

36. OTDK Biológia Szekció

**Egy új, *Solanum lycopersicum* L.-eredetű defenzin termelése
gomba-alapú expressziós rendszerekben**

Papp Rebeka

Biológia MSc II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biotechnológiai Tanszék

Témavezetők: Dr. Tóth Liliána és Dr. Galgóczi László

2023

Tartalomjegyzék

1. Irodalmi bevezető	3
1.1. Növényi defenzinek általános jellemzése	3
1.1.1 Növényi defenzinek szerkezete	3
1.1.2. Növényi defenzinek antimikrobiális hatása	4
1.1.3. A növényi defenzinek egyéb, nem antimikrobiális szerepe.....	5
1.1.4. A növényi defenzinek alkalmazása a mezőgazdaságban.....	5
1.2. Mikrobiális fehérje expressziós rendszerek	5
1.2.1. <i>Pichia pastoris</i> -alapú expressziós rendszer.....	6
1.2.2. Növényi defenzinek termelése <i>P. pastoris</i> -alapú heterológ expressziós rendszerben	8
1.2.3. <i>Penicillium chrysogenum</i> -alapú expressziós rendszer	9
2. Célkitűzések	11
3. Anyagok és módszerek	12
3.1. Tápközegek és tenyésztési körülmények	12
3.2. Pufferek és oldatok	14
3.3. <i>In silico</i> vizsgálati módszerek	14
3.3.1. A K4CBP6 fizikokémiai tulajdonságainak előrejelzése	14
3.3.2. A K4CBP6 fehérje harmadlagos szerkezetének előrejelzése homológia modellezéssel	15
3.4. A K4CBP6 fehérjét kódoló cDNS-t tartalmazó pSK275 plazmid létrehozása.....	15
3.4.1. A K4CBP6 cDNS felszaporítása PCR-el	15
3.4.2. K4CBP6-ot kódoló cDNS klónozása a pGEM-Tn β 2 vektorba.....	16
3.4.3. A <i>paf</i> 5'- és 3'-UTR régiókkal szegélyezett konstrukciók felszaporítása.....	16
3.4.4. Az Amplikon3 klónozása a pSK275n β 2 vektorba	18
3.5. A K4CBP6 fehérjét kódoló gént tartalmazó pPICZaA plazmid létrehozása	19
3.5.1. A K4CBP6 cDNS felszaporítása PCR-el	19
3.5.2. A K4CBP6 cDNS klónozása a pPICZaA vektorba	19
3.6. A K4CBP6 fehérjét kódoló pSK275 és pPICZaA plazmid transzformálása <i>E. coli</i> Top10F ⁻ törzsbe	21
3.7. A K4CBP6 fehérjét kódoló pSK275 plazmid transzformálása <i>P. chrysogenum</i> -ba	21
3.8. A K4CBP6 fehérjét kódoló pPICZaA plazmid transzformálása <i>P. pastoris</i> KM71H törzsbe	22
3.9. A K4CBP6 fehérje termelésre legalkalmasabb <i>P. chrysogenum</i> törzs kiválasztása	24
3.10. A K4CBP6 fehérjét legjobban termelő <i>P. pastoris</i> törzs kiválasztása.....	24
3.11. A K4CBP6 fehérje nagy mennyiségű termelése és tisztítása	25
3.11.1. Fehérjetermelés <i>P. chrysogenum</i> -alapú heterológ expressziós rendszerrel.....	25
3.11.2. Fehérjetermelés <i>P. pastoris</i> KM71H-alapú heterológ expressziós rendszerrel.....	25

3.11.3. Fehérjetisztítás	25
3.11.4. Fehérje gélelektroforézis és Coomassie Brilliant Blue R-250 festés	26
3.11.5. A K4CBP 6 sómentesítése és liofilizálása	26
3.12. A K4CBP6 fehérje további tisztítása és azonosítása fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával	26
3.13. A K4CBP6 fehérje azonosítása tömegspektrometriával	27
3.14. A <i>P. chrysogenum</i> -alapú heterológ expressziós rendszerrel terelt K4CBP6 defenzin másodlagos szerkezetének vizsgálata ECD spektrometriával	27
3.15. A <i>P. chrysogenum</i> -alapú heterológ expressziós rendszerrel terelt K4CBP6 defenzin antifungális hatásának vizsgálata	27
4. Eredmények és értékelésük	29
4.1. <i>In silico</i> szerkezetvizsgálatok	29
4.1.1. A K4CBP6 előre jelzett fizikokémiai tulajdonságai	29
4.1.2. A K4CBP6 előre jelzett harmadlagos szerkezete	29
4.2. A K4CBP6 heterológ expressziója	30
4.2.1. A pSK275_K4CBP6 expressziós vektor létrehozása	30
4.2.2. A pPICZαA_K4CBP6 expressziós vektor létrehozása	31
4.3. A K4CBP6 fehérjét legnagyobb mennyiségben termelő <i>P. chrysogenum</i> és <i>P. pastoris</i> törzs kiválasztása	32
4.4. A K4CBP6 fehérje termelése és tisztítása	33
4.5. A tisztított K4CBP6 RP-HPLC és tömegspektrometriás analízise	33
4.6. A <i>P. chrysogenum</i> -alapú expressziós rendszerrel termeltetett K4CBP6 szerkezetének vizsgálata ECD spektroszkópiával	35
4.7. A <i>P. chrysogenum</i> -alapú expressziós rendszerrel megtermelt K4CBP6 antifungális hatása	35
5. Összefoglalás	37
6. Köszönetnyilvánítás	38
7. Irodalomjegyzék	38

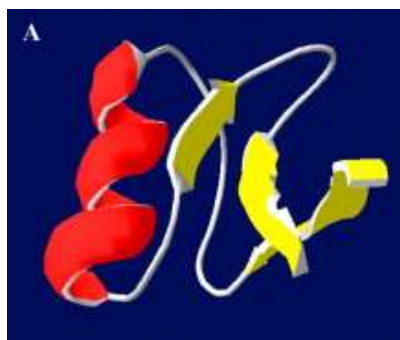
1. Irodalmi bevezető

1.1. Növényi defenzinek általános jellemzése

A növényi defenzinek az antimikrobiális fehérjék közé sorolható kisméretű (45-54 aminosav, 5-7 kDa), amfipatikus, bázikus proteinek, amik fontos szerepet játszanak a patogénnel szembeni védelemben. Emiatt nem meglepő, hogy legnagyobb mennyiségben a levelekben, magokban és virágokban találhatóak meg, mivel ezek a növény leginkább kitett részei a kórokozók számára.^[32] Egyes defenzinek állandóan jelen vannak a növényben, míg mások sebzés, biotikus vagy abiotikus stressz hatására termelődnek.^[6, 19, 32]

1.1.1 Növényi defenzinek szerkezete

A növényi defenzinek globuláris, pozitív töltésű fehérjék, melyek elsődleges szerkezetükben nagyon változatosak lehetnek. Ennek ellenére mindegyik nyolc ciszteint tartalmaz, amelyek között kialakuló négy diszulfid-híd stabilizálja a fehérje szerkezetét szélsőséges környezeti körülmények között.^[18] A defenzinek harmadlagos szerkezete viszont nagyon hasonló: egy α -hélix és három antiparalell β -redő, $\beta\alpha\beta\beta$ elrendeződésben (**1. Ábra**).^[6, 23] A növényi defenzinek rendelkeznek az ún. γ -core régióval (GXCX₃₋₉C), amit a β 2 -és β 3-redő és az ezeket összekötő hurokrégió alkot. Ez a régió a fehérje szerkezeti stabilitásának kialakítása mellett antimikrobiális hatással is rendelkezik.^[23, 27]



1. Ábra. Növényi defenzin harmadlagos szerkezete. Pirossal az α -hélix, míg sárgával a három antiparalell β -redő van ábrázolva.^[6]

A növényi defenzinek prekursor formájában szintetizálódnak. A legtöbb rendelkezik egy N-terminális szignálszekvenciával, aminek fontos szerepe van a fehérje extracelluláris térbe történő szekréciójában és emellett gátolja a fehérje aktivitását is. A szignálszekvencia egy proteolitikus folyamat során lehasad, így az érett fehérjén már nem található meg. A defenzinek

kisebb csoportja egy C-terminális prodoménnel is rendelkezik, ami a vakouláris transzportot biztosítja. Feltehetőleg ennek a doménnek lehet szerepe a defenzin toxikus hatásának semlegesítésében a transzportfolyamatok közben.^[6, 23]

1.1.2. Növényi defenzinek antimikrobiális hatása

A növényi defenzinek antimikrobiális hatásukat tekintve nagyon sokoldalúak, mivel széles körben képesek gátolni a baktériumok (Gram-pozitív és Gram-negatív) és a fitopatogén gombák növekedését, továbbá enzimek és proteázok aktivitását is blokkolhatják. Hatásuk kationok (pl.: Ca^{2+} , Mg^{2+}) jelenlétében csökken, mivel a fehérje szerkezete megváltozik és nehezebben tud kölcsönhatást kialakítani a kórokozó membránjával.^[6] A szerkezet változás mellett az antagonista hatást az is elősegítheti, hogy a pozitív töltésű ionok versengenek a defenzinokkal a membránkötésben.^[18] Antibakteriális hatásukat különböző módon képesek kifejteni. Ezek a defenzinek pozitív töltésükből adódóan képesek kölcsönhatást kialakítani a baktériumok negatív töltésű membránalkotóival (teikonsavval, lipopoliszachariddal, foszfolipiddel) ezáltal csökkenteni azok növekedését,^[23, 27] továbbá gátolhatják a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok K^+ -csatornáját is.^[2] Emellett a defenzinek feszültségfüggő csatornákat is ki tudnak alakítani a baktérium membránjában, melyen keresztül beáramló víz szétfeszíti a kórokozó plazmamembránját.^[28] Nemrég azt is kimutatták, hogy a defenzin képes internalizálódni és a sejten belül kölcsönhatást kialakítani a DNS-el és ez által gátolni a kórokozó szaporodását.^[19]

A növényi defenzinek legmeghatározóbb tulajdonsága a gombaellenes hatásuk. Ez alapján két csoportba sorolhatóak: 1) a morfogenikus defenzinek, melyek a hifák túlzott elágazódását, és megduzzadását és lassú növekedését okozzák; és 2) a nem morfogenikus defenzinek, melyek a gomba sejtmembránjának roncsolása által fejtik ki hatásukat.^[6, 23] Az utóbbi csoportba tartozó pozitív töltésű defenzinek képesek kölcsönhatást kialakítani a kórokozó membránjában található negatív töltésű szfingolipidekkel (mannozil-diinozitol-foszfoamid, glükoszilceramid), majd a membránba beépülve annak destabilizációját kiváltani. Emellett egyes defenzinek az L-típusú Ca^{2+} -csatornákra kifejtett hatásukkal a hifa túlzott elágazódását váltják ki, míg bizonyos proteinek a feszültségfüggő Na^+ -csatornák működését befolyásolva eredményezik a gomba növekedésének csökkentését.^[6, 15]

1.1.3. A növényi defenzinek egyéb, nem antimikrobiális szerepe

A növényi defenzinek a növény fejlődésére is hatással vannak, mivel szerepet játszhatnak a pollentömlő kialakításában, vagy az önmegtermékenyítés elkerülésében,^[23, 31] továbbá az abiotikus stressz (pl. hideg, szárazság, só) ellen is védelmet tudnak kialakítani.^[6]

1.1.4. A növényi defenzinek alkalmazása a mezőgazdaságban

A gombás fertőzések, minden évben nagy termés kiesést és anyagi károkat okoznak a mezőgazdaság számára.^[3] A jelenleg forgalomban lévő kémiai peszticidek, azonban nem képesek megfelelően felvenni a harcot a kórokozókkal szemben, emellett egészség- és környezetkárosító hatással is rendelkeznek.^[22]

A növény-eredetű defenzinek használata megoldást nyújthat a problémára, mivel egy fehérje akár több kórokozó ellen is hatékony lehet, valamint csak néhány esetben írtak le rezisztenciát velük szemben.^[6, 17] A defenzinek alkalmazása mellett szól az is, hogy emlős sejtekre nem fejtenek ki káros hatást, valamint nem károsak a növény rhizoszférájában található szimbióta mikroorganizmusokkal szemben.^[6] A defenzinek egyik alkalmazási lehetősége az, hogy defenzint expresszáló transzgenikus növényeket hoznak létre.^[13] Számos esetben megfigyelték, hogy ezek a növények fokozott rezisztenciát mutattak a kórokozókkal szemben.^[6] Azonban ilyen transzgenikus növények termesztésbe való bevonása nem egyszerű a jelenleg érvényben lévő EU-s jogszabályok miatt.^[11] Továbbá, a genetikailag módosított forrásból származó élelmiszerek visszatetszést keltenek a legtöbb vásárlóban.^[30]

Az antimikrobiális hatású fehérjéket közvetlen módon is próbálják alkalmazni növényvédelmi célra, de ennek egyelőre számos nehézsége van. A költséges előállítás mellett, hiányosak az ismereteink a defenzinek antifungális spektrumáról, a növényi és emberi szervezetre, valamint a környezetre gyakorolt lehetséges, hosszútávú káros hatásairól.^[14]

1.2. Mikrobiális fehérje expressziós rendszerek

Napjainkban a természetes eredetű fehérjék alkalmazása igen elterjedt az iparban, a mezőgazdaságban és a gyógyászatban egyaránt. Alkalmazásukat azonban gyakran korlátozza az a tény hogy, nem áll rendelkezésre az ipar számára megfelelő mennyiségben a fehérjetermék, mivel a természetes termelő organizmusok csak kismennyiségben állítják elő ezeket a proteinek. A probléma megoldására a kémiai szintézissel való előállítás, illetve a heterológ expressziós rendszerek alkalmazása egyaránt megoldást jelenthet. Annak ellenére, hogy a szintetikus módszert egyre gyakrabban alkalmazzák, számos hátránya van. Mindamelllett, hogy a szintézis drága és időigényes folyamat, a fehérjék megfelelő diszulfid-híd mintázatának

kialakítása nem könnyen kivitelezhető.^[24] Ezzel szemben a heterológ fehérje expresszió egy gyorsabb és olcsóbb módszer, így hatékonyabban alkalmazható a fehérjék ipari mennyiségű előállítására. Eleinte prokarióta sejteket használtak a fehérjék nagymennyiségű termelésére, mivel ezek gyorsan képesek osztódni, költséghatékonyan fenntarthatóak, könnyen és gyorsan transzformálhatóak, valamint magas expressziós szintet és fehérje hozamot biztosítanak.^[16] Napjainkban az *Escherichia coli* az egyik leggyakrabban használt baktérium-alapú expressziós rendszer, annak ellenére, hogy ugyan tulajdonságai alapján megfelel a rekombináns protein előállítására, azonban a termelés során probléma léphet fel az eukarióta-prokarióta közti eltérő kodonpreferencia és a poszttranszlációs módosítások hiánya miatt, ami a fehérjék nem megfelelő érését és a diszulfid-hidak kialakulásának a hiányát eredményezheti. Emellett sok esetben a termék endotoxinnal szennyeződhet, a fehérje szekréciója sem sokszor megoldott, ezért gyakori az úgynevezett „inclusion body” képződése, ami megnehezíti a tisztítási lépéseket.^[5, 16, 29]

Az eukarióta sejteken alapuló heterológ fehérje expressziós rendszernek több előnye is van a prokarióta gazdákhöz képest. Az élesztő-alapú (pl. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*) rendszerekben a sejtek gyorsan növekednek, a megfelelő poszttranszlációs módosításokra is képesek, valamint a megtermelt fehérje tápközegbe történő hatékony szekretálásával megkönnyítik a tisztítás folyamatát. Emellett genetikailag könnyen módosíthatók, a lineáris expressziós vektor képes kromoszómába beépülni és így stabilan fennmaradni a sejtben.^[1, 16] Az élesztők mellett fonalgomba (pl. *Aspergillus*, *Trichoderma* és *Penicillium*) fajok is hatékonyan alkalmazhatók fehérjetermelésre.^[12, 29] A gomba-alapú expressziós rendszerek hátránya lehet a nem megfelelő N- és O- glikoziláció, ami immunreakciót válthat ki az emberben a terápiás célra termelt fehérjék esetében.^[16]

1.2.1. *Pichia pastoris*-alapú expressziós rendszer

A metilotróf, „generally recognized as safe” (GRAS) státusszal rendelkező *P. pastoris* élesztő-alapú fehérjetermelés az egyik legelterjedtebb gomba-alapú heterológ expressziós rendszer.^[16] Napjainkban elsősorban biológikumok (pl. Kalbitor, Biocon, Jetrea, elasztáz inhibitor) és ipari enzimek (pl. foszfolipáz C, fitáz, tripszin) előállítására használják.^[1]

A rendszer nem igényel komplex táptalajt, ezért gyors és olcsó fehérjeelőállítást tesz lehetővé. Előnyei közé tartozik az is, hogy képes a termelt proteint nagy mennyiségben a tápközegbe szekretálni megkönnyítve ezzel a tisztítási folyamatot.^[1, 24] Emellett a fehérje megfelelő poszttranszlációs módosításai is megvalósíthatók, például az N-glikoziláció, melynek fontos szerepe van a terápiás fehérjék esetében.^[16] A *P. pastoris*-alapú rendszerrel

történő termelés során, azonban felmerülhet néhány probléma. Sok esetben megfigyelhető a fehérjék hibás glikozilációja is (ami *GlycoSwitch* technika alkalmazásával kiküszöbölhető), illetve a tápközeg mannán szennyezése, ami megnehezítheti a termék kinyerését.^[16, 29] A rendszer használatát az is megnehezíti, hogy nagy mennyiségű expressziós vektorra van szükség a transzformáláshoz, továbbá kevés szelekciós marker áll rendelkezésre. Emellett gyakori az előállított fehérje proteázok általi degradációja. Ennek elkerülése érdekében proteáz deficiens törzseket hoztak létre. Továbbá a tápközeg könnyen szennyeződhet szaprofita baktériummal, gombával.^[1, 16]

A *P. pastoris*-alapú expressziós rendszerben a leggyakrabban használt indukálható promóter az alkohol oxidáz (AOX1) promótere. Ez az erős promóter represszált állapotban van glükózt, glicerolt vagy etanolt tartalmazó tápközegben, és csak akkor aktiválódik, ha ezeknek a szénforrásoknak a szintje lecsökken és metanolt adnak egyedüli szénforrásként a tápközeghez.^[1] Általában 0,5-5 V/V% mennyiségű metanollal indítható el a génexpresszió, ennél magasabb alkoholszint már toxikus lehet a sejtek számára. A túl alacsony metanolszint a fehérje degradációjához vezethet.^[16] Mivel a metanol gyúlékony és egészségre káros, alternatív indukálható promótereket is alkalmaznak. Ilyen például a metanol-oxidáz (MOX), és a formiát-dehidrogenáz (FMDH) promóter, amelyek metanol nélkül indukálhatók, ugyanakkor magas szintű expressziót biztosítanak. Kedvelt konstitutív promóter a gliceraldehyd-3-foszfát (GAP) promótere, illetve a hatékonyabb expressziót eredményező GCW14 promótere is. Ezen promóterek előnye, hogy nem igényelnek indukálószer a fehérjetermelés elindításához.^[1]

Irodalmi adatok alapján a beépült génmennyiség korrelációt mutat a fehérjehozammal, ezért a magas expressziós szint eléréséhez a kívánt gén többszöri genomba történő beépülésére van szükség. Általában a lineáris expressziós kazetta csak egyszeres kópiában épül be (90-99% valószínűséggel) az AOX1 lókuszbba, azonban magas zeocin koncentrációt (100-2000 µg/ml) tartalmazó szelektív táptalajjal többszörös beépülést hordozó transzformások szelektálása is megvalósítható.^[1, 16]

A *P. pastoris*-alapú expressziós rendszer képes a megtermelt fehérje extracelluláris szekrécióját biztosítani. Ehhez leggyakrabban a *Saccharomyces cerevisiae* α -párosodási faktorának extracelluláris szignálszekvenciáját használják. A szignálszekvenciát a pre-pro régióba építik be, amely lehetővé teszi a fehérje Sec61 transzlokonon keresztül történő endoplazmatikus retikulumba juttatását és a megfelelő poszttranszlációs módosítások elvégzését (pl. diszulfid-kötések kialakítása, glikoziláció). A szekréciót biztosító α -faktort, a fehérje Golgi-ba történő transzportját követően a Kex2 proteáz hasítja le. A Kex2

szignálszekvenciától 3' irányban gyakran található egy Glu-Ala ismétlődés, amely a fehérje érési folyamatát segíti, és a ste13 endoproteáz távolítja el az érett fehérjéről.^[1, 20]

A megfelelő mennyiségű fehérjeexpresszióhoz elengedhetetlen a tenyésztési körülmények optimalizálása. Megfigyelték, hogy a *P. pastoris* optimális növekedési és fehérjetermelési hőmérséklete 28-30 °C. 32 °C-on a sejtek elpusztulnak, míg alacsony hőmérsékleten az élesztő életképessége csökken és az endoplazmatikus retikulum nem megfelelő működése miatt a termelni kívánt fehérje érési folyamata is hibás lesz. A hőmérséklet mellett az inkubációs/indukciós idő hossza is nagymértékben befolyásolja az expressziót, ugyanis a legnagyobb sejtnövekedés 96 óra inkubáció után, míg a legnagyobb fehérjehozam 48 óra után volt megfigyelhető, azonban a legtöbb irodalmi adat alapján 72-96 óra a legoptimálisabb idő a fehérje termelődése szempontjából. Azt is megfigyelték, hogy szorbitol jelenlétében csökken a sejtnövekedés, ellenben több termék képződik. Ennek hátterében valószínűleg a szorbitol oxigén-gyökök és toxikus melléktermékek hatástalanító képessége áll.^[16]

1.2.2. Növényi defenzinek termelése *P. pastoris*-alapú heterológ expressziós rendszerben

A *P. pastoris*-alapú heterológ expressziós rendszer hatékonyan alkalmazható a növényi defenzinek nagy mennyiségű előállítására. Mungóbabából származó VrD1 defenzint 3 mg/liter hozamban voltak képesek termeltetni. Az előállított fehérje szerkezete nem teljesen egyezett meg a vad típusúéval, mivel az N-terminális végén két extra aminosavat (Tyr és Val) tartalmazott. A rekombináns antifungális fehérje azonban megőrizte biológiai aktivitását, ugyanis gombaellenes hatást mutatott *Fusarium oxysporum*-mal, *Pyricularia oryzae*-val, *Rhizoctonia solani*-val, és *Trichophyton rubrum*-mal szemben.^[8] Cabral és munkatársai (2003) borsóból származó Pds1 fehérjét állítottak elő *P. pastoris* segítségével, 36 mg/liter hozammal. A tömegspekrometriás vizsgálatok kimutatták, hogy a rekombináns defenzin poszttranszlációs módosításai megegyeznek a vad típuséval. A cirkuláris dikroizmus és magmágneses rezonancia mérések alapján megállapították, hogy a fehérje másodlagos és harmadlagos szerkezete is megegyezik az eredetiével. Az előállított defenzin rendelkezett antifungális hatással, noha ennek mértéke tizedére csökkent a vad típuséhoz képest. Ennek oka valószínűleg az N-terminális részre beépített Glu-Ala ismétlődés lehetett.^[5] Kukoricánövényből származó 9 kDa tömegű, 35 aminosavból álló defenzint fejeztettek ki *E. coli*-ban és *P. pastoris*-ban. Az élesztő alapú rendszerrel előállított fehérje nagyobb mértékű antifungális hatást mutatott a baktériummal termeltetthez képest, amelynek hátterében a fehérjében található a több β -redő és kevesebb rendezetlen szerkezet állhatott.^[15]

1.2.3. *Penicillium chrysogenum*-alapú expressziós rendszer

A szintén GRAS státusszal rendelkező *P. chrysogenum*-ot már régóta használják az iparban antibiotikum (pl. penicillin, cefalosporin) előállítására. Ezzel ellentétben a tudományban, csak az utóbbi évtizedekben terjedt el ennek a fonalasgombának a használata homológ és heterológ fehérjék alapkutatási célú előállítására. A rendszer előnye, hogy sokféle, nem csak gomba eredetű génkifejezésre alkalmas. A fehérje érése hasonló a magasabb rendű eukariótákéhoz, ezért akár az emberihez nagyon hasonló glikozilációs mintázat is megvalósítható, amelynek nagy jelentősége lehet a terápiás célra termelt fehérjék esetében. Emellett a termelt fehérjét a gomba a tápközegbe szekretálja, ahonnan akár egy lépésben is könnyen tisztítható lehet.^[12, 29]

Heterológ expressziós rendszer létrehozásánál létfontosságú a megfelelő promóter kiválasztása. Megfigyelték, hogy *P. chrysogenum*-ban az elsődleges anyagcsereutakban résztvevő NADP-függő glutamát-dehidrogenáz gén (*gdhA*) erős konstitutív promóterrel rendelkezik. Ennek a promóternek a felhasználásával kifejeztetett fehérje *E. coli*-ban, és *P. chrysogenum*-ban is megfelelő aktivitással és szerkezettel bírt.^[10, 29] Indukálható promóterként a xilanáz (*xylA*) és a foszfáttal gátolható alkalikus foszfataz (*phoA*) gén promóterét alkalmazzák. A *xylA* promóter xilán jelenlétében aktiválódik, ezzel szemben *phoA* promóter költséghatékony fehérjeexpressziót biztosít, mivel indukálószer használata helyett a foszfáthiány indukálja a fehérjetermelést. A *phoA* esetében azonban azt is megfigyelték, hogy represszálo körülmények között a promóter nem volt teljesen legátolva. *PhoA* promótert tartalmazó heterológ expressziós rendszerrel Graessle és munkatársai (1997) sikeresen állítottak elő emberi könnyből lipokalcint, amelyet a tápközegből lehetett tisztítani. Ezzel bizonyították, hogy a rendszer alkalmas lehet heterológ fehérjeexpresszióra is.^[12, 29] Sonderegger és munkatársai (2016) a *paf* gén erős promóterét alkalmazták az expressziós rendszerrel történő termeltetés során.^[29, 33] Megfigyelték, hogy a célfehérje elé beépített pre-proszekvencia segíti a fehérje megfelelő szerkezetének kialakulását, mivel chaperon-szerű funkcióval rendelkezik. Ez a szekvencia a fehérje szekrécióna során proteolitikus hasításon esik át, így a kész terméken már nem található meg.^[29]

Stabil expressziós rendszer létrehozásához elengedhetetlen a kívánt fehérje génjének a *P. chrysogenum* genomjába történő integrálódása. A beépülési szám és a fehérjehozam általában korrelációt mutat, de ennek is van korlátozó tényezője. Cefalosporin (*cefG*) gén túlexpresszálása esetén hibás szerkezetű cefalosporin C keletkezett, emellett a nagyobb kópiaszám nem növelte a transzkript szintet sem.^[10] Rekombináns xilanáz előállításánál azt mutatták ki, hogy a fehérjehozamot a génmásolat beépülésének helye is befolyásolja, mivel a

hat kópiás törzs több fehérjét produkált mint a kilenc kópiás.^[12] Sonderegger és munkatársai (2016) is megfigyelték, hogy a génmásolatok száma és a fehérjehozam nem mindig mutat közvetlen összefüggést. A túlzott génmennyiség gátolhatja a transzkripciót és a transzlációt a sejtben. A fehérjetermelésre, szekretálásra a génmásolat mennyisége mellett a promóter és a szignálszekvencia is hatással lehet.^[29]

A *P. chrysogenum*-alapú expressziós rendszer nagy mennyiségű fehérjetermelést, biztosít. A rekombináns xilanáz mennyisége 1000-szeresére nőtt, a penicillin mennyisége 10-30%-al növekedett, míg az NFAP2 antifungális protein esetében 40-szeresére nőtt a termelt fehérje mennyisége.^[10, 12, 29]

Heterológ expressziós rendszerrel termelt fehérjék esetében elengedhetetlen, hogy a termék megőrizze aktív szerkezetét. A *P. chrysogenum* rendszerrel termelt PAF és NFAP antifungális proteinek szerkezetét tömeg és magmágneses rezonancia spektroszkópiával is vizsgálták. Az eredmények alapján elmondható volt, hogy az expressziós rendszerrel előállított fehérjék tömege megegyezett az előzőleg számított tömeggel és a megfelelő diszulfid-híd mintázattal rendelkeztek, aminek a következtében fel tudták venni a funkcionális harmadlagos szerkezetet. A PAF és NFAP fehérjék hatékonyságát mikrodilúciós tesztben vizsgálták, amelyben a rekombináns fehérjék azonos aktivitással rendelkeztek, mint a vad típusú.^[29]

Növényi defenzinek *P. chrysogenum*-alapú expressziós rendszerrel történő előállítására nem található példa a szakirodalomban.

2. Célkitűzések

Az utóbbi évtizedekben óriási kihívást jelent a növénypatogén gombák által okozott kártételek leküzdése a mezőgazdaság számára. A probléma megoldására a jelenleg alkalmazott kémiai-alapú növényvédő szerekkel szembeni rezisztencia folyamatos terjedése, továbbá az új EU-s jogszabályok -melyek értelmében 2030-ig felére kell csökkenteni Európában a kémiai növényvédő szerek használatát- rávilágítottak új, az eddigiektől alapjaiban eltérő antifungális stratégiák kifejlesztésének szükségességére. Szakirodalmi adatok alapján a növények által termelt kisméretű, ciszteinben gazdag gombaellenes hatású defenzinek kiválóan megfelelnek erre a célra.^[6, 15] Mezőgazdasági alkalmazásukat azonban többek között hátráltatja az a tény, hogy ipari méretben történő előállításuk a mai napig nem megoldott. Munkánk során két különböző gomba-alapú expressziós rendszer (*P. chrysogenum* és *P. pastoris*) alkalmazásával kísérletet tettünk egy paradicsomnövény (*Solanum lycopersicum* L.) -eredetű defenzin (K4CBP6) nagy mennyiségű, extracelluláris, heterológ termelésére.

A munkánk során a következő konkrét célokat fogalmaztuk meg:

1. A K4CBP6 fizikokémiai tulajdonságainak meghatározása és harmadlagos szerkezetének előrejelzése *in silico* módszerekkel.
2. Egy *P. chrysogenum* és egy *P. pastoris*-alapú heterológ expressziós rendszer létrehozása a K4CBP6 defenzin nagy mennyiségű megtermeltetésére.
3. A megtermeltetett K4CBP6 izolálása és azonosítása.
4. A *P. chrysogenum*-alapú expressziós rendszerrel előállított K4CBP6 fehérje antifungális hatásának vizsgálata paradicsomnövény kórokozó fonalgombákkal szemben.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Tápközegek és tenyésztési körülmények

Alacsony sótartalmú Luria-Bertani tápoldat/táptalaj (LSLB tápoldat/táptalaj): 1% (m/V%) tripton, 0,5% (m/V%) élesztőkivonat, 0,5% (m/V%) NaCl, táptalaj esetén 1,5% (m/V%) agar, pH=7,5, a pH-t 1M NaOH oldattal állítottuk be. **Aspergillus nidulans komplett táptalaj pH=6,5** (ACM): 2% (V/V%) 50× sóoldat*, 0,2% (m/V%) pepton, 0,1% (m/V%) élesztőkivonat, 0,1% (m/V%) NZ-amin A, 2% (m/V%) glükóz, 0,1% (V/V%) nyomelemoldat (pH=6,5)** , pH-t 2M NaOH oldattal állítottuk be. * 50× sóoldat: 2,6% (m/V%) KCl, 2,6% (m/V%) $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 7,6% (m/V%) KH_2PO_4 . ** nyomelemoldat (pH=6,5): 0,1% (m/V%) $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,9% (m/V%) $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,04% (m/V%) $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 0,01% (m/V%) $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,01% (m/V%) H_3BO_3 , 0,01% (m/V%) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$. **Transzformáló táptalaj**: 0,0714% (m/V%) $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,0714% (m/V%) KCl, 2,86% (m/V%) szacharóz, 0,007% $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 42,86% (V/V%) R1-oldat (pH=5,8)*, 0,1% (V/V%) nyomelemoldat, pH-t 75mM KH_2PO_4 -el** és 75mM K_2HPO_4 -el*** állítottuk be. **Alapagar**: transzformáló talaj 2% (m/V%) agarral, 1 µg/ml piritiaminnal. **Fedőagar**: transzformáló talaj 1% (m/V%) agarral. * R1-oldat (pH=5,8): 1% (m/V%) NaNO_3 , 11,6% (m/V%) NaCl. ** 75mM KH_2PO_4 : 10,2 g/l KH_2PO_4 . *** 75mM K_2HPO_4 : 13,05 g/l K_2HPO_4 . **Penicillium chrysogenum minimál tápoldat/táptalaj** (PCMM tápoldat/táptalaj): 0,3% (m/V%) NaNO_3 , 0,05% (m/V%) $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,05% (m/V%) KCl, 2% (m/V%) szacharóz, 0,005% (m/V%) $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,25% (m/V%) 1M $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -puffer (pH=5,8)*, 0,01% (m/V%) nyomelemoldat (pH=6,5)** , táptalaj esetén 2% (m/V%) agar. * 1M $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -puffer (pH=5,8): 174 g/l K_2HPO_4 , 136 g/l KH_2PO_4 . ** nyomelemoldat (pH=6,5): 0,1% (m/V%) $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,9% (m/V%) $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,04% (m/V%) $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 0,01% (m/V%) $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,01% (m/V%) H_3BO_3 , 0,01% (m/V%) $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$.

Burgonyakivonat-glükóz tápoldat/táptalaj (PDB/PDA; Sigma-Aldrich) táptalaj esetén 1,5% agar. **Élesztőkivonat pepton dextróz tápoldat** (YPD): 1% (m/V%) élesztőkivonat, 2% (m/V%) pepton, 2% (m/V%) dextróz (glükóz). **Élesztőkivonat pepton dextróz szorbitol táptalaj** (YPDS tápoldat/táptalaj): 1% (m/V%) élesztőkivonat, 2% (m/V%) pepton, 2% (m/V%) dextróz (glükóz), 18,22% (m/V%) szorbitol, táptalaj esetén 1,5% (m/V%) agar. **Pufferelt minimál glicerol/metanol tápoldat** (BMG/BMM tápoldat): 10% (V/V%) 1M $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ puffer (pH=6), 10% (V/V%) 10× YNB, 10% (V/V%) 10× glicerol/10× metanol, 0,2% (V/V%) 500× biotin.

P. chrysogenum transzformálásakor a *Δpaf/pafb* törzset 200 ml ACM tápoldatban rázattuk 160 rpm-en, 40 órán át, szobahőmérsékleten. A transzformált sejteket 4 ml 1%-os fedő és 15 ml 2%-os (m/V%), 1 μg/ml piritiamin tartalmú alapagarra szélesztettük és egy hétig 25 °C-on inkubáltuk. Az első szelekciós lépés esetében a transzformáns törzseket 2 μg/ml piritiamint tartalmazó 2%-os PCMM táptalajon növesztettük 7 napon keresztül 23 °C-on. A második szelekciós lépésnél a transzformáns telepek konídiumaiból 10^{-4} - 10^{-6} hígítást készítettünk, melyekből 10 μl mennyiséget hatlyukú 5 ml 2%-os (m/V%), 2 μg/ml piritiamin tartalmú PCMM táptalajra szélesztettünk, és egy hétig 25 °C-on inkubáltuk. A fehérjét legnagyobb mennyiségben termelő törzs kiválasztásához, a telepek konídium szuszpenzióiból 2×10^8 spórát 200 ml PCMM tápoldatban növesztettünk 25 °C-on, 96 órán keresztül, 160 rpm rázatás mellett. A legjobban termelő törzseket PCMM táptalajra oltottuk át és 4 napig 25 °C-on inkubáltuk. A fehérje nagymennyiségű előállításánál ugyanúgy jártunk el, mint a termelő törzs kiválasztása esetében. Az antifungális érzékenységi tesztek során a fitopatogén *Cladosporium herbarum* FSU 1148 és *Fusarium oxysporum* SZMC 6237J törzseket PDA táptalajon növesztettük 9 napon át szobahőmérsékleten.

A transzformálás előtt a *P. pastoris* KM71H sejteket 200 ml YDP tápoldatban növesztettük 16 órán keresztül, 30 °C-on, 160 rpm rázatás mellett. A transzformált sejtek 100 μg/ml zeocint tartalmazó YPDS táptalajon inkubáltuk 5 napon át, 30 °C-on. A legjobban termelő törzs kiválasztásához az élesztőt először 10 ml YDP tápoldatot tartalmazó 50 ml-es falkoncsőben inkubáltuk 16 órán keresztül, 180 rpm-en, 30 °C-on. Ezt követően a sejteket 1 literes Erlenmeyer-lombikban, 100 ml BMG tápoldatban növesztettük szintén 16 órán át, 30 °C-on 180 rpm rázatás mellett. Végül a sejteket 6 napon keresztül inkubáltuk 100 ml-es Erlenmeyer-lombikban, 15 ml BMM-ben, 30 °C-on, 180 rpm-en. A tápközeget naponta 75 μl 100% (V/V%) metanollal egészítettük ki. A fehérjetermelés során a transzformáns *P. pastoris* törzset 16 órán keresztül 10 ml YPD-ben inkubáltuk 30 °C-on, 180 rpm-en. Ezután 25 ml BMG tápoldatot tartalmazó 250 ml-es lombikba oltottuk át, majd 16 órán keresztül 30 °C-on inkubáltuk 180 rpm rázatás mellett. Ezt követően a 3 l-es Erlenmeyer-lombikban elkészített 1 l BMG oldatban növesztettük tovább a sejteket 16 órán át, 180 rpm-en, 30 °C-on. Végül a *P. pastoris* törzset BMM tápoldatot tartalmazó lombikba oltottuk úgy, hogy az $OD_{600}=1$ legyen. Az élesztőt 4 napig inkubáltuk 30 °C-on, 180 rpm-en rázatva és 24 óránként a sejtkultúrához 0,5% mennyiségben 100% (V/V%) metanolt adagoltunk.

3.2. Pufferek és oldatok

Spórapuffer: 0,9% (m/V%) NaCl, 0,01% (V/V%) Tween 80. *P. chrysogenum* **transzformáláshoz használt oldatok és pufferek:** Lizis puffer (pH=5,8): 5,22% (m/V%) KCl, 85,6% (V/V%) KH₂PO₄ 50 mM [6,8g/l KH₂PO₄], 14,4% (V/V%) K₂HPO₄ 50 mM [8,7g/l K₂HPO₄]. KCM (pH=5,8): 5,22% (m/V%) KCl, 0,8% (m/V%) CaCl₂, 0,2% (m/V%) MOPS, pH-t 0,1 M KOH oldattal állítottuk be. PCM (pH=5,8): 0,8% (m/V%) CaCl₂; 0,2% (m/V%) MOPS; 50% (m/V%) polietilén-glikol (PEG) 6000 vagy 8000, a pH-t NaOH 1 M oldattal állítottuk be. 0,7 M KCl oldat: 52,15 g/l KCl. *P. pastoris* **transzformáláshoz használt oldatok:** 50% (m/V%) PEG-3350, 1M LiCl, 100mM LiCl, 2 mg/ml fragmentált lazac spermium DNS (Invitrogen). **DNS kivonáshoz használt oldatok:** 10% (m/V%) nátrium-lauril-szarkozinát, 5 M Na-acetát (pH=5,5), izopropanol, 70% (V/V%) etanol. **Nukleinsav-gélelektroforézishez használt oldatok:** 1%-2% (m/V%) agaróz, 0,1% (V/V%) etidium-bromid, nátrium tetraborát puffer vagy TAE puffer*, 6×DNS mintapuffer, molekulaszúlymarker (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder és GeneRuler 1000 bp DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific/Fermentas). * TAE puffer: 40 mM Tris-HCl (pH=7,6), 1mM Na₂-EDTA. **Kationcserés tisztításnál használt oldatok:** Ekvilibráló puffer: 1% (V/V%) 1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-puffer* (pH=6,6), 0,5% (V/V%) 5 M NaCl, 0,03% (V/V%) 0,5 M etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA). 0,1 M NaCl: 1% (V/V%) Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-puffer, 2% (V/V%) 5 M NaCl. 0,2 M NaCl: 1% (V/V%) Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-puffer, 4% (V/V%) 5 M NaCl. 0,3 M NaCl: 1% (V/V%) Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-puffer, 6% (V/V%) 5 M NaCl. 1,5 M NaCl: 1% (V/V%) Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-puffer, 30% (V/V%) 5 M NaCl. * 1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-puffer (pH=6,6): 37,5% (V/V%) 1 M Na₂HPO₄, 62,5% (V/V%) 1 M NaH₂PO₄. **Fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiához (RP-HPLC) használt oldatok:** „A” eluens: 0,1% (V/V%) TFA ioncserélt vízben. „B” eluens: 80% (V/V%) ACN; 0,1% (V/V%) TFA ioncserélt vízben. **Tömegspektrometriás analízishez használt oldatok:** „A” eluens: 0,1% (V/V%) TFA ioncserélt vízben. „B” eluens: 80% (V/V%) ACN; 0,1% (V/V%) TFA ioncserélt vízben.

3.3. In silico vizsgálati módszerek

3.3.1. A K4CBP6 fizikokémiai tulajdonságainak előrejelzése

A ProtParam tool (www.web.expasy.org) és a ProteinCalculator v3.4 (www.protcalc.sourceforge.net) alkalmazások segítségével határoztuk meg a K4CBP6 fizikokémiai tulajdonságait.

3.3.2. A K4CBP6 fehérje harmadlagos szerkezetének előrejelzése homológia modellezéssel

A SignalP 4.0 szerveret használtuk a K4CBP6 szignálszekvencia lehasadási helyének a meghatározásához.^[25] A K4CBP6 homológiai modelljét az I-TASSER szerverrel hoztuk létre.^[35] A legmegbízhatóbb modell szerkezetét energiaminimalizálással finomítottuk tovább a ModRefiner alkalmazás segítségével.^[34] Az előre jelzett fehérjeszerkezet megbízhatóságát Ramachandran plot analízissel ellenőriztük a RAMPAGE szerver használatával.^[21] A DISULFIND alkalmazást használva határoztuk meg a diszulfid-híd mintázatot.^[7] Az UCSF Chimera szoftverrel ábrázoltuk a fehérjemodell térbeli szerkezetét, hidrofóbicitás és töltöttségi felszínét.^[26]

3.4. A K4CBP6 fehérjét kódoló cDNS-t tartalmazó pSK275 plazmid létrehozása

3.4.1. A K4CBP6 cDNS felszaporítása PCR-el

A K4CBP6-ot kódoló cDNS-t génszintézis szolgáltatás igénybevételével állítottuk elő a *P. chrysogenum* kodon preferenciájának a figyelembevételével (Eurofins Genomics, Ebersberg, Németország). A pEX-A128-K4CBP6 plazmid *EcoRV* restriktációs enzim hasítóhelyére beépített 258 bp méretű K4CBP6 fehérjét kódoló cDNS-t az NFAP2F (5'-GGCCGCTGAGGCCGGTGT-3'; T_m: 64,1 °C) és az NFAP2R (5'-GGCCAAGCTTCGAGAATCACAGG-3'; T_m: 61,5 °C) indítószekvenciapár segítségével sokszorozítottuk fel. Az indítószekvenciák részben átfedtek a *paf* prepro-szekvenciával és a *paf* 3'-UTR-régióval, valamint rendelkeztek a *BbvCI* és *HindIII* restriktációs endonukleázok hasítóhelyivel (2. Ábra).

```
>K4CBP6_cDNA_for_pGME_T_7thsign_BbvCI_HindIII
GGCC CGGTGTCTCTCGCCACTGCGAGTCCCTCTCCACCGCTTCAAGGGCCCTGCGTCTCCGACAAGAACTGCGC
CTCCGCTCTGCGAGACCGAGCGCTTCTCCGGCGGTAACTGCCGCGGCTTCCGCCGTCGCTGCTTCTGCACCAAGCCCTGCTAAAT
GGTCTCTGCGATCACCAGGGCATTAAATGGTTTTTGGTTCCCTTCTTGTGGTGATATGCGAGATGCCCTGTGATTCTCG
GGCC
```

2. Ábra: A pEX-A128-K4CBP6 plazmid *EcoRV* restriktációs endonukleáz hasítóhelyére beágyazott szintetikus génkonstrukció nukleotid sorrendje. Dőlt piros betűkkel van jelölve a *paf* prepro-szekvencia utolsó 18 nukleotidja, míg kék színnel a *paf* 3'-UTR-rel részben átfedő nukleotidjai. Sárgával az érett K4CBP6-ot kódoló cDNS-t emeltük ki. A *BbvCI* és a *HindIII* restriktációs endonukleázok hasítóhelyeit zöld, valamint kék színnel jelöltük. Az NFAP2F és NFAP2R primerpár bekötési helyét aláhúzással jelöltük.

A PCR-hez az MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad) készüléket használtuk, és az alábbi reakciót mértük össze 50 µl végtérfogatban (1. Táblázat). Az 1. Táblázatban feltüntetett reakciókörülményeket alkalmaztuk. A PCR-terméket gélelektroforézissel, etídium-bromiddal festet, 2%-os (m/V%) agaróz gélen ellenőriztük.

1. Táblázat. PCR reakciókörülmények

PCR (50µl)	PCR reakciókörülmények
- 22,5 µl nukleázmentes víz (MQ)	Elődenaturáció: 94 °C, 1 perc 30 mp
- 10 µl reakció puffer Q5 High-Fidelity pfu 5x	Denaturáció: 94 °C, 10 mp
- 10 µl 1 mM dNTP	Indítószekvencia kötődés: 60 °C, 15 mp
- 2,5 µl 10 µM forward indítószekvencia (NFAP2F)	Láncszintézis: 72 °C, 15 mp (30×)
- 2,5 µl 10 µM reverse indítószekvencia (NFAP2R)	Végső láncszintézis: 72 °C, 5 per
- 0,5 µl DNS polimeráz Q5 High-Fidelity Phusion (2000 U/ml)	
- 1 µl templát (K4CBP6 cNDS) (31 ng/µl)	

3.4.2. K4CBP6-ot kódoló cDNS klónozása a pGEM-Tnfp2 vektorba

A pEX-A128-K4CBP6 vektorból felszaporított 258 bp nagyságú K4CBP6 fehérjét kódoló cDNS-t a már előzőleg elkészített pGEM-Tnfp2 plazmidba klónoztuk.^[33] A vektorban található az *nfp2* cDNS, ami a *paf* prepro-szekvenciához fuzionáltatott és a *paf* részleges 5' és 3'-UTR régiói által határolt. Ennek helyére klónoztuk a felszaporított K4CBP6 cDNS-t, a plazmid *BbvCI* és *HindIII* restrikciós endonukleázok hasítóhelyeire. Az így létrehozott pGEM-T7_K4CBP6 vektor tartalmazta a K4CBP6 cDNS-t, melyet a *paf* prepro-szekvenciához fuzionált és a *paf* részleges 5'- és 3'-UTR által határolt.^[32]

Emésztési és ligálási reakciók: A plazmid DNS és PCR ampikonok emésztési és ligálási reakcióinak körülményeit a **2. Táblázat** foglalja össze.

2. Táblázat. Az emésztési és ligálási reakciókörülmények.

	Emésztési reakciók	Ligálási reakciók
Összetétel:	-5 µg plazmid DNS vagy PCR ampikon -50 U restrikciós endonukleáz* -1×enzimpuffer*	-300 ng inszert DNS -100 ng linearizált plazmid DNS -40 U T4 DNS ligáz* -1×T4 DNS ligáz puffer*
Reakció	16 óra, 37 °C	3 óra, 25 °C
Leállítás	10 perc, 65 °C	10 perc, 65 °C

*New England Biolabs

3.4.3. A *paf* 5'- és 3'-UTR régiókkal szegélyezett konstrukciók felszaporítása

A 1454 bp méretű, a *paf* 5'- és 3'-UTR régiókkal szegélyezett konstrukciót „joint” PCR technikával hoztuk létre, két ampikon felhasználásával. Az első ampikont a pSK275 plazmidból sokszorozítottuk fel. Ez tartalmazta a *paf* 5'-UTR és a *paf* prepro-szekvencia 16 nukleotid hosszúságú szakaszát, valamint a *NheI* restrikciós endonukleáz hasítóhelyét (**3. Ábra**). A reakcióhoz az 5'-UTRF (5'-GGCCGCTAGCATCCCGCTG-3'; Tm: 70,8 °C) és a STARTR (5'-CTGTGGTGATTTGCATTATGAAGGGCTTGAG-3'; Tm: 59,4 °C) indítószekvenciákat használtuk.

A 606 bp méretű második amplikont a pGEM-T7_K4CBP6 plazmidből amplifikáltuk fel a STARTF (5'-CTCAAGCCCTTCATAATGCAAATCACCACAG-3'; Tm: 67,3 °C), és a 3'UTRR (GGCCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAG (Tm: 67,88 °C) indítószekvenciával. A STARTF és az Amplikon1 létrehozásánál használt STARTR indítószekvencia átfed egymással. Az Amplikon2 tartalmaz 15 nukleotidot az 5'-UTR végéből, a *paf* 3'-UTR régiót a *NotI* restrikciós hasítóhellyel és a K4CPB6 defenzint kódoló cDNS-t, amely a *paf* prepro-szekvenciához fuzionált (4. Ábra).

>Amplikon1 (799 bp):

```
GGCCGCTAGCATCCCGCTGTAAGCCACCCATCCACCTTGAAGTATGCAACTTTTGACCGCTAGACCATGTGAGCTTAT
GTTACTGAAATACTACCCGCGAATCATTTCTTAATTTGCTTTGGCTCGAATCCACCCAGCCCTACGTAACACAACCGGGA
GCTGCCTTACAGCTTGGCTGTATCACAGTATCACATAGATACATAGTATAGTGCCTTTTGCCTTTTCGACCTATAAGC
ATCCGCCATATGCTAAACCTTCTCATATACCAACATTTTGGATTTGGAGATCATTTCCCTAGTGAAACAACCTTTATCAAATG
CAATGCAGCCATCGTCTTTGCAGATCCGAGTGGCCAGTCACCGTGTCAACGTGTCAGCCGTTTCTCTGCTTTTATAGGA
AATGATTACCATAGGTAAAGCCAAAAATATCTTCTGGTAAACAAGTGTGCATCTTACCCGGAGGCTGAAGCAGGTAA
GGGATTTTGGAGAGACCCACCCGTAAGAATATACAGCCAAAGAGGTCCAGTATCCTGAAGTATGTGAGGCATTAATGTCA
TTGGAGAAGTCATGCAATCCATAAGCTGCCACCCCAAGATGACTGCATTGGACCTGAGCATTGTATGTGTACCTTTTAC
ACAGAGCTCATGATCTGGTTTATAAAGGCGGCTTCATGACCTCAATTCCATATAGTATCACTCCCATCACAGCATTTTGA
TATCTTCAACCACTTTAACCTTCTCCAGAGGATCATCATCTCAAGCCCTTCATAATGCAAATCACCACAG
```

3. Ábra. Az Amplikon1 nukleotid sorrendje. Késsel jelöltük a *paf* 5'-UTR régiót, és dőlt pirossal a *paf* prepro-szekvencia 16 nukleotidját. Az 5'UTRF és STARTR indítószekvenciák bekötési helyét lilával és késsel emeltük ki. A *NheI* restrikciós endonukleáz hasítóhelyét aláhúzott, félkövér betűkkel jelöltük.

>Amplikon2 (606 bp):

```
TCATGCGCTTCATATGCAAATCACCACAGTTGCCCTTTTCTCTTCGCTGCAATGGGCGGGGTAGCCACCCCATTTGA
GTCTGTATCAAACGACCTCGATGCCAGGGCTGAGGCGGTGTCTGCGCACTGCGAGTCCCTCTCCCACCGCTTCAAGG
GCCCCCTGCGTCTCCGACAAGAACTGCGCCTCCGTCTGCGAGACCGAGCGCTTCTCCGGCGGTAACTGCCGCGGCTTCCGC
CGTCGCTGCTTCTGCACCAAGCCCTGCTAAATGGTCTCTGCGATCACCAGGGCATTTAATGGTTTTTGGTTCCCTTCTTG
TTGGTGATATGCGAGATGCCCTGTGATTCTCGAAGCTTACTACCCTACACCCACAAGGACTCGAACCAAGGACTGCTCGG
TGGGTGATACATATACACCCAGTATCTATCCAGCTTCAATTTTCGGCGAATTTTGTCTTATTTTATTAAGACACTCGT
TTGATATCTAGCTAGATATTGTTGCTCATCAACGAAATGGTTGTAGATTATCGAATATATCCAGCATCTTTTGATCGTAG
TCGGAAGTGAAATGGAGTACTATGATACGACACATGTACATTGTAAGCAGAAATAGGCTAGAGGGATAACTATCAAACCTG
CTGCAGCCCGGGGATCCACTAGTTCTTAGAGCGCGCCACCGGCC
```

4. Ábra. Az Amplikon2 nukleotid sorrendje. Dőlt pirossal jelöltük a *paf* prepro-szekvenciát, késsel a *paf* 5'-UTR 15 nukleotidját, sárgával pedig a *paf* 3'-UTR-t. A K4CBP6 cDNS-t sárgával emeltük ki. A *NotI* restrikciós endonukleáz hasítóhelyét egyszeres, míg a *HindIII* restrikciós enzim hasítóhelyét dupla aláhúzással emeltük ki. A STARTF és 3'UTRR indítószekvenciák bekötési helyét kék és zöld háttérrel jeleztük.

Az Amplikon1 és Amplikon2-t használtuk a 1454 bp nagyságú Amplikon3 létrehozásához. Az 5'UTRF, és 3'UTRR indítószekvenciáért alkalmaztuk a „joint” PCR technika közben. A konstrukció magába foglalta az *NheI* és *NotI* restrikciós endonukleázok hasítóhelyei közé beágyazott *paf* 5'-UTR-t, a *paf* prepro-szekvenciához fuzionáltatott K4CBP6-ot kódoló cDNS-t, a *paf* 3'-UTR-t, valamint a pSK275 plazmid részleges 5'- és 3'-UTR régióit (5. Ábra). Az emésztési és ligálási reakciókat a korábban említett körülmények alkalmazásával végeztük el.

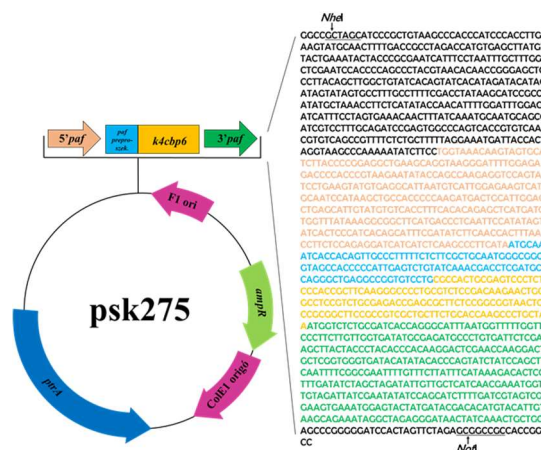
>Amplikon3 K4CBP60 (1454 bp):

GGCCGCTAGCATCCCGCTGTAAGCCCAACCATCCACCTTGAAGTATGCAACTTTTGACCGCCTAGACCATGTGAGCTTAT
GTTACTGAAATACTACCCGGAATCATTTCCTAATTTGGCTTGGCTCGAATCCACCCAGCCCTACGTAACACAACCGGGA
GCTGCCTTACAGCTTGGCTGTATCACAGTATCACATAGATACATAGTATAGTGCCTTTTGCCTTTTCGACCTATAAGC
ATCCGCCATATGTAAACCTTCTCATATACCAACATTTTGGATTGGAGATCATTTCTAGTGAAACAACCTTTATCAAATG
CAATGCAGCCATCGTCTTTGCAGATCCGAGTGGCCAGTCAACGTGTCAACGTGTCAGCCGTTTCTCTGCTTTTATAGGA
AATGATTACCACTAGGTAAGCCCAAAATATCTTCCGTGTAACAAGTAGTGCATCTTACCCCGGAGGCTGAAGCAGGTAA
GGGATTTTGGAGAGACCCCAACCGTAAGAATATACAGCCAGAGTCCAGTATCTGAGGTATGTGAGGCATTAATGTCA
TTGGAGAAGTCATGCAATCCATAAGCTGCCACCCCAAGATGATGCATTTGGACCTGAGCATTTGTATGTGTACCTTTTCAC
ACAGAGCTCATGATCTGGTTTATAAAGGCGGCTTCATGACCTCAATTCCATATAGTATCACTCCCATCACAGCATTTCGA
TATCTTCAACCACTTTAACCCTTCTCCAGAGGATCATCATCTCAAGCCCTTCATAATGCAAAATCACCACTTGCCCTTTT
CTCTTCGCTGCAATGGGCGGGTAGCCACCCCAATTGAGTCTGTATCAAAACGACCTCGATGCCAGGGTGAGGCGGGTGT
CTGCGCCACTGCGAGTCCCTCTCCACCGCTTCAAGGGCCCTGCGTCTCCGACAAGAAGTGGCCCTCCGCTCTGCGAGACC
GAGCGCTTCTCCGCGGTAACCTGCCGCGGCTTCCGCGCTGCTGCTTCTGCACCAAGCCCTGCTAAATGGTCTCTGCGATC
ACCAGGCGATTTAATGGTTTTTGGTTCCCTTCTTGTGGTGATATGCGAGATGCCCTGTGATTCTCGAAGCTTACTACCT
ACACCCACAAGGACTCGAACCAGGACTGCTCGGTGGGTGATACATATACACCCAGTATCTATCCAGCTTCAATTTTCGGC
GAATTTTGGTTCTTATTTTATAAAGACACTCGTTTGATATCTAGCTAGATATTGTTGCTCATCAACGAATGGTTGTAGAT
TATCGAATATATCCAGCATCTTTTGTAGCTAGTCGGAAGTGAATGGAGTACTATGATACGACACATGTACATTGTAAGCA
GAAATAGGCTAGAGGGATAAATATCAAACTGCTGAGCCCGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGCGCCGACCCGCGC

5. Ábra. Az Amplikon3 nukleotid sorrendje. Késsel a *paf* 5'-UTR-t, dőlt piros betűkkel a *paf* prepro-szekvenciát, sárgával pedig a *paf* 3'-UTR-t jelöltük. Sárgával emeltük ki a K4CBP6 kódoló cDNS-t. A *NheI* és *NotI* restrikciós endonukleázok hasítóhelyét dupla, illetve egyszeres aláhúzással emeltük ki. A 5'UTRF, 3'UTRR, STARTF és STARTR indítószekvenciák bekötési helyét lilával, késsel és zölddel emeltük ki.

3.4.4. Az Amplikon3 klónozása a pSK275*nfap2* vektorba

Az Amplikon3-at, az előzőleg elkészített pSK275*nfap2* vektorba klónoztuk.^[33] Az expressziós vektor magába foglalta a szelekcióhoz szükséges ampicilin és piritiamin rezisztencia géneket, a replikációs origót, és a *NotI* restrikciós endonukleáz hasítóhelyét, amit a vektor linearizálásához használtunk. A pSK275*nfap2* vektorban lévő *nfap2* cDNS helyére klónoztuk az Amplikon3-at. A klónozáshoz *NheI* és *NotI* restrikciós endonukleázokkal hasítottuk a plazmidot. A folyamat végeredményeképp kaptuk meg a pSK275_K4CBP6 expressziós vektort, amely tartalmazta a *paf* 5'- és 3'-UTR régióval határolt, *paf* prepro-szekvenciához fuzionált K4CBP6 cDNS-t (6. Ábra).



6. Ábra. A pSK275_K4CBP6 plazmid felépítése. A *prfA* a piritiamin rezisztencia gént, az *F1 ori* a replikációs origót, az *ampR* az ampicilin rezisztencia gént, a *ColEI* origó a replikációs origót jelöli. Bőrszínnel kiemelve az 5'-UTR *paf*, késsel a *paf* prepro-szekvencia, sárgával a K4CBP6-ot kódoló cDNS, míg zölddel a 3-UTR ' *paf* ' régió látható.

3.5. A K4CBP6 fehérjét kódoló gént tartalmazó pPICZαA plazmid létrehozása

3.5.1. A K4CBP6 cDNS felszaporítása PCR-el

A K4CBP6-ot kódoló cDNS-t génszintézis szolgáltatás igénybevételével állítottuk elő a *P. pastoris* kodon preferenciájának a figyelembevételével (Eurofins Genomics, Ebersberg, Németország). A pEX-A128-K4CBP6_Pichia plazmidba beágyazott 182 bp méretű cDNS-t *XhoI* és *XbaI* restriktációs endonukleázok hasítóhelyeit tartalmazó K4CBP6f (5'-GGCCCTCGAGAAAAGAAGGC-3' T_m: 61,0 °C) és K4CBP6r (5'-GGCCTCTAGATTAGCATGGCTT-3' T_m: 60,0 °C) indítószekvenciapárral sokszorosítottuk PCR-ban. Az indítószekvenciák rendelkeztek a Kex2 szignál szekvenciával, valamint az *XhoI* és *XbaI* restriktációs endonukleázok hasítóhelyeivel. A *P. pastoris*-alapú expressziós rendszerhez tervezett K4CBP6 fehérjét, kódoló gén nukleotid sorrendje a 7. Ábrán látható.

GGCCCTCGAGAAAAGAAGGCATTGTGAAAGTTTGTCCCACCGTTTCAAGGGTCCATGCGTCAGTGATAAGAACTGTGCTTCTGTCTGTGAAACAGAAAGATTCTCTGGAGGTAACCTGTCGTGGCTTTCGTAGAAGGTGCTTCTGTACCAAGCCATGCTAATCTAGAGGCC

7. Ábra. A pEX-A128-K4CBP6_Pichia plazmidba beépített K4CBP6 fehérjét kódoló cDNS nukleotid sorrendje. Sárgával a Kex2 szignál szekvenciát és az *XhoI* restriktációs endonukleáz hasítóhelyét jelöltük. Kékkel emeltük ki a K4CBP6 defenzint kódoló cDNS-t, míg zölddel a *XbaI* restriktációs hasítóhelye látható. Aláhúzással az indítószekvenciapár bekötési helyét ábrázoltuk.

A polimeráz láncreakciót MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad) készülékkel végeztük. A felszaporításhoz az alábbi PCR-t mértük össze 25 µl végtérfogatban és az alábbi reakciókörülményeket alkalmaztuk 3. Táblázat. A PCR eredményét etídium-bromidot tartalmazó 2%-os (m/V%) agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

3. Táblázat. PCR reakciókörülmények.

PCR (25 µl)	PCR reakciókörülmények
- 11,4 µl nukleázmentes víz (MQ)	Elődenaturáció: 94 °C, 1 perc 30 mp
- 5 µl reakció puffer Q5 High-Fidelity pfu 5x	Denaturáció: 94 °C, 10 mp
- 5 µl 1 mM dNTP	Indítószekvencia kötődés: 60 °C, 15 mp
- 1,25 µl 10 µM forward indítószekvencia (K4CBP6f)	Láncszintézis: 72 °C, 15 mp (30×)
- 1,25 µl 10 µM reverse indítószekvencia (K4CBP6r)	Végso láncszintézis: 72 °C, 5 per
- 0,1 µl DNS polimeráz Q5 High-Fidelity Phusion (2000 U/ml)	
- 1 µl templát (K4CBP6 cNDS) (80 ng/µl)	

3.5.2. A K4CBP6 cDNS klónozása a pPICZαA vektorba

A felsokszorosított K4CBP6 fehérjét kódoló cDNS-t, *XbaI* és *XhoI* restriktációs endonukleázzal emésztettük meg (4. Táblázat). Ellenőrzésképpen ebben az esetben is etídium-bromiddal festett 2%-os (m/V%) agaróz gélét használtunk. A meghasított cDNS-t és a már

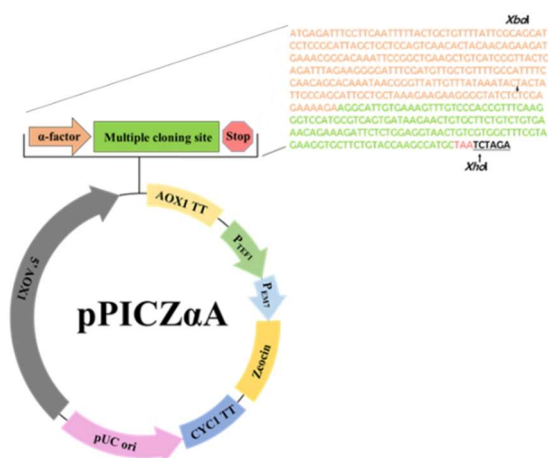
korábban *Xba*I és *Xho*I-el megemésztett ~3,6 kb nagyságú pPICZαA plazmidot T4 DNS ligáz enzimmel ligáltuk össze (4. Táblázat). A reakció eredményeképp létrejött a pPICZαA_K4CBP6 plazmid, amelyben az AOX1 promóter a metanollal indukálható fehérjetermelést biztosítja, míg a K4CBP6 cDNS-től 5' irányban elhelyezkedő α-faktor a fehérje szekréciójáért felelős (8. Ábra).

Emésztési és ligálási reakciók: A plazmid DNS és PCR ampikonok emésztési reakcióit és a ligálási reakciókat a 4. Táblázat foglalja össze.

4. Táblázat. Az emésztési és ligálási reakciókörülmények.

	Emésztési reakciók (50 µl)	Ligálási reakciók (20 µl)
Összetétel:	-10 µl nukleázmentes víz (MQ) -5 µl puffer (<i>Green Buffer fast digest 10X</i>) -30 µl inszert (K4CBP6 cDNS, 78,4 ng/µl) -2,5 µl <i>Xho</i> I és <i>Xba</i> I restriktions enzim	-7 µl nukleáz mentes víz (MQ) -2 µl 5X <i>rapid ligation puffer</i> -2 µl <i>Xho</i> I és <i>Xba</i> I emésztett pPICZαA plazmid (156,4 ng) -8 µl inszert (<i>Xho</i> I és <i>Xba</i> I emésztett K4CBP6 cDNS; 470,4 ng) -1 µl T4 DNS ligáz enzim
Reakció	20 perc, 37 °C	30 perc, 25 °C
Leállítás	10 perc, 75 °C	10 perc, 65 °C

*New England Biolabs



8. Ábra. A pPICZαA_K4CBP6 plazmid felépítése. 5' AOX1 az alkohol-oxidáz gén promóterét, míg az AOX1 TT az AOX1 transzkripció terminációs régióját jelöli. A P_{TEF1} és P_{EM7} a TEF1 és EM1 promóterét ábrázolja. A zeocin a zeocin rezisztencia gént, a CYC1 TT a CYC1 transzláció termináció régióját, míg a pUC ori a pUC origót jelöli. Narancssárgával az α-faktor, zölddel az „multiple cloning site” helyre beillesztett K4CBP6-ot kódoló fehérje, pirossal a STOP kodon lett kiemelve. A fekete nyilak az *Xho*I és *Xba*I restriktions endonukleázok hasítóhelyeit mutatja.

3.6. A K4CBP6 fehérjét kódoló pSK275 és pPICZαA plazmid transzformálása *E. coli* Top10F⁻ törzsbe

A kompetens Top10F⁻ *E. coli* sejteket egy korábbi transzformálás alkalmával már előállítottuk, ezeket -80 °C-on táruztuk. A lefagyasztott sejteket jégen olvasztottuk fel, majd 50 µl mennyiségű *E. coli*-hoz, 10 µl K4CBP6 fehérjét kódoló cDNS-t tartalmazó pSK275 és pPICZαA plazmidot adtunk hozzá. Ezt követően a mintákat jégen inkubáltuk 30 percen keresztül, majd 2 percig 42 °C-on inkubáltuk, végül ismét 2 percig jégen. Ezután a sejtekre 500 µl LSLB tápoldatot pipettáztunk, és 1 órán át 37 °C-on 120 rpm-en inkubáltuk. A transzformációs elegyből 100 µl-t és 200 µl-t szélesztettünk ki, a pSK275_K4CBP6 esetében 50 µg/ml ampicillint, míg a pPICZαA_K4CBP6 esetében 25 µg/ml zeocint tartalmazó LSLB táptalajra. A sejteket 16 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on.

A transzformáció sikerességét kolónia PCR-el ellenőriztük. A kinőtt telepekről fogpiszkálóval inokulumot vettünk és „3.4.1. A K4CBP6 cDNS felszaporítása PCR-el” és a „3.5.1. A K4CBP6 cDNS felszaporítása PCR-el” részekben leírt polimeráz láncreakciókat végeztük el, azzal a különbséggel, hogy az elődenaturáció másfél perc helyett 5 percig tartott. A PCR termékek jelenlétét 2%-os (m/V%) etídium bromidot tartalmazó agaróz gélen vizsgáltuk. A pozitív eredményt adó telepekről ismét fogpiszkálóval inokulumot vettünk és 2 ml a pSK275 plazmid esetében 50 µg/ml ampicillint, a pPICZαA K4CBP6 fehérjét kódoló plazmid esetében pedig 25 µg/ml zeocint tartalmazó LSLB tápoldatba oltottuk, majd 16 órán keresztül 37 °C-on ráztuk 160 rpm-en.

3.7. A K4CBP6 fehérjét kódoló pSK275 plazmid transzformálása *P. chrysogenum*-ba

A transzformálás előtt 40 órával 500 ml-es Elenmeyer-lombikba 2×10^8 db *P. chrysogenum* Δ*pafl*/Δ*pafl* konídiumot oltottunk le 2×200 ml ACM-be, és 25 °C-on ráztuk 160 rpm-en. A micéliumokat vákuum-szűrő és Büchner-tölcsér segítségével szűrtük le, majd 500 ml desztillált vízzel mostuk. A micélium szárazra törlése után, a gomba sejtfalát vinotaste-et tartalmazó lízispufferben (1,2 g vinotaste 30 ml lízispufferben) bontottuk le. A micéliumok óvatos pipettával történő szétmacerálása után, az elegyet 40 percig 25 °C-on inkubáltuk, 50 rpm-en ráztuk protoplasztképzés céljából. A protoplasztokat steril tölcser és szűrőpapír (*Filter paper 320mm Qualitative*, Filtres Fironi) segítségével választottuk el a micéliumtól, majd 10 percig 4 °C centrifugáltuk alacsony gyorsulási és fékezési körülmények mellett 200×g-n. A felülúszó leöntése után a sejteket 20 ml 0,7 M-os KCl oldatba vettük fel és ismét lefugáltuk őket az előbbi paraméterek szerint. A protoplasztokat 5 ml 0,7 M KCl-ban szuszpendáltuk fel, majd újabb centrifugálás (200×g, 4 °C) követően a sejteket végül 200 µl KCM oldatban

oldottuk fel. Négy lépésben $10\times$ hígítási sort készítettünk, majd a 10^{-3} hígítási lépéséből határoztuk meg a protoplasztok számát. A transzformálásig a sejteket $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A transzformálásnál $100\text{ }\mu\text{l}$ (3×10^7 db) protoplasztot, $8\text{ }\mu\text{l}$ linearizált pSK275_KACBP6 plazmidot ($15\text{ }\mu\text{g}$), és $25\text{ }\mu\text{l}$ PCM oldatot mértünk össze, majd 30 percig jégen inkubáltuk. Negatív kontrollként DNS helyett vizet adtunk az imént említett reakcióhoz. Ezt követően $250\text{ }\mu\text{l}$ PCM-et adtunk a transzformálási reakcióhoz és $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk 20 percen keresztül. Végül 1 ml $0,7\text{ M}$ KCl-ot adtunk az elegyhez. A 4 ml $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os fedőagarhoz $172\text{ }\mu\text{l}$ mintát adtunk, majd a 15 ml $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra előmelegített $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ piritiamint tartalmazó alapagarra öntöttük. A negatív kontroll esetében is a fentebb említett módon jártunk el. Az agarlemezeket $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk maximum 10 napig.

Transzformánsok szelektálása

A felnőtt telepekről fogpiszkálóval konídiumot gyűjtöttünk, majd $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ piritiamin tartalmú PCMM táptalajra pontban oltottuk. $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 1 héten keresztül növesztettük őket, majd ismét spórát gyűjtöttünk, hogy a K4CBP6 fehérjét kódoló cDNS jelenlétét spóra PCR-el kimutassuk. A DNS kivonása érdekében a spórákat 5 percig 500 W -on mikrohullámú sütőben melegítettük. Ezt követően a DNS-t $30\text{ }\mu\text{l}$ TE-pufferben oldottuk fel, majd, fél percig votrexeltük. 5 perc $100\times\text{g}$ centrifugálást követően a felülúszót tiszta Eppendorf-csőbe pipettáztuk át és összemértük a PCR-t a **3.4.1.** fejezetben leírtak szerint. Az amplikon jelenlétét 2% -os (m/V%) agaróz gélen ellenőriztük. Az első szelektációs lépés után a felnőtt transzformáns telepek konídiumaiból $10\times$ hígítási sort készítettünk, majd a 10^{-4} - 10^{-6} hígítási lépésekből $10\text{ }\mu\text{l}$ mennyiséget $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ piritiamint tartalmazó PCMM táptalajra szélesztettünk és $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk.

3.8. A K4CBP6 fehérjét kódoló pPICZaA plazmid transzformálása *P. pastoris* KM71H törzsbe

A *P. pastoris* KM71H-ba történő transzformálás előtt a felnőtt *E. coli* transzformánsokból plazmidot tisztítottunk (*Monarch® Plasmid Miniprep Kit* (New England Biolabs)) a transzformáló vektor szekvenciájának Sanger-szekvenálással történő ellenőrzéséhez. A pPICZaA_K4CBP6 plazmid nagymennyiségű tisztításához a *ZymoPURE™ -Express Plasmid Midiprep Kit* (Zymo Research) használtuk. Ehhez a transzformáns *E. coli*-t 50 ml LSLB tápoldatban növesztettük $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 160 rpm -en rázatva 16 órán keresztül, majd a plazmidot a gyártó utasításai szerint tisztítottuk ki. Ellenőrzésképpen az inszert beépülését ismét ellenőriztük PCR-rel a **3.5.1.** fejezetben leírtak szerint.

A kitisztított, K4CBP6 cDNS-t tartalmazó plazmidot *SacI* enzimmal linearizáltuk (**5. Táblázat**), 16 h órán keresztül 37 °C-on, a reakciót hőkezeléssel állítottuk le (65 °C, 20 perc). Az emésztést 2%-os (m/V%) agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Ezt követően az emésztett plazmidot kloroformos extrakcióval tisztítottuk és töményítettük be. A 250 µl emésztett plazmidhoz 50 µl kloroformot adtunk, és óvatosan összeszuszpendáltuk az oldatot. Ezt követően 5 percig 13800×g-n fugáltuk a mintát. Ennek következtében két frakció különült el, egy felül a vizes plazmidot tartalmazó frakció, míg alul egy kloroformos. A vizes fázist tiszta Eppendorf-csőbe pipettáztuk át, és 500 µl izopropanolt adtunk hozzá, majd 20 percig jégen inkubáltuk. Ezután 25 percig, 13800×g-n, 4 °C-on centrifugáltuk a mintát. A felülúszó eltávolítása után az Eppendorf-csőben maradt plazmidra 500 µl 70% (V/V%) etanolt mértünk. Újabb centrifugálást (5 perc, 13800×g, 4 °C) követően az etanolt eltávolítottuk a DNS-ről és elszívó fülke alatt beszárítottuk a mintát. Végül a plazmidot 10 µl desztillált vízben oldottuk vissza.

5. Táblázat. *A SacI-gyel történő plazmid linearizálási reakció.*

<i>SacI</i> linearizálási reakció (250 µl)
- 200 µl (73,6 ng/µl) plazmid
- 25 µl <i>SacI</i> . puffer 10X (Thermo science)
- 17,5 µl nukleázmentes víz (MQ)
- 7,5 µl <i>SacI</i> restrikciós endonukleáz (10 U/µl)

A transzformáláshoz a *P. pastoris* KM71H sejteket először 200 ml YPD-ben inkubáltuk 16 órán keresztül 30°C-on, 160 rpm-en rázatva. Ezt követően sejt kultúrát 1500×g-n fugáltuk 5 percig szobahőmérsékleten. A felülúszó eltávolítása után a sejteket 25 ml steril vízzel mostuk, majd centrifugálással (5 perc, 1500×g, 25 °C) újra összegyűjtöttük őket. A sejteket végül 1 ml 100 mM LiCl oldatban szuszpendáltuk fel és steril 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe mértük át. Ezt követően szobahőmérsékleten 15 másodpercig 13800×g-n fugáltuk a mintákat, majd a felülúszó eltávolítása után 400 µl 100 mM LiCl-ba vettük fel az összegyűlt sejteket. A 400 µl szuszpenzióból 50 µl mennyiséget használtunk a transzformáláshoz. Újabb centrifugálást (13800×g, 15 másodperc, 24 °C) követően a leülepedett sejtekről eltávolítottuk a LiCl-ot és összemértük a transzformálási reakciót. Összekeverés után a mintákat 30 °C-on, 30 percig inkubáltuk. 42 °C-on történő 20 percig tartó hősokk után az elegyet 4700×g-n centrifugáltuk 15 másodpercig. A transzformáló elegy összetételét a **6. Táblázat** tartalmazza. A transzformáló oldat eltávolítása után a sejteket 1 ml YPD tápoldatba vettük fel és 1 órán keresztül 30 °C-on 160 rpm-en ráztuk. Végül a transzformált sejtekből 25 µl-t, 50 µl-t, és 100 µl-t, valamint az ezen felül megmaradt mennyiséget 100 µg/ml zeocint tartalmazó YPDS táptalajra

szélesztettünk. Kontrollként a plazmid helyett, desztillált vízzel transzformált sejtekből 50 µl-t szélesztettünk 100 µg/ml zeocint tartalmazó YPDS, valamint zeocin mentes YPDS talajra. Az így elkészített agarlemezeket 30 °C-on 5 napig inkubáltuk.

6. Táblázat. *A P. pastoris transzformálása során alkalmazott reakcióelegy összetétele.*

Transzformálási reakcióelegy komponensei
- 240 µl 50% (V/V%) PEG-3350
- 36 µl 1 M LiCl
- 25 µl 2 mg/ml egyesszálú fragmentált lazac spermium DNS (használat előtt 5 percig 95 °C-on melegítve, majd jégen lehűtve)
- 4 µl (2606 ng/µl) <i>SacI</i> enzimmel linearizált K4CBP6 cDNS-t tartalmazó pPICZαA plazmid
- 46 µl nukleázmentes víz (MQ)

3.9. A K4CBP6 fehérje termelésre legalkalmasabb *P. chrysogenum* törzs kiválasztása

A transzformálás/szelekció után felnőtt egyes telepeket PCMM-be oltottuk át és a 3.1. fejezetben leírtak szerint és növesztettük őket 96 órán át. 72 és 96 óra inkubáció után mintát vettünk a fermentléből és annak fehérjetartalmát 18%-os tris-glicin SDS-PAGE gélelektroforézissel ellenőriztük a K4CBP6 nagy mennyiségű jelenlétére.

3.10. A K4CBP6 fehérjét legjobban termelő *P. pastoris* törzs kiválasztása

A felnőtt telepekben kolónia PCR segítségével ellenőriztük a K4CBP6-t kódoló cDNS jelenlétét. A „3.5.1. A K4CBP6 cDNS felszaporítása PCR-el” fejezetben leírtak szerint végeztük el a reakciót, annyi eltéréssel, hogy az elődenatrációs idő másfél perc helyett 5 perc hosszú volt. Pozitív kontrollként az *E. coli* transzformálása során használt K4CBP6 cDNS-sel ligált pPICZαA plazmidot használtuk, míg negatív kontrollként az üres pPICZαA vektort. A PCR termékeket 2% (m/V%) agaróz gélen ellenőriztük. A transzformáns telepekről inokulumot gyűjtöttünk és 10 ml YDP-t tartalmazó 50 ml-es falkoncsőbe oltottuk, majd 30 °C-on, 16 órán át, 180 rpm-en inkubáltuk. A sejt kultúrát 5 percig 3000×g-n szobahőmérsékleten centrifugáltuk, majd sejteket 100 ml BMG oldatban vettük fel 1 literes Erlenmeyer-lombikban. 16 óra, 30 °C-on történő rázatás (180 rpm) után a tenyészetet lecentrifugáltuk (5 perc, 3000×g, 25 °C) és a *P. pastoris* sejteket 100 ml-es 15 ml BMM tápoldatot tartalmazó Erlenmeyer-lombikba oltottuk át. A sejteket 6 napon keresztül 30 °C-on 180 rpm-en rázatva növesztettük tovább. A fermentléből 24 óránként 500 µl mennyiségű mintát vettünk, majd a centrifugálást (16800×g, 3 perc, 24 °C) követően a sejtmentes felülúszót -20 °C-on tároltuk. A tápoldathoz naponta 75 µl 100% (V/V%) metanolt adtunk hozzá. Az így elkészített minták fehérjetartalmát 18% tris-glicin SDS-PAGE-en ellenőriztük.

3.11. A K4CBP6 fehérje nagy mennyiségű termelése és tisztítása

3.11.1. Fehérjetermelés *P. chrysogenum*-alapú heterológ expressziós rendszerrel

A legjobban termelő *P. chrysogenum* törzs spóráiból spóraszuszpenziót készítettünk, majd ebből 100 µl-t szélesztettünk PCMM táptalajra, és 4 napon keresztül 25 °C-on inkubáltuk. A felnőtt telep konídiumaiból spóraszuszpenziót készítettünk. Végül 2×10^8 db spórát oltottunk 200 ml PCMM tápoldatot tartalmazó 500 ml-es Erlenmeyer-lombikba, amit 4 napig, 25 °C-on, 160 rpm-en ráztunk.

3.11.2. Fehérjetermelés *P. pastoris* KM71H-alapú heterológ expressziós rendszerrel

A legjobban termelő törzset 10 ml BMG tápoldatot tartalmazó 100 ml-es Erlenmeyer-lombikba oltottuk és 30 °C-on, 16 órán keresztül, 180 rpm-en rázatva inkubáltuk. Ezt követően a szuszpenzió fényelnyelését spektrofotométerrel mértük meg OD₆₀₀-on. Amennyiben a kapott érték OD₆₀₀ = 2-6 közé esett, a 10 ml mennyiségű sejt kultúrát hozzáadtuk az 1 l BMG tápközeget tartalmazó 3 l-es Erlenmeyer-lombikhoz, majd ismét 30 °C-on 180 rpm-en ráztunk 16 órán keresztül. Ezután a fermentlevet 5 percig 2000×g centrifugáltuk, majd a felülúszó leöntése után a sejteket 100 ml BMM tápoldatban vettük fel 1 l-es Erlenmeyer-lombikban. A fehérje termeléshez az élesztőt 4 napon keresztül inkubáltuk 30 °C-on 180 rpm rázás mellett, miközben 24 óránként 500 µl 100% (V/V%) metanolt adtunk a tenyészethez.

3.11.3. Fehérjetisztítás

Mindkét heterológ expressziós rendszer a tápközegebe szekretálja a megtermelt K4CBP6 fehérjét, ezért az a sejtek feltárása nélkül könnyen tisztítható. A *P. chrysogenum* esetében először a tápoldatot vákuum-szűrő, szűrőpapír (*Papier Filtre Qualitatif, 90 mm*, Filtres Fioni) és Büchner-tölcsér segítségével megtisztítottuk a micéliumtól, majd a tápoldatot 1 órán át 4600×g-n centrifugáltuk szobahőmérsékleten és szűrőpapíron újra átszűrtük. *P. pastoris* esetében a 4 napos inkubálást követően a tápoldatot 2000×g-n 5 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten. A fermentlé 30 kDa alatti fehérjetartományát ultrafiltrációval választottuk el Amicon® *Stirred Cell 400 mL* (Millipore) eszköz felhasználásával (*Amicon Stirred Cell, 400ml és Ultracell 30 kDa Ultrafiltration Discs, regenerated cellulose*, Millipore). A 30 kDa alatti frakcióból a K4CBP6-ot kationcserés oszlopkromatográfiával (*Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High S column*, Bio-Rad) tisztítottuk *Duoflow Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) System* (Bio-Rad) készülékkel. A mintafelvétel után, az oszlopra fel nem kötött komponenseket 60 ml ekvilibráló pufferrel mostuk le, 2 ml/perc átfolyási sebesség mellett. A

fehérje eluálása foszfát-pufferben oldott emelkedő NaCl koncentrációval (0,1 M, 0,2 M, 0,3 M és 1,5 M) történt 2,5 ml/perc átfolyási sebességgel.

3.11.4. Fehérje gélelektroforézis és Coomassie Brilliant Blue R-250 festés

A fermentlevek és a tisztítás egyes lépéseinek a fehérjetartalmát tris-glicin poliakrilamid SDS-PAGE-n ellenőriztük. Szeparáló gélként 18%-os gél-t öntöttünk és 1×SDS futtatópuffert vagy 1×TGS puffert használtunk. Molekulasúly markerként a *Neosartorya (Aspergillus) fischeri* antifungális protein 2-t (NFAP2: 5,6 kDa) alkalmaztuk. A gélelektroforézist a szeparáló gél eléréséig 90 V, majd ezt követően 150 V áramerősséggel végeztük. A géleket az elektroforézis után 45 percig Coomassie Brilliant Blue R-250 festékben ráztuk, majd 2×30 percig Mosóoldat I.-ben inkubáltuk, végül Mosóoldat II.-ben tovább mostuk és tároltuk.

3.11.5. A K4CBP 6 sómentesítése és liofilizálása

A fehérje kationcserés tisztítása közben gyűjtött 0,1 M, 0,2 M és 1,5 M frakciókat egyesítettük a *P. chrysogenum* esetében. A *P. pastoris* rendszernél a teljes 0,3 M és a 1,5 M frakció első 3 lépését egyesítettük és dialízissel sómentesítettük. A mintákat dialízismembránban (*Snake SkinTM dialysis tubing*, 3,5 K MWCO, Thermo Fisher Scientific) 8 órán keresztül dializáltuk 5 liter desztillált vízzel szemben. Ezt követően a mintákat liofilizáltuk, majd a fehérjét 3 ml steril vízbe oldottuk vissza.

3.12. A K4CBP6 fehérje további tisztítása és azonosítása fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával

Mindkét heterológ expressziós rendszerrel megtermelt K4CBP6 defenzint RP-HPLC-vel tisztítottuk tovább. A fehérjét *Phenomenex Jupiter C18* oszlopon (250 × 4,6 mm, 10 µm részecskeméret, 300 Å pórusméret, Phenomenex) tisztítottuk tovább fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás készülékkel. A tisztítás során „A” és „B” eluent használtunk. A folyamat elején a „B” eluent 5 V/V%-ban alkalmaztuk, majd 35 perc alatt fokozatosan 40 V/V%-ra emeltük a koncentrációját. Az áramlási sebességet 1 ml/perc-re állítottuk be. A fehérjét a retenciós idő figyelembevételével lehetett beazonosítani. A mérések elvégzésében Dr. Váradi Györgyi, a Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Intézetének munkatársa volt segítségünkre.

3.13. A K4CBP6 fehérje azonosítása tömegspektrometriával

A két különböző expressziós rendszerrel előállított fehérje tömegspektrometriai analíziséhez ultra-nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal (Nano Aquity Ultraperformance Liquid Chromatography System, UPLC, Waters) összekapcsolt Orbitrap MS (Thermo Q-exactive+) készüléket használtunk, és BEH130 C18 oszlopot (Waters, oszlophossz 250 mm, oszlopátmérő: 75 µm, részecskeméret: 1,7 µm) alkalmaztunk. A folyamat során a „B eluens” 3 V/V%-os koncentrációját 40 perc alatt fokozatosan 40 V/V%-ra emeltük, 350 nl/perc áramlási sebesség mellett. A mérések elvégzésében és adatok kiértékelésében Dr. Kele Zoltán, a Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Intézetének munkatársa segített.

3.14. A *P. chrysogenum*-alapú heterológ expressziós rendszerrel terelt K4CBP6 defenzin másodlagos szerkezetének vizsgálata ECD spektrometriával

A dializált és liofilizált fehérjét másodlagos szerkezetét *Jasc-815* típusú ECD spektrométerrel határoztuk meg. A méréshez 0,1 cm vastag kvarc küvettát használtunk. A vizsgálatot 25-95 °C-on és 195-260 nm-en végeztük. Kontrollként desztillált víz spektrumát is felvettük és később ezt vontuk ki a fehérje mérése során kapott eredményből. A vizsgálatot 100 nm/másodperc szkennelési sebességgel végeztük el 25 °C-on. A mérések elvégzésében és az adatok kiértékelésében Dr. Borics Attila, az Eötvös Loránd Kutatási Hálózat, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézetének munkatársa segített.

3.15. A *P. chrysogenum*-alapú heterológ expressziós rendszerrel terelt K4CBP6 defenzin antifungális hatásának vizsgálata

A K4CBP6 defenzin antifungális hatását *C. herbarum* FSU 1148 és *F. oxysporum* SZMC 6237J növénypatogén gombákkal szemben vizsgáltuk. A fitopatogén gombák konídiumaiból 2×10^5 spóra/ml koncentrációjú szuszpenziót készítettünk PDB-ben és 100-100 µl-t mértünk 96 lyukú mikrotiterlap egyes lyukaiba (*96 wells, flat-bottom Tissue Culture Plates*, VWR). Ezekhez a K4CBP6 fehérje (törzsoldat: 40 µg/ml) PDB-ben készített 4 lépéses $10 \times$ hígítási sor egyes lépéseiből 100 µl-t adtuk hozzá. A fehérje végkoncentrációi így az egyes lyukakban a következők voltak: 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml és 1,25 µg/ml. Növekedési kontrollként a mikotiterlap lyukába 100 µl spóraszuszpenziót és 100 µl PDB-t mértünk. A mikrotiterlapokat 25 °C-on inkubáltuk nedves törlőkendőt tartalmazó dobozban. A minták fényelnyelését *Hidex Sense* mikrotiterlemez-leolvasó készülékkel (Hidex) mértük

OD₆₂₀-on 0 és 72 óra inkubálást követően. A kísérletet kétszer ismételtük meg két technikai párhuzamos bevonásával.

Az adatok kiértékeléséhez Excel 2016 táblázatkezelő programot (Microsoft) használtunk. A gombák növekedési mértékét a 72 és 0 órában mért fényelnyelés különbsége határozta meg. A növekedési kontroll fényelnyelését tekintettük 100%-os növekedésnek. Az egyes mintahelyek növekedési százalékát az alábbi egyenlettel számoltuk ki: $\frac{(72\text{óra}-0\text{óra})\times 100}{\text{kontroll átlag}}$.

A *C. herbarum* morfológiai változásának vizsgálatához fenolgyapotkék (R-8) festéket használtunk. A 10 µg/ml és 20 µg/ml K4CBP6 fehérjét tartalmazó mintákat, valamint a növekedési kontrollt Eppendorf-csőben 5 percig centrifugáltuk 16800×g-n. A felülúszó eltávolítása után a mintákhoz 20 µl PDB-t és 10 µl R-8 festéket adtunk. A megfestett mintákat fénymikroszkóppal (Olympus BX53) 100× és 20× nagyításon vizsgáltuk és Olympus XC50 digitális kamerával fényképeztük.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. *In silico* szerkezetvizsgálatok

4.1.1. A K4CBP6 előre jelzett fizikokémiai tulajdonságai

A Sol Genomics Network adatbázisban azonosítottuk a K4CBP6 paradicsom-eredetű, defenzin-szerű fehérjét kódoló gént (Lókusz [5]: Solyc07g007760.2.1, UniProt azonosító: K4CBP6) (UniProt Consortium, 2017). Az *in silico* vizsgálatok alapján a K4CBP6 fehérje 78 aminosav hosszú preproteinként expresszálódik, amely rendelkezik egy 31 aminosav hosszúságú N-terminális szignálszekvenciával, így az érett fehérje 47 aminosavból áll. Ez a szignálszekvencia a defenzin érése közben lehasad. Az érett fehérje pozitívan töltött, hidrofíl molekula, amelynek harmadlagos szerkezetét nyolc cisztein között kialakult *adbacdbc* mintázatot mutató diszulfid-híd stabilizálja. A K4CBP6 rendelkezik γ -core régióval (7. Táblázat).

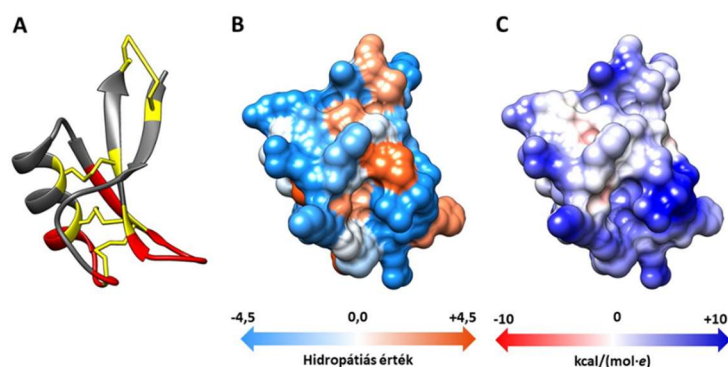
7. Táblázat. A *Solanum lycopersicum* L.-eredetű újonnan azonosított K4CBP6 defenzin-szerű molekula aminosav-szekvenciája és *in silico* meghatározott fiziko-kémiai tulajdonságai.

Protein	Aminosavak száma	Mw. (kDa)	Ciszteinek száma	Lizin/Arginin/Hisztidin	Izoelektromos pont	Töltés pH 7	GRAVY
MAQSIRFFATLFLLLAMLMVEMGPTRIVEA RHCESLSHRFKGPCVSDKNCASVCETERFSGGNCRGFRRCFCTKPC							
K4CBP6	47	5,4	8	3/7/2	9,14	+6,2	-0,757

Az aminosav-szekvenciában a fekete betűk a szignál szekvenciát jelzik, míg a piros vastagon szedettek az érett fehérjét. A γ -core motívumok aláhúzással jelöltük. GRAVY: grand average of hydropathy value (átlagos hidrofóbicitás érték).

4.1.2. A K4CBP6 előre jelzett harmadlagos szerkezete

Az elkészített homológia modell alapján a K4CBP6 harmadlagos szerkezete nagyon hasonló a már izolált növényi defenzinekéhez és hurokrégiókkal összekötött egy α -hélixet és három antiparalell β -redőt tartalmaz (9A. Ábra). A K4CBP6 felszínén egymással váltakozva elhelyezkedő hidrofíl és hidrofób foltok találhatóak aminek a következtében a molekula amfipatikus (9B. Ábra). Mindemellett a felületen elhelyezkedő semleges, vagy nagy mértékű pozitív töltésű régiók következtében a molekula pozitív össztöltéssel rendelkezik (9C. Ábra). Ramachandran plot analízis alapján a K4CBP6 aminosavjainak 100%-a az ún. energetikailag legkedvezőbb régióban találhatóak, ezért megbízhatónak tekinthető a készített modell.

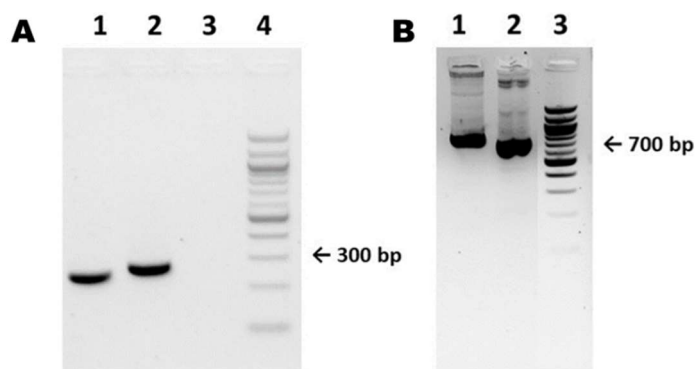


9. Ábra. A K4CBP6 *in silico* homológia modellezéssel előre jelzett (A) harmadlagos szerkezete, (B) hidrofóbicitás felszíne, (C) és töltöttségi felszíne. A ciszteinek sárgával lettek jelölve és a közöttük kialakuló diszulfid-hidak pedig sárga vonalakkal. A γ -core régiók pirossal kerültek kiemelésre.

4.2. A K4CBP6 heterológ expressziója

4.2.1. A pSK275_K4CBP6 expressziós vektor létrehozása

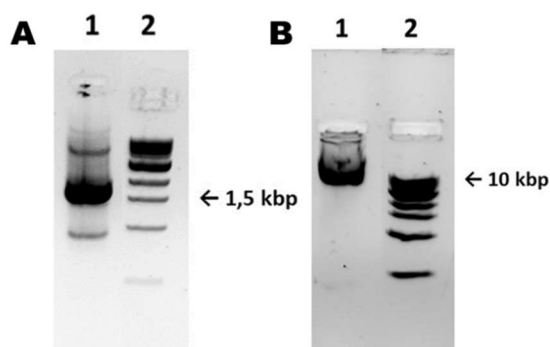
A pEX-A128-K4CBP6 vektorból felszaporítottuk a K4CBP6 cDNS-ét (**10A. Ábra**). Az így kapott 258 bp méretű amplikont *BbvCI* és *HindIII* restrikciós endonukleázokkal hasítottuk és a már korábban ezekkel az enzimekkel emésztett pGEM-*Tnfap2* vektorba klónoztuk. Ezt használtuk később templátként az Amplikon2 létrehozásához. Az Amplikon1 előállításához a pSK275*nfap2* plazmidot használtuk (**10B. Ábra**).



10. Ábra. A K4CBP6-ot tartalmazó génkonstrukció amplikonja, valamint az Amplikon1 és Amplikon2. (A) 1: K4CBP6 (templát: pEX-A128-K4CBP6), 2: pozitív kontroll - NFAP2 (templát: pSK275*nfap2*), 3: negatív kontroll (templát: ddH₂O), 4: 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs). (B) 1: Amplikon 1 (templát: pSK275*nfap2*) 2: Amplikon2 K4CBP6 (templát: pGEM-K4CBP6), 3: 1000 bp DNA Ladder (New England Biolabs).

Az Amplikon3 létrehozásához az Amplikon1-et és Amplikon2-t használtuk a „joint” PCR-ben. (**11A. Ábra**). Az Amplikon3-at *NheI* és *NotI* restrikciós endonukleázzal emésztettük és ezekkel az enzimekkel linearizált pSK275*nfap2* plazmidba klónoztuk, így létrehozva a

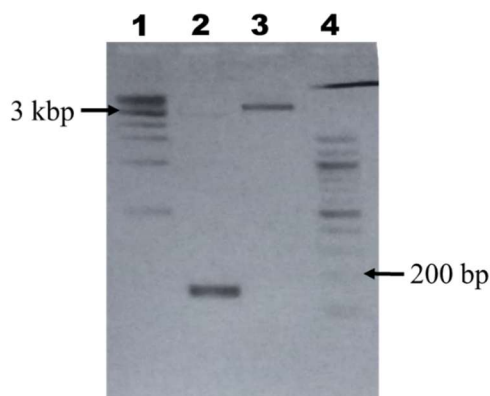
pSK275_K4CBP6 expressziós vektor. Ezt a konstrukciót *NotI* emésztéssel linearizáltuk, majd a *P. chrysogenum* Δ *pafl/pafb* törzsbe transzformáltuk (**11B. Ábra**).



11. Ábra. Az Amplikon3, valamint a *NotI* restrikciós endonukleázzal emésztett pSK275-K4CBP6 expressziós vektor. (A) 1: Amplikon3 K4CBP6, 2: 1 kbp DNA Ladder (New England Biolabs), (B) 1: pSK275 η pa2-K4CBP6, 2: 1 kbp DNA Ladder (New England Biolabs).

4.2.2. A pPICZ α A_K4CBP6 expressziós vektor létrehozása

Az előző rendszerhez hasonlóan a pEX-A128-K4CBP6 vektorból szaporítottuk fel a K4CBP6 182 bp méretű cDNS-ét, melyet *XhoI* és *XbaI* enzimekkel emésztettünk és a pPICZ α A plazmidba klónoztunk (**12. Ábra**). Ezt a konstrukciót először *E. coli* Top10F⁻ törzsbe transzformáltuk, majd a tisztítást és a *SacI* enzimmel történő linearizálást követően *P. pastoris* KM71H élesztőbe transzformáltuk.

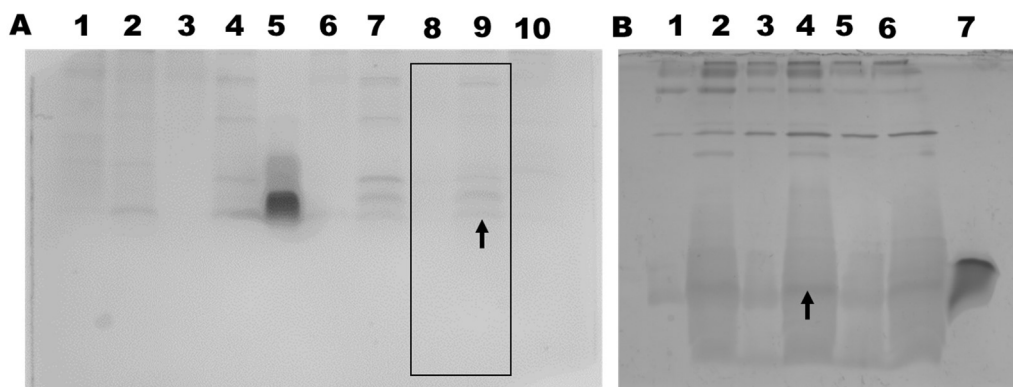


12. Ábra. *XhoI* és *XbaI* restrikciós endonukleázzal emésztette K4CBP6 cDNS és pPICZ α A plazmid. 1: 1 kbp DNA Ladder (New England Biolabs), 2: emésztett K4CBP6, 3: emésztett pPICZ α A plazmid, 4: 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs)

4.3. A K4CBP6 fehérjét legnagyobb mennyiségben termelő *P. chrysogenum* és *P. pastoris* törzs kiválasztása

A *P. chrysogenum* esetében a transzformáns telepek közül tíz klónt (K4CBP6/A – K4CBP6/J) választottunk ki. A transzformánsokat 4 napig PCMM tápoldatban inkubáltuk, 25 °C-on, 160 rpm rázatás mellett és 72, valamint 96 óra elteltével mintát vettünk a fermentléből azért, hogy 18% tris-glicin SDS-PAGE elektroforézissel információt kapjunk a tápközegebe szekretált K4CBP6 mennyiségéről (13A. ábra).

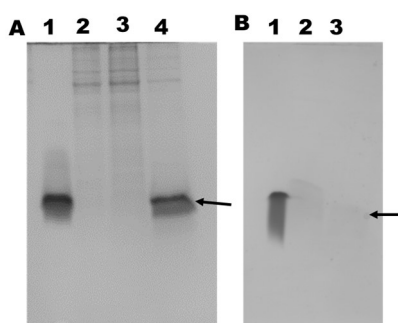
A *P. pastoris*-alapú expressziós rendszer esetében a transzformáns telepek közül hatot (2., 4., 5., 7., 9., 10. telep) választottunk ki, a nagymennyiségű fehérjetermelés teszteléséhez. A sejteket 6 napon keresztül BMM tápoldatban 30 °C-on, 160 rpm-en növesztettük és naponta 0,5% (V/V%) mennyiségben 100% metanolt adtunk hozzá. A tápközegből 24 óránként mintát vettünk, hogy 18% tris-glicin SDS-PAGE gélelektroforézissel vizsgáljuk a fermentlében lévő fehérjék és a K4CBP6 mennyiségét (13B. ábra). A *P. chrysogenum* esetében 96 óra elteltével észleltük a legnagyobb mennyiségű K4CBP6-ot, míg a *P. pastoris*-nál 4 nap elteltével lett a legnagyobb hozam. A *P. chrysogenum*-alapú rendszer esetében a K4CBP6/H transzformáns törzset választottuk ki a nagymennyiségű termeléshez, mivel ez termelte a legtöbb fehérjét (13A. Ábra). Az élesztő alapú rendszer esetében az 5. telepet választottuk ki a nagymennyiségű K4CBP6 termelésre (13B. Ábra).



13. Ábra. A vizsgálatba bevont két expressziós rendszer fermentlevének 18% tris-glicin SDS-PAGE vizsgálata. A fermentlé minták 72 és 96 óra után (*P. chrysogenum*,) valamint 6 napon keresztül (*P. pastoris*) lettek véve. **(A)** *P. chrysogenum*-alapú rendszer: 1: K4CBP6/E/72 óra; 2: K4CBP6/E/96 óra; 3: K4CBP6/F/72 óra; 4: K4CBP6/F/96 óra; 5: NFAP2 (2µg); 6: K4CBP6/G/72 óra; 7: K4CBP6/G/96 óra; 8: K4CBP6/H/72 óra; 9: K4CBP6/H/96 óra; 10: Δpaf/96 óra. **(B)** *P. pastoris*-alapú rendszer 5. telep: 1: 1. nap, 2: 2. nap, 3: 3. nap, 4: 4. nap, 5: 5. nap, 6: 6. nap 7: NFAP2 (2µg). Feketével bekeretezve a K4CBP6/H/72 óra és K4CBP6/H/96 óra minta látható, amit a nagymennyiségű fehérje termelésre választottunk ki. Fekete nyíllal a K4CBP6 fehérjét jelöltük. A *P. pastoris*-alapú rendszer esetében a fekete nyíllal a 4. nap fehérjehozamát jelöltük, mivel itt érte el a fehérjehozam a maximumát.

4.4. A K4CBP6 fehérje termelése és tisztítása

Mindkét expressziós rendszer esetében a fermentlé 30 kDa alatti frakcióját tisztítottuk kationcserés oszlopkromatográfiával. A fehérjét 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M és 1,5 M sókoncentrációval eluáltuk, majd a fehérje jelenlétét 18% tris-glicin SDS-PAGE-n vizsgáltuk a gyűjtött frakciókban. Mindkét esetben az 1,5 M-os NaCl koncentráció esetében figyeltük meg a K4CBP6 jelenlétét (**14. Ábra**). A *P. chrysogenum*-alapú rendszerrel 75 µg/l fehérjét sikerült előállítani. A *P. pastoris*-alapú expressziós rendszer esetén, a minta heterogenitása miatt hozamot nem tudtunk megállapítani (ld. **4.6. fejezet**). Ennek ellenére elmondható volt, hogy a *P. pastoris*-alapú rendszer alkalmazásával nagyobb K4CBP6 hozamot tudtunk elérni



14. Ábra. K4CBP6 fehérje tisztításának ellenőrzése Coomassie Brilliant Blue R-250 festéssel. **(A)** *P. chrysogenum*-alapú expressziós rendszerrel termeltetett K4CBP6: 1: NFAP2 (2 µg); 2: 0,1 M NaCl, 3: 0,2 M NaCl; 4: 1,5 M NaCl. **(B)** *P. pastoris*-alapú expressziós rendszerrel termeltetett K4CBP6: 1: NFAP2 (2 µg), 2: 1,5 M NaCl/1 frakció, 3: 1,5 M NaCl/2 frakció. Fekete nyíllal a K4CBP6 fehérje sávját jelöltük.

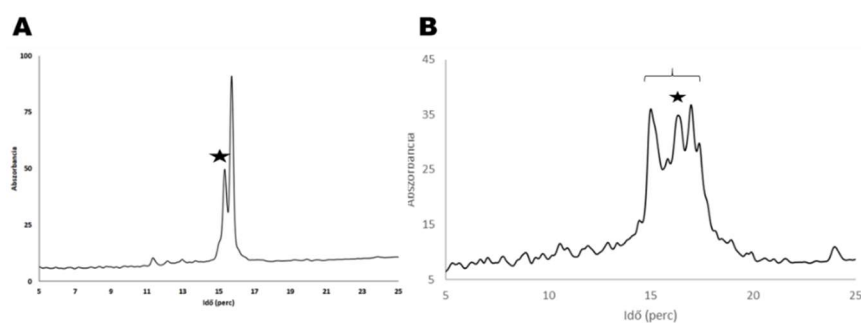
4.5. A tisztított K4CBP6 RP-HPLC és tömegspektrometriás analízise

A 1,5 M sókoncentrációval eluálódott K4CBP6 fehérje minőségét és összetételét mindkét expressziós rendszer esetében RP-HPLC analízissel vizsgáltuk. A *P. chrysogenum*-alapú rendszer esetében a K4CBP6 defenzin a 15. és a 16. percben eluálódott (**15A. Ábra**), míg a *P. pastoris*-alapú rendszerénél több csúcs is megfigyelhető volt a fehérje eluálása során a 15. és a 17. perc között (**15B. Ábra**).

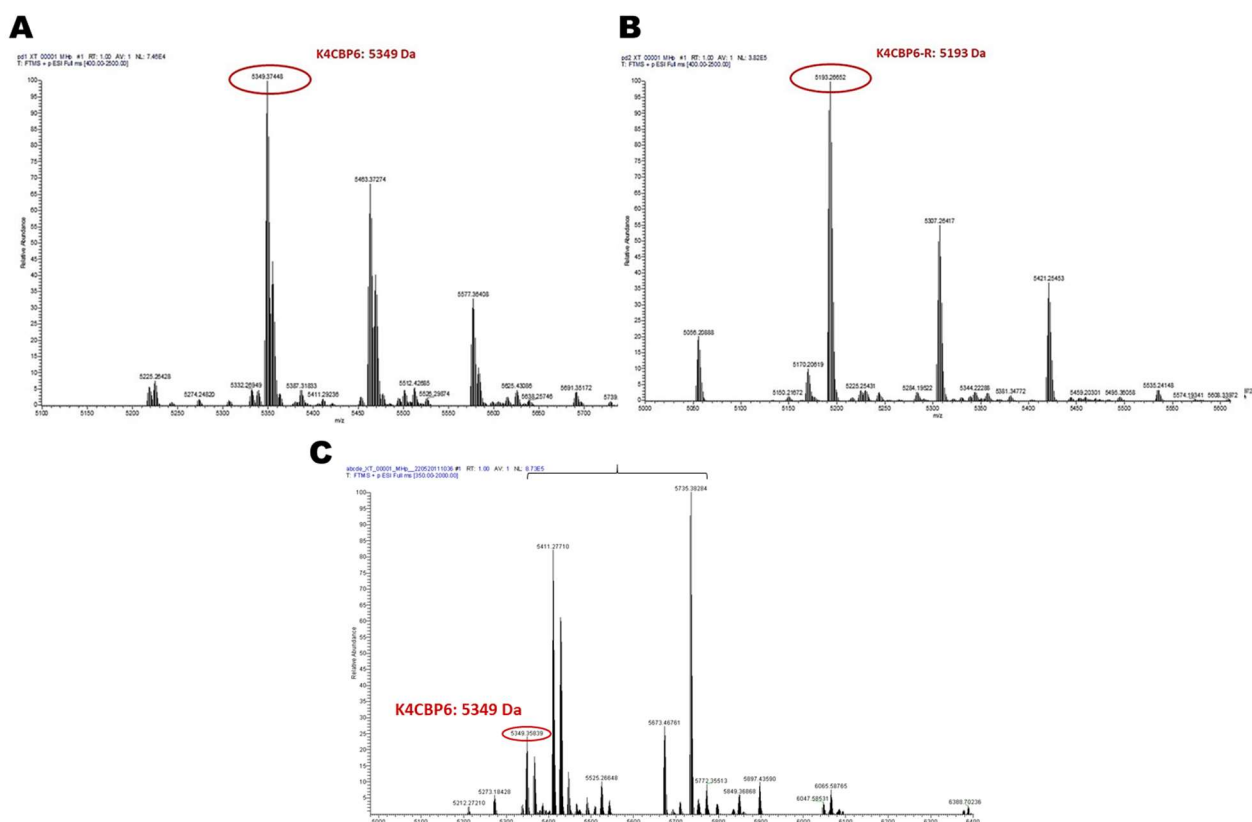
A *P. chrysogenum* esetében a tömegspektrometriás analízis kimutatta, hogy a 15. percben eluálódott csúcs a teljes hosszúságú K4CBP6 fehérjét tartalmazza, míg a 16. percben eluálódó pedig ennek, egy N-terminális végen arginin hiányos változatát (K4CBP6-R) (**15A. Ábra**). Mindkét fehérje esetében, azonban a ciszteinek között kialakultak a diszulfid-hidak a molekulatömegek alapján (**16. Ábra**).

A *P. pastoris* esetében az RP-HPLC és tömegspektrometriás vizsgálatok kimutatták, hogy az érett teljes hosszúságú fehérje mellett, számos az N-terminálison a Kex2

szignálszekvencia hasítóhelyéből extra aminosava(ka)t tartalmazó változat is expresszáldott (16. Ábra.).



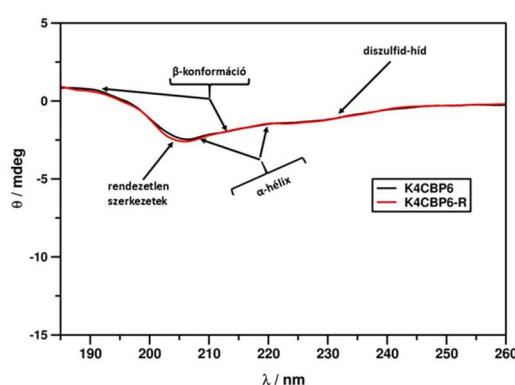
15. Ábra. A 1,5 M NaCl tartalmú pufferrel eluálódó K4CBP6 minták RP-HPLC kromatogramjai. (A) *P. chrysogenum*-alapú rendszerrel termelt K4CBP6 fehérje kromatogramja. (B) *P. pastoris*-alapú rendszerrel termelt K4CBP6 fehérje kromatogramja. Fekete csillaggal a megfelelően érett K4CBP6-ot jelöltük, míg kapcsos zárójellel a K4CBP6 eltérő érett változatait ábrázoltuk.



16. Ábra. Az RP-HPLC tisztított *P. chrysogenum*-alapú rendszerrel előállított (A) K4CBP6 és (B) arginin hiányos változatának (K4CBP6-R) tömegspektruma, valamint a (C) *P. pastoris*-alapú rendszerrel előállított K4CBP6 tömegspektruma. Kapcsos zárójellel a K4CBP6 eltérő módon érett változatait ábrázoltuk.

4.6. A *P. chrysogenum*-alapú expressziós rendszerrel termeltetett K4CBP6 szerkezetének vizsgálata ECD spektroszkópiával

A K4CBP6 és K4CBP6-R fehérje másodlagos szerkezeti elemeinek vizsgálatát ECD spektroszkópiával végeztük el. A spektrum alapján elmondható, hogy mindkét esetben a defenzin feltekeredett szerkezettel rendelkeznek, emellett az arginin hiány nem befolyásolta a fehérje konformációját. Az vizsgálat alapján az is megállapítható, hogy mindkét molekula tartalmaz α -helixet (195, 208, 222 nm), β -redőt (190, 215 nm) és diszulfid-hidakat (~228 nm) (17. Ábra). Ez alapján elmondható, hogy a fehérje rendelkezik a növényi defenzinekre jellemző másodlagos szerkezeti elemekkel.^[6, 23]



17. Ábra. Az RP-HPLC tisztított K4CBP6 (fekete) és K4CBP6-R (piros) ECD spektruma.

4.7. A *P. chrysogenum*-alapú expressziós rendszerrel megtermelt K4CBP6 antifungális hatása

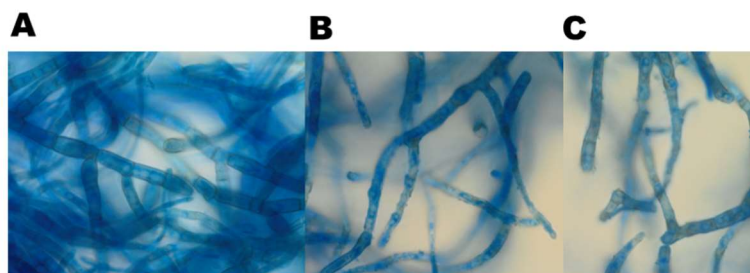
A K4CBP6 antifungális hatásának vizsgálatát a *C. herbarum* FSU 1148 és a *F. oxysporum* SZMC 6237J izolátumokkal szemben végeztük el fehérje 1,25 - 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációinál (8. Táblázat). Az eredmények alapján elmondható, hogy a K4CBP6 kis mértékben képes gátolni a *C. herbarum* növekedését, azonban *F. oxysporum*-mal szemben nem mutat gombaellenes hatást a vizsgált koncentrációtartományban.

8. Táblázat. A *C. herbarum* és *F. oxysporum* izolátumok növekedése (%) eltérő koncentrációjú K4CBP6 jelenlétében, a kezletlen kontrollhoz viszonyítva (100% növekedés) 72 óra, szobahőmérsékleten történő inkubáció után.

	20 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	2,5 $\mu\text{g/ml}$	1,25 $\mu\text{g/ml}$	Kontroll
<i>F. oxysporum</i>	97 $\pm$ 6,0	119 $\pm$ 4,3***	125 $\pm$ 5,9***	116 $\pm$ 4,6**	99 $\pm$ 16,25	100 $\pm$ 2,8
<i>C. herbarum</i>	73 $\pm$ 3,3	71 $\pm$ 11,9	78 $\pm$ 16,2	74 $\pm$ 14,9	76 $\pm$ 17,1	100 $\pm$ 29,6

A szignifikáns eltérést *($P \leq 0.05$), **($0.0001 < P \leq 0.005$), és ***($P \leq 0.0001$) jelöltük.

A K4CBP6-nak a *C. herbarum* növekedésére gyakorolt hatását mikroszkópiával, laktófenolgyapotkék (R-8) festéssel vizsgáltuk. A fehérjét 20 és 10 µg/ml-ben tartalmazó minták esetén a hifafonalak elvékonyodását, összeesését tapasztaltuk, valamint sejtfal törmelék is megfigyelhető volt (**18. Ábra**). A megfigyeltek alapján azt feltételezzük, a K4CBP6 nem morfogenikus defenzin, hanem a sejtfal/sejtmembrán roncsolásán keresztül fejti ki a hatását.



18. Ábra. *C. herbarum* hifájának változása K4CBP6 fehérje jelenlétében. (A) 0 µg/ml, (B) 10 µg/ml, (C) 20 µg/ml K4CBP6-tal kezelt konídiumból kifejlődött hifa látható.

5. Összefoglalás

A növényi defenzineket lehetséges biofungicidként tartják számon, mivel széles körben képesek gátolni a növénypatogén gombák növekedését, és eddig csak pár esetben írtak le rezisztenciát velük szemben. A defenzinek ipari léptékű előállítása azonban eddig még nem megoldott. Kutatócsoportunk egy paradicsomnövény-eredetű defenzin-szerű fehérje, a K4CBP6 heterológ expresszióját valósította meg fonalasgomba- (*P. chrysogenum*) és élesztő- (*P. pastoris*) alapú rendszerekben.

Az *in silico* vizsgálatok alapján a K4CBP6 fizikokémiai tulajdonságai hasonlóak az eddig megismert növényi defenzinekéhez: a fehérje kis molekulatömegű (5,4 kDa), pozitív töltésű (+6,2) és hidrofil (GRAVY: -0,757). Az előre jelzett homológia modell alapján a K4CBP6 a növényi defenzinekre jellemző egy α -hélix és három antiparallel β -redővel rendelkezik, amelyeket hurokrégiók kötnek össze, valamint megtalálható benne a γ -core régió. A szerkezetét a nyolc cisztein között kialakult diszulfid-híd stabilizálja.^[6, 19, 23]

A K4CBP6 fehérjét a *P. chrysogenum*- és a *P. pastoris*-alapú heterológ expressziós rendszerrel is egyaránt sikerült megtermeltetnünk és a fermentléből ultraszűrés után kationcserés oszlopkromatográfiával egy lépésben tisztítanunk. Az RP-HPLC és tömegspektrometriás analízisek alapján a *P. chrysogenum*-mal előállított megfelelően érett K4CBP6 mellett egy, az N-terminálison arginin hiányos változat is megjelent. ECD spektrometriás analízis rámutatott arra, hogy az arginin hiánya nem befolyásolja a megfelelő másodlagos szerkezeti elemek kialakulását és a fehérje megfelelő feltekeredését. A *P. chrysogenum*-alapú rendszerrel megtermeltetett K4CBP6 képes lehet a fitopatogén gombák növekedését gátolni valószínűsíthetően a sejtfal/sejtmembrán roncsolásán keresztül. Habár ez még további megerősítést igényel a vizsgálatokon kívül számos más növény kórokozó gombafaj bevonásával. A *P. pastoris*-alapú expressziós rendszer esetében a megfelelően érett defenzin mellett több, az N-terminálison számos aminosavat tartalmazó változat is keletkezett. Ennek hátterében a szignálszekvencia nem megfelelő proteolitikus hasítása állhat.

Mindezek és a becsült fehérjehozamok alapján elmondható, hogy a *P. chrysogenum* a fehérje jobb érését biztosítja, míg a *P. pastoris* a fehérje nagyobb mennyiségű termelésére lehet alkalmas. Laboratóriumunk jelenleg a *P. pastoris*-alapú expressziós rendszer optimalizálásán dolgozik annak érdekében, hogy csökkentsük a nem megfelelően érett K4CBP6 változatok számát és mennyiségét a termelés során.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Tóth Liliánának és Dr. Galgóczi Lászlónak, hogy végigkísértek a kutatói folyamat rögzös útján, és hasznos tanácsaikkal segítettek a dolgozat elkészítését. Külön köszönettel tartozom Dán Kingának és Bende Gábornak, akiket bármikor segítségemre siettek a laboratóriumi kísérletek során.

Köszönöm az SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszék vezetőjének, Dr. Rákhely Gábornak, hogy lehetőséget biztosított a kísérletek elvégzéséhez; továbbá köszönöm a Tanszék dolgozóinak a kedvességüket és a segítőkészségüket.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Váradi Györgyinek (SZTE, SZAOK, Orvosi Vegytani Intézet) a RP-HPLC vizsgálatok során nyújtott segítségéért. Köszönöm Dr. Kele Zoltánnak (SZTE, SZAOK, Orvosi Vegytani Intézet) a tömegspektrometriai vizsgálatokat. Továbbá köszönöm Dr. Borics Attila (ELKH, SZBK, Biokémiai Intézet) segítségét az ECD spektrometriás méréseknél.

T. L. kutatását a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) támogatta a PD 134284 azonosítószámú pályázat keretében.

7. Irodalomjegyzék

- [1] **Ahmad M**, Hirz M, Pichler H et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014; 98: 5301-17.
- [2] **Almeida MS**, Cabral KM, Kurtenbach E et al. Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. *J Mol Biol.* 2002;315(4):749-57.
- [3] **Avery SV**, Singleton I, Magan N et al. The fungal threat to global food security. *Fungal Biol.* 2019; 123:555-7.
- [4] **Bloch**, Carlos; Richardson et al. A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect α -amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat γ -purothionins. *FEBS Lett.* 1991; 279: 101-4.
- [5] **Cabral KM**, Almeida MS, Valente AP et al. Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (Psd1) in *Pichia pastoris*: overcoming the inefficiency of the STE13 protease. *Protein Expr Purif.* 2003; 31:115-22.
- [6] **Carvalho Ade O**, Gomes VM. Plant defensins--prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides.* 2009; 30:1007-20.
- [7] **Ceroni A**, Passerini A, Vullo A et al. DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Res.* 2006; 1;34(Web Server issue):W177-81.
- [8] **Chen JJ**, Chen GH, Hsu HC et al. Cloning and functional expression of a mungbean defensin VrD1 in *Pichia pastoris*. *J Agric Food Chem.* 2004; 21;52:2256-61.
- [9] **Chen KC**, Lin CY, Kuan CC et al. A novel defensin encoded by a mungbean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid. *J Agric Food Chem.* 2002; 4;50:7258-63.

- [10] **Díez B**, Mellado E, Rodríguez M et al. The NADP-dependent glutamate dehydrogenase gene from *Penicillium chrysogenum* and the construction of expression vectors for filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999; 52:196-207.
- [11] **Eriksson D**. The evolving EU regulatory framework for precision breeding. *Theor Appl Genet*. 2019; 132:569-73.
- [12] **Graessle S**, Haas H, Friedlin E et al. Regulated system for heterologous gene expression in *Penicillium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol*. 1997; 63:753-6.
- [13] **Iqbal**, Aneela, et al. Antimicrobial peptides as effective tools for enhanced disease resistance in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2019, 139.1:1-15.
- [14] **Jung**, Yu-Jin; Kang et al. Application of antimicrobial peptides for disease control in plants. *Plant Breed Biotechnol*. 2014; 2:1-13.
- [15] **Kant P**, Liu WZ, Pauls KP. PDC1, a corn defensin peptide expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* inhibits growth of *Fusarium graminearum*. *Peptides*. 2009; 30:1593-9.
- [16] **Karbalaei M**, Rezaee SA, Farsiani H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *J Cell Physiol*. 2020; 235:5867-81.
- [17] **Keymanesh**, Keykhosrow; Soltani et al. Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009; 25.6: 933-944.
- [18] **Khan RS**, Nakamura I, Mii M. Development of disease-resistant marker-free tomato by R/RS site-specific recombination. *Plant Cell Rep*. 2011; 30:1041-53.
- [19] **Kovaleva V**, Bukhteeva I, Kit OY et al. Plant Defensins from a Structural Perspective. *Int J Mol Sci*. 2020; 26;21:5307.
- [20] **López-García B**, Moreno AB, San Segundo B et al. Production of the biotechnologically relevant AFP from *Aspergillus giganteus* in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*. 2010; 70:206-10.
- [21] **Lovell SC**, Davis IW, Arendall WB 3rd et al. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins*. 2003;15;50:437-50.
- [22] **Montesinos E**. Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiol Lett*. 2007; 270:1-11.
- [23] **Odintsova TI**, Slezina MP, Istomina EA. Defensins of Grasses: A Systematic Review. *Biomolecules*. 2020; 10;10:1029.
- [24] **Parachin NS**, Mulder KC, Viana AA et al. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides*. 2012; 38:446-56.
- [25] **Petersen TN**, Brunak S, von Heijne G et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. 2011; 29;8:785-6.
- [26] **Pettersen EF**, Goddard TD, Huang CC et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004; 25:1605-12.
- [27] **Sathoff AE**, Velivelli S, Shah DM et al. Plant Defensin Peptides have Antifungal and Antibacterial Activity Against Human and Plant Pathogens. *Phytopathology*. 2019; 109:402-408.
- [28] **Sher Khan R**, Iqbal A, Malak R et al. Plant defensins: types, mechanism of action and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants. *3 Biotech*. 2019; 9:192.
- [29] **Sonderegger C**, Galgóczy L, Garrigues S et al. A *Penicillium chrysogenum*-based expression system for the production of small, cysteine-rich antifungal proteins for structural and functional analyses. *Microb Cell Fact*. 2016; 11;15:192.
- [30] **Tagliabue**, Giovanni. "Counterproductive consequences of 'anti-GMO'activism." *Ethics in Science and Environmental Politics* 2018; 18: 61-74.
- [31] **Takayama S**, Shimosato H, Shiba H et al. Direct ligand-receptor complex interaction controls Brassica self-incompatibility. *Nature*. 2001; 4;413:534-8.
- [32] **Tam JP**, Wang S, Wong KH et al. Antimicrobial Peptides from Plants. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2015; 16;8:711-57.
- [33] **Tóth L**, Váradi G, Borics A et al. Activity and Functional Mapping of Recombinant and Synthetic Neosartorya fischeri Antifungal Protein 2 (NFAP2). *Front Microbiol*. 2018; 7;9:393.
- [34] **Xu D**, Zhang Y. Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophys J*. 2011; 16;101:2525-34.
- [35] **Yang J**, Yan R, Roy A et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods*. 2015; 12:7-8.