióta expressziós
rendszerben

*„A legnagyobb hiba,
hogy azt hiszed
van időd.”*

Gautama Buddha

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton megragadom az alkalmat, köszönetet mondok ez úton is témavezetőimnek. Hálás vagyok **Prof. Dr. Albert Beátának**, hogy segített a biotechnológia, biokémia útvesztőiben eligazodni, munkámat figyelemmel és türelemmel kísérte. Köszönetemet fejezném ki továbbá **Prof. Dr. Lányi Szabolcs** Professzor Úrnak, aki munkámat mindvégig tudásával, gondos figyelmével és irányításával segítette. Köszönettel tartozom **Prof. dr. Kilár Ferencnek**, aki doktori képzésem során támogatott, ösztönzött az önálló kutatómunka magas színvonalú művelésében, a doktori értekezés létrejöttéhez nagy mértékben hozzájárult, hálás köszönet érte. Hálás köszönetem fejezem ki **Prof. Dr. Hársfalvi Jolánnak** a PhD évek során nyújtott hasznos szakmai tanácsokért és támogatásáért, a doktori értekezés kivitelezésében vállalt szerepéért.

Köszönöm **Dr. Miklóssy Ildikónak**, aki a modern biotechnológia világában sok-sok türelemmel kalauzolt, és mindig segítségemre volt a felmerülő problémák megoldásainak keresésében. A tudományos közleményekben, a kísérletek kivitelezésében nyújtott önzetlen segítségért köszönettel tartozom **Dr. Orbán Csongornak**. Köszönet illeti **Dr. Bálint Emesét** a közlemények és a dolgozat elkészítéséhez nyújtott fáradhatatlan és önzetlen segítségéért. Az értekezés elkészítése során nyújtott hasznos tanácsokért köszönet illeti **Dr. Csató-Kovács Erikát**.

Külön köszönet illeti **munkatársaimat** is, akiknek hála a mindennapok sosem teltek egyhangúan, illetve dolgozatom alapos és kritikus átnézésével nagy segítségemre voltak.

Köszönettel tartozom a **Richter Gedeon Talentum Alapítvány** anyagi támogatásért és a munkám figyelemmel követéséért.

A PhD képzés során az önálló kutatói munka, a kutatástervezés magas szintű elsajátításához nagyban hozzájárult az **Új Nemzeti Kiválóság Program (UNKP)**.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm családomnak és barátaimnak a türelmet, a támogatást.

Tartalomjegyzék

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	4
Tartalomjegyzék	5
Rövidítések jegyzéke.....	7
Ábrajegyzék.....	8
Táblázatjegyzék.....	10
Kivonat	11
1. Irodalmi áttekintés	12
1.1. Bevezetés	12
1.2. Rekombináns fehérjék bioszintézise	14
1.2.1. T7 promóter alapú expressziós rendszer	15
1.2.2. Autoindukció.....	17
1.3. Rekombináns fehérjék bioszintézisének optimalizálása.....	18
1.4. Zárványtestek képződésének elkerülése	19
1.5. A vizsgált fehérjék molekuláris jellemzői és biológiai funkciói	21
2. Célkitűzések	25
3. Anyagok és módszerek	27
3.1. Alkalmazott sejtvonalak.....	27
3.2. Kémai kompetens sejtek előállítása és transzformáció	28
3.3. A SMAC és BUFII rekombináns fehérje bioszintézise.....	29
3.3.1. pUbiq-SMAC expressziós vektor létrehozása	29
3.3.2. 10xHis-UBI_SMAC fehérje expressziója és tisztítása	30
3.3.3. 10xHis-UBI_SMAC fehérje szerkezetének modellezése.....	32
3.3.4. SMAC és GST-XIAP közötti kölcsönhatás <i>in vitro</i> vizsgálata.....	32
3.3.5. 10xHis-UBI_BUFII fehérje bioszintézise	32
3.4. GST-XIAP zárványtestek refoldingja.....	34
3.4.1. GST-XIAP zárványtestek bioszintézise	34

3.4.2.	GST-XIAP zárványtestek szolubilizálása és refoldálása	35
3.5.	Autoindukció alkalmazása az AURKA zárványtestekké történő aggregációja ellen.....	37
3.5.1.	Heterológ gént tartalmazó kultúrák előnevelése	37
3.5.2.	Fermentációs körülmények	37
3.5.3.	Mintavétel, mintaelőkészítés és SDS-PAGE	38
3.5.4.	Rekombináns fehérje mennyiségi meghatározása.....	41
4.	Eredmények	42
4.1.	SMAC és BUFII rekombináns fehérje bioszintézise	42
4.1.1.	pUbiq-SMAC expressziós vektor.....	42
4.1.2.	10xHis-UBI_SMAC fehérje expressziója és tisztítása	43
4.1.3.	10xHis-UBI_SMAC fehérje szerkezete	46
4.1.4.	SMAC és GST-XIAP közötti kölcsönhatás <i>in vitro</i> vizsgálata.....	47
4.1.5.	10xHis-UBI_BUFII fehérje bioszintézise	48
4.2.	GST-XIAP zárványtestek refoldingja.....	50
4.2.1.	GST-XIAP zárványtestek bioszintézise	50
4.2.2.	GST-XIAP zárványtestek szolubilizálása és refoldálása	50
4.3.	Autoindukció alkalmazása az AURKA zárványtestekké történő aggregációja ellen.....	53
4.3.1.	Mikrotitráló lemezes fermentáció monitorizálása.....	53
4.3.2.	Alkalmazott tápoldatok összehasonlítása	55
4.3.3.	Rekombináns fehérje mennyiségi meghatározása.....	58
5.	Diszkusszió.....	62
6.	Tézispontok	67
7.	Publikációs jegyzék	69
8.	Irodalomjegyzék	73
9.	Mellékletek.....	84

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Magyarázat
BOG	B-oktil-glükózid 3-oktil-glükózid
bp	bázispár
BUFII	BUFORIN II
CCMV	Cowpea Chlorotic Mottle Virus
CHAPS	3-((3-kolamidopropil) -dimetil-ammónio) -1-propánszulfonát
CMC	kritikus micellakoncentráció
DTT	ditiotreitól
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
glc	glükóz
GST	Glutation-S-transzferáz
IPTG	izopropil β -D-1-tiogalaktozid
kb	kilobázis
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertani táptalaj/ tápoldat
OD ₆₀₀	optikai denzitás (600 nm)
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PCR	Polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
RPM	fordulat/perc (revolutions per minute)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SMAC	második mitokondriális kaszpázaktivátor fehérje
TEMED	N, N, N', N' - tetrametil-etilén-diamin
TRIS	tris- (hidroximetil)-amino-metán
XIAP	X-kromoszómához kapcsolódó apoptózis inhibitor

Ábrajegyzék

1. ábra T7 expressziós rendszer sematikus ábrája (Bardóczy, 2009)	15
2. ábra: A tanulmányban vizsgált pUbiq rendszer sematikus ábrája	29
3. ábra: EGFP koncentráció meghatározásához alkalmazott kalibráció	41
4. ábra pUbiq-SMAC vektor konstrukció részlete	42
5. ábra: Az optikai denzitás (biomassza) vizsgálata a fermentáció során.....	43
6. ábra: A 10xHis-UBI_SMAC rekombináns fehérje (32,1 kDa) termelés SDS-PAGE analízise	44
7. ábra: A 10xHis-UBI_SMAC rekombináns fehérje affinitáskromatográfiás tisztítás (5 mL HisTrap (GE Healthcare)) elúció folyamatának kromatogramja	44
8. ábra: A 10xHis-UBI_SMAC komplex YUH1 emésztésének SDS PAGE eredménye	45
9. ábra: 10xHis-UBI_SMAC szerkezet.....	46
10. ábra. A rekombináns natív SMAC kötődési vizsgálata GST-XIAP-vel.....	47
11. ábra: A pUbiq-BUFII vektor restriktív endonukleázokkal végzett emésztés agaróz-gélelektroforézis eredménye	48
12. ábra: A fúziós fehérje nikkell affinitás kromatográfiás tisztítási minták SDS-PAGE ellenőrzése:	49
13. ábra: Az ubiquitin fúziós partner leemésztésének 10%-os SDS-PAGE ellenőrzése	49
14. ábra. E. coliban 18 °C-on expresszált GST-XIAP 10%-os SDS-PAGE analízise	50
15. ábra. Különböző koncentrációjú N-lauroil-szarkozinnal szolubilizált GST-XIAP zárványtestek 10%-os SDS-PAGE analízise	51
16. ábra. A rekombináns GST-XIAP refoldálás optimalizálásának 10%-os SDS-PAGE ellenőrzése TritonX-100, CHAPS és OTG különböző arányban történő hozzáadásával	52
17. ábra. GST-XIAP fehérje Western blot eredménye.....	52
18. ábra: E. coli BL21 (DE3) ClearColi fermentáció az alkalmazott tápoldatokban.....	54
19. ábra: E. coli BL21 (DE3) Star fermentáció az alkalmazott tápoldatokban	54
20. ábra: A glc koncentráció hatása a sejtsűrűsége ZYM tápoldatban, E. coli BL21 (DE3) Clear sejtvonal esetében	55

21. ábra: A glc koncentráció hatása a sejtsűrűsége ZYM tápoldatban, E. coli BL21 (DE3) Star sejt vonal esetében	56
22. ábra: A glc koncentráció hatása a sejtsűrűsége ZYP tápoldatban, E. coli BL21 (DE3) Clear sejt vonal esetében	57
23. ábra: A glc koncentráció hatása a sejtsűrűsége ZYP tápoldatokban, E. coli BL21 (DE3) Star sejt vonal esetében.....	57
24. ábra: A glükóz koncentráció és a termelődött EGFP mennyiségének összefüggése E. coli BL21 (DE3) ClearColi sejt vonal és ZYM tápoldat esetében ...	58
25. ábra: A glükóz koncentráció és a termelődött EGFP mennyiségének összefüggése E. coli BL21 (DE3) Star sejt vonal és ZYM tápoldat esetében	59
26. ábra: A glükóz koncentráció és a termelődött EGFP mennyiségének összefüggése E. coli BL21 (DE3) ClearColi sejt vonal és ZYP tápoldat esetében....	60
27. ábra: A glükóz koncentráció és a termelődött EGFP mennyiségének összefüggése E. coli BL21 (DE3) Star sejt vonal és ZYP tápoldat esetében	60
28. ábra: Optimális körülmények összehasonlítása az EGFP és AURKA esetében E. coli BL21 (DE3) ClearColi sejt vonal alkalmazásával ZYP és aM9 tápoldatokban.....	61
29. ábra: Az értekezésben tárgyalt E. coli expressziós rendszerben történő rekombináns fehérjetermelés fejlesztésére irányuló stratégiák	62

Táblázatjegyzék

1. táblázat: Az 5x KCM puffer oldat összetevői	28
2. táblázat: A TSB puffer oldat összetevői	28
3. táblázat: Tervezett oligonukleotidok (SMAC fehérje klónozása).....	30
4. táblázat: A PCR során alkalmazott keverék összetétele	30
5. táblázat: A dekahisztidin fúziós (10xHis-UBI_SMAC) rekombináns fehérje tisztítására használt pufferek.....	31
6. táblázat: Tervezett oligonukleotidok (BUFII fehérje klónozása)	33
7. táblázat: Fermentáció során alkalmazott szénforrások aránya.....	38
8. táblázat: Lízis puffer összetétele	39
9. táblázat: 6x Mintakezelő puffer összetétele	39
10. táblázat: Az alsó, szeparáló és felső, koncentráló gél összetétele	40
11. táblázat: SDS-PAGE gél festék összetevői	40
12. táblázat: Destain oldat összetevői	40
13. táblázat: Tervezett oligonukleotidok (a célfehérje (Pol) klónozása).....	65

Kivonat

A génklónozástól a fehérjetisztításig a rekombináns fehérjék bioszintézisének minden lépésében alkalmazandó molekuláris eszközök számos alternatívában és széles körben hozzáférhetőek. Ezen bőség ellenére nem ritka a funkcionális rekombináns fehérje bioszintézisének kudarca a gazdaszervezetre gyakorolt fehérjetoxicitás vagy a zárványtestekben történő aggregáció miatt.

A rekombináns fehérjék előállítására ma már széles körben alkalmaznak különféle mikrobiális rendszereket. Annak ellenére, hogy az *Escherichia coli* (*E. coli*) a leggyakrabban használt gazdaszervezet a rekombináns fehérjék bioszintézisére, prokarióta rendszerként számos korláttal rendelkezik, amelyek közül az idegen fehérjék oldhatatlan zárványtestekké történő aggregációja képezi a legfőbb limitáló tényezőt. Ezzel szemben az *E. coli* alacsony fenntartási költségeinek, egyszerű genetikai állományának előnyei elengedhetetlenek olyan új rendszerek megtervezéséhez, amelyek a gazdasejtben a rekombináns fehérje túltermelésére irányulnak. A gén- és fehérjetechnológiai eljárások lehetővé teszik új, személyre szabott stratégiák tervezését a felhasználói vagy folyamati követelményeknek megfelelően. A fúziós technológiák széles körben alkalmazottak *E. coli* expressziós rendszerben az oldható rekombináns fehérjetermelés és/vagy tisztítás javítására. Az ubikvitin fúziós partner alkalmazása lehetővé teszi kis molekulatömegű peptidek előállítása során a proteázokkal szembeni védelem és stabilitás mellett a célfehérje specifikus hasítását, affinitás címke-mentes natív fehérje bioszintézisét.

Jelen PhD értekezés az *E. coli* expressziós rendszerben történő rekombináns fehérjetermelés fejlesztésére irányuló stratégiákat tárgyalja három példán keresztül a fehérjetermelés hatékonyságnövelésének aktuális lehetőségeiből: 1. ubikvitin fúzió sikeres alkalmazása a natív SMAC és a gazdatörzsre nézve toxikus BUFII fehérjék bioszintézisére (fúziós stratégia); 2. zárványtestben termelődő GST-XIAP (aggregátumok) szolubilizálása, majd refoldingja a fehérje aktív formájának előállítására (poszttranszlációs renaturálás stratégia); 3. autoindukció alkalmazása az AURKA oldhatatlan zárványtestekké történő aggregációja ellen (fermentációs körülmények beállításán alapuló stratégia). Az autoindukciós fermentáció körülményeinek beállítása céljából az EGFP-t, átfogóan tanulmányozott rekombináns fehérjét választottunk, amely

hagyományos, IPTG alapú indukció során is hatékony oldott formájú, aktív fehérjetermelést eredményez.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Bevezetés

Az első mesterségesen létrehozott gén bejuttatása és annak kifejeztetése (Berg és mtsai., 1975), *Escherichia coli* baktérium sejtekben a heterológ génexpresszió kezdetét jelentette, a biotechnológiai kutatások alapját képezte (Kunjapur és mtsai. 2018). A biotechnológiai eljárásokkal előállított termékek jelentős része olyan kis molekulatömeggel rendelkező első- vagy másodlagos metabolitok, heterológ fehérjék, amelyeket emberi, illetve állati diagnosztikában, terápiában, illetve oltóanyagként használnak fel; melyek általában enzimek, illetve biopolimerek. Az utóbbi évek során egyre több rekombináns fehérje termelését valósították meg különböző expressziós rendszerek felhasználásával: bakteriális-, élesztősejt-, rovar sejt-, növényi sejt-, illetve emlős sejt kultúrák (Demain és Vaishnav 2009; Rasala és mtsai. 2010; Frenzel és mtsai. 2013; Gomes és mtsai. 2016).

A prokarióta sejteket gyakran használják heterológ fehérjetermelés céljából, mivel olcsó szénforrást igényelnek a létfenntartásukhoz szükséges biokémiai folyamatok során, gyors a biomassza képződése, megvalósítható a nagy sejtsűrűség mellett történő fermentáció, valamint a biomassza növeléséhez szükséges körülmények megteremtése nem okoz különösebb kihívást. Ezen bakteriális rendszereknek viszont az a hátrányuk, hogy sok esetben inaktív fehérjék termelődnek, inklúziós (zárvány) testben (Lawson, 1999; Patra és mtsai., 2000; Upadhyay és mtsai., 2012). A bakteriális expressziós rendszerek esetében a leginkább használt gazdasejt az *E. coli* baktérium sejt, melynek több törzsét is alkalmazzák, illetve ezekhez különböző promóter szakaszokat alkalmaznak a rekombináns fehérjetermelés hatékonysága érdekében (Vaillancourt, 2003).

Az élesztő expressziós rendszerek használatának előnyei közé tartoznak mindazon tulajdonságok, amelyek a bakteriális expressziós rendszerek alkalmazása során is: a genom ismerete, a fiziológiai tulajdonságok ismerete, a konstitutív, illetve

indukálható promóterek használhatósága, a plazmidok több kópiaszámban való alkalmazhatósága, továbbá a bejuttatott gének kromoszómába való integrálhatósága (Geisse és *mtsai.*, 1996; Griffith és *mtsai.*, 2003). Évekig az összes élesztő expressziós rendszerre alapozott terápiás fehérjét a *Saccharomyces cerevisiae* élesztősejtekben állították elő, közben viszont megjelentek más élesztő sejteket felhasználó biotechnológiai folyamatok is. Ilyen például a több mint 120 heterológ fehérje termelésére használt *Pichia pastoris* rendszer, amelyben a sikeresen megtermelt fehérjék nagy része emberi vagy legalább emlős eredetű, ezért napjainkban is használják ezt a fajt a terápiás fehérjék termelésére (Cregg, Vedvick és Raschke, 1993; Macauley-Patrick és *mtsai.*, 2005; Julleson és *mtsai.*, 2015). Ennek a rendszernek viszont van egy olyan tulajdonsága is, amely hátrányt jelenthet a megtermelt fehérje használhatósága szempontjából, azaz képes a fajra specifikus poszttranszlációs módosításokat végrehajtani (Gerngross, 2004).

A bakulovírus expressziós rendszert széleskörben alkalmazzák a rovar sejtenyészetekben történő fehérje termeltetésre. A rendszer előnye, hogy felhasználható nehezen termelődő eukarióta fehérje komplexek előállítására is. A rendszert folyamatosan fejlesztik annak érdekében, hogy a célfehérjék termelése még jobb minőségben valósuljon meg, és még szélesebb körben használható legyen (Chavez-Pena és Kamen, 2018).

Az emlős sejtenyészetek alkalmazásán alapuló expressziós rendszerek a leghatékonyabbak a gyógyászatban használt emlős szervezetekből származó heterológ fehérjék termelésére, mivel ezekben a rendszerekben helyesen történik meg a fehérjék feltekeredése, illetve poszttranszlációs átalakulása és ezáltal a fehérjék felhasználhatósága jóval szélesebb skálán mozog. A leggyakrabban használt emlős sejtenyészetek immortalizált sejtekből származnak, mint például a kínai hörcsög petefészek sejtek (CHO), egér myeloma sejtek (NS0), bébi hörcsög vese sejtek (BHK) és az emberi embrió vesesejtek (HEK-293). Ezek a sejtenyészetek bár a legalkalmasabbak a gyógyászatban használt heterológ fehérjék termelésére, nagyon összetett a tápanyagigényük, illetve a fenntartásuk komplex feltételeket igényel (Wurm, 2004).

Expressziós rendszer gazdasejtjeként megemlíthetjük még a növényi sejtenyészeteket, melyek szintén felhasználhatóak heterológ fehérjék expressziójára, akár a gyógyászatban használt fehérjék is előállíthatóak biztonságosan, mivel a növényi sejtekben nincsenek az emberre káros vírusok vagy patogének, a poszttranszlációs

módosulások is megvalósulnak, illetve rendkívül költséghatékony módszer, azonban a növényi sejtek generációs ideje nagyobb az előző sejtekhez viszonyítva (Huang és McDonald, 2009).

A fent említett expressziós rendszerek közül a bakteriális emelhetjük ki, mint olyan expressziós rendszert, amely alkalmazása széleskörben elterjedt a laboratóriumi kutatások során, mivel gyors, hatékony és gazdaságos módszernek bizonyult. A rendszer hátrányait a különböző promóterekkel és beépített szabályozó szakaszokkal javítják (Rosano és mtsai. 2019; Hayat és mtsai. 2018; Ahmad és mtsai. 2018).

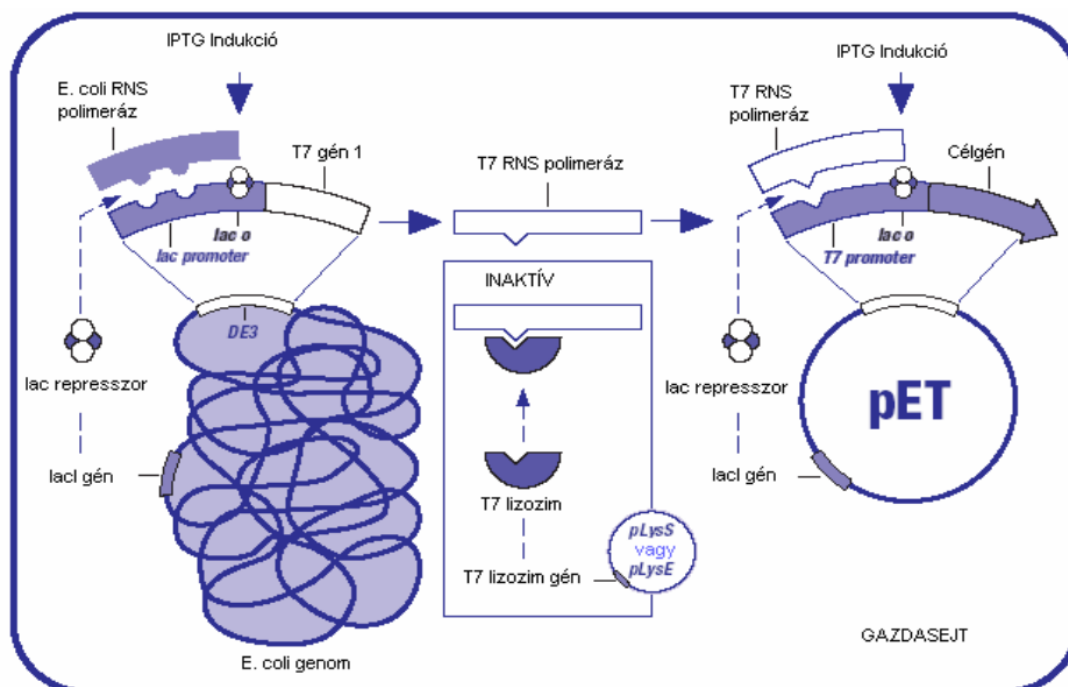
1.2. Rekombináns fehérjék bioszintézise

A rekombináns fehérjetermelés során az idegen szervezetből származó fehérje génje génszintézeti úton kerül előállításra, molekuláris technikák alkalmazásával bejuttatva baktérium sejtekbe, majd a megfelelő promótert alkalmazva szabályzás alatt termeltethető (a rekombináns gének által kódolt humán fehérjék termeltethetők baktérium sejtekben). Erre a fehérje termelési eljárásra leggyakrabban *Escherichia coli* (*E. coli*) törzset alkalmaznak. Ezen baktériumtörzsek nem igényelnek komplex táptalajokat vagy különleges tápanyagokat, az inkubálási paraméterek könnyen megvalósíthatóak. A rekombináns fehérjék előállításának hatékonyságát nagyban befolyásolja, hogy a fehérjék szolubilisen vagy zárványtestekben képződnek (Thomas és Baneyx, 1996; Peternel és Liovic, 2010; Kante és mtsai., 2018).

A bioszintézis során szolubilis formában keletkező fehérjék további kísérleti/diagnosztikai célokra való felhasználása jóval előnyösebb, mint a zárványtestben termelődő: nem szükséges további időt és erőforrást befektetni a zárványtestekből való feltáráshoz. A fehérjetermelés indukciójához leggyakrabban alkalmazott indukáló szer az IPTG (izopropil β -D-1-tiogalaktozid) (Kilikian és mtsai., 2000; Kok, 2008; Gomes, Monteiro és Mergulhão, 2020), mely egy nem metabolizálódó laktóz analóg, a *lac operon* felszabadításával indukálja a rekombináns fehérje termelését. Az autoindukciós fermentációs eljárások növelhetik a szolubilisen termelődött fehérjék mennyiségét, így bár lassabban, de jobb minőségű fehérje termeltetésére válik ezáltal lehetőségünk. Jelen értekezés az autoindukciós fermentáció alkalmazhatóságát vizsgálja a rekombináns fehérjék kvalitatív, illetve kvantitatív előállítás hatékonyságának növelésére vonatkozóan.

1.2.1. T7 promóter alapú expressziós rendszer

A DNS szerkezetét és szekvenciájának megismerését követően, a DNS technikák lehetővé tették, hogy a már ismert fehérjekódoló szekvenciákat plazmidok által bejuttassuk baktérium sejtekbe, lehetővé téve azt, hogy szervezet-idegen fehérjéket termeltessünk ezen baktérium törzsekkel. Számos expressziós rendszer létezik, melyek közül egyik legismertebb és leggyakrabban alkalmazott a T7 expressziós rendszer (1. ábra). Ezen rendszer alapja, hogy a baktériumtörzs genomja tartalmazza a T7 bakteriofág RNS polimeráz génjét, melynek kifejeződése a lacUV5 promóter szabályozása alatt áll (Kaur, Kumar és Kaur, 2018). A célfehérje génjének szekvenciáját T7 promóter szabályozása alatt álló plazmidba építve, ha a lacUV5 promóter indukálódik, átíródik a T7 RNS polimeráz génje, majd ez az RNS polimeráz elkezd átírni a T7 promóter után szereplő gént, így megtörténik a célfehérje génjének transzkripciója, illetve translációja (Dubendorf és William Studier, 1991; F. William Studier, 2005).



1. ábra T7 expressziós rendszer sematikus ábrája (Bardóczy, 2009)

Az *E. coli* baktérium sejtek laktóz gazdag környezetben képesek osztódni. Amikor a laktóz átjut a periplazmából a citoplazmába, szükség van arra, hogy glükózzra és galaktózzra hasítódjon, mivel a glükóz a sejtek fő energiaforrása. Következésképpen

egy enzimre van szükség ahhoz, hogy ez a hasítás végbemenjen, amely jelen esetben a β -galaktozidáz enzim. A *lac operon* három strukturális gént foglal magába a *lacZ*, *lacY* és *lacA* géneket, ezek sorban a β -galaktozidáz, laktóz permeáz és tiogalaktozid transzacetiláz enzimeket kódoló gének (Jacob és Monod 1961). A laktóz permeáz egy transzmembrán fehérje mely szerepet játszik a laktóz szállításában, a sejtbe való bejuttatás során. Abban az esetben, ha a tápközegben alacsony a laktóz tartalom, a *lac operon* működésében a represszor molekula negatívan befolyásolja a rendszert, mivel az operátor régióhoz kötődve megakadályozza az RNS polimerázt abban, hogy génátírás történjen. Laktóz vagy allolaktóz jelenlétében ezekkel a molekulákkal a represszor olyan komplexet alkot mely konformáció változást idéz elő a represszor molekulában, inaktiválva azt. Ebben az az RNS polimeráz kötődik a promóter régióhoz és átíródnak a strukturális gének. (Beckwith, 1967).

A *lac operon* szabályozása glükóz által is megvalósulhat: ez az *E. coli* baktériumsejtek elsődlegesen használt szén- és energiaforrása. Amennyiben a sejten kívüli glükóz koncentráció csökken, a sejten belül megnő a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szintje. A cAMP molekula kötődik az öt felismerő receptor fehérjéhez (CRP) és egy komplex jön létre, melyet katabolit aktiváló fehérjének (CAP) nevezünk. A CAP komplex csak a *lac* promóter upstream régiójához kötődik, segítve az RNS polimerázt abban, hogy lemásolja a *lac operon* génjeit: ha megtörténik az átírás, a keletkező mRNS-ről a riboszómán megtörténik a transzláció (Zhou, 1994; Busby és Ebright, 1999). A *lac operon* működése szempontjából a tiogalaktozid transzacetiláznak nincs jelentősége. Ezen szabályozási rendszer lehetővé teszi a fehérjetermelés hatékonyságának növelését, ugyanakkor más promóterrel, illetve szabályozó szakaszokkal kiegészítve kedvezőbb fehérje termeléshez vezethet.

A T7 RNS polimeráz nagyfokú szelektivitást mutat a saját promótereire, melyek normál esetben nem találhatóak meg az *E. coli* baktérium sejtekben. A T7 RNS polimeráz viszonylag kis mennyiségben is elegendő, hogy a T7 promóterrel ellátott génekről nagyfokú génátírás valósuljon meg, akár nagy kópiaszámú plazmid esetében is. Ennek következtében a transzkripció hosszabb ideig is megvalósulhat egy plazmidon, anélkül, hogy leállna: sokkal aktívabb a T7 RNS polimeráz, mint az *E. coli* saját RNS polimeráza (Studier és Moffatt, 1986).

1.2.2. Autoindukció

Az autoindukciós fermentáció bevezetése lehetővé teszi a rekombináns fehérje termelését a baktériumkultúra növekedésének folyamatos monitorozása nélkül és a fermentáció perturbációja (indukáló szer hozzáadása) nélkül. Előnye tehát, hogy a rendszerbe történő beavatkozás nélkül, de mégis kontrollált körülmények között aktiválható a célfehérje (rekombináns fehérje) szintézise.

E fermentáció egy különböző szénforrásokat tartalmazó tápközeg alkalmazásával valósítható meg: szükséges, hogy tartalmazzon glükózt, (glicerolt), illetve az indukció lebonyolítása érdekében laktózt. Jelen esetben a glükóz az elsődleges hasznosítani kívánt szénforrás a baktériumok számára, majd ezt követően a laktóz indukálószerként funkcionál a *lac operon* által szabályozott fehérje termelés kivitelezéséhez (Li és mtsai., 2011). Ezen fermentációs technológia alkalmazása lehetővé teszi a baktériumok fokozott metabolizmusát, továbbá a célfehérje termeltetése minőségi, illetve mennyiségi szempontból jelentős (F. W. Studier, 2005).

E fermentációs technológia alapját képezi az indukálószer (izopropil- β -tiogalaktozid - IPTG) hozzáadásával hasonlatos (hagyományos) indukálható *lac* promóter. A hagyományos fermentáció során a túltermeltetni kívánt fehérjét kódoló gén átírása az indukálószer hozzáadásával aktiválódik.

Ennek hátránya, hogy a baktériumkultúra növekedését folyamatosan szükséges monitorozni, majd, ha elérte a megfelelő sejtsűrűséget, perturbálni kell a rendszert (hozzá kell adni az indukálószer). Ezen hátrány kiküszöbölésére nyújt megoldást az autoindukciós fermentációs technológia.

A folyamat során a baktériumkultúra nevelésére használt tápoldathoz glükózt, laktózt és glicerint adunk. A glükóz jelenti a baktériumok növekedése során az elsődleges szénforrást, ezért a sejtek ezt használják a növekedéshez és az életfolyamatok fenntartásához. Figyelembe véve a *lac operon* működését, ha a glükóz jelen van a tápoldatban, akkor a sejtek azt használják fel és mivel a laktóz bontására nincs szükség a rekombináns fehérje expressziója is gátolt. Glükóz hiányában a sejtek éhezni kezdenek és a laktóz hasznosításhoz bekapcsolódó *lac operon*, illetve a vele együttes szabályozás alatt álló gének (célfehérje) expressziója is megvalósul. Az autoindukciós fermentációs technológiákon további fejlesztéseket végeztek és igazolták, hogy a sejtsűrűség, illetve a rekombináns fehérje termelés hatékonysága jóval nagyobb

abban az esetben, ha a laktózzal párhuzamosan egy másik szén- és energiaforrást is alkalmaznak. Erre a célra alkalmas a glicerin, amely nem idézi elő a laktóz katabolit repressziót és egyúttal szén-és energia forrást biztosító komponens (Ukkonen és mtsai., 2013).

1.3. Rekombináns fehérjék bioszintézisének optimalizálása

A rekombináns fehérjetermelés során több szempontot érdemes figyelembe venni a művelet hatékonyságának fokozása, a nagyobb mennyiségű hozam elérése érdekében. Erre vonatkozóan több tényező együttes alkalmazása, illetve ezek változtatásai jelentik a megoldást, mivel a hatékonyság a legtöbb esetben több tényező együttes hatásaként nyilvánul meg: módosított *E. coli* gazdatörzsek; különböző promóter és terminátor szakaszok; dajka fehérjékkel való együttes fehérje expresszió a megfelelő fehérje feltekeredés, a stabilitás és az oldékonyság növelése érdekében (Sahdev, Khattar és Saini, 2008).

Az első és legfontosabb lépés egy fehérje termeléséhez a gazdaszervezet (expressziós rendszer) kiválasztása. Az *E. coli* expressziós rendszer választása mellett szól a költséghatékonyság, a baktériumtörzs teljes genomjának ismerete, illetve genomjának módosítása könnyen kivitelezhető a génszerkesztés eszközeivel. A baktériumtörzs felhasználása mellett szól továbbá a sejtek gyors növekedése, az olcsó tápanyagigény (Joseph és mtsai., 2015).

Az egyik legfontosabb szempont a rekombináns fehérjetermelés során a fehérjék stabilitásának biztosítása, mivel nemcsak a felhasználást, de a tisztítást és tárolást is befolyásolja: a helyes konformációval rendelkező fehérjék stabilak maradnak mind az expresszió, mind a tisztítás során. Különböző tényezők befolyásolhatják a fehérjék stabilitását: az aminosav sorrend, a fehérje szerkezete, a gazdaszervezet, az expressziós és tisztítási körülmények (Prosinecki, Faisca és Gomes, 2007; Deller, Kong és Rupp, 2016). A nyomelemekkel, ásványi anyagokkal és vitaminnal dúsított tápoldatok növelik a fehérjék stabilitását, annak ellenére, hogy nem szükségesek a sejtek növekedéséhez: kofaktor, prosztetikus csoport, illetve ligand szerepet is betölthetnek a célfehérje számára, és döntőek lehetnek a helyes fehérje konformáció kialakításában. Az alacsonyabb hőmérsékleten, illetve rövidebb ideig tartó indukció szintén növelheti a rekombináns fehérjék stabilitását (de Groot és Ventura, 2006). Az expresszió sejten

belüli helye is meghatározó lehet, mivel egyes fehérje csak akkor stabil, ha zárványtestben képződik (nem a citoplazmában, szolubilisen). Továbbá a dajka fehérjékkel való együttes expresszió is hozzájárul a nagyobb stabilitással rendelkező fehérjék képződéséhez (de Marco és mtsai., 2007).

A rekombináns fehérje termeltetése során fontos az expressziós szint ismerete, mely leginkább a transzkripció mértéke által van szabályozva. Fontos a promóter erőssége, ez határozza meg a rekombináns fehérje esetében a messenger RNS (mRNS) mennyiségét. Erős promóter alkalmazásával megnövelhető a mRNS mennyisége; ugyanakkor a gazdaszervezetre nézve toxikus fehérje esetében gyengébb promótert ajánlott használni. Egy további expressziós szintet növelő szakasz a riboszóma kötő hely, melyet Shine-Dalgarno szakasz néven is ismerünk, konszenzus szekvenciája UAAGGAGG: az ebben a szakaszban bekövetkező változások, a riboszóma kötőhely és a riboszóma közötti affinitás mértéke nagy mértékben befolyásolhatják az expresszió mértékét (Jacob, Santer és Dahlberg, 1987; Ma, Campbell és Karlin, 2002). A riboszóma kötőhely és a start kodon közötti távolság szintén fontos. A stop kodonok esetében az UAA alkalmazásával lehet elérni a legnagyobb expressziós szintet, a többi stop kodonnal szemben. A transzkripció terminátor szakasz módosítja a mRNS 3' végét, ezáltal stabilizálva azt. A replikációs origó meghatározza a vektorról készülő másolatok számát: minél több másolat készül a célfehérje génjét tartalmazó vektorról, annál nagyobb mennyiségű fehérje termelődik. A felsorolt tényezők különböző kombinációjs lehetővé teszi a rekombináns fehérje mennyiségi és minőségi előállítását.

1.4. Zárványtestek képződésének elkerülése

1.4.1. Helyes diszulfid hidak kialakulása

Számos rekombináns fehérje esetében létfontosságú a diszulfid hidak helyes kialakulása, amely által biztosított a biológiailag aktív háromdimenziós konformáció. A hibás diszulfid hidak kialakulása a fehérje helytelen feltekeredéséhez vezethet, emiatt zárványtestekké aggregálódnak. *E. coli*-ban a cisztein oxidációja a periplazmában játszódik le. Itt a Dsb enzimes család által katalizált csere reakciók során alakulnak ki a diszulfid hidak (Messens és Collet, 2006). Ezzel ellentétben a citoplazmában ritkán alakulnak ki diszulfid hidak, így az itt kialakult diszulfid-hidak a fehérje inaktivációjához, misfoldinghoz és aggregációhoz vezethet (Derman és mtsai., 1993). A

citoplazmában nagyobb a negatív redoxpotenciál. Ezt a redukáló környezetet a tioredoxin reduktáz (trxB) és a glutaredoxin reduktáz (gor) tartja fenn (Stewart, Aslund és Beckwith, 1998). Ez nagy hatással van a diszulfid-híddal rendelkező fehérjék termeltetésére. Ezen probléma megoldására célszerű a rekombináns fehérjét olyan fúziós címkével ellátni, amely biztosítja a periplazmába való kijuttatást. A citoplazmába történő expresszió lehetséges olyan tervezett *E. coli* sejtvonalak felhasználásával, melyek oxidatív citoplazmatikus környezettel rendelkeznek, ami elősegíti a diszulfid hidak kialakulását (Derman és mtsai., 1993).

1.4.2. Az expresszió sebességének csökkentése

A termeltetés sebességének csökkentése időt biztosít a rekombináns fehérjék helyes feltekeredésére, a helyes konformáció kialakulására. A sejten belüli fehérje koncentráció csökkentése kedvez a helyes foldingnak. A leggyakrabban alkalmazott megközelítés az inkubációs hőmérséklet csökkentése az indukciót követően (Schein és Noteborn, 1988; Vasina és Baneyx, 1997; Vera és mtsai., 2007; Lebendiker és Danieli, 2014; Sela Castiñeiras és mtsai., 2018). Az alacsonyabb hőmérséklet alkalmazása csökkenti az aggregáció létrejöttének esélyét, mivel a magasabb hőmérsékleten a hidrofób interakciók gyakoribbak (McCarty és Walker, 1991; Schellman, 1997; Mendoza, Dulin és Warren, 2000).

A zárványtestek elkerülése céljából a fehérjeszintézis hőmérsékletét 15-25 °C körüli ajánlott beállítani, ellenben eredményes expresszió érhető el 4 °C-on is 72 órán keresztül (San-Miguel, Pérez-Bermúdez és Gavidia, 2013). Az alacsonyabb hőmérséklet alkalmazása során a baktériumok növekedése lassabb, az expresszió sebessége is mérsékelt, amely megnyilvánul a fehérjehozamban is; továbbá zavarhatja a chaperon hálózat működését is (McCarty és Walker, 1991; Mendoza, Dulin és Warren, 2000; Strocchi és mtsai., 2006).

1.4.3. Etanol, mint expresszió enhancer

A rekombináns fehérje heterológ expresszió mértékének növelésére egyik legújabb megközelítésben alkalmazott enhancer az etanol (Chhetri, Kalita és Tripathi, 2015; Zheng és mtsai., 2019; Cheng és mtsai., 2020). Ezen módszer mechanizmusának feltárása ígéretes stratégiát jelent az etanollal aktivált rekombináns fehérjék szintézisének fokozása érdekében: transzkriptomikai elemzés eredményei azt mutatják,

hogy a kulcsfontosságú szabályozó gének, a malK és a prpD gyakorolják a legjelentősebb hatást a heterológ expresszióra, az etanol jelenlétében, *E. coli* BL21 (pET26b-katA) törzsben (Zheng és mtsai., 2019). A maltóz ABC transzporter és a szén-anyagcsere a propanoát metabolizmustól a citrát ciklusig a fő szabályozási útvonalak, amelyeket az etanol aktivál a heterológ fehérjék szintézisének fokozása érdekében (Chen, 2013; Shu és mtsai., 2020).

Ezen mechanizmusok ismeretében megvalósítható egy széles körben alkalmazható *E. coli* expressziós törzs létrehozása heterológ fehérjék expressziójának fokozására.

1.5. A vizsgált fehérjék molekuláris jellemzői és biológiai funkciói

1.5.1. A SMAC fehérje

A SMAC fehérje nem rendelkezik enzimatis aktivitással. A citoplazmában szintetizálódik, 239 aminosavat tartalmaz. Az 1-55. aminosav u.n. mitokondriális lokalizációs szignál, ami a fehérjét a mitokondriumba irányítja. Itt proteolitikus hatásra leválik a lokalizációs szignál, és szabaddá válik az Ala-Val-Pro-Ile Ala (AVPIA) amino terminális szekvencia, mely N terminálissal rendelkező fehérje biológiai funkció alapján képezi a natív SMAC-ot (Shi 2001). Amennyiben a mitokondrium károsodás (ill. egyéb hatások) következtében a mitokondrium külső membránjának permeabilitása megnövekszik, a módosult SMAC fehérje (más fehérjékkel együtt) újra a citoplazmába kerül. Itt stabil komplexet képez az XIAP fehérjével. A komplex képzésnek két feltétele van, a szabad AVPIA szekvencia és SMAC fehérje dimerizációja (Gonçalves és mtsai. 2008). A XIAP fehérje egy kaszpáz inhibitor, amely a sejt nyugalmi állapotában a véletlenül aktiválódó kaszpázokat gátolja.

1.5.2. A BUFII peptid

A BUFORIN II egy átfogóan tanulmányozott antimikrobiális peptid (AMP), melyet először a *Bufo gargarizans* békafajból izolált buforin I peptid szerkezetének módosításával állítottak elő (Park és mtsai. 1996). A mindössze 21 aminosavból álló peptid jelentős antibakteriális hatást mutatott Gram-pozitív (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas*

putida) és Gram-negatív (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia sp.*) baktériumokkal, valamint gombákkal (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*) szemben (Park és mtsai. 1996). Más AMP-től eltérően, a BUFORIN II nem a membrán szerkezetének roncsolásával fejt ki antibakteriális hatását, hanem közvetlenül a bakteriális DNS-hez és RNS-hez való kötődés által (Park és mtsai. 1998; Uytterhoeven és mtsai. 2008). Ezen tulajdonsága miatt a BUFORIN II és a szerkezetmódosítással előállított analógjai tumorelles hatással is rendelkeznek (Lee és mtsai. 2008; Jang és mtsai. 2012; Marqus és mtsai. 2017).

A BUFORIN II peptid méretének és a bakteriális DNS-hez és az RNS-hez kötődve kifejtett toxikus hatásának következtében limitált a bioszintézisének lehetősége *E. coli* expressziós rendszerben. E problémák ellenére lehet expresszálni, ha negatív fúziós partnerrel semlegesítik a peptid pozitív töltését (Lee és mtsai. 1998; Wang és mtsai. 2011). Lee és mtsai (1998) a BUFORIN II peptid pozitív töltésének semlegesítésén alapuló savas peptiddel való fuzionálási módszert dolgoztak ki, hogy elkerüljék az expresszált antimikrobiális peptid toxikus hatását a gazdasejtre. A fúziós peptidet *E. coli*-ban expresszálták tandem ismétlődésként a termékhozam növelése érdekében. A savas peptid-BUFORIN II fúziós peptid multimerjei magas hozammal expresszázódtak anélkül, hogy károsodtak volna a szintézis során a sejtekben. A cisztein-maradékok jelenléte a savas peptidben kritikus volt a fúziós peptid multimerok magas szintű expressziójához. A fúziós partnerként alkalmazott savas peptid lehasítása egy plusz metionin beépítése révén brómcíánnal valósították meg. Wang és mtsai (2011) új előállítási eljárást fejlesztettek ki *E. coli*-ban a BUFORIN Iib előállítására, a BUFORIN II szintetikus analógjára: Trx-BUFORIN Iib fúziós fehérjeként előállítva (Asn-Gly kötést beépítésével) hidroxil-amin-hidrokloriddal hasították, így izolálva a rekombináns BUFORIN Iib-t. A fúziós partner lehasítása mindkét esetben kémia reakcióval történt.

1.1.1. Az XIAP fehérje

Két fő apoptotikus útvonal ismert: az intrinsic (mitokondriális) és az extrinsic útvonal (Cairrão és Domingos, 2010; Burke, 2017). A két útvonal összekapcsolódik, és az egyik útvonalon lévő molekulák befolyásolhatják a másik utat, míg mindkettő aktiváló kaszpázokon keresztül halad (Estornes és Bertrand, 2015). A IAP család legerősebb kaszpáz inhibitora az X-kromoszómához kapcsolódó apoptózis inhibitor,

amely 3 BIR domént (Baculovirus IAP Repeat) tartalmaz az N-terminális régióban és egy RING domént, amely E3 ubiquitin ligáz aktivitással rendelkezik a C-terminális régióban. Ezen szerkezeti domének funkcionális jellemzőit részletesen tanulmányozták: a BIR2 domén gátolja a kaszpáz-3-at és a kaszpáz-7-et, míg a BIR3 domén gátolja a kaszpáz-9-et. Az XIAP-t valószínűleg poszttranszlációs mechanizmusok szabályozzák (Hundsdoerfer és mtsai., 2010; Saraei és mtsai., 2018). Ebben az esetben előfordulhat, hogy a mitokondriumokból felszabaduló Smac-DIABLO fiziológiás mennyisége nem elegendő a XIAP kaszpázokra kifejtett gátló hatásának leküzdésére, így megakadályozza az apoptózist. A túlzottan expresszált XIAP Smac mimetikus molekulák általi inaktiválása enyhítheti a kaszpáz kötést, ezáltal elősegítve az apoptózist a rosszindulatú sejtekben (Feltham és mtsai., 2011; Garg és mtsai., 2014; Fulda, 2015; Tchoghandjian és mtsai., 2016; Manzoni és mtsai., 2017).

1.1.2. Az EGFP fehérje

Az elmúlt évtizedben a zöld fluoreszcens fehérje (GFP) és származtatott mutánsai általánosan használt eszközzé váltak a sejtbiológiában, fehérje vizsgálatokban, gyógyászatban stb. A GFP-t először *Aequorea victoria* medúzából izolálták (Shimomura 2005). Ez volt az első zöld fluoreszcens fehérje, amelynek elsődleges szerkezetét leírták és klónozták (Prasher és mtsai. 1992). A fehérje egyedülálló szerkezetű, egy 11 szálú β -hordóval rendelkezik, amely egy kromofór csoportot zár be, amely egy torz α -hélixen helyezkedik el a molekula közepén. A kromofór képződés spontán módon megy végbe, a kromofór csoportot alkotó három aminosav önkatalizált intramolekuláris ciklizációja révén (Chalfie és mtsai. 1994). Számos kísérlet kimutatta, hogy a fehérje teljes szerkezetére szükség van a kromoforképzéshez és a fluoreszcenciához (Zimmer 2002).

A vad típusú GFP-nek vannak olyan tulajdonságai, amelyeket javítani kell, mint például az alacsony fényerő, a kromofór képződés késleltetése. Így a fehérjét számos mutációnak vetették alá, hogy javítsák ezeket a tulajdonságokat. A vad típusú GFP-t (EGFP) a gerjesztési csúcsok és a fényerő módosításával javították. A vad típusú GFP abszorbancia csúcsa 395 és egy 475 nm-en van (Bizzarri és mtsai. 2007). Az EGFP-nek két mutációja van (F64L, S65T) a kromofór régióban, javultak a spektrális jellemzői, a legfényesebb és leginkább fotostabil fluoreszcens fehérjék közé tartozik (Bizzarri és mtsai. 2007; Heim és mtsai. 1995). A GFP számos továbbfejlesztett változata létezik

különböző spektrális tulajdonságokkal, amelyek a kéktől a sárgáig terjedő színeket bocsátanak ki a látható spektrumban (Heim és Tsien 1996).

1.1.3. Az AURKA fehérje

A szomatikus sejtekben az Aurora A fontos szabályozója a centroszóma érésének, a bipoláris orsó összeállításának és fenntartásának, valamint a kromoszóma szegregációnak (Carmena és Earnshaw 2003). Mind az Aurora A mennyisége, mind a kináz aktivitása tetőzik a mitózisban (Bischoff és mtsai. 1998). A humán Aurora A aktivitásához az aktiválási hurokban lévő T288-as aminosavának foszforilációja szükséges (Littlepage és mtsai. 2002). Más molekulák, például a TPX2 (az XKLP2 célfehérje) és a p53 szabályozhatják az Aurora A-t az Aurora A különböző régióihoz való közvetlen kötődés révén, pozitív és negatív módon (Littlepage és mtsai. 2002; Tsai és mtsai. 2003; Eyers és mtsai. 2003; Chen és mtsai. 2002).

2. Célkitűzések

A tiszta, oldható és funkcionális fehérjékre nagy az igény a modern biotechnológiában. A természetes fehérjeforrások ritkán felelnek meg a mennyiségre, a könnyű izolálhatóságra vagy az árra vonatkozó követelményeknek, ezért gyakran a rekombináns technológia a választott módszer. Az *Eschericia coli* gyakran használt gazdaszervezet, mivel viszonylagos egyszerűsége, olcsó és gyors, nagy sűrűségű tenyésztése, jól ismert genetikája és nagyszámú, kompatibilis molekuláris eszköz révén hozzájárul a rekombináns fehérje hatékony heterológ expressziójához. Mindezen tulajdonságok ellenére a rekombináns fehérjék *E. coli* gazdaszervezettel történő expressziója gyakran oldhatatlan és/vagy nem működő fehérjéket eredményez. Jelen PhD értekezés az *E. coli* expressziós rendszerben történő rekombináns fehérjetermelés fejlesztésére irányuló stratégiákat tárgyalja három példán keresztül a fehérjetermelés hatékonyságnövelésének aktuális lehetőségeiből: 1. ubikvitin fúzió alkalmazása a natív SMAC és a gazdatörzsre nézve toxikus BUFII fehérjék bioszintézisére (fúziós stratégia); 2. zárványtestben termelődő GST-XIAP (aggregátumok) denaturálása, majd refoldingja a fehérje aktív formájának előállítására (poszttranszlációs renaturálás stratégia); 3. autoindukció alkalmazása az AURKA oldhatatlan zárványtestekké történő aggregációja ellen (fermentációs körülmények beállításán alapuló stratégia).

A 20-50 aminosavat tartalmazó peptidek szintézisének előfordulhat, hogy nem vesznek fel megfelelő konformációt, valamint kevésbé állnak ellen a proteázok aktivitásának, emiatt lebomolhatnak (Piatkov és mtsai. 2013). Célkitűzésünk ubikvitin fúziós címke alkalmazása kis molekulatömeeggel rendelkező peptid (BUFORIN II) esetében a rekombináns fehérje stabilitásának növelése érdekében.

Célunk az ubikvitin fúziós címke alkalmazása kis molekulatömeeggel rendelkező peptid (BUFORIN II), illetve kis molekulatömeeggel rendelkező fehérje (SMAC) esetében a célfehérje specifikus hasítása érdekében. Az expresszált fehérjék detektálásának és tisztításának megkönnyítésére gyakran alkalmaznak affinitás címkéket. A leggyakrabban alkalmazott affinitás címke a hexa/deka hisztidin szekvencia, ami Ni-nitrilo-tricetát mátrixhoz köti a fúziós fehérjét. A bakteriális fehérjék mosással eltávolíthatók, majd a tiszta fehérje imidazol oldattal eluálható a mátrixról. Az expressziós vektorokban az affinitás címke és a célfehérje közé beépítenek egy proteáz

hasítási helyet is. Gyakran használt proteáz a trombin vagy a faktor Xa. Ezeknek az enzimeknek a használata során előfordulhat, hogy a célfehérje is proteolízist szenved. Mivel a proteázok általában a hasítási szekvencia közepén vágnak, az affinitás címke eltávolítása után a célfehérje amino terminális szekvenciája általában megváltozik. A fenti két problémára megoldás az ubikvitin fúziós partner használata. Az amino terminálisukon ubikvitinált fehérjékről az ubikvitin lehasítását az ubikvitin hidrolázok egyik változata végzi, ilyen a jelen dolgozatban is alkalmazott YUH1 enzim (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase). Ez az enzim abszolút specifikus az ubikvitin szekvenciára, és nem érzékeny a célfehérje amino-terminális szekvenciájára.

Célunk az ubikvitin fúziós címke alkalmazása kis molekulatömeggel rendelkező peptid (BUFORIN II), illetve kis molekulatömeggel rendelkező fehérje (SMAC) esetében az affinitás címke-mentes céltermék bioszintézisének érdekében.

Jelen dolgozat további célkitűzése az autoindukciós fermentáció alkalmazhatóságának vizsgálata a zárványtestben képződő AURKA rekombináns fehérje aktív formában történő előállítása céljából. Az autoindukciós fermentáció körülményeinek beállítása céljából az EGFP-t, átfogóan tanulmányozott rekombináns fehérjét választottunk, amely hagyományos, IPTG alapú indukció során is hatékony oldott formájú, aktív fehérjetermelést eredményez.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Alkalmazott sejtvonalak

Az *E. coli* BL21 (DE3) Star sejtvonala alkalmas a kis kópiaszámban jelenlévő plazmidok esetében is nagy hatékonyságú expresszióra. Nagy mRNS stabilitással és fehérje hozammal rendelkezik, a T7 promóter alapú plazmidok használatára optimalizált sejtvonala.

A baktériumokban történő rekombináns fehérjék előállítása során állandó probléma az endotoxinok (a gazdaszervezet által termelt lipopoliszacharidok, „belső mérég”) jelenléte a tisztított fehérjekészítményekben: az *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonala egy olyan sejtvonala, melyben módosított lipopoliszacharid van jelen, amely nem vált ki endotoxin választ. Alkalmas membránhoz és lipidekhez kötődő fehérjék expressziójára.

Az *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta pLysS ritka kodonokat kódoló vektort tartalmazó sejtvonala, amely a humán eredetű fehérjék prokariótákban történő előállítására optimalizált.

Az *E. coli* BL21 (DE3) Top10 sejtvonala alkalmaztuk a plazmidok felszaporítására. A sejtvonala előnyei közé tartozik, hogy képes stabilan, nagy kópiaszámban lemásolni a bejuttatott plazmidot, mivel fokozott a genomiális DNS klónozási kapacitása.

A kutatás során alkalmazott sejtvonalaikat a SAPIENTIA EMTE, Csíkszeredai Kar, Biomérnöki Tanszéke biztosította. Az autoindukciós kísérletek során a rendelkezésre álló sejtvonala típusok közül alkalmas volt az *E. coli* BL21 (DE3) Star és az *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi, melyek nem tartalmazzák a pLysS rendszert. A pLysS törzsek T7 lizozimot expresszálnak, ami tovább gátolja a T7 RNS polimeráz alapexpresszióját az indukció előtt, így stabilizálja a sejtnövekedést és életképességet befolyásoló célfehérjéket kódoló pET rekombinánsokat, így autoindukcióra alkalmatlanná téve ezen törzseket.

3.2. Kémiai kompetens sejtek előállítása és transzformáció

A kutatás során felhasznált anyagok listáját az I. melléklet tartalmazza. A kutatás során termeltetni/vizsgálni kívánt célfehérjék (SMAC, BUFII, GST-XIAP, EGFP, AURKA) génjét tartalmazó plazmidokat kémiai transzformálás során juttattuk be előkészített kémiai kompetens *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta plyS, *E. coli* ClearColi BL21(DE3) és *E. coli* Star BL21 (DE3) sejtekbe. A kémiai kompetens sejtek létrehozásához és a transzformáláshoz két pufferoldatot készítettünk el a 1. táblázat, illetve a 2. táblázat alapján.

1. táblázat: Az 5x KCM puffer oldat összetevői

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség (V=10 mL)
KCl	1 M	5,1 mL
CaCl ₂	1 M	2,5 mL
MgCl ₂	1 M	2,4 mL

2. táblázat: A TSB puffer oldat összetevői

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség (V=50 mL)
PEG (polietilén-glikol)	10%(m/V)	5 g
DMSO (dimetil-szulfoxid)	5%(V/V)	2,5 mL
MgCl ₂	10 mM	5 mL (1 M törzsoldatból)
MgSO ₄	10 mM	5 mL (1 M törzsoldatból)

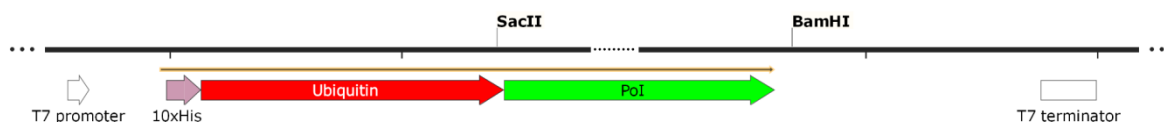
A kémiai kompetens sejtek elkészítéséhez LB tápoldatban, 37 °C-on O.N. előnevelt kultúrát alkalmaztunk. A kompetens sejteket módosított, hősokk mentes transzformáláshoz alkalmas módszerrel készítettük: 200 mL LB tápoldathoz 1 mL O.N. baktériumkultúrát adtunk, majd 37 °C hőmérsékleten, 250 rpm-en inkubáltuk, elérve OD₆₀₀=0,4 sejtsűrűséget. A sejtnövekedést optikai sűrűségméréssel követtük λ=600 nm-en UV-Vis spektrofotométerrel (GeneQuant pro Spectrophotometer, GE Healthcare). Ezt követően 10 percig jégen inkubáltuk, majd 3500 rpm-en, 4 °C-on, 5 percig centrifugáltuk (Thermo Scientific SL 40R Centrifuge). Centrifugálás után a pellettez hozzáadtunk 2 mL

TSB puffert, majd óvatosan szuszpendáltuk. Steril glicerin hozzáadását követően (végső koncentráció 15%) 100 μ L-enként szétosztva tároltuk -80°C -on (Thermo Scientific FORMA 88000 SERIES). A kémiai kompetens sejtek készítését követően a transzformálást a következő módszerrel végeztük: 20 μ L 5x KCM puffer oldathoz 1 μ L plazmidot és 100 μ L kompetens sejtet adtunk, majd 20 percet jégen, ezt követően 10 percet szobahőmérsékleten inkubáltuk a sejteket. Ezt követően 100 μ L LB tápoldatot adtunk az elegyhez majd 37°C -on, 250 rpm-en inkubáltuk 30 percig. 200 μ L transzformált sejtet szélesztettünk a megfelelő antibiotikum tartalmú LB agar táptalajra, a transzformáció hatékonyságának ellenőrzése érdekében. A transzformálás során alkalmazott, rekombináns géneket tartalmazó vektorokat a Sapientia EMTE, Csíkszeredai Kar, Biomérnöki Tanszéke, illetve a Corax CEU Bioneer SA kutatóintézet bocsátotta rendelkezésünkre.

3.3. A SMAC és BUFII rekombináns fehérje bioszintézise

3.3.1. pUbiq-SMAC expressziós vektor létrehozása

A pUbiq expressziós vektor ajándék volt prof. Dr. Perczel András kutatócsoport (MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport és Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium) részéről. A tervezett oligonukleotidokat (primereket) a GeneriBiotech (Debrecen) gyártotta le. A pET20b_SMAC (Salamon és *mtsai.*, 2017) konstrukcióból származó SMAC gén amplifikációját PCR-rel végeztük (PRO FLEX PCRS System, Life Technologies) a megfelelő primerekkel (3. táblázat). A DNS-szekvencia megjelenítésére és szerkesztésére (2. ábra) Snapgene szoftvert (1.1.3-as verzió) használtunk (<https://www.snapgene.com/>). A PCR reakció összetétele a 4. táblázatban látható.



2. ábra: A tanulmányban vizsgált pUbiq rendszer sematikus ábrája

A hőmérsékleti profil: 90 mp 95°C -on, melyet követ 35 ciklus 10 mp 95°C -on, 30 mp 54°C -on és 60 mp 72°C -on, ezt követően 10 percig 72°C -on.

3. táblázat: Tervezett oligonukleotidok (SMAC fehérje klónozása)

Primer név	Nukleotid szekvencia	T _m (°C)	RE	G-C arány (%)
Fw-SMAC-UBI-SacII	5'CTCCGCGGTGGAGCGGTTTCCTATTG CACAGAAATC	70	SacII	57
R-SMAC-UBI-BamHI	5'CCGGATCCTGGTAATTAATCCTCAC GCAGGTAGGCC	67	BamHI	56

4. táblázat: A PCR során alkalmazott keverék összetétele

Komponens	Mennyiség
10x Phusion HF puffer (Thermo Scientific)	5 µL
10 mM dNTP mix (Thermo Scientific)	1,5 µL
10 µM Fw-SMAC-UBI-SacII	0,5 µL
10 µM R-SMAC-UBI-BamHI	0,5 µL
SMAC template (21,23 g/mL)	1 µL
Pfu DNA polymerase (Thermo Scientific)	1 µL
H ₂ O	40,5 µL
Összesen	50 µL

A PCR terméket SacII (Thermo Scientific) és BamHI (Thermo Scientific) restrikciós endonukleázokkal emésztettük. A foszfodiészter kötés létrehozását a SMAC inszert ragadós végeihez a pUbiq plazmid ragadós végeivel T4 DNS ligáz (Thermo Scientific) alkalmazásával végeztük el, így hozva létre a pUbiq-SMAC vektor DNS konstrukciót. A vektorkonstrukció szekvenálását a GeneriBiotech (Debrecen) végezte. A PCR-termékek, illetve a restrikciós endonukleázokkal végzett emésztések szétválasztását agaróz-gélelektroforézissel végeztük, 1%-os agaróz (Lonza SeaKem® LE) gélen 20 000-szeres hígítású festéssel (RedSafe Nucleic Acid Staining Solution; iNtRON Biotechnology, Korea).

3.3.2. 10xHis-UBI_SMAC fehérje expressziója és tisztítása

A baktériumkultúrát Sartorius BIOSTAT® A plus 1 literes bioreaktorban inkubáltuk, a következő működési paraméterek mellett: a sejteket 37 °C-on LB tápoldatban tenyésztettük 50 mg/L kanamicinnel kiegészítve, az *E. coli* transzformánsok szelekciója és fenntartása céljából; keverési sebesség 300 rpm; légáramlási sebesség 0,2

vvm. A sejtnövekedést optikai sűrűségméréssel követtük $\lambda=600$ nm-en UV-Vis spektrofotométerrel (GeneQuant pro Spectrophotometer, GE Healthcare). A 10xHis-UBI_SMAC expresszióját 0,5 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk $OD_{600}=0,8$ optikai sűrűség mellett, az expresszió időtartama 5 óra volt.

A baktériumkultúrát centrifugálással (SL-40R, Thermo Scientific) gyűjtöttük össze 4000 g 10 percig. A sejteket 20 mL lízis pufferben szuszpendáltuk (5. táblázat), majd ultrahangos lizálást követően 60 000 g-vel 60 percig centrifugáltuk (Sorvall Lynx 6000, Thermo Scientific). A felülúszót 4°C-on tároltuk a tisztítási folyamat alatt. A felülúszóban található (oldott) fehérjéket SDS-PAGE-n (12% akrilamid) választottuk el. A rekombináns fehérje méret szerinti azonosítására a Protein Marker I (peqGOLD, VWR) létra szolgált.

A bioreaktorban expresszált 10xHis-UBI_SMAC rekombináns fehérje tisztítását FPLC-vel (ÄKTA purifier, GE Healthcare) végeztük HisTrap (GE) 5 mL-es affinitás kromatográfiás oszlopon. Az alkalmazott pufferrendszert a 5. táblázat mutatja be. A pufferrendszer Mosó I és Mosó II puffert tartalmaz, annak érdekében, hogy minimalizáljuk a fehérjék és az oszlop között létrejövő nem specifikus kölcsönhatásokat. Az eluált fehérjék abszorbanciáját UV-detektorral (UPC-900, GE Healthcare) követtük 280 nm hullámhosszon.

5. táblázat: A dekahisztidin fúziós (10xHis-UBI_SMAC) rekombináns fehérje tisztítására használt pufferek

LÍZIS PUFFER	MOSÓ I. PUFFER	MOSÓ II. PUFFER	ELÚCIÓS PUFFER
<i>pH=8</i>	<i>pH=8</i>	<i>pH=8</i>	<i>pH=8</i>
50 mM	50 mM	20 mM Tris	20 mM Tris
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O		
300 mM NaCl	300 mM NaCl	1 M NaCl	200 mM NaCl
20 mM imidazol	40 mM imidazol	20 mM imidazol	400 mM imidazol
			10% glicerin
0.2% CHAPS	2 mM β -merk.	2 mM β -merk.	2 mM β -merk.
2 mM β -merk.			0,2% BOG

A 10xHis-UBI_SMAC sikeres tisztítása után a fehérje komplexet 1U YUH1-gyel emésztettük, 4 órán át. A YUH1 emésztő puffer 20 mM Tris-HCl-t, 1 mM DTT-t és 0,5 mM EDTA-t tartalmazott. Az emésztési reakciót 10%-os SDS-PAGE-el ellenőriztük, a kapott képet a GelAnalyzer 19.1 szoftverrel elemeztük (<http://www.gelanalyzer.com/>).

A natív SMAC izolálása érdekében egy újabb affinitás kromatográfiás tisztítást alkalmaztunk, így távolítva el az elegyből az 10xHis-ubikvitint és a YUH1 enzimet. Az alkalmazott pufferrendszert a 5. táblázat mutatja be. Az eluált fehérjék abszorbanciáját UV-detektorral (UPC-900, GE Healthcare) követtük 280 nm hullámhosszon.

3.3.3. 10xHis-UBI_SMAC fehérje szerkezetének modellezése

A 10xHis-UBI_SMAC fehérje komplex 3D szerkezetét homológia alapú modellező algoritmussal végeztük. A Phyre2 online keresőmotort használtuk a fúziós rekombináns fehérje szekvencia homológok keresésére és a modell megalkotására (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/>). A modell készítése során a következő struktúrákat használtuk sablonként: 3LOW, 5Y3T, 1FEW, 3AI5, 10GW, 10QY, 6PX3, 1YX5. A megfelelő templatókból a meglévő ismert kristályszerkezetek alapján a Phyre2 alkalmazásával (nagy pontossággal) meghatározható a fúziós fehérje térszerkezete (DeLano, 2002; Kelley és *mtsai*, 2015). A 3D-s szerkezet megjelenítéséhez PyMOL 2.0 szoftvert használtunk (<https://pymol.org/2/>).

3.3.4. SMAC és GST-XIAP közötti kölcsönhatás *in vitro* vizsgálata

A SMAC és GST-XIAP közötti kölcsönhatás *in vitro* vizsgálatához használt rekombináns GST-XIAP kereskedelmi forrásokból (Merck) származott. A Glutathione Sepharose 4b gyantát reakció pufferrel (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4) ekvilibráltuk. A GST-pulldown kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük. A GST-XIAP fehérjét (8 µg) és a rekombináns SMAC-et (8 µg) glutation gyöngyökkel inkubáltuk 1-2 órán át reakciópufferben, majd három mosás követte. A megkötött fehérjét 10 mM szabad redukált glutationnal eluáltuk Tris pufferben. Pozitív kontrollként GST-t (8 µg), negatív kontrollként a SMAC fehérjét alkalmaztuk (a SMAC egyedül, ha nincs GST-XIAP, önmagában nem kötődik fel az oszlopra). Az eluált mintákat 8%-os SDS-PAGE-n ellenőriztük.

3.3.5. 10xHis-UBI_BUFII fehérje bioszintézise

A BUFORIN II kis méretének (21 aminosav, 63 bp) következtében a klónozáshoz szükséges inszert (gén) két egyszálú oligonukleotid (primer) (6. táblázat). A BUFORIN II peptidet kodoló DNS szekvencia N-terminálisára SacII és C-terminálisra a BamHI

enzimet által felismert szekvenciát terveztünk. A tervezett oligonukleotidokat a GeneriBiotech (Debrecen) gyártotta le. A DNS-szekvencia megjelenítésére és szerkesztésére Snapgene szoftvert (1.1.3-as verzió) használtunk (<https://www.snapgene.com/>).

6. táblázat: Tervezett oligonukleotidok (BUFII fehérje klónozása)

Primer név	Nukleotid szekvencia
Fw-BUFII	5'CCGCGGTGGAACCCGCAGCAGCCGCGCGGGCCTGCAGTTTCCGGTGGG CCGCGTGCATCGCCTGCTGCGCAAATAAGGATCC
R-BUFII	5'GGATCCTTATTTGCGCAGGCGATGCACGCGGCCACCGGAAACTG CAGGCCCGCGGGCTGCTGCGGGTTCCACCGCGG

Az inszert előállítását a két egyszálú oligonukleotid (BUFORIN II peptidet kódoló DNS szekvencia) hibridizációjával valósítottuk meg. A hibridizációt TE pufferben végeztük (100 µL): a reakcióelegybe 25 µL „forward” (5’) és 25 µL „reverse” (3’) szekvenciát adtunk, amelyet 4 µL 1 M-os NaCl oldattal egészítettük ki. A reakcióelegyet PCR készülékbe helyeztük, melyet lassan felmelegítettük 95°C-ra, mely hőmérsékleten tartottuk 10 percig, majd alacsony sebesség mellett hűtöttük szobahőmérsékletre.

A rekombináns vektor létrehozását BamHI és SacII restrikciós endonukleázok felhasználásával valósítottuk meg. A megfelelő klón kiválasztása érdekében a ligálási reakcióelegyet *E. coli* TOP10F klónozó sejt vonalba transzformáltuk.

A 10xHis-UBI_BUFII fehérje expressziójára *E. coli* Rosetta™ (DE3)pLysS törzset, mint proteáz-hiányos gazdasejtet használtunk. A rekombináns fehérje nagy mennyiségben való termelését 1 literes Sartorius Biostat®A Plus bioreaktorban valósítottuk meg. A fermentáció körülményeinek vezérlését BioPAT®MFCS/DA Supervisory Control szoftverrel végeztük. A bioreaktort 0,7 L 2YT táplevelessel (16 g/L Trypton, 10g/L élesztő kivonat, 5 g/L NaCl) töltöttük fel, majd a teljes rendszert autoklávban sterilizáltuk (120 °C, 20 perc). A fermentáció paraméterei: 400 RPM, 37 °C, pH=6,9. A rendszer stabilizálódása után a reaktort beoltottuk, majd a sejtenyészetet 37 °C-on, 6,9-es pH-n és 40% fölötti oldott oxigén szint mellett növesztettük 26-os optikai denzitás (600 nm) eléréséig. Az optikai denzitás mérése CamSpecM330 UV-VIS spektrofotométerrel történt. A fehérjeexpressziót izopropil-tiogalaktopiranoziddal (IPTG) indukáltuk, 1 mM végső koncentrációban. A fehérje expresszió 37 °C-on, 4 órán

át zajlott. A sejtek begyűjtését centrifugálással (12000xg, 10perc, 4 °C, Sorvall LYNX 6000 Ultracentrifuga), feltárásukat Microfluidizer LM10 műszerrel végeztük. A feltáráshoz használt lízis puffer összetétele: 20 mM Tris-HCl(pH=8), 250 mM NaCl, 2 mM ditiotritol (DTT), 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), 1X proteáz inhibi-tor (Thermo Scientific). A feltárást során nyert kivonatot centrifugáltuk (60000xg, 60 perc, 4 °C, Sorvall LYNX6000 Ultracentrifuga) a sejtörmelék eltávolításának érdekében.

Az affinitás kromatográfiás tisztítás 5 mL-es HisTrap (GEHealthcare) oszlopon történt, AKTA FPLC (Amersham Pharmacia Biotech) készüléken. A rendszer vezérlését és az adatgyűjtést UNICORN 5.11 szoftverrel végeztük. A mosó puffer összetétele: 20 mM Tris-HCl (pH=8), 250 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 20 mM imidazol; az elúciós puffer összetétele: 20 mM Tris-HCl (pH=8), 250 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 500 mM imidazol. Az alkalmazott tisztítási paraméterek a következők: 1 mL/perc áramlási sebesség, 1 mL/frakció. Az elúció során lépcsős gradienssel- (40-500 mM imidazol, 2 oszloptérfogat, 1 mL frakció), valamint lineáris gradienssel (0-500 mM imidazol, 4 oszloptérfogat, 1 mL frakció) történő elválasztást alkalmaztunk. A tisztítás során kapott fehérje oldatot dialízisnek vetettük alá, mely 24 órán keresztül tartott, 4 °C-on, kevertetve, a következő pufferben: 20 mM Tris-HCl (pH=8), 250 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM PMSF. A 10xHis-UBI_BUFII sikeres tisztítása után a fehérje komplexet 1 U YUH1-gyel emésztettük a 10xHis-UBI_SMAC komplex körülményeinek megfelelően.

3.4. GST-XIAP zárványtestek refoldingja

3.4.1. GST-XIAP zárványtestek bioszintézise

A pGEX-GST-XIAP rekombináns plazmid Reményi Attila (MTA TTK, Szerves Kémiai Intézet, Fehérje Kölcsönhatás Kutatócsoport, Budapest, Magyarország) ajándéka. Kísérleteink során a teljes XIAP fehérjét expresszáltuk. A Western blot analízishez kontrollként használt rekombináns GST-XIAP kereskedelmi forrásokból (Merck) származott. Az elektroforézis készülék a Bio-Rad (Bio-Rad Mini ProteanTetraCell) cégtől származott. A centrifugáláshoz Sorvall LYNX 6000 centrifugát (Thermo Scientific) használtunk. A fehérjék szakaszos tisztítását Glutathione Sepharose 4B affinitáskromatográfiás gyantával (GE Healthcare) végeztük. Minden kromatográfiás kísérletet AKTA FPLC rendszerrel (Amersham Pharmacia Biotech) végeztünk. A Hi Load 16/600 Superdex 75 pg oszlopot a GE Healthcare-től vásároltuk. A chip elektroforézis

vizsgálatokhoz 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent) és Protein 250 Kit (Agilent) használtunk.

A pGEX-GST-XIAP rekombináns plazmidot kompetens *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta plysS baktériumsejtekbe transzformáltuk, és 100 µg/mL ampicillint és 34 µg/mL kloramfenikolt tartalmazó Luria Bertani (LB) tápagarra szélesztettük. Egyetlen telepet használtunk 5 ml LB-ampicillin tápoldat beoltására, és 8 órán át 37 °C-on, 250 rpm sebességgel növesztettük. Ezután 1 mL inokulumtenyészetet 200 mL 100 µg/mL ampicillint és 34 µg/mL kloramfenikolt tartalmazó M9 minimál tápoldatba vittünk tovább, és ugyanolyan körülmények között tenyésztettük, amíg az OD₆₀₀ érték el nem érte a 0,7-et. A tenyésztési hőmérsékletet 18 °C-ra csökkentettük, és 0,2 mM IPTG-t adtunk hozzá a rekombináns fehérje expressziójának iniciációja érdekében. A baktériumkultúrát 8 órán át 18 °C-on inkubáltuk. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze 4500 rpm-en 10 percig 4 °C-on. Az összfehérjét 10%-os (w/v) SDS-PAGE-val analizáltuk.

3 g kinyert sejtet 30 mL lízispufferben (50 mM Tris HCl, 200 mM NaCl és 2 mM DTT, pH 7,8) szuszpendáltunk. Lizozimet (1 mg/mL) adtunk a sejtsuszpenzióhoz, és 30 percig inkubáltuk 4 °C-on. Ezt követően DNáz I-et (0,1 mg/mL végső koncentráció) adtunk a sejtsuszpenzióhoz. 30 perces inkubálás után a sejteket nagynyomású homogenizátorral (LM10 Microfluidizer) homogenizáltuk 18 000 psi nyomáson két cikluson keresztül. A sejtízátumot 20 percig centrifugáltuk 15 000 x g-vel, 4 °C-on, majd a pelleteket összegyűjtöttük és ultratiszta vízzel kétszer mostuk.

3.4.2. GST-XIAP zárványtestek szolubilizálása és refoldálása

A célfehérje szolubilizálását úgy végeztük, hogy a fent említett lízispufferhez N-Lauroil-szarkozint adtunk különböző koncentrációkban (2%, 3%, 4% és 10%). Ezeket a szuszpenziókat szobahőmérsékleten inkubáltuk enyhe keverés közben 1 órán át, majd centrifugáltuk 10 000 x g-vel 15 percig. A célfehérjét tartalmazó felülúszót azonnali refoldálási eljárásnak vetettük alá. A szolubilizált fehérjefrakciókat 10%-os (w/v) SDS-PAGE-val analizáltuk.

A teljes fehérje kvalitatív elemzését protein chip analízissel végeztük. A kísérletet a Protein 230 Kit (Agilent) kísérleti leírása szerint végeztük Bioanalyzer 2100 használatával. A rekombináns XIAP-GST folding feltételeinek optimalizálását TritonX-

100, CHAPS és OTG alkalmazásával végeztük, különböző arányokban. A 6 különböző körülmény:

- 1: 1% TritonX-100 és 0,61% (10 mM) CHAPS;
- 2: 2% TritonX-100 és 1,22% (20 mM) CHAPS;
- 3: 3% TritonX-100 és 4,83% (30 mM) CHAPS;
- 4: 1% TritonX-100 és 1,5% OTG;
- 5: 1% TritonX-100 és 1% OTG;
- 6: 0,61% (10 mM) CHAPS és 1% OTG.

A folding körülményeit három párhuzamos ismétlésben teszteltük. A detergenset óvatosan, lassan keverve, szobahőmérsékleten adtuk a szolubilizált fehérjéhez. A refoldált fehérjét Glutathione Sepharose 4B gyantán tisztítottuk. A szolubilizált fehérjét 2 órán át inkubáltuk a glutation gyöngyökkel szobahőmérsékleten, enyhe keverés közben. A refoldált fehérjék tisztítását a gyártó (GE Healthcare) utasításai szerint végeztük, majd 10%-os SDS-PAGE analízis követte. A fehérje eluálását 50 mM Tris-HCl pufferrel (pH 8,0), amely 20 mM redukált glutationt tartalmazott. Az eluált frakciókat 4 °C-on tároltuk, és 10%-os SDS-PAGE-val analizáltuk. A tisztított fehérjét 48 órán át dializáltuk 50 mM Tris-HCl pufferben (pH 7,8), háromszori puffercserével. A célfehérje további tisztítását méretkizárásos kromatográfiával végeztük HiLoad 16/600 Superdex 75 pg oszlopon 1 mL/perc áramlási sebességgel. Az oszlopot először 2 oszloptérfogatnyi 50 mM Tris-HCl, pH 7,8 pufferrel töltöttük fel, majd a mintát injektáltuk. Az elúciót 280 nm-en követtük. Az eluált frakciókat 4 °C-on tároltuk, és 10%-os SDS-PAGE-val analizáltuk. Minden mintát a Laemmli protokollon alapuló SDS-PAGE módszerrel elemeztünk 5%-os (w/v) stacking géllal és 10%-os (w/v) rezolváló géllal 120 V állandó feszültség mellett.

Western blot (Mini Trans-Blot®, Bio-Rad) analízist végeztünk a GST-XIAP refolding megerősítésére. A rekombináns GST-XIAP fehérjét elektroforézissel, 10%-os natív PAGE alkalmazásával választottuk el, 4 °C-on, majd nedves transzferrel PVDF membránra vittük át. A transzfer puffer 25 mM Tris-HCl-t, 192 mM glicint, 0,7%-os ecetsavat tartalmazott, pH=7,4. A transzfert 4 °C-on 100V feszültség mellett végeztük, 1 órán keresztül. A membrán szabad fehérjekötő felszínét indifferens sovány tejporral blokkoltuk. A membránt 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk monoklonális anti-XIAP antitesttel, a 2F1 klónnal (Abcam), 1:1000 hígítással TBS pufferben. 15 perces TBS-sel végzett négyszeri mosás után a membránt TBS-ben 1:1000 arányban hígított Goat Anti-

Mouse IgG H&L (HRP) másodlagos antitesttel (Abcam) inkubáltuk. A következő lépés négyzeri mosás volt TBS-sel 15 percig. Végül a fehérjét Pierce™ ECL szubsztráttal (Thermo Scientific) detektáltuk, és a membránt röntgenfilm segítségével (dark room technika) tettük láthatóvá.

3.5. Autoindukció alkalmazása az AURKA zárványtestekké történő aggregációja ellen

3.5.1. Heterológ gént tartalmazó kultúrák előnevelése

A fermentációk előkészítése során előnevelt kultúrákat hoztunk létre. Kísérleteink során a teljes AURKA fehérjét expresszáltuk. Az első előnevelést 10 mL 100 mg/mL koncentrációjú ampicilin tartalmú LB tápoldatban végeztük, a transzformálás utáni szélesztés eredményeként kinőtt baktériumtelepek leoltásával. A kultúrák előnevelését 37 °C-on, 250 rpm-en végeztük addig a pontig amikor a sejtsűrűség elérte az $OD_{600} = 0,1-0,2$ közötti értéket, ez általában 4 óra alatt valósult meg. Ezekhez az előnevelt kultúrákhoz 15% végkoncentrációban steril glicerint adtunk hozzá, majd -80°C-on tároltuk őket. A további előnevelt kultúrákat ezekből a tárolt mintákból oltottuk be, hogy a fermentációk során ugyanazon telepből származó sejtekkel dolgozzunk. A továbbiakban az előnevelt kultúra létrehozásához 5 mL 100 mg/mL ampicilin tartalmú LB tápoldatba oltottunk be 1 mL-t a tárolt mintákból és ezeket az előzőekkel azonos körülményeken inkubáltuk.

Az autoindukciós fermentációk során kontrollként LB és M9 tápoldatot alkalmaztunk, továbbá vizsgáltuk három autoindukciós tápoldat hatékonyságát: ZYM, ZYP (F. William Studier, 2005), illetve autoindukciós M9 (II. és III. melléklet). A tápoldatok összetétele jelen értekezés Anyag és módszer megfelelő alfejezetében látható.

3.5.2. Fermentációs körülmények

Ezen kísérlet során 12 különböző körülményt, 2 sejtvonalat és 2 rekombináns fehérjének az expresszióját vizsgáltuk. A különböző szubsztrát/indukálószer arány hatását vizsgáltuk a sejtnövekedésre és az expresszió mértékére, 37 °C-on, 24 órán keresztül. A vizsgált szubsztrát/indukálószer arányok a 7. táblázatban láthatóak.

12 db. előre összeállított tápoldatot mértünk ki, majd 96 lyukú mikrotitráló lemezre (TPP TP29097) osztottunk szét 200-200 μL -t mintánként 8-as ismétléssel. A 6 perc ciklusidő indokolt a folyamatos rázatás érdekében.

A mikrolemez olvasó (BMG LABTECH FLUOstar OPTIMA) programja:

- ciklusok száma és ideje: 72 ciklus, 6 perc
- hőmérséklet: 37 °C
- rázatás: 250 RPM

7. táblázat: Fermentáció során alkalmazott szénforrások aránya

		Körülmények				
Tápoldat	Szénforrás	I.	II.	III.	IV.	V.
aM9	glc (g/L)	2	27	52	77	102
	lac (g/L)	2	2	2	2	2
	glc/ lac arány	1	13,5	26	38,5	51
ZYM	glc (g/L)	0,5	5,5	30,5		
	lac (g/L)	2	2	2		
	glc/ lac arány	0,25	2,75	15,25		
ZYP	glc (g/L)	0,5	5,5	30,5		
	lac (g/L)	2	2	2		
	glc/ lac arány	0,25	2,75	15,25		

3.5.3. Mintavétel, mintaelőkészítés és SDS-PAGE

Egy mérésorozatot 24 órán keresztül zajlott, a fermentációt követően a mintákat összegyűjtöttük, 18 000 RPM-en, 15 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót tiszta centrifuga csőbe pipettáztuk.

A EGFP és AURKA fehérjék sejtből való kinyerésének érdekében a sejtek feltárását a pelletekből, a következő protokollt követve végeztük el:

- a pelletet (sejtüledék) 100 μL lízis pufferben szuszpendáltuk fel (8. táblázat)
- szobahőmérsékleten inkubáltuk 30 percig

- ezt követően jégre helyezve 2 x 20 impulzusnyit szonikáltuk (Hielscher UP200S).
- 18000 RPM-en centrifugáltuk 10 percig, majd a felülúszót óvatosan egy másik centrifugatubusba pipettáztuk

A centrifugálás utáni felülúszó tartalmazza a szolubilis rekombináns fehérjét.

8. táblázat: Lízis puffer összetétele

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség (V=100 mL)
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	50 mM	0,89 g
NaCl	300 mM	1,75 g
Imidazol	20 mM	0,135 g
DTT	1 mM	0,0154 g
TritonX100	1%(V/V)	1 mL
Lizozim	0,1 mg/mL	0,01 g

A sejtek feltárása után kapott felülúszóból 25 µL-hez 5 µL 6X mintakezelő puffert (9. táblázat) adtunk. 98 °C-on 5 percig főztük a mintákat.

9. táblázat: 6x Mintakezelő puffer összetétele

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség (V=10 mL)
Tris HCl pH=6,8	0,375 M	*
SDS	12%(m/V)	1,2 g
Glicerin	60%(V/V)	6 mL
DTT	0,6 M	0,93 g
Brómfenol kék	0,06%(m/V)	6 mg

Az SDS PAGE gél futtatása során 7 µL molekulásúly markert (peqGOLD Protein Marker I, VWR), illetve 10 µL mintát vittünk fel a géltre. A 10 %-os SDS-PAGE gél öntéséhez használt összetevőket és mennyiségeket tartalmazza a 10. táblázat. Az SDS-

PAGE gél futtatási paraméterei: a felső gél esetében 80 V 20 perc, majd a minták alsó gélbe való érkezését követően 120 V-on kb. 1,5 óra.

10. táblázat: Az alsó, szeparáló és felső, koncentráló gél összetétele

Összetevő	Alsó, szeparáló gél	Felső, koncentráló gél
H ₂ O	4,9 mL	6,1 mL
40% Acrylamide	2,5 mL	1,3 mL
1,5 M Tris-HCl	2,5 mL	-
0,5 M Tris-HCl	-	2,5 mL
10% SDS	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL
10% APS	32 µL	100 µL

A 11. táblázat tartalmazza a fehérjegél festése során alkalmazott SDS-PAGE festék összetevőit. A gél festése 30 percig rázatva történt, majd a fehérje sávok detektálhatósága érdekében destain oldatot (12. táblázat) alkalmaztunk, rázatva.

11. táblázat: SDS-PAGE gél festék összetevői

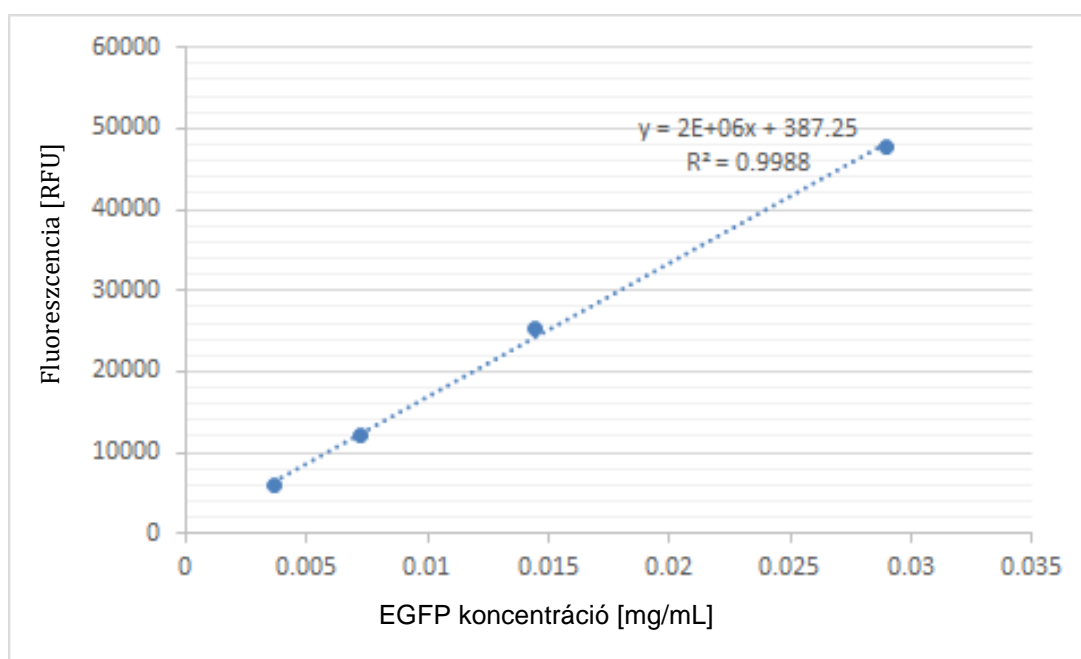
Összetevő	Koncentráció	Mennyiség (V=500 mL)
Coomassie Brilliant Blue	0,1%(m/V)	0,5 g
Metanol	20%(V/V)	100 mL
Ecetsav	10%(V/V)	50 mL

12. táblázat: Destain oldat összetevői

Összetevő	Koncentráció	Mennyiség (V=500 mL)
Metanol	50%(V/V)	250 mL
Ecetsav	10%(V/V)	50 mL

3.5.4. Rekombináns fehérje mennyiségi meghatározása

A minták begyűjtését és feltárását követően, a rekombináns fehérjék mennyiségének meghatározását fluorimetriás méréssel határozzuk meg. A mintákból 5 μL -t szuszpendáltunk 100 μL lízis pufferben (összetételt lásd a feltárás leírásánál), majd ebből készítettünk 20x-os hígítást, biztosítva ezáltal azt a koncentrációt, amely a mérési tartományban található. Az előkészített minták, hígítások fluoreszcenciáját mértük fluoriméter (BMG LABTECH FLUOstar OPTIMA) segítségével (405 nm excitáció, 520 nm emisszió). A kalibrációs görbe során ismert EGFP koncentrációjú fehérje oldatból elkészített hígítási sort alkalmaztunk. A kalibrációs görbe a 3. ábrán található.



3. ábra: EGFP koncentráció meghatározásához alkalmazott kalibráció

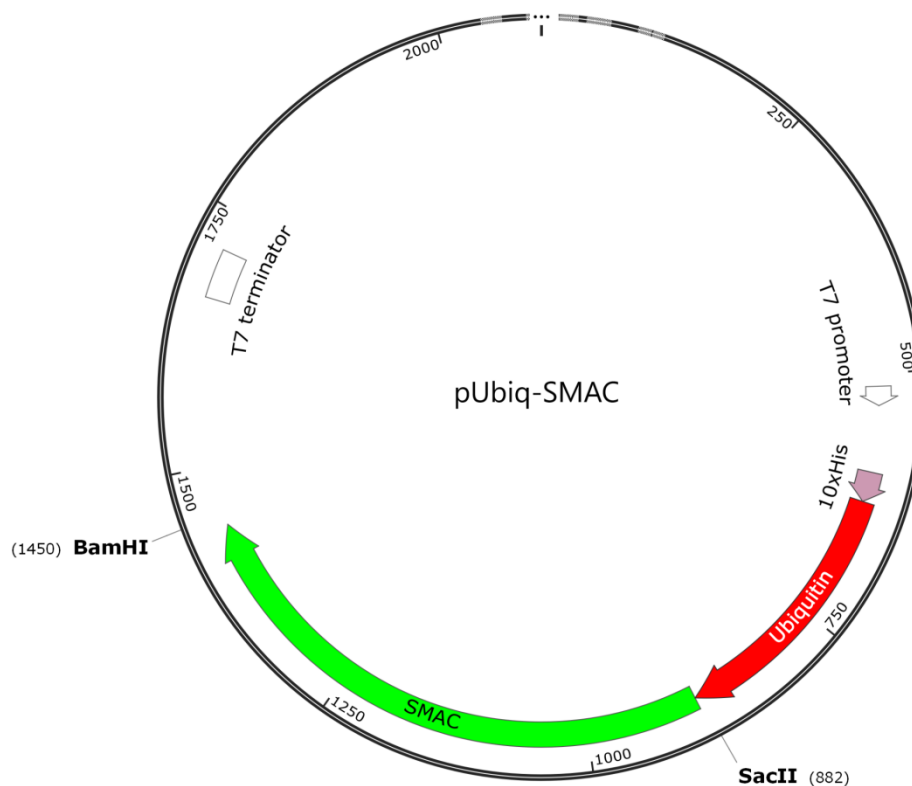
A mérés alapját az EGFP fluoreszcens tulajdonsága képezi, amely révén a fluoreszcencia intenzitásának mérésével meghatározható a termelődött rekombináns fehérje koncentrációja.

4. Eredmények

4.1. SMAC és BUFII rekombináns fehérje bioszintézise

4.1.1. pUbiq-SMAC expressziós vektor

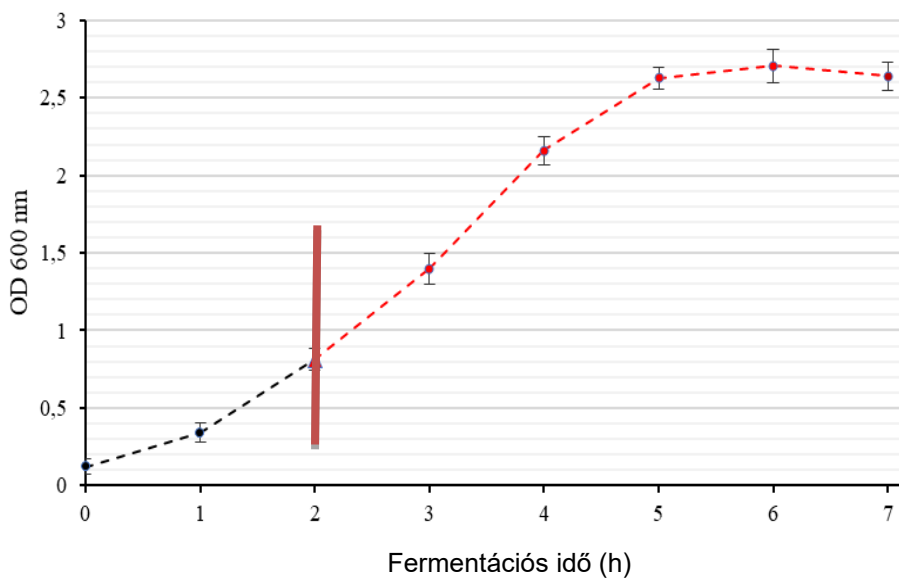
Jelen tanulmányban létrehozott vektor konstrukció részlete a 4. ábrán található. A SMAC fehérjét kódoló gén a *SacII* és *BamHI* restrikciós endonukleázok között található. A vektor konstrukció (pUbiq-SMAC) ellenőrzése különböző restrikciós endonukleáz kombinációval történő emésztéssel, illetve szekvenálással történt (IV. és V. melléklet). A pUbiq-SMAC vektor kanamicin rezisztenciáért felelős szelekciós gént kódol.



4. ábra pUbiq-SMAC vektor konstrukció részlete

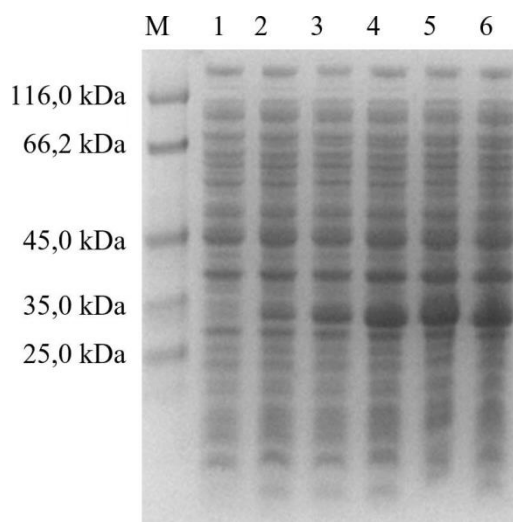
4.1.2. 10xHis-UBI_SMAC fehérje expressziója és tisztítása

A biomassza változását óránként követtük bioreaktorban, az optikai denzitás 600 nm-en történő mérésével. Az optikai denzitás (OD₆₀₀) monitorizálása az expresszió során az 5. ábrán látható. A rekombináns fehérje termelését a fermentáció 2. órájában indukáltuk 0,5 mM koncentrációjú IPTG-vel OD₆₀₀=0,8 értéknél, amelyet a 5. ábrán „|” -vel jelöltünk. Az expresszió 5 órán keresztül zajlott.

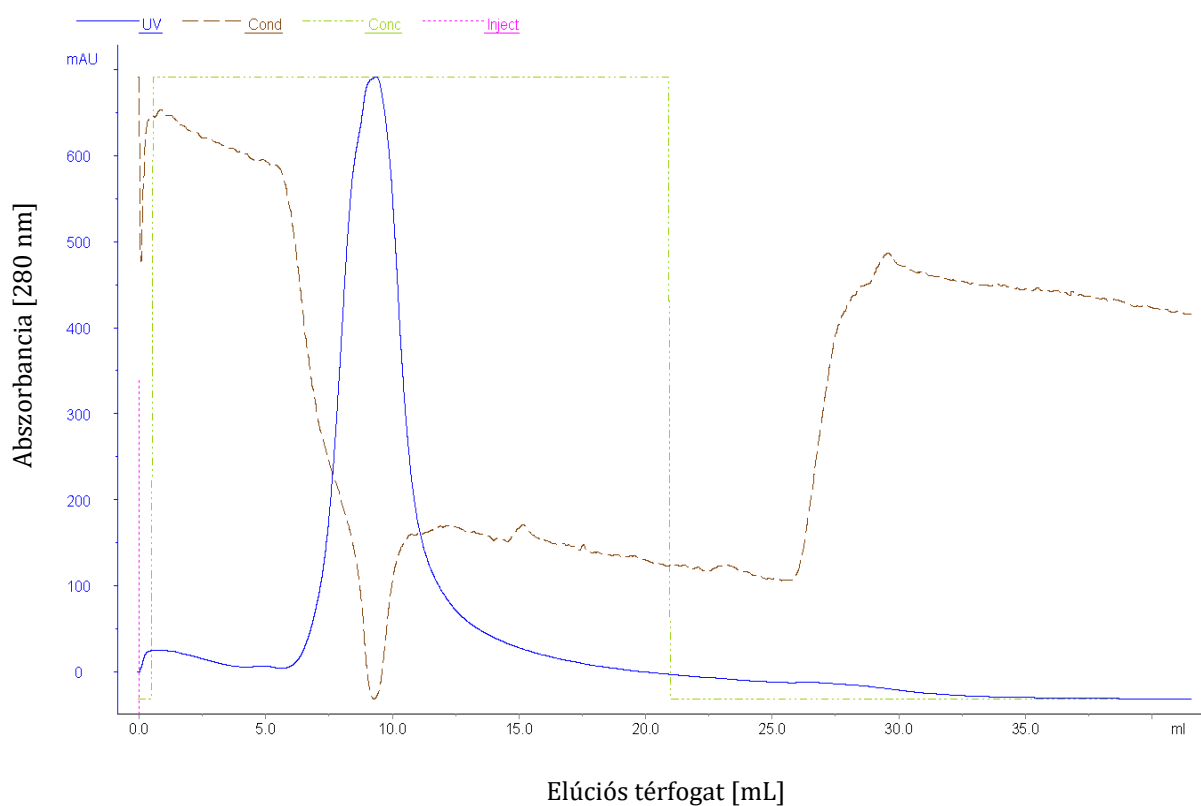


5. ábra: Az optikai denzitás (biomassza) vizsgálata a fermentáció során (A 10xHis-UBI_SMAC rekombináns fehérje termelődését a fermentáció 2. órájában indukáltuk IPTG-vel („|”), az expresszió 5 órán keresztül zajlott)

A rekombináns fehérje termelésének SDS-PAGE analízise a 6. ábrán látható. A rekombináns fehérje a fermentáció idejének előrehaladtával nagyobb mértékben termelődik az oldható frakcióban.



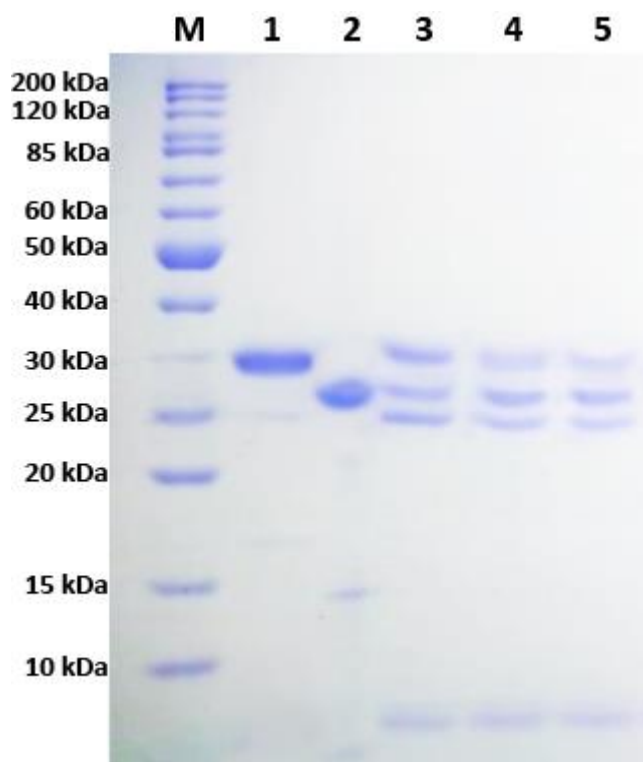
6. ábra: A 10xHis-UBI_SMAC rekombináns fehérje (32,1 kDa) termelés SDS-PAGE analízise (M.: standard PeqGold Protein marker; 1.: indukció előtti minta; 2.: az indukció utáni 1. órai minta; 3.: az indukció utáni 2. órai minta; 4.: az indukció utáni 3. órai minta; 5.: az indukció utáni 4. órai minta; 6.: az indukció utáni 5. órai minta)



7. ábra: A 10xHis-UBI_SMAC rekombináns fehérje affinitáskromatográfiás tisztítás (5 mL HisTrap (GE Healthcare)) elúció folyamatának kromatogrammja. Az elúció során a frakcionálás a 280 nm-en mért abszorbancia függvényében történt. A kromatogram a vezetőképességet (Cond) és az alkalmazott elúciós térfogatot (Conc) is tartalmazza. Az elúciós puffer imidazol koncentrációja 400 mM.

A tisztítás során a 10xHis-UBI_SMAC fehérjét elválasztottuk a celluláris fehérjéktől és egyéb szennyeződésektől. A 7. ábra a UNICORN 5.0 szoftverből exportált affinitáskromatográfiás eredményt tartalmazza (AKTA Explorer, GE Healthcare). A rekombináns fehérje tisztítása sikeres volt az 8. ábra 1. mintájának SDS-PAGE gélképe alapján.

A továbbiakban YUH1 enzim emésztéssel eltávolítottuk a 10xHis-UBI fúziós partnert a fehérje komplexből, így előállítva a natív SMAC fehérjét. A reakció időtartama 3 óra volt, és amint a 8. ábrán látható, a második órától kezdve az emésztés hatékonysága nem javul. A 3-5. sávban a 30 kDa-nak megfelelő relatív molekulatömegű sáv a 10xHis-UBI_SMAC komplexet, a 26 kDa, 23 kDa és 8 kDa (a GelAnalyzer 19.1 elemzése szerint) a YUH1-et, a natív SMAC-ot és az ubikvitin t jelenti.

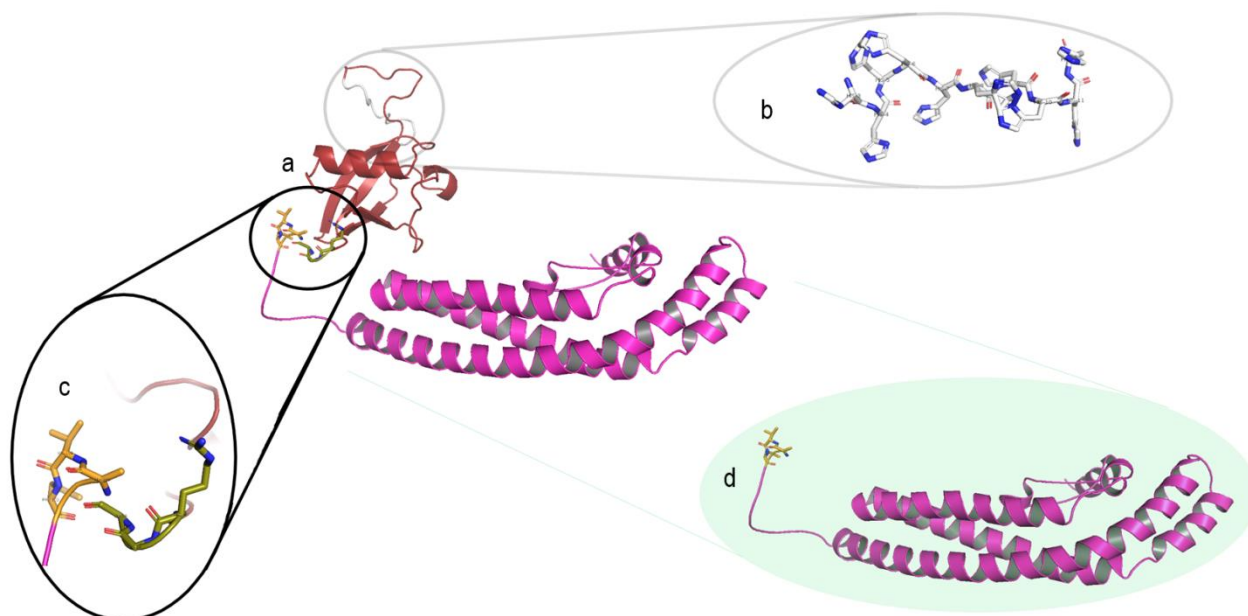


8. ábra: A 10xHis-UBI_SMAC komplex YUH1 emésztésének SDS PAGE eredménye
M.: standard (PeqGold Protein II marker); 1.: 10xHis-UBI_SMAC; 2.: YUH1; 3-5.: a 10xHis-UBI_SMAC emésztése YUH1 enzimmel az 1., 2. és 3. órában.

A natív SMAC fehérje szeparálását újabb affinitáskromatográfiás eljárás segítségével végeztük el, melynek során a 10xHis-UBI szegmens kötődik az oszlophoz, így a SMAC fehérje az elúció során kimosódik az oszlopról.

4.1.3. 10xHis-UBI_SMAC fehérje szerkezete

A natív fehérje bioszintézis folyamatának további vizsgálatához elkészítettük a 10xHis-UBI_SMAC komplex 3D szerkezeti modelljét, a Phyre2 online szoftver (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/>) alkalmazásával (9. ábra). A modell pontossága/jósága: 277 aminosav (98%), >90%-os pontosság. Az új molekuláris modellezési platformok megjelenésével kielégítő az egyezés a fehérjetulajdonságok előre jelzett értékei és az irodalomban található kísérleti adatok között.



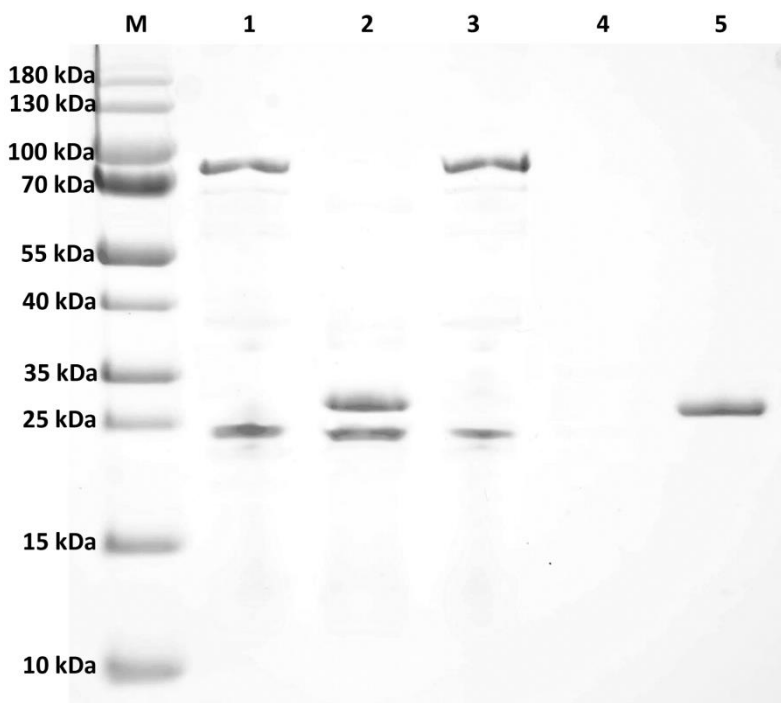
9. ábra: 10xHis-UBI_SMAC szerkezet

((a) rekombináns SMAC fehérjeszintézis után, (b) deka hisztidin fúziós szegmens, (c) YUH1 enzim hasítási hely, (d) Ubikvitin eltávolítva, natív SMAC fehérje

Az expressziós rendszer használatával a natív fehérje a fúziós szegmens nélkül is előállítható, amint azt a 9. ábrán látható komplex modellje mutatja. A dekahisztidin fúziós partner felhasználásával a rekombináns fehérje affinitáskromatográfiával tisztítható a sejtalkotó fehérjéktől. Amint a 9. ábra C. részletében látható, a rekombináns konstrukció rendelkezik egy olyan specifikus régióval (ubikvitin C terminális régió, 'RGG' szekvencia), amely régióhoz kötődve a YUH1 enzim hasítja az ubikvitinhez fuzionált célfehérjét. A proteolízist követően egy újabb affinitáskromatográfiás tisztítással elválasztható a natív fehérje a fúziós partnertől és a YUH1 enzimtől.

4.1.4. SMAC és GST-XIAP közötti kölcsönhatás *in vitro* vizsgálata

A natív SMAC aktív formájának és funkciójának vizsgálatára pull-down kísérletet végeztünk egy ismert interakciós partnerrel, a GST-XIAP-vel (10. ábra). A kísérlet körülményei a 3.3.4 szakaszban találhatók. A GST-XIAP fúziós fehérje Glutathione-Sepharose gyöngyökhöz való kötődési képessége elengedhetetlen volt a GST pull-down kísérletek elvégzéséhez.



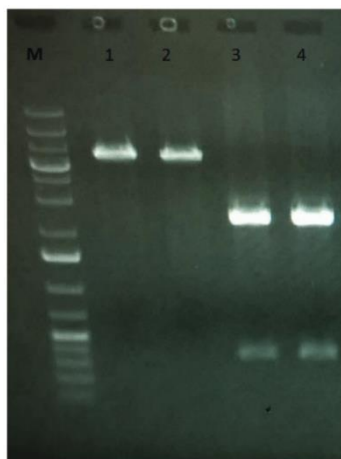
10. ábra. A rekombináns natív SMAC kötődési vizsgálata GST-XIAP-vel (1.: GST-XIAP és SMAC; 2.: GST és SMAC; 3–5.: az oszlopra felvitt minták glutationnal eluálva- 3.: GST-XIAP és SMAC interakciós komplex; 4.: SMAC GST-XIAP nélkül - negatív kontroll; 5.: GST).

Az interakciós komplexum során az első sáv XIAP-ként (78 kDa), míg a második sáv SMAC-ként (23 kDa) azonosítható. A fent bemutatott eredmények értelmében a SMAC-GST-XIAP kölcsönhatás kimutatása sikeres volt, ami bizonyítja a rekombináns SMAC fehérje aktív formáját, a szabad N terminális AVPIA szekvenciát.

4.1.5. 10xHis-UBI_BUFII fehérje bioszintézise

A pUbiq-BUFII vektor létrehozása és ellenőrzése esetében a pUbiq-SMAC konstrukció munafolyamata releváns, kivételt képezve az insert előkészítése (pUbiq-BUFII esetében hibridizáció által).

A konstrukció megfelelő beépülésének gyors ellenőrzése érdekében restriktációs endonukleázzal történő emésztést végeztünk a ligálási reakcióeleggyel transzformált *E. coli* TOP10F sejtekből izolált vektorokra. A restriktációs emésztés agaróz-gélelektroforézis eredményét a 11. ábra tartalmazza. A különböző restriktációs endonukleáz kombinációval történő emésztés eredménye alapján a megfelelő pUbiq-BUFII vektor meghatározása szekvenálással történt (VI. és VII. melléklet). A pUbiq-BUFII vektor kanamicin rezisztenciáért felelős szelekciós gént kódol.

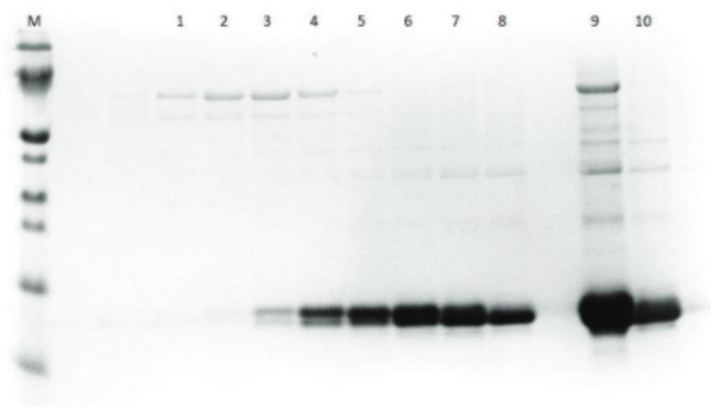


11. ábra: A pUbiq-BUFII vektor restriktációs endonukleázokkal végzett emésztés agaróz-gélelektroforézis eredménye
A fragmentumok hossza a 3. és 4. minta esetében megfelelő (M - GeneRuler 1 kb Plus, Sigma-Aldrich)

A 20-50 aminosavat tartalmazó peptidek szintézisének előfordulhat, hogy nem vesznek fel megfelelő konformációt, valamint kevésbé állnak ellen a proteázok aktivitásának, emiatt lebomolhatnak. Ennek elkerülése érdekében alkalmaztuk a BUFII esetében fúziós partnerként az ubiquitint.

A 10xHis-UBI_BUFII fehérje tisztítására egy lépéses elválasztási technikát alkalmaztunk. A nikkel affinitás kromatográfiás tisztítást 5 mL-es HisTrap (GE Healthcare) oszlopon végeztük, a 10xHis-UBI_SMAC rekombináns fehérje során alkalmazott pufferrendszer használatával. Az elúció során izolált célfehérje tisztaságának fokozása érdekében egyaránt alkalmaztunk lépcsős gradienssel-, valamint lineáris gradienssel történő elválasztást (12. ábra). A két elúció paramétereit (oszlop térfogat, puffer összetétel,

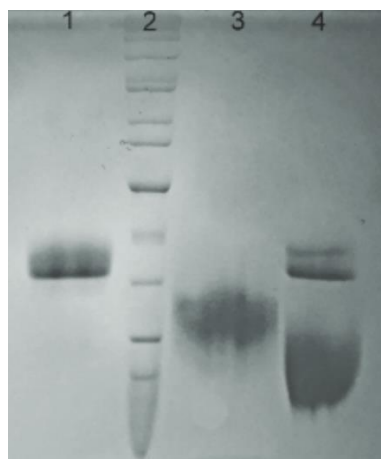
áramlási sebesség, gradiens meredekség) a 3.3.5. fejezet tartalmazza. Ezen két folyamat közül a lineáris elúció alkalmazása esetében sikerült nagyobb tisztaságú 10xHis-UBI_BUFII rekombináns fehérjét izolálni.



12. ábra: A fúziós fehérje nikkel affinitás kromatográfiás tisztítási minták SDS-PAGE ellenőrzése:

(1.): Molekulasúly-marker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific), (1-8.): Minták a lineáris gradiens elúcióból, (9-10) Minták a lépcsős gradiens elúcióból

Az ubiquitin fúziós partner emésztése a célpeptidről ubiquitin karboxil-terminális hidroláz (YUH1) enzimmel történt (13. ábra). Tekintettel arra, hogy a YUH1 enzim és a lehasított ubiquitin is rendelkezik (10x) polihisztidin címkével, a BUFORIN II célpeptid egy újabb affinitás kromatográfiás tisztítással elválasztható a fúziós partnertől és az emésztőenzimtől. Mivel a lehasított célpeptid már nem rendelkezik polihisztidin címkével, nem mutat affinitást az oszlop állófázisa iránt, így a tisztítási folyamat végén az oszlopon átfolyó oldat tartalmazza. Az átfolyó oldat fehérjetartalmát Qubit 2.0 fluoriméterrel (Thermo Scientific, Waltham, MA AEÁ) határoztuk meg.

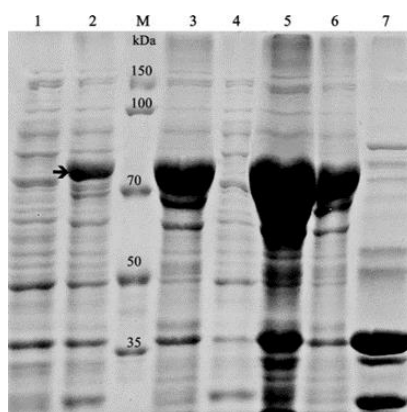


13. ábra: Az ubiquitin fúziós partner leemésztésének 10%-os SDS-PAGE ellenőrzése (1.: Ubiquitin karboxil-terminális hidroláz enzim; 2.: Molekulasúly marker (peqGOLD II, VWR); 3.: Emésztés előtti mint; 4.: Emésztés reakcióelegye

4.2. GST-XIAP zárványtestek refoldingja

4.2.1. GST-XIAP zárványtestek bioszintézise

A GST-címkével jelölt XIAP rekombináns fehérje expressziójához *E. coli* BL21(DE3) Rosetta plysS baktériumtörzset alkalmaztuk, ahol a legnagyobb rekombináns fehérjemennyiséget 18 °C-on, 8 óra alatt, 0,2 mM IPTG koncentráció mellett értük el. Az overexpresszált fehérje látszólagos molekulatömege 80 kDa az SDS-PAGE analízis alapján; a GST-XIAP konstrukció számított molekulatömege 78 kDa. Az SDS-PAGE ellenőrzés alapján (14. ábra) a vizsgált indukció utáni mintában lévő jelölt sáv jelenléte az indukció előtt vett mintákhoz képest igazolja a célfehérje sikeres expresszióját. A sejtlízist követően a felülúszó és a pellet frakció mutatja a célfehérje zárványtestekben aggregálódott jellemét. A 14. ábra 6. mintája a zárványtest felülúszóját tartalmazza szolubilizálás után, míg a 7. minta a szolubilizálás utáni pelletet.

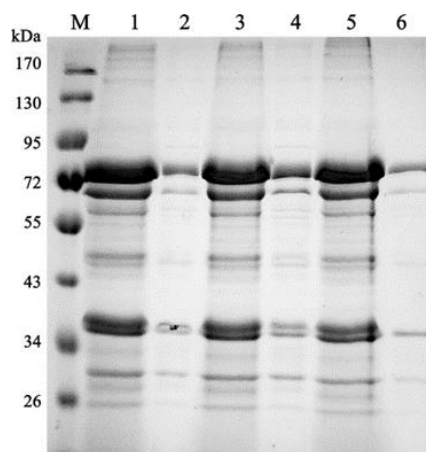


14. ábra. *E. coli*ban 18 °C-on expresszált GST-XIAP 10%-os SDS-PAGE analízise (1.: nem indukált teljes sejtlízátum; 2.: teljes sejtlízátum 0,2 mM IPTG-vel végzett indukció után 8 órás tenyésztés után; M.: fehérje molekulatömeg marker (Novagen, Sigma Aldrich); 3.: sejtlízátum homogenizálás után; 4.: felülúszó centrifugálás után; 5.: pellet centrifugálás után; 6.: felülúszó 10% N-lauroil-szarkozinnal történő szolubilizálás után; 7.: pellet szolubilizálás után).

4.2.2. GST-XIAP zárványtestek szolubilizálása és refoldálása

Tudva, hogy a zárványtest-aggregátumok enyhe szolubilizálása a kulcs a bioaktív fehérjék visszanyerésének javításához, folytattuk munkánkat az N-Lauroil-szarkozin koncentráció hatásának felmérésével a célfehérje szolubilizációs hozamára. A fehérjék

kaotróp ágensek nélküli szolubilizálásán alapuló refolding protokollt optimalizáltuk és alkalmaztuk a GST-XIAP konstrukcióhoz (15. ábra). Feltételeztük, hogy az N-lauroil-szarkozin kevesebb mint 10%-a már alkalmas a zárványtestek szolubilizálására. Eredményeink azt mutatták, hogy az N-Lauroil-szarkozin koncentrációját 4%-ról 2%-ra csökkentve, mint a 15. ábra mutatja, nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az összes oldott fehérje mennyiségében. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a 2%-os N-Lauroil-szarkozinnal történő szolubilizálás már sikeresen alkalmazható a zárványtestben lévő fehérjék oldott formában hozatalára.

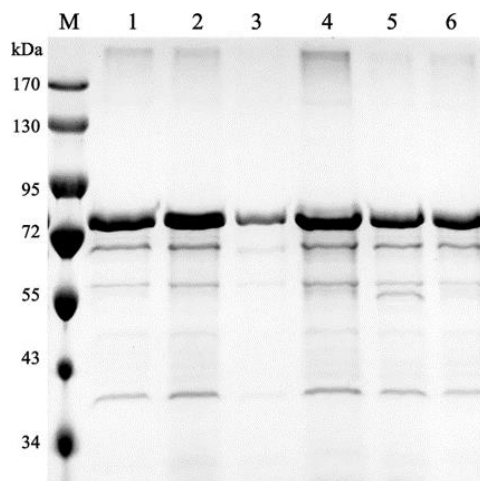


15. ábra. Különböző koncentrációjú N-lauroil-szarkozinnal szolubilizált GST-XIAP zárványtestek 10%-os SDS-PAGE analízise

(M.: fehérje molekulatömeg marker (Thermo Scientific); 1.: 3% N-lauroil-szarkozin felülúszó; 2.: 3% N-lauroil-szarkozin pellet; 3.: 4% N-lauroil-szarkozin felülúszó; 4.: 4% N-lauroil-szarkozin pellet; 5.: 2% N-lauroil-szarkozin felülúszó; 6.: 2% N-lauroil-szarkozin pellet).

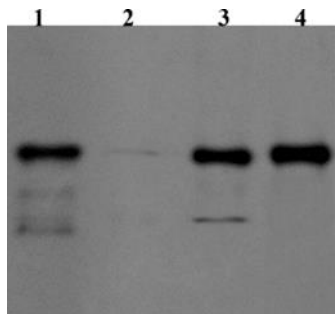
A rekombináns GST-XIAP refoldálásának optimalizálását TritonX-100, CHAPS és OTG megfelelő arányban történő hozzáadásával végeztük, 6 különböző körülmény tesztelésével, az Anyagok és módszerek részben leírtak szerint (Triton X-100, CHAPS páros használata vagy OTG), az affinitási tisztítás előtt. Mindhárom detergens (TritonX-100, CHAPS és OTG) elősegítette a XIAP-fúziós GST kötődését a GSH Sepharose mátrixhoz. A legmagasabb koncentrációjú TritonX-100 és 30 mM CHAPS alkalmazása mellett a célfehérje kicsapódott. Az SDS-PAGE gélen (16. ábra) elválasztott tisztított frakciók alapján a refolding a 2% Triton X-100 és 20 mM CHAPS együtt alkalmazása mellett a leghatékonyabb (92,34%; 3,02 mg) a GST-XIAP-ra. Hatékonyság szempontjából az 1%-os Triton X-100-zal végzett körülmény eredményezte a következő legmagasabb hozamot – 82,15% (2,68 mg) 10 mM CHAPS hozzáadásával és 79,86%

(2,61 mg) 1,5% OTG hozzáadásával. Enyhén csökkent hatásfok volt megfigyelhető (73,03%; 2,39 mg) az 1% TritonX-100 és 1% OTG, valamint (72,12%; 2,36 mg) 10 mM CHAPS és 1% OTG esetén. A további tisztítási protokollt 2% TritonX-100 és 10 mM CHAPS alkalmazásával végeztük annak érdekében, hogy nagy tisztaságú fehérjeoldatot kapjunk.



16. ábra. A rekombináns GST-XIAP refoldálás optimalizálásának 10%-os SDS-PAGE ellenőrzése TritonX-100, CHAPS és OTG különböző arányban történő hozzáadásával (M.: fehérje molekulatömeg marker (Thermo Scientific); 1.: 1% TritonX-100 és 10 mM CHAPS; 2.: 2% TritonX-100 és 20 mM CHAPS; 3.: 3% TritonX-100 és 30 mM CHAPS; 4.: 1% TritonX-100 és 1% OTG; 5.: 1% TritonX-100 és 1,5% OTG; 6.: CHAPS és 10 mM 1% OTG).

Western blot analízis során mutattuk ki az inklúziós testben termelődött GST-XIAP rekombináns fehérjét (17. ábra). A GST-XIAP rekombináns fehérje immundetektálása anti-XIAP antitesttel történt, amely a XIAP 352-449. aminosav szegmens, C-terminális régióban található epitóppal reagál.



17. ábra. GST-XIAP fehérje Western blot eredménye (1.: szolubilizált GST-XIAP a 2. kísérletből, 2.: átfolyó frakció az affinitás tisztítás során a 2. kísérletből; 3.: GST-XIAP méretkizárásos kromatográfia után a 2. kísérletből; 4.: Kontroll GST-XIAP).

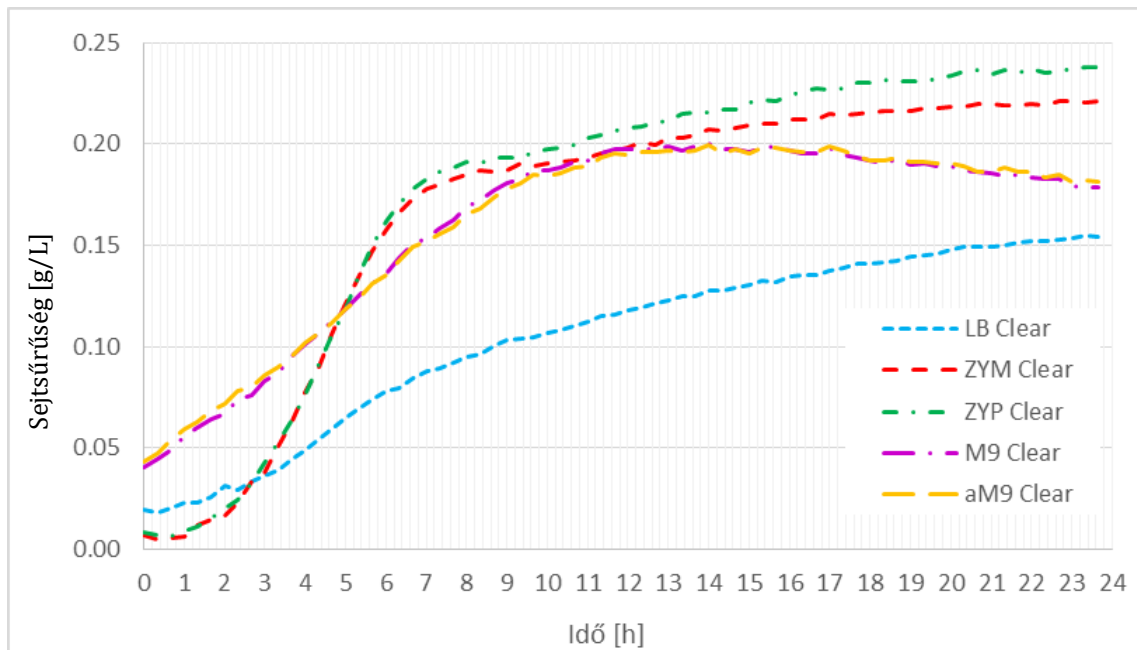
A Western blot módszer alkalmazásával mutattuk ki a GST-XIAP fehérjét. Kontrollmintaként kereskedelmi forrásokból származó rekombináns GST-XIAP-t (84 kDa) alkalmaztunk; a Western blot kísérletet (az elektroforézist és a fehérje transzfert is) nem denaturáló körülmények alkalmazásával terveztük (l. 35. oldal). A 17. ábra a szolubilizált XIAP-GST WB elemzését mutatja. Amint ezen eredmény is mutatja, a GST-XIAP szolubilizálása és újratekerése sikeres volt, mivel mind az újrahajtogatott fehérje, mind a kereskedelmi forgalomban lévő fehérje hasonló profilt mutat. A 2. kísérletből származó, affinitás kromatográfiás tisztítás során keletkező átfolyó esetében (17. ábra, 2. minta) a blottolás után nincs detektálható GST-XIAP fehérje.

4.3. Autoindukció alkalmazása az AURKA zárványtestekké történő aggregációja ellen

4.3.1. Mikrotitráló lemezes fermentáció monitorizálása

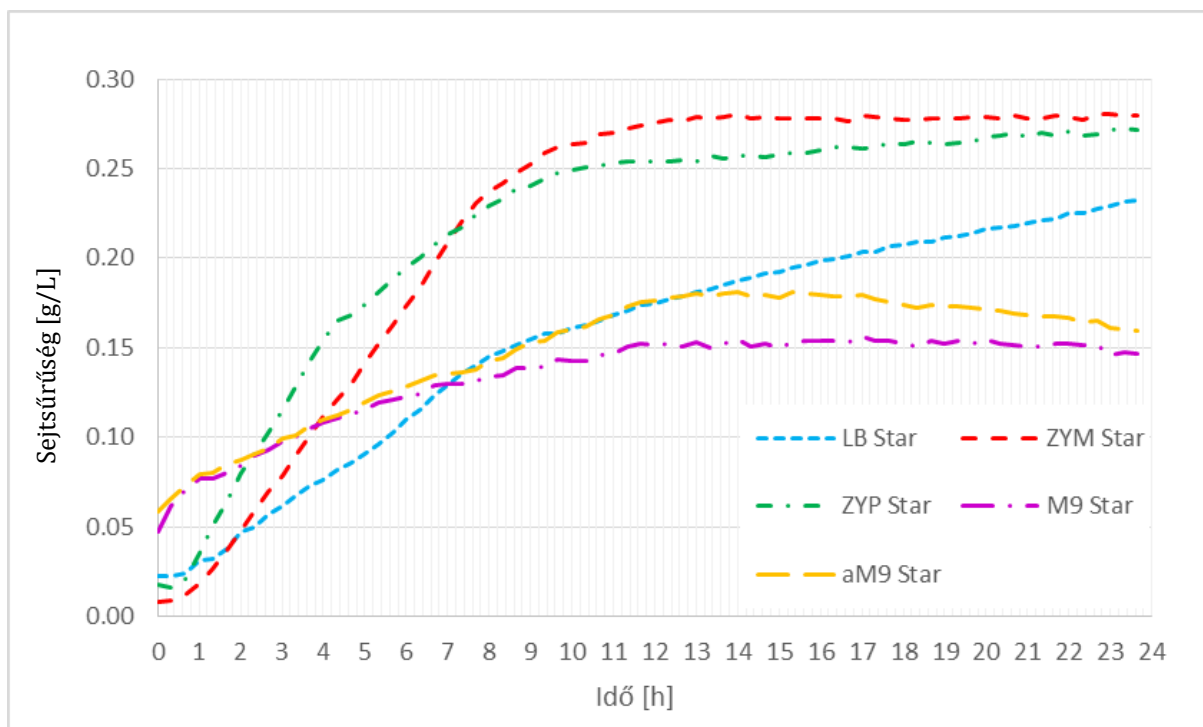
A fermentációk során a fluoriméter (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Ortenberg, Németország) 6 percenként mérte az optikai denzitást 600 nm hullámhosszon, amely eredményeket felhasználva határoztuk meg a biomassa időbeli változását, a populációdinamikai fázisokat.

A 18. ábra *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi kultúrák sejttömeg növekedését tartalmazza az idő függvényében. Megfigyelhető, hogy a legkisebb sejt tömeget az LB eredményezi, a vizsgált autoindukciós tápoldatok minden esetben nagyobb sejt tömeget eredményeztek. Amíg az aM9 tápoldat esetében egy lassú exponenciális fázisnövekedést láthatunk, a ZYM, ZYP tápoldatokban egy meredekebb exponenciális fázis figyelhető meg. Ezen eredmény azzal magyarázható, hogy a ZYM, ZYP tápoldatok összetétele tápanyagdúsabb, mint a szintetikus aM9 leves. A tápanyagdús környezet lehetővé teszi a sejtek rövidebb időn belüli adaptációját, míg a szintetikus leves esetében ezen feltétel nem biztosított.



18. ábra: *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi fermentáció az alkalmazott tápoldatokban

A 19. ábra az *E. coli* BL21 (DE3) Star baktériumkultúra növekedését tartalmazza: a tápanyagban gazdag ZYM és ZYP tápoldatokban szintén jelentősen meredekebb exponenciális fázist produkálnak, mint a szintetikus tápoldat esetében. A sejttömeg mennyisége a fermentáció végén a tápanyagdús ZYM, ZYP tápoldatokban közel duplája (1,92), mint a szintetikus aM9 tápoldat alkalmazása esetében.

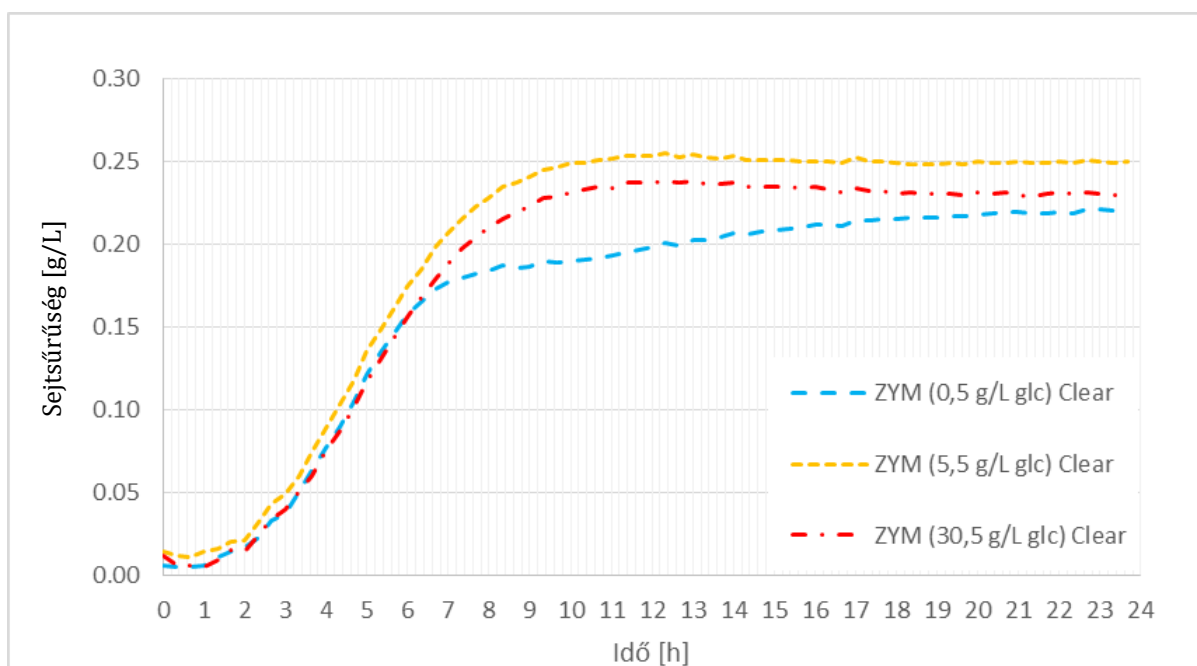


19. ábra: *E. coli* BL21 (DE3) Star fermentáció az alkalmazott tápoldatokban

4.3.2. Alkalmazott tápoldatok összehasonlítása

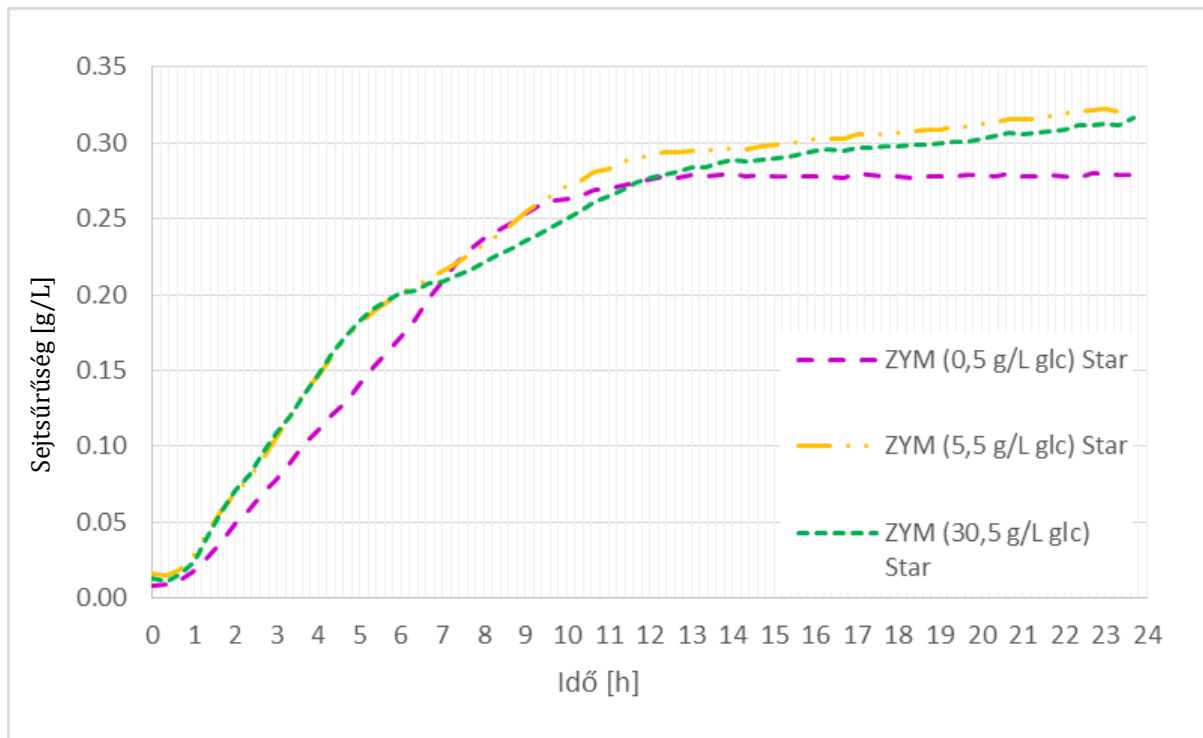
A három autoindukciós tápoldatban a glükóz koncentráció hatását vizsgáltuk az *E. coli* BL21 (DE3) Star és ClearColi sejtvonalak esetében mindkét rekombináns fehérje mennyiségére nézve.

A katabolit represszió lévén a glükóz/laktóz arány változtatásával szabályozható az autoindukciós fermentáció során az indukció kezdete. Jelen tézis kutatási tárgyát képezte, hogy a hozzáadott glükóz (jelenléte gátolja az indukciót) milyen hatással van a termelt rekombináns fehérje mennyiségére. A 20. ábra mutatja be a glükóz koncentráció hatását a sejtnövekedésre ZYM tápoldatban, *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonala esetében. A glükóz/laktóz arány, a glükóz koncentráció növelése ZYM tápoldatban, *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonala alkalmazása esetében a kultúra populációdinamikai fázisaira nézve, az exponenciális fázis során nem tér el.



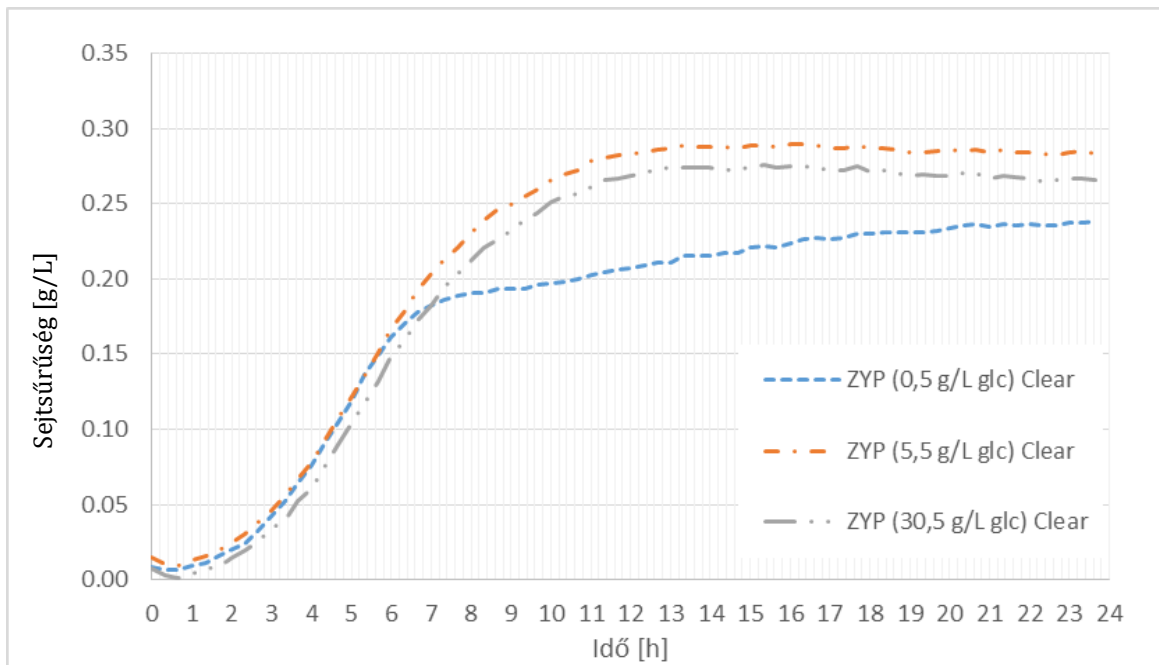
20. ábra: A glc koncentráció hatása a sejtsűrűségre ZYM tápoldatban, *E. coli* BL21 (DE3) Clear sejtvonala esetében

A 21. ábra mutatja be a glükóz koncentráció hatását a sejtnövekedésre ZYM tápoldatban, *E. coli* BL21 (DE3) Star sejtvonala esetében. Az *E. coli* BL21 (DE3) Star sejtek esetében az *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtekkel megegyezően a magasabb glükóz koncentráció alkalmazása nem mutat elérést az exponenciális fázisára nézve.



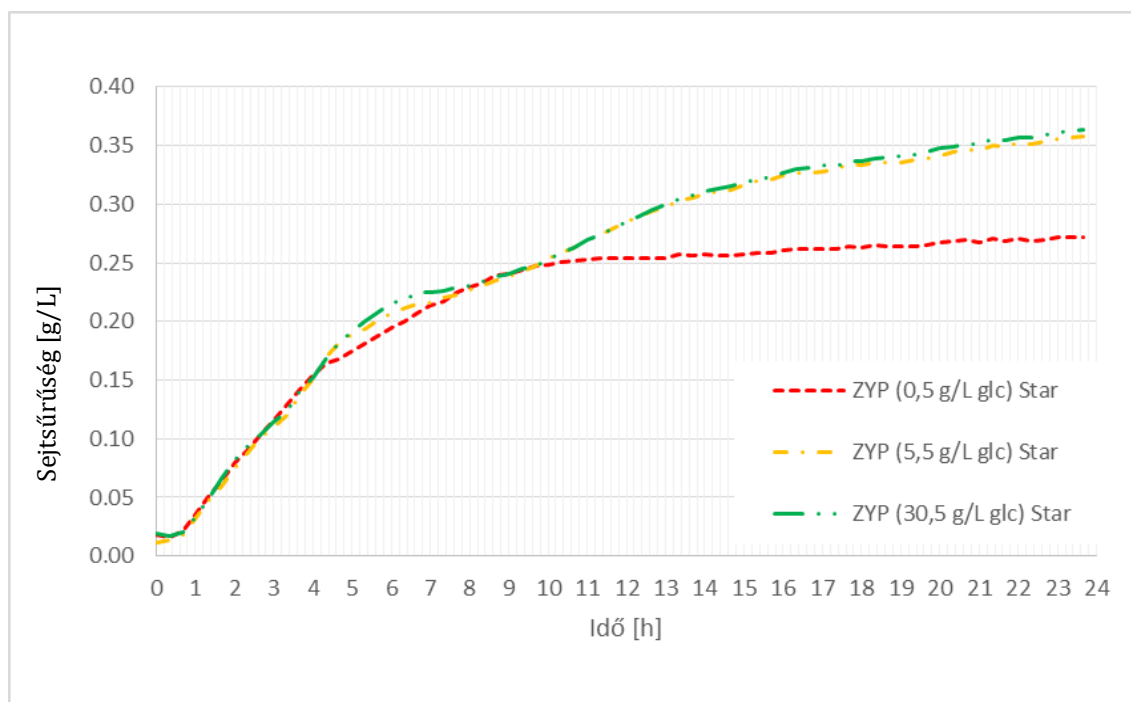
21. ábra: A glc koncentráció hatása a sejtsűrűsége ZYM tápoldatban, *E. coli* BL21 (DE3) Star sejtvonala esetében

A 22. ábrán látható a glükóz koncentráció hatása a sejtnövekedésre ZYP tápoldatban, *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonala esetében. Az eredmények alapján elmondható, hogy az *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonala esetében az alap tápoldathoz képest mindkét nagyobb koncentrációjú glükózt tartalmazó tápoldat esetén szignifikáns különbség figyelhető meg a stacioner fázisban lévő sejtszám esetében.



22. ábra: A *glc* koncentráció hatása a sejtsűrűsége ZYP tápoldatban, *E. coli* BL21 (DE3) Clear sejtvonala esetében

A 23. ábrán látható növekedési görbék esetében megfigyelhető, hogy az *E. coli* BL21 (DE3) Star sejtvonala esetében a ZYP tápoldatban a glükóz koncentráció növelésével nagyobb sejttömeget értünk el, mint az *E. coli* BL21 (DE3) Clear sejtvonala esetében.

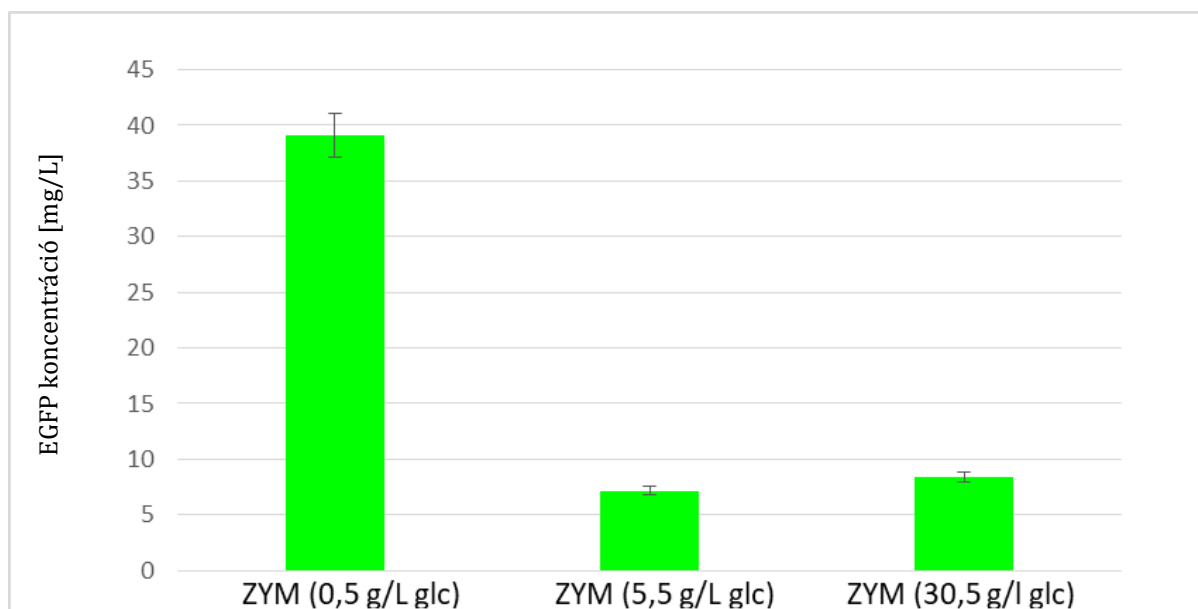


23. ábra: A *glc* koncentráció hatása a sejtsűrűsége ZYP tápoldatokban, *E. coli* BL21 (DE3) Star sejtvonala esetében

4.3.3. Rekombináns fehérje mennyiségi meghatározása

A fluorimetriás mérések során kapott eredményekből, a meghatározott EGFP koncentrációk értékelése révén határoztuk meg a rekombináns fehérje optimális termelési körülményeit. A két legnagyobb rekombináns fehérje koncentráció értéket a ZYM tápoldat, illetve az 52 g/L glükóz koncentrációjú autoindukciós M9 tápoldat eredményezte.

A glükóz koncentrációjának növelésével az autoindukciós fermentáció során időzíthető/programozható az indukció kezdete. A 24. ábrán látható *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonalat alkalmazva a glükóz koncentráció és a termelődött EGFP mennyiségének összefüggése, ZYM tápoldat esetében. Azon minták esetében, amely kezdetben nem tartalmaz nagy mennyiségű glükózt (0,5 g/L glükóz, 2 g/L laktóz, glükóz/laktóz= 0,25) végeredményben nagyobb mennyiségű rekombináns fehérje termelődött.

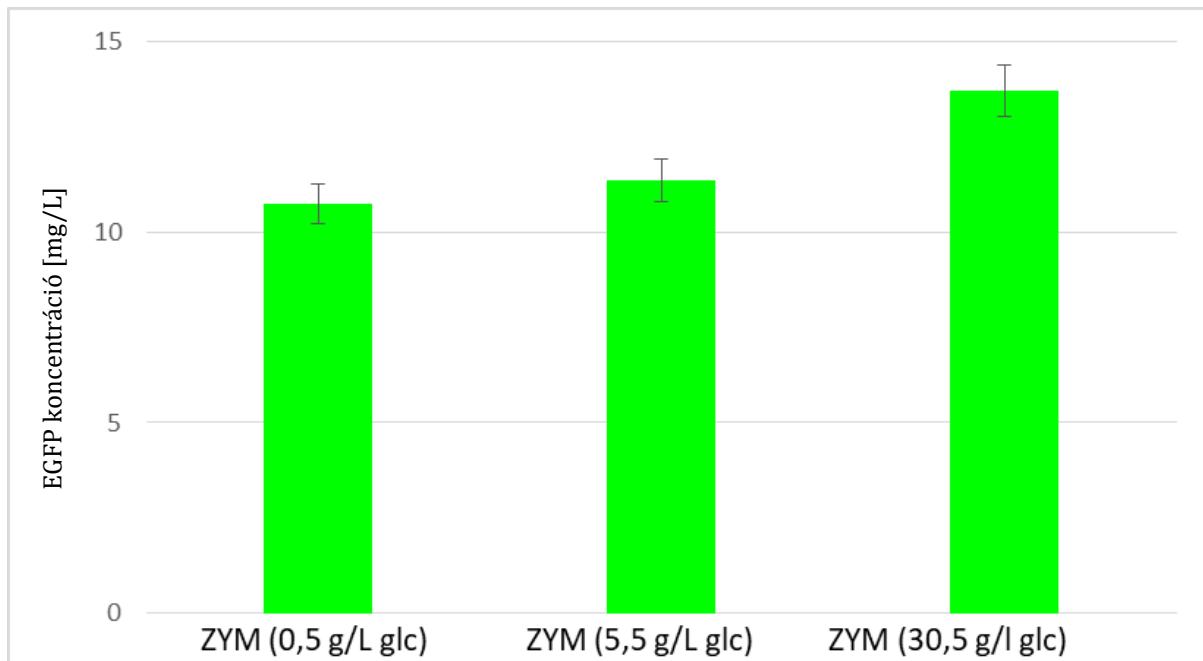


24. ábra: A glükóz koncentráció és a termelődött EGFP mennyiségének összefüggése *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonala és ZYM tápoldat esetében

Ezen eredmény értelmében a glükóz/laktóz arány megválasztása egy autoindukciós fermentációs kísérlet során kulcsfontosságú. Amennyiben a termeltetni kívánt rekombináns fehérje toxikus a gazdasejtre nézve a nagy glükóz/laktóz arány használata indokolt, így biztosított az indukció kezdetének időbeli eltolása, amely által

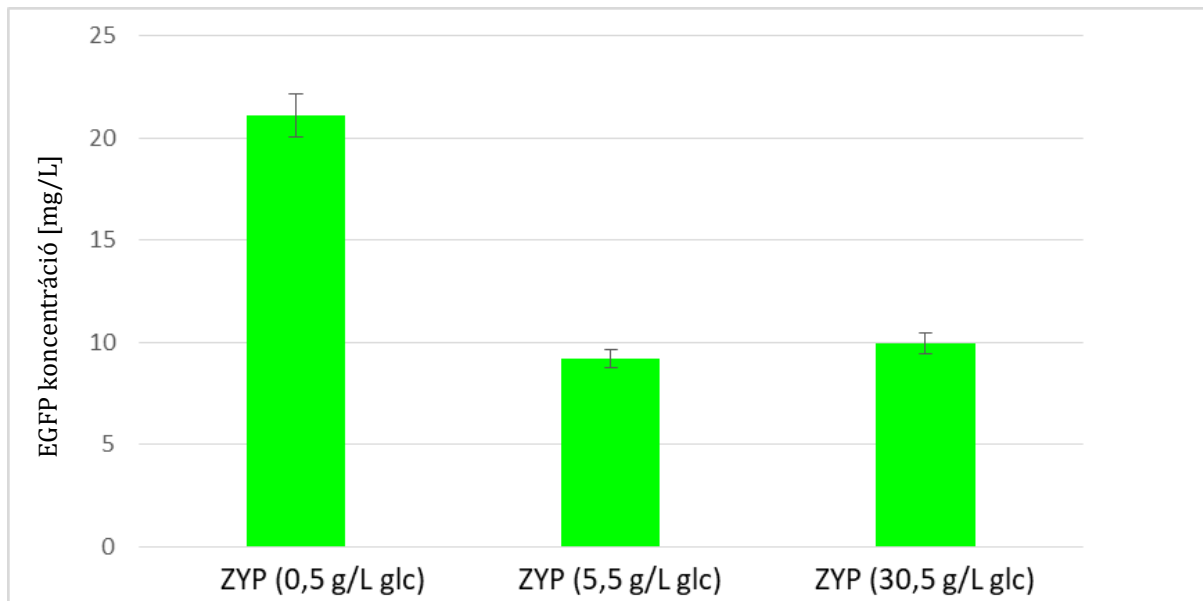
biztosítható, hogy nagyobb sejttömeg mellett valósuljon meg a rekombináns fehérje előállítása.

A 25. ábrán látható *E. coli* BL21 (DE3) Star sejtvonalat alkalmazva a glükóz koncentráció és a termelődött EGFP mennyiségének összefüggése, ZYM tápoldat esetében. A glükóz koncentráció változtatása nem eredményez szignifikáns különbséget a fehérjetermelés során.



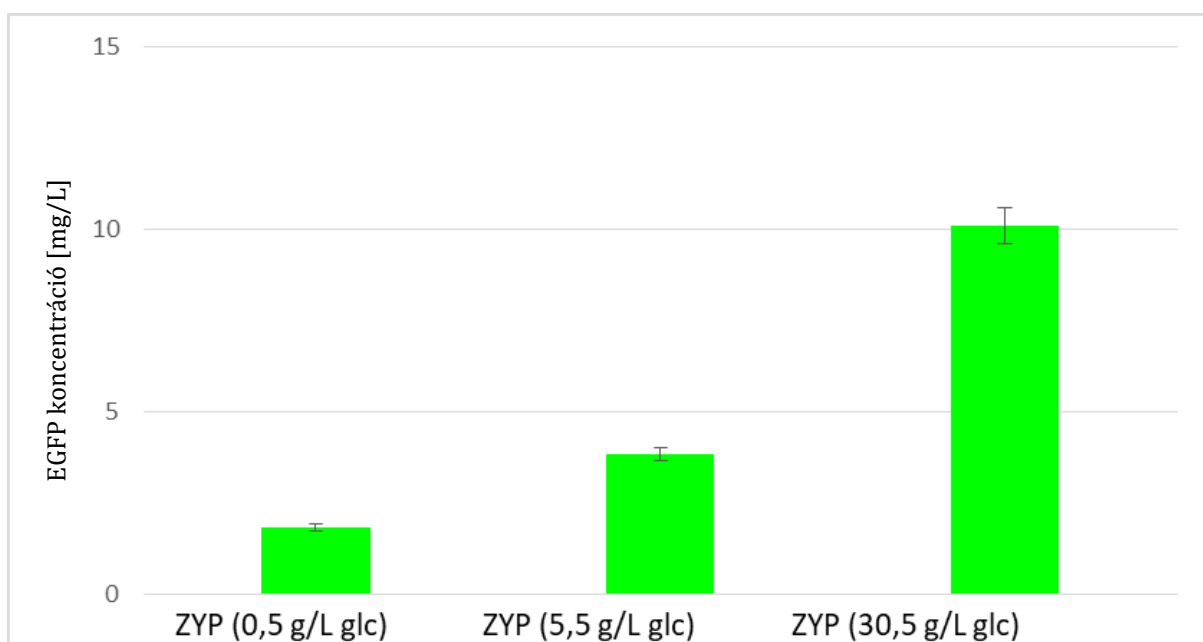
25. ábra: A glükóz koncentráció és a termelődött EGFP mennyiségének összefüggése *E. coli* BL21 (DE3) Star sejtvonala és ZYM tápoldat esetében

A 26. ábrán látható, hogy a ZYP tápoldatban az *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi esetében a glükóz koncentrációjának növelése a rekombináns fehérje mennyiségének csökkenését eredményezte.



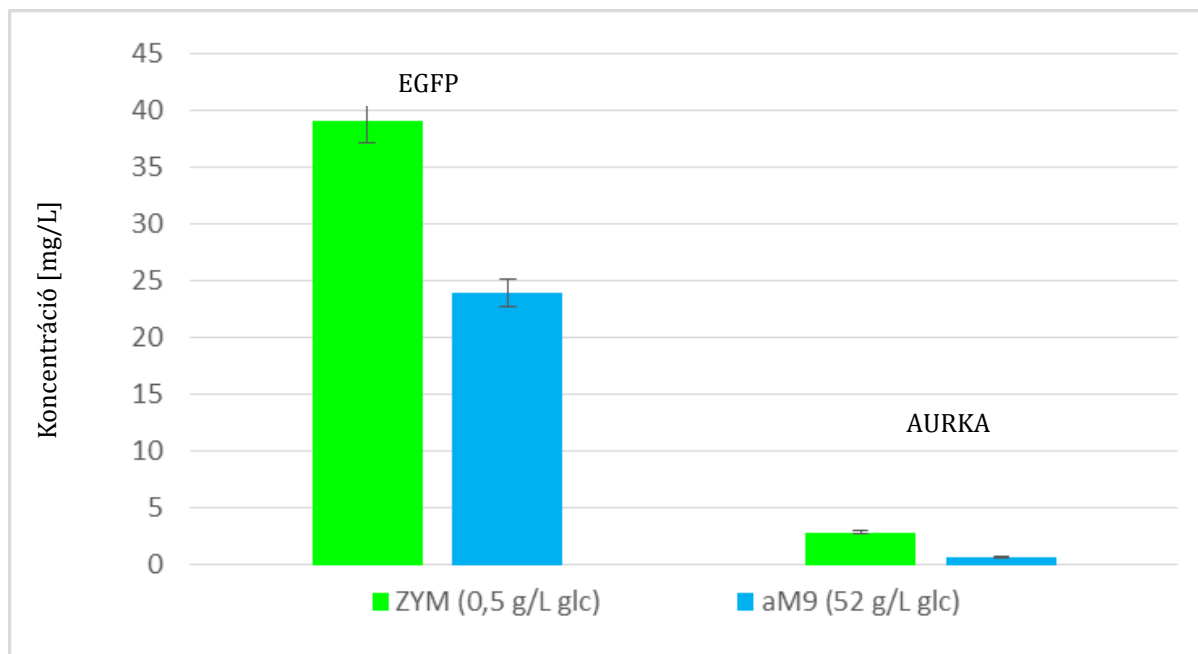
26. ábra: A glükóz koncentráció és a termelődött EGFP mennyiségének összefüggése *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonalt és ZYP tápoldat esetében

A 27. ábra tartalmazza az *E. coli* BL21 (DE3) Star sejtvonalt alkalmazva a glükóz koncentráció és a termelődött EGFP mennyiségének összefüggését, ZYP tápoldat esetében. A legnagyobb glükóz koncentráció esetében figyelhető meg a legnagyobb rekombináns fehérje koncentráció.



27. ábra: A glükóz koncentráció és a termelődött EGFP mennyiségének összefüggése *E. coli* BL21 (DE3) Star sejtvonalt és ZYP tápoldat esetében

A 28. ábrán látható a meghatározott optimális körülményeken termelődött rekombináns fehérjék összehasonlítása: az aM9 tápoldat alkalmazása esetében kevesebb EGFP termelődött (23,95 mg/L) mint a ZYM tápoldatban (39,07 mg/L). A normál körülményeken zárványtestben termelődő AURKA esetében megfigyelhető a fehérje oldott formában történő előállítás.



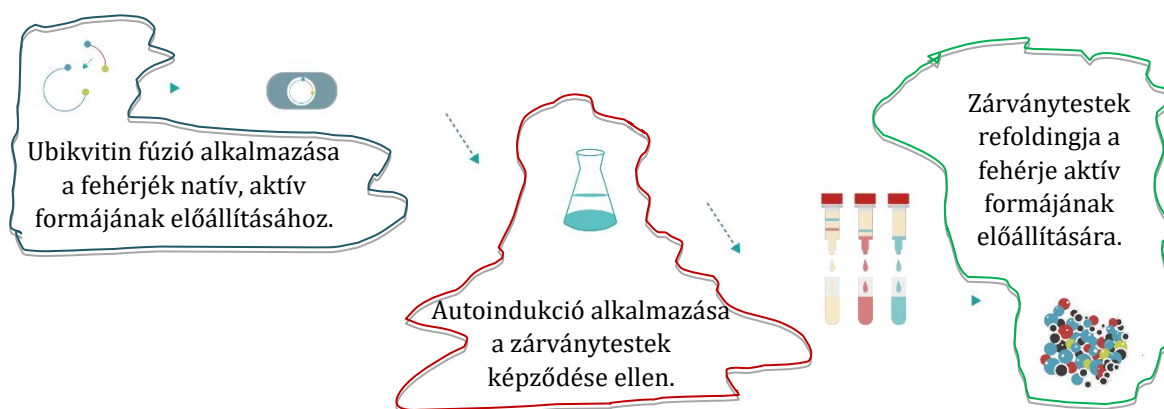
28. ábra: Optimális körülmények összehasonlítása az EGFP és AURKA esetében *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonallal alkalmazásával ZYM és aM9 tápoldatokban

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy jelen fermentációs körülmények között végzett programozott rekombináns fehérje expresszió megvalósítható a normál expressziós körülmények között problémásan termelődő (zárványtestben) fehérjék esetében (AURKA).

5. Diszkusszió

Jelen PhD értekezés az *E. coli* expressziós rendszerben történő rekombináns fehérjetermelés fejlesztésére irányuló stratégiákat tárgyalja három példát mutatva be a fehérjetermelés hatékonyságnövelésének aktuális lehetőségeiből (29. ábra):

- 1. ubikvitin fúzió sikeres alkalmazása a natív SMAC és a gazdatörzsre nézve toxikus BUFII fehérjék bioszintézisére; fúziós stratégia
- 2. zárványtestben termelődő GST-XIAP (aggregátumok) denaturálása, majd refoldingja a fehérje aktív formájának előállítására; poszttranszlációs renaturálás stratégia
- 3. autoindukció alkalmazása az AURKA oldhatatlan zárványtestekké történő aggregációja ellen. fermentációs körülmények beállításán alapuló stratégia



29. ábra: Az értekezésben tárgyalt *E. coli* expressziós rendszerben történő rekombináns fehérjetermelés fejlesztésére irányuló stratégiák

A molekuláris klónozás első lépését a primerek (oligonukleotidok) tervezése jelentette, amelyeket felhasználva polimeráz láncreakcióval (PCR) a templát DNS-ről amplifikáltuk a célgént (SMAC) a megfelelő restriktív hasító helyek létrehozásával egyidejűleg. A BUFORIN II kis méretének (21 aminosav, 63 bp) következtében a klónozáshoz szükséges inszert (gén) két egyszálú oligonukleotid. A pUbiq-BUFII konstrukcióhoz alkalmazott inszert előállítását a két egyszálú oligonukleotid (BUFORIN II peptidet kódoló DNS szekvencia) hibridizációjával valósult meg. A PCR/hibridizációs terméket tisztítottuk a pufferoldat eltávolítása érdekében, majd a megfelelő restriktív enzimekkel kettős emésztéseket végeztünk a megfelelő tapadós vég kialakítása

érdekében. A pUbiq vektor emésztését követően a megfelelő (nagy) fragmentet agaróz gélből izoláltuk.

A konstrukció összeillesztésére ligáz enzimet használtunk. A ligálás terméket kompetens *E. coli* TOP10 sejtekbe transzformáltuk, majd kanamicin tartalmú LB lemezre szélesztettük ki, hogy ellenőrizzük, mely telepek tartalmazzák a plazmidot. Az LB agaron kinőtt telepekből plazmidot izoláltunk. Az ellenőrző emésztéseket követően abból a plazmidból, mely megfelelő inszert beépülést mutatott DNS szekvenálásra alkalmas mintát készítettünk. A plazmid által kódolt rekombináns konstrukció kifejezésének érdekében *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta plysS baktréiumtörzset alkalmaztunk. A fehérje tisztítását FPLC rendszeren, affinitás kromatográfiával végeztünk, melyet követett a SMAC/BUFII enzimátikus eltávolítása a fúziós fehérjétől. A natív SMAC/BUFII extrakcióját az emésztési reakcióelegyből affinitás kromatográfiával valósítottuk meg.

Egy hatékony expressziós rendszer kivitelezéséhez számos molekuláris biológiai eszköz és technika alkalmazása szükséges (Demain és Vaishnav 2009; de Lorenzo 2009). Jelen tanulmányban, a PhD értekezés fő tézis pontja a humán rekombináns SMAC fehérjén keresztül vizsgálni a pUbiq expressziós rendszer hatékony alkalmazhatóságát szabad N terminális véggel rendelkező rekombináns fehérje oldott formában, magas fehérje hozamú expresszióját prokarióta (*E. coli*) rendszerben. Az expressziós gazdaszervezetként alkalmazott *E. coli* és a pUbiq expressziós konstrukciót kombinációja az expresszió körülményeinek optimalizálása ellenére adekvát fehérje termelést sikerült megvalósítani. A natív SMAC izolálása, a fúziós partnertől való eltávolítás érdekében YUH1 proteolitikus emésztést alkalmaztunk. A natív, fúziós partner mentes rekombináns SMAC fehérje funkcióképességét GST pull-down technikával igazoltuk, csaliként GST-XIAP-t alkalmazva, amely egy ismert interakciós partner (Song és mtsai. 2003).

A tanulmányban leírt fehérje expressziós rendszer és tisztítási stratégia alkalmazható aktív rekombináns fehérjék előállítására, idő- és költséghatékonyan. A tanulmányban vizsgált expressziós rendszer további alkalmazhatóságát valósítottuk meg a CCMV (Szövérfi és mtsai., 2021) rekombináns fehérje előállítása esetében is.

A tanulmány kulcsfontosságú eredménye, hogy először szintetizáltuk az ubikvitinnel fuzionált rekombináns SMAC fehérjét bakteriális expressziós rendszerben, jelen módszer alkalmazásával natív SMAC fehérje előállítása valósult meg. A teljes

fehérje struktúra helyett csak azon régió került klónozásra és expresszállásra, amely a SMAC fehérje esetében az AVPIA N terminális szegmenssel történő kölcsönhatásában szerepet játszik.

Kutatásunk során a BUFORIN II antimikrobiális peptid magas hozamú expresszióját valósítottuk meg bioreaktorban, gazdaszervezetként *Escherichia coli* BL21 DE3 Rosetta sejtvonalat alkalmazva, ubiquitin fúziós partnerrel ellátva. A fúziós komplexet egy deka-hisztidin címke egészíti ki, mely lehetővé teszi az antimikrobiális peptid affinitás kromatográfiával történő tisztítását. Szerkezeti, illetve hatástani tulajdonságaiból adódóan az antimikrobiális peptidek alkalmazása ígéretes terápiás alternatíva a hagyományos antibakteriális hatóanyagok mellett. A klinikai vizsgálatok során olyan betegségek kezelésében alkalmaznak antimikrobiális peptideket, mint pl. a Gram-pozitív baktériumok (*Clostridium difficile*, methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*) okozta fertőzések, diabéteszes lábfekély, rosacea, idült bakteriális középfülgyulladás vagy körömgombásodás (Fox 2013). A BUFORIN II egy átfogóan tanulmányozott antimikrobiális peptid, melyet először a *Bufo gargarizans* békafajból izolált buforin I peptid szerkezet módosításával állítottak elő (Park és mtsai. 1996). A mindössze 21 aminosavból álló peptid jelentős antibakteriális hatást mutatott Gram-pozitív (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas putida*) és Gram-negatív (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia sp.*) baktériumokkal, valamint gombákkal (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*) szemben. Más antimikrobiális peptidtól eltérően, a BUFORIN II nem a membránszerkezet módosításával, hanem közvetlenül a bakteriális DNS-hez, ill. RNS-hez való kötődés által (Park és mtsai. 1998; Uytterhoeven és mtsai. 2008) fejt ki antibakteriális hatását. Ezen tulajdonságából adódóan a BUFORIN II és a szerkezetmódosítással előállított analógjai tumorelles hatással is rendelkeznek (Lee és mtsai. 2008; Marqus és mtsai. 2017).

A pUbiq expressziós rendszer széles körben alkalmazható szervezetidegen fehérjék előállítására ubiquitin fúziós partnerrel bakteriális expressziós rendszerekben. A fuzionálandó célfehérje klónozására szolgáló univerzális primerek egyszerűsített formáját a 13. táblázatban foglaltam össze. Forward és reverse primerek esetén a konstans rész és a változó, célfehérje-függő DNS szakasz megjelölésre került: a konstans szekvencia előtt egy „&” jel található, amelyet a célfehérje megfelelő végszekvenciája

követ. A T7 expressziós rendszer biztosítja a fúziós rekombináns fehérje szabályozott termelését (Wang és mtsai., 2003; Li, Hao és Xu, 2017).

13. táblázat: Tervezett oligonukleotidok (a célfehérje (PoI) klónozása)

Primer	Nukleotid szekvencia	RE
Fw-PoI-UBI –SacII	5'-CTCCGCGGTGGA&[15-25 bázis a PoI 5' végen]-3'	SacII
Rev-PoI-UBI- BamHI	5'- GGATCCTGGTAATTA&[15-25 bázis a PoI 3' végen]-3'	BamHI

A zárványtest-aggregátumok enyhe szolubilizálása a kulcs a bioaktív fehérjék visszanyerésének javításához, munkánk során az N-Lauroil-szarkozin koncentráció hatását vizsgáltuk a célfehérje szolubilizációs hozamára. A fehérjék kaotróp ágensek nélküli szolubilizálásán alapuló refolding protokollt optimalizáltuk és alkalmaztuk a GST-XIAP konstrukcióhoz. Az N-Lauroil-szarkozin eltávolítása szükséges a hatékony affinitási tisztításhoz és a célfehérje refoldingjához. Az irodalomban számos tanulmány létezik az N-lauroil-szarkozin hígítással és dialízissel történő eltávolítására vonatkozóan (Yamaguchi és Miyazaki 2014). Az N-Lauroil-szarkozin CMC értéke >0,5% (14 mM), alacsonyabb koncentrációknál (0,1-1%) dialízissel eltávolítható. Az alacsony CMC azt jelzi, hogy a detergens monomerek és a detergens micellák közötti egyensúly szinte teljesen a micella oldalon van, és a micellák nagy méretűek, miközben csak a detergens monomerek diffundálhatnak könnyen a környező pufferbe. Az 5 mM feletti CMC-t tartalmazó detergensok eltávolítása nem lehetséges dialízissel. Ezenkívül az N-lauroil-szarkozin nem ionos detergens, például OTG hozzáadásával is elkülöníthető az N-Lauroil-szarkozinhoz képest legalább ötszörös tömegű feleslegben (Kumar 2018).

Az értekezésben továbbá azon autoindukciós fermentációs körülmények vizsgálatát végeztem, amely során aktív formában állítható elő rekombináns fehérje idő- és költséghatékonyan; lehetővé téve nehezen előállítható (zárványtestben képződő) fehérjék, lassú, szabályozott bioszintézisét (kvalitatív optimalizálás).

Az *E. coli* BL21 (DE3) ClearColi sejtvonalból származó kultúrák növekedési görbéje során megfigyelhető az aM9 tápoldat esetében egy lassú exponenciális fázisú növekedés, amíg a ZYM, ZYP tápoldatokban egy meredekebb exponenciális fázis. Ezen eredmények magyarázatául szolgál, hogy a ZYM, ZYP tápoldatok gazdagabb összetételű tápanyaggal rendelkeznek, mint a szintetikus aM9 tápoldat. A tápanyagdús környezet lehetővé teszi a sejtek rövidebb időn belüli adaptációját, amíg a szintetikus leves

esetében ez hosszabb időt vesz igénybe. Az *E. coli* BL21 (DE3) Star sejtvonala esetében a tápanyagdús ZYM és ZYP tápoldatokban jelentősen nagyobb az elért sejttömeg mennyisége.

A katabolit represszió révén a glükóz/laktóz arány változtatásával szabályozható az autoindukciós fermentáció során az indukció kezdete. A populációdinamikai fázisvizsgálat alapján az autoindukciós M9 tápoldatban a glükóz koncentráció növelése nem befolyásolta a sejtnövekedést egyik sejtvonala esetében sem. A ZYM és ZYP tápoldatokban a glükóz koncentráció növelése pozitívan befolyásolta a sejtsűrűséget. A glükóz/laktóz arány megválasztása egy autoindukciós fermentációs kísérlet során kulcsfontosságú tényező. Amennyiben a termeltetni kívánt rekombináns fehérje toxikus a gazdasejtre nézve a nagy glükóz/laktóz arány használata indokolt, így biztosított az indukció kezdetének időbeli eltolása, amely által biztosítható, hogy nagyobb sejtsűrűség mellett valósuljon meg a rekombináns fehérje előállításának indukciója.

6. Tézispontok

- 6.1. Elsőként állítottam elő a pUbiq rendszer alkalmazásával, ubikvitin fúziót alkalmazva natív SMAC fehérjét bakteriális expressziós rendszerben. Az ubikvitin fúziós partner alkalmazásával biztosítottam a célfehérje specifikus hasítását, az affinitás címke-mentes natív SMAC bioszintézisét. A SMAC fehérje nem rendelkezik enzimatis aktivitással. A citoplazmában szintetizálódik, 239 aminosavat tartalmaz. Az 1-55. aminosav u.n. mitokondriális lokalizációs szignál, ami a fehérjét a mitokondriumba irányítja. Itt proteolitikus hatásra leválik a lokalizációs szignál, és szabaddá válik az Ala-Val-Pro-Ile Ala (AVPIA) amino terminális szekvencia, mely N terminálissal rendelkező fehérje biológiai funkció alapján képezi a natív SMAC-ot (Shi 2001). Amennyiben a mitokondrium károsodás (ill. egyéb hatások) következtében a mitokondrium külső membránjának permeabilitása megnövekszik, a módosult SMAC fehérje (más fehérjékkel együtt) újra a citoplazmába kerül. Itt stabil komplexet képez az XIAP fehérjével. A komplex képzésnek két feltétele van, a szabad AVPIA szekvencia és SMAC fehérje dimerizációja (Gonçalves és mtsai. 2008). A XIAP fehérje egy kaszpáz inhibitor, amely a sejt nyugalmi állapotában a véletlenül aktiválódó kaszpázokat gátolja.
- 6.2. A pUbiq fúziós rendszer felhasználásával, ubikvitin fúziót alkalmazva a gazdatörzsre nézve toxikus BUFORIN II antimikrobiális peptidet állítottam elő bakteriális expressziós rendszerben. A BUFORIN II egy átfogóan tanulmányozott antimikrobiális peptid. Mindössze 21 aminosavból áll, antibakteriális hatását kifejti Gram-pozitív (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas putida*) és Gram-negatív (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia sp.*) baktériumokra egyaránt, valamint gombákkal (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*) szemben is. A BUFORIN II nem a membránszerkezet módosításával, hanem közvetlenül a bakteriális DNS-hez, ill. RNS-hez való kötődés által fejt ki antibakteriális hatását, mely tulajdonságából

adódóan a BUFORIN II és a szerkezetmódosítással előállított analógjai tumorelles hatással is rendelkeznek.

- 6.3. A zárványtest-aggregátumok enyhe szolubilizálása fontos kulcsát képezi a bioaktív fehérjék előállításához. Munkánk során vizsgáltuk az N-Lauroil-szarkozin koncentráció hatását a célfehérje szolubilizációs hozamára. A fehérjék kaotróp ágensek nélküli szolubilizálásán alapuló refolding protokollt optimalizáltuk a GST-XIAP fehérjére.
- 6.4. Az AURKA (normál körülmények között – IPTG indukció) zárványtestben képződő humán rekombináns fehérje expresszióját valósítottam meg bakteriális expressziós rendszerben autoindukciós (laktóz alapú) fermentáció alkalmazása révén.

7. Publikációs jegyzék

A PhD fokozatszerzési eljárás tárgykörében készült publikációk:

P. Salamon, C. K. Orbán, K. Molnár-Nagy, Z. Kovács, K. Váncsa, E. Bálint, I. Miklóssy, B. Albert, G. Tar, S. Lányi, “Study of native SMAC protein production in the pubiq expression system: molecular cloning, biosynthesis and molecular modelling”, *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 56, pp. 39-46, 2022., **IF.: 2,80**

K. Nagy, Z. Kovács, I. Miklóssy, **P. Salamon**, C.-K. Orbán, B. Albert, and S. Lányi, “Detergent aided refolding and purification of recombinant XIAP from inclusion bodies,” *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia*, vol. 66, no. 4, pp. 355–368, 2021., **IF.: 0,447**

P. Salamon, I. Miklóssy, B. Albert, S. Lányi, and C. Orbán, “Comparative study on conventional and auto-induction fermentation” *Upb Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, vol. Vol. 83, Iss. 2, p. 77, 2021.

F. A. Boda, Z. I. Szabo, E. Szócs, **P. Salamon**, C. Orbán, and E. Székely, “Heterologous expression and purification of the antimicrobial peptide BUFORIN II,” *Bulletin of Medical Sciences*, vol. 92, 2020.

K. Nagy, Z. Kovacs, **P. Salamon**, C.-K. Orban, S. Lanyi, and B. Albert, “Enhanced heterologous expression in *E. coli*,” *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia*, vol. 64, no. 2, pp. 101–110, 2019., **IF.: 0,494**

P. Salamon, I. Miklóssy, B. Albert, M. Korodi, K. Nagy, I. Bakos, S. Lányi, and C. Orbán, “Heterologous expression and purification of recombinant proapoptotic human protein SMAC/Diablo with EGFP as fusion partner,” *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia*, vol. 62, no. 2, pp. 333–345, 2017., **IF.: 0,305**

A PhD fokozatszerzési eljárás tárgykörén kívül készült publikációk:

Z. Bardocz-Veres, M. Székely, **P. Salamon**, E. Bala, E. Bereczki, and B. Kerekes-Máthé, “Quantitative and qualitative assessment of fluorescence in aesthetic direct restorations,” *MATERIALS*, vol. 15, no. 13, p. 4619, 2022., **IF.: 3,748**

S. János, K. O. Csongor, A. Beáta, N. Katalin, **P. Salamon**, and L. Szabolcs, "In vitro study of the CCMV capsid protein: cloning, expression, and purification," *Upb Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, vol. Vol. 83, Iss. 1, p. 135, 2021.

Z. Gáll, K. Kelemen, I. Mihály, **P. Salamon**, I. Miklóssy, B. Zsigmond, and M. Kolcsár, "Role of lacosamide in preventing pentylenetetrazole kindling-induced alterations in the expression of the gamma-2 subunit of the GABAA receptor in rats," *Current Molecular Pharmacology*, vol. 13, p. 1, 2020., **IF.: 3,339**

S. Szentes, N. Zsibrita, M. Koncz, E. Zsigmond, **P. Salamon**, Z. Pletl, and A. Kiss, "I-Block: a simple Escherichia coli-based assay for studying sequence-specific DNA binding of proteins," *Nucleic Acids Research*, vol. 48, no. 5, 2020., **IF.: 16,971**

B. Francisc-Andrei, **P. Salamon**, O. Csongor, B. Lavinia, C. Augustin, G. Serban-Andrei, and D. Maria, "Heterologous expression and purification of recombinant crotoxin b, the phospholipase a2 subunit of crotoxin," *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia*, Vol. 63, no. 1, pp. 7–20, 2018., **IF.: 0,275**

A PhD fokozatszerzési eljárás tárgykörében tartott előadások:

P. Salamon, I. Miklóssy, S. Lányi, Cs. K. Orban, and B. Albert, "Fehérje-fehérje interakció vizsgálata a sejthalál szabályozásában," in *25th International Conference on Chemistry = XXV. Nemzetközi Vegyészkonferencia*, 2019, p. 105.

Á. Dósa, **P. Salamon**, C. Orbán, F. Boda, Z. Szabó, and E. Székely, "Antimicrobial Peptide Biosynthesis for The Development of a Nanofiber-Based Wound Dressings," in *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája "FIBOK 2018": Abstract Book*, 2018, p. 46.

P. Salamon, "Modern Biotechnológia Székelyföldön: Monoklonális Antitestek Bioszintézise," in *Határhelyzetek XI.*, 2018, p. 423.

N. Katalin, O. Csongor-Kálmán, A. Beáta, M. Ildikó, **P. Salamon**, and L. Szabolcs, "Proteomimetic SMAC Peptides: Cloning, Heterologous Expression with Fusion Partner, Purification and Interaction with Inhibitor of Apoptosis Proteins," in *20th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, 2017, p. 16.

S. Réka, B. F. Márta, **P. Salamon**, A. Emőke, B. Zsolt, M. Ildikó, and L. Szabolcs, "Heterologous expression, purification, and primary characterization of an alcohol/aldehyde dehydrogenase suitable for 1,4 butanediol production," in *20th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, 2017.

A PhD fokozatszerzési eljárás tárgykörén kívül tartott előadások:

E. Antal, **P. Salamon**, and I. Miklóssy, "In silico examination of a malonyl-coa-reductase enzyme for metabolic engineering purposes," in *ABSTRACTS BOOK, 19th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, 2019*, 2019, p. 84.

M. Balázs, E. Antal, **P. Salamon**, I. Miklóssy, and Z. Bodor, "Analysis of Basfia Succiniciproducens Gene Expression Profile by RT-qPCR Method," in *25th International Conference on Chemistry = XXV. Nemzetközi Vegyészkonferencia, 2019*, p. 34.

P. Salamon, F. M. Both, and I. Miklóssy, "Anyagcseremérnökséggel előállított, rekombináns *E. coli* törzsek génexpressziós profilelemzése és optimális tenyésztési körülményeinek meghatározása," in *XXXIV. Országos Tudományos Diákköri Konferencia: Biológia Szekció, 2019*, p. 131.

P. Salamon, F. M. Both, R. Sinkler, E. Sipos, Z. Bodor, B. Albert, S. Lányi, and I. Miklóssy, "1,4-butándiol bioszintézisére alkalmas, anyagcsere mérnökséggel előállított, rekombináns *E. coli* törzsek génexpressziós profilelemzése és optimális tenyésztési körülményeinek vizsgálata," in *XII. Szent-Györgyi Albert Konferencia kiadványa, 2018*, p. 32.

P. Salamon, "Az RT-qPCR alkalmazása iparilag hasznos vegyületek bioszintézisét megvalósító baktériumtörzsek vizsgálatára," in *Határhelyzetek X.*, 2018, p. 379.

A PhD fokozatszerzési eljárás tárgykörében készült poszterek:

Á. Dósa, **P. Salamon**, C. Orbán, F. Boda, Z. Szabó, and E. Székely, "Antimicrobial peptide biosynthesis for the development of a nanofiber-based wound dressings," in *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája "FIBOK 2018": Abstract Book, 2018*, p. 46.

P. Salamon, K. Nagy, Z. Kovács, B. Albert, I. Miklóssy, S. Lányi, and C. K. Orbán, "Nekroptózist moduláló humán fehérjék bioszintézise," in *XXIV. Nemzetközi Vegyészkonferencia, 24th International Conference on Chemistry*, 2018, p. 42.

P. Salamon, F. M. Both, R. Sinkler, B. Albert, E. Sipos, and I. Miklóssy, "RT-qPCR módszer alkalmazása genetikai módosítások és tenyésztési körülmények hatásának vizsgálatára," in *XXIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia*, 2017, p. 119.

A PhD fokozatszerzési eljárás tárgykörén kívül készült posztterek:

M. Cs. Csányi, **P. Salamon**, T. Feller, T. Bozó, J. Hársfalvi, and M. S.Z. Kellermayer, "Force dependent multimer glycoprotein elongation" in *20th International Symposium and Summer School on Bioanalysis*, 2022

M. Cs. Csányi, **P. Salamon**, T. Feller, J. Hársfalvi, and M. S.Z. Kellermayer, "Von Willebrand multimer structure and extensibility analyzed by single-molecule AFM," in *PhD Scientific Days 2020*, 2020

P. Salamon, F. M. Both, R. Sinkler, B. Albert, Z. Bodor, and I. Miklóssy, "RT-qPCR analysis of *E. coli* strains obtained by metabolic engineering" in *18th International Symposium and Summer School on Bioanalysis*, 2018, p. 31372038.

S. Sarolta, Z. Eszter, **P. Salamon**, and K. Antal, "; A simple genetic system to study sequence specific DNA-binding proteins in *E. coli*," in *Hungarian Molecular Life Sciences 2017*, 2017, p. 45.

8. Irodalomjegyzék

- Ahmad, I., Nawaz, N., Darwesh, N. M., Ur Rahman, S., Mustafa, M. Z., Khan, S. B., & Patching, S. G. (2018). Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 144, 12–18.
- Bardóczy, V. (2009). *In vitro* transzlációs vektorok fejlesztése és alkalmazása. 1–110.
- Beckwith, J. R. (1967). Regulation of the lac operon. Recent studies on the regulation of lactose metabolism in *Escherichia coli* support the operon model. *Science*, 156(3775), 597–604.
- Berg, P., Baltimore, D., Brenner, S., Roblin, R. O., 3rd, & Singer, M. F. (1975). Asilomar conference on recombinant DNA molecules. *Science*, 188(4192), 991–994.
- Bischoff, J. R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., Chan, C. S., Novotny, M., Slamon, D. J., & Plowman, G. D. (1998). A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *The EMBO Journal*, 17(11), 3052–3065.
- Bizzarri, R., Nifosì, R., Abbruzzetti, S., Rocchia, W., Guidi, S., Arosio, D., Garau, G., Campanini, B., Grandi, E., Ricci, F., Viappiani, C., & Beltram, F. (2007). Green fluorescent protein ground states: the influence of a second protonation site near the chromophore. *Biochemistry*, 46(18), 5494–5504.
- Boda, F.-A., Zoltán-István, S., Erika, S., Pál, S., Csongor, O., & Edit, S. (2019). Heterologous expression and purification of the antimicrobial peptide buforin II. *Bulletin of Medical Sciences*, 92(2), 119–125.
- Burke, P. J. (2017). Mitochondria, Bioenergetics and Apoptosis in Cancer. *Trends in Cancer Research*, 3(12), 857–870.
- Busby, S., & Ebricht, R. H. (1999). Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *Journal of Molecular Biology*, 293(2), 199–213.
- Cairrão, F., & Domingos, P. M. (2010). Apoptosis: Molecular Mechanisms. In eLS. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001150.pub2>
- Carmena, M., & Earnshaw, W. C. (2003). The cellular geography of aurora kinases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(11), 842–854.

- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802–805.
- Chavez-Pena, C., & Kamen, A. A. (2018). RNA interference technology to improve the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnology Advances*, 36(2), 443–451.
- Cheng, J., Luo, Q., Duan, H., Peng, H., Zhang, Y., Hu, J., & Lu, Y. (2020). Efficient whole-cell catalysis for 5-aminovalerate production from L-lysine by using engineered *Escherichia coli* with ethanol pretreatment. *Scientific Reports*, 10(1), 990.
- Chen, J. (2013). Molecular mechanism of the *Escherichia coli* maltose transporter. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(4), 492–498.
- Chen, S.-S., Chang, P.-C., Cheng, Y.-W., Tang, F.-M., & Lin, Y.-S. (2002). Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function. *The EMBO Journal*, 21(17), 4491–4499.
- Chhetri, G., Kalita, P., & Tripathi, T. (2015). MethodsX An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. *MethodsX*, 2, 385–391.
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S., & Raschke, W. C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/technology*, 11(8), 905–910.
- Crowley, E. L., & Rafferty, S. P. (2019). Review of lactose-driven auto-induction expression of isotope-labelled proteins. *Protein Expression and Purification*, 157, 70–85.
- de Groot, N. S., & Ventura, S. (2006). Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. *FEBS Letters*, 580(27), 6471–6476.
- DeLano, W. L. (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter Protein Crystallogr*, 40, 82–92.
- Deller, M. C., Kong, L., & Rupp, B. (2016). Protein stability: a crystallographer's perspective. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 72(Pt 2), 72–95.
- de Lorenzo, V. (2009). Recombinant bacteria for environmental release: what went wrong and what we have learnt from it. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15 Suppl 1, 63–65.

- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297–306.
- de Marco, A., Deuerling, E., Mogk, A., Tomoyasu, T., & Bukau, B. (2007). Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. *BMC Biotechnology*, 7, 32.
- Derman, A. I., Prinz, W. A., Belin, D., & Beckwith, J. (1993). Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science*, 262(5140), 1744–1747.
- Dubendorf, J. W., & William Studier, F. (1991). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 219, Issue 1, pp. 45–59). [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90856-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90856-2)
- Estornes, Y., & Bertrand, M. J. M. (2015). IAPs, regulators of innate immunity and inflammation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 39, 106–114.
- Eyers, P. A., Erikson, E., Chen, L. G., & Maller, J. L. (2003). A Novel Mechanism for Activation of the Protein Kinase Aurora A. In *Current Biology* (Vol. 13, Issue 8, pp. 691–697). [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00166-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00166-0)
- Feltham, R., Bettjeman, B., Budhidarmo, R., Mace, P. D., Shirley, S., Condon, S. M., Chunduru, S. K., McKinlay, M. A., Vaux, D. L., Silke, J., & Day, C. L. (2011). Smac Mimetics Activate the E3 Ligase Activity of cIAP1 Protein by Promoting RING Domain Dimerization. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 286, Issue 19, pp. 17015–17028). <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.222919>
- Fox, J. L. (2013). Antimicrobial peptides stage a comeback. In *Nature Biotechnology* (Vol. 31, Issue 5, pp. 379–382). <https://doi.org/10.1038/nbt.2572>
- Frenzel, A., Hust, M., & Schirrmann, T. (2013). Expression of recombinant antibodies. *Frontiers in Immunology*, 4, 217.
- Fulda, S. (2015). Promises and Challenges of Smac Mimetics as Cancer Therapeutics. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(22), 5030–5036.
- Garg, G., Vangveravong, S., Zeng, C., Collins, L., Hornick, M., Hashim, Y., Piwnica-Worms, D., Powell, M. A., Mutch, D. G., Mach, R. H., Hawkins, W. G., & Spitzer, D. (2014). Conjugation to a SMAC mimetic potentiates sigma-2 ligand induced tumor cell

- death in ovarian cancer. In *Molecular Cancer* (Vol. 13, Issue 1).
<https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-50>
- Geisse, S., Gram, H., Kleuser, B., & Kocher, H. P. (1996). Eukaryotic expression systems: a comparison. *Protein Expression and Purification*, 8(3), 271–282.
- GelAnalyzer. (n.d.). Retrieved November 18, 2021, from <http://www.gelalyzer.com>
- Gerngross, T. U. (2004). Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1409–1414.
- Gomes, A. R., Institute of Animal Health and Veterinary Biologicals, KVAFSU, Hebbal, Bengaluru-560024, Karnataka, India, Byregowda, S. M., Veeregowda, B. M., & Balamurugan, V. (2016). An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4(7), 346–356.
- Gomes, L., Monteiro, G., & Mergulhão, F. (2020). The Impact of IPTG Induction on Plasmid Stability and Heterologous Protein Expression by *Escherichia coli* Biofilms. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 2, p. 576).
<https://doi.org/10.3390/ijms21020576>
- Gonçalves, R. B., Sanches, D., Souza, T. L. F., Silva, J. L., & Oliveira, A. C. (2008). The proapoptotic protein Smac/DIABLO dimer has the highest stability as measured by pressure and urea denaturation. *Biochemistry*, 47(12), 3832–3841.
- Griffith, D. A., Delipala, C., Leadsham, J., Jarvis, S. M., & Oesterhelt, D. (2003). A novel yeast expression system for the overproduction of quality-controlled membrane proteins. *FEBS Letters*, 553(1-2), 45–50.
- Hayat, S. M. G., Farahani, N., Golichenari, B., & Sahebkar, A. (2018). Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* (E.coli): What We Need to Know. *Current Pharmaceutical Design*, 24(6), 718–725.
- Heim, R., Cubitt, A. B., & Tsien, R. Y. (1995). Improved green fluorescence. In *Nature* (Vol. 373, Issue 6516, pp. 663–664). <https://doi.org/10.1038/373663b0>
- Heim, R., & Tsien, R. Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology: CB*, 6(2), 178–182.
- Huang, T.-K., & McDonald, K. A. (2009). Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 45(3), 168–184.

- Hundsdoerfer, P., Dietrich, I., Schmelz, K., Eckert, C., & Henze, G. (2010). XIAP expression is post-transcriptionally upregulated in childhood ALL and is associated with glucocorticoid response in T-cell ALL. In *Pediatric Blood & Cancer* (Vol. 55, Issue 2, pp. 260–266). <https://doi.org/10.1002/pbc.22541>
- Jacob, F., & Monod, J. (1961). On the Regulation of Gene Activity. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 26, 193–211.
- Jacob, W. F., Santer, M., & Dahlberg, A. E. (1987). A single base change in the Shine-Dalgarno region of 16S rRNA of *Escherichia coli* affects translation of many proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(14), 4757–4761.
- Jang, S. A., Kim, H., Lee, J. Y., Shin, J. R., Kim, D. J., Cho, J. H., & Kim, S. C. (2012). Mechanism of action and specificity of antimicrobial peptides designed based on buforin IIb. *Peptides*, 34(2), 283–289.
- Joseph, B. C., Pichaimuthu, S., Srimenakshi, S., Murthy, M., Selvakumar, K., Ganesan, M., & Manjunath, S. R. (2015). An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Cell Science & Therapy*, 6(5), 221.
- Jullesson, D., David, F., Pflieger, B., & Nielsen, J. (2015). Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1395–1402.
- Kante, R. K., Vemula, S., Somavarapu, S., Mallu, M. R., Boje Gowd, B. H., & Ronda, S. R. (2018). Optimized upstream and downstream process conditions for the improved production of recombinant human asparaginase (rhASP) from *Escherichia coli* and its characterization. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, 56, 45–53.
- Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 106, pp. 803–822). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858.
- Kilikian, B. V., Suárez, I. D., Liria, C. W., & Gombert, A. K. (2000). Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG

- induction. In *Process Biochemistry* (Vol. 35, Issue 9, pp. 1019–1025). [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(00\)00137-0](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(00)00137-0)
- Kok, F. S. (2008). Induction of Recombinant Protein Expression in *Escherichia Coli* Using IPTG.
- Kuhlman, B., & Bradley, P. (2019). Advances in protein structure prediction and design. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(11), 681–697.
- Kumar, D. (2018). Chromatographic Protein Refolding/Renaturation. Reference Module in Life Sciences. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20824-8>
- Kunjapur, A. M., Pflingst, P., & Thompson, N. C. (2018). Gene synthesis allows biologists to source genes from farther away in the tree of life. *Nature Communications*, 9(1), 4425.
- Lawson, L. G. (1999). Examining Fermentation Conditions Affecting Inclusion Body Formation in *Escherichia Coli*. Colorado State University.
- Lebediker, M., & Danieli, T. (2014). Production of prone-to-aggregate proteins. *FEBS Letters*, 588(2), 236–246.
- Lee, H. S., Park, C. B., Kim, J. M., Jang, S. A., Park, I. Y., Kim, M. S., Cho, J. H., & Kim, S. C. (2008). Mechanism of anticancer activity of buforin IIb, a histone H2A-derived peptide. *Cancer Letters*, 271(1), 47–55.
- Lee, J. H., Minn, I., Park, C. B., & Kim, S. C. (1998). Acidic Peptide-Mediated Expression of the Antimicrobial Peptide Buforin II as Tandem Repeats in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 12(1), 53–60.
- Li, H., Hao, C., & Xu, D. (2017). Development of a novel vector for cloning and expressing extremely toxic genes in *Escherichia coli*. *Electronic Journal of Biotechnology: EJB*, 30, 88–94.
- Littlepage, L. E., Wu, H., Andresson, T., Deanehan, J. K., Amundadottir, L. T., & Ruderman, J. V. (2002). Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15440–15445.
- Li, Z., Kessler, W., van den Heuvel, J., & Rinas, U. (2011). Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based *Escherichia coli* expression systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), 1203–1213.

- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249–270.
- Ma, J., Campbell, A., & Karlin, S. (2002). Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures. *Journal of Bacteriology*, 184(20), 5733–5745.
- Manzoni, L., Samela, A., Barbini, S., Cairati, S., Penconi, M., Arosio, D., Lecis, D., & Seneci, P. (2017). 4-Connected azabicyclo[5.3.0]decane Smac mimetics-Zn²⁺ chelators as dual action antitumoral agents. In *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (Vol. 27, Issue 11, pp. 2336–2344). <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.04.032>
- Marqus, S., Pirogova, E., & Piva, T. J. (2017). Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *Journal of Biomedical Science*, 24(1), 21.
- McCarty, J. S., & Walker, G. C. (1991). DnaK as a thermometer: threonine-199 is site of autophosphorylation and is critical for ATPase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(21), 9513–9517.
- Mendoza, J. A., Dulin, P., & Warren, T. (2000). The Lower Hydrolysis of ATP by the Stress Protein GroEL Is a Major Factor Responsible for the Diminished Chaperonin Activity at Low Temperature. In *Cryobiology* (Vol. 41, Issue 4, pp. 319–323). <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2287>
- Messens, J., & Collet, J.-F. (2006). Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(7), 1050–1062.
- Park, C. B., Kim, H. S., & Kim, S. C. (1998). Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 244, Issue 1, pp. 253–257). <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8159>
- Park, C. B., Kim, M. S., & Kim, S. C. (1996). A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218(1), 408–413.
- Patra, A. K., Mukhopadhyay, R., Mukhija, R., Krishnan, A., Garg, L. C., & Panda, A. K. (2000). Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 18(2), 182–192.

- Peternel, S., & Liovic, M. (2010). Production of Recombinant Proteins in Bacteria: The Inclusion Bodies Formation and their Use in Biomedicine. In *Recent Patents on Biomedical Engineering* (Vol. 3, Issue 3, pp. 153–161). <https://doi.org/10.2174/1874764711003030153>
- Piatkov, K., Graciet, E., & Varshavsky, A. (2013). Ubiquitin reference technique and its use in ubiquitin-lacking prokaryotes. *PloS One*, 8(6), e67952.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2), 229–233.
- Prosinecki, V., Faisca, P. F. N., & Gomes, C. M. (2007). Conformational States and Protein Stability from a Proteomic Perspective. In *Current Proteomics* (Vol. 4, Issue 1, pp. 44–52). <https://doi.org/10.2174/157016407781387375>
- Rasala, B. A., Muto, M., Lee, P. A., Jager, M., Cardoso, R. M. F., Behnke, C. A., Kirk, P., Hokanson, C. A., Crea, R., Mendez, M., & Mayfield, S. P. (2010). Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnology Journal*, 8(6), 719–733.
- Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 28(8), 1412–1422.
- Sahdev, S., Khattar, S. K., & Saini, K. S. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 307(1-2), 249–264.
- Salamon, P., Miklóssy, I., Albert, B., Korodi, M., Nagy, K., Bakos, I., Lányi, S., Orbán, C. (2017). Heterologous Expression and Purification of Recombinant Proapoptotic Human Protein Smac/Diablo with EGFP as Fusion Partner. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Chemia*, 62(2), 333–345.
- San-Miguel, T., Pérez-Bermúdez, P., & Gavidia, I. (2013). Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. *SpringerPlus*, 2(1), 89.
- Saraei, R., Soleimani, M., Movassaghpour Akbari, A. A., Farshdousti Hagh, M., Hassanzadeh, A., & Solali, S. (2018). The role of XIAP in resistance to TNF-related

- apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in Leukemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy* = *Biomedecine & Pharmacotherapie*, 107, 1010–1019.
- Schein, C. H., & Noteborn, M. H. M. (1988). Formation of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia Coli* is Favored by Lower Growth Temperature. *Biotechnology*, 6(3), 291–294.
- Schellman, J. A. (1997). Temperature, stability, and the hydrophobic interaction. *Biophysical Journal*, 73(6), 2960–2964.
- Selas Castiñeiras, T., Williams, S. G., Hitchcock, A. G., & Smith, D. C. (2018). *E. coli* strain engineering for the production of advanced biopharmaceutical products. *FEMS Microbiology Letters*, 365(15). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny162>
- Shimomura, O. (2005). The discovery of aequorin and green fluorescent protein. In *Journal of Microscopy* (Vol. 217, Issue 1, pp. 3–15). <https://doi.org/10.1111/j.0022-2720.2005.01441.x>
- Shi, Y. (2001). A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nature Structural Biology*, 8(5), 394–401.
- Shu, W., Zheng, H., Fu, X., Zhen, J., Tan, M., Xu, J., Zhao, X., Yang, S., Song, H., & Ma, Y. (2020). Enhanced Heterologous Production of Glycosyltransferase UGT76G1 by Co-Expression of Endogenous *prpD* and *malK* in *Escherichia coli* and Its Transglycosylation Application in Production of Rebaudioside. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16). <https://doi.org/10.3390/ijms21165752>
- SnapGene software (from Insightful Science; available at snapgene.com). (n.d.).
- Song, Z., Yao, X., & Wu, M. (2003). Direct Interaction between Survivin and Smac/DIABLO Is Essential for the Anti-apoptotic Activity of Survivin during Taxol-induced Apoptosis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(25), 23130–23140.
- Stewart, E. J., Aslund, F., & Beckwith, J. (1998). Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *The EMBO Journal*, 17(19), 5543–5550.
- Strocchi, M., Ferrer, M., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2006). Low temperature-induced systems failure in *Escherichia coli*: insights from rescue by cold-adapted chaperones. *Proteomics*, 6(1), 193–206.
- Studier, F. W. (2005a). New Studier media for auto-induction and other applications. *Protein Expression and Purification*, 41, 207–234.

- Studier, F. W. (2005b). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234.
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130.
- Szövérfi, Csongor, K. O., Beáta, A., Katalin, N., Salamon, P., & Szabolcs, A. L. (2021). IN VITRO STUDY OF THE CCMV CAPSID PROTEIN: CLONING, EXPRESSION, AND PURIFICATION. *UPB SCIENTIFIC BULLETIN, SERIES B: CHEMISTRY AND MATERIALS SCIENCE*, 83(1), 135.
- Tchoghandjian, A., Soubéran, A., Tabouret, E., Colin, C., Denicolaï, E., Jiguet-Jiglaire, C., El-Battari, A., Villard, C., Baeza-Kallee, N., & Figarella-Branger, D. (2016). Inhibitor of apoptosis protein expression in glioblastomas and their in vitro and in vivo targeting by SMAC mimetic GDC-0152. In *Cell Death & Disease* (Vol. 7, Issue 8, pp. e2325–e2325). <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.214>
- Thomas, J. G., & Baneyx, F. (1996). Protein Misfolding and Inclusion Body Formation in Recombinant *Escherichia coli* Cells Overexpressing Heat-shock Proteins. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 271, Issue 19, pp. 11141–11147). <https://doi.org/10.1074/jbc.271.19.11141>
- Tsai, M.-Y., Wiese, C., Cao, K., Martin, O., Donovan, P., Ruderman, J., Prigent, C., & Zheng, Y. (2003). A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. In *Nature Cell Biology* (Vol. 5, Issue 3, pp. 242–248). <https://doi.org/10.1038/ncb936>
- Ukkonen, K., Mayer, S., Vasala, A., & Neubauer, P. (2013). Use of slow glucose feeding as supporting carbon source in lactose autoinduction medium improves the robustness of protein expression at different aeration conditions. *Protein Expression and Purification*, 91(2), 147–154.
- Upadhyay, A. K., Murmu, A., Singh, A., & Panda, A. K. (2012). Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. *PloS One*, 7(3), e33951.
- Uyterhoeven, E. T., Butler, C. H., Ko, D., & Elmore, D. E. (2008). Investigating the nucleic acid interactions and antimicrobial mechanism of buforin II. *FEBS Letters*, 582(12), 1715–1718.

- Vaillancourt, P. E. (2003). *E. Coli Gene Expression Protocols*. Springer Science & Business Media.
- Vasina, J. A., & Baneyx, F. (1997). Expression of Aggregation-Prone Recombinant Proteins at Low Temperatures: A Comparative Study of the *Escherichia coli* *cspA* and *tac* Promoter Systems. *Protein Expression and Purification*, 9(2), 211–218.
- Vera, A., González-Montalbán, N., Arís, A., & Villaverde, A. (2007). The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(6), 1101–1106.
- Wang, Q., Zhu, F., Xin, Y., Liu, J., Luo, L., & Yin, Z. (2011). Expression and purification of antimicrobial peptide buforin IIb in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 33(11), 2121–2126.
- Wang, T., Evdokimov, E., Yiadom, K., Yan, Z., Boon Chock, P., & Yang, D. C. H. (2003). Biotin–ubiquitin tagging of mammalian proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 30(1), 140–149.
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1393–1398.
- Yamaguchi, H., & Miyazaki, M. (2014). Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. In *Biomolecules* (Vol. 4, Issue 1, pp. 235–251). <https://doi.org/10.3390/biom4010235>
- Zheng, H., Yu, Z., Shu, W., Fu, X., Zhao, X., Yang, S., Tan, M., Xu, J., Liu, Y., & Song, H. (2019). Ethanol effects on the overexpression of heterologous catalase in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3), 1441–1453.
- Zhou, Y. (1994). *Transcription Activation by Escherichia Coli Catabolite Gene Activator Protein (CAP)*. Rutgers University.
- Zimmer, M. (2002). Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chemical Reviews*, 102(3), 759–781.

9. Mellékletek

I. melléklet: A kutatás során felhasznált anyagok

Anyag	Gyártó	
HCl	Merck	Darmstadt, Németország
FeCl ₃ *6H ₂ O	Merck	Darmstadt, Németország
CaCl ₂	Merck	Darmstadt, Németország
CuCl ₂ *2H ₂ O	Merck	Darmstadt, Németország
Élesztőkivonat	Merck	Darmstadt, Németország
Imidazol	Merck	Darmstadt, Németország
KCl	Merck	Darmstadt, Németország
MgSO ₄	Merck	Darmstadt, Németország
MnCl ₂ *4H ₂ O	Merck	Darmstadt, Németország
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	Merck	Darmstadt, Németország
NiCl ₂ *6H ₂ O	Merck	Darmstadt, Németország
Pepton	Merck	Darmstadt, Németország
Na ₂ HPO ₄	Merck	Darmstadt, Németország
MgSO ₄	Merck	Darmstadt, Németország
CaCl ₂	Merck	Darmstadt, Németország
NH ₄ Cl	Merck	Darmstadt, Németország
KH ₂ PO ₄	Merck	Darmstadt, Németország
Taq polimeráz	PCR Biosystems	London, Egyesült Királyság
Taq buffer	PCR Biosystems	London, Egyesült Királyság
Laktóz	Sigma	Buenos Aires, Argentina
H ₃ BO ₃ *5H ₂ O	Sigma	Buenos Aires, Argentina
CoCl ₂	Sigma	Buenos Aires, Argentina
NaCl	Sigma	Buenos Aires, Argentina
Tripton	Sigma	Buenos Aires, Argentina
LB agar	Sigma	Buenos Aires, Argentina
ZnSO ₄ *7H ₂ O	Sigma	Buenos Aires, Argentina
Glükóz	Sigma	Buenos Aires, Argentina
DMSO (dimetil-szulfoxid)	Sigma	Buenos Aires, Argentina
MgCl ₂	Sigma	Buenos Aires, Argentina
Na ₂ SeO ₃ *5H ₂ O	Sigma	Buenos Aires, Argentina
PEG (polietilén-glikol)	Sigma	Buenos Aires, Argentina
Glicerín	Thermo Scientific	Waltham, MA AEÁ
DTT	Thermo Scientific	Waltham, MA AEÁ
Pfu DNA polymerase	Thermo Scientific	Waltham, MA AEÁ

II. melléklet: A törzsoldatok komponensei

	Összetevő	Koncentráció	Mennyiség
ZY (V=1 L)	Tripton	1%(m/V)	10 g
	Élesztőkivonat	0,5%(m/V)	5 g
50xM (V=0,05 L)	Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	1,25 M	11,125 g
	KH ₂ PO ₄	1,25 M	8,5 g
	NH ₄ Cl	2,5 M	6,7 g
	Na ₂ SO ₄	0,25 M	1,775 g
20xP (V=0,1 L)	Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	1 M	17,8 g
	KH ₂ PO ₄	1 M	13,6 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 M	6,6 g
50x 5052 (V=0,2 L)	Glicerín	25%(m/V)	39,68 mL
	Glükóz	2,5%(m/V)	5 g
	α-Laktóz	10%(m/V)	20 g
500x MgSO ₄ (V=0,05 L)	MgSO ₂	1 M	12,325 g
1000x nyomelem törzsoldat (TRACE) (V=0,05 L)	FeCl ₃ *6H ₂ O	50 mM	0,675 g
	CaCl ₂	20 mM	0,11 g
	MnCl ₂ *4H ₂ O	10 mM	0,095 g
	ZnSO ₄ *7H ₂ O	10 mM	0,205 g
	CoCl ₂	2 mM	0,02 g
	CuCl ₂ *2H ₂ O	2 mM	0,015 g
	NiCl ₂ *6H ₂ O	2 mM	0,02 g
	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	2 mM	0,02 g
	Na ₂ SeO ₃ *5H ₂ O	2 mM	0,025 g
	H ₃ BO ₃ *5H ₂ O	2 mM	0,015 g
	HCl	60 mM	25 mL

III. melléklet: Az alkalmazott tápoldatok összetevői 1 L térfogatra

Tápoldat megnevezése	Összetevő törzsoldat	Bemérendő mennyiség (1 L-re)
ZYM	ZY	958 mL
	50x M	20 mL
	50x 5052	20 mL
	500x MgSO ₄	2 mL
	1000x nyomelem oldat	0,2 mL
ZYP	ZY	928 mL
	20x P	50 mL
	50x 5052	20 mL
	500x MgSO ₄	2 mL
	1000x nyomelem	0,2 mL
LB	Pepton	10 g
	Élesztőkivonat	5 g
	NaCl	5 g
aM9	Na ₂ HPO ₄	3,54 g
	NaCl	0,5 g
	KH ₂ PO ₄	3,4 g
	NH ₄ Cl	2 g
	glükóz	2 g
	laktóz	2 g
	glicerol	5 g
	MgSO ₄	2 mM
	CaCl ₂	0,02 mM
	1000x nyomelem	1 mL

IV. melléklet: pUbiq-SMAC_prom szekvencia

GSSGRRRSGGGCTKGCCTSTGWGCAAWGAATTWTGTTTACTTTGMWGARGGTWG
 WGAYACCATGGGSCATCATCATCAYCATCATCATCATSACRGCRCGGCSATATCGACGA
 CGACGACWAGCATAKGC AAATTTTTGTCAAGACACTGRCAGGTAAGACTRTAMCCCTAGAG
 GTTGAATCTTCTGACACTATCGACAACGTTAAGTCGAAAATTCAAGACAAGGAAGGTATTCC
 TCCAGATCAACAAAGATTGATTTTTGTCTGGTAAGCAACTGGAAGACGGTAGAACGCTGTCTG
 ATTATAACATTCAGAAAGAGTCTACGTTGCATTTGGTGTGAGACTCCGCGGTGGAGCGGTT
 CCTATTGCACAGAAATCAGAGCCTCATTCCTTAGTAGTGAAGCATTGATGAGGAGAGCAGT
 GTCTTTGGTAACAGATAGCACCTCTACCTTTCTCTCTCAGACCACATATGCGTTGATTGAAGC
 TATTACTGAAATATACTAAGGCTGTTTATACCTTAACTTCTCTTTACCGACAAATATACAAA
 GTTTTACTTTGGGAAAATTGAAATTCAGAAGGAGGAAAGAATGAAAGTTGTGGGCAAGGTG
 AATCMTTAAGGAAGCCCAGAGCTTGARAWTGAACTTTCAAAAACCACCCAAGRAAGTACCT
 TTGAAAGCCTGGAAAACCAMCTTTGGAATGGAACCTGCCARTTTGGGTCTTTTCCAGRAGA
 TTGGGCCAGGCCAGAAAGSCTTGCMATWTTCAAACCTGGGCCSSCAGAATTCAAGGGCCYT
 YCTATAAAAACSSCCAGGAAATTCMCAATTCMAGCYTTGGKGGAAAACCTTGCCAAGGTTGR
 GAAAAAAAGTTGCCMACCCACCTYTCYCCCYKGGGGAAAAGMCAAAAAAACCCYAAAGCCT
 KTGGGCARRAAAGCCCACAAATAAAAAAAGWASSCTCTCCKKTSSAGAAAAAARACMCM
 AAGGGAAGAAAGGGAGGAGMAACCKGCYTTAATYCCGAAACCMRRGAAGRCCCTTWCCCK
 TGGSGTTGGGAGTATTTATATTAACCRAGGGWWTCCCGGSCTGGGCTCGGGSTGGGCT

V. melléklet: pUbiq-SMAC_term szekvencia

AGRAGGKAWWGCARCACTCACTTCCTTTGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCCTTA
 ACTCGGGGTGGACGCCAGAGCTAGGACCGCCTGTTTCAGCCACTGAATATACAGGTTTCC
 ACCGCGGAGTCTCAACACCAAATGCAACGTAGACTCTTTCTGAATGTTATAATCAGACAGCG
 TTCTACCGTCTTCCAGTTGCTTACCAGCAAAAATCAATCTTTGTTGATCTGGAGGAATACCTT
 CCTGTCTTGAATTTTCGACTTAACTTGTGATAGTGTGTCAGAAGATTCAACCTCTAGGGTT
 ATAGTCTTACCTGTCAGTGTCTTGACAAAAATTTGCATATGCTTGTGTCGTCGTCGATATG
 GCCGCTGCTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGGCCATGGTATATCTCCTTCTTA
 AAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGAAACCGTTGTGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA
 ATTTCCGCGGATCGAGATCTAAGCTTGAATCCCCGGGGACGTCACAGCAAGCGAACCGGAA
 TTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTTCAAAGTAACTGGATGGCTTTC
 TTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGAT

CGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGG
 CTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTG
 TCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTTGTCAAGACCGACATGTCCGGTGCCCTGAATGAACT
 GCAGGACGAGCAGCGCGGCTATCGTGCTGGTCACGATGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTC
 GACGTTGTCACTGGAAGCGGGAAGGACTGCTGCTTATTGGGCGAAGTGCTGGGGCAAGGAT
 CTCTGTCATCTCACCTGCTTCTGCGGAAAAGTATCTAACKATGCCTGGAATGCCTAATG

VI. melléklet: pUbiq-UBI_prom szekvencia

AGGCSAAMGGGKTTtCCTCTAGAtATTTTGTTTACTTTAAGAAGGAGATatACCATGGGCCAT
 CATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGACGACGACGACAAGCATATG
 CAAATTTTTGTCAAGACACTGACAGGTAAGACTATAACCCTAGAGGTTGAATCTTCTGACAC
 TATCGACAACGTTAAGTCGAAAATTCAAGACAAGGAAGGTATTCCTCCAGATCAACAAAGAT
 TGATTTTTGCTGGTAAGCAACTGGAAGACGGTAGAACGCTGTCTGATTATAACATTCAGAAA
 GAGTCTACGTTGCATTTGGTGTGAGACTCCGCGGTGGAACCCGAGCAGCCGCGGGCCTG
 CAGTTTCCGGTGGGCCGCGTGCATCGCCTGCTGCGCAAATAAGGATCCCTTGCTAACAAAGCC
 GAAGAAGCTGATTGTCTGCTGCCACCGCTGACAATAACTAGCTAACCCTTTGTAACCCTTTGT

VII. melléklet: pUbiq-UBI_term szekvencia

AWKWGGSRRCCAMTCAGCTTCCTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCCTTATTTGCGCAG
 CAGGCGATGCACGCGGCCACCGGAAACTGCAGGCCCGCGCGGCTGCTGCGGGTTCCACCGCG
 GAGTCTCAACACCAAATGCAACGTAGACTCTTTCTGAATGTTATAATCAGACAGCGTTCTAC
 CGTCTTCCAGTTGCTTACCAGCAAAAAATCAATCTTTGTTGATCTGGAGGAATACCTTCCTTG
 TCTTGAATTTTTCGACTTAACGTTGTCGATAGTGTGAGAAGATTCAACCTCTAGGGTTATAG
 TCTTACCTGTCAGTGTCTTGACAAAAATTTGCATATGCTTGTGTCGTCGTCGATATGGCCGC
 TGCTGTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGGCCCATGGTTATATCTCCTTCTTAAAGT
 TTAACCAAAATTTTCTAGAGGAAACCGTGTGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATAATTCG
 GCGGGAATCGAGATCTAGCTTGTATCCCCTGGGGAACGTCCACAGCCAAAGCGAAACCGAAG
 CGAAACCG