



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA

IN VITRO TRANSZLÁCIÓS VEKTOROK FEJLESZTÉSE
ÉS ALKALMAZÁSA

TÉZISFÜZET

KÉSZÍTETTE:
BARDÓCZY VIOLA

TÉMAVEZETŐ:
DR. MÉSZÁROS TAMÁS
SE Orvosi Vegytani Intézet

BME ALKALMAZOTT BIOTECHNOLÓGIA ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI TANSZÉK

2009

1. Bevezetés

A humán genom szekvencia megismerését követő korszak kulcsfontosságú kérdése a genomban kódolt fehérjék azonosítása, ezek molekuláris biológiai módszerekkel történő előállítása, módosítása, valamint az egyes fehérjék funkciójának felderítése. A proteomikai vizsgálatok során alkalmazott fehérjék előállítására jelenleg a baktériumokban történő fehérje túltermelés a legáltalánosabban alkalmazott eljárás, ennek azonban számos hátránya ill. korlátja van. A fehérjeszintetizálás másik lehetősége sejtmentes (*in vitro*) fehérjeszintetizáló rendszerek alkalmazása, doktori munkámban ezeket alkalmaztam. Ez a technika már az 1950-es évektől ismert, számos fontos információt nyújt a genetikai kódról, az mRNS és a riboszómák funkciójáról, a translációs fehérjefaktorokról és a transláció mechanizmusáról. Napjainkra az *in vitro* translációs rendszereket optimalizálták, így ezek jól működő alternatívái lettek az élő sejteken alapuló fehérjetermelésnek. A sejtmentes fehérje-szintetizáló rendszerek számos proteomikai kísérlet fehérje szükségletét biztosíthatják, többek között alkalmazhatók fehérje chipok előállítására, kémiaiilag módosított és izotóppal jelölt fehérjék szintézisére, *in silico* tervezett fehérjék tesztelésére és fehérjék funkcionális tanulmányozására.

Munkám elsődleges célkitűzése egy új, *in vitro* translációs rendszerben alkalmazható vektorcsalád létrehozása. Elképzelésünk szerint ez lehetővé teszi majd egy tetszőleges DNS szakasz gyors klónozását, *in vitro* translációját, valamint a létrehozott fehérje egyszerű tisztítását is. A létrehozott translációs rendszer sikerességét egy, a növényi szignál transzdukcióban kulcsfontosságú szerepet játszó fehérje, az *AtMPK6* előállításával terveztük igazolni.

2. Irodalmi áttekintés

A jelenleg általánosan használt *in vitro* translációs technikák alapját az *E. coli*-ból, nyúl retikulocitából és búzacsírából tisztított translációs apparátusok adják. Az 1950-es évektől kezdve ismert tény, hogy a translációhoz nem szükséges a sejt integritása, a fehérjék bioszintézise sejt kivonatokban is bekövetkezik. Az első patkány májsejt kivonatból készített translációs rendszert több *E. coli*-ból származó követte. Mindezen rendszerek közös vonása, hogy az endogén, sejt feltáráskor riboszómához kötött mRNS-t olvassák a transláció során, így nem alkalmasak tetszőleges fehérjék termelésére. A sejtmentes fehérje előállítás szempontjából döntő lépés volt az exogén mRNS-ek translálása *E. coli*, nyúl retikulocita és búzacsíra sejt kivonatban. Mindhárom rendszer alkalmas lehet nagy mennyiségű fehérje gyors

előállítására, azonban jelentős különbség van közöttük a sikeresen termeltethető fehérjék, ezek tulajdonságai, valamint az eljárás költsége tekintetében.

In vitro translációra alkalmas *E. coli* kivonat viszonylag könnyen készíthető. A rendszer további előnye, hogy a transzkripció és transláció kapcsoltan, azonos reakcióközegben megy végbe. A prokarióta sejt kivonaton alapuló fehérje bioszintézis hátránya – hasonlóan az *E. coli* sejteken alapuló *in vivo* rendszerekhez – hogy számos esetben nem alkalmas megfelelő konformációjú eukarióta fehérje termelésére.

A nyúl retikulocita kivonat alkalmazása ugyan a fenti hátrányokat kiküszöböli, de ugyanakkor számos más problémát vet fel. Előállítása költséges, mivel a translációs apparátus tisztításhoz nagy mennyiségű vér szükséges, és az endogén mRNS eltávolításához Ca^{2+} függő RN-ázzal kell kezelni a kivonatot. A retikulocita kivonat globin termelésére optimált, így ezen a rendszeren más fehérjék csak kis mennyiségben állíthatók elő. További nehézséget jelent a magas endogén hemoglobin tartalom, amely a termék tisztítását nehezíti.

A növényi magvak csírázásával járó intenzív fehérjeszintézist az érett embrióban beszáradt állapotban raktározódó, translációhoz szükséges komponensek biztosítják. Ennek következtében az izolált növényi csíra elsőrendű translációs apparátus forrás, ráadásul az endogén mRNS hiányának következtében a fehérjekivonat előkezelés nélkül közvetlenül használható. A napjainkban végzett nagy áteresztőképességű vizsgálatok azt is igazolták, hogy a búzacsíra kivonattal előállított, heterológ eukarióta fehérjék döntő része megfelelő harmadlagos szerkezetet vesz fel. Mindezek fényében az eukarióta eredetű fehérjék bioszintézisére a búzacsíra kivonatot alkalmazó *in vitro* fehérje translációs rendszerek tűnnek a legígéretesebbnek, doktori munkám során is ezt használtam.

A fehérje transláció *in vitro* reprodukálása kezdetben a fehérje bioszintézis molekuláris mechanizmusának tanulmányozására szolgált. A genetikai kódra, az mRNS-re, a riboszóma funkcióira, a translációs fehérjefaktorokra, a transláció mechanizmusára és a fehérje hajtogatódásra vonatkozó ismeretek jelentős részben a sejtmentes fehérje bioszintetizáló rendszerek nyújtotta lehetőségeknek köszönhetők. Napjainkra az *in vitro* translációs rendszerek alkalmazását optimálták, és egyre szélesebb körben alkalmazzák egyes fehérjék előállítására. A sejtmentes fehérjetermelő rendszerek növekvő népszerűségét indokolja, hogy felhasználásukkal nagyszámú fehérjét lehet rövid idő alatt előállítani, a transláció körülményei rugalmasak, így a reakcióelegy paraméterei széles határok között változtathatóak, és a termelt fehérjék könnyen jelölhetőek, módosíthatóak.

A prokarióta és eukarióta fehérje transláció mechanizmusa és ennek egyes lépései részletesen ismert és tanulmányozott folyamatok. Az alapkivonat és mechanizmusok mindkét esetben megegyeznek: A fehérjék bioszintézise a riboszómákon történik, az

aminosavakat tRNS-ek szállítják a szintézis helyére, az aminosavak tRNS-re való kapcsolását az aminoacil-tRNS-szintetázok biztosítják és a translációhoz további fehérjék, iniciációs, elongációs és terminációs faktorok is szükségesek. Ezen hasonlóságok ellenére számos különbség is van a kétféle organizmus fehérje translációjának mikéntjében, és ezeknek az eltéréseknek a sejtmentes fehérje bioszintézis kivitelezése szempontjából nagy gyakorlati jelentősége van.

Az *in vitro* transláció szempontjából egyik legfontosabb különbség a translációra alkalmas mRNS-sel szemben támasztott követelményekben jelentkezik. A prokarióta sejtekben az átíródott mRNS nem módosul, a transzkripció és transláció szimultán valósul meg. Gyakorlati szempontból előnyös, hogy az *in vivo E. coli* expresszió során alkalmazott DNS vektorok az *E. coli* kivonaton alapuló *in vitro* translációs rendszerekben is megfelelnek. A prokariótákkal szemben az eukarióta élőlényekben az mRNS poszttranszkripciós módosításokon megy keresztül, melyek közül az *in vitro* translációs rendszer szempontjából a 7-metil-guanozin sapkának valamint a poli-A szekvenciának van jelentősége, mivel ezek hiányában drasztikusan csökken a transláció hatékonysága. A poszttranszkripciós módosítások következtében az eukarióta *in vitro* fehérjetermelő rendszerekben alkalmazandó mRNS előállításához speciális DNS templátot illetve vektort igényel.

Egy másik, gyakorlati okokból fontos eltérés a transzkripció és transláció sejten belüli lokalizációjából következik. A két folyamat prokariótákban időben és térben is együtt játszódik le, míg eukariótákban a transzkripció a sejtmagban, a fehérje bioszintézis pedig a citoplazmában megy végbe. A sejtmag és citoplazma eltérő ion összetételének megfelelően az eukarióta transzkripció és transláció más-más körülmények között működik optimálisan, így a két folyamat összekapcsolása technikai kihívást jelent az eukarióta sejtmentes fehérjetermelő rendszerek fejlesztése során.

Napjainkban a legtöbb *in vitro* fehérje translációs rendszer olyan durva sejt kivonatokon alapul, amelyek tartalmazzák a riboszómát, az oldható enzimeket, translációs faktorokat és tRNS-eket. A sikeres fehérje *in vitro* translációhoz a sejt kivonatokban található polinukleotid és fehérje komponenseken kívül számos más vegyületre is szükség van. A megfelelő pH, ion koncentráció és redukzív körülmények biztosításán túl a bioszintézis során beépülő aminosavakat is elérhetővé kell tenni. A fehérjetermelő *in vitro* transláció hatékonyságát általában exogén tRNS hozzáadásával növelik meg.

Az előzőekben leírt rendszerek ún. „batch” típusúak, melyekben egy adott térfogatú analíziscsőben végzik a translálást. Alkalmazásukat korlátozza a rövid idejű aktivitás és az alacsony fehérjehozam. Ezekben a rendszerekben a transláció 20-60 perces inkubációs idő után leáll, ekkorra az energiakomponensek elfogynak vagy a termékek, illetve a

melléktermékek koncentrációja elér egy olyan kritikus mennyiséget, amely már gátolja a translációt.

A fehérje bioszintézis alkalmazását folyamatosan táplált rendszerek bevezetésével jelentősen javítani lehet. Ez az újítás radikálisan növeli mind a transláció időtartamát (mely akár két hétre is növelhető) mind pedig a fehérjehozamot (mely elérheti a 10 mg/ml-t is a translációs elegyben). A folyamatos *in vitro* fehérje translációs rendszerek elve, hogy a translációs illetve a transzkripciós-transzlációs rendszer számára folyamatosan biztosítottak a szükséges szubsztrátok (aminosavak, energia komponensek), a keletkező termékek. Ezzel egyidejűleg a melléktermékek eltávolításra kerülnek, így állandósulnak az optimális reakció körülmények. A folyamatosan táplált fehérje bioszintézist a gyakorlatban három módon valósítják meg. A CFCF (continuous-flow cell-free) rendszerben a reakciókamrába tápláló, azaz szubsztrátokat tartalmazó oldatot áramoltatnak, ahol a többi, translációhoz szükséges komponens, úgymint riboszóma, mRNS, tRNS, translációs faktorok egy ultra-szűrős hártyával elzárt részben található. A membrán a nagy molekulákat visszatartja, a kisebbeket átengedi, így a kamra alján – a membrán pórusátmérőjének megfelelően – a termékek és a melléktermékek kiáramlanak a rendszerből.

A CECF (continuous-exchange cell-free) rendszer sok tekintetben hasonló a CFCF-hez. Fontos különbség, hogy dialízis membránt használnak az ultra-szűrős helyett, és az oldatok cseréje passzív diffúzióval megy végbe. A tápláló oldatot és a reakcióközeget tartalmazó kamrák membránnal elválasztva helyezkednek el. A reakció során a melléktermékek és a szubsztrátok helyet cserélnek, a keletkezett termék pedig a sejtmentes kivonatot tartalmazó kamrában halmozódik fel.

A kétrétegű (bilayer) reakció a legegyszerűbben kivitelezhető folyamatosan táplált rendszer, mégis több mint tízszer hosszabb ideig működik, mint a hagyományos 'batch' reakció, és fehérje hozama milligramm nagyságrendű lehet. A reakció összeállításakor a nagyobb sűrűségű translációs elegyet rétegezzük a tápláló oldat alá. Az inkubáció során a határreteken keresztül diffundálnak a komponensek, és az inkubációs idő végére homogén oldat keletkezik.

A laboratóriumunkban alkalmazott búzacsíra alapú sejtmentes rendszert elsőként Robertis alkalmazta *in vitro* translációra. A rendszer kialakítása óta elmúlt több mint 30 év során számos fejlesztés valósult meg, így az eredeti módszer hatékonysága megsokszorozódott. A változtatások során részben a csírákivonat készítését és a transláció körülményét optimalizálták, részben pedig az *in vitro* fehérje translációhoz szükséges plazmidokat, PCR primereket fejlesztettek ki. Az utóbbi években fedezték fel, hogy a búzacsírából készült fehérjekivonatokban translációt gátló komponensek, így RNS N-

glikozidáz, tritin, tionin, ribonukleázok, proteázok is jelen vannak. A fehérje bioszintézis inhibitorai nagyrészt az endospermiumban lokalizálódnak, így annak eltávolításával a transláció hatékonysága növekszik. A búzaembriók feltárás előtti, alapos mosásával az endospermium eredetű inhibitorok eltávolíthatók, és az ily módon előkészített embrióból olyan nagy stabilitású és aktivitású kivonat készíthető, amely fagyasztva vagy liofilizálva évekig tárolható.

Kezdetben az mRNS *in vitro* transzkripciója során a hatékony translációhoz elengedhetetlen 5' metil-guanozin sapka szerkezetet egy módosított dinukleotid (7-mG-5'-ppp-5'G) beépítésével valósították meg. A beépülés hatékonysága azonban alacsony volt, a szabadon maradt dinukleotid eltávolítása körülményes, a translációs oldatban a szabad dinukleotid pedig kompetitíven kötődik a sapka kötő eIF4E fehérjéhez, ily módon gátolja a translációt. Az eukarióta mRNS 3' végén elhelyezkedő poli(A) láncvégződés *in vitro* biztosítása szintén problémába ütközött, mert a hosszú poli(A) szekvenciák plazmidok replikációja során nem stabilak, így ilyen szekvenciákat nem tanácsos a transzkripció templátjaként szolgáló plazmidokba beépíteni.

A mRNS végeinek módosításából fakadó nehézségeket dohány mozaik vírus tanulmányozása során észlelt megfigyelés segített megoldani. A vírus evolúciója során olyan 5' és 3' szekvenciák szelektálódtak, melyek fokozzák a translációt, ugyanakkor sem sapka motívumot, sem pedig poli(A)-láncvéget nem tartalmaznak. Kimutatták, hogy a dohány mozaik vírus 75 bázisnyi translációt fokozó szekvencia részletének (az Ω szekvenciának) és a GAA hármas nukleotid motívumnak az adott mRNS 5' végre helyezésével a translációjának hatékonysága nagymértékben nő, és eléri a természetes metil-guanozin sapkát hordozó mRNS translációs hatékonyságának a 75%-át. Azt is igazolták, hogy a 3' poli(A) láncvég szekvenciája lényegtelen, a transláció hatékonyságát csak az mRNS 3', nem translálódo régiójának hossza szabja meg, így ez tetszőleges nukleotid szekvenciával helyettesíthető.

A kísérletek, amelyek a búzacsíra kivonat működéséhez szükséges alapvető technikai feltételeket megalapozták, lehetővé tették két új, *in vitro* translációt alkalmazó rendszer kifejlesztését. Az első módszer PCR reakcióval állítja elő a megfelelő DNS szekvenciával rendelkező cDNS templátot, azonban ezzel a megoldással csak mikrogrammos mennyiségben termeltethető rekombináns fehérjék. A fehérjehozam növelésére fejlesztették ki az általunk is használt *pEU3-NII* illetve *pEU-E01* vektorokat.

A vektorok klónozása, szaporítása *E. coli* sejtekben történik, ennek megfelelően tartalmazzák a megfelelő replikációs origót és antibiotikum rezisztencia gént. A bakteriális elemek mellett, az *in vitro* transzkripcióhoz szükséges T7 vagy SP6 promóterek, illetve a

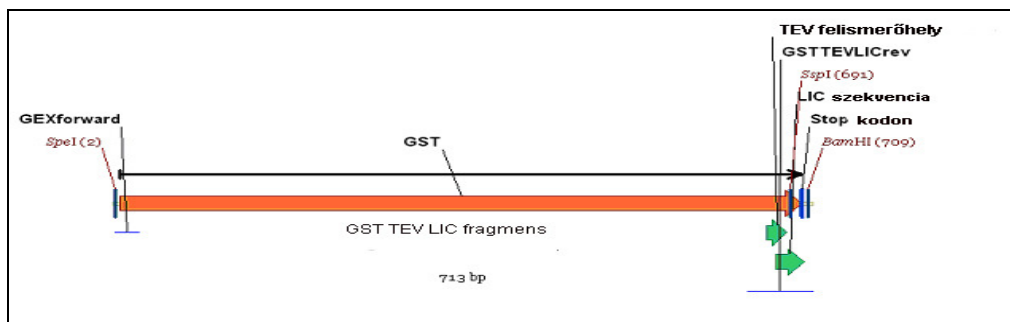
keletkezett mRNS búzacsíra kivonatban történő transzlációjához szükséges motívumokat biztosító, fentebb tárgyalt szekvencia elemek is megtalálhatók a vektorokban. Habár a pEU vektor család tagjai biztosítják a hatékony transzlációt, rutinszerű alkalmazásukat hátráltatja, hogy a tanulmányozandó fehérjét kódoló DNS fragmenseket restriktív endonukleázok segítségével kell beépíteni, így minden esetben más-más klónozási stratégiát kell alkalmazni. A vektorok további hiányossága, hogy nem kódolnak affinitás-kromatográfiás tisztításra alkalmas motívumokat, így az előállított fehérjék tisztítása körülményes, és minden fehérje esetében optimalizálást igényel.

3. Kísérletek és eredmények

Kutatásaim első lépése az irodalmi összefoglalóban említett, az *in vitro* transzlációban gyakran használt pEU vektorok továbbfejlesztése volt. A kutatás a meglévő *pEU3-NII* illetve *pEU-E01* vektorokon alapult. Ezekből a vektorokból első lépésben *in vitro* mutagenézissel elimináltam az *SspI* restriktív enzim felismerő helyet, és így létrehoztam az *SspI pEU-3NII* és *pEU-E01* vektorokat. Erre azért volt szükség, mert a későbbi ligálás-független klónozás alapja a kialakított konstrukció *SspI* hasítással történő linearizálása.

A fejlesztés következő eleme az volt, hogy a fenti *in vitro* transzlációs vektorokba egy több szempontból is jelentős, három elemet tartalmazó *GST-TEV-LIC* szekvenciát illesztettem be (1. ábra). A LIC-hely feladata, hogy lehetővé teszi egy (megfelelő 5' végű nukleotid szekvenciával rendelkező) PCR termék vektorba illesztését ligálás-független klónozással. A GST (Glutation-S-Transzferáz) motívum az *in vitro* transzlált fehérje N-terminális végét módosítja. A jelölés révén a lehetővé válik a rekombináns fehérje affinitás kromatográfiával történő tisztítása (redukált glutationt hordozó állófázison, a beépített GST motívummal való kölcsönhatás révén). A harmadik beépített motívum (TEV) egy hét aminosav hosszú szekvencia (*Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly*). Ezt a motívumot ismeri fel és hasítja el a Tobacco Etch Virus (TEV) proteáz. Ennek segítségével az előállított és megtisztított fehérjéről lehasítható a tisztítást lehetővé tevő GST motívum.

A *GST-TEV-LIC* szekvencia kialakításához templátként a GST-helyet tartalmazó *pGEX-2T* expressziós vektort használtam, melyet PCR-rel amplifikáltuk. A reakció terméket tisztítás után *BamHI* enzimmel emésztettem, majd ligáltam az *EcoRV- BamHI* hasított *pEU-3NII* és *pEU-E01 SspI* vektorokba. A ligálási reakcióval kompetens sejteket transzformáltam, majd az ampicillines táptalajon kinőtt telepeken kolónia PCR-rel ellenőriztem a fragmens jelenlétét. A pozitív jelet adó kolóniákból plazmidot izoláltam. Az így nyert plazmidok *GST-TEV-LIC* inzerciót hordozó részét megszekvenáltattuk, mely a várt szekvencia meglétét igazolta.



1. ábra : A GST-TEV-LIC szekvencia

Kutatásaim következő fázisa, a fent ismertetett módon előállított, igazolt szerkezetű, *pEU-3NII* és *pEU-E01* GST-TEV-LIC *in vitro* transzlációs vektorok gyakorlati alkalmazása. Ennek során a fenti vektorokat a növényélettani szempontból jelentős mitogén aktivált kináz (AtMPK6) fehérje előállítására kívántam felhasználni. A létrehozott vektorokba ligálás-független klónozással illesztettem be az AtMPK6 Sheen vektorból a megfelelő végekkel amplifikált AtMPK6 fehérje cDNS-ét. A ligálás-független klónozási reakcióeleggyel *E.coli* DH5 α kompetens baktériumot transzformáltam, majd az ampicillines táptalajon kinőtt telepeken kolónia PCR-t hajtottam végre a fragmens jelenlétének ellenőrzésére. A pozitív kolóniák esetében a PCR terméket agaróz gélen elválasztva a megfelelő bázispár nagyságú terméket kaptam.

A *pEU3-NII-GST-TEV-MPK6*, valamint a *pEU-E01-GST-TEV-MPK6* plazmidokon a vektorok promótereinek megfelelően T7 illetve SP6 polimeráz használatával végrehajtottam az *in vitro* transzkripciót. A transzkripció során nyert mRNS agaróz gélen történt minőségi és mennyiségi ellenőrzését követően templátként szolgált az *in vitro* transzlációs reakciókhoz.

A fehérje bioszintézist kétrétegű *in vitro* transzlációs rendszer használatával kiviteleztem. A szintetizálódott fehérjéket 12%-os poliakrilamid gélelektroforézissel választottam el, és Coomassie kék festék alkalmazásával detektáltam. A GST-MPK6 fehérje a búzacóra kontrollban megtalálható egyéb komponensektől jól megkülönböztethető.

A termelődött fehérjéket Western-blottal GST specifikus ellenanyaggal is ellenőriztem. A Western-blot reakció egyértelműen bizonyította, hogy az általunk klónozott GST-MPK6 fehérje termelődött a transzlációs elegyben.

A rekombináns fehérje tisztítását a GST motívum felhasználásával, affinitás kromatográfia alkalmazásával, redukált glutationt tartalmazó gyantán tisztítottam. A transzlációs elegyben lévő MPK6 GST jelölt fehérje a gyantán megkötődött, míg a nem specifikusan kötődő fehérjéket mosással el tudtam távolítani. A megkötődött GST-MPK6 fehérjét redukált glutation tartalmú pufferral eluáltam. Ezzel a módszerrel egy lépésben nagy

tisztaságú MPK6 fehérjét sikerült előállítani. Ez igazolta, hogy az előállítandó fehérje vektorban kódolt GST-vel történő fuzionáltatása jelentősen leegyszerűsíti a szintetizált fehérjék izolálását.

A következő lépésben a vektorba inszertált proteáz felismerő helyet használtam fel a GST motívum lehasítására. A redukált glutationnal eluált GST-MPK6 fehérjét TEV proteázzal kezeltem, minek következtében a GST jelölés lehasadt. Kísérleteink azt igazolták, hogy a vektorokban kódolt proteáz hasító hely az elvárásoknak megfelelően működik.

Kutatásaim további része a fent bemutatott vektorcsalád további módosítása, működésének optimalizálása volt. Irodalmi források szerint az *in vitro* transzláció hatékonysága fokozható a transzkripció templátként alkalmazott vektor linearizálásával. Linearizáláshoz a *HindIII* enzimet használtam. A *GST-MPK6* fehérjékre vonatkozó összehasonlító vizsgálatokkal megállapítottam, hogy a transzláció hatékonysága közel azonos mind a cirkuláris, mind a lineáris DNS-ből származó mRNS esetében. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a vektor linearizálással járó többlet költség és többlet munka nem áll arányban a transzláció hatékonyságának növekedésével.

A következőben megvizsgáltam, hogy az affinitáskromatográfiához szükséges GST motívum mennyire helyettesíthető egy poli-hisztidin egységgel. Ennek céljából egy hat darab hisztidin egységet tartalmazó jelölést illesztettünk be (*His-TEV-LIC* kazetta), és előállítottam a *pEU-3-NII-His-TEV-LIC*, illetve *pEU-E01-His-TEV-LIC* vektorokat. A His jelölés sokkal rövidebb, mint a GST, így a fehérje tulajdonságait kevésbé befolyásolja, lehasítása nem feltétlenül szükséges a transzlálás után. A megfelelő szekvenciák megtervezését követően a fragmens mindkét szálát megszintetizáltattuk, majd a két szálát megfelelő körülmények közt hibridizáltattuk. Az így elkészített kettős-szálú DNS fragmenst *SpeI* és *BamHI* enzimekkel hasítottuk, és inszertáltuk az azonos restrikciós endonukleázokkal kezelt *pEU-3NII-GST-TEV-AtMPK6* és *pEU-E01-GST-TEV-AtMPK6* vektorokba. A kolónia PCR alapján pozitív telepekből plazmidot izoláltam, és a konstrukciókat szekvenálással is ellenőriztem. A létrehozott vektorokból a korábbiakban ismertettekkel megegyező módon, ligálás-független klónozással létrehoztam a *pEU-3NII-His-TEV-AtMPK6* és *pEU-E01-HIS-TEV-AtMPK6* konstrukciókat.

A *pEU-3NII-His-TEV-AtMPK6* és *pEU-E01-His-TEV-AtMPK6* plazmidokkal végrehajtottam a transzkripciót, majd a transzlációt, és a fehérjemintázatot poliakrilamid gélelektroforézissel analizáltam. A GST-t kódoló konstrukciónál látottakhoz hasonlóan ebben az esetben is Coomassie festéssel detektálható mennyiségű *AtMPK6* fehérje szintetizálódott. A His jelölés gyakorlati felhasználását a kináz fehérje nikkel ionos gyantán

történő tisztításával vizsgáltam, minek eredményeként az imidazol tartalmú pufferrel kivitelezett elúcióval egy lépésben nagy tisztaságú fehérjét nyertem ki.

Az eddig felvázolt kísérletek igazolták, hogy az *in vitro* fehérje transzláció a fehérjetermelés egyik jól használható alternatívája. A továbbiakban azt kívántam tanulmányozni, hogy a búzacsíra alapú *in vitro* rendszerben előállított fehérje mennyiben használható funkcionális vizsgálatokra. Ezek során az *in vitro* transzlációval illetve bakteriális fehérjetúltermeléssel előállított AtMPK6 fehérjék *in vitro* kináz aktivitását vetettem össze.

Az AtMPK6 *E. coli*-ban történő előállításához elsőként a megfelelő vektor konstrukciót kellett létrehoznom. A *pET11a* bakteriális fehérjetúltermelő vektorba restrikciós endonukleázok segítségével, és ligálással a *His-TEV-AtMPK6* fragmenst inszertáltam. A létrehozott *pET11a-His-TEV-AtMPK6* plazmiddal BL21 (DE3), fehérje expresszióra alkalmas *E. coli* törzset transzformáltam, és optimalizált körülmények között indukáltam a fehérje termelődését. A szintetizálódott kinázt a sejtek feltárását követően nikkel ion alapú hisztidin-kötő gyanta segítségével tisztítottam, és TEV proteáz kezeléssel hasítottam.

Az *in vitro* kináz aktivitás meghatározása során összehasonlítottam az *E. coli* rendszerben termelt és a kétrétegű *in vitro* transzlációval előállított AtMPK6 aktivitását. A reakcióelegyekbe azonos mennyiségű AtMPK6-t mértem be, és reakció leállítás után autoradiográfiával detektáltam a mesterséges szubsztrátként alkalmazott mielin bázikus fehérje foszforilálódásának mértékét. Az eredmények azt mutatták, hogy az *in vitro* transzlációs technikával előállított kináz fehérje aktivitása sokszorososa az *E. coli in vivo* expressziós rendszerben termeltének. Ennek legvalószínűbb magyarázata, hogy az eukarióta transzlációs rendszerben előállított fehérje térszerkezete valószínűleg megegyezik a természetessel, valamint az, hogy a búzacsíra kivonatban az AtMPK6-t foszforilálódása is bekövetkezhet, mely aktiválja a fehérje kináz működését.

Vektor konstrukcióink tesztelését követően a *pEU-E01-His-TEV-LIC* vektor széleskörű alkalmazhatóságát igazoltuk négy, állatgyógyászati szempontból fontos, baromfipestis vírusfehérje előállításával. A baromfipestis vírus *La Sota* és *NDVDE* törzseire specifikus fehérjéket cDNS könyvtárból amplifikáltuk, majd ligálás- független klónozással a vektorba inszertáltuk. A vírusfehérjéket kódoló vektorok alkalmazásával a korábban ismertetett eljárásoknak megfelelően nagy tisztaságú fehérjéket izoláltunk. Az előállított fehérjék mind mennyiségi, mind minőségi szempontból megfeleltek a sikeres aptamer szelekció fehérje követelményeinek.

4. Összefoglalás

Munkám során létrehoztam a modern proteomika elvárásainak is megfelelő *in vitro* transzlációs vektorcsaládot. Az optimalizált vektorok lehetőséget teremtenek tetszőleges DNS szakasz gyors klónozására, sikeres *in vitro* transzlálás esetén pedig a fehérje egyszerű tisztítására is. Ezeket az új tulajdonságokat búzacsíra kivonaton alapuló *in vitro* transzlációs rendszer számára kifejlesztett plazmidok módosításával hoztam létre. Az előállított vektorrendszer gyakorlati alkalmazhatóságát több fehérje sikeres előállításával, egyszerű tisztításával, biológiai funkciójuk ellenőrzésével igazoltam. Az így elkészült, búzacsíra kivonaton alapuló *in vitro* transzlációs vektorcsalád, nem csak csoportunk további kutatásainak fehérjeigényét hívatott kielégíteni, hanem szélesebb körben alkalmazható proteomikai vizsgálatokat végző laboratóriumokban.

5. Tézisek

1. Sikeresen megterveztem a *GST-TEV-LIC* valamint *His-TEV-LIC* DNS szekvenciákat, amelyek javítják az irodalomban ismert *pEU-E01* és *pEU-3NII* *in vitro* transzlációs vektorok felhasználhatóságát. Molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával létrehoztam a *pEU-3NII-GST-TEV-LIC*, *pEU-E01-GST-TEV-LIC* valamint a *pEU-3NII-His-TEV-LIC* és *pEU-E01-His-TEV-LIC* *in vitro* transzlációs vektorokat [1].
2. Megterveztem az *AtMPK6* fehérje cDNS ligálás-független-klónozására alkalmas végcsoportokkal rendelkező PCR primereket. Az *AtMPK6 Sheen* vektor templátként történő felhasználásával sikeresen amplifikáltam ezt, a növényi szignál transzdukcióban kulcsfontosságú szerepet játszó fehérjét [3].
3. A létrehozott vektorokba ligálás-független klónozással illesztettem be az *AtMPK6 Sheen* plazmidból ligálás-független klónozásra alkalmas végekkel amplifikált növényi mitogén aktivált kináz (*AtMPK6*) fehérje cDNS-ét. Az így létrehozott vektorok mindegyikén végrehajtottam a transzkripciót és transzlációt. Mindegyik esetben kimutattam, majd affinitás-alapú módszerrel megtisztítottam az *AtMPK6* fehérjét [1].
4. Igazoltam, hogy a cirkuláris DNS templát ugyanolyan hatékonysággal alkalmazható az *in vitro* transzláció templátjaként, mint a lineáris DNS templát [1].

5. *In vitro* kináz reakció alkalmazásával bizonyítottam, hogy az *in vitro* transzlációval előállított AtMPK6 fehérje nagyobb kináz aktivitást mutat, mint a prokarióta *in vivo* rendszerben előállított fehérje [1] [2].

6. Az általunk előállított *in vitro* transzlációs vektorokba sikeresen klónoztuk négy növényi vírus fehérje génjét aptamer szelekcióhoz. A létrehozott DNS templatokon végrehajtottuk a transzkripciót és transzlációt, majd a keletkezett fehérjéket affinitás alapú módszerrel megtisztítottuk [4].

6. A témához kapcsolódó publikációk:

Angol nyelvű publikációk:

1. Bardóczy, V., V. Géczi, T. Sawasaki, Y. Endo, and T. Mészáros. 2008. A set of ligation-independent *in vitro* translation vectors for eukaryotic protein production. *BMC Biotechnol* 8:32. IF: 2,36; I:7
2. Sonkoly, B., V. Bardóczy and T. Mészáros (2009) Expression and Purification of Active Protein Kinases from Wheat Germ Extracts *Methods in Molecular Biology, Plant Kinase Protocols (Schnittger, A., ed.) Humana Press (accepted) Book chapter*
3. Mészáros, T., A. Helfer, E. Hatzimasoura, Z. Magyar, L. Serazetdinova, G. Rios, V. Bardóczy, M. Teige, C. Koncz, S. Peck, and L. Bögre. 2006. The Arabidopsis MAP kinase kinase MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin. *Plant J* 48: 485-498. IF: 6,49

Magyar nyelvű publikációk:

4. Bardóczy, V., Mészáros, T. 2009. Aptamerek-az antitestek lehetséges alternatívái. *Élelmiszervizsgálati közlemények* 2: 105. IF: 0,02

A témához szorosan nem kapcsolódó angol nyelvű publikációk:

5. Arányi, T., M. Ratajewski, V. Bardóczy, L. Pulaski, A. Bors, A. Tordai, and A. Váradi. 2005. Identification of a DNA methylation-dependent activator sequence in the pseudoxanthoma elasticum gene, ABCC6. *J Biol Chem* 280:18643-18650. IF: 5,85

Előadások

1. Bardóczy Viola: Bioanalitikai vizsgálatok rekombináns fehérjék jellemzésére. 2008 Május 22 –Magyar Kémiai Egyesület Richter Gyári Csoport
2. Bardóczy Viola, Mészáros Tamás: *In vitro* translációs vektorok fejlesztése. XIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, 2007 November 9- Kolozsvár
3. Bardóczy Viola, Mészáros Tamás: *In-vitro* translációs vektorok fejlesztése 2007 - Az Oláh György Doktori Iskola konferenciája
4. Bardóczy Viola, Mészáros Tamás: Aptamerek szelekciója makromolekulákra és kismolekulákra, 2006-Az Oláh György Doktori Iskola konferenciája

Konferencia poszterek, abstractok

1. Gergely Lautner, Júlia Szűcs, Róbert E. Gyurcsányi, Zsófia Balogh, Viola Bardóczy, Tamás Mészáros, Beata Komorowska: Selective detection of of plant virus coat proteins by aptamer based biochips, International Conference on Electrochemical Sensors, Dobogókő, 5-10 th of October, 2008
2. Gergely Lautner, Júlia Szűcs, Róbert E. Gyurcsányi, Zsófia Balogh, Viola Bardóczy, Beata Komorowska, Tamás Mészáros: Selective detection of of plant virus coat proteins by aptamer based biochips, A Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlés, Szeged, 2008 augusztus 31. – szeptember 3
3. Bardóczy Viola , Mészáros Tamás: *In-vitro* translációs vektorok fejlesztése. Development of *in-vitro* translation vectors, XIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, 2007 November 9- Kolozsvár
4. Bardóczy Viola, Géczi Viktória, Mészáros Tamás: *In vitro* translációs vektorok fejlesztése 2007- A Magyar Biokémiai egyesület Vándorgyűlése, Debrecen
5. Júlia Szűcs, Gergely Lautner, Róbert E. Gyurcsányi, Viola Bardóczy, Tamás Mészáros, Klára Tóth: Development of biochips for surface plasmon resonance imaging detection of aptamer – ligand interactions; Chemistry conference, Pardubice, 2007 August
6. T. Mészáros; A. Helfer; S. Peck, V. Bardóczy; L. Bögre: MAPKs modules in plant pathogen perception 2005- FEBS Conference, Budapest
7. T. Arányi, M. Ratajewski; V. Bardóczy, L. Pulaski, A. Bors, A. Tordai ; A. Váradi: Epigenetic Regulation of Transcription 2005- FEBS Conference, Budapest