

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Příprava rekombinantního lidského ameloblastinu

Bc. Filip Petira

Diplomová práce

2017

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

The preparation of human recombinant ameloblastin

Bc. Filip Petira

Thesis

2017

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Filip Petira**  
Osobní číslo: **C15623**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Příprava rekombinantního lidského ameloblastinu**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování:

Teoretická část bude obsahovat rešerši na téma (i) příprava rekombinantních proteinů v bakteriálním a kvasinkovém expresním systému; (ii) role ameloblastinu při tvorbě zubní skloviny; (iii) strukturní vlastnosti ameloblastinu.

Experimentální část - přehled metod a dílčích kroků:

1. Amplifikace genu kódujícího ameloblastin
2. Pokus o konstrukci vektoru pro expresi ameloblastinu v *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Exprese ameloblastinu v *Escherichia coli*, případně v *S. cerevisiae* a následná purifikace.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Wald, Osickova, Sulc et al. (2013) Intrinsically disordered enamel matrix protein ameloblastin forms ribbon-like supramolecular structures via N-terminal segment encoded by exon 5. J. Biol. Chem 288, 22333-22354.

Khow a Suntrarachun (2012) Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. Asian Pac.J.Trop.Biomed 2, 159-162.

Porro, Gasser, Fossati et al. (2011) Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89, 939-948.

Ruml (1997) Laboratoře z genového inženýrství. VŠCHT Praha.

Kromě těchto základních prací vyhledejte další relevantní články pomocí standardních databází.

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 11.5.2017

Bc. Filip Petira

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych velmi rád poděkoval vedoucí své diplomové práce RNDr. Olze Heidingsfeld, Ph.D. za vedení diplomové práce, cenné rady, připomínky, podporu a v nemalé míře za trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Pavlíně Majtnerové, Mgr. Elišce Kročové a Janě Kňavové za pomoc a rady při měřeních a také své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

## **ANOTACE**

Práce se zabývá srovnáním exprese proteinů v bakteriálních expresních systémech oproti expresi v kvasinkových expresních systémech. Velká část práce je věnována představení nejvýznamnějších kvasinkových druhů využívaných jako expresní systémy a také vektorům, které se v těchto druzích pro expresi používají.

Cíle práce jsou zaměřeny na produkci ameloblastinu divokého typu v expresním systému *E. coli* a jeho následná purifikace. Dále na vytvoření vektoru pro kvasinkový expresní systém, který by obsahoval gen pro ameloblastin divokého typu a jeho další dva mutanty, a to konkrétně ameloblastin  $\Delta 5$ , který postrádá úsek kódovaný exonem 5 a ameloblastin c-terminální část, který kóduje daný protein od 197 do 421 aminokyseliny.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Bakteriální expresní systémy, kvasinkové expresní systémy, *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *P. pastoris*, purifikace proteinů, ameloblastin, In-Fusion cloning.

## **TITLE**

The preparation of human recombinant ameloblastin

## **ANNOTATION**

The thesis deals with the comparison of protein expression in bacterial expression systems against expression in yeast expression systems. A big part of the thesis is devoted to introduction of the most important yeast species, which are used as expression systems and also to vectors which are used in these expression systems.

The aims of thesis are focused on the production of ameloblastin wild type in *E. coli* as expression system and subsequent purification. Further, to create a vector for yeast expression system, which contains the gene for ameloblastin wild type and others two mutants, namely ameloblastin  $\Delta 5$ , which lacks segment encoded by the exon 5 and ameloblastin c-terminal part, which encode the protein from the amino acid 197 to 421.

## **KEYWORDS**

The bacterial yeast expression systems, the yeast expression systems *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *P. pastoris*, protein purification, ameloblastin, In-Fusion cloning.



# Obsah

0 ÚVOD.....	18
1 PRODUKCE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ .....	19
1.1 Expresní systémy .....	19
1.2 Vektory.....	21
1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
1.4 <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	25
1.5 <i>Pichia pastoris</i> .....	27
2 AMELOBLASTIN (SHEATHLIN).....	30
2.1 Gen <i>AMBN</i> .....	30
2.2 Primární struktura ameloblastinu a jeho vlastnosti.....	30
2.3 Sekundární struktura ameloblastinu.....	31
2.4 Funkce ameloblastinu.....	32
2.5 Štěpení ameloblastinu proteinázami .....	33
2.6 Ameloblastin a vývoj kostí.....	34
2.7 Vývoj zubů .....	35
2.8 Produkce a zkoumání lidského ameloblastinu.....	36
3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	37
3.1 Cíl 1 .....	37
3.2 Cíl 2.....	37
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	38
4.1 Chemikálie, přístrojové a další vybavení .....	38
4.1.1 Chemikálie .....	38
4.1.2 Přístroje.....	39
4.1.3 Použité sady .....	40
4.1.4 Ostatní materiál .....	40
4.1.5 Použitý buněčný materiál.....	40

4.2 Pufry a roztoky .....	40
4.2.1 Purifikace proteinů .....	40
4.2.2 Práce s DNA.....	41
4.2.3 Regenerace Ni-NTA .....	41
4.2.4 Agarózová elektroforéza.....	41
4.2.5 SDS PAGE.....	42
4.2.6 Silver stain.....	42
4.2.7 Western blot .....	43
4.2.8 Dialýza .....	43
4.2.9 Měření koncentrace proteinů.....	43
4.3 Média.....	43
4.4 Metodika.....	44
4.4.1 Použité vektory.....	44
4.4.2 Expres AMBN v <i>E. coli</i> .....	44
4.4.2.1 Transformace buněk .....	44
4.4.2.2 Expres AMBN.....	45
4.4.2.3 Dezintegrace buněk .....	45
4.4.3 Afinitní chromatografie .....	45
4.4.3.1 Kolonová afinitní chromatografie .....	45
4.4.3.1.1 Skoková eluce .....	46
4.4.3.1.2 Gradientová eluce.....	46
4.4.3.1.3 Promytí kolony.....	46
4.4.3.1.4 Regenerace kolony .....	46
4.4.3.2 Vsádkové uspořádání .....	47
4.4.3.2.1 Vsádkové uspořádání se štěpením na Ni-NTA agaróze .....	47
4.4.3.2.2 Regenerace Ni-NTA agarózy.....	47
4.4.3.3 SDS-PAGE .....	47

4.4.3.5 Western blot.....	48
4.4.3.6 Zahuštění proteinů.....	49
4.4.3.7 Dialýza.....	49
4.4.3.8 Měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové .....	49
4.4.3.9 Štěpení TEV proteázou.....	50
4.4.4 Expres AMBN v kvasinkách.....	50
4.4.4.1 Příprava primerů .....	50
4.4.4.2 PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	50
4.4.4.3 Elektroforéza na agarózovém gelu.....	51
4.4.4.4 Extrakce DNA z agarózy.....	51
4.4.4.5 Měření koncentrace DNA.....	52
4.4.4.6 Štěpení vektoru pYEX-BX.....	52
4.4.4.7 In-Fusion cloning .....	52
4.4.4.8 Transformace buněk <i>E. coli</i> DH5a .....	53
4.4.4.9 Získání plazmidové DNA .....	53
4.4.4.10 Sekvenace .....	54
4.4.4.11 Software.....	54
4.4.4.12 Webové databáze a nástroje.....	54
5 VÝSLEDKY A DISKUSE .....	55
5.1 Příprava rekombinantního ameloblastinu v expresním systému <i>E. coli</i> .....	55
5.1.1 Transformace buněk <i>E. coli</i> Bl 21 (DE3), exprese proteinu a dezintegrace buněčného materiálu .....	55
5.1.2 Afinity chromatografie .....	55
5.1.2.1 Optimalizace Afinity chromatografie.....	55
5.1.2.1.1 Kolonové uspořádání se skokovou elucí .....	55
5.1.2.1.2 Kolonové uspořádání s gradientovou elucí.....	55
5.1.2.1.3 Vsádkové uspořádání se skokovou elucí .....	55

5.1.2.2 Výsledky vsádkové afinitní chromatografie .....	56
5.1.2.2.1 Štěpení TEV proteázou.....	58
5.1.2.3 Výsledky afinitní chromatografie pro dvojnásobné množství vzorku .....	59
5.1.2.3.1 Dialýza a štěpení TEV proteázou.....	60
5.1.2.3.2 Western blot .....	62
5.1.2.4 Modifikace afinitní chromatografie .....	63
5.1.2.4.1 Western blot .....	66
5.2 Příprava rekombinantního ameloblastinu v expresním systému kvasinek .....	67
5.2.1 Klonování s využitím štěpení restriční endonukleázou BamHI.....	67
5.2.1.1 Optimalizace PCR reakce a amplifikace konstruktů <i>AMBN</i> .....	67
5.2.1.2 In-Fusion cloning .....	68
5.2.1.3 Sekvenování.....	70
5.2.2 Klonování prostřednictvím BamHI a EcoRI.....	70
5.2.2.1 Optimalizace PCR a amplifikace konstruktů <i>AMBN</i> .....	70
5.2.2.2 In-Fusion cloning .....	72
6 ZÁVĚR.....	74
6.1 Produkce ameloblastinu v expresním systému <i>E. coli</i> .....	74
6.2 Produkce ameloblastinu v expresním systému kvasinek .....	74
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	76

## Seznam obrázků

Obrázek 1: <i>S. cerevisiae</i> obarvená podle Grama .....	24
Obrázek 2: <i>Kluyveromyces lactis</i> . .....	27
Obrázek 3: Možné uspořádání ameloblastinových monomerů v supramolekulárních strukturách. ....	32
Obrázek 4: Schéma konstruktů vloženého do vektoru pET28b.....	44
Obrázek 5: Schéma In-Fusion reakce.....	53
Obrázek 6: Průběh afinitní chromatografie vsádkové uspořádání .....	56
Obrázek 7: SDS PAGE analýza afinitní chromatografie 1 .....	57
Obrázek 8: SDS PAGE analýza afinitní chromatografie 2.....	57
Obrázek 9: SDS PAGE analýza elučnicích frakcí před a po štěpení TEV proteázou .....	58
Obrázek 10: Foto SDS PAGE analýza afinitní chromatografie po štěpení TEV proteázou ....	59
Obrázek 11: SDS PAGE analýza afinitní chromatografie.....	60
Obrázek 12: SDS PAGE analýza ameloblastinu během dialýzy a štěpení TEV proteázou.....	61
Obrázek 13: SDS PAGE analýza supernatantu a sedimentu po štěpení TEV proteázou.....	62
Obrázek 14: Western blot .....	63
Obrázek 15: Modifikace afinitní chromatografie.....	64
Obrázek 16: SDS PAGE analýza afinitní chromatografie gel 1 .....	65
Obrázek 17: SDS PAGE analýza afinitní chromatografie gel 2 .....	65
Obrázek 18: Western blot .....	66
Obrázek 19: Analýza amplifikace konstruktů ameloblastinu na agarózovém gelu .....	67
Obrázek 20: Štěpení vektoru pYEX-BX restriční endonukleázou BamHI a amplifikace konstruktů ameloblastinu a analýza na agarózovém gelu. ....	68
Obrázek 21: Diagnostická PCR A analýza na agarózovém gelu .....	69
Obrázek 22: Diagnostická PCR B analýza na agarózovém gelu .....	69
Obrázek 23: Amplifikace konstruktů AMBN s novými primery .....	71
Obrázek 24: Analýza štěpení vektoru pYEX-BX restričními endonukleázami BamHI a EcoRI a amplifikované konstrukty ameloblastinu na agarózovém gelu .....	72

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Srovnání různých parametrů hostitelských buněk .....	20
Tabulka 2: Množství produkovaných proteinů v hostitelských kmenech. ....	29
Tabulka 3: Protokol pro barvení stříbrem.....	48
Tabulka 4: PCR program pro amplifikaci konstruktů <i>AMBN</i> .....	51
Tabulka 5: PCR program pro diagnostické primery .....	51
Tabulka 6: Měření koncentrace proteinů v elučních frakcích .....	56
Tabulka 7: Měření koncentrace proteinů v elučních frakcích .....	60
Tabulka 8: PCR program pro amplifikaci konstruktů <i>AMBN</i> .....	67
Tabulka 9: Měření koncentrace DNA a její čistoty .....	68
Tabulka 10: PCR program pro amplifikaci <i>AMBN</i> .....	71
Tabulka 11: Měření koncentrace DNA a její čistoty.....	73

## Seznam zkratek

ADH1 promotor	Promotor genu pro Alkohol dehydrogenázu 1
AMBN	Gen kódující ameloblastin
AMBN $\Delta$ 5	Úsek genu kódující ameloblastin bez exonu 5
AMBN c-term	Úsek genu kódující c terminální část ameloblastinu
AMBN wt	Gen kódující ameloblastin divokého typu
AMP	Ampicilin
AMTN	Gen kódující amelotin
AOX1/2	Geny kódující alkohol oxidázu
APS	Peroxidisíran amonný
ARS	Autosomal replication sequence (Autozomální replikační sekvenec)
BamHI endonukleáza	<i>B. amyloliquefaciens</i> H 1 endonukleáza
BMP	Bone Morphogenic Protein pathway
BSA	Bovine Serum Albumine (Hovězí sérový albumin)
CD34	Cluster of differentiation 34
CD63	Cluster of differentiation 63
CMK2	Gen kódující Calmodulin Dependentní protein kinázu
CNE1	Gen kódující Calnexin
CUP1 promotor	Promotor genu pro metallothionein
ČR	Česká republika
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	Dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
DTT	Dithiotreitol
E1-3	Eluční frakce 1-3
EcoRI endonukleáza	<i>E. coli</i> RY13 1 endonukleáza
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
ENAM	Gen kódující enamelin
FLD1	Gen kódující formaldehyd dehydrogenázu
GAL1	Gen kódující galaktokinázu
Gal4	Galactose-responsive transcription factor
GRAS	Generally recognized as safe (Obecně považován za bezpečný)
HBsAg	Povrchový antigen hepatitidy B

<i>HIS4</i>	Gen kódující multifunkční enzym, který katalyzuje druhý, třetí, devátý a desátý krok biosyntézy histidinu
His-tag	Histidinový kotva
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
KAN	Kanamycin
Kex2 proteáza	Kexinová proteáza
KLK4	Kalikrein-4
<i>LAC4</i>	Gen kódující $\beta$ -galaktosidázu
<i>LAC12</i>	Gen kódující permeázu
<i>LEU2</i>	Gen kódující $\beta$ -isopropylmalát dehydrogenázu
LB médium	Luria-Bertani médium
M	Marker
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MCS	Multiple cloning site
MDO médium	Medium Density Overlay médium
MF $\alpha$ 1	Mating factor $\alpha$ 1
MMP-20	Metaloproteináza-20
Msx2	msh homebox 2
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
Ori	Origin
P1-3	Promývací frakce 1-3
PBI	Pribnow box-like
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerázová řetězová reakce)
<i>PDI1</i>	Gen kódující Protein Disulfidovou Izomerázu
PGK1 promotor	Promotor genu pro Phosphoglycerát Kinázu 1
<i>POH1</i>	Gen kódující kyselou fosfatázu
PVDF	Polyvinyliden fluorid
rDNA	Ribosomální deoxyribonukleová kyselina
RT-PCR	Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
SacII endonukleáza	<i>Streptomyces achromogenes</i> endonukleáza
SDS	Dodecylsírán sodný



SDS-PAGE	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného
<i>SSO1</i>	Gen kódující Syntaxin
TEF1 promotor	Promotor genu kódující translační elongační faktor EF-1 alpha
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TEV proteáza	Tobacco Etch Virus proteáza
TPI1 promotor	Promotor genu kódující triosa-phosfát isomerazu TPI1
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Trx	Thioredoxin
ÚOCHB AV ČR	Ústav organické chemie a biologie Akademie věd České republiky
<i>URA3</i>	Gen kódující orotidin 5'-dekarboxylázu
USA	United States of America (Spojené státy americké)
UV	Ultra Violet (Ultrafialová)
UV/VIS	Ultra Violet/Visible (Ultrafialovo/viditelná)
VF	Vazebná frakce
YE <sub>p</sub>	Yeast Episomal plasmids (Kvasinkový episomální plasmid)
YI <sub>p</sub>	Yeast Integrating plasmids (Kvasinkový integrační plasmid)

## 0 ÚVOD

Produkce proteinů v expresních systémech kvasinek si rychle získala na oblibě, a to nejen díky jejich snadné kultivovatelnosti, vysokým výtěžkům, ale i díky postranslačním modifikacím a skládání proteinů, které poskytují. Postranslační modifikace kvasinek je daleko podobnější vyšším eukraotickým organismům než v případě používání bakterií jako expresních systémů. Proto je tato práce věnována představení hlavních zástupců kvasinek, ve kterých exprese proteinů je nejčastěji prováděna.

Cíle práce jsou zaměřeny na produkci ameloblastinu divokého typu v expresním systému *E. coli* a jeho následnou purifikaci. Dále na vytvoření vektoru pro kvasinkový expresní systém, který by obsahoval gen pro ameloblastin divokého typu a jeho další dva mutanty, a to konkrétně ameloblastin  $\Delta 5$ , který postrádá úsek kódovaný exonem 5 a ameloblastin c-terminální část, který kóduje daný protein od 197 do 421 aminokyseliny.

# 1 PRODUKCE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

Protein, který je syntetizován jiným organismem než tím, z něhož pochází, se nazývá rekombinantní. Z dárcovského organismu se izoluje úsek DNA kódující protein, který má být produkován. Tato sekvence je poté vpravena do vektoru. Vektory pro expresi proteinů v bakteriích jsou odvozeny od bakteriálních plazmidů. Jsou to malé kruhové molekuly DNA, které jsou schopny se samy replikovat. Vektory, do nichž je cíleně vložena DNA z jiného organismu pak nazýváme rekombinantními. Vektor je poté použit k transformaci buněk, které mají sloužit jako expresní systém. Mohou to být bakterie, kvasinky nebo vyšší eukaryotické buňky. V těchto buňkách poté pomocí jejich proteosyntetického aparátu probíhá exprese proteinu, jehož kódující sekvence je obsažena ve vektoru. [1]

Poté následuje získání proteinu ať již z buňky či z média, kam může být produkován. Tento proces se nazývá purifikace. Proces purifikace lze rozdělit na analytický a preparativní. Analytická purifikace má za cíl získat malé množství čistého proteinu pro další analýzu. Preparativní purifikace má za cíl získat co možná nevyšší množství proteinu např. pro účely strukturální analýzy nebo pro účely komerční. [2]

## 1.1 Expresní systémy

S postupným rozvojem technologie rekombinantní DNA přišel čas na to nalézt vhodný zdroj, který by sloužil pro produkci rekombinantních proteinů. Hledán byl takový organismus, který by poskytoval velké výtěžky, byl snadno kultivovatelný, mohlo s ním být snadno geneticky manipulováno a přitom, aby náklady na jeho získání byly co nejmenší. Takovýto expresní systém představovaly bakterie. Prvním rekombinantně produkováným proteinem se stal lidský inzulin. Ten byl poprvé získán v laboratoři roku 1977, a to z bakterie *E. coli*. Na trh se tento rekombinantní protein dostal roku 1982 pod názvem Humulin™. Později se však ukázalo, že ne všechny proteiny jdou snadno produkovat v bakteriích. Bakteriální expresní systémy mají nevýhodu kvůli nestabilitě plasmidů, které ztrácí. Dále jim schází schopnost provádět složitější post-translační modifikace a u některých proteinů absence správného složení kvůli přítomnosti disulfidických vazeb. Další nevýhodou mohou být u některých proteinů nízké výtěžky. Špatně složený protein je poté ukládán v inkluzních těliscích a při procesu purifikace je nutno jej refoldovat. Bakteriální systémy se obecně používají pro produkci méně komplexních proteinů. [3,4]

V hledání jiných expresních systémů byly další volbou kvasinky, které se v mnoha aspektech při produkci rekombinantních proteinů podobají bakteriím. I přes to však okolo 30% všech rekombinantních proteinů je produkováno v *E. coli*, a to díky tomu, že máme

dobré znalosti o jejím genomu a metabolických drahách. Je schopna růstu ve vysokých hustotách a dosahovat vysokých výtěžků. Ty činí až 50% z celkové biomasy. Dnešní protokoly umožňují kultivovat *E. coli* v hustotách až 100g biomasy na litr média. Porovnání produkce mezi různými expresními systémy je uvedeno na obr. 1. [3]

Dalším významným a neopomenutelným bakteriálním expresním systémem je tyčinkovitá bakterie *Bacillus subtilis*. Tato bakterie je na rozdíl od *E. coli* gram pozitivní a sekretuje řadu enzymů, které degradují různé substráty, což ji umožňuje růst v neustále se měnícím prostředí. Tento druh bakterie se používá především pro produkci objemných průmyslových enzymů. Obdobně jako *E. coli* je i *B. subtilis* schopen růst ve vysoké buněčné hustotě, avšak je oproti *E. coli* zvýhodněn při produkci potravinářských výrobků, a to díky tomu že nese status GRAS (Generally recognized as safe) neboli obecně považován za bezpečný. Také má vyšší sekreční kapacitu a produkuje proteiny přímo do média. Nevýhody, které tento expresní systém oproti *E. coli* má, jsou v podobě nedostatku vhodných expresních vektorů, nestabilitě plazmidů a přítomnosti proteáz. [5]

**Tabulka1: Srovnání různých parametrů hostitelských buněk.** Obr. převzat z [3]

	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. pastoris</i>	<i>P. pastoris</i>
Destination of product	Secreted	Cytoplasm	Secreted	Cytoplasm	Secreted	Cytoplasm	Secreted
Biomass cell dry weight (g/l)	20–35	50–70	20–60	<90	60–100	80–150	80–150
Typical spec. growth rate (1/h)	0.05–0.8	0.08–0.12	<0.1	0.01–0.2	0.01–0.15	0.02–0.04	0.02–0.18
Product concentration (g/l)	≤3	10–15	0.2–2	0.5–1.5	≤1	10–20	<5

Prvním kvasinkovým kmenem použitým pro heterologní produkci proteinů se stal kmen *Saccharomyces cerevisiae*. Jedním z prvních takto produkovaných proteinů byl opět inzulin. Inzulin produkovaný kvasinkami pro lidské potřeby se stal dostupný v roce 1987. Do té doby byl inzulin získáván izolací z vepřových a hovězích slinivek anebo od roku 1982 z *E. coli*. Dalším proteinem byl povrchový antigen hepatitidy B (HBsAg), který byl potřebný pro výrobu vakcíny. Kvasinkami produkovaný HBsAg se stal na trhu dostupný v roce 1986. [3,6,7]

Používání kvasinek jako expresních systémů namísto bakteriálních přináší jisté výhody. Kultivace kvasinek je snadná a jednoduchá stejně jako je tomu v případě bakterií. Produkce proteinů v kvasinkách dosahuje velkých výtěžků. Kvasinky též rostou ve vysokých hustotách. Dále je významným aspektem i nízká cena. Podobně jako u bakterií i pěstování

kvasinek není nijak náročné při porovnání s kulturami savčích buněk. Růstová média pro kvasinky jsou levná a jednoduchá jako v případě bakteriálních. Další výhodou je snadná genetická manipulovatelnost a dostatek již popsanych postupů, jak kvasinky modifikovat. Velikou výhodou kvasinek oproti bakteriím je jejich schopnost provádět složitější posttranslační modifikace na produkovaných proteinech. Další výhodou je možnost sekrece proteinů do média, pokud námi požadovaný protein obohatíme signální sekvencí, která jej zařadí do sekreční dráhy. Dále kvasinky také využívají chaperony, které pomáhají proteinům zaujmout správnou konformaci. Tyto vlastnosti, kterými kvasinky disponují, vedou k tomu, že kvasinkami produkovaný protein je podobný savčím proteinům. [4,8]

Pro navýšení produkce a dosažení tak vyšších výtěžků rekombinantních proteinů lze provést několik úprav týkajících se genomu expresního systému, anebo podmínek jejich růstu. Mezi ně patří navýšení exprese genů pro chaperony. Dále pak snížení extra a intracelulární proteolýzy a úprava DNA sekvence, která kóduje daný protein, nebo úprava signální sekvence. Další možností je optimalizace kultivačních podmínek. [9]

## 1.2 Vektory

Vektory používané pro transformaci kvasinek jsou nejčastěji kruhové dvouřetězcové molekuly DNA schopné autonomní replikace. Tyto vektory jsou plazmidového typu. Takové vektory mají velikost od 2 do 15 kb. Prostupnost do buněk je totiž úměrná jejich velikostem. Obecná stavba vektoru začíná promotorem. Tato sekvence zajišťuje vazbu transkripčních faktorů a následné nasednutí RNA polymerázy, která zahájí transkripci. Poté následuje multiple cloning site (MCS). V tomto místě je obsažena řada sekvencí, které jsou štěpeny restrikcími endonukleázami a slouží pro vložení genu zájmu do vektoru. Dále následuje sekvence selekčního markeru. Tato sekvence zahrnuje obvykle enzymy, které transformované buňce dávají rezistenci vůči antibiotikům. Další důležitou sekvencí je ori místo neboli origin of replication. Na této sekvenci začíná replikace vektoru. [6,10,11,12]

Vektory použité v kvasinkových expresních systémech jsou obecně hybridy mezi sekvencemi odvozenými od kvasinek, bakterií a sekvencemi cizího původu (lidské, uměle vytvořené). Z bakteriálních sekvencí bývá ve vektorech použita sekvence ori místa a selekčního markeru jako je rezistence na ampicilin. Tyto sekvence slouží pro namnožení vektoru právě v bakteriích. Sekvence od kvasinek jsou voleny na základě toho, zdali má být vektor episomální, anebo se má inkorporovat do genomu kvasinky. Pokud má být vektor episomální tak jsou použity sekvence, které se vyskytují v přirozených plazmidech kvasinek. Tyto vektory dosahují velkého počtu kopií, ale může docházet k jejich ztrátě při absenci

selekčních markerů. Pokud je to vektor, který se má inkorporovat do genomu expresního systému, jsou tyto sekvence cíleny tak, aby se vektor inkorporoval do specifických genů, které jsou hojně exprimovány. Mezi ně patří geny pro enzymy využívající zdroje uhlíku, anebo inkorporace do rDNA. Pro začlenění vektoru do genomu musí být vektor lineární, nebo je před transformací linearizován. Začlenění do genomu poté probíhá procesem homologní rekombinace. Dále pak takový vektor obsahuje sekvenci pro selekční marker. Tyto vektory již kvasinka neztrácí, i když chybí selekční markery. [6,10,11,12]

### 1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* je nejdéle používaným druhem kvasinek ať již v odvětví pivovarnickém, nebo pekařském. Díky tomu se tato kvasinka stala v roce 1930 laboratorním modelovým systémem pro studium obecných otázek fyziologie, genetiky, biochemie a pro vývoj genetických nástrojů. Na základě toho je předkládána jako modelový eukaryotní organismus. V roce 1996 byl dokončen projekt na osekvenování celého genomu *S. cerevisiae*, a takto se stala tato kvasinka prvním eukaryotním organismem, u kterého byl osekvenován a přečten celý genom. Kolem roku 1990 získala *S. cerevisiae* díky svému využití v potravinářském průmyslu status GRAS (Generally recognised as Safe) neboli je obecně považována za bezpečný. Díky tomu byla *S. cerevisiae* použita jako první eukaryotický organismus pro heterologní produkci proteinů. [6,7,13]

*S. cerevisiae* odolává chladu a je možné její buňky skladovat s přidavkem kryoprotektiva, jako je kupříkladu glycerol, či propandiol, zmrazené při  $-70^{\circ}\text{C}$ . Jejich generační doba se pohybuje v rozmezí od 2 do 4 hodin, a to v závislosti na teplotě, při které jsou kultivovány a na typu a množství živin v médiu. Mají též diploidní sexuální cyklus, kdy se haploidní buňky opačného pohlaví spojí a dojde k fúzi jader. Takto vzniklé diploidní buňky pak mohou být udržovány v laboratoři, nebo mohou vstoupit do meiózy a sporulovat. V haploidním stavu má *S. cerevisiae* 16 chromozómů. [13]

Oproti bakteriálním expresním systémům má *S. cerevisiae* schopnost post-translačních modifikací a sekreci produkovaných proteinů do kultivačního média. Díky těmto vlastnostem klesá cena za purifikaci proteinů a jejich následnou modifikaci. *S. cerevisiae* je tolerantnější k nižším hodnotám pH a vyššímu obsahu cukru. Také odolává vyššímu osmotickému tlaku a obsahu ethanolu. Tento fakt je výhodný pro průmyslovou fermentaci. [9]

Produkce rekombinantních proteinů v systému *S. cerevisiae* má navzdory svým výhodám i jistá omezení. Jedním z nich je hyperglykosylace proteinů, kdy na N-konec produkovaného proteinu může být navázáno vazbou  $\alpha 1,3$  až 150 manózových jednotek. Takto

hyperglykosylované proteiny mají imunogenní potenciál. Z tohoto hlediska se přistoupilo k hledání a využívání jiných kmenů. Jedním z kmenů, u kterých nebyl pozorován výskyt imunogenní sekvence manózových jednotek, je *Pichia pastoris*. U tohoto kmenu je imunogenní vazba  $\alpha$ 1,3 nahrazena neimunogenní vazbou  $\alpha$ 1,2. Hyperglykosylace se však též vyskytuje i u *P. pastoris*. Nevýhodou produkce hyperglykosylovaných proteinů může být ztráta aktivity daného proteinu. Dalšími nevýhodami jsou nízké výtěžky u některých proteinů a fakt, že *S. cerevisiae* tvoří ethanol, který během růstu rychle dosahuje toxické hladiny a tím inhibuje její růst. [3,6,14]

Použité vektory pro transformaci *S. cerevisiae* jsou hybridy mezi sekvencemi odvozenými od kvasinek a bakterií. Z bakteriálních sekvencí jsou to ori místo a ampicilinová rezistence pro namnožení vektoru v *E. coli*. Z kvasinkových sekvencí jsou to další selekční markery jako *LEU2* (gen pro  $\beta$ -isopropylmalát-dehydrogenázu), nebo *URA3* (gen pro orotidin 5'-dekarboxylázu). Většina používaných vektorů vychází z plazmidu YEp, vyskytujících se v buňkách obvykle ve 30 kopiích nebo více díky autonomní replikaci. Takováto replikace je možná prostřednictvím sekvencí pocházejících z přirozeného kvasinkového plazmidu 2  $\mu$ m. Jsou to sekvence *ARS* (autosomal replication sequence) a sekvence z *STB* lokusu. Oproti tomu vektory typu YIp neobsahují *ARS* sekvenci. Proto jsou namísto množení integrovány do kvasinkového genomu. Tyto vektory jsou stabilní, avšak se vyskytují v nízkém počtu kopií. [6]

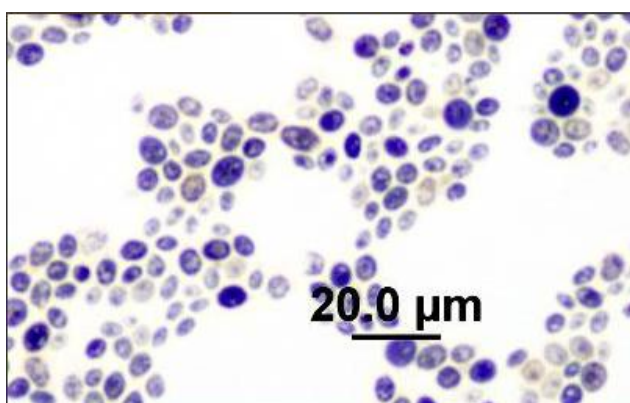
Proteiny, které *S. cerevisiae* produkuje, mohou být skladovány uvnitř buněk v podobě proteinů solubilních v cytoplasmě, nebo mohou být transportovány mimo buňku. Proteiny, které jsou sekretovány ven z buněk musejí obsahovat sekreční signál, pomocí něhož se dostanou do sekreční dráhy. Aby k tomuto došlo, je před gen zájmu vložena tzv. prepro-sekvence. Pre-sekvence neboli signální peptid vede produkovaný protein do endoplazmatického retikula a pro-sekvence je navržena tak, aby zvyšovala rozpustnost produkovaného proteinu a vyšší účinnost výměny proteinu v mezi-organelovém transportu. Tyto sekvence mohou být v podobě nativního signálního peptidu, heterologního sekrečního peptidu či nově designované, vyrobené a vložené pomocí nástrojů genetické manipulace před sekvencí proteinu, který chceme produkovat. Mezi nativní sekvence patří prepro-sekvence MF $\alpha$ 1 (Mating factor  $\alpha$  1). Ta bývá nejčastěji používána pro sekreci proteinu do média nejen v systému *S. cerevisiae*, ale i ostatních kvasinkách. Mezi uměle vytvořené patří YAP3-TA57. Ta se používá pro sekreci prekurzorů inzulínu. [6,9]

Obecně je možné mezi signální sekvenci a sekvenci pro produkovaný protein umístit další sekvenci, která je rozpoznávána určitou proteázou. To slouží k tomu, aby byl protein zbaven sekrečního signálu. Nejčastěji to bývají sekvence, které rozpoznávají proteázy Kex2, TEV, trombin a další. [8,10]

Sekrece heterologních proteinů však bývá často narušena, například glykosylací signální sekvence. To může být zmírněno použitím mutantních kmenů, které mají vliv na jednotlivé stupně syntézy proteinů a sekreci, nebo zlepšení kvality proteinů. Druhou možností je současná exprese genů sekreční dráhy jako *SSO1*, *PDII*, *CMK2*, nebo *CNE1*. [6,9]

Nejčastěji používanými promotory v expresním systému *S. cerevisiae* jsou konstitutivní promotory PGK1 a ADH1. Dále také promotory CUP1 a GAL1. Promotor PGK1 pochází z genu, který kóduje fosfoglycerát kinázu. Je to jeden z nejsilnějších a nejúčinnějších promotorů této kvasinky. Promotor GAL1 pochází od stejnojmenného genu. Tento gen je nejvíce transkribovaný v přítomnosti galaktózy, a to díky Gal4 aktivátoru vázající se na jeho promotor, naopak je suprimován v přítomnosti glukózy. Tento gen kóduje galaktokinázu, která fosforyluje galaktózu. Pro využití GAL promotoru je zapotřebí využívat mutantní kmen *S. cerevisiae*, který postrádá gen *GALI*. Poté je produkce proteinu spuštěna galaktózou, která ovlivňuje jen promotor a není spotřebována kvasinkou. CUP1 je promotor indukovatelný přidávkem mědi do média. Je také hojně používán i v jiných expresních systémech, než je *S. cerevisiae*. Promotor TEF1 může řídit expresi, jak za podmínek, kdy je vysoký obsah glukózy v médiu, tak i nízký. Další takový promotor je i TPI1, který vychází se stejnojmenného genu, jež kóduje trioza-fosfát-izomerázu. Promotor ADH pochází z genu pro alkohol-dehydrogenázu. POH5 promotor je spouštěn, když je z média vyčerpán fosfát. [7,9,10,15]

**Obrázek 1: *S. cerevisiae* obarvená podle Grama** obrázek převzat z: [40]





## 1.4 *Kluyveromyces lactis*

Je pučící kvasinkou patřící do askomycét. Má heterothalický způsob rozmnožování. Tato kvasinka roste v rozmezí teplot 25-35°C. Její kolonie mají narůžovělou krémovou barvu díky pigmentu pulcherriminu, který produkují. Původně byla označována jako *Saccharomyces lactis*, a to díky genetické podobnosti s *S. cerevisiae*. Avšak se tyto druhy fyziologicky výrazně liší. Výrazným odlišujícím znakem je, že může používat laktózu jako jediný zdroj uhlíku. Jako další zdroje uhlíku může využívat širokou škálu substrátů jako galaktózu, rafinózu a maltózu. Podobně jako u *S. cerevisiae* tak i u *K. lactis* byl osekvenován celý její genom. [6,10]

Tato kvasinka byla pojmenována po nizozemském mikrobiologovi na jeho počest. Tento rod pod sebou skrývá 6 druhů. Z hlediska biotechnologií je krom *K. lactis* velmi významným druhem i *K. marxianus*. Geneticky identické jsou však jen z 20%. Tyto dva druhy jakožto jediné ze svého rodu umí utilizovat xylózu, xylitol, celobiósu, arabinózu a laktózu jak v tekutých, tak tuhých médiích. *K. lactis* je možné pěstovat i na syrovátce, která je velmi levná a snadno dostupná, jelikož se jedná o odpadní produkt mlékárenského průmyslu. *K. lactis* existuje ve dvou druzích, a to *K. lactis* var *lactis*, který je domestikovaný a *K. lactis* var *drosophilarum*, jež je divokého typu. Rozdíl mezi nimi je ten, že divoká forma má umlčeny geny *LAC4* a *LAC12*. Gen *LAC4* kóduje enzym  $\beta$ -galaktosidázu a *LAC12* kóduje permeázu. Na základě toho není divoká forma schopna utilizovat laktózu. [16,17]

*K. lactis* má potenciál exprimovat velké proteiny, což se ukázalo na produkci lidského sérového albuminu. Proto je hojně využívána ve farmaceutickém průmyslu. Pomocí ní je získáván interleukin 1- $\beta$ , interferon- $\alpha$ , M-CSF, také prekurzory inzulinu a různé protilátky. [10]

Je jednou z nejdůležitějších kvasinek pro výzkum a pro průmyslovou biotechnologii. Od roku 1991 bylo v tomto expresním systému produkováno téměř 100 rekombinantních proteinů. *K. lactis* obdobně jako *S. cerevisiae* nese status GRAS. Je využívána hlavně v biotechnologickém průmyslu pro průmyslovou produkci proteinů. [10]

První pokus s *K. lactis* jako expresním systémem byl proveden na začátku roku 1980. Byly zde použity vektory, které nesly selekční gen  $Km^R$  a sekvenci *ARS* odvozenou od *S. cerevisiae*. Vektor může být v kvasince uchováván jako episomální anebo může být začleněn do genomu. Nejčastěji se začleňuje mezi promotor a terminátor genu *LAC4*, který je hojně produkován, pokud je kvasinka pěstována na médiu s laktózou. [6]

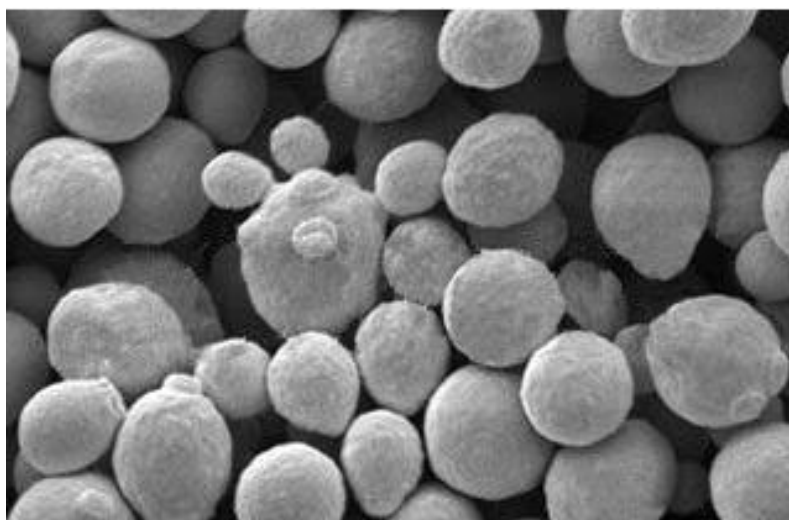
Při růstu na substrátech obsahujících laktózu jako jediný zdroj uhlíku, získává *K. lactis* laktózu z média pomocí permeázy, která je kódována genem *LAC12*. Metabolizaci laktózy zprostředkovává enzym  $\beta$ -galaktosidáza, která je kódována *LAC4* a přeměňuje laktózu na galaktózu a glukózu. [6]

Episomální vektory pro *K. lactis* jsou odvozeny z přirozených plazmidů. Vektory pGL1 a pGL2 jsou odvozeny od plazmidů stejného jména. Tyto plazmidy kódují hetero trimerní endotoxin. Jsou to dsDNA plazmidy a v buňce se vyskytují v počtu 100 až 200 kopií. Oproti nim je vektor pKD1 a jeho deriváty, který je nejčastěji používán, podobný plazmidu 2  $\mu$ m pocházejícího z *S. cerevisiae*. Tento plazmid byl získán z divoké formy *K. lactis* var *drosophilorum* a byl použit pro první produkci heterologních proteinů. Kupříkladu pomocí něj byl produkován lidský interleukin 1- $\beta$  nebo lidský lysozym. [10,18]

Integrační vektory. Nejčastěji používaným vektorem toho typu v *K. lactis* je vektor pKLAC2. Tento vektor je před integrací linearizován restrikcí endonukleázou SacII. Obsahuje ori místo a také sekvenci pro ampicilinovou rezistenci. To je důležité pro namnožení vektoru v *E. coli*. Vektor vychází z varianty *LAC4*. Obsahuje mutovanou PBI (Pribnow box-like) sekvenci, dále prepro-sekvenci z  $\alpha$ -mating faktoru *K. lactis* a transkripční promotor *LAC4* a terminátor taktéž z *K. lactis*. Jako selekční marker je zde sekvence kódující acetamidázu z *Asporgillus nidulans*, která je řízena *ADHI* promotorem z *S. cerevisiae*. [10,18]

Nejčastěji používaným promotorem pro expresi v *K. lactis* je promotor *LAC4*. Je velmi oblíbený z toho důvodu, že s jeho pomocí je dosahováno vysokých výtěžků a také odděluje růstovou fázi od expresní. Tento promotor se dá využít jak pro indukibilní, tak pro konstitutivní expresi heterologních proteinů. Je indukován přítomností laktózy nebo galaktózy. V této kvasince jsou používány i promotory z jiných kvasinek, a to nejčastěji ty pocházející z *S. cerevisiae*. Jsou to promotory PGK1 a POH5, které byly použity při produkci interleukinu 1- $\beta$  (*Kluyveromyces lactis*). Další významný promotor, který je využíván i v jiných expresních systémech, je promotor genu *PDC1*. Tento promotor je indukován při nižší tenzi kyslíku. Toho je snadno dosahováno v bioreaktorech. [7]

**Obrázek 2: *Kluyveromyces lactis*.** Obrázek převzat z:[19]



### **1.5 *Pichia pastoris***

Je dnes nejpoužívanější kvasinkou pro produkci rekombinantních proteinů. Zachovává výhody exprese v *S. cerevisiae*, ale má vyšší výtěžky. Téměř 17% všech produkovaných rekombinantních proteinů bylo v roce 2009 produkováno právě v tomto expresním systému. Tato kvasinka je používána především pro výrobu léčiv a průmyslových enzymů. Všechny kmeny *P. pastoris*, které jsou v současnosti používány jako expresní, jsou odvozeny od kmene NRRL-Y11430. To je kmen s genotypem divokého typu. [3,4,6,20,21,22]

*P. pastoris* patří mezi methylotrofní kvasinky, jako *Hansenula*, *Candida* a *Torulopsis*. To znamená, že má schopnost využívat methanol jako jediný zdroj energie a uhlíku. Pokud tato kvasinka není donucena k pohlavnímu rozmnožování tak je haploidní. Klíčové enzymy pro růst těchto kvasinek v prostředí alkoholu jsou alkohol oxidáza (AOX), formiát dehydrogenáza a dihydroxyaceton syntáza. Utilizace methanolu začíná v peroxizómech, kdy alkohol oxidáza oxiduje methanol na formaldehyd a peroxid vodíku. Peroxid vodíku je následně katalázou rozložen na vodu a kyslík. Část formaldehydu je oxidací přeměněna na oxid uhličitý. Zbytek formaldehydu je pomocí dihydroxyaceton syntázy přeměněn na dihydroxyaceton a glyceraldehyd-3-fosfát. [3,4,6,20,21,22]

Expresí těchto enzymů je závislá na druhu zdroje uhlíku v médiu. Pokud je přítomen jiný zdroj než methanol, tak dochází ke snížení exprese těchto enzymů a například glukóza expresi těchto genů přímo potlačuje. *P. pastoris* obsahuje dva takové geny *AOX1* a *AOX2*. Jejich sekvence jsou z 92% homologní, avšak *AOX1* gen je zodpovědný za převážnou aktivitu alkohol oxidázy v buňce. Zastoupení tohoto enzymu v buňce může být až 30% ze všech proteinů co buňka obsahuje. Promotor tohoto genu se používá pro spouštění exprese

rekombinantních proteinů tím, že je přidán substrát do média, který vyvolá expresi tohoto genu. Promotory, které nesouvisí s tímto metabolickým pochodem, jsou také používány. Zde je to GAP1 promotor. Ten pochází od genu, který kóduje glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenázu. Pokud chceme pro expresi využívat právě AOX1 promotor je nutné, aby kmen *P. pastoris* měl ve svém genomu deletovaný gen pro *AOX1*. [3,4,6,20,21,22]

K výhodám této kvasinky patří rychlost jejího růstu, tendence k respiračnímu růstu a také schopnost růst ve vysokých hustotách. Oproti ostatním expresním systémům má značně vyšší výtěžky, jak je vidět v tabulce 1. Při použití vhodného expresního vektoru je schopna sekretovat produkované proteiny do média. Do média exprimuje jen málo vlastních proteinů. Pokud je tedy použit vektor pro extracelulární expresi, je většina proteinů v médiu zastoupena námi chtěným proteinem, což výrazně zlevňuje a zjednodušuje purifikaci takovýchto proteinů. V rámci post-translačních modifikací je *P. pastoris* schopna jak N- tak O-glykosylace. Při glykosylacích jsou manóзовé zbytky vázány neimunogenní vazbou  $\alpha$ 1,2 jak již bylo zmíněno dříve. *P. pastoris* dokáže tvořit disulfidické vazby v proteinech a též je skládat do nativního uspořádání. [20,21,22,23]

Nejčastěji používanými vektory jsou pPIC3K a pPIC9K. Ve většině případů se používá začlenění linearizovaného vektoru do genomu *P. pastoris*. Tyto vektory jsou přesně cílené na určitá místa v genomu. Nejčastěji bývají využity *AOX1* a *HIS4* geny nebo rDNA, kam se vektory inkorporují. Oproti použití epizomálního vektoru to má výhodu v genetické stabilitě, kdy nedochází ke ztrátě vektoru a odpadá tak i nutnost použití selekčních médií s antibiotiky. Požadovaný vektor obsahující chtěný gen je nejprve namnožen v *E. coli*, izolován, poté linearizován a zaveden do *P. pastoris*. Začlenění vektoru do genomu se může dít dvěma způsoby, a to genovou inzercí nebo nahrazením současného genu. Začlenění pomocí inzerce vede k několika násobnému vložení, což je pro produkci výhodnější. [20,22]

Promotory pocházející z této kvasinky jsou promotory AOX1 a GAP. AOX1 promotor je nejčastěji používán a je indukován v přítomnosti methanolu a suprimován v přítomnosti glukózy. Při použití GAP promotoru odpadá nutnost použití methanolu pro indukci a také nemusí být měněn zdroj uhlíku v médiu. Tento promotor je indukovatelný přidávkou glukózy. Síla tohoto promotoru je srovnatelná s promotorem AOX1. Další promotor, který lze použít, je FLD1. Ten pochází z genu kódujícího glutathion dependentní formaldehyd dehydrogenázu. Tento enzym je nezbytný pro metabolismus některých methylovaných aminů, které slouží jako zdroje dusíku a methanolu jako zdroje uhlíku. Při použití tohoto promotoru můžeme pro indukci použít methanol jako jediný zdroj uhlíku a síran amonný jako zdroj

dusíku, nebo methylamin jako zdroj dusíku a glukózu jako zdroj uhlíku. Poskytuje také vysoké hladiny exprese. Signální sekvence využívané ve vektorech *P. pastoris* jsou *POHI* a MF $\alpha$ 1 faktor z *S. cerevisiae*. *POHI* pochází z genu kódujícího kyselou fosfatázu v *P. pastoris*. [20,21]

**Tabulka 2: Množství produkovaných proteinů v hostitelských kmenech. Převzato z [24]**

Recombinant hosts	mg/L
BHK cells	0.05
Insect cells	0.40
<i>Streptomyces lividans</i>	0.25–0.5
<i>Escherichia coli</i>	200–300
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40–500
<i>Hansenula polymorpha</i>	1500
<i>Pichia pastoris</i>	1500

## 2 AMELOBLASTIN (SHEATHLIN)

Ameloblastin je protein produkovaný ameloblasty. Ameloblast je buňka epitelového původu vyskytující se na lamina dentalis a účastní se tvorby zubní skloviny. Ameloblasty během vývoje zubní skloviny produkují krom ameloblastinu i další proteiny extracelulární matrix, a to enamelin a amelogenin. Jedná se o bipolární extracelulární matrix protein patřící do skupiny vnitřně nestruturovaných proteinů, který hraje klíčovou roli v procesu biomineralizace zubní skloviny. Je to tkáňově specifický adhezí glykoprotein, jehož exprese je nejvyšší během sekreční fáze ameloblastů a klesá během maturační fáze. Je to nejhojněji zastoupený protein nonamelogeninového typu v matrix zubní skloviny. Matrix zubní skloviny je tvořena z 90% amelogeninem a zbylých 10% připadá na nonamelogeninové proteiny. Jeho podíl na sklovinové matrix činí až 5%. [12,14,25,26,27]

Má značný vliv na ameloblasty a osteoblasty tím, že řídí jejich proliferaci a diferenciaci. Osteoblasty jsou aktivní kostní buňky, které tvoří základní kostní hmotu takzvaný osteoid, který je tvořen z 90% kolagenu typu I. K řízení proliferace vlivem ameloblastinu dochází tak, že se molekula naváže na povrch cílové buňky. Tím zabrání buňce v proliferaci a udržuje ji tak v sekreční fázi. Během sekreční fáze produkují ameloblasty velké množství proteinů do extracelulárního prostoru. Při tvorbě skloviny jsou využívány vazebné možnosti ameloblastinu protein-protein a protein-buňka. [12,14,25,26,27]

Ameloblastin je dobře konzervován mezi živočišnými druhy a je neustále přítomen po celou dobu evoluce a vývoje mineralizace tkání. Lidský ameloblastin je také podobný s prasečím z 66%, krysím z 61% a myším z 58%. [12,14,25,26,27]

### 2.1 Gen *AMBN*

Lidský ameloblastin je kódován genem *AMBN*. Gen *AMBN* byl poprvé sekvenován a klonován v roce 1995, a to z myši během vývoje jejich zubů, kdy byla vyizolována mRNA kódující myši ameloblastin. Lidský gen *AMBN* má délku 19541 párů bazí a skládá se ze 13 exonů (45-1101 bp) a 12 intronů (105-2300 bp). Nachází se na dlouhém raménku 4. chromozomu. Konkrétně je to pozice 4q13.3. Obklopují ho geny *ENAM*, jehož produktem je protein enamelin, a *AMTN*, který kóduje protein amelotin. Produktem genu *AMBN* je protein, který je tvořen 447 aminokyselinami. [14,28,29,30,31,32]

### 2.2 Primární struktura ameloblastinu a jeho vlastnosti

Predikovaný produkt genu *AMBN* je kyselý s pI 4,54 a vypočtenou hmotností 45,3 kDa, bez signálního peptidu. Samotný řetězec ameloblastinu začíná od 27. aminokyseliny,

prvních 26 aminokyselin je signální peptid. V rámci post-translačních modifikací dochází v řetězci ameloblastinu ke glykosylaci na 112. aminokyselině serinu. Dále je 37. aminokyselina změněna hydroxylací z prolinu na hydroxyprolin a 43. aminokyselina je změněna fosforylací serinu na fosfoserin. Známý jsou 2 isoformy ameloblastinu. Je to dáno alternativním sestřihem mRNA. Isoforma 2 je složena ze 432 aminokyselin, a to je dáno tím, že oproti isoformě 1 zde chybí 15 aminokyselin, a to od pozice 99. až 113. Jedná se o sekvenci YEYSLPVHPPPLPSQ. [26,28,29,30,32]

Procentuální zastoupení aminokyselin, které se v řetězci vyskytují nejvíce, je 15,2 % prolinu, 10,2 % leucinu a 9 % glycinu. Protein se při separaci pomocí SDS-PAGE projevuje jako proužek o molekulové hmotnosti 60-75 kDa. Navzdory velké podobnosti s ameloblastinem prasat, myši a krys se lidský ameloblastin odlišuje unikátní sekvencí 26 aminokyselin, které u výše zmíněných druhů nejsou přítomné. Jedná se o sekvenci SLPGMDFPDPQGPSLPLGLDFADPQGS začínající serinem na pozici 164 a končící serinem na pozici 189. [26,28,29,30,32]

### **2.3 Sekundární struktura ameloblastinu**

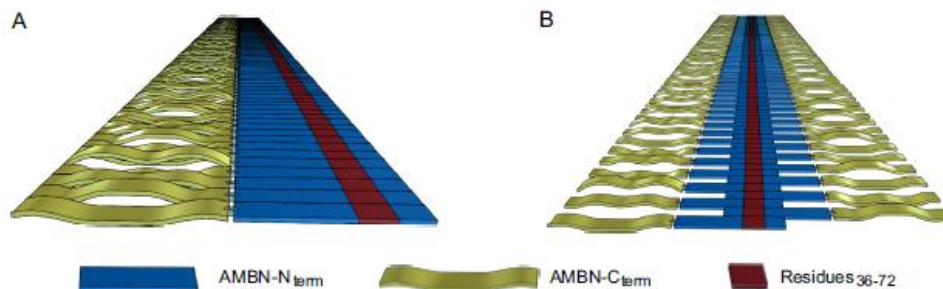
Ameloblastin patří mezi vnitřně nestrukturované proteiny. Je obecně tvořen N- a C-koncovou částí, která je spojená středním úsekem, jež je snadno štěpen proteinázami. N-koncová část má sklon zaujímat tvar helixu, kdežto C-koncová část společně se střední částí naopak zapřičiňuje nestrukturovanou povahu ameloblastinu. [12,14,25,26,27]

Ameloblastin se sám organizuje do supramolekulární struktury, která je podobná stuze. Šířka této stuhy je v průměru 18 nm a tloušťka 0,34 nm. Tyto stuhy bývají dlouhé desítky až stovky nm. V N-koncové části byla predikována jediná konformace  $\alpha$ -helixu. Ve zbytku molekuly, převážně však v oblasti C-koncové části, bylo predikováno okolo 7 skládaných  $\beta$ -listů různé délky. [12,14,25,26,27]

N-koncová část ameloblastinu, která je kódována exonem 5, obsahuje 2 krátké nestrukturované regiony. Převážně na N-konci jsou pak obsaženy motivy bohaté na prolin, které by mohly být důležité pro signalizační aktivitu ameloblastinu. [12,14,25,26,27]

**Obrázek 3: Možné uspořádání ameloblastinových monomerů v supramolekulárních strukturách.** Obrázek převzat z: [27]

A. Paralelní uspořádání monomerů. B. Antiparalelní uspořádání.



## 2.4 Funkce ameloblastinu

Nestrukturovanost dává ameloblastinu mnoho funkčních výhod a může se tak zapojit do mnoha procesů během tvorby zubní skloviny. Mezi ně patří tvorba scaffoldu pro krystaly hydroxyapatitu během mineralizace, přemostění vzdáleností mezi hydroxyapatitovými krystaly a ukotvení buněk a jejich stabilizace během tvorby zubní skloviny. [12,14,25,26,27]

V posledních studiích se ukázalo, že ameloblastin může mít roli i jako signální molekula a také mít funkci růstového faktoru. Napovídá tomu i jeho struktura, která je podobná strukturám známých signálních molekul. Dále bylo prokázáno, že ameloblastin interaguje s povrchovou molekulou CD63. Funkce podobná růstovému faktoru byla prokázána v buňkách periodontálního vaziv. Obsahuje ve své struktuře několik heparin vazajících domén. Dále také interakční místa pro fibronektin a buněčný adhezivní motiv pro trombospodin, který může být zodpovědný za vazbu ameloblastinu k povrchu epitelálních dentálních buněk. [12,14,25,26,27]

Vliv ameloblastinu na proliferaci buněk závisí na typu buněk, a dle něho se tak i mění. Kupříkladu ameloblastin vykazuje inhibiční účinek na proliferaci epitelových buněk *in vitro*, a to tím způsobem, že ovlivňuje buněčný cyklus a buňky ustanou v G1 fázi. Naproti tomu jiné studie poukázali na to, že ameloblastin stimuluje proliferaci buněk periodontálního ligamentu. [33]

Mezi další vlastnosti ameloblastinu jako proteinu extracelulární matrix patří schopnost řízení aktivity Src-kinázy a diferenciaci osteoblastů prostřednictvím vazby na molekulu CD63. Dále má také vazbu k ostatním buňkám, nebo matrix zubní skloviny, a to přes vazebná místa pro fibronektin a heparin, která obsahuje. Zapojuje se též do mineralizace zubní



skloviny díky vazebným doménám pro vápník, které jsou situovány na C-konci molekuly. [32]

Vazebná doména lidského ameloblastinu pro vápník počíná tyrosinem 217 a končí argininem 230. Vazebná doména pro heparin se u lidského ameloblastinu vyskytuje taktéž na C-konci molekuly, a to konkrétně v místech počínajících glutaminem 174 a končí glycinem 299. Vazebná doména pro CD63 je rozsáhlá a nachází v několika oddělených částech řetězce ameloblastinu taktéž na C-konci. [32]

## 2.5 Štěpení ameloblastinu proteinázami

Celý nenaštěpený ameloblastin nebyl doposud *in vivo* izolován, a to díky faktu, že je během procesu biomineralizace zubní skloviny štěpen proteinázami. A to konkrétně metaloproteinázou-20 (MMP-20) a kalikreinem-4 (KLK4). Tyto proteinázy jsou stejně jako ameloblastin exprimovány ameloblasty. MMP-20 je exprimována během sekreční a časné maturační fáze ameloblastů. Během maturační fáze prochází ameloblasty změnami jak funkčními, tak morfologickými a zubní sklovina dosahuje požadované šířky. Oproti tomu KLK4 je exprimována při přechodu sekreční fáze do fáze maturační a její sekrece pokračuje po celou dobu maturační fáze ameloblastů. [25,26]

Při štěpení ameloblastinu se oddělí C-koncová a N-koncová část a vzniká řada štěpných produktů. *In vivo* je ameloblastin štěpen MMP-20 za Asn31, Gln130, Arg170, Ala222, Gly300, Arg319 a Ala342. Při porovnání *in vivo* a *in vitro* štěpných míst se zjistilo, že *in vitro* štěpná místa jsou shodná s těmi *in vivo* pouze ve třech bodech, a to Gln130, Arg170, Ala222. Produkty štěpení se poté ukládají v různých částech vyvíjející se zubní skloviny. [25,26]

Produkty štěpení pocházející z N-koncové části jsou stabilní a zahrnují úseky o velikostech 17 kDa, 15 kDa a 13 kDa. Tyto produkty štěpení se poté vyskytují v plášťovém prostoru skloviny u přechodu prizmatické a aprizmatické skloviny. Produkty štěpení z C-koncové části zahrnují úseky obsahující doménu vázající vápník. Tyto produkty mají velikosti 27 a 29 kDa. Mají však kyselou povahu a jsou z větší části degradovány. Jejich krátkodobý výskyt je situován v blízkosti sekretujících ameloblastů a v méně zralých oblastech zubní skloviny jako je její povrch, kde se koncentrují a vytváří tyče. [12,14,25,26,27]

## 2.6 Ameloblastin a vývoj kostí

Ukázalo se, že je ameloblastin také sekretován osteoblasty a cementoblasty. Načež bylo nedávno prokázáno, že se ameloblastin podílí na reparacích a vývoji kostí, a že je také přítomen již během embryogeneze v raných počátcích kostí a extracelulární matrix chrupavek. Původně se myslelo, že je ameloblastin exprimován pouze ameloblasty, ale studie s využitím RT-PCR ukázaly přítomnost mRNA ameloblastinu v lidských mezenchymálních kmenových buňkách, primárních osteoblastech, chondrocytech, již zmíněných osteoklastech a cementoblastech, a také v buňkách nesoucích znak CD34. Tyto buňky nesoucí povrchový znak CD34 jsou hematopoetické a mohou se diferencovat i do osteoblastu a prekurzorů osteoklastů. To naznačuje, že ameloblastin společně s dalšími proteiny hraje důležitou roli nejen při tvorbě zubní skloviny, ale také při vývoji a reparaci kostí. Exprese ameloblastinu byla též zjištěna v raných odontoblastech při reparacích dentinu spuštěných traumatickou změnou a také v buňkách podobným osteoblastům, při raných fázích tvorby kostní tkáně. Ameloblastin je exprimován během pokračujícího vývoje, růstu a remodelačních procesů kostí. Ke konci těchto procesů jeho exprese klesá a ve zralé kosti již není detekovatelný. Jak *in vitro*, tak *in vivo*, a to na myších modelech bylo potvrzeno, že ameloblastin indukuje regeneraci tvrdých tkání, a to tím mechanismem, že v místě reparační ovlivňuje růst a diferenciaci mezenchymálních buněk. Nicméně role ameloblastinu v procesech tvorby a opravy kostí není zcela známá. Nelze tedy vyloučit, že defekty v genu kódujícím ameloblastin, mají spojitost s dědičnými onemocněními kostí, jako je tomu například amelogenesis imperfecta. [34]

Ukázalo se, že ameloblastin také reguluje míru exprese transkripčního faktoru Msx2. Tímto způsobem ameloblastin ovlivňuje růst a vývoj craniofaciálních kostí a lebečních švů. Msx2 je protein, který reguluje aktivitu genů, jež jsou zodpovědné za růst a dělení buněk, diferenciaci a přežívání buněk. Je součástí BMP (bone morphogenic protein pathway) signalizační dráhy a je důležitý pro vývoj lebečních kostí. Přítomnost ameloblastinu byla v myších modelech prokázána v lebečních kostech a tvrdé plně mozkové jak metodou RT-PCR tak i Westernblot a také imunochemicky. Míra exprese ameloblastinu v těchto kostech je však nižší v porovnání s vyvíjející se zubní sklovinou. To naznačuje, že ameloblastin neřídí vývoj kostí stejně jako je tomu u zubní skloviny, kde přímo reguluje růst krystalů, nýbrž nepřímo, jako signální molekula působící na expresi transkripčních faktorů a signální dráhy extracelulární matrix. To potvrdily i studie, při nichž měla rozdílná koncentrace ameloblastinu vliv na chování buněk, včetně proliferace a mineralizace. Při pokusech na transgenních

myších byl použit lidský promotor Keratin 14 pro overexpresi ameloblastinu v osteoblastech lebečních kostí a mezenchymálních buněk lebečních švů. U těchto myší byly poté pozorovány poruchy vývoje lebečních kostí a lebečních švů, a to v podobě ztenčení kostí s opožděným nebo neuzavřením lebečních švů. To je způsobeno snížením proliferace mezenchymálních buněk lebečních švů, snížením hladiny proliferačního markeru cyklinu D1 a snížením hladiny transkripčního faktoru Msx2. Je to dáno tím, že nadměrná exprese ameloblastinu má inhibiční vliv na buňky. Tyto inhibiční vlastnosti jsou způsobeny zvýšením hladiny inhibitorů buněčné proliferace, jakými jsou proteiny p21 a p27. [35,36]

## 2.7 Vývoj zubů

Vývoj zubní skloviny je regulován sekvenční a reciproční interakcí mezi mezenchymem odvozeným z neurálního hřebene a orálním ektodermem. Bazální membrána mezi mezenchymálními a epiteliálními buňkami hraje klíčovou roli v indukci a udržení odlišných buněčných fenotypů. Tato bazální membrána je složena z lamininu, kolagenu typu IV, perlekanu a nidogenu. Zubní sklovinu vytvářejí ameloblasty, které jsou odvozené z buněk zubního epitelu. Ameloblasty během svého života procházejí několika stádii. Podle těchto stádií je rozdělen i proces amelogeneze. Jsou to stádia presekreční, sekreční a maturační stádium. [12,37,38]

Během presekrečního vznikají ze zubního epitelu preameloblasty a z mezenchymálních buněk preodontoblasty. Dále v tomto stádiu zaniká bazální membrána oddělující preameloblasty a preodontoblasty. Zaniklá bazální membrána je nahrazena matrix zubní skloviny. Preameloblasty se polarizují a připravují se na sekreční fázi. [12,37,38]

V sekreční fázi se preameloblasty diferencují v zralé ameloblasty. Ameloblasty pak produkují proteiny zubní skloviny. Nejvíce zastoupeným produktem ameloblastů je amelogenin, který je i nejdůležitější pro tvorbu zubní skloviny. Další produkty jsou ameloblastin a enamelin. Enamelin je největší z těchto proteinů. Vlivem produkce ameloblastů roste tloušťka sklovinové matrix a začíná docházet k částečné mineralizaci, kdy produkované proteiny slouží jako scaffold pro krystaly hydroxyapatitu. [12,37,38]

V maturační fázi dochází k mineralizaci sklovinové matrix a tvorbě zubní skloviny. Proteiny zubní matrix jsou štěpeny MMP-20 a KLK-4 proteinázami. Ameloblasty sekretují do sklovinové matrix značné množství vápenatých a fosfátových iontů, čímž napomáhají mineralizaci. [12,37,38]

## 2.8 Produkce a zkoumání lidského ameloblastinu

K analýze struktury a funkcí lidského ameloblastinu bylo zapotřebí vyrobit tento protein. Prvními pokusy o charakterizaci lidského ameloblastinu, a tedy i jeho produkci zahájila skupina kolem Tomáše Walda. Tato skupina publikovala v roce 2011 článek v časopise *European Journal of Oral Sciences* s názvem *Biophysical characterization of recombinant human ameloblastin*, kde popisovali přípravu a analýzu tohoto proteinu. Prvně bylo nutné zvolit expresní systém. Tím se stala bakterie *E. coli* BL21 ( $\lambda$ DE3), která byla transformována vektorem pET28b obsahující gen pro ameloblastin. O dva roky později tato skupina vyvinula metodu purifikace ameloblastinu, díky které získali protein o velké čistotě a také množství postačujícím pro strukturní analýzu tohoto proteinu a jeho mutantů. Produkce byla opět prováděna v expresním systému *E. coli* BL21 ( $\lambda$ DE3). [14,27]

## 3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

### 3.1 Cíl 1

Cílem diplomové práce byla příprava rekombinantního ameloblastinu divokého typu v expresním systému *E. coli* a jeho následná purifikace podle protokolu publikovaného v článku Wald et al. (2013), který byl obměněn.

### 3.2 Cíl 2

Dalším cílem diplomové práce byla amplifikace genu pro ameloblastin a jeho dvou mutantů *AMBN* c-terminální část a *AMBN*  $\Delta 5$  z vektorů pET28b-Trx-*AMBN*, pET28b-Trx-*AMBN*<sub>ct</sub>, pET28b-Trx-*AMBN* $\Delta 5$ , jejich následné překlonoání do vektoru pYEX-BX prostřednictvím In-Fusion cloning, exprese v kvasinkovém expresním systému a následná purifikace.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Chemikálie, přístrojové a další vybavení

#### 4.1.1 Chemikálie

2-merkaptoethanol

Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)

Agaróza (Sigma-Aldrich)

Ampicilin (Sigma-Aldrich)

Bromfenolová modř (Penta)

Comassie Brilliant Blue

Dithiotreitol (DTT)

Dodecylsírán sodný (SDS)

Dusičnan stříbrný

Ethylalkohol (Lach-ner, Česká republika)

Formaldehyd (Penta, Česká republika)

Fosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, USA)

Glycerol (Penta, Česká republika)

Glycin (Sigma-Aldrich, USA)

Hovězí sérový albumin (BSA)

Hydrogenfosforečnan draselný

Hydroxid sodný (Penta, Česká republika)

Chlorid amonný

Chlorid sodný (Lach-ner, Česká republika)

Kvasnicový extrakt (Fluka, Švýcarsko)

Imidazol

IPTG (Sigma-Aldrich, USA)

Kanamycin (Sigma-Aldrich)

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)

Kyselina fosforečná

Kyselina chlorovodíková (Penta, Česká republika)

Kyselina octová (Penta, Česká republika)

Mléko sušené  
Močovina (Lach-ner, Česká republika)  
Methylalkohol  
Peroxodisíran amonný (APS) (Sigma-Aldrich, USA)  
Ponceau S  
Síran nikelnatý hexahdrát  
Tetramethylethylenediamin (TEMED) (Sigma-Aldrich, USA)  
Thiaminhydrochlorid  
Thiosíran sodný  
Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (Sigma-Aldrich, USA)  
Triton 100X  
Uhličitan sodný (Sigma-Aldrich, USA)

#### **4.1.2 Přístroje**

analytické váhy (KERN)  
centrifuga (Hettich Mikro 20)  
centrifuga (Hermle Z383K)  
centrifuga (Sorvall LYNX 6000, Thermo Fisher Scientific)  
pH metr (FiveEasy Mettler Toledo)  
sonikátor (UP50H, Hielscher)  
inkubátor (Inculine, VWR)  
třepačka (Enviromental Shaker-Incubator ES-20/60, Biosan)  
vortex (Heidolph)  
spektrofotometr Nano-MD PDA UV-VIS Bio Spektrofotometr (Scinco)  
termocyklér pro PCR T-personal (Biometra)  
UV prohlížečka gelů (Vilber Lourmat)  
kamera (ChemiDoc™ MP System, BioRad)  
vortex (Heidolph)  
zdroj napětí pro elektroforézu bio rad powerpac 3000  
zdroj napětí pro elektroforézu (EC 250-90)  
mikrovlnná trouba (LG)  
blotovací zařízení (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio Rad)

termostat (SBH 200D)

#### **4.1.3 Použité sady**

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)

Zyppy™ Plasmid Minioreo Kit (ZYMO RESEARCH)

Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad)

#### **4.1.4 Ostatní materiál**

Jednorázový plastový laboratorní materiál (pipetovací špičky, mikrozkuhavky, rukavice, bakteriologické misky, zkuhavky, mikrotitrační destičky, L-hokejky)

Laboratorní sklo

Pipety (Eppendorf)

Elektroforérický set (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio Rad)

Dialyzační membrána (Por Biotech)

TEV proteáza (Tobacco Etch Virus proteáza)

PVDF (Polyvinyliden difluoridová) membrána (Milipore)

Ni-NTA (Nikl-Nitrilotrioctová kyselina) Agaróza (Qiagen)

Vektor pET28b-Trx-AMBN (Dar od Ing. Radima Osičky, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky)

Kanamycin sulfát (Sigma-Aldrich)

Protilátky primární: mice anti-His-Tag

Protilátky sekundární: anti mice IgG značené HRP

Proteinový standard (vlastní výroby UOCHAB)

#### **4.1.5 Použitý buněčný materiál**

Kompetentní buňky *E. coli* BL21 (DE3)

Kompetentní buňky *E. coli* DH5α

## **4.2 Pufry a roztoky**

### **4.2.1 Purifikace proteinů**

Promývací pufř I:

-50mM Tris (pH=7,4), 150mM NaCl, 5mM EDTA



TN-Promývací pufr II:

-50mM Tris (pH=7,4), 250mM NaCl, 2M močovina

TN-ekvilibrační pufr:

-50mM Tris, 250mM NaCl, 2M močovina, 5mM imidazol

TN-eluční pufr:

-50mM Tris, 250mM NaCl, 2M močovina, 600mM imidazol

#### **4.2.2 Práce s DNA**

Emerald Master Mix (TaKaRa)

PPP Master Mix (Top-Bio)

Marker 155-970 (Top-Bio)

Marker 1Kb Ladder (Sigma-Aldrich)

PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio)

Restrikční štěpení

EcoRI (TaKaRa)

10X H Buffer (TaKaRa)

BamHI (TaKaRa)

10X K Buffer (TaKaRa)

10X Loading Buffer (TaKaRa)

In-Fusion cloning

5X In-Fusion® HD Enzyme Premix

#### **4.2.3 Regenerace Ni-NTA**

Regenerační pufr

-6M Guanidin hydrochlorid, 0,2M kyselina octová

Promývání roztok

- 0,1M kyselina octová; 30% ethanol

Nabití kolony

-0,1M NiSO<sub>4</sub> nebo 0,1M NiCl<sub>2</sub>

#### **4.2.4 Agarózová elektroforéza**

10X TBE Buffer

-108 g Tris, 55 g kys. borité v 900 ml H<sub>2</sub>O, 8 ml 0,5M Na<sub>2</sub>EDTA (pH=8,0),

doplnit objem na 1 l

1X TBE Buffer

-10,8 g Tris, 5,5 g kys. borité v 900 ml H<sub>2</sub>O, 4 ml 0,5M Na<sub>2</sub>EDTA

(pH=8,0), doplnit objem na 1 l

Ethidium bromid 10 mg/ml (Top-Bio)

#### 4.2.5 SDS PAGE

SDS elektrodový pufr

-2 mM Tris, 192mM glycin, 0,1% SDS

SDS vzorkovací pufr

-0,5M Tris-HCl (pH=6,8), 80% glycerol, β-merkptoethanol, 10% SDS, 0,1%  
bromfenolová modř.

Roztok pro dělicí gel

-30% akrylamid/bisakrylamid mix, 1,5M Tris-HCl pH=8,8, 10% SDS, 10%  
peroxodisíran amonný, TEMED

Roztok pro zaostřovací gel

-30% akrylamid/ bisakrylamid mix, 1M Tris-HCl pH=6,8, 10% SDS, 10%  
peroxodisíran amonný, TEMED

#### 4.2.6 Silver stain

Roztok 1

-50% methanol, 12% kyselina octová, 0,5 ml 37% formaldehydu

Roztok 2/10

-50% methanol

Roztok 3

- Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> . 5 H<sub>2</sub>O 0,2 g/l

Roztok 5

- AgNO<sub>3</sub> 2 g/l, 0,75 ml 37% formaldehydu

Roztok 7

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 60 g, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> . 5 H<sub>2</sub>O 4 mg/l, 0,5 ml 37% formaldehydu

Roztok 9

-50% methanol, 12% kyselina octová

#### **4.2.7 Western blot**

Transférový pufr 10X

- Glycin 29,3 g, Tris 58,1 g, SDS 3,7 g a doplněno vodou na objem 1 litru

TBS pufr

- 20mM Tris/Cl (pH=7,5), 150mM NaCl

Blokovací pufr

- TBS pufr, 5% sušené odtučněné mléko, 0,1% Triton

Protilátkový pufr

- TBS pufr, 2% sušené odtučněné mléko, 0,1% Triton

Promývací pufr

- TBS pufr, 0,1% Triton

Substrátový roztok

- Super Signal Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad): 1,5 ml roztoku A a 1,5 ml roztoku B

0,5% Ponceau S

- 0,5% Ponceau S, 1 ml kyseliny octové, doplněno destilovanou vodou na objem 100 ml

#### **4.2.8 Dialýza**

Dialyzační pufr pro TEV proteázu

- 2M močovina, 150mM NaCl, 50mM Tris-Cl pH 8.0, 1mM DTT, 0.5mM EDTA

#### **4.2.9 Měření koncentrace proteinů**

Činidlo dle Bradfordové

- 70 mg Comasie Blue G250, 50ml 95% etanolu (UV), 100ml 85% kyseliny fosforečné, doplnit vodou (HPLC) na objem 1 l

#### **4.3 Média**

MDO médium

- Yeast extract 20g, Glycerol 20g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3g, NH<sub>4</sub>Cl 2g, NaSO<sub>4</sub> 0,5g, Thiaminhydrochlorid 0,01 g, doplněno H<sub>2</sub>O na 1000ml

LB (Luria-Bertani) médium

- 20 g LB média= trypton 10 g/l, kvasnicový extrakt 5 g/l, NaCl 5 g/l, doplněno H<sub>2</sub>O

na 1000 ml

LB agar s kanamycinem/ampicilinem

-50 mg/ml kanamycin/ampicilin

## 4.4 Metodika

### 4.4.1 Použité vektory

Vektory pro přípravu ameloblastinu wild-type (*AMBN* wt), c terminální části (*AMBN* c-term) a ameloblastinu bez exonu 5 (*AMBN* Δ5) byly poskytnuty Ing. Radimem Osičkou Ph.D. z mikrobiologického ústavu Akademie věd ČR. Vychází z plazmidu pET28b, do kterého byl vložen insert nesoucí gen zájmu pro jednotlivé typy ameloblastinu, který byl zbaven signálního peptidu a opatřen na obou koncích histidinovou kotvou (His-tag). N-konec byl opatřen dvojitou histidinovou kotvou s thioredoxinem (Trx) a za ně byla umístěna specifická sekvence pro TEV proteázu. C-konec byl opatřen jednou histidinovou kotvou. Pro pozdější odstranění histidinových kotev a thioredoxinu byly mezi ně a ameloblastin vloženy sekvence, které specificky štěpí TEV proteáza. Jsou to vektory pET28b-Trx-AMBN, pET28b-Trx-AMBN-Cterm a pET28b-Trx-AMBNΔ5

**Obrázek 4: Schéma konstruktů vložených do vektoru pET28b.** Převzato z [27]



Pro produkci ameloblastinu v expresním systému *Saccharomyces* nám byl poskytnut vektor pYEX-BX od firmy Clontech, obsahující gen pro acyl-CoA desaturázu lišaje *Manduca sexta* (lišaj tabákový) od Dr. Aleše Bučka. Vektor měl být zbaven genu pro desaturázu z lišaje a místo něj měl být vložen gen pro ameloblastin.

### 4.4.2 Exprese AMBN v *E. coli*

#### 4.4.2.1 Transformace buněk

Suspenze kompetentních buněk *E. coli* BL21 (DE3) byla vyjmuta z mrazáku, kde se buňky uchovávají při -80 °C, a vložena do termoboxu s ledem. Poté byly k buňkám přidány 2-3 μl vektoru pET28b-Trx-AMBN o koncentraci 214 ng/μl. Následovala 60 minutová inkubace buněk na ledu. Po inkubaci byly buňky vystaveny teplotnímu šoku při 42 °C po dobu 2 minut a opět umístěny na led. Následně byl k buněčné suspenzi přidán 1 ml sterilního

LB média a následovala 60 minutová inkubace v termostatu při 37°C. Po inkubaci bylo 120-140 µl této suspenze rozočkováno pomocí L-hokejky na Petriho misky s LB agarem a Kanamycinem o koncentraci 50 mg/l. Zaočkované misky byly umístěny do termostatu a kultivovány do druhého dne při 37°C.

#### **4.4.2.2 Exprese AMBN**

Druhý den byly narostlé kolonie použity k zaočkování tekutého media. 2-3 ml sterilního LB média byly nanесeny na misky a narostlé kolonie byly pomocí L-hokejky rozmíchány v LB médiu. Výsledná suspenze byla rozdělena do Erlenmayerových baněk s 200 ml MDO nebo LB média s Kanamycinem o koncentraci 50 mg/l. Následovala kultivace a růst buněk v třepačce při 37 °C do dosažení optické denzity 0,5 při 600 nm (OD600). Poté byl přidán 1M IPTG pro spuštění produkce proteinu. IPTG bylo přidáno tolik, aby v médiu byla dosažena koncentrace 0,1 mM. Poté následovala inkubace 4 hodiny při 37°C. Po inkubaci byla buněčná suspenze zcentrifugována při 4500 g po dobu 10 minut. Po odstranění supernatantu byla buněčná suspenze uchována v mrazáku při -20°C.

#### **4.4.2.3 Dezintegrace buněk**

Získané buňky byly vyjmuty z mrazáku, 2x promyty promývacím pufrem I (25 ml na jednu kyvetu) a centrifugovány 4500 g po dobu 10 minut. Poté byly buňky resuspendovány v TN-promývacím pufru (12 ml na jednu kyvetu) a slity do 50 ml kádinky. Obsah kádinky byl umístěn do termoboxu s ledem dezintegrován pomocí sonikátoru. Sonikace probíhala 4x po dobu 1 minuty. Následně byla suspenze přelita do kyvety a centrifugována při 20 000 g po dobu 30 minut.

#### **4.4.3 Afinitní chromatografie**

##### **4.4.3.1 Kolonová afinitní chromatografie**

Kolonová afinitní chromatografie byla prováděna s kolonkou Ni-NTA agaróza His-Trap, nízkotlakým kapalinovým chromatografem Biologic od firmy Rio-Rad a UV/VIS detektorem. Všechny používané roztoky byly připravovány z deionizované vody a následně odvzdušněny. Nejprve byl nastaven na chromatografu nejvyšší průtok kapaliny 1,75 ml/min a poté byla kolonka promyta deionizovanou vodou. Následovala ekvilibrace TN-ekvilibračním pufrem, dokud se neustálila hodnota absorbance. Měřeno bylo při 280 nm. Mezitím byla promyta i dávkovací smyčka. Nejprve byla 3x promyta deionizovanou vodou a poté 3x TN-ekvilibračním pufrem. Do smyčky byly nadávkovány 4 ml vzorku. Vzorek byl před dávkováním ještě dodatečně zcentrifugován při 13 000 g po dobu 10 minut. Před

nadávkováním vzorku na kolonu byl snížen průtok mobilní fáze na 1 ml/min. Otočením 6-ti cestného ventilu do polohy otevřeno došlo k nadávkování vzorku na kolonu. Po nadávkování prudce narostla hodnota absorbance díky balastním proteinům ve vzorku, které se nenavázaly na kolonu. Dávkování probíhalo do ustálení hladiny absorbance na původní hodnotu. Poté byl celý systém promyt TN-ekvilibračním pufrem. Po promytí následovala eluce proteinů z kolony pomocí TN-elučního pufru obsahujícího vysokou koncentraci imidazolu.

#### **4.4.3.1.1 Skoková eluce**

TN-ekvilibrační pufr byl vyměněn za TN-eluční pufr a průtok byl nastaven na 1,75 ml/min. Při průchodu elučního pufru kolonou byl uvolněn navázaný protein vlivem vyšší vazebné afinity imidazolu k Ni-NTA. To se projevilo nárůstem absorbance. Jakmile absorbance dosáhla maxima, byly z kolony jímány eluční frakce do připravených 1,5 ml mikrozkušavek. Nasbíráno bylo 10-12 frakcí.

#### **4.4.3.1.2 Gradientová eluce**

Na průtokovém chromatografu byl nastaven program, který ve vymezeném čase měnil složení mobilní fáze z 100% TN-ekvilibračního pufru a 0% TN-elučního pufru na 0% TN-ekvilibračního pufru a 100% TN-elučního pufru. Opět docházelo k uvolňování navázaného proteinu a vzestupu absorbance. Stejně jako v případě skokové eluce bylo jímáno 10-12 frakcí při vzestupu absorbance do předem připravených 1,5 ml mikrozkušavek.

#### **4.4.3.1.3 Promytí kolony**

Po provedení chromatografie bylo nutné kolonu promýt a zakonzervovat. Promytí kolony při maximálním průtoku mobilní fáze 1,75 ml/min probíhalo promytím deionizovanou vodou, následně 0,1M kyselinou octovou, opět deionizovanou vodou a na závěr 30% ethanolem.

#### **4.4.3.1.4 Regenerace kolony**

Pro regeneraci Ni-NTA v koloně byla kolona při maximálním průtoku mobilní fáze 1,75 ml/min promývána stripovacím roztokem, TN-ekvilibračním pufrem a deionizovanou vodou po dobu 30 minut. Následně byla Ni-NTA aktivována promýváním roztokem 0,1M NiSO<sub>4</sub> dokud se neustálila konduktometrická křivka. Na závěr byl systém promýván 15 minut deionizovanou vodou.

#### **4.4.3.2 Vsádkové uspořádání**

Do 50 ml zkumavky byly napipetovány 2 ml čisté Ni-NTA agarózy. Následně byla Ni-NTA agaróza promyta destilovanou vodou a TN-ekvilibračním pufrem. Poté byl na agarózu nadávkován vzorek a ponechán kontrolní vzorek původního vzorku. Oddělení Ni-NTA agarózy od roztoku bylo prováděno dekantací, nebo krátkým stočením na centrifuze při 3000 g po dobu 5 minut. Poté byl supernatant slit a označen jako vazebná frakce. Následně byla Ni-NTA agaróza 3x promyta TN-ekvilibračním pufrem. Supernatant byl vždy slit a označen jako promytí 1-3. Poté byla zahájena eluce pomocí TN-elučního pufru, kdy byla Ni-NTA agaróza 3x převrstvena tímto pufrem. Supernatant byl opět slit a označen jako eluce 1-3. Nakonec bylo odebráno 5  $\mu$ l Ni-NTA agarózy a označeno jako stacionární fáze.

##### **4.4.3.2.1 Vsádkové uspořádání se štěpením na Ni-NTA agaróze**

Postup probíhal stejně jako v předchozí kapitole, jen s drobnějšími úpravami. Místo TN-ekvilibračního pufru byl používán pufr dialyzační pro TEV proteázu. Mezi kroky promytí a eluce byl zařazen ještě jeden krok, při kterém bylo napipetováno na Ni-NTA 6 ml dialyzačního pufru pro TEV proteázu a přidána TEV proteáza. Poté byla zkumavka umístěna na rotátor a zde se nechala inkubovat při pokojové teplotě 16 hodin. Následně byl odebrán supernatant, který měl obsahovat ameloblastin zbavený histidinových kotev. Poté se pokračovalo v elučních krocích.

##### **4.4.3.2.2 Regenerace Ni-NTA agarózy**

Ni-NTA agaróza v 50 ml zkumavce byla 2x převrstvena regeneračním pufrem, 5x promyta destilovanou vodou a 3x 2% roztokem SDS. Následně byla kolona promyta zvyšující se koncentrací etanolu 25%, 50%, 75%, 100%, 75%, 50%, 25%. Poté 1x promyta destilovanou vodou. Kolona pak byla převrstvena 5x roztokem 100mM EDTA o pH=8,0 a opět promyta destilovanou vodou. Pro nabití kolony byla 2x převrstvena roztokem obsahujícím  $\text{Ni}^{2+}$ , 100 mM  $\text{NiSO}_4$ . Poté opět 2x promyta destilovanou vodou a 2x regeneračním pufrem.

#### **4.4.3.3 SDS-PAGE**

Pro elektroforézu byla využívána souprava Mini-PROTEAN Tetra Cell. Pro přípravu dělicího gelu byla nejprve očištěna skla etanolem. Poté bylo na podložní sklo přiklopeno krycí sklíčko a skla byla umístěna do držáku. Tento komplet byl následně uchycen v nástavci a podložen gumovou houbičkou proti protečení. Následně byl v kádince připraven 15% dělicí gel a ten byl napipetován mezi skla zhruba do 80% objemu a převrstven destilovanou vodou

pro zajištění rovnosti gelu. Po ztuhnutí byla destilovaná voda vysáta filtračním papírem a v kádince byl připraven 5% zaostřovací gel. Ten byl napipetován do zbytku objemu mezi skly. Následně byl do něj vložen hřebínek pro vytvoření jamek pro vzorky. Skla byla poté vyjmuta z držáku a umístěna do elektroforetické cely. Ta byla umístěna do elektroforetické vany naplněné SDS elektrodoým pufrem po rysku a po ztuhnutí gelu byl vyjmut hřebínek.

Vzorky byly smíchány s SDS vzorkovým pufrem v poměru 1:1 a vloženy do termostatu na 5 minut při 100°C. Následně byly vzorky společně se standardem molekulových hmotností nadávkovány do jamek v gelu. Vzorku se dávkovalo maximálně 20 µl, standardu molekulových hmotností byly dávkovány 3 µl. Na elektroforetickou vanu byl nasazen kryt a vana byla připojena ke zdroji napětí. Dělení probíhalo za konstantního napětí 200 V po dobu 45 minut.

Po elektroforéze byla odstraněná skla z gelu. Gel byl vložen do plastové misky a na straně markeru byl odříznut roh pro určení orientace gelu. Následně byl gel barven dle protokolu Silver stain.

### **Tabulka 3: Protokol pro barvení stříbrem**

Roztok 1. Gel ponechán 1 hodinu
Roztok 2. Gel 3x 15 minut
Roztok 3. Gel 1 minuta, poté 3x promýt vodou
Roztok 5. Gel 20 minut, poté 3x promýt vodou
Roztok 7. Dokud není gel obarven, poté 1x promýt vodou
Roztok 9. Dokud se barvení nezastaví
Roztok 10. Uchování gelu

#### **4.4.3.5 Western blot**

Gel po SDS-PAGE byl vyjmut ze skel a vložen do transférového pufru 1x, který byl připraven naředěním 10 ml zásobního pufru 970 ml H<sub>2</sub>O a 20 ml ethanolu. Následně byla uštířena PVDF membrána na rozměry gelu, promyta methanolem a transferovým pufrem. Poté byla PVDF membrána položena na gel a z obou stran byly přiloženy blotovací papíry namočené v transférovém pufru. Takto vzniklé uspořádání (sandwich) bylo vloženo do blotovacího zařízení v pořadí: katoda, blotovací papír, gel, PVDF membrána, blotovací papír a anoda. Poté bylo toto uspořádání (sandwich) pováleno skleněnou zkumavkou pro odstranění bublinek. Po připojení ke zdroji stejnosměrného napětí probíhalo blotování 35 minut za konstantního napětí 15 V.

Po ukončení blotování byla PVDF membrána vyjmuta ze sandwichového uspořádání a obarvena 0,5% roztokem Ponceau S. Po obarvení byly vystřížením drobných trojúhelníků



vyznačeny proužky proteinového standardu. Poté byla z membrány vodou omyta Ponceau S. Následně byla membrána zavařena do igelitového sáčku a inkubována s blokovacím pufrem po dobu 1 hodiny na rotátoru. Poté byla membrána zatavena do nového igelitového sáčku společně s 5 ml protilátkového pufru obsahujícího primární protilátky (myší protilátky proti His-kotvě) v naředění 1:5000. Následovala inkubace při 4°C přes noc na rotátoru.

Po inkubaci byla PVDF membrána promyta promývacím pufrem 2x5 minut v 80 ml a následně 15 minut v 20 ml. Poté byla membrána zatavena v plastovém sáčku společně s 4 ml protilátkového pufru obsahující sekundární protilátku (anti-myší protilátka značená křenovou peroxidázou). Poté byla provedena inkubace 2 hodiny na rotátoru. Po inkubaci byla membrána promyta promývacím pufrem 3x5 minut. Poté byl na membránu nanesen substrát, 1,5 ml roztoku A a 1,5 ml roztoku B (Super Signal Clarity Western ECL Substrate, BioRad). Detekce probíhala na přístroji ChemiDoc™ MP System.

#### **4.4.3.6 Zahuštění proteinů**

Pro zahuštění proteinů byla použita ultrafiltrační membrána Amicon umístěná v plastové cele. Tato membrána měla hodnotu cut-off 30 kDa. Do cely s membránou byl nalit vzorek a cela se umístila do prázdné 50 ml zkumavky a zajistila víčkem. Zkumavka byla umístěna do centrifugy a centrifugována 10 min při 3500 g. Zahuštěný protein byl poté odpipetován z cely a uchován ve zkumavce.

#### **4.4.3.7 Dialýza**

Vzorky proteinů byly dialyzovány v dialyzační membráně s hodnotou cut-off 10-12 kDa. Dialýza probíhala proti dialyzačnímu pufru pro TEV-proteázu a dialýza probíhala přes noc při 4°C.

#### **4.4.3.8 Měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové**

Pro měření koncentrace proteinů bylo používáno činidlo dle Bradfordové. Činidlo bylo připraveno rozpuštěním 70 mg Coomassie Blue G250 v 50 ml 95% ethanolu, 100 ml 85% kyseliny fosforečné a doplněno vodou pro HPLC na objem 1 litru. Toto činidlo bylo poté zfiltrováno přes filtrační papír 0,45 µm a uchováváno v tmavé láhvi.

Pro vytvoření kalibrační řady byl použit zásobní roztok BSA o koncentraci 1 mg/ml. Rozsah koncentrací kalibrační řady byl 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml, 0,01 mg/ml a 0,005 mg/ml. Vzorky pro analýzu byly naředěny 1x, 10x a 20x. Tato kalibrační řada společně se vzorky a slepým vzorkem v podobě destilované vody byla napipetována na 96 jamkovou mikrotitrační destičku v množství 20 µl. Vše bylo provedeno v tripletech.

Následně bylo přidáno činidlo v množství 200  $\mu$ l. Následovala 5-ti minutová inkubace na světle. Poté byla mikrotitrační destička vložena do čtečky a změřena absorbance při 595 nm. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí Microsoft Excel.

#### **4.4.3.9 Štěpení TEV proteázou**

K vzorkům po dialýze proti dialyzačnímu pufru pro TEV-proteázu byla přidána TEV-proteáza. Ta byla přidávána ke vzorkům v poměru 1:100. Štěpení probíhalo přes noc při laboratorní teplotě.

#### **4.4.4 Exprese AMBN v kvasinkách**

##### **4.4.4.1 Příprava primerů**

Na základě znalosti sekvence pro ameloblastin a sekvence pro MCS vektoru pYEX-BX byly navrženy primery pro překlonoání *AMBN* z vektoru pET28b-Trx-AMBN do vektoru pYEX-BX. Byly vytvořeny 3 druhy primerů. První pár byl vytvořen pro klonování prostřednictvím restriční štěpení vektoru pYEX-BX restriční endonukleázou BamHI. Druhý pár primerů byl vytvořen pro klonování prostřednictvím restriční štěpení pomocí restričních endonukleáz BamHI a EcoRI, kdy forward primer zůstal stejný jako v předchozím případě a byly vytvořeny dva reverse primery jeden mnou a druhý paní doktorkou Heidingsfeld pro restriční endonukleázu EcoRI. Třetí pár primerů byl navržen jako diagnostický, kdy forward primer nasedal na sekvenci obsaženou v c-terminální části ameloblastinu a reverse primer nasedal na sekvenci za MCS vektoru pYEX-BX. Tyto primery byly vyrobeny firmou Generi-Biotech a Sigma. Vytvořené primery byly dodány v mikrozkušavkách v krystalické formě. Pro použití bylo nutné vytvořit zásobní roztok primerů o koncentraci 0,1 mM přidáním deionizované vody. Z tohoto zásobního roztoku byly připraveny pracovní roztoky o koncentraci 10  $\mu$ M.

##### **4.4.4.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Do PCR mikrozkušavky byla připravena reakční směs o složení 20  $\mu$ l PCR vody, 25  $\mu$ l EmeraldAmp Max PCR Master Mix (2X Premix), nebo PPP Master Mix Top-Bio, 2  $\mu$ l primerů (Forward a Reverse) a 1  $\mu$ l templátové DNA o koncentraci 1410 ng/ $\mu$ l. Mikrozkušavka byla vložena do termocykléru a byl nastaven PCR program.

**Tabulka 4: PCR program pro amplifikaci konstruktů *AMBN***

Denaturace 95°C	60 s	36x
Denaturace 98°C	10 s	
Annealing 62°C	35 s	
Elongace 72°C	120 s	
Elongace 72°C	120 s	

**Tabulka 5: PCR program pro diagnostické primery**

Denaturace 95°C	60 s	36x
Denaturace 98°C	10 s	
Annealing 52°C	35 s	
Elongace 72°C	45 s	
Elongace 72°C	120 s	

#### 4.4.4.3 Elektroforéza na agarózovém gelu

Nejprve byla připravena elektroforetická vana, do níž byla vložena menší vanička pro nalití gelu. Vanička byla utěsněna gumičkami a byl vložen hřebínek, který vytvořil jamky pro nadávkování vzorků. Poté byl připraven 1% agarózový gel, do kterého bylo přidáno 5,5  $\mu$ l ethidium bromidu. Gel byl nalit do vaničky s hřebínkem. Po ztuhnutí gelu byl hřebínek vyjmut a vanička byla otočena ve směru, aby jamky pro vzorky byly blíže u katody. Následně byla vana naplněna po rysku TBE 1x pufrem a do jamek byly nadávkovány vzorky po 20  $\mu$ l a marker po 5  $\mu$ l. Na vanu byl umístěn kryt s připojením ke zdroji napětí. Elektroforéza probíhala 45 minut při konstantním napětí 120 V. Po separaci byl gel vyjmut a vložen do prohlížeče gelů, kde byl osvětlen UV světlem pro detekci.

#### 4.4.4.4 Extrakce DNA z agarózy

V prohlížeči gelů byly z gelu pomocí kovové špachtle vyříznuty proužky, které svou velikostí odpovídaly požadovanému produktu. Tyto vzorky agarózy byly vloženy do mikrozkuvek. Pro separaci DNA byla použita souprava NucleoSpinR Gel and PCR Clean-up od firmy MACHEREY-NAGEL. Pro vyzolování DNA se postupovalo dle návodu dodaného výrobcem.

#### **4.4.4.5 Měření koncentrace DNA**

Měření koncentrace DNA probíhalo na spektrofotometru Nano-MD PDA UV-VIS Bio. Pro měření byla použita nano-kyveta 0,5 mm. Pro měření se dávkovaly 3  $\mu\text{l}$  vzorku a 3  $\mu\text{l}$  sterilní destilované vody jako slepého vzorku. Měření probíhalo při 260 nm.

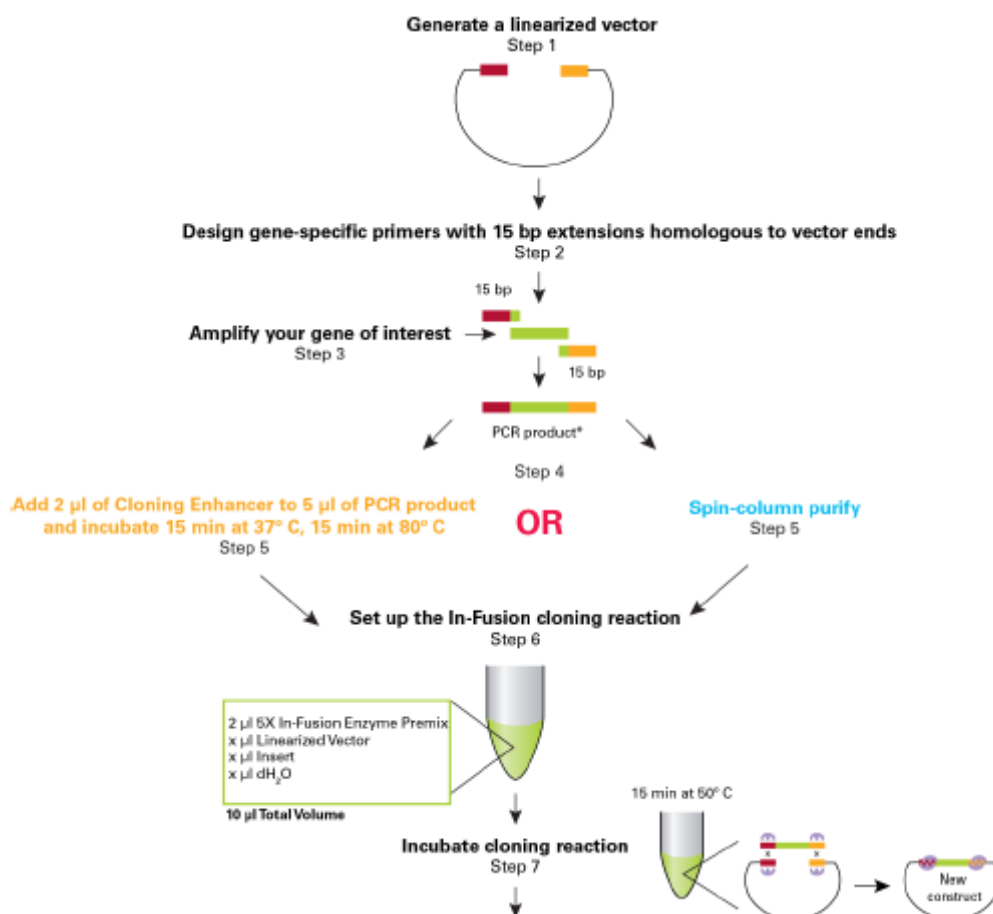
#### **4.4.4.6 Štěpení vektoru pYEX-BX**

Štěpení vektoru probíhá ve sterilní mikrozkuhavce přes noc při 37°C. Do mikrozkuhavky byl napipetován vektor pYEX-BX, aby jeho koncentrace dosáhla maximálně 1  $\mu\text{g}$ . Dále do reakce byl přidán 1  $\mu\text{l}$  enzymu BamHI, 1  $\mu\text{l}$  enzymu EcoRI, 2  $\mu\text{l}$  10X H pufru a doplněno destilovanou vodou na celkový objem 20  $\mu\text{l}$ . Pro kontrolu štěpení vektoru byla provedena elektroforéza na agarózovém gelu.

#### **4.4.4.7 In-Fusion cloning**

Pro In-Fusion cloning reakci byly napipetovány do sterilní mikrozkuhavky 2  $\mu\text{l}$  5X In-Fusion HD Enzyme Premixu, tolik  $\mu\text{l}$  inzertu (vyizolovaná DNA ameloblastinu po PCR), aby jeho koncentrace byla v rozmezí 50-100 ng a tolik  $\mu\text{l}$  linearizovaného vektoru pYEX-BX, aby jeho koncentrace dosáhla 50-100 ng. To vše bylo doplněno sterilní deionizovanou vodou na celkový objem 10  $\mu\text{l}$ . Tato reakční směs byla inkubována 5 minut v 37°C. Poté probíhala druhá inkubace při 50°C po dobu 15 minut. Schéma In-Fusion reakce je uvedeno na obrázku 5.

Obrázek 5: Schéma In-Fusion reakce. Převzato z: [39]



#### 4.4.4.8 Transformace buněk *E. coli* DH5α

Buňky *E. coli* DH5α, které se používají pro namnožení vektorové DNA, byly transformovány reakční směsí z In-Fusion cloning reakce. Expres v těchto buňkách není možná z důvodu chybějící T7 polymerázy. Transformace byla provedena podle protokolu pro transformaci buněk *E. coli* BL21 (DE3) viz kapitola Expres AMBN v *E. coli*. Jediným rozdílem je selekční marker, kterým je u vektoru pYEX-BX rezistence proti ampicilinu.

#### 4.4.4.9 Získání plazmidové DNA

Pro získání plazmidové DNA byla použita souprava Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit. Výchozím vzorkem byly buňky transformované vektorem pYEX-BX, kdy kolonie narostlé na plotnách s ampicilinem byly pomocí párátko setřeny a zaočkovány na další plotnu s Ampicilinem a párátko se zbytkem buněk bylo vloženo do zkumavky se 4 ml tekutého LB média obohaceného o Ampicilin. Kultivace probíhala na třepačce při 30°C do druhého dne. Poté byly buňky centrifugovány v mikrozukmavkách 60 s při 11 000 g a buněčná peleta byla dále zpracována. Postupováno bylo dle návodu poskytnutého dodavatelem s obměnou v prvním kroku daného protokolu, kdy byla používána varianta 1D.

#### **4.4.4.10 Sekvence**

Sekvenovány byly vektory pYEX-BX získané z transformovaných kolonií. Pro sekvenaci bylo důležité, aby získaný vektor měl koncentraci vyšší jak 20 ng/μl a čistotu  $R_{260/280} \geq 1,8$ . Sekvence byla provedena firmou GATC Biotech.

#### **4.4.4.11 Software**

Výsledný chromatogram ze sekvenování byl prohlížen a čten v programu Chromas Lite 2.1 (Technesium Pty Ltd).

#### **4.4.4.12 Webové databáze a nástroje**

Pro porovnávání sekvencí získaných ze sekvenování probíhalo pomocí online software MultAlin (Corpet F. 1988, <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>)

K vyhledávání a určení výsledků ze sekvenování byla použita online databáze NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

## **5 VÝSLEDKY A DISKUSE**

### **5.1 Příprava rekombinantního ameloblastinu v expresním systému *E. coli***

#### **5.1.1 Transformace buněk *E. coli* BL 21 (DE3), exprese proteinu a dezintegrace buněčného materiálu**

Transformace, exprese proteinu a dezintegrace probíhala přesně podle pokynů uvedených výše. Transformace buněk byly úspěšné. *E. coli* BL21 (DE3) narostly ve velkém počtu na všech zaočkovaných plotnách s LB+KAN. Nárůst do požadované buněčné denzity proběhl v rozmezí 3-4 hodin a poté byla spuštěna exprese proteinu přidáním IPTG. Sklizeň buněk i jejich následná dezintegrace probíhala bez potíží.

#### **5.1.2 Afinitní chromatografie**

##### **5.1.2.1 Optimalizace Afinitní chromatografie**

###### **5.1.2.1.1 Kolonové uspořádání se skokovou elucí**

Prvním purifikačním krokem byla afinitní chromatografie pro separaci proteinu pomocí vazby His kotvy na Ni-NTA agarózu. Prvně byla použita afinitní chromatografie v kolonovém uspořádání se skokovou elucí, jak je popsáno výše. Po analýze elučních frakcí pomocí SDS PAGE se došlo k závěru, že tento druh čištění proteinů není dost účinný. Mimo proteinu zájmu bylo v elučních frakcích přítomno i spousty balastních proteinů. Mimo to je tento druh afinitní chromatografie náročný na spotřebu pufrů, a proto bylo přikročeno k modifikaci.

###### **5.1.2.1.2 Kolonové uspořádání s gradientovou elucí**

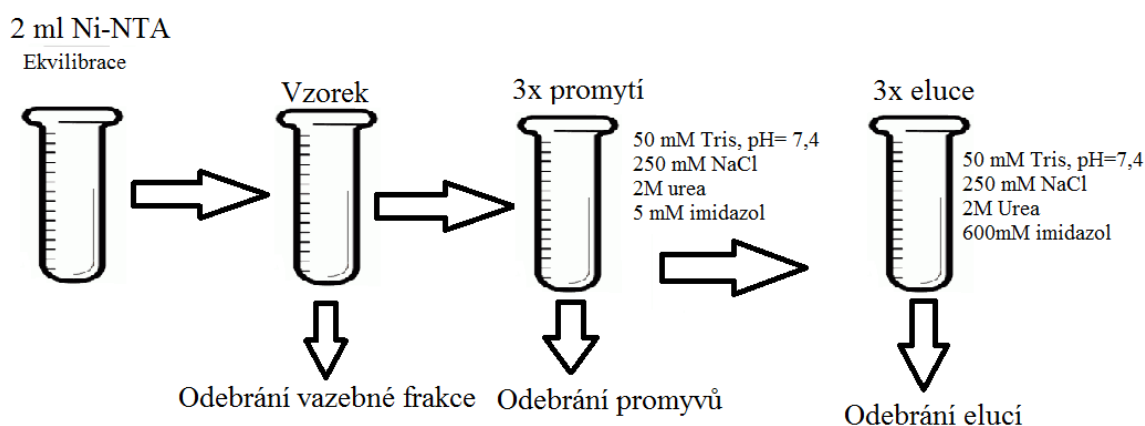
První modifikace spočívala v zavedení gradientové eluce. Postupováno bylo dle pokynů výše uvedených. Po analýze elučních frakcí pomocí SDS PAGE se došlo k závěru, že tato modifikace afinitní chromatografie poskytuje čistší produkt, a i spotřeba pufrů je nižší. Nicméně jako velká nevýhoda se ukázala časová náročnost a malé množství vzorku, které lze najednou zpracovat (4 ml), jež bylo dáno použitím nízkotlakého kapalinového chromatografu BioLogic. Proto bylo přikročeno k další modifikaci afinitní chromatografie.

###### **5.1.2.1.3 Vsádkové uspořádání se skokovou elucí**

Dalším krokem bylo zavedení vsádkové afinitní chromatografie. Postupováno bylo dle pokynů uvedených výše. Po analýze všech frakcí prostřednictvím SDS PAGE se vsádkové uspořádání ukázalo jako nejvhodnější. Čistota proteinu v elučních frakcích se ukázala

srovnatelná jako v případě kolonového uspořádání s gradientovou elucí. Výhodou bylo též velké množství vzorku, které šlo najednou zpracovat (50 ml) a časová nenáročnost. Pro tyto aspekty byla afinitní chromatografie ve vsádkovém uspořádání vyhodnocena jako optimální metoda.

**Obrázek 6: Průběh afinitní chromatografie vsádkové uspořádání**



### 5.1.2.2 Výsledky vsádkové afinitní chromatografie

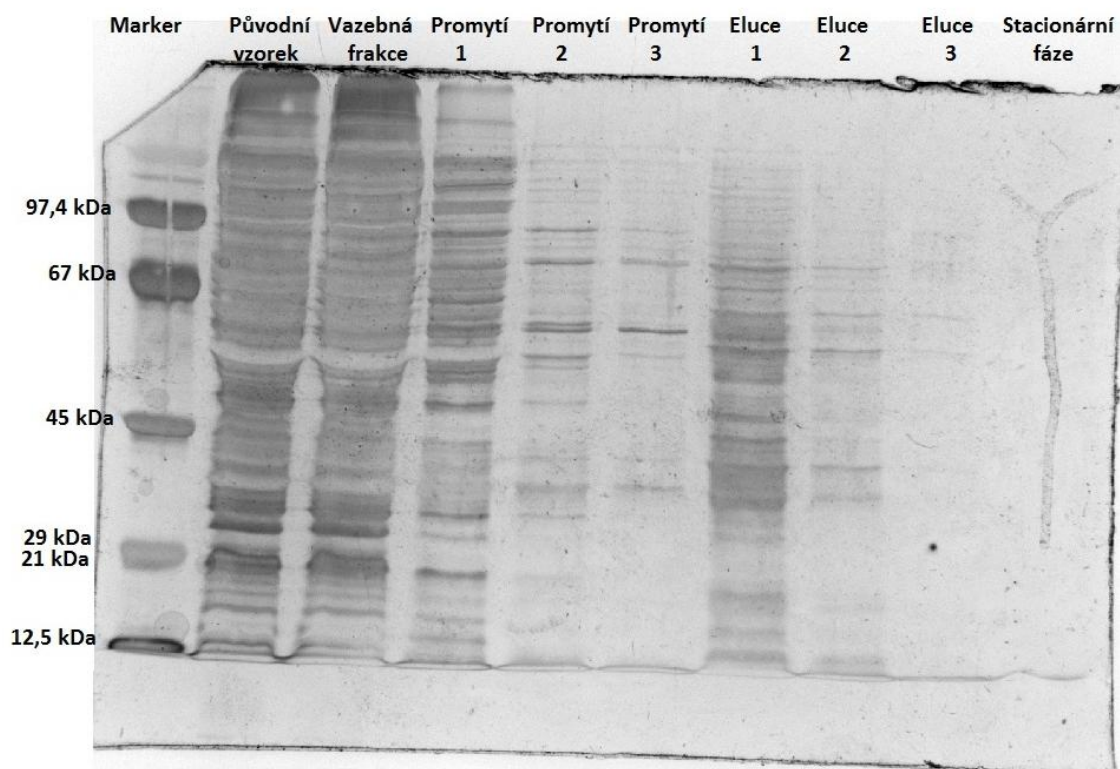
Jako vzorek pro afinitní chromatografii byla použita dezintegrovaná buněčná peleta narostlá z 600 ml kultivačního média. Po analýze frakcí prostřednictvím SDS PAGE byla zjištěna největší přítomnost ameloblastinu v eluční frakci číslo 1, jak lze vidět na obrázku 7 a 8. Ameloblastin by měl migrovat při elektroforéze v oblasti okolo 70 kDa. Poté byly všechny tři eluční frakce zahuštěny pomocí Amicon a byla změřena koncentrace proteinu, jak je uvedeno v tabulce 6.

**Tabulka 6: Měření koncentrace proteinů v elučních frakcích**

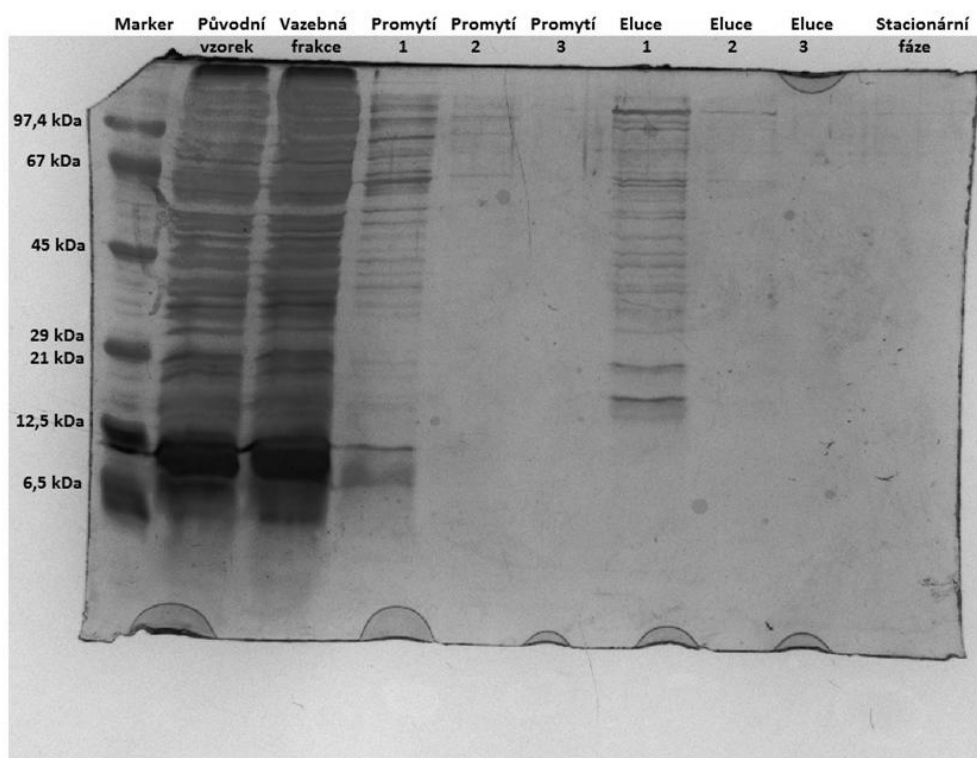
Afinitní chromatografie 1		Afinitní chromatografie 2	
Eluční frakce 1	c=1,554 mg/ml	Eluční frakce 1	c=0,495 mg/ml
Eluční frakce 2	c=0,269 mg/ml	Eluční frakce 2	c=neměřeno
Eluční frakce 3	c=mimo rozsah kalibrace	Eluční frakce 3	c=neměřeno



Obrázek 7: SDS PAGE analýza afinitní chromatografie 1



Obrázek 8: SDS PAGE analýza afinitní chromatografie 2

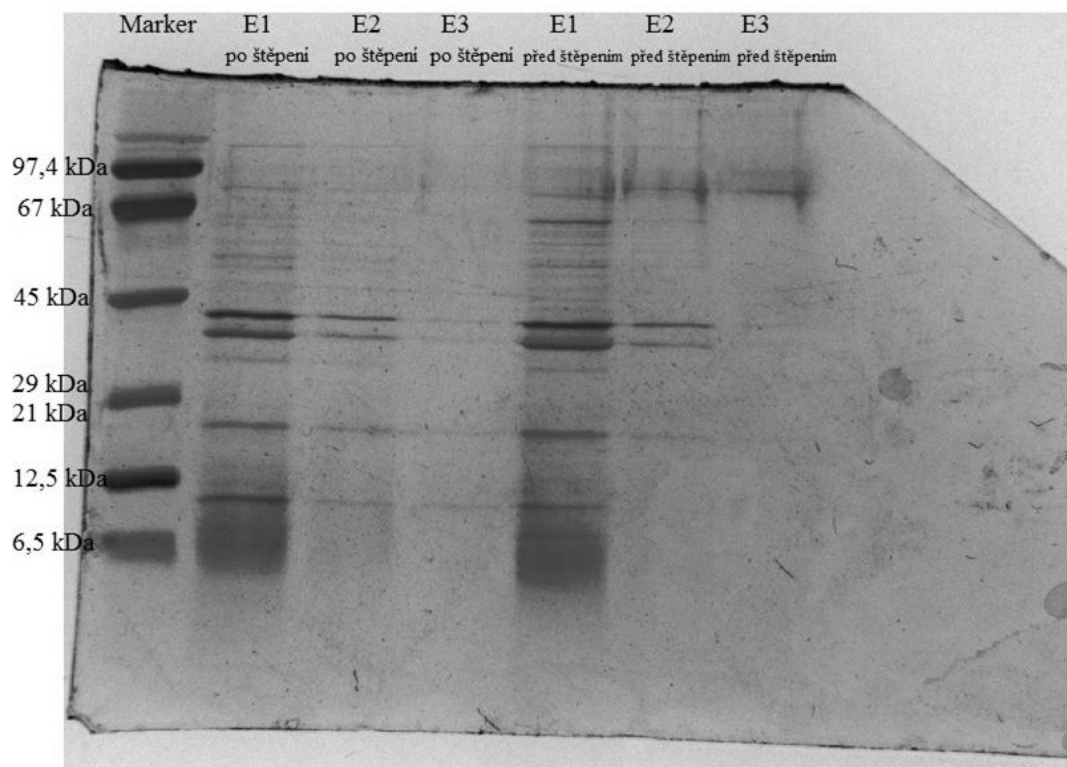


### 5.1.2.2.1 Štěpení TEV proteázou

Z výsledků měření koncentrace proteinu v elučních frakcích byly vybrány frakce z afinitní chromatografie 1. U nich byla provedena dialýza proti dialyzačnímu pufru pro TEV proteázu a poté byla k frakcím přidána TEV proteáza. V tomto kroku měly být od proteinu odstraněny obě His kotvy a thioredoxin. Po štěpení byla provedena SDS PAGE pro analýzu štěpení. Odštěpený thioredoxin by měl při elektroforéze putovat v oblasti okolo 15 kDa. Pro porovnání účinnosti štěpení byly analyzovány frakce jak před štěpením, tak po štěpení TEV proteázou viz obrázek 9.

#### Obrázek 9: SDS PAGE analýza elučních frakcí před a po štěpení TEV proteázou

E1-E3 eluční frakce

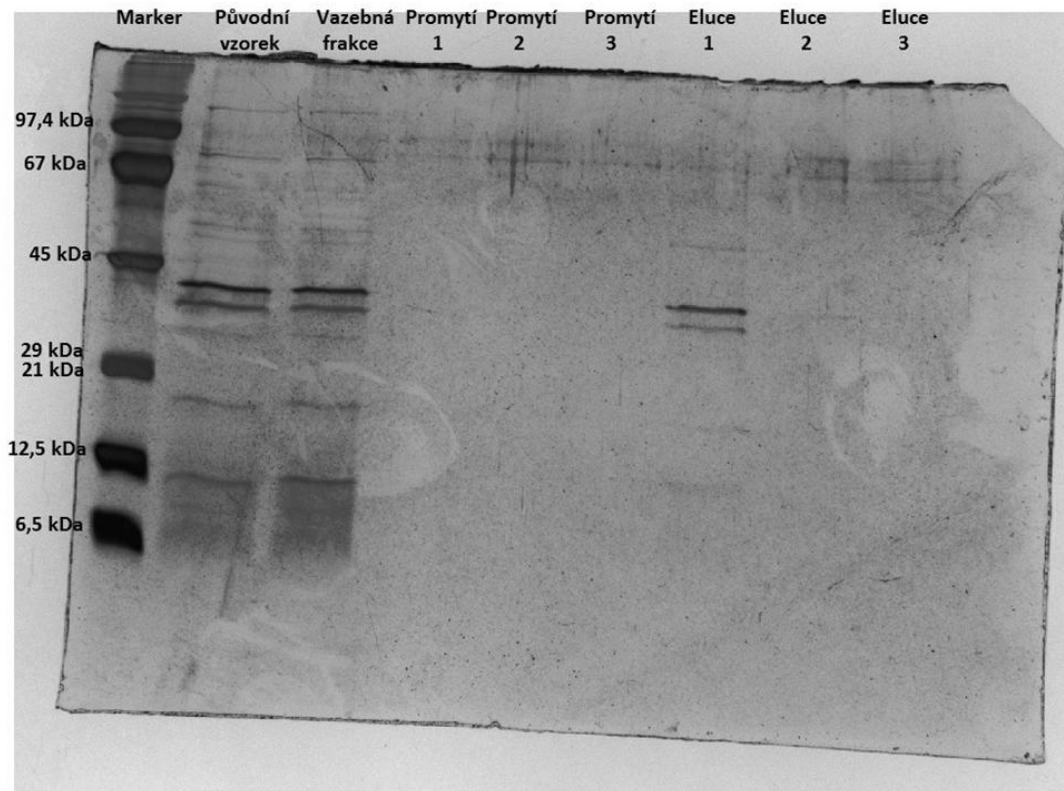


Z výsledků na gelu je patrné, že štěpení TEV proteázou nebylo úspěšné. Na gelu se neobjevil u elučních frakcí po štěpení výrazný proužek okolo 15 kDa svědčící o odštěpení thioredoxinu. Naopak jsou na gelu patrné výrazné proužky okolo 40 kDa, které po afinitní chromatografii patrné nebyly. Nejspíše se jedná o rozpadové produkty ameloblastinu.

Pro potvrzení této hypotézy byla provedena afinitní chromatografie, kdy jako vzorek byly použity všechny tři eluční frakce po štěpení TEV proteázou. Analýza pomocí SDS

PAGE je vidět na obrázku 10. Po této afinitní chromatografii by v elučních frakcích měl zůstat jen odštěpený thioredoxin.

**Obrázek 10: Foto SDS PAGE analýza afinitní chromatografie po štěpení TEV proteázou**



Výsledek afinitní chromatografie potvrdil hypotézu, že štěpení TEV proteázou neproběhlo a výrazné proužky na gelu jsou rozpadové produkty ameloblastinu opatřené His kotvou.

### 5.1.2.3 Výsledky afinitní chromatografie pro dvojnásobné množství vzorku

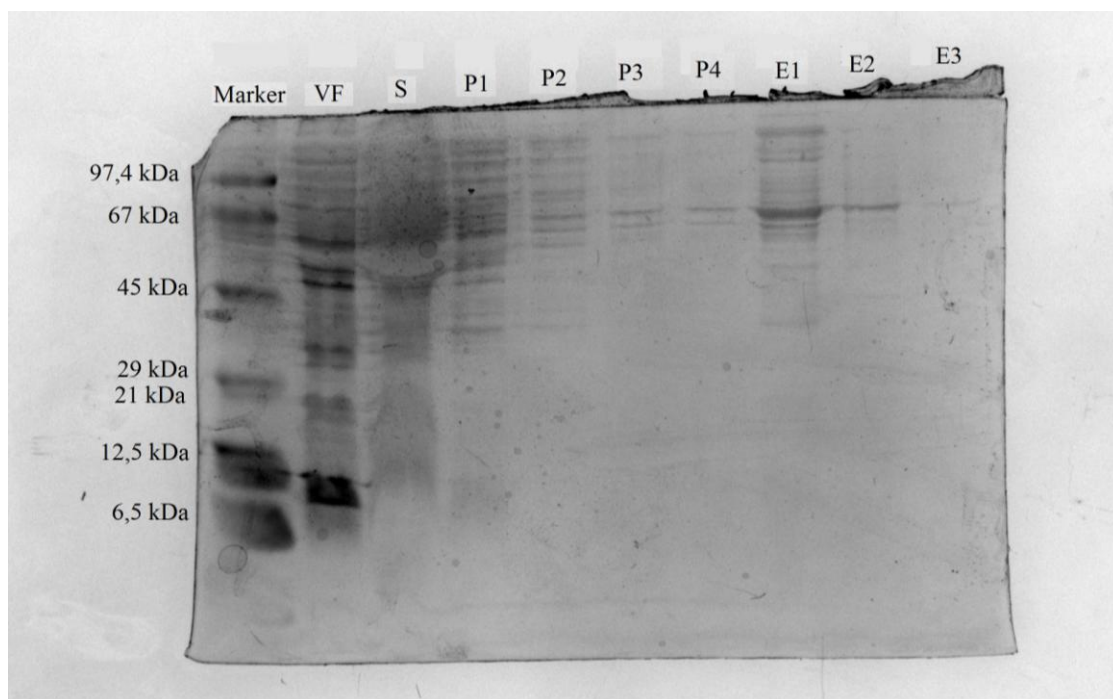
Kvůli nízké koncentraci proteinu v elučních frakcích se přistoupilo k navýšení množství vzorku, který byl použit pro afinitní chromatografii a jako vzorek byla používána dezintegrovaná buněčná peleta narostlá z 1200 ml kultivačního média. Po ukončení afinitní chromatografie byly analyzovány všechny frakce pomocí SDS PAGE, viz obrázek 11. Největší přítomnost ameloblastinu byla opět v eluční frakci číslo 1. Eluční frakce byly zahuštěny na Amicon a byla změřena koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích. Výsledky měření koncentrace jsou uvedeny v tabulce 7.

**Tabulka 7: Měření koncentrace proteinů v elučních frakcích**

Afinní chromatografie	
Eluční frakce 1	c=1,679 mg/ml
Eluční frakce 2	c=0,279 mg/ml
Eluční frakce 3	c=mimo rozsah kalibrace

**Obrázek 11: SDS PAGE analýza afinní chromatografie**

VF = vazebná frakce, S = stacionární fáze, P1-P3 = promývací frakce, E1-E3 = eluční frakce



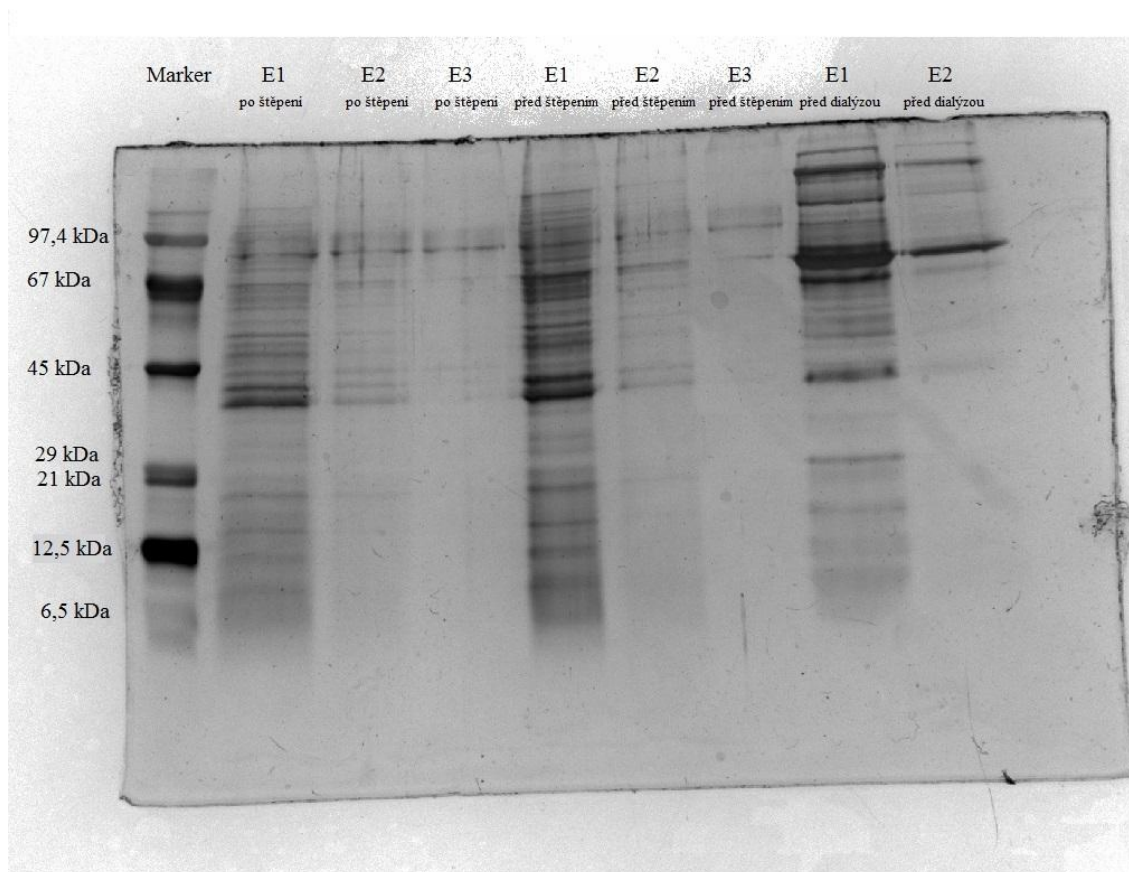
#### 5.1.2.3.1 Dialýza a štěpení TEV proteázou

Po dialýze proti dialyzačnímu pufru pro TEV proteázu byla ke vzorkům přidána TEV proteáza a vzorky se nechaly štěpit. Potíže se ukázaly v podobě, že po dialýze se začaly objevovat ve vzorcích drobné sraženiny. Tato přítomnost sraženin byla ještě více patrná po provedení štěpení pomocí TEV proteázy. Proto byly uchovávány vzorky elučních frakcí před zahájením dalšího kroku a ty poté analyzovány pomocí SDS PAGE viz obrázek 12. Tato analýza ukázala, že se ameloblastin rozpadá během procesu dialýzy a štěpení TEV proteázou. To je dáno jeho přirozenou nestabilitou a schopností vypadávat z roztoku, pokud není všechen

naštěpen TEV proteázou a v roztoku se vyskytuje jak ameloblastin bez His kotvy a thioredoxinu tak ameloblastin mající His kotvy a thioredoxin. Také se ukázalo, že po štěpení TEV proteázou opět chybí proužek pro odštěpený thioredoxin.

### Obrázek 12: SDS PAGE analýza ameloblastinu během dialýzy a štěpení TEV proteázou

E1-E3 = eluční frakce

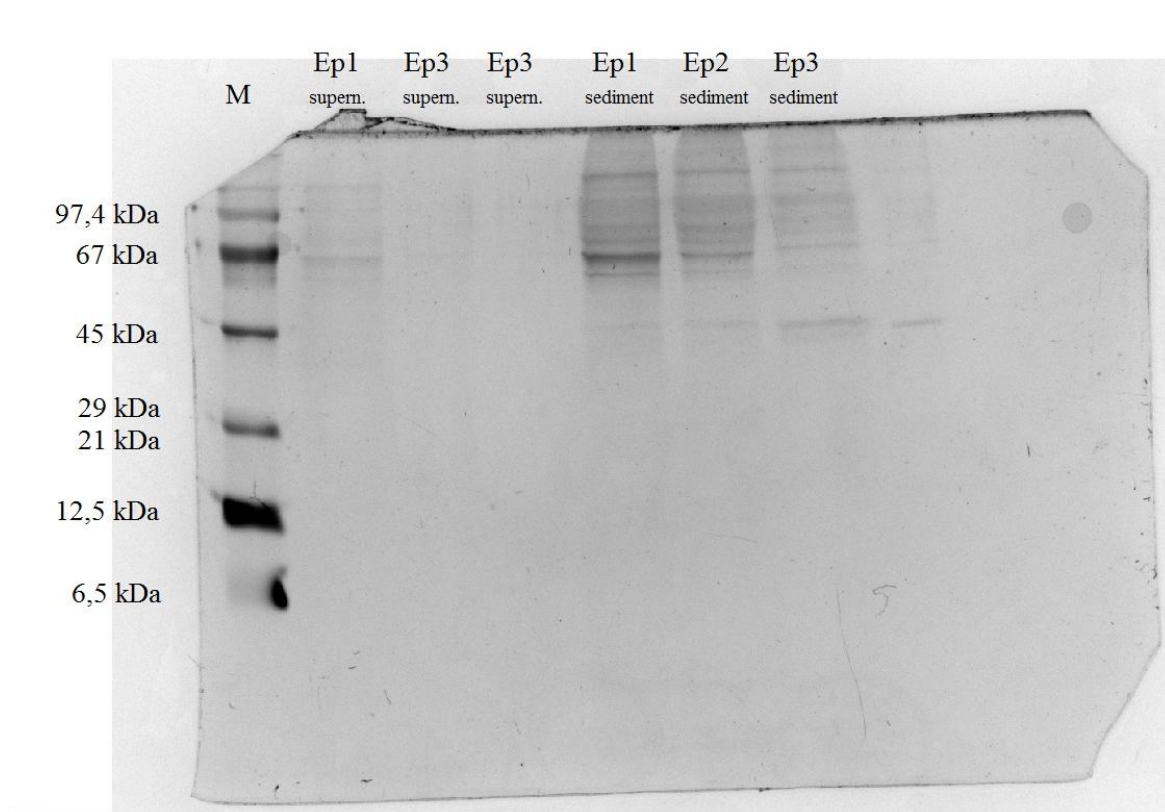


Z důvodu vypadávání proteinu během dialýzy byla provedena modifikace afinitní chromatografie, aby byl zkrácen čas pro degradaci ameloblastinu.

Byla provedena také analýza supernatantu a sedimentu elučních frakcí po štěpení ameloblastinu TEV proteázou metodou SDS PAGE viz obrázek 13. Po analýze se došlo k závěru, že téměř všechny protein z roztoku se vysrážel a nebyl TEV proteázou vůbec štěpen.

### Obrázek 13: SDS PAGE analýza supernatantu a sedimentu po štěpení TEV proteázou

Ep1-Ep3 = eluční frakce

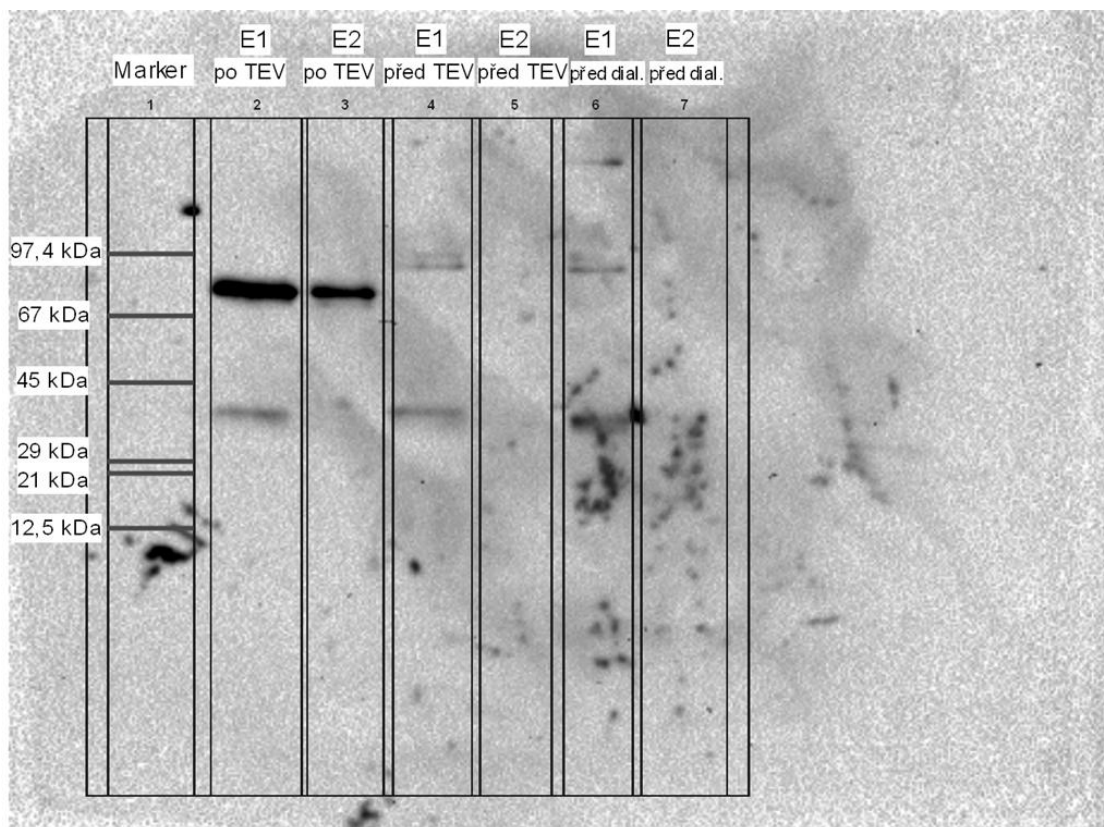


#### 5.1.2.3.2 Western blot

Pro potvrzení hypotézy, že ameloblastin nebyl TEV proteázou štěpen, byl proveden western blot. Použity byly protilátky proti His kotvě. Jako vzorky byly použity dvě eluční frakce během procesu zpracování vzorku pro štěpení TEV proteázou a po štěpení TEV proteázou. U vzorků po štěpení TEV proteázou byla nabrána i sraženina proteinů, u vzorků před dialýzou a po dialýze byl vzat pouze supernatant. Z výsledků je patrné, že ameloblastin His kotev a thioredoxinu nebyl vůbec zbaven a TEV proteáza musí být nefunkční. Proto byla přivezena nová TEV proteáza, kterou poskytl Dr. Jiří Dostál z ÚOCHB AV ČR. Výsledky lze vidět na obrázku 14.

## Obrázek 14: Western blot

E1-E2 po TEV = eluční frakce po štěpení TEV proteázou s obsahem sraženiny, E1-E2 před TEV = supernatant elučních frakcí před štěpení TEV proteázou, E1-E2 před dial. = supernatant elučních frakcí před procesem dialýzy



### 5.1.2.4 Modifikace afinitní chromatografie

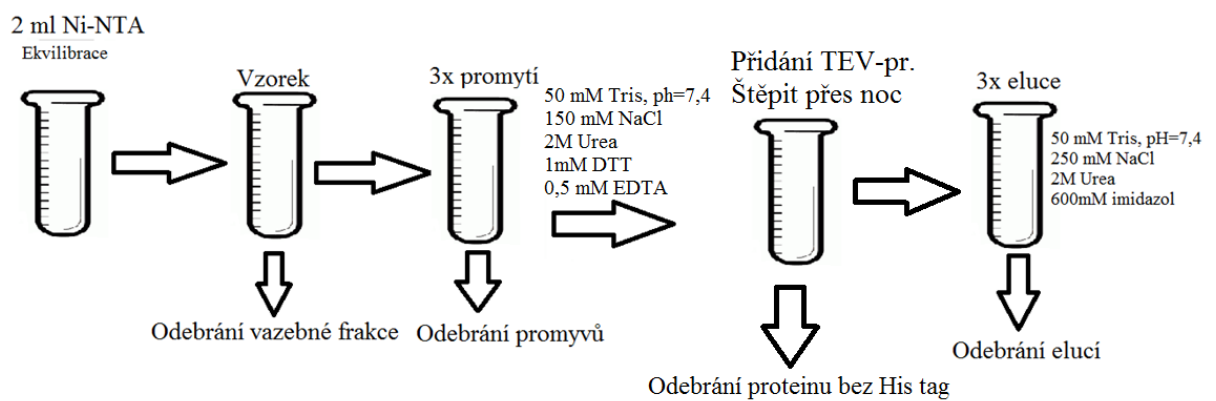
Modifikace afinitní chromatografie spočívala v používání dialyzačního pufru pro TEV proteázu místo ekvilibračního pufru a tím umožnit štěpení ameloblastinu navázaného na Ni-NTA agaróze a zbavit se tak zdlouhavého kroku dialýzy. Schéma modifikované afinitní chromatografie lze vidět na obrázku 15.

Po navázání ameloblastinu na Ni-NTA agaróze bylo přidáno 6 ml dialyzačního pufru a TEV proteáza. Poté se nechalo probíhat štěpení 16 hodin na rotátoru při pokojové teplotě. Supernatant, který byl odpipetován by měl obsahovat pouze ameloblastin zbavený His kotev a thioredoxinu. Poté byla opět provedena eluce elučním puftrem a v elučních frakcích měly být přítomny pouze odštěpené His kotvy s thioredoxinem.

Během afinitní chromatografie se však začaly objevovat sraženiny již od promývacích frakcí. Všechny frakce tedy byly centrifugovány a analyzován byl jak sediment, tak

i supernatant pomocí SDS PAGE viz obrázek 16 a 17. Z výsledků je patrné, že protein samovolně vypadává z roztoku. Po štěpení TEV proteázou všechen ameloblastin se vysrážel z roztoku a je přítomen pouze ve formě sraženiny a supernatant je ameloblastinu prostý. Zarážející je i přítomnost proužku pro ameloblastin v sedimentu i supernatantu elučních frakcích 1 a 2. To ukazuje na fakt, že z ameloblastinu nebyly odštěpeny His kotvy a thioredoxin. Toto mohlo být způsobeno špatným nastavením podmínek během štěpení, díky kterým nemusela TEV proteáza fungovat, nebo faktem, že použitá TEV proteáza nebyla funkční. V úvahu by připadalo vyzkoušet více variant dialyzačních pufrů a změn v době a teplotě během štěpení.

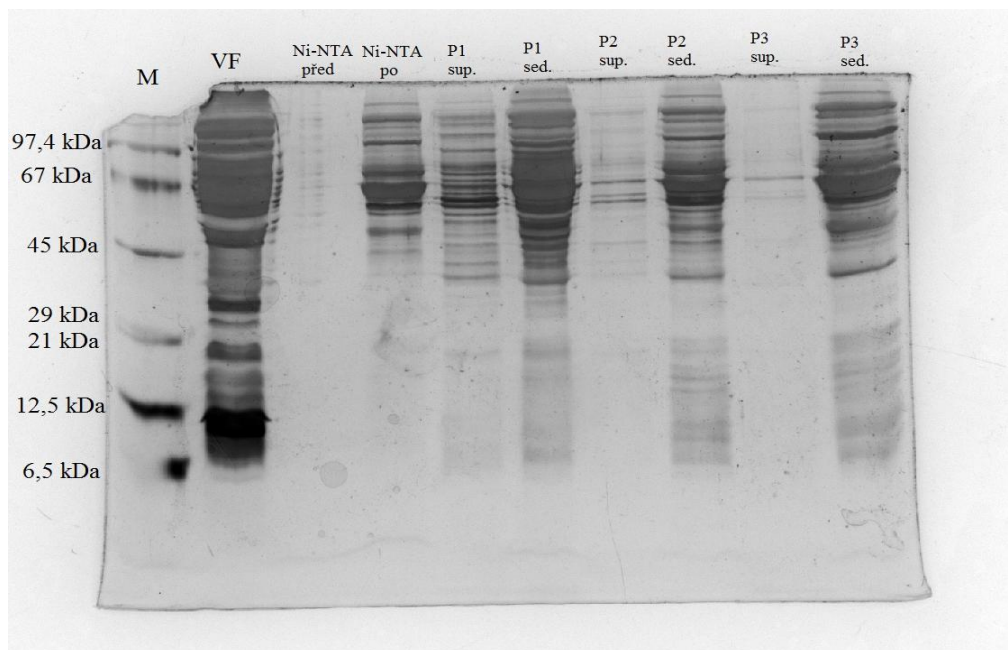
**Obrázek 15: Modifikace afinitní chromatografie**





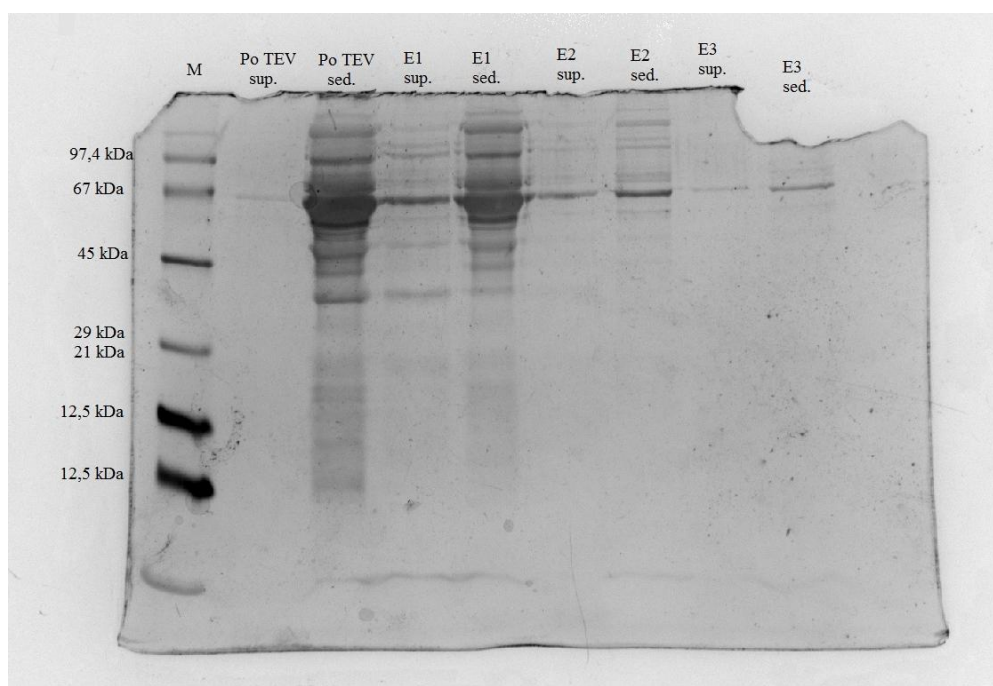
### Obrázek 16: SDS PAGE analýza afinitní chromatografie gel 1

M = Marker, VF = Vazebná frakce, P1-P3 sup. = promývací frakce 1-3 supernatant, P1-P3 sed. = promývací frakce 1-3 sediment



### Obrázek 17: SDS PAGE analýza afinitní chromatografie gel 2

M = Marker, Po TEV sup. = vzorek po štěpení TEV proteázou supernatant, Po TEV sed. = vzorek po štěpení TEV proteázou sediment, E1-E3 sup. = eluční frakce 1-3 supernatant, E1-E3 sed. = eluční frakce 1-3 sediment.

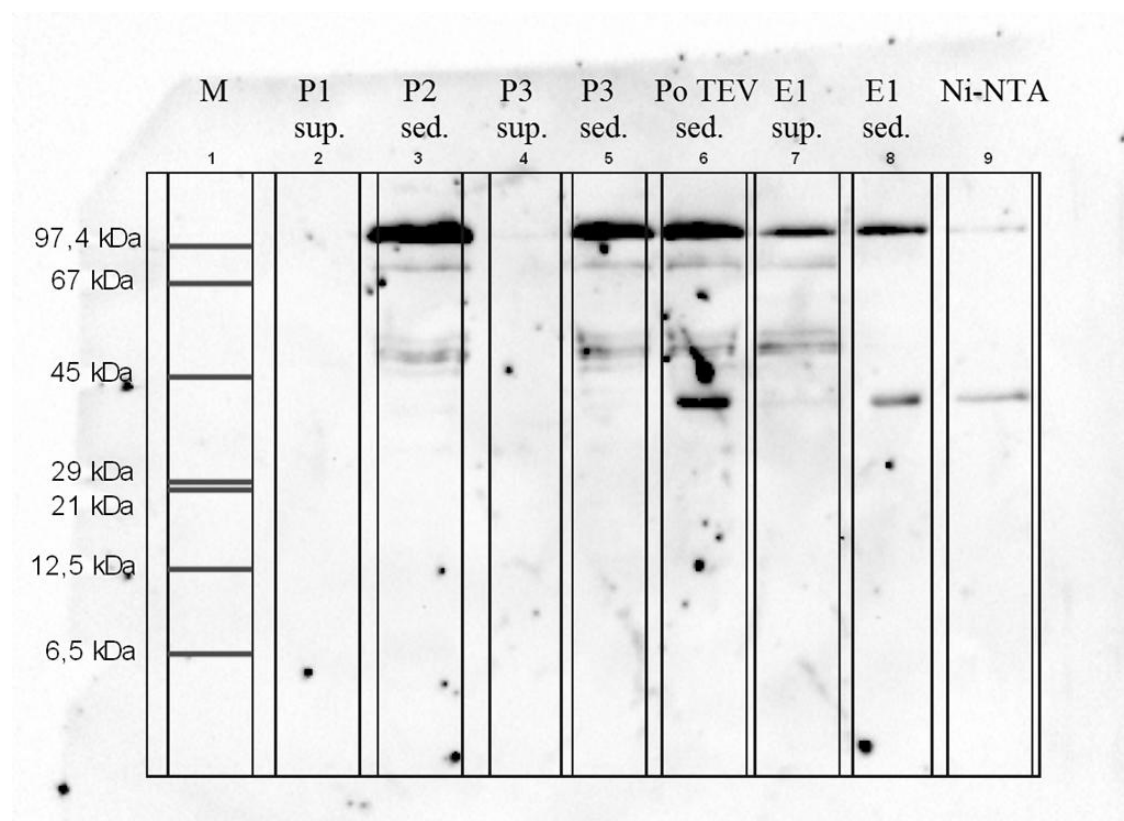


#### 5.1.2.4.1 Western blot

Pro potvrzení hypotézy, že se ameloblastin sráží z roztoku již během promývací fáze a není z něj odstraněna His kotva a thioredoxin, byl proveden Western blot s protilátkami právě proti His kotvě. Jako vzorky byly použity sedimenty a supernatanty z promývacích frakcí, sediment z frakce po štěpení TEV proteázou a sedimenty a supernatanty z eluční frakce 1. Z výsledků je patrné, že ameloblastin vypadáva z roztoku již během promývání. Potvrzená přítomnost ameloblastinu jak v sedimentu, tak supernatantu eluční frakce 1 potvrzuje hypotézu, že TEV proteáza neodštěpuje His kotvy a thioredoxin z ameloblastinu. To může být způsobeno tím, že TEV proteáza je nefunkční, anebo se ameloblastin vysráží z roztoku rychleji, než ho TEV proteáza stihne poštěpit. Výrazný proužek u vzorku sedimentu z frakce po štěpení TEV proteázou potvrzuje, že se ameloblastin sráží z roztoku během procesu štěpení, a to ve velké míře, další výrazný proužek ukazuje rozpadový produkt ameloblastinu. Výsledky lze vidět na obrázku 18.

#### Obrázek 18: Western blot

M = Marker, P1 a P3 sup = promývací frakce 1 a 3 supernatant, P2 a P3 sed. = promývací frakce 2 a 3 sediment, Po TEV sed. = vzorek po štěpení TEV proteázou sediment, E1 sup. = eluční frakce 1 supernatant, E1 sed. = eluční frakce 1 sediment



## 5.2 Příprava rekombinantního ameloblastinu v expresním systému kvasinek

### 5.2.1 Klonování s využitím štěpení restriční endonukleázou BamHI

#### 5.2.1.1 Optimalizace PCR reakce a amplifikace konstruktů *AMBN*

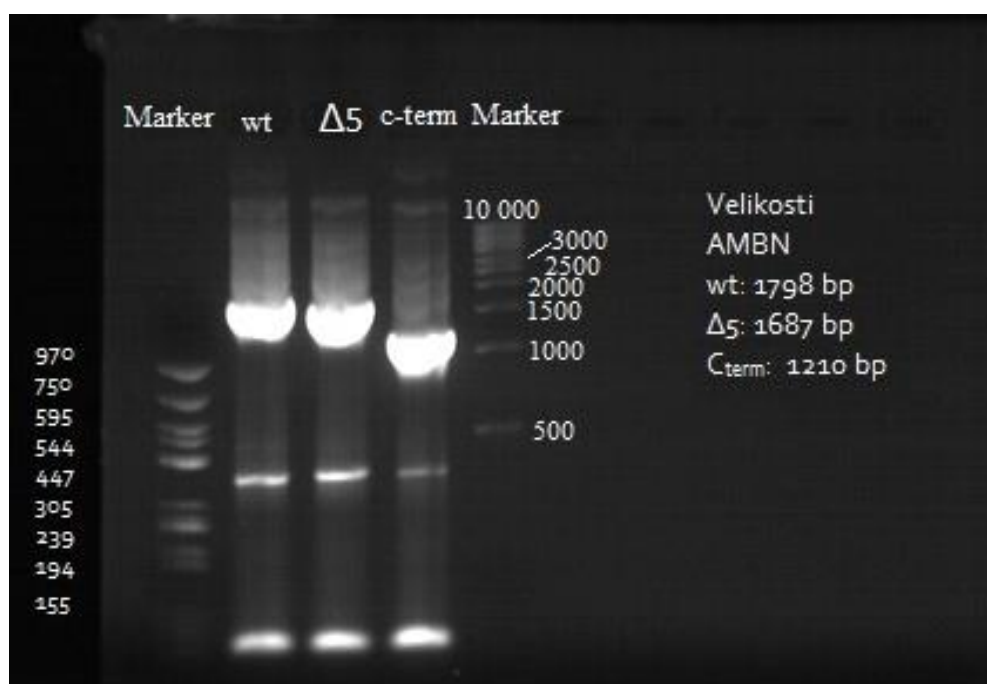
Pro amplifikace jsme použili dvojici primerů navrženou tak, aby amplifikovaný produkt bylo možno použít pro klonování s využitím jednoho restričního enzymu, a to BamHI. Po amplifikaci byly vzorky rozděleny pomocí agarózové chromatografie a vyříznuty z gelu. Poté následovalo čištění PCR fragmentů pomocí sady NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Poté byla u vzorků změřena koncentrace DNA a její čistota viz tabulka 9. Na obrázku 19 je vidět úspěšná amplifikace konstruktů *AMBN*.

**Tabulka 8: PCR program pro amplifikaci konstruktů *AMBN***

	Teplota [°C]	Čas [s]	
Denaturace	95	60	
Denaturace	98	10	36x
Annealing	42	35	
Elongace	72	120	

**Obrázek 19: Analýza amplifikace konstruktů ameloblastinu na agarózovém gelu**

wt = *AMBN* wt,  $\Delta 5$  = *AMBN*  $\Delta 5$ , c-term = *AMBN* Cterm



**Tabulka 9: Měření koncentrace DNA a její čistoty**

Měření koncentrace DNA a její čistoty		
<i>AMBN</i> wt	<i>AMBN</i> $\Delta 5$	<i>AMBN</i> c-term.
c=131,6 ng/ $\mu$ l R=1,89	c=140,8 ng/ $\mu$ l R=1,83	c=136,3 ng/ $\mu$ l R=1,85

### 5.2.1.2 In-Fusion cloning

Vektor pYEX-BX byl podroben restričnímu štěpení pomocí restriční endonukleázy BamHI. Po štěpení byla provedena elektroforéza na agarózovém gelu viz obrázek 20 a vektor byl z gelu vyříznut a vyčištěn pomocí sady NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

**Obrázek 20: Štěpení vektoru pYEX-BX restriční endonukleázou BamHI a amplifikace konstruktů ameloblastinu a analýza na agarózovém gelu.**

wt = *AMBN* wt,  $\Delta 5$  = *AMBN*  $\Delta 5$ , c-term = *AMBN* Cterm

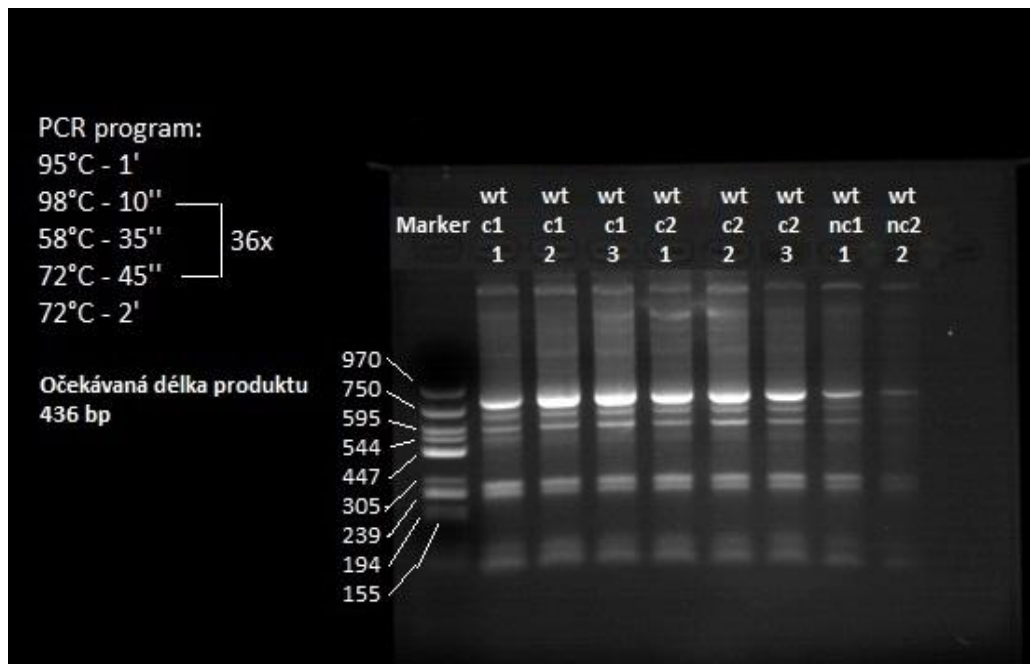


Jak je vidět na obrázku, štěpení vektoru neproběhlo se 100% účinností. 100% poštěpený vektor by na gelu putoval jako jediný proužek. Nejsvětlejší proužek v 3-5 dráze představuje štěpený vektor, další dva slabé proužky představují nepoštěpený vektor v cirkulární a superhelixové formě.

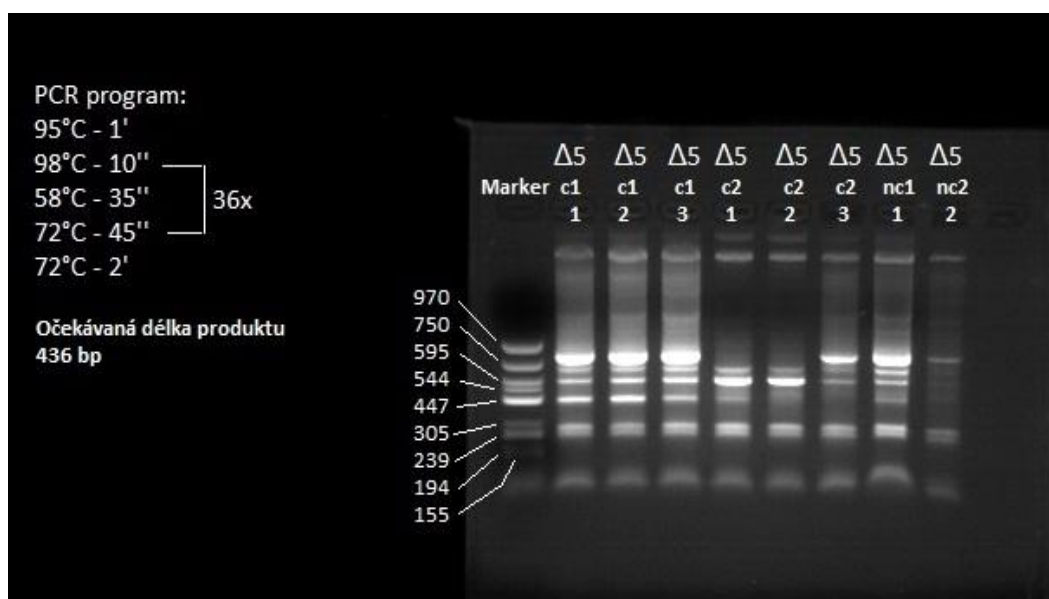
Poté bylo připraveno 6 In-Fusion cloning reakcí dle pokynů uvedených výše. Použity byly dva konstrukty ameloblastinu, a to wt a  $\Delta 5$ . Poté byly těmito reakčními směsmi

transformovány buňky *E. coli* DH5 $\alpha$  a zaočkovány na LB plotny s ampicilinem. Po inkubaci byl pozorován nárůst kolonií *AMBN* wt a  $\Delta 5$ . Z těchto kolonií byla získána plazmidová DNA, která byla použita jako templát pro diagnostickou PCR s diagnostickými primery. Analýza proběhla prostřednictvím elektroforézy na agarózovém gelu viz obrázek 21.

**Obrázek 21: Diagnostická PCR A analýza na agarózovém gelu**



**Obrázek 22: Diagnostická PCR B analýza na agarózovém gelu**



Jak je vidět na obrázku A u kolonií *AMBN* wt nejsou přítomny proužky v očekávané velikosti 436 bp, což svědčí o tom, že vektor po In-Fusion cloning reakci neobsahuje náš gen pro ameloblastin nýbrž se jen uzavřel, a tak mohly buňky transformovány tímto vektorem narůst.

Oproti tomu na obrázku B jsou patrné proužky ve specifické velikosti a také spousta dalších nespecifických proužků. Na základě výsledků agarózové elektroforézy byl vybrán vzorek plazmidové DNA z kolonií  $\Delta 5/c1/2$ , u které byla změřena koncentrace, čistota a vybrané vzorky byly poslány do firmy GATC biotech na sekvenování.

### 5.2.1.3 Sekvenování

Výsledný chromatogram byl zpracován v programu Chromas Lite 2.1 (Technelesium Pty Ltd) a výsledky porovnány v internetovém softwaru MultAlin. Výsledná sekvence byla vyhledána v databázi NCBI pro potvrzení, že se jedná o náš gen *AMBN*. Výsledná sekvence obsažená ve vektoru pYEX-BX nebyl náš gen *AMBN*  $\Delta 5$ , ale gen kódující acyl-CoA desaturázu *Manduca sexta*.

Po prozkoumání sekvence genu pro acyl-CoA desaturázy *manduca sexta* byla zjištěna částečná homologie mezi sekvencí tohoto genu a sekvencí diagnostických primerů. Společně s nižší teplotou annealingu tak docházelo k nasednutí primerů v těchto oblastech a tvorbě produktů okolo 444 bp. Z tohoto zjištění bylo přikročeno k zvýšení teploty annealingu pro zvýšení specifity nasedání primerů. Pravděpodobný neúspěch při klonování byl způsoben právě nedostatečným nastěpením vektoru.

## 5.2.2 Klonování prostřednictvím BamHI a EcoRI

### 5.2.2.1 Optimalizace PCR a amplifikace konstruktů *AMBN*

Z výsledků předchozího klonování bylo přikročeno ke změně strategie při klonování. Pro klonování byl přidán další restriční enzym a EcoRI. Tento restriční enzym byl vybrán z důvodu, že gen pro desaturázu *Manduca sexta* byl do vektoru pYEX-BX vložen právě v místech, které štěpí BamHI a EcoRI. Tímto krokem bylo předpokládáno, že bude gen pro desaturázu z vektoru vyštěpen. Po navržení nových primerů bylo nutné optimalizovat PCR pro amplifikaci konstruktů *AMBN* viz tabulka 10. Po amplifikaci proběhla analýza PCR reakce pomocí elektroforézy na agarózovém gelu viz obrázek 23.

**Tabulka 10: PCR program pro amplifikaci *AMBN***

	Teplota [°C]	Čas [s]	
Denaturace	95	60	
Denaturace	98	10	36x
Annealing	62	35	
Elongace	72	120	

**Obrázek 23: Amplifikace konstruktů *AMBN* s novými primery**

wt/OH = *AMBN* wt amplifikovaný primerem BamHI a primerem EcoRI navržený doktorkou Heidingsfeld,

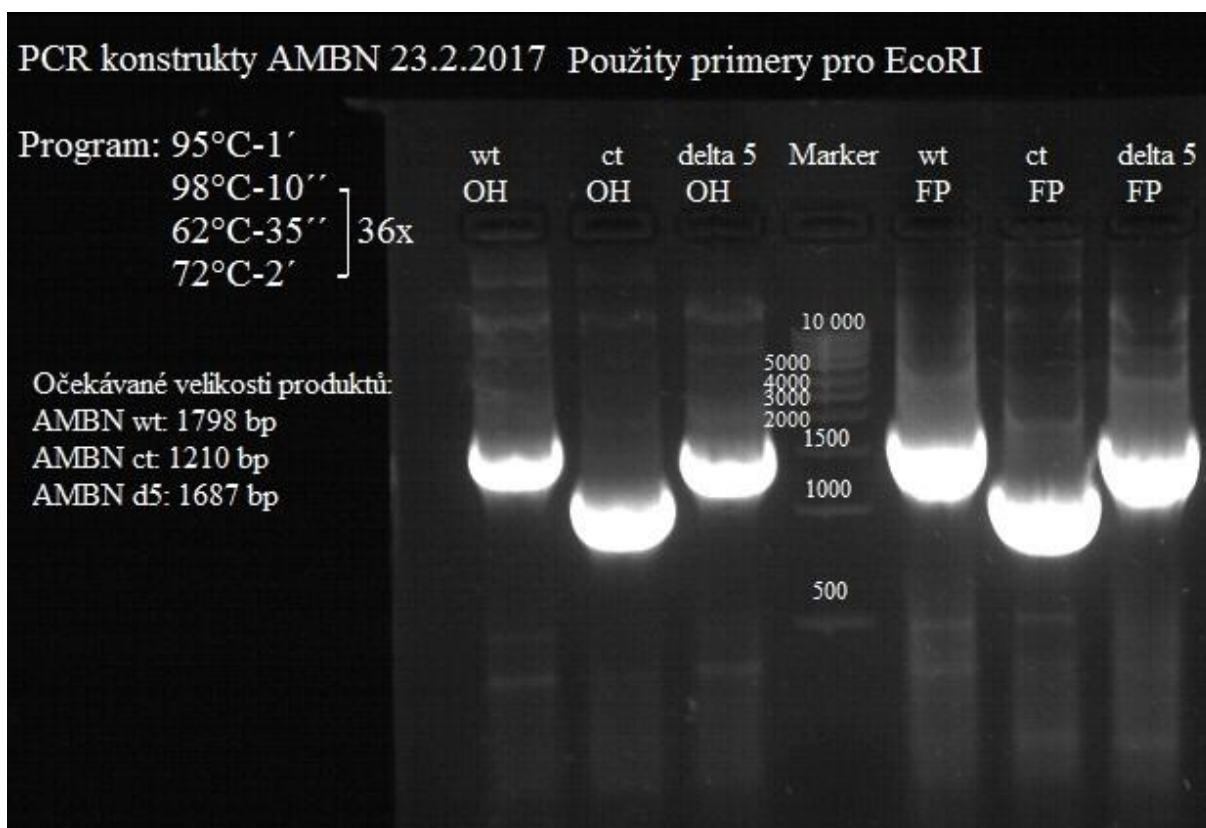
ct/OH = *AMBN* wt amplifikovaný s primerem BamHI a primerem EcoRI navržený doktorkou Heidingsfeld,

delta 5 = *AMBN* wt amplifikovaný s primerem BamHI a primerem EcoRI navržený doktorkou Heidingsfeld

wt/FP = *AMBN* wt amplifikovaný s primerem BamHI a primerem EcoRI navržený mnou

ct/FP = *AMBN* wt amplifikovaný s primerem BamHI a primerem EcoRI navržený mnou

delta5/FP = *AMBN* wt amplifikovaný s primerem BamHI a primerem EcoRI navržený mnou



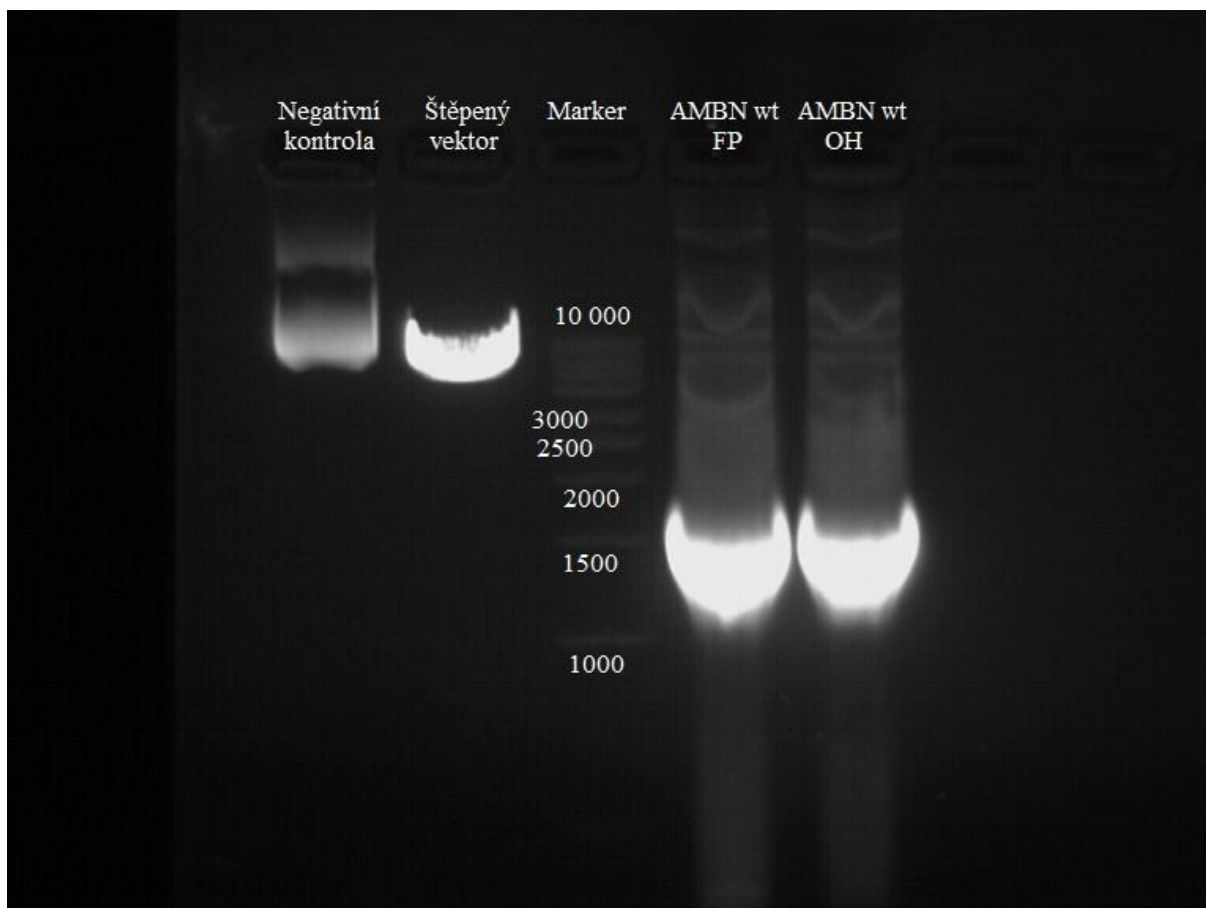
Jak je vidět na obrázku 23, tak amplifikace produktu s novými primery fungovala dobře a s vyšší teplotou annealingu se snížilo i množství tvorby nespecifických produktů.

### 5.2.2.2 In-Fusion cloning

Vektor pYEX-BX byl podroben restričnímu štěpení pomocí restričních endonukleáz BamHI a EcoRI. Po štěpení byla provedena elektroforéza na agarózovém gelu viz obrázek 24 a vektor byl z gelu vyříznut a vyčištěn pomocí sady NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Pro klonování byl zvolen pouze *AMBN wt*.

#### Obrázek 24: Analýza štěpení vektoru pYEX-BX restričními endonukleázami BamHI a EcoRI a amplifikované konstrukty ameloblastinu na agarózovém gelu

AMBN wt/FP = *AMBN wt* amplifikovaný s primerem BamHI a primerem EcoRI navržený mnou. AMBN wt/OH = *AMBN wt* amplifikovaný primerem BamHI a primerem EcoRI navržený doktorkou Heidingsfeld



Jak je vidět na obrázku, tak štěpení vektoru restričními endonukleázami proběhlo se 100% účinností. Poté byly vektor i amplikony *AMBN* vyříznuty z gelu, vyčištěny a byla změřena jejich koncentrace a čistota, viz tabulka 11. Poté byly připraveny 2 In-Fusion reakce,



kterými byly transformovány buňky *E. coli* DH5 $\alpha$ . Po transformaci byly buňky naočkovány na plotny s LB médiem obohaceným o ampicilin. Nárůst kolonií nebyl pozorován, což svědčí o faktu, že naše inzerty nebyly zaligovány do linearizovaného vektoru pYEX-BX.

**Tabulka 11: Měření koncentrace DNA a její čistoty**

Měření koncentrace DNA a její čistoty		
AMBN wt/FP	AMBN wt/OH	Vektor pYEX-XB
c=142,6 ng/ $\mu$ l R=1,93	c=134,8 ng/ $\mu$ l R=1,78	c=55 ng/ $\mu$ l R=1,95

## 6 ZÁVĚR

### 6.1 Produkce ameloblastinu v expresním systému *E. coli*

Dle vytyčených cílů byly provedeny pokusy o získání ameloblastinu v expresním systému *E. coli*. Transformace a kultivace buněk probíhala dobře a rovněž první purifikační krok, tedy afinitní chromatografie, probíhal bez větších problémů. Nicméně během dalších kroků procesu purifikace byly pozorovány problémy ve formě rozpadu a vypadávání proteinu z roztoku. I přes navržené modifikace afinitní chromatografie a vynechání dialyzačního kroku se nepodařilo získat čistý protein. Tyto potíže se samovolným rozpadem ameloblastinu jsou způsobeny jeho přirozenými vlastnostmi. Srážení proteinu z roztoku je možné si vysvětlit přílišnou náloží proteinu ve vzorku v případě používání buněčného nárůstu z 1200 ml kultivačního média a jeho přirozené nestabilitě. Potíže při odštěpení His kotev a thioredoxinu z molekuly ameloblastinu byly pravděpodobně způsobeny inaktivní TEV proteázou, anebo nedostatečnou optimalizací podmínek, v nichž toto štěpení probíhá. Rozsáhlejší experimenty s cílem dosáhnout efektivního štěpení proteázou TEV by však vyžadovaly větší množství vzorku a byly by náročné i ekonomicky. V závěru lze konstatovat, že v tomto ohledu se vytyčený cíl diplomové práce nepodařilo splnit. Přesto se domnívám, že práce přinesla důležitou zkušenost, pokud jde o chování ameloblastinu během purifikace a tato zkušenost může být využita těmi, kdo budou v práci pokračovat.

### 6.2 Produkce ameloblastinu v expresním systému kvasinek

Dle vytyčených cílů diplomové práce byly provedeny pokusy o překlonoání genu *AMBN* a jeho dvou mutantů *AMBN*  $\Delta 5$  a *AMBN* c-term z vektorů pET28b-Trx-*AMBN*, pET28b-Trx-*AMBN*<sub>ct</sub>, pET28b-Trx-*AMBN* $\Delta 5$  do vektoru pYEX-BX prostřednictvím In-Fusion cloning. Úspěšně se podařilo navrhnout primery pro amplifikaci všech konstruktů ameloblastinu. Podařilo se také amplifikovat všechny konstrukty ameloblastinu, optimalizovat podmínky PCR a získat amplikony v dostatečném množství i čistotě. Překlonoání pomocí jedné restrikční endonukleázy, a to BamHI nepřineslo pozitivní výsledek. Analýza plazmidové DNA, která byla získána izolací z buněk transformovaných In-Fusion reakcí sestávající se z inzertu *AMBN* wt a *AMBN*  $\Delta 5$  společně s vektorem pYEX-BX linearizovaným prostřednictvím restrikčního štěpení restrikční endonukleázou BamHI, ukázala přítomnost jiného inzertu v daném vektoru, a to konkrétně acyl-CoA desaturázy lišaje *Manduca sexta*. To lze vysvětlit tím, že obdržení vektor od Dr. Aleše Bučka byl kontaminován vektorem, který obsahoval právě výše zmíněný gen a také, že náš pokus o zaligování *AMBN* nebyl úspěšný.

Po modifikaci klonovací strategie přidáním další restriční endonukleázy, a to konkrétně EcoRI byly provedeny další pokusy o překlonoání tentokrát již jen *AMBN* wt do vektoru pYEX-BX. Po sérii několika In-Fusion reakcí a pokusů transformovat buňky *E. coli* DH5 $\alpha$  nebyl pozorován žádný nárůst buněk. V závěru lze konstatovat, že z vytyčených cílů se podařilo amplifikovat gen pro ameloblastin, nicméně pokus o konstrukci vektoru pro expresi v kvasinkovém expresním systému byl neúspěšný. Přesto se však domnívám, že získané poznatky mohou být prospěšné pro ty, kteří se budou dále touto prací zabývat.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition.: Making recombinant DNA. *NCBI* [online]. USA: National Center for Biotechnology Information, 2000 [cit. 2017-01-10]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21881/>
- [2] GRÄSLUND, Susanne, Pär NORDLUND, Johan WEIGELT, et al. *Protein production and purification*. *Nature Methods* 2008, **5** (2), 135-146. DOI: 10.1038/nmeth.f.202. Protein. ISSN: 1548-7105. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nmeth.f.202>
- [3] PORRO, Danilo, Brigitte GASSER, Tiziana FOSSATI, Michael MAURER, Paola BRANDUARDI, Michael SAUER a Diethard MATTANOVICH. *Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, Volume 89, Number 4, Page 939 DOI: 10.1007/s00253-010-3019-z. ISBN 10.1007/s00253-010-3019-z. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-010-3019-z>
- [4] SØRENSEN, Hans. *Towards universal systems for recombinant gene expression*. *Microbial Cell Factories*. 2010, **9**:27. DOI: 10.1186/1475-2859-9-27. ISBN 10.1186/1475-2859-9-27. Dostupné také z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-9-27>
- [5] WESTERS, Lidia, Helga WESTERS a Wim J. QUAX. *Bacillus subtilis as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2004, **1694**(1-3), 299-310. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2004.02.011. ISSN 01674889. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488904000837>
- [6] BÖER, Erik, Gerhard STEINBORN, Gotthard KUNZE a Gerd GELLISSEN. *Yeast expression platforms*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, Volume 77, Number 3, Page 513 DOI: 10.1007/s00253-007-1209-0. ISBN 10.1007/s00253-007-1209-0. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-007-1209-0>

[7] FORSBURG, Susan L. THE YEASTS SACCHAROMYCES CEREVISIAE AND SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE: MODELS FOR CELL BIOLOGY RESEARCH. *Gravitational and Space Biology*. 2005, 18(2), 3-9.

[8] SUDBERY, Peter E. The expression of recombinant proteins in yeasts. *Current Opinion in Biotechnology*. 1996, 7, 517-524. ISSN 0958-1669.

[9] LIU, Zihe, Keith E.J. TYO, José L. MARTÍNEZ, Dina PETRANOVIC a Jens NIELSEN. *Different expression systems for production of recombinant proteins in Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 109: 1259–1268. DOI: 10.1002/bit.24409. ISBN 10.1002/bit.24409. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.24409>

[10]SPOHNER, Sebastian C., Vivienne SCHAUM, Hendrich QUITMANN a Peter CZERMAK. *Kluyveromyces lactis: An emerging tool in biotechnology*. *Journal of Biotechnology*. 2016, 222, 104-116. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.02.023. ISBN 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x. ISSN 01681656. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816561630075X>

[11]Vektory. *Masarykova Univerzita* [online]. Masarykova Univerzita, 2017 [cit. 2017-02-1]. Dostupné z: <http://is.muni.cz/el/1431/jaro2008/Bi6400/um/Vektory08.txt?lang=cs>

[12]ZATLOUKALOVÁ, Simona. *Příprava nestrukturovaných proteinů zapojených do tvorby matrice zubní skloviny*. Pardubice, 2016. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce RNDr. Olga Heidingsfeld, Ph.D.

[13]FORSBURG, Susan L. THE YEASTS SACCHAROMYCES CEREVISIAE AND SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE: MODELS FOR CELL BIOLOGY RESEARCH. *Gravitational and Space Biology*. 2005, 18(2), 3-9.

[14]WALD, Tomáš, Lucie BEDNÁROVÁ, Radim OSIČKA, Petr PACHL, Miroslav ŠULC, Stale Petter LYGSTADAAS, Ivan SLABY a Jiří VONDRÁŠEK. *Biophysical characterization of recombinant human ameloblastin*. *European Journal of Oral Sciences*.

Singapore, 2011, **119**(1), 261-269. DOI: 10.1111/j.1600-0722.2011.00913.x. ISBN 10.1111/j.1600-0722.2011.00913.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0722.2011.00913.x>

[15]KOLLER, A., VALESCO, J. and SUBRAMANI, S. (2000), The *CUPI* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* is inducible by copper in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 16: 651–656. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(200005)16:7<651::AID-YEA580>3.0.CO;2-F

[16]LACHANCE, M. *Current status of Kluyveromyces systematics*. *FEMS Yeast Res.*7 (5), 642–645. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00197.x. ISBN 10.1111/j.1567-1364.2006.00197.x. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2006.00197.x>

[17]NONKLANG, S., B. M. A. ABDEL-BANAT, K. CHA-AIM, N. MOONJAI, H. HOSHIDA, S. LIMTONG, M. YAMADA a R. AKADA. *High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with Linear DNA in the Thermotolerant Yeast Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (24),7514–7521. DOI: 10.1128/AEM.01854-08. ISBN 10.1128/AEM.01854-08. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.01854-08>

[18]JOHANNES H. DE WINDE (EDITOR). *Functional genetics of industrial yeasts: Topics in Current Genetics*. vol. 2. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2003. ISBN 978-364-2056-970.

[19]*DiAkr* [online]. diArk 3.0 Team, 2017 [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: [http://www.diark.org/diark/species\\_list/Kluyveromyces\\_lactis\\_NRRL\\_Y-1140](http://www.diark.org/diark/species_list/Kluyveromyces_lactis_NRRL_Y-1140)

[20]CEREGHINO, Joan Lin a James M. CREGG. *Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 2000; 24 (1): 45-66. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x. ISBN 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>

[21]MACAULEY-PATRICK, Sue, Mariana L. FAZENDA, Brian MCNEIL a Linda M. HARVEY. *Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system*. DOI: 10.1002/yea.1208. ISBN 10.1002/yea.1208. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/yea.1208>

[22]OBOŘIL, Michal. *Optimalizace exprese rekombinantních proteinů v kvasince Pichia pastoris*. Brno, 2010. Diplomová práce. MASARYKOVA UNIVERZITA V BRNĚ Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Mgr. Janu Lochmanovi, Ph.D.

[23]PETROŠ, Vojtěch. *Heterologní exprese kryptogeinu K13V a testování jeho biologické aktivity*. Brno, 2016. Bakalářská práce. MASARYKOVA UNIVERZITA PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA ÚSTAV BIOCHEMIE. Vedoucí práce Mgr. Jan Lochman, Ph.D.

[24]JAHIC, M. *Pichia Pastoris: A Platform Organism To Produce Proteins*. Wilmington, DE, USA: DuPont Central Research and Development, 2012.

[25]CHUN, Y.- H. P., Y. YAMAKOSHI, F. YAMAKOSHI, M. FUKAE, J. C.- C. HU, J. D. BARTLETT a J. P. SIMMER. Cleavage Site Specificity of MMP-20 for Secretory-stage Ameloblastin. *J Dent Res*. 2010, **89**(8), 785-790. DOI: 10.1177/0022034510366903. ISBN 10.1177/0022034510366903. Dostupné také z: <http://jdr.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0022034510366903>

[26]IWATA, T., Y. YAMAKOSHI, Hu. J C-C, I. ISHIKAWA, et al. *Processing of Ameloblastin by MMP-20*. *Journal of Dental Research*. 2007, **86**(2), 153-157.

[27]WALD, T., A. OSICKOVA, M. SULC, et al. *Intrinsically Disordered Enamel Matrix Protein Ameloblastin Forms Ribbon-like Supramolecular Structures via an N-terminal Segment Encoded by Exon 5*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. USA: The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2013, **288**(31), 22333–22345. DOI: 10.1074/jbc.M113.456012. ISBN 10.1074/jbc.M113.456012. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M113.456012>

[28] AMBN ameloblastin [ Homo sapiens (human) ]. *NCBI* [online]. USA: National Center for Biotechnology Information, 2016 [cit. 2017-01-3]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/258>

[29] MACDOUGALL, Mary, Darrin SIMMONS, Ting Ting GU, Kristina FORSMAN-SEMB a Michael MESBAH. Cloning, characterization and immunolocalization of human ameloblastin. *European Journal of Oral Science*. UK, 2000, **108**, 303-310. ISSN 0909-8836.

[30] PERDIGÃO, P.F, R.S GOMEZ, F.J.G.S PIMENTA a L DE MARCO. Ameloblastin gene (AMBN) mutations associated with epithelial odontogenic tumors. *Oral Oncology*. 2004, **40**, 841-846. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2004.03.004. ISBN 10.1016/j.oraloncology.2004.03.004. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368837504000843>

[31] UniProtKB - Q9NP70 (AMBN\_HUMAN). *UniProt* [online]. USA, 2002 [cit. 2017-01-5]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NP70>

[32] ZHANG, Xu, Thomas G. H. DIEKWISCH a Xianghong LUAN. Structure and function of ameloblastin as an extracellular matrix protein: adhesion, calcium binding, and CD63 interaction in human and mouse. *European Journal of Oral Sciences*. Singapore, 2011, **119**(1), 270-279. DOI: 10.1111/j.1600-0722.2011.00889.x. ISBN 10.1111/j.1600-0722.2011.00889.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0722.2011.00889.x>

[33] SAITO, Noriko, Wataru ARIYOSHI, Toshinori OKINAGA, Mariko KAMEGAWA, Miho MATSUKIZONO, Yasuo AKEBIYAMA, Chiaki KITAMURA a Tatsuji NISHIHARA. Inhibitory effects of ameloblastin on epithelial cell proliferation. *Archives of oral biology*. 2014, **59**, 835-840. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2014.05.010. ISBN 10.1016/j.archoralbio.2014.05.010. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003996914001125>

[34] TAMBURSTUEN, Margareth V., Janne E. RESELAND, Axel SPAHR, Steven J. BROOKES, Gunnar KVALHEIM, Ivan SLABY, Malcolm L. SNEAD a S. Petter



LYNGSTADAAS. Ameloblastin expression and putative autoregulation in mesenchymal cells suggest a role in early bone formation and repair. *Bone*. 2011, **48**, 406-413. DOI: 10.1016/j.bone.2010.09.007. ISBN 10.1016/j.bone.2010.09.007. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328210014523>

[35]ATSAWASUWAN, Phimon, Xuanyu LU, Yoshihiro ITO, Youbin ZHANG, Carla A. EVANS, Xianghong LUAN a Chi ZHANG. Ameloblastin Inhibits Cranial Suture Closure by Modulating Msx2 Expression and Proliferation. *PLoS ONE*. 2013, **8**(4), e52800. DOI: 10.1371/journal.pone.0052800. ISBN 10.1371/journal.pone.0052800. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0052800>

[36]MSX2 gene: msh homeobox 2. *Genetic Home Reference* [online]. USA, 2017 [cit. 2017-01-20]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MSX2>

[37]FUKUMOTO, Satoshi, Aya YAMADA, Kazuaki NONAKA a Yoshihiko YAMADA. Essential Roles of Ameloblastin in Maintaining Ameloblast Differentiation and Enamel Formation. *Cells Tissues Organs*. 2005, **181**, 189-195. DOI: 10.1159/000091380. ISBN 10.1159/000091380. Dostupné také z: <http://www.karger.com/?doi=10.1159/000091380>

[38]SIERANT, Megan L. a John D. BARTLETT. *Stress Response Pathways in Ameloblasts: Implications for Amelogenesis and Dental Fluorosis*. *Cells*. 2012, **1** (3), 631-645. DOI: 10.3390/cells1030631. ISBN 10.3390/cells1030631. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2073-4409/1/3/631/>

[39]*In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual*. Takara Bio USA. Dostupné z: [www.clontech.com/xxclt\\_ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17497](http://www.clontech.com/xxclt_ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17497)

[40]*Easy Notecards* [online]. Terms & Policies, 2016 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: [http://www.easynotecards.com/notecard\\_set/3242#&ui-state=dialog](http://www.easynotecards.com/notecard_set/3242#&ui-state=dialog)

[41]Ruml (1997) *Laboratoře z genového inženýrství*. VŠCHT Praha.