

**SZENT ISTVÁN EGYETEM**

**A *Thermoplasma acidophilum* kinontestek vizsgálata lipid-  
és fehérjeanalitikai módszerekkel**

**Varga Sándor**

**Gödöllő**

**2016**

**A doktori iskola**

**Megnevezése:** Környezettudományi Doktori Iskola

**Tudományága:** Környezettudomány

**Vezetője:** Csákiné Dr. Michéli Erika  
Tanszékvezető, egyetemi tanár  
Szent István Egyetem  
Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar  
Környezettudományi Intézet  
Talajtani és Agrokémiai Tanszék

**Témavezető:** Dr. Nagy István  
Kutató  
Max Planck Intézet, Biokémiai Részleg  
Struktúrbiológiai Osztály, Planegg, Németország

Dr. Kriszt Balázs  
Tanszékvezető, egyetemi docens  
Szent István Egyetem  
Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar  
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet  
Környezetbiztonsági és Környezettóxicológiai Tanszék

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezetők jóváhagyása

## Tartalomjegyzék

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	5
<b>1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	7
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	10
<b>2.1</b> Az archaeák evolúciós jelentősége.....	10
<b>2.2</b> Az archaea genom.....	13
<b>2.3</b> Archaeák fiziológiája.....	14
<b>2.3.1</b> Acidophil archaeák.....	15
<b>2.3.2</b> Thermofil archaeák.....	15
<b>2.3.3</b> Halofil archaeák.....	17
<b>2.4</b> Krio-elektronmikroszkópos szerkezetmeghatározás.....	17
<b>2.4.1</b> SPA - Single particle analysis .....	18
<b>2.4.2</b> Krio-elektrontomográfia .....	19
<b>2.5</b> A <i>Thermoplasma acidophilum</i> modellorganizmus jellemzése .....	20
<b>2.5.1</b> Élőhely .....	21
<b>2.5.2</b> Morfológia és fiziológia .....	21
<b>2.5.3</b> Genom és biokémia.....	22
<b>2.5.4</b> Modellorganizmus .....	24
<b>2.6</b> Intracelluláris hidrofób cseppek a prokariótákban .....	24
<b>2.7</b> Oldhatóságot növelő fúziós fehérjepartnerek .....	25
<b>3. ANYAG ÉS MÓDSZER</b> .....	27
<b>3.1</b> <i>T. acidophilum</i> DSM 1728 tenyésztése és sejt extraktum előállítás .....	27
<b>3.2</b> A <i>Thermoplasma</i> kinontestek izolálása .....	27
<b>3.3</b> A <i>Thermoplasma</i> kinontestek apoláros komponenseinek azonosítása .....	28
<b>3.3.1</b> Minta előkészítés és TLC analízis.....	28
<b>3.3.2</b> UV spektroszkópia.....	29
<b>3.3.3</b> LC/MS analízis.....	29
<b>3.4</b> Izolált TaKT-ek krio-elektrontomográfiai vizsgálata .....	30
<b>3.5</b> A Ta0547 fehérje expressziójának nyomonkövetése Western blot technikával... 30	
<b>3.5.1</b> A Ta0547-es gén klónozása .....	30
<b>3.5.2</b> Poliklonális antitest termelés és a Ta0547-es fehérje immuno-precipitációja..... 31	
<b>3.5.3</b> A Ta0547 expressziós szintjének követése Western blot analízissel..... 31	
<b>3.6</b> A TaKT asszociált fehérjék LC-MS/MS analízise .....	32
<b>3.6.1</b> Az oldatban lévő fehérjék emésztése.....	32
<b>3.6.2</b> NanoLC-MS/MS .....	33

3.6.3	Peptid azonosítás MASCOT adatbázis alapján .....	33
3.6.4	LC/MS analízis.....	33
3.7	Automatizált Edman degradáció .....	34
3.8	Bioinformatikai módszerek .....	34
3.9	Elektronmikroszkópos analízis .....	35
3.9.1	A tisztított TaKT-ek negatív festése és EM analízise .....	35
3.9.2	Immunogold jelölés .....	35
3.9.3	A 7 napos kultúrából származó sejtek negatív festése és EM analízise .....	36
3.9.4	Krio-elektrontomográfia.....	36
3.10	A fehérjék oldhatóságát növelő SAMP fúziós partneren alapuló rendszer kifejlesztése .....	37
3.10.1	Az alkalmazott sejtvonalak, plazmidok és sejtenyésztési paraméterek .....	37
3.10.2	A fehérjeexpressziós kísérletek körülményei .....	37
3.10.3	Transzformációs módszerek.....	38
3.10.3.1	<i>E.coli</i> transzformáció .....	38
3.10.3.2	<i>Rhodococcus</i> transzformáció .....	38
3.10.4	PCR amplifikációs módszerek.....	39
3.10.5	A klónozáshoz alkalmazott módszerek.....	39
3.10.6	A <i>Thermoplasma</i> SAMP expressziós vektorok előállítása.....	39
3.10.7	JAMM proteáz expressziós vektorok és az expresszált proteázokon alapuló hasítási tesztek.....	40
3.10.8	Ta0895 fúziós protein vektorok előállítása.....	40
3.10.9	Ta1019, Hvo_2619 és Mbur_1415 SAMP fúziós fehérjét hordozó vektorok előállítása valamint az ScRpn11 klónozása különböző fúziós fehérje tageket hordozó pCoofy vektor variánsokba .....	41
3.10.10	Az ScRpn11 fúziós fehérjevariánsok tisztítása, detektálása és oldhatóságuk összehasonlítása.....	42
3.10.11	Sejtextraktum preparáció.....	43
3.10.12	Fehérje tisztítási módszerek .....	43
3.10.12.1	Affinitáskromatográfiás módszerek .....	43
3.10.12.2	Preparatív méretkizárásos kromatográfiás eljárások.....	43
3.10.13	SDS-PAGE analízis .....	44
3.10.14	Az eredeti Ta0895 fehérje VSGG hasítási szekvenciájának módosítása .....	44
4.	EREDMÉNYEK.....	46
4.1	A <i>T. acidophilum</i> sejtek krio-elektrontomográfiája .....	46
4.2	A TaKT-ek fő fehérjekomponensének, a Ta0547-nek az azonosítása .....	46
4.3	A Ta0547-es fehérje bioinformatikai elemzése .....	48
4.4	A TaKT-ekkel asszociált fehérjék azonosítása LC-MS/MS és Edman degradáció módszerekkel.....	50
4.5	A TaKT-ek nem fehérje komponenseinek vizsgálata vékonyréteg kromatográfiával, ultraibolya spektroszkópiával és LC/MS-sel .....	53

4.6	A TaKT-ek karakterizálása krio-ET-vel .....	57
4.7	A Ta0547 szerepe a struktúra kialakításában.....	58
4.8	A Ta0547 expressziós szintjében bekövetkező változások nyomonkövetése .....	60
4.9	A feltételezett <i>T. acidophilum</i> SAMP-ok expressziós tesztje <i>E.coli</i> -ban.....	62
4.10	A kereskedelmi forgalomban kapható szolubilizáló tagekkel és a SAMP-okkal fuzionáltatott ScRpn11 variánsok oldhatóságának összehasonlítása .....	64
4.11	A Ta0895 fehérje tisztítás utáni szolubilizáló hatását igazoló további kísérletek	66
4.12	A metalloproteázok és a SAMP homológokkal fuzionáltatott ScRpn11 fehérjék expressziója és tisztítása.....	68
4.13	<i>Archaea</i> eredetű metalloproteázok szűrése SAMP hasítási aktivitás alapján.....	68
4.14	AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	73
5.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK .....	74
6.	ÖSSZEFOGLALÁS .....	80
7.	SUMMARY .....	83
1.	MELLÉKLET - IRODALOMJEGYZÉK .....	86
2.	MELLÉKLET.....	100
3.	MELLÉKLET.....	101
4.	MELLÉKLET.....	102
5.	MELLÉKLET.....	103
6.	MELLÉKLET.....	105
7.	MELLÉKLET.....	106
8.	MELLÉKLET.....	107
9.	MELLÉKLET.....	108
10.	MELLÉKLET.....	109
11.	MELLÉKLET.....	119
12.	MELLÉKLET.....	120
13.	MELLÉKLET.....	121
14.	MELLÉKLET.....	122

**RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

bp	bázispár
BSA	bovine serum albumin
CCD	charge-coupled device
CMOS	complementary metal–oxide–semiconductor
Da	dalton
DDM	n-dodecil- $\beta$ -D-maltozid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	dithiothreitol
EM	elektronmikroszkóp
ESI-MS	Electrospray Ionisation Mass Spectrometry
FEG	Field emission gun
GST	glutation-s-transzferáz
GuC	gulopiranozil-( $\beta$ 1-1)-caldarchaeol
GuCGp	gulopiranozil-( $\beta$ 1-1)-caldarchaetidilglicerol
hmm	Hidden Markov model
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KMV	kloroform:metanol:víz
LB	Luria-Bertrani
LC	liquid chromatography
LLTP	large lipid transfer protein
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MBP	maltózkötő fehérje
MK	menakinon
MMK	metilmenakinon
MS/MS	tandem tömegspektrometria
MTK	methionaquinone
MWCO	Molecular weight cut-off
NiNTA	nickel-nitrilotriacetic acid
NMR	nuclear magnetic resonance

NusA	N utilisation substance protein A
ORF	open reading frame
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PHA	polyhydroxyalkanoate
PVDF	polyvinylidene fluoride
Rf	retardációs faktor
RMSD	root-mean-square deviation
SAMP	small archaeal modifier protein
SDS	sodium dodecyl sulfate
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
SEC	size-exclusion chromatography
SLIC	sequence- and ligation-independent cloning
SOC	super optimal broth
SPA	single particle analysis
SUMO	small ubiquitin-like modifier
TACK	Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota
TAE	tris-acetate-EDTA
TAG	triacylglycerol
TaKT	Thermoplasma kinontest
TB	Terrific Broth
TEV	tobacco etch virus
TFA	trifluoroacetic acid
TLC	thin-layer chromatography
TPQ	thermoplasmaquinone
Trx	thioredoxin

## 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A mikroorganizmusok hatása a biológia és biotechnológia fejlődésére mindig is meghatározó jelentőséggel bírt. A bennük lezajló biokémiai és genetikai folyamatok nyomonkövetésére és manipulálására kifejlesztett technológiai megoldások mostanra számos esetben megoldást kínálnak a mikroorganizmusokban rejlő, az emberiség számára potenciálisan előnyös lehetőségek megismerésére és kiaknázására. Ezt nagymértékben megkönnyítette a mikroorganizmus törzsek azonosításához és egymáshoz viszonyított evolúciós rokonsági fokának megállapításához kidolgozott riboszómális RNS szekvencia alapú módszer, mely sokkal megbízhatóbbnak bizonyult, mint a korábban alkalmazott morfológiai és kémiai alapú eljárások. A riboszómális RNS szekvenciák összehasonlítása vezetett ahhoz a felismeréshez, hogy a prokarióták egy sajátos tulajdonságokkal rendelkező csoportja egy teljesen eltérő evolúciós fejlődési utat járt be. Indokolt volt tehát egy új, a leszármazási viszonyokat előtérbe helyező, átfogó rendszer kialakítása. Carl Woese 1977-ben a rendelkezésre álló riboszómális RNS szekvenciák és molekuláris biológiai bizonyítékok alapján javasolta az élővilág rendszerének felosztását három (*Archaea*, *Bacteria* és *Eucarya*) doménre. Az *Archaea* domén önállóságát három tulajdonság indokolta: a sejtmag hiánya, a sejtmembránt alkotó izoprenoid glicerol-diéter és diglicerol-tetraéter lipidek túlsúlya, valamint az archaeákra jellemző riboszómális RNS szekvencia és másodlagos szerkezet (Woese, Kandler és Wheelis, 1990).

Az archaea fajok molekuláris fiziológiájáról az eddigi ismeretek alapján elmondható, hogy a genomszerveződés szintjén a prokariótákkal mutatható ki nagymértékű hasonlóság, míg a transzkripcióhoz, illetve a „magasabb-információ” feldolgozó szintekhez köthető enzimszerek az eukariótákhoz állnak közelebb (Spang és *mtsai.*, 2015). Genomméretük az eukariótákéhoz viszonyítva kicsi, valamint jellemző, hogy az ide tartozó fajok gyakran extrém élőhelyeket foglalnak el, egyedi adaptációkkal alkalmazkodva különféle szélsőséges környezeti feltételekhez.

Felfedezésüket követő évtizedekben az archaeák népszerűsége fokozatosan nőtt, mára több modellrendszer alapját képezik. Felépítésük kiméra jellegéből adódóan általuk jól modellezhető számos prokarióta és eukarióta sejtszintű folyamat, a különálló evolúciós fejlődési útvonalluknak köszönhetően pedig az extremofil fajok a legkorábbi evolúciós lépések megértéséhez szolgáltathatnak információt. Szintén jelentős a nagyrészt extrém élőhelyekhez alkalmazkodott archaea fajok hatása a biotechnológiai eljárásokra, az általuk termelt enzimek aktívak maradhatnak szélsőséges környezeti feltételek mellett is, ami az egyes technológiák hatékonyságát jelentős mértékben növelheti.



A 70-es és 80-as években a martinsriedi Max Planck Intézet Molekuláris Biológia Osztályán extrém halofilek és acidofilek DNS függő RNS polimerázával foglalkozó Wolfram Zillig és Karl Stetter az elsők között kapcsolódtak be az archaeák kutatásába. Mostanra az archaeák a képalkotó eljárások technikai fejlődése nyomán kialakuló modern struktúrbiológia kedvelt kísérleti alanyai lettek, az intézet Struktúrbiológiai Osztályán folyó, archaeákkal foglalkozó kutatási programok egyike a hő- és savkedvelő *Thermoplasma acidophilum* belső 3D szerkezetének feltérképezését tűzte ki célul. A *T. acidophilum* több olyan tulajdonsággal is rendelkezik, melyek az elektronmikroszkópos kísérletek ideális modellszerkezetévé teszik. Az egyik ilyen tulajdonság az elektronok számára áthatolható kis sejt méret, mely a fehérjék *in vivo* szerkezetének vizualizációját jelentősen megkönnyíti. A sejtek másik sajátossága az 1/3-ad részben eukarióta fehérje homológokat kódoló genom, ami eukariótákban is előforduló fehérjekomplexek többek között a proteaszóma, szerkezetének egyre pontosabb feltérképezését teszi lehetővé. A 3D leképezéshez alkalmazott krio-elektronmikroszkópos tomográfia alapját a sikeresen végrehajtott genomszekvenálási és proteomikai projektek alkották. A képalkotás eredményeként kapott elektronmikroszkópos tomogramokon átlagosan 50 nm átmérőjű, gömb alakú, intracelluláris testek váltak láthatóvá. Az ezt követő kísérletek kimutatták, hogy a sejtekből izolált gömb alakú sejtalkotók egyedi módon főként menakinonokból és fehérjékből állnak.

A doktori munka elsődleges céljai a következők voltak:

- a testeket alkotó anyagok azonosítása biokémiai módszerekkel,
- a testek felépítésének meghatározása elektronmikroszkópos vizsgálati módszerekkel,
- a testek mennyiségi viszonyait befolyásoló környezeti feltételek (hőmérséklet, pH,...stb.) meghatározása.

A kísérletes munka során az izolált *Thermoplasma* fehérjék az alkalmazott körülmények között kicsapódásra hajlamosnak mutatkoztak, ezért másodlagos feladatként egy olyan fúziós fehérjepartner keresését tűztük ki, amely változatos kémiai körülmények mellett képes oldatban tartani a célfehérjéket, ami a további kísérletek egyik fontos feltétele volt.

A kísérletekhez a *T. acidophilum* proteom analízise során három rendkívül szolubilisnek mutakozó, kisméretű, kifelé semleges töltést mutató fehérjét választottunk ki. Az aminosav szekvencia-adatbázisok alapján ezek ubiquitin szerű fehérjék, melyek az archaeákban általánosan előforduló SAMP (ubiquitin-like small archaeal modifier protein) alcsaládba tartoznak.

Bizonyos kísérletek végrehajtásához, mint például egyes fehérjék kristályosítása, szükséges a szolubilitást fokozó fehérje partnerek eltávolítása, aminek leghatékonyabb módja, ha egy proteáz

képes a partner specifikus eltávolítására/levágására. A Hvo\_2619 kód jelű *Haloferax* SAMP kompatibilis a JAB1/MPN/Mov34 metalloproteázzal és ennek segítségével levágható a fehérje partneréről (Hepowit és mtsai., 2012).

Ezek alapján az alábbi feladatokat tűztük ki célul:

- potenciális szolubilizáló fúziós partnerek, SAMP-ok tesztelése különös tekintettel hidegtűrő fajokból származó fehérjékre, hogy a proteolitikus hasítást alacsony hőmérsékleten tudjuk kivitelezni.
- a SAMP-ok oldhatóságra gyakorolt hatását összehasonlítani a kereskedelmi forgalomban kapható és széles körben használt szolubilizáló fehérjepartnerekkel.
- megvizsgálni a megfelelő hatásfokú SAMP-ok célfehérjéről való enzimátikus eltávolításának lehetőségeit.

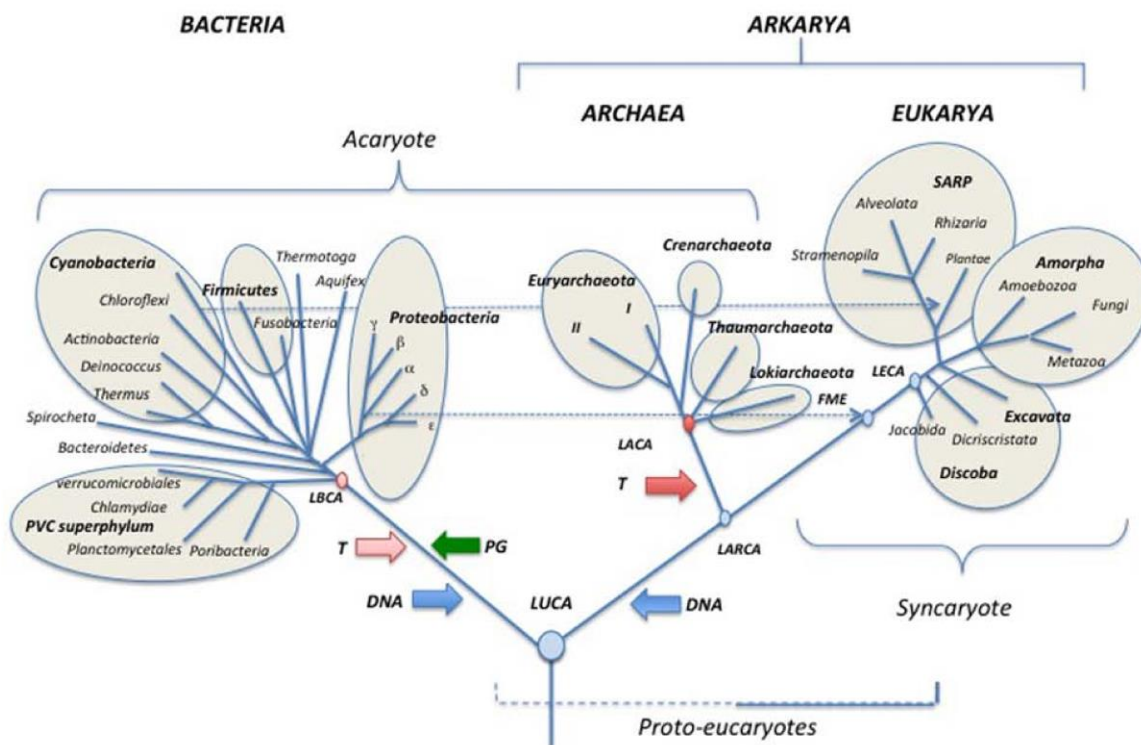
A *Thermoplasma* sejtek citoplazmájában talált kinontesteket eddig más archaeákból nem mutatták ki, szerepük tisztázása fényt deríthet az extremofilekre jellemző eddig ismeretlen adaptációs mechanizmusokra, melyek a szélsőségesen savas és magas hőmérsékletű környezetben való túléléshez szükségesek. A megszerzett ismeretek a későbbiekben akár speciális biotechnológiai problémákra is megoldást jelenthetnek, mint például az extrém körülmények mellett történő fehérje expresszió, vagy a biotechnológiában használt mikroorganizmusok felruházása új képességekkel.

A másodlagos célként kitűzött, biotechnológiai jellegű fejlesztés jelentős szerephez juthat olyan tudományos projektekben, akár alapkutatás akár biotechnológiai gyakorlati szinten, ahol a nehezen tisztítható fehérjék előállítására eddig megoldhatatlan feladat elé állította a kutatókat.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 Az archaeák evolúciós jelentősége

A jelenleg uralkodó nézőpont szerint az élővilágot 3 doménre, a baktériumok, az archaeák és az eukarióták doménjére osztjuk (**1. ÁBRA**). Citológiai sajátosságok alapján a baktériumok és az archaeák egyszerű felépítésűek, míg az eukarióták nagyfokú komplexitással rendelkeznek (Embley és Martin, 2006). Az élővilág Carl Woese szerinti felosztását és a különálló Archaea domén létrehozását követően az archaeákat gyakran az Eukarióták őseinek tekintették (Woese, Kandler és Wheelis, 1990). Ezt a megközelítést több kísérletes eredmény is alátámasztja, a két domén közötti rokon kapcsolat egyik fontos eleme a transzkripció rendszerek nagyfokú hasonlósága (Pühler és *mtsai.*, 1989). Genomszekvenciák alapján ez a hasonlóság még inkább meggyőző (Rivera és *mtsai.*, 1998).



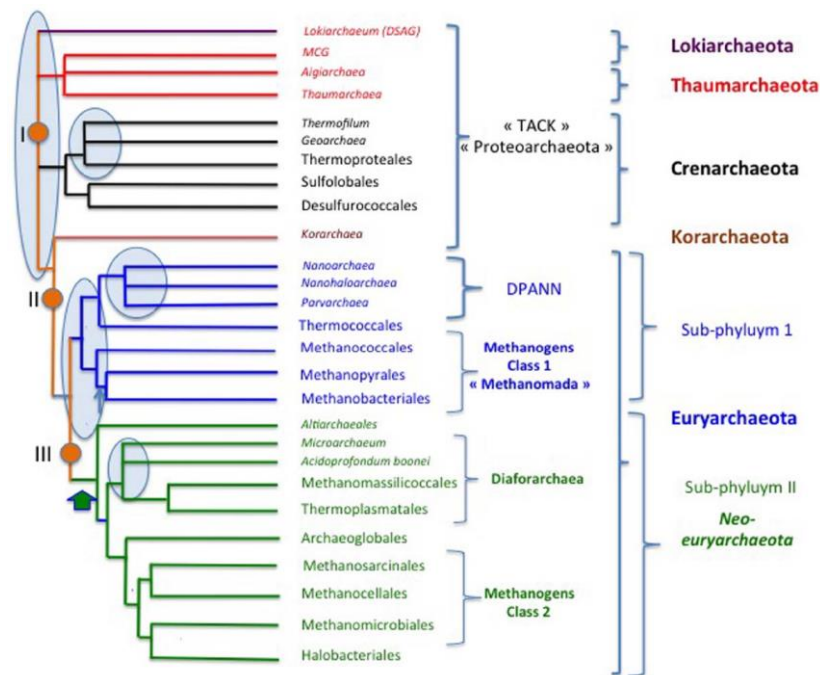
**1.ÁBRA** Az élővilág sematikus, leszármazási viszonyokon alapuló felosztása (Forterre 2015).

A genomszekvenciák összevetéséből arra is fény derült, hogy az eukarióták genomjának kiméra jellege van, egy része bakteriális, a másik archaea eredetű, valamint rendelkeznek kizárólag az eukariótákra jellemző génekkel is. Az eukarióták bakteriális eredetű génjeinek eredete visszavezethető a mitokondriumok alfa-proteobaktérium őséig, azonban az eukarióta

gazdaszervezet leszármazása eddig nem tisztázott (Rochette, Brochier-Armanet és Gouy, 2014). Feltételezések szerint az eukarióták leszármazása a riboszómális RNS hasonlósága alapján egy archaea-eukarióta közös ősig (Woese, Kandler és Wheelis, 1990), vagy egy archaea ősig vezethető vissza. Ez utóbbi forgatókönyv esetében azonban több elvi probléma is felmerül. Az eukarióták sejtmérete átlagosan 1000-szeres a baktériumokhoz és archaeákhoz viszonyítva, a biokémiai folyamataikat kismértékben korlátozza a diffúzió. Rendelkezik a kompartmentalizáció alapját képező fejlett belső membránrendszerrel, aktin illetve tubulin hálózattal, ezeknek a struktúráknak a baktériumokban és archaeákban nincs közvetlen megfelelője. A kompartmentalizációban mutatkozó további különbség, hogy csak az eukariótáknak van mitokondriuma illetve egyes esetekben kloroplasztisza. Szintén eukarióta jellegzetesség a komplex és sokrétű jelátvitel, melynek főbb részei: a fehérje funkciókat foszforiláción és defoszforiláción keresztül módosító kináz-foszfatáz rendszer; a fehérjék degradációját és lokalizációját reverzibilis ubiquitináció révén befolyásoló ubiquitin hálózat; a transzláció szabályozása mikro RNS-ek révén; a transzkripció szabályozása az egyes gének illetve a kromatin átrendeződés szintjén. A felsorolt jellemzők jól mutatják az eukarióták és a másik két domén közötti evolúciós szakadékot, az eddigi filogenetikai rekonstrukciók alapján az eukarióta komplexitás előzmény nélküli, nincsenek átmeneti formák a prokarióták és az eukarióta szerveződési szintjei között. Korábban az eukarióták őseinek a mitokondrium nélkülinek hitt „primitívebb” archaeoákat vélték, azonban később kiderült, hogy mindegyikük rendelkezik valamiféle módosult mitokondriummal (Embley és Martin, 2006; Koonin, 2010).

Az archaeák evolúciós folyamatokban betöltött szerepét jól mutatja, hogy jelenleg a lehetséges forgatókönyvek – egy kivétellel – mindegyik esetben az eukarióták lehetséges őseiként számolnak velük. Az elmúlt években a „három domén” forgatókönyv – az eukarióták és az archaeák az *Archaea* domén diverzifikálódása előtt váltak szét - teret veszíteni látszik a többi alternatívával szemben, az újabb, heterogén adatbázisok elemzésén alapuló algoritmusok a többi verziót valószínűsítik. Az 1,6 milliárd évesnél idősebb, kőzetekbe ágyazott zárvány testekben talált sejtek fosszíliai inkább a „ring of life” forgatókönyv mellett szólnak, vagyis az ismert három domén közös, primitív prokarióta ősökig vezethető vissza. Egy másik lehetőség a korai eukarióta modell – a prokarióták egy komplex eukarióta őstől származnak -, ez azonban bioenergetikai számítások szerint igen valószínűtlen. A molekuláris biológiai szintű összehasonlítások eredményei alátámasztják, hogy az eukarióták két leszármazási vonal összeolvadásából jöhettek létre. A rendelkezésre álló ismeretek alapján a kutatók leginkább az eocita - vagyis az eukarióták a *Crenarchaeota* archaea törzsből (eociták) származnak - és a „ring of life” – az eukarióták az archaeák (eociták) és baktériumok egyesülésével jöhettek létre - forgatókönyvet részesítik előnyben

(McInerney, O'Connell és Pisani, 2014). Az említett modellek egyik szűk keresztmetszetét a vizsgálandó fajok számához mérten kis mennyiségű genomi információ jelenti. Jelenleg hozzávetőleg 12.000 leírt archaea és baktérium fajt ismerünk, továbbá a még fel nem fedezett baktérium phylumok számát 50-100-ra becsülik. Más kalkulációk szerint ez a szám akár 1300-ra is tehető és valószínűsíthető, hogy az archaeák esetében is hasonlóak az arányok (Hedlund, Dodsworth és Staley, 2015). Napjainkban az egy sejt genomika, illetve a metagenomika térnyerésével lehetővé vált olyan új fajok „leírása”, melyek a „biológiai sötét anyagot”, vagyis a nem tenyészthető mikrobatorzsek csoportját alkotják, ezért a jövőben számos olyan mikrobatorzs kerülhet napvilágra, melyek majd megerősítik, vagy akár teljes mértékben cáfolni fogják egyik vagy másik teóriát (Hedlund, Dodsworth és Staley, 2015).



2. **ÁBRA** Az Archaea domén sematikus, konzervált fehérjék hasonlósága alapján kialakított filogenetikai rendszere (Forte 2015).

A legújabb, teljes proteom adathalmazokat összevető filogenetikai számítások egyelőre megerősíteni látszanak azt az elgondolást, miszerint az eukarióták az archaeák testvér leszármazási vonalát képezik, vagy egyenesen a TACK (*Thaumarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Korarchaeota*) Archaea superphylumból származnak (2. **ÁBRA**). A TACK csoport összehasonlító genomikai vizsgálata során több olyan fehérjét azonosítottak, melyek az eukariótákkal való kapcsolatot jelzik (eukarióta szignál fehérje, ESP): archaea aktin, tubulin, sejtosztódási fehérjék (ESCRT-III), transzkripcióhoz és translációhoz köthető információ feldolgozó molekulák. Ezek az eredmények az eddig megismerteknél jóval komplexebb archaeák létezését valószínűsítették.

Az *in silico* adatokkal összhangban, az újonnan felfedezett phylum kandidátus *Lokiarchaeoták*-hoz tartozó, nem tenyésztethető törzsek genomja számos olyan ESP gént tartalmaz, amit az eddig megismert archaea törzsekből elszórtan mutattak ki. Az aminosav szekvencia alapú predikció eddig ismeretlen ESP géneket is kimutatott, többek között membrán átalakításhoz, illetve vezikuláris transzportozhoz köthetőket. Ezeknek a jelenléte magyarázhatja, hogy miként tehettek szert a mai eukarióták ősei a bekebelezéshez szükséges képességekre, melyek hiánya az endoszimbionta elmélet logikai felépítésének jelentős hiányossága volt. További fontos eredmény, hogy a *Lokiarchaeoták*-nak van az eukariótákéra eddig leginkább hasonlító riboszómája. A jövőben várható, hogy az eukariótákhoz evolúciós értelemben még közelebb álló új törzsek fognak felbukkanni, melyek kémiai, metabolikai, sejtbiológiai tulajdonságai még több részletet tárhatnak fel az eukarióták lehetséges őseről (Spang és mtsai., 2015).

## 2.2 Az archaea genom

A baktériumok genommérete 1078 genom alapján 0,32 - 9,73 megabázispár (Mbp), az archaeák genommérete ehhez nagyon hasonló 0,49-5,75 Mbp intervallumban mozog (82 genom alapján). Az eukarióták ehhez képest jelentősen eltérnek, legkisebb genomméretük 8-10 Mbp, a nagyobb méretűek pedig több százszor nagyobbak, mint a legnagyobb bakteriális genomok. Az archaeák genetikai állományának méretét formáló legfontosabb tényezők a gén duplikáció, a laterális géntranszfer és a leszármazási vonalakra specifikus génvesztés. A legkisebb genommal rendelkező archaeák életben maradásukhoz változatlan környezeti feltételeket igényelnek, az egyetlen ismert parazita életmódú archaea, *Nanoarchaeum equitans* esetében ez egy adott gazdaszervezetet jelent. A legkisebb szabadon élő archaeák a Thermoplasmatales rendbe tartoznak, legismertebb képviselőjük a *T. acidophilum* 1,57 Mbp-os genommal rendelkezik, ezzel összehasonlítva a legkisebb szabadon élő baktérium (*Pelagibacter ubique*) genomja 1,3 Mbp-os. A legnagyobb genommal rendelkező archaeák, a baktériumokhoz hasonlóan, igen változatos környezeti feltételek között képesek megélni. Erre jó példa az édesvízben, tengeri üledékben, lebomló levelekben, olajkutakban megtalálható *Methanosarcina acetivorans* (Galagan és mtsai., 2002). Szintén a baktériumokra jellemző módon a genomméret egyenesen arányos a kódolt gének számával, ami feltételezi a szelekciós nyomástól való nagymértékű függést. Az archaeáknak rendszerint egy cirkuláris kromoszómájuk van (kivéve a *Haloarcula marismortui*), ezen felül többnyire cirkuláris extrakromoszómális elemek is a genetikai állomány részét képezik. Ilyen elemek extrém halofilekben, metanogénekben és egyes Crenarchaeota törzsekben sokkal nagyobb gyakoriságban fordulnak elő, mint a domén többi képviselőjében, a replikonok száma fajtól függően 1-től 7-ig változhat. Az eddig ismert archaea genomok GC tartalma a szélsőséges 27,6%

(*Methanospaera stadtmannae*) és 65,7% (*Halobacterium salinarum*) között található. A legszélesebb intervallumban (27,6% - 62,1%) a metanogének GC tartalma változik. A baktériumokra ennél némileg szélesebb spektrum jellemző 20,2% (*Buchnera aphidicola*) – 74,9% (*Anaeromyxobacter dehalogenans*). (<http://www.cbs.dtu.dk/services/GenomeAtlas-3.0/>)

Az archaeák genetikai állománya az eukarióták genomszerkezetéhez képest kompaktabb, a fehérjét kódoló géneket nem szakítják meg intronok, homológia tekintetében számos archaea gén jobban hasonlít az eukarióta homológjára mint a bakteriálisra. Az archaea promoterek AT gazdag régiók, tartalmaznak TATA box-ot. A replikációs origók rendszerint GC gazdagok és míg a bakteriális genomok egy origót tartalmaznak, ezzel szemben az archaeák többel is rendelkezhetnek, azonban számuk az eukariótákéhoz viszonyítva jóval alacsonyabb. A riboszómális gének szinténiája jól illeszthető a baktériumokéra, a szekvencia szintjén viszont az eukariótákkal mutatkozik nagyobb egyezés. A génfunkció szinténia alapú predikciója csak közeli leszármazási vonalak esetében eredményes, távolabbi rokonoknál a genomátrendeződés hatása jelentős, amiért a replikációs origók környékén bekövetkező inverziók és az archaeákban is megtalálható transzpozabilis elemek lehetnek felelősek (IS, MITEs, plazmidok, profágok, intronok, inteinek, SRSR) (She, Zhu és Xiang, 2007; Koonin és Wolf, 2008). Bizonyos integrázok jelenléte baktériumokban és archaeákban egyaránt kimutatható (She, Brügger és Chen, 2002), ami hozzájárulhat a két domén közötti genetikai információ cseréhez. Az említett folyamat eukariótákra nem jellemző, néhány protista esetében fordul csak elő.

Extra aminosavak használata az Archaea doménon belül csak egyes metanogének esetében ismeretes, az UAG stop kodon pirrolizint az UGA pedig szelenociszteint kódol (Rother és Krzycki, 2010). Keret eltolódással kódolt információt eddig egyedül a *Sulfolobus solfataricus fucA1* gén esetében figyeltek meg, ahol a helyes átíródáshoz a -1 pozícióból való kiindulásra van szükség (Cobucci-Ponzano és mtsai., 2005). Az archaeákban általános a pre-tRNS vagy pre-rRNS intronok jelenléte, azonban ez csak a II-es típusú intronokra igaz, az I-es típusú intronon hiányoznak, a nem autosplicer intronokat kizárólag a tRNS-t vágó endonukleázok távolítják el (Tocchini-Valentini, Fruscoloni és Tocchini-Valentini, 2011).

### 2.3 Archaeák fiziológiája

Az Archaea doménbe tartozó mikroorganizmusok ősei a 16S rDNS szekvenciák analízise alapján feltehetően már az első sejtes élőlények között is megtalálhatók voltak. Az élet kialakulásának kezdeti feltételei a jelenlegi környezeti feltételekhez képest több szempontból is extrémnek bizonyultak. A geológiai bizonyítékok, a mikrobiális fossziliák illetve az akkori fajok ma is élő

leszármazottainak fiziológiai tulajdonságai alapján az archaeák ősei feltehetőleg jól alkalmazkodtak az extrém magas hőmérséklethez, az oxigénmentes redukáló környezethez és a szervetlen energiahordozó vegyületek felhasználásához. A mai archaeák számos tekintetben hasonló eszközöket vetnek be a szélsőséges környezeti hatásokkal szembeni védekezés során, mint a baktériumok, azonban rendelkeznek tőlük teljesen eltérő mechanizmusokkal is. Egyes fajok tolerálják a gyakran magas hőmérséklettel párosuló rendkívül savas kémhatást, a hideg és tápanyagokban rendkívül szegény tengervizet vagy akár a széles intervallumban változó ammónium szintet. Sokáig dominánsnak tűnt az extremofil archaea fajok aránya, azonban a sejttenyésztést nem igénylő közösség vizsgálati módszereknek köszönhetően egyre nő az újonnan felfedezett mezofilek száma. Anyagcsere folyamataik szerint jelenlegi ismereteink alapján lehetnek kemolitotrófok illetve kemoorganotrófok, előfordulnak közöttük aerob és anaerob fajok, valamint képesek lehetnek fermentációra is.

### **2.3.1 Acidophil archaeák**

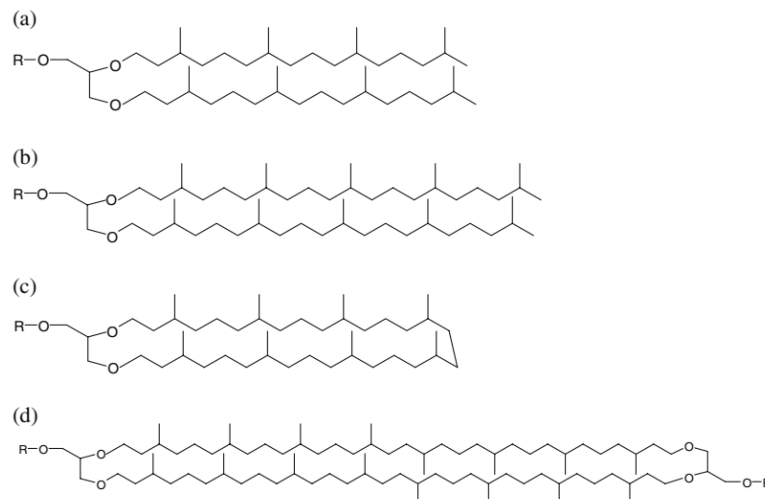
Négyes vagy annál alacsonyabb pH-jú természetes illetve mesterséges élőhelyeken fordulnak elő. Az ilyen élőhelyekre jellemző savas kémhatás komoly kihívások elé állítja az ott élő mikroorganizmusokat. Egyes savtűrő élőlények esetében az intracelluláris tér kémhatása enyhén savas (pH 5-7) és ezzel párhuzamosan pedig kimutatható savtűrő fehérjék jelenléte (Sharma, Kawarabayasi és Satyanarayana, 2012). A belső pH további csökkenése azonban magával vonná a DNS és egyéb makromolekulák destabilizációját, ezért a belső homeosztázis megtartásához elengedhetetlen a megfelelő proton barrierék megléte. Az acidophil archaeák esetében a membrán dibifitanil-glicerín-tetraéter alapú egyszeres membránból áll, amely ionok számára teljesen átjárhatatlan. A láncokban előforduló ciklopentil gyűrűk a membrán szerkezetét kompaktabbá téve növelik annak hőstabilitását és ezáltal a protonok is kisebb eséllyel jutnak át (Gabriel és Lee Gau Chong, 2000). A thermoacidofil archaeák a homeosztázis fenntartása mellett számos alacsony pH optimumú fehérjével is rendelkeznek (amilázok, cellulázok, xilanázok, proteázok, ligázok) (Sharma, Kawarabayasi és Satyanarayana, 2012).

### **2.3.2 Thermofil archaeák**

Az extrém magas hőmérsékleten való élethez az archaeák alapvető sajátágaikból kifolyólag képesek voltak hatékonyan alkalmazkodni. A sejteket működtető fehérjék hőstabilitása több okra vezethető vissza. A chaperonként funkcionáló hősokk fehérjék fokozottabb aktivitása, a



konformáció, a fehérjén belüli H-kötések, hidrofób és elektrosztatikus kölcsönhatások mintázata mind hozzájárulhat a nagyobb stabilitáshoz. A mezofil fehérjékhez képest rövidebbek és kismértékben eltér a hőtűrő fehérjék szekvenciája, egyes semleges aminosavak lecserélődése töltéssel rendelkező aminosavra (főleg a kötőhelyeken) az elektrosztatikus kötések hálózatában jelentős mértékben hozzájárul a stabilitáshoz. Hasonló szerepe van a fehérjéken belüli sóhidak, illetve a hidrofób régiók egymással való kölcsönhatásának (Kumar és Nussinov, 2001). A 80 °C feletti hőmérsékletet kedvelő organizmusokat hipertermofilnek nevezzük. Ilyen hőmérsékleten a DNS instabil, a hipertermofilek mutációs rátája azonban a mezofilekhez képest alacsonyabb. Ennek hátterében részben az extrém thermofilekben gyakori reverz giráz állhat, mely a DNS-t feszített, kompaktabb struktúrába rendezi, illetve a DNS javítómechanizmusok, melyek a környezetből felvett homológ DNS darabok segítségével a kettősszalú töréseket képesek kijavítani (van Wolferen és *mtsai.*, 2013). Míg a mezofil (baktériumok és eukarióták – archaeák is ideértve) sejtmembránja 80 °C felett instabillá és egyre átjárhatóbbá válik, addig az archaeákra specifikusan jellemző di- és tertaéter membránokat alkotó caldarchaeol, archaeol, ciklikus caldarchaeol (**3. ÁBRA**) arány, illetve az egyes szénláncokban található ciklopentán gyűrűk száma jelentős befolyással bír az archaea-membrán átjárhatóságára, bizonyos összetétel esetén 0-100 °C között is megtartja a folyadékkristály állapotát így szinte teljesen átjárhatatlan, hozzájárulva ezzel a belső homeosztázis fenntartásához (Koga, 2012).



**3. ÁBRA** Tipikus archaea poláris lipidek. (a) archaeol (C<sub>20,20</sub>), (b) archaeol (C<sub>25,25</sub>), (c) makrociklikus archaeol, (d) caldarchaeol (Ulrih et al. 2009).

### 2.3.3 Halofil archaeák

Az extrém magas sókoncentrációt igénylő archaeák számos helyen fellelhetőek, tipikusan beszáradó, magas sótartalmú vizekben fordulnak elő, de kimutatták jelenlétüket sólepárlókban illetve magas sótartalmú kőzetekben is (Radax, Gruber és Stan-Lotter, 2001). Az ilyen élőhelyeken élő organizmusok nagy ionerősségnek, magas hőmérsékletnek és erős UV sugárzásnak vannak többnyire kitéve. Az eukarióták és prokarióták ilyen életkörülmények ellen többnyire spóráképzéssel védekeznek, azonban jelenlegi ismereteink szerint az archaeák ilyen képességgel nem rendelkeznek (Onyenwoke és *mtsai.*, 2004). A archaeák intracelluláris  $K^+$  szintje az eddigi vizsgálatok szerint optimális körülmények mellett is magasnak mondható, emellett a fehérjéik nagy számban tartalmaznak savas karakterű aminosavakat (Jarrell és Sprott, 1984). Feltételezhető, hogy a nettó negatív töltéssel rendelkező fehérjék felgombolyodásához alapvetően szükséges a magas  $K^+$  ion szint. A *Halobacterium* és *Haloferax* genusok alkalmaznak egyedül szerves, ozmotikusan aktív anyagokat az ozmotikus nyomás kompenzálására (Roberts, 2004). A halofil pro- és eukarióták az ozmotikus stressz válasz során felhalmozott szerves ionokat általában ozmotikusan aktív szerves anyagokra cserélik. Az archaeák is alkalmaznak hasonló stratégiát, amelyhez a baktériumokra jellemző vegyületek negatív töltésű funkciós csoportokkal módosított változatait használják, melyek fehérje stabilizáló hatással is rendelkezhetnek (Roeßler és Müller, 2001). Egyedi megoldásként a *Haloquadratum walsbyi* kiszáradás ellen egy nagy molekulású, mucinszerű fehérjét (halomucin) választ ki, mely nagy vízmegkötő képességgel rendelkezik, így biztosítva a sejtek számára a hidratált köznyezetet (Dyall-Smith és *mtsai.*, 2011).

## 2.4 Krio-elektronmikroszkópos szerkezetmeghatározás

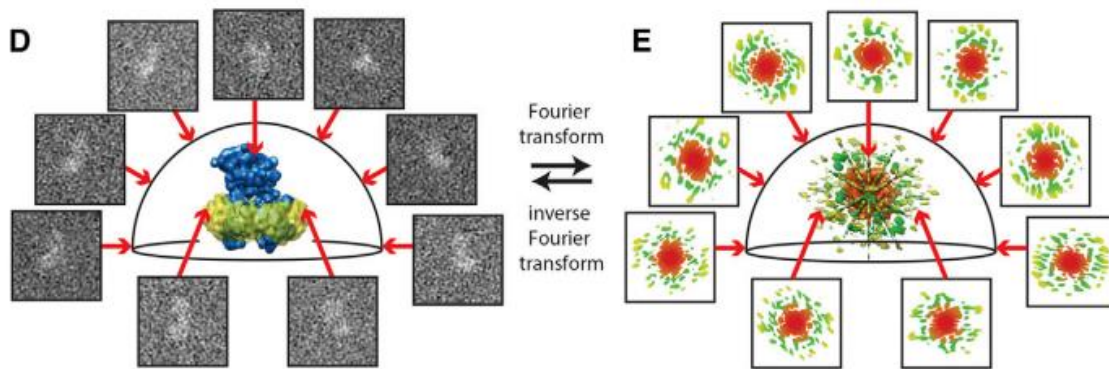
Az elektronmikroszkópokat 1940-es évekbeli kereskedelmi forgalomba jutásukat követően egyre nagyobb mértékben használták biológiai kísérletekben a sejtek belső felépítésének tanulmányozásához (Harris, 2014). A krio-elektronmikroszkóp az 1980-as évekre lett népszerű képalkotási módszer, mely a fehérjék és a beágyazáshoz használt, pillanatszerűen megfagyasztott (vitrifikált) puffer sűrűségbeli eltéréseiből adódó fáziskontraszton alapul. A módszer fontos sajátossága, hogy a krio-fixált mintát nem módosítja sem festékanyag sem fixálószer, így az atomi szerkezet intakt állapotban vizsgálható (Hoenger, 2014).

A képalkotó technológiák fejlődése nyomán kialakult struktúrbiológia célja, hogy a molekuláris biológiai jelenségek háttérében álló fehérjék kölcsönhatásait a 3D atomszerkezetük ismeretében

mechanikai folyamatokkal modellezze. A fehérjék atomjainak térbeli elrendeződésének megismeréséhez eddig röntgenkristallográfiát, illetve mágneses magrezonanciát (NMR) használtak, azonban mindkét módszernek megvan a maga hátránya. A röntgenkristallográfiához megfelelő méretű és minőségű fehérje kristályok, az NMR esetében 40-50 kDa méretűnél kisebb fehérjékből álló nagy tisztaságú minta szükséges. A krio-elektronmikroszkópos technológia fejlődése azonban 2013-ra megnyitotta az utat az említett kritériumoknak nem megfelelő makromolekulák felépítésének megismeréséhez. Az újabb készülékekben az elektronokat egy téremissziós forrás generálja, a fémzárlhevíteses módszerhez képest nagyobb elektron sűrűségű és összetartóbb nyalábot hozva létre. A mintával kölcsönhatásba kerülő elektronok észleléséhez a korábban használt komplementer fémoxid félvezető (CMOS) kamerát egy elektronokat közvetlenül detektáló eszközzel egészítik ki, ami képes az egyes beérkező elektronokat közvetlenül érzékelni, számlálni illetve filmfelvételt készíteni. A közvetlen elektron detektorokkal a korábbi megoldásokhoz képest jelentősen jobb jel/zaj arány érhető el, amivel kiküszöbölhető az (biológiai minták érzékenysége miatt) alacsony elektrondózisból fakadó gyenge jelerősség, valamint a filmfelvevő üzemmódban kiszűrhetők a minta elmozdulásából eredő torzulások (Bai, McMullan és Scheres, 2014). Fontos újítás az elődeinél sokkal tartósabb Volta-fázislemez, mellyel a mintával kölcsönható elektronok fázisának eltolása révén kontrasztosabb kép állítható elő úgy, hogy a minta a fókuszpontban marad (nincs szükség defókuszálásra) (Danev és mtsai., 2014)

#### **2.4.1 SPA - Single particle analysis**

A fehérjék szerkezetének krio-elektronmikroszkópos azonosításához a vizsgálni kívánt fehérje nagy tisztaságú oldatát egy porózus szénréteggel borított gridre cseppentik, a fölösleges puffert felitatják, így a pórusok felett egy vékony folyadékréteg alakul ki. A mintát folyékony nitrogénnel hűtött folyékony etánnal pillanatszerűen megfagyasztják, majd vitrifikálják (amorf szerkezetű jégbe ágyazzák), így védve a kiszáradástól és az elektronok károsító hatásától (Cheng, 2015). A mintában jelenlévő, különböző mértékben elforgatott fehérjéken áthaladó és kölcsönhatásba lépő elektronok számos vetületet hoznak létre. Az így létrejövő 2D vetületek mindegyike a minta 3D Fourier transzformációjának az áthaladó elektronok irányára merőleges középső része. Ebből fakadóan a 2D vetületek irányának ismeretében rekonstruálható a minta 3D Fourier transzformációja, mely inverzének kiszámításával létrehozható a vizsgált objektum eredeti 3D-s képe (Nogales és Scheres, 2015) (4. ÁBRA).

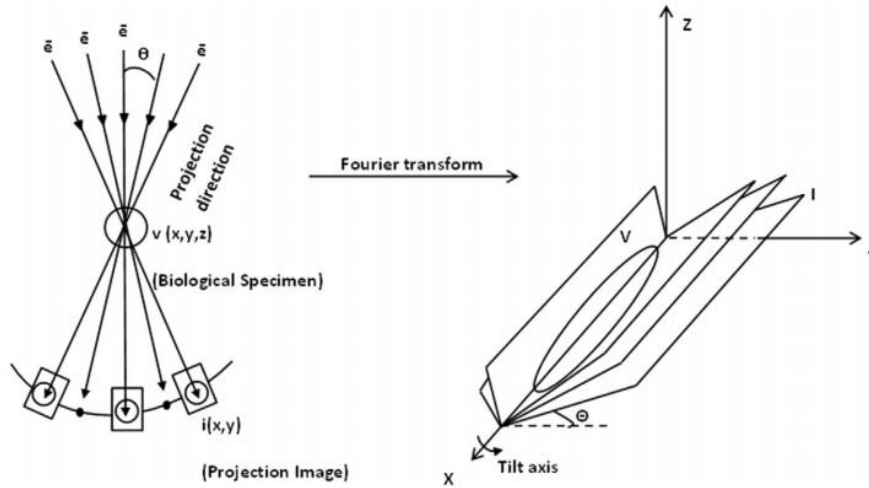


4. **ÁBRA** Számos 2D vetület Fourier transzformációjából létrehozható az eredeti objektum 3D Fourier transzformált képe, amiből inverzióval megkapjuk az eredeti képet (Nogales & Scheres 2015).

### 2.4.2 Krio-elektrontomográfia

A számítástechnika, a tömegspektrometria és a proteomika fejlődése nagymértékben elősegíti a fehérjék bonyolult interakciós hálózatainak feltérképezését. A bioinformatikai elemzések, összhangban a kísérletes eredményekkel rávilágítottak arra, hogy az egyes funkciókért nem egy-egy fehérje felelős, hanem moduláris felépítésű fehérjekomplexek csoportjai (Tong és *mtsai.*, 2004; Walther és Mann, 2010). A proteomikai módszerek csak olyan fehérjék közötti kölcsönhatások esetében informatívak, melyek a tisztítási folyamatok során megőrzik stabilitásukat. Számos esetben azonban a fehérjék közötti kapcsolat csak az intracelluláris tér kémiai viszonyai között tanulmányozható. A problémára az elmúlt években gyors ütemben fejlődő krio-elektronmikroszkópos technológia jelenthet megoldást, mellyel a vitrifikált sejtek natív szerkezetű fehérjei közötti fizikai kapcsolat nagy felbontással leképezhető (Lučić, Rigort és Baumeister, 2013). A krio-elektrontomográfias képalkotáshoz a mintákat először vagy az SPA-nál leírt módon folyékony etánban vagy nagy nyomáson, folyékony nitrogénnel fagyasztják (Studer, Humbel és Chiquet, 2008). A mintát alkotó molekulákkal (egyszeresen) rugalmasan ütköző elektronok hozzák létre a képalkotás során a kontrasztot, míg a rugalmatlanul ütköző elektronok növelik a zaj arányát illetve energiát közölnek a mintával, ezzel károsítva azt. Minél vastagabb a minta, annál nagyobb az esélye annak, hogy egy elektron többször is kölcsönhatásba kerül a mintával vagy rugalmatlanul ütközik, ezért a maximális vastagság maximum pár száz nanométeres lehet (Koning és Koster, 2009). Vastagabb vizsgálandó objektumok esetében régebben gyémántkéssel vagy fagyasztva, töréssel állították elő a megfelelő méretű preparátumot. Mindkét megoldás együtt járt a minta mechanikus torzulásával, ami a képalkotás során műtermékek formájában jelenik meg. Erre jelentett megoldást a fókuszált ionsugár, amellyel nagy pontossággal lehet folyamatos kontroll mellett eltávolítani a sejtek nem vizsgált részeit. Ionforrásként

rendszerint galliumot használnak, a kedvező alacsony olvadáspont, illékonyság és gőznyomás értékek miatt (Rigort és Plitzko, 2015). A megfelelő vastagságú mintát ezután az elektronnyaláb útjába helyezik és egy tengely mentén  $\pm 60$ -70 fokos szögben elmozdítják, majd 360 fokos szögben körbeforgatják, ilyen módon létrehozva a vizsgálati objektum hiányos leképezését (5. ÁBRA).

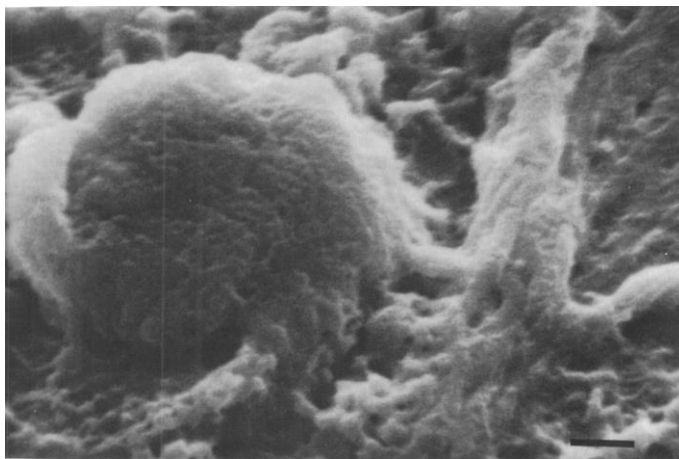


5. ÁBRA Egy tengely mentén elforgatott minta vetületeinek ábrázolása valós (balra) illetve Fourier térben (Carazo et al. 2015)

A hiányzó szögtartomány a rekonstrukció során a kép elektronsugár irányában történő megnyúlását idézi elő, ezt a fajta torzulást szoftveres úton, vagy egy újabb, merőleges tengelyen történő elforgatással lehet korrigálni. Az összegyűjtött vetületek elemzése szoftveres zajszűréssel történik, majd az esetleges defókuszálás hatását kontraszt-transzfer függvényekkel javítják ki. A kutatás szempontjából fontos komplexek azonosítása történhet manuális, illetve automatikus szegmentálással. Utóbbi esetben a detektálás történhet templát illesztéssel, amihez általában röntgenkristallográfiával, illetve SPA-val meghatározott nagy felbontású szerkezettel rendelkező referenciafehérjéket használnak. Ehhez hasonló módon működik a szubtomogram átlagolás, ebben az esetben a mintában lévő azonos komplexek iteratív átlagolásával érhető el egyre jobb felbontású térbeli struktúra (Lučić, Rigort és Baumeister, 2013).

## 2.5 A *Thermoplasma acidophilum* modellorganizmus jellemzése

A *T. acidophilum* (*Euryarchaeota* - *Thermoplasmata* osztály - *Thermoplasmatales* rend – *Thermoplasmataceae* család) (6. ÁBRA) a *Thermoplasma* genusba tartozik a *T. volcanium*-mal együtt. E fajokra jellemző a termoacidofil életmód. A 16S rRNS hasonlóság alapján legközelebbi rokonaik a *Picrophilaceae* családba tartozó *Picrophilus torridus* és *P. oshimae* fajok, melyek az eddig ismert legsavtűrőbb élőlények.



6. ÁBRA A *T. acidophilum* pásztaó elektronmikroszkópos felvétele (Mayberry-Carson et al. 1974).

### 2.5.1 Élőhely

A *T. acidophilum*-ot 1970-ben írták le, a típustörzset elsőként Indianában (USA) a Friar Tuck szénbánya felmelegedő meddőhányójából izolálták, majd izolálták Olaszországban, az Azori-szigeteken, Izlandon, USA-ban, Indonéziában és Jáván is (Darland és *mtsai.*, 1970; Segerer, Langworthy és Stetter, 1988). Később az Ooakudani völgyben (Japán) található szolfatárakban (kénes gázokat kibocsátó fumarolák) számos új törzs jelenlétét mutatták ki (Yasuda és *mtsai.*, 1995). Az eddigi ismeretek alapján olyan természetes élőhelyeken fordul elő, ahol a magas hőmérséklet rendkívül savas kémhatással párosul. A *T. acidophilum* képes 0,8-4 pH intervallumban, illetve 45 és 63 °C közötti hőmérsékleten növekedni (DeLong, 2000). Tengervízből eddig nem sikerült izolálni, azonban a *Thermoplasmatales* rendbe tartozó rokon fajok (16 S rRNS izolátumok/szekvenciák alapján) megtalálhatóak mélytengeri üledékben, sekély tengervizek felszíni rétegeiben, savas bányavizekben, kórödzőkben és savas kémhatású folyókban (Reysenbach és Brileya, 2014).

### 2.5.2 Morfológia és fiziológia

A *T. acidophilum* sejtek szabálytalan alakú kokkuszok, szilárd médiumon növesztve 1 mm átmérőjű, tükrötojásszerű telepeket hoznak létre, a sejtek átmérője 0,2 és 5 µm között változik (Reysenbach és Brileya, 2014). A *T. acidophilum* tiszta tenyészetben történő szaporodásához az optimális hőmérséklet és kémhatás 58 °C illetve 2-es pH (Segerer, Langworthy és Stetter, 1988). A kedvezőtlen környezeti viszonyok ellenére sejtfallal vagy S-layerrel nem rendelkeznek. Laboratóriumi körülmények között a sejtmembrán pH 3-4 intervallumban a legstabilabb, pH 2 alatt és pH 6 fölötti értékeken a sejtek egy része szétesik, 8-as pH feletti értékeken a lízis teljes. A

magasabb pH értékeken tapasztalt lítikus hatást a megnövelt ionerősség részben képes kompenzálni (Smith és *mtsai.*, 1973). A 3 rétegű sejtmembrán átlagos átmérője 7 nm, főként izoprenoid 40 szétantomból álló bifitanil-diglicerol-tetraéter láncokból áll, melyeket láncon belüli ciklopentán gyűrűk stabilizálhatnak (Gambacorta és *mtsai.*, 1993). Mikroszkópos felvételek igazolták, hogy a *T. acidophilum* képes "bukfencező", illetve rotáló helyváltoztatásra, ez a képessége a megfigyelések alapján 40 és 45 °C között nem változott, 35 °C alatt azonban az úszó sejtek száma lecsökkent. Az úszáshoz egyetlen ostort használnak, mely változatos alakú (szinusz hullám, egyenes vagy szabálytalan), átmérője átlagosan 9 µm, egyes esetekben több, egy pontból eredő ostor is megfigyelhető volt (Black és *mtsai.*, 1979). A *T. acidophilum* heterotróf, fakultatív aerob szervezet, anaerob környezetben tenyésztve elemi kén jelenlétében H<sub>2</sub>S keletkezik, ami kén respirációra utal. Hozzáadott kén hiányában is tapasztalható növekedés (feltételezhetően egy ismeretlen elektron akceptornak köszönhetően), azonban üteme 10 x lassabb, ebben az esetben CO<sub>2</sub> jelenléte teljes mértékben gátolja a növekedést. Aerob környezetben a tenyészet kizárólag élesztőkivonat hozzáadásával tartható fent, a növekedéshez szükséges aktív komponens feltételezhetően egy 1000 Da méretű polipeptid (Smith, Langworthy és Smith, 1975).

### 2.5.3 Genom és biokémia

A *T. acidophilum* DSM 1728 az egyik legkisebb genommal rendelkező, szabadon élő szervezet, melynek 1564905 bp hosszú kromoszómájának teljes szekvenciáját 2000-ben publikálták. A genomban 1509 nyitott leolvasási keretet (ORF - Open Reading Frame) azonosítottak, melyek harmadának mindegyik rendszertani doménben volt homológja. Az ORF-ek 55%-ának volt ismert funkciójú homológja. Az ORF-ek 29%-a más organizmusok hipotetikus génjeire hasonlított, 16%-a pedig teljesen egyedinek bizonyult. Az ORF-ek harmada konzervált szerkezetű, szinténias csoportokba rendeződik, feltételezhetően egyszeri genetikai események során integrálódtak a genomba, a legnagyobb ilyen klaszterek riboszómális fehérjéket, NADH dehidrogenáz alegységeket, precorrin bioszintézis fehérjéket és flagelláris fehérjéket kódolnak. A genomban a riboszómális RNS-t kódoló gének, archaeák esetében egyedülálló módon, elszórtan és csatolatlanul helyezkednek el, más fajokban legalább 2 riboszómális RNS gén szomszédos egymással. Más archaeák genomjával összevetve szembetűnő, hogy az ORF-ek 17%-a nagy hasonlóságot mutat a rendszertanilag távol eső *Sulfolobus solfataricus* különböző transzport, metabolikus, proteolitikus, illetve ismeretlen funkciójú fehérjéivel. A felsorolt fehérjéket kódoló gének valószínűleg a környezeti feltételekhez való alkalmazkodást segítik elő és a mikroorganizmusokra jellemző módon, laterális géntranszfer útján kerültek át a *S. solfataricus*-ból a *T. acidophilum*-ba (Ruepp és *mtsai.*, 2000).

Az 1995-ben Japánban izolált 12 *T. acidophilum* törzs közül hatban találtak plazmido(ka)t (Yasuda, Yamagishi és Oshima, 1995). A HO-1012-es törzsből izolált pTA1 plazmid 15,723 bázispár méretű, G + C tartalma 46,7 %, ami majdnem megegyezik a kromoszóma 46%-os G + C arányával. A pTA1 plazmid szekvenciája az ORF1 és ORF2 régiók kivételével nem mutatott egyezést a *T. acidophilum* és *T. volcanium* genomok, illetve más archaeák plazmid szekvenciáival. Az ORF1 által kódolt 41.5 kDa-os protein ATPáz és szárnyas hélix motívumokat kódol és egy szakasza hasonlít a (sejtosztódást kontrolláló) Cdc6 fehérjére. Az ORF1 körüli intergénikus régiók direkt és fordított ismétlődései a pTA1 plazmid replikációs origójaként funkcionálhatnak (Yamashiro és *mtsai.*, 2006).

A *T. acidophilum* genom és proteom analízise alapján az aerob és anaerob körülmények között expresszáldó gének 99%-a megegyezik, 9 fehérje csak aerob, 2 fehérje pedig csak anaerob környezetben fejeződik ki. Az aerob környezetben kifejeződő gének változatos funkciókat ellátó ismert homológokra hasonlítanak, ilyenek például: az RNS molekulák másodlagos szerkezetét "kitekerő" DEAD box fehérjék, vagy a hem bioszintézisben szerepet játszó radical SAM fehérjék, vagy éppen az archaea eredetű thermopsin proteáz. A piruvát-szintáz komplex egyik alegysége kizárólag anaerob körülmények között termelődik. Az anyagcsere utak központi részét a Krebs-ciklus és a glükózbontásért felelős, nem foszforiláló Entner-Doudoroff útvonal képezi (Searcy és Whatley, 1984; Ruepp és *mtsai.*, 2000). Oxigén jelenlétében extracelluláris polipeptidek membránon keresztüli transzportjárt felelős fehérjék, membránhoz kötött proteázok és számos prediktált protein-, oligopeptid- és aminosav-transzporter fehérje expressziója jelentős mértékben emelkedik. Mivel a glükóz lebontásáért felelős enzimek expressziója oxigén hiányában fokozódik, ezért feltételezhető, hogy az oxigén jelenlététől függően a *T. acidophilum* sejtek anyagcsere szubsztrát preferenciája változó. Vélhetőleg a glükózból származó energiával kompenzálják az anaerob környezetre jellemző alacsonyabb energia mennyiséget (Sun és *mtsai.*, 2010). Az aerob és anaerob anyagcseréjű sejtek proteom analízise kimutatta, hogy aerob állapotban a feltételezett aerob elektrontranszportlánc fehérjék közül a citokróm bd komplex mennyisége megnövekszik. Anaerob állapotban az aerob protontranszport rendszer néhány eleme aktív marad, a NADH komplex  $\alpha$  és  $\beta$  alegységének termelődése stimulálódik, azonban az oxigén redukció utolsó lépése nem megy végbe. Oxigénmentes állapotban az elemi ként hidrogén-szulfiddá alakító kén-reduktáz enzim szintje érdekes módon nem változott, ellenben egy citoszólikus szulfid-kinon-reduktáz homológ és a *Pyrococcus furiosus* hipertermofil archaeában leírt, eddig ismeretlen kénreduktáló enzimrendszerhez tartozó, NADPH kén oxidoreduktáz homológjának expressziója többszörösére emelkedett. A NADH dehidrogenáz  $\alpha$  és  $\beta$  alegység enzimszintek növekedése és a *Pyrococcus*



*furiosus* enzimrendszerével való hasonlóság alapján lehetséges, hogy a NADH dehidrogenáz részt vesz az elemi kén redukciójában (Ruepp és *mtsai.*, 2000; Sun és *mtsai.*, 2010).

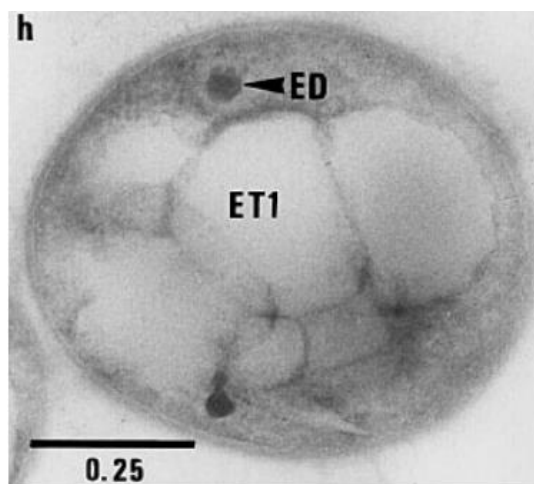
#### 2.5.4 Modellorganizmus

A *T. acidophilum* proteomjának ismeretében bioinformatikai eszközökkel számos bakteriális és eukarióta fehérje homológját sikerült azonosítani. A proteom analízisből származó adatok ismeretében az NMR, röntgenkristallográfia és SPA módszerekkel meghatározott struktúrájú fehérjék a *T. acidophilum* krio-elektronmikroszkópos tomográfiához templátként szolgáltak (Sun és *mtsai.*, 2007). Az így előállított 3D-s fehérjetérképek részletes információval szolgálhatnak az egyes makromolekuláris komplexek működéséről és más intracelluláris fehérjékkel való interakciójáról, mint azt például a tricorin proteáz és a proteaszóma esetében feltételezik, valamint a fehérjeszerkezetek nagy részletességű modelljei lehetővé teszik különböző célzottan ható gyógyszer hatóanyagok tervezését (Brandstetter és *mtsai.*, 2002; Campbell és *mtsai.*, 2015). A *T. acidophilum* eddig elkészített elektronmikroszkópos tomogramjainak analízise során megfigyelhetőek voltak ismeretlen funkciójú, 50 nm-es átmérőjű testek, melyekre semmilyen ismert szerkezet nem volt illeszthető.

#### 2.6 Intracelluláris hidrofób cseppek a prokariótákban

Az eukarióta és prokarióta sejtekben gyakran előfordulnak foszfolipid membránnal határolt, intracelluláris, hidrofób anyagokat tartalmazó cseppek. A lipidcseppeket sokáig passzív, citoszólikus sejtalkotóknak vélték, azonban manapság összetett és dinamikus változó sejtstruktúrák tartják őket számon (Pol, Gross és Parton, 2014). A polihidroxi-alkanoát (PHA) és triacilglicerol (TAG) például prokariótákban tölt be energia és szénraktározó szerepet (Anderson és Dawes, 1990; Steinbüchel, 1991). A TAG testek előfordulása prokariótákban a nocardioform aktinomicétákra korlátozódik, de a Gram-negatív *Acinetobacter* nemzetségben is megtalálták (Fixter és McCormack, 1976; Murphy, 2001; Wältermann és *mtsai.*, 2005). A prokarióta lipidcseppek általában 0,15-0,3 µm átmérőjűek (Steinbüchel és *mtsai.*, 1995), jelentősen kisebbek mint az eukariótákban előfordulók (0,1-2 µm átmérő) (Murphy, 2012; Thiam, Farese és Walther, 2013). A lipidcseppek membránjai gyakran tartalmaznak szerkezeti vagy enzimikus funkcióval rendelkező fehérjéket. A lipidcseppekhez kötődő fehérjék nagyfokú változatosságot mutatnak faj szintek között, azonban fajon belüli, illetve akár sejten belüli variabilitás is megfigyelhető (Beller és *mtsai.*, 2010). Sokáig nem azonosítottak fehérjéket bakteriális TAG tartalmú lipidcseppekben (Hänisch és *mtsai.*, 2006), azonban a *Rhodococcus*

*opacus* sejtekben nem rég egy heparinkötő hemagglutinin homológot (TadA) találtak, mely hozzájárul a cseppek kialakulásához (MacEachran, Prophete és Sinskey, 2010). A fehérjékből és lipidekből álló struktúrák egyik alcsoportját alkotják a fehérjékből, koleszterolból, foszfolipidból és TAG-ból álló lipoprotein részecskék (7. ÁBRA). Ezek 5-1000 nm-es átmérőjű, gömb alakú testekké állnak össze, melyeket a fő komponenseik és sűrűségük alapján lehet tovább csoportosítani. Az összetételük és méretük teszi lehetővé vízoldhatatlan és más lipofil összetevők szállítását a gerincesek és gerinctelenek keringési rendszerében lévő víz alapú plazmában. A testeket alkotó fehérjekomponensek (apolipoproteinek) amfipatikus természetűek, részben stabilizáló funkciót töltenek be, részben a testek metabolizmusában játszanak szerepet (Van Der Horst és Rodenburg, 2010).



7. ÁBRA *Rhodococcus opacus* sejt elektronmikroszkópos képe. Az ED és ET1 két különböző típusú TAG inklúziós testet jelöl (Alvarez et al. 1996).

## 2.7 Oldhatóságot növelő fúziós fehérjepartnerek

A rekombináns géntechnológia fejlődése mára a heterológ génexpressziós rendszerek széles palettájának kialakulását tette lehetővé, melyek célja nagy mennyiségű, nagy tisztaságú és megfelelően felgombolyodott fehérjék megtermelése röntgenkristallográfiás, enzim és egyéb vizsgálatokhoz (Bell és *mtsai.*, 2013). Azonban nagy mennyiségű és tisztaságú fehérje megtermelése többnyire nem egyszerű feladat, a megtermelt fehérjék nagy eséllyel aggregálódnak, kicsapódnak vagy nem a természetes szerkezetüket veszik fel (Unzueta és *mtsai.*, 2015). Emiatt egy fehérjeexpressziós projekt megkezdésekor számos tényezőt figyelembe kell venni. Ilyen fontos meghatározó elemek például az expressziós gazdaszervezet és vektor, az affinitáshoz használt „tag” fehérje, a kodonpreferencia és kodon optimalizáció, indukáló ágens koncentrációja, az expresszió hőmérséklete, a szolubilizáló fúziós partner, proteáz hasító hely a fúziós partnerek

eltávolításához, a fehérje tisztítása során alkalmazandó optimális összetételű puffer (Chen, 2012). A legtöbb esetben az *Escherichia coli* a leginkább kedvelt expressziós gazda, más prokarióta illetve eukarióta expressziós rendszerekkel szemben, köszönhetően a rövid generációs időnek, a kidolgozott és megbízható genetikai eszközöknek és az alacsony fenntartási költségeknek (Bell és mtsai., 2013). A célfehérje expressziós szintjének növelésének és a precipitáció megelőzésének egyik lehetséges módja szolubilizáló fúziós fehérjék hozzákapsolása a célfehérje amino- vagy karboxil-láncvéghez (Chen, 2012; Rosano és Ceccarelli, 2014). A szolubilizáló fúziós partnerek stabilizálhatják a fehérjék struktúráját változatos kémiai környezetben és megnövelhetik az expresszió szintjét is (Sørensen és Mortensen, 2005). Azonban az ilyen fúziós partnerek hatással lehetnek a rekombináns fehérje felgombolyodására. Mivel a negyedleges szerkezetre gyakorolt hatásuk nem előrejelezhető, ezért azt minden esetben egyedileg meg kell vizsgálni (Arnau és mtsai., 2006; Costa és mtsai., 2013; Yuan és mtsai., 2014).

Ezidáig még nem áll rendelkezésre olyan affinitás és szolubilizáló fúziós partner kombináció, mely minden fehérje esetében képes megoldani az oldhatósággal kapcsolatos problémákat. Ezért a már meglévő szolubilizáló fúziós partnerek tesztelése minden esetben szükséges, továbbá az optimális tisztítási feltételek elérésének esélyét növeli a potenciálisan alkalmas új szolubilizáló „tag” fehérjék keresése is. Egy ideális szolubilizáló partner kisméretű, stabil, nagy mennyiségben termelhető oldott formában anélkül, hogy kölcsönhatásba lépne az expressziós gazdatest fehérjéivel, valamint szükség esetén eltávolítható a célfehérjéről. Az N- és C-terminális „tag”-ek eltávolításához endopeptidázokat (enteropeptidáz, thrombin, dohánymozaik vírus (TEV) rhinovírus C3 proteáz) illetve exopeptidázokat (karboxipeptidázok és aminopeptidázok) használnak (Waugh, 2011). A felsorolt proteázok működéséhez elengedhetetlen proteáz hasítóhelyek alkalmazása helyett sokkal előnyösebb, ha fúziós partner specifikus hasítóhellyel rendelkezik, aminek segítségével a későbbiek során eltávolítható. A felsorolt szempontok szerint ígéretes fehérjék a nemrég felfedezett ubiquitinszerű fehérjék egy csoportja, az ubiquitinszerű kis archaeális módosító fehérjék (SAMP), melyek az összes Archaeában gyakoriak és emellett részt vesznek a kén metabolizmusban és fehérje lebontásban (Humbard és mtsai., 2010; Maupin-Furlow, 2013). Azt is kimutatták, hogy a *H. volcanii* (Hvo) JAMM proteáz homológ Hvo\_2505 képes specifikusan hasítani a lineárisan kötődő SAMP Hvo\_2619 fehérjét a célfehérjeként használt MoaE-ről (molibdopterin szintáz nagy alegysége). A Hvo JAMM1 proteáz maximum aktivitása 40-50 °C közé esik és a lineárisan kapcsolt Hvo SAMP-ot a VSGG szekvenciánál hasítja le a MoaE fehérjéről (Hepowit és mtsai., 2012). A kísérleteink során erre az újonnan felfedezett csoport *T. acidophilum*-ban, Ta0895, Ta1019 és Ta1442, a hidegtűrő *Methanococcus burtonii*-

ban, Mbur\_1415 illetve a *Haloferax volcanii*ban, Hvo\_2619 megtalálható homológjaira fókuszáltunk (ez utóbbi töltötte be a kontroll szerepét is).

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

#### A *Thermoplasma* kinontestek tanulmányozásához felhasznált anyagok és módszerek

##### 3.1 *T. acidophilum* DSM 1728 tenyésztése és sejt extraktum előállítás

A *T. acidophilum* kultúrák tenyésztése standard módszerekkel történt (Robb és Place, 1995) kisebb változtatásokkal (Sun és mtsai., 2007). A 2 illetve 6 napos inkubációs időt követően az 500 ml-es térfogatú sejt kultúrákból a sejteket külön-külön 4 °C-on, 4000 x g-vel, 10 perc időtartamú centrifugálással gyűjtöttük össze. A sejteket ezt követően először MilliQ vízzel alaposan átmostuk majd 5 ml proteáz inhibitor (Complete protease inhibitor cocktail, Santa Cruz Biotechnology), 5 mM MgCl<sub>2</sub>-t, 1 mM ATP-t és 1 mM dithiotreitol tartalmazó (DTT, Merck) MilliQ vízben reszuszpendáltuk. A sejtuszpenzió pH-ját 1 M-os nem pufferelt Tris-szel állítottuk be pH 8-as értékre, aminek következtében a sejtek azonnal lizáltak. A felszabaduló DNS-t 0,5 mg DNA-áz I-gyel (Roche) emésztettük majd a sejtörmelék eltávolításához a lizátumot 34.800 x g-vel 30 percig, 4 °C-on egy Beckmann ultracentrifugában centrifugáltuk. Az anaerob körülmények között tartott *T. acidophilum* sejteket standard laboratóriumi protokollok alkalmazásával tenyésztettük (Robb és Place, 1995).

##### 3.2 A *Thermoplasma* kinontestek izolálása

A kinonokban gazdag testek (kinontest, KT) tisztításához oszlopkromatográfiai módszereket használtuk. A 200 mg összfehérjének megfelelő sejt extraktumot 0,5 ml/min átfolyási sebességgel egy 20 ml-es térfogatú házi készítésű, előzetesen kálium-foszfát pufferrel ekvibrált (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM; pH 7,0) hidroxipatit oszlopra (Macro-Prep Ceramic Hydroxiapatite Type I 80 µm, Bio-Rad) töltöttünk, melyet ezután két lépésben 150 mM-os és 300 mM-os kálium-foszfát pufferrel (pH 7) mostunk a stabil alapvonal eléréséig. Az oszlopon maradó proteineket egy lépésben 500 mM-os kálium-foszfát pufferrel (pH 7,0) eluáltuk, és 30 kDa MWCO (Millipore) koncentrátor oszlopon a végső ~ 500 µl-es végső térfogat eléréséig koncentráltuk. Ebből a

mintából 2 mg fehérjét tartalmazó térfogatot egy Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare) oszlopra töltöttünk 0,4 ml/min sebességgel, amit előzőleg pufferrel equilibráltunk (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5). Az eluált fehérjéket 0,5 ml-es frakciókba gyűjtöttük és a mintákból 20 µl mennyiségeket 15 %-os SDS géltre töltöttünk fel. Coomassie késsel megfestett, kutatás szempontjából jelentőséggel bíró fehérjesávokat kivágtuk és MALDI-TOF-MS-sel analizáltuk (Tebbe és *mtsai.*, 2005). Ezzel párhuzamosan ugyanezeket a frakciókat a globuláris testek jelenlétének igazolásához elektronmikroszkóppal is megvizsgáltuk.

### 3.3 A *Thermoplasma* kinontestek apoláros komponenseinek azonosítása

#### 3.3.1 Minta előkészítés és TLC analízis

Az apoláros komponensek azonosításához a tisztított kinontesteket TLC, UV spektrum és LC/MS analízisnek vetettük alá. A liofilizált *T. acidophilum* sejtek és a *Thermoplasma* kinontestek (TaKT) lipidtartalmát kloroform, metanol és víz 62:25:4 v/v/v arányú elegyével extraháltuk a TLC elválasztáshoz. Az extraktumokat egy ALUGRAM SIL G/UV szilica gélre (Macherey-Nagel) töltöttük és ugyanazzal az oldószer eleggyel futtattuk. Az elválasztott lipideket először UV fényvel tettük láthatóvá, majd az UV-t nem abszorbeáló lipidek előhívásához a lemezt 5% formaldehid és 30 % kénsav vizes oldatából előállított aeroszollal kezeltük és 150 °C-on 15 percig melegítettük (Shimada és *mtsai.*, 2002). A TLC lemezt az előhívás után beszkeneltük és 3 egymástól független kísérlet alapján a jelintenzitásokat egy AIDA 2D denzitometriás szoftverrel (Raytest Isotopenmassgerate GmbH) analizáltuk és kiszámoltuk a szórást.

A gulopiranozil-(β1-1)-caldarchaeol (GuC) és az izolált TaKT-ek 2D TLC vizsgálata a DSMZ poláris lipid alapú prokarióta osztályozási módszerének standard protokollján alapult (Tindall és *mtsai.*, 2007). A mintákat a TLC lemez bal alsó sarkába töltöttük fel és kloroform:metanol:víz (65:25:4, v/v/v) oldószer eleggyel szeparáltuk az összetevőket 1D-ben, majd a lemezt megszáritottuk. A megszáradt lemezeket 90°-kal elforgattuk óramutató járásával ellentétesen és a második szeparációt kloroform:ecetsav:víz (80:12:15:4, v/v/v/v) elegyével végeztük el. Ezt követően 5% formaldehid, 30% kénsav vizes oldatával fűjtük be és 150 °C –on melegítettük 15 percig.

A GuC a gulopiranozil-(β1-1)-caldarchaeidilglicerolból (GuCGp) állítható elő (Shimada és *mtsai.*, 2008). Elsőként a sejtekből szerves oldószerrel kivont anyagokat hívtuk elő egy 1D TLC kísérletben a korábban leírtaknak megfelelően és az R<sub>f</sub> érték alapján a GuCGp-t tartalmazó szilika mátrixot lekapartuk és összegyűjtöttük. A GuCGp-t kloroform:metanol (2:1, v/v) oldószer eleggyel

extraháltuk, az extraktumot ezt követően centrifugáltuk és a felülúszót egy üveg minta tartóba helyeztük át, majd az oldószert folyamatosan áramló nitrogén gázzal elpárologtattuk, amíg ~ 1 ml térfogat nem maradt. A koncentrált mintát egy 1 ml-es üvegcsébe helyeztük át és az oldószert teljesen elpárologtattuk. A száraz GuCGp-re 200 µl gyenge HCl oldatot (pH 1,8) rétegeztünk, lezártuk és 3 napig 60 °C-on inkubáltuk, majd oldószerral extraháltuk a korábban leírtak szerint (Shimada és *mtsai.*, 2008). Ezzel a módszerrel a GuCGp-t GuC-re és glicerolfoszfátra bontottuk. A 2D TLC elválasztás után a kontroll és minta GuC Rf értékeit meghatároztuk és összehasonlítottuk.

### 3.3.2 UV spektroszkópia

Az UV spektroszkópiához előkészületként a fehérjéket acetonnal (500 µl) kicsapattuk egy üvegcsében 1:4 vízben oldott minta:aceton (v/v) arányban és az összekeverés után az oldatot – 20 °C-on egy éjszakán keresztül inkubáltuk. A kicsapódott fehérjék eltávolításához a mintát egy Beckmann centrifugában 2.000 x g-n, 4 °C-on 20 percig centrifugáltuk. A felülúszót egy ismert tömegű üveg mintatartóba helyeztük át és azonos térfogatú etil-acetátot adtunk hozzá. Az oldószert folyamatosan áramló nitrogéngázzal párologtattuk, amíg a víz és az oldószer fázis el nem vált egymástól (többnyire 100 µl térfogatú oldószer maradt meg). Az alsó vizes fázist eltávolítottuk és az oldószer frakciót tovább párologtattuk a minta kiszáradásáig. A mintatartó tömegét ismét megmértük (az extrahált anyag tömegének kiszámításához) majd hozzáadtunk 50 µl kloroformot, hogy újra feloldjuk az extrahált összetevőket. A tiszta, enyhén sárgás oldószer fázisból 5 µl-t 1 ml hexánhoz kevertünk egy kvarc küvettában. Az extraktum spektrumát egy Lambda 40 (Perkin Elmer) fotométerrel mértük meg a 210 nm – 400 nm tartományban (Langworthy, Smith és Mayberry, 1972). A precipitálódott protein pelletet megszáritottuk és újra felvettük 8M-os ureában koncentrációmérés céljából.

### 3.3.3 LC/MS analízis

Egyenlő térfogatú metanolt adtunk 20 µl újra feloldott TaKT szerves oldószeres extraktumhoz és 5 µl mintát egy 2,1x100 mm-es Waters X Terra-MS C8-as oszlopra töltöttünk. Az oszlop által megkötött anyagokat az eluens A (0,05% TFA H<sub>2</sub>O-ban) és eluens B (0,05% TFA acetonitrilben) gradiensével eluáltuk, 50%-os kezdeti eluens B aránnyal, melyet 15 perc alatt 95% eluens B-re növeltünk. Az eluálás ezt követően 7 percig 95%-os eluens B-vel történt 250 µl/perc sebességgel és az abszorbanciát 210 nm és 248 nm hullámhosszokon mértük. Az eluált komponensek m/z

arányát ESI-MS-sel (microTOF LC Bruker Daltonics) mértük meg a 100-1600 amu (atomic mass unit) tömeg intervallumban. Referenciaként a Sigma-tól származó vitamin K<sub>2</sub>-t (MK-4) és a kereskedelmi forgalomban kapható étrendkiegészítő Vitamin K<sub>2</sub>-ből (Solgar Vitamin and Herb) tisztított vitamin K<sub>2</sub>-7-t használtuk. Ezeket az összetevőket feltöltöttük a C8-as oszlopra és megmértük a retenciós időket valamint m/z arányokat.

### **3.4 Izolált TaKT-ek krio-elektrontomográfiai vizsgálata**

Méretkizárásos kromatográfiával (SEC) tisztított TaKT-k oldatát 10 nm BSA-val (magzati szarvasmarha szérum) burkolt kolloidális arany (Aurion) koncentrált oldatával kevertük össze. A keverékből 3 µl-t plazmával kezelt porózus szénnel borított réz gridre (Quantifoil) cseppentettünk, szűrőpapírral (Whatman Grade 1) szárítottuk és a vitrifikáláshoz folyékony nitrogénnel hűtött folyékony propán/etán keverékbe mártottuk.

A vitrifikált mintákról egy 300 kV-on működtetett Tecnai G2 Polara (FEI Company) krio-elektronmikroszkóppal készítettünk képeket. A mikroszkóphoz tartozott egy téremissziós forrás, egy a mintát -150 °C-on tartó komputerizált krio-mintatartó, egy „zero-loss” üzemmódban működtetett elektronoptikai oszlop utáni energiaszűrő és egy K2 Summit (Gatan) közvetlen elektron detektor.

A - 64° és 64°-os intervallumban 2°-onként elforgatott képsorozatot SerialEM-el (Mastronarde, 2006) rögzítettük. A minta szintjén a pixel méret 0,4 nm volt, a defókuszálás értéke - 5 µm. A vetületek képeit számláló üzemmódban, elektron ráta < 10 e-/pixel/s értéken rögzítettük. A teljes elektrondózist 150 e-/Å<sup>2</sup> alatt tartottuk.

A közvetlenül detektált nyers képkockákat házi készítésű szoftverrel illesztettük egymásra. Az elforgatásból származó képsorozatot referencia markerként használt aranyszemcsék segítségével illesztettük egymásra és szeriális iteratív rekonstrukciós módszerrel rekonstruáltuk az elektronmikroszkópos képek feldolgozására kifejlesztett IMOD programcsomag alkalmazásával (Kremer, Mastronarde és McIntosh, 1996). A rekonstrukció során a képeket négyszeres anti-aliasing filterrel szűrtük, ami 1,7 nm-es végső voxel méretet eredményezett. A 9. ábrán látható tomográfiai képek az IMOD interpolációs eszközével készültek.

### **3.5 A Ta0547 fehérje expressziójának nyomonkövetése Western blot technikával**

#### **3.5.1 A Ta0547-es gén klónozása**

Oszlopkromatográfiás fehérje tisztítási kísérleteinkben a méretkizárásos kromatográfiás elválasztás “holt térfogat” frakcióiban talált domináns fehérjét a Ta0547 kódszámú ORF-ként azonosítottuk MALDI-TOF analízissel. A fehérjét kódoló gént a 5’- *gccatggctcgagaaagaaagaaggat* és 5’-*gctcgagctcctgtatgatctcatccac* primerpárt használva PCR-rel szintetizáltuk és T4 polinukleotid-kinázzal foszforiláltuk. A keletkező DNS szakaszt először a pUC18 vektor SmaI helyére ligáltuk majd *E. coli* TOP10 sejtekbe transzformáltuk az amplifikációhoz. Egy pozitív transzformánst használtunk a szubklónozásához, a vizsgálandó gént a C-terminális végen 6 His-taget hordozó pET28a expressziós vektor (Novagen) *NcoI-XhoI* restrikciós hasítóhelyére inszertáltuk. A klónozáshoz standard módszereket használtunk (Sambrook, Fritsch és Maniatis, 1989). A fehérjét *E. coli* BL21 (DE3) sejtvonalon expresszáltuk és NiNTA gyöngyökkel (Quiagen) tisztítottuk a gyártó protokollja szerint. A további tisztításokat egy Sephadex 200 oszlopon (GE Healthcare) végeztük és a nagy tisztaságú Ta0547-es fehérjét tartalmazó, 34-es frakcióból kinyert fehérjét nyúl immunizációhoz használtuk poliklonális antitestek előállításának céljából.

### 3.5.2 Poliklonális antitest termelés és a Ta0547-es fehérje immuno-precipitációja

A Ta0547 elleni antitest termeltetés standard laboratóriumi protokollok alapján történt (Harlow, 1988). Maximális szérumszám esetében a kezeletlen szérumszám 1:7500 hígítási arányban lehetővé tette 1 ng célfehérje detektálását a Western blot során anélkül, hogy keresztreakcióba lépett volna más *T. acidophilum* fehérjékkel. A Ta0547 specifikus antitestek tisztításához a rekombináns Ta0547 fehérjét cianogén-bromiddal aktivált Sepharose 4B gyöngyökhöz (Sigma) kötöttük. Az antitestek megkötéséhez a gyöngyöket összekevertük és a szérummal inkubáltuk, majd a gyártó utasításai szerint elvégeztük a mosás és elució lépéseket. A tisztított antitest titer értéke magas volt (1:10,000 arányú hígításban kimutatta 1 ng tisztított Ta0547 jelenlétét). A natív Ta0547 tisztításához *T. acidophilum* lizátumból a Pro-Found Immunoprecipitation kitet (Pierce) használtuk. A kapott frakciók fehérje összetételét 1D-PAGE/MALDI-TOF és Orbitrap MS/MS (Thermo) módszerekkel analizáltuk. A komplexek méretét és alakját EM-mel és TLC-vel határoztuk meg, a TaKT-ek nem-fehérje komponenseinek azonosításához LC-MS-t használtunk.

### 3.5.3 A Ta0547 expressziós szintjének követése Western blot analízissel

A *T. acidophilum* sejteket standard aerob körülmények között növesztettük 3 független 500 ml-es kultúrában. 50 ml-es mintákat vettünk naponta, 6 napon keresztül. 6 nap után a sejt kultúrák OD<sub>600</sub>



értéke csökkenni kezdett, így a mintavételezést leállítottuk. A sejteket a fentebb leírtaknak megfelelően összegyűjtöttük, mostuk, feltártuk és a lizátumhoz 0,1 %-os végkoncentrációban SDS-t adtunk, majd -20 °C-on tároltuk. A fehérje koncentrációt BCA assay-vel (Bio-Rad) mértük meg és mintánként 10 µg-ot egy 1D-SDS géltre töltöttünk (ismert mennyiségű referenciaként szolgáló rekombináns Ta0547 fehérjével együtt). A fehérjét Coomassie blue-val festettük a fehérje koncentrációk megállapításához. Ezt a kísérletet megismételtük a festési lépés nélkül és a fehérjét egy Whatman NC membránra blottoltuk. A Western hibridizációt (Sambrook, Fritsch és Maniatis, 1989) Ta0547 szérum antitestekkel végeztük el (1:1000 hígítás), ezt követően a membránt inkubáltuk a másodlagos antitestekkel (anti-nyúl IgG peroxidáz (Sigma), 1:5000 hígítás) 1 órán keresztül. A membránt az inkubációt követően 2,5 mM Luminol-t tartalmazó ECL oldattal (Sigma Aldrich) átítattuk és a sávok által kibocsátott fény intenzitását azonnal megmértük egy LAS3000 (Fuji) képalkotó rendszerrel. Az intenzitás értékeket Aida V.4.15.025 szoftverrel (Raytest Isotopenmassgerate GmbH) analizáltuk és mg/ml mértékegységre konvertáltuk. Az adatok minőségét az adatpontok szórásának számításával ellenőriztük.

### **3.6 A TaKT asszociált fehérjék LC-MS/MS analízise**

A nem megjelölt származású, vizsgálatához használt anyagok a Sigma Aldrich-től származnak. A hamis pozitív találatok kiszűréséhez mind az oszlop kromatográfiából, mind az immunprecipitációból származó frakciókat analizáltuk, hogy így csökkentsük a TaKT asszociált fehérje jelöltek számát.

#### **3.6.1 Az oldatban lévő fehérjék emésztése**

A mintákat denaturáció céljából 6 M urea/ 2 M thiourea (10 mM Hepes, pH 8,0) pufferben 4-szeresére hígítottuk. A diszulfid kötések redukálásához 100 mM DTT-t adtunk a protein oldathoz 10 mM-os végkoncentráció eléréséig és 56 °C-on 1 órán át sötétben inkubáltuk. A keletkező szabad tiol (-SH) csoportokat ezután jódetammiddal alkiláltuk (55 mM végkoncentráció) szobahőmérsékleten 45 percig sötétben. Ezt követően az oldatokat Lys-C-vel (Wako) emésztettük (1 µg/50 µg minta fehérje 3 órán át, szobahőmérsékleten), négyszeresére hígítottuk 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-tal és tripszinnel emésztettük (Promega) (1 µg/50 µg minta fehérje 16 órán át 37°C-on). A peptid keverékekből „Stop and Go” extrakciós pipetta hegyekkel (STAGE) a sót eltávolítottuk és az eluált peptideket használtuk a tömegspektrometriai analízishez (Foster, De Hoog és Mann, 2003).

### 3.6.2 NanoLC-MS/MS

Az összes megemésztett peptid keveréket online nanoLC-vel szeparáltuk és elektropray ionizációs tandem tömegspektrometriával analizáltuk. A kísérleteket egy Agilent 1200 nanoflow rendszerrel végeztük el, ami egy nanoelektrospray ionforrással (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark) felszerelt LTQ Orbitrap tömegspektrométerrel (Thermo Electron, Bremen, Germany) volt összekötve. A peptidek megkötése és a kromatográfiás elválasztása egy 15 cm-es olvasztott szilícium-dioxid emitterben (75 µm belső átmérőjű, Proxeon Biosystems) történt, ami házilag pakolt reverz fázisú ReproSil-Pur C18-AQ 3 µm-es gyantát tartalmazott (Dr. Maisch GmbH). A peptideket egy 98%-os A oldat (0,5% ecetsav (Fluka) vizes oldata) és 50%-os B oldat (80% acetonitril (Merck) és 0,5% ecetsav vizes oldata) 140 perces lineáris grádiensével eluáltuk. A prekursor ionspektrumot az Orbitrap készülékkel állítottuk elő ( $m/z$  300–1800,  $R = 60,000$ , ion akkumuláció 1.000.000-ós cél értékig). Az öt legintenzívebb iont fragmentáltuk és az ioncsapdában detektáltuk. A „lock mass” opció lehetővé tette a tömeg pontos mérését mind az MS mind az Orbitrap MS/MS üzemmódban (Olsen és *mtsai.*, 2005). Az MS/MS-hez kiválasztott célionok esetében a dinamikus kizárás időtartama 90 másodperc volt.

### 3.6.3 Peptid azonosítás MASCOT adatbázis alapján

Az adatelemzés MaxQuant szoftverrel történt (Gruhler és *mtsai.*, 2005), a peptid azonosításhoz a Mascot (Matrix Science) adatbázis keresőmotorját használtuk. Az MS mérések csúcsai a tömeg retenciós idősíkból kiemelkedő csúcsokat reprezentálják. Az MS/MS csúcsok listájából kiválogattuk azokat, melyek legfeljebb hat csúcsot tartalmaztak 100 Da-os intervallumonként és Mascot keresővel az összefűzött forward és reverse *T. acidophilum* adatbázison belül kerestünk találatokat. A kezdeti tömeg tolerancia MS üzemmódban 7 ppm-re volt állítva, az MS/MS tömeg tolerancia 0,5 Da volt. Cisztein karbamidometiláció fix modifikációként, az N-acetil protein és oxidált metionin változó modifikációként szerepelt a keresésben.

### 3.6.4 LC/MS analízis

Az intakt fehérjék molekulatömegének meghatározása Bruker Daltonics microTOF tömegspektrométerrel történt LC/MS üzemmódban 2 kDa – 30 kDa mérési intervallumban a gyártó ajánlása szerint (Bruker). A fehérjék elválasztását egy Phenomenex Aeris WIDEPORÉ C4 3,6µ (100 x 2,1 mm) oszloppal felszerelt HPLC Agilent 1100 eszközön végeztük el. A fehérjéket

30%-os A (0,05% TFA/H<sub>2</sub>O) és 90% B (0,05% TFA/ACN) eluens közötti grádienssel eluáltuk 15 perc alatt. Az UV kromatogram felvétele 214 nm-en történt.

### 3.7 Automatizált Edman degradáció

Az N-terminális fehérje szekvencia meghatározásához a széles körben elfogadott Edman degradációt használtuk. Ehhez az Applied Biosystems Model 492 cLC Procise Protein Sequencing System készüléket használtuk a gyártó útmutatója alapján működtetve. A vizsgálathoz PVDF membránra blottolt fehérjéket használtunk. A degradált helyek meghatározásához legalább 4 aminosavat azonosítottunk.

### 3.8 Bioinformatikai módszerek

A fehérje homológia adatbázisban való keresés a National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLASTP kereső algoritmusával történt <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Altschul és *mtsai.*, 1997).

A TaKT-ek esetleges transzmembrán héliceinek kereséséhez/azonosításához a DAS-TM filter <http://www.enzim.hu/DAS/DAS.html> (Cserző és *mtsai.*, 2002; Cserzo és *mtsai.*, 2004), Tmpred [http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) (Hofmann és Stoffel, 1993), Phobius <http://phobius.sbc.su.se/index.html> (Käll, Krogh és Sonnhammer, 2004) és HMMTOP <http://www.enzim.hu/hmmtop/> (Tusnády és Simon, 1998, 2001) célszoftvereket használtuk.

A Ta0547-es fehérje bioinformatikai jellemzéséhez a KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) adatbázis annotációjából indultunk ki (Kanehisa és *mtsai.*, 2016). A másodlagos szerkezet, colied-coil struktúrák, rendszertelen szakaszok, szignálpeptidek, predikciójához a Quick2D szoftvert használtuk ([http://toolkit.tuebingen.mpg.de/quick2\\_d](http://toolkit.tuebingen.mpg.de/quick2_d)) (Biegert és *mtsai.*, 2006). A vitellogenin lipid transzport doménnel való hasonlóság predikciója a KEGG adatbázis találatára alapult. Az eredmény megerősítéséhez a homológiát hmm (hidden Markov model) profilok alapján kalkuláló HMMER szoftvercsomagot használtuk (Eddy, 2011), a kereséshez a PFAM adatbázisból letöltött vitellogenin-N hmm profilját használtuk (PF01347) (Finn és *mtsai.*, 2015). A Ta0547 vitellogenin domén szerkezetének számítógépes modellezését a Modeller nevű szoftverrel végeztük el (Webb és Sali, 2014), templátként a lipovitellin kristályszerkezetet véve alapul (PDB: 1LSH). A kapott modell és a templát egymásra illesztéséhez valamint az atomok RMSD (root-mean-square deviation) pozíciójának kiszámításához a TM-align algoritmust

használtuk (Zhang és Skolnick, 2005). A vitellogenin domén konzerváltságát az NCBI Genebank adatbázisban található *Euryarchaea* fehérjék elemzésével állapítottuk meg a vitellogenin-N hmm profilt (PF01347) alkalmazva templátként.

### 3.9 Elektronmikroszkópos analízis

#### 3.9.1 A tisztított TaKT-ek negatív festése és EM analízise

A szén bevonatú réz grideket egy Plasma Cleaner-ben (Harrick Scientific Corporation, NY, USA) hidrofilizáltuk. A tisztított TaKT-eket tartalmazó fehérjeoldatból 3  $\mu$ l-t 1 percig a gridre helyeztünk. A folyadék fázist szűrőpapírral felitattuk majd lecseréltük 3  $\mu$ l 2%-os uranil acetátra. 30 másodperc múlva a fölösleges festéket szűrőpapírral felitattuk és a gridet levegőn megszáritottuk. Az elektron mikrográfiákat egy 160 kV-os gyorsító feszültségen működtetett Philips CM200 FEG transzmissziós elektronmikroszkóppal készítettük. A negatívan festett mintákról készült képeket egy 4kx4k CCD kamerával 53,960-as nagyítás (0,278 nm tárgy-pixel méret) értéken rögzítettük.

#### 3.9.2 Immunogold jelölés

Az exponenciális növekedési szakasz kései fázisából származó sejteket MQ vízzel mostuk és LR White gyantába (Fluka) ágyaztuk a gyártó utasításai szerint. A gyantába ágyazott *T. acidophilum* sejteket ultravékony metszetekre vágtuk (~ 70 nm) az immunogold jelöléshez. A nikkellal griden lévő metszeteket először 10 percig blokkoltuk, ehhez a grideket 0,1% (w/v) BSA-t, 0,13% (w/v)  $\text{NaN}_3$ -ot és 10% (v/v) hővel inaktivált nyúl szérumot tartalmazó 25  $\mu$ l-es 10 mM-os PBS (pH 8,0) cseppeken úsztattuk (15 min, 45 °C). A metszeteket ezután 2 órán át 1:100 arányban 0,1% (w/v) BSA, 0,13% (w/v)  $\text{NaN}_3$  tartalmú 10 mM PBS (pH 8,0) pufferrel hígított, affinitáskromatográfiával tisztított poliklonális nyúl antitestekkel (1.5 mg/ml anti-Ta0547, 20% glicerin) inkubáltuk. A grideket 10 mM PBS (pH 8,0) cseppeken úsztatva mostuk 5x 2 percen keresztül. A megkötött antitestek jelöléséhez a metszeteket 1 órán át 1:10 arányban 0,1% BSA, 0,05% (w/v) Tween 20 és 5% (v/v) magzati szarvasmarha szérum tartalmú 0,5 M-os sóoldattal hígított (pH 7,4) anti-nyúl IgG arany konjugátum 100  $\mu$ l-es cseppjében inkubáltuk. Végül a grideket kétszeresen desztillált vízcseppeken mostuk 5x 5 percig majd 2%-os uranil acetát vizes oldatában festettük. A negatív festés után a grideket ismét MQ vízzel átöblítettük és levegőn

megszárítottuk. Az összes inkubációs lépés szobahőn történt. A negatív kontrollok előállításához hasonlóan történt az elsődleges antitestek használata nélkül.

### 3.9.3 A 7 napos kultúrából származó sejtek negatív festése és EM analízise

7 napos *T. acidophilum* kultúrákból 12 µl-es térfogatokat 8 nm vastag szénbevonattal ellátott réz gridekre helyeztünk, melyeket előzőleg plazmakisüléssel 20 másodpercig kezeltünk. 30 másodperces inkubációt követően a felesleges médiumot Whatman szűrőpapírral (No 1) eltávolítottuk és a sejteket ugyanúgy mostuk 2 x 5 µl, kénsavval pH 2-es értékre beállított vízzel, majd 30 másodpercig 3 µl 2%-os uranil-acetát oldattal. A felesleges festőoldatot eltávolítottuk és a grideket levegőn megszárítottuk. Az elektronmikrográfiákat – 1,5 µm-es fókuszálással 12.500 x-os nagyítás mellett egy 160 V-on működtetett Philips CM20 TEM-mel készítettük. A TEM egy téremissziós forrással (FEG) és egy 4k CCD (töltéscsatolt eszköz) kamerával (TVIPS) rendelkezett.

### 3.9.4 Krio-elektrontomográfia

A porózus szénréteggel (Quantifoil R 2/1, Jena, Germany) borított rézgrideket plazmakisüléssel kezeltük egy Plasma Cleaner berendezéssel (Harrick Scientific Corporation) majd egy 10 nm-es szemcséket tartalmazó aranykolloid szuszpenzióba helyeztük, végül levegőn megszárítottuk. A jégbe ágyazást megelőzően a *T. acidophilum* sejteket 60 °C-on tartottuk és 6 µl sejtsuszpenziót cseppentettünk a gridre, amit 1-2 perc inkubáció követett. A felesleges folyadékot ezután eltávolítottuk szűrőpapírral (Whatman Grade No. 1 Filter Paper, 1001 090) és a gridet folyékony etánban pillanatszerűen lefagyasztottuk (Dubochet és *mtsai.*, 1988). A vitrifikált mintákat rögtön folyékony nitrogénbe helyeztük és ott tároltuk a felhasználásig. A gridet folyékony nitrogénben helyeztük át egy „cryo-tilt” tartóba (Gatan) és alacsony elektrondózis mellett vizsgáltuk. A minta tanulmányozásához egy 300 kV gyorsítófeszültséggel, zero-loss üzemmódban (slit-width 20 eV) működtetett Philips CM300 FEG transzmissziós elektronmikroszkópot (FEI Company) használtunk mely egy Gatan energiaszűrővel (GIF 2002, Gatan) volt ellátva. A jégbe ágyazott *T. acidophilum* különböző tomografikus elforgatott metszeteinek sorozatát félig automatizáltan, alacsony elektrondózis (Grimm és *mtsai.*, 1997) mellett készítettük 36,5 kx és 44 kx nagyításban, ami 0,82 nm-es és 0,68 nm-es pixelméretet eredményezett. A mikrográfiákat -8 µm-es fókusszal rögzítettük, az elforgatás intervalluma -70°-tól + 70°-ig terjedt, 2,4°-os lépésekben növelve. A képfeldolgozáshoz EM és TOM szoftvercsomagokat használtunk (Hegerl, 1996; Nickell és *mtsai.*,

2005). Az elforgatásból származó képsorozatok egymásra illesztéséhez aranyrészecskéket használtunk referenciaként, a 3D rekonstrukciókat a súlyozott visszavetítések alapján számoltuk.

### **3.10 A fehérjék oldhatóságát növelő SAMP fúziós partneren alapuló rendszer kifejlesztése**

#### **3.10.1 Az alkalmazott sejtvonalak, plazmidok és sejtenyésztési paraméterek**

A munka során használt baktérium sejtvonalak és plazmidok (**2. MELLÉKLET**) kerülnek összefoglalásra. A klónozási célra használt *E. coli* sejtvonalakot Luria-Bertrani (LB) médiumban (tryptone 10 g; élesztőkivonat 5 g; NaCl 10 g; 1.000 ml dH<sub>2</sub>O-ban) növesztettük. Chloramphenicol, kanamycin, ampicillin és spectinomycin szelekciós ágenseket használtunk 34, 50 és 100 mg/ml-es koncentrációkban. A fehérje expresszióhoz használt *E. coli* és *Rhodococcus* sejtvonalakot alkalmas antibiotikummal kiegészített terrific broth (TB) médiumban (tryptone 12 g; élesztőkivonat 24 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,3 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12,5 g; glicerol 8,0 g 1.000 ml dH<sub>2</sub>O-ban) növesztettük. Általánosságban a kis léptékű fehérjeexpressziós kísérleteket 2 ml TB médium expressziós törzssel való beoltásával indítottuk és az éjszakán át 37 °C-on, 180 rpm-en történő rázatást követően az előkultúrát hozzáadtuk 10 ml TB médiumhoz, amit egy 50 ml-es lombik tartalmazott. A nagy léptékű expressziós kísérletekhez 2 ml-es starter kultúrát 12 órán át 37 °C-on növesztettünk majd 20 ml médiumhoz adtuk és egy éjszakán keresztül inkubáltuk azonos körülmények mellett. Az inkubációt követően a sejt kultúrát végül 200 ml médiumhoz adtuk és 200-220 rpm-mel ráztattuk 2 órán keresztül. Autoindukció esetén első lépésben 2 ml LB médiumot inokuláltunk és 37 °C-os egy éjszakán át tartó inkubációt követően 10 ml autoindukciós médiumhoz (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM; NH<sub>4</sub>Cl 50 mM; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM; MgSO<sub>4</sub> 2 mM; glükóz 0,05%; laktóz 2,0%; glicerol 0,5%; tryptone 2,0%; élesztőkivonat 3,0%; nyomelem oldat 1×) adtuk expresszió céljából (Burroughs és mtsai., 2007; Li és mtsai., 2011).

#### **3.10.2 A fehérjeexpressziós kísérletek körülményei**

A fehérjeexpresszió során a sejtenyésztéshez alkalmazott körülményeket az **1. TÁBLÁZAT** foglalja össze. Az *E. coli* sejtekben a rekombináns fehérje termelődését 1 mM-os végkoncentrációjú IPTG-vel, *Rhodococcus* sejtek esetében 50 µg/L thiostreptonnal indukáltuk. Ötféle kondíciót (A, B, C, D és E) alkalmaztunk a sejt kultúra térfogatot, indukciós hőmérsékletet és időintervallumot illetően a következők szerint: 220 ml-es sejt kultúrákat alkalmaztunk az A, B,

C, E és 50 ml-t a D módszer során. A kultúrákat (A) 24 °C-on 7 óráig, (B) 37 °C-on 4 óráig, (C/1) 16 °C-on 12 óráig, (C/2) 10 °C-on 24 óráig, (D) 24 °C-on 5 óráig (E) 30°C-on 24 óráig inkubáltuk. A rekombináns fehérjék expresszióját His- és Strep-tag elleni antitesteken alapuló Western blottal illetve LC/MS-sel követtük nyomon.

### 1. TÁBLÁZAT A célfehérjék expressziójához használt sejtenyészési paraméterek

Módszer	Sejtkultúra térfogat (ml)	Rázatas sebessége (Rpm)	Expressziós hőmérséklet (°C)	Indukciós időtartama (h)
A	220	220	24	7
B	220	220	37	4
C/1	220	220	16	12
C/2	220	220	10	24
D	50	220	24	5
E	220	220	30	24

### 3.10.3 Transzformációs módszerek

#### 3.10.3.1 *E.coli* transzformáció

50 µl *E. coli* DH5 alpha és *E. coli* BL21 (DE3) kémiai kompetens sejteket (New England Biolabs) jégen felolvasztottunk és 5 µl (30-35 ng/µl) plazmiddal összekevertük (Quiagen EB pufferben feloldva) majd jégen 30 percig inkubáltuk. Az inkubációt követően egy Eppendorf Thermomixer Comfort készülékben a sejteket 30 másodpercre 42 °C-ra melegítettük. A hősokkrolás után 2 percig jégen hűtöttük a sejteket, majd 450 µl SOC (super optimal broth with catabolite repression) mediumban regeneráltattuk 45 percig 37 °C-on, 750 rpm-es rázattal. A regeneráltatás után 200 µl sejtszuszpenziót megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB agarlemezre szélesztettünk.

#### 3.10.3.2 *Rhodococcus* transzformáció

Kompetens *R. erythropolis* L88 sejtek készítéséhez a sejteket először LB agarlemezre szélesztettük és 30 °C-on inkubáltuk 48 órán keresztül a kolóniák megjelenéséig. Egy kiválasztott kolóniával beoltottunk 5 ml LB médiumot amit 30 °C-on, 150 rpm-mel rázattunk 24 órán keresztül. A felnövesztett sejtkultúrával beoltottunk 500 ml LB médiumot és 30 °C-on egy éjszakán keresztül rázattuk. 0,8-as OD<sub>600</sub> érték elérésekor a sejteket 2000 x g-n 10 percig centrifugáltuk és steril MilliQ vízzel kétszer átmostuk, majd 5 ml 30%-os PEG1000-rel felszuszpendáltuk. 400 µl sejt

szuszpenziót 3  $\mu$ l (30–35 ng/ $\mu$ l) plazmival kevertünk össze egy 0,2 mm-es küvetében és egy GenePulser XCell (BioRad) elektroporátorral elektrosokkoltuk az alábbi beállítások szerint: kimeneti feszültség: 2500 V, kapacitás: 25  $\mu$ F, ellenállás: 400  $\Omega$ . Az elektrosokkot követően 1 ml SOC médiumot adtunk a sejtsuszpenzióhoz és átpipettáztuk egy 2 ml SOC médiumot tartalmazó sejttenyésztő csőbe. A sejteket 30 °C-on 4 órán át rázatva regeneráltattuk és 200  $\mu$ l sejtsuszpenziót 34  $\mu$ g/ml kloramfenikol tartalmú LB agarlemezre szélesztettünk.

#### 3.10.4 PCR amplifikációs módszerek

A célgéneket PCR-rel (**4. MELLÉKLET**) *NdeI-XhoI* vagy *AseI-SalI* túlnyúló végekkel rendelkező primerekkel (**3. MELLÉKLET**) és Pfu DNS polimerázzal amplifikáltuk a gyártó ajánlásai alapján (Thermo Scientific). A reakciókban genomi DNS-t használtunk templátként. A további alkalmazásokhoz a mintákat Qiagen Gel gélextrakciós kittel (Qiagen) tisztítottuk a gyártó ajánlásai szerint és a megfelelő FastDigest restriktív endonukleázokkal (Thermo Scientific) 2 órán át emésztettük. A reakciótermékeket 1 x-es TAE pufferrel (Applichem) készített és SYBR Safe DNS festéket (Invitrogen) tartalmazó 1%-os agaróz gélre töltöttük. A TAE pufferben történő elektroforézist (100 V, 50 perc) követően megjelent, megfelelő méretű sávokat Qiagen Gel gélextrakciós kittel tisztítottuk.

#### 3.10.5 A klónozáshoz alkalmazott módszerek

A klónozás során a helyes gén orientáció kialakításához mind a vektort, mind az inszertet FastDigest *NcoI/XhoI* vagy *NdeI/XhoI* (Thermo Scientific) restriktív endonukleáz párokkal emésztettük. Az emésztett plazmidokat és PCR termékeket (**4. MELLÉKLET**) a leírtak alapján tisztítottuk (**3.10.4**). Ligációhoz Rapid T4 DNA ligázt használtunk a gyártó előírásait követve. A ligált terméket *E. coli* DH5 alpha sejtekbe transzformáltuk és a transzformált sejteket a megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB lemezekre szelektáltuk. Egy-egy különálló kolóniát választottunk ki és plazmid DNS-t izoláltunk Plasmid Miniprep kit-tel (Qiagen). Az izolált plazmidok méretét restriktív endonukleázokkal való emésztéssel ellenőriztük. A megfelelő méretű inszerteket tartalmazó konstrukciókat kiválasztottuk és szekvenáltuk (ABI 3730 48-kapilláris szekvenáló).

#### 3.10.6 A *Thermoplasma* SAMP expressziós vektorok előállítása



A *T. acidophilum*-ból származó, kodon optimalizált, szintetikus (Eurofins MWG OPERON) *Ta0895*, *Ta1019* és *Ta1442* géneket (feltételezett SAMP homológok) pET28a vektor *NdeI/XhoI* helyére inszertáltuk ezáltal egy 6-His-taggal látva el az N-terminális véget. Miután *E. coli* BL21 (DE3) (New England Biolabs) sejtekbe transzformáltuk a kialakított konstrukciókat, a célfehérjéket expresszáztattuk és a minták tisztaságát His-tag tisztítást követően SDS-PAGE-val ellenőriztük (3.10.13).

### 3.10.7 JAMM proteáz expressziós vektorok és az expresszált proteázokon alapuló hasítási tesztek

A *H. volcanii*, *M. burtonii*, *N. maritimus* és *T. acidophilum* eredetű kodon optimalizált, szintetikus (Eurofins MWG OPERON), N-terminális végen 6-His-taggal rendelkező *HVO\_2505*, *Mbur\_0623*, *Nmar\_1227* és *Ta0623* JAMM proteáz géneket a SAMP génekhez hasonlóan pET28a vektorba klónoztuk, az így kialakított konstrukciókkal *E. coli* BL21(DE3) sejteket transzformáltunk majd a célfehérjéket expresszáztattuk.

A *Hvo\_2505*, *Nmar\_1227* és *Mbur\_0623* JAMM1 metalloproteázok hasítási aktivitását a *Ta0895\_VSGG-Ta0547*, *Ta0895\_VAGG-Rpn8-Rpn11*, *Ta1019-ScRpn11*, *Hvo\_2619-ScRpn11* és *Mbur\_1415-ScRpn11*, SAMP-pal fuzionáltatott, szubsztrátokon teszteltük. A reakciót 20 µl-es térfogatú foszfátpufferben állítottuk össze ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM; NaCl 300 mM;  $\text{ZnCl}_2$  100 µM; pH 7,0). A *Hvo\_2505* proteáz esetében a sókoncentrációt 2 M-os értékre állítottuk be. Az enzim és szubsztrát komponensek koncentrációja egységesen 0,1 mg/ml volt, az enzimreakciókat 10, 24 és 37 °C-on inkubáltuk. Figyelembe véve a *H. volcanii* (35–55 °C) és *M. burtonii* (1,7–29,5 °C) növekedéshez szükséges hőmérsékleti optimumát, a *Hvo\_2505* és *Mbur\_0623* enzimek *Ta0895\_VAGG-Rpn8-Rpn11* szubsztrát jelenlétében mutatott aktivitását 48 °C-on és 4 °C-on is megvizsgáltuk. A reakció során esetlegesen keletkező hasítási termékeket SDS-PAGE-val tettük láthatóvá. Kontrollként 0,1 mg/ml enzimet és szubsztrátot inkubáltunk különálló csövekben az enzimreakciók körülményeivel megegyező módon, majd töltöttük fel SDS-PA géltre a hasított termékek detektálásának megkönnyítése érdekében. A *Ta0895\_VAGG-Rpn8-Rpn11* szubsztrát alapú enzim aktivitás tesztet kétszeres ismétlésben végeztük el.

### 3.10.8 Ta0895 fúziós protein vektorok előállítása

A Ta0895-ös fehérjével fuzionáltatott célfehérjék termeltetéséhez expressziós vektorokat használtunk. Első lépésben szintetikus *Ta0895* gén két változatát (az N-terminálison 8His vagy StrepII affinitás taget, a C-terminálison egy TEV hasítóhelyet és egy azt követő multiklónozó régiót) (**5. MELLÉKLET**) *NcoI* és *XhoI* FastDigest restriktív endonukleázokkal (Thermo Scientific) megemésztettük, majd pET28a, pRSFDuet és pETDuet vektorok *NcoI/XhoI* helyére klónoztuk standard módszerek szerint (**3.10.5**). Ez a klónozó stratégia a pRSFD\_8HisTa0895TEV, pETD\_8HisTa0895TEV, pET28\_8HisTa0895TEV, pRSFD\_StrepIITa0895TEV, pETD\_StrepIITa0895TEV és pET28\_StrepIITa0895TEV vektorokat eredményezte. Ezt követően a vektorokat *NdeI/XhoI*, az 5' és 3' kompatibilis végekkel rendelkező célgéneket *NdeI/XhoI* vagy *AseI/SalI* restriktív endonukleázokkal emésztettük majd a kapott termékeket ligáltuk. A klónozás további lépései a korábban leírtak szerint történtek (**3.10.5**). Az elkészített plazmidokat a **2. MELLÉKLET** foglalja össze.

### **3.10.9 Ta1019, Hvo\_2619 és Mbur\_1415 SAMP fúziós fehérjét hordozó vektorok előállítása valamint az ScRpn11 klónozása különböző fúziós fehérje tageket hordozó pCoofy vektor variánsokba**

Három kodon optimalizált, szintetikus, *H. volcanii*, *M. burtonii* és *T. acidophilum* SAMP homológ gént inszertáltunk pRSFD\_8HisTa0895TEV-ScRpn11 plazmid konstrukcióba, melyből előzőleg a 8His-tag-gel ellátott *Ta0895* gént *NcoI* és *NdeI* restriktív endonukleázokkal eltávolítottunk. Hogy a leginkább széles körben használt szolubilizáló fúziós fehérjéket összehasonlítsuk (Esposito és Chatterjee, 2006), (azonos promoterral rendelkező) pCoofy vektorokból álló sorozatot alkalmaztunk a különféle tagekhez kapcsolt ScRpn11 fehérje expressziójához. A pCoofy1 (6His-tag), pCoofy2 (Trx-tag), pCoofy3 (GST-tag), pCoofy4 (MBP-tag), pCoofy5 (SUMO-tag) és pCoofy16 (NusA-tag) vektorokba való klónozáshoz SLIC klónozást használtunk (Scholz és *mtsai.*, 2013). Mindegyik plazmidot *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta T1 sejtekbe transzformáltuk (Merck Millipore), majd a fehérjéket 30 µg/ml kanamycin-t és 34 µg/ml chloramphenicol-t tartalmazó autoindukciós médiumban (Li és *mtsai.*, 2011) expresszáltuk kétszeres ismétlésben. A sejt kultúra térfogata minden sejt vonal esetében 10 ml volt egy 50 ml-es lombikban, a kultúrákat egy Ecotron rázatóban inkubáltuk 24 °C-on, 220 rpm-mel. A pCoofy1, 2, 3, 15, 16 és *Ta1019*, *Hvo\_2619*, *Mbur\_1415* géneket tartalmazó vektorokkal transzformált sejteket 24 órás inkubáció után, míg a pCoofy4, 5, 14 és *Ta0895* vektorokkal transzformált sejteket 44 óra után gyűjtöttük össze. A megismételt kísérletről származó sejteket egységesen az indukciót követő 27. órában gyűjtöttük össze. A kísérletekből származó összes sejtet lefagyasztottuk és -80 °C-on

tartottuk a felhasználásig. Az összehasonlító tesztek során a 6His-tag-gel rendelkező ScRpn11 (*Saccharomyces cerevisiae* 26S proteaszóma Rpn11 alegység) szolgált kontrollként.

### **3.10.10 Az ScRpn11 fúziós fehérjevariánsok tisztítása, detektálása és oldhatóságuk összehasonlítása**

A fagyasztott sejteket felolvasztottuk és szuszpendáltuk 10 ml His kötő pufferben ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM; NaCl 500 mM; imidazol 10 mM; pH 8,0). A sejteket egy Avestin, Emulsiflex-C5 homogenizátorral tártuk fel (2 ciklus és 1000–1500 bar). A feltárás után a proteáz aktivitást 4-(2-aminoetil) benzolszulfonil-fluorid hidroklorid (AEBSF-HCl), aprotinin, leupeptin és pepstatin proteáz inhibitorokkal gátoltuk 1 mM, 2  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  és 1  $\mu\text{g/ml}$  végkoncentrációkban. A genomi DNS eltávolításához 1  $\mu\text{l}$  benzonase-t ( $\sim 750 \text{ U}/\mu\text{l}$ , MPI of Biochemistry, Biochemistry Core Facility) adtunk 12 ml lizátumhoz. A sejtlyzátumokat egy Evolution centrifugával, egy SS-34 rotorban (Thermo Scientific) centrifugáltuk 20.500 rpm fordulatszámon 30 percig 4 °C-on. A kiinduló biomassza mennyiségek egységesítéséhez a legalacsonyabb  $\text{OD}_{600}$  értékű sejtvonalat választottuk ki referenciaként. A magasabb  $\text{OD}_{600}$  értékkel rendelkező sejtvonalakból származó sejtextraktumokat (folyadék fázis) a centrifugálást megelőzően mért  $\text{OD}_{600}/\text{referencia } \text{OD}_{600}$  értékkel arányosan hígítottuk. Mindegyik extraktumból 12 ml-t töltöttünk 0,5 ml/min-es sebességgel egy 1 ml-es térfogatú HisTrap HP oszlopra egy ÄKTA basic (GE Healthcare) fehérjetisztító berendezés segítségével. A minták eluálásához 10 ml His elúciós puffert használtunk ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM; NaCl 500 mM; imidazol 250 mM; pH 8,0), 1 ml/min áramlási sebességgel, az eluált fehérjéket 1 ml-es frakciókba gyűjtöttük. A minták további tisztítását szolgáló méretkizáró oszlopkromatográfiához (SEC) egy 2,4 ml térfogatú Superdex 200 PC 3.2/30 oszlopot (GE Healthcare) használtunk. Általánosságban 50  $\mu\text{l}$  mintát töltöttünk a SEC oszlopra és gélfiltrációs pufferrel eluáltuk ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM; NaCl 500 mM; glycerol 0,1%; pH 8,0) 0,07–0,08 ml/min áramlási sebességgel és az eluált mintákat 0,1 ml frakciókba gyűjtöttük. A megfelelő frakciókban található fehérjék molekulatömegének meghatározásához és azonosításukhoz LC/MS módszert használtunk. A tisztítás különböző fázisaiból származó, tagekkel ellátott fehérjék láthatóvá tételéhez és az expressziós szintjük összevetéséhez egy Agilent 2100 Bioanalyzer-t és a hozzá tartozó Agilent Protein 80 kit-et (Agilent Technologies) használtuk. A fehérjék méretét és mennyiségét a migráció idejét és fluoreszcencia intenzitást mérő P80 fehérje chippel határoztuk meg. Az adatok feldolgozásához és vizualizációjához 2100 Expert Software-t (Agilent Technologies) használtunk.

### 3.10.11 Sejtextraktum preparáció

Az *E. coli* sejteket egy Sorvall RC-5B Superspeed centrifugával gyűjtöttük össze 4.000 x g-n 10 percig 4 °C-on majd His kötő pufferben (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM; NaCl 300 mM; imidazol 10 mM; pH 8,0) vagy Strep futtatópufferben (TrisHCl 100 mM; NaCl 150 mM; pH 8,0) szuszpendáltuk és jégen 2 mg/ml lizozimmal 30-60 percen keresztül kezeltük őket. A DNS emésztéséhez a nyers lizátumhoz DNázi (Roche) enzimet adtunk és 30 percig jégen tartottuk. Az inkubációt követően a lizátumot 2 x 1 percig szonikáltuk (Branson Sonifier 250) 30-30%-os teljesítményen, 50%-os ciklusokban. A sejtörmelékét egy Beckmann centrifugával szeparáltuk 50.000xg-n 45 percig 4 °C-on.

### 3.10.12 Fehérje tisztítási módszerek

#### 3.10.12.1 Affinitáskromatográfiai módszerek

Két különböző affinitáskromatográfiai módszert használtunk. His-tag tisztítás esetében a felülúszót egy 4 °C-on működtetett ÄKTA Purifier (GE Healthcare) berendezéshez csatlakoztatott, 1 ml térfogatú HisTrap FF Crude oszlopra (GE Healthcare) töltöttük. A nem kötődő fehérjék eltávolításához az oszlopot futtatópufferrel (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM; NaCl 300 mM; imidazol 20 mM; pH 8,0) mostuk 1 ml/min sebességgel addig, amíg a detektált UV abszorbancia változása kisebb nem lett, mint 2 mAU/ml. A megkötött fehérjéket változatlan pufferösszetétel mellett 20 perces 20 mM-tól 500 mM-ig haladó imidazol grádienssel eluáltuk. 0,5 ml-es frakciókba gyűjtöttük az eluált fehérjéket, a termék tisztaságát és mennyiségét SDS-PAGE-val követtük nyomon. Strep-tag tisztítás esetén a Strep futtatópufferrel elkészített felülúszót 1 ml/min sebességgel egy 4 °C-on működtetett ÄKTA Explorer-hez csatlakoztatott, 5 ml térfogatú StrepTrap HP oszlopra (GE Healthcare) töltöttük. A nem kötődő fehérjéket 40 ml, 4 ml/min-es sebességgel áramló futtatópufferrel (TrisHCl 100 mM; NaCl 150 mM; pH 8,0) távolítottuk el. A megkötött fehérjéket lépcsőzetesen eluáltuk (2,5 mM D-desthiobiotin Strep futtatópufferben), 1 ml/min sebességgel. 0,5 ml-es frakciókba gyűjtöttük az eluált fehérjéket, melyek tisztaságát és mennyiségét SDS-PAGE-val követtük nyomon.

#### 3.10.12.2 Preparatív méretkizárásos kromatográfiai eljárások

Az affinitáskromatográfiai tisztításból származó, célfehérjét tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük és a célfehérje méretének megfelelő Amicon 3.000, 10.000 és 30.000 MWCO koncentráló

oszlopokkal (Merck Millipore) betöményítettük. A további tisztításhoz illetve a homogenitás és az esetleges aggregálódás nyomonkövetéséhez a koncentrált mintákat méretkizárásos kromatográfiás oszlopra (SEC) töltöttük. Erre a célra egy Superose 12 10/300 GL vagy egy Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) oszlopot használtunk, melyet egy 4 °C-on működtetett ÄKTA purifier-hez csatlakoztattunk. Az oszlopot első lépésben 2 oszlop térfogatnyi (48 ml) futtatópufferrel ekvibráltuk és maximum 500 µl térfogatban 1-5 mg NiNTA vagy Strep tisztításból származó fehérjét töltöttünk fel rá.

A SEC kromatográfia során használt kondíciók:

1. módszer: 500 µl mintát töltöttünk 0,8 ml/min sebességgel egy Superose 12 10/300 GL oszlopra és TrisHCl 25 mM; pH 7,5 puffert használtunk az elválasztáshoz.
2. módszer: 400 µl mintát töltöttünk 0,4 ml/min sebességgel egy Superdex 200 10/300 GL oszlopra és Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM; NaCl 300 mM; pH 8,0 puffert használtunk az elválasztáshoz.

### 3.10.13 SDS-PAGE analízis

Minta előkészítés: 12 µl tisztított fehérjeoldatot összekevertünk 4 µl négyszeres töménységű SDS töltőpufferrel (TrisHCl 200 mM; DTT 400 mM; SDS 8,0%; brómfenolkék 0,4%; glicerol 40,0%; pH 6,8).

Elválasztás: 10 µl töltőpufferben felvett mintát egy 12,5%-os SDS poliakrilamid gélbe (Laemmli, 1970) töltöttünk és SDS futtatópufferben (Tris bázis 3,0 g; glicin 14,4 g és SDS 1,0 g 1.000 ml dH<sub>2</sub>O-ban) szeparáltuk 140 V-on 1 óra 20 percig. 6 µl PageRuler Prestained Protein Ladder-t (Thermo Scientific) használtunk molekulatömeg markerként. NuPAGE gélek (Novex) esetében a gyártó használati útutatóját követtük, futtatáshoz 1x-es MES puffert (Novex) használtunk.

Előhívás: az elválasztott fehérjék festéséhez a géleket Instant Blue (Expedeon) gélfestékben rázattuk 1 órán át szobahőmérsékleten. A célfehérjék méretének becsléséhez a fehérjék pozícióját összevetettük a molekulatömeg marker komponenseinek pozíciójával.

### 3.10.14 Az eredeti Ta0895 fehérje VSGG hasítási szekvenciájának módosítása

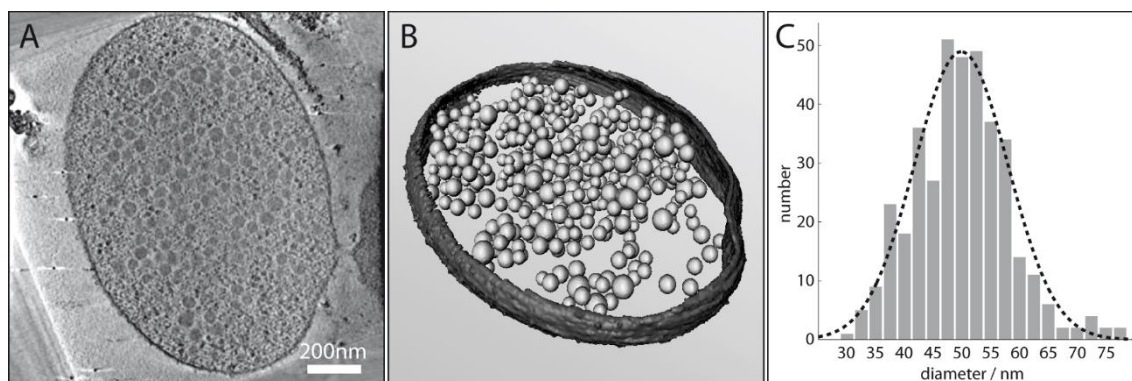
A *H. volcanii* JAMM1 proteáz Hvo\_2505 a lineárisan kötődő Hvo\_2619 (SAMP1) fehérjét a VSGG helyen hasítja (Hepowit és mtsai., 2012). Ugyanilyen hasítóhellyel rendelkező Ta0895 variáns kialakításához a C-terminálison lévő VAGG szekvenciát VSGG-re mutáltattuk

QuickChange Lightning Site Specific Mutation kit-tel (Agilent Technologies) a gyártó felhasználási utasításait követve. Templátként a pTIPRC1\_8HisTa0895-Ta0547 konstrukció szolgált, a felhasznált primereket a **3. MELLÉKLET** tartalmazza.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1 A *T. acidophilum* sejtek krio-elektrontomográfiája

A *T. acidophilum* sejtek mérete 0,5-3  $\mu\text{m}$  között változik, átlagos vastagságuk 0,2-0,5  $\mu\text{m}$ , ez teszi ezt az organizmust megfelelő mértékben áthatolhatóvá az elektronok számára és emiatt alkalmassá a struktúra feltárását célzó krio-elektronmikroszkópos tomográfias vizsgálatokhoz (Nickell és *mtsai.*, 2006). Anaerob körülmények között tenyésztett *T. acidophilum* sejtekről 15 különböző tomogramot készítettünk, melyek 3D rekonstrukciót követő elemzése nagyszámú citoplazmikus, globuláris testecske jelenlétét tárta fel (**8. A ÁBRA**). A manuális szegmentáció és a 3D-s felszín reprezentációk képanalízisen alapuló eljárások kimutatták, hogy a testek gömb alakúak, eloszlásuk a sejten belül egyenletes (**8. B ÁBRA**). Elliptikus alakot feltételezve, a számított sejttérfogat és a testek által kitöltött tér alapján a *T. acidophilum* sejtek térfogatának 35-50 %-át a kimutatott testek adják. A testek mérete Gauss féle eloszlást követ 50 nm-es átlagértékkel és 15 nm-es szórással (**8. C ÁBRA**). A meghatározott méret és feltételezett 1,3 g/cm<sup>3</sup> fehérjedensítés alapján a testek átlagos molekulatömegét 6 MDa-ra becsültük. Ezt az értéket használtuk fel a későbbiekben az izolálást célzó kísérletekhez.

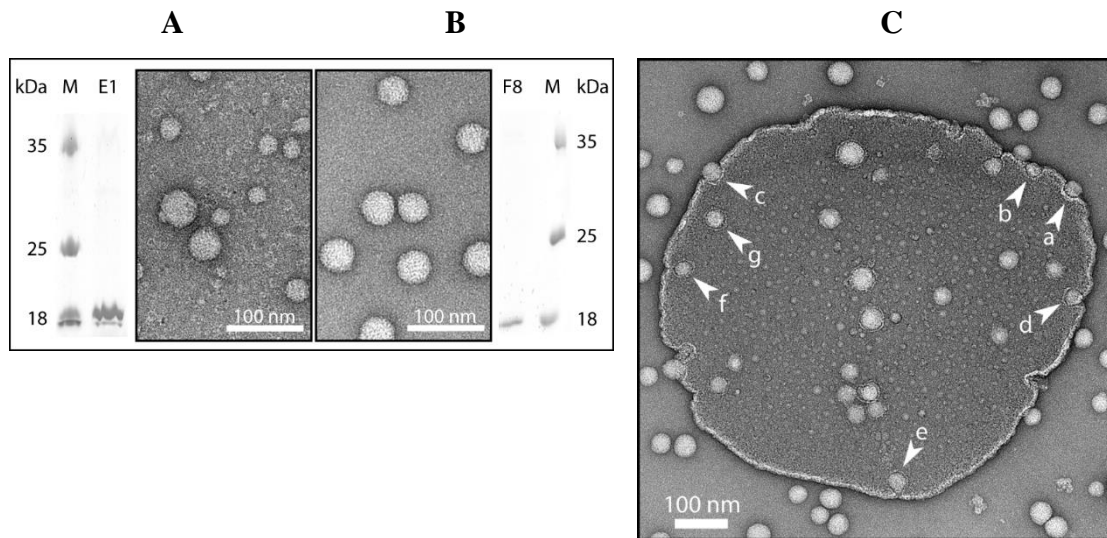


**8.ÁBRA** Egy anaerob környezetben tenyésztett *T. acidophilum* sejt krio-elektronmikroszkópos analízise és 3D szegmentációja. A *T. acidophilum* sejtek tomogrammjaiknak egyes x-y irányultságú metszetein gömb alakú, elektron-denz partikulumok figyelhetők meg (A). A TaKT-ek a 3D-s szegmentációt követő becslés alapján ~35-50 %-ban töltik ki a sejttérfogatot (B). A TaKT-ek átmérőiből létrehozott hisztogram Gauss féle eloszlást mutat, az átlagos átmérő 50 nm, a szórási 15 nm (C).

### 4.2 A TaKT-ek fő fehérjekomponensének, a Ta0547-nek az azonosítása

A sejt-lizátumok citoszolikus fehérjeit az intakt sejtek, sejt-törmelék és sejt-membrán centrifugálással történő eltávolítását követően oszlop-kromatográfián alapuló tisztítási

módszerekkel izoláltuk. Az első lépésként használt hidroxipapatit oszlop számos nagyméretű fehérjekomplexet képes nagy mennyiségben megkötni, melyek közül sokat 500 mM-os foszfát pufferrel tudunk eluálni. Ezt a frakciót tovább tisztítottuk méretkizárásos oszlopkromatográfiával (Sun és *mtsai.*, 2009). A nagy molekulatömegű fehérjéket tartalmazó Superose 6 frakciókat denaturáltuk és SDS PA géltre töltöttük fel. Következő lépésént a Coomassie Blue-val megfestett sávokat kivágtuk és MALDI-TOF-MS-sel azonosítottuk. Ilyen módon azonosítani tudtuk a holtér frakcióiban domináns Ta0547-es fehérjét (**9. A ÁBRA**).

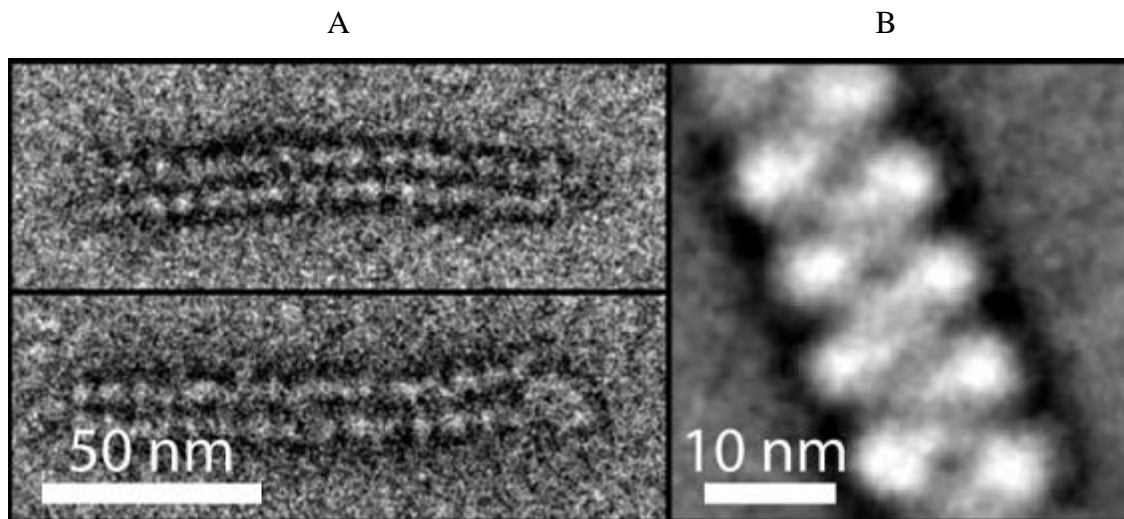


**9.ÁBRA** Az A) ábrán a Ta0547 ellen nyúlban termeltetett poliklonális antitesttel immuno-precipitált a B) ábrán pedig az oszlopkromatográfiával tisztított TaKT-ek 1D-SDS-PAGE és elektronmikroszkópos képei láthatóak. A Ta0547 fehérje (18 kDa) sávjait MALDI-TOF-MS-sel azonosítottuk. A gélfotó feletti számok sorrendben az eluált mintát (E1) és a frakció sorszámát (F8) jelentik. A molekulatömeg marker viszonyítási pontjait kDa-ban adtuk meg. C) Elektronmikroszkóppal megfigyelhető volt, hogy megnövelt NaCl (250 mM) hatására a TaKT-ek nagyobb és sötétebb struktúrákká olvadnak össze, melyek képesek elnyelni különálló TaKT-eket. Ennek a folyamatnak a különböző állomásai láthatóak egy nagyobb struktúra határán (nyilak a-g-ig).

Figyelemre méltó, hogy míg más nagyméretű fehérjekomplexek elhanyagolható mennyiségben voltak jelen, addig a frakciók negatív EM képein több nagy globuláris test látszott (**9. A ÁBRA**), melyek méret és alak tekintetében a krio-ET kísérletekben megfigyelt testekre hasonlítottak (**9. A ÁBRA**). Annak igazolására, hogy a Ta0547 a megfigyelt testek alkotórésze, poliklonális antitesteket termeltettünk a Ta0547 ellen és immuno-precipitációs kísérletekben alkalmaztuk őket. Erre a célra a Ta0547 gént pET28a expressziós vektorba klónoztuk és a 6His-taggel rendelkező rekombináns fehérjéket *E.coli* BL21(DE3) sejtekben termeltettük meg és Ni-NTA affinitás és Sephadex 200 méretkizárásos kromatográfiával tisztítottuk. A 34-es frakcióban talált rövid,



lineáris, valószínűleg helikális elrendezésű (10. ÁBRA) rekombináns Ta0547 fehérjét használtuk poliklonális antitest termeltetéshez.



10.ÁBRA A) *E. coli*ből tisztított, változó hosszúságú, rekombináns Ta0547 fonalak. B) A metszetek 2D-s átlagolása a szerkezet szabályos, pseudo-helikális elrendeződését mutatja.

A tisztított Ta0547 specifikus antitesteket használtuk ezután csaliként az immuno-precipitációs kísérletekben a TaKT-ek megkötésére és tisztítására a natív Ta0547-tel való kölcsönhatás révén. Az eluált frakciókat SDS-PAGE-val és a ráépülő MALDI-TOF-MS-sel analizáltuk, hogy igazoljuk az antitest specificitását. A Ta0547 mellett csak néhány alig látható fehérje sávot találtunk (9. B ÁBRA). Az antitestekkel tisztított, natív Ta0547 negatív festésű EM analízise során gömb alakú testeket lehetett megfigyelni, hasonló méretűeket és alakúakat, mint az oszlopkromatográfiás tisztítások során (9. B ÁBRA). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a Ta0547 valóban a TaKT-ek fő protein komponense.

### 4.3 A Ta0547-es fehérje bioinformatikai elemzése

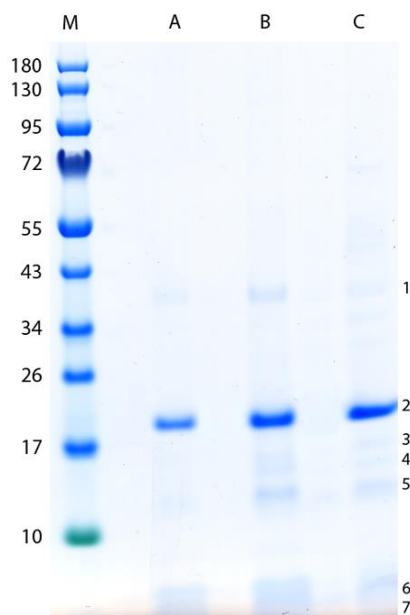
A Ta0547 fehérje az UniProt adatbázis annotációja alapján ismeretlen funkciójú. A prediktált másodlagos szerkezet alapján szolubilis, szignál peptidet illetve transzmembrán domént nem tartalmaz. Az aminosav szekvencia alapján főleg  $\alpha$ -hélixekből és rövid  $\beta$ -redőkből és az N-láncvégnél található kis kiterjedésű rendezetlen régiókból áll (11. ÁBRA).



**ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY - 1. tézis, 4.2 és 4.3 fejezetek alapján: Az izolált *Thermoplasma* kinontestek fő fehérje komponense a Ta0547. A Ta0547-es fehérje a bioinformatikai elemzés alapján egy vitellogenin N-domén homológ. Az eredményeket nemzetközi publikációban adtuk közre (Nagy és mtsai., 2016).**

#### **4.4 A TaKT-ekkel asszociált fehérjék azonosítása LC-MS/MS és Edman degradáció módszerekkel**

A TaKT asszociált fehérjék és a proteom analitikai módszerek érzékenysége miatt detektált szennyeződések elkülönítésére az immunprecipitációs illetve oszlopkromatográfias kísérletekből származó frakciókat LC-MS/MS analízisnek vetettük alá (**6. MELLÉKLET**). Azokat a fehérjéket melyek csak az egyik kísérletben voltak kimutathatóak vagy a TaKT-eknél sokkal kisebb molekulatömegű peptideket és fehérjéket, mint például Ta1475, termoszóma, riboszóma, proteaszóma...stb. nem vontuk be a vizsgálatokba. A kritériumokat végül 7 fehérje teljesítette: Ta0547, Ta0337, Ta0437, Ta0438, Ta0182, Ta0093 és Ta1223a, melyek nagy valószínűséggel a TaKT-ek komponensei lehetnek (**6. MELLÉKLET**). Ezek a fehérjék a Ta0437-es fehérjét leszámítva kisebbek mint 20 kDa. A Ta0547, Ta0182, Ta0438 és Ta0337 funkciója nem ismert, a BLAST keresés leginkább termoacidofil archaeákban eredményezett találatokat úgymint *T. volcanium*, *Picrophilus torridus*, *Sulfolobus solfataricus*, *S. acidocaldarius*, *S. tokodaii* és *Ferroplasma acidarmanius*. A felsorolt fehérjék közül a Ta0182 homológjai általánosan előfordulnak prokariótákban, míg a Ta0438 géntermék homológjai kizárólag *Thermoplasma* törzsekben találhatóak meg. A Ta1223a az archaeák Sec független iker arginin transzlokázaival, míg a Ta0437 számos organizmusban előforduló, anion transzporter és oxianion transzlokáz ATP-ázokkal mutatott homológiát. A kisméretű fehérjék MS alapú mennyiségi meghatározása során jelentkező általános problémák ellenére megkíséreltük a TaKT-ekben lévő fehérjék relatív mennyiségét kiszámolni. Az eredmények szerint (**6. MELLÉKLET**) az expressziós arányok nagyfokú változatosságot mutattak, egyedüli következtetésként a Ta0547-es fehérje dominanciája volt levonható. A Ta0547 és a többi TaKT asszociált fehérje aránya megközelítőleg 8:1.



**12.ÁBRA:** TaKT asszociált fehérjék grádiens NuPAGE 4-12% Bis-Tris gélen elválasztva. Az elválasztott fehérjék analízise Edman degradációval és LC-MS/MS-sel történt. A molekulatömeg marker referenciapontjai kDa-ban vannak feltüntetve. A TaKT-eket oszlopkromatográfiával (A) vagy immunprecipitációval (B és C) tisztítottuk aerob (A és B) vagy anaerob (C) környezetben tenyésztett sejtekből. Az 1-7-ig megszámozott sávok TaKT fehérjék: **1.**: Ta0547 dimer (N-terminális szekvencia: KEKKD), **2.**: Ta0547, **3.**: Ta0547 (N-terminális szekvencia: VSELA), **4.**: Ta0438 (N-terminális szekvencia: MDIE) és Ta1223a (N-terminális szekvencia: MLDSA) keveréke, **5.**: Ta1223a (N-terminális szekvencia: MLDS). A felsorolt fehérjéket Edman degradációval azonosítottuk. A 6-os és 7-es sávot degradált Ta0547 fehérjéként azonosítottuk LC-MS/MS-sel. Ezekben a sávokban a Ta0547 peptidok mennyisége megközelítőleg 100-szorosa a többi együtt migráló fehérjék peptidjeinek.

A minta tisztaságának felméréséhez, illetve a TaKT asszociált fehérjékhez használható keresztvizsgálathoz az oszlopkromatográfiás és immunprecipitációs kísérletekből származó frakciókat NuPAGE 4-12% Bis-Tris géltre töltöttük és Coomassie blue-val festettük (**12. ÁBRA**), vagy Edman degradációval történő N-terminális aminosav meghatározáshoz PVDF membránra blottoltuk (**7. MELLÉKLET**). Érdekes módon az 1-es és 3-as sáv a Ta0547 csonka változatának bizonyult, KEKKD és VSLA szekvenciákkal az N-terminális végen. Az 1-es sávhoz tartozó molekulásúly kétszer akkora volt, mint az intakt Ta0547. Feltehetően az 1-es sávot megrövidült Ta0547 molekulák dimerizált populációja alkotja, melyeket a tisztításkor alkalmazott körülményekkel nem sikerült egymástól elválasztani. A 4-es sáv a Ta0438 (az N terminális MDIE szekvencia mutatja a második metioninnál kezdődő transzkripciós startot) és Ta1223a (MLDSA) fehérjék keveréke volt, míg az 5-ös sáv a Ta1223a-hoz tartozott (MLDS) (**7. MELLÉKLET**). A 6-os és 7-es sávot alkotó fehérjék N-terminális szekvenciáit nem sikerült meghatározni, mivel a blottolás során nem sikerült megkötni a fehérjéket a membránon. Mindazonáltal az említett két sáv fehérjéit gélben emésztéses LC-MS/MS analízise kimutatta, hogy főként Ta0547 csonka vagy

emésztett peptidjeiből állnak, melyek hozzávetőlegesen 100x nagyobb mennyiségben voltak jelen, mint más együtt migráló fehérjék. Végül a Ta0547 degradációs termékeit tartalmazó, alacsony molekulatömegű pozícióban lévő sávok összetételének megerősítéséhez, illetve az esetlegesen jelenlévő egyéb fehérjék kimutatásához elvégeztük denaturált, de emésztetlen TaKT asszociált fehérjék LC/MS vizsgálatát ami ugyancsak a Ta0547, Ta1223a, Ta0438 és Ta0093 jelenlétét igazolta (**9. MELLÉKLET**). A Ta0547 fehérjék csonka és/vagy emésztett változatainak megjelenésének oka és esetleges funkciója jelenleg ismeretlen.

Transzmembrán domének (TM) kereséséhez a 7 TaKT asszociált fehérjét TM domén felismerésre tervezett, DAS-TM filter (Cserző és mtsai., 2002; Cserzo és mtsai., 2004), Tmpred (Hofmann és Stoffel, 1993), Phobius (Käll, Krogh és Sonnhammer, 2004, 2007) és HMMTOP (Tusnády és Simon, 1998, 2001) szoftverek segítségével bioinformatikai elemzésnek vetettük alá (**3.8**). A Tmpred elemzés a Ta0437, Ta0182, Ta0337 és Ta1223a esetében prediktált TM doméneket, azonban csak a Ta1223a és Ta0337 esetében adott szignifikáns találatot. A legszigorúbb feltételekkel kereső DAS-TM filter módszerrel a Ta1223a és Ta0337 fehérjékben találtunk potenciális TM doménket, azonban az utóbbi a lekérdezett TM fehérje adatbázissal történő összevetés után nem bizonyult szignifikánsnak. A másik két módszer (Phobius és HMMTOP) szintén azonosított TM doméneket a Ta1223a és Ta0337 fehérjékben. Az eredmények azt sugallják, hogy a Ta1223a valószínűleg, a Ta0337 pedig talán TM fehérje. A többi fehérje, a Ta0547-tel együtt, nem rendelkezik TM doménnel (**2. TÁBLÁZAT**).

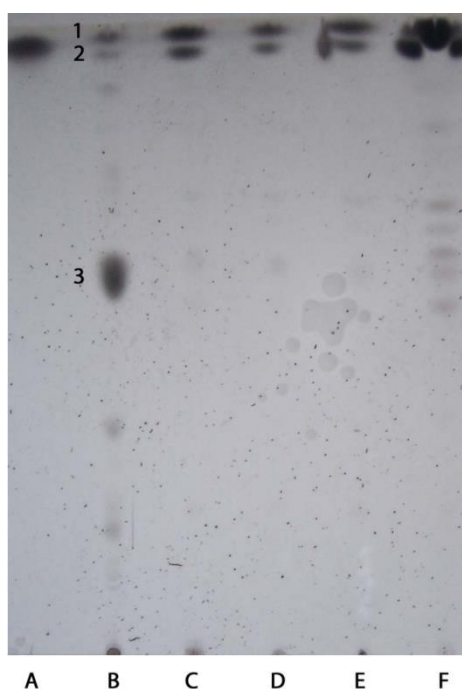
**2. TÁBLÁZAT:** A 7 TaKT asszociált fehérje aminosav szekvenciájában transzmembrán (TM) domén predikációs szoftverekkel (DAS-Tmfilter, Tmpred, Phobius és HMMTOP) detektált TM doménjeinek pozíciói.

<b>Feltételezett TM hélix pozíció</b>				
<b>Fehérje</b>	<b>DAS-TMfilter</b>	<b>Tmpred</b>	<b>Phobius</b>	<b>HMMTOP</b>
Ta0547	-	-	-	-
Ta0437	-	(12-32) (130-150) or (9-29) (135-154) *	-	-
Ta0438	-	-	-	-
Ta0337	106-116 *	102-119	100-119	103-119
Ta0093	-	-	-	-
Ta0182	-	(37-53) vagy (41-58) *	-	-
Ta1223a	7-21	(5-23) vagy ( 4-20)	6-22	4-21

\* nem szignifikáns találatok

#### 4.5 A TaKT-ek nem fehérje komponenseinek vizsgálata vékonyréteg kromatográfiával, ultraibolya spektroszkópiával és LC/MS-sel

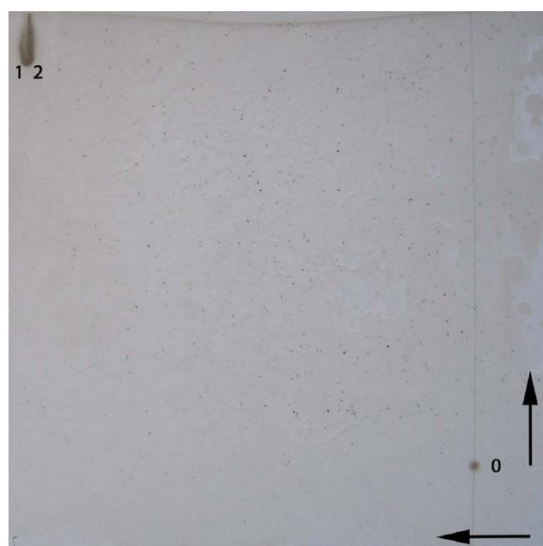
A más organizmusokban előforduló lipidtestekre emlékeztető TaKT-ek izolálását és mikroszkópos megfigyelését követően a lehetséges lipidkomponensek kimutatása vékonyréteg kromatográfiával (TLC) történt. Az általánosan alkalmazott Bligh-Dyer összlipid extrakciós módszert használtuk (Bligh és Dyer, 1959) a liofilizált *T. acidophilum* sejtek és az izolált TaKT-ek lipid összetevőinek extrakciójához. Az így kivont anyagokat TLC-vel szeparáltuk, és színező eljárásokkal láthatóvá tettünk (Shimada és mtsai., 2002). A TLC lemezeket az elválasztás után UV fényel megvilágítottuk, láthatóvá téve az UV-t elnyelő lipideket. Az UV fényel detektálható lipidek az oldószer frontjaival együtt haladtak, míg az UV fényel nem detektálható lipidek csak kénsavas szenesítés után váltak láthatóvá. A sejtek poláris lipid mintázata jól illeszkedett korábban publikált eredményekhez és két fő lipidkomponens jelenlétét igazolta: gulopiranozil-( $\beta$ 1-1)-caldarchaeol (GuC/U4) és a domináló gulopiranozil-( $\beta$ 1-1)-caldarchaetidilglicerol (GuCGp) (**13. ÁBRA**). A tisztított TaKT-ek esetében a fő komponens együtt vándorolt az oldószer fronttal, így a pozíciója egybeesett az UV-vel detektálható anyagokéval. Később ezt a komponenst menakinonok keverékeként azonosítottuk. Egy kevésbé intenzív jelet adó, lassabban vándorló folt is látható volt, ami megfelelt Shimada és kollégái által azonosított U4 (GuC) komponensnek (Shimada és mtsai., 2002).



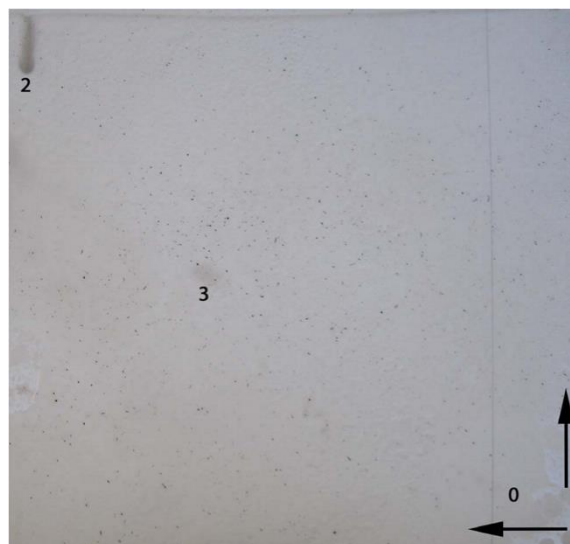
**13.ÁBRA:** *T. acidophilum* sejt kivonat és izolált KT-ek TLC analízise. Rövidítések: **A** MK-4 referencia **B** Liofilizált *T. acidophilum* sejtekből kloroform:methanol:H<sub>2</sub>O (KMV) (65:25:4) elegyével extrahált anyagok. **C** Az

oszlopkromatográfiával tisztított TaKT frakció közvetlenül a TLC lemezre feltöltve. **D** Az immunprecipitációs tisztításból származó eluált frakció közvetlenül a TLC lemezre feltöltve. **E** Liofilizált TaKT-ekből KMV eleggyel extrahált anyagok. **F** TaKT-ekből acetonnal és etilacetáttal extrahált anyagok nagyobb mennyiségben feltöltve a kisebb mennyiségben jelenlévő komponensek detektálásához. A menakinonok az oldószer fronttal együtt migráltak (**1**), a teljes sejtexteraktum poláros lipidjeinek (**B**) eloszlása megegyezett a publikált eredményekkel (Shimada és *mtsai.*, 2002). A *T. acidophilum* két meghatározó poláros lipidje a gulopiranozil-( $\beta$ 1-1)-caldarchaeol (**2**) és a gulopiranozil-( $\beta$ 1-1)-caldarchaetidilglicerol (**3**). A TaKT-ek legnagyobbbrészt menakinonokat tartalmaztak, a második legnagyobb mennyiségben előforduló lipid a gulopiranozil-( $\beta$ 1-1)-caldarchaeol volt. Egyéb poláros lipidek sokkal kisebb koncentrációban voltak jelen, valamint a teljes sejtexteraktum és a KT-ek lipidprofilja teljes mértékben eltért egymástól.

A három független tisztításból származó minták menakinon és U4 intenzitását 2D denzitometriával mértük meg, a kapott adatokból kiszámolt arányuk 147:100 volt. Az említett komponensek mellett több kisebb intenzitású jelet is detektáltunk, azonban a sejtekből és a tisztított TaKT-ekből szerves oldószerrel kivont összetevők TLC mintázata teljesen eltérő volt (**13. ÁBRA**). Az U4 azonosításhoz szükséges referenciaként egy 2D TLC kísérlet (a prokarióták osztályozásához általánosan használt módszer) szolgált. Az izolált TaKT-ekből oldószerrel izolált összetevőket a start pozícióra pipettáztuk (**14. A ÁBRA**), és az 1D futtatáshoz kloroform:metanol:víz (65:25:4, v/v/v) elegyet, a 90<sup>0</sup>-os elforgatás után pedig kloroform:metanol:ecetsav:víz (80:12:15:4, v/v/v/v) elegyét használtuk a futtatáshoz (Tindall és *mtsai.*, 2007). Az eredményeket a GuCGp-ből származtatott kontroll GuC 2D TLC profiljával (**14. B ÁBRA**) vetettük össze (Shimada és *mtsai.*, 2008). A kontroll és a minta U4 foltok retardációs faktora (Rf) azonos volt, ilyen módon az U4 azonosítása bizonyítást nyert.

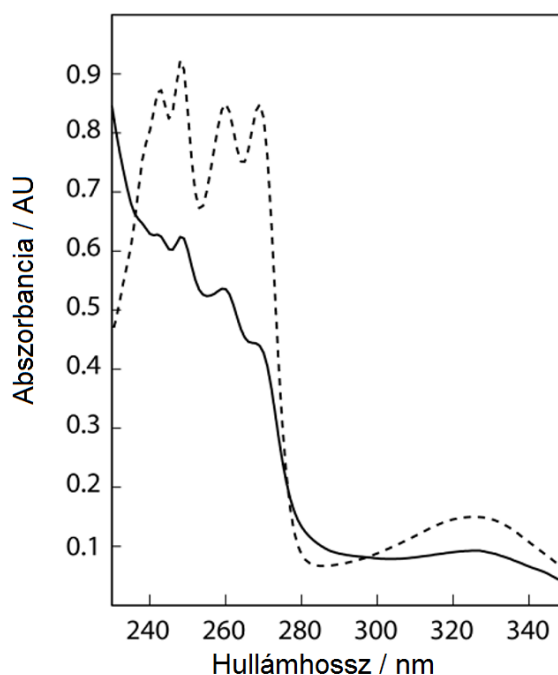


**14. A ÁBRA:** A kezdőpontra (**0**) feltöltött TaKT-ek, 2D TLC-vel a módszertani részben leírtaknak megfelelően elválasztott és előhívott, oldószeres kivonata. A menakinonok és (**1**) és GuC pozíciója (**2**) a TLC lemezen számmal jelölt. A vízszintes nyíl az elválasztás első, a függőleges nyíl a második dimenziójának irányát jelzi. A TaKT GuC (**1**) komponensének Rf értéke 0,96 és 0,91.



**14. B ÁBRA:** A módszertani részben leírtaknak megfelelően 2D TLC-n elválasztott és előhívott, GuCGp-ből (**3**-as száma kiindulási anyag maradékát jelzi) származtatott, kontrollként használt GuC (**2**). A futtatás kiindulópontját (**0**) jelöli. A vízszintes nyíl az elválasztás első, a függőleges nyíl a második dimenziójának irányát jelzi. A GuC (**2**) Rf értéke 0,97 és 0,92.

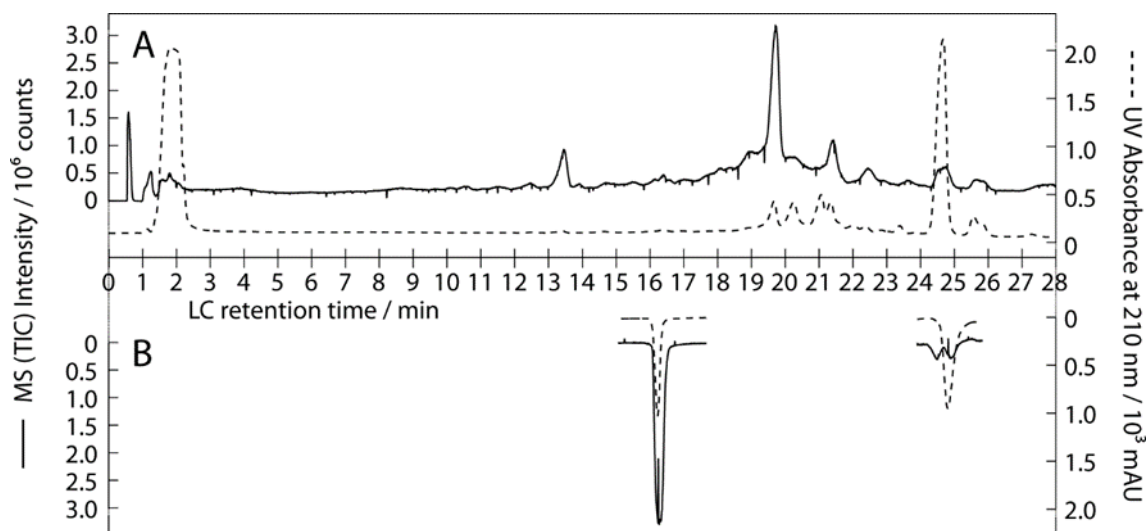
Az U4 azonosítását követően a Shimada és kollégái által nem meghatározott (Shimada és *mtsai.*, 2002), UV fényben látható komponensekre fókuszáltunk. A TaKT-ekből oldószerrel extrahált anyagokat UV abszorpciós spektroszkópiával vizsgáltuk. Az 325 nm, 269 nm, 260 nm, 248 nm és 243 nm-en mért abszorpciós maximumok (**15. ÁBRA**) menakinonok jelenlétére utaltak, melyeknek legismertebb tagja a K2 vitamin (MK-4) (Langworthy, Smith és Mayberry, 1972). Erre az eredményre támaszkodva az UV fényvel detektálható összetevők megkülönböztetéséhez folyadékkromatográfiát (LC) használtunk és az eluált mintákat tömegspektrometriával vizsgáltuk.





**15. ÁBRA:** A referenciaként használt MK-4 keverék UV abszorpciós maximumai 325, 269, 260, 248 és 243 nm-nél találhatóak (szaggatott vonal), ami jó egyezést mutat a TaKT-ekből aceton/etil-acetát eleggyel extrahált anyagok maximum értékeivel (folytonos vonal).

Összességében a C8-as oszlopon alapuló szeparációs módszer bizonyult hatékonynak a menakinonok megkötéséhez és elválasztásához (**16. ÁBRA**) és a felvett tömegspektrumon belül végül 200-nál több összetevőt detektáltunk (**10. MELLÉKLET**). Érdekes módon a különböző LC frakciókban jelentős számú, eltérő m/z értékkel rendelkező komponens mutattunk ki, ami a kiindulási vegyületek izomer alakjaival magyarázható. A TaKT-ek fő komponensének az MK-7 bizonyult, 24,8 perces retenciós idővel és 648(+1) m/z aránnyal. Két kisebb csúcs is látható 20,4 és 21,4 perces retenciós időnél, egyaránt 646(+1) m/z aránnyal. Említésre méltó, hogy a *T. acidophilum* HO-62 törzsnél leírt kinonokat (Shimada és *mtsai.*, 2001) is sikerült megtalálni. A feltételezett thermoplasmaquinone-7 (TPQ-7) (m/z 662(+1)) 25,7 perc míg a feltételezett methionaquinone-7 (MTK-7) (m/z 680(+1)) retenciós ideje 20,4 és 21,4 perc volt. 16,4 perces retenciónál egy kisebb, MK-4-re hasonlító, 444(+1) m/z arányú csúcs található, illetve 19,7 és 13,3 percnél ionok két jelentősebb csúcsa található 466(+1) és 390(+1) m/z aránnyal (**16. ÁBRA**). A referenciavegyületekhez, mint például az MK-4 (16,4 perc) és MK-7 (24,9 perc), tartozó retenciós idők és a detektált m/z értékek nagyfokú egyezést mutattak a TaKT-ek főbb komponenseinek mért retenciós idejével és m/z arányával (**16. ÁBRA** és **10. MELLÉKLET**). Ezen túlmenően, az oldószerrel kivont biológiai eredetű anyagok összetételében bekövetkező változások nyomon követéséhez a mintákat zsírsav és kinon analízisre küldtük a DSMZ-be. A 2 napos sejt kultúrából származó TaKT-ek kinonprofilja a következőképpen alakult: 93% MK-7, 5% MMK-7 (TPQ-7) és 2% MK-6. A 6 napos kultúrák esetében a komponensek aránya megváltozott, 100%-ban MK-7, nyomokban MMK7 (TPQ-7) volt kimutatható, míg a zsírsav analízis nem eredményezett találatot. Legvégül a TaKT-ek fehérje/lipid arány meghatározása céljából megmértük a kicsapott és újra oldatba vitt fehérjék koncentrációját és az extrahált kisméretű komponensek tömegét. A fehérjék koncentrációjából kiszámított mennyiség és az oldószeres extrakcióból származó komponensek tömege 1:10 arányban viszonyult egymáshoz.

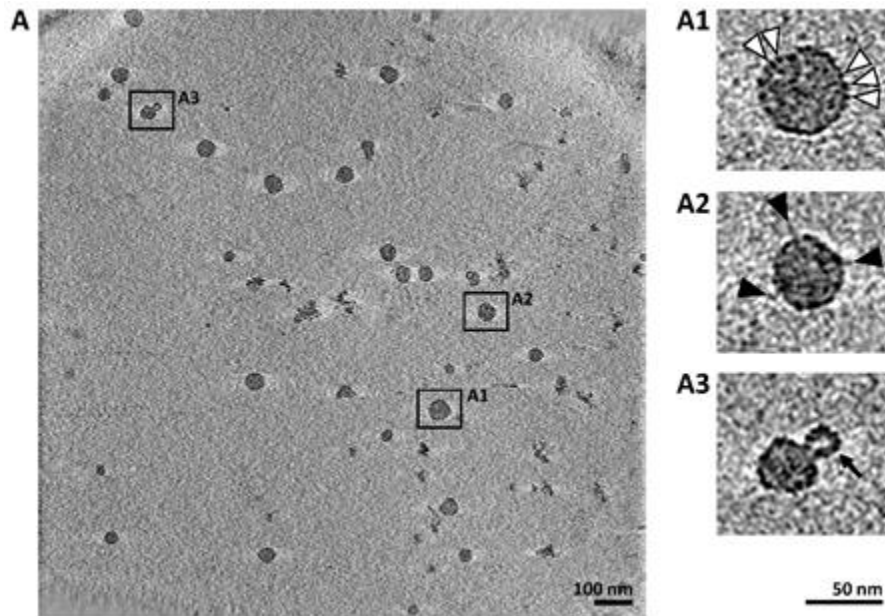


**16. ÁBRA** Az A) ábrán a két napos kultúrákból kivont és C8-as oszlopon elválasztott TaKT-ek LC kromatogramja, amelyen az MK-4 (m/z 444), MTK-7 (m/z 680), MK-7 (m/z 648), TPQ-7 (m/z 662) vegyületek voltak detektálhatóak 16,4; 21,4; 24,8; és 25,7 percnél. A 390 és 466 m/z arányú és 13,5 és 19,7 perc retenció idejű összetevők nem kerültek azonosításra. A B) ábra a K2-4 és K2-7 vitamin referencia retenció idejét mutatja 16,4 és 24,8 percnél. Az ionok intenzitását folytonos, az UV intenzitást szaggatott vonallal jelöltük.

**ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY - 2. tézis, 4.5 fejezet alapján:** Az izolált *Thermoplasma* kinontestek fő lipid összetevői a menakinon-7 és a gulopiranozil-( $\beta$ 1-1)-caldarchaeol illetve kisebb mennyiségben tartalmaznak metilmenakinon, methionaquinone-7, thermoplasmaquinone-7 és menakinon-4 vegyületeket. Az eredményeket nemzetközi publikációban adtuk közre (Nagy és mtsai., 2016).

#### 4.6 A TaKT-ek karakterizálása krio-ET-vel

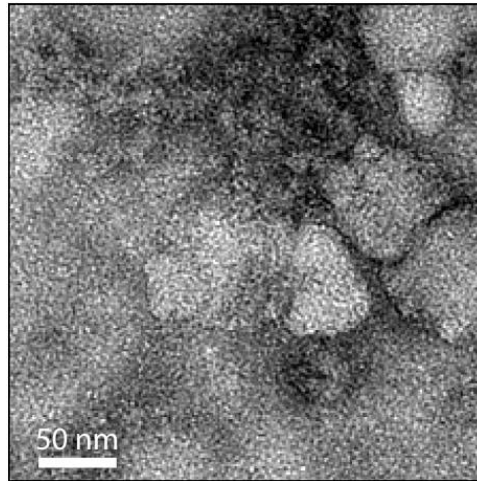
Hogy további betekintést nyerjünk a TaKT struktúrájába, a méretkizárásos kromatográfiával tisztított TaKT-eket a képi információt közvetlen elektron detektorral észlelő krio-elektromográfiaival vizsgáltuk. Az *in situ* megfigyeléseket alátámasztva, a TaKT-ek hozzávetőlegesen gömb alakúak és 25-60 nm-es átmérőjűek (**17. A ÁBRA**). A TaKT-ek többsége egy elektrondenz belső térrel rendelkezik, amit egy tömörebb határoló rész vesz körül. Egyes esetekben egy kisebb, üres belső résszel rendelkező, gömb alakú struktúra csatlakozott a nagyobb és tömör belső résszel rendelkező testekhez (**17. A3 ÁBRA**). A TaKT-ek határa nem volt folytonos, úgy tűnt, hogy diszkrét, egymással összeköttetésben álló, ~4 nm nagyságú, sűrűbb részek csoportosulásából áll össze (**17. A1 ÁBRA**), azt sugallva, hogy ez a határoló rész nem lipid természetű. Egyes esetekben hasonló globuláris képletek megfigyelhetőek voltak a TaKT-ek belső terében is. A testek külsejéhez rögzített, kifelé álló tüske alakú struktúrák is megfigyelhetőek voltak (**17. A2 ÁBRA**).



**17. ÁBRA:** Méretkizárásos kromatográfiával tisztított TaKT-ek krio-elektronmikroszkópos képe. Az összes ábra 1,7 nm vastag tomográfias metszetet reprezentál. A) Egy jellegzetes tomogram áttekintése. A1-A3) Az eredeti kép bekeretezett részei megnövelt nagyításban. A1) A fehér nyílhegyek néhány, a TaKT határát alkotó, összeköttetésben lévő, sűrűbb struktúrára mutatnak. Hasonló struktúrák megfigyelhetők a TaKT-ek belsejében is. A2) A fekete nyílhegyek a TaKT határvonalából kiálló tüske alakú struktúrákat jelölik. A3) A fekete nyíl egy nagyobb, sűrűbb belső terű testből leváló vagy vele összeolvadó kisebb méretű és világos lumenű struktúrára mutat.

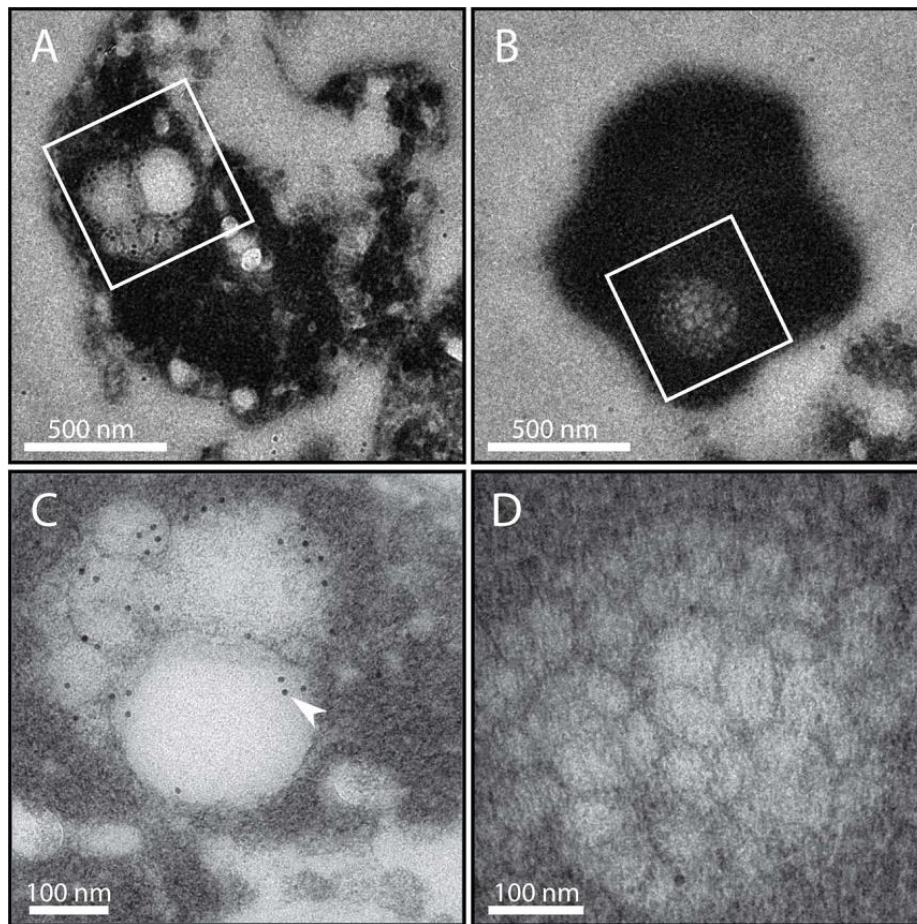
#### 4.7 A Ta0547 szerepe a struktúra kialakításában

A Ta0547 TaKT-ek struktúrájában, kialakulásában és/vagy stabilizálásában betöltött szerepének vizsgálatához elektronmikroszkópos megfigyelést alkalmaztunk, amihez negatívan festett, tisztított TaKT-ek frakcióit használtuk, lépcsőzetesen növelt NaCl koncentrációjú környezetben (0,125, 0,25 és 0,5 M). Az ionerősség növelése elindít egy lassú nukleációs/összerendezési folyamatot, (hetek alatt történik) és kisebb részek összeolvadásával vagy bekebeleződése révén nagyobb és sötétebb struktúrákat eredményez (**9. C ÁBRA**). A struktúra biokémiai jellemzéséhez kis mennyiségű, tisztított TaKT mintákat tripszinnel, nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) illetve n-dodecil- $\beta$ -D-maltoziddal (DDM) kezeltük. Az SDS (0,1%) kezelés pozitív kontrollként szolgált, mivel mind a membrán, mind a fehérje struktúrákat denaturálja és ennek megfelelően a TaKT-ek integritása megszűnt a kezelés hatására. Meglepő módon a membránfehérjék izolálására is használt DDM-es (10%) kezelés nem befolyásolta a testek struktúráját, ami egy feltételezett lipid határolóréteg hiányát jelezte. Ezzel ellentétesen a tripszines kezelés a testek széteséséhez vezetett (**18. ÁBRA**), ami feltehetőleg a Ta0547 degradációjára vezethető vissza. Ezek az eredmények együtt ahhoz a feltételezéshez vezettek, miszerint a Ta0547 kiemelt szerepet játszik a TaKT-ek szerkezetének kialakításában.



**18. ÁBRA:** A kromatográfiával tisztított és tripszinnel kezelt TaKT-ek elektronmikroszkópos mikrografiája. A kinontestek integritása 3 órás tripszines emésztést követően felbomlott és a gömb alakú struktúrák peptidek, menakinonok és GuC amorf, alig detektálható halmazává váltak.

A Ta0547 fehérje *T. acidophilum* sejteken belüli lokalizációjához a sejtekből készített vékony metszeteken poliklonális antitestekkel immunfestést végeztünk el. A Ta0547 fehérjék főleg a TaKT-ek felszínén fordultak elő, azonban nem sikerült bizonyítani egy folytonos fehérjeburok meglétét (**19. ÁBRA**). Mindez jó egyezést mutat az EM analízissel, ami szintén nem igazolta sem egy folytonos fehérjeréteg vagy egy lipid határolóburok jelenlétét (**17. ÁBRA és 11. MELLÉKLET**).



**19. ÁBRA:** A) Műgyantába ágyazott, Ta0547 poliklonális nyúl antitestekkel immunjelölt *T. acidophilum* sejtek. C) KT-eket tartalmazó *T. acidophilum* sejtek erősebb nagyításban. A Ta0547 fehérjék pozícióját arany szemcsék jelölik (egy ilyen szemcsére mutat a fehér nyílhegy). B) és D) A Ta0547 antitestek nélküli kontrollkísérletek esetében nem láthatóak specifikusan kikötődött arany szemcsék.

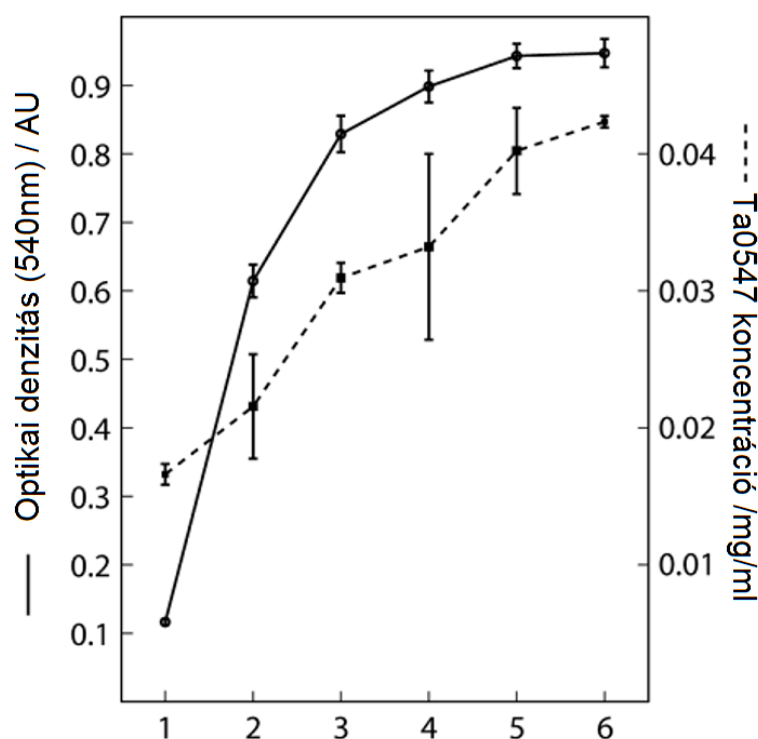
**ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY - 3. tézis, 4.6 és 4.7 fejezet alapján:** Az elektronmikroszkópos megfigyelések alapján a kinontestek megközelítőleg gömb alakúak, 25-60 nm-es átmérővel rendelkeznek és egy diszkrét egységekből álló réteg határolja őket, a Ta0547-es fehérje kulcsfontosságú szerepet játszik a megfelelő szerkezet fenntartásában. Az eredményeket nemzetközi publikációban adtuk közre (Nagy és mtsai., 2016).

#### 4.8 A Ta0547 expressziós szintjében bekövetkező változások nyomonkövetése

A TaKT-ek komponenseinek azonosítását követően megkíséreltük a testek lehetséges fiziológiai szerepének meghatározását azáltal, hogy nyomon követjük a környezeti hatások következtében a

Ta0547 expressziós szintjében bekövetkező esetleges változásokat. Ehhez Western blot analízissel monitoroztuk több változó hatását, úgymint megnövelt pH, aerob és anaerob környezet és a növekedési görbe. A tesztelt környezeti paraméterek érdekes módon egyik esetben sem befolyásolták a Ta0547 expressziós szintjét a kultúra elindítását követő 2. napig. Azonban a 6 napon át szaporított kultúra esetében a Ta0547 szintje folyamatosan növekedett (**20. ÁBRA**).

Az eddigieket összegezve elmondható, hogy az eredmények elsőként igazolják lipidtestszerű képletek jelenlétét *T. acidophilum* sejtekben. Ezek fő alkotóelemei a Ta0547, menakinonok és a GuC lipid. Ezekre az eredményekre alapozva a testecskék elnevezésére a Thermoplasma kinontest (Thermoplasma Quinone Droplet) nevet javasoljuk.



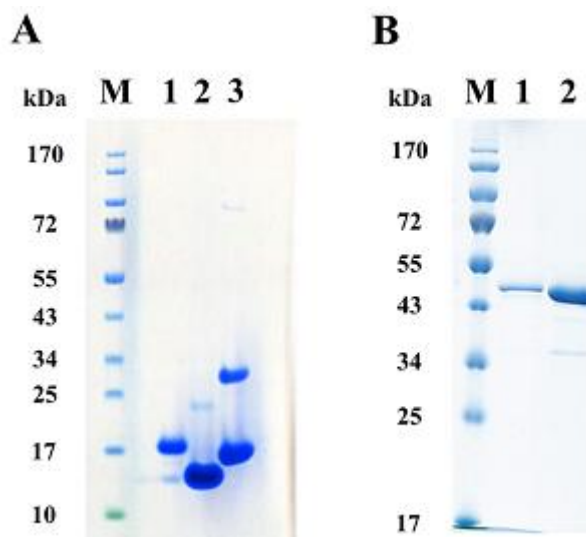
**20. ÁBRA:** A kvantitatív Western blot analízis alatt mért Ta0547 expressziós szint (szaggatott vonal) korrelál a *T. acidophilum* kultúrák sejtdenzitásával (folytonos vonal). A sejtek denzitását naponta mértük ( $OD_{540}$ ), ezzel egyidőben mintát vettünk a Western blot analízishez. A kísérlet addig tartott, amíg a sejtek denzitása el nem kezdett csökkenni (7. nap). A sejt kultúrák a 3. napon érték el a stationer fázist, ezt követően az OD érték 0,9 maradt, azonban a Ta0547 expressziós szintje lineárisan nőtt egészen a sejtek haláláig. A pontok 3 független sejt kultúra, illetve sejt extraktum átlag értékeit reprezentálják, a hiba vonalak a szórás mértékét jelzik.

**ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY - 4. tézis, 4.8 fejezet alapján: A kinontesteket alkotó menakinonok és Ta0547 fehérjék mennyisége 6 napos sejtenyésztési ciklus esetében folyamatosan nőtt. Az eredményeket nemzetközi publikációban adtuk közre (Nagy és mtsai., 2016).**

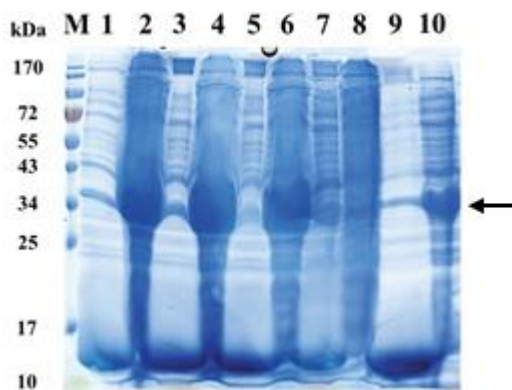
#### 4.9 A feltételezett *T. acidophilum* SAMP-ok expressziós tesztje *E.coli*-ban

A *T. acidophilum* Ta0895, Ta1019 és Ta1442 kodon optimalizált, feltételezett SAMP homológok expressziós kísérletei *E. coli*-ban jó kiindulási alapot szolgáltattak a szolubilizáló tagként való további felhasználásra. Mindhárom fehérje nagy mennyiségben termelődött és a minták tisztasága közel homogénnek volt tekinthető a NiNTA tisztítást követően (**21. A ÁBRA**). A tisztaságnak ez a foka jól mutatta, hogy nem volt jelen olyan *E. coli* fehérje ami kölcsönhatásba tudott volna lépni és így kötődni a vizsgált SAMP-okkal a tisztítás során. A Ta0895 volt a legígéretesebb fúziós tag fehérjeként használható jelölt, ugyanis amellett, hogy nagy tisztaságban és koncentrációban termelődött *E. coli*-ban, a többi SAMP-hoz képest ez a fehérje expresszáldott a legnagyobb mennyiségben a *T. acidophilum*-ban (Sun és mtsai., 2010). A fúziós fehérjeként a szintetikus, kodon optimalizált Ta0895 verziót használtuk. Az 5' és 3' végeken *NcoI* és *XhoI* restrikciós helyekkel határolt DNS szakasz tartalmazott egy 8His-taget (**5. A MELLÉKLET**) vagy egy StrepII-taget (**5. B MELLÉKLET**), a Ta0895 gént és egy TEV hasítóhelyet. A TEV hasítóhelytől downstream irányban elhelyezkedő *NdeI* és *XhoI* restrikciós hasítóhelyek közé beillesztettünk egy multiklónozó régiót a cél génnek inszertálásához (**5. MELLÉKLET**). A Ta0895 fúziós fehérje gén Duet vektorokba való inszertálását követően a PCR-rel amplifikált *ScRpn11*, egy zárványtest képzésre hajlamos 26S proteaszóma 19S alegység fehérjét kódoló gént (**22. ÁBRA**), a Ta0895 géntől downstream inszertáltuk. A ragadós végek előállításához *NdeI* és *XhoI* restrikciós endonukleázokat használtunk, majd az így kezelt DNS szakaszt pETD\_8HisTa0895TEV és pRSF\_STREPIITa0895TEV vektorokba ligáltuk. Az expressziós tesztek jó eredménnyel zárultak, a fúziós fehérjék nagy mennyiségben termelődtek és a tisztítást követően is oldatban maradtak (**21. B ÁBRA**).





**21.ÁBRA:** **A)** A rekombináns, affinitáskromatográfiával tisztított Ta0895 (1), Ta1442 (2) és Ta1019 (3) *T. acidophilum* SAMP homológok (a 2-es és 3-as minta esetében monomer és dimer formában), valamint **B)** a Ta0895 fehérjéhez (pETD\_8HisTa0895TEV vektorban) fuzionáltatott és SEC eljárással tisztított ScRpn11 fehérjék SDS-PAGE-n megfuttatva (1. és 2. minta az eluált cél fehérje egymást követő frakciói). **M:** molekulatömeg-markerek kDa-ban megadva.



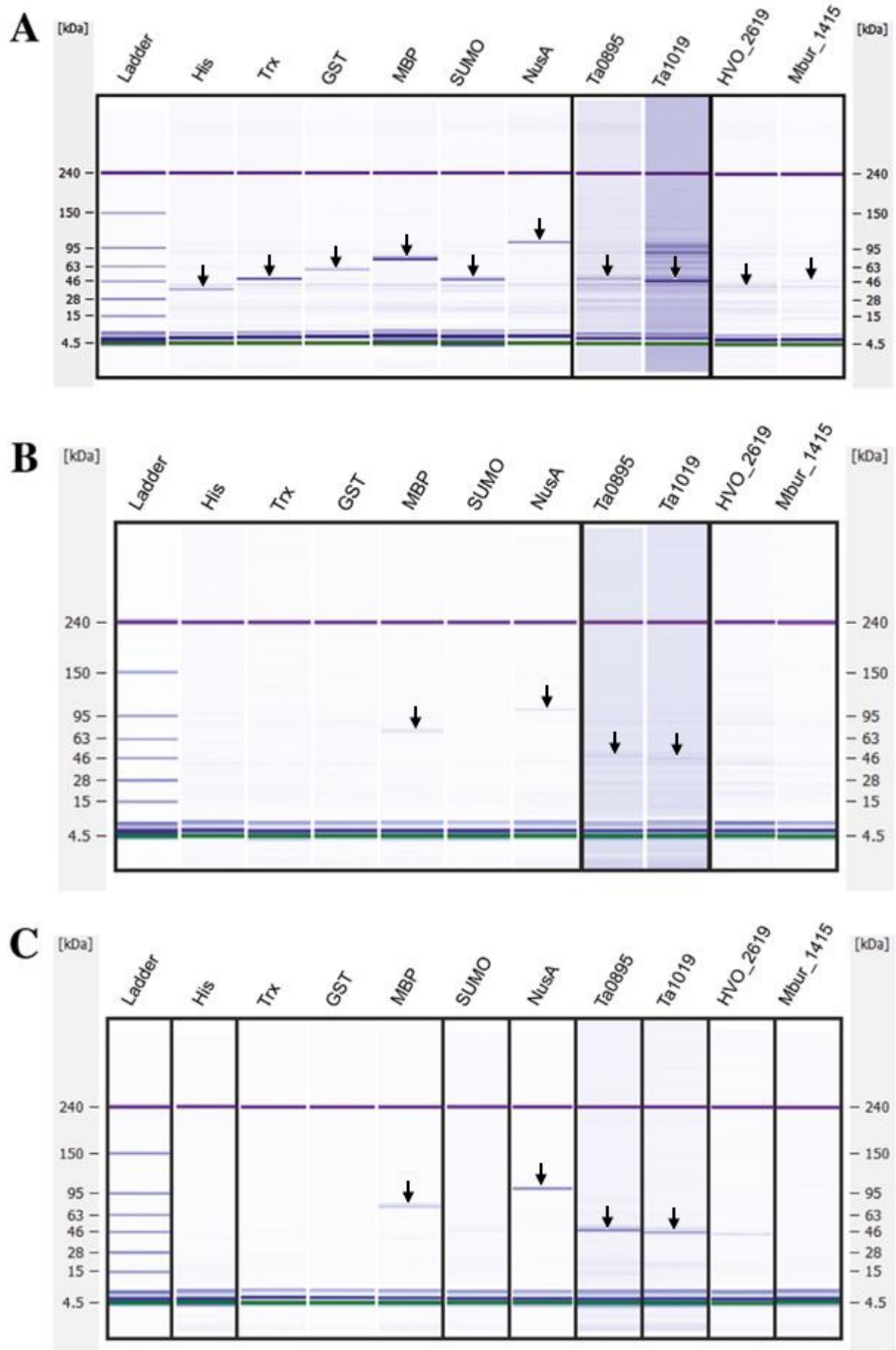
**22. ÁBRA:** SDS-PAGE-n futtatott, heterológ expresszált, *S. cerevisiae* 26S proteaszóma Rpn11 alegység. Az optimalizált szekvenciájú ScRpn11 gént pBAD\_His vektorba klónoztuk *E. coli*-ban történő expresszióhoz. A fehérje expresszió indukciójához használt cukor L-arabinóz (1. és 2. minta), szorbóz (3. és 4. minta) és trehalóz (5. és 6. minta) valamint ezek keveréke (9. és 10. minta) volt. Kontrollként nem indukált mintákat használtunk (7. és 8.). A natív (1., 3., 5., 7. és 9. minta) és denaturáló (2., 4., 6., 8. és 10. minta) protein extrakciós körülmények összehasonlítása azt mutatja, hogy nagy mennyiségű, de oldhatatlan rekombináns fehérje termelődik. Az Rpn11 fehérjék pozícióját az ábra jobb oldalán látható nyíl jelöli.

**ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY - 5. tézis, 4.94.8 fejezet alapján: *E. coli* Expressziós tesztek igazolták, hogy a *T. acidophilum* eredetű SAMP fehérjék képesek az ScRpn11 cél fehérjét oldatban tartani. Az eredményeket nemzetközi publikációban adtuk közre (Varga és mtsai., 2015).**



#### 4.10 A kereskedelmi forgalomban kapható szolubilizáló tagekkel és a SAMP-okkal fuzionáltatott ScRpn11 variánsok oldhatóságának összehasonlítása

A Ta0895 fehérje expresszióra, illetve oldhatóságra gyakorolt relatív hatásának felméréséhez 3 archaea eredetű, Ta1019, Hvo\_2619 és Mbur\_1415, feltételezett SAMP-pal illetve hat, kereskedelmi forgalomban kapható fehérjével, 6His, Trx, GST, MBP, SUMO és NusA hasonlítottuk össze. Az ScRpn11 fehérjét a felsorolt tagek C-terminusához fuzionáltattuk majd *E. coli*-ban expresszáltuk. Az expresszált fehérjék mennyiségét minden tisztítási lépést követően megmértük. A mért rekombináns fehérje / összfehérje arányok denaturáló körülmények mellett a gyári tagek esetében a SAMP tagekhez képest magasabb expressziós szintet jeleztek (**23. A ÁBRA és 12. A MELLÉKLET**). Azonban az oldhatósági tesztek demonstrálták, hogy ezek a magasabb expressziós szintek egyben nagymértékű zárványtest képződéssel is párosultak a SAMP-okkal ellentétben. A rekombináns ScRpn11-ek oldhatóságát a sejtextaktumokból határoztuk meg a rekombináns fehérje / összfehérje jelerősségből (**23. B ÁBRA és 12. B MELLÉKLET**). A tag fehérjéket két mérésorozat átlagértékei alapján rangsoroltuk az alábbiak szerint: 1. MBP-tag: 82,75%; 2. NusA: 44,70%; 3. Ta0895-tag: 36,35%; 4. Ta1019-tag: 34,70%; 5. Sumo-tag: 16,80%; a GST, His, Hvo\_2619 és Mbur\_1415 tagek értékei 15%-nál alacsonyabbak voltak, a Trx-ScRpn11 fúziós fehérje pedig nem volt jelen észlelhető mennyiségben. A His-tag-tisztítást követő rekombináns fehérje/összfehérje arányok a következők szerint alakultak: MBP-tag: 86,10%; NusA-tag: 83,75%; Hvo\_2619-tag: 78,95%; Ta0895-tag: 74,55%; Ta1019-tag: 58,80%; Sumo-tag: 53,65%; Trx-tag: 48,45%; GST-tag: 48,00%; 6His-tag és Mbur\_1415-tag: kevesebb mint 15% (**23. C ÁBRA és 12. C MELLÉKLET**). A méretkizárásos kromatográfiához csak az MBP, NusA, Ta1019 és Ta0895 tagekhez kapcsolt ScRpn11 fehérje minták szolgáltatottak megfelelő mennyiségű kiindulási terméket. A SEC tisztítás után a fehérjék azonosítását LC/MS analízissel végeztük el. Látszólag a hozam a NusA-ScRpn11 és MBP-ScRpn11 fehérjék esetében volt a legmagasabb, azonban figyelembe kell venni, hogy a SAMP-okkal összekapcsolt fúziós fehérjék molekulatömege szignifikáns mértékben kisebb, mint a NusA-ScRpn11 és MBP-ScRpn11 fehérjék tömege. Ezért a kapott értékeket korrigáltuk a fúziós partner molekulatömegével a következő képlet szerint:  $[\text{célfehérje MW}/(\text{célfehérje MW} + \text{tag fehérje MW})] * (\text{célfehérje mennyiség}/\text{összfehérje mennyiség})$ . A korrigált értékek alapján elkészített rangsort a **13. MELLÉKLET** foglalja össze.

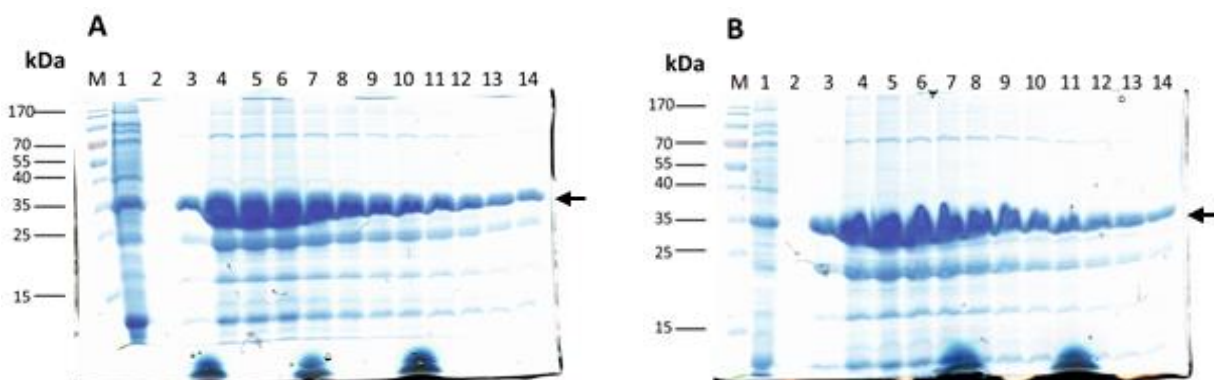


**23. ÁBRA:** SAMP-okkal és gyári szolubilizáló tagekkel fuzionáltatott és expresszált ScRpn11 virtuális gélképei. **(A)** Az oldható és oldhatatlan fehérjéket tartalmazó lizált sejtekből származó minták összehasonlítása. **(B)** Az oldhatatlan fehérjék centrifugálással történő eltávolítását követően a felülúszóban maradó oldható fehérjéket kimutató gélkép. **(C)** Az affinitáskromatográfiás tisztítást követően eluált fehérjék gélképe. A fehérjék elválasztása Agilent Protein 80 kittel történt. A gélképen látható sávok relatív fehérje koncentrációkat reprezentálnak, melyek az egyes fehérjék Agilent 2100 bio-analyzer készülékkel mért lézer indukált fluoreszcenciájának intenzitásából származtathatóak. Az egyes fúziós fehérjéket fekete nyilak jelölik. A lila (240 kDa) és zöld (4,5 kDa) sávok a standard referenciákat jelölik.

**ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY - 6. tézis, 4.104.8 fejezet alapján: Az összehasonlító tesztek eredményei szerint a Ta0895 SAMP volt a leghatékonyabb szolubilizáló partner a vizsgált fehérjék közül. Az eredményeket nemzetközi publikációban adtuk közre (Varga és mtsai., 2015).**

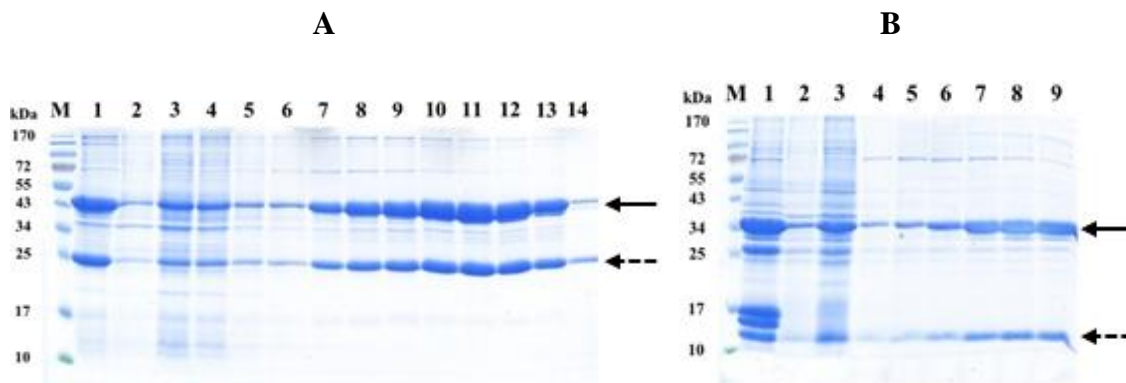
#### 4.11 A Ta0895 fehérje tisztítás utáni szolubilizáló hatását igazoló további kísérletek

A rekombináns, teljes méretű *S. cerevisiae* *Rpn10* és *Rpn13* géneket PCR-rel amplifikáltuk és pETD\_StrepIITa0895TEV vector *NdeI/XhoI* hasítóhelyére inszertáltuk standard klónozási módszerek szerint. Az így létrejött konstrukciókat *E.coli* BL21(DE3) Rosetta kompetens sejtekbe transzformáltuk és a fehérjeexpressziót az A módszer szerint hajtottuk végre (**3.10.2**). A célfehérjék tisztításához első lépésként affinitáskromatográfiát (**3.10.12.1**) használtunk, majd az 1-es módszer (**3.10.12.2**) szerint méretkizárásos kromatográfiát alkalmaztunk. Az említett két fehérjét sikerült homogén tisztaságot elérve oldható formában szeparálni (**24. ÁBRA**), aminek következtében csaliként szolgálhattak egy antitest alapú fehérjetisztítás során.



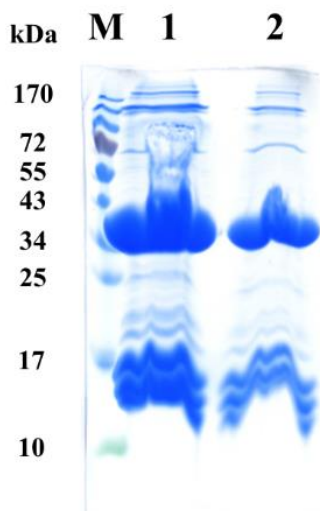
**24. ÁBRA:** Strep-tag affinitáskromatográfiával tisztított és PA gélen megfuttatott StrepTa0895\_ScRpn10 **(A)** és StrepTa0895\_ScRpn13 **(B)** fehérjék. **1.** minta: sejtlyizátum; **2.** minta: mosás; **3-14.** minta: eluált fehérjék. A fúziós fehérjék pozícióját az ábrák jobb oldalán található fekete nyilak jelölik.

A Ta0895 fehérje fuzionáltatása a gyengén oldható ScRpn11-hez az elvárt eredményeket hozta, azonban a Ta0895 eltávolítása TEV proteázzal a tisztított ScRpn11 fehérje kicsapódásához vezetett. Ezért 26S proteaszóma specifikus, tevéből származó antitesteket termeltettünk a 26S proteaszóma alegység ellen és ScRpn11 specificitás alapján szűrtük őket (Pathare és *mtsai.*, 2014). A nanobodykat *E.coli* periplazmában expresszáltuk, hogy megfelelően felgombolyodó és oldható fehérjék jöjjenek létre. Oldható tevé antitestek létrehozásához a citoplazmában a CA7053 nanobodyt a Ta0895 fehérjéhez fuzionáltattuk és a Ta0895-ScRpn11 fehérjével koexpresszáltattuk. A két fehérje stabil komplexet képezett, ami az elúciós puffer optimalizációjával a Ta0895-tagek eltávolítását követően is megtartotta a vízoldhatóságát, ezzel megnyitva a lehetőséget az erre alapuló alkalmazások számára (25. ÁBRA).



**25. ÁBRA:** *E. coli*-ban koexpresszált Strep895\_ScRpn11 és 8His895\_Ca7053 tevé antitest fehérjéket a homogenitás és megfelelő sztöchiometriai arány eléréséhez NiNTA és Strep affinitáskromatográfiával tisztítottuk meg. **A)** Az összevont frakciókat egy Superose 12 oszloppal tovább tisztítottuk és a Strep895\_ScRpn11 (45 kDa) és 8His895\_Ca7053 (25 kDa) célfehérjéket SDS-PAGE-val detektáltuk. **B)** A megtisztított Strep895\_ScRpn11 és 8His895\_Ca7053 16-22 (7-13. minta) frakcióit összevontuk és TEV proteázzal kezeltük, majd egy Superose 12 SEC oszlopra töltöttük fel. A Ta0895 tag nélküli ScRpn11 és Ca7053 fehérjék 35 kDa és 12 kDa pozíciókban figyelhetőek meg. A fúziós- és a proteázzal kezelt fehérjék pozícióját folytonos (ScRpn11) illetve szaggatott (Ca7053) nyilak jelölik.

A Ta0895-öt az emberi antizyme 1 (HAZ1) fehérjéhez is hozzákapcsoltuk és *E.coli*-ban expresszáltattuk. A fúzió eredményeképpen nagy mennyiségű és oldható fehérje termelődött a tisztítást követő precipitáció előfordulása nélkül. Azonban nem várt módon nagymennyiségű Ta0895 fehérje vágódott le a célfehérjéről egy ismeretlen mechanizmus következtében, erre a NiNTA tisztítást követő SDS-PAGE analízis során felbukkanó 15 kDa méretű fehérjesávok (a Ta0895 mérete) engedtek következtetni (26. ÁBRA).



**26. ÁBRA:** NiNTA gyönggyel tisztított Ta0895\_HAZ1 (human antizyme 1) fúziós fehérje. Az eluált frakciókból kis mennyiséget SDS-PAGE-en futtattunk meg. Az oldható Ta0895\_HAZ1 fehérje 35 kDa méretnél található. A túlermeltetett fehérje jelentős része ismeretlen okból elhasadt, a NiNTA gyöngyökhöz a fúziós fehérjéről levágódott His-taggal rendelkező, Ta0895 rész kötődött ki, ami 15 kDa méretnél található.

#### 4.12 A metalloproteázok és a SAMP homológokkal fuzionáltatott ScRpn11 fehérjék expressziója és tisztítása

Az N-terminális végen Ta1019, Hvo\_2619 és Mbur\_1415 SAMP homológokat hordozó ScRpn11 fehérjevariánsokat *E.coli* BL21 (DE3) sejtekben expresszáltattuk (az alacsony expressziós szintek ellenére az utóbbi két fehérjéből kis mennyiségeket előállítottunk analitikai célokra) a C módszer szerint (3.10.2), míg a Ta0895\_VSGG-Ta0547 fúziós fehérjét *R. erythropolis* L88 sejtekben termeltettük az E módszer szerint (3.10.2). Ezek a fúziós fehérjék szolgáltak a további kísérletek során szubsztrátként a JAMM1 proteázok számára. A Hvo\_2505, Nmar\_1227 és Ta0623 JAMM1 metalloproteázok expressziója során a B módszert, az Mbur\_0623 esetében pedig a C/1 illetve C/2 módszert használtuk (3.10.2). A proteázokat affinitáskromatográfiával tisztítottuk (3.10.12.1), proteáz inhibitorok alkalmazása nélkül. Az imidazol eltávolításához utolsó tisztítási lépésként a 2. SEC módszert (3.10.12.2) használtuk. A Ta0623-at kizártuk a további kísérletekből a nagy mennyiségű *E.coli*-ből származó fehérjeszennyeződés miatt, illetve az előkísérletek alapján nem mutatott hasítási aktivitást a Ta0895-ScRpn11 szubsztráton.

#### 4.13 Archaea eredetű metalloproteázok szűrése SAMP hasítási aktivitás alapján

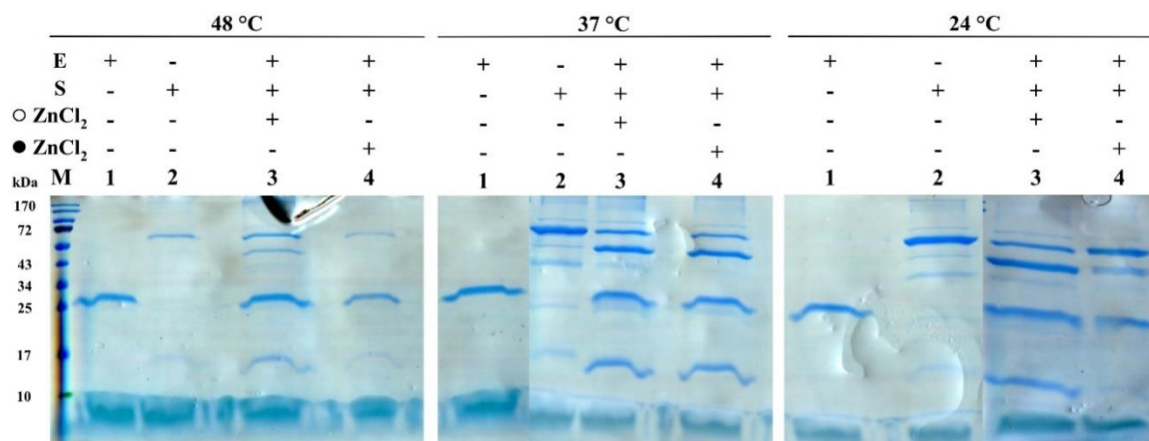
Hogy megvizsgáljuk a SAMP fúziós tagek enzimátikus eltávolításának lehetőségét a Hvo\_2505, Nmar\_1227 és Mbur\_0623 JAMM1 metalloproteázokat a következő SAMP-ScRpn11 és SAMP-Ta0547 szubsztrátvariánsokhoz adtuk: Ta0895\_VAGG-Rpn8-Rpn11, Ta1019-ScRpn11, Hvo\_2619-ScRpn11, Mbur\_1415-ScRpn11 és Ta0895\_VSGG-Ta0547 (**3. TÁBLÁZAT**), majd különböző hőmérsékleteken inkubáltuk a mintákat.

**3. TÁBLÁZAT:** A Hvo\_2505, Nmar\_1227 és Mbur\_0623 JAMM proteázok aktivitásának teszteléséhez használt reakció-összetétel.

Reakció-összetevő	Végkoncentráció
ZnCl <sub>2</sub>	100 μM
Puffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50mM; NaCl300 mM*
Enzim	0,1 mg/ml
Szubsztrát	0,1 mg/ml
Σ:	20 μl, pH 7,0

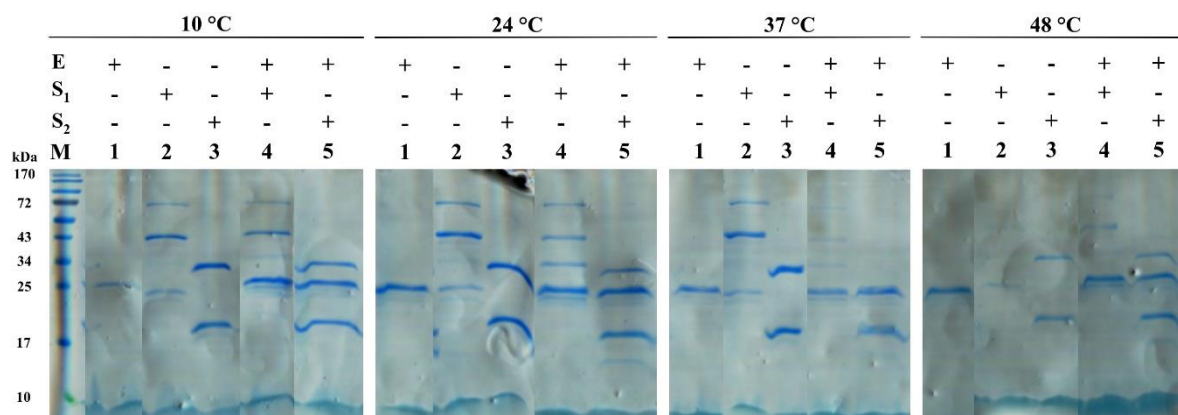
\* A halofil eredetű Hvo enzim esetében a NaCl koncentráció 2M volt (Hepowit és mtsai., 2012)

A kezelt minták denaturáló SDS-PAGE analízise hasítási termékek jelenlétét mutatta ki Hvo\_2505 és Ta0895\_VAGG-Rpn8-Rpn11 párosításánál 53 kDa (Rpn8-Rpn11) és ~14 kDa (Ta0895\_VAGG) pozíciókban. A Hvo\_2505 és Ta0895\_VSGG-Ta0547 reakciója 18 kDa (Ta0547) és ~14 kDa (Ta0895\_VSGG) pozíciókban eredményezett hasítási termékeket. A Hvo\_2505 24, 37 és 48 °C-on mutatott aktivitást, számottevő mennyiségű Ta0895\_VAGG-ScRpn11 (**27. ÁBRA**) és Ta0895\_VSGG-Ta0547 (**28. ÁBRA**) szubsztrátot elhasítva, azonban alacsonyabb hőmérsékleteken (10 °C) nem tapasztaltunk enzimaktivitást. Az összes vizsgált enzim, a Hvo\_2505-öt is beleértve, inaktív volt a Ta1019-ScRpn11 és Mbur\_1415-ScRpn11 fúziós fehérje szubsztrátok esetében. Az SDS-PAGE analízis szerint sem az Nmar\_1227 sem az Mbur\_0623 enzimek nem voltak képesek egyik fúziós tag eltávolítására sem az ScRpn11 fehérjéről a megadott tesztelési körülmények mellett (**28. ÁBRA** és **4. TÁBLÁZAT**).



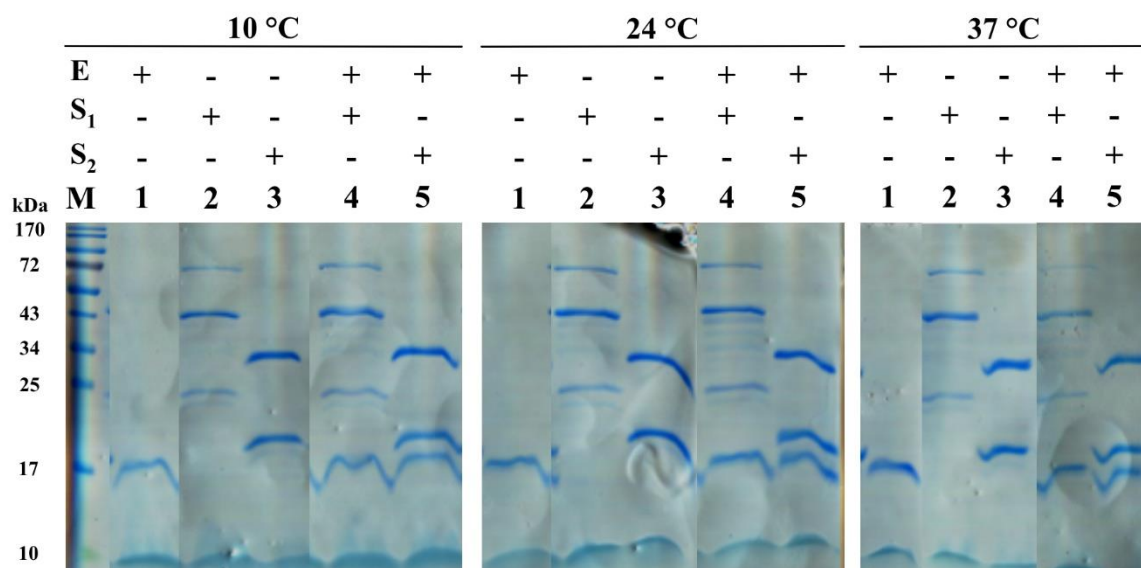
**27. ÁBRA:** A Hvo\_2505 metalloproteáz aktivitása 48, 37 és 25 °C-on Ta0895\_VAGG-Rpn8-Rpn11 szubsztrát jelenlétében. **E:** HVO\_2505 enzim (25 kDa); **S:** Ta0895\_VAGG-Rpn8-Rpn11 szubsztrát (65 kDa); ○ ZnCl<sub>2</sub>: 100 μM ZnCl<sub>2</sub>; ● ZnCl<sub>2</sub>: 100 nM ZnCl<sub>2</sub>. 1 órás inkubációt követően a fúziós fehérjék változó arányban emésztődtek, amit az enzimmel kezelt szubsztrátok mintáinál megjelenő Ta0895 (~14 kDa) és Rpn8-Rpn11 (~53 kDa) fehérjék sávjai jeleznek. Az enzim 37 °C-on, 100 μM ZnCl<sub>2</sub> jelenlétében mutatta a legnagyobb aktivitást, azonban az enzimátikus hasítás sosem volt teljes mértékű.

A

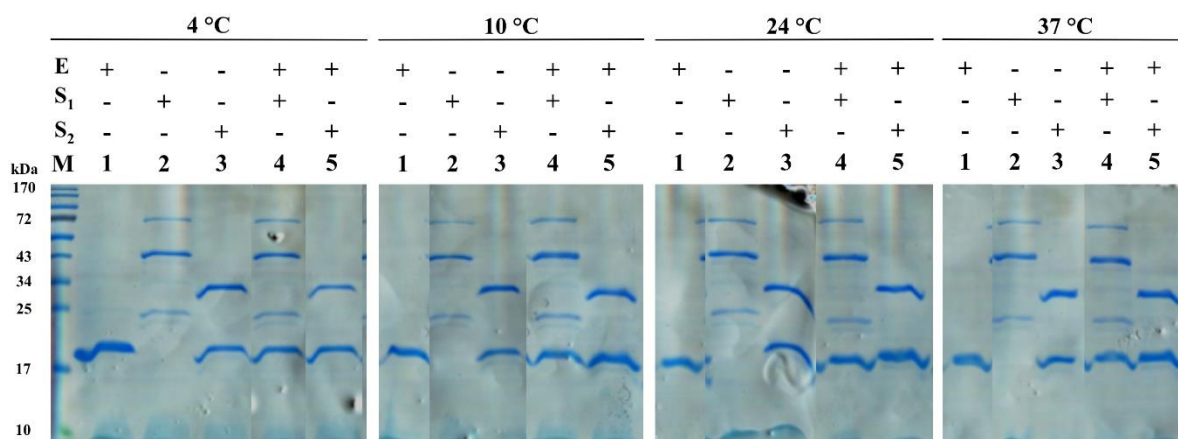




B



C



**28. ÁBRA:** A Hvo\_2505 (A), Nmar\_1227 (B), és Mbur\_0623 (C) metalloproteázok aktivitása Hvo2619-ScRpn11 és Ta0895\_VSGG-Ta0547 szubsztrátok jelenlétében, különböző hőmérsékleteken. Az Nmar\_1227 és Mbur\_0623 enzimeknek nem volt észlelhető hasítási aktivitásuk. A Hvo-2505 esetében mindkét szubsztrát esetében észlelhető volt az enzimaktivitás. A Ta0895\_VSGG-Ta0547 szubsztrát ~14 kDa (Ta0895 fehérje) és ~18 kDa (Ta0547) méretű részekre hasadt, utóbbi együtt migrált a Hvo\_2505 enzimmal. A Hvo2619-ScRpn11 szubsztrát az enzimmal kezelt mintában szintén elhasadt, a 35 kDa méretnél megjelenő extra sáv az ScRpn11 méretéhez közeli, azonban a tag protein nem volt detektálható. E: metalloproteáz; S<sub>1</sub>: Hvo2619-ScRpn11; S<sub>2</sub>: Ta0895\_VSGG-Ta0547



**4. TÁBLÁZAT:** JAMM metalloproteázok enzimaktivitása N-terminális végen SAMP homológokkal összekapcsolt szubsztrát proteinek jelenlétében. A látható mértékű hasítási aktivitást "+" jellel jelöltük. A látható mennyiségű hasítási termékeket nem tartalmazó reakciókat "-" jellel jelöltük. \* A szubsztrát forrása: (Pathare és *mtsai.*, 2014).

JAMM metalloproteáz	Szubsztrát fehérje				
	Hvo_2619- ScRpn11	Ta0895_VSGG- Ta0547	Ta0895_VAGG- Rpn8-Rpn11*	Ta1019- ScRpn11	Mbur_1415- ScRpn11
Hvo_2505	+	+	+	-	-
Nmar_1227	-	-	-	-	-
Mbur_0623	-	-	-	-	-

**ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY - 7. tézis, 4.134.8 fejezet alapján: A Ta0895 fúziós partner specifikus eltávolítása lehetséges a Haloferax volcanii eredetű Hvo\_2505 metalloproteáz enzimmel. Az eredményeket nemzetközi publikációban adtuk közre (Varga és *mtsai.*, 2015).**

#### 4.14 AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. tézis: Az izolált *Thermoplasma* kinontestek fő fehérje komponense a Ta0547. A Ta0547-es fehérje a bioinformatikai elemzés alapján egy vitellogenin N-domén homológ.
2. tézis: Az izolált *Thermoplasma* kinontestek fő lipid összetevői a menakinon-7 és a gulopiranozil-( $\beta$ 1-1)-caldarchaeol illetve kisebb mennyiségben tartalmaznak metilmenakinon, methionaquinone-7, thermoplasmaquinone-7 és menakinon-4 vegyületeket.
3. tézis: Az elektronmikroszkópos megfigyelések alapján a kinontestek megközelítőleg gömb alakúak, 25-60 nm-es átmérővel rendelkeznek és egy diszkrét egységekből álló réteg határolja őket, a Ta0547-es fehérje kulcsfontosságú szerepet játszik a megfelelő szerkezet fenntartásában.
4. tézis: A kinontesteket alkotó menakinonok és Ta0547 fehérjék mennyisége 6 napos sejtenyésztési ciklus esetében folyamatosan nőtt.
5. tézis: *E. coli* Expressziós tesztek igazolták, hogy a *T. acidophilum* eredetű SAMP fehérjék képesek az ScRpn11 cél fehérjét oldatban tartani.
6. tézis: Az összehasonlító tesztek eredményei szerint a Ta0895 SAMP volt a leghatékonyabb szolubilizáló partner a vizsgált fehérjék közül.
7. tézis: A Ta0895 fúziós partner specifikus eltávolítása lehetséges a *H. volcanii* eredetű Hvo\_2505 metalloproteáz enzimmal.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A doktori munka elsődleges célja a *T. acidophilum*-ban felfedezett kinontestek izolálása, biokémiai és strukturális jellemzése volt. A TaKT-eket két különböző módszerrel tisztítottuk és a minták tisztaságát SDS-PAGE-val, TLC-vel, és EM-mel ellenőriztük. Ezen kísérletek szerint a TaKT-ek közel homogén tisztaságot értek el, ugyanis az aerob és anaerob környezetben növesztett sejtekből származó, immuno-precipitációval és/vagy oszlopkromatográfiával tisztított minták fehérje és lipid profilja megegyezett, ezzel szemben szignifikáns mértékben eltértek a sejtek összlipid illetve összprotein profiljától. Ezen túlmenően az izolált TaKT-ek frakcióinak EM vizsgálata során csak nyomokban fordultak elő egyéb makromolekuláris komplexek.

A TaKT asszociált fehérjék azonosítása és referenciákkal való összevetése különféle módszerekkel történt. Az azonosított proteinkészlet az összes eddig ismert lipidtest vagy lipid alapú sejtalkotó összetételétől eltért. Az LC-MS/MS alapú fehérjeazonosítási módszer szerint a Ta0547 a fő illetve a Ta1223a, Ta0438, Ta0093, Ta0182, Ta0337 és Ta0437 proteinek a másodlagos fehérjekomponensek. Ezek a fehérjék a Ta0437-et leszámítva kis molekulatömegűek és többségük hipotetikus fehérje, csak a Ta1223a és Ta0437 néhány homológjának van ismert funkciója más organizmusokban. A fehérjék TM domén analízise szerint a Ta1223a valószínűleg, míg a Ta0337 talán TM fehérje, a többiek nem rendelkeznek TM doménnel. Érdekes, hogy a TaKT-ekkel asszociált fehérjék közül a Ta0093 egy prokarióta hiszton domént tartalmazó, DNS kötő fehérje (Searcy és Delange, 1980). Ez jelentheti azt, hogy a TaKT-ek képesek a nukleoidhoz kötődni, hasonlóan a *Ralstonia eutropha* PHA testjeihez, melyek a PhaM fehérjén keresztül kötődnek (Wahl és mtsai., 2012). A PhaM egy PHA granulum asszociált fehérje phasinszerű tulajdonságokkal rendelkezik és képes DNS-hez és a phasin PhaP5 fehérjéhez is kötődni (Wahl és mtsai., 2012). Szintén meglepő volt a sec független protein transzlokáz TatA (Ta1223a) TaKT alkotóként történő azonosítása, melynek a szerepe még ismeretlen.

Az izolált TaKT-ek TLC analízise 2 jelentősebb lipidet azonosított. Az intenzívebb, oldószer fronttal együtt futó lipid UV-val detektálható volt és a későbbi vizsgálatok menakinonok keverékeként azonosították MMK, TPQ-7 és MK-7 komponensekkel, melyek közül az utóbbi volt a domináns. Ez azért volt szokatlan, mivel az izoprenoid ubiquinonok és menakinonok lipofil, nem-fehérje komponensei a prokariótákban a membránkötött fehérjekomplexek között elektronokat szállító elektrontranszferláncnak. A fő komponens MK-7 valamint az MK-6, MK-5, TPQ-7 (a metilmenakinon (MMK) származéka) és a methioquinone MTK-7 vegyületeket előfordulását már leírták *T. acidophilum*-ban (Collins és Langworthy, 1983; Shimada és mtsai.,

2001), azonban azt sosem feltételezték, hogy a menakinonok nagy része (az UV fényben nem észlelhető U4 poláris lipiddel együtt) a citoszolban található.

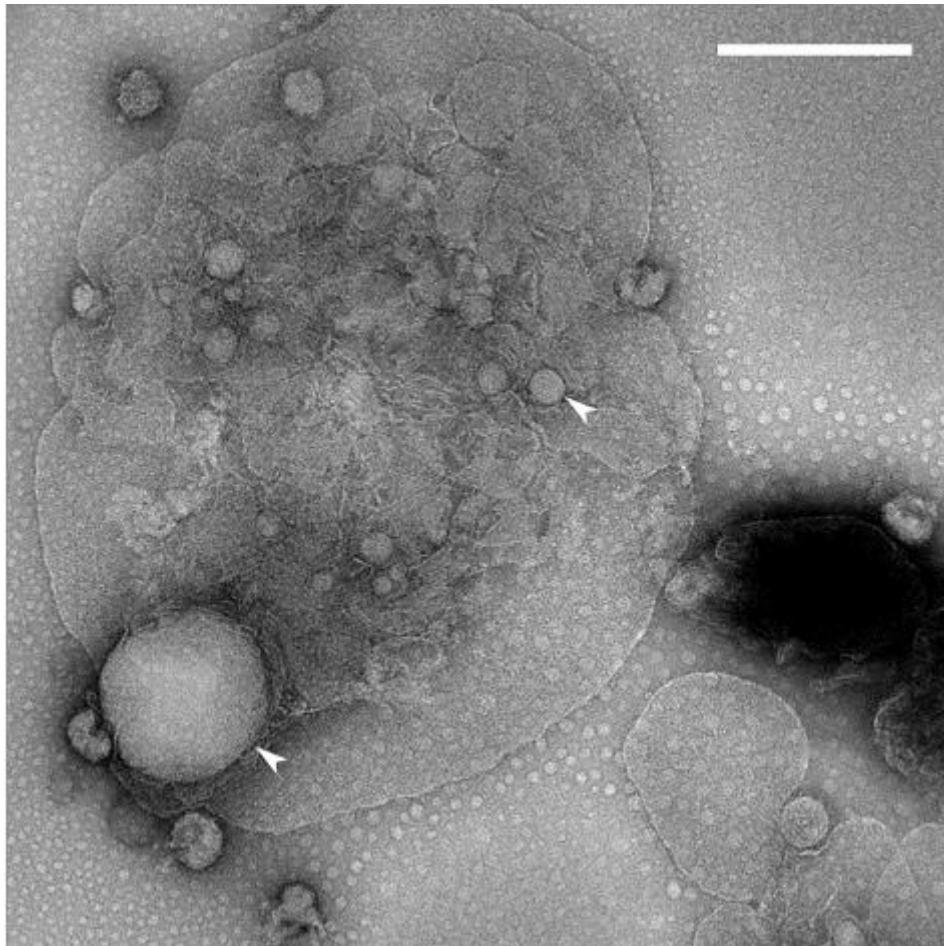
Növényekben és algákban lévő plasztoglobulusokban és plasztidokban kimutatták nem sejtmembránba ágyazódó kinonok akkumulációját (Lohmann és *mtsai.*, 2006; Bréhélin és Kessler, 2008), melyek között neutrális lipidek mint például TAG-ek, szterol észterek és lipofil pigmentek fordultak elő fillokinonokkal együtt. Erre alapozva feltételezték, hogy a plasztoglobulusok rezervoárként működnek, melyek szerepe a környezeti hatásokra adott gyors reakció, melynek célja a fotoszintézishez szükséges homeosztázis fenntartása a megfelelő anyagok koncentrációjának növelésén és csökkentésén keresztül. A plasztoglobulusokkal szemben a TaKT-eket nem határolja lipidmembrán. Említésre érdemes, hogy majdnem az összes *T. acidophilum*-ban azonosított poláris lipid (az U4-et is beleszámítva) szerkezete 2 farokrésznél összekapcsoló foszfolipid molekulából áll össze, egy két poláris fejjel rendelkező molekulát hozva létre (Shimada és *mtsai.*, 2002) (ez a szerkezet a membrán rigiditását és ebből fakadóan a környezeti hatásokkal szembeni ellenállását nagymértékben növeli (Hanford és Peeples, 2002)), melynek EM vizsgálatok során látszódnia kellett volna. Ehelyett a TaKT-ek elektrondenz belső térrel rendelkeznek, amit sűrűbb, diszkrét, 4 nm-es globuláris struktúrákból álló csoportok határolnak szakaszosan, ami arra enged következtetni, hogy ez a határoló struktúra inkább fehérje, mint lipid természetű. Hasonló lehet a helyzet a PHA granuláris struktúrák esetében, melyet elvileg egy foszfolipid membrán vesz körül, azonban ezt a modellt több szerző is megtámadta azzal érvelve, hogy a membrán komponensek az *in vitro* sejt preparálás műtermékei (Wahl és *mtsai.*, 2012).

Valójában az MK-7 és fehérjék közötti komplex képzés nem előzmény nélküli, leírtak ugyanis egy *Bacillus natto* által termelt és kiválasztott 200 kDa méretű MK-7/fehérje komplexet (Yanagisawa és Sumi, 2005), azonban az asszociált fehérjéket nem sikerült azonosítani. Emberben szintén leírtak K2 vitaminhoz kötődő lipoprotein partikulumokat. A vizsgált menakinonok (MK-4, MK-7 and MK-9) előfordulnak triacilglicerolban gazdag, valamint alacsony sűrűségű lipoprotein testecskékben, míg az MK-4 nagy sűrűségű lipoprotein testecskékben is megtalálható volt (Schurgers és Vermeer, 2002).

A TaKT-ek elektronmikroszkóppal megfigyelhető tulajdonságai, a hozzávetőleges gömb alak; a 25-60 nm-es méret; az elektrondenz lumen és az azt szakaszosan határoló sűrűbb határolóréteg; a kisebb méretű, világos lumennel rendelkező gömbszerű struktúrák, melyek leválásra vagy fúzióra utaló módon nagyobb, denz lumenű testekhez kötődnek; a testekhez kötődő tüske alakú struktúrák mind azt jelzik, hogy a TaKT-ek inkább lipoproteinszerű testecskék semmint lipidcseppek. A TaKT-ek és lipid partikulumok (Zhang és *mtsai.*, 2012) között megfigyelt hasonlóság csak a morfológia szintjére korlátozódik, mivel a fő asszociált fehérjék (TaKT proteom illetve

apolipoproteinek) és lipidek (menakinonok és U4 poláros lipidek illetve TAG, koleszterol és foszfolipidek) eltérőek. Ennek ellenére feltételezhető, hogy a TaKT-ek a lipoprotein partikulumokhoz hasonlóan részt vesznek a lipidek sejten belüli transzportjában. Ezt alátámasztja, hogy a lipidtranszporthoz köthető vitellogenin-N domén fehérje (Pfam PF01347) hmm profil alapú illesztése a *T. acidophilum* proteomban egyedül a Ta0547 fehérje esetében adott találatot és a Ta0547 fehérje lipovitellin kristályszerkezet (1LSH) alapján elkészített szerkezeti modellje a lipovitellin helikális doménjének 313. és 435. aminosava közötti régió szerkezetével gyakorlatilag teljesen megegyezett. Tehát a Ta0547 nem szekvencia hanem szerkezeti alapon egy archaeális vitellogenin-N domén homológja az eukarióta LLTP fehérjéknek (egy rövid szakaszon). Bizonyítottuk, hogy a TaKT-eket alkotó menakinon és Ta0547 mennyisége a 6 napos növekedési periódus alatt dinamikusan nő. A biokémiaiilag észlelhető változások mellett a TaKT-eken vizuális változásokat is megfigyelhettünk. A 7 napos kultúrák esetében, mikor a *T. acidophilum* sejtek integritása elkezd megszűnni és a TaKT-ek láthatóvá válnak a negatívan festett EM képeken, sokkal kevesebb TaKT-et figyeltünk meg mint a 2 napos kultúrákból származó sejtekből, viszont a megmaradó néhány test mérete jelentősen megnövekedett (**29. ÁBRA**). Mindemellett a TaKT-ek aggregációja immunjelölt sejtekben (**19. ÁBRA** és **14. MELLÉKLET**) és összeolvadó TaKT-ek *in vitro* körülmények között (**9. ÁBRA / C**) szintén megfigyelhető volt. Ezen felül észleltünk leváló/összeolvadó TaKT-eket, melyek egy primitív sejtservecske aktív biokémiai folyamataira utalhat.

A TaKT-ek és a hozzájuk társítható fehérjék és lipidek biokémiai szerepének tisztázásához a jövőben további kísérletek elvégzése lesz szükséges: a célgének KO mutagenezise, a fehérjék harmadlagos és negyedleges atomszintű szerkezetének meghatározása, a legtöbb lipidkomponens azonosítása LC/MS-sel támogatott lipid profil elkészítésével, a sejtmembrán lipidösszetételének illetve a TaKT-ek környezeti hatásra bekövetkező mennyiségi változásainak mérése.



**29. ÁBRA:** Negatívan festett, aerob körülmények között tenyésztett, 7 napos *T. acidophilum* sejtek elektronmikroszkópos képe. A sejtekben változatos méretű TaKT-ek láthatóak (a nyílhegyek egy kicsi- és egy nagyméretű testre mutatnak). A méretarány-skála 550 nm-nek felel meg.

A doktori munka másodlagos célja a TaKT fehérjék tisztítására alkalmas szolubilitást növelő fúziós partner fehérjék keresése volt. A homológia szerinti keresések alapján fehérje expressziós tesztet alakítottunk ki *E. coli*-ban a Ta0895, Ta1019 és Ta1442 feltételezett *T. acidophilum* SAMP-ok vizsgálatára. Az elmélet teszteléséhez az ScRpn11 fehérjét a Ta0895 fehérje C terminális részéhez kapcsoltuk. Az expressziós tesztek bizonyították, hogy ez a SAMP képes a célfehérjét oldható állapotban tartani. Bízató eredmények után megkezdtük más SAMP-ok tesztelését is.

A röntgenkristallográfiai vizsgálatok céljából megtisztított *Saccharomyces cerevisiae* 26S proteaszoma 19S szabályozó részének Rpn11-es alegységének esetében a tisztítást követően, egyes TaKT fehérjékhez hasonlóan, nagyfokú zárványtest képződés hátráltatta a munkát (Pathare és mtsai., 2014). Az expresszió optimalizálása és a glutation S-tranzferáz illetve a SUMO szolubilizáló fehérjék alkalmazása ellenére a zárványtestek képződése megakadályozta a sikeres

tisztítást, emiatt az Rpn11 ideális célfehérjének tűnt a szolubilitási tesztek elvégzéséhez. A tesztek során az ScRpn11 fehérjét fuzionáltattuk négy, Ta0895, Ta1019, Hvo\_2619 és Mbur\_1415, feltételezett SAMP-pal és hat, széles körben használt, kereskedelmi forgalomban kapható, glutation-s-transzferáz (GST), maltózkötő fehérje (MBP), N utilisation substance fehérje A (NusA), kisméretű ubiquitinszerű módosító fehérje (SUMO) és thioredoxin (Trx) fúziós fehérje partnerrel és összehasonlítottuk az oldható fehérjék koncentrációját. A kísérlet első felében a gyári fúziós partnerek jelentősen jobban teljesítettek, a nyers lizátumban a SAMP-okhoz mérten legalább kétszer nagyobb volt a koncentrációjuk. Azonban a centrifugálást követően a Sumo-ScRpn11, GST-ScRpn11, 6His-ScRpn11 és Trx-ScRpn11 fehérjék mennyisége a felülúszóban azt mutatta, hogy ezek a fehérjék az expresszió során kicsapódnak és zárványtestet képeznek. A Hvo\_2619-ScRpn11 és Mbur\_1415-ScRpn11 fehérjék kezdeti koncentrációja nagyon alacsony volt a többi fúziós fehérjéhez képest, ráadásul a túlnyomó többsége ezeknek a rekombináns fehérjéknek zárványtesteket hozott létre. Ennek ellenére az összes fehérjét megtisztítottuk His affinitáskromatográfiával, azonban csak négy fehérje, MBP-ScRpn11, NusA-ScRpn11, Ta1019-ScRpn11 és Ta0895-ScRpn11 szolgáltatott elégséges kiindulási mennyiséget a SEC tisztításhoz. Esetükben magas oldható rekombináns fehérje / oldható összfehérje arány adódott. A His affinitástisztítást követően a rekombináns fehérje / összfehérje arány alapján az MBP és NusA fúziós partnerek voltak a leghatékonyabb szolubilizálók. Azonban a molekulatömeg szerint elvégzett korrekció megváltoztatta a rangsort a Ta0895 és Ta1019 javára, melyek esetében az eluált fehérjék 55,67% és 45,28% volt célfehérje, ami azt jelenti, hogy az ScRpn11 esetében ez a két szolubilizáló fehérje bizonyult a leghatékonyabbnak.

A komparatív kísérletek után a Ta0895-öt kipróbáltuk más fehérjéken is. Az ScRpn10 és ScRpn13 Ta0895-tel való összekapcsolás megelőzte a konstrukció tisztítást követő kicsapódását, a CA7053 nanobody és HAZ1 fehérje esetében pedig hatékony szolubilizáló partnernek bizonyult. A HAZ1 fehérje túltermeltetése esetében viszont a fúziós fehérjepartner egy ismeretlen mechanizmus következtében levágódott, ami miatt nagy mennyiségű lehasadt Ta0895 fehérje keletkezett.

Bizonyos kísérletekhez natív állapotú, fúziós partner nélküli fehérje megléte szükséges (Arnau és mtsai., 2006). Ezért a SAMP szolubilizáló fehérjék eltávolításához célul tűztük ki a fúziós partnert szükséges esetben specifikus helyen, lehetőleg alacsony hőmérsékleten lehasítani képes enzimek keresését. A célra négy archaea JAB domén metalloproteázát és feltételezett szubsztrátjaikat választottuk ki: *H. volcanii* (Hvo\_2619 és Hvo\_2505), *N. maritimus* (Nmar\_1227), *M. burtonii* (Mbur\_1415 és Mbur\_0623) és *T. acidophilum* (Ta0895, Ta1019 és Ta0623). Ezek a mikrobák különféle hőmérsékletekhez alkalmazkodtak, az 1-2 °C-ot is elviselni képes, pszikrofil *M. burtonii* volt leginkább az érdeklődésünk fókuszában (Dworkin és mtsai., 2006). A *Haloferax* Hvo\_2505

enzim volt az egyetlen amelyik el tudott vágni néhány lineárisan kötődő SAMP-ot (Hvo\_2619 és Ta0895) az eredeti VSGG és VAGG szekvenciáknál. Szintén képes volt vágni a módosított Ta0895-öt a VSGG szekvenciánál. Habár ilyen módon a SAMP eltávolítása lehetséges, de az enzym aktivitásához szükséges feltételek messze esnek az ideálistól (2 M NaCl koncentráció és 24–48 °C-os hőmérséklet). A többi enzym-szubstrát párosítás nem mutatta jelét aktivitásnak. Még az Mbur\_0623 enzym is inaktív maradt 4, 10 és 24 °C-os inkubációs hőmérsékleten. Ennek oka talán az hasítási teszt során alkalmazott aerob környezet vagy a 37 °C-os expressziós hőmérséklet inaktiválta a termelődő enzymet (alacsonyabb hőmérsékleten nem nőtt a sejt kultúra).

A Ta0895 fehérjén alapuló rendszer továbbfejlesztéséhez a kutatás következő szakaszában a célfehérje degradációját okozó proteázok azonosítása, majd a proteáz fehérjét kódoló gént nem tartalmazó gazdasejt kiválasztása vagy előállítása és egy alacsony hőmérsékleten is működő, Ta0895 fehérjét specifikusan eltávolítani képes proteáz keresése a cél.



## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az élővilág riboszómális RNS alapú felosztását követően az 1977-ben felfedezett *Archaea* domént (Woese, Kandler és Wheelis, 1990) képviselő fajok egyedi tulajdonságaik miatt egyre népszerűbbek a kutatók körében. Egyes archaeák rendkívül szélsőséges környezeti feltételekhez alkalmazkodtak különböző egyedi adaptációk révén, melyek tanulmányozása segíthet a korai evolúciós események megismerésében, valamint hozzájárulhat egyes biotechnológiai problémák megoldásához. Az egyik ilyen extremofil hő- és savkedvelő archaea, a *T. acidophilum* az egyszerű genetikai és proteomikai felépítése miatt máig a struktúrbiológiai kutatások egyik kedvelt modellorganizmusa (Brandstetter és mtsai., 2002; Campbell és mtsai., 2015). A *T. acidophilum* sejtek tomográfiás vizsgálata során ismeretlen felépítésű és funkciójú citoszólikus testek váltak láthatóvá, melyek az előkísérletek szerint nagy mennyiségben tartalmaztak menakinonokat. Lipidtestek gyakoriak a baktériumok, archaeák és eukarióták körében, azonban eddig csak polihidroxialkanoát tartalmú zárványtestekről számoltak be.

A doktori munka elsődleges célkitűzése az említett testek szerkezetének biokémiai illetve elektronmikroszkópos képalkotó módszerekkel való meghatározása volt. A kísérletes munka során fehérjekomplexek megkötésére alkalmas hidroxipatit kromatográfiás oszlopon tisztítottuk majd tömegspektrometriával beazonosítottuk a testeket legnagyobb mennyiségben alkotó Ta0547-es fehérjét. Az *E. coli*-ban expresszálatott és affinitáskromatográfiával megtisztított Ta0547 fehérjék ellen poliklonális antitesteket termeltettünk. A kapott antitestek egy immuno-precipitációs kísérletben nagy specificitással kötöttek meg Ta0547-es fehérjéket a feltárt *T. acidophilum* sejtekből. Az antitestekkel és a kromatográfiás módszerekkel elválasztott és eluált mintákról készített elektronmikroszkópos felvételeken mindkét esetben a tomogramokon is látható globuláris struktúrák voltak láthatóak, tehát megerősítést nyert, hogy a Ta0547 a testek fő fehérjekomponense. A Ta0547-es fehérje bioinformatikai elemzéséhez abból indultunk ki, hogy a KEGG adatbázisban vitellogenin-N domén fehérjeként annotálták. Ezt a domént eddig kizárólag eukarióta lipid transzfer fehérjékben mutatták ki, azonban elvégzett szekvencia alapú keresés (PBLAST) nem adott eukarióta találatot és a Pfam adatbázisban sem találtunk egyezést a Ta0547 és a vitellogenin-N domén között. Az ellentmondást a Ta0547 hmm profil illetve prediktált térszerkezet alapú keresés oldotta fel, ezek az illesztési módszerek majdnem teljes egyezést mutattak a vitellogenin-N domén egy rövid szakaszával (ILSH, 313.-tól a 435. aminosavig).

A kinontesteket alkotó egyéb fehérjék vizsgálata folyadék kromatográfiával kombinált tömegspektrometriával történt, a Ta0547 mellett további 6 fehérjét sikerült ilyen módon azonosítani. A Ta0337, Ta0437, Ta0438, Ta0182, Ta0093 és Ta1223a fehérjék leginkább

thermoacidofil életmódú archaeák fehérjéivel mutattak hasonlóságot, azonban ismert funkciójú homológja csak a Ta1223a és Ta0437 fehérjéknek volt. A transzmembrán domén keresés két fehérjében eredményezett találatot, a Ta1223a valószínűleg, a Ta0337 pedig talán TM fehérje. Vékonyréteg kromatográfiával, UV spektroszkópiával és folyadékkromatográfiával kombinált tömegspektrometriával a tisztított testekből lipid komponenseket mutattunk ki, a két legnagyobb mennyiségben megtalálható vegyület a menakinon-7-es és a gulopiranozil-( $\beta$ 1-1)-caldarchaeol volt. A biokémiai vizsgálatokat követően a kinontesteket krio-elektronmikroszkóppal vizsgáltuk, a felvételek alapján a 25-60 nm-es testeket 4 nm-es méretű diszkrét, elektrondenz részek határolják, esetenként kiemelkedő túske alakú képletek illetve kisebb méretű csatlakozó gömb alakú struktúrák voltak megfigyelhetőek. A Ta0547 szerkezetkialakításban betöltött funkciójának meghatározásához az izolált kinontesteket különböző enzimekkel és detergenssekkel kezelve és a bekövetkező változásokat elektronmikroszkópos felvételekkel nyomon követve bizonyítást nyert, hogy az intakt Ta0547 jelenléte elengedhetetlen a testek integritásának fenntartásához. A különböző környezeti tényezők Ta0547 expressziós szintre gyakorolt hatását Western blot módszerrel vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az öregedő sejt kultúrákban a Ta0547 koncentrációja jelentősen megnő.

A *Thermoplasma* kinontestek tehát lipoproteinszerű testecskek, melyek nem rendelkeznek folytonos lipidmembránnal, lipid összetételük eltér az eddig megismert lipid testekétől, a fő fehérjekomponens Ta0547 pedig a bioinformatikai elemzést alapul véve nagy valószínűséggel a lipidtranszportban játszhat szerepet. A kinontestek fiziológiai szerepének tisztázásához a jövőben szükséges a kinontest asszociált fehérjék „knock out” mutagenézise, harmadlagos és negyedleges atomszintű szerkezetének meghatározása, a még nem azonosított lipid összetevők, valamint a testek mennyiségi viszonyait befolyásoló környezeti tényezők meghatározása.

A kinontest fehérjék tisztításukat követően hajlamosnak bizonyultak a kicsapódásra ezért másodlagos célként olyan fehérjék keresését tűztük ki célul, melyek szolubilizáló partnerként jöhetnek szóba. Választásunk a nemrég felfedezett ubiquitinszerű SAMP fehérjecsalád (Humbarb és *mtsai.*, 2010; Maupin-Furlow, 2013) *T. acidophilum*-ban is megtalálható 3 tagjára esett (Ta0895, Ta1019 és Ta1442). *E. coli* gazdasejtben elvégzett expressziós tesztek eredményei szerint a legideálisabb tulajdonságokkal a Ta0895-ös fehérje bírt, így a munka további részében erre a fehérjére összpontosítottunk. A nehezen tisztítható ScRpn11 fehérjéhez külön-külön fuzionáltatott 6 kereskedelmi forgalomban kapható szolubilizáló fehérje, 3 SAMP és a Ta0895-ös fehérje oldhatóságra gyakorolt hatását összehasonlító kísérletben több szempont alapján végül a Ta0895 bizonyult a leghatékonyabbnak. Mivel a fúziós partner jelenléte torzíthatja a célfehérje szerkezetét ezért megvizsgáltuk a Ta0895 fehérje alacsony hőmérsékleten történő specifikus

eltávolításának lehetőségét. Három JAMM1 metalloproteáz enzimaktivitását vizsgáltuk különböző Ta0895 fúziós fehérje szubsztrátok jelenlétében. Egyedül a Hvo\_2505 enzim volt képes a Ta0895 eltávolítására 24, 37 és 48 °C-on, azonban alacsonyabb hőmérsékleteken (10 °C) nem tapasztaltunk enzim aktivitást. A Ta0895 fehérje alapú szolubilizáló rendszer hatékonyságát a későbbiekben a gazda sejten belüli degradálódás kiküszöbölésével és egy alacsony hőmérsékleten is aktív, Ta0895 specifikus proteáz integrálásával lehet tovább növelni.

## 7. SUMMARY

After the the partition of living organisms based on ribosomal RNA similarity, species belonging to the *Archaea* domain became more and more popular amongst researchers because of their unique properties. Some of the archaea adapted to extreme environmental conditions due to their various unique adaptations and studying them may provide insights into early evolutionary events and may contribute to the solution of certain biotechnological problems. One such archaea is the thermoacidophile *Thermoplasma acidophilum* which because of its simple genetic and proteome structure is still a highly favored modelorganism of structural biology until today (Brandstetter és mtsai., 2002; Campbell és mtsai., 2015). During the tomography of *Thermoplasma* cells cytosolic particles with unknown structure and function became visible, which based on pilot experiments contained large amount of menaquinones. Lipid bodies are frequent in bacteria, archaea- and eukaryotes, but inclusions containing polyhydroxyalkanoates have been reported.

The primary aim of the PhD study was to determine the structure of the newly discovered *T. acidophilum* cytosolic droplets using biochemical and electron microscopic imaging methods. During the experimental work the droplets were purified on a hydroxyapatite column suitable to bind protein complexes and the dominant Ta0547 protein was identified by mass spectrometry. The Ta0547 protein was expressed in *E.coli* and purified by affinity chromatography then polyclonal antibody was produced against the pure protein. The antibodies could bind Ta0547 in lysed *T. acidophilum* cells with high specificity during an immuno-precipitation experiment. Electron micrographs of samples from both purification experiment displayed the same globular particles seen on the 3D tomograms this way confirming that Ta0547 is the main protein component of the droplets. Basic bioinformatics analysis has shown that the Ta0547 protein was annotated in the KEGG database as a vitellogenin-N domain protein. This domain was present so far only in eukaryotic lipid transfer proteins however searches based on sequence similarity (PBLAST) resulted no hits in eukaryotes and there was no match in the Pfam database between Ta0547 and vitellogenin-N domain. Alignment searches based on the hmm profile and predicted structure of Ta0547 has shown that it has the same structure like a short region (1LSH, from 313. to 435. aminoacid) of the vitellogenin-N domain.

To investigate other proteins associated to the droplets liquid chromatography and mass spectrometry was used. This way 6 other protein were identified. Ta0337, Ta0437, Ta0438, Ta0182, Ta0093 and Ta1223a proteins had homologues mostly in thermoacidophile archaea species but only Ta1223a and Ta0437 had homologues with known function. The transmembrane domain search returned hits in case of Ta1223a and Ta0337, the former probably, the latter maybe

being a transmembrane protein. Thin-layer chromatography, UV spectroscopy and liquid chromatography combined with mass spectrometry was used to identify lipid components of the droplets. The two most significant compounds were gulopiranozil-( $\beta$ 1-1)-caldarchaeol and menaquinone-7. Following the biochemical experiments the quinone droplets were observed by cryo-electron microscopy. The images revealed that the droplets are 25-60 nm in diameter and they are bordered by discrete interconnected densities 4 nm in diameter. In some cases short spike-like structures protruding from the boundary and smaller spherical structures joining the droplets could be seen. To define the role of Ta0547 in maintaining the structure the droplets were treated by different chemicals and monitoring the changes has proved that the presence of intact Ta0547 is necessary to maintain structural integrity. Monitoring the effect of different environmental factors on the concentration of Ta0547 by Western blot we experienced that Ta0547 expression increases significantly in aging cell cultures.

So the *Thermoplasma* quinone droplets are lipoprotein particles without a continuous lipid membrane, the lipid composition is different compared to known lipid droplets and the main protein component is most likely takes part in lipid transport based on the bioinformatic analysis. To determine physiological role of the droplets it is necessary to knock out the quinone droplet associated protein coding genes, to identify their high resolution tertiary and quaternary structure and to identify environmental factors influencing the quantity of the droplets.

Since some of the quinone droplet associated proteins were prone to precipitation after purification as a secondary aim we tried to find potential solubility enhancer protein partners. We have chosen three *T. acidophilum* proteins (Ta0895, Ta1019 and Ta1442) of the recently discovered ubiquitin like SAMP protein family (Humbard *és* *mtsai.*, 2010; Maupin-Furlow, 2013). According to the expression tests in *E. coli* host cells the Ta0895 protein had the most advantageous attributes so we focused on this protein. In a comparative test 6 commercially available protein tags, three SAMPs and the Ta0895 protein were separately attached to the hardly soluble ScRpn11 (*S. cerevisiae* 26S proteasome, 19S lid particle subunit, Rpn11) and considering different characteristics the Ta0895 proved to be the most efficient. Since the attached fusion partner may distort the target protein structure we have investigated the possibility of specific enzymatic removal of Ta0895 at low temperatures. The activity of three JAMM1 metalloproteases were tested in the presence of different Ta0895 fusion protein substrates. Only Hvo\_2505 enzyme was capable to remove Ta0895 at 24, 37 and 48 °C but on lower temperatures no activity could be observed. The efficiency of the Ta0895 based solubility system could be further increased by the elimination of possible intracellular tag cleavage and finding of a specific protease which is able to cleave off the Ta0895 tag at low temperatures.



## 1. MELLÉKLET - IRODALOMJEGYZÉK

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. és Lipmann, D. J. (1997) „Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, *Nucleic Acids Research*, 25(17), o. 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389.

Anderson, A. J. és Dawes, E. A. (1990) „Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates.”, *Microbiological reviews*, 54(4), o. 450–472. doi: 0146-0749/90/040450-23\$02.00/0.

Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E. és Pedersen, J. (2006) „Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins”, *Protein Expression and Purification*, o. 1–13. doi: 10.1016/j.pep.2005.12.002.

Bai, X., McMullan, G. és Scheres, S. H. . (2014) „How cryo-EM is revolutionizing structural biology”, *Trends in Biochemical Sciences*, 40(1), o. 49–57. doi: 10.1016/j.tibs.2014.10.005.

Bell, M. R., Engleka, M. J., Malik, A. és Strickler, J. E. (2013) „To fuse or not to fuse: What is your purpose?”, *Protein Science*, 22(11), o. 1466–1477. doi: 10.1002/pro.2356.

Beller, M., Bulankina, A. V., Hsiao, H. H., Urlaub, H., Jäckle, H. és Kühnlein, R. P. (2010) „PERILIPIN-dependent control of lipid droplet structure and fat storage in *Drosophila*”, *Cell Metabolism*, 12(5), o. 521–532. doi: 10.1016/j.cmet.2010.10.001.

Biegert, A., Mayer, C., Remmert, M., Söding, J. és Lupas, A. N. (2006) „The MPI Bioinformatics Toolkit for protein sequence analysis”, *Nucleic Acids Research*, 34(WEB. SERV. ISS.). doi: 10.1093/nar/gkl217.

Black, F. T., Freundt, E. A., Vinther, O. és Christiansen, C. (1979) „Flagellation and swimming motility of *Thermoplasma acidophilum*”, *Journal of Bacteriology*, 137(1), o. 456–460.

Bligh, E. G. és Dyer, W. J. (1959) „A rapid method of total lipid extraction and purification”, *Canadian journal of biochemistry and ...*, 37(8), o. 911–917.

Brandstetter, H., Kim, J. S., Groll, M., Göttig, P. és Huber, R. (2002) „Structural basis for the processive protein degradation by tricorn protease”, *Biological Chemistry*, 383(7–8), o. 1157–1165. doi: 10.1515/BC.2002.127.

Bréhélin, C. és Kessler, F. (2008) „The plastoglobule: a bag full of lipid biochemistry tricks.”, *Photochemistry and photobiology*. Blackwell Publishing Ltd, 84(6), o. 1388–94. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00459.x.

- Burroughs, A. M., Balaji, S., Iyer, L. M. és Aravind, L. (2007) „Small but versatile: the extraordinary functional and structural diversity of the beta-grasp fold.”, *Biology direct*, 2, o. 18. doi: 10.1186/1745-6150-2-18.
- Campbell, M. G., Veessler, D., Cheng, A. C., Potter, C. S. és Carragher, B. (2015) „2.8 angstrom resolution reconstruction of the *Thermoplasma acidophilum* 20S proteasome using cryo-electron microscopy”, *Elife*, 4, o. 10. doi: 10.7554/eLife.06380.
- Chen, R. (2012) „Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond”, *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 30(5), o. 1102–1107. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.013.
- Cheng, Y. (2015) „Single-particle Cryo-EM at crystallographic resolution”, *Cell*, 161(3), o. 450–457. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.049.
- Cobucci-Ponzano, B., Cobucci-Ponzano, B., Rossi, M., Rossi, M., Moracci, M. és Moracci, M. (2005) „Recoding in archaea”, *Mol Microbiol*, 55, o. 339–348. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04400.x.
- Collins, M. D. és Langworthy, T. A. (1983) „Respiratory quinone composition of some acidophilic bacteria”, *Systematic and Applied Microbiology [SYST. APPL. MICROBIOL.]*, 4, o. 295–304. doi: citeulike-article-id:11186436\rdoi: 10.1016/S0723-2020(83)80016-2.
- Costa, S. J., Almeida, A., Castro, A., Domingues, L. és Besir, H. (2013) „The novel Fh8 and H fusion partners for soluble protein expression in *Escherichia coli*: A comparison with the traditional gene fusion technology”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(15), o. 6779–6791. doi: 10.1007/s00253-012-4559-1.
- Cserzo, M., Eisenhaber, F., Eisenhaber, B. és Simon, I. (2004) „TM or not TM: Transmembrane protein prediction with low false positive rate using DAS-TMfilter”, *Bioinformatics*, 20(1), o. 136–137. doi: 10.1093/bioinformatics/btg394.
- Cserzö, M., Eisenhaber, F., Eisenhaber, B. és Simon, I. (2002) „On filtering false positive transmembrane protein predictions.”, *Protein engineering*, 15(9), o. 745–752.
- Danev, R., Buijsse, B., Khoshouei, M., Plitzko, J. M. és Baumeister, W. (2014) „Volta potential phase plate for in-focus phase contrast transmission electron microscopy.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(44), o. 15635–40. doi: 10.1073/pnas.1418377111.
- Darland, G., Brock, T. D., Samsonoff, W. és Conti, S. F. (1970) „A thermophilic, acidophilic



mycoplasma isolated from a coal refuse pile.”, *Science*, 170(1962), o. 1416–1418. doi: 10.1126/science.170.3965.1416.

DeLong, E. F. (2000) „Extreme genomes.”, *Genome biology*, 1, o. REVIEWS1029. doi: 10.1186/gb-2000-1-6-reviews1029.

Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, a W. és Schultz, P. (1988) „Cryo-electron microscopy of vitrified specimens.”, *Quarterly reviews of biophysics*, 21(2), o. 129–228. doi: 10.1017/S0033583500004297.

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. és Stackebrandt, E. (2006) *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes, The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. doi: 10.1007/0-387-30746-x\_22.

Dyall-Smith, M. L., Pfeiffer, F., Klee, K., Palm, P., Gross, K., Schuster, S. C., Rampp, M. és Oesterhelt, D. (2011) „Haloquadratum walsbyi: limited diversity in a global pond.”, *PloS one*, 6(6), o. e20968. doi: 10.1371/journal.pone.0020968.

Eddy, S. R. (2011) „Accelerated profile HMM searches”, *PLoS Computational Biology*, 7(10). doi: 10.1371/journal.pcbi.1002195.

Embley, T. M. és Martin, W. (2006) „Eukaryotic evolution, changes and challenges.”, *Nature*, 440(7084), o. 623–630. doi: 10.1038/nature04546.

Esposito, D. és Chatterjee, D. K. (2006) „Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags”, *Current Opinion in Biotechnology*, 17(4), o. 353–358. doi: 10.1016/j.copbio.2006.06.003.

Finn, R. D., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G. A., Tate, J. és Bateman, A. (2015) „The Pfam protein families database: towards a more sustainable future.”, *Nucleic acids research*, 44(D1), o. D279–D285. doi: 10.1093/nar/gkv1344.

Fixter, L. M. és McCormack, J. G. (1976) „The Effect of Growth Conditions on the Wax Content of Various Strains of *Acinetobacter*”, *Biochemical Society Transactions*. Portland Press Limited, 4(3), o. 504–505. doi: 10.1042/bst0040504.

Foster, L. J., De Hoog, C. L. és Mann, M. (2003) „Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), o. 5813–5818. doi: 10.1073/pnas.0631608100.

Gabriel, J. L. és Lee Gau Chong, P. (2000) „Molecular modeling of archaebacterial bipolar tetraether lipid membranes”, *Chemistry and Physics of Lipids*, 105(2), o. 193–200. doi: 10.1016/S0009-3084(00)00126-2.

Galagan, J., Nusbaum, C., Roy, A., Endrizzi, M. és Metcalf, W. W. (2002) „The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity”, *Genome Research*. doi: 10.1101/gr.223902.

Gambacorta, A., Trincone, A., Nicolaus, B., Lama, L. és De Rosa, M. (1993) „Unique Features of Lipids of Archaea”, *Systematic and Applied Microbiology*, 16(4), o. 518–527. doi: 10.1016/S0723-2020(11)80321-8.

Grimm, R., Barmann, M., Hackl, W., Typke, D., Sackmann, E. és Baumeister, W. (1997) „Energy filtered electron tomography of ice-embedded actin and vesicles”, *Biophys J*, 72(1), o. 482–489. doi: 10.1016/s0006-3495(97)78689-2.

Gruhler, A., Olsen, J. V, Mohammed, S., Mortensen, P., Faergeman, N. J., Mann, M. és Jensen, O. N. (2005) „Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway.”, *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 4(3), o. 310–27. doi: 10.1074/mcp.M400219-MCP200.

Hanford, M. J. és Peebles, T. L. (2002) „Archaeal tetraether lipids: unique structures and applications.”, *Applied biochemistry and biotechnology*, 97(1), o. 45–62. Elérhető: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11900115>.

Hänisch, J., Wältermann, M., Robenek, H. és Steinbüchel, A. (2006) „Eukaryotic lipid body proteins in oleogenous actinomycetes and their targeting to intracellular triacylglycerol inclusions: Impact on models of lipid body biogenesis”, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), o. 6743–6750. doi: 10.1128/AEM.00584-06.

Harlow, E. ; D. L. (1988) *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Harris, J. R. (2014) „Transmission electron microscopy in molecular structural biology: A historical survey”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 581, o. 3–18. doi: 10.1016/j.abb.2014.11.011.

Hedlund, B. P., Dodsworth, J. A. és Staley, J. T. (2015) „The changing landscape of microbial biodiversity exploration and its implications for systematics.”, *Systematic and applied microbiology*, 38(4), o. 231–236. doi: 10.1016/j.syapm.2015.03.003.

Hegerl, R. (1996) „The EM Program Package: A Platform for Image Processing in Biological

Electron Microscopy”, *Journal of structural biology*, 116(1), o. 30–4. doi: 10.1006/jsbi.1996.0006.

Hepowit, N. L., Uthandi, S., Miranda, H. V., Toniutti, M., Prunetti, L., Olivarez, O., De Vera, I. M. S., Fanucci, G. E., Chen, S. és Maupin-Furlow, J. a. (2012) „Archaeal JAB1/MPN/MOV34 metalloenzyme (HvJAMM1) cleaves ubiquitin-like small archaeal modifier proteins (SAMPs) from protein-conjugates”, *Molecular Microbiology*, 86(4), o. 971–987. doi: 10.1111/mmi.12038.

Hoenger, A. (2014) „High-resolution cryo-electron microscopy on macromolecular complexes and cell organelles”, *Protoplasma*, o. 417–427. doi: 10.1007/s00709-013-0600-1.

Hofmann, K. és Stoffel, W. (1993) „TMbase-A database of membrane spanning proteins segments”, *Biol Chem HoppeSeyler*, 374, o. 166.

Van Der Horst, D. J. és Rodenburg, K. W. (2010) „Lipoprotein assembly and function in an evolutionary perspective”, *Biomolecular Concepts*, 1(2), o. 165–183. doi: 10.1515/bmc.2010.012.

Humbard, M. a, Miranda, H. V, Lim, J.-M., Krause, D. J., Pritz, J. R., Zhou, G., Chen, S., Wells, L. és Maupin-Furlow, J. a (2010) „Ubiquitin-like small archaeal modifier proteins (SAMPs) in *Haloferax volcanii*.”, *Nature*. Nature Publishing Group, 463(7277), o. 54–60. doi: 10.1038/nature08659.

Jarrell, K. és Sprott, G. (1984) „Intracellular potassium concentration and relative acidity of the ribosomal proteins of methanogenic bacterial”, *Canadian Journal of Microbiology*, 30, o. 663–668.

Käll, L., Krogh, A. és Sonnhammer, E. L. L. (2004) „A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method”, *Journal of Molecular Biology*, 338(5), o. 1027–1036. doi: 10.1016/j.jmb.2004.03.016.

Käll, L., Krogh, A. és Sonnhammer, E. L. L. (2007) „Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction-the Phobius web server”, *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2). doi: 10.1093/nar/gkm256.

Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M. és Tanabe, M. (2016) „KEGG as a reference resource for gene and protein annotation”, *Nucleic Acids Research*, 44(D1), o. D457–D462. doi: 10.1093/nar/gkv1070.

Koga, Y. (2012) „Thermal adaptation of the archaeal and bacterial lipid membranes.”, *Archaea (Vancouver, B.C.)*, 2012, o. 789652. doi: 10.1155/2012/789652.

Koning, R. I. és Koster, A. J. (2009) „Cryo-electron tomography in biology and medicine”, *Annals*

*of Anatomy*, o. 427–445. doi: 10.1016/j.aanat.2009.04.003.

Koonin, E. V (2010) „The origin and early evolution of eukaryotes in the light of phylogenomics.”, *Genome biology*, 11(5), o. 209. doi: 10.1186/gb-2010-11-5-209.

Koonin, E. V. és Wolf, Y. I. (2008) „Genomics of bacteria and archaea: The emerging dynamic view of the prokaryotic world”, *Nucleic Acids Research*, 36(21), o. 6688–6719. doi: 10.1093/nar/gkn668.

Kremer, J. R., Mastronarde, D. N. és McIntosh, J. R. (1996) „Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD.”, *Journal of structural biology*, 116(1), o. 71–76. doi: 10.1006/jsbi.1996.0013.

Kumar, S. és Nussinov, R. (2001) „How do thermophilic proteins deal with heat?”, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 58(9), o. 1216–1233. doi: 10.1007/PL00000935.

Laemmli, U. K. (1970) „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.”, *Nature*, 227(5259), o. 680–685. doi: 10.1038/227680a0.

Langworthy, T. A., Smith, P. F. és Mayberry, W. R. (1972) „Lipids of *Thermoplasma acidophilum*.”, *Journal of Bacteriology*, 112(3), o. 1193–1200.

Li, Z., Kessler, W., Van Den Heuvel, J. és Rinas, U. (2011) „Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based *Escherichia coli* expression systems”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), o. 1203–1213. doi: 10.1007/s00253-011-3407-z.

Lohmann, A., Schöttler, M. A., Bréhélin, C., Kessler, F., Bock, R., Cahoon, E. B. és Dörmann, P. (2006) „Deficiency in Phylloquinone (Vitamin K1) Methylation Affects Prenyl Quinone Distribution, Photosystem I Abundance, and Anthocyanin Accumulation in the *Arabidopsis* AtmenG Mutant”, *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), o. 40461–40472. doi: 10.1074/jbc.M609412200.

Lučić, V., Rigort, A. és Baumeister, W. (2013) „Cryo-electron tomography: The challenge of doing structural biology in situ”, *Journal of Cell Biology*, 202(3), o. 407–419. doi: 10.1083/jcb.201304193.

MacEachran, D. P., Prophete, M. E. és Sinskey, A. J. (2010) „The rhodococcus opacus PD630 heparin-binding hemagglutinin homolog TadA mediates lipid body formation”, *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), o. 7217–7225. doi: 10.1128/AEM.00985-10.

Mastronarde, D. N. (2006) „Fiducial marker and hybrid alignment methods for single- and double-

axis tomography”, in *Electron Tomography: Methods for Three-Dimensional Visualization of Structures in the Cell*. Springer New York, o. 163–185.

Maupin-Furlow, J. A. (2013) „Ubiquitin-like proteins and their roles in archaea”, *Trends in Microbiology*, o. 31–38. doi: 10.1016/j.tim.2012.09.006.

McInerney, J. O., O’Connell, M. J. és Pisani, D. (2014) „The hybrid nature of the Eukaryota and a consilient view of life on Earth.”, *Nature reviews. Microbiology*, 12(6), o. 449–55. doi: 10.1038/nrmicro3271.

Murphy, D. J. (2001) „The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms”, *Progress in Lipid Research*, o. 325–438. doi: 10.1016/S0163-7827(01)00013-3.

Murphy, D. J. (2012) „The dynamic roles of intracellular lipid droplets: From archaea to mammals”, *Protoplasma*, o. 541–585. doi: 10.1007/s00709-011-0329-7.

Nagy, I., Knispel, R. W., Kofler, C., Orsini, M., Boicu, M., Varga, S., Weyher-Stingl, E., Sun, N., Fernandez-Busnadiego, R., Kukolya, J., Nickell, S. és Baumeister, W. (2016) „Lipoprotein-like particles in a prokaryote: quinone droplets of *Thermoplasma acidophilum*”, *FEMS Microbiology Letters*. Elérhető: <http://femsle.oxfordjournals.org/content/early/2016/07/11/femsle.fnw169.abstract>.

Nickell, S., Förster, F., Linaroudis, A., Del Net, W., Beck, F., Hegerl, R., Baumeister, W. és Plitzko, J. M. (2005) „TOM software toolbox: Acquisition and analysis for electron tomography”, *Journal of Structural Biology*, 149(3), o. 227–234. doi: 10.1016/j.jsb.2004.10.006.

Nickell, S., Kofler, C., Leis, A. P. és Baumeister, W. (2006) „A visual approach to proteomics.”, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(3), o. 225–230. doi: 10.1038/nrm1861.

Nogales, E. és Scheres, S. H. W. (2015) „Cryo-EM: A Unique Tool for the Visualization of Macromolecular Complexity”, *Molecular Cell*, o. 677–689. doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.019.

Olsen, J. V, de Godoy, L. M., Li, G., Macek, B., Mortensen, P., Pesch, R., Makarov, A., Lange, O., Horning, S. és Mann, M. (2005) „Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap”, *Mol Cell Proteomics*, 4(12), o. 2010–2021. doi: 10.1074/mcp.T500030-MCP200.

Onyenwoke, R. U., Brill, J. A., Farahi, K. és Wiegel, J. (2004) „Sporulation genes in members of the low G+C Gram-type-positive phylogenetic branch ( Firmicutes).”, *Archives of microbiology*, 182(2–3), o. 182–92. doi: 10.1007/s00203-004-0696-y.

Pathare, G. R., Nagy, I., Śledź, P., Anderson, D. J., Zhou, H.-J., Pardon, E., Steyaert, J., Förster, F., Bracher, A. és Baumeister, W. (2014) „Crystal structure of the proteasomal deubiquitylation module Rpn8-Rpn11.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(8), o. 2984–9. doi: 10.1073/pnas.1400546111.

Pol, A., Gross, S. P. és Parton, R. G. (2014) „Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites.”, *The Journal of cell biology*, 204(5), o. 635–46. doi: 10.1083/jcb.201311051.

Pühler, G., Leffers, H., Gropp, F., Palm, P., Klenk, H. P., Lottspeich, F., Garrett, R. a és Zillig, W. (1989) „Archaeobacterial DNA-dependent RNA polymerases testify to the evolution of the eukaryotic nuclear genome.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(12), o. 4569–73. Elérhető: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=287312&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Radax, C., Gruber, C. és Stan-Lotter, H. (2001) „Novel haloarchaeal 16S rRNA gene sequences from Alpine Permo-Triassic rock salt.”, *Extremophiles : life under extreme conditions*, 5(4), o. 221–8. doi: 10.1007/s007920100192.

Reysenbach, A.-L. és Brileya, K. (2014) „The Family Thermoplasmataceae”, in Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., és Thompson, F. (szerk.) *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, o. 385–387. doi: 10.1007/978-3-642-38954-2\_327.

Rigort, A. és Plitzko, J. M. (2015) „Cryo-focused-ion-beam applications in structural biology”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, o. 122–130. doi: 10.1016/j.abb.2015.02.009.

Rivera, M. C., Jain, R., Moore, J. E. és Lake, J. a (1998) „Genomic evidence for two functionally distinct gene classes.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), o. 6239–6244. doi: 10.1073/pnas.95.11.6239.

Robb, F. T. és Place, A. R. (1995) *Archaea: a laboratory manual. Thermophiles*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Elérhető: <https://books.google.hu/books?id=y8YauAAACAAJ>.

Roberts, M. F. (2004) „Osmoadaptation and osmoregulation in archaea: update 2004.”, *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 9, o. 1999–2019. doi: 10.2741/roberts.

Rochette, N. C., Brochier-Armanet, C. és Gouy, M. (2014) „Phylogenomic Test of the Hypotheses for the Evolutionary Origin of Eukaryotes”, *Molecular biology and evolution*, 31(4), o. 1–14. doi:

10.1093/molbev/mst272.

Roeßler, M. és Müller, V. (2001) „Osmoadaptation in bacteria and archaea: Common principles and differences”, *Environmental Microbiology*, 3(12), o. 743–754. doi: 10.1046/j.1462-2920.2001.00252.x.

Rosano, G. L. és Ceccarelli, E. a. (2014) „Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges”, *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), o. 1–17. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172.

Rother, M. és Krzycki, J. A. (2010) „Selenocysteine, pyrrolysine, and the unique energy metabolism of methanogenic archaea”, *Archaea*. doi: 10.1155/2010/453642.

Ruepp, A., Graml, W., Santos-Martinez, M. L., Koretke, K. K., Volker, C., Mewes, H. W., Frishman, D., Stocker, S., Lupas, A. N. és Baumeister, W. (2000) „The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*”, *Nature*, 407(6803), o. 508–513. doi: 10.1038/35035069.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. és Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual (2nd ed.)*, New York.

Scholz, J., Besir, H., Strasser, C. és Suppmann, S. (2013) „A new method to customize protein expression vectors for fast, efficient and background free parallel cloning.”, *BMC biotechnology*, 13, o. 12. doi: 10.1186/1472-6750-13-12.

Schurgers, L. J. és Vermeer, C. (2002) „Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects”, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1570(1), o. 27–32. doi: 10.1016/S0304-4165(02)00147-2.

Searcy, D. G. és Delange, R. J. (1980) „*Thermoplasma acidophilum* histone-like protein. Partial amino acid sequence suggestive of homology to eukaryotic histones”, *Biochim Biophys Acta*, 609(1), o. 197–200.

Searcy, D. G. és Whatley, F. R. (1984) „*Thermoplasma acidophilum*: Glucose Degradative Pathways and Respiratory Activities”, *Systematic and Applied Microbiology*. Urban & Fischer, 5(1), o. 30–40. doi: 10.1016/S0723-2020(84)80049-1.

Seegerer, A., Langworthy, T. A. és Stetter, K. O. (1988) „*Thermoplasma acidophilum* and *Thermoplasma volcanium* sp. nov. from Solfatara Fields”, *Systematic and Applied Microbiology*, 10(2), o. 161–171. doi: 10.1016/S0723-2020(88)80031-6.

Sharma, A., Kawarabayasi, Y. és Satyanarayana, T. (2012) „Acidophilic bacteria and archaea:

Acid stable biocatalysts and their potential applications”, *Extremophiles*, 16(1), o. 1–19. doi: 10.1007/s00792-011-0402-3.

She, Q., Brügger, K. és Chen, L. (2002) „Archaeal integrative genetic elements and their impact on genome evolution.”, *Research in microbiology*, 153(6), o. 325–32. doi: Pii S0923-2508(02)01331-1\|rDoi 10.1016/S0923-2508(02)01331-1.

She, Q., Zhu, H. és Xiang, X. (2007) „Integration Mechanisms: Possible Role in Genome Evolution”, in *Archaea*. Malden, MA, USA: Blackwell Publishing Ltd, o. 113–123. doi: 10.1002/9780470750865.ch10.

Shimada, H., Nemoto, N., Shida, Y., Oshima, T. és Yamagishi, A. (2002) „Complete polar lipid composition of *Thermoplasma acidophilum* HO-62 determined by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection”, *Journal of Bacteriology*, 184(2), o. 556–563. doi: 10.1128/JB.184.2.556-563.2002.

Shimada, H., Nemoto, N., Shida, Y., Oshima, T. és Yamagishi, A. (2008) „Effects of pH and temperature on the composition of polar lipids in *Thermoplasma acidophilum* HO-62”, *Journal of Bacteriology*, 190(15), o. 5404–5411. doi: 10.1128/JB.00415-08.

Shimada, H., Shida, Y., Nemoto, N., Oshima, T. és Yamagishi, a (2001) „Quinone profiles of *Thermoplasma acidophilum* HO-62”, *Journal of Bacteriology*, 183(4), o. 1462–1465. doi: 10.1128/JB.183.4.1462-1465.2001.

Smith, P. F., Langworth, T. a, Mayberry, W. R. és Houghland, a E. (1973) „Characterization of the membranes of *Thermoplasma acidophilum*.”, *Journal of bacteriology*, 116(2), o. 1019–28. Elérhető:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=285480&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Smith, P. F., Langworthy, T. A. és Smith, M. R. (1975) „Polypeptide nature of growth requirement in yeast extract for *Thermoplasma acidophilum*”, *Journal of Bacteriology*, 124(2), o. 884–892.

Sørensen, H. P. és Mortensen, K. K. (2005) „Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*”, *Journal of Biotechnology*, o. 113–128. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.08.004.

Spang, A., Saw, J. H., Jørgensen, S. L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A. E., van Eijk, R., Schleper, C., Guy, L. és Ettema, T. J. G. (2015) „Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes”, *Nature*, 521(7551), o. 173–179. doi: 10.1038/nature14447.



Steinbüchel, A., Aerts, K., Babel, W., Follner, C., Liebergesell, M., Madkour, M. H., Mayer, F., Pieper-Furst, U., Pries, A. és Valentin, H. E. (1995) „Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions.”, *Canadian journal of microbiology*, 41 Suppl 1, o. 94–105. doi: 10.1139/m95-175.

Steinbüchel, A. (1991) „Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources”, in Byrom, D. (szerk.). London: Palgrave Macmillan UK, o. 123–213. doi: 10.1007/978-1-349-11167-1\_3.

Studer, D., Humbel, B. M. és Chiquet, M. (2008) „Electron microscopy of high pressure frozen samples: Bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution”, *Histochemistry and Cell Biology*, o. 877–889. doi: 10.1007/s00418-008-0500-1.

Sun, N., Beck, F., Knispel, R. W., Siedler, F., Scheffer, B., Nickell, S., Baumeister, W. és Nagy, I. (2007) „Proteomics analysis of *Thermoplasma acidophilum* with a focus on protein complexes.”, *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(3), o. 492–502. doi: 10.1074/mcp.M600322-MCP200.

Sun, N., Pan, C., Nickell, S., Mann, M., Baumeister, W. és Nagy, I. (2010) „Quantitative proteome and transcriptome analysis of the archaeon *thermoplasma acidophilum* cultured under aerobic and anaerobic conditions”, *Journal of Proteome Research*, 9(9), o. 4839–4850. doi: 10.1021/pr100567u.

Sun, N., Tamura, N., Tamura, T., Knispel, R. W., Hrabe, T., Kofler, C., Nickell, S. és Nagy, I. (2009) „Size distribution of native cytosolic proteins of *Thermoplasma acidophilum*”, *Proteomics*, 9(14), o. 3783–3786. doi: 10.1002/pmic.200800892.

Tebbe, A., Klein, C., Bisle, B., Siedler, F., Scheffer, B., Garcia-Rizo, C., Wolfertz, J., Hickmann, V., Pfeiffer, F. és Oesterhelt, D. (2005) „Analysis of the cytosolic proteome of *Halobacterium salinarum* and its implication for genome annotation.”, *Proteomics*, 5(1), o. 168–79. doi: 10.1002/pmic.200400910.

Thiam, A. R., Farese, R. V és Walther, T. C. (2013) „The biophysics and cell biology of lipid droplets”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(12), o. 775–86. doi: 10.1038/nrm3699.

Tindall, B. J., Sikorski, J., Smibert, R. A. és Krieg, N. R. (2007) „Chapter 15 : Phenotypic Characterization and the Principles of Comparative Systematics”, *Methods for General and Molecular Microbiology, Third Edition*, o. 330–393. doi: 10.1128/9781555817497.

Tocchini-Valentini, G. D., Fruscoloni, P. és Tocchini-Valentini, G. P. (2011) „Evolution of introns in the archaeal world.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), o. 4782–4787. doi: 10.1073/pnas.1100862108.

Tong, A. H. Y., Lesage, G., Bader, G. D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., Young, J., Berriz, G. F., Brost, R. L., Chang, M., Chen, Y., Cheng, X., Chua, G., Friesen, H., Goldberg, D. S., Haynes, J., Humphries, C., He, G., Hussein, S., Ke, L., Krogan, N., Li, Z., Levinson, J. N., Lu, H., Ménard, P., Munyana, C., Parsons, A. B., Ryan, O., Tonikian, R., Roberts, T., Sdicu, A.-M., Shapiro, J., Sheikh, B., Suter, B., Wong, S. L., Zhang, L. V, Zhu, H., Burd, C. G., Munro, S., Sander, C., Rine, J., Greenblatt, J., Peter, M., Bretscher, A., Bell, G., Roth, F. P., Brown, G. W., Andrews, B., Bussey, H. és Boone, C. (2004) „Global mapping of the yeast genetic interaction network.”, *Science (New York, N.Y.)*, 303(5659), o. 808–13. doi: 10.1126/science.1091317.

Tusnády, G. E. és Simon, I. (1998) „Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction.”, *Journal of molecular biology*, 283(2), o. 489–506. doi: 10.1006/jmbi.1998.2107.

Tusnády, G. E. és Simon, I. (2001) „The HMMTOP transmembrane topology prediction server.”, *Bioinformatics (Oxford, England)*, 17(9), o. 849–850. doi: 10.1093/bioinformatics/17.9.849.

Unzueta, U., Vázquez, F., Accardi, G., Mendoza, R., Toledo-Rubio, V., Giuliani, M., Sannino, F., Parrilli, E., Abasolo, I., Schwartz, S., Tutino, M. L., Villaverde, A., Corchero, J. L. és Ferrer-Miralles, N. (2015) „Strategies for the production of difficult-to-express full-length eukaryotic proteins using microbial cell factories: production of human alpha-galactosidase A”, *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi: 10.1007/s00253-014-6328-9.

Varga, S., Pathare, G. R., Baka, E., Boicu, M., Kriszt, B., Székács, A., Zinzula, L., Kukolya, J. és Nagy, I. (2015) „Enhancing recombinant protein solubility with ubiquitin-like small archeal modifying protein fusion partners”, *Journal of Microbiological Methods*, 118, o. 113–122. doi: 10.1016/j.mimet.2015.08.017.

Wahl, A., Schuth, N., Pfeiffer, D., Nussberger, S. és Jendrossek, D. (2012) „PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*.”, *BMC microbiology*, 12(1), o. 262. doi: 10.1186/1471-2180-12-262.

Wältermann, M., Hinz, A., Robenek, H., Troyer, D., Reichelt, R., Malkus, U., Galla, H. J., Kalscheuer, R., Stöveken, T., Von Landenberg, P. és Steinbüchel, A. (2005) „Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: How bacteria fatten up”, *Molecular Microbiology*, 55(3), o. 750–763. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04441.x.

Walther, T. C. és Mann, M. (2010) „Mass spectrometry-based proteomics in cell biology.”, *The Journal of cell biology*, 190(4), o. 491–500. doi: 10.1083/jcb.201004052.

Waugh, D. S. (2011) „An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags”, *Protein*

- Expression and Purification*. Elsevier Inc., 80(2), o. 283–293. doi: 10.1016/j.pep.2011.08.005.
- Webb, B. és Sali, A. (2014) „Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER.”, *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]*, 47, o. 5.6.1-5.6.32. doi: 10.1002/0471250953.bi0506s47.
- Woese, C. R., Kandler, O. és Wheelis, M. L. (1990) „Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), o. 4576–4579. doi: 10.1073/pnas.87.12.4576.
- van Wolferen, M., Ajon, M., Driessen, A. J. M. és Albers, S. V. (2013) „How hyperthermophiles adapt to change their lives: DNA exchange in extreme conditions”, *Extremophiles*, 17(4), o. 545–563. doi: 10.1007/s00792-013-0552-6.
- Yamashiro, K., Yokobori, S.-I., Oshima, T. és Yamagishi, A. (2006) „Structural analysis of the plasmid pTA1 isolated from the thermoacidophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum*.”, *Extremophiles : life under extreme conditions*, 10(4), o. 327–35. doi: 10.1007/s00792-005-0502-z.
- Yanagisawa, Y. és Sumi, H. (2005) „NATTO BACILLUS CONTAINS A LARGE AMOUNT OF WATER-SOLUBLE VITAMIN K (MENAQUINONE-7)”, *Journal of Food Biochemistry*. Blackwell Science Inc, 29(3), o. 267–277. doi: 10.1111/j.1745-4514.2005.00016.x.
- Yasuda, M., Oyaizu, H., Yamagishi, a és Oshima, T. (1995) „Morphological variation of new *Thermoplasma acidophilum* isolates from Japanese hot springs.”, *Applied and environmental microbiology*, 61(9), o. 3482–5. Elérhető: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=167629&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Yasuda, M., Yamagishi, A. és Oshima, T. (1995) „The plasmids found in isolates of the acidothermophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*”, *FEMS Microbiology Letters*, 128(March), o. 157–162. Elérhető: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07516.x/abstract>.
- Yuan, S., Wang, X., Xu, J., Yan, Z. és Wang, N. (2014) „Ubiquitin-like prokaryotic Moad as a fusion tag for expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*.”, *BMC biotechnology*, 14(1), o. 5. doi: 10.1186/1472-6750-14-5.
- Zhang, L., Yan, F., Zhang, S., Lei, D., Charles, M. A., Cavigliolo, G., Oda, M., Krauss, R. M., Weisgraber, K. H., Rye, K.-A., Pownall, H. J., Qiu, X. és Ren, G. (2012) „Structural basis of

transfer between lipoproteins by cholesteryl ester transfer protein”, *Nature Chemical Biology*, 8(4), o. 342–349. doi: 10.1038/nchembio.796.

Zhang, Y. és Skolnick, J. (2005) „TM-align: A protein structure alignment algorithm based on the TM-score”, *Nucleic Acids Research*, 33(7), o. 2302–2309. doi: 10.1093/nar/gki524.

## 2. MELLÉKLET

A doktori munka során használt plazmid vektorok és gazdasejtek

<i>E. coli</i> és <i>R. erythropolis</i> expressziós plazmidok	Affinitás és/vagy szolubilizáló tag	A vektor rezisztencia-markere	Expressziós gazdasejt	Forrás	Leírás
pRSFDuet	6His	Km	<i>E. coli</i>	MERCK MILLIPORE	Expressziós vektor
pETDuet	6His	Amp	<i>E. coli</i>	MERCK MILLIPORE	Expressziós vektor
pET28a	6His	Km	<i>E. coli</i>	MERCK MILLIPORE	Expressziós vektor
pET28_Ta0895	6His	Km	<i>E. coli</i>	Doktori munka	Ta SAMP expressziós vektorok
pET28_Ta1019	6His	Km	<i>E. coli</i>	Doktori munka	
pET28_Ta1442	6His	Km	<i>E. coli</i>	Doktori munka	
pET28_8HisTa0895TEV	8His/Ta0895	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Doktori munka	Ta0895 szolubilizáló taggal rendelkező vektorok
pRSFD_8HisTa0895TEV	8His/Ta0895	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Doktori munka	
pETD_8HisTa0895TEV	8His/Ta0895	Amp	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Doktori munka	
pET28_StrepIITa0895TEV	StrepII/Ta0895	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Doktori munka	
pRSFD_StrepIITa0895TEV	StrepII/Ta0895	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Doktori munka	
pETD_StrepIITa0895TEV	StrepII/Ta0895	Amp	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Doktori munka	
pETD_StrepIITa0895-ScRpn11	StrepII/Ta0895	Amp	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta T1	Doktori munka	
pETD_StrepIITa0895-ScRpn10	StrepII/Ta0895	Amp	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta T1	Doktori munka	
pETD_StrepIITa0895-ScRpn13	StrepII/Ta0895	Amp	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta T1	Doktori munka	
pET28_6HisHvo_2505	6His	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Doktori munka	
pET28_6HisNmar_1227	6His	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Doktori munka	
pET28_6HisMbur_0623	6His	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Doktori munka	
pET28_6HisTa0623	6His	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Doktori munka	
pRSFD_8HisTa0895TEV-ScRpn11	8His/Ta0895	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta T1	Doktori munka	ScRpn11-SAMP fúziós fehérjét kódoló vektorok
pRSFD_8HisTa1019TEV-ScRpn11	8His/Ta1019	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta T1	Doktori munka	
pRSFD_8HisHvo_2619TEV-ScRpn11	8His/Hvo_2619	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta T1	Doktori munka	
pRSFD_8HisMbur_1415TEV-ScRpn11	8His/Mbur_1415	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta T1	Doktori munka	
pTIPRCL_8HTEVTa0895VSGG-Ta0547	8His/Ta0895	Cm	<i>Rhodococcus erythropolis</i> L88	Doktori munka	
pCoofy1_ScRpn11	6His	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta T1	Doktori munka	Gyári szolubilizáló partnerekhez fuzionált ScRpn11 fehérjét hordozó pCoofy vektorok
pCoofy2_ScRpn11	6His/Trx	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta T1	Doktori munka	
pCoofy3_ScRpn11	6His/GST	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta T1	Doktori munka	
pCoofy4_ScRpn11	6His/MBP	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta T1	Doktori munka	
pCoofy5_ScRpn11	6His/SUMO	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta T1	Doktori munka	
pCoofy16_ScRpn11	6His/NusA	Km	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta T1	Doktori munka	

### 3. MELLÉKLET

Az ScRpn11, ScRpn10, ScRpn13, teve antitest, human antizyme1 (HAZ1), Ta0623, Ta0547 és Ta0895\_VSGG gének szintéziséhez használt primerek.

Primer	Primer szekvencia	Primer leírása
pCoofy1-ScRpn11-5' (forward)	AAGT TCT GTT CCAGGGGCCCAT GG AACGT CT GCAGCGT C	A pCoofy1 (NHis6-tag), pCoofy2 (NHis6_Trx-tag), pCoofy3 (NHis6_GST-tag), pCoofy4 (NHis6_MBP-tag) és pCoofy16 (NHis10_NusA-tag) vektorokba SLIC módszerrel inszertált ScRpn11 gén PCR alapú előállításához használt primerek. A reakcióhoz a pET28_8HisTa0895TEV_ScRpn11 vektor szolgált templátként.
pCoofy1-ScRpn11-3' (reverse)	CCCCAGAACAT CAGGT T AAT GGCG T T A T T G A T T G C A A C G C T A T T A A C G C C T G C	
pCoofy5-ScRpn11-5' (forward)	GTCT ACCAGGAACAAACCGGT GGA ATGGAACGT CT GCAGCGT C	A pCoofy535 (NHis10_SUMO-tag) vektorba SLIC módszerrel inszertált ScRpn11 gén előállításához használt primerek.
pCoofy5-ScRpn11-3' (reverse)	CCCCAGAACAT CAGGT T AAT GGCG T T A T T G A T T G C A A C G C T A T T A A C G C C T G C	
CA7053 nanobody forward	CGAAT T <u>CCATATG</u> CAGGT GCAGCT GCAGGAGT CT G	Az NdeI és XhoI enzimekkel megvágott pET Duet_His8Ta0895 vektorba inszertált teve antitest gén előállításához használt primerek.
CA7053 nanobody reverse	CGAAT T <u>CCTCGAG</u> T T A T G A G G A G A C G G T G A C C T G G G T C C C C T G	
HAZ1 forward	CGAAT T <u>CCATATG</u> GTGAAAAGCAG CCTGCAGCGCATT C	Az NdeI és XhoI enzimekkel emésztett pET28_8HisTa0895 vektorba inszertált HAZ1 gén előállításához használt primerek.
HAZ1 reverse	CGAAT T <u>CCTCGAG</u> T T A T T C T T C T T C T T C G C C G C T G C T T T C G C G	
ScRpn10 forward ( <i>AseI</i> site)	CGAAT T <u>CATTAAT</u> GT ATT GGAAGC TACAGT GTT AGT GATT G	ScRpn10 előállításához használt primerek.
ScRpn10 reverse ( <i>SalI</i> site)	CGAAT T <u>CGTCGAC</u> T T A T T T G T C T T G G T G T T G T T C A G G C T G T T C A G	
ScRpn11 forward	CGAAT T <u>CCATATG</u> GAACGACT ACA GAGATT GATGAT G	ScRpn11 előállításához használt primerek.
ScRpn11 reverse	CGAAT T <u>CCTCGAG</u> T T A T T T A A T T GCCACT GAAT T A A C A C C C	
ScRpn13 forward	CGAAT T <u>CCATATG</u> AGT ATGAGT T CAACT GT AAT T A A A T T C A G	ScRpn13 előállításához használt primerek.
ScRpn13 reverse	CGAAT T <u>CCTCGAG</u> T T A A T C T T G C A T A C T A A C A T C C A C A T C T T G A G	
Ta0623 forward	CGAAT T C C A T A T G T G G T T A A T T A A G A A A A C A C C C T T C	Ta0623 előállításához használt primerek.
Ta0623 reverse	CGAAT T C C T C G A G T C A C A G T A T A T C A A C C T G T A T C C T G T T C C	
Ta0547 forward	<u>GCCATGG</u> TCGAGAAAGAAAAGAA GGAT	Ta0547 előállításához használt primerek.
Ta0547 reverse	<u>GCTCGAG</u> CTCTGTATGATCTCA TCCAC	
Ta895_VSGG forward	T T G A C C T C T T T C G C C A G T T T C C G G A G G T C A T A T G G A A C G T C T G C	A VAGG hasítóhelyen mutáns Ta0895 gén előállításához használt primerek.
Ta895_VSGG reverse	G C A G A C G T T C C A T A T G A C C T C C G G A A A C T G G C G G A A A G A G G T C A A	

#### 4. MELLÉKLET

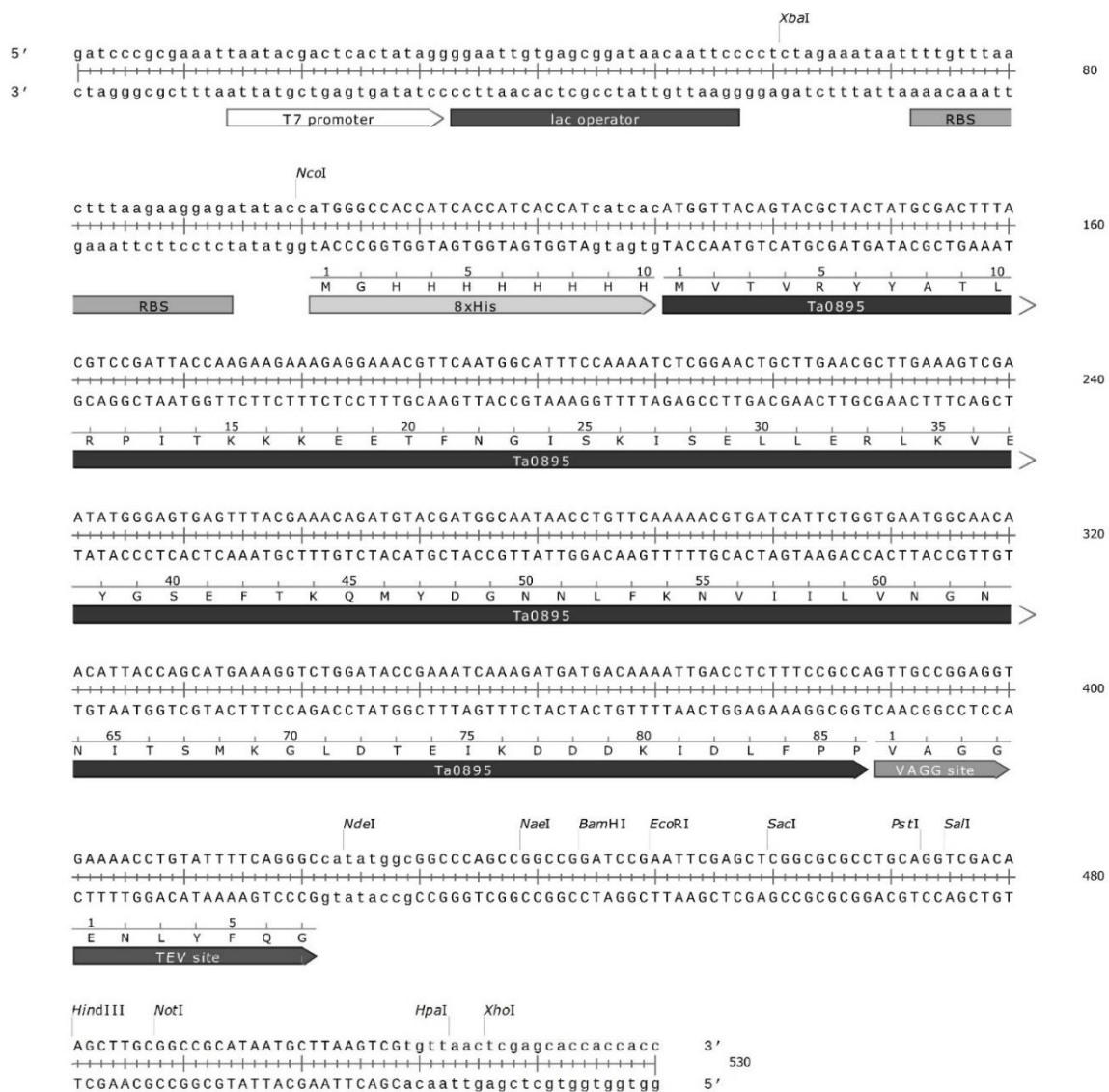
A gének szintéziséhez használt PCR módszerek. A denaturációs lépés, a PCR ciklus és a záró lépés hőmérsékleti és idő paraméterei változatlanok, csak az amplifikáció időtartama változott a célgén hosszának függvényében. T: hőmérséklet °C-ban megadva, t: idő percben megadva.

Amplifikált gén	PCR ciklus										Ciklus szám
	Kezdő lépés		Denaturáció		Primer annealing		Amplifikáció		Záró lépés		
	T	t	T	t	T	t	T	t	T	t	
CA7053	95 °C	3:00	95 °C	0:20	53 °C	0:20	72 °C	1:00	72 °C	7:00	30
HAZ1								1:00			
Rpn10								1:00			
Rpn11								1:00			
Rpn13								0:30			
Ta0547								0:30			
Ta0623								0:30			

## 5. MELLÉKLET

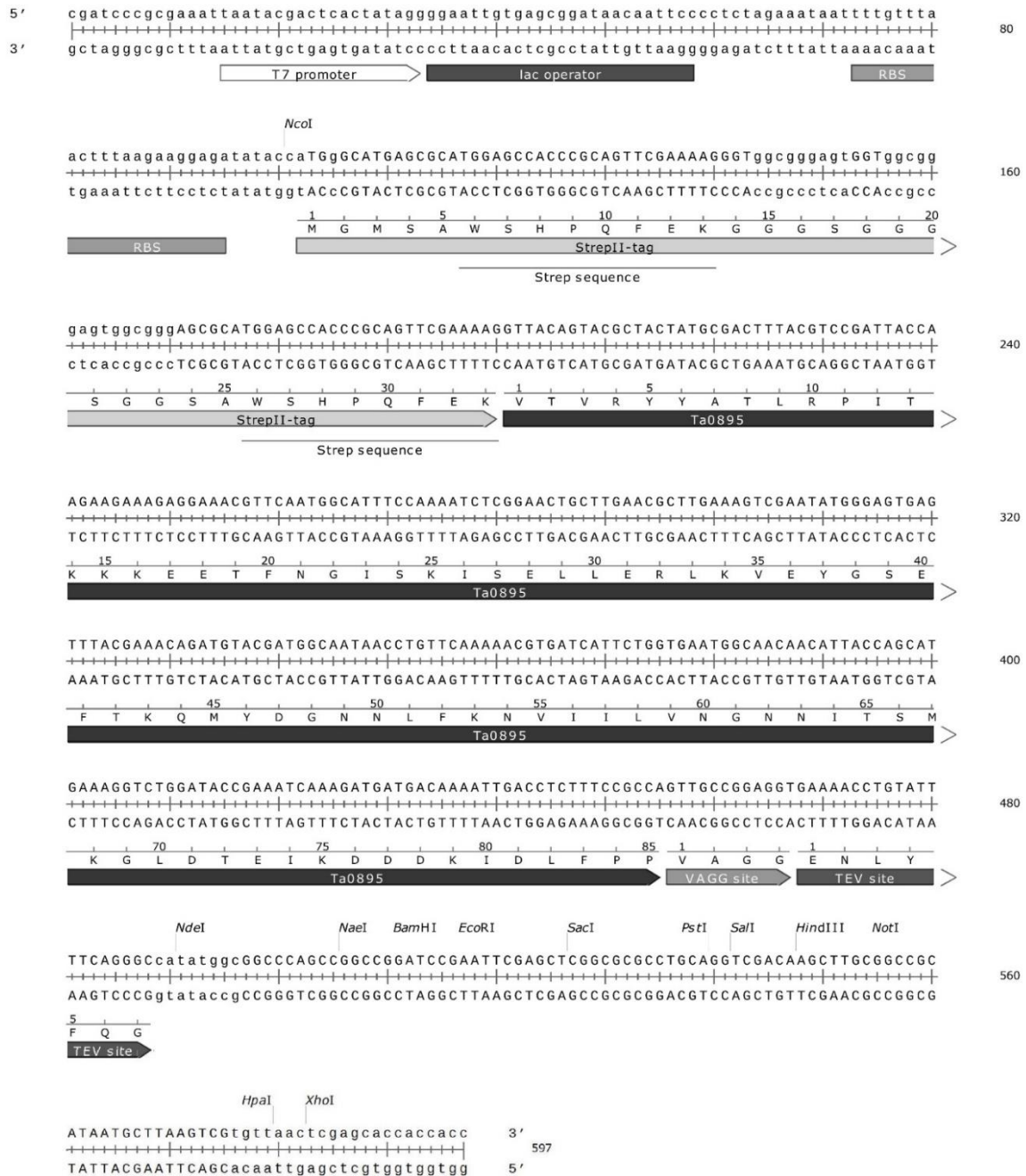
A szolubilizáló partnerként használt kodon optimalizált Ta0895 gén 8His-taggel (A) és StrepII taggel (B) ellátott változatának DNS és aminosav szekvenciája. Az ábrákon az affinitás tageket, a szolubilizáló tageket, a TEV hasítóhelyet és a multiklónozó helyet emeltük ki. A DNS szekvencia NdeI és XhoI helyei a multiklónozó régió határait jelölik.

A



B





## 6. MELLÉKLET

A pull-down és oszlopkromatográfiás módszerrel tisztított TaKT-ek proteom analízise.

Fehérje	Peptid szám	Egyedi fehérjék (seq)	Szekvencia átfedés (%)	Egyedi és "razor" peptid szekvencia lefedettség	Molekula-tömeg (kDa)	Szekvencia-hossz	FPR	Intenzitás	Intenzitás
Pull down tisztítás									
Ta0547	17	17	76,5	76,5	17,435	153	1,69E-76	1,25E+09	1250800000
Ta0182	4	4	52,6	52,6	14,373	133	1,22E-19	1,08E+06	1082400
Ta0337	7	7	61	61	14,146	123	1,06E-28	5,29E+07	52926000
Ta0437	13	13	42,1	42,1	43,951	387	2,40E-98	4,58E+07	45846000
Ta0438	3	3	38,7	38,7	7,6679	62	2,23E-14	5,24E+07	52400000
Ta1223a	9	9	74	74	10,967	100	6,13E-70	253240000	253240000
Ta0093	3	3	37,8	37,8	10,065	90	1,69E-27	1,07E+07	10681000
Oszlopkromatográfiás tisztítás									
Ta0547	22	22	91,5	91,5	17,435	153	7,99E-114	1,06E+09	1063400000
Ta0182	6	6	63,2	63,2	14,373	133	1,16E-58	8,42E+07	84237000
Ta0337	10	10	65	65	14,146	123	1,66E-60	1,01E+08	101450000
Ta0437	12	12	49,4	49,4	43,951	387	6,28E-100	8,52E+06	8522500
Ta0438	4	4	43,5	43,5	7,6679	62	4,30E-14	4,06E+08	405540000
Ta1223a	8	8	78	78	10,967	100	3,77E-83	8,07E+08	806920000
Ta0093	6	6	48,9	48,9	10,065	90	3,39E-44	2,94E+08	294120000

## 7. MELLÉKLET

A TaKT asszociált fehérjék szekvenciái. Az Edman degradációval azonosított N-terminális szekvenciák piros betűkkel jelöltek. Az LC/MS kísérletben (Ta0547, Ta1223a, Ta0438 és Ta0093) mért tömegekhez illeszkedő szekvenciák első aminosava kékkel jelölt ha a metionin levágódik. Ebben a kísérletben a Ta0182, Ta0337 és Ta0437 fehérjéket nem tudtuk azonosítani.

Ta0547 (UniProt: Q9HKP9)

MVEKEKKDEEETRKITISVKGIRDDVYRNVSELARHTGKTIGEITNDA YRTFLGTVEGVR  
NVSQSFIEGA KGAIPRYIDNFKKLEITADDLKDLGQKVAFRNIDELTFKNITDEEFSKYVA  
FIDGVKVLKIPKTVKKT TVIKISTFVDEIIQE

Ta0182 (UniProt: Q9HLP5)

MCSIFNRTNISGEEMSDVIMVNTEYIPGKRIVKVFGTIWGITVRSRGLGGNLVAGLRSLA  
GGEIKEYTKMLSDARNTAMERLQSAAEQIGANAVINVRFDSSDIGQVMTEIVAYGTAVL  
VEDVTDNIQRVGLS

Ta0438 (UniProt: Q9HL02)

MSDRMDIEITIKVSKKTYEKLERLFYLITLPRNFEEFQKEIRKETAPKKESEKDKFRKIEIK

Ta1223a (NCBI-GeneID: 1457147)

MLDSAIEWLIVIVAILVLFSGAKKVP ELAKNIGRATGEFKRGQMEVEEEEIRKAMYSKPAQ  
TTSASGVDYIAVAKTMGIDTDGKSIDELKSEIQEKLQHAQ

Ta0093 (UniProt: P02345)

MVGISELSKEVAKKANTTQKVARTVIKSFLDEIVSQANGGQKINLAGFGIFERRTQGPRK  
ARNPQTKKVIEVPSKKKVFVFRASSKIKYQQ

Ta0337 (UniProt: Q9HL93)

MAMGFAESEFWNGIALKALNEGNITYKNDPVYGRVPRISDSGVFRRSIGEPKGQIADW  
RFTMPWDSRSVHAVEYIDRYEIHVDKYDPAKHPIMLINDAPKYGSVILPLLALFPLFLL RKKL

Ta0437 (UniProt: Q9HL03)

MRPRILLYTGKGGVVGKTSIAAATGALLSSKGHKTLIISTDPAHSLGDAFGMEIGHSIKQLA  
DNLYGQEVSVVQSINEHWGELKDYLRSLFLSQGLDPVSADEIATLPGFEEASELLYL RNY  
YYDEEYDTIIMDSAPTGAALQLLSFPEVMTWYMDKLPISRKTARVARPLLKPFVDIPLP  
EDAVFENIDLLYRQLTDIRKILTNNVDVTSIRLVTPDNMSYSETKRAYTYLLLYGYPVDA  
VIINKILSDETGDFFEKMRGSQKDIITEMENSFVDIKIFKARLLQEEPIGIKKLIELGKLIYG  
DEDPYKVFYKGTPIKYTKNGDRYILKIKMPFAEKEKLNLFNHGGELTIEIANWKRVFYLP  
ESISDKRPVSAEYSNGYLVILE

**8. MELLÉKLET**

A T0547 és lipovitellin egymásra illesztett aminosav szekvenciái. A Ta0547 vitellogenin N domén (7 – 123 aminosav) és a lipovitellin 1LSH A láncának szerkezetileg homológ régiói sorrendben kékkkel és pirossal jelölve. A jelölt régiókat használtuk a 3D modell létrehozásához, a szürke régiók nem szerepeltek a számításokban, mivel nem mutattak sem szekvencia sem struktúra alapú hasonlóságot.

>Ta0547

```
-----
-----
-----
-----MVEKEKKDEEETRKITISVKGiRDDVYR
NVSELARHT-GKTIGEITNDAYRFLGTVEGVRNVSQSFIEGAKGAIIPRYIDNFKKLEITADDLKDLGQKVAFRNI-DEL
TFKNITDEEFISKYVAFIDGVKVLKIPKTVKKTTVIKISTFVDEIIQE-----
-----
-----
-----
-----
-----
-----
-----
-----
-----
-----
-----
```

>1LSH:chain\_A

```
EFQPGKVYRYSYDAFSISGLPEPGVNRAGLSGEMKIEIHGHTHNQATLKITQVNLKYFLGPWPSDSFYPLTGGYDHFIIQQ
LEVVPVRFDYSAGRIGDIYAPPQVTDTAVNIVRGILNLFQLSLKKNQOTFELQETGVEGICQTTYVVQEGYRTNEMAVVKT
KDLNNCCHKVYKTMGTAYAERCPTCQKMKNLRSTAVYNYAIFDEPSGYIIKSAHSEEIQQLSVFDIKEGNVIESRQKL
ILEGIQSAPAASQAASLQNRGGLMYKFPSSAITKMSSLFVTKGNLESEIHTVLKHLVENNQLSVHEDAPAKFLRLTAFL
RNVDAGVLQSIWHKHLHQKDYRRWILDVAVPAMATSEALLFLKRTLASEQLTSAEATQIVASTLSNQQATRESLSYARELL
NTSFIRNRPILRKTAVLGYGSLVFRYCANTVSCPDELLQPLHDLLSQSSDRAKEEIVLALKALGNAGQPNSIKKIQRFL
PGQGKSLDEYSTRVQAEAIMALRNIAKRDPRKVQEIVLPIFLNVAIKSELIRRSCIVFFESKPSVALVSMVAVRLRREP
LQVASFVYSQMRSLSRSSNPEFRDVAACSVAIKMLGSKLDRLGCRYSKAVHVDTFNARTMAGVSADYFRINSPSGPLPR
AVAAKIRGQGMGYASDIVEFGLRAEGLQELLYRGSQEQDAYGTALDRQTLLRSGQARSHVSSIHDTLRKLSDWKSVPPEER
PLASGYVKVHGQEVVFAELDKMMQRISQLWHSARSHHAAAQEIQI GAVVSKLEQGMDVLLTKGYVSEVRYMQPVCIGIP
MDLNLLVSGVTTNRANLSASFSSLPADMKLADLLATNIELRVAATTSMSQHAVAIMGLTDLAKAGMQTHYKTSAGLGVN
GKIEMNARESNEFKASLKPQKTVVVLSTMESIVFVRDPSGSRI LPVLPKMTLDKGLISQQQQPHHQQPHHQGDQA
RAAYQRPWASHEFSPAQQKQIHDIMTARPVMRKQSCSKSAALSSKVCFSARLRNAAFIRNALLYKITGDYVSKVYVQPT
SSKAQITKVELELQAG
```

## 9. MELLÉKLET

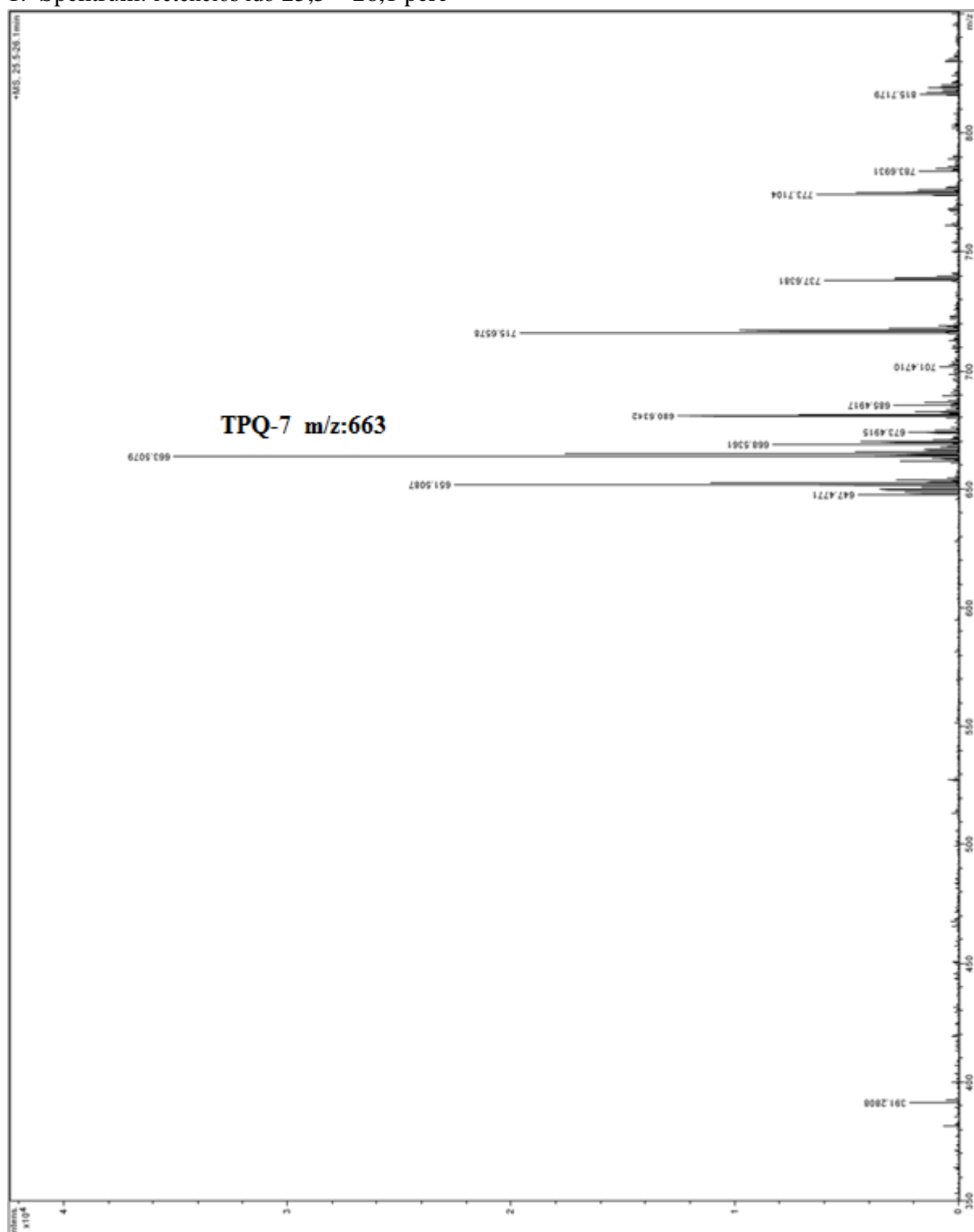
Az intakt, denaturált kinontest fehérjék analíziséből származó molekulatömegek összevethetőek az elméleti adatokból számított, vagy az Edman degradáció alapján kiszámolt (N-terminálison rövidebb fehérjék) értékekkel. A tömegek méréséhez 3 minta szolgált alapul.

<b>Fehérje</b>	<b>Megfigyelt molekulatömeg (Da)</b>	<b>Számolt molekulatömeg (Da)</b>	<b>Megjegyzések</b>
Ta0547	A: 17303.25 B: 17303.16 C: 17303.07	17303.71	N-terminális metionin nélküli értékek
Ta1223a	A: 10966.55 B: 10966.55 C: 10966.55	10966.66	N-terminális metionnal számolt értékek
Ta0093	A: 9933.50 B: 9933.55 C: 9933.49	9933.52	N-terminális metionin nélküli értékek
Ta0438	A: 7177.99 B: 7178.00 C: 7176.94	7178.41	2. metionintól számolt értékek

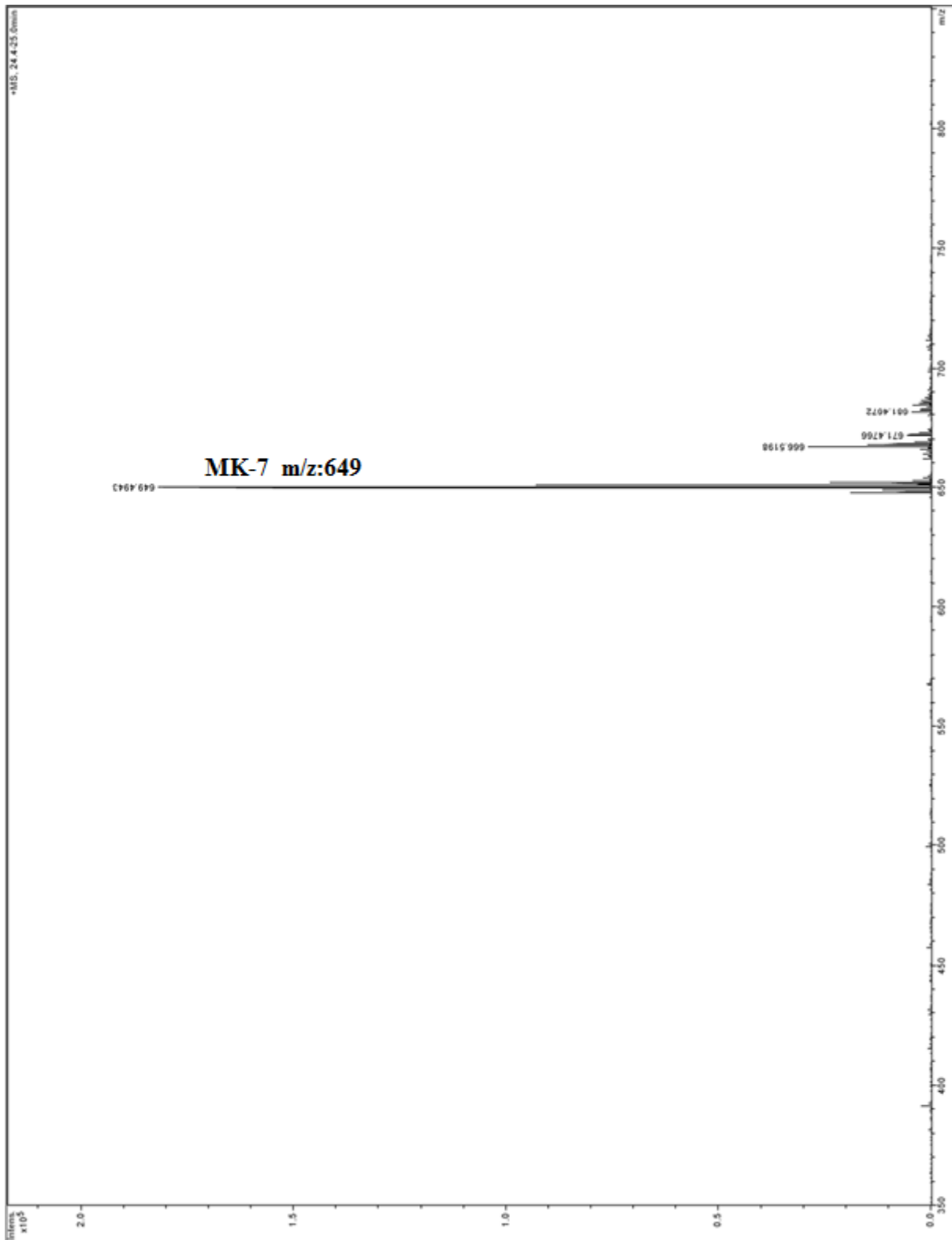
## 10. MELLÉKLET

A TaKT összetevők tömegspektruma. A tisztított TaKT-ekből KMV oldószer eleggyel extrahált anyagok elválasztása és analízise a módszertani részben leírtaknak megfelelően történt. A 1-8. spektrum a TaKT-ekből extrahált és C8 oszlopon elválasztott anyagok m/z arányait mutatja (a retenciós idő a jobb felső sarokban található). A függőleges tengely az ionintenzitást, a vízszintes tengely a tömeg/töltés arányt mutatja (m/z). Csak a nagy intenzitású m/z arányokat jelöltük. A 9. és 10. spektrum az MK-4 és MK-7 referencia-összetevők m/z arányait mutatja.

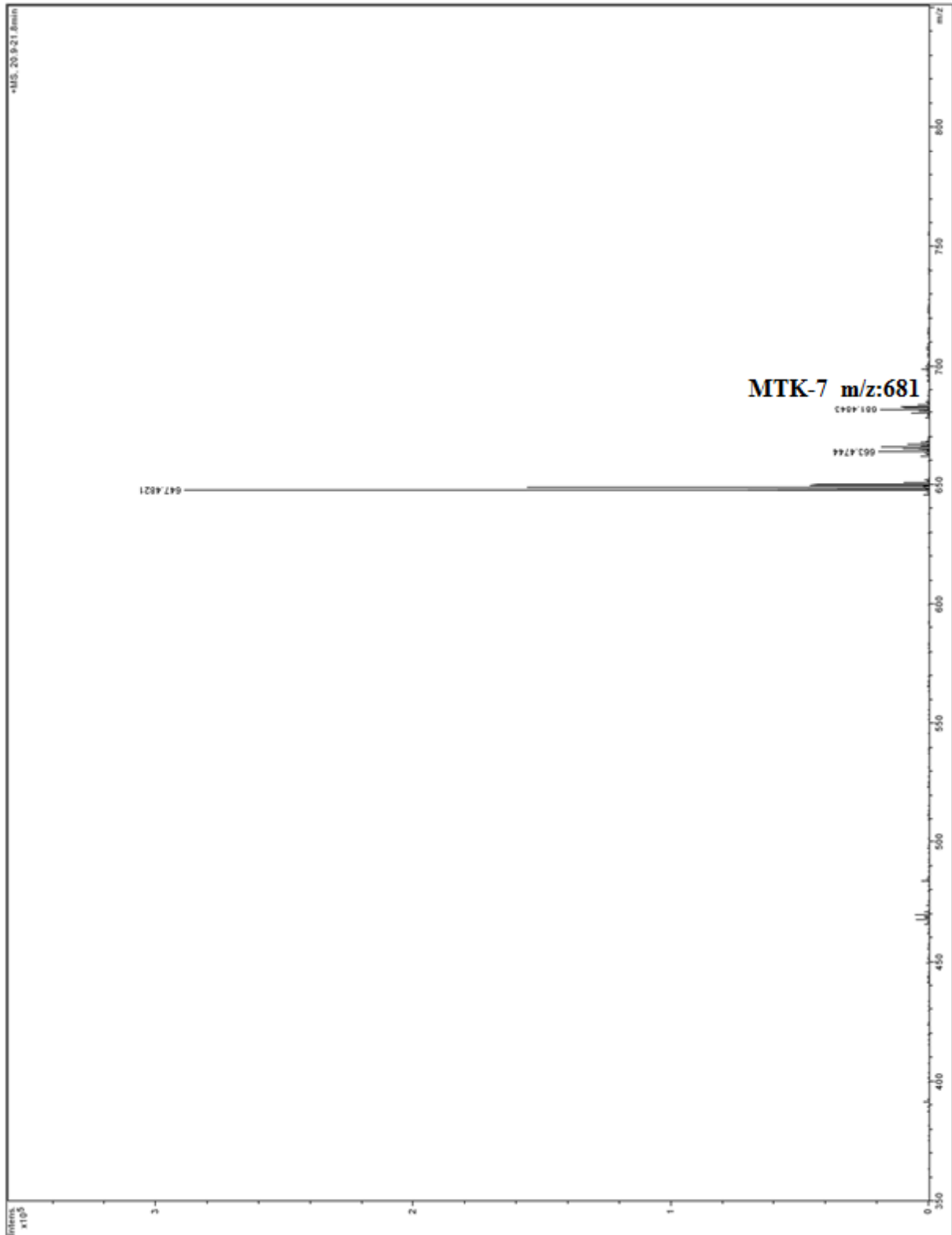
### 1. Spektrum: retenciós idő 25,5 – 26,1 perc



## 2. Spektrum: retenció idő 24,4 – 25 perc

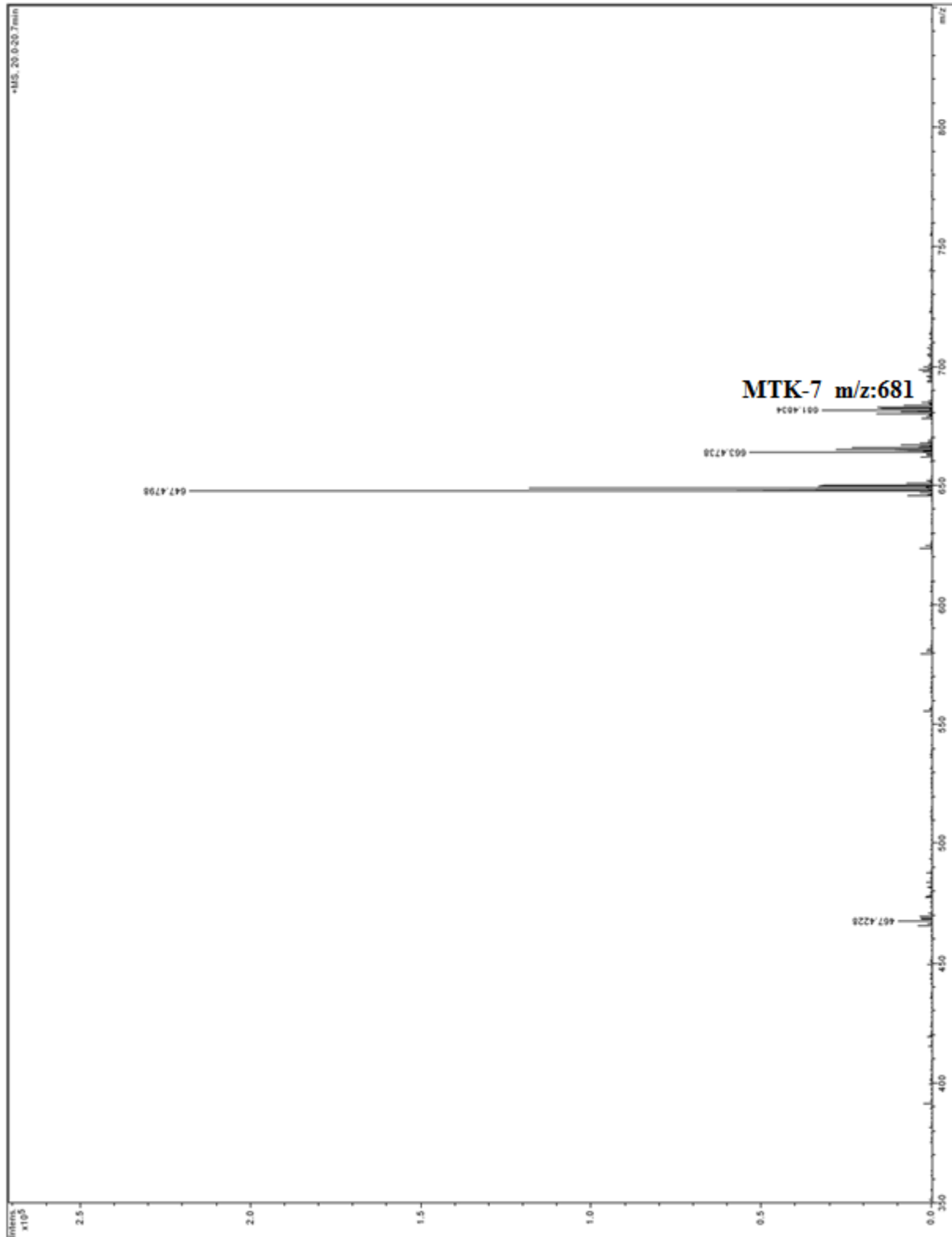


## 3. Spektrum: retenció idő 20,9 – 21,8 perc

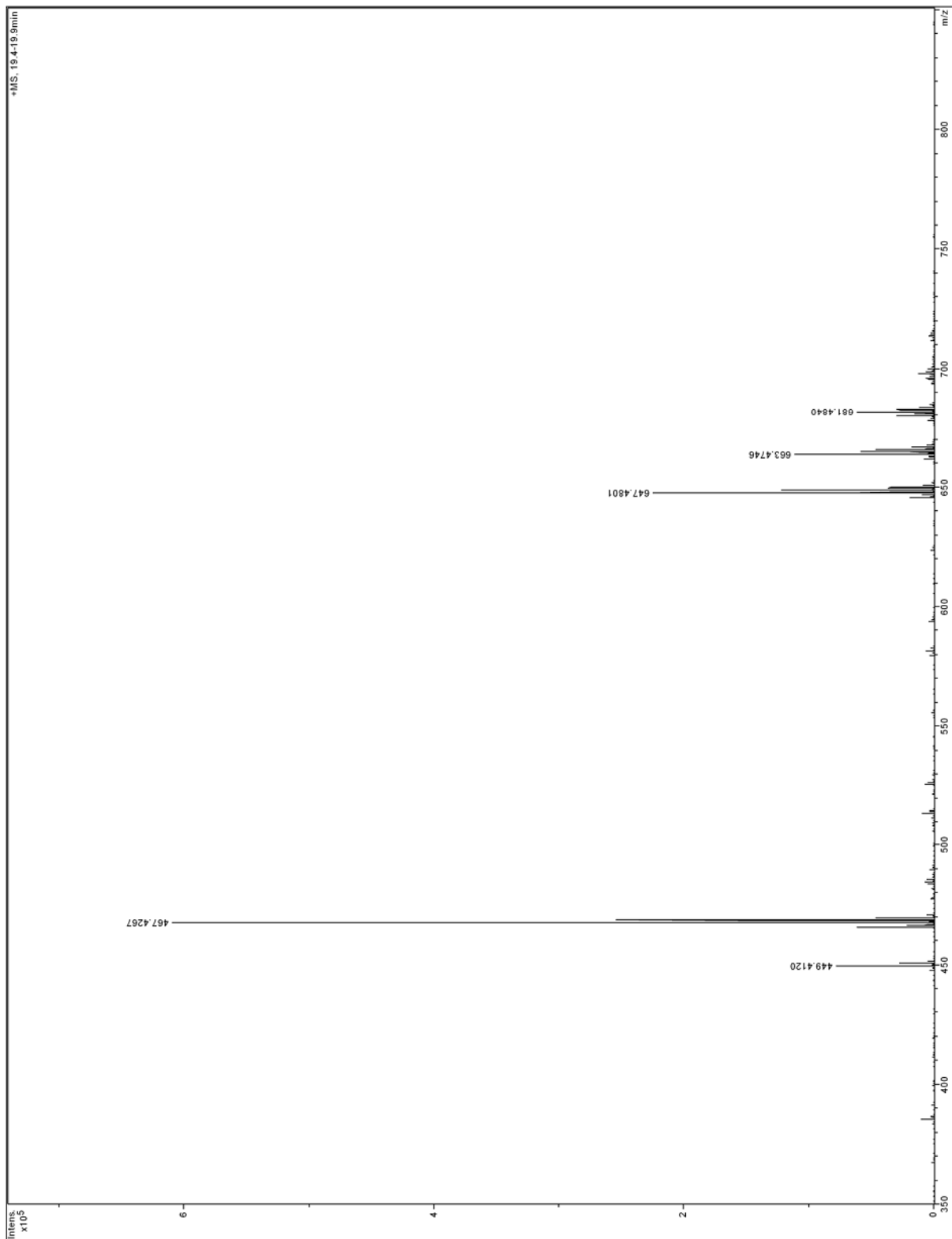




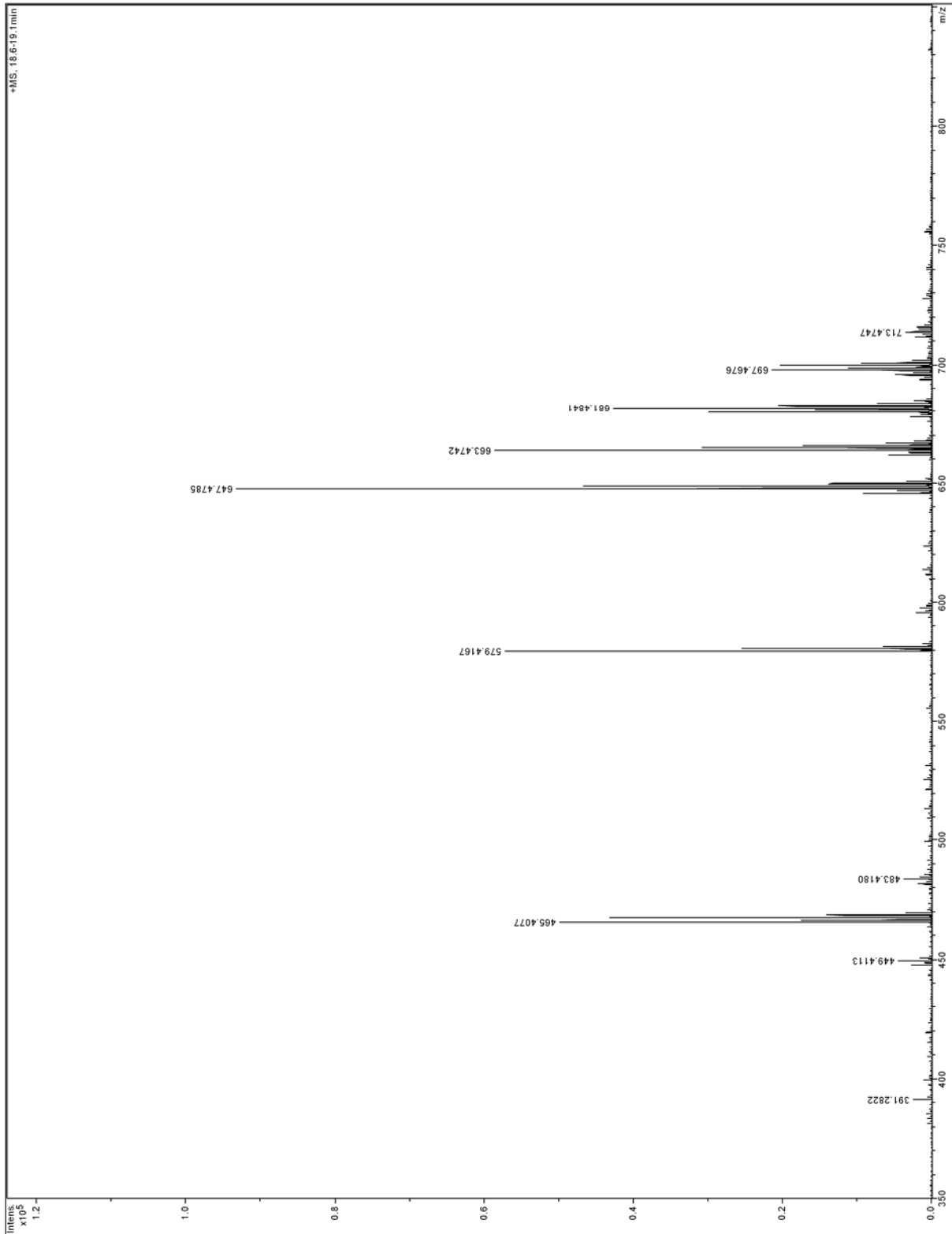
## 4. Spektrum: retenció idő 20 – 20,7 perc



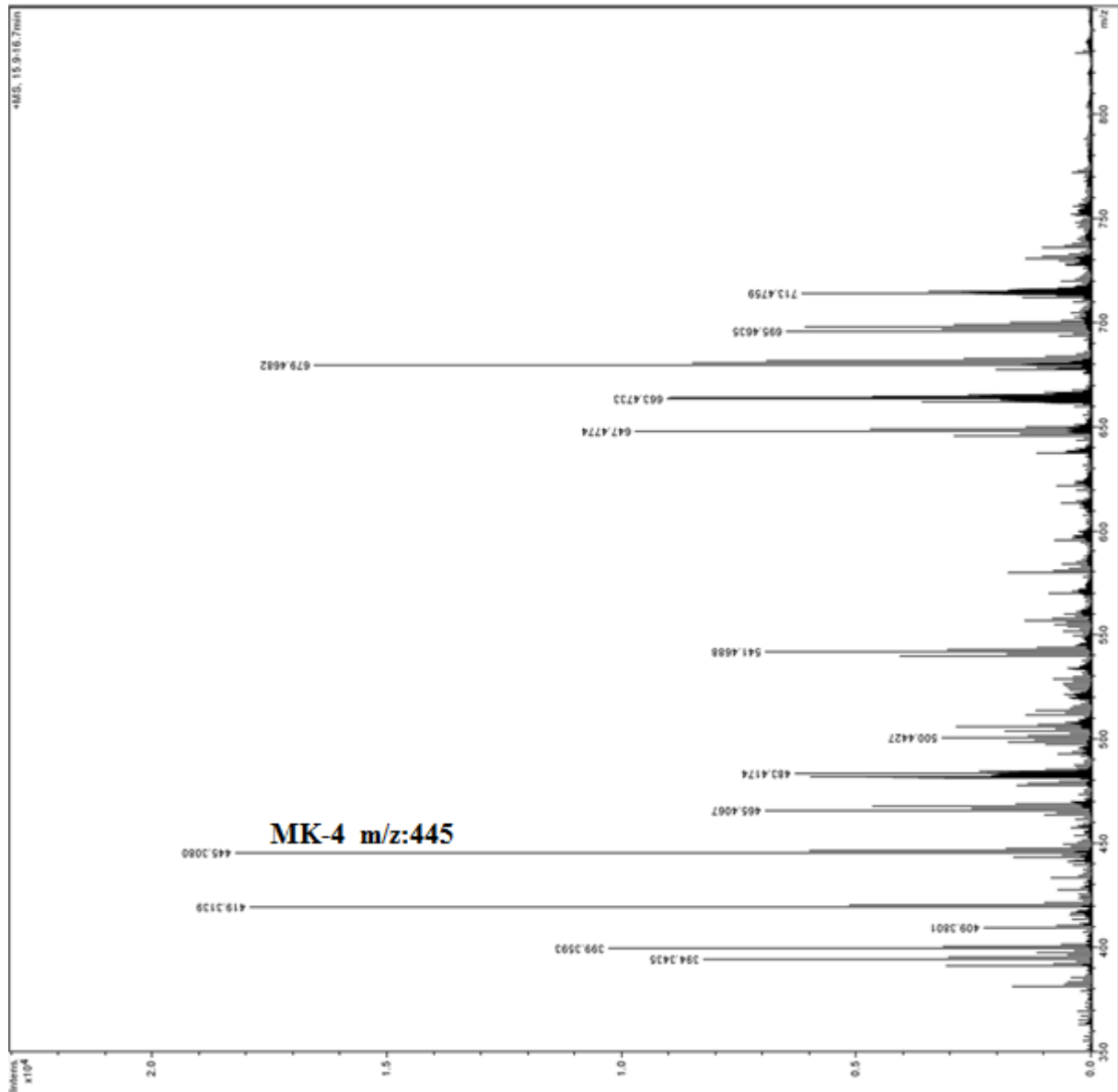
5. Spektrum: retenciósi idő 19,4 – 19,9 perc



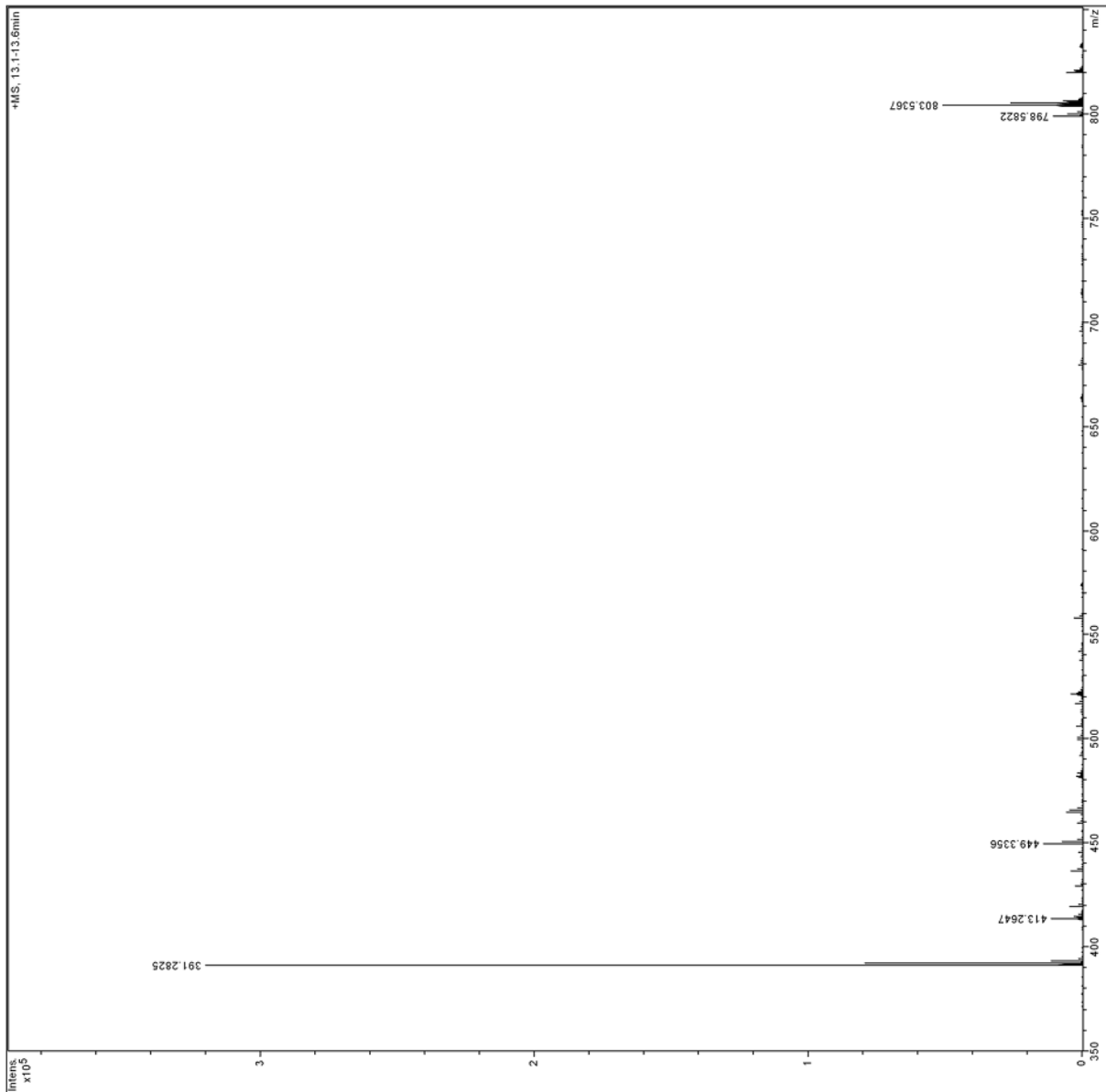
## 6. Spektrum: retenció idő 18,6 – 19,1 perc



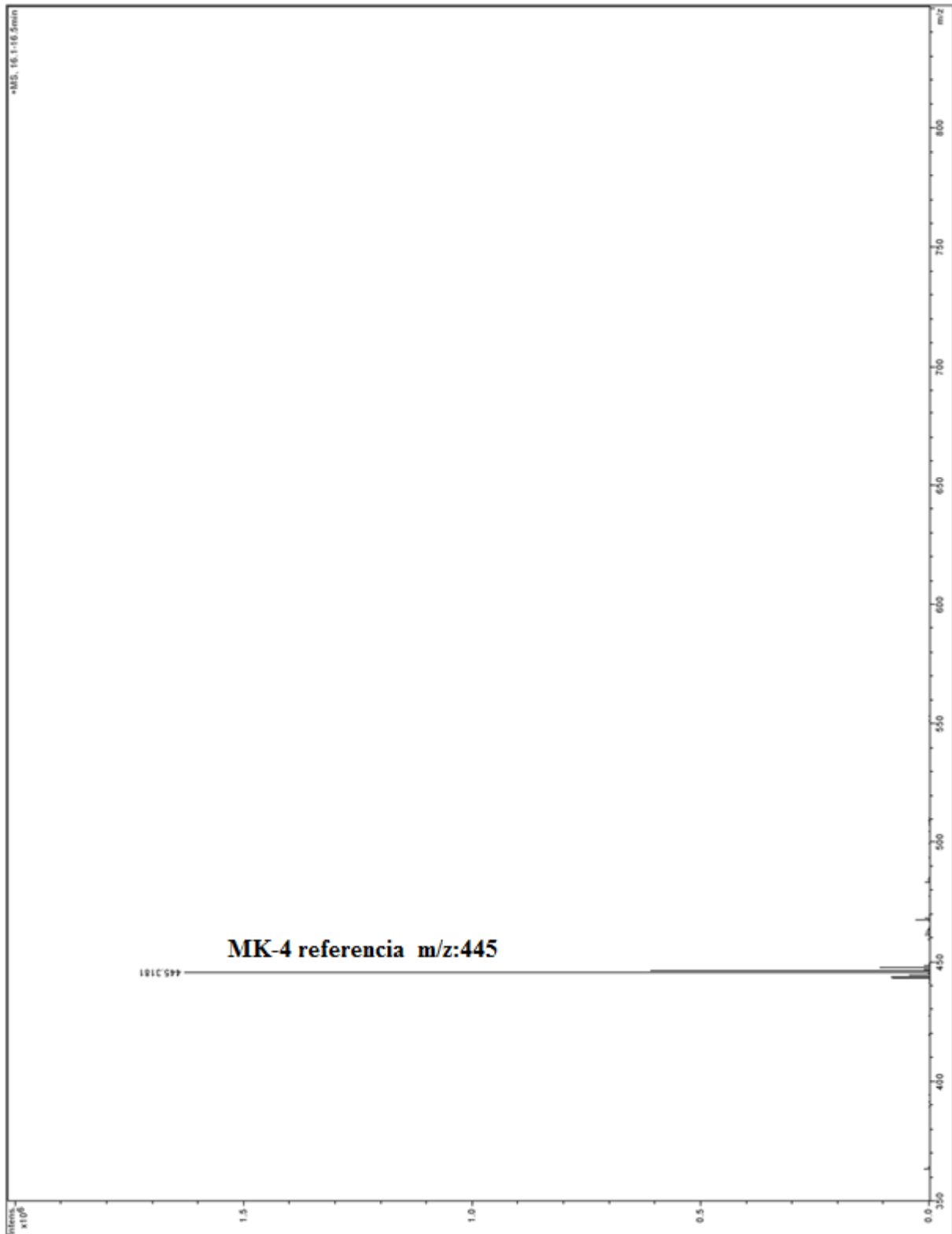
## 7. Spektrum: retenció idő 15,9 – 16,7 perc



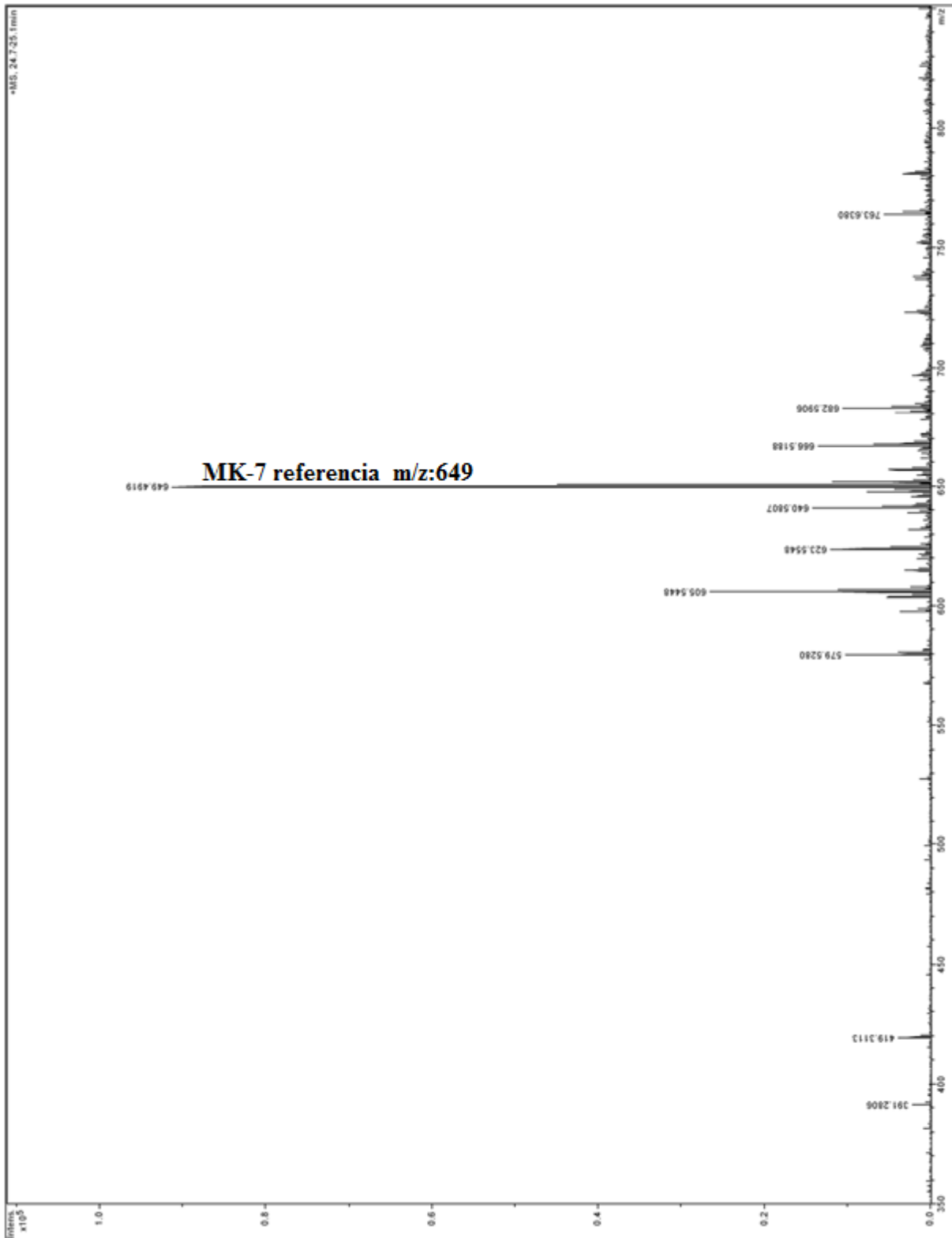
## 8. Spektrum: retenció idő 13,1 – 13,6 perc



## 9. Spektrum: retenció idő 16,1 – 16,5 perc

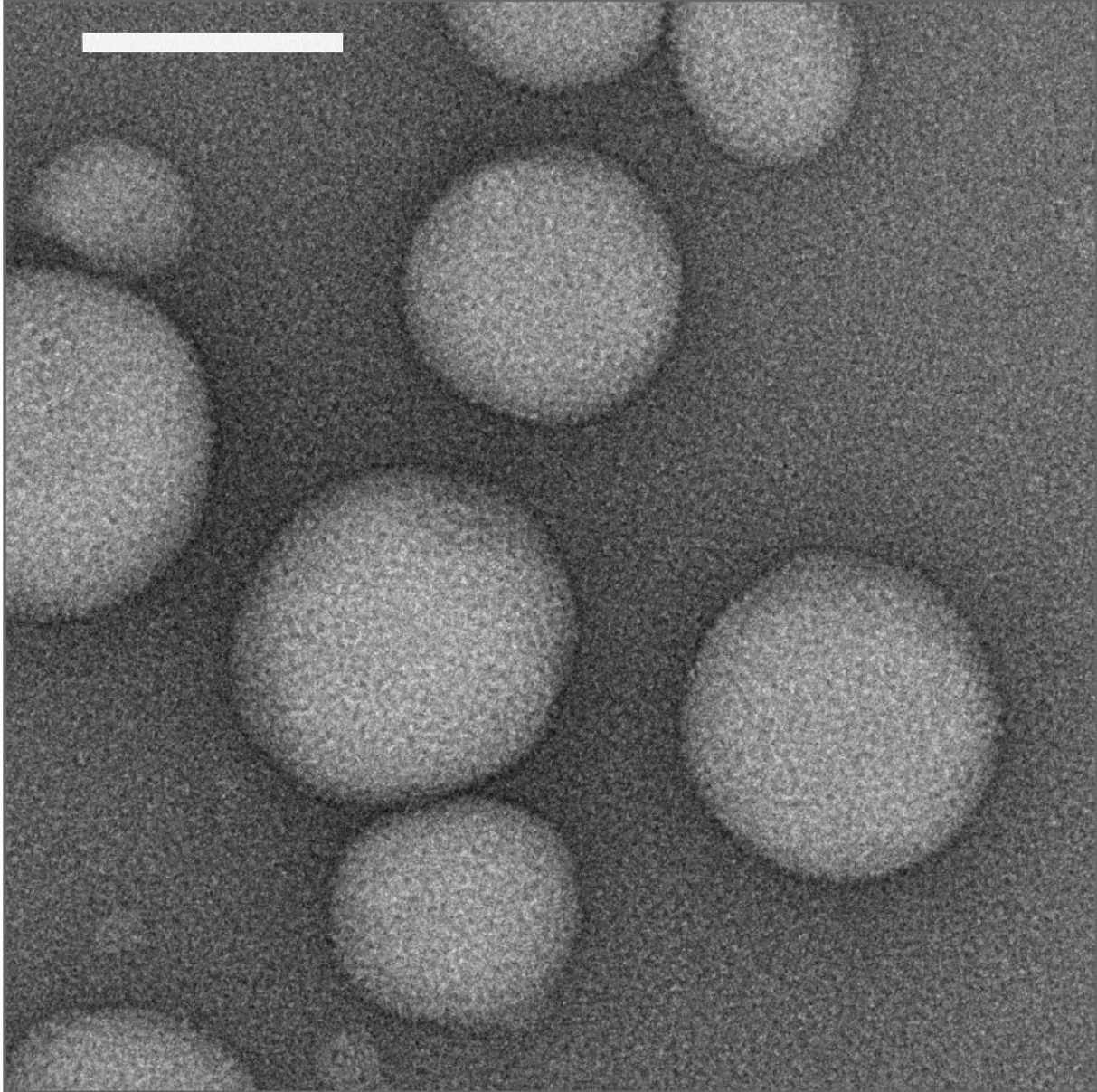


## 10. Spektrum: retenció idő 24,7 – 25,1 perc



**11. MELLÉKLET**

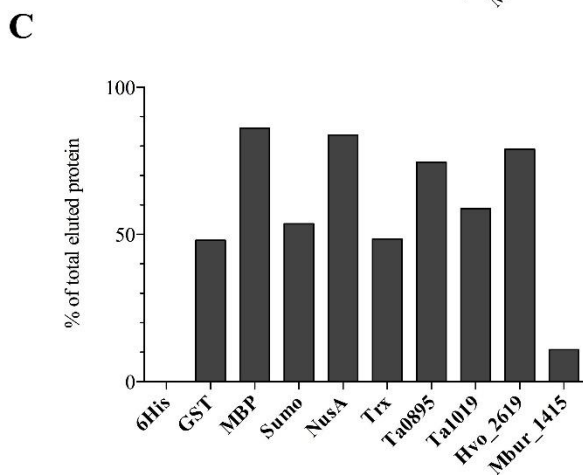
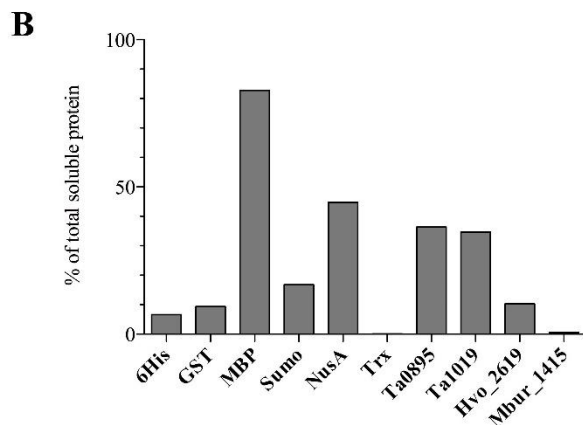
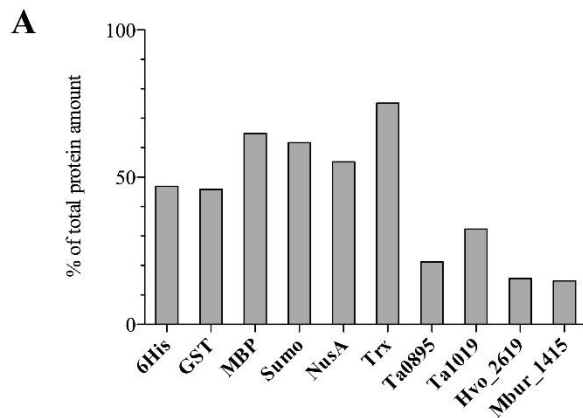
A TaKT-ek strukturálatlan felszínét bemutató elektronmikroszkópos kép. A méretarány-skála 80 nm-nek felel meg.





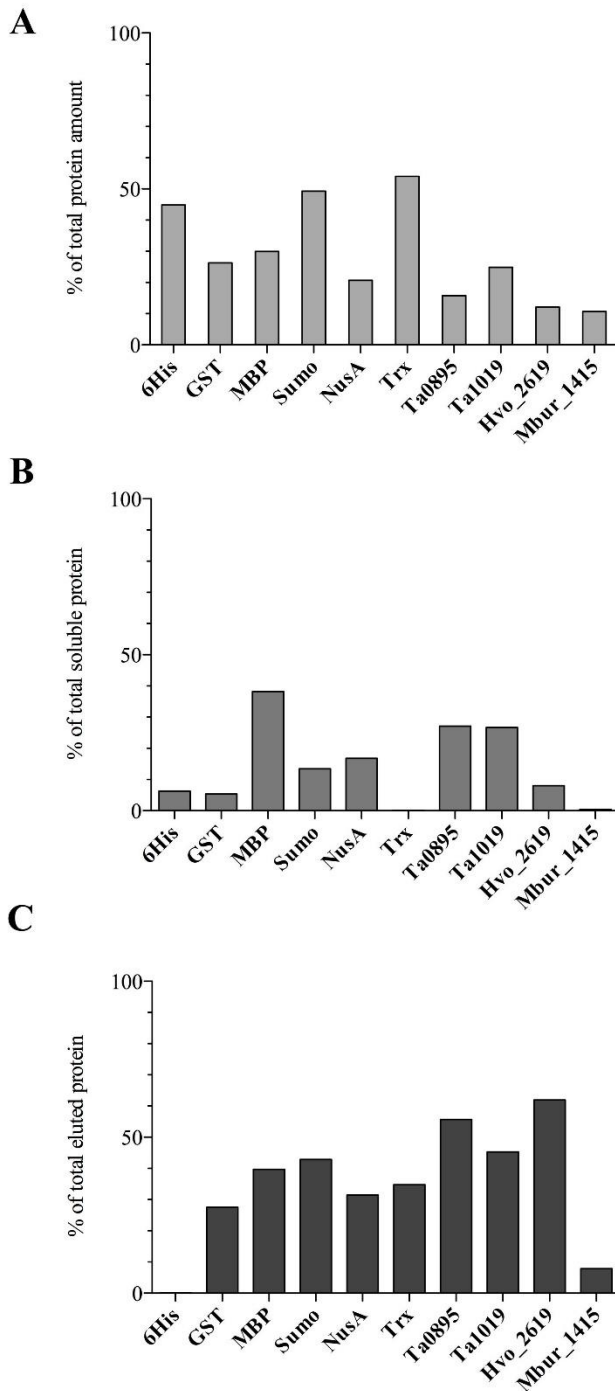
## 12. MELLÉKLET

A szolubilizáló partnerek rekombináns ScRpn11 expressziós szintjére és oldhatóságára gyakorolt hatása. A megadott értékek az egymást követő tisztítási lépésekből származó fehérjék Agilent 2100 bio-analyzerrel mért mennyisége százalékban kifejezve. **A)** Expressziós arány (%): rekombináns fehérje/sejtlizátum összfehérje arány; **B)** Oldható fehérjék aránya (%): rekombináns fehérje/összfehérje arány a sejttörmeléktől és oldhatatlan fehérjéktől centrifugálással megtisztított felülúszóban; **C)** Eluált fehérjék aránya (%): rekombináns fehérje/összfehérje arány a His-tag tisztítást követően. Minden érték kétszeres ismétlés átlaga.



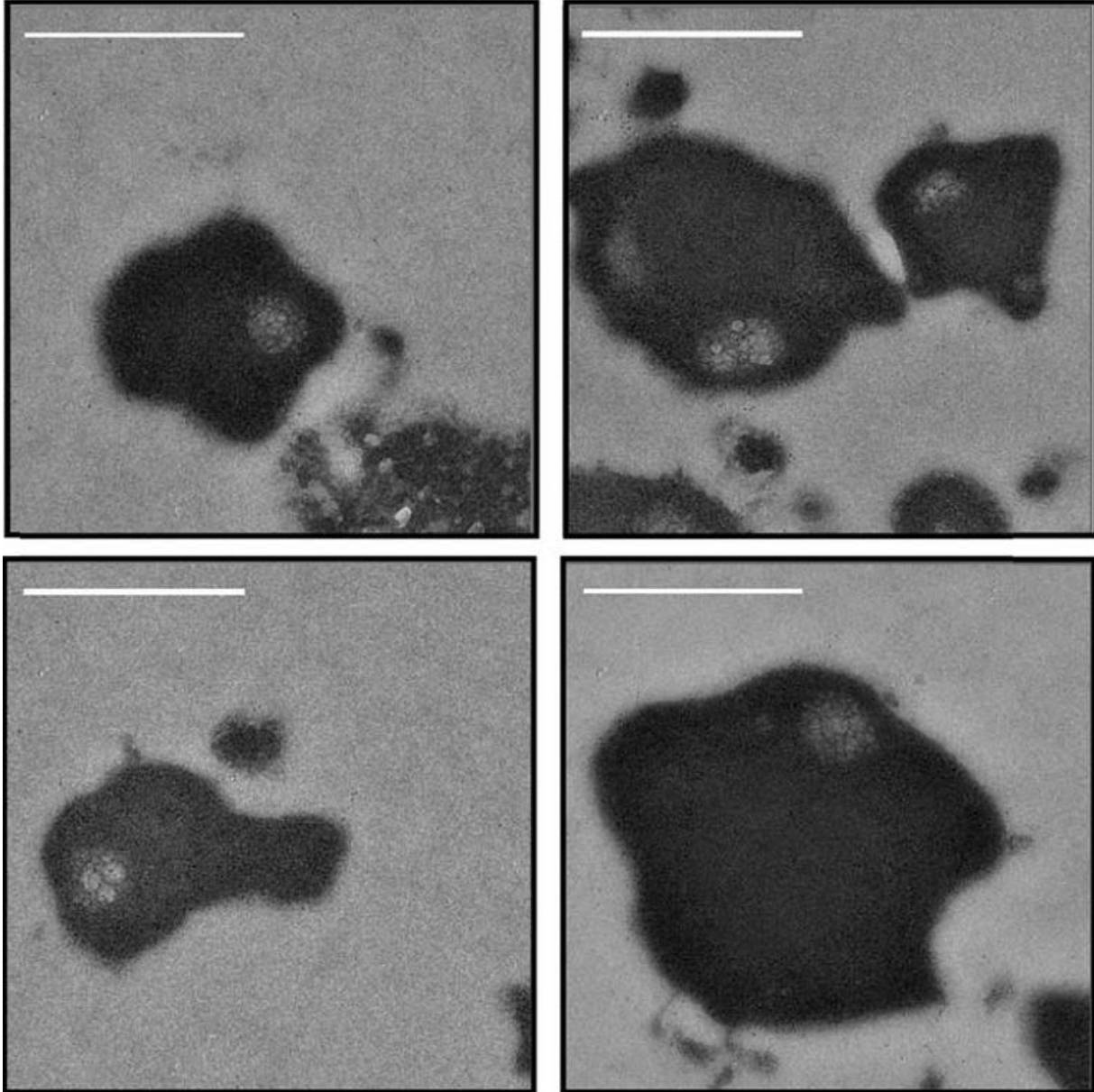
### 13. MELLÉKLET

A szolubilizáló partnerek rekombináns ScRpn11 expressziós szintjére és oldhatóságára gyakorolt hatása. A **11. MELLÉKLET**ben bemutatott értékeket a fúziós partner molekulatömegével korrigáltuk. Az **A**, **B** és **C** jelölések megegyeznek az **11. MELLÉKLET** jelöléseivel.



**14. MELLÉKLET**

Immunjelölt *T. acidophilum* sejtek vékony metszeteinek elektronmikroszkópos képei, melyeken aggregálódott TaKT-ek figyelhetők meg. A méretarány-skálák 1 $\mu$ m-nek felelnek meg.



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban témavezetőimnek, Dr. Nagy Istvánnak és Dr. Kriszt Balázsnak valamint konzulensemnek Dr. Kukolya Józsefnek szeretném megköszönni a kísérlettervezésben, a kísérletes munkában és a publikálásban nyújtott segítséget, illetve a rendelkezésemre bocsátott, kutatáshoz nélkülözhetetlen laboratóriumi „játszóteret” és eszközöket.

Köszönöm Prof. Dr. Wolfgang Baumeisternek a támogatást és lehetőséget, hogy a Max Planck Intézetben végezhettem kutatómunkám egy részét.

Köszönöm volt kollégáimnak és doktorandusz munkatársaimnak, hogy segítettek elmélyülni a molekuláris biológiai kísérletek rejtelmeiben, ebben a tekintetben külön köszönet illeti Dr. Baka Erzsébet, Dr. Tóth Ákos és Dr. Pathare Ganesh kollégáimat.

Köszönöm volt egyetemi tanárainak Dr. Hoffmann Gyulának és Dr. Mátics Róbertnek a gondolatébresztő beszélgetéseket és a mentorálást, mely máig inspirálólag hat.

Köszönöm Ludvig Brigittának a disszertáció szerkesztésében és az apró hibák kigyomlálásában nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak a feltétel nélküli támogatást és a buzdítást.