



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Szerves Kémia és Technológia Tanszék

TDK Dolgozat

**Affinitás kromatográfiai hordozók fejlesztése
fehérjék szelektív elválasztására**

Készítette:
Illés Emese

Témavezetők:
Boros Zoltán
Tudományos segédmunkatárs

Dr. Poppe László
Egyetemi tanár

Konzulens:
Oláh Márk
PhD hallgató

Budapest
2014

Rövidítések jegyzéke

A TDK dolgozatban előforduló rövidítések

APS	ammónium-perszulfát
DETA	dietilén-triamin
DIEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DMF	dimetil-formamid
DTPA	dietilén-triamin-pentaecetsav
dUMP	dezoxiuridin-difoszfát
dUTP	dezoxiuridin-trifoszfát
dUTPáz	dezoxiuridin-trifoszfát-nukleotidhidroláz
<i>HsdUTPáz</i>	humán dezoxiuridin-trifoszfát-nukleotidhidroláz
EC	Enzyme Commission
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
GDE	glicerol-diglicidil-éter
HAL	hisztidin ammónia-liáz
HEPES	2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etánszulfonsav
HS	nagy koncentrációjú sóoldat (High Salt)
IDA	iminodiecetsav
IMAC	rögzített fémion adszorpciós kromatográfia (immobilized metal ion affinity chromatography)
LS	alacsony koncentrációjú só oldat (law salt)
MIO	3,5-dihidro-5-metilidén-4H-imidazol-4-on
<i>PcPAL</i>	<i>Petroselinum crispum</i> fenilalanin ammónia-liáz
PPI	pirofoszfát
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis)
TMEDA	tetrametilén-etilén-diamin
TRISZ	trisz(hidroximetil)-aminometán

Tartalom

Rövidítések jegyzéke	2
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. Enzimek	7
2.2. Deoxiuridin-trifoszfát-nukleotidhidroláz (dUTPáz) enzim.....	9
2.3. Fenilalanin ammónia-liáz (<i>PcPAL</i>) enzimek.....	12
2.4. Rögzített fémion affinitás kromatográfia alapjai (Immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC)	16
2.4.1. Affinitás kromatográfia.....	16
2.4.2. Alkalmazott hordozók.....	17
2.4.3. Alkalmazott kelátorok.....	18
2.4.4. Fémek jelentősége az IMAC esetében.....	19
3. Eredmények és értékelésük.....	21
3.1. Hordozófejlesztés.....	21
3.1.1. Különböző pórusméretű szilikagélek felületmódosítása metil- és <i>N</i> -(2-aminoetil)-3-aminopropil-csoportokkal	21
3.1.2. Felületmódosított szilikagélek kapcsolása EDTA-anhidriddel.....	22
3.1.3. Az EDTA kelátorral kapcsolt hordozók feltöltése fémekkel.....	23
3.2. Fehérjetisztítás	24
3.2.1. Humán eredetű rekombináns <i>HsdUTPáz</i> szakaszos üzemű tisztítása	24
3.2.3. <i>PcPAL</i> szakaszos üzemű tisztítása	26
3.2.4. <i>PcPAL</i> tisztítása átfolyásos rendszerben	28
3.3. Hidrofil karakterű hordozók fejlesztése.....	29
3.3.1. Különböző pórusátmérőjű szilikagélek felületmódosítása	29
3.3.2. Biszepoxiddal való kapcsolat	29
3.3.3. Poliaminok kapcsolása epoxid-tartalmú hordozókhoz	30
3.3.4. Poliaminnal módosított szilikagélek kapcsolása EDTA-biszanhidriddel.....	31
3.3.5. Hidrofil karakterű hordozókhoz alkalmazott fémek.....	31
3. 4. Új típusú hidrofil hordozókkal megvalósított átfolyásos rendszerű fehérjetisztítások	33
4. Kísérleti rész	39
4.1. Felhasznált anyagok.....	39
4.2. A felületmódosítás és fehérjetisztítás során alkalmazott oldatok, pufferek, gélek elkészítése	39

4.2.1. Fémme töltött hordozók mosásához szükséges oldatok	39
4.2.2. Puffer oldatok	39
4.2.3. Gélkészítéshez szükséges oldatok	40
4.2.4. Low Salt és High Salt pufferek.....	40
4.2.5. EDTA elúciós oldatok	40
4.3. Analitikai módszerek	41
4.3.1. Tisztítás, gélelektroforézis	41
4.3.2. Sejtfeltárás	42
4.4. Kelátormolekula (EDTA-biszanhidrid) előállítása.....	43
4.5. Kevert felületmódosítású hordozók fejlesztése	43
4.5.1. Különbözö porusátmérőjű szilikagélek felületmódosítása metil- és N-(2-aminoetil)-3-aminopropil-csoportok különbözö arányával	43
4.5.2. Felületmódosított szilikagélek kapcsolása EDTA-anhidriddel.....	44
4.5.3. Felületmódosított-EDTA-kapcsolt szilikagélek feltöltése fémekkel.....	44
4.6. Hidrofil karakterű hordozók fejlesztése.....	45
4.6.1. Különbözö porusátmérőjű szilikagélek felületmódosítása	45
4.6.2. Biszepoxiddal való kapcsolat	45
4.6.3. Poliaminok.....	45
4.6.4. EDTA-val való kapcsolat	45
4.6.5. Fémfeltöltés	45
4.7. Fehérjetisztítás	46
4.7.1. Rekombináns <i>HsdUTPáz</i> szakaszos üzemű tisztítása	46
4.7.2. <i>PcPAL</i> szakaszos üzemű tisztítása	46
4.7.3. <i>PcPAL</i> tisztítása átfolyásos rendszerben	46
4.7.4. Hidrofil hordozókkal végzett átfolyásos rendszerű <i>HsdUTPáz</i> és <i>PcPAL</i> tisztítások	46
5. Összefoglalás	48
6. Köszönetnyilvánítás.....	51
7. Irodalomjegyzék	52

1. Bevezetés

A gyógyszer- és vegyipar, valamint az orvosi diagnosztika sokéves fejlődése és az új követelményeknek való megfelelési kényszer hatására egyre nagyobb teret nyernek új technológiák. Egy élő rendszerekre alapuló technológiai rendszer - ami teljesen más eszköztárral rendelkezik, mint a korábban alkalmazott eljárások - terjed egyre szélesebb körben, amely nem más, mint a biotechnológia. Segítségével könnyebb megfelelni a hatályos rendeletekben foglalt szabályok mellett a zöld kémia törvényeiben leírtaknak is ^{1, 2}. A szintetikus gyártási folyamatok mellett egyre nagyobb szerepet kapnak ezek az eljárások, amelyek hajtóereje a természetes katalizátorok, az enzimek. A biokatalízist széles körben alkalmazzák úgy, mint a textil-, bőr-, élelmiszer-, műanyagipar, valamint a növényvédőszer-gyártás területén is.

A biotechnológiában gyakran alkalmazott eljárás fehérjék előállítására a rekombináns módszer, amely új genetikai információ bevitelét jelenti egy idegen gazdaszervezetbe (baktérium, állati sejt). A rekombináns fehérjék (hormon, antitest, enzim, vakcina) előállítását prokariótákkal (baktériumok) és eukariótákkal (állati szövettenyészet) végzik. Az első rekombináns módszerrel előállított fehérje az inzulin volt³. A fermentáció során egy komplex fehérjeoldatot kapunk, amely a termelő vagy átalakító mikroorganizmusokból, tápanyagkomponensekből és a termék(ek)ből áll. Mivel célfehérjére a későbbi alkalmazás során többnyire tiszta formában van szükség, így szükséges a komponensek szeparációja. Cél, hogy olyan módszert alkalmazzunk, amely a célmolekula szelektív elválasztására képes a fehérjeoldat többi komponensétől. Fehérjék tisztítására számos szeparációs művelet áll rendelkezésre (fizikai módszer pl. centrifuga, elválasztás gélen (gélelektroforézis), elválasztás izoelektromos pont szerint, kromatográfia (pl. ioncserés), affinitás kromatográfia), a választást az adott folyamat sajátosságai határozzák meg.

Az affinitás kromatográfián belül, a rögzített fémion affinitás kromatográfia, (angol kifejezéssel: immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC)) több területen is alkalmazott módszer. Fehérjetisztítás esetén elve azon alapszik, hogy a fehérjéket is felépítő néhány esszenciális aminosav (hisztidin, cisztein) oldalláncai révén képes komplexet képezni a hordozó felületére immobilizált fémionokkal (Ni, Co, stb). A fémionok rögzítéséhez stabil komplexek szükségesek, amelyeket kelátképző molekulák segítségével valósítanak meg, mint például a széles körben alkalmazott

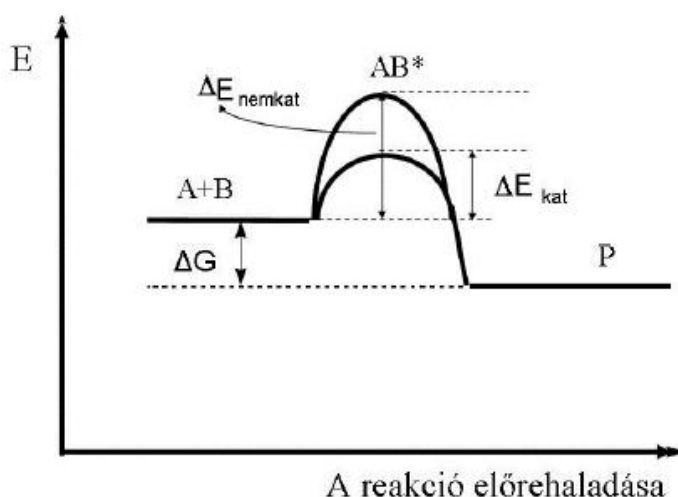
etilén-diamin-tetraecetsav, vagyis az EDTA, amely az egyik leggyakrabban alkalmazott komplexképző vegyület.

Munkám során rögzített fémionos affinitás kromatográfiai hordozók előállítása, fejlesztése, majd ezek segítségével rekombinánsan előállított fehérjék tisztítása volt a cél. Szilárd hordozóként a kitűnő mechanikai adottságokkal rendelkező szilikagéleket választottuk, amelyek felülete szerteágazóan módosítható. Célunk olyan IMAC hordozó fejlesztése volt, amivel akár átfolyásos üzemben is megvalósítható és léptéknövelhető a fermentációval előállított fehérjék tisztítása és/vagy rögzítése⁴.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Enzimek

Az enzimek olyan fehérjék, amelyek képesek valamilyen folyamat lejátszódását katalizálni, így az élő szervezet biokatalizátorainak is nevezik őket. Működésükkel növelik a sejtekben fiziológiai körülmények között lejátszódó biokémiai reakciók sebességét. Hatásuk abban áll, hogy a reakciósebesség növelését az aktiválási energia csökkentésével érik el, új reakcióutat nyitnak meg a reaktánsok speciális elrendezésével, azonban a folyamatra jellemző szabadenergia-változást nem befolyásolják, vagyis energetikailag kedvezőbb utat biztosítanak a spontán módon is lezajló reakcióknak (1. ábra).



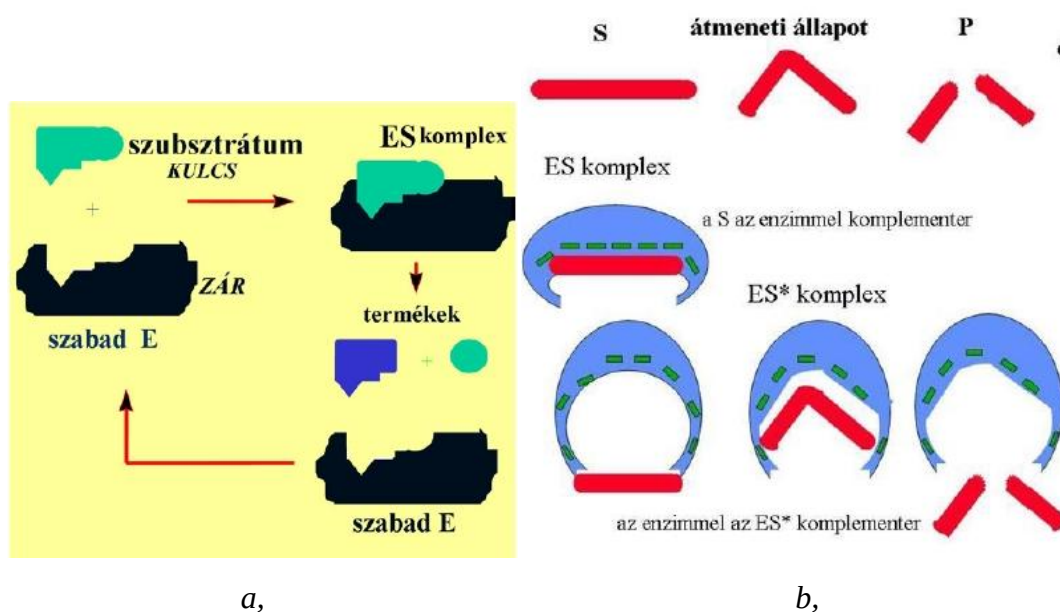
1. ábra: A nem katalizált reakció és az enzim által katalizált reakció során kialakuló energiaszintek⁵

Az enzimekre jellemző tulajdonságai a nagyfokú specifitás (szubsztrát-, reakció-, regio-, sztereospecifitás), érzékenység (hő, pH, ionkoncentráció), vizes közeget és az alacsony hőmérsékletet kedvelik, valamint érzékenyebbek, mint a kémiai katalizátorok. A teljes enzim (holoenzim) két részből áll, az apoenzimből (fehérjerész) és a koenzimből (nemfehérje komponens).

A katalitikus folyamat során a fehérjének csak egy kis része vesz részt, ez az aktív centrum, amely az aminosav-oldallancok kölcsönhatása útján kialakult speciális mélyedésben található. A fehérje felületén egy sajátos szerkezeti egység alakul ki,

amelyhez a szubsztrát molekula illeszkedik és az enzimhez kapcsolódik, ez a szubsztrátkötőhely. Az aktív centrumban található még a katalitikus hely, ahol azok a kulcsszerepet játszó funkciós csoportok foglalnak helyet, amelyek a szubsztrátum átalakításában játszanak közvetlen szerepet.

Az enzimek nagyfokú specifikására kétfajta modell mutat példát. A kulcs-zár modell szerint az enzim kötőhelye merev (*zár*), amelyhez csak a pontosan illeszkedő szubsztrát (*kulcs*) tud bekötődni, míg az indukált illeszkedés modellje általánosabb érvényű. Az enzim és a szubsztrát közötti megfelelés azonban e modell esetében nem tökéletes, a két komponens először egymással lép kölcsönhatásba (elsődleges kölcsönhatás), majd az enzimben és/vagy a szubsztrátban konformáció változás jön létre (2. ábra). Egy adott enzim hőmérsékleti- és pH-optimuma arra a közegre jellemző, ahol a feladatát el kell látnia.



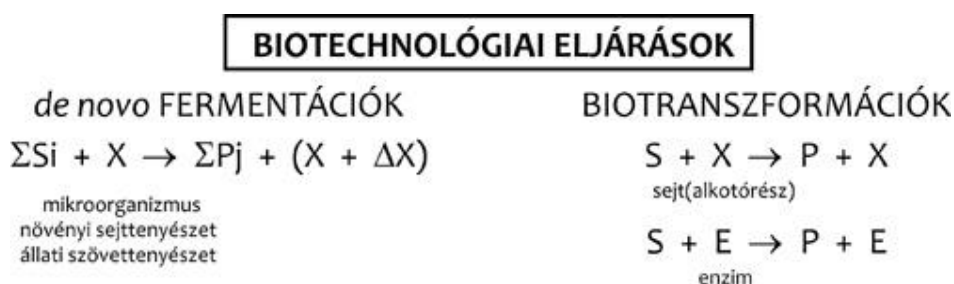
2. ábra: A szubsztrát enzimhez való kötődése: „a” a kulcs-zár modell és „b” az indukált illeszkedés alapján⁵

Az enzimek nemzetközileg elfogadott csoportosítása a katalizált kémiai folyamat alapján történik, nem az enzim szerkezete alapján. Az „Enzyme Commission” (EC) hozta létre a négy szintű besorolású rendszert, ahol négy számjeggyel azonosítják az enzimeket. Az első számjegy egytől hatig változik, ez vonatkozik a katalizált reakció típusára, a második és harmadik alcsoportokat jelöl, míg a negyedik a konkrét enzimet definiálja.

A hat főcsoport:

1. oxidoreduktázok: oxidációs-redukciós reakciók, pl. alkohol dehidrogenáz, metán-monooxygenáz,
2. transzferázok: atomcsoport áthelyezése (metil- vagy glikozilcsoport), pl. aminosztransferázok, foszfortranszferázok,
3. hidrolázok: a szubsztrát kovalens kötéseit hasítják víz belépésével, pl. észterázok, lipázok, glükózidázok, proteázok,
4. liázok: kötések bontása nem hidrolitikus reakcióval, pl. piruvát-dekarboxiláz,
5. izomerázok: izomerek képződését segítik elő, egy molekulán belül geometriai vagy szerkezeti változásokat idéznek elő, pl. fruktóz izomeráz, ribulóz-foszfát-epimeráz,
6. ligázok: ATP felhasználásával molekulákat kapcsolnak össze → szintetázok
CO₂ megkötését katalizálják → karboxilázok
pl. piruvát karboxiláz⁶.

Alapvetően két részre csoportosítják a biotechnológiai eljárásokat, *de novo* fermentációkat (sejttömeg termelés, sejtkomponensek előállítása, metabolit-termelés) és a biotranszformációkat (szubsztrát átalakítások) különböztetünk meg (3. ábra). Mindkét módszer előnye, hogy egyetlen lépésben keletkezhetnek komplex molekulák (monoklonális antitestek, antibiotikumok, hormonok), specifikusak (tisztá optikai izomerek), enyhe reakciókörülmények mellett zajlanak (általában vizes oldatokkal dolgozunk) és kis energia-befektetéssel nagyobb hozamot tudunk elérni⁷.



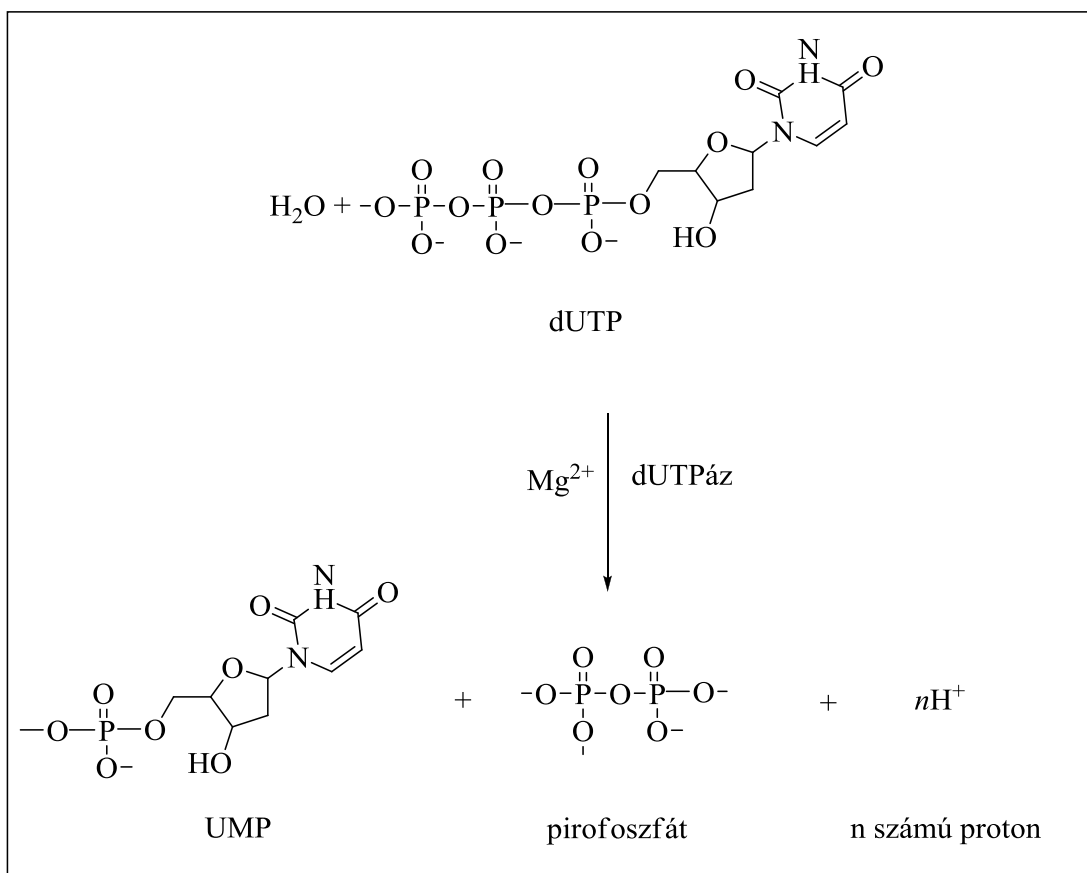
3. ábra: Fermentációs eljárások két típusa⁷

2.2. Dezoxiuridin-trifoszfát-nukleotidhidroláz (dUTPáz) enzim

A minket körülvevő környezetből érkező számos ártalmas, mutagén eredetű hatás a DNS-t alkotó elemek végleges megváltozásához, de akár a sejtek

elpusztulásához is vezethetnek⁸. Azonban a természet igyekszik a szervezetben keletkezett hibák kijavítására, így a DNS integritásának védelmére több javítómechanizmus is létezik. Az egyik leggyakoribb hiba a DNS uracil-tartalmának megnövekedése, amelyet két folyamat idézhet elő, a citozin spontán bekövetkező oxidatív deaminálása és a timin uracillal történő helyettesítése⁹. Ekkor egy báziskivágáson alapuló javítómechanizmus lép életbe, amely kromoszóma-fragmentálódást idéz elő, így a sejt halálát okozza. A korrigáló folyamatban a dezoxiuridin-trifoszfát-nukleotidhidroláz (dUTPáz) enzim kulcsfontosságú szerepet tölt be, ugyanis megakadályozza az uracil DNS-be való beépülését, így sajátos módon javítva a DNS mutálódását¹⁰. 1961-ben Bertani mutatta ki először a dUTPáz enzim létezését *Escherichia coli* kivonatból. Ekkor fedezték fel az enzim specifikitását dezoxiuridin-trifoszfátra (dUTP) nézve és a Mg^{2+} jelentőségét a reakcióban¹¹.

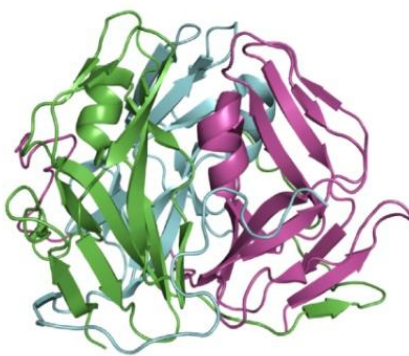
A dUTPáz enzim a dUTP hidrolízisét katalizálja dezoxiuridin-monofoszfáttá (dUMP) és pirofoszfáttá (PPi). A hasítás az α és β foszforatomok közötti foszforanhidrid kötésen következik be, amelyet a Mg^{2+} , mint kofaktor indukál. Korábbi kutatások szerint a szubsztrát, a dUTP a fémion segítségével lép kölcsönhatásba, esetleg egy víz molekulával vagy egy α foszfát csoport felé irányuló oldallánccal. A β foszfát szintén hozzájárulhat a fémes kötés kialakításához. A dUTPáz által katalizált reakció jelentősége, hogy a termék, a dUMP a de novo szintézis prekursora, valamint a reakció alacsony értéken tartja a sejten belüli dUTP/dTTP arányt.



4. ábra: dUTP hidrolízise dUTPáz enzim által, ahol n értéke függ a fémion koncentrációtól és a pH-tól

A dUTPáz enzimeket három csoportba soroljuk a negyedleges szerkezetük alapján, monomer, homodimer vagy homotrimer. A homotrimer forma a legáltalánosabb, jellemző a prokariótákra, az eukariótákra és a legtöbb vírusra^{12, 13}. Mindegyik enzimben öt konzervált szekvenciamotívumot azonosítottak, amelyek az aktív centrumban vagy annak közelében helyezkednek el, s párhuzamot mutatnak az aktív centrum felépítésében és magas szubsztrát-specifitásban¹⁴. A monomer dUTPázok örökítőanyagukban kódoló herpeszvírusok, amelyek az emlősök szervezetét megfertőzik. Eltérő sorrendben, de ugyanazokat a szekvenciamotívumokat tartalmazzák, mint a homotrimer csoport tagjai¹⁴. A dimer dUTPáz előfordul protozoákban és a *Campylobacter jejuni* baktériumban¹⁵. A dimer szerkezetű enzim a homotrimer és monomer társaival szemben nem tartalmazza az öt konzervált szekvenciamotívumot, valamint a szubsztrát-specifitása alacsonyabb. A dUDP-t hidrolizálja, amely az előző két csoport tagjainak aktivitását gátolja¹⁶.

Az *E. coli* dUTPáz háromdimenziós szerkezetére (5. ábra) a röntgenkristallográfia mutatott rá, amely megállapította, hogy szerkezete szimmetrikus trimer és 152 aminosavból épül fel¹⁷. A különböző enzimeket alkotó alegységek eltérő hosszúságú polipeptidláncok, amelyek szerkezetileg csak kis mértékben térnek el egymástól.

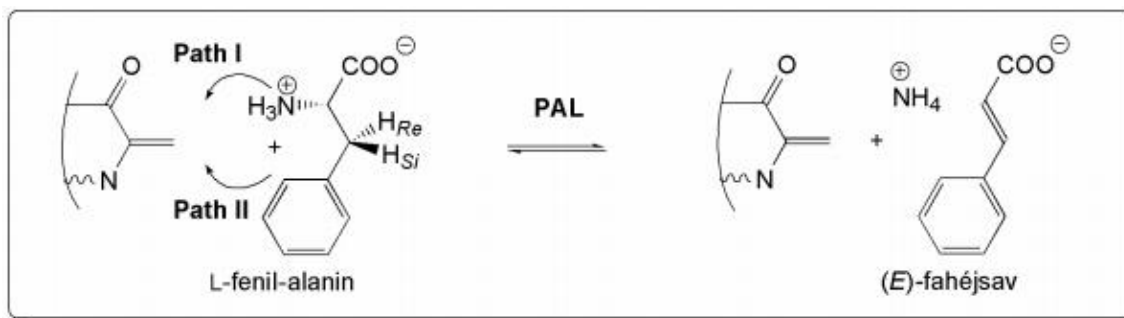


5. ábra: dUTPáz Negyedleges szerkezete - a három alegység különböző színnel jelölve¹⁹

2.3. Fenilalanin ammónia-liáz (PcPAL) enzimek

A fenilalanin ammónia-liáz (EC 4.3.1.24; PcPAL) enzim széles körben megtalálható a növényekben, gombákban, élesztőben. Részt vesz a polifenol vegyületek, mint a flavonoidok, fenil-propanoidok (pl. lignin) bioszintézisében^{18, 19}. Az enzim az ammónia-liáz család tagja, amely a szén-nitrogén kötések hasítását végzi.

A PAL enzim specifikus az *L*-fenilalaninra, kevésbé az *L*-tirozinra, így a növényvilágban és a gombákban lejátszódó metabolizmus kezdeti lépéseként az *L*-fenilalanin ammóniává és transz fahéjsavvá történő bomlásában (6. ábra) katalizálja az ammónia nem oxidatív eliminációját^{20, 21}. A képződő (*E*)-fahéjsav a fenil-propanoidok, flavonoidok, valamint a kumarinok kulcsprekurzora^{22, 23, 24}. Az (*E*)-fahéjsav orto-helyzetben történő hidroxileződése a kumarinhoz, míg para-helyzetben az (*E*)-4-hidroxi-fahéjsavhoz vezet, amely az acetilkolin-észterázon át a lignin kiindulási anyaga.

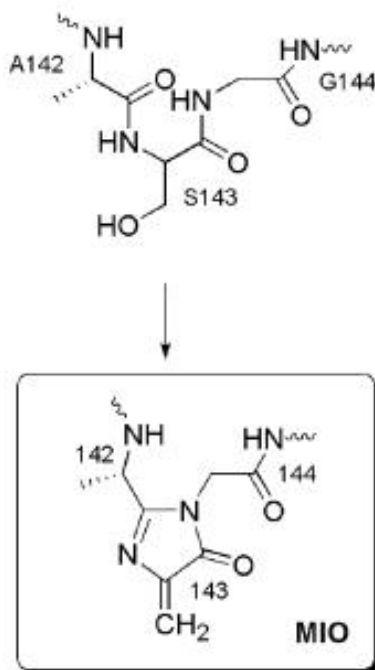


6. ábra: PAL enzim működésének mechanizmusa^{25, 26}

Hasonló elven működik a hisztidin ammónia-liáz (EC 4.3.1.3; HAL) enzim is²⁷. A HAL az *L*-hisztidin lebontásának első lépését katalizáló enzime, szubsztrátjának nem oxidatív dezaminálását katalizálja (*E*)-húgysavvá^{28, 29}. A HAL megtalálható a baktériumokban, az állatokban és az emberben egyaránt, arról még nincsen információ, hogy a növények is tartalmazzák.

A PAL enzim kevésbé szubsztrátspecifikus mint társa, így számos lehetőség nyílik akirális szubsztrátokból történő enantiomertiszta aminosav-származékok előállítására. Korábbi vizsgálatok bebizonyították, hogy a PAL képes az ammónia aril-akrilátokra történő enantioszelektív addíciójának katalízisére, amennyiben az ammónia koncentrációja meghaladja az 5 mol/dm^3 -t^{30, 31, 32}.

A PAL és rokona, a HAL hasonló reakciót katalizálnak (ammónia-elimináció α, β -telítetlen savat eredményező aromás aminosavból), így feltehetően e két enzim szerkezetében is hasonlóságot mutat. A különféle szervezetekből származó fenilalanin- és hisztidin-liázok több homológ sort elemző szekvencia-összevetése is valószínűsítette, hogy ezen enzimek aktív centrumai is hasonlóak³³. Az előzetes (Hanson és Havir)³⁴, majd a későbbi kutatások (Rétey és munkatársai)^{35, 36} több éves munkája során nagyszámú mechanizmusvizsgálati eredmény született. Ezzel a témával foglalkozó első tanulmány 1969-ben jelent meg, amely azt feltételezte, hogy a HAL enzim dehidroalanint tartalmazó elektrofil csoportot használ a katalízis során³⁷. Nem sokkal ezt követően meghatározták az elektrofil prosztetikus csoport, a 3,5-dihidro-5-metilidén-4H-imidazol-4-on (MIO) szerkezetét²⁹ (7. ábra).

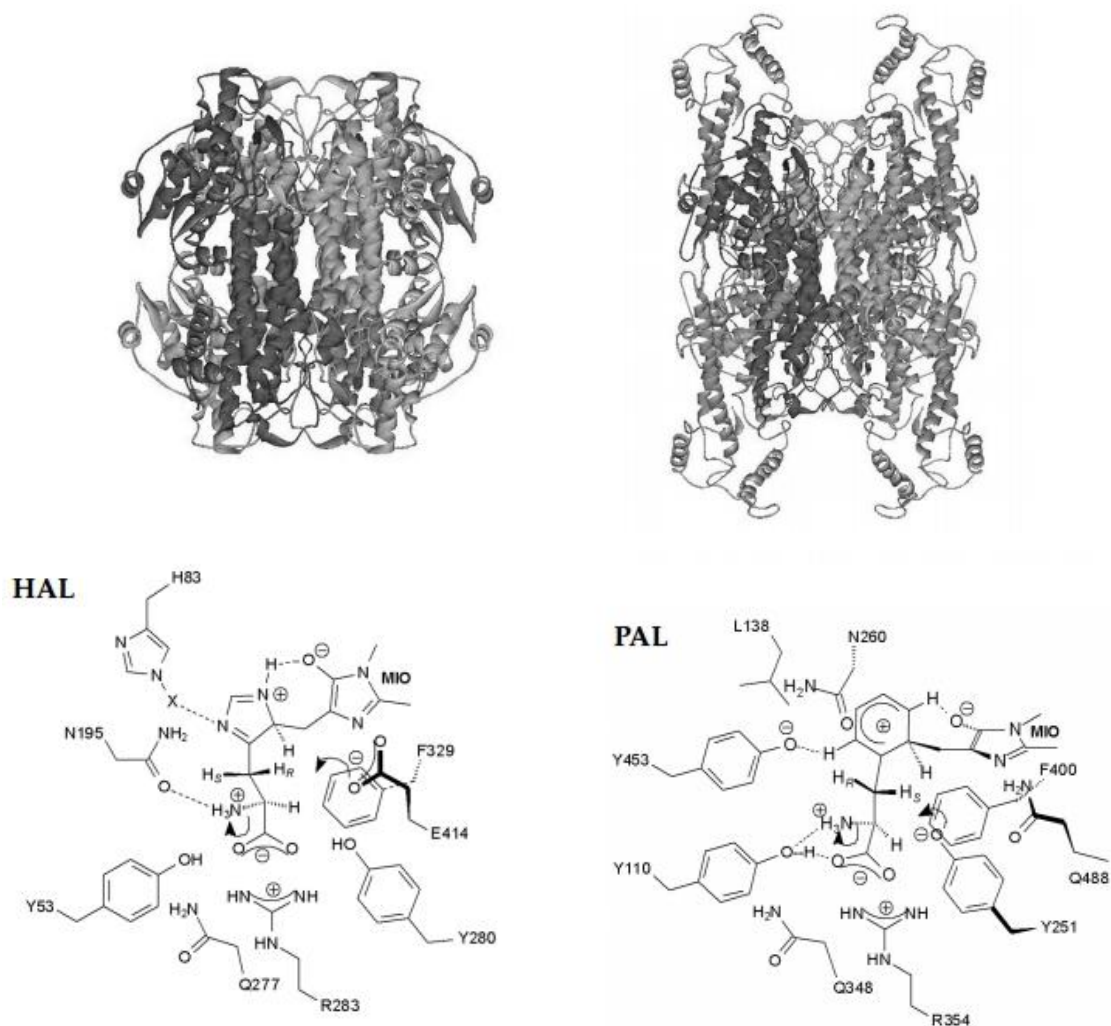


7. ábra: A MIO prosztetikus csoport szerkezete és prekursora a HAL/PAL enzimen²⁹

Fény derült az elektrofil prosztetikus csoport szerepére, miszerint a szubsztrát α -aminocsoportjának Michael-addíciója után a β -proton lehasítása, majd eliminációja következik be^{30, 36, 38}. A képződő amino-enzim intermediérben az elektrofil prosztetikus csoport és az ammónia között kovalens kötés jön létre. Peterkofsky kísérletei alátámasztották ezt a feltételezést, ugyanis az amino-intermediér stabil vegyület³⁸. Azonban a Hanson-mechanizmus fő problémája, hogyan képződött az enzimen belül a karbanion, azaz az enzim milyen módon aktiválja a β -hidrogén protonként történő lehasítását³⁹. A kérdésre a választ Rétey és társai dolgozták ki, ez egy olyan módszer, amely az elektrofil prosztetikus csoportnak az aminosavak aromás gyűrűjére történő Friedel-Crafts típusú addíciójának mechanizmusán alapszik. Eszerint az addíciót követően képződő σ -komplex-szerű intermediérben a pozitív töltésűvé váló gyűrű elektronszívó hatása nagymértékben aktiválja a β -proton lehasítását.

Újabb eredmények igazolták, hogy az elektrofil prosztetikus csoport nem dehidroalanin, hanem a 3,5-dihidro-5-metilidén-4H-imidazol-4-on (MIO), amelynek jelenlétét a HAL krisztályszerkezetében, illetve UV-spektrózkópiával a PAL enzimen is igazolták⁴⁰. A MIO erősebben elektrofil karakterű, mint a dehidroalanin, így alkalmas a szubsztrátok aromás gyűrűjére történő addícióra^{40, 41, 42}.

Funkcionális és genetikai hasonlóságuknak köszönhetően a PAL enzim szerkezeti modellje a HAL (és részben az aszpartáz) már ismert szerkezete alapján homológiamodellezéssel meghatározható volt⁴³ (8. ábra). E kísérletek és a felépített modell segítségével világossá vált az aktív hely aminosav-oldalláncának katalízisben betöltött szerepe.



8. ábra: A HAL kristályszerkezetének²⁹ és aktív centrum modelljének⁴⁴ összehasonlítása a PAL homológia-modellezéssel nyert szerkezetével és aktív centrum modelljével⁴⁵

2.4. Rögzített fémion affinitás kromatográfia alapjai (Immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC)

2.4.1. Affinitás kromatográfia

Munkám során a fehérjék elválasztására alkalmas szeparálási műveletek közül az affinitás kromatográfia módszerét alkalmaztam, amely nagy szelektivitással, felbontóképességgel, s többnyire nagy kapacitással hat a specifikusan kölcsönható biomolekulákra. E módszernek különösen a rekombináns fehérjék tisztítása során van jelentősége. Ezen technika során a biomolekula kölcsönható partnerét (enzim, antitest, hormon, fém-kelát, nukleinsav) immobilizálják a kromatográfiás töltetbe, mely ligand specifikusan megkötí az elegyben levő, tisztítani kívánt anyagot. A művelet során nem kötődött fehérjék lemosásával, majd specifikus elúcióval, tiszta formában deszorbeálható a kívánt célfehérje. A fehérjék egyedi biológiai funkciója lehetővé teszi az aktív molekulák elválasztását is az inaktív denaturált formáktól. Rekombináns fehérjék esetén gyakran az N- vagy C-terminális végeket fúziós „címkével” látják el, egyik legismertebb az oligo-hisztidinnel (His-tag) történő jelölés, amely reverzibilisen kötődik fémkelátokhoz (pl. Ni-kelát). Ez a módszer a rögzített fémion affinitás kromatográfia (IMAC) alapja⁴⁵.

Az esszenciális aminosavak közül a hisztidin, cisztein és triptofán oldalláncai a nitrogén atomok nem kötő elektronpárjain keresztül képesek kötődni a szilárd hordozón komplexált fémek ionjaihoz (Ni, Co, stb). A hisztidin és a cisztein rézzel és cinkkel történő komplexképző tulajdonságára a korábbi szakirodalomban is van példa, ugyanis 1975-ben Porath és munkatársai készítettek először IMAC gyantát, amely agarózból készült (Sephacrose 4B). A készítményt iminodiacetsavval (IDA) módosították, amelyhez Cu^{2+} és Zn^{2+} ionokat kapcsoltak. A vizsgálatokból kiderült, hogy a fém-fehérje komplex stabilitása nő, ha a fehérjében egymás után több hisztidin egység van jelen. A módszer hatékonyságát humán szérum fehérjék elválasztásával igazolták⁴⁶. Az első IMAC hordozó kifejlesztésével közel egy időben indult fejlődésnek a rekombináns fehérjetechnológia, amelynek köszönhetően a fehérjék oligohisztidin jelöléssel láthatóak el, ezáltal növelve affinitásukat az alkalmazott fémekhez. Ennek hatására a rögzített fémion affinitás kromatográfia egyre fontosabb szerepet tölt be a fehérjetisztításban.

2.4.2. Alkalmazott hordozók

Hordozóként alkalmazott agarózokon kívül (butil-, fenil-, oktil-agaróz)⁴⁷ vannak egyéb természetes és mesterséges hordozók is, amelyek enzimrögzítésre alkalmasak. Ilyenek a poliszacharidok, mint például az agaróz, cellulóz és dextrán gél mátrixok. Jellemzőjük, hogy nem specifikus interakciót alakítanak ki és számos enzimmel kompatibilisek, így szelektivitásuk alacsony, illetve gyenge mechanikai tulajdonságaik miatt nagy nyomáson nem alkalmazhatók. A szintetikus polimerek (pl. akrilátok, poliamidok, polisztirol-származékok) ellenállnak a nyomásnak, azonban enzimek immobilizációjára kevésbé használatosak alacsony kapacitásuk miatt. Hasonlóan az előbb tárgyalt hordozókhoz, szintén nem specifikus kölcsönhatásokat alakítanak ki a szubsztrátokkal⁴⁸.

A természetben széles körben elterjedt polimer a kitozán, amely a rákfélék kيتينpáncéljának is összetevője. A poliszacharid láncain több szabad amino- és hidroxil-csoportot is tartalmaz, amelyek aktív reakcióhelyeket szolgáltatnak az enzimek kötődéséhez. A tiszta kitozán biokompatibilis gél, mechanikai erőssége gyenge, de keresztkötések kialakításával javítható. Kémiaiailag módosított kitozánt korábban is alkalmaztak enzimek immobilizációjára⁵⁰.

A kutatócsoportban szilárd hordozóként szilikagéleket alkalmaztunk. A szilikagél formális kémiai képlete: $\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, amely szilárd, amorf formája a vizes szilícium-oxidnak. Szerkezete polimerizált szilikát részecskék véletlenszerű összekapcsolódásával jött létre. A részecskék (micellák) szferoidszerűek, átmérőjük széles skálán változik, akár nanométeresek is lehetnek, ennek köszönhetően nagy fajlagos felület jellemzi őket. A hordozó tulajdonságait a micellák aggregációjának foka és kémiai tulajdonságai, mint a hidroxilált felület határozzák meg⁴⁹. A hidroxil csoportok pK_a értéke 6,0, izoelektromos pontjuk $\text{pH}=2$. A felület hidrofil, gyorsan adszorbeálja a vizet, amelyet termikus körülmények között $100\text{--}200^\circ\text{C}$ -on könnyű eltávolítani. A termikus kezelés után a szilanol csoportok felületi sűrűsége lecsökken⁵⁰.

A szilikátok funkcionálizálása a szabad szilanol csoportokon keresztül lehetséges, a reakcióban a sziloxán csoportok is részt vesznek⁵¹. A szilikagél specifikus tulajdonságait a szervesetlen porózus hordozóknak köszönheti, amelyek a következők: polaritás, hidrofobicitás, optikai tulajdonságok, katalízis^{52, 53}. A felületmódosításban a szilanol csoportok játszanak szerepet, ugyanis ezek a csoportok könnyebben hozzáférhetőek, mint a szilikagél belsejében található csoportok. További előnyeik közé

sorolható, hogy aktívabbak a szilanol csoport gyengén savas jellegű protonja következtében, mint a sziloxán csoportok. Termodinamikai értelemben a szilikagél nem stabil vegyület, stabil módosulata a kristályos, nem porózus kvarc. Ebből kifolyólag a szilikagélek tulajdonságait jelentősen befolyásolhatják az előállítás és az utókezelés paraméterei. Egy rendszer minél távolabb kerül az egyensúlyi helyzetétől, annál nagyobb a hajtóerő, hogy az visszatérjen oda.

A szilikagélek fő jellemzője a porozitás, amelynek jellemzésére több paraméter is rendelkezésre áll:

- fajlagos felület (m^2/g): A szilárd fázis teljes felületét jelenti, azonban elhanyagolja a szubmikronos méretű aggregátumokat,
- fajlagos térfogat (ml/g): 1 g anyagra vonatkoztatott teljes térfogat,
- átlagos pórusátmérő ($\text{\AA}$)
- pórusméret eloszlás (eloszlás-függvényben megadva)⁵⁴.

A felületmódosítás kivitelezése számos módon lehetséges, egyik ezek közül a Wang-módszer⁵⁴. A hordozó felületét 80°C -os vákuumos előkezeléssel aktiválják, majd a szilárd hordozót ezután toluol és alkiltriethoxi-szilán 1:4 térfogatarányú oldatában szuszpendálják. Ezt három napos kevertetés követi, a mosás acetonnal és hexánnal történik, majd a hordozót vákuum alatt szárítják. Módosító anyagként elterjedten használnak különböző funkciós csoportokkal ellátott alkoxi-szilánokat, illetve klór-szilánokat^{55, 56}.

2.4.3. Alkalmazott kelátorok

A stabil segédanyag-fehérje komplexum kialakításához kelátképző vegyületek alkalmazására van szükség, amelyek rögzítik a fémionokat a hordozóra és így biztosítják a fehérje kötődését a felülethez. A leggyakrabban alkalmazott komplexképző az etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), de széles körben használják az iminodiacetsavat (IDA), illetve a dietilén-triamin-pentaecetsavat (DTPA). Az EDTA szintelen, vízben rosszul oldódó, négyértékű poliamino-karbonsav, két- és háromértékű fémionokkal stabil kelátkomplex képzésére képes. A fémionokat a négy karboxilát- és két amincsoportján keresztül oktaéderes formában köti meg. Nagyon erős komplexet képez például a Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{3+} és Fe^{3+} ionokkal⁵⁷. Az EDTA akut toxicitása alacsony, LD_{50} értéke patkánynál 2,0–2,2 g/testsúly kg^{-1} ⁵⁸.

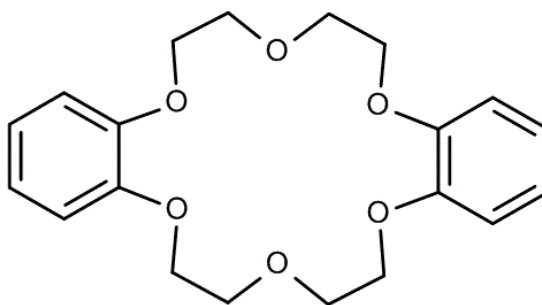
2.4.4. Fémek jelentősége az IMAC esetében

A fémrácsos kristályban a rácspontokon pozitív töltésű fématomtörzsek vannak, amelyeket a hozzájuk közösen tartozó delokalizált elektronok tartanak össze (fémes kötés). A fémes kötés tehát nem irányított, a közös elektronok a rácspontok között viszonylag szabadon mozognak. Három fajta rácsípust különböztetünk meg:

- lapon középpontos (lapcentrált) kockarács
- térben középpontos (tércentrált) kockarács
- hatszöges (hexagonális) rács.

Mindenegyik rácsípust egy-egy koordinációs szám jellemez. Koordinációs számnak nevezzük azt a számot, amely megmutatja, hogy egy kérdéses tömegpontot hány közvetlenül szomszédos tömegpont vesz körül egyenlő távolságban, azaz a központi atom vagy ion ligandumainak száma. Lapcentrált kockarács jellemző többek között a rézre, alumíniumra, kalciumra, mangánra, koordinációs számuk 12. Tércentrált rácsípustba tartozik például a vas, kálium, króm, koordinációs számuk: 8. Hexagonális rácsban helyezkednek el a magnézium, nikkell, cink fématom törzsei, koordinációs számuk szintén 12⁵⁹.

Az alkáli- és alkáliföldfémek a periódusos rendszer I-II. főcsoportjába tartoznak, ezek az *s* mező elemei. Elektronszerkezetük ns^1 , ns^2 . Mindkét csoport tagjai reakcióképesek, redukálószerként is alkalmazzák őket, biológiai jelentőségük azonban a komplexképző képességükben rejlik. Az alkáli fémek (pl. Cs), valamint az alkáli földfémek (pl. Mg, Ca, Sr) koronaéterekkel és kriptándokkal komplexek képzésére alkalmasak (9. ábra), így szelektív fémeltávolításra használhatók.



9. ábra: Dibenzo-18-korona-6 (18-C-6)

Az átmeneti fémek csoportjának neve az *s* és *p* mező közötti átmenetre, nem pedig a fémek és nemfémek közötti kapcsolatra utal. Elektronszerkezetük: $(n-1)d^xns^2$,

ahol $(n-1) = 3, 4, 5, \dots$. Nagy a hajlamuk komplexképzésre, nagyobb oxidációs állapotban stabilabb komplexeket alakítanak ki, ahol az elektronpár akceptor központi fém(ion) (Lewis sav) és B elektronpár donor ligandumok között donor-akceptor (koordinatív) kötés jön létre, amely viszonylag meghatározott koordinációs számú és geometriai elrendeződésű új kémiai minőséget eredményez. Jellemző koordinációs számok és kapcsolódó geometria például a trigonális bipiramis $[\text{Fe}(\text{CO})_5]$, $N=5$; oktaéder $[\text{Ni}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$, $N=6$.

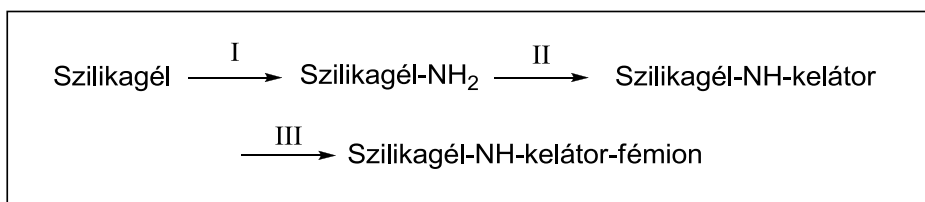
A ritkaföldfémek a periódusos rendszer elemeinek egy sajátos csoportja, ide tartoznak a tizenöt elemből álló lantanidák, kiegészülve a szkandiummal és az ittriummal, amelyek nagyon reakcióképes fémek, emellett az f-mező komplex vegyületei, amelyek halványszínűek. Koordinációs számuk: sp^3d^5 hibridizációból legfeljebb 9-es, f-pályák részvételével akár magasabb is (pl. 12), de általában 8-as vagy 9-es. Bár ritkaföldfémeknek nevezzük őket, előfordulási arányuk összemérhető olyan elemekével, mint a jód, kobalt vagy a szelén. Vegyületeik árában sem mutatkozik olyan nagy különbség a cink, kobalt és nikkelt vegyületeihez képest⁶⁰.

Egyes fémek, mint nyomelemek nagyon kis koncentrációban ($<0.005\%$) elengedhetetlenek a szervezet egészséges és normális működéséhez, ilyen például a cink, vas, kobalt, réz, mangán vagy a stroncium⁶¹. Nagy koncentrációban azonban toxikus hatást fejtenek ki. A nikkelt és vegyületei a bőr és légutak nyálkahártyájára izgató hatással vannak, annak gyulladásáért felelősek. Rákkeltő hatása is bizonyított, bőrrel érintkezve allergiás bőrreakciót vált ki (pl. nikkelt-acetát). Porát belélegezve szervkárosító hatású. Nikkelt tartalmazhatnak adalékanyagként pénzérmék, szemüvegkeretek, kozmetikai cikkek, élelmiszerek (margarin, mogyoró, csokoládé, dió, mandula). A felsoroltak alkalmazása, fogyasztása mind allergiát válthat ki az emberi szervezetből, asztma, ekcémás tünetek, kötőhártya-gyulladás. Nagy mennyiségben alkalmaznak nikkelt a festék- és kerámiáiparban, ékszerek, fémérmék, valamint katalizátorok gyártásakor. Orális toxicitási értéke patkányok esetén $350 \text{ mg/testsúly kg}$. A lantanida fémek kationsugaruk miatt képesek ugyan bizonyos Ca-csatornák blokkolására, de jóval kisebb toxicitást mutatnak az emberi szervezetben, mint például a nikkelt, kobalt, réz vagy a cink⁶².

3. Eredmények és értékelésük

3.1. Hordozófejlesztés

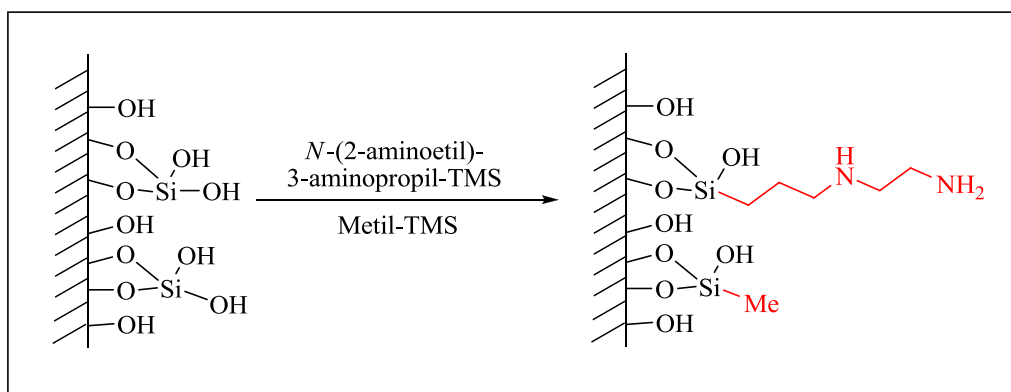
TDK munkám során a kutatócsoport korábbi tapasztalataira alapozva és az új céloknak megfelelően kezdtük el az újabb rögzített fémionos affinitás kromatográfiai hordozók előállítását és fejlesztését. A hordozók felépítése során lineáris módszert alkalmaztunk, vagyis az egyes funkciók kialakítása egymás utáni lépések során történtek. Első lépésben (I) a szilikagélek felületét a megfelelő alkiloxi-szilánok segítségével módosítjuk, így alakítjuk ki az amin-funkciókat, amik a II. lépésben a kelátorokból kialakított savanhidridekkel képesek reagálni. Majd a III., egyben utolsó lépés a hordozók fémionokkal való feltöltése vizes közegben (10. ábra).



10. ábra: His-Tag hordozók előállításának lépései

3.1.1. Különböző pórusméretű szilikagélek felületmódosítása metil- és N-(2-aminoetil)-3-aminopropil-csoportokkal

Korábbi enzimrögzítési vizsgálataink során egyértelművé vált, hogy a felületmódosításkor kialakított csoportok minősége jelentős hatással bír az így kapott szilárd enzimkészítmények biokatalitikus aktivitására⁶². A szilikagélt egy etanol helyettesítő alkohol keverékben, Patosolvban szuszpendáltattuk és a felület előkezelése érdekében NH_4OH oldatot adtunk hozzá és szobahőmérsékleten ráztattuk 1 órán keresztül. Ez után adtuk hozzá a szilán-származékok számított mennyiségének negyedét, majd 23 óra ráztatás után a maradékot, vagyis a $\frac{3}{4}$ részt és további 48 órán keresztül reagáltattuk, így elkerülve az esetleges mellékreakciókat. A mintákat centrifugáltuk, a felülúszót ledekantáltuk, majd Patosolvval öntöttük fel, kétszeri ismétlés után leszűrtük (G4). Szárítás után inert atmoszféra alatt tároltuk. A reakció a 11. ábrán látható.



11. ábra: Szilikagélek felületmódosítása metil- és *N*-(2-aminoetil)-3-aminopropil-csoportokkal

A felületmódosítások során inert, amin-funkciót nem, illetve aktív, vagyis amin-funkciót tartalmazó csoportok kialakítása volt a cél különböző arányokban, amelyhez metil-trimetoxi és *N*-(2-aminoetil)-3-aminopropil-trimetoxi szilánokat alkalmaztunk előre számított mennyiségű keverékekkel. A szilánok reaktivitását a szilícium molekulához kapcsolódó alkoxi-csoportok határozzák meg, így a felületen kialakított csoportok molaránya megegyezik a szilán keverék molarányával. Összesen 36 hordozót állítottunk elő, 12 különböző arányú felületmódosítással három eltérő pórusméretű (250, 500, 1000Å) szilikagélen.

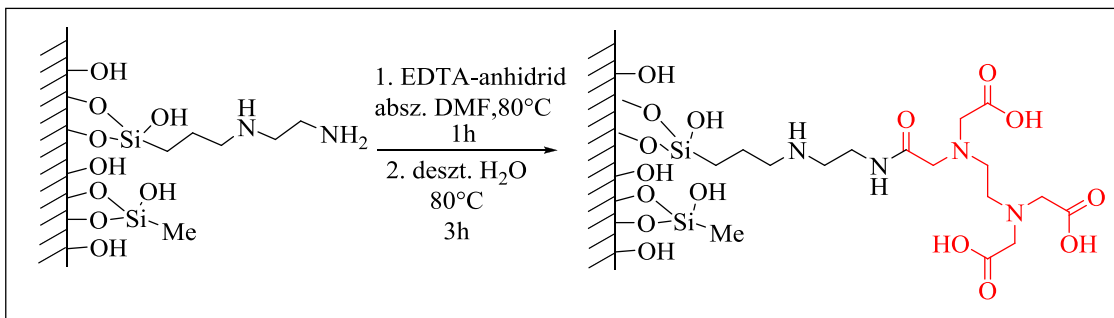
1. táblázat: A metil- és *N*-(2-aminoetil)-3-aminopropil-csoportokkal történő felületmódosítások arányai

Az alkalmazott 12 különböző felületmódosítási arány												
Aktív	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Inert	0	2	4	8	12	16	24	32	48	64	80	96
Jelölés	A0	A2	A4	A8	A12	A16	A24	A32	A48	A64	A80	A96

3.1.2. Felületmódosított szilikagélek kapcsolása EDTA-anhidriddel

A következő lépésben a kelátor molekulákat savanhidridek formájában kapcsoltuk a felületen kialakított amin-csoportokhoz, így a reakciókat inert körülmények között végeztük. Az EDTA-anhidridet, a szilikagélt, majd a *N,N*-diizopropiletilamint (DIEA), amely katalizátor szerepét tölti be a reakcióban és végül oldószerként a vízmentes DMF-et. A reakció inert körülmények között 80°C-on

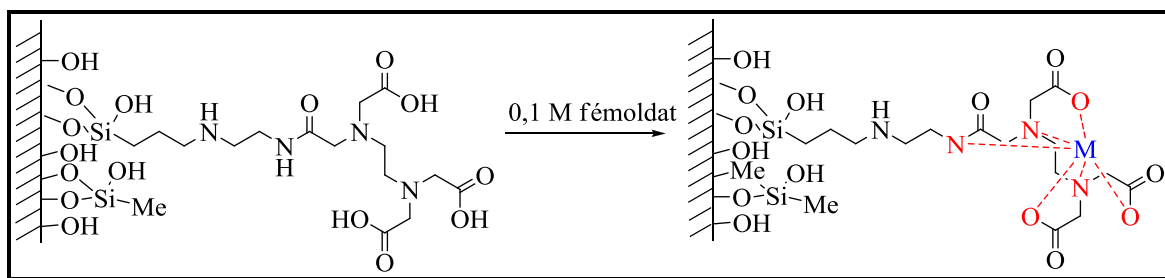
egy óra alatt végbemegy, amely után Hamilton-fecskendővel egy ekvivalens desztillált vizet adtunk az elegyhez és további 3 órát kevertettük 80°C-on, hogy felnyissuk az el nem reagált savanhidrid funkciókat, amelyek később a fémionok komplexálásában vesznek részt. Szűrés után különböző folyadékokkal mostuk (DMF, víz, NaHCO₃, víz, Patosolv, hexán), majd szárítás után a mintákat argon alatt tároltuk. A reakció a 12. ábrán látható.



12. ábra: Felületmódosított szilikagél kapcsolása EDTA-anhidriddel

3.1.3. Az EDTA kelátorral kapcsolt hordozók feltöltése fémekkel

A hordozófejlesztés első szakaszának utolsó lépésében a szilikagél-alapú, EDTA keláló ágenssel kapcsolt hordozók fémrel való feltöltését végeztük el. Ennek során a szilárd hordozókat felfuszpendáltuk a fém sók (lantán, nikkel, kobalt, eurórium, terbium) 0,1 mol/dm³-es desztillált vizes oldatában, majd rövid rázatás után a szilárd hordozókat kiszűrtük (G4 üvegszűrő), végül a visszamaradt szilikagél-alapú hordozókat különböző folyadékokkal mostuk (HEPES-puffer, desztillált víz, imidazol-oldat, desztillált víz, Patosolv, hexán). Az elkészített fémtartalmú szilikagél-alapú affinitás anyagot szárazon, szobahőmérsékleten, argon alatt tároltuk. A folyamat a 13. ábrán látható.



13. ábra: Kelátorral kapcsolt szilikagél hordozók fém komplexeinek előállítása

3.2. Fehérjetisztítás

A különböző arányban felületmódosított, majd keláló ágenssel ellátott és többféle fémmel töltött hordozók segítségével rekombinánsan termeltetett fehérjék tisztításának megvalósítása volt a cél úgy, hogy a hordozó felületéről tisztán, aktív formában elválható legyen a fehérje.

A tisztításhoz többféle HisTag célfehérje is rendelkezésünkre állt úgy, mint a humán eredetű dUTPáz enzim, vagy a növényi eredetű *Petroselinum crispum* fenilalanin ammónia-liáz (PcPAL). A fermentáció után a sejttömeget kiszűrték az elegyből, majd nagynyomású homogenizátor segítségével lízis pufferben proteáz inhibitor jelenlétében feltárták, a sejtszuspenziót lecentrifugálták. A Fermentia Kft.-től kapott fehérjeoldatokból végeztük a célfehérjék elválasztását.

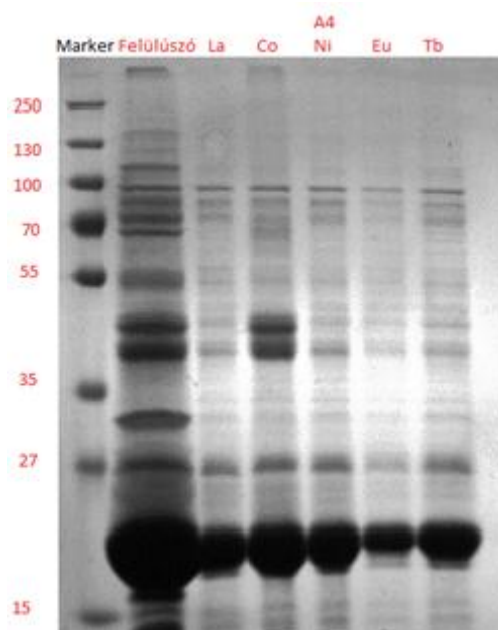
3.2.1. Humán eredetű rekombináns HsdUTPáz szakaszos üzemű tisztítása

A szakaszos üzemű tisztítás során párhuzamosan végeztük az egyes hordozók vizsgálatát ugyanazon fehérjeoldatból. A szilárd hordozókat Eppendorf csövekbe mértük, hozzámértük a fehérjeoldatot, majd meghatározott ideig rázattuk, lecentrifugáltuk, mintát vettünk a felülúszóból és leöntöttük azt. Az aspecifikusan (adszorpcióval) és specifikusan (fémion affinitással) rögzült fehérjét további oldatok, pufferek segítségével eluáltuk a felszínről (2. táblázat), majd centrifugálás után mintát vettünk. Minden egyes fehérje frakciót, a kiindulási oldatot, az áteső frakciót és minden elúciós oldatot SDS-PAGE gélelektroforézissel vizsgáltunk.

2. Táblázat: Elúciós oldatok és az általuk lemosott fehérjék

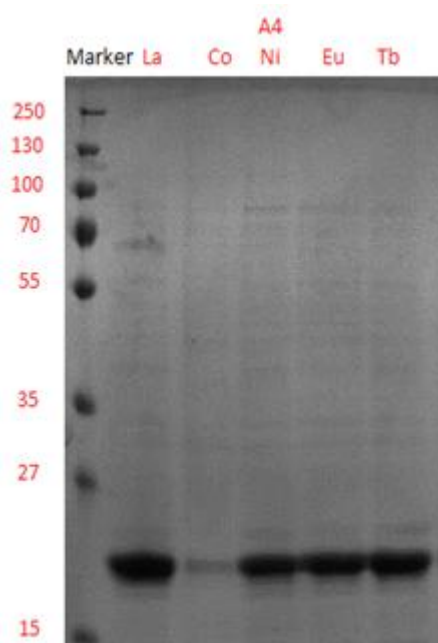
Eluensek sorrendje	Eluens típusa	Lemosott fehérjék a kötődés típusa szerint
1.	LS puffer	aspecifikus
2.	HS puffer	
3.	LS puffer	
4.	5 mM EDTA	specifikus
5.	25 mM EDTA	
6.	100 mM EDTA	
7.	200 mM EDTA	

Az 14. ábrán láthatjuk a SDS-PAGE gélelektroforézis utáni gélképet. Az egy oszlopban lévő foltok ugyanazon mintához tartoznak (a minta kódja az oszlop tetején látható), amely foltok azonos magasságban találhatók, azok ugyanakkora tömegű fehérjére vonatkoznak. Az első függőleges oszlopban a „fehérje létra”, angol nevén „marker” látható, amely egy kereskedelmi kapható fehérjekeverék. Ezen keverék összetétele ismert, így segítségével a saját mintáinkban lévő fehérjefrakciók könnyebben azonosíthatók. A második oszlopban látható a feltárt nyers fehérjeelegység, amellyel minden egyes hordozó rögzítési képességét vizsgáltuk. Míg a 3-7. oszlop a 250Å pórusméretű A4 felületmódosítású hordozó különböző fémekkel töltött változatainak (a két betűs név a fémek vegyjelével azonos) úgynevezett „áteső” frakcióit mutatja, vagyis amely fehérjék nem kötődtek ki a hordozóra. Ha a felülúszóhoz hasonlítjuk a 3-7. oszlopot, akkor a hordozó felületére rögzült fehérje mennyisége azonos a foltok elhalványulásának mértékével. Vagyis, ha a hordozónk az adott fehérjéből nagy mennyiséget adszorbeál egyszerűen fizikailag, vagy a rögzített fémionon keresztül affinitással, akkor a felülúszóhoz képest a folt annál kisebb méretű lesz. A célfehérjénk a gélkép alsó negyedében található 20 kDa környékén. Jól látszik, hogy a lantán és európiummal töltött hordozók kötötték meg legjobban a célfehérjét, míg a kobalt a legkevésbé. A nagyobb tömegű fehérjék foltjai is kisebbek lettek, vagyis azok közül is tapadt a szilikagélek felületére. A 40-45kDa tömegű fehérjéből szintén a kobalt rögzített a leggyengébben.



14. ábra: A *HsdUTPáz* nyers felülúszó és áteső frakciói a különböző fémekkel töltött 250Å pórusméretű A4 felületmódosítású hordozóknak

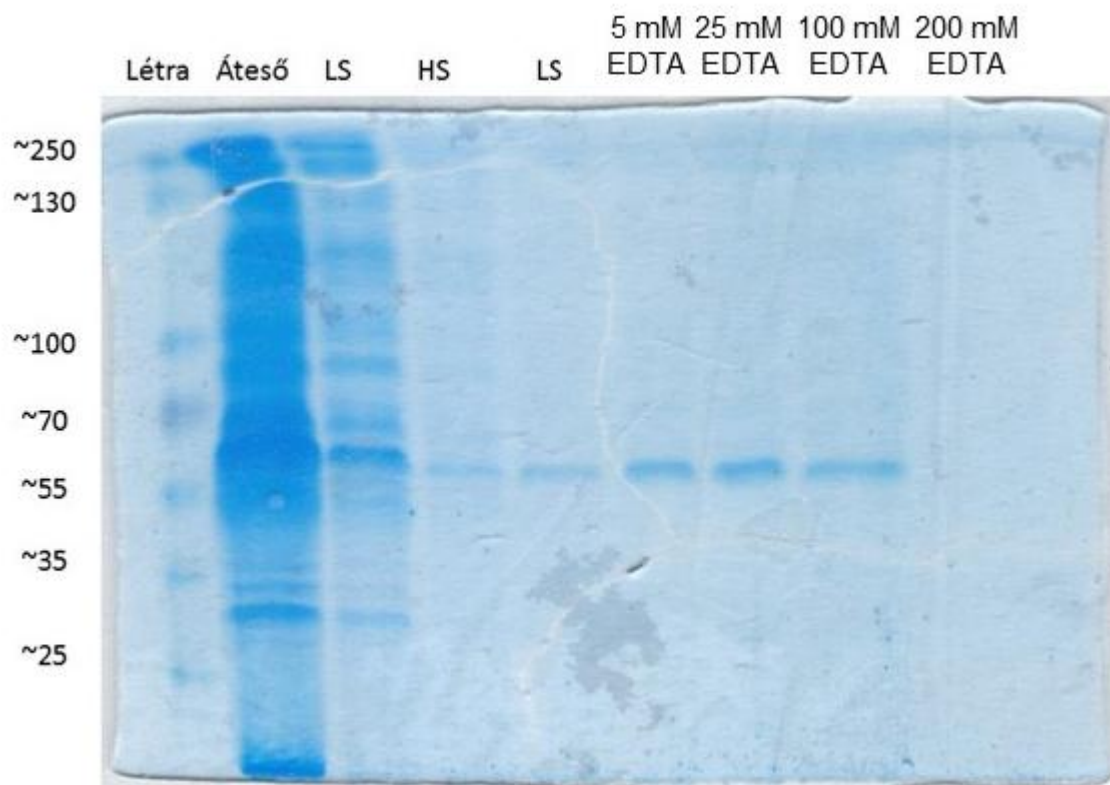
Az 15. ábrán szintén ugyanezen kísérletsorozat eredményei láthatók, azonban itt a fehérje felvitele utáni legaktívabb, vagyis a 200mM koncentrációja EDTA oldattal eluált frakciók gélképe látható. Jól látszik, hogy minden egyes fémnél a célfehérje (*HsdUTPáz*) ~20kDa körüli frakciója dominál, vagyis a hordozóról ezzel az eluenssel nagy tisztaságban (>95%) tudtuk lemosni. Egyedül a kobalttal töltött hordozón nem rögzült elegendően nagy affinitással a célfehérje és már kevésbé erőyes eluensekkel történt mosás során eltávolítható volt a dUTPáz. Legnagyobb mennyiségben fehérjét a lantánnal töltött hordozó kötött meg, vagyis a lantán-fehérje között kialakult affinitás erőssége bizonyult a legnagyobbknak, így ez volt legjobban alkalmas a fermentációs elegyből legszelektívebben kikötni a célfehérjét.



15. ábra: 200mM EDTA oldattal eluált *HsdUTPáz* enzim frakciói a különböző fémekkel töltött 250Å pórusméretű A4 felületmódosítású hordozóknak

3.2.3. *PcPAL* szakaszos üzemű tisztítása

Szerettük volna meghatározni, hogy a felületmódosítás első lépésének, vagyis a metil- és amin-csoportok arányának mekkora hatása van az affinitás kromatográfiás hordozók fehérje megkötő képességére. Ezért a *HsdUTPáz* enzim esetén legjobbnak bizonyult fémionnal, a lantánnal feltöltöttük a teljes 250Å pórusméretű sorozatot (12 különböző felületmódosítású hordozó) és elvégeztük szakaszos üzemen a *PcPAL* enzim tisztítását.



16. ábra: A 250Å jelzésű minta egyes elúciós frakcióinak gélképe

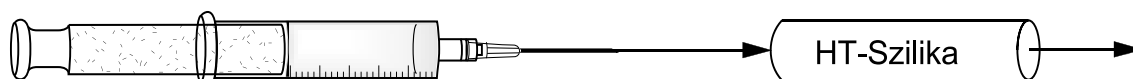
Az 16. ábrán a 250Å pórusméretű metil- és amin-csoporttal 2:1 arányban módosított, EDTA kelátorral és lantánnal töltött hordozóval tisztított *PcPAL* gélképe látható. Jól látszik, hogy a kis koncentrációjú LS (Low Salt) oldat a célfehérjén kívül a pusztán adszorpcióval rögzült fehérjéket is eluálta a felszínről. A HS (High Salt), a második mosó folyadék egy nagyobb koncentrációjú KCl-oldat, amelynél jól látszik, hogy még szintén mosott le adszorpcióval rögzült fehérjéket. A második LS-es mosás már csak célfehérjét mosott le kis töménységben. Ez után négy, egyre növekvő koncentrációjú 5, 25, 100, 200 mM-os EDTA oldattal mostuk a hordozót, ahol az első három frakció EDTA (5-25-100 mM) teljesen tisztán eluálta a célfehérjét a hordozó felületéről, míg a negyedik 200 mM-os EDTA mosó folyadék már nem mosott le semmit, amelynek két oka lehet. Vagy a korábbi mosások már minden fehérjét eluáltak a hordozó felületéről, vagy még ez a koncentráció sem elég ahhoz, hogy a célfehérjét leszorítsa nagyobb kémiai potenciálja révén a felszínről. Mivel azonban a *PcPAL* foltjainak nagysága folyamatosan csökken az 5-25-100 mM-os EDTA irányában, így feltételezhető, hogy ezek a mosó folyadékok már minden rögzített célfehérjét eluáltak.

A leghatékonyabb felületmódosításnak az A2-A16-ig adódtak a géleképek alapján, ha ennél kevesebb amin-csoport volt a felszínen, az már nagyon gyenge kapacitású tisztítást eredményezett, azonban ekkor is tiszta célenzim frakciókat kaptunk.

3.2.4. *PcPAL* tisztítása átfolyásos rendszerben

Mivel szakaszos üzemű tisztításra az általunk fejlesztett hordozók hatékonynak bizonyultak, így céljainknak megfelelően folyamatos üzemű protokoll kidolgozását tűztük ki, hogy később egy áramlásos, teljesen automatizálható készülékben tudjuk alkalmazni töltetként ezen hordozókat.

Az átfolyásos rendszerű tesztek során az affinitás kromatográfiás hordozóinkkal 70 mm-es rozsdamentes acél CatCart oszlopokat töltöttünk és megfelelő csövezési rendszerrel egy fecskendőpumpához csatlakoztattuk. A fecskendőből meghatározott térfogatáramokkal és mennyiségekben áramoltattuk át a fehérjeoldatot és eluenseket, a készülék elvi elrendezését a 17. ábra szemlélteti.



17. ábra: Szilikagél-alapú fém-tartalmú HisTag affinitáskromatográfiás töltetek tesztelése átfolyásos rendszerben

Az átfolyásos rendszerű tesztekhez a 250A2 lantánt tartalmazó hordozójából töltöttünk oszlopot, majd ezt vizsgáltuk. Az oszlop előkészítéséhez először desztillált vízzel, majd LS oldattal mostuk át az oszlopot. Itt abba a problémába ütköztünk, hogy a folyadékot a fecskendőpumpa nehezen tudta átnyomni az oszlopon és ezáltal nedvesíteni a hordozó felületét. Ez után következett a *PcPAL* fehérje felvitele az oszlopra, azonban itt akkora ellenállás keletkezett, hogy a pumpa nem volt képes átnyomni az oszlopon a fehérjeoldatot és a pumpa megállt. Végeztünk kísérletet másik arányú felületmódosítással is, azonban azokkal sem sikerült a fehérje felvitele az oszlopra.

Arra a következtetésre jutottunk, hogy a hordozóink felülete túlságosan hidrofób karakterű és a vizes fehérje oldatok, vagyis teljesen hidrofil, poláris elegyek áramlása erőteljesen gátolt. A hidrofób karaktert első sorban a metil-csoportoknak tulajdonítjuk. Így hordozóink ebben a formában nem alkalmasak átfolyásos rendszerben, vizes közegű

oldatokkal való technológiai folyamatokra, vagyis további módosításuk, fejlesztésük szükséges.

3.3. Hidrofil karakterű hordozók fejlesztése

Az eddig alkalmazott metil- és *N*-(2-aminoetil)-3-aminopropil-csoportokkal történő kevert felületmódosítás nem bizonyult megfelelőnek áramlásos rendszerekben a hordozók magas hidrofóbicitásának köszönhetően, így célunk volt egy hidrofil karakterű hordozócsalád fejlesztése. Ezt úgy szerettük volna megvalósítani, hogy módosítjuk a felületmódosítást és tisztán amin-csoportokat alakítunk ki a felszínen, majd a további lépésekben olyan módosító molekulákat alkalmazunk, amik növelik a hidrofilítást, vagyis hidrogén donorként és akceptorként is viselkedhetnek. Ezek potenciálisan hidroxil- és amin-funkciókat tartalmazó molekulák lehetnek.

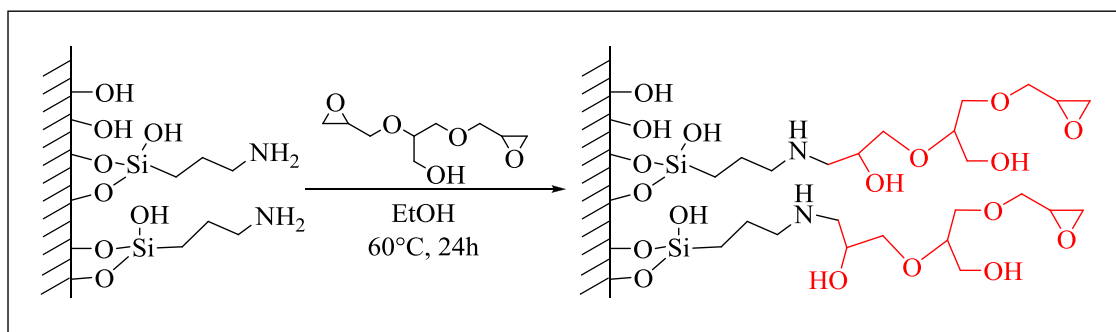
Így amellet döntöttünk, hogy egy rövid szénláncú amino-trimetoxi szilánt alkalmazunk és a felületi 3-aminopropil-csoportokat biszepoxidokkal kapcsoljuk, majd ezt olyan linker molekulával kötjük össze, amelyek legalább két amin-csoportot tartalmaznak. Így az egyik amin-csoportjával a hordozóhoz kapcsolódik az epoxidon keresztül, míg a szabadon maradt másik aminnel képes a kelátor anhidridjével reagálni. Továbbra is fontos tényező volt, hogy egyszerűen kivitelezhető és hatékony technológiai lépések beiktatásával tudjuk kialakítani a hordozóinkat.

3.3.1. Különböző pórusátmérőjű szilikagélek felületmódosítása

A 3.1.1-es pontban leírtaknak megfelelő technológiával hajtottuk végre 250 és 500Å pórusátmérőjű szilikagélek felületmódosítását tisztán 3-aminopropil-trimetoxiszilán alkalmazásával.

3.3.2. Biszepoxiddal való kapcsolás

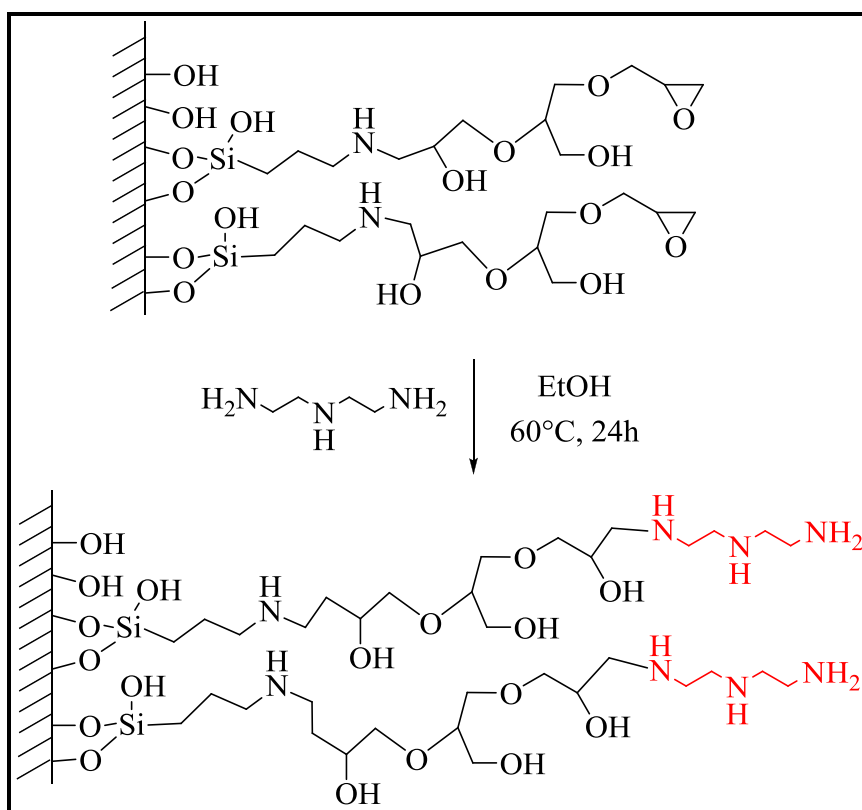
A hidrofil felület kialakításához két biszepoxid funkciót tartalmazó glicerol-diglicidil-étert (GDE) alkalmaztunk. A GDE-ből etanolos törzsoldatot készítettünk, majd a szilikagélekhez pipettáztunk, a kapcsolás egy napos 60°C ráztatás során végbement és egyszerű mosási lépésekkel tisztítható volt. Olyan módosítást kaptunk, amelyek így reaktív, szabad epoxi funkciót tartalmaznak (18. ábra).



18. ábra: Felületmódosított szilikák kapcsolása GDE-vel

3.3.3. Poliaminok kapcsolása epoxid-tartalmú hordozókhoz

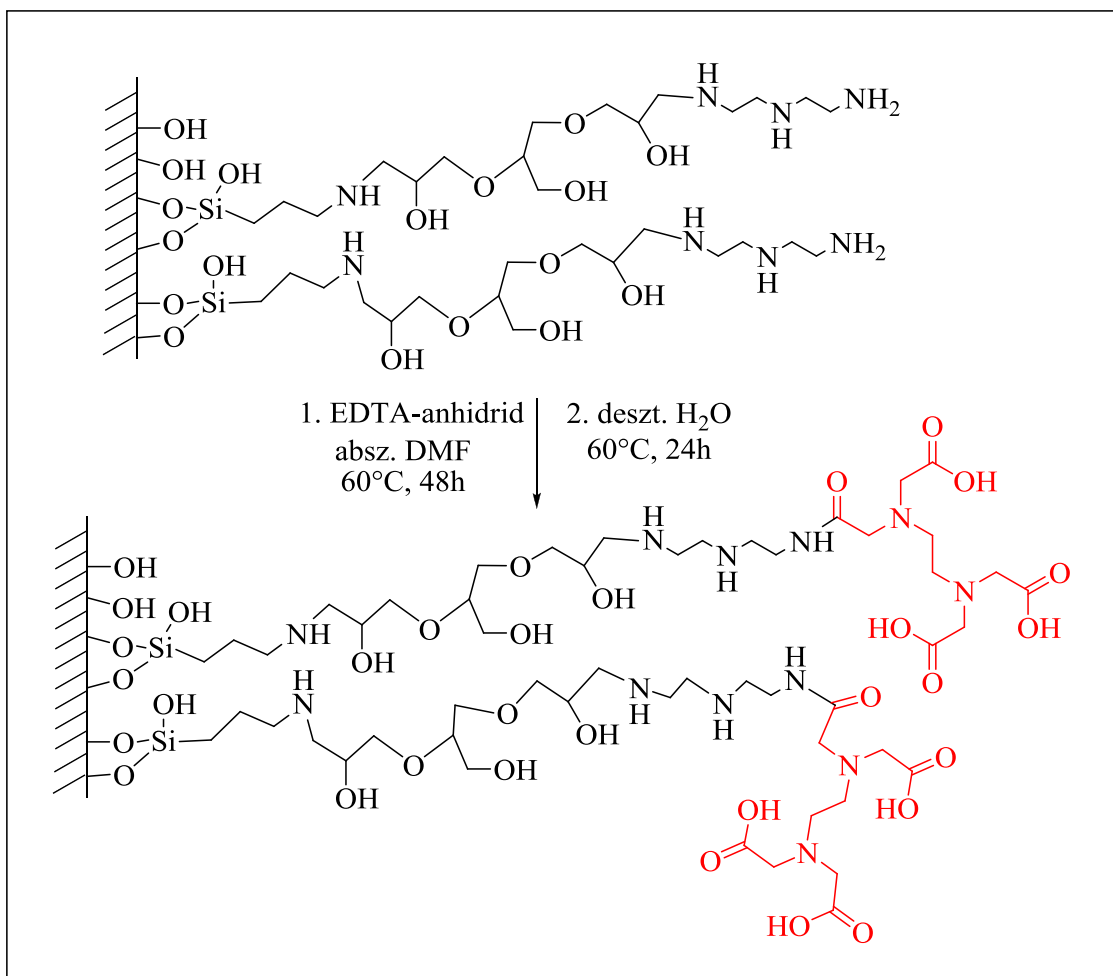
Hasonlóan az előző pontban leírtakhoz, a poliaminok is hozzájárulnak a hidrofíl felület előállításához és lehetőséget biztosítanak szabad amin-csoportjukon keresztül a kelátorok anhidrides kapcsolására. A két amin funkciót tartalmazó dietilén-triaminból (DETA) etanolos törzsoldatot pipettáztunk az epoxid-tartalmú szilikagélekhez, majd 24 órán át 60°C-on ráztuk őket (19. ábra).



19. ábra: Felületmódosított szilikagélek kapcsolása biszaminnal (DETA)

3.3.4. Poliaminnal módosított szilikagélek kapcsolása EDTA-biszanhidriddel

A 3.1.2.-vel azonos elven, azonban módosított technológiával végeztük a kelátor molekulák hordozóhoz történő kapcsolását. A reakciókat szintén inert körülmények között, EDTA-biszanhidrides reakciójával végeztük, azonban 60°C-on 48 órán keresztül reagáltattuk etanolos közegben, majd a reagálatlan andhidrid gyűrű felnyitásához 24 órán keresztül ment a reakció (20. ábra). A módosítások ilyen paraméterekkel is hatékonyan végbementek.



20. ábra: Felületmódosított szilikagélek kapcsolása kelátorral (EDTA)

3.3.5. Hidrofil karakterű hordozókhoz alkalmazott fémek

A fémek listáját kibővítettük a rendelkezésünkre álló és potenciálisan alkalmas többértékű fémekre, így összesen 23 különböző fémionnal töltöttük meg az előállított 250 és 500Å pórusméretű szilikagéleket a 3.1.3.-al azonos módon. Olyan fémeket választottunk ki, amelyek csak az I. illetve II. toxicitási kategóriába esnek, így nem károsak az élő szervezetre, felhasználhatók biotechnológiai rendszerekben (3. táblázat).

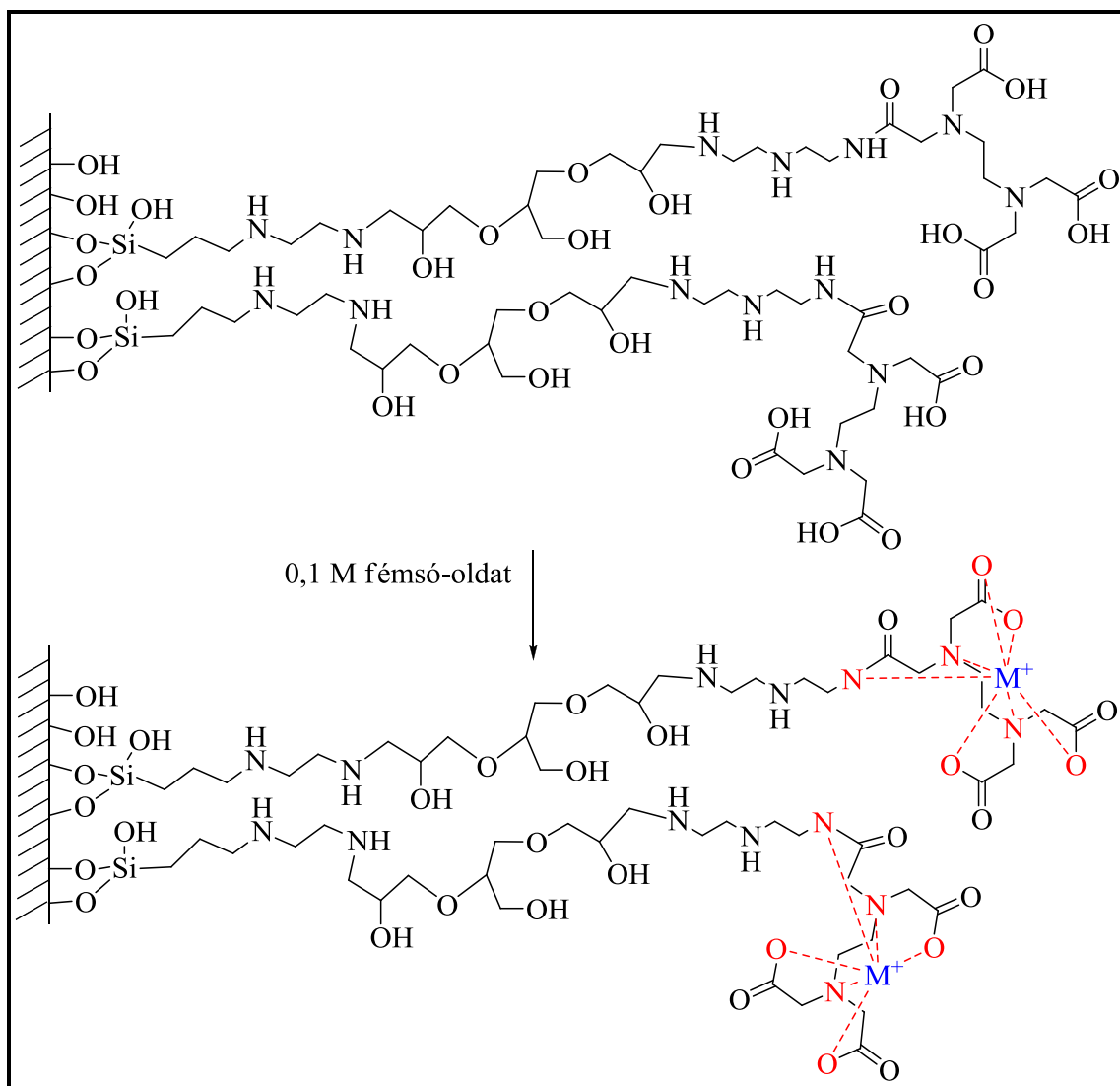
3. táblázat: Vizsgált fémionok

Fém	Vegyjel	Felhasznált fémsó
Lantán	La	LaCl_3
Cérium	Ce	CeCl_3
Prazeodímium	Pr	PrCl_3
Neodímium	Nd	NdCl_3
Európium	Eu	EuCl_3
Terbium	Tb	ErCl_3
Diszprózium	Dy	DyCl_3
Erbium	Er	ErCl_3
Túlium	Tm	TuCl_3
Itterbium	Yb	YbCl_3
Ittrium	Y	YCl_3
Magnézium	Mg	MgCl_2
Kalcium	Ca	CaCl_2
Stroncium	Sr	SrCl_2
Mangán	Mn	MnCl_2
Vas	Fe	FeCl_3
Alumínium	Al	AlCl_3
Cirkónium	Zr	$\text{Zr(OAc)}_2(\text{OH})_2$
Kobalt	Co	CoCl_2
Nikkel	Ni	NiCl_2
Króm	Cr	CrCl_3
Réz	Cu	CuCl_2
Cink	Zn	ZnCl_2

Számos fém sója színesen oldódik, mint például a nikkel-klorid oldata zöld színű, EDTA-komplexe pedig kék színű. A rögzítés során a fémekkel való feltöltésnek így szabad szemmel is látható változása történik, hiszen az eddigi fehér szilikagél szemcsék elszíneződnek fémektől függően (21. ábra).



21. ábra: Hidrofil töltetű hordozók (balról jobbra: fémtöltés előtti, kobalttal illetve rézzel töltött hordozók)

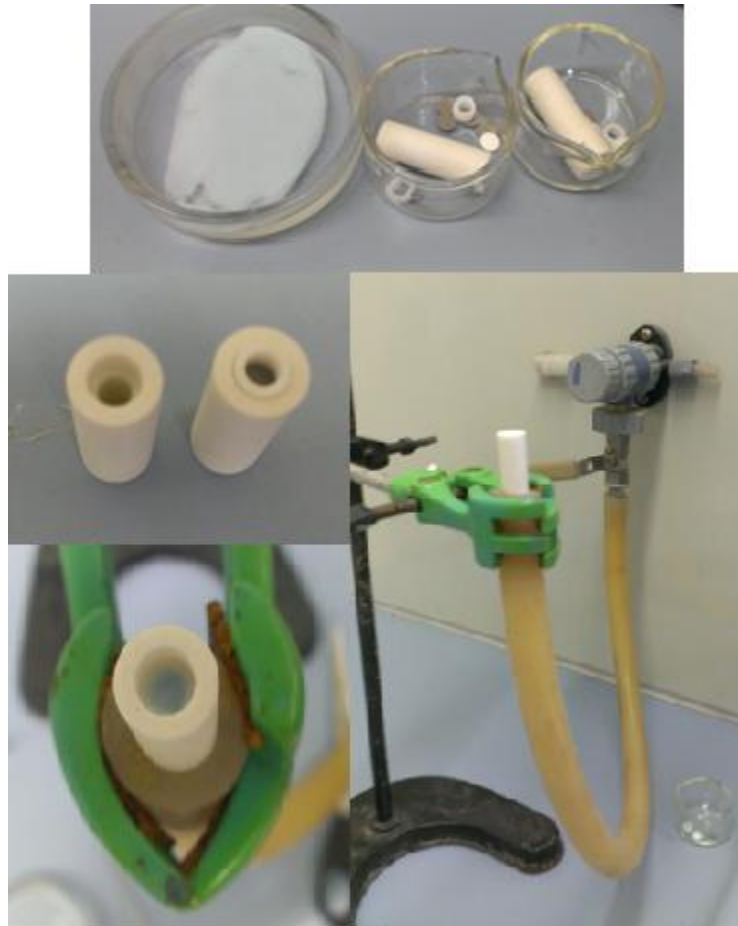


22. ábra: Hidrofil hordozók töltése fémekkel

3. 4. Új típusú hidrofil hordozókkal megvalósított átfolyásos rendszerű fehérjetisztítások

Szakaszos üzemű teszteket nem végeztünk az új hordozókkal, hiszen végső célunk egy folyamatos áramlásos, teljesen automatizálható rendszerben való alkalmazás. Így a 250Å pórusméretű, módosított technológiával előállított szilikagél a kiválasztott fémionok közül összesen kilencel (nikkel, mangán, cirkónium, lantán, ittrium, neodímium, prazeodímium, cérium, erbium) vizsgáltuk humán *HsdUTPáz* és *PcPAL HisTag* fehérjék átfolyásos rendszerű tisztítására.

A kísérletekhez 30 mm hosszúságú teflon oszlopokat és záró elemeket használtunk, amelyeket vákuumban töltöttünk meg a hordozókkal (23. ábra).



23. ábra: A teflon oszlopok, záró elemek és a vákuum töltése

Az átfolyásos rendszerű tesztknél a korábbi szakaszos rendszerben alkalmazott eluenseket használtuk némi módosítással az áramlásos rendszerek kívánalmainak megfelelően (4. táblázat).

4. táblázat: Az átfolyásos rendszerű tesztekhez használt mosófolyadékok és eluensek

Mosó folyadékok és eluensek sorrendje	Mosás célja	Eluens típusa	Térfogatáram [ml/h]	Használt mennyiség [ml]
1.	töltet előkezelése	dH ₂ O	20	5
2.		LS puffer		
3.	fehérje felvitele	Fehérjeoldat	10	5
4.		LS puffer		
5.		HS puffer		
6.		LS puffer		
7.		5 mM EDTA		
8.		25 mM EDTA		
9.		100 mM EDTA		
10.		200 mM EDTA		
11.	töltet utókezelése	LS puffer	20	5
12.		dH ₂ O		

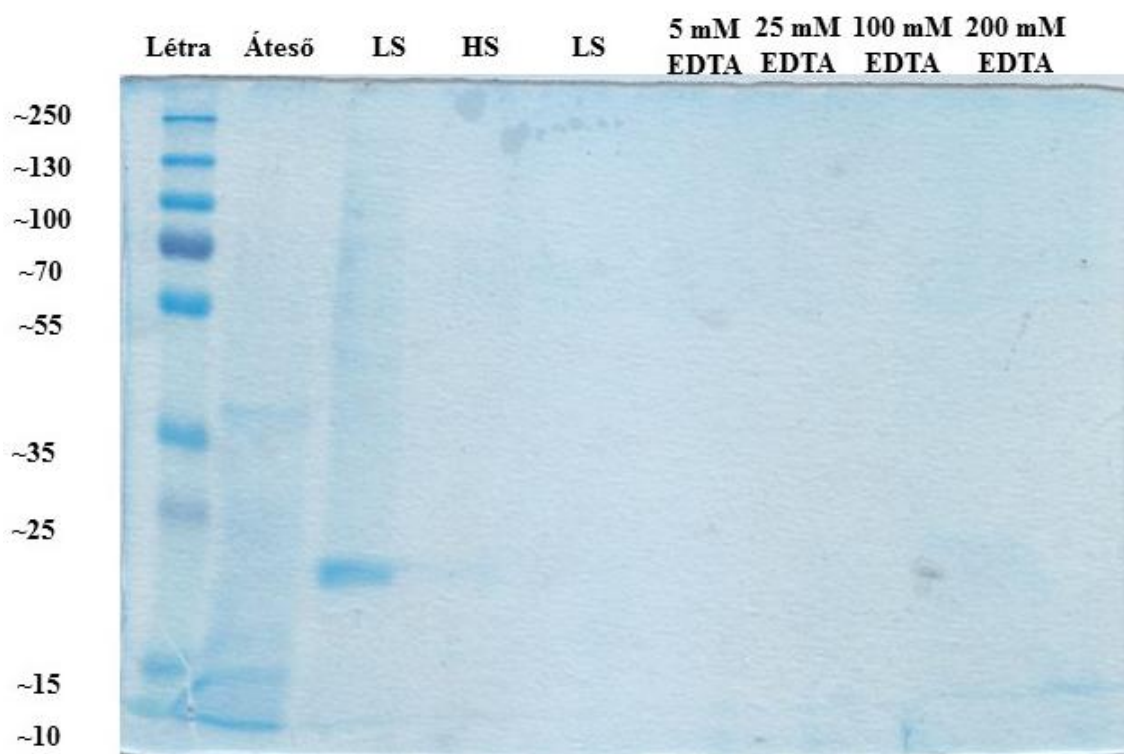
5. táblázat: A HsdUTPáz enzimmel végzett átfolyásos rendszerű tesztek eredményei 250Å-ös hordozókkal (megjegyzés: a szürke háttérű cellák tiszta fehérje frakciókat, a „+”-ok száma a gélképek alapján becsült relatív mennyiségeket jelölnek)

	Áteső	LS	HS	LS	5 mM EDTA	25 mM EDTA	100 mM EDTA	200 mM EDTA
Ni 30mm	+	+++						
Mn 30mm	+++	++	++		+	+		
Zr 30mm	-	+++						
Ce 30mm	+++	+	++		+	+	+	
Er 30mm	++	+	+		++	+		
Pr 30mm	++	++	+		+	+	+	
Y 30mm	++	++	+		+++	++	+	
Nd 30mm	++	++	+		+	++	+	
La 30mm	++	++	+		+	+	+	
La 70mm	+	+	++		++	++	++	+

A 5. táblázatban a *HsdUTPáz* enzimmel 250Å pórusméretű hordozón rögzített különböző fémekkel elért eredményeinket foglaltam össze. Általánosságban megfigyelhető, hogy az első LS mosás során vegyesen, az áteső fehérjeelegységhez hasonló összetételű fehérje frakciók eluálhatók. Az ezt követő HS mosás során a legtöbb fémnél (kivéve nikkel és cirkónium) már tiszta célfehérje elegyek moshatók le, míg a második LS mosás egyik fém esetén sem eluált semmit. A nikkellel töltött hordozóval nem sikerült tiszta HisTag fehérje frakciót szeparálnunk, a kötődés gyenge volt, így már az első LS mosás során vegyesen deszorbeálódtak a fehérjék. A cirkónium esetén pedig egy olyan érdekes jelenséget tapasztaltunk, hogy már az első LS pufferes mosás tisztán hozott le nagy koncentrációban célfehérjét. Azt feltételezzük, hogy a cirkónium hatására nagyon szelektíven kötődnek a HisTag fehérjék a hordozóhoz, így ezek hatására erősen háttérbe szorul a pusztán adszorpcióval rögzülő fehérjék aránya (24. ábra). A kötődés viszont nem erős, hiszen már egy kis ionerősségű HEPES puffer (LS) lemossa őket a hordozóról.

A cérium, mangán, erbium, prazeodímium, ittrium, neodímium és lantán fémek hasonlóan viselkedtek a kísérletek során. Az 5-25-100 mM-os EDTA oldatok hatására tiszta HisTag frakciók eluálódtak, kivéve az ittrium és erbium, ahol a legkisebb koncentrációjú EDTA frakciók szennyezettek voltak egyéb fehérjékkel.

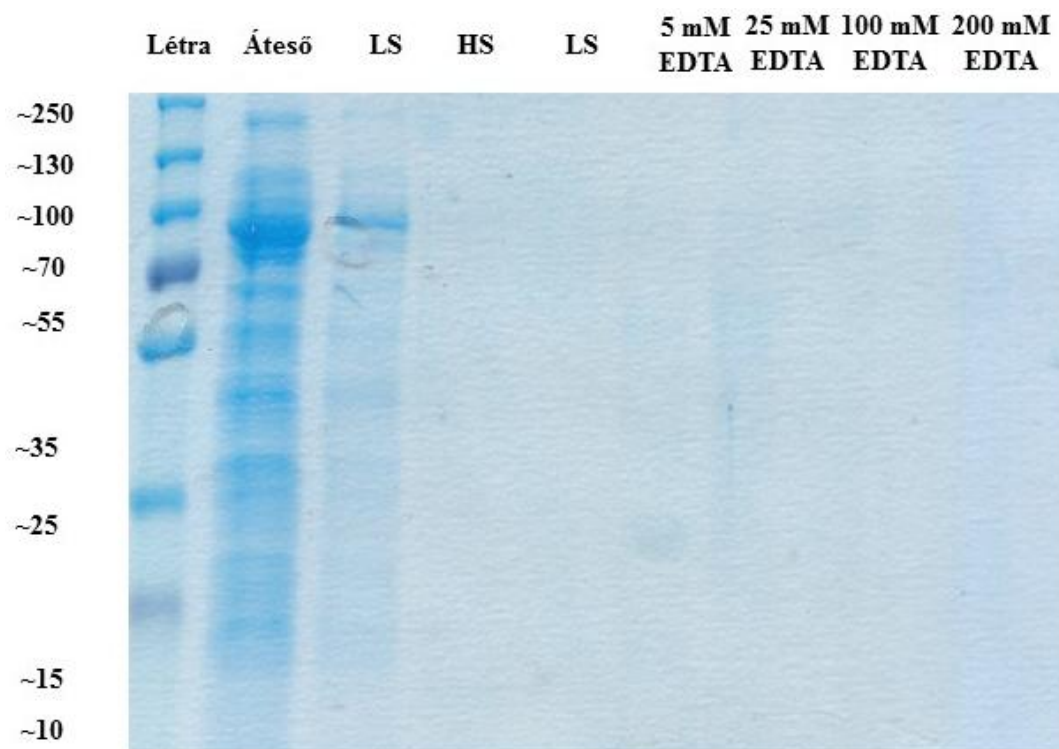
A lantánnal töltött hordozóból 30 és 70 mm-es teflon oszlopot is töltöttünk és vizsgáltunk. A hosszabb oszlop nagyobb töltőtömege révén nagyobb mennyiségű fehérjét is megkötött, így még a 200 mM-os EDTA oldat is mosott le tiszta célfehérjét. Mivel látszik az is, hogy már az 5-25-100 mM-os EDTA oldatok is tudták eluálni a *HsdUTPáz* nagy részét, így következtetésként az vonható le, hogy a mosófolyadék mennyiségének, illetve térfogatáramának is nagy jelentősége van az elúció során az EDTA oldatok koncentrációja mellett.



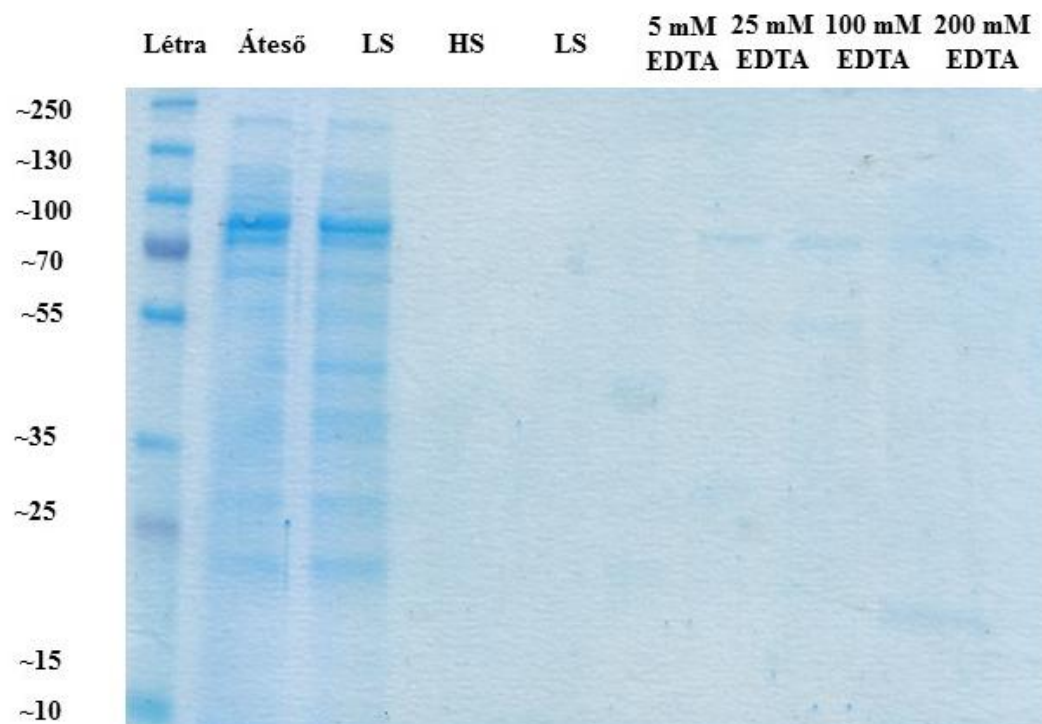
24. ábra: A cirkóniummal töltött 250Å-ös hidrofil szilikagéllel tisztított *HsdUTPáz* gélképe

A *PcPAL* enzim átfolyósos rendszerű tisztítását teljesen azonos módon végeztük a *HsdUTPáz*hoz hasonlóan, azonban a hidrofil karakterű 250Å pórusméretű hordozónkon egyik fémrel sem tudtuk megkötni, illetve elválasztani a többi HisTag nélküli fehérjétől. Minden fém esetén már az első LS puffer lemosta a hordozóról az összes fehérjét, így a további mosófrakciók gélképein nem láttunk fehérjét (példa a 25. ábra). Egyedül a 70 mm-es oszlopon, a lantánnal töltött hordozón tapasztaltunk halvány fehérje foltot (26. ábra).

Így arra a következtetésre jutottunk, hogy a méretében sokkal kisebb fehérje, a négy, egyenként nagyjából 20 kDa-os monomer egységből felépülő *HsdUTPáz* sokkal kisebb diffúziós gátat kell leküzdjön, mint a három 80 kDa-os egységből felépülő *PcPAL* enzim a szilikagél pórusaiban. Így azonos idő alatt (eluens mennyiség és térfogatáram által szabályozva) ugyanazon a hordozókon a kisebb enzim könnyebben tud affinitással megkötődni, mint a nagyobb méretű fehérje. Erre megoldás lehet a nagyobb pórusméretű szilikagélek, illetve a kisebb térfogatáramok alkalmazása, amelyek terveink között szerepelnek.



25. ábra: A neodímiummal töltött 250Å-ös hidrofil szilikagéllel tisztított *PcPAL* gélképe



26. ábra: A lantánnal töltött (70 mm-es oszlop) 250Å-ös hidrofil szilikagéllel tisztított *PcPAL* gélképe

4. Kísérleti rész

4.1. Felhasznált anyagok

A felhasznált vegyszerek és oldószerek a Sigma-Aldrich, a Fluka, a Merck, az Alfa Aesar, a Reanal, és a Molar Chemicals termékei. A fehérjeanalízis során alkalmazott egyéb vegyszerek a Biorad és a Thermo Scientific termékei. A tesztekhez szükséges fehérjék fermentációit a Fermentia Kft.-vel közösen végeztük.

Munkám során felhasznált anyagok: Davisil LC250Å, LC500Å és LC1000Å 40-63 micron (Grace 10000193273) szilikagélek, *N*-(2-aminoetil)-3-aminopropil-TMS (AEAP-TMS), 3-Aminopropil-TMS (AP-TMS), Metil-TMS (Me-TMS), NH₄OH (25%), EDTA, DIEA (5 n/n %), GDE, DETA, vízmentes DMF, HEPES, imidazol, vízmentes etanol, Patolsolv, hexán.

4.2. A felületmódosítás és fehérjetisztítás során alkalmazott oldatok, pufferek, gélek elkészítése

4.2.1. Fémmel töltött hordozók mosásához szükséges oldatok

- *HEPES*: desztillált vízbe (150 ml) feloldottam a HEPES-t (0,715 g), majd az oldat pH-ját szilárd nátrium-hidroxid segítségével 7,5-re állítottam.
- *Imidazol*: desztillált vízbe (80 ml) deloldottam az imidazolt (2,723 g), majd az oldat pH-ját cc. sósavval 7,5-re állítottam.

4.2.2. Puffer oldatok

- *0,5 M trisz-puffer (tömörítő puffer)*: Trisz bázist (6,0 g; 50 mmol) feloldottam desztillált vízben (60 ml), cc. sósavval 6,8-as pH-ra állítottam majd desztillált vízzel 100 ml-re egészítettem ki.
- *1,5 M trisz-puffer (elválasztó puffer)*: Trisz bázist (27,23 g; 225 mmol) feloldottam desztillált vízben (100 ml), cc. sósavval 8,8-as pH-ra állítottam majd desztillált vízzel 150 ml-re egészítettem ki.
- *Futtató puffer*: Trisz bázist (30,3 g; 250 mmol), glicint (144 g; 1,92 mol) és nátrium-dodecil-szulfátot (10 g; 34,68 mmol) feloldottam desztillált vízben (1000 ml). Az így kapott tömény futtató puffer 100 ml-ét hígítottam 1000 ml-re, és ezt az oldatot alkalmaztam futtató eluensnek a gélelektroforézis során.

4.2.3. Gélkészítéshez szükséges oldatok

- *10%-os SDS oldat*: Nátrium-dodecil-szulfátot (10 g; 34,68 mmol) feloldottam desztillált vízben (90 ml), majd feloldás után 100 ml-re hígítottam.
- *APS oldat*: Ammónium-perszulfátot (60 mg; 0,26 mmol) feloldottam desztillált vízben (600 µl). Az oldatot minden gélyöntés alkalmával frissen készítettem el.
- *10% gél* (8 lapra): Centrifugacsőbe bemértem desztillált vizet (19,6 ml), elválasztó puffert (10 ml), akrilamidot (10 ml) és 10%-os SDS oldatot (400 µl). Közvetlenül a gélyöntés előtt hozzáadtam az APS oldatot (400 µl) és a TMEDA-t (40 µl; 0,031 g; 0,27 mmol). Az oldatot Vortex segítségével homogenizáltam, és fecskendővel az öntőformákban fecskendeztem a gél.
- *4% gél* (4 lapra): Centrifugacsőbe bemértem desztillált vizet (6,425 ml), tömörítő puffert (2,5 ml), akrilamidot (975 µl) és 10%-os SDS oldatot (100 µl). Közvetlenül a gélyöntés előtt hozzáadtam az APS oldatot (100 µl) és a TMEDA-t (20 µl; 0,015 g; 0,13 mmol). Az oldatot Vortex segítségével homogenizáltam, és fecskendővel a már megkötött 10%-os gélre fecskendeztem a gél.

4.2.4. Low Salt és Hight Salt pufferek

- *LS puffer*: desztillált vízbe (500 ml) feloldottam kálium-kloridot (1,118 g; 15 mmol) és HEPES-t (5,960 g; 25 mmol), majd az oldat pH-ját szilárd nátrium-hidroxid segítségével 7,5-re állítottam.
- *HS puffer*: desztillált vízbe (100 ml) feloldottam kálium-kloridot (2,237 g; 30 mmol) és HEPES-t (1,192 g; 5 mmol), majd az oldat pH-ját szilárd nátrium-hidroxid segítségével 7,5-re állítottam.

4.2.5. EDTA elúciós oldatok

- *5 mM*: LS oldatban (100 ml) bemértem az etilén-diamin-tetraecetsav-dinátriumsóját (0,186 g; 0,5 mmol), majd miután feloldódott szilárd nátrium-hidroxid adagolásával 8,0-as pH-ra állítottam.
- *25 mM*: LS oldatban (100 ml) bemértem az etilén-diamin-tetraecetsav-dinátriumsóját (0,931 g; 2,5 mmol), majd miután feloldódott szilárd nátrium-hidroxid adagolásával 8,0-as pH-ra állítottam.
- *100 mM*: LS oldatban (100 ml) bemértem az etilén-diamin-tetraecetsav-dinátriumsóját (3,722 g; 10 mmol), majd miután feloldódott szilárd nátrium-hidroxid adagolásával 8,0-as pH-ra állítottam.

- 200 mM: LS oldatban (100 ml) bemértem az etilén-diamin-tetraecetsav dinátriumsóját (7,445 g; 20 mmol), majd miután feloldódott szilárd nátrium-hidroxid adagolásával 8,0-as pH-ra állítottam.

4.3. Analitikai módszerek

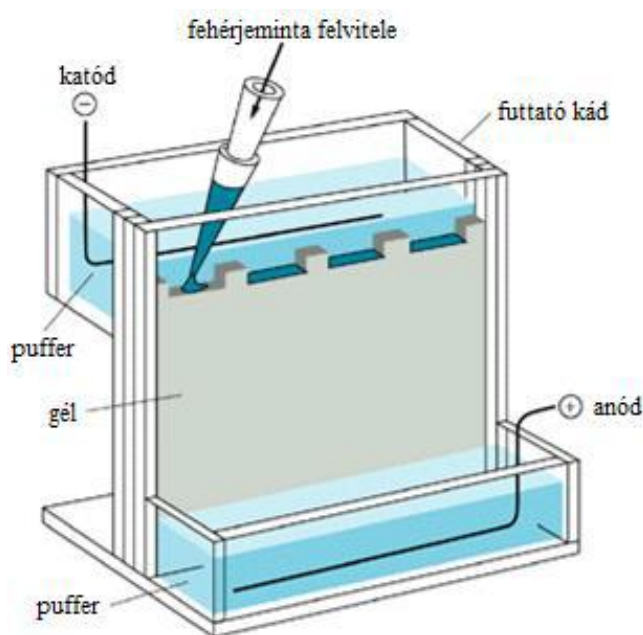
4.3.1. Tisztítás, gélelektroforézis

A fehérjetisztítás során a hordozót (50 mg) először a fehérje oldattal ráztattuk. A felületre aspecifikusan adszorbeálott fehérjék lemosását különböző koncentrációjú sóoldatokkal, a hisztidin jelöléssel ellátott fehérjéket pedig növekvő koncentrációjú EDTA-oldatokkal, gradiens elúció alkalmazásával távolítottuk el. Az alkalmazott fehérjeoldatból és a lemosó pufferekből vett minták segítségével, valamint a gélelektroforézis⁶³ módszerével ellenőrizni tudtuk a fehérjetisztítás hatékonyságát, illetve a minták fehérjeösszetételét. A gélelektroforézis alapja, hogy az elektromos töltéssel rendelkező fehérje elektromos térben azon elektród irányába mozdul el, amelynek töltése ellentétes a saját töltésével. Az elektromos térerősség gyorsítja, a mozgással szemben fellépő közegellenállás pedig lassítja a molekulát. A két erő egyenlővé válásával a molekula állandó sebességgel halad tovább. Az előbbi hatásokból az következik, hogy a fehérjék a gélelektroforézis során méret és töltés szerint válnának szét. E zavaró kettősség kiküszöböléséhez és csak a méret szerinti szétválás eléréséhez a töltés hatását el kell nyomni. Ehhez megfelelő mintaelőkészítés és maszkírozás szükséges.

Első lépés a fehérje denaturálása a diszulfidhidak kémiai felbontásával. A maszkírozás SDS-tal történik, amely a fehérje pozitív töltésű csoportjaival ionpárt képez, s leárnyékolja azokat, alkiláncával pedig másodlagos kötéseket alakít ki a fehérje felületén. A szabadon maradó negatív töltéseknek köszönhetően minden fehérje anionos jellegűvé válik. A fehérjék haladásának követése érdekében valamilyen színes, kis molekulájú vegyületre van szükség, általában bróm-timolkék, amelyet a fehérjemintához adva, az végig a fehérjék előtt halad a futtatás során. A fehérjét 5 percen keresztül 95°C-on kell összefőzni a mintaelőkészítéshez szükséges anyagokkal. Ez alatt az idő alatt megtörténik a denaturáció és a pozitív töltések leárnyékolása is.

A mintafelvitel a következőképpen megy végbe: a fehérjeoldatokból a gállapok mintatartó zsebeibe visszük fel a mintát. A zsebeknél, valamint a gél felső szakaszán alkalmazhatunk kisebb sűrűségű gél is, amelynek célja, hogy a nagy mintatérfogatban lévő fehérjék összetömörödjenek és az előhívás után jól elváló csíkokat kapjunk. Az

előhívás során az SDS oldatot alaposan ki kell mosni a gél lapokból. Ezt követően a géllapokat a megfelelő előhívó festék oldatában áztatva, a megfestődött fehérjék vékony csíkok formájában jelennek meg a gélen. Az előhívott gélképek alapján megállapítható, hogy mindegyik hordozó esetén a célfehérje komplexálódott a rögzített fém ionokhoz, majd az EDTA-s elúció során lemosódott a hordozóról.



27. ábra: Gélelektroforézishez szükséges berendezés részei, működése

4.3.2. Sejtfeltárás

Sejtfeltárás során 500 ml lízis pufferben (150 mM NaCl; 50 mM Tris pH=8,0; 0,5 mM EDTA) felszuszpendáltunk ~21 g WPCL sejttömeget (130508 WPCL 1.; 5,31 + 4,92 + 5,50 + 5,30 = 21,03 g), hozzáadtunk 10 db proteáz inhibitor tablettát (Roche complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, 11836145001), majd nagynyomású homogenizátorban két körben ~1000 bar nyomáson feltártuk (Első lépés: p=920-980 bar; T=3,5-32°C. Második lépés: p=920-960 bar; T=3,0-32°C). Ezután ~150 ml lízis pufferrel öblítettük a készüléket. A homogenizált sejtszuszpenziót (~650 ml) 1 órán át centrifugáltuk (4200 rpm) 4°C-on, de nem váltak szét a fázisok. A képződött (~10 mg) sejttörmeléből képzett pelletből mintát vettünk. A szuszpenziót HPLC szűrőkön (Millipore Millex-GS; 0,22 µm; 33 mm) szűrtük át.

4.4. Kelátormolekula (EDTA-biszanhidrid) előállítása

Az EDTA-biszanhidrid előállítása során inert körülmények mellett dolgoztunk. A polikarbonsavat egy 500 ml-es négynyakú gömblombika bemértük (EDTA: 100 g; 0,34 mol), majd hozzáadtuk a piridint (170 ml). A szuszpenziót 65°C-ra melegítettük és 1 órán át kevertettük. Ezt követően csepegtető tölcsérből adagoltuk hozzá az ecetsav-anhidridet (130 ml; 1,34 mol), majd az elegyet 16 órán keresztül, 65°C-on kevertettük. Az anyagot szobahőmérsékletre hűtöttük és üvegszűrőn (G3) szűrtük inert körülmények között. A terméket ecetsav-anhidriddel (2*100 ml) és dietil-éterrel (3*100 ml) mostuk, majd vákuum alatt szárítottuk exsikkátorban (P₂O₅ szárítószer).

EDTA-anhidrid: 90 g (97%) fehér kristály, ¹H NMR (DMSO-d₆): 2,67 (s, 4H, CH₂), 3,72 (s, 8H, CH₂).

4.5. Kevert felületmódosítású hordozók fejlesztése

4.5.1. Különböző pórusátmérőjű szilikagélek felületmódosítása metil- és N-(2-aminoetil)-3-aminopropil-csoportok különböző arányával

A felületmódosítást 50 ml-es talp nélküli centrifugacsövekben végeztük. Először bemértük a szilikagélt (4,0-4,0 g), majd Patosolvban szuszpendáltattuk (40 ml) és hozzáadtunk NH₄OH oldatot (640 µl). Rázógépen (Heidolph Vibramax 100) szobahőmérsékleten ráztuk olyan fordulaton, hogy a centrifugacsövek tartalma ne ülepedjen vissza (kb. 500 rpm). 1 óra ráztatás után a mintákhoz adtuk megfelelő arányban a szilán-származékokat (200-200 µl), majd még 23 órát ráztuk, majd a mintákhoz hozzáadtunk a megfelelő szilán-származékból (600-600 µl). További 48 óra ráztatás után a mintákat kivettük a rázógépből, majd mostuk őket. A rázógépből kivett centrifugacsöveket lecentrifugáltuk (Hermle Z400K, 3500 rpm, 0°C, 20 min), a felülúszót ledekantáltuk, majd a maradékot felszuszpendáltattuk Patosolvban (45 ml-re a centrifugacső jelzése szerint). Újabb centrifugálás után (3500 rpm, 0°C, 20 min) ismét ledekantáltuk a felülúszót, a maradékot újra szuszpendáltattuk Patosolvban (45 ml-re a centrifugacső jelzése szerint), majd leszűrtük (G4). A mintákat szobalevegőn legalább 3 napig szárítottuk (naponta átkevertük) és argon alatt tároltuk.

4.5.2. Felületmódosított szilikagélek kapcsolása EDTA-anhidriddel

A reakció során inert körülmények között dolgoztunk. Első lépésben a reakció megkezdése előtt kihevítettük a készüléket és folyamatosan argon gázt áramoltattunk át rajta. Háromnyakú lombikba bemértük 600 mg EDTA-anhidridet, a 2 g szilikagél (különböző arányban felületmódosított, tiszta amin, A0-A12, összesen 12 db), majd a 1,5 ml DIEA-oldatot és végül a 11 ml vízmentes DMF-et. A reakció elegyet 80°C-ra felmelegítettük és 1 órán keresztül kevertettük. Ez után Hamilton-fecskendővel egy ekvivalens desztillált vizet (40 µl) adtunk az elegyhez és további 3 órát kevertettük 80°C-on. Szobahőmérsékletre hűtés után az elegyeket üvegszűrőn (G4) szűrtük, majd mostuk DMF-el (3*10 ml), vízzel (2*5 ml), NaHCO₃-al (2*10 ml), vízzel (2*10 ml), EtOH-al (2*10 ml) és végül hexánnal (1*10 ml). A reakciót argon atmoszféra alatt hajtottuk végre. A mintákat 1 napig levegőn szárítottuk, s argon alatt tároltuk.

4.5.3. Felületmódosított-EDTA-kapcsolt szilikagélek feltöltése fémekkel

A kutatómunka következő lépésében a szilikagél-alapú keláló ágenssel kapcsolt hordozót (0,500 g) felszuszpendáltuk a lantán, nikkelt, kobalt, eurórium, terbium fémsó desztillált vizes oldatában (8,0 ml; 100 mM). 5 perc szobahőmérsékleten való rázatás (Heidolph Vibramax 100, 350 rpm) után az elegyet leszűrtük (G4 üvegszűrő), majd a visszamaradt szilikagél-alapú hordozót szűrőn felszuszpendálással a következő oldózerekkel mostuk:

- HEPES-puffer (1*8,0 ml; 20 mM; pH=7,5),
- desztillált víz (1*10 ml),
- imidazol oldat (1*4,5 ml; 500 mM; pH=7,5),
- desztillált víz (1*10 ml),
- vízmentes etanol (1*10 ml).

Az elkészített fémtartalmú szilikagél-alapú affinitás anyagot szárazon, szobahőmérsékleten, argon alatt tároltuk.

4.6. Hidrofil karakterű hordozók fejlesztése

4.6.1. Különböző pórusátmérőjű szilikagélek felületmódosítása

A kísérletet a 4.5.1.-ben leírt recept alapján hajtottuk végre 250Å és 500Å pórusméretű szilikagél hordozókon, 3-aminopropil-trimetoxiszilán módosító ágens alkalmazásával. Így tiszta aminnal módosított szilikagéleket kaptunk.

4.6.2. Biszepoxiddal való kapcsolás

A 4.6.1.-ben végzett tiszta aminnal módosított szilikagélekhez pipettáztunk a GDE-ből készült törzsoldatból (1000 mg hordozóhoz: 15 ml etanol, 175 mg GDE arányban) 15 ml-eket 20 ml-es pattintós kupakkal ellátott üvegekben. A szuszpenziókat 24 órán át 60°C-on ráztuk (Heidolph Vibramax, 350 min⁻¹). 24 óra után a mintákat üvegszűrőn (G4) szűrtük, majd Patosolvval (2*5 ml) és hexánnal (1*5 ml) felszuszpendáltuk és újra szűrtük. A mintákat 2 órán keresztül levegőn szárítottuk, s argon alatt tároltuk.

4.6.3. Poliaminok

A 4.6.2.-es pontban leírt recept alapján végeztük el a poliaminok kapcsolását. A kísérletet 20 ml-es pattintós kupakkal ellátott üvegekben végeztük. A DETA-törzsoldatból (1000 mg hordozóhoz: 15 ml etanol, 200 µl DETA arányban) 15 ml-eket az előre kimért tiszta aminnal módosított szilikagél hordozóhoz mértünk, majd 24 órán át 60°C-on ráztuk (Heidolph Vibramax, 350 min⁻¹), ezt követően a mintákat leszűrtük. 24 óra után Patosolvval (2*5 ml), illetve hexánnal (1*5 ml) mostuk, újrászűrtük. A mintákat 2 órát szárítottuk levegőn, s argon alatt tároltuk.

4.6.4. EDTA-val való kapcsolás

A keláló ágenssel történő kapcsolást a 4.5.2.-es pontban leírt recept alapján hajtottuk végre.

4.6.5. Fémfeltöltés

A szilikagél-alapú keláló ágenssel kapcsolt hordozót (0,500 g) a 4.5.3.-as pontban részletezett módszerrel és fémekkel töltöttük fel.

4.7. Fehérjetisztítás

4.7.1. Rekombináns *HsdUTPáz* szakaszos üzemű tisztítása

A szakaszos üzemű tisztítás során a szilárd hordozókat (50 mg) Eppendorf csövekbe mértük, hozzáamértük a fehérjeoldatot (1 ml), majd 15 percen keresztül rázattuk (200 min^{-1}), Eppendorf centrifugában lecentrifugáltuk (14800 min^{-1}), majd mintát (200 μl) vettünk a felülúszóból és leöntöttük azt. A hordozókat a következő oldatok, pufferek 1-1 ml-ében rázattuk: LS puffer, HS puffer, LS puffer, 5 mM EDTA-oldat, 25 mM EDTA-oldat, 100 mM EDTA-oldat, 200 mM EDTA-oldat. Minden egyes frakció között centrifugálást végeztünk és mintát vettünk. Minden fehérje frakciót, a kiindulási oldatot, az áteső frakciót és minden elúciós oldatot SDS-PAGE gélelektroforézissel vizsgáltunk.

4.7.2. *PcPAL* szakaszos üzemű tisztítása

A *PcPAL* szakaszos üzemű tisztítását a 4.6.1-ben leírt recept alapján végeztük el.

4.7.3. *PcPAL* tisztítása átfolyásos rendszerben

Az átfolyásos rendszerű tesztek során a 250A2 módosítású lantánt tartalmazó hordozóból (hordozó töltő tömege $\sim 300 \text{ mg}$) 70 mm-es rozsdamentes acél CatCart oszlopokat, vákuumban töltöttünk és megfelelő csövezési rendszerrel egy fecskendőpumpához csatlakoztattuk. A fecskendőből a fehérjeoldatot 10ml/óra, az eluenseket 20ml/óra térfogatárammal áramoltattuk át. Az oszlop előkészítéséhez először desztillált vízzel (1*5 ml), majd LS puffer (1*5 ml) mostuk át az oszlopot. Ez után vittük fel a fehérjeoldatokat (5 ml), amely koncentrációját 4 mg/ml összefehérje koncentrációra állítottunk foszfát pufferrel a feltárt fehérjeoldatból hígítva. Az oszlopra történő felvitel során a pumpák megakadtak és nem tudtak tovább szállítani, így a kísérletet félbeszakítottuk.

4.7.4. Hidrofil hordozókkal végzett átfolyásos rendszerű *HsdUTPáz* és *PcPAL* tisztítások

Az átfolyásos rendszerű tesztek során a 250Å pórusméretű hidrofil karakterű hordozók nikkel, mangán, cirkónium, lantán, ittrium, neodímium, prazeodímium, cérium, erbium fémtartalmú változataiból vákuumban 30 mm-es teflon oszlopokat (lantán tartalmúból referenciaként 70 mm-es oszlopot is) töltöttünk és teflon szűrővel és

záróelemmel zártuk le. Megfelelő csövezési rendszerrel egy fecskendőpumpához csatlakoztattuk. A fecskendőből 10 ml/óra térfogatárammal a fehérjeoldatot, 20 ml/óra térfogatárammal az eluenseket és mosó folyadékokat áramoltattuk át. Az oszlop előkészítéséhez először desztillált vízzel (1*5 ml), majd LS puffer (1*5 ml) mostuk át az oszlopot. Ez után vittük fel a fehérjeoldatokat (5 ml), amelyek koncentrációját egységesen 4 mg/ml összefehérje koncentrációra állítottunk foszfát pufferrel a feltárt fehérjeoldatból hígítva. A következő eluensekkel mostuk sorban LS puffer (1*5 ml), HS puffer (1*5 ml), LS puffer (1*5 ml), 5 mM EDTA-oldat LS pufferben (1*5 ml), 25 mM EDTA-oldat LS pufferben (1*5 ml), 100 mM EDTA-oldat LS pufferben (1*5 ml), végül 200 mM EDTA-oldat LS pufferben (1*5 ml). Utókezelésként LS pufferrel (1*5 ml), majd desztillát vízzel (1*5 ml) mostuk. A *HsdUTPáz* és *PcPAL* fehérjék tisztításait külön oszlopokon végeztük, a hordozók viszont ugyanazon sarzsban készültek.

5. Összefoglalás

A biotechnológiai úton előállított fehérjék, egész sejtek, hormonok, antitestek és egyéb termékek előállítása, vagyis az upstream műveletek után még további downstream műveleti lépések során kerülnek olyan végleges formába, amelyben a végső felhasználásra alkalmasak lesznek. A downstream műveleti lépések az ilyen technológiai folyamatokban legalább olyan fontosak, mint a termék előállításához kapcsolódó lépések, vagyis az upstream. Megfelelő szeparációs, tisztítási, feldolgozási és kiserelési eljárások nélkül ezek a biológiai úton előállított termékek nem lennének hatékonyan felhasználhatók.

TDK munkám során egy olyan kutatási projektbe kapcsolódhattam be, amelynek során egy ilyen downstream művelet, ahol fehérjék egymástól történő elválasztásának, tisztításának egy ismert technológiájához újszerű segédanyag fejlesztése a cél. Olyan szilárd hordozók fejlesztését akarjuk megvalósítani, amelyek megoldást jelenthetnek a kereskedelmi forgalomban kapható készítmények hiányosságaira (száraz formában inaktívak, mechanikai stabilitásuk gyenge, toxikus fémeket tartalmaznak), előállítási technológiájuk egyszerű és alkalmazásukkal a fehérjék tisztítása átfolyós rendszerben léptéknövelhető, így kivitelezhető nagyméretű ipari fermentációs fehérjeelegyek tisztítása. Munkám során szilikagél alapú rögzített fémionos affinitás kromatográfiai (immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC) segédanyagok fejlesztésével akartuk ezt megvalósítani.

Munkám során különböző pórusméretű szilikagéleket (250, 500, 1000Å) használtam. A porózus anyagok egyik fontos fizikai paramétere ez a tulajdonság, hiszen nagy mértékben meghatározza ezen hordozók fajlagos felületét, azonban egy bizonyos méret alatt már nagy diffúziós gát léphet fel, amely a makromolekulás fehérjék számára akadályt jelent, így az elérhető szabad felület csökken. A hordozófejlesztés első lépéseként aktív, amin-funkciót tartalmazó és inert, amin-funkciót nem tartalmazó alkoxi-szilánokkal különböző arányban módosítottuk a szilikagél felszínét, majd az amin-csoporton (aktív) keresztül reagáltattuk az etilén-diamino-tetraecetsav, ismert nevén EDTA biszanhidrijével inert körülmények között. Így egy fémionok komplexálásra alkalmas, mechanikailag stabil hordozót kaptunk. Ezeket a hordozókat a kereskedelembe is kapható IMAC készítményekben széles körben alkalmazott fémekkel, nikkellel és kobalttal, illetve lantán, eurórium és terbium ritkaföldfém sókkal töltöttük meg. Munkánk során meg akartuk vizsgálni, hogy a bizonyítottan toxikus

nikkelt más, nem mérgező és gazdaságos áron beszerezhető átmeneti fémmel vagy ritka fémmel helyettesítsük. Elvégeztük *HsdUTPáz* és *Petroselinum crispum* fenilalanin ammónia-liáz (*PcPAL*) rekombinánsan termelt enzimek szakaszos üzemű tisztítását. Leghatékonyabb és legnagyobb kapacitású fémionnak a lantán bizonyult. Megkíséreltük folyamatos áramlásos rendszerben is ezen hordozóink vizsgálatát fehérjék tisztítására, azonban már a töltetek előkezelése során tapasztaltuk, hogy nagy ellenállása van az oszlopnak és a fehérje oldat átáramoltatásakor a pumpák nem tudtak szállítani. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a hordozóink felülete erősen hidrofób, ezért alakul ki nagy ellenállás vizes oldatok átáramoltatásakor. A hidrofóbicitás egyik fő oka a metil-csoportok jelenléte, amit hordozó felületmódsításának első lépésében alakítottunk ki. Mivel célunk egy átfolyós rendszerű, automatizálható rendszer felépítése ilyen hordozókra alapozva, így új eljárás kidolgozását tűztük ki.

A módosított hordozó fejlesztésben első lépésben már tisztán amin-csoportok kialakítását végeztük el a hidrofóbicitást növelő inert metil-csoportok nélkül. További hidrofilitást növelő segédmolekulák alkalmazását építettük be. Olyan bifunkciós molekulákat szerettünk volna beépíteni, amelyek egyik funkciójukkal a hordozó felületéhez kapcsolódnak, másik funkciójukon lineárisan továbbépíthető a hordozó. Ezért második lépésben biszepoxiddal, glicerol-diglicidil-éterrel (GDE) reagáltattuk a felületi amin-csoportokat, így a biszepoxidok egyik epoxi-csoportja a felületen szabadon maradt és továbbépíthető a hordozó. Harmadik lépésben kétértékű aminnal, dietilén-triaminnal (DETA) reagáltattuk a felületi epoxi-funkciót. A második és harmadik lépés után, a felnyíló epoxi-gyűrűk hatására hidroxil-csoportok alakulnak ki a láncon és a szénláncban is több helyen van heteroatom, oxigén vagy nitrogén. Negyedik lépésben szintén inert körülmények között kapcsoltuk hozzá az EDTA-biszanhidridet, azonban egyszerűsített és könnyebben kivitelezhető reakcióval. Utolsó lépésben összesen 23 különböző fémionnal töltöttük meg mind a 250 és mind az 500 Å pórusméretű hordozónkat, így 46 affinitás kromatográfiás segédanyagot állítottunk elő.

Ezek közül eddig a 250 Å pórusméretű, nikkelt, mangán, cirkónium, lantán, ittrium, neodímium, praeodímium, cérium, erbium fémekkel töltött hordozókat vizsgáltuk meg humán *HsdUTPáz* és *PcPAL* átfolyós rendszerű tisztítására. Minden egyes hordozón megfelelő áramlási sebességgel tudtunk vizes oldatokat, puffereket és fehérje oldatokat átáramoltatni, így a fizikai paraméterei megfelelőek voltak a tölteteknek. A *HsdUTPáz* esetén a nikkelt kivételével minden fém esetén tudtunk tiszta fehérje frakciókat eluálni a töltetekről. A mosások során a cirkónium esetében érdekes

jelenséget tapasztaltunk, mert a hordozó a fehérje elegyből szinte az összes fehérjét kikötötte, azonban már az első elúció (LS puffer) teljesen deszorbeálta a felszínről a *HsdUTPáz* tiszta formában. Vagyis a hordozó szelektíven köti ki a HisTag fehérjét, azonban kis affinitással, mert már egy kis ionerősségű sóoldattal eluálható volt. A *PcPAL* esetén egyik fémmel sem tudtunk tiszta célfehérje frakciót elválasztani 30 mm-es oszlopon. A nagyobb töltő tömegű 70 mm-es lantán töltetű oszlopon volt tapasztalható egyedül halvány *PcPAL* fehérje folt a gélképeken. Következtetésként azt vontuk le, hogy a jóval nagyobb méretű *PcPAL* (három 80 kDa-os monomerből felépülő) esetén a 250Å pórusméret nem elegendő nagyságú és így nagy diffúziós gát lép fel. Ezzel szemben a jelentősen kisebb, így jóval mozgékonyabb *HsdUTPáz* (négy 20 kDa-os monomerből felépülő) enzim tisztítása már ekkora pórusmérettel is megvalósítható. Ez a jelenség felhasználható egyfajta méretkizárással kombinált IMAC fehérjetisztításra is.

Összefoglalva elmondható, hogy sikeresen tudtuk megvalósítani rekombinánsan termelt HisTag fehérjék folyamatos áramlásos üzemű tisztítását többféle fémionnal is. Vizsgáltuk a hordozó pórusméretének szerepét, több ponton fejlesztettük, egyszerűbben kivitelezhetővé tettük a hordozók előállítási technológiáját. Elvégeztük kilenc fémion vizsgálatát, amelyek közül több is hatékonyabbnak bizonyult, mint a széles körben alkalmazott és toxikus nikkel. Továbbiakban tervezzük a már előállított hordozók tesztelését, így kiterjeszteni a vizsgált fémionokat és a pórusméret széleskörű vizsgálatát. Célunk még a hordozók pontos kapacitásának meghatározása, az eluensek mennyiségének és összetételének optimalása.

6. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Boros Zoltánnak és Dr. Poppe Lászlónak, illetve konzulensemnek Oláh Márknak szakmai tanácsaikért, lelki támogatásukért, amelyet a munkám során Tőlük kaptam, hiszen segítségük nélkül TDK dolgozatom nem jöhetett volna létre.

Hálás köszönettel tartozom az MTA TTK Enzimológiai Intézetének, a SynBiocat és a Fermentia Kft.-nek a fermentációk kivitelezéséért, illetve a Bibus Kft.-nek a kísérleti munkához biztosított eszközökért.

Munkám anyagi támogatását az Új Széchenyi Terv keretén belül megvalósuló KMR_12-1-2012-0028 pályázat fedezte.

Szeretném megköszönni a laborban dolgozó technikusainknak, Molnárné Bernáth Ritának és Czerman Ádámnak, a munkám során nyújtott folyamatos segítségüket.

Hálával tartozom a Bioorganikus Kutatócsoport minden tagjának, valamint családomnak, barátaimnak, amiért támogattak és bíztattak munkám során.

7. Irodalomjegyzék

1. P.T. Anastas, J.C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, Oxford, **1998**
2. J. Clark, M. Acquerrie, *Handbook of Green Chemistry & Technology*, Blackwell Science Ltd., Oxford, **2002**
3. G. Walsh, *Nature Biotechnology*, **2000**, 18, 831-833.
4. L. Poppe, Z. Boros, B.G. Vértessy, K. Kovács, A. Tóth, G. Hornyánszky, J. Nagy, B. Erdélyi, V. Bódai Erdélyiné, P. Sátorhelyi, *PCT Szabadalmi bejelentés*, **2013**
5. B. Sevelle, *Biomérnöki műveletek és folyamatok*, Typotex, Budapest, **2011**
6. L. Poppe, L. Novák, „*Selective Biocatalysis – A Synthetic Approach*”, Wiley-VCH, Weinheim, **1991**.
7. M. Gavrilescu, Y. Chisti, *Biotechnology Advances*, **2005**, 23, 471–499.
8. T. Lindahl, *Nature*, **1993**, 362, 709-715.
9. D.W. Mosbaugh, S.E. Benett, *Journal of Molecular Biology*, **1994**, 48, 315-370.
10. G.B. Vértessy, *Biokémia*, **2000**, 24, 105-110.
11. L.E. Beratni, A. Häggmark, P.J. Reichard, *The Journal of Biological Chemistry*, **1961**, 236, PC67-PC68.
12. G. Larsson, L.A. Svensson, P.O. Nymann, *Nature Structural & Molecular Biology*, **1996**, 3, 532-538.
13. G.S. Prasad, E.A. Stura, D.E. McRee, G.S. Laco, C. Hasselkus-Light, J.H. Elder, C.D. Stout, *Protein Science*, **1996**, 5, 2429-2437.
14. D.J. McGeoch, *Nucleic Acids Research*, **1990**, 18, 4105-4110.
15. J. Parkhill, B.W. Wren, K. Mungall, J.M. Ketley, C. Churcher, D. Basham, D. Chillingworth, R.M. Davies, T. Feltwell, S. Holroyd, S. Jagels, A.V. Karlyshev, S. Moule, M.J. Pallen, C.V. Penn, M.A. Quail, M.A. Rajandream, K.M. Rutherford, A.H. van Vliet, S. Whitehead, B.G. Barrell, *Nature*, **2000**, 403, 665-668.
16. A. Bernier-Villamor, A. Camacho, D. González-Pacanowska, E. Cedergren-Zeppezauer, A. Antson, K.S. Wilson, *Acta Crystallographica*, **1999**, D55, 528-530.
17. E.S. Cedergren-Zeppezauer, G. Larsson, P.O. Nyman, Z. Dauter, K.S. Wilson, *Nature*, **1992**, 335, 740-743.
18. R.R. Fritz, D.S. Hodgins, C.W. Abell, *The Journal of Biological Chemistry*, **1976**, 251 (15), 4646–50.

19. Y. Tanaka, M. Matsuoka, N. Yamanoto, Y. Ohashi, Y. Kano-Murakami, Y. Ozeki, *Plant physiology* **1989**, 90 (4), 1403–7.
20. D.S. Hodgins, *The Journal of Biological Chemistry*, **1971**, 246 (9), 2977–85.
21. J. Koukol, E.E. Conn, *The Journal of Biological Chemistry*, **1961**, 236, 2692–8.
22. M. Chen, J.W. McClure, *Phytochemistry*, **2000**, 53, 365–370.
23. E. Logemann, A. Tavernaro, W. Schulz, I.E. Somssich, K. Hahlbrock, *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **2000**, 97, 1903–1907.
24. Y. Kitamura, T. Ikenaga, Y. Ooe, N. Hiraoka, H. Mizukami, *Phytochemistry*, **1998**, 48, 113–117.
25. K.R. Hanson, E.A. Havir, *Archives Biochemistry and Biophysics*, **1970**, 141, 1–17.
26. B. Schuster, J. Rétey, *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **1995**, 92, 8433–8437.
27. T.F. Schwede, J. Rétey, G.E. Schulz, *Biochemistry*, **1999**, 38 (17), 5355–61.
28. J.L. Givot, T.A. Smith, R.H. Abeles, *The Journal of Biological Chemistry*, **1969**, 244, 6341–6353.
29. R.B. Wickner, *The Journal of Biological Chemistry*, **1969**, 244, 6550–6552.
30. S. Yamada, K. Nabe, N. Izuo, K. Nakamichi, I. Chibata, *Applied and Environmental Microbiology*, **1981**, 42, 773–778.
31. C.T. Evans, K. Hanna, C. Payne, D. Conrad, M. Misawa, *Enzyme and Microbial Technology*, **1987**, 9, 417–421.
32. M. Yanaka, D. Ura, A. Takahashi, N. Fukuhara, *Japán Szabadalom*, **1984**, 06, 113–870.
33. R.G. Taylor, M.A. Lambert, E. Sexsmith, S.J. Sadler, P.N. Ray, D.J. Mahuran, R.R. McInnes, *The Journal of Biological Chemistry*, **1990**, 265, 18192–18199.
34. K.R. Hanson, E.A. Havir, *Archives Biochemistry and Biophysics*, **1970**, 141, 1–17.
35. M. Langer, A. Pauling, J. Rétey, *Angewandte Chemie International Edition in English*, **1995**, 34, 1464–1465.
36. B. Schuster, J. Rétey, *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **1995**, 92, 8433–8437.
37. J.L. Givot, T.A. Smith, R.H. Abeles, *The Journal of Biological Chemistry*, **1969**, 244, 6341–6353.
38. A. Peterkofsky, *The Journal of Biological Chemistry*, **1962**, 237, 787–795.
39. J.D. Hermes, P.M. Weiss, W.W. Cleland, *Biochemistry*, **1985**, 24, 2959–2967.

40. B. Langer, M. Langer, J. Rétey, *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 58; J.P. Klinman, J.E. Dove, Editors.), **2001**, (Academic Press, New York)
41. L. Poppe, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2001**, 5, 512–524.
42. J. Rétey, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2003**, 1647, 179–184.
43. D. Röther, L. Poppe, G. Morlock, S. Viergutz, J. Rétey, *European Journal of Biochemistry*, **2002**, 269, 3065–3075.
44. D. Röther, L. Poppe, S. Viergutz, B. Langer, J. Rétey, *European Journal of Biochemistry*, **2001**, 68, 6011–6019.
45. P. Bailon, K. George Ehrlich, W.-J. Fung, W. Berthold, *Humana Press*, **2000**.
46. J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature*, **1975**, 258, 598–599.
47. A. Bastida, P. Sabuquillo, P. Armisen, R. Fernández-Lafuente, J. Hugnet, J.M. Guisán, *Biotechnology and Bioengineering*, **1998**, 58, 486–493.
48. K.D. Trimukhe, N.D. Mahadik, D.V. Gokhale, A.J. Varma, *International Journal of Biological Macromolecules*, **2008**, 43, 422–425.
49. O. Floerke, H. Graetsch, F. Brunk, L. Benda, S. Paschen, H.E. Bergna, W.O. Roberts, W.A. Welsh, C. Libanati, M. Ettlinger, D. Kerner, M. Maier, W. Meon, R. Schmoll, H. Gies, D. Schiffmann, ‘*Silica*’, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.
50. G.V. Lisichkin, A.Y. Fadeev, A.A. Serdan, P.N. Nesterenko, P.G. Mingalyov, D.B. Furman, *Chemistry of surface grafted compounds*, Fizmatlit, Moscow, **2003**.
51. V.A. Rao, M.M. Kulkarni, D.P. Amalnerkar, T. Seht, *Applied Surface Science*, **2003**, 203, 262.
52. K.K. Unger, *Journal of Chromatography Library*, **1979**, 16, 9.
53. C. Morterra, M.J.D. Low, *Journal of Physical Chemistry*, **1969**, 73, 321.
54. H.H. Weetall, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **1993**, 41, 157–188.
55. J.A. Bosley, J.C. Clayton, *Biotechnology and Bioengineering*, **1994**, 43, 934–938.
56. K. Wannerberger, T. Arnebrant, *Journal of Colloid and Interface Science*, **1996**, 177, 316–324.
57. A.F. Holleman, E. Wiberg, *"Inorganic Chemistry"* Academic Press: San Diego, **2001**.
58. J. Roger Hart, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.

59. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements*, Butterworth-Heinemann, Oxford, **1997**
60. A. Pałasz, P. Czekaj, *Acta Biochimica Polonica*, **2000**, 47, 1107-1114.
61. P. Tai, Q. Zhao, D. Su, P. Li, F. Stagnitti, *Chemosphere*, **2010**, 80 (9), 1031–1035.
62. Z. Boros, D. Weiser, M. Márkus, E. Abaháziová, Á. Magyar, A. Tomin, B. Koczka, P. Kovács, L. Poppe, *Process Biochemistry*, **2013**, 48, 1039-1047.
63. M. Pécs, *Fermentációs feldolgozási műveletek*, Typotex, Budapest, **2012**.