



**Pannon
Egyetem**



Országos Tudományos Diákköri Konferencia

2012

A FliI fehérje klónozása, termeltetése és tisztítása

Készítette: Kovács Mátyás

Témavezető: Dr. Vonderviszt Ferenc

Konzulensek: Dr. Muskotál Adél és Dr. Tóth Balázs

Műszaki Informatikai Kar, Műszaki Kémiai Kutatóintézet

Bio-Nanorendszerek Laboratórium

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Bevezetés és célkitűzés	4
1. Irodalmi áttekintés	5
1.1 A bakteriális flagellum	5
1.2 A flagellum-specifikus-exportrendszer meghatározó komponensei	8
1.3 A flagelláris exportrendszer működési mechanizmusa	10
1.4 A FliI szerepe az exportrendszerben	12
2. Alkalmazott módszerek	14
2.1 Elektroforézis	14
2.1.1 Agaróz gélelektroforézis	14
2.1.2 SDS-Poliakrilamid gélelektroforézis	15
2.2 Expressziós vektorok	16
2.2.1 pET vektorok	16
2.2.2 pGEX vektorok	17
2.3 Gazdasejt	17
2.4 Restrikciós Emésztés	18
2.5 PCR (polymerase chain reaction)	18
2.6 Ligálás	21
2.7 Transzformálás	21
2.8 FPLC (fast protein liquid chromatography)	23
2.8.1 Affinitás kromatográfia	23
3. Elvégzett kísérletek és kiértékelésük	24
3.1 Szükséges anyagok, berendezések	24
3.2 FliI génjének amplifikálása	25

3.3 A pET23b-GST-TEV plazmid tisztítása	26
3.4 A FliI inszert és a pET23b-GST-TEV plazmid emésztése	27
3.5 A DNS fragmentumok ligálása	28
3.6 TOP 10 kompetens sejt transzformálása	30
3.7 Ellenőrző emésztés.....	30
3.8 BL21-(DE3) kompetens baktériumtörzs transzformálása.....	31
3.9 A GST-FliI fúziós fehérje bakteriális termeltetése, feltárása.....	32
3.10 A GST-FliI fúziós fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával GSTrap 5ml-es oszlopon	33
3.11 A tiszta FliI előállítása TEV proteolitikus enzim használatával	35
4. Összefoglalás	39
5. További célok	41
6. Irodalomjegyzék	41
Köszönetnyilvánítás.....	47

Bevezetés és célkitűzés

A baktériumok flagellumok segítségével mozognak, amelyek egy a sejtmembránban elhelyezkedő molekuláris motorból és a hozzá kapcsolódó helikális filamentumból állnak. A filamentum több ezer flagellinből és néhány egyéb fehérje alegységből áll, amelyek a citoplazmában szintetizálódnak és egy speciális exportrendszer segítségével a helikális filamentum belső csatornáján keresztül jutnak el a beépülési helyükre a filamentum végére.

Az exportrendszer kulcsfontosságú eleme a FliI ATPáz. Ez egy 49 kDa nagyságú fehérje, melynek N-terminális szegmense 110 aminosavból áll, ez felelős az egyéb flagelláris fehérjékkel való kölcsönhatásért, centrális régiója pedig ATPáz aktivitással rendelkezik. A FliI az ATP hidrolízise során felszabaduló energia segítségével végzi az exportálódó fehérjekomponensek kitekerését és bejuttatását az exportcsatornába.

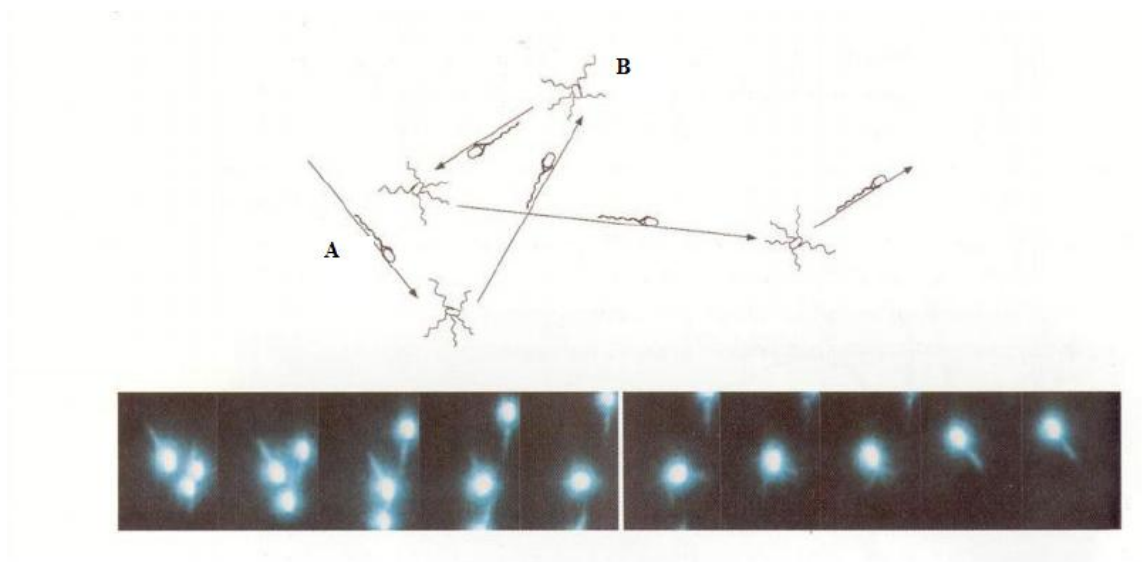
A korábbi tisztítási eljárásoknál problémaként lépett fel a FliI aggregációja és érzékeny N-terminális régiójának elemésztődése. Munkám során génsebészeti módszerekkel a glutation-S-transzferáz (GST) fehérjét a FliI N-terminális régiójához fuzionáltattam, így a GST tag megvédi a fehérje sérülékeny N-terminális részét és elősegíti annak feltekeredését, s mindezek mellett lehetővé teszi a fehérje affinitás kromatográfiás tisztítását glutation tartalmú oszlopon. A FliI és a GST közé a TEV proteáz enzim specifikus hasító helyét illesztettem, mely lehetővé teszi a GST tag eltávolítását. Feladatom volt még a GST-FliI fúziós fehérje nagy mennyiségű bakteriális termeltetése és tisztítása. Az így előállított FliI olyan vizsgálatok alapjául szolgálhat, amelyekkel tisztázhatjuk szerepét a flagelláris exportszubsztrátok felismerésében és kijuttatásában.

1. Irodalmi áttekintés

1.1 A bakteriális flagellum

A baktériumok flagellumok segítségével mozognak, amelyek egy a sejtmembránban elhelyezkedő molekuláris motorból és a hozzá kapcsolódó helikális filamentumból állnak [1].

A baktériumok helyváltoztatására kétféle módszert figyeltek meg. Ha a flagelláris motor az óramutató járásával ellentétes irányban mozog, a filamentumok egy nagy helikális köteggé állnak össze, s mint egy propeller hajtják előre a baktériumot. Ezt a mozgást nevezik úszásnak (*run*). Ha a motor forgási iránya megváltozik és a filamentumokat az óramutató járásával megegyező irányban forgatja, a helikális kötegek szétesnek és egyfajta kapálózó (*tumble*) mozgás jön létre. A kétfajta mozgás sűrű váltakozása során a sejt haladási iránya rövid időn belül változik. Az úszási minták irányított váltakozásának frekvenciáját a környezeti paraméterek (pl: tápanyag, koncentráció) befolyásolják. A mozgás frekvenciája illetve az elmozdulás nagysága abban az irányban a nagyobb, ahol a számára kedvezőbb feltételeket találja (1.ábra) [2, 3].



1. ábra: A baktériumok mozgása: (A) úszás (*run*), (B) kapálózás (*tumble*)

Namba & Vonderviszt 1997

A bakteriális flagellum három fő részből áll: a bazális testből-, mely a sejtmembránba ágyazott motorként működik, a kampóból (hook) és a filamentumból (2.ábra).

A motor meghajtását a membránon keresztül fellépő proton gradiens biztosítja, amely hatására akár 90000-es percenkénti fordulatszámra is képes. A motor egy membránba ágyazott álló és egy forgó részt tartalmaz [4].

A kampó egy axiális fehérjékből felépülő görbült struktúrájú erőátviteli szerkezet, mely a filamentum és a motor közötti kapcsolatot biztosítja. A kampó képes a forgástengely irányának megváltoztatására. Ez teszi lehetővé, hogy a filamentumok ne a motor tengelye körül forogjanak, hanem arra közel merőlegesen. A kampó és a filamentum között helyezkednek el a HAP3 és HAP1 kampó asszociált fehérjék [5, 6].

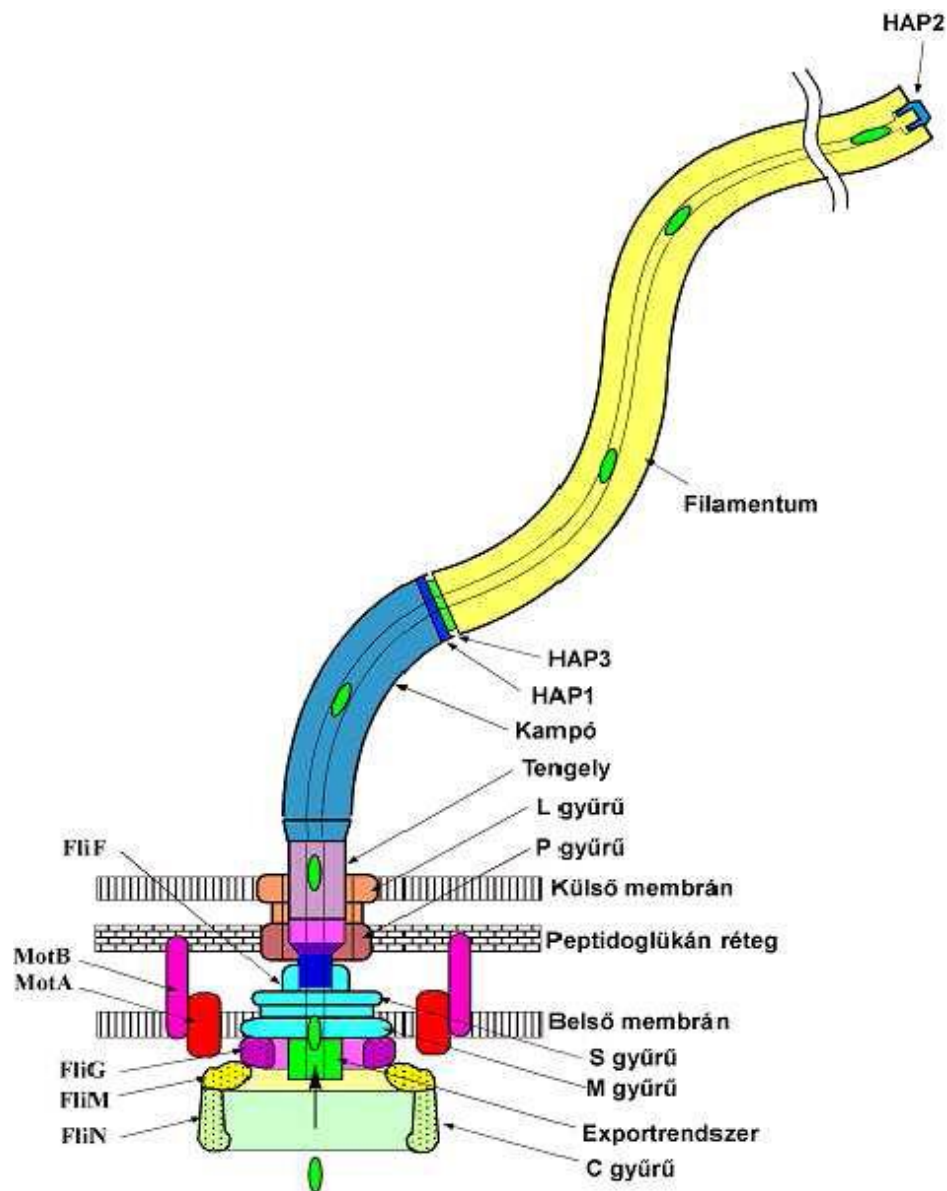
A flagelláris filamentum több tízezer flagellin (FliC) kópiájából áll, amelyek a citoplazmában szintetizálódnak és egy speciális exportrendszer segítségével a helikális filamentum belső csatornáján keresztül jutnak el a beépülési helyükre a növekvő filamentum végére.

A filamentum helikális szerkezetű, melynek átmérője 20 nm körüli, míg hossza 10-20 μm körül változhat. Az flagellin fehérjék a citoplazmában szintetizálódnak, majd a filamentum belső üregén keresztül jutnak el a beépülési helyükre a filamentum végére, ahol spontán polimerizációra képesek. Ez önszerveződő tulajdonságuknak, illetve a HAP2 fehérje komplexnek köszönhető. A flagellin alegységek szétdiffundálását az extracelluláris térben a HAP2 sapka akadályozza meg, illetve ez irányítja az alegységek megfelelő beépülését. A HAP2 egy intelligens fehérje, mely tulajdonsága a flagellin kötésében nyilvánul meg. Egyszerre képes erősen megkötni a molekulát, illetve időszakosan, a beépülés pillanatában elengedni azt. [7].

A motor tengelyét felépítő négy-féle rod fehérjét, a hook fehérjét, a flagellint, és a HAP fehérjéket együttesen axiális fehérjéknek nevezik. Az axiális fehérjék mind a citoplazmában szintetizálódnak és a baktérium flagelláris exportmechanizmusa segítségével jutnak el beépülési helyükre a flagellumon belül. Közös jellemzőjük hogy kiterjedt rendezetlen terminális régiókkal rendelkeznek. Ezek a rendezetlen régiók a molekulák legkonzerváltabb részei, ami fontos szerkezeti és funkcionális szerepükre utal [7, 8].

A flagellin molekulák az önszerveződő képességükénél fogva feltételezhetően képesek lennének a sejten belüli polimerizációra, viszont ezt az úgynevezett dajkafehérjék (chaperonok) akadályozzák meg.

Az exportrendszer egyik ilyen chaperonja a FliS, ez egy citoplazmatikus fehérje, amely megakadályozza az exportálandó szubsztrátum korai aggregációját a citoplazmában [9]. Egy másik dajkafehérje a FliJ, amely az exportszubsztrátumot kötve szerepet játszik a flagelláris exportban.



2. ábra: A bakteriális flagellum szerkezeti képe

A filamentum átmérője 24 nm, míg hossza 10 - 20 μm közötti.

[2]

1.2 A flagellum-specifikus-exportrendszer meghatározó komponensei

A baktériumok többféle exportrendszerrel rendelkeznek, melyek különféle anyagok (pl. fehérjék) kijuttatását végzik a membránon keresztül a külvilág felé. A gram- negatív baktériumok esetében több (I-V) különböző export mechanizmus ismert. A III. típusú exportrendszer jellemzője, hogy bizonyos fehérjéket juttatnak át a sejtmembránon és a kijuttatandó fehérjék nem rendelkeznek semmiféle exportszignállal vagy szignálpeptiddel, ami a membránon való transzportban jelként szolgálna. A dolgozatban vizsgált baktériumok flagelláris exportapparátusa is ezzel a III. típusú szekréciós rendszerrel mutat rokonságot. A flagelláris export komponensekben jelentős szekvenciális hasonlóság figyelhető meg a patogén baktériumok injekciós apparátusával, mely a III. típusú szekréciós rendszerrel juttatja a virulens faktorait a fogadó sejtbe [2, 3, 10, 11, 12].

A bakteriális flagellumok túlnyomó része a sejtmembránon kívül helyezkedik el. Az axiális fehérjéknek át kell jutniuk a citoplazma membránon, illetve bizonyos komponenseknek a külső membránon is. Az alkotó axiális fehérjeegységek egy speciális exportmechanizmussal a flagellumok belső csatornáján át a flagellum-specifikus exportrendszer segítségével kerülnek ki a sejtől [13]. Kimutatták, hogy az exportfolyamat hajtóereje a citoplazma membránon keresztül fellépő proton gradiens [14, 15].

A feltételezések szerint ez az exportrendszer a bakteriális flagellum bazális test MS gyűrűjének citoplazma felőli oldalán, a C gyűrű belsejében helyezkedik el [2, 13]. A bakteriális exportrendszert felépítő komponensek három csoportba sorolhatók: integrális membránfehérjék (FliO, FliP, FliQ, FliR), vizes közegben működő fehérjék (FliI és a FliH) és a citoplazmatikus membránba ágyazott perifériális membránfehérjék (FlhA és az FlhB) [1]. Az egyes fehérjék szerepének kiderítésére elvégzett vizsgálatok azt mutatják, hogy az exportfolyamatban az FlhA, FlhB és a FliI fehérjéknek van meghatározó szerepük [10].

A legújabb vizsgálatok sikerrel azonosították a flagellum-specifikus ATPáz molekulát (FliI), mely nagy valószínűséggel kulcsfontosságú szerepet tölt be a flagellum-specifikus exportrendszerben. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a FliI

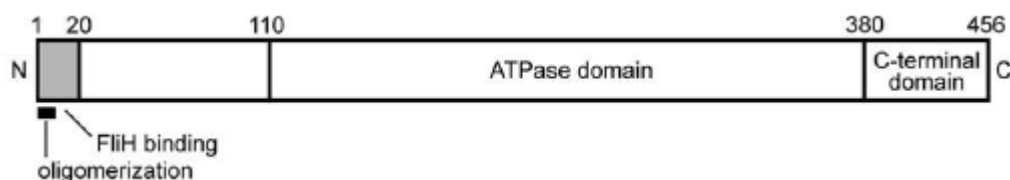
fehérje aminosav szekvenciája rokonságot mutat bizonyos baktériumok virulens fehérjeinek kiválasztására specializálódott exportrendszerének egy komponensével is [2].

A FliI egy 49 kDa nagyságú fehérje, melynek N-terminális szegmense 110 aminosavból áll, ez felelős az egyéb flagelláris fehérjékkel (pl.: FliH) való kölcsönhatásért, centrális régiója ATPáz aktivitással rendelkezik, itt van az ATP hidrolízis katalitikus helye, míg C-terminálisának funkciója azonosítatlan [16]. Továbbá, a vizsgálatok arra utalnak, hogy a FliI első 20 aminosava nemcsak a FliH-val való interakcióért felelős, hanem a saját oligomerizációs képességét is szabályozza (3.ábra.). A FliI az ATP hidrolízise során felszabaduló energia segítségével végzi az exportálódó fehérjekomponensek kitekerését és bejuttatását az exportcsatornába. A FliI feladatát csak más fehérjékkel alkotott multikomplex rendszerben képes elvégezni, hasonlóan az F_0F_1 ATPáz β alegysége esetében [2, 16].

A FliI-vel szoros együttműködési kapcsolatban van egy másik citoplazmatikus fehérje a FliH, mely az oldatban dimerként van jelen, s a FliI-vel komplexet képez (heterotrimer).

Feltételezések szerint a FliH elsődleges feladata a FliI működésének szabályozása, valamint ATPáz aktivitásának gátlása. A FliH addig gátolja a FliI ATPáz hidrolizáló képességét, amíg az exportrendszer képessé válik, hogy felhasználja ezt az energiát az axiális fehérjék továbbítására [17, 18, 19, 20].

Azt tapasztalták, hogy az axiális fehérjék jelenléte stimuláló hatással van a FliI ATPáz aktivitására. Továbbá a foszfolipid molekulák jelenléte megtízszerezi a FliI ATPáz aktivitását.



3. ábra: A FliI ATPáz funkcionális doménjei

N-terminális: FliH kötődés és oligomerizáció szabályozás. Centrális régió: ATP hidrolízis

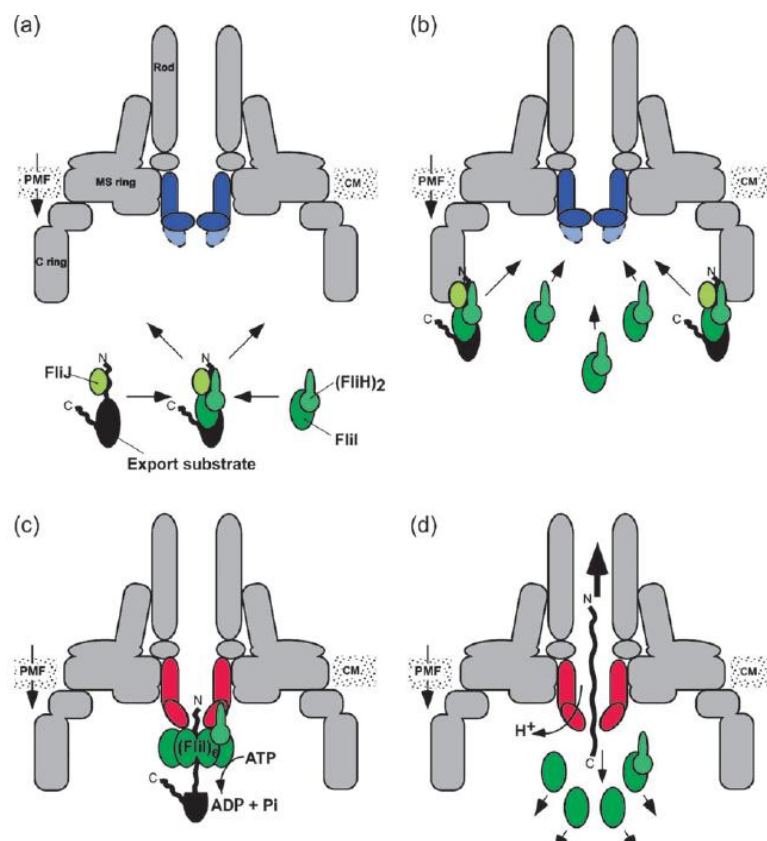
[16]

1.3 A flagelláris exportrendszer működési mechanizmusa

Az eddigi ismeretek alapján a flagellum-specifikus exportrendszerben az FlhA, FlhB és a FliI játsszák a főszerepet. A flagelláris fehérje export a fehérje szintézis gátló anyagok (spectinomycin és klóramfenikol) használata során sem szűnik meg, mely jelzi, hogy a fehérje export nem kapcsolódik közvetlenül a fehérje szintézishez. Továbbá azt is sugallja, hogy ezeknek a fehérjéknek az aminosav szekvenciája elegendő jelként szolgál az exportrendszer számára. Valószínűleg az exportszubsztrátumok N-terminális régióiban helyezkedik el az export szignál, de ez még nem bizonyított az elsődleges szekvencia szinten [2].

Az export rendszer központi csatornájának átmérője indukálja azt a kérdést, hogy hogyan képes végighaladni az exportálandó szubsztrátum a mindössze 2 nm átmérőjű csövön? Melyek azok a mechanizmusok, amelyek kitekerik a molekulát? Illetve mi annak az energiának a forrása, ami felhasználódik, mind a kitekeréshez, mind a csatornán való transzlokációhoz?

A flagelláris exportmechanizmus máig sem teljesen tisztázott folyamata a 4. ábrán látható.



4. ábra: A flagelláris export mechanizmus

- a): A FliH₂FliI-FliJ-szubsztrátum komplex kialakulása. b): Csatlakozása a C- gyűrűhöz. c): A FliH₂FliI-szubsztrátum komplex kötődése FlhA-FlhB platformhoz ahol hexamer gyűrűt képez és a FliH_xFliI₆ hexamer elősegíti az export szubsztrátum N-terminális szegmensének kezdeti belépését az exportcsatorna kapujába. d): Megtörténik az ATP hidrolízis, a FliH_xFliI₆ hexamer szétesik, az exportszubsztrátum kitekeredik és a polipeptid lánc kijut az exportcsatornán.

[2]

A folyamat első lépéseként a citoplazmában a FliH₂FliI dimer és a szubsztrátum-FliJ kötődéséből kialakul a FliH₂FliI-FliJ-szubsztrátum komplex. (4./a) ábra). Majd a FliH₂FliI-FliJ-szubsztrátum komplex csatlakozik a C gyűrűben levő FliN-hez, növelve a lokális komplex koncentrációt. (4./b) ábra). A FliJ kötődik a C gyűrűben levő FliM-hez, mely lehetővé teszi a FliH₂FliI-szubsztrátum komplex felszabadulását a C gyűrűről. A FliH₂FliI-szubsztrátum komplexnek így lehetősége van az MS gyűrűben levő FlhA-FlhB platformhoz kötödni, ahol hexamer gyűrűt képez. Az FlhA-FlhB platform és a FliH_xFliI₆ hexamer kölcsönhatásának eredményeként a FliH_xFliI₆ hexamer elősegíti az export szubsztrátum N-terminális szegmensének kezdeti belépését az exportcsatorna kapujába. (4./c) ábra). Ha az N-terminális szegmens kötődött a csatorna

bejárati kapujába, megtörténik az ATP hidrolízis. A felszabaduló energia arra fordítódik, hogy megkönnyítse a FliH_xFliI₆ hexamer szétesését és az exportkapuról való leválását, az exportszubsztrátum kitekerését és a polipeptid lánc kijutását, illetve a kezdeti FliH₂FliI dimerek összekapcsolását a következő ciklusban történő felhasználásához. (4./d) ábra). [2, 21, 22, 23].

Az exportszubsztrátum egymást követő kitekerésének, illetve a polipeptidlánc szűk exportcsatornában bekövetkező transzlokációjának a hajtóereje, a motort is működtető proton gradiens hatására bekövetkező egy-dimenziós Brown mozgás [2].

1.4 A FliI szerepe az exportrendszerben

A FliI működésével kapcsolatban van néhány nyitott, megválaszolásra váró kérdés.

Nem teljesen világos, hogy a kijuttatandó fehérjéket miként ismeri fel az exportapparátus, mivel nem rendelkeznek lehasadó szignál szekvenciával vagy bármilyen közös exportszignállal, ami jelként szolgálna az exportrendszer számára, ezen belül a FliI számára.

Eddigi eredmények azt mutatják, hogy a flagellin 26-47 szegmense között levő 22 aminosav hosszúságú szakasz tartalmazza a felismerő jelet [24, 25]. Összehasonlítva a különböző fajok flagellin fehérjéinek aminosav szekvenciáját, kiderült, hogy az export szignált tartalmazó szegmensekben nagyon erős konzerváltság figyelhető meg. Az azonosított exportszignállal fuzionáltatott rekombináns fehérjék szintén kijutottak a sejten kívüli térbe [26, 27]. Az exportszignál a flagellin molekula rendezetlen N-terminális régiójában található. Ez a rendezetlen N-terminális rész egy közös struktúrája, a bakteriális flagellum axiális fehérjéinek [28]. Számos bizonyíték utal arra, hogy ez az export szignál, a kijuttatandó molekula rendezetlen N-terminális régiójában helyezkedik el [29, 30]. Úgy tűnik, hogy ez a rendezetlen struktúra az alapvető felismerési jel, a flagellum-specifikus exportrendszer számára.

Az is köztudott, hogy a flagellin és más egyéb exportszubsztrátum a FliI ATP-ázzal lép kölcsönhatásba, növelve ATPáz katalitikus aktivitását [31]. Az előzetes kísérletek alapján az is kiderült, hogy az export szignállal csatolt idegen fehérjék, hasonló mértékben előidézik a FliI ATP hidrolízisét. A megfigyelések arra utalnak,

hogyan a FliI felismeri és megköti az exportszignált. Ezért fontos lenne ennek a folyamatnak a pontos mechanizmusát ismerni.

A FliI-exportszignál (FliI-ES) jellemzéséhez első lépésként ki kell dolgozni egy magas hozamú tisztítási protokollt a FliI fehérjére, mert szükség lesz nagy mennyiségű FliI-re a nagyszámú kísérletekhez, hogy tanulmányozni tudjuk a FliI-ES kölcsönhatást és a FliI oligomerizációs szerepét.

A korábbi tisztítások során hisztidin-tag-es FliI-t expresszáltattak E.coli sejtben, azonban ezzel a változattal állandó problémaként lépett fel a FliI aggregációja, inklúziós test formába kerülése és érzékeny N-terminális régiójának elemésztődése.

A problémák megoldására és a FliI fehérje nagy mennyiségű előállítására egy újfajta tisztítási módszert dolgoztam ki. A hisztidin-tag helyett, génsebészeti módszerekkel a glutation-S-transzferáz (GST) fehérjét a FliI N-terminális régiójához fuzionáltattam, amely megvédi a fehérje sérülékeny N-terminális részét és elősegíti annak feltekeredését. Ezenfelül lehetővé teszi a fehérje affinitás kromatográfiás tisztítását glutation tartalmú oszlopon. A FliI és a GST tag közé a vírus TEV proteáz enzim specifikus hasító helyét illesztettem, mely lehetővé teszi a GST-tag eltávolítását.

2. Alkalmazott módszerek

2.1 Elektroforézis

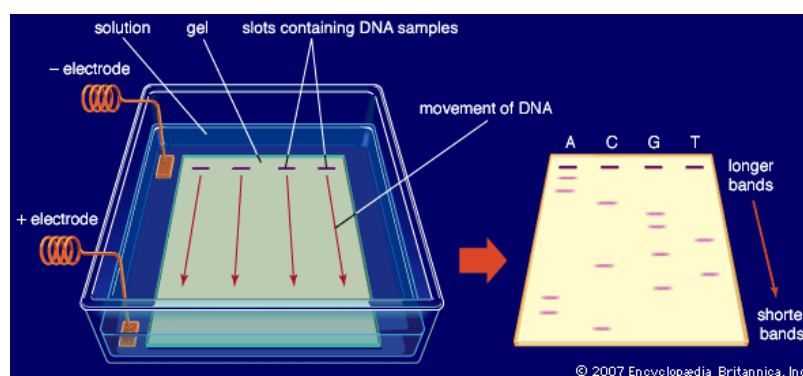
Az elektroforetikus módszerek alapelve, hogy a töltéssel rendelkező molekulák az eredő töltésüknek megfelelően elektromos térben az ellentétes töltéssel rendelkező elektród felé vándorolnak, és ha vándorlásuk sebessége különböző, egymástól fizikailag elválaszthatók. A vándorlás sebessége függ a molekula töltésétől, tömegétől, alakjától és az elektromos tér nagyságától. A szeparáció javítására különböző szilárd mátrixokat használnak [32].

2.1.1 Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz egy poliszacharid, mely vizes szuszpenziója hevítés hatására megolvad, majd lehűlés után géllé dermed. Az agarózláncok egymással, hidrogénhidakkal kapcsolódva térhálós szerkezetet hoznak létre.

Az elválasztást végző inert porózus gél egyfajta molekulaszűrőként viselkedik, ezáltal a nukleinsavakat méret alapján szeparálja. A futtatás zsebekkel ellátott, vízszintes helyzetű gél lemezben történik (5. ábra).

A különböző méretű nukleinsavak az egyenáram hatására különböző sebességgel mozognak. A kis molekulák gyorsan haladnak előre a gélben, míg a nagyobb molekulák szinte teljesen visszatartódnak. A molekula méretét egy standardként szolgáló DNS oldattal becsülhetjük meg. Az agaróz gélelektroforézis RNS és DNS fragmentumok frakcionálására alkalmazott módszer [32, 33].



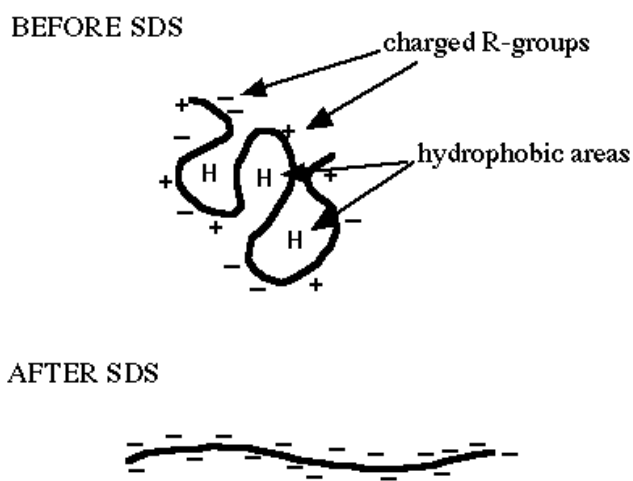
5. ábra: Az agaróz gélelektroforézis kivitelezése

(<http://media.web.britannica.com/eb-media/72/47672-004-4E16B61F.gif>)

2.1.2 SDS-Poliakrilamid gélelektroforézis

Az egyik leghatékonyabb fehérjeszeparációs módszer melyben egy denaturáló körülmény van jelen a Na-dodecil-szulfát (SDS), amely alkalmazásával lehetővé válik a fehérjéknél a móltömeg alapján való elválasztás. Az SDS hasítja a fehérjékben a hidrogénhid kötések, illetve semlegesíti a fellépő hidrofób kölcsönhatásokat, melynek eredményeképp kitekeri a fehérjét. Az SDS erősen kötődik a polipeptidhez, melynek az aminosavakkal arányos negatív töltése lesz (6.ábra). Az egységesen negatív töltésű fehérjék az elektroforézis során méretüktől függő sebességgel vándorolnak a pozitív pólus felé. A kapcsolódó SDS mennyisége arányos a fehérje méretével, ezért az áramlási sebessége, futási távolsága fordítottan arányos a fehérje molekulatömegével. Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis nemcsak molekulasúly szerinti szétválasztásra alkalmas, hanem a fehérjék molekulasúlyának meghatározására is, ismert molekulatömegű fehérjék mellett futtatva [32, 33].

A szeparálni kívánt fehérje mintát SDS és merkaptotanol jelenlétében forralják, majd két üveglap között polimerizálódott poliakrilamid gél zsebeibe töltik. Az elektroforézis függőleges helyzetben történik [32]. A fehérjéket egy speciális festékkel lehet láthatóvá tenni, mely a gél anyagához nem kötődik, majd a nem kötődő festéket kioldva a fehérjék kék sávként jelennek meg a gélen.



6. ábra: Az SDS hatása a fehérjékre

Az SDS hasítja a fehérjékben a hidrogénhid kötések, kitekeri a fehérjét, s az aminosavakkal arányos negatív töltést eredményez.

(<http://www.davidson.edu/academic/biology/courses/molbio/sdspage/SDSwprotein.GIF>)

2.2 Expressziós vektorok

Ezeket a transzlációs vektorokat úgy tervezik meg, hogy a lehető legnagyobb mennyiségben képződjön a klónozott génről a túltermelni kívánt fehérje. Ez a vektorokba beépített erős promotereknek és riboszóma kötőhelyeknek köszönhető. A legtöbb klónozó vektor indukálható (pl: izopropil-tiogalaktoziddal (IPTG)).

Az idegen fehérjék (főleg nagy mennyiségben) toxikus hatással lehetnek a gazdasejt számára, ezért előnyös, ha a klónozott gén kikapcsolt állapotban van a vektorban és csak a megfelelő időben fejeződik ki, külső behatás következtében. A biomassza képződését és a fehérje termelésének folyamatát időben elválasztjuk [34].

Az indukció folyamata, jelentősége:

- A túltermelni kívánt fehérje génjét klónozzuk a pET vektorba
- Ezt a konstrukciót transzformáljuk BL21-(DE3) E. coli gazdasejtvonalba, mely a kromoszómáján tartalmazza az IPTG-vel indukálható T7 RNS polimeráz gént
- IPTG hozzáadásakor megindul a T7 RNS polimeráz enzim termelődése,
- ami a vektoron levő promóterhez kapcsolódva megindítja a túltermelni kívánt fehérje kifejeződését [35]

Az expressziós vektorokkal gyakran fúziós fehérjét állítanak elő, melynek N-terminálisát a vektorban levő kódoló szekvenciák, C-terminálisát pedig a klónozott gén határozza meg (vagy fordítva). A fúziós fehérjék stabilitása növekedhet a baktériumsejtekben, az idegen fehérjékhez képest. Ezenfelül megkönnyíthetik a fehérje tisztítását (pl: affinitás kromatográfiás módszerrel) [34].

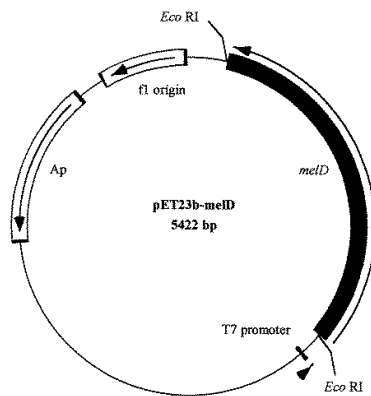
Az általam termelni kívánt fúziós fehérjének a GST-FliI-nek is, az N-terminálisú, GST-t kódoló gén a transzlációs (pET23b) vektorban van, míg a fúziós fehérje C-terminálisát meghatározó klónozott gén az amplifikált FliI. A fúziós fehérjék nagy előnye az egyszerűbb izolálásukban rejlik.

2.2.1 pET vektorok

A pET vektorok olyan vektorok, melyekben a termeltetni kívánt fehérjék transzkripcióját a T7 promoter biztosítja (*plasmid for expression by T7 RNA polymerase*) (7.ábra). A T7 promoter génjének a transzkripcióját csak a T7 RNS

polimeráz végzi. Az *E. coli* saját RNS polimeráza nem. A T7 RNS polimeráz kifejeződését viszont maga a gazda sejt szabályozhatja.

A T7 RNS polimeráz alapú rendszer előnye a nagyfokú szelektivitás, valamint gyorsabb, mint az *E. coli* saját RNS polimeráza [35].



7. ábra: pET23b vektor szerkezeti képe
[24]

2.2.2 pGEX vektorok

A pGEX vektorokban a termeltetni kívánt fehérje génjét glutation-S-transzferáz (GST) génjével fuzionáltatják. A GST egy 26 kDa-os fehérje, amely *E. coli*-ban aktívan termeltethető. A GST és a fúziós partner között egy proteolitikus hasító helyet alakítottak ki. A pGEX vektorokban szintén megtalálható az ampicillin rezisztencia génje mely a szelekciót segíti. A létrehozott GST-fúziós fehérjék glutationt tartalmazó oszlopon tisztíthatók, ezen kívül a GST tag része az adott vágóhelyet felismerő restrikciós enzimmel eltávolítható. A gének transzkripcióját a tac promóter vezérli, amely szintén IPTG-vel indukálható [35].

2.3 Gazdasejt

Az általam használt fehérjetermelő gazdasejt a BL21-(DE3). A DE3 egy λ -bakteriofág származék. A lizogén állapot létrejöttével az *E. coli* kromoszóma tartalmazza a T7 RNS polimeráz génjét a további szabályozó elemekkel együtt, s így IPTG-vel indukálható [35].

2.4 Restriktációs Emésztés

Az a genetikai művelet, mely során a restriktációs endonukleáz enzimekkel DNS hasítás történik. A baktériumok természetes védekezési rendszerében szerepelnek olyan enzimek, amelyek megakadályozzák az idegen DNS invázióját a molekula feldarabolásával, saját bakteriális DNS-üket azonban nem hasítják (modifikáció). Ezeket az enzimeket restriktációs endonukleázoknak hívjuk. Az endonukleáz elnevezés arra utal, hogy az idegen molekula belsejében hasít és nem a DNS végén. A restriktációs endonukleázok arról a mikroorganizmusról kapják nevüket, amiből izolálják őket [32, 34, 36].

Ezen enzimek közös jellemzői, hogy a DNS-en 4, 6 vagy 8 bázispárnyi úgynevezett palindrom (a két lánc szekvenciája 5' → 3' irányba olvasva azonos) szekvenciát ismernek fel specifikusan és vagy a felismert szekvencián belül vagy attól néhány bázispárra elhasítják a DNS molekulát. A hasítás történhet a két szálon ugyanott vagy néhány bázis távolságra. Az első esetben úgynevezett tompa végek (*blunt end*) (8.ábra), míg a második esetben úgynevezett ragadós végek (*sticky end*) alakulnak ki (9.ábra). Az enzimek alkalmazhatóságát a reprodukálható hasítás teszi lehetővé, ami azt jelenti, hogy mindig ugyan ott vágják el a DNS-t. Ezeket az enzimeket általában klónozáskor vektorok kinyitására illetve a beültetendő fragmentum kivágására használják. [32, 34, 36].



8. ábra: A SmaI restriktációs enzim tompa végű hasítása



9. ábra: Az EcoRI restriktációs enzim ragadós végű vágása

2.5 PCR (polymerase chain reaction)

A polimeráz láncreakció (PCR) egy molekuláris biológiai technológia DNS enzimatisz amplifikálására (azaz a kópiák megsokszorozására) élő szervezet, például *E. coli* vagy élesztő, igénybevétele nélkül *in vitro* körülmények között. A módszert

1985-ben Mullis dolgozta ki. A technológia lehetővé teszi a DNS egy rövid, jól definiált szakaszának (primerek által közrefogott rész) néhány óra alatti megsokszorozását, analízis céljából.

A PCR reakció alapvető komponensei:

- DNS-templát – ez tartalmazza a felsokszorozni kívánt DNS szakaszt
- Primerek – (forward és reverse primer) a DNS két szálához kapcsolódik bázispárosodással és az amplifikálódó DNS szakaszt fogja közre
- DNS polimeráz – (Taq polimeráz) enzim, amely a primerekhez kötődik és lemásolja az adott DNS szakaszt
- Nukleotidok – amelyekből építkezik a DNS polimeráz enzim
- Puffer – a reakció és az enzim számára megfelelő közeg

A felsokszorozni kívánt DNS-szakasz szekvenciáját nem kell feltétlenül ismerni. Csúpan a két végén elhelyezkedő, az adott DNS- szakaszt határoló primerek szekvenciájának ismerete szükséges. A felsokszorozni kívánt DNS-fragment sokkal nagyobb lehet (akár 10 kbázis), mint a szükséges primerek, melynek tipikus hossza 20-30 bázis [37].

Az amplifikálandó DNS-szakaszt a primerek kiválasztásával határozzák meg. A primerek rövid, mesterséges DNS-szálak, amelyek komplementerek az amplifikálandó DNS szakasz elejével és végével. Ezek a többnyire 20 – 25 bázispárnyi primerek a templátként szolgáló DNS megfelelő szakaszához kötődve a DNS polimeráz enzimnek jelölik ki a felsokszorozandó fragmentumot. A DNS polimeráz a bázispárosodás szabályainak megfelelően 5'→ 3' irányba szintetizálja a templát DNS-sel komplementer új szálát. Miután a DNS polimeráz befejezte a szintézist, a primerek helyén keletkezett hézagot feltölti nukleotidokkal.

A primerek olvadáspontjának 60 C⁰ körül kell lennie.

A PCR eljárás körülbelül harminc ciklus egymásutánjából áll. A ciklusok ismétlődését a computer által vezérelt PCR (thermocycler) biztosítja.

Mindegyik ciklus három lépés:

- 1. lépés:** a reakció elegyet 92-95 C⁰-ra hevítjük, ekkor a kettős szálú DNS molekula *denaturálódik*, a hidrogénkötések felbomlanak, a két lánc elválík egymástól.

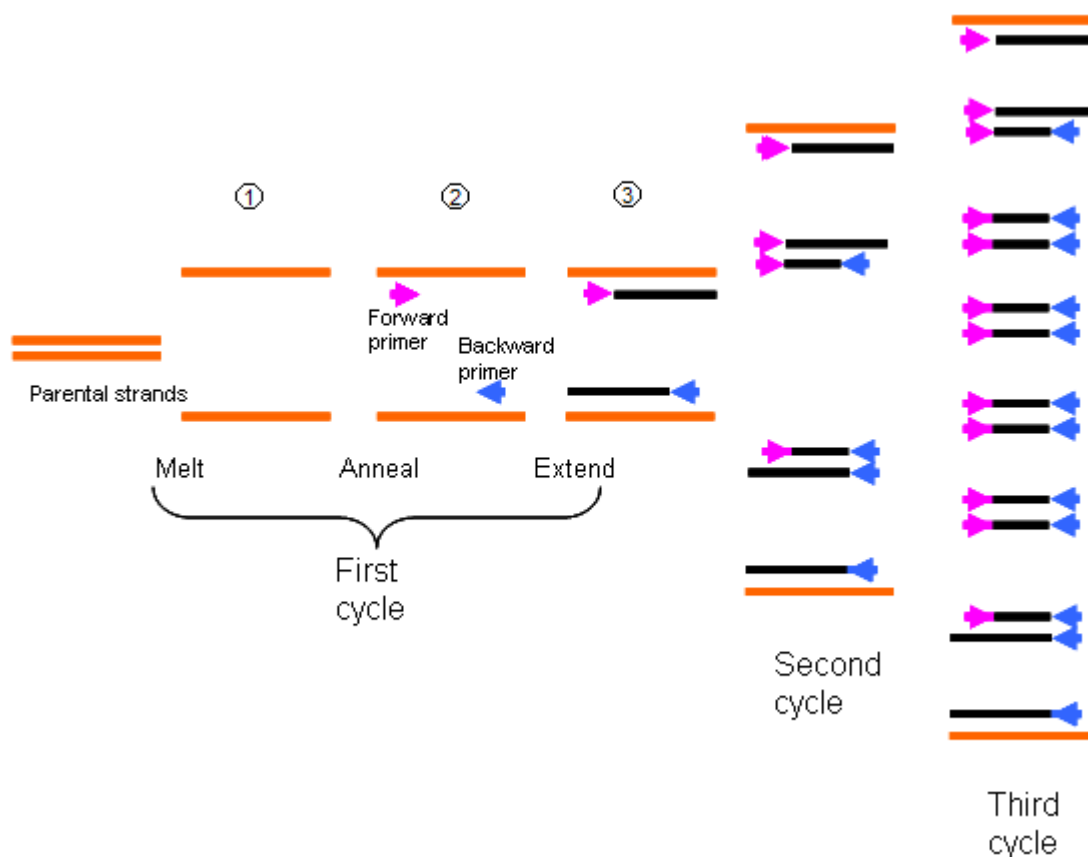
2. lépés: a reakcióelegyet 30-65 °C-ra hűtjük. Ezt a lépést *annealing* vagy kapcsolódási lépésnek nevezzük. Ez az a hőmérséklet, amelyen a primerek a DNS komplementer részeihez hibridizálnak. (általában 5°C-kal alacsonyabb, mint a primerek olvadáspontja)

3. lépés: egy újabb felmelegítés következik 65-75 °C-ra. Ez a hőmérséklet a DNS polimeráz aktivitásának a legkedvezőbb, ekkor *szintetizálja* az enzim a DNS templátról az új komplementer DNS szálakat [38].

A három lépés végére a kiindulási DNS mennyiség megkétszereződik.

Ezután következik egy újabb ciklus (DNS denaturálás, primer kötődés, DNS szintézis), így a 30. ciklus végére körülbelül 10^6 sokszorozás érhető el.

A polimeráz láncreakciót a 10. ábra szemlélteti.



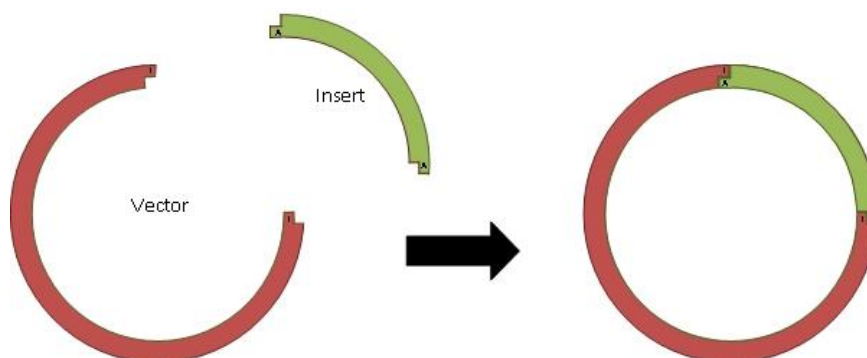
10. ábra: A PCR ciklus folyamatának ábrája. (1): denaturáció 92-95°C-on. (2): annealing 30-65°C-on. (3): DNS szintézis 65-75°C-on. Az eredményül kapott két DNS-szál a következő ciklus templátja lesz, azaz minden ciklusban megkétszereződik a DNS mennyisége.

(<http://www.korinfo.hu/drupal/en/node/8912>)

2.6 Ligálás

A restrikciós endonukleáz enzimekkel emésztett fragmensek összekapcsolása DNS-ligáz enzimmel (11. ábra). A kapcsolódás feltétele az, hogy az összeligálni kívánt DNS fragmentumok (inszert, vektor) mindegyike azonos restrikciós endonukleáz által emésztett ragadós vagy tompa végeket tartalmazzon. Az összekapcsolást a T4 DNS-ligáz enzim végzi 5' → 3' irányban kovalens kötések létrehozva. Az így létrejött rekombináns DNS-t adott mikroorganizmusba való transzformálás után, általában fúziós fehérjék expresszáására használják [36, 39].

A ligálás során nem minden emésztett DNS kapcsolódik össze megfelelően. A rekombináns DNS-ek mellett jelen vannak az újra összekapcsolódott inszert és plazmid DNS-ek, melyek kizárása az ellenőrző emésztéssel (a ligátum újbóli emésztése ugyanazon restrikciós enzimekkel) oldható meg.



11. ábra: A ligálás folyamata

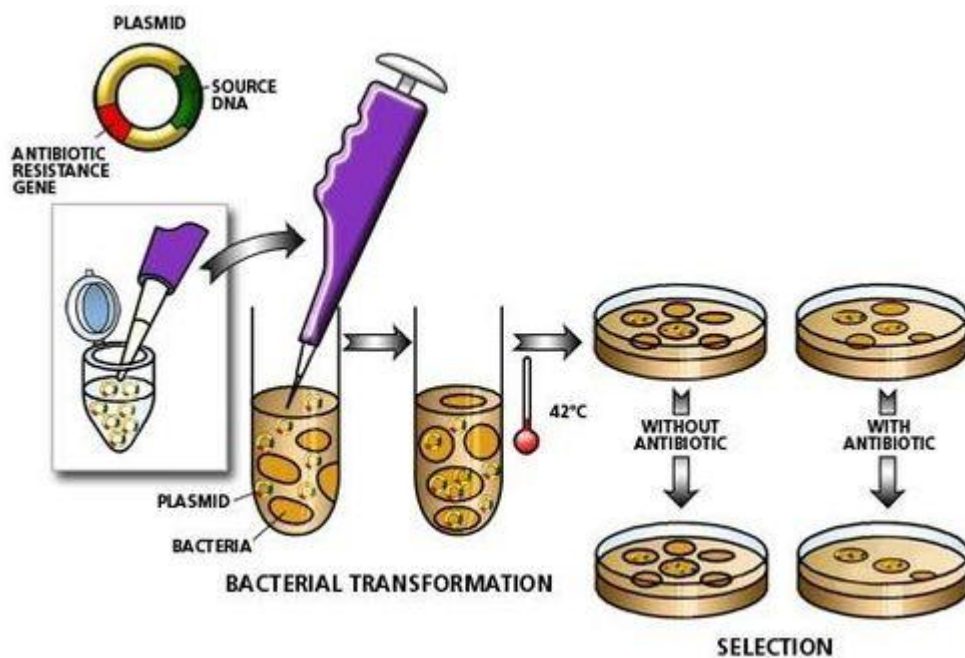
A restrikciós endonukleázokkal emésztett DNS szakaszok összekapcsolása.

(<http://www.di.uq.edu.au/sparqligation>)

2.7 Transzformálás

Az a folyamat, amikor a plazmid DNS kívülről, a baktériumot körülvevő közegből átkerül a baktérium sejtfalán illetve sejtmembránján és bekerül a sejt citoplazmájába. A transzformálás kompetens sejtekbe történik. A kompetens sejtek membránjának permeabilitása nagyobb, mint a normál sejteké, amely az előzetes kezeléseknek (jégen tömény kalciumsóoldattal kezelik) köszönhető [34]. A kompetens

sejtek olyan fiziológias állapotba kerülnek, amely lehetővé teszi a maximális mennyiségű DNS felvételt. A felvett plazmid DNS autonóm replikációra képes, ezáltal biztosítva van a beágyazott gén (inszert) amplifikációja. A megfelelően transzformált sejtek, amelyek ténylegesen felvették a bevinni kívánt vektort, szelektálhatók adott antibiotikumot (pl.ampicillint) tartalmazó táptalajon. Az antibiotikumot tartalmazó táptalajon csak a transzformált sejtek nőnek ki, a nem transzformált sejtek elpusztulnak. Ez annak köszönhető, hogy a bevitt plazmidok tartalmazzák az adott antibiotikum rezisztencia génjét [32]. A transzformálás folyamata a 12. ábrán látható:



12. ábra: Transzformálás

Plazmid DNS bejuttatása kompetens gazdasejtbe.

(http://www.biotechlearn.org.nz/themes/dna_lab/images/bacterial_transformation)

A transzformálás lépései:

1. lépés: Adott mennyiségű kompetens sejt és DNS ligátum összemérése jégen
2. lépés: Inkubáció jégen egy órán keresztül
3. lépés: Egy percig tartó hő sokk 42°C-on
4. lépés: 2 percre vissza jégre
5. lépés: 45 percig 37°C-on tápanyag dús közegben rázatni
6. lépés: Centrifugálás után, adott mennyiségű felülszót, antibiotikumot tartalmazó szilárd táptalajra kikenni
7. lépés: 37 °C-on inkubálás overnight

A membrán
permeabilitásának
növelése

2.8 FPLC (fast protein liquid chromatography)

Az FPLC-t (gyors fehérje folyadék kromatográfia) fehérjekeverékek elválasztására vagy tisztítására alkalmazzák. A mozgó fázis folyadék, az álló fázis szilárd vagy folyadék fázisú lehet. A folyadék fázisú minta tisztításához különféle oszlopokat alkalmazhatunk.

2.8.1 Affinitás kromatográfia

Az affinitás kromatográfia nagy szelektivitású, specifikus módszer, a kiválasztott biológiai komponens analitikai vagy preparatív elválasztására.

Az eljárás alapja hogy a fehérjék többsége képes biospecifikusan, de nem kovalens módon kötődni különböző molekulákhoz. Ezek a molekulák az úgynevezett ligandumok, amelyek egy semleges porózus mátrixhoz vannak kötve. Az oszlopokat ezekkel a ligandumos hordozókkal töltik meg. Mikor a különböző fehérjéket tartalmazó mintát felvisszük az oszlopra a ligandumok csak a neki megfelelő (specifikusan kötő) fehérjét tartja vissza, az összes többi szabadon áramlik át az oszlopon illetve arról lemosható. Ezután a megkötődött fehérje megfelelő oldószerrel (eluens) eluálható. A kapcsolat fajlagos tulajdonságának következtében az affinitás-kromatográfia a tisztítás leghatékonyabb módszere: a kiszemelt molekula egyetlen kromatográfiás lépéssel nagymértékben feldúsítható a mintában [32]. Tehát az affinitás kromatográfiában döntő a ligandum és a mozgó fázis (minta) között fellépő biospecifikus kötődés. Feltétel még, hogy a hordozó legyen inert, hidrofób, valamint ne legyen ionos töltése.

3. Elvégzett kísérletek és kiértékelésük

3.1 Szükséges anyagok, berendezések

Az FliI génjét végein a megfelelő restrikciós vágóhelyekkel együtt a VectorNTI (Invitrogen) programmal terveztük meg, és azt a pET19b vektorba építve korábban a laboratóriumunkban előállították. A különböző DNS-szakaszok emésztéséhez a következő Fermentas által gyártott restrikciós endonukleázokat (a hozzájuk tartozó puffer oldatokkal, és a gyártó által megadott protokoll szerint) használtam: BamHI, XhoI. A baktériumokkal végzett munka során használt eszközöket, valamint az LB és LB-agar tápoldatokat sterilizáltam. A sterilizálás 121°C-on 30 percig történt a Sanyo Labo Autoclave-val. A TOP10 illetve BL21-(DE3) baktériumtörzsekből kompetens sejteket az Invitrogen és Izinta cégektől vásároltam. A baktériumok felszaporítására LB/Amp (Luria Bertani – Sharlau/Ampicillin Sodium Salt – Calbiochem) tápoldatot használtam. A TOP10 baktériumban termelt DNS-t Mini Prep Kittel (Viogene) tisztítottam. Az agaróz gélelektroforézisét Biometra készüléken végeztem. Az agarózt a Sigma gyártotta. A géleket GelRed DNA gel stain (10000x Conc in DMSO) (Izinta) festékkel festettem. Az agaróz gélen elválasztott DNS darabokat a további lépésekhez a gélből a Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Kittel (Promega) izoláltam. Az FliI génjét a megfelelő vektorokba a 10xLigation Kit-tel (Stratagene) ligáltam, melyhez a cég által forgalmazott T4 ligáz enzimet és T4 ligáz puffert használtam. Az FliI fehérje kifejezéséhez használt pET23b vektort a Novagene gyártotta. A baktériumok felszaporításához LB/Amp lemezeket és tápoldatot használtam. Indukáláshoz a Biosynth AG gyártó által előállított IPTG (Isopropyl-beta-D-tioga-actopyranoide, dioxane free – Biosynth AG) -t használtam. A baktériumok szaporodásához szükséges optimális hőmérsékletet Edmund Bühler TH15 rázóinkubátor biztosította. A baktériumok szaporodásának követésére optikai sűrűség OD₆₀₀ méréshez Helios-Unicam spektrofotométert alkalmaztam. A növesztést Orbital Shaker Incubatorban végeztem, illetve a sejtkultúrákat Biofuge Herause-zal centrifugáltam. A sejteket feltáráskor PBS tablettából készült pH=7,4 (Sigma) pufferben szuszpendáltam. 40 ml pufferben feloldottam két darab Complete EDTA-free Protease Inhibitor Coctail tablettát (Roche) is a termelődött fehérje degradációjának megelőzése céljából. A

Tisztítás előtt a mintát steril szűrővel (0,22 µm pórus méret) szűrtem, melyet a Millipore gyártott. A kromatográfiás tisztítás során használt oszlopokat a GE Healthcare gyártotta. Az eluensekhez felhasznált glutationt a Sigma, a NaCl-t, TRIS-t és DTT-t a Merck forgalmazza. A kromatográfiás tisztítások után gyűjtött frakciókat akrilamid gélelektroforézissel ellenőriztem. A megfelelő koncentrációk eléréséhez előzőleg sterilizált MQ tisztaságú desztillált vizet (SDV) használtam.

3.2 FliI génjének amplifikálása

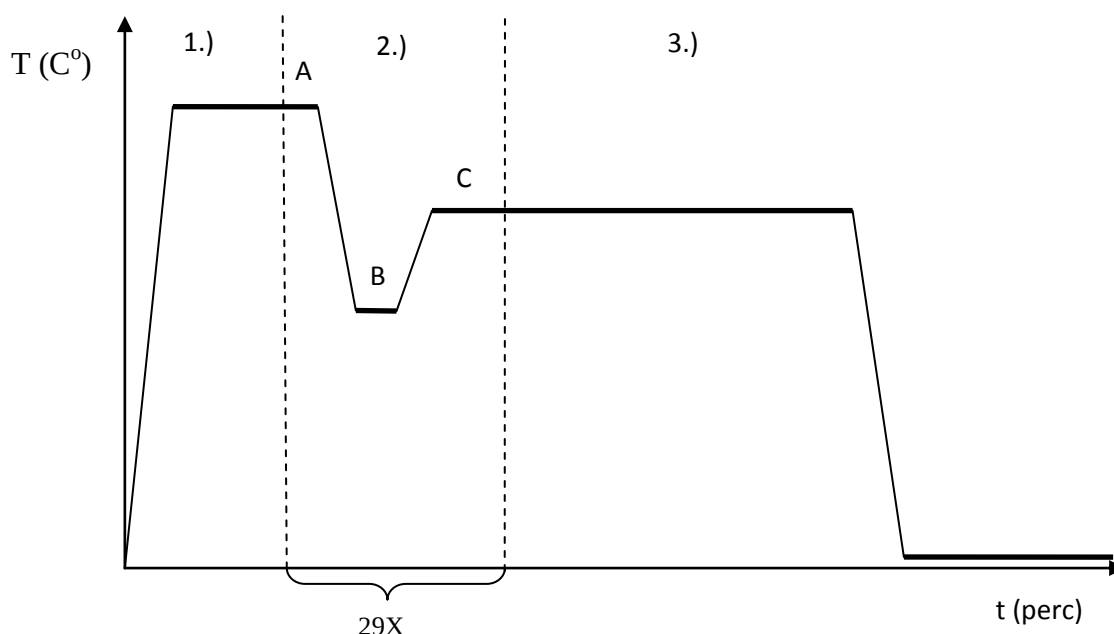
A FliI fehérje (génjének) klónozásának első lépéseként a gént meghatározó primereket terveztem meg. A primerek tervezését a megfelelő proteolitikus vágóhelyekkel egy számítógépes programmal (vektor NTI) készítettem el.

A forward primert a „felső” szálhoz terveztem, mely egy ACAT régióból, egy BamHI restrikciós endonukleáz hasító helyből és egy ragadós (GC gazdag) végből állt. A reverse primert az „alsó” szálhoz terveztem, mely szintén egy ACAT régióból, egy XhoI restrikciós endonukleáz hasító helyből és egy ragadós (GC gazdag) végből állt. A FliI génjének tervezése során a C-terminális régió végére STOP kodont helyeztem, így a génfüziós rendszerben a transzláció során a pET23b-GST-TEV vektorról nem fejeződik ki a vektorban levő 6 db hisztidin tag.

A FliI gént a tanszéken korábban elkészített FliI génjét tartalmazó pET19b-FliI konstrukciójú plazmid DNS templátból PCR-eztem ki.

<i>PCR reakció:</i>	40 µl SDV	<i>PCR program:</i>	1.) 95 C ⁰ 120"	
	5 µl puffer		2.) 95 C ⁰ 45"	} 29X
(primer)	1 µl FliI fw BamHI		58 C ⁰ 45"	
(primer)	1 µl FliI rew XhoI		72 C ⁰ 90"	
(templát)	1 µl pET19b-FliI 100x híg plazmid DNS		3.) 72 C ⁰ 5'	
	1 µl dNTP		4 C ⁰ ∞	
	1 µl pfu ultra enzim			

A PCR-en lefuttatott program mindegyik ciklusa egy DNS denaturációs (A), egy primer kapcsolódási (annealing) (B) és egy DNS szintézis szakaszból (C) áll. A harminc ciklus elteltével körülbelül 10^6 sokszorozás volt elérhető. A PCR reakció hőmérsékletprofilja a 13. ábrán látható.



13. ábra: A PCR reakció hőprofilja

(A): denaturáció 95°C-on, 45 másodpercig.

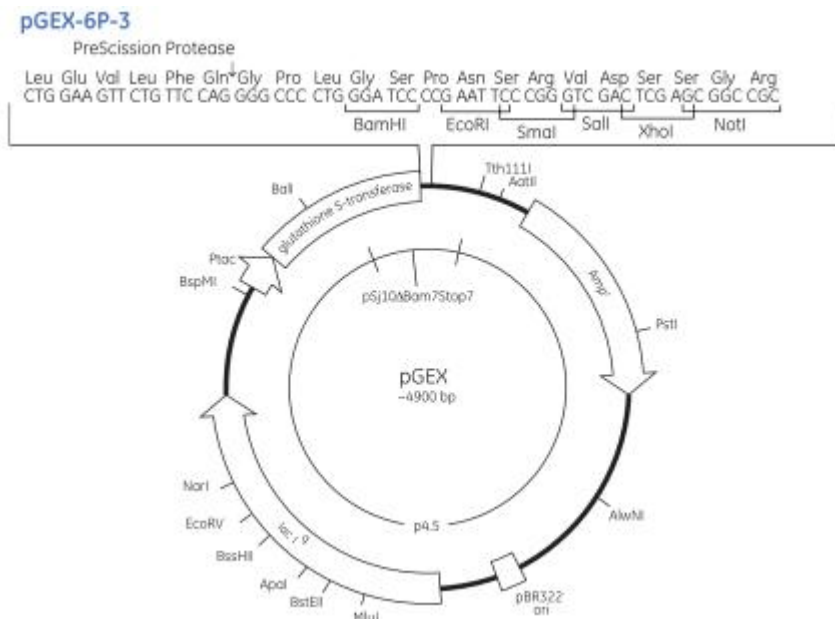
(B): annealing 58°C-on, 45 másodpercig. (C): DNS szintézis 72°C-on, 90 másodpercig.

A plazmid DNS-ből PCR-ezett FliI PCR terméket a felszaporítás ellenőrzése érdekében agaróz gélen futattam meg.

A PCR-ezett FliI génjét az agaróz gélelektroforézis után a gélből kivágtam, majd a Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Kit segítségével a gélből tisztítottam.

3.3 A pET23b-GST-TEV plazmid tisztítása

A FliI tisztítását és az aggregáció elkerülését elősegítő GST génjét tartalmazó pGEX-6p-3 vektorból a GST génjét a labor egyik munkatársa kivágta (14. ábra).



14. ábra: pGEX-6P-3 vektor sematikus képe
(www.hcmibiotech.com.vn)

A GST génjét a TEV proteáz vágóhellyel együtt a pET23b expressziós vektorba klónoztam. A kész vektort ezután a DNS sokszorozó TOP10-es *E.coli* baktériumtörzsbe transzformálva kaptam meg. A transzformált TOP10-es *E.coli* baktériumból Mini Prep kittel kipreparáltam a GST génjét és a TEV proteáz hasítóhelyét tartalmazó plazmid DNS-t (pET23b-GST-TEV).

Ezután mind a pET23b-GST-TEV plazmidot és a pET19b-FliI vektort (inszert) BamHI és XhoI restrikciós endonukleáz enzimekkel emésztettem.

3.4 A FliI inszert és a pET23b-GST-TEV plazmid emésztése

A vektorok emésztéséhez BamHI és XhoI restrikciós endonukleázokat használtam. Minden enzimnek megvan a maga puffer oldata, amiben a legjobban hasít. Így mikor kettő enzimet használtam meg kellett néznom azt a pufferoldatot, amiben mindkettő enzim képes hasítani. Ezt az interneten is fellelhető double digest calculator segítségével választottam ki.

Az emésztési reakció egy Eppendorf csőben összemért, 37°C-on 1,5 órán át tartó inkubációt jelentett. A két enzim nem egyformán dolgozik, ezért a BamHI enzimet a reakció kezdete után fél órával adtam a reakcióelegyhez.

plazmid emésztése: 7,7 µl pET23b-GST-TEV plazmid
1 µl NEB4 puffer (10X)
0,1 µl BSA (100X)
1 µl XhoI → 30' emésztés után
0,2 µl BamHI +1 h emésztés

Inszeret emésztése: 35 µl pET19b-FliI vektor
4,2 µl puffer NEB4 (10X)
0,42 µl BSA (100X)
0,58 µl SDV
1,5 µl XhoI → 30' emésztés után
0,3 µl BamHI +1 h emésztés

A termékeket ismét agaróz gélelektroforézissel analizáltam, majd a vektort és az inszeretet az agaróz gélből tisztítottam.

Miután emésztettem és tisztítottam az összekapcsolni kívánt fragmentumokat (vektor, inszeret) szintén gélen meg kellett becsülni a vektor inszeret arányát, hogy a ligáláshoz a megfelelő mennyiségeket tudjam összemérni.

3.5 A DNS fragmentumok ligálása

A ligálás során 1:2, 1:3, 1:4 vektor (4300bp) inszeret (1400bp) arányokat használtam. Az arányok becsléséhez a mintákból 5-5 µl-t futtattam meg, majd a gélen észlelhető DNS sávok fényintenzitásával számolva becsültem meg az összemérendő vektor-inszeret térfogatarányokat (15.ábra). Az egy órás rapid ligálás 16°-on inkubálva Eppendorf csőben történt, az alkalmazott enzim a T4 ligáz volt.



15. ábra: A DNS fragmentumok mennyiségének becslése ligálás előtt,
(1): plazmid 4300bp, (2): inszert (FliI gén) 1400bp.

Ligálási reakciók: 1:2 V:I

1 µl T4 ligáz
2 µl T4 ligáz puffer (5X)
3,5 µl Vektor
3,5 µl Inszert

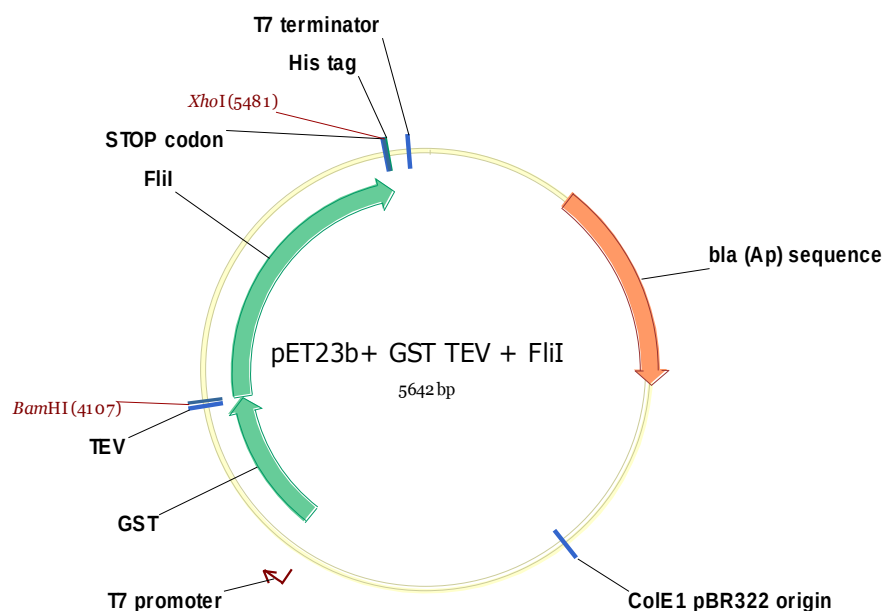
1:3 V:I

1 µl T4 ligáz
2 µl T4 ligáz puffer (5X)
2 µl Vektor
4 µl Inszert
1 µl SDV

1:4 V:I

1 µl T4 ligáz
2 µl T4 ligáz puffer (5X)
4,5 µl Vektor
2,5 µl Inszert

Az így előállított pET23b-GST-TEV-FliI konstrukció a 16. ábrán látható.



16. ábra: A pET23b-GST-TEV-FliI, vektor NTI-al készített sematikus képe

3.6 TOP 10 kompetens sejt transzformálása

A kész ligátumot (pET23b-GST-TEV-FliI) TOP 10-es *E. Coli* törzsbe transzformáltam, mely egy plazmidsokszorozó törzs.

A transzformáció során, 100 µl TOP 10 kompetens sejtet, 2 µl ligátumot egy Eppendorf csőben jégre helyeztem, majd egy órán keresztül jégen inkubáltam. Ezután 42 °C-on 1 perces hősokk alkalmazása után visszahelyeztem jégre 2 percre, majd 500 µl SOC-ot adtam hozzá. Ezt 45 perces inkubálás követte 37°C-on, 200 rpm fordulaton.

A transzformált sejt kultúrákat ampicillint tartalmazó LB lemezekre kentem ki és inkubáltam 37°C-on egész éjszakán át. (A transzformált plazmidokban benne van az ampicillin rezisztencia génje, ezáltal a sikeresen transzformált baktériumok fel tudnak nőni, az ilyen antibiotikumot tartalmazó táptalajon is).

Másnap a lemezen kinőtt telepekből véletlenszerűen kiválasztottam négyet, melyeken ellenőrző emésztést hajtottam végre a ligálás sikerességének alátámasztására.

3.7 Ellenőrző emésztés

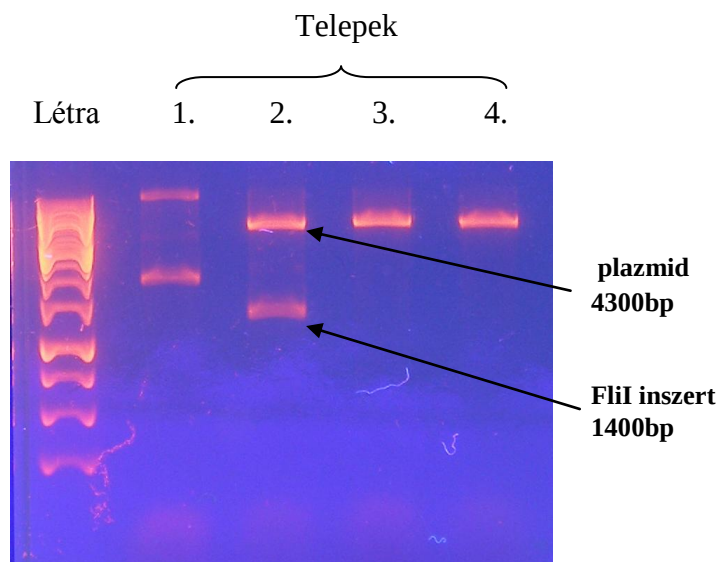
A ligálás ellenőrzése érdekében mind a négy telepen próbaemésztést hajtottam végre. Az ellenőrző emésztés előtt a kinőtt telepekről le kellett oltani tenyészeteket, melyből az összeligált DNS vektorokat (pET23b-GST-TEV-FliI) VIOGENE Mini Kit Prep-pel tisztítottam, majd az emésztéshez is használt restriktációs endonukleáz enzimek (BamHI, XhoI) használatával ellenőrző emésztést végeztem.

Ellenőrző emésztés: mindegyik plazmidból 2 µl-t vizsgáltam, melyekhez

6,6 µl SDV
1 µl NEB 4 puffer
0,1 µl BSA
0,075 µl BamHI
0,2 µl XhoI

reakcióelegyet adtam, majd inkubáltam 37 °C-on 1,5 órán keresztül.

Az ellenőrző emésztés lejárta után agaróz gélen megfuttattam a négy telepből izolált emésztett DNS vektorokat (pET23b-GST-TEV-FliI) (17.ábra).



17. ábra: Próbaemésztés ellenőrzése agaróz gélen: Az 1,2,3,4 a különböző telepekből tisztított BamHI és XhoI restrikciós enzimekkel emésztett DNS mintákat jelölik.

A gélkép azt mutatta, hogy csak a második telepben levő plazmid konstrukciója volt helyes, mert az emésztés után csak ennél a telepnél látszik a megfelelő vektor, inszert méret. Az egyes telepen nem megfelelő a vektor, inszert mérete, míg a harmadik és a negyedik telepen el sem emésztődött a vektor és már a ligálás sem volt sikeres.

3.8 BL21-(DE3) kompetens baktériumtörzs transzformálása

A második telepről leoltott tenyészetből (TOP10) tisztított vektor DNS-t (pET23b-GST-TEV-FliI) egy fehérjetermelő törzsbe a kompetens BL21-(DE3) *E.coli* törzsbe transzformáltam. Egy Eppendorf csőbe jégen összemértem 100 µl kompetens BL21-(DE3) sejtet 0,2 µl pET23b- GST-TEV-FliI vektor DNS-el, majd jégen inkubáltam fél órát. Ezután következett a 45 másodpercig tartó 42 °C-os hő sokk, mely után visszatettem jégre 2 percre. 900 ml SOC (ami végig a 42 °C-os vízfürdőn volt) hozzáadása után 45 percig 37°C-on 200 rpm-en rázattam, majd 150 µl kikentem ampicillint tartalmazó LB táplemezre. A transzformált BL21-(DE3)-pET23b-GST-TEV-FliI baktériumokat tartalmazó LB táplemezt rázás nélkül 37°C-on inkubáltam egész éjszakán át. Másnapra kinőttek a telepek.

3.9 A GST-FliI fúziós fehérje bakteriális termeltetése, feltárása

A BL21-(DE3)-pET23b-GST-TEV-FliI telepeket tartalmazó LB lemezről 3 ml startert oltottam le steril LB tápoldatba, melyből 500 µl tovább oltottam 10 ml LB-be a próbaindukciós kísérlet miatt. A próbaindukció sikeresnek bizonyult, így a 10 ml starterből átoltás után steril 1 liter LB tápoldatban 37°C-on rázó inkubátorban növesztettem a biomasszát. Amikor a tenyészet optikai sűrűsége 600 nm-en elérte a 0,5-0,6-os abszorbancia értéket, 200 mM-os IPTG hozzáadásával (0,5 mM végkoncentrációban) indukáltam a bevitt pET23b-GST-TEV-FliI vektorról a GST-FliI fúziós fehérje túltermeltetését. Az indukálás után visszatettem a rázóinkubátorba 20°C-ra egy éjszakán át tartó fehérjetermelés céljából.

A következő nap az 1 liter biomasszát lecentrifugáltam 4.500 rpm 30 perc, 6°C, majd a felülúszót eltávolítottam és a baktérium csapadékot egy órára -80°C-ra helyeztem, így könnyebben feltárhatóvá váltak. A csapadékot 40 ml PBS pufferbe oldottam fel, amibe 2 db Complete EDTA-free Protease Inhibitor Coctail tablettát (Roche) oldottam a termelődött fehérje degradációjának megelőzése céljából.

Ezután végig jégen dolgozva (nehogy a sejtkultúra felmelegedjen) a sejtfeltárást szonikálással végeztem 90-es amplitúdóval, 1 perc szonikálás és 1 perc szünet váltakozásával, amíg a szuszpenzió ki nem tisztult. Ezután ismét centrifugáltam 8.500 rpm 30 perc, 6°C, ekkor a nagyobb sejttörmelékek leülepedtek. A felülúszót, ami tartalmazta a baktérium saját fehérjéit, és egyéb sejtalkotók mellett a tisztítandó GST-FliI fúziós fehérjét, tovább centrifugáltam ultracentrifugával 50.000 rpm 30 perc, 6°C. Ekkor már az oldhatatlan fehérjék és az esetlegesen inklúziós testként jelenlevő fehérjék váltak ki és a felülúszóban már csak az oldható fehérjék voltak jelen.

A mintát (50.000-es felülúszó) közvetlenül az FPLC alkalmazása előtt átszűrtem egy 0,22 µm pórusú steril membránszűrőn.

3.10 A GST-FliI fúziós fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával GSTrap 5ml-es oszlopon

A GSTrap oszlopok agarózzal töltöttek, melyekhez a glutation ligandum 10 db szén atomon keresztül kötődik. Ehhez a glutationhoz kapcsolódik biospecifikusan a tisztítandó fúziós fehérje GST része. A glutation 3 aminosavból áll (glutaminsav, cisztein, glicin), melyből a glutation kötést a cisztein molekulák tiol csoportjai (-SH) alakítják ki, diszulfid- hidak létrejöttével. Különböző fehérjék lemosásához különböző glutation koncentrációjú eluens oldat kell, ezen kívül nagyon fontos mind a kötődésnél mind az eluálásnál az alacsony áramlási sebesség.

A fehérje tisztításánál kétféle módszer lehetséges:

1.) Az oszlopon tisztítjuk a GST fúziós fehérjét és eluálás után TEV enzimmel hasítjuk, majd ismét oszlopon tisztítjuk.

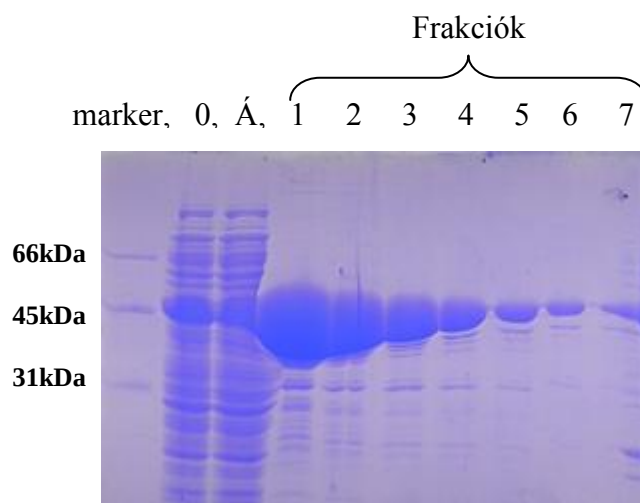
2.) Az oszlopon emésztünk és az eluálás során a tisztítandó fehérje mosódik le (a hasító enzimet felfogjuk egy másik oszlopon).

Munkám során az első típust végeztem el a GST-FliI esetében glutationos oszlopon, amely a következőképpen történt: (a tisztítást manuálisan fecskendő használatával végeztem)

- A 20%-os EtOH-t tartalmazó oszlopot 15 ml steril desztillált vízzel tisztítottam meg.
- Ezután 25 ml kötő pufferrel (PBS) mostam az oszlopot,
- majd a már megszűrt mintát (ami PBS-ben van) steril fecskendővel felvittem a kolonnára, majd frakciókba szedtem a fel nem kötődött fehérjét.
- 40 ml PBS pufferrel mostam az oszlopot a specifikus kötődések eltávolítása érdekében.
- Ezután 10 mM glutation, 50 mM TRIS pH 8.0 pufferrel izokratikus módszerrel eluáltam a kötődött fúziós fehérjét.
- Az eluálódott fúziós fehérjét frakciókba szedtem.
- Mostam az oszlopot 20 ml PBS pufferrel, illetve 15 ml steril desztillált vízzel,
- ezután 20%-os EtOH-ba tettem el az oszlopot

A különböző frakciókból 10 µl mintát vettem, melyhez 10 µl merkaptotanol illetve bróm fenolkék elegyéből álló mintapuffert adtam. A mintát 10 percig tartó forralással készítettem elő és SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel analizáltam.

Az SDS poliakrilamid gél zsebeibe 8 µl-nyi mintát vittem fel, és 30 mA áramerősséggel futattam (18.ábra).



18. ábra: A tisztítás eredményének vizsgálata:

1,2,3,4,5,6,7: a glutationos oszlopon tisztított GST-FliI frakciók.

0: kontroll; Á: a glutationos oszlopra fel nem kötődő áteső frakció.

(SDS poliakrilamid gél)

A gélről leolvasható információk alapján elmondható, hogy sikerült (viszonylag nagy mennyiségben) a GST-FliI fúziós fehérje klónozása termeltetése és tisztítása.

A tisztított GST-FliI mellett elenyésző emésztett fragmentumok is jelen voltak. Ez azzal magyarázható, hogy a FliI rendezetlen N-terminális régiója igen sérülékeny, így ezen a részen leemészthető. Ezen a problémán éppen a GST-taggal lehetett segíteni, mely eredményeként az eddigi tisztítások során megjelenő emésztett fragmentumok nagyobb mennyisége leredukálható volt.

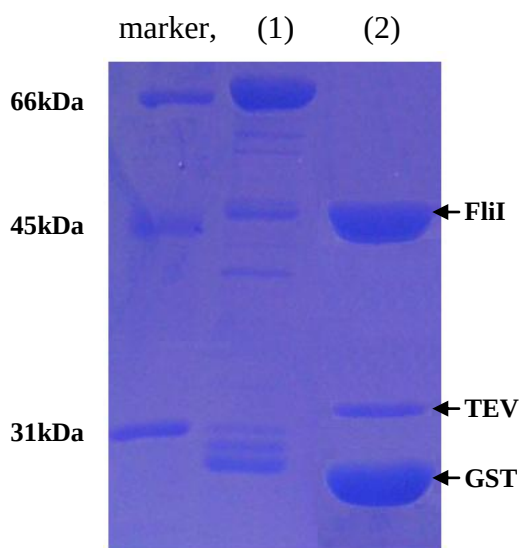
Látható, hogy az oszlop telítődött a fúziós fehérjével (az oszlopnak adott kötő kapacitása van). Az összes glutation kötőhely foglalt volt, így a fel nem kötődő GST-FliI fúziós fehérje szabadon áramlott az oszlopon. Az áteső frakciókat gyűjtöttem, majd egy következő ciklusban ismét az oszlopon tisztítottam.

Következő lépés a tiszta FliI előállítása volt, melyet a GST-tag TEV proteázzal való lehasításával valósítottam meg. A tisztított GST-FliI frakciók az elúciót követően elég nagy koncentrációban tartalmaztak glutationt ahhoz, hogy akadályozza a további

tisztítás során a GST toldalék kötődését az oszlopra. Ezért szükséges volt a kapott GST-FliI dialízálása megfelelő mennyiségű PBS pufferbe, hogy a glutation koncentrációt lecsökkentsük arra az értékre, ami már nem befolyásolja a GST kötődését.

3.11 A tiszta FliI előállítása TEV proteolitikus enzim használatával

Kísérleteim során megállapítottam, hogy 500ml baktérium kultúrából származó GST-FliI-t volt képes megkötni egyszerre a GST-s oszlop. Egy tisztításból származó GST-FliI-hez 300 μ l 0,4 mg/ml -es TEV enzimet adtam és szobahőmérsékleten 1 órát inkubáltam az elegyet. Az emésztést követően a tiszta FliI kinyeréséhez el kellett távolítanom az elegyben található GST-t és TEV-et (19.ábra). Munkám során his-tag-es TEV (Laboratóriumunkban korábban előállított) enzimet használtam, amelyet nikkell töltetű affinitás oszloppal könnyedén el tudtam választani a többi komponenstől.



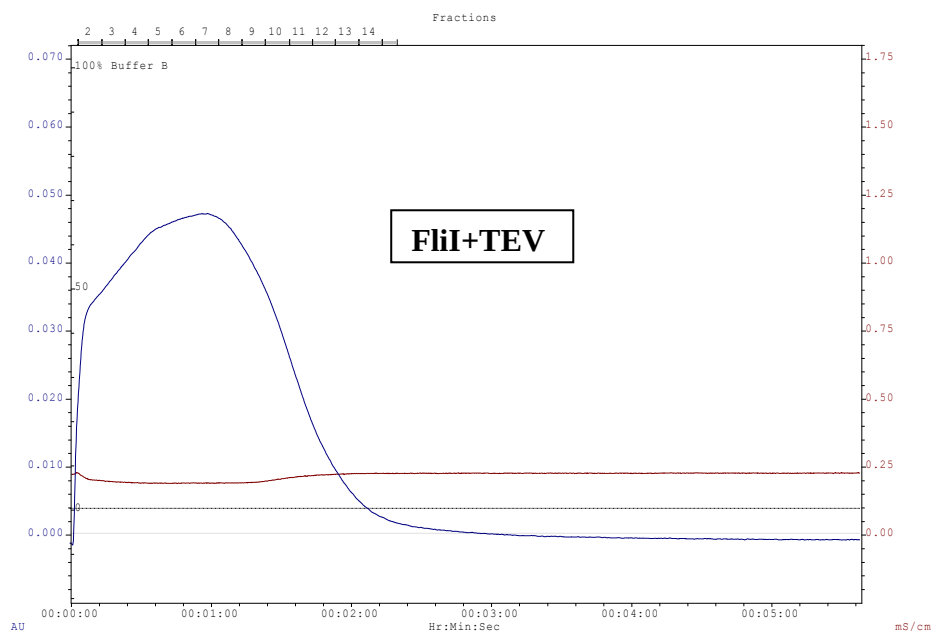
19. ábra: Emésztés előtti és utáni állapot vizsgálata

(1): GST-FliI frakció emésztés előtt;

(2): TEV-es emésztés után, FliI (49kDa), TEV (33kDa), GST (26kDa).

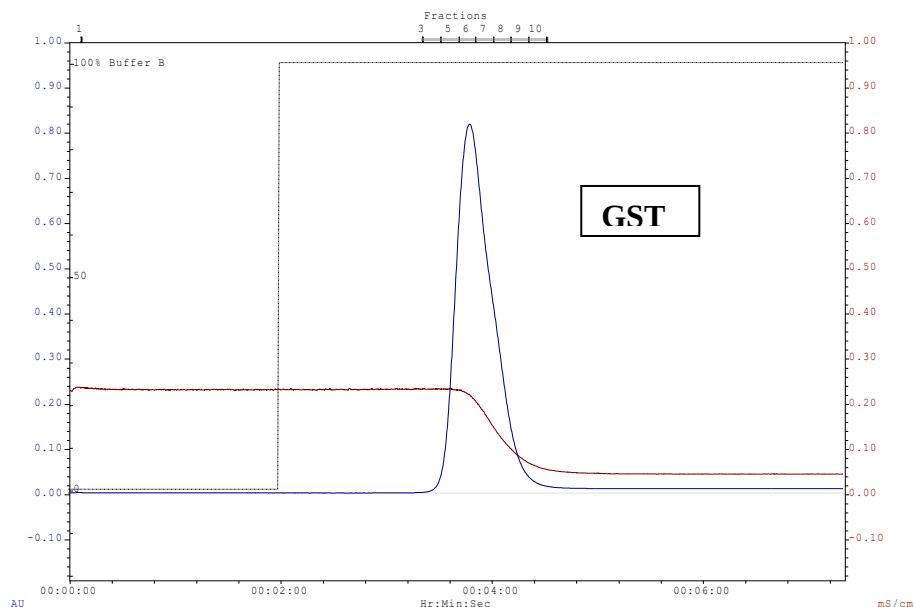
Ennek érdekében az FPLC rendszerbe bekötöttem a GST-s oszlopot és felvittem rá az emésztési elegyet. Ebben az esetben csak a lehasított GST kötődött fel az oszlopra,

a fel nem kötődött frakciókban volt benne a FliI és a TEV (alábbi kromatogram, 20.ábra).



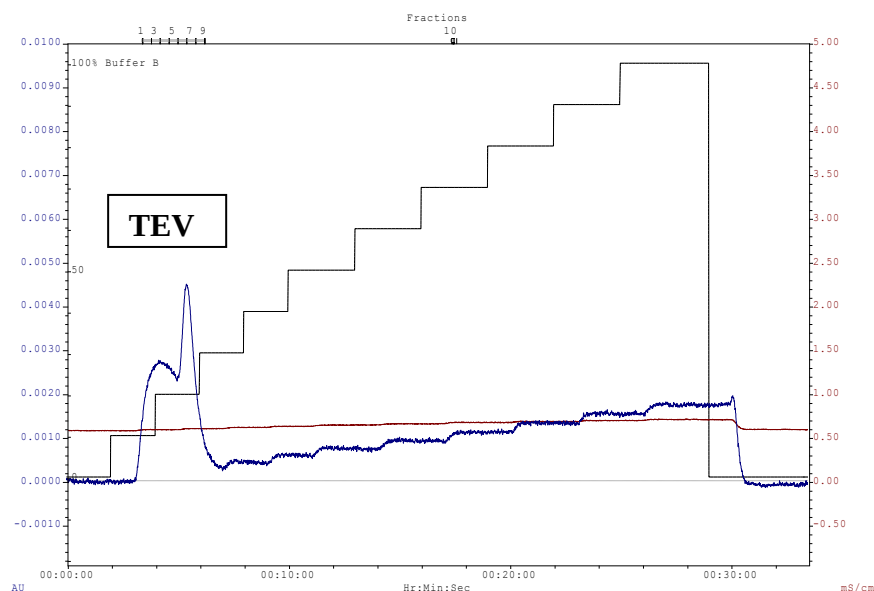
20.ábra: A GST-s oszlop mosása.
A kék csúcs a lemosott tiszta FliI és TEV frakciókat jelzi.

Majd a GST-s oszlopról leeluáltam a felkötődött GST-t 50 mM Tris, 10 mM glutation, pH 8,0 pufferrel (alábbi kromatogram, 21.ábra).



21. ábra: A GST-s oszlop eluálása.
A kék csúcs a leeluált GST frakciókat jelzi.

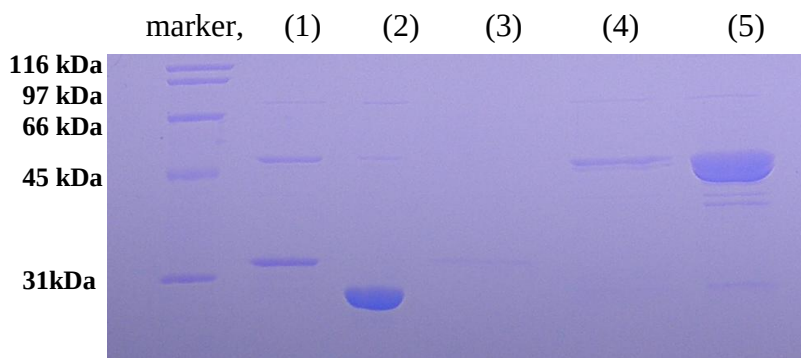
Ezt követően a FliI és TEV frakcióhoz 40 mM-nyi végkoncentrációban imidazolt kevertem, hogy a Ni^{2+} -es affinitás oszlopon a FliI aspecifikus kötődését megakadályozzam. Az elegy felvitelekor a fel nem kötődött frakciókban volt a tiszta FliI, majd a felkötődött TEV-et imidazolos pufferrel 10%-kal növekvő lépcsőkkel, gradiens technikával eluáltam le (alábbi kromatogram, 22.ábra).



22. ábra: A Nikkel töltetű oszlop eluálása.

A kék csúcs a gradiens módszerrel eluált TEV frakciókat jelzi.

SDS gélen analizáltam a GST-s oszlopról lemosódó Tiszta FliI és TEV frakciókat, a GST-s oszlopról eluált GST frakciókat, a nikkel affinitású oszlopról eluált TEV frakciókat illetve a kötődés nélkül áteső tiszta FliI frakciókat (23.ábra).



23. ábra: Az oszlopokról eluált frakciók ellenőrzése SDS gélen:

(1): FliI (49kDa), TEV (33kDa); (2): GST (26kDa); (3): TEV (33kDa); (4), (5): tiszta FliI (49kDa) frakciók.

Az alkalmazott módszerrel tisztán elválaszthatóak a tiszta FliI, TEV, GST fehérjék. A kapott tiszta FliI 20mM TRIS 150mM NaCl pH 7.8 pufferben fagyasztható, hosszabb ideig eltartható, a korábbi His-es tisztítási eljárásoknál tisztább és kevésbé degradálódó.

4. Összefoglalás

A FliI ATPáz kulcsfontosságú szerepe tölt be a flagellum-specifikus exportrendszer működésében. Ez egy 49 kDa nagyságú fehérje, melynek centrális régiója ATPáz aktivitással rendelkezik. Működése során más fehérjékkel alkotott multikomplex rendszerben az ATP hidrolízise során felszabaduló energia segítségével végzi az exportálódó fehérjekomponensek kitekerését és bejuttatását az exportcsatornába. A FliI felismeri és megköti az exportszignált.

Ezen összetett szerepe miatt fontos lenne az exportrendszerben betöltött funkciójának minél részletesebb felderítése, a FliI-exportszignál (FliI-ES) jellemzése és a FliI oligomerizációs szerepének tisztázása. Ennek érdekében szükség van nagy mennyiségű tiszta FliI előállítására, mellyel fedezni tudják a kísérletekhez szükséges FliI mennyiségét.

A korábbi tisztítások során hisztidin-tag-es FliI-t expresszáltattak *E.coli* sejtben, azonban ezzel a változattal állandó problémaként lépett fel a FliI aggregációja, inklúziós test formába kerülése és érzékeny N-terminális régiójának elemésztődése.

A problémák megoldására és a FliI fehérje nagy mennyiségű előállítására egy újfajta tisztítási módszert dolgoztam ki.

A munkám során a FliI-t kódoló gént, a tanszéken korábban elkészített FliI génjét tartalmazó pET19b-FliI konstrukciójú plazmid DNS templátból PCR-eztem ki.

A FliI tisztítását és az aggregáció elkerülését elősegítő GST génjét tartalmazó pET23b-GST-TEV plazmid tisztítását követően, a vektort és a FliI inszertet, restrikciós endonukleáz enzimekkel emésztettem. Az emésztéshez használt enzimek nem egyforma sebességgel hasítanak, így a reakció optimalizálása érdekében a két enzimet fél óras különbséggel adtam a reakció elegyhez. A kapott fragmenteket előzetes becslés alapján különböző arányokban ligáltam.

A kész ligátumot (pET23b-GST-TEV-FliI) TOP 10-es *E. Coli* plazmidsokszorozó törzsbe transzformáltam, majd a sejt kultúrát ampicillint tartalmazó LB táplemezekre kentem ki. (A transzformált plazmidokban benne van az ampicillin rezisztencia génje, ezáltal a sikeresen transzformált baktériumok fel tudnak nőni, az ilyen antibiotikumot tartalmazó táptalajon is).

A kinőtt telepekből véletlenszerűen választott telepeken ellenőrző emésztést hajtottam végre, majd a helyes konstrukciót tartalmazó sejtekből a DNS-t tisztítottam. A

pET23b-GST-TEV-FliI helyes konstrukciójú vektort a kompetens BL21-(DE3) fehérjetermelő *E.coli* törzsbe transzformáltam.

A kinőtt telepekről a próbaindukciós kisretek után 10 ml startert oltottam le, melyet 11 ampicillint tartalmazó LB tápoldatban növesztettem a megfelelő optikai denzitás eléréséig.

Az indukciót követően a sejtek feltárását proteáz gátlók használata mellett végeztem, melyek segítségével elkerülhető volt a fúziós fehérje részleges emésztődése.

A fehérje elegyet, amely tartalmazta a túltermelt GST-FliI fúziós fehérjét, glutationos oszlopon, affinitás kromatográfiás módszerrel tisztítottam meg.

A tisztítást a génszűréses módszerekkel a FliI N-terminális régiójához fuzionáltatott GST tag tette lehetővé. A GST tag megvédte a fehérje sérülékeny N-terminális részét és elősegítette annak feltekeredését. A fúziós fehérjét izokratikus módszerrel, 10mM glutation 50mM TRIS pH 8.0 eluáltam.

A kapott tiszta GST-FliI fúziós fehérje frakciókhoz, adott mennyiségű His-tag-es TEV proteáz enzimet mértem a GST tag eltávolítása céljából és egy órát szobahőmérsékleten inkubáltam. A hasítás után az emésztési elegyet ismét a glutationos oszlopra vittem fel, ahol a GST tag felkötődött, az átesett frakciókban a tiszta FliI és a TEV proteáz jelent meg. Az átesett frakciókhoz 40mM végkoncentrációban imidazolt keverttem, hogy megakadályozzam a FliI aspecifikus kikötődését a Ni^{2+} tartalmú oszlopra. A FliI és a TEV-et tartalmazó frakciók Ni^{2+} -es affinitás oszlopon történő elválasztásánál a hisztidin toldalékos TEV proteáz enzim felkötődött a Ni^{2+} töltetű oszlopra, míg a tiszta FliI akadály nélkül átesett.

Az alkalmazott módszerrel tisztán elválaszthatóak a tiszta FliI, TEV, GST fehérjék. A kapott tiszta FliI 20mM TRIS 150mM NaCl pH 7.8 pufferben fagyasztható, hosszabb ideig eltartható, a korábbi His-es tisztítási eljárásoknál tisztább és kevésbé degradálódó.

5. További célok

A kidolgozott tisztítási módszerrel a korábbi eljárásoknál nagyobb mennyiségben és tisztább formában állítható elő, mind a GST-FliI fúziós fehérje, mind a tiszta FliI.

További kitűzött feladatként szerepel a meglévő tisztítási és izolálási eljárás optimalizálása, a hatékonyabb és egyszerűbb folyamat leírása. Továbbá a kapott tiszta FliI jellemzése, saját oligomerizációs képességének a tisztázása, ATPáz aktivitásának és a flagellin fehérjével való kölcsönhatásának vizsgálata, s nem utolsósorban a flagelláris export szignál hipotézis igazolása.

6. Irodalomjegyzék

- [1] Vonderviszt F, Namba K (2008) Structure, function and assembly of flagellar axial proteins in *Fibrous Proteins*, ed. T. Scheibel; pp. 58-76, Landes Biosciences.
- [2] T. Minamino, K. Imada, K. Namba, Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly, *Mol. Biosyst.* 4 (2008) 1105–1115.
- [3] Namba, K & Vonderviszt, F (1997). Molecular architecture of bacterial flagellum *Quarterly Rev. of Biophysics* 30, 1, 1-65.
- [4] Minamino T., Imada K., Namba K.: Molecular motors of the bacterial flagella, *Current Opinion in Structural Biology* 18, 2008, 693–701.
- [5] I. Yamashita, K. Hasegawa, H. Suzuki, F. Vonderviszt, Y. Mimori-Kiyosue, N. Namba: Structure and Switching of Bacterial Flagellar Filaments Studied by X-ray Fiber Diffraction. *Nature Struct. Biol.* (1998), 5, 125-132.
- [6] Minamino T., Imada K., Kinoshita M., Nakamura S., Morimoto V. Y., Namba K.: Structural insight into the rotational switching mechanism of the bacterial flagellar motor, *PLoS*
- [7] Vonderviszt F., Imada K., Furukawa Y., Uedaira H., Taniguchi H., and Namba K.: Mechanism of self-association and filament capping by flagellar HAP2, *J. Mol. Biol.* 284, (1998) 1399-1416. *Biol*, 9(5), 2011
- [8] F. Vonderviszt, R. Ishima, K. Akasaka, K. & Aizawa, S.-I. (1992) Terminal disorder: a common structural feature of the axial proteins of bacterial flagellum. *J. Mol. Biol.* 226, 575-579.

- [9] A. Muskotál, R. Király, A. Sebestyén, Z. Gugolya, B. M. Végh, F. Vonderviszt: Interaction of FliS flagellar chaperone with flagellin. *FEBS Letters* 580 () 3916-3920.
- [10] T. Minamino, és mts. (1999) Components of the Salmonella Flagellar Export Apparatus and Classification of Export Substrates *J. Bacteriol.* 1388-1394.
- [11] Blocker A, Komoriya K, Aizawa SI (2003) Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 3027-3030.
- [12] Journet L, Hughes KT, Cornelis GR (2006) Type III secretion: a secretory pathway serving both motility and virulence. *Mol. Membr. Biol.* 22, 41-50.
- [13] T. Minamino, K. Kazetani, A. Tahara, H. Suzuki, Y. Furukawa, M. Kihara, K. Namba, FliI is controlled by its extreme N-terminal region, *J. Mol. Biol.* 360 (2006) 510–519.
- [14] Minamino T, Namba K (2008) Distinct roles of the FliI ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature* 451, 485-488.
- [15] Paul K, Erhardt M, Hirano T, Blair DF, Hughes KT (2008) Energy source of flagellar type III secretion. *Nature* 451, 489-492.
- [16] M. Okabe, T. Minamino, K. Imada, K. Namba, M. Kihara, Role of the N-terminal domain of FliI ATPase in bacterial flagellar protein export, *FEBS Letters* 583 (2009) 743–748.
- [17] T. Minamino és mts. (2002) Structural Properties of FliH, an ATPase Regulatory Component of the Salmonella, Type III Flagellar Export Apparatus *J. Mol. Biol.* 322, 281-290.

- [18] Claret L, Calder SR, Higgins M, Hughes C (2003) Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly. *Mol. Microbiol.* 48, 1349-1355.
- [19] Minamino T, Tame JRH, Namba K, Macnab RM (2001) Proteolytic analysis of the FliH/FliI complex, the ATPase component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*. *J. Mol. Biol.* 312, 1027-1036.
- [20] Stafford GP, Evans LBD, Krumscheid R, Dhillon P, Fraser GM, Hughes C (2007) Sorting of early and late flagellar subunits after docking at the membrane ATPase of the type III export pathway. *J. Mol. Biol.* 374, 877-882.
- [21] Kazetani KI, Minamino T, Miyata T, Kato T, Namba K (2009) ATP-induced FliI hexamerization facilitates bacterial flagellar protein export. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 323-327.
- [22] Minamino, T., and R. M. Macnab (2000). FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Mol. Microbiol.* 37:1494-1503.
- [23] Minamino, T., B. González-Pedrajo, M. Kihara, K. Namba, and R. M. Macnab (2003). The ATPase FliI can interact with the type III flagellar protein export apparatus in the absence of its regulator, FliH. *J. Bacteriol.* 185:3983-3988.
- [24] Végh BM, Gál P, Dobó J, Závodszky P, Vonderviszt F (2006) Localization of the flagellum-specific secretion signal in *Salmonella* flagellin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 93-98.
- [25] Gál P, Végh BM, Závodszky P, Vonderviszt F (2006) Export signals. *Nat. Biotechnol.* 24, 900-901.
- [26] Dobó J, Varga J, Sajó R, Végh BM, Gál P, Závodszky P, Vonderviszt F (2010) Application of a short, disordered N-terminal flagellin segment, a fully

functional flagellar type III export signal, to expression of secreted proteins. *Appl. Env. Microbiol.* 76, 891-899.

- [27] Vonderviszt F, Sajó R, Dobó J, Závodszky P (2011) The use of a flagellar export signal for the secretion of recombinant proteins in *Salmonella*. *Methods in Molecular Biology*, *in press*.
- [28] Vonderviszt F, Ishima R, Akasaka K, Aizawa SI (1992) Terminal disorder: A common structural feature of the axial proteins of bacterial flagellum. *J. Mol. Biol.* 226, 575-579.
- [29] Kornacker MG, Newton A (1994) Information essential for cell-cycle-dependent secretion of the 591- residue *Caulobacter* hook protein is confined to a 21-amino-acid sequence near the N-terminus. *Mol. Microbiol.* 14, 73-85.
- [30] Weber-Sparenberg C, Pöplau P, Brookman H, Rochón M, Möckel C, Nietschke M, Jung H (2006) Characterization of the type III export signal of the flagellar hook scaffolding protein FlgD of *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 186, 307-316.
- [31] Silva-Herzog E, Dreyfus G (1999) Interaction of FliI, a component of the flagellar export apparatus, with flagellin and hook protein. *BBA* 1431, 374-383.
- [32] Szeberényi József: Molekuláris sejtbiológia. Dialóg Campus Kiadó 1999.
- [33] Darnell J., Lodish H., Baltimore D., Molecular cell biology, *Scientific American Books, Inc.*, New York ,US, 1986, 229-248.
- [34] Robert F. Weaver, Philip W. Hedrick: Genetika. Panem Könyvkiadó 2000. 15 fejezet.
- [35] biotech.szbk.u-szeged.hu/RG_Jegyzet/pET_pGEX_vektorok

- [36] Allison, Lizabeth A. Fundamental Molecular Biology. Blackwell Publishing, 2007, Chapter 8.
- [37] Bálint Miklós: Molekuláris biológia I. Műszaki Könykiadó 2000.
- [38] László Éva: Polimeráz láncreakció a géntechnológia nélkülözhetetlen eszköze. Műszaki Szemle 1999. 7-8. szám.
- [39] Sambrook J., Russel D. W.: Molecular cloning a laboratory manual, First Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001) Chapter 1, 1.103-1.105.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Vonderviszt Ferencnek, hogy lehetőséget adott a dolgozat elkészítéséhez, s hogy fontos szakmai tanácsokkal látott el munkám során.

Szeretném megköszönni Dr. Muskotál Adélnak mindazt az odaadó, széleskörű gyakorlati és szakmai segítséget, amelyet a dolgozat megírása alatt tőle kaptam.

Köszönöm Dr. Tóth Balázsnak, aki tanácsaival nagyban hozzájárult a dolgozat létrejöttéhez.