



UNIVERSITATEA „POLITEHNICA” din BUCUREȘTI
Facultatea de Chimie Aplicată și Știința Materialelor
Departamentul de Chimie Analitică și Ingineria Mediului

Nr. Decizie 836 din 15.04.2022

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Biosinteza proteinelor modulatorie de apoptoză și investigarea interacțiunilor dintre ele

Biosynthesis and interaction studies of apoptosis modulating proteins

Autor: Katalin Nagy

Conducător de doctorat: Prof. dr. ing. Szabolcs Lányi Szabolcs

Cuvintele-cheie: peptide cu masa moleculară mică, apoptoză, mimetice SMAC, expresie heterologă, purificarea proteinelor, refoldare, marcarea chimică fluorescentă

Comisia de doctorat

Președinte	Prof. Habil. dr. ing. Ileana Rău	de la	Universitatea „Politehnica” din București
Conducător de doctorat	Prof. dr. ing. Szabolcs LÁNYI	de la	Universitatea „Politehnica” din București
Referent	Prof. dr. ing. Cristina COSTACHE	de la	Universitatea „Politehnica” din București
Referent	Prof. Habil. dr. ing. Csaba PAIZS	de la	Universitatea Babeș-Bolyai
Referent	Prof. univ. dr. Előd- Ernő NAGY	de la	Universitatea de Medicină, Farmacie, Științe și Tehnologie „George Emil Palade” din Târgu Mureș

București
2022

CUPRINS

MULȚUMIRI.....	3
INTRODUCERE.....	4
CAPITOLUL 1.	6
PREZENTARE GENERALĂ A LITERATURII	6
1.1. PEPTIDE	6
1.1.2. Peptide terapeutice-medicamente peptidice	6
1.2. BIOSINTEZA	7
1.2.2. Selecția gazdei	8
1.2.4. Etichete de purificare și afinitate a proteinelor	9
1.3. MOARTEA CELULARĂ ȘI APOPTOZA	10
1.4. MIMETICE SMAC	11
1.4.1 Interacțiuni cu proteine și molecule mimetice.....	11
1.4.2. Caracteristicile structurale ale moleculelor mimetice Smac	12
CAPITOLUL 3.	15
REZULTATE.....	15
3.1. BIOSINTEZA proteinelor CIAP1, CIAP2 și XIAP	15
3.1.2. Optimizarea expresiei proteinei XIAP [18]	15
3.1.3. Solubilizarea proteinei XIAP-GST	16
3.1.4. Refoldarea și purificarea cu detergent a proteinei XIAP-GST prin cromatografie de afinitate și filtrare pe gel	18
3.1.5. Identificarea proteinei refoldate	21
3.2. BIOSINTEZA DOMENIULUI BIR3 AL IAP-urilor	22
3.2.1. Clonarea și expresia domeniului BIR3 al IAP-urilor	22
3.2.2. Cromatografia de purificare prin afinitate și schimb de anioni.....	23
3.3. PEPTIDA SMAC SI PEPTIDA CONTROL	25
3.3.1. Design and construction of SUMO fusion system for SMAC mimetic peptide expression	25
3.3.2. Exprimarea heterologă și purificarea constructelor SUMO-Peptide.....	26
3.3.4. Recuperarea peptidelor recombinante	29
3.3.5. Marcarea fluorescentă C-terminală a peptidelor și biotinilarea	30
3.3.6. Monitorizarea interacțiunii BIR3-peptidă.....	32
3.3.7. Testul Pull-Down	33
CONCLUZII	35
C.1. CONCLUZII GENERALE	35
C.2. CONTRIBUȚII ORIGINALE	35
C.3. DEZVOLTĂRI VITOARE ÎN CERCETARE	36
REFERINȚĂ SELECTATĂ.....	37
APPENDIX.....	41
A.1. PUBLICAȚII ȘI PARTICIPARE LA CONFERINȚE	41

MULȚUMIRI

Aș dori să-mi exprim recunoștința tuturor celor care au contribuit la această teză și m-au susținut în acest fel, deoarece fără niciunul dintre ei, această lucrare de cercetare nu ar fi fost posibilă.

În primul rând, aș dori să-mi exprim sincere mulțumiri conducătorului meu Prof. Szabolcs LÁNYI pentru că mi-a oferit ocazia de a-mi finaliza teza de doctorat. Aș dori să mulțumesc pentru sprijinul persistent și răbdător în timpul cercetării.

Nu găsesc cuvinte pentru a-mi exprima recunoștința sinceră față de Prof. dr. Beáta ALBERT pentru că mi-a oferit această mare oportunitate de a lucra în grupul ei. Apreciez contribuțiile ei de timp și idei pentru a-mi face munca productivă și stimulativă. Îi sunt recunoscătoare pentru incredibilul ei ajutor, răbdare și pentru o mulțime de lucruri pe care le-am învățat de la ea.

De asemenea, aș dori să profit de această ocazie pentru a-i mulțumi dr. ing. Ildikó MIKLÓSSY și dr. ing. Csongor ORBÁN pentru că mi-a împărtășit ideile și sugestiile utile pentru munca mea. Interacțiunile lor academice și ajutorul tehnic mi-au permis să-mi finalizez munca.

Aș dori să-i mulțumesc prof. Habil. Dr. Ing. Csaba PAIZS de la Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică a Universității „Babes-Bolyai” Cluj-Napoca, îndrumarea și posibilitatea de a efectua experimentele la grupul său de cercetare. Mai mult, aș dori să îi mulțumesc Dr. ing. Csaba László BENCZE pentru cooperare în realizarea reacțiilor de etichetare chimică.

Aș dori să-mi exprim recunoștința colegilor mei pentru sprijinul și ajutorul acordat în această activitate.

Mulțumesc din suflet familiei mele minunate pentru sprijinul meu în momentele de dificultăți din ultimii ani. Cuvintele nu pot exprima sentimentele pe care le am pentru mama mea, Zsuzsanna BENEDEK, pentru sprijinul ei constant necondiționat atât în studiul meu, cât și în cariera mea. Nu aș fi aici fără sprijinul tău. Îi mulțumesc nespuse soțului meu, Csaba MOLNÁR pentru dragostea, răbdarea, sprijinul și ajutorul spiritual, pentru că m-a încurajat sincer în momentele grele. De asemenea, sunt recunoscător prietenilor mei care m-au sprijinit pe parcurs.

În cele din urmă, această teză este dedicată memoriei tatălui meu, László Nagy. Mi-e dor de tine în fiecare zi și sper cu adevărat că ești mândru de mine.

INTRODUCERE

În ultimul deceniu, mai multe peptide au fost considerate surse terapeutice potențiale ale diferitelor boli. Interesul pentru peptidele bioactive a crescut în farmacologie și științe medicale datorită cunoașterii lor crescânde asupra diverselor moduri de acțiune. Peptidele terapeutice au fost în general derivate din trei surse: peptide naturale sau bioactive produse de plante, animale sau umane, peptide izolate din biblioteci genetice sau recombinante și peptide descoperite din biblioteci chimice. Terapiile peptidice sunt limitate de labilitățile chimice și enzimatică ale peptidelor [1]. Multe peptide sunt inactive atunci când sunt aplicate pe cale orală și chiar și aplicarea parenterală nu este adesea posibilă [2]. Aplicarea prin intermediul membranelor mucoase (de exemplu, nazale) este promițătoare. O strategie majoră în chimia peptidelor este proiectarea modificării chimice pentru a crește stabilitatea sa chimică și enzimatică, pentru a prelungi timpul de acțiune și pentru a crește activitatea și selectivitatea către receptor [3].

Clasificate după ținte celulare, peptidele au două grupuri majore [4]. Prima include peptide care sunt active împotriva celulelor microbiene și canceroase, dar care nu sunt active împotriva celulelor sănătoase ale mamiferelor. Al doilea grup conține peptide anticanceroase care au activitate împotriva tuturor celor trei tipuri de celule (microbiene, normale și canceroase).

Producția industrială de peptide se bazează în mod obișnuit pe trei tehnologii alternative: sinteza în fază solidă, sinteza în fază lichidă și tehnologia recombinantă biotehnologică in vivo. Strategiile chimice sintetice sunt provocatoare din punct de vedere economic. Producerea de peptide cu tehnici recombinante s-a dovedit a fi mai eficientă.

Peptidele au primit o atenție specială în biologia moleculară în ultima perioadă, deoarece peptidele ar putea fi utilizate în studiul structurii și funcției proteinelor. Apoptoza este un proces esențial în dezvoltarea celulelor. Proteine inhibitorii ale apoptozei (IAP) suprimă moartea celulară. Această supresie este cauzată de inhibarea activității caspazelor [5]. Proteina mitocondrială SMAC (al doilea activator al caspazelor derivat din mitocondrie) promovează apoptoza prin eliminarea efectului inhibitor al IAP prin interacțiuni fizice. Secvențele amino-terminale din proteina SMAC (AVPI) sunt necesare pentru această funcție. SMAC promovează apoptoza prin activarea caspazelor în calea citocromului c / Apaf-1 / caspazei-9 [5]. În cazul apoptozei, cercetătorii s-au concentrat pe mimetici Smac cu molecule mici [6] care vizează domeniile BIR3 IAP's. Acești inhibitori ai IAP sunt în prezent investigați ca medicamente anticanceroase în studiile clinice [5, 6].

În această lucrare, am studiat biosinteza peptidelor mici cu lungimea de 13 aminoacizi. Aceste peptide conțin fracțiune tetrapeptidică AVPI a SMAC, care sunt implicate în interacțiunea cu IAP. Mai mult, marcarea C-terminală a peptidelor a fost executată prin reacție de marcarea fluorescentă. S-a folosit un colorant Alexa Flour pentru reacția de reticulare. Studiile de interacțiune au fost efectuate prin metoda de polarizare a fluorescenței. În plus, domeniul BIR3 al IAP a fost produs și prin tehnici recombinante. În timpul cercetării noastre am investigat expresia heterologă a IAP's. În acest sens, solubilizarea din corpul de incluziune și replierea cu succes a XIAP au fost executate folosind condiții de nenedaturare. Această cercetare include, de asemenea, investigația in vitro a interacțiunii proteine-proteine prin tehnica pull-down.

Teza este împărțită în trei capitole principale. În primul capitol, într-o prezentare generală a literaturii, este prezentată importanța peptidelor mici în perspectiva științifică actuală. Urmată de prezentarea moleculelor mimetice SMAC, efectul lor asupra apoptozei și prezentarea aplicațiilor terapeutice. Mai mult, în acest capitol este discutată în detaliu metoda pe care o considerăm cea mai eficientă și cea mai adecvată pentru producția de peptide.

În al doilea capitol sunt prezentate materialele și metodele utilizate în timpul lucrului practic, începând de la tehnicile recombinante până la investigarea interacțiunii peptidă-proteină.

Al treilea capitol conține lucrările de cercetare propriu-zise și discutarea rezultatelor sale. La începutul capitolului este prezentată proiectarea și biosinteza peptidelor mici. Acesta include proceduri de clonare, selectarea vectorului adecvat și a liniei celulare gazdă, expresie heterologă și rezultate eficiente de purificare. Mai mult, acest capitol conține rezultatele noastre despre biosinteza IAP's. Tehnicile recombinante menționate mai sus au fost utilizate și în această fază a cercetării. În plus, este prezentată solubilizarea din corpul de incluziune și replierea XIAP. Și, în cele din urmă, sunt discutate studiile de interacțiune a domeniului BIR3 și a peptidelor mici marcate fluorescent.

CAPITOLUL 1.**PREZENTARE GENERALĂ A LITERATURII****1.1. PEPTIDE****1.1.2. Peptide terapeutice-medicamente peptidice**

O serie de funcții biochimice importante ale vieții sunt influențate de peptide. Peptidele au primit o atenție specială în biologia moleculară în ultima perioadă din mai multe motive. La început, peptidele ar putea fi utilizate în studiul structurii și funcției proteinelor. De exemplu, peptidele sintetice pot fi utilizate ca sonde pentru a determina interacțiunile proteină-peptidă. Peptidele inhibitoare sunt, de asemenea, utilizate în cercetarea clinică pentru a examina efectele peptidelor asupra inhibării proteinelor canceroase [4] și a altor boli.

Peptidele bioactive au un interes crescut de farmacologie și științe medicale datorită cunoașterii lor crescândă asupra diverselor moduri de acțiune. Izolarea și aplicarea țintită a peptidelor câștigă importanță pentru tratamentul proceselor patologice. Noile metode terapeutice bazate pe peptide pentru o serie de boli dau naștere speranței că bolile pot fi supuse terapiei. În tabelul următor vă prezentăm câteva dintre aceste peptide bioactive comerciale.

Table 1.1. Peptide bioactive comerciale

Denumire generic (denumire comercială)	Boală / țintă	Proprietăți	Referință
Ecaltantide (Kalbitor®)	Angioedem ereditar	Inhibitor al kalikreinei plasmatică	[9]
Telavancin (Vibativ®)	Infecția pielii	Agent antibacterian	[10]
Romidepsin (Istodax®)	Limfom cutanat de celule T	inhibitor HDAC	[11]
Liraglutide (Victoza®)	Diabet de tip 2	Agonist al receptorului GLP-1	[12]
Boceprevir (Victrelis™)	Genotipul 1 al virusului hepatitei C	Inhibitor de protează NS3/4A	[13]
Telaprevir (Incivek®)	Genotipul 2 al virusului hepatitei C	Inhibitor de protează NS3/4A	[14]
Brentuximab vedotin (Adcetris™)	limfomul lui Hodgkin	CD30 regizat	[15]
Icatibant (Firazyr®)	Angioedem ereditar	Antagonist al receptorului bradicininei B2	[16]

Peptidele terapeutice au fost în general derivate din trei surse: (a) peptide naturale sau bioactive produse de plante, animale sau oameni (derivate din hormoni peptidici naturali sau din fragmente de proteine mai mari); (b) peptide izolate din biblioteci genetice sau recombinante și (c) peptide descoperite din biblioteci chimice.

Terapiile peptidice sunt limitate de labilitățile chimice și enzimatică ale peptidelor. Multe peptide sunt inactivate atunci când sunt aplicate pe cale orală și chiar și aplicarea parenterală nu este adesea posibilă [2]. Aplicarea prin intermediul membranelor mucoase (de exemplu, nazale) este promițătoare. O strategie majoră în chimia peptidelor este îndreptată spre modificarea chimică a creșterii stabilității chimice și enzimatică.

Clasificate după celulele țintă peptidele au două grupe majore [4]. Prima grupă include peptide active împotriva celulelor microbiene și canceroase, dar care nu sunt active împotriva celulelor sănătoase ale mamiferelor. A doua grupă conține peptide anticanceroase care au activitate împotriva tuturor celor trei tipuri de celule (microbiene, normale și canceroase).

Conform literaturii, au fost comercializate peste 50 de medicamente peptidice și sute de peptide se află într-un stadiu preclinic sau în studii clinice. Vânzările anuale de medicamente peptidice sunt de ~ 25 miliarde USD, iar vânzările de medicamente peptidice sunt estimate să depășească 50 miliarde USD în 2024 [17].

1.2. BIOSINTEZA

În zilele de astăzi, multe peptide terapeutice și proteine sunt produse prin tehnici recombinante. Expresia heterologă este definită ca expresia unei gene sau a unei părți a unei gene într-un organism gazdă, unde gena nu există în mod natural în organism. Inserarea genei țintă în gazda heterologă se realizează prin tehnici recombinante [18]. Bacteriile, ciupercile, celulele mamiferelor, celulele animale, celulele vegetale pot fi celule gazdă. Sistemele de expresie heterologă se bazează pe ipoteza că principiile de bază ale expresiei și funcției proteinelor sunt similare în toate organismele. Proteinele și peptidele au mai multe caracteristici care ar trebui observate cu atenție atunci când se alege un sistem gazdă pentru producția lor, cum ar fi dimensiunea, localizarea sau secreția intracelulară, pliarea corectă și modelul de glicozilare.

Teoretic, etapele necesare pentru obținerea unei peptide recombinante sunt destul de simple. La început, gena de interes trebuie clonată într-un vector de expresie, rezultând plasmida corespunzătoare. Această plasmidă din a doua etapă este transformată în celula gazdă. Următorul pas este inducerea celulei gazdă, care începe producția de peptide. După aceste proceduri, peptida este gata pentru purificare și caracterizare. În trecut, multe recenzii au descris sistemele de expresie heterologe cu foarte multe detalii [63-66].

În practică, planificarea unei expresii și realizarea acesteia pare dificilă [64]. Circumstanțele care trebuie luate în considerare în timpul planificării sunt următoarele: trebuie să examinăm modalități de a izola gena intereselor, alegând vectorul de expresie adecvat și care funcționează bine, alegând organismul adecvat pentru expresie, depanând producția, purificarea și analiza structurală a peptidelor recombinante.

1.2.2. Selecția gazdei

Celulele bacteriene pot fi proiectate pentru a exprima gene non-native, rezultând în producția de peptide și proteine recombinante, care au diverse aplicații biotehnologice și farmaceutice. În eucariote, cum ar fi celulele de mamifere și drojdie, care au genomi mari, o expresie mai mare a proteinelor recombinante poate fi dificilă.

Alegerea celulei gazdă a cărei producere a peptidei va iniția schița întregului proces. Sisteme gazdă disponibile, de ex. bacteriile, drojdia, ciupercile, celulele vegetale, celulele animale și algele unicelulare au toate punctele tari și punctele slabe, iar alegerea lor poate depinde de peptida de interes. În revizuirea recentă a literaturii, ne vom concentra pe expresia heterologă la bacterii, expresia peptidică recombinantă în *Escherichia coli*.

Celulele *E. coli* au fost cele mai populare celule producătoare de proteine recombinante de peste două decenii. În sistemul de expresie *Escherichia coli*, expresia este indusă cu izopropil b-D-1-tiogalactopiranozidă (IPTG). Studiile au arătat niveluri scăzute de expresie a peptidelor. Procesul de producție necesită realizarea a trei factori individuali: expresie, solubilizare și purificare [23].

Sistemul de expresie *E. coli* rămâne să fie sistemul preferat pentru investigațiile de laborator și dezvoltarea inițială în activități comerciale, deoarece este o gazdă bine stabilită, cu un timp de cultivare scurt și este ușor de manipulat genetic [18]. În plus, ne putem aminti că *E. coli* are nevoie de suporturi ieftine. Numărul de copii plasmidice din celulă poate varia de la una la câteva sute. Numărul de copii ale plasmidelor este o proprietate combinată a repliconilor prezenți în plasmidă, celulă și starea sa metabolică actuală. De exemplu, familia ColE1 [24] a repliconilor este utilizată în sistemele vectoriale populare precum pET (pMB1, 15-60 copii / celulă) și pUC (variantele pMB1, 500-700 copii / celulă). În expresia *E. coli*, sistemul T7 este cea mai populară abordare pentru producerea de peptide și proteine. În acest sistem, un vector de expresie care conține o genă de interes clonată în aval de promotorul T7 este introdus într-o gazdă de expresie T7 [18]. Gazdele de expresie T7, cum ar fi tulpinile DE3 [25], [26] sau tulpinile expres T7 poartă o copie cromozomială a genei fagului T7 ARN polimeraza. Când se adaugă un inductor, ARN polimeraza T7 este expresat și începe transcrierea genei de interes.

Expresia genei recombinante în *E. coli* este în mod normal sub controlul unui promotor inductibil care necesită prezența unui metabolit specific sau a unui inductor sintetic pentru a

transcrie direct gena de interes. Sunt folosiți mai mulți promotori diferiți, cei mai frecvenți fiind lac / tac, lacUV5, araBAD și rhaBAD [27],[28], [29].

Avantajele utilizării E. coli ca organism gazdă sunt următoarele [28]:

- Are o cinetică de creștere rapidă, în medii de săruri de glucoză și având în vedere condițiile de mediu optime, timpul de dublare este de aproximativ 20 min.
- Se realizează cu ușurință culturi cu densitate celulară ridicată. Limita teoretică a densității unei culturi lichide de E. coli este estimată la aproximativ 200 g greutate celulă uscată / l sau aproximativ 1×10^{13} bacterii viabile / ml, ceea ce reprezintă mai puțin de 0,1% din limita teoretică. Din acest motiv, metodele de cultură cu densitate celulară ridicată au fost concepute pentru creșterea E. coli.
- Mediile complexe bogate pot fi realizate din componente ușor accesibile și ieftine.
- Transformarea cu ADN exogen este rapidă și ușoară.

1.2.4. Etichete de purificare și afinitate a proteinelor

Etichetele de afinitate pentru proteine și peptide au devenit instrumente foarte populare pentru purificarea proteinelor recombinante și a complexelor de proteine native din motive excelente. Avantajele utilizării unei etichete de proteină/peptidă fuzionate cu proteina/peptida recombinantă sunt în principal de a facilita purificarea și detectarea acesteia. Purificarea simplă este posibilă folosind cromatografia de afinitate. Unele etichete permit legarea puternică de medii de cromatografie în prezența denaturanților, făcând posibilă reîncărcarea pe coloană. Etichetele pot îmbunătăți, de asemenea, stabilitatea și solubilitatea proteinelor recombinante.

Utilizarea proteinelor recombinante a crescut foarte mult în ultimii ani. În același timp, tehnicile și produsele utilizate pentru expresia și purificarea lor au prezentat o dezvoltare rapidă în ultimii 20 de ani. Majoritatea etichetelor de afinitate pentru proteine și peptide disponibile pot fi clasificate în trei clase. Prima clasă de etichete de afinitate pentru epitop conține acele peptide sau proteine care sunt fuzionate la liganzi cu molecule mici legați la un suport solid. Această grupă conține eticheta de hexahistidină, care se leagă de metalul imobilizat [30], [31] și fuziunile de proteine glutatation S-transferază care se leagă de glutatation atașat la beadurile de cromatografie [32]. În a doua clasă de etichete de afinitate, sunt acele etichete peptidice care se leagă de un partener de legare a proteinelor imobilizate la o rășină de cromatografie, ca de exemplu peptida calmodulina-binding, care se leagă în mod specific de calmodulină. A treia clasă de etichete de afinitate epitop sunt partenerii de legare a proteinelor atașat la rășină,

aceasta fiind un anticorp care recunoaște epitopii peptidici specifici [33]. De exemplu, peptida FLAG poate fi utilizată cu mai multe rășini cu anticorpi anti-FLAG [93],[35].

1.3. MOARTEA CELULARĂ ȘI APOPTOZA

În organismul multicelular apoptoza este un proces normal și important. Apoptoza înseamnă moartea celulară programată genetic. Apoptoza a fost implicată în multe boli umane: cancer, boală, inflamație și neurodegradare. Cartografierea regulatorilor critici ai apoptozei este o strategie comună pentru dezvoltarea de noi terapii [18]. Sunt cunoscute două căi principale apoptotice (Fig.1.3.): Calea intrinsecă (mitocondrială) și calea extrinsecă.

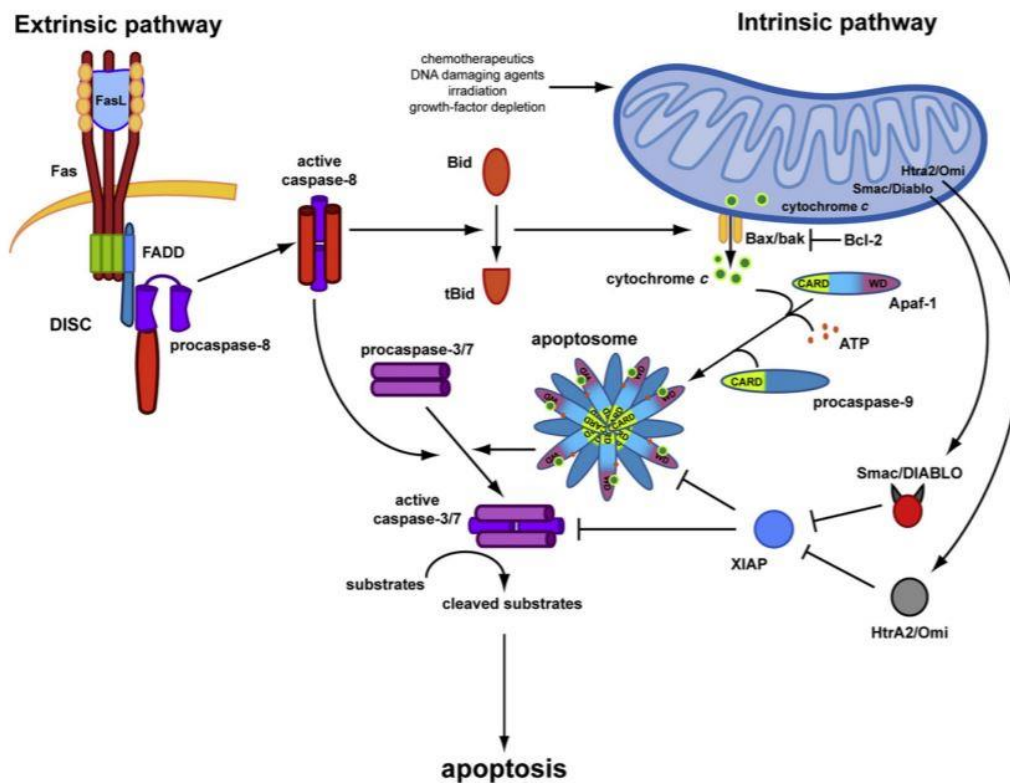


Fig.1.3. Prezentare generală a căilor apoptotice extrinsece și intrinsece [36]

Calea intrinsecă este caracterizată prin permeabilizarea mitocondriilor indusă de semnale de stres (de exemplu, medicamente chimioterapeutice și radiații). La nivel molecular, calea intrinsecă implică translocarea și oligomerizarea proteinelor BAX sau BAC, apoi ele formează un por în peretele mitocondrial exterior care duce la eliberarea citocromului c și al doilea activator derivat mitocondrial al caspazelor (SMAC / DIABLO-direct IAP -proteina de legare cu pI scăzut) din mitocondrii în citosol [37]. Formarea apoptozomilor are loc în citosol prin legarea citocromului c, factorului 1 de activare a proteazei apoptotice (APAF1) și procaspazei-9 [38]. Deci apoptozomul este un complex multi-proteic, care scindează procaspaze-9 în caspază-9 activă. Caspaza activă-9 activează caspazele efectoare (caspază-3 și caspază-7), care scindează substraturile de moarte celulară în aval, ducând la apoptoză.

Calea extrinsecă este inițiată prin legarea liganzilor de moarte (Fas / Apo-1, TNF- α , Apo2L / TRAIL la receptorii lor corespondenți de moarte (CD95 / FasR, TNFR1 și DR4 / DR5) de pe suprafața celulei [39]. Această legare are ca rezultat recrutarea complexului de semnalizare inducător de moarte multiproteic (DISC) la membrana plasmatică. O proteină adaptoare din DISC recrutează procaspaza-8 în complex și rezultă activarea automată a caspazei-8. Apoi clivarea caspazei-8 activează caspaza-3 și caspaza-7 [40]. Cele două căi sunt legate și moleculele dintr-o cale pot influența cealaltă cale [41].

Ambele căi se desfășoară prin activarea caspazelor. Caspazele sunt principalele enzime ale apoptozei și se găsesc sub formă inactivă, denumite procaspaze, care sunt activate prin scindare proteolitică. În plus, caspazele pot fi grupate în caspaze inițiatoare upstream (ca caspazele 8 și 9) și caspaze efectoare downstream (ca caspazele 3,6 și 7) [42].

Proteinele implicate în apoptoză pot fi clasificate în funcție de rolul lor, în senzori și efectori [43]. Mediul celular este monitorizat de senzori, care detectează semnale care inițiază apoptoza (ca anomalii ale ADN-ului). Sensorii activează efectorii morții celulare apoptotice.

Inhibitorii proteinelor apoptozei conțin aproximativ 70 de motive de aminoacizi [18] denumite domenii repetate IAP baculovirus (BIR) [44]. Cel mai puternic inhibitor al caspazelor din familia IAP este inhibitorul uman legat de X al proteinei apoptozei (XIAP), care conține 3 domenii BIR în regiunea N-terminală și un domeniu RING dotat cu activitate E3 ubiquitin ligază, în regiunea C-terminală. Conform literaturii, au fost găsite niveluri ridicate de XIAP în mai multe linii de celule canceroase. Cantitatea fiziologică de Smac-DIABLO eliberată din mitocondrii poate să nu fie suficientă pentru a depăși efectul inhibitor al XIAP asupra caspazelor, prevenind astfel apoptoza [45]. Inactivarea XIAP supraexprimat de către moleculele mimetice Smac poate ușura legarea caspazei, promovând astfel apoptoza în celulele maligne [18].

1.4. MIMETICE SMAC

1.4.1 Interacțiuni cu proteine și molecule mimetice

Proiectarea unei molecule mimetice proteice se bazează pe moleculele peptidice mici sau moleculele non-peptidice care sunt capabile să imite proprietățile sau activitatea biologică a unei proteine datorită prezenței structurii secundare și a altor caracteristici care sunt analoge cu cele ale proteinei originale. În general, interacțiunile proteice sunt dependente de alte proteine, peptide sau molecule organice specifice. Scopul principal al proiectării medicamentelor este de a interveni în mod specific în aceste interacțiuni. După cum știm, structura proteinelor dictează funcția proteinelor.

Proprietățile chimice și fizice ale peptidelor și proteinelor sunt determinate de natura lanțurilor laterale de aminoacizi și a vertebrei de peptide poliamidice. Această natură a

proteinelor implică faptul că moleculele mimetice mici sunt adesea proiectate pentru a mima contactele cheie cu proteine (interacțiuni). Mimeticele trebuie să fie capabile să se lege cu proteina partener de legare naturală. În zilele noastre există diverse metode pentru dezvoltarea unui mimetic specific [46], inclusiv metode de screening, metode de calcul, precum și metode experimentale. În cercetările recente ne concentrăm pe molecule mimetice proteice pe bază de peptide. Mai exact, în locul proteinei țintă se selectează partea activă, o mică peptidă cu secvență specifică de aminoacizi.

Referindu-ne la prezentarea generală a literaturii prezentate mai sus, peptidele au prezentat un mare potențial farmaceutic ca medicamente active și diagnostice în mai multe domenii clinice, cum ar fi endocrinologie, urologie, obstetrică, oncologie, etc.

1.4.2. Caracteristicile structurale ale moleculelor mimetice Smac

Au fost dezvoltate mai multe strategii pentru proiectarea inhibitorilor moleculari mici ai XIAP [6]. O primă soluție a fost blocarea interacțiunii dintre XIAP BIR2 și caspases-3 / -7 [6]. Structura cristalină a proteinei Smac într-un complex cu domeniul XIAP BIR3 a fost dezvoltată în 2000 de grupul lui Shi [47]. Informațiile structurale la nivel atomic au stat la baza proiectării moleculelor mimetice Smac.

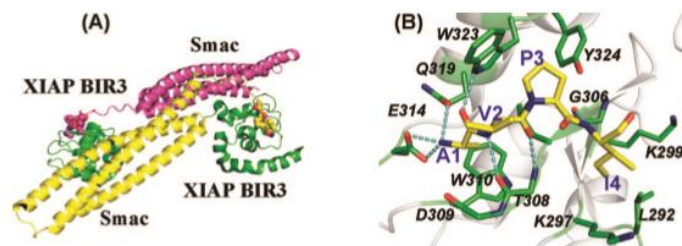


Fig.1.4. Reprezentarea schematică a structurilor Smac / XIAP-BIR3 [6]

Structura cristalină a arătat (Fig.1.4.) că proteina Smac formează un homodimer alungit (A), în plus cele patru reziduuri N-terminale (Ala1-Val2-Pro3-Ile4) din Smac recunosc și se leagă de un șanț de suprafață pe XIAP BIR3 (B) îndepărtarea inhibării caspazelor-9 și legarea cu afinitate mai mică la domeniul BIR2, reducând inhibarea de către caspaze-3 și -7. Grupa amino liberă a Ala1 formează legături puternice de hidrogen la reziduurile Glu314 și Gln319 de pe BIR3. Grupa carbonil a vertebrei formează o legătură de hidrogen la grupul indol NH din Trp323 [6]. Grupul metil alaninei menționat mai sus este introdus într-un mic buzunar hidrofob. Grupările amino și carbonil ale Val2 formează legături de hidrogen cu grupările carbonil și amino ale Thr308, în timp ce lanțul lateral Val2, fără interacțiuni cu reziduurile de proteine, este expus solventului [47]. Prolina formează legături Van der Waals cu lanțurile laterale ale Trp323 și Tyr324 [48]. Grupul amino a rezidului Ile4 formează o legătură de hidrogen cu grupul carbonil din Gly306. Lanțul său lateral hidrofob se inserează într-un buzunar hidrofob format din lanțuri laterale de Leu292 și Val298 și porțiunea hidrofobă a lanțurilor laterale din

Lys297 și Lys299. cIAP1 și cIAP2 ale membrilor familiei IAP sunt similare cu XIAP. Ca și în cazul XIAP, domeniile BIR2 și BIR3 ale cIAP1 și cIAP2 leagă, de asemenea, caspase și Smac. Spre deosebire de XIAP, rolul dominant al cIAP1 și cIAP2 în reglarea apoptozei pare să apară în contextul semnalizării TNF prin TNFR1, unde aceste proteine joacă un rol esențial în inducerea NF- κ B și suprimarea apoptozei induse de TNF [49].

În ultimii ani, cercetătorii s-au concentrat pe mimetice Smac cu molecule mici care vizează domeniul BIR3 al XIAP, în ciuda faptului că au existat puține rapoarte privind proiectarea compușilor care afectează inhibarea prin legarea la domeniul BIR2 al XIAP. Acești inhibitori ai IAP sunt în prezent investigați ca medicamente anticancerigene în studiile clinice. Cunoscând în detaliu caracteristicile structurii se pot concluziona unele specificități ale relației structură-activitate (Fig.1.5.). Poziția (a) este preferabil grup metil sau etil. În cazul metilării, există două poziții, o poziție (b) unde metilarea nu este tolerată și o altă poziție (c) unde metilarea este tolerată. În plus, la poziția (d) Gly, Asp, pro nu este favorabil. În partea (e) a moleculei, grupurile hidrofobe mai mari sunt mai optime.

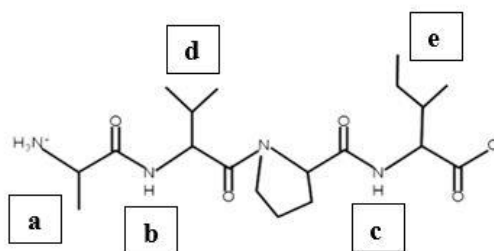


Fig.1.5. Specificitățile structurii peptidei AVPI

În ultimii ani, o serie de grupuri de cercetători au proiectat și sintetizat multe mimetice Smac peptidice și nonpeptidice. Mai mult, au fost sintetizate o serie de molecule mimetice bivalente Smac care imită interacțiunea proteinelor Smac cu XIAP [50]. Conform literaturii moleculele mimetice bivalente Smac pot obține o afinitate mult mai mare față de XIAP față de inducția mimetică monovalentă Smac corespunzătoare apoptozei în celulele tumorale [51].

În prezent, mai multe mimetice Smac sunt în curs de evaluare în studii clinice. Aceste mimetice sunt următoarele: LCL161 [52], AT-406/Debio1143 [53], TL32711/birinapant [53], HGS1029, GDC-0917/CUDC-427 [54].

Primul mimetic Smac care a intrat în studii clinice a fost proiectat de Genentech și a fost unul dintre compușii monovalenți din serie. Studiile inițiale au arătat că GDC-0152 este un antagonist puternic al XIAP, cIAP1 / 2.

Grupul lui Ling a elaborat studii teoretice privind interacțiunea domeniului XIAP-BIR2, cu scopul de a obține o perspectivă asupra naturii legării, dockingul molecular și simulările

dinamice au fost utilizate pentru a studia legarea XIAP-BIR3 cu trei grupuri de mimetice Smac [55].

CAPITOLUL 3.

REZULTATE

În ultimul deceniu, peptidele au primit o atenție specială în biologia moleculară în ultima perioadă. După cum am descris în introducere, ne-am concentrat asupra moleculelor mimetice SMAC. Scopul cercetării noastre a fost de a dezvolta o metodă adecvată pentru biosinteza și marcarea C-terminală a peptidelor mici. Aceste molecule proteomimetice ar putea fi modificate chimic în funcție de aplicația lor. Sistemul de expresie a *E. coli*, în raport cu sinteza chimică, rămâne să fie sistemul preferat pentru investigațiile de laborator și dezvoltarea inițială în activități comerciale, deoarece este o gazdă bine stabilită, cu timp scurt de cultivare și manipulare genetică ușoară [18], [56].

3.1. BIOSINTEZA proteinelor CIAP1, CIAP2 și XIAP

Pentru biosinteza cIAP1, a fost conceput sistemul de expresie cIAP2 și XIAP *E. coli*. Construcția recombinată (pGEX) a conținut un partener de fuziune glutation S-transferază (GST), care permite purificarea proteinei prin cromatografie de afinitate. Ca celulă gazdă a fost aleasă linia celulară *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS. Tulpinile gazdă Rosetta sunt derivați BL21 lacZY concepuți pentru a spori nivelurile de expresie ale proteinelor care conțin codoni rar utilizați în *E. coli*. Genele ARNt sunt conduse de promotorii lor nativi. În Rosetta (DE3)pLysS, genele rare de ARNt sunt prezente pe plasmidele pRARE care poartă lizozima T7.

În cazul producerii de proteine intracelulare, cantitatea de proteină țintă este direct proporțională cu cantitatea de biomasă. Inducerea celulelor are ca rezultat exprimarea proteinei. Pentru proteinele heteroloage sensibile, este necesar să se optimizeze condițiile de expresie pentru a obține randamente mai mari. În acest stadiu al cercetării noastre a fost examinată creșterea culturii celulare pentru a determina densitatea celulară optimă pentru inducție [18].

3.1.2. Optimizarea expresiei proteinei XIAP [18]

În această parte a tezei mele, sunt rezumate rezultatele despre exprimarea balonului de agitare a XIAP-GST în mediu minim M9 indus cu diferite concentrații finale de IPTG. În timpul experimentului, probele luate la fiecare 3-3 ore pentru a determina concentrația țintă de proteine au fost examinate prin analiza SDS-PAGE.

XIAP este o proteină de 53 kDa. În niciun caz, nu se poate observa o expresie proteică la 37 °C. Se observă că proteinele au fost produse numai la 18 ° C timp de 12 ore (Fig.3.3.). Putem observa diferențe la concentrația inductorului. Din păcate, proteinele țintă au fost expresate în corpuri de incluziune, prin urmare solubilizarea și replierea sunt pași necesari spre purificarea proteinelor. Frecvent, proteinele umane exprimate în sisteme procariote formează

corpuri de incluziune denaturate. Pentru a obține forma activă a proteinei, cea mai comună tehnică este denaturarea agregatelor proteice, urmată de replierea proteinelor de incluziune. Denaturanții convenționali pentru solubilizare sunt ureea, clorhidratul de guanidină și dodecil sulfatul de sodiu (SDS), în timp ce replierea poate fi realizată prin mai multe tehnici găsite în literatură [57], [58].

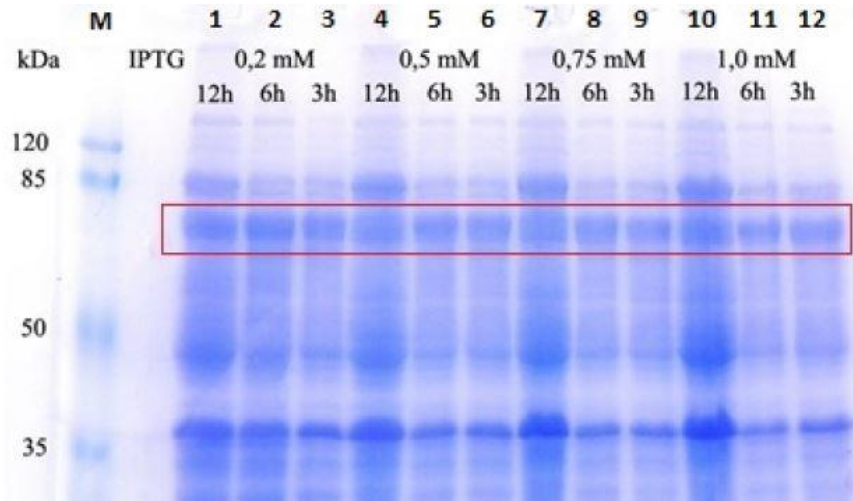


Fig.3.3. Expresia heterologă a proteinei XIAP-GST la 18 °C.

Probele au fost analizate prin 10% SDS-PAGE

M: Prestained Protein Ladder 20-120 kDa; 1: inducere cu 0.2 mM, 12h; 2: inducere cu 0.2 mM IPTG, 6h; 3: inducere cu 0.2 mM IPTG, 3h; 4: inducere cu 0.5 mM IPTG, 12h; 5: inducere cu 0.5 mM IPTG, 6h; 6: inducere cu 0.5 mM IPTG, 3h; 7: inducere cu 0.75 mM IPTG, 12h; 8: inducere cu 0.75 mM IPTG, 6h; 9: inducere cu 0.75 mM IPTG, 3h; 10: inducere cu 1.0 mM IPTG, 12h; 11: inducere cu 1.0 mM IPTG, 6h; 12: inducere cu 1.0 mM IPTG, 3h. [18]

3.1.3. Solubilizarea proteinei XIAP-GST

Solubilizarea proteinelor a fost executată folosind detergenți. XIAP conține un domeniu RING și 20 de resturi de cisteină, posibil constructul de fuziune GST este exprimat în *E. coli* ca corpuri de incluziune prin protocoale standard de expresie, care pot fi solubilizate în mod eficient de N-lauroilsarcozină conform rezultatelor noastre. Pentru replierea proteinei, am folosit o procedură modificată pe bază de cromatografie, asistată de detergent și micle, prezentată inițial de Massiah et. al [59], care a fost dezvoltat în continuare folosind diferiți detergenți, optimizați pentru XIAP.

După liza celulară, supernatantul bacterian analizat (Fig.3.4, banda 3) și fracția granulată (Fig.3.4, banda 4), arată proteina țintă agregată în corpurile de incluziune. Proteinele îndoite nativ pot fi extrase din corpurile de incluziune folosind N-lauroilsarcozină. În cazul nostru, într-un prim experiment, etapa de solubilizare a fost efectuată conform protocolului elaborat de grupul lui Massiah. Rezultatele sugerează că practic cantitatea totală de GST-XIAP insolubil a fost solubilizată cu succes la 10% N-lauroilsarcozină adăugată la tamponul de liză.

Fig.3.4, banda 6. arată supernatantul corpului de incluziune după solubilizare, în timp ce banda 7. arată peleta după solubilizare.

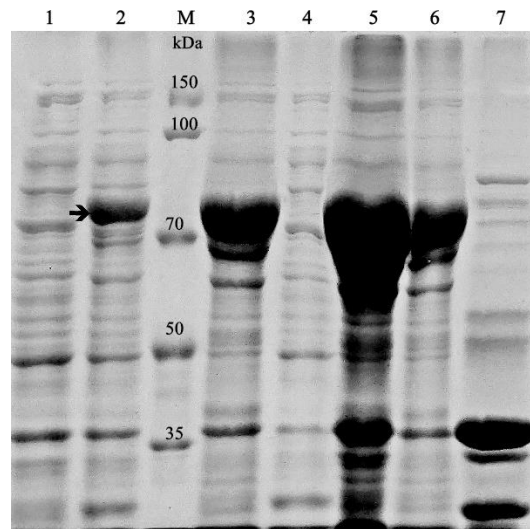


Fig.3.4. Analiza 10 % SDS-PAGE a proteinei XIAP-GST exprimat în *E. coli* la 18 °C.

1: Celule totale înainte de inducere; 2: Celule totale după inducere cu 0.2 mM IPTG, 8 hours; M: Protein molecular weight marker (Novagen, Sigma Aldrich); 3: celule lizate după omogenizare; 4: proteinele solubile; 5: proteine insolubile; 6: supernatant după solubilizare cu 10% N-lauroylsarcosina, 7: pellet după solubilizare.

Știind că solubilizarea ușoară a agregatelor corporale de incluziune este cheia pentru îmbunătățirea recuperării proteinelor bioactive, ne-am continuat activitatea cu evaluarea efectului concentrației de N-lauroilsarcozină asupra randamentului de solubilizare a proteinelor noastre țintă. Protocolul de repliere, bazat pe solubilizarea proteinelor fără agenți haotropi a fost optimizat și utilizat pentru constructul XIAP-GST.

Mecanismul exact de acțiune al N-lauroilsarcozinei este necunoscut, se presupune că moleculele N-lauroilsarcozine perturbă agregarea prin încapsularea proteinelor, în timp ce concentrațiile mai mari ale agentului de solubilizare ar putea interfera purificarea ulterioară a afinității proteinelor marcate cu GST. Cu toate acestea, unele date sugerează că în timpul diluării proteinelor solubilizate cu sarkosil (la o concentrație de 0,01% N-lauroilsarcozină) detergentul poate acționa ca un amplificator de pliere prin prevenirea agregării conformerilor parțial pliați prin interacțiuni hidrofobă [60], [61].

În etapa următoare, fracțiile de proteine solubilizate au fost analizate prin microcip electroforetic folosind un kit 2100 Bioanalyzer și Protein 230 pentru determinarea greutatei moleculare și cuantificarea proteinelor. Pe baza electroperegramei, așa cum se arată în figura 3.6. arată, greutatea moleculară aparentă a proteinei țintă a fost de aproximativ 80,4 kDa, în concordanță cu masa moleculară calculată a constructului GST-XIAP (78 kDa), în timp ce concentrația de proteină solubilizată este de 1,025 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$. În total, am obținut 20 mg GST-XIAP solubilizat.

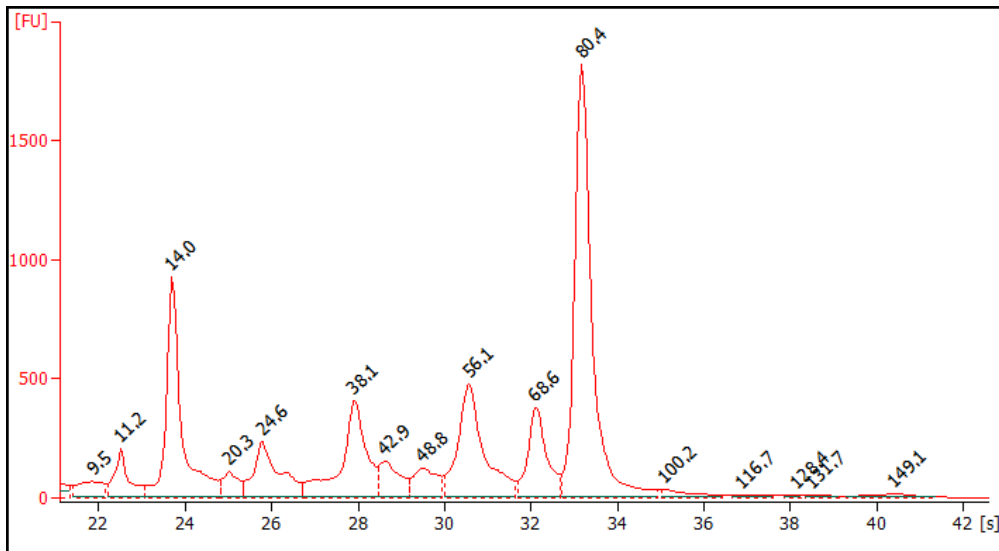


Fig.3.6. Analiza electroforetică microcip a supernatantului după solubilizare cu N-lauroilsarcozină.

3.1.4. Refoldarea și purificarea cu detergent a proteinei XIAP-GST prin cromatografie de afinitate și filtrare pe gel

CMC al N-lauroilsarcozinei este mai mare de 0,5% (14 mM). Din păcate, îndepărtarea detergenților cu CMC mai mare de 5 mM nu este posibilă prin dializă. Îndepărtarea N-lauroilsarcozinei este necesară pentru purificarea eficientă a afinității și replierea proteinei țintă. Există mai multe studii în literatura de specialitate pentru îndepărtarea N-lauroilsarcozinei prin diluare și dializă [62], [63]. O CMC scăzută indică faptul că echilibrul dintre monomerii detergenți și micellele de detergent este aproape complet pe partea micellei. În plus, miceliile sunt de dimensiuni mari, în timp ce numai monomerii detergenți pot difuza cu ușurință în tamponul din jur. N-lauroilsarcozina poate fi sechestrată prin adăugarea unui detergent neionic, cum ar fi OTG.

Table 3.1. Condiții de refoldare asistată de detergent

Nr.	Triton-X (%)	CHAPS (mM)	OTG (%)
1.	1	10	-
2.	2	20	-
3.	3	30	-
4.	1	-	1
5.	1	-	1.5
6.	-	10	1

Optimizarea condițiilor de refoldare pentru XIAP-GST recombinant a fost efectuată adăugând TritonX-100, CHAPS și OTG în rapoartele adecvate, testând 6 condiții diferite de repliere, așa cum este descris în secțiunea Materiale și metode. Purificarea prin afinitate a fost efectuată în mod discontinuu. Toți cei trei detergenți (TritonX-100, CHAPS și OTG) au dus la legarea GST la matricea GSH Sepharose. Nu s-au observat precipitații de proteine în cazul condițiilor 1, 2, 4, 5, 6, în timp ce în cazul condiției 3 (Fig.3.7, banda 3), folosind cele mai mari concentrații de TritonX-100 și 30% CHAPS, aproape totalul cantitatea de proteină țintă precipitată. Purificarea proteinei repliate a fost urmată de SDS-PAGE (Fig.3.7.). Pe baza rezultatelor noastre, replierea ajutată de 2% Triton X-100 și 20% CHAPS (Fig.3.7, banda 2) poate fi considerată a fi cea mai adecvată pentru XIAP-GST în cadrul nostru experimental.

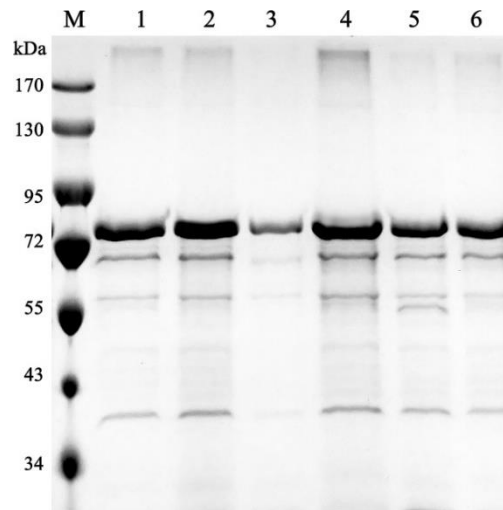


Fig.3.7. Purificarea prin afinitate a proteinei XIAP-GST

M: Protein molecular weight marker (Thermo Scientific); 1: 1% TritonX-100 și 10 mM CHAPS; 2: 2% TritonX-100 și 20mM CHAPS; 3: 3% TritonX-100 și 30mM CHAPS; 4: 1% TritonX-100 și 1% OTG; 5: 1% TritonX-100 și 1.5 % OTG; 6: 10 mM CHAPS și 1% OTG.

Pe scurt, experimentele de refoldare și purificare pot fi considerate de succes. Proteinele au fost repliate eficient. Cea mai mare eficiență, adică 87,11% proteină repliată, a fost obținută prin experimentul 2. (2% TritonX-100 și 20 mM CHAPS). A fost urmat de experimentul 1. (79,5 %) și experimentul 5. (73,79 %). Nu poate fi considerată o eficiență mult mai mică în cazul experimentului 4. (68,08 %) și experimentului 6. (67,36 %). În interesul obținerii proteinelor de înaltă puritate, pentru purificarea ulterioară a fost ales experimentul 2.

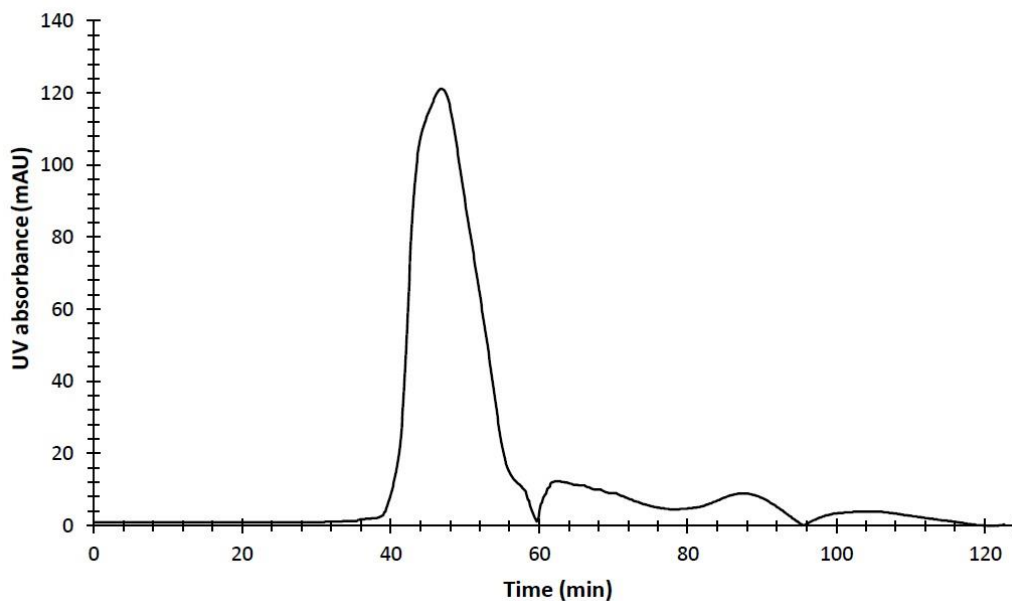


Fig.3.9. Profilul de eluție al XIAP-GST refoldat după trecerea printr-o coloană HiLoad 16/600 Superdex 75 pg

Pentru purificarea ulterioară a proteinei țintă, am efectuat cromatografia de excludere prin dimensiune, folosind coloana HiLoad 16/600 Superdex 75 pg. Detectarea a fost stabilită la 280

nm. Coloana a fost mai întâi încărcată cu tampon Tris-HCl (pH=7,5), urmată de injectarea probei în coloană. În Fig.3.9. arată profilul de eluție al XIAP-GST. În cromatogramă se pot observa un vârf mare și două vârfuri mici. Această etapă de purificare a dus la o puritate de 97% a proteinei repliate. Randamentul total de proteină repliată a fost de 15,67 mg/200 ml cultură de E. coli.

3.1.5. Identificarea proteinei refoldate

Testul pull-down este o metodă potrivită pentru examinarea interacțiunilor directe proteină-proteină dintre două proteine purificate folosind purificarea prin afinitate. Capacitatea proteinei de fuziune GST-XIAP de a se lega de perlele GST Sepharose a fost esențială pentru a efectua experimente GST pull-down. Această metodă poate furniza date decisive în ceea ce privește dacă studiul este adecvat pentru determinarea structurii. În cazul nostru, interacțiunea directă XIAP-SMAC a indicat autenticitatea proteinei repliate și purificate. Această interacțiune a fost descrisă anterior în literatură [64], [65].

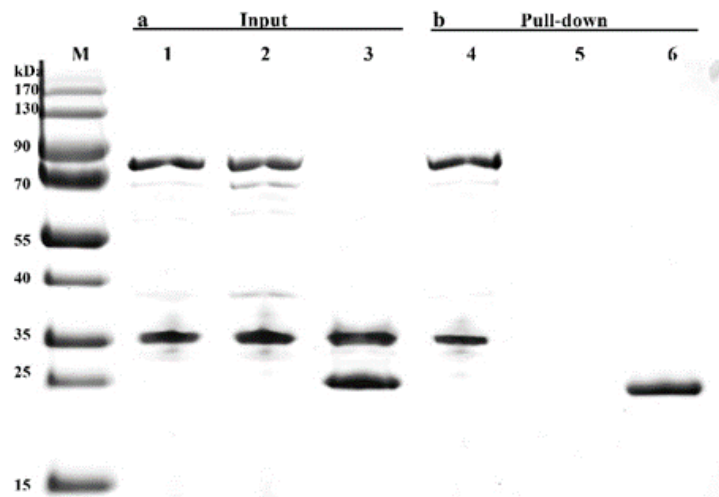


Fig.3.11. Testele pull-down ale GST-XIAP refoldat cu proteina SMAC

(a) arată proteinele “input” în testele de legare pull-down, proteina recombinantă SMAC ca pradă cu GST-XIAP refoldat și corp de incluziune GST-XIAP ca momeală.

1: GST-XIAP refoldat și purificat cu SMAC; 2: GST-XIAP desfășurată și SMAC; 3: SMAC și GST control.

(b) arată teste de legare pull-down a proteinei pradă cu proteinele de momeală.

4: complexul de interacțiune între GST-XIAP refoldat și purificat și SMAC; 5: complexul de interacțiune între GST-XIAP desfășurat și SMAC; 6: SMAC și GST control

În cazul complexului de interacțiune, prima bandă a fost identificată ca XIAP (78 kDa), în timp ce a doua bandă a fost recunoscută ca SMAC (aproximativ 30 kDa). După cum arată rezultatele prezentate mai sus, solubilizarea și replierea XIAP-GST a avut succes. GST-XIAP repliat și purificat arată o interacțiune adecvată împotriva SMAC (Fig.3.11, banda 4.), în timp ce în cazul proteinei desfăcute nu sunt detectate benzi de interacțiune proteice după pull-down (Fig.3.11, banda 5). Acest lucru poate fi, de asemenea, considerat ca o dovadă că numai proteinele repliate interacționează cu SMAC. GST este adoptat ca un control negativ.

În general, constatările noastre concluzionează că, pornind de la 200 ml cultură de expresie, se pot obține 19,62 mg de XIAP-GST solubilizat prin adăugarea a 2% N-Lauroylsarcosină în soluția de tamponul pentru liză, 92,34% din proteină poate fi repliată folosind 2% TritonX-100 și 20% mM CHAPS în timpul purificării prin afinitate, în timp ce cromatografia de excludere prin mărime asigură o purificare a 97% din soluția de proteină repliată, obținându-se astfel un randament total de 17,57 mg XIAP-GST purificat și repliat.

3.2. BIOSINTEZA DOMENIULUI BIR3 AL IAP-urilor

Genele domeniilor BIR3 au fost clonate cu succes în vectorul de expresie pMAL-p2x. Acest sistem vector conține ca partener de fuziune proteina de legare a maltozei (MBP) și peptida semnal de pe pre-MBP direcționează proteinele de fuziune către periplasmă. Expresia proteinei din balonul agitat a fost realizată în celule pLysS de E. coli Rosetta (DE3) utilizând mediu bogat. Proteinele au fost izolate din periplasmă și purificate prin cromatografie de afinitate folosind rășină de amiloză. Pentru creșterea purității proteinei a fost efectuată cromatografia de schimb anionic.

3.2.1. Clonarea și expresia domeniului BIR3 al IAP-urilor

Construcția celor trei plasmide recombinante a fost efectuată așa cum este descris în secțiunea Metode. Genele țintă amplificate (105 bp) au fost subclonate direct în vectorul de expresie pMAL-2x în toate cele trei cazuri, iar vectorul de expresie a fost construit cu succes.

Plasmidele recombinante au fost confirmate prin digestia cu duble enzime și secvențierea genelor.

Expresia proteinei a fost indusă cu 0,3 mM IPTG. Considerăm că cantitatea de proteine exprimată în inducție la 18°C timp de 16 ore a fost cea mai semnificativă [66]. Ca Fig.3.13. arată (banda 1) expresia proteinei a fost executată cu succes. Proteinele țintă pot fi observate pe gel 10% în jur de 46 kDA. Comparând expresia în citoplasma bacteriană cu periplasma bacteriană, am constatat că în spațiul periplasmic pot fi produse mult mai puține proteine. În plus, mediul oxidant al periplasmei permite o mai bună formare a legăturilor disulfurice și plierea proteinelor.

Izolarea cu succes a proteinelor din periplasma bacteriană poate fi enumerată printre rezultatele noastre. Înghețarea celulelor în 5 mM MgCl₂ este o metodă simplă și ușoară. Este important de menționat că celulele trebuie să se dezghețe ușor la 4 °C. În plus, următoarea etapă de resuspendare trebuie executată la 4 °C, acordând atenție la resuspendarea blândă.

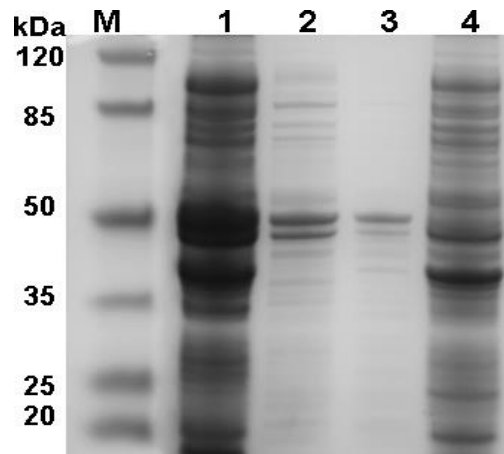


Fig.3.13. Verificarea expresiei și izolarea proteinelor din periplasma bacteriană
 M: Marker de proteine 20-120 kDa (Thermo Scientific); 1: proteinele din celule totale; 2: II. Extract din periplasmă; 3: I. Extract din periplasmă; 4:proteinele celulare după extracția proteinelor din periplasmă;

Banda a 2-a și a 3-a din Fig.3.13. arată că proteinele țintă direcționate către periplasmă au fost izolate așa cum ne așteptam. După procedura de izolare, nicio proteină țintă nu poate fi observată în proba analizată.

3.2.2. Cromatografia de purificare prin afinitate și schimb de anioni

Metoda de purificare a proteinelor se bazează pe interacțiunea MBP-rășină de amiloză și pe eluarea proteinei țintă folosind maltoză. După cum se arată Fig.3.14. proteinele au fost eluate cu succes din rășina de amiloză cu tampon de coloană care conține maltoză 10 mM (culoarele 1, 2 și 3). Proteina de legare a maltozei este o etichetă comună de exprimare a proteinei și este o proteină de aproximativ 42 kDa. Domeniile BIR3 sunt compuse din 35-35 de resturi de aminoacizi și au o masă moleculară de ~ 4 kDa.

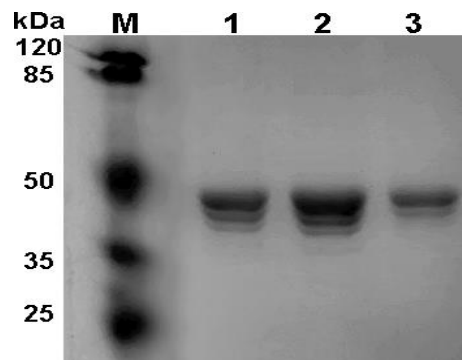


Fig.3.14. Purificarea prin afinitate a construcției MBP-XIAP-BIR3

Rezultatele purificării noastre (Fig.3.14.) în cazul MBP-XIAP/BIR3 și în celelalte două cazuri au fost, de asemenea, de succes și după dializă am obținut aproximativ 2 mg/mL proteină. Pentru creșterea purității proteinelor am efectuat o altă etapă de purificare. Punctul izoelectric al construcției MBP-XIAP/BIR3 este de aproximativ 5,01, astfel încât cromatografia de schimb anionic a fost aleasă pentru următoarea etapă de purificare. Puritatea proteinei a fost examinată

pe 10%-SDS PAGE, prezentată în Fig.3.15. Rezultatele arată că s-a atins o puritate ridicată a proteinelor.

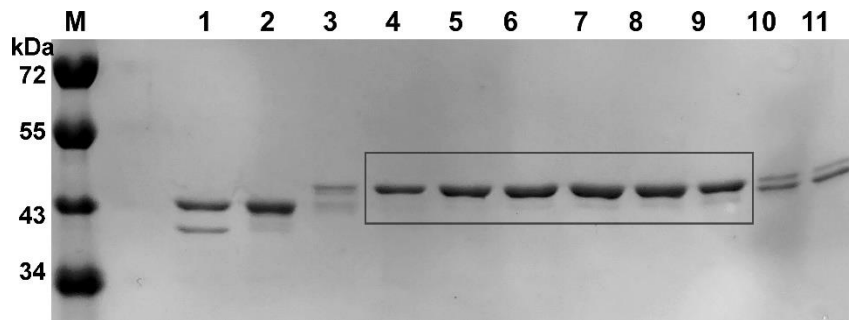


Fig.3.15. Analiza 8% SDS-PAGE a fracțiilor eluate

Rezultatele arată că proteinele contaminante rămân în flux, astfel că sistemul tampon BIS-TRIS la pH=5,8 a funcționat bine. Proteinele țintă încărcate negativ au fost eluate cu NaCl. Pe baza cromatogramei, prezentată în Fig.3.16, proteinele țintă au fost eluate din coloană folosind eluare cu gradient liniar de 24 CV cu aproximativ 250-300 mM NaCl.

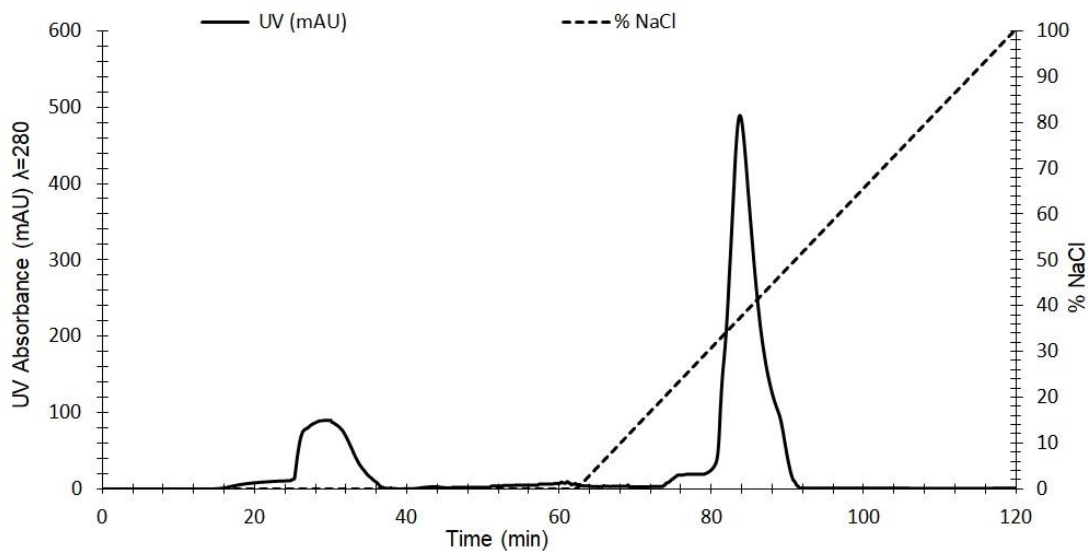


Fig.3.16. Profilul de eluție al MBP-XIAP/BIR3 după trecerea printr-o coloană HiTrap Q HP. Detectarea a fost setată la 280 nm;

Pe baza rezultatelor noastre, se poate afirma că obiectivul nostru referitor la biosinteza și purificarea cIAP-urilor recombinante a fost atins. Cercetarea noastră s-a extins la investigarea domeniului BIR3 al proteinelor țintă prin biosinteza și teste de interacțiune. Proteinele noastre recombinante biologic active sunt utile pentru studierea funcțiilor biologice ale genelor în diferite boli, pentru dezvoltarea de medicamente terapeutice, biomimetice și biomateriale pentru industria biotehnologiei [18], [56].

3.3. PEPTIDA SMAC SI PEPTIDA CONTROL

3.3.1. Design and construction of SUMO fusion system for SMAC mimetic peptide expression

În următoarea parte a tezei voi prezenta un sistem de expresie, dezvoltat de grupul nostru, care permite producerea de cantități suficiente de peptide recombinante pentru studiile de interacțiune proteină-peptidă.

La început, hibridizarea oligonucleotidelor proiectate corespunzătoare are ca rezultat modelele de ADN țintă. Examinând electroferograma (Fig.3.17.) putem declara în mod evident un semn bine definit cu lungimea de 50 bp, în concordanță cu lungimea calculată a ADN-ului țintă.

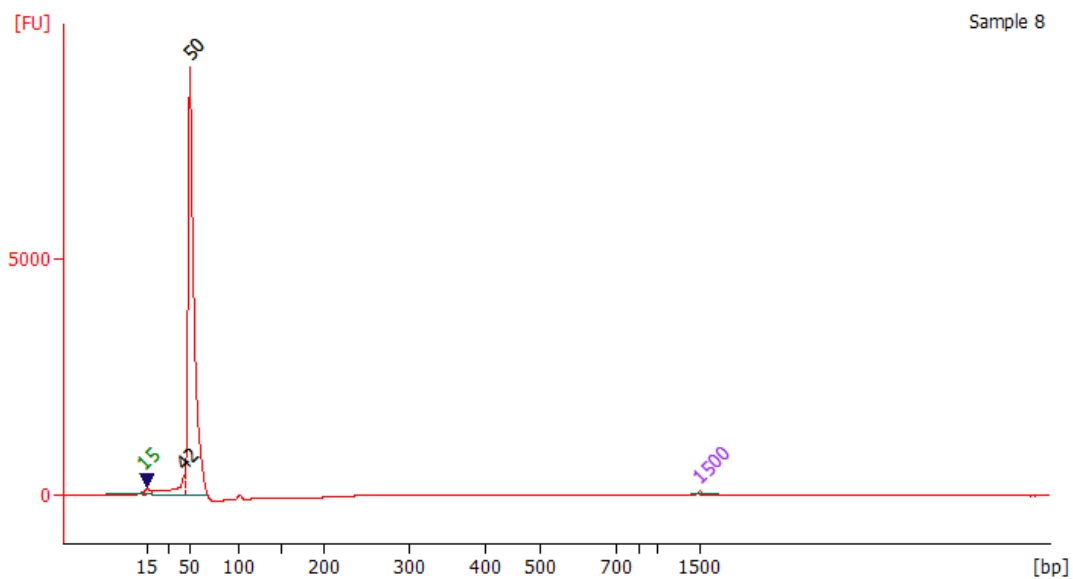


Fig.3.17. Analiza electroforetică cu microcip al ADN-ului SMAC obținut din hibridizare

În plus, poate fi menționată o etapă critică pentru hibridizare, răcirea reacției. Acest pas trebuie efectuat lent, pentru a forma ADN dublu catenar. ADN-ul obținut are capete contondente. Următoarea etapă de pregătire a inserției ADN a fost adăugarea de protuberanțe A. Plasmida proiectată de noi poate fi formată prin complementaritate între inserția 3'-A proeminente și vector 3'-T proeminente. Reacția A-tailing funcționează cel mai bine atunci când este utilizată o anumită cantitate de ADN. Cantitatea recomandată este de 10–100 ng (0,15–1,5 pmol) ADN pentru fiecare lungime de 100 bp a ADN-ului. În plus, a fost necesară purificarea ADN-ului hibridizat.

După ce reacția A-tailing ligarea ADN-ului de inserție la ADN-ul vector a fost efectuată utilizând ADN ligaza T4, apoi plasmidele recombinante pozitive au fost selectate cu succes. S-au executat selecția (Fig.3.18.) și examinarea clonelor așa cum este descris în secțiunea Metode. Situl de donare TA al vectorului pET-SUMO este prezentat în Anexa A.2, Fig.A.2.3.

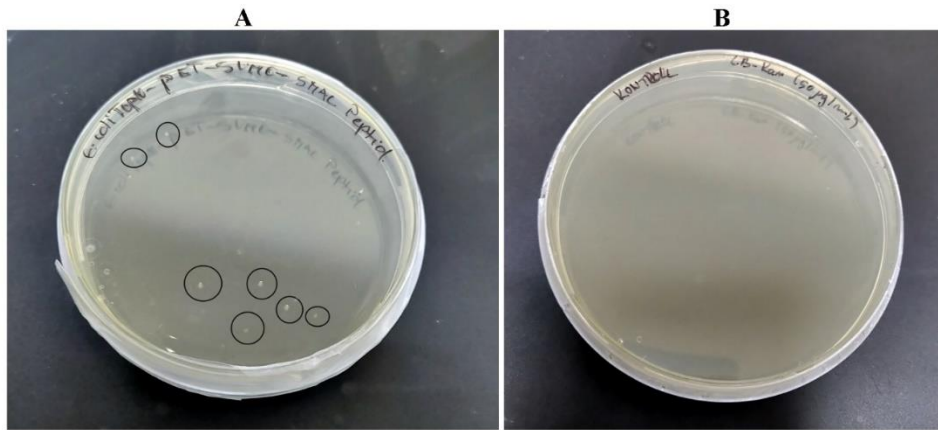


Fig.3.18. A: Colonii formate după transformarea *E. coli* TOP10F' cu plasmidă recombinantă pET-SUMO-SMAC

B: Transformarea controllă după ligarea ADN-ului de inserție și vector

Plasmidele amplificate au fost în jur de 300 bp. Fragmentele de ADN amplificate au fost confirmate cu succes prin electroforeză pe gel de agaroză 1% prezentată în Fig.3.19.

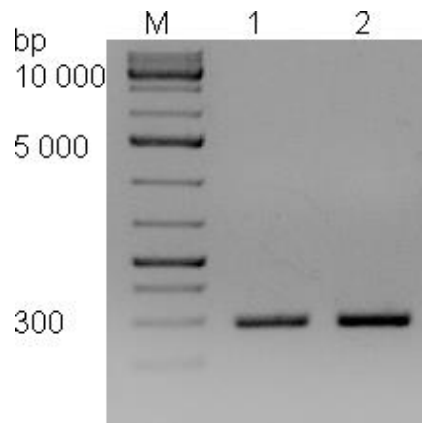


Fig. 3.19. Fragmentele ADN amplificate;

M: GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific); 1: verificarea pSUMO-SMAC; 2: verificarea pSUMO-Control

3.3.2. Exprimarea heterologă și purificarea constructelor SUMO-Peptide

Transformation of both recombinant plasmids in *E. coli* BL21(DE3) host cell line were successfully executed with high efficiency.

Putem declara că expresia a avut succes, iar linia de celule gazdă selectată a funcționat bine. Inducerea cu concentrații diferite de IPTG a cauzat diferențe în nivelurile de expresie a proteinei. Pe Fig.3.21. putem observa proteine țintă care apar sub 20 kDa.

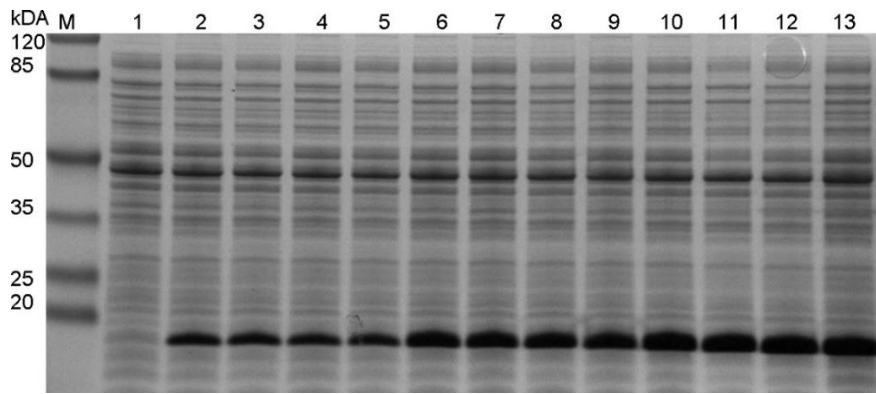


Fig.3.21. Optimizarea expresiei heterologă a constructei SUMO-SMAC+K;

10% SDS-PAGE. M: Marker de proteine 20-120 kDa 1: celule neinduse; 2: inducție cu 0,3 mM IPTG-1h; 3: inducție cu 0,3 mM IPTG-2h; 4: inducție cu 0,3 mM IPTG-3h; 5: inducție cu 0,5 mM IPTG-1h; 6: inducție cu 0,5 mM IPTG-2h; 7: inducție cu 0,5 mM IPTG-3h; 8: inducție cu 0,8 mM IPTG-1h; 9: inducție cu 0,8 mM IPTG-2h; 10: inducție cu 0,8 mM IPTG-3h; 11: inducție cu 1 mM IPTG-1h; 12 inducție cu 1 mM IPTG-2h; 13: inducție cu 1 mM IPTG-3h

Pe măsură ce am crescut concentrația de IPTG de la 0,3 mM la 1 mM, nivelul de expresie al proteinei țintă a crescut, de asemenea. În cazul inducției IPTG de 1 mM se poate observa cel mai înalt nivel de expresie. Dacă comparăm expresia menționată mai sus în prima oră (banda 11) cu expresia din a treia oră a cazurilor de inducție IPTG de 0,3 mM (banda 4) sau 0,5 mM (banda 7), putem observa diferențe mari de nivel de expresie. În plus, proteina SUMO îmbunătățește producția și solubilitatea proteinelor.

În continuare, expresia heterologă a fost efectuată în 200-200 mL mediu LB. Creșterea volumului bulionului un număr mai mare de celule și o concentrație mai mare de proteine țintă poate produce. Fig.3.22. prezintă expresia heterologă a construcției SUMO-SMAK-peptidă folosind parametrii optimi determinați după optimizare. Expresia proteinei a fost indusă de 1 mM IPTG timp de 3 ore la 37°C. Proteinele țintă au fost exprimate în citoplasma bacteriană. După liza celulară, proteinele au fost extrase sub formă solubilă. Proteinele solubile (banda 1, 2 și 3) și pelete (banda 6, 7 și 8) sunt prezentate în Fig.3.22.

Pentru liza celulară, sistemele tampon cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) au fost alese prin proprietățile de stabilizare a proteinei. În plus, s-a adăugat inhibitor de protează, glicerol pentru creșterea stabilității proteinelor. Tamponul de liză conținea săruri (NaCl) pentru a menține sau a crește puterea mediului ionic și detergent (Triton X-100) pentru a dizolva membranele celulare și a facilita eliberarea proteinelor solubile și a altor componente celulare în soluție. Experimentele au fost efectuate în condiții de pH care imită condițiile biologice (pH 7,4). Tamponul de legare a conținut imidazol 20 mM pentru a minimiza legarea proteinelor contaminante și pentru a crește puritatea cu mai puține etape de spălare. Teoretic, cu concentrație crescută de sare (1 M NaCl) putem elimina proteinele contaminante. În cele din urmă, s-a efectuat eluarea proteinelor țintă cu tampon care conține imidazol 400 mM. Fig.3.22.

prezintă experimentul de purificare descris. Se poate considera că acest sistem tampon funcționează bine. Folosind aceste condiții, fracția de eluție conține aproape numai proteine țintă (Fig.3.22, banda 4).

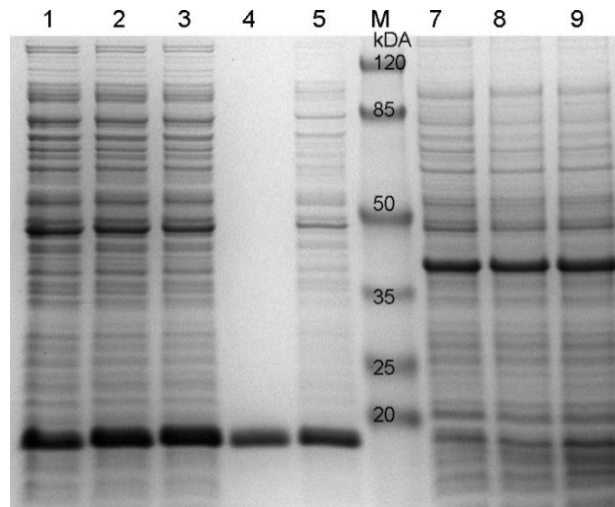
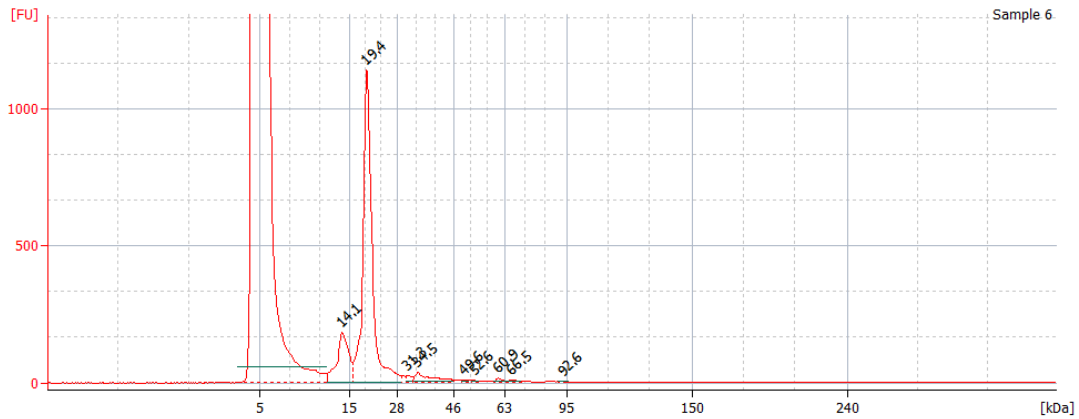


Fig.3.22. Expresia heterologă a constructei SUMO-SMAC+K
10% SDS-PAGE. 1-3: proteine solubile 1-3 h, 4: SUMO-SMAC+K purificat, 5: proteinele legate cu Ni-NTA, M: Marker de proteine 20-120 7-9: proteinele insolubile 1-3 h

A:



B:

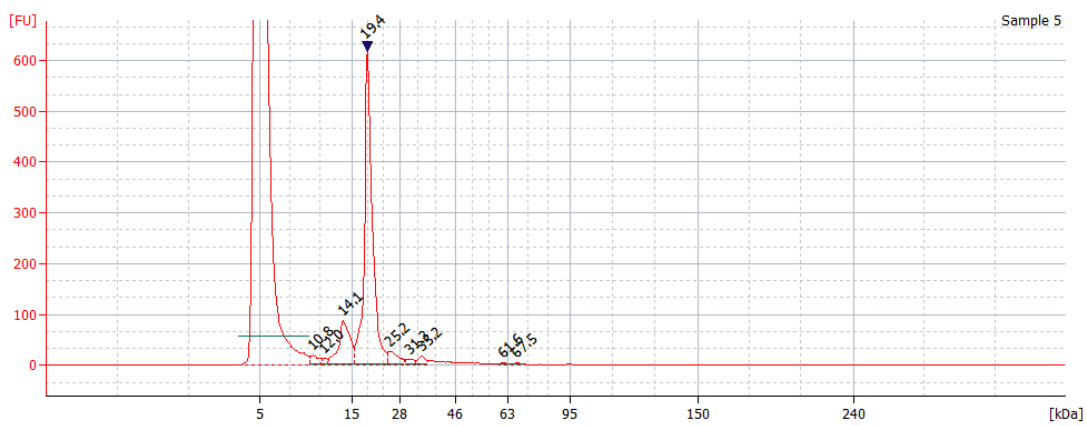


Fig.3.23. Analiza electroforetică cu microcip a proteinelor purificate

A: SUMO-SMAC purificat; B: SUMO-Control purificat

Conform electroferogramei din figura 3.23, proteina noastră țintă apare în jur de 19 kDa. Concentrația de proteine țintă obținută este de aproximativ 5 mg/mL cu o puritate relativ ridicată. Am descoperit că concentrația de Sumo-SMAC este mai mare (5,25 mg/mL) decât concentrația Sumo-Control (4,02 mg/mL).

În cele din urmă, putem declara că sistemul de expresie SUMO a fost potrivit pentru exprimarea constructelor noastre recombinante. Sistemul de purificare prezentat mai sus este pur și simplu practicabil și se poate obține o puritate ridicată a proteinelor. Acest sistem de expresie heterolog s-a dovedit a fi potrivit pentru producerea altor peptide recombinante..

3.3.4. Recuperarea peptidelor recombinante

Dimensiunile precise pentru peptidele recombinante au fost de 1,39 kDa. Conform protocolului producătorului, hidroliza proteinei de fuziune a fost realizată cu succes. Peptidele au fost separate de proteina SUMO și protează SUMO utilizând purificarea cu afinitatea Ni. Peptidele recombinante au fost confirmate prin analiză LC/MS. Puritya peptidelor a fost determinată prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) în fază inversă folosind ca referințe, peptida SMAC sintetizată chimic și peptida de control.

Peptidele proiectate au următoarele proprietăți calculate folosind instrumentele ExPASy ProtParam și PeptideMass:

Table 3.3. Proprietățile peptidelor proiectate

<i>Peptide/Properties</i>	<i>SMAK+K</i>	<i>Control+K</i>
Number of amino acids	13	13
Amino acid sequence	AVPIAQKSEPHSK	AQVKSIEPAHSPK
Molecular weight (g/mol)	1391.59	1391.59
Theoretical pI	8.64	8.64
Net charge at pH 7	1.1	1.1
Estimated solubility	Good water solubility	Good water solubility
[M - H] ⁻	1389.75	1389.75
[M+H] ⁺	1391.76	1391.76
[M - 2H] ²⁻	694.37	694.37
[M+3H] ³⁺	464.59	464.59
[M+2H] ²⁺	696.38	696.38

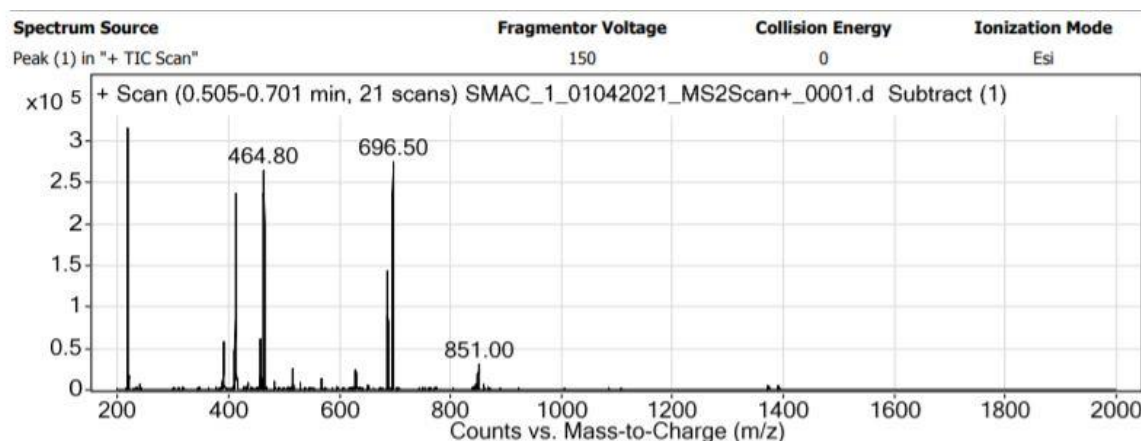


Fig.3.24. Analiza MS a peptidei recombinante SMAK+K

Analysis of chemically synthesized peptides in Appendix A.5 were presented.

3.3.5. Marcarea fluorescență C-terminală a peptidelor și biotinilarea

Pentru a menține structura nativă a N-terminalului peptidelor, am efectuat o reacție de marcarea fluorescență C-terminală. Legătura încrucișată cu grupările carboxil este mediată de o carbodiimidă solubilă în apă. Conform literaturii de specialitate, carbodiimidele efectuează conjugarea carboxilului cu hidrazide rezultă în formarea de legături hidrazone. În cazul experimentului nostru, au fost etichetați aminoacizi care conțin carboxil (acid glutamina și

lizină C-terminală). Pentru investigarea reacției de marcarea, analiza MS a fost efectuată utilizând MALDI Biotyper. Pe baza rezultatelor MS, reacția de marcarea a fost realizată cu succes în ambele cazuri. După cum arată următoarele figuri (Fig.3.25 și Fig.3.26), tehnica de ionizare cu laser a fost potrivită pentru investigarea ionilor corespunzători. Eficiența reacțiilor de etichetare a fost acceptabilă. Printre planurile de viitor proiectăm optimizarea reacției de etichetare.

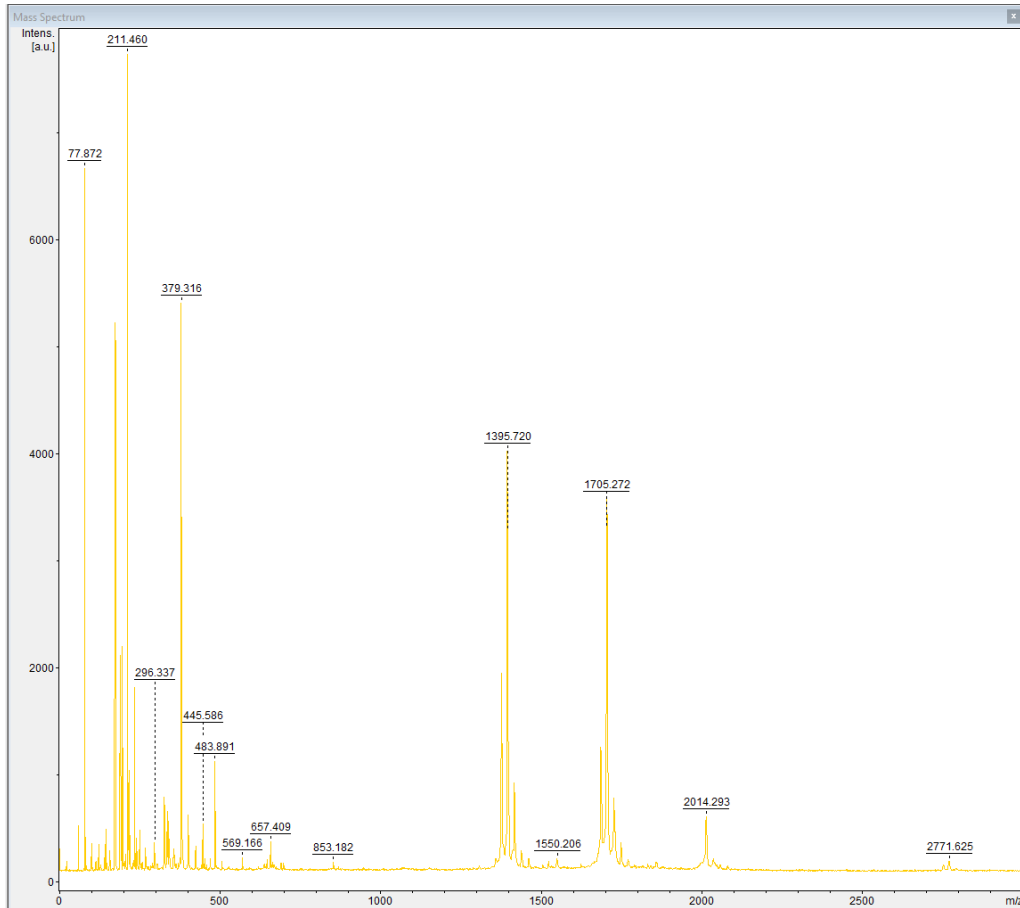


Fig.3.25. Analiza MS a peptidei SMAK+K marcate fluorescent

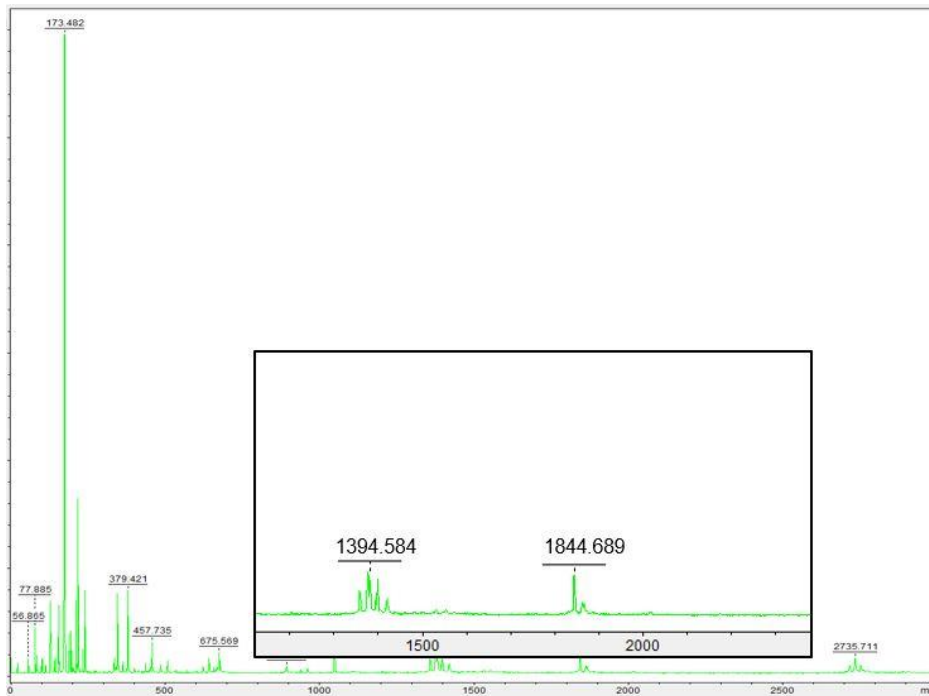


Fig.3.26. Analiza MS a peptidei SMAK+K biotinate

3.3.6. Monitorizarea interacțiunii BIR3-peptidă

Există mai multe exemple în literatura de specialitate privind clasificarea mimeticelelor Smac. În primul rând sunt clasificate ca mimetice Smac monovalente și bivalente [124]. Compușii monovalenți imită legarea unui singur motiv AVPI la proteinele IAP. Compușii bivalenți conțin două motive de legare AVPI. Monitorizarea interacțiunii peptidelor BIR3-SMAC+K aparține obiectivelor majore ale cercetării noastre.

Interacțiunea menționată este prezentată în Fig.3.24. folosind software-ul de vizualizare moleculară PyMOL.

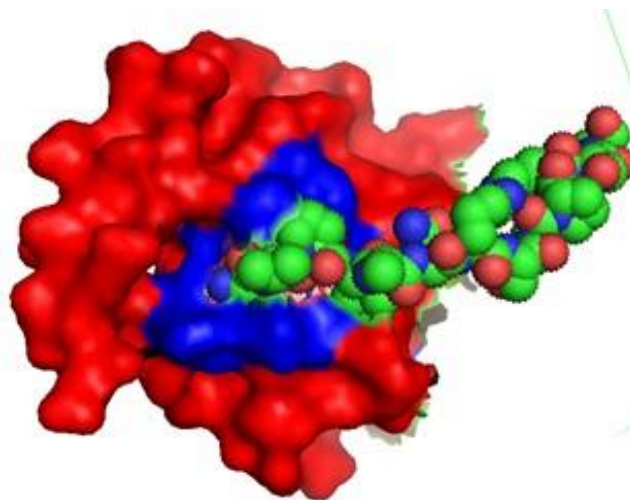


Fig.3.24. Interacțiunea XIAP-BIR3 și SMAC+K (PyMOL)

3.3.7. Testul Pull-Down

În partea următoare voi prezenta teste de tip pull-down concepute pentru investigarea interacțiunilor domeniului BIR3. Testul pull-down este o metodă *in vitro* utilizată pentru a analiza interacțiunea proteină-proteină folosind purificarea prin afinitate. Aceasta este o interacțiune fizică între două sau mai multe proteine. În cazul nostru, la început, proteina de momeală (și anume domeniul BIR3) a fost marcată și capturată pe un ligand de afinitate imobilizat specific pentru etichetă (rășină de amiloză). Ulterior, proteinele dezlegate au fost spălate. Următorul pas a fost legarea proteinei „pradă” de proteina momeală. Proteinele „pradă” au fost proteinele Cas9 și SMAC separat. După formarea complexului de interacțiune proteină-proteină a fost efectuată o etapă de spălare. Metoda de eluare a proteinei depinde de ligand de afinitate. În cazul nostru, complexe de interacțiune au fost eluate cu maltoză 10 mM. În cele din urmă, complexul de interacțiune proteină-proteină a fost analizat prin SDS-PAGE. Acești pași generali ai testului pull-down sunt prezentați în Fig.3.25.

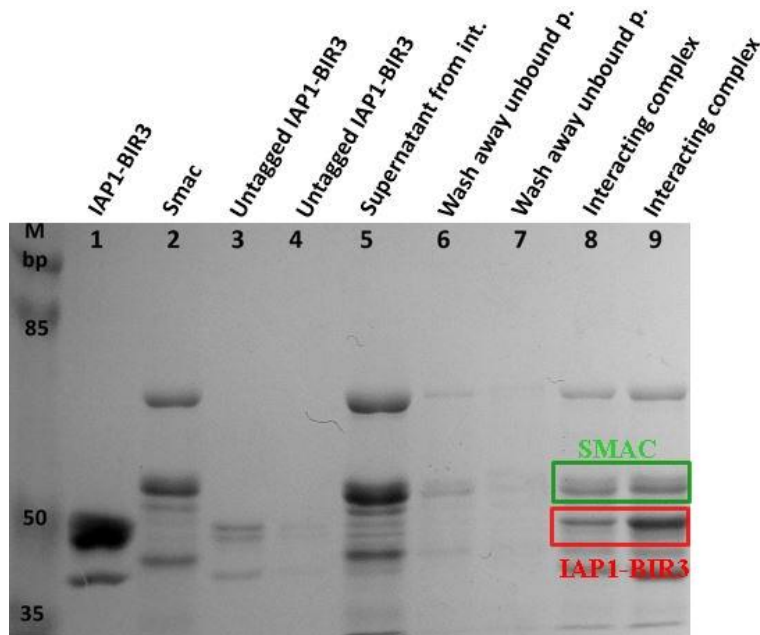


Fig.3.25. Analiza interacțiunii IAP1-BIR3 și SMAC cu 10% SDS-PAGE

În această etapă a cercetării noastre am investigat interacțiunea dintre IAP1-BIR3 și proteina SMAC. Este important de menționat că proteina SMAC-EGFP (~ 50 kDa) este și proteină recombinantă, aparținând cercetărilor noastre anterioare [139]. Pentru exprimarea proteinei recombinante SMAC-EGFP, tulpina de expresie de *E. coli* Rosetta™(DE3) pLysS transformată cu vectorul recombinant a fost utilizată cu succes. O cantitate semnificativă de 20 mg/L de proteină recombinată pură SMAC-EGFP a fost obținută într-o cultură cu bioreactor. În ceea ce privește procedura de purificare, protocolul nostru în două etape s-a dovedit a fi de succes.

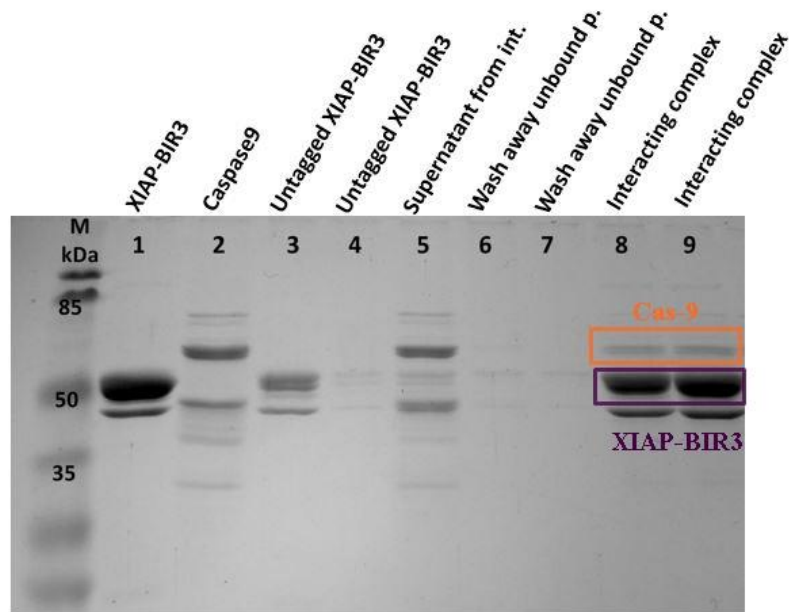


Fig.3.27. Analiza interacțiunii XIAP-BIR3 și Cas9 cu 10% SDS-PAGE

În cazul celui de-al doilea test pull-down, de ex. interacțiunea dintre Cas9 și XIAP-BIR3, rezultatele noastre au fost, de asemenea, de succes. Proteina de momeală (XIAP-BIR3) a fost marcată cu succes pe rășină de amiloză, prin urmare proteinele de momeală nemarcate au fost spălate din rășina de amiloză (Fig.3.27. banda 3 și banda 4). Interacțiunea împotriva proteinei Cas9 a fost investigată prin incubare peste noapte la 4°C. După cum se arată în figura 3.27. cantitatea de proteine care interacționează este semnificativă. În plus, este necesar să se optimizeze testele recente de interacțiune proteină-proteină.

CONCLUZII

C.1. CONCLUZII GENERALE

Peptidele bioactive prezintă un interes sporit în domeniul farmacologiei și științei medicale datorită cunoștințelor crescânde despre diversele moduri de acțiune. Peptidele terapeutice sunt în general derivate din trei surse: peptide naturale sau bioactive produse de plante, animale sau umane, peptide izolate din biblioteci genetice sau recombinante și peptide descoperite din biblioteci chimice. O strategie importantă în chimia peptidelor este proiectarea modificării chimice pentru a crește stabilitatea chimică și enzimatică a acestora în interesul de a prelungi timpul de acțiune și de a crește activitatea și selectivitatea față de receptor [3].

Producția industrială de peptide se bazează în mod obișnuit pe trei tehnologii alternative: sinteza în fază solidă, sinteza în fază lichidă și tehnologia recombinantă biotehnologică *in vivo*. Strategiile de sinteză chimică sunt provocatoare din punct de vedere economic. Producerea de peptide prin tehnici recombinante a contribuit, de asemenea, la progrese importante ale metodologiei.

Apoptoza este un proces esențial în dezvoltarea celulelor. Proteina mitocondrială SMAC promovează apoptoza prin eliminarea efectului inhibitor al IAP-urilor prin interacțiuni fizice. Secvențele amino-terminale din proteina SMAC sunt necesare pentru această funcție, deoarece mutația primului aminoacid duce la pierderea interacțiunii cu IAP. SMAC promovează apoptoza prin activarea caspazelor în calea citocromului c/Apaf-1/caspaze-9 [5]. În cazul apoptozei, cercetătorii s-au concentrat pe mimeticele Smac cu molecule mici care vizează IAP-urile din domeniul BIR3. Acești inhibitori IAP sunt în prezent investigați ca medicamente anticanceroase în studiile clinice [5, 6]. Cu cunoștințele de astăzi, am dezvoltat un sistem de expresie și o procedură de purificare care permite producerea de cantități suficiente de peptide recombinante pentru studiile de interacțiune proteină-peptidă. Se poate afirma că obiectivul nostru referitor la biosinteza și purificarea cIAP-urilor recombinante a fost atins. De asemenea, este important să menționăm experimentele noastre de succes de refoldare a proteinelor. Cercetarea noastră s-a extins și la investigarea domeniului BIR3 al proteinelor țintă prin biosinteză și teste de interacțiune. Proteinele recombinante biologic active menționate anterior sunt utile pentru studierea funcțiilor biologice ale genelor în diferite boli, pentru dezvoltarea de medicamente terapeutice, biomimetice și biomateriale pentru industria biotehnologiei [18], [56].

C.2. CONTRIBUȚII ORIGINALE

Această teză contribuie la studiul chimiei proteinelor și peptidelor, incluzând producția, purificarea, replierea, analiza interacțiunii proteină-peptidă, după cum urmează:

1. Sistemul de expresie Champion pET SUMO se dovedește a fi potrivit pentru exprimarea peptidelor, în special pentru biosinteza peptidelor mici.
2. Etichetarea chimică C-terminală proiectată a peptidelor folosind hidrazida Alexa Fluor 350 și hidrazida Biotin XX a fost implementată cu succes. Reacțiile de marcare chimică fluorescentă joacă un rol important în testele de polarizare fluorescentă.
3. Sistemul de expresie pMAL-2px se dovedește a fi aplicabil pentru exprimarea producției de proteine recombinante în cantități mari.
4. Metoda dezvoltată pentru izolarea domeniilor BIR3 recombinante ale IAP-urilor din periplasmă a fost realizată cu succes.
5. Am dezvoltat o procedură de solubilizare rapidă și simplă și de repliere asistată de detergent folosind detergenți pentru recuperarea proteinei XIAP recombinante native etichetate GST.

C.3. DEZVOLTĂRI VITOARE ÎN CERCETARE

În zilele noastre, chimia peptidelor este un domeniu emergent al științei. Cunoștințele teoretice dobândite cu privire la aspectele chimiei peptidelor în timpul acestui studiu ne-au încurajat să formăm un concept al unui proiect viitor cu scopul de a crea alte peptide mici recombinante. Vor fi selectate peptide de interes pe baza funcției lor biologice. Printre planurile viitoare ale cercetării noastre, proiectăm să elaborăm în detaliu teste de polarizare fluorescentă.

REFERINȚĂ SELECTATĂ

- [1] M. Rijavec, "Escherichia coli Bacteriocins : Antimicrobial Efficacy and Prevalence among Isolates from Patients with Bacteraemia," vol. 6, no. 12, 2011.
- [2] P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez, and M. Khrestchatsky, "Synthetic therapeutic peptides : science and market," *Drug Discov. Today*, vol. 15, no. 1/2 January, pp. 40–56, 2010.
- [3] D. M. Copolovici, K. Langel, and E. Eriste, "Cell-Penetrating Peptides: Design, Synthesis, and Applications," *ACS Nano*, vol. 8, no. 3, pp. 1972–1994, 2014.
- [4] D. Gaspar, A. S. Veiga, and M. A. R. B. Castanho, "From antimicrobial to anticancer peptides . A review," *Front. Microbiol.*, vol. 4, no. October, pp. 1–16, 2013.
- [5] S. T. Le Qument, M. Ishoey, M. T. Petersen, P. M. Simonsen, N. S. Holck, and T. E. Nielsen, "Solid-phase synthesis of an apoptosis-inducing tetrapeptide mimicking the Smac protein," *Tetrahedron Lett.*, vol. 52, no. 52, pp. 7049–7053, 2011.
- [6] H. Sun *et al.*, "Design of small-molecule peptidic and nonpeptidic smac mimetics," *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, no. 10, pp. 1264–1277, 2008.
- [7] F. Cossu *et al.*, "Recognition of Smac-mimetic compounds by the BIR domain of cIAP1," *Protein Sci.*, vol. 19, no. 12, pp. 2418–2429, 2010.
- [8] E. Mastrangelo *et al.*, "Targeting the X-Linked Inhibitor of Apoptosis Smac Mimetics . Structure , Activity , and Recognition Principles," *J. Mol. Biol.*, vol. 384, no. 3, pp. 673–689, 2008.
- [9] W. Kanchongkittiphon, N. Kabil, L. B. Bacharier, and M. Kitcharoensakkul, "Ecallantide: An alternative treatment of refractory angioedema in adolescents with systemic lupus erythematosus," *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, pp. 1–2, 2019.
- [10] L. R. Duncan, H. S. Sader, J. I. Smart, R. K. Flamm, and R. E. Mendes, "Telavancin activity in vitro tested against a worldwide collection of Gram-positive clinical isolates (2014)," *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, vol. 10, no. 2014, pp. 271–276, 2017.
- [11] V. Y. Yazbeck and S. Grant, "Romidepsin for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma," *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 24, no. 7, pp. 965–979, 2015.
- [12] L. V. Jacobsen, A. Flint, A. K. Olsen, and S. H. Ingwersen, "Liraglutide in Type 2 Diabetes Mellitus: Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics," *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 55, no. 6, pp. 657–672, 2016.
- [13] K. J. Wilby, N. Partovi, J. A. E. Ford, E. D. Greanya, and E. M. Yoshida, "Review of boceprevir and telaprevir for the treatment of chronic hepatitis C," *Can. J. Gastroenterol.*, vol. 26, no. 4, pp. 205–210, 2012.
- [14] J. J. Kiser, J. R. Burton, P. L. Anderson, and G. T. Everson, "Review and management of drug interactions with boceprevir and telaprevir," *Hepatology*, vol. 55, no. 5, pp. 1620–1628, 2012.
- [15] S. Schönberger *et al.*, "Brentuximab vedotin exerts profound antiproliferative and pro-apoptotic efficacy in CD30-positive as well as cocultured CD30-negative germ cell tumour cell lines," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 22, no. 1, pp. 568–575, 2018.
- [16] M. van den Elzen, M. F. C. L. Go, A. C. Knulst, M. A. Blankestijn, H. van Os-Medendorp, and H. G. Otten, "Efficacy of Treatment of Non-hereditary Angioedema," *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, vol. 54, no. 3, pp. 412–431, 2018.
- [17] A. Henninot, J. C. Collins, and J. M. Nuss, "The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future?," *J. Med. Chem.*, vol. 61, no. 4, pp. 1382–1414, 2018.
- [18] K. Nagy, Z. Kovács, P. Salamon, C. K. Orbán, S. Lányi, and B. Albert, "Enhanced heterologous expression in E.Coli," *Stud. Univ. Babeş-Bolyai Chem.*, vol. 64, no. Tom I, pp. 101–110, 2019.
- [19] A. D. P. Van Staden, L. M. Faure, R. R. Vermeulen, L. M. T. Dicks, and C. Smith, "Functional Expression of GFP-Fused Class i Lanthipeptides in Escherichia coli," *ACS Synth. Biol.*, vol. 8, no. 10, pp. A-H, 2019.
- [20] N. S. Parachin, K. C. Mulder, A. A. B. Viana, S. C. Dias, and O. L. Franco, "Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides," *Peptides*, vol. 38, no. 2, pp. 446–456, 2012.
- [21] G. L. Rosano and E. A. Ceccarelli, "Recombinant protein expression in Escherichia coli : advances and

- challenges,” vol. 5, no. April, pp. 1–17, 2014.
- [22] J. Scholz, H. Besir, C. Strasser, and S. Suppmann, “A new method to customize protein expression vectors for fast, efficient and background free parallel cloning,” *BMC Biotechnol.*, vol. 13, pp. 1–11, 2013.
- [23] G. Chhetri, P. Kalita, and T. Tripathi, “MethodsX An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in Escherichia coli,” *MethodsX*, vol. 2, pp. 385–391, 2015.
- [24] D. I. Fisher, L. M. Mayr, and R. G. Roth, “MOLECULAR PRINCIPLES , COMPONENTS , TECHNOLOGY , AND CONCEPTS : PROTEINS,” in *Encyclopedia of Cell Biology*, vol. 1, Elsevier Ltd., 2016, pp. 54–65.
- [25] Y. Li, “Recombinant production of antimicrobial peptides in Escherichia coli: A review,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 80, no. 2, pp. 260–267, 2011.
- [26] S. Tabor, “Expression Using the T7 RNA Polymerase/Promoter System,” in *Current Protocols in Molecular Biology*, 2001, pp. 1–11.
- [27] G. L. Rosano and E. A. Ceccarelli, “Recombinant protein expression in Escherichia coli : advances and challenges,” *Front. Microbiol.*, vol. 5, no. April, pp. 1–17, 2014.
- [28] R. Chen, “Bacterial expression systems for recombinant protein production : E . coli and beyond,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 5, pp. 1102–1107, 2012.
- [29] M. Merlin, E. Gecchele, S. Capaldi, M. Pezzotti, and L. Avesani, “Comparative Evaluation of Recombinant Protein Production in Different Biofactories : The Green Perspective,” vol. 2014, 2014.
- [30] M. Petzold, C. J. Coghlan, and M. T. W. Hearn, “Studies with an immobilized metal affinity chromatography cassette system involving binuclear triazacyclononane-derived ligands: Automation of batch adsorption measurements with tagged recombinant proteins,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1351, pp. 61–69, 2014.
- [31] C. Karakus, M. Uslu, D. Yazici, and B. A. Salih, “Evaluation of immobilized metal affinity chromatography kits for the purification of histidine-tagged recombinant CagA protein,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1021, pp. 182–187, 2016.
- [32] P. Kumar and G. K. Aradhyam, “Easy and efficient protocol for purification of recombinant peptides,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 95, pp. 129–135, 2014.
- [33] M. Urh, D. Simpson, and K. Zhao, “Chapter 26 Affinity Chromatography. General Methods,” in *Methods in Enzymology*, 1st ed., vol. 463, Elsevier Inc., 2009, pp. 417–438.
- [34] J. J. Lichty, J. L. Malecki, H. D. Agnew, D. J. Michelson-Horowitz, and S. Tan, “Comparison of affinity tags for protein purification,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 41, no. 1, pp. 98–105, 2005.
- [35] J. J. Lichty, J. L. Malecki, H. D. Agnew, D. J. Michelson-Horowitz, and S. Tan, “WITHDRAWN: Reprint of: Comparison of affinity tags for protein purification,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 41, pp. 98–105, 2011.
- [36] M. Lamkanfi and V. M. Dixit, “Manipulation of host cell death pathways during microbial infections,” *Cell Host Microbe*, vol. 8, no. 1, pp. 44–54, 2010.
- [37] L. Galluzzi *et al.*, “Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018,” *Cell Death Differ.*, vol. 25, no. 3, pp. 486–541, 2018.
- [38] H. Sun *et al.*, “Design of Small-Molecule Peptidic and Nonpeptidic Smac Mimetics,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, no. 10, pp. 1264–1277, 2008.
- [39] L. Flanagan *et al.*, “XIAP impairs Smac release from the mitochondria during apoptosis,” *Cell Death Dis.*, vol. 1, no. 6, pp. 1–13, 2010.
- [40] L. Bai, D. C. Smith, and S. Wang, “Small-molecule SMAC mimetics as new cancer therapeutics,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 144, no. 1, pp. 82–95, 2014.
- [41] “Apoptosis : A Review of Programmed Cell Death,” *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, 2007.
- [42] N. M. Y. Elsayed, D. A. Abou, E. Ella, R. A. T. Serya, and K. A. M. Abouzid, “Future Journal of Pharmaceutical Sciences Targeting apoptotic machinery as approach for anticancer therapy : Smac mimetics as anticancer agents,” *Futur. J. Pharm. Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 16–21, 2015.
- [43] P. Obexer and M. Ausserlechner, “X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) - a critical death-resistance

- regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy,” *Front. Oncol.*, vol. 4, no. October, pp. 1–9, 2014.
- [44] M. González-Lpez *et al.*, “Design, synthesis and evaluation of monovalent Smac mimetics that bind to the BIR2 domain of the anti-apoptotic protein XIAP,” *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 21, no. 14, pp. 4332–4336, 2011.
- [45] E. Mastrangelo *et al.*, “Targeting the X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein through 4-Substituted Azabicyclo[5.3.0]alkane Smac Mimetics. Structure, Activity, and Recognition Principles,” *J. Mol. Biol.*, vol. 384, no. 3, pp. 673–689, 2008.
- [46] A. Goede, E. Michalsky, U. Schmidt, and R. Preissner, “SuperMimic--fitting peptide mimetics into protein structures.,” *BMC Bioinformatics*, vol. 7, no. 7, pp. 11–15, 2006.
- [47] G. Wu *et al.*, “Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO,” *Nature*, vol. 408, no. 6815, pp. 1008–1012, 2000.
- [48] E. J. Hennessy *et al.*, “Discovery of aminopiperidine-based Smac mimetics as IAP antagonists,” *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 22, no. 4, pp. 1690–1694, 2012.
- [49] K. Welsh *et al.*, “Characterization of Potent SMAC Mimetics that Sensitize Cancer Cells to TNF Family-Induced Apoptosis,” *PLoS One*, vol. 11, no. 9, pp. 1–19, 2016.
- [50] H. Sun *et al.*, “Cyclopeptide Smac mimetics as antagonists of IAP proteins,” *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 20, no. 10, pp. 3043–3046, 2010.
- [51] H. Sun *et al.*, “Potent bivalent smac mimetics: Effect of the linker on binding to inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) and anticancer activity,” *J. Med. Chem.*, vol. 54, no. 9, pp. 3306–3318, 2011.
- [52] A. C. West *et al.*, “The SMAC mimetic , LCL-161 , reduces survival in aggressive MYC-driven lymphoma while promoting susceptibility to endotoxic shock,” *Oncogenesis*, vol. 5, no. 4, pp. 1–6, 2016.
- [53] E. Carosati *et al.*, “Discovery of Novel, Potent, and Specific Cell-Death Inducers in the Jurkat Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line,” *ChemMedChem*, vol. 10, no. 10, pp. 1700–1706, 2015.
- [54] A. Tchoghandjian, A. Soubéran, E. Tabouret, C. Colin, E. Denicolaï, and C. Villard, “Inhibitor of apoptosis protein expression in glioblastomas and their in vitro and in vivo targeting by SMAC mimetic GDC-0152,” *Cell Death Dis.*, vol. 7, no. 8, pp. 1–10, 2016.
- [55] B. Ling, L. Dong, R. Zhang, Z. Wang, Y. Liu, and C. Liu, “Theoretical studies on the interactions of XIAP-BIR3 domain with bicyclic and tricyclic core monovalent Smac mimetics,” *J. Mol. Graph. Model.*, vol. 29, no. 3, pp. 354–362, 2010.
- [56] P. Salamon *et al.*, “Heterologous expression and purification of recombinant proapoptotic human protein smac/diablo with egfp as fusion partner,” *Stud. Univ. Babeş-Bolyai Chem.*, vol. 62, no. TOM II, pp. 333–345, 2017.
- [57] F. Naz, M. Asad, and P. Malhotra, “Cloning , Expression , Purification and Refolding of Microtubule Affinity-Regulating Kinase 4 Expressed in Escherichia coli,” *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 172, no. 6, pp. 2838–2848, 2014.
- [58] A. Ghoshal and S. S. Ghosh, “Expression, Purification, and Therapeutic Implications of Recombinant sFRP1,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 175, no. 4, pp. 2087–2103, 2014.
- [59] M. A. Massiah, K. M. Wright, and H. Du, “Obtaining soluble folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, triton X-100, and CHAPS: Application to LB and M9 minimal media,” *Curr. Protoc. Protein Sci.*, vol. 2016, no. April, pp. 6.13.1–6.13.24, 2016.
- [60] M. Orwick-Rydmark, T. Arnold, and D. Linke, “The use of detergents to purify membrane proteins,” *Curr. Protoc. Protein Sci.*, vol. 2016, pp. 4.8.1–4.8.35, 2016.
- [61] D. M. Francis and R. Page, “Strategies to optimize protein expression in E. coli,” *Curr. Protoc. Protein Sci.*, no. SUPPL. 61, pp. 1–29, 2010.
- [62] B. Chisnall, C. Johnson, Y. Kulaberoglu, and Y. W. Chen, “Chapter 12 Insoluble Protein Purification with Sarkosyl : Facts and Precautions,” vol. 1091, pp. 179–186.
- [63] S. Frankel, R. Sohn, and L. Leinwand, “The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 4, pp. 1192–1196, 1991.

- [64] Y. Huang, R. L. Rich, D. G. Myszka, and H. Wu, "Requirement of both the second and third BIR domains for the relief of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated caspase inhibition by Smac.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 49, pp. 49517–49522, 2003.
- [65] S. P. Burke and J. B. Smith, "Monomerization of cytosolic mature Smac attenuates interaction with IAPs and potentiation of caspase activation," *PLoS One*, vol. 5, no. 10, 2010.
- [66] K. Nagy, C. K. Orbán, B. Albert, and S. Lányi, "Biosynthesis of BIR3 domain of inhibitor of apoptosis proteins," *UPB Sci. Bull. Ser. B Chem. Mater. Sci.*, vol. 81, no. 4, pp. 15–22, 2019.

APPENDIX

A.1. PUBLICAȚII ȘI PARTICIPARE LA CONFERINȚE

Lucrări publicate în reviste ISI

1. Pál SALAMON, Csongor K. ORBÁN, **Katalin MOLNÁR-NAGY**, Zita KOVÁCS, Klára VÁNCSA, Emese BÁLINT, Ildikó MIKLÓSSY, Beáta ALBERT, Gyöngyi TAR, Szabolcs LÁNYI, Study of native SMAC protein production in the pUbiq expression system: molecular cloning, biosynthesis and molecular modelling, *Electronic Journal of Biotechnology*, 2022, ISSN 0717-3458, Impact factor: 2.8
2. **Katalin Nagy**, Zita Kovács, Ildikó Miklóssy, Pál Salamon, Csongor-Kálmán Orbán, Beáta Albert, Szabolcs Lányi, Detergent aided refolding and purification of recombinant XIAP from inclusion bodies, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Seria Chimia*, LXVI, 4, 2021 (p. 355-368), ISSN (Print): 1224-7154, Impact Factor: 0.447
3. **Katalin NAGY**, Csongor-Kálmán ORBÁN, Beáta ALBERT, Szabolcs LÁNYI, Biosynthesis of BIR3 domain of inhibitor of apoptosis proteins, *Scientific Bulletin Series B: Chemistry and Materials Science*, Vol. 81, Iss. 4, 2019, ISSN 1454-2331.
4. **Katalin NAGY**, Zita KOVÁCS, Pál SALAMON, Csongor-Kálmán ORBÁN, Szabolcs LÁNYI, Beáta ALBERT, Enhanced heterologous expression in *E.coli*, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Seria Chimia*, LXIV, 2, Tom I, 2019 (p. 101-110), ISSN (Print): 1224-7154, 2019, Impact Factor: 0,305
5. Pál SALAMON, Ildikó MIKLÓSSY, Beáta ALBERT, Mónika KORODI, **Katalin NAGY**, Ildikó BAKOS, Szabolcs LÁNYI, Csongor ORBÁN, Heterologous expression and purification of recombinant proapoptotic human protein SMAC/diablo with EGFP as fusion partner, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Seria Chimia*, LXII, 2, Tom II, 2017 (p. 333-345), ISSN (Print): 1224-7154, 2017, Impact Factor: 0.305

Participare la conferințe (2015-2019)

1. Krisztina KOVÁCS, **Katalin MOLNÁR-NAGY**, Zita KOVÁCS, Kálmán-Csongor ORBÁN, Beáta ALBERT, Biosynthesis and purification of apoptosis modulating BIR3 domain of IAP2, *25rd International Conference on Chemistry*, Cluj-Napoca, October 24–26, 2019
2. Pál SALAMON, Ildikó MIKLÓSSY, **Katalin NAGY**, Zita KOVÁCS, Szabolcs LÁNYI, Csongor-K. ORBÁN, Beáta ALBERT, Analysis of protein-protein interactions in cell death control, *25rd International Conference on Chemistry*, Cluj-Napoca, October 24–26, 2019
3. **Nagy Katalin**, Kovács Zita, ORBÁN Kálmán-Csongor, LÁNYI Szabolcs, ALBERT Beáta, A humán XIAP refoldálása, *XII. Szent-Györgyi Albert Konferencia*, Budapest, Április 5-6, 2019
4. SALAMON Pál, **NAGY Katalin**, KOVÁCS Zita, ALBERT Beáta, MIKLÓSSY Ildikó, Lányi Szabolcs, ORBÁN Csongor-K., A kaszpáz 9 szerepe a kaszpáz függetlennek vélt „öngyilkos” sejthalál programban, *XII. Szent-Györgyi Albert Konferencia*, Budapest, Április 5-6, 2019

5. **Katalin NAGY**, Csongor-Kálmán ORBÁN, Beáta ALBERT, Zita KOVÁCS, Pál SALAMON, Szabolcs LÁNYI, Biosynthesis, purification and protein-protein interaction studies of BIR3 domain of IAP's, *24rd International Conference on Chemistry*, Szovátafürdő, october 24-28, 2018
6. Zita KOVÁCS, Beáta ALBERT, Csongor-Kálmán ORBÁN, **Katalin NAGY**, Pál SALAMON, Szabolcs LÁNYI, Molecular cloning of human Tyrosine Kinase FER and heterologous expression, *24rd International Conference on Chemistry*, Szovátafürdő, october 24-28, 2018
7. SALAMON Pál, **NAGY Katalin**, KOVÁCS Zita, Beáta ALBERT, Ildikó MIKLÓSSY, Szabolcs LÁNYI, Csongor-Kálmán ORBÁN, Biosynthesis of Necroptosis Modulating Human Proteins, *24rd International Conference on Chemistry*, Szovátafürdő, october 24-28, 2018
8. **Katalin NAGY**, Csongor-Kálmán ORBÁN, Beáta ALBERT, Ildikó MIKLÓSSY, Szabolcs LÁNYI, Biosynthesis, purification and chemical labelling of AVPI binding motifs containing Smac mimetics, *23rd International Conference on Chemistry*, Deva, October 25-28, 2017
9. Zita KOVÁCS, Csongor-Kálmán ORBÁN, Beáta ALBERT, SALAMON Pál, Mónika KORODI, **Katalin NAGY**, Optimizing the heterologous expression of Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAP), *23rd International Conference on Chemistry*, Deva, October 25-28, 2017
10. **Katalin NAGY**, Csongor-Kálmán ORBÁN, Beáta ALBERT, Ildikó MIKLÓSSY, Szabolcs LÁNYI, SMAC „mimicking” peptides: cloning, heterologous expression with fusion partner and purification, *22rd International Conference on Chemistry*, Temesvár, November 3-6, 2016