

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

*PhD értekezés tézisei*

ing. Salamon Pál

Témavezető: Dr. Albert Beáta D.Sc



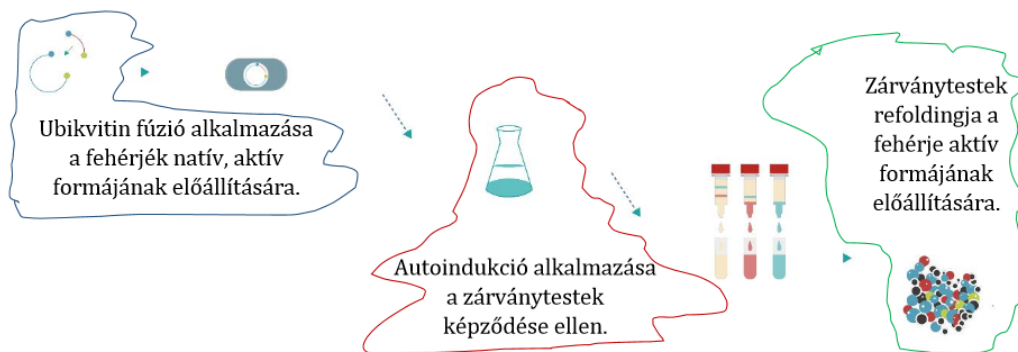
Pécs, 2022

## 1. Bevezetés

A génlónozástól 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 gazdaszejtben a rekombináns fehérje túltermelésére irányulnak. A gén- és fehérjetechnológiai eljárások lehetővé teszik új, személyre szabott stratégiák tervezését a felhasználói vagy folyamatok 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 előállítását 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 (1. ábra): 1. ubikvitin fúzió 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. ábra: Az értekezésben tárgyalt *E. coli* expressziós rendszerben történő rekombináns fehérjetermelés fejlesztésére irányuló stratégiák

## 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 *Escherichia coli* gyakran használt gazdaszervezet, mivel viszonylagos egyszerűsége, olcsó és gyors, nagy sűrűségű tenyésztése, jól ismert genetikája és nagyszámú, kompatibilis molekuláris eszköze 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: 1. ubikvitin fúzió alkalmazása a SMAC és BUFI1 fehérjék natív formában történő bioszintézisére; 2. GST-XIAP zárványtestek (aggregátumok) denaturálása, majd annak refoldingja a fehérje aktív formájának előállítására; 3. autoindukció alkalmazása az AURKA oldhatatlan zárványtestekké történő aggregációja ellen.

A 20-50 aminosavat tartalmazó peptidok 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 molekulatömeggel rendelkező peptid (BUFORIN II) esetében a rekombináns fehérje stabilitásának növelése érdekében.

Célunk az ubikvitin fúziós címke alkalmazása kis molekulatömeggel rendelkező peptid (BUFORIN II), illetve kis molekulatömeggel 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-nitrilotricetát 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 fehérjéről 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

#### A SMAC és BUFII rekombináns fehérje bioszintézise

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 DNS-szekvencia megjelenítésére és szerkesztésére Snapgene szoftvert (1.1.3-as verzió) használtunk (<https://www.snapgene.com/>).

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).

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, 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. 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.

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.gelalyzer.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 eluált fehérjék abszorbanciáját UV-detektorral (UPC-900, GE Healthcare) követtük 280 nm hullámhosszon.

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, 1OGW, 1OQY, 6PX3, 1YX5. A megfelelő templátokból 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/>).

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) ekvibráltuk. A GST-pulldown kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük. A GST-XIAP fehérjéket (8 µg) és a rekombináns SMAC-et (8 µg) glutation gyöngyökkel inkubáltuk 1-2 órán át reakciópufferben, majd három mosás követte. A megkötött fehérjéket 10 mM szabad redukált glutationnal eluáltuk Tris pufferben. A GST-t (8 µg) negatív kontrollként alkalmaztuk. Az eluált mintákat 8%-os SDS-PAGE-n ellenőriztük.

A BUFORIN II kis méretének (21 aminosav, 63 bp) következtében a klónozáshoz szükséges inszert (gén) két egyszálú oligonukleotid (primer). 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/>). Az inszert előállítás a két egyszálú oligonukleotid (BUFORIN II peptidet kódoló DNS szekvencia) hibridizációjával valósult 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 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 táplevessel (16 g/L Tripton, 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 oldottoxigén 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), feltárást 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 feltárás 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 eluciósi 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 eluálás során lépcsős gradienssel-, valamint lineáris gradienssel 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.

### GST-XIAP zárványtestek refoldingja

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 plys 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 OD<sub>600</sub> 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 sejtszuszpenzióhoz, és 30 percig inkubáltuk 4 °C-on. Ezt követően DNáz I-et (0,1 mg/mL végső koncentráció) adtunk a sejtszuszpenzióhoz. 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.

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 fehérjét 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, natív PAGE alkalmazásával választottuk el, 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 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 négyszeri 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.

#### Autoindukció alkalmazása az AURKA oldhatatlan zárványtestekké történő aggregációja ellen

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, illetve autoindukciós M9. 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. 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.

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. Az 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, 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.

A sejtek feltárása után kapott felülúszóból 25 µL-hez 5 µL 6X mintakezelő puffert adtunk. 98 °C-on 5 percig főztük a mintákat. A 10 %-os SDS PAGE gél futtatása során 7 µL molekulasúly markert (peqGOLD Protein Marker I, VWR), illetve 10 µL mintát vittünk fel a géltre. 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. A gél festése 30 percig rázatva történt, majd a fehérje sávok detektálhatósága érdekében destain oldatot alkalmaztunk, rázatva.

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, majd ebből készítettünk 20x-os hígítást. 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 mérés alapját az EGFP fluoreszcens tulajdonsága képezi, amely révén a fluoreszcencia intenzitásának mérésével meghatározható a termelődött rekombináns fehérje koncentrációja.

## 4. Eredmények

Jelen PhD értekezés az E. coli expressziós rendszerben történő rekombináns fehérjetermelés fejlesztésére irányuló stratégiákat tárgyalja három szegmensben:



- 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.

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 restriktions hasító helyek létrehozásával egyidejűleg. A BUFORIN II kis méretének (21 aminosav, 63 bp) következtében a klónozáshoz szükséges inszert (gén) két egyszálú oligonukleotid. A pUbiq-BUFI konstrukcióhoz alkalmazott inszert előállítására 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 restriktions 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.

A pUbiq expressziós rendszer alkalmazása a natív SMAC bioszintézisére sikeresnek bizonyult prokarióta (*E. coli*) expressziós rendszerben (GST pull-down). A rekombináns fehérje 3D szerkezetét modellezve, annak kölcsönhatás vizsgálatával előre jósolható a proteolízis hatékonysága a komplexen (fúziós partner eltávolítása). A rekombináns fehérje 3D szerkezetének molekuláris modellezése az egyik legfontosabb lépését kell, hogy képezze a bioszintetikus folyamatok tervezésében (Kuhlman és Bradley 2019).

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 ubiquitinnel 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 expresszálásra, 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 fejti ki antibakteriális hatását. Ezen tulajdonságából adódóan a BUFORIN II és a szerkezetmódosítással előállított analógjai tumorelles hatással is rendelkeznek.

A zárványtest-aggregátumok enyhe szolubilizálása a kulcs a bioaktív fehérjék visszanyerésének javításához, munkánk során az N-Lauroil-szarkozil 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-szarkozil 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

detergensnek 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.

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 kezdeti glükóz koncentráció nem befolyásolta a sejtnövekedést egyik vizsgált 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.

## 5. Publikációs jegyzék

*A PhD fokozatszerzési eljárás tárgy körében készült publikációk:*

**P. Salamon**, C. K. Orbán, K. Molnár-Nagy, Z. Kovács, K. Vánca, 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 Babeș-Bolyai Chemia*, vol. 62, no. 2, pp. 333–345, 2017., **IF.: 0,305**

*A PhD fokozatszerzési eljárás tárgykorán 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 pentylene tetrazole 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 Babeș-Bolyai Chemia*, Vol. 63, no. 1, pp. 7–20, 2018., **IF.: 0,275**

*A PhD fokozatszerzési eljárás tárgykorán 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 tárgykorán 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 génextpressziós 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 génextpressziós 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 poszterek:*

M. Cs. Csányi, **P. Salamon**, T. Feller, T. Bozó, J. Hársfalvi, and M. S.Z. Kellermayer, "Force dependent multimer glycoprotein elongation" in *20th Int. 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.