

**UNIVERZITA PARDUBICE FAKULTA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**VYUŽITÍ CHAPERONŮ V PŘÍPRAVĚ MEDICINÁLNĚ
VÝZNAMNÝCH REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: David Hájek

VEDOUCÍ PRÁCE: RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.

2017

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**USE OF CHAPERONES IN THE PREPARATION OF
MEDICALLY SIGNIFICANT RECOMBINANT PROTEINS**

BACHELOR THESIS

AUTHOR: David Hájek

SUPERVISOR: RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.

2017

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **David Hájek**
Osobní číslo: **C14268**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Využití chaperonů v přípravě medicíně významných rekombinantních proteinů**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Prostudujte literaturu pojednávající o bakteriálních chaperonech, popište jejich strukturu a funkci v buňce.
2. V hlavní části popište možnosti příprav rekombinantních proteinů se zaměřením na prokaryontní expresní systém. Uveďte úskalí jednotlivých metod. Soustřeďte se především na proteiny využívané v humánní medicíně.
3. Ke studiu tématiky použijte hlavně zahraniční odbornou literaturu a informace společně se získanými experimentálními daty přehledně zpracujte podle pokynů a doporučení školitele.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Khov and Suntrarachun (2012) Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. Asian Pac.J. Trop. Biomed. 2, 159-162.
Baneyx (1999) Recombinant protein expression in Escherichia coli. Curr. Opin. Biotech. 10, 411-421.
Baneyx and Mujacic (2004) Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. Nat. Biotechnol. 22, 1399-13408.
Kuo, Tan, Ku, Hsu et al. (2013) Improving Pharmaceutical Protein Production in Oryza sativa. Int.J.Mol.Sci 14, 8719-8739. Další relevantní články vyhledejte pomocí standardních databází.

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

Katedra biologických a biochemických věd

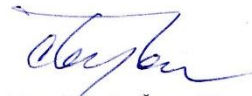
Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 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. 121/200 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 28. 6. 2017

David Hájek

Mé poděkování patří RNDr. Olze Heidingsfeldové, CSc. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala. Dále bych rád poděkoval své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Anotace:

Bakalářská práce se zabývá využitím chaperonů v přípravě medicínálně významných rekombinantních proteinů. Po stručném úvodu, který se věnuje vzniku proteinů, následuje kapitola zabývající se chaperony obecně. Tato kapitola vysvětluje, k čemu v buňce slouží a představuje základní komplexy chaperonů nacházející se v prokaryotické buňce. Další část práce je věnována rekombinantním proteinům, konkrétně historii a expresním systémům, ve kterých je možné rekombinantní proteiny produkovat. Následně jsou rozebrány jednotlivé části expresního vektoru, tedy například promotor, selekční marker, afinitní značka a další komponenty. V této kapitole je také uvedeno využití chaperonů k získání proteinů z inkluzních tělísek, do kterých se proteiny často formují při expresi v cizím hostiteli. Na konci práce jsou uvedeny kmeny bakterie *Escherichia coli*, které se často používají k výrobě rekombinantních proteinů. V samotném závěru jsou poté uvedeny jednotlivé proteiny, které se mohou vyrábět rekombinantní technologií v prokaryotické buňce.

Klíčová slova:

chaperony, rekombinantní proteiny, *Escherichia coli*, expresní vektor

Annotation:

The bachelor thesis is focused on usage of chaperones in the preparation of medically significant recombinant proteins. After the brief introduction about protein synthesis, the chapter about chaperones in general comes. This chapter explains the role of chaperones in the cell and introduces basic complexes of chaperones located in the prokaryotic cell. Next part of this thesis is devoted to recombinant proteins specifically to the history and expression systems, in which recombinant proteins can be produced. Then there is a part about each component of expression vectors, such as promoter, selection marker, affinity tag and other components. In this chapter is also mentioned usage of chaperons to obtain proteins from inclusion bodies into which proteins often form after expression in foreign host. At the end of this thesis strains of bacteria *Escherichia coli*, which are commonly used for production of recombinant proteins are described. At the very end individual proteins, which can be produced by recombinant technology in prokaryotic cells are described.

Key words:

chaperones, recombinant proteins, *Escherichia coli*, expression vector

Seznam použitých zkratk

3D	trojrozměrný
ADP	adenosindifosfát
APTG	<i>p</i> -amino-fenyl- β -D-thio-galactosidáza
ATP	adenosintrifosfát
AUG	adenin, uracil, guanin
BNP	mozkový natriuretický peptid
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
ColE1	kolistin E1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DsbA	thiol disulfid oxidoreduktáza
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GST	glutathion S-transferáza
HCl	kyselina chlorovodíková
hcn	high-copy-number
HGH	lidský růstový hormon
His-tag	polyhistidinová afinitní značka
Hsp	proteiny teplotního šoku
IgG	imunoglobulin G
IMAC	chelatační afinitní chromatografie
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
kDa	kilodalton
lac	laktóza

lcn	low-copy-number
MBP	maltózu vázající protein
MCS	multiple cloning site
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCS	protease cleavage site
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů
pre-rRNA	prekurzorová ribozomová ribonukleová kyselina
pre-tRNA	prekurzorová transferová ribonukleová kyselina
PTM	posttranslační modifikace
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomová ribonukleová kyselina
scFv	jednořetězový variabilní fragment
TAT	twin arginine translocation
TF	trigger factor
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
trp	tryptofan
UAC	uracil, adenin, cytosin

Obsah

0 Úvod.....	13
1 Proteosyntéza.....	14
1.1 Transkripce.....	14
1.2 Translace.....	14
2 Chaperony.....	16
2.1 Sbalování proteinů.....	16
2.2 Trigger factor.....	16
2.3 DnaK-DnaJ-GrpE.....	17
2.4 GroEL-GroES komplex.....	18
2.5 Degradace proteinů.....	20
3 Rekombinantní proteiny.....	21
3.1 Historie vzniku rekombinantních proteinů.....	21
3.2 <i>Escherichia coli</i> a její využití v expresi genů.....	21
3.3 Ostatní expresní systémy.....	22
3.3.1 Expresní systém kvasinek.....	22
3.3.2 Hmyzí expresní systém.....	22
3.3.3 Savčí expresní systém.....	22
4 Expresní vektor.....	24
4.1 Promotor.....	25
4.1.1 <i>lac</i> promotor a jeho deriváty.....	25
4.1.2 T7 promotor.....	25
4.1.3 <i>cspA</i> promotor.....	26
4.2 Selekční marker.....	28
4.2.1 <i>bla</i> gen.....	28
4.2.2 <i>mfabI</i>	29
4.3 Afinitní značky.....	29
4.3.1 Protein A.....	29
4.3.2 LacZ.....	30
4.3.3 Polyhistidin.....	30
4.3.4 Glutathion S-transferáza.....	31
4.3.5 Maltózu vázající protein.....	32

5	<i>Escherichia coli</i> BL21 a BL21(DE3).....	33
6	Proteiny produkované rekombinantní technologií	34
6.1	Lidský inzulin	35
6.2	Lidský růstový hormon	36
6.3	Ferritin	37
6.4	anti-BNP scFv.....	38
7	Závěr.....	40
8	Seznam literatury	41

0 Úvod

Proteiny patří společně se sacharidy a lipidy k základním stavebním kamenům všech živých organismů. Jsou složeny z aminokyselin a vznikají procesem zvaným jako proteosyntéza. Aby mohl protein plnit svoji biologickou funkci, je nutné, aby všechny jeho struktury byly správně uspořádány a složeny. K tomu mohou být nápomocné chaperony. Chaperony jsou proteiny umístěné převážně v cytoplazmě buňky, kde napomáhají úspěšnému složení proteinu do své sekundární a terciární struktury a také chrání vzniklý protein před agregací s ostatními proteiny nebo molekulami.

Díky tomu jsou chaperony také velmi často používány při přípravě proteinů pomocí rekombinantní technologie. Rekombinantní proteiny jsou proteiny vznikající umělým spojením dvou molekul DNA, respektive jednotlivých genů, kódujících bílkoviny. Takto vzniklé proteiny jsou dnes užívány v mnoha odvětvích od zemědělství počínaje a medicínou konče. Právě v medicíně přinesla výroba proteinů uměle značné výhody jako například snížení ceny nebo zvýšení množství výtěžku, oproti metodám, používaným v minulosti.

1 Proteosyntéza

1.1 Transkripce

Vzniku proteinů předchází několik významných kroků, jež můžeme souhrnně nazvat jako proteosyntéza. Na počátku se DNA transkribuje, neboli přepíše na RNA. Transkripci katalyzuje enzym DNA-dependentní RNA-polymeráza, někdy též zkráceně zvaná RNA-polymeráza. RNA-polymeráza hraje důležitou roli při výrobě dlouhých primárních transkriptů, které se skládají z promotoru, strukturních genů a terminátoru. Mezi primární transkripty řadíme messengerovou ribonukleovou kyselinu (mRNA), nepodléhající u bakterií posttranskripčním úpravám. Další primární transkripty, které už ale podléhají posttranskripčním úpravám jsou prekurzorová transferová ribonukleová kyselina (pre-tRNA), z níž vzniká tRNA a prekurzorová ribozomová ribonukleová kyselina (pre-rRNA), z které vzniká rRNA. mRNA, jenž vzniká na základě komplementarity bazí, slouží jako vzor pro výrobu peptidového řetězce na ribozomu. To, že se může mRNA vázat k ribozomům, zajišťuje přepis Shineovy-Dalgarnovy sekvence.

1.2 Translace

Aby mohla začít další fáze proteosyntézy, tedy translace, musí se nejdříve aktivovat aminokyselina, která bude vázaná na tRNA. Aktivace aminokyseliny spočívá v navázání aminokyseliny na svou specifickou tRNA pomocí makroergické vazby. Spojení aminokyseliny a specifické tRNA se nazývá aminoacyl-tRNA a je katalyzováno enzymem aminoacyl-tRNA-syntetázou. Po aktivaci aminokyseliny tedy začíná samotná translace, a to konkrétně jejím prvním krokem, kterým je iniciace. Iniciace spočívá ve vytvoření iniciačního komplexu. Ten sestává z ribozomu, molekuly mRNA a molekuly tRNA s navázanou aminokyselinou. Uvnitř ribozomu se spojí kodon mRNA s antikodonem tRNA. Například kodon AUG na mRNA se spojí s antikodonem UAC na tRNA, obsahující aminokyselinu methionin. Iniciace většinou začíná právě kodonem AUG, proto se také nazývá jako start kodon. Na iniciaci navazuje druhý krok translace a tím je elongace, spočívající v navazování ostatních aminokyselin a postupném vytváření polypeptidového řetězce, který vzniká spojením jednotlivých

aminokyselin. Celá translace je ukončená terminací, kdy dojde k uvolnění polypeptidového řetězce z ribozomu. Konkrétně translaci ukončuje stop kodon.

Prokaryotický ribozom se skládá ze dvou podjednotek. Podjednotka 30S, na níž je umístěno vazebné místo pro mRNA a podjednotka 50S, která je větší než 30S a je na ní umístěno vazebné místo pro aktivovanou aminokyselinu společně s tRNA. Z peptidylového místa, umístěného částečně na obou podjednotkách, postupně vystupuje řetězec prodlužující se o jednu aminokyselinu. Tento řetězec je nově vznikající protein a translace je tedy u konce. Výsledkem translace je překlad genetické informace do primární struktury proteinu. Aby výsledný protein byl plně účinný, je nutné, aby se složil do své sekundární a terciární struktury. Struktura terciární, někdy též nazývaná jako 3D struktura, hraje zásadní roli při biologické funkci proteinu a je pro ni nutné, aby byla složena správně [1,2].

2 Chaperony

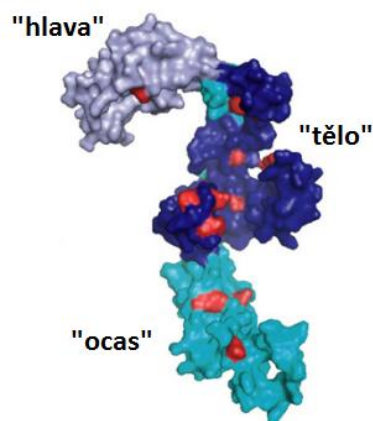
2.1 Sbalování proteinů

Sbalování proteinů, neboli folding (z anglického slova fold = složit), je proces při kterém vzniká sekundární a terciární struktura proteinu.

Nově vznikající proteiny jsou vystaveny přeplněnému buněčnému prostředí, kde mohou jejich postranní řetězce interagovat s dalšími proteiny nebo molekulami, což může způsobit agregaci nebo špatné složení. Až 30 % nově syntetizovaných proteinů podléhá těmto interakcím a nevznikne z nich nativní konformace. Jedna ze strategií přírody, jak zabránit agregaci a špatnému složení je použití molekulárních chaperonů. Chaperony jsou proteiny, které mají schopnost rozpoznat nepřírozenou strukturu ostatních proteinů, pomáhají jim se složením a také je chrání před agregací. V bakteriální buňce, přesněji v jejím cytosolu, jsou tři základní komplexy molekulárních chaperonů, napomáhající úspěšnému složení nově vznikajícího polypeptidu. Jsou jimi: Trigger factor (TF), DnaK-DnaJ-GrpE a GroEL-GroES (ELS) komplex [3].

2.2 Trigger factor

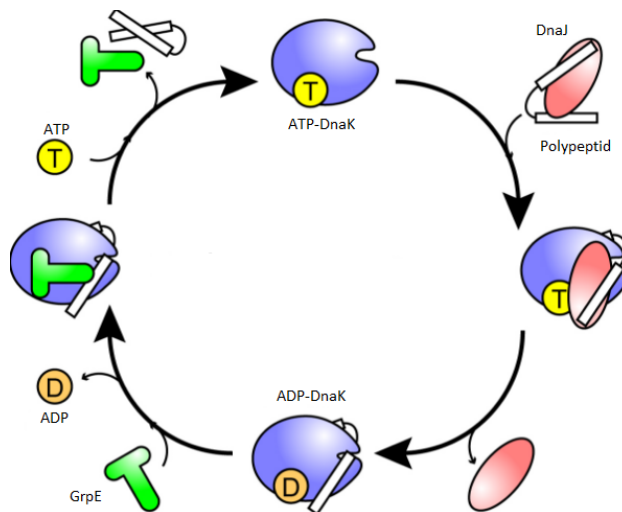
Trigger factor, je první chaperon, který začíná reagovat s nově vznikajícím řetězcem. TF, s molekulovou hmotností 48-kDa, se skládá ze tří domén, jež ve výsledné 3D struktuře připomínají tvarem draka. První doména zvaná N-terminální doména se spojuje s ribozomovou podjednotkou 50S a tvoří „ocas“ TF draka. Konec N-terminální domény se připojuje hned vedle místa vzniku polypeptidového řetězce, a proto je schopen dobře se s ním spojit ihned po výstupu z ribozomu. Druhá doména trigger faktoru se nazývá centrální doména. Centrální doména, regulující mimo jiné aktivitu peptidyl-prolyl cis/trans isomerázy, je umístěna nejvzdáleněji od vznikajícího řetězce a označuje se také jako „hlava“ TF draka. Poslední doména se nazývá C-terminální doména. Skládá se ze dvou ramen a je ze všech tří částí, co se rozměru týče největší. Jelikož je ve 3D projekci uprostřed, označuje se také jako „tělo“ draka. C-terminální doména je spojena s N-doménou a Centrální doménou pomocí krátkých úseků aminokyselin, tzv. linkerů. Izolovaná C-terminální doména je na rozdíl od ostatních domén schopna *in vitro* vykazovat chaperonovou aktivitu [3,4].



Obr. 1: 3D struktura Trigger faktoru připomínající tvarem draka. Světle modrá barva značí N-terminální doménu, tedy „ocas“ draka. Světle šedá je znázorněna „hlava“ draka, což je centrální doména. Obě domény spojuje „tělo“ draka, značené tmavě modrou barvou příslušící C-terminální doméně (upraveno) [4].

2.3 DnaK-DnaJ-GrpE

Dalším systémem, který napomáhá správnému složení polypeptidu v bakteriálním cytosolu je DnaK-DnaJ-GrpE chaperonový systém. Tyto proteiny se řadí do rodiny Hsp70. Zkratka Hsp znamená heat shock proteins, tedy proteiny teplotního šoku a jejich syntéza je zvýšena, pokud buňka čelí nepříznivým podmínkám, jako jsou například změna teploty, účinek toxických látek či změna pH. Číslo 70 značí molekulovou hmotnost proteinu, tedy 70-kDa. Hlavní úlohou DnaK-DnaJ-GrpE systému je oprava špatně složených proteinů, ovšem dokáže se vázat i na nově vznikající proteiny, kterým pomáhají se přemístit z cytosolu do jiných částí buňky. DnaK se naváže na hydrofobní části polypeptidového řetězce společně s ATP. Na toto spojení se naváže také DnaJ. Po navázání DnaJ se ATP přemění na ADP, který má vysokou afinitu k substrátu. Následně se uvolní DnaJ. Po uvolnění DnaJ se připojí GrpE, jenž uvolňuje ADP z DnaK. Na konec se může opět připojit ATP za odštěpení GrpE a celý cyklus se může znovu opakovat. Konec cyklu nastává, pokud se protein úspěšně složí do své nativní konformace, nebo ve chvíli, kdy je polypeptid uvolněn do ELS komplexu. Celý tento cyklus se nazývá ATP hydrolyzující kruh a je schematicky znázorněn na (obr. 2) [3,5].

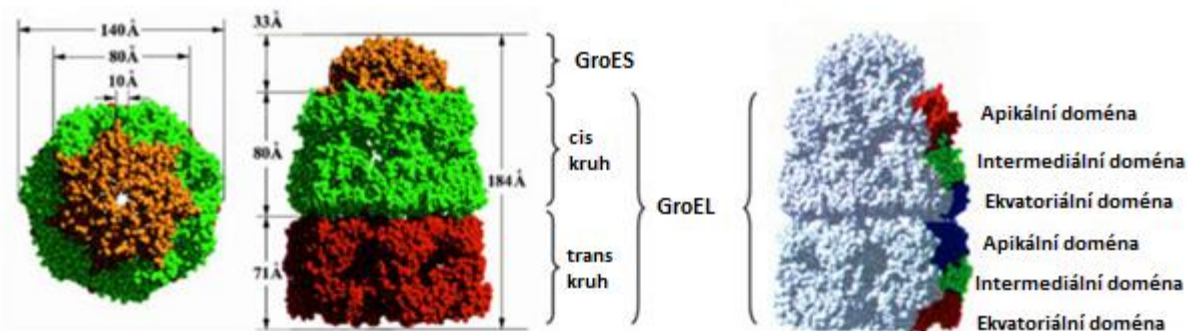


Obr. 2: ATP hydrolyzující kruh a DnaJ-DnaK-GrpE chaperonový systém (upraveno) [6].

2.4 GroEL-GroES komplex

Komplex GroEL-GroES sestává, jak už z názvu vyplývá ze dvou částí. První z nich je GroEL komplex, složený ze dvou navzájem propojených sedmidílných kruhů, tedy v součtu je složen ze 14 podjednotek s molekulovou hmotností 57-kDa na jednu podjednotku. Každá podjednotka je dále složena ze tří domén, konkrétně apikální, ekvatoriální a intermediální. Apikální doména GroEL komplexu je flexibilní, zodpovídající za navázání proteinu a GroES ke komplexu. Ekvatoriální doména připojuje a hydrolyzuje ATP. A nakonec doména intermediální, která je umístěna uprostřed a kovalentně spojuje obě dvě domény.

Druhá část komplexu se nazývá GroES. Je tvořena 7 podjednotkami s molekulovou hmotností 10-kDa a po navázání na GroEL celý komplex uzavírá. Pro lepší představu využijeme (obr. 3).



Obr. 3: Struktura GroEL-GroES komplexu. Hnědá barva značí GroES komplex navázaný na komplex GroEL složený ze zelené barvy příslušící cis-kruhu a tmavě červené barvě znázorňující trans-kruh GroEL komplexu. První obrázek zleva je pohled ze shora na celý GroEL-GroES komplex, obrázky uprostřed a napravo ukazují boční pohled. Symbol Å, značí jednotku angstrom, což je jednotka délky odpovídající 0,1 nm pro hodnotu jednoho angstromu. (upraveno) [3].

GroEL-GroES systém může proteiny složit dvěma cestami. První z nich je cis-folding, odehrávající se na cis-kruhu GroEL komplexu, kde se skládají převážně menší proteiny (pod 70kDa). Na druhém sedmidílném kruhu probíhá trans-folding, jenž slouží převážně ke složení větších proteinů anebo zde může docházet k degradaci proteinů, které již nemohou dosáhnout své nativní konformace. Cis a trans kruhy jsou od sebe odděleny, takže se proteiny nemohou na jednom konci navázat a na druhém opustit GroEL komplex. Všechny kroky úspěšného složení tedy probíhají odděleně buď v cis anebo trans kruhu.

Apikální doména zachytí špatně sbalený protein, načež se uzavře GroEL komplex navázáním GroES a molekuly ATP na ekvatoriální doménu. Uzavřený GroEL-GroES systém společně s navázanou molekulou ATP způsobí pohyb apikální domény nahoru a následnou rotaci o 120°. Díky těmto změnám se zvětší prostor v centrální dutině, kam se uvolní protein, který byl navázaný na apikální doméně. Centrální dutina může protein skládat pasivně, kdy jednoduše odstraňuje špatně složené části polypeptidu. V tomto případě můžeme hovořit o tzv. „Anfinsenově kleci“ (Christian Anfinsen obdržel roku 1972 Nobelovu cenu za chemii) [7]. Anebo se snaží aktivně odstranit energetické bariéry reorganizací vazeb. Po správném složení proteinu se ATP hydrolyzuje na ADP, což vede k uvolnění GroES a nově vzniklého proteinu z GroEL komplexu do prostředí buňky. Hydrolyza ATP na cis-kruhu vede k navázání další molekuly ATP, tentokrát již na trans-kruh GroEL komplexu, kde se může navázat další nově vznikající nebo již špatně složený polypeptid [3].

2.5 Degradace proteinů

Proteiny, které se nepodaří ani jedním mechanismem správně sbalit, je nutné z důvodu negativního vlivu na buňku, rozložit na jejich základní stavební kameny, tedy aminokyseliny. Aminokyseliny mohou být dále využity v metabolismu buňky nebo také k opětovné výrobě nových proteinů. Degradace může probíhat pomocí proteazomu, což je proteinový komplex nacházející se jak v eukaryotické, tak prokaryotické buňce [8]. V prokaryotické buňce nacházíme pět ATP-dependentních proteáz, které se podobají proteazomu, jenž je charakteristický spíše pro eukaryota. Konkrétně jimi jsou: Lon, ClpYQ/HslUV, ClpAP, ClpXP a FtsH, jenž jsou doprovázeny peptidázami, které hydrolyzují krátké sekvence bílkovin. Tyto proteázy obsahují remodelující komponenty nebo domény, které se naváží na špatně složené proteiny a několik ATP, hydrolyzující rozkládání těchto špatně složených proteinů. Například Lon, zodpovědný za hromadnou bílkovinnou degradaci, je serinová proteáza, skládající se ze tří částí. První z nich N-koncová část se spojuje se substrátem, zatímco centrální a C-koncová část zodpovídají za aktivitu ATP a s ní spojený rozklad proteinů [9].

3 Rekombinantní proteiny

Rekombinantní proteiny vznikají umělým spojením dvou molekul DNA, respektive jednotlivých genů, kódujících bílkoviny. Inzert, jenž obsahuje geny pro rekombinantní protein je vložen do DNA jiného organismu, takzvaného vektoru, který tento inzert přijme a začne produkovat rekombinantní protein. Příklad můžeme uvést produkci lidského inzulínu v buňkách bakterií. V tomto případě můžeme také o proteinu říci, že je heterologní, to znamená, že je produkován v organismu, pro který není přirozený, tedy lidský protein v bakteriální buňce. Další organismy, ve kterých můžeme provést expresi genu, jsou rostliny, hmyz nebo savčí buňky [13,15,37].

3.1 Historie vzniku rekombinantních proteinů

Vznik rekombinantní DNA technologie se datuje na počátek sedmdesátých let minulého století, kdy se dá s jistotou říci, že tato technologie přinesla revoluci v molekulární biologii. Ještě více na významu získala tato metoda se vznikem polymerázové řetězové reakce (PCR, z anglického Polymerase Chain Reaction), jež umožňuje rychlé namnožení úseků DNA [10]. Stanley Cohen ze stanfordské univerzity a Herbert Boyer z kalifornské univerzity v San Francisku získali roku 1980 patent na komerční využití metody pro klonování prakticky všech možných DNA a vektorů [11]. Dozajista nejvíce popsaným a nejdříve studovaným organismem pro expresi genu je bakterie *Escherichia coli* [12].

3.2 *Escherichia coli* a její využití v expresi genů

Escherichia coli (*E. coli*) je gram-negativní bakterie úzce spjatá s technologií rekombinantních proteinů. První pokusy o vytvoření rekombinantního proteinu byly prováděny právě na *E. coli* a když vezmeme v potaz, že je tomu již přes půl století, nedá se divit, že právě ona patří k bakteriím, s nejlépe popsaným genomem. Tento fakt je dozajista jedna z mnoha výhod a příčin, proč je dnes stále hojně používána při genetické manipulaci a průmyslové výrobě proteinů terapeutického a komerčního využití. Pokud hovoříme o výhodách, určitě nesmíme opomenout jejich rychlý růst na levných půdách, rychlou akumulaci biomasy, vysoký výtěžek a jednoduchost systému, jelikož se jedná o bakterii [9,13]. Co se nevýhod týče, tak problém nastává s proteiny, které se po translaci modifikují. Složitější proteiny, u kterých probíhá posttranslační

modifikace (PTM) tedy nelze v *E. coli* a ostatních prokaryotických systémech exprimovat. Mezi PTM řadíme fosforylaci, glykosylaci, ubikvitinaci a další modifikace, kdy dochází k úpravě vzniklého proteinu po translaci [14].

3.3 Ostatní expresní systémy

Jak již bylo řečeno na začátku odstavce o rekombinantních proteinech, prokaryotní expresní systém, reprezentující *E. coli*, není jediným systémem, kde se využívá technologie rekombinantní DNA.

3.3.1 Expresní systém kvasinek

Kvasinky představují další systém, který se velmi často využívá. Svoji složitější strukturou a obsahem organel jsou řazeny již mezi eukaryotické organismy, proto u nich můžeme provést některé posttranslační modifikace, konkrétně glykosylaci. K tomu můžeme přičíst poměrně rychlý růst na jednoduchých půdách, nízkou cenu a vysokou výtěžnost jako u prokaryot. Jelikož je to opět hojně využívaný organismus, i zde nacházíme velmi dobře popsanou genomovou strukturu. Jako nevýhodu lze určitě uvést hyperglykosylaci manosou, tedy hypermanosylaci, což je připojení velkého množství manosy k proteinu. Hypermanosylace následně může způsobit problémy při sbalování proteinu, což má negativní dopad na aktivitu proteinu. Nejčastěji používanou kvasinkou je rod *Saccharomyces* [15].

3.3.2 Hmyzí expresní systém

Produkce rekombinantních proteinů v hmyzím expresním systému je spjata s bakulovirem. Tento virus napadá hmyzí buňky dospělých jedinců nebo jejich larev. Virus je infekční pouze pro bezobratlé živočichy, obratlovcům nijak neškodí, takže může být využit k rekombinaci jejich proteinů. Co se posttranslačních modifikací týče, hmyzí expresní systém nabízí větší možnosti oproti systému v *E. coli* nebo kvasinkách, ovšem musíme zde počítat s vyšší cenou a nižší výtěžností [15,16].

3.3.3 Savčí expresní systém

Evolučně nejmladším a zároveň nejdokonalejším expresním systémem pro savčí proteiny je bezesporu savčí expresní systém. V savčích buňkách by měly být exprimovány proteiny, vyžadující savčí PTM. Musíme ovšem dbát na druhová

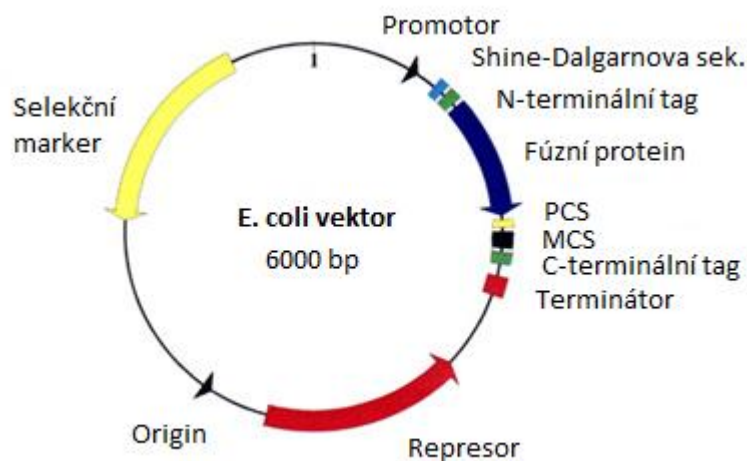
specifika. Například jsou zaznamenány rozdíly u glykosylace v buňkách hlodavců a lidských buňkách. Hlavní výhodou savčího expresního systému je tedy široká škála posttranslačních modifikací, ovšem s tím spojená časová náročnost a technická vybavenost pro produkci, která neposkytuje tak vysoké výtěžky. Cena celého procesu je tedy ze všech expresních systémů nejvyšší [15].

Po zvolení správného expresního systému následuje samotný proces vzniku rekombinantního proteinu. Z teoretického hlediska se může jednat o snadnou záležitost. Gen, který kóduje zvolený protein, vložíme do expresního vektoru, následně ho transformujeme do hostitelské buňky a buňku s vloženým genem necháme kultivovat. Po namnožení buněk spustíme samotnou syntézu heterologního proteinu pomocí vhodného induktoru. Na konec buňky sklídíme, vyčistíme protein a máme hotovo. V praxi je samozřejmě celý proces daleko složitější. V následujících odstavcích si přiblížíme, jak probíhá v prokaryotickém expresním systému, konkrétně v *E. coli* [13].

4 Expresní vektor

Expresní vektor je kruhová molekula DNA, tedy plazmid, obsahující charakteristické sekvence, díky kterým může proběhnout úspěšná exprese proteinu. To z něj dělá jeden ze základních nástrojů v molekulární biologii a genetickém inženýrství. Většina vektorů vychází z plazmidu ColE1, který pomáhá izolovat velké množství plazmidové DNA a také je nápomocný při purifikaci proteinů. ColE1, který kóduje produkci kolistinu E1, odtud také jeho název, je nejlépe popsáným nekonjugativním plazmidem. Konjugace je způsob výměny genetické informace mezi bakteriemi. ColE1 je high-copy-number (hcn) plazmid. To znamená, že dokáže vytvořit velké množství kopií, které, pokud nebudou regulovány, mohou ohrozit buňku. Samozřejmě existují i low-copy-number (lcn) plazmidy, které, co se regulace týče, nejsou tak složité [17,18].

Každý plazmid, používaný jako expresní vektor, by měl obsahovat sekvence znázorněné na (obr. 4).



Obr. 4: Vektor *E. coli* s jednotlivými sekvencemi. Origin – začátek replikace, Selekční marker – identifikace našeho vektoru, Promotor – začátek transkripce, Shine-Dalgarnova sekvence – začátek replikace, N-terminální a C-terminální tag – detekce, Fúzní protein – složený protein, PCS – protease cleavage site – odstranění tagů, MCS – multiple cloning site – místo pro vklonování genu, Terminátor – ukončuje transkripci, Represor – zastavuje transkripci (upraveno) [19].

4.1 Promotor

4.1.1 *lac* promotor a jeho deriváty

Základním prokaryotickým promotorem je *lac* promotor, základní komponenta *lac* operonu. Laktózový (*lac*) operon je důležitý pro metabolismus laktózy, odtud také jeho název [20]. Laktóza způsobuje indukci systému a tak může být tento cukr použit při produkci proteinů. Indukce je ztížena v přítomnosti cukrů, které snadno metabolizují uhlíkové zdroje, jako například glukózy. Proto pokud je současně přítomna laktóza i glukóza, *lac* promotor neplní naplno svojí funkci do té doby, dokud není glukóza užitečkována. Při nízké hladině glukózy je produkován cyklický adenosin monofosfát (cAMP), který je důležitý pro celkovou aktivitu *lac* operonu [21]. K dosažení exprese v přítomnosti glukózy byl vytvořen mutantní promotor *lacUV5*. Nicméně *lac* promotor ani jeho derivát *lacUV5* nejsou kvůli své slabosti při výrobě rekombinantních proteinů tak často používány. Aby se využilo výhod *lac* promotoru a byl získán silný promotor, vzniknul za tímto účelem syntetický hybrid *tac* promotor. Ten je složen z 35 částí tryptofanového (*trp*) promotoru a 10 částí *lac* promotoru. Tento hybrid je přibližně 10x silnější než promotor *lacUV5* [17].

4.1.2 T7 promotor

T7 promotor produkovaný v pET vektoru je velice populární pro expresi rekombinantních proteinů. V tomto systému je gen našeho zájmu klonován za T7 promotor, na který nasedá T7 RNA polymeráza, pocházející z bakteriofága λ . Systém může být indukován laktózou nebo jejím nehydrolyzovatelným analogem, kterým je isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid (IPTG). IPTG nicméně není příliš vhodný pro produkci velkého množství lidských terapeutických proteinů, z důvodu toxicity a vysoké ceny [22]. Exprese může být kontrolována T7 lysozymem, jenž se váže na T7 RNA polymerázu a tím může inhibovat transkripci T7 promotoru. Kontrola T7 lysozymu spočívá v hlídání množství vyprodukované mRNA, která by při nadbytku mohla způsobit destrukci ribozomu nebo smrt buňky. pET totiž patří k systémům, které produkují velké množství mRNA [13].

4.1.3 *cspA* promotor

T7 promotor a ostatní silné promotory jsou často limitovány skutečností, že protein našeho zájmu není schopen dosáhnout nativní konformace, kdy se protein částečně nebo kompletně usadí do formy zvané inkluzní tělíska. Tento problém může být vyřešen použitím promotoru, aktivovaným teplotním skokem z teploty vyšší na nižší nebo použitím fúzní proteinové technologie. Konec konců skládání proteinů probíhá lépe při nižších teplotách, kdy vznikají stabilnější proteiny díky hydrofobním interakcím, s čímž také souvisí aktivita chaperonů [22]. Poměrně dobře popsáným promotorem aktivovaným při snižující se teplotě je *cspA* promotor. *cspA* promotor je potlačován při teplotě 37°C a výše, naopak při nižších teplotách a to dokonce kolem 10°C si zachovává svojí funkci. Značnou nevýhodou toho promotoru je fakt, že jeho funkce začíná být potlačována 1-2 hodiny po teplotní změně [13].

4.1.3.1 Inkluzní tělíska

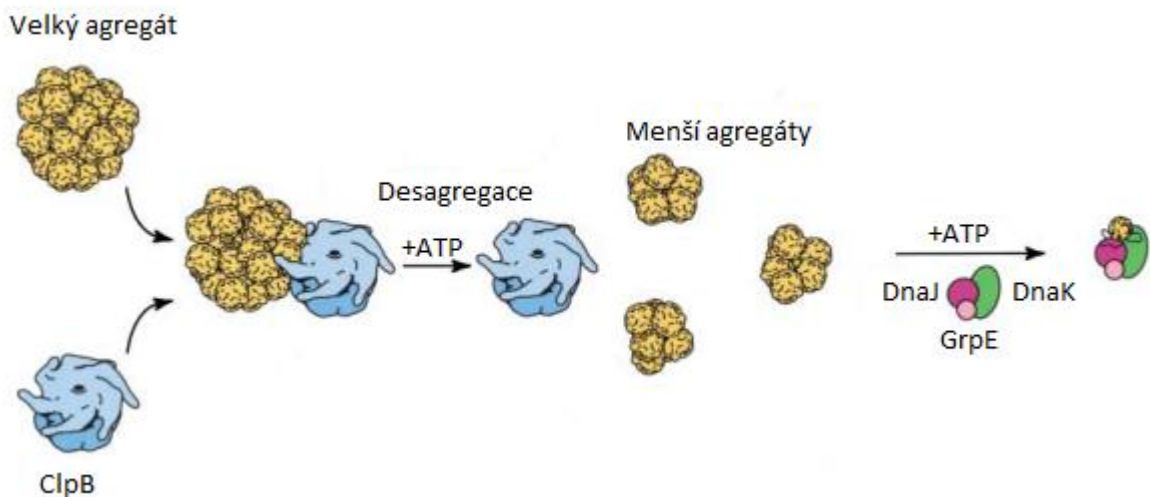
Výše zmíněná inkluzní tělíska jsou intracelulární proteinové agregáty, které vznikají, jak již bylo uvedeno, z proteinů, které nedokáží dosáhnout své nativní konformace a mohly by tak ohrozit životaschopnost buňky [22]. Při expresi cizího genu do hostitelské buňky je nově vznikající rekombinantní protein exprimován do prostředí, které se může značně lišit oproti původnímu prostředí, ze kterého pochází. Rozdíly mohou být v pH, osmolaritě, redoxním potenciálu nebo také rozdílném mechanismu skládání. Inkluzní tělíska se akumulují v cytoplazmě nebo periplazmatickém prostoru, kde jsou často asociována s modulátory zapříčiňujícími úspěšně složení proteinu, jako jsou například chaperony DnaK nebo GroEL. Cytoplazmatická inkluzní tělíska jsou pórovité válce s maximální délkou dosahující 1 μm a objemem 0,6 μm^3 [9]. Díky tomu, že jsou rezistentní k proteolýze a obsahují velké množství relativně čistého materiálu, jsou často využívány k produkci proteinů, které jsou toxické, nestabilní nebo se dokáží opětovně složit [23].

4.1.3.2 Využití chaperonů k zabránění agregace a získání proteinů z inkluzních tělísek

K získání proteinů z agregované formy inkluzních tělísek nebo k zabránění vzniku této formy se využívají molekulární chaperony. Komerčně nejvíce používaný systém je chaperonový plazmidový set od firmy Takara [24]. Tento set obsahuje pět plazmidů umožňujících expresi jednotlivých chaperonů nebo jejich vzájemnou kombinaci. Nacházíme zde tedy chaperony, jejichž funkce byla popsána na začátku této práce: GroES-GroEL, DnaK-DnaJ-GrpE, Trigger factor nebo jejich kombinace: GroES-GroEL + DnaK-DnaJ-GrpE nebo také GroES-GroEL + Trigger factor [17].

Kromě těchto základních chaperonů nacházíme při stresových situacích v buňce ještě další, pomocné chaperony, lépe řečeno co-chaperony nebo v tomto případě také holding chaperony (holdazy). Ty se konkrétně neúčastní procesu skládání, ale jsou velice nápomocné právě při stresových situacích, kdy dochází k agregaci a vzniku inkluzních tělísek. Nejrozsáhleji charakterizovaná holdaza patří do malé Hsp rodiny. Je to holdaza IbpB, která společně se svým homologem IbpA je kódována na jednom operonu. IbpB tvoří velké oligomery a to tak, že při vyšší teplotě v buňce zachytává nesložené proteiny, konkrétně jejich hydrofobní části na povrchu proteinu. Po odeznění stresových podmínek se na tento komplex naváže DnaK, nebo pokud je to nutné se komplex transformuje do GroEL, kde je nesložený protein uvolněn a opět složen [9,25].

Nicméně pokud se nepodaří zabránit agregaci, je zde další chaperon připravený tento problém vyřešit a získat tak funkční protein. Na bakteriální desagregaci, což je opačný proces agregace, se podílí ClpB, jenž společně se svým eukaryotickým homologem Hsp104, mají schopnost zachránit stresem poničený protein z agregované formy. Tato záchrana probíhá tak, že ClpB se naváže na velké agregáty, s kterými interaguje, a následně vznikají menší agregáty, které rozpozná systém DnaK-DnaJ-GrpE, jenž dokáže tyto menší agregáty solubilizovat a následně z nich získat protein. Celý tento proces probíhá za účasti ATP. ClpB patří do rodiny Hsp100, kam také řadíme další ATPázy jako například ClpA, ClpX nebo ClpY, jež se účastní proteolýzy [9,26].



Obr. 5: Desagregace pomocí ClpB a následné interakce systému DnaK-DnaJ-GrpE s menšími agregáty (upraveno) [26].

4.2 Selekční marker

4.2.1 *bla* gen

Další důležitá část expresního vektoru je selekční marker. V expresním vektoru se nejvíce jako selekční marker používají geny zajišťující rezistenci na antibiotikum. Po přidání antibiotika buňky obsahující tyto geny dokáží přežít, ostatní buňky, které neobsahovaly geny zodpovědné za rezistenci na antibiotikum, na selekčním médiu vůbec nenarostou. Díky tomu dokážeme vyselektovat pouze buňky, respektive plazmidy našeho zájmu a ostatních se zbavit. Například gen, nesoucí rezistenci na β -laktamová antibiotika se nazývá *bla* gen, ten produkuje periplazmatický enzym β -laktamázu, jehož funkce spočívá v inaktivaci β -laktamového kruhu antibiotik. Nicméně značná nevýhoda je fakt, že pokud je β -laktamáza konstantně vylučována, nastává neustálá degradace antibiotik, které se po několika hodinové inkubaci spotřebují, a vznikne situace, kdy v našem médiu mohou růst buňky, které neobsahují gen pro rezistenci, protože je antibiotikum spotřebováno. Mezi β -laktamová antibiotika mající tento problém můžeme zařadit penicilin nebo ampicilin. Velmi dobrou alternativou se jeví tetracyklin, jenž se ukazuje velice stabilní během kultivace, protože jeho rezistence je založena na aktivním efluxu, tedy vylučování antibiotika z buňky a tím dochází k jeho neustálé obnově v médiu [27,28]. Blastocidin, hygromycin a zeocin můžeme uvést jako

další příklad antibiotik, nicméně jejich vysoká cena značně ovlivňuje jejich popularitu.

4.2.2 *mfabI*

Poměrně nově vzniklým selekčním markerem je *mfabI* (mutant *fabI*). Kromě toho, že je to úspěšný selekční marker také usnadňuje molekulární manipulaci s nestabilními sekvencemi pocházejícími ze savčího genomu, který pokud je replikován v bakteriálním hostiteli, může způsobit problémy a neefektivní replikaci. Triklosan (systematický název dle IUPAC: 5-chlor-2-[2,4-dichlorfenoxy]fenol) je syntetická chemikálie, chovající se jako inhibitor bakteriálního růstu při nízkých koncentracích. Při koncentracích vyšších, se chová jako biocid, tedy látka schopná usmrtit buňky. Triklosan svojí bakteriální aktivitu projevuje tak, že se naváže na bakteriální enzym FabI odpovídající za tvorbu lipidů v *E. coli*. Po navázání, triklosan tento enzym inhibuje a tím nedochází ke stavbě buněčných membrán. Pokud ale dojde k mutaci genu *fabI*, jenž dává vznik enzymu FabI, tak bakterie obsahující tento mutantní gen *mfabI*, budou moci růst v přítomnosti triklosanu, kdy u nich nebude docházet k inhibici enzymu. Z toho vyplývá, že se tento mutantní gen dá využít jako selekční marker [29].

4.3 Afinitní značky

Pokud potřebujeme čistý rozpustný aktivní rekombinantní protein, což potřebujeme ve většině případů, je výhodné mít prostředek, díky kterému můžeme tento protein detekovat. K tomuto účelu se využívají afinitní značky neboli afinitní tagy, které kromě detekce pomáhají dosáhnout maximální rozpustnosti a čistoty proteinu [30]. Afinitní značku můžeme umístit jak na N-konec, tak na C-konec proteinu. Na N-konec se umísťuje spíše signální sekvence pro sekreci rekombinantního proteinu a na C-konec připadají purifikační a detekční značky.

4.3.1 Protein A

První afinitní značky byly velké proteiny využívány výhradně pro expresi a purifikaci proteinu v *E. coli*. Jedním z nich je protein A vyskytující se na povrchu *Staphylococcus aureus*, jenž je 280 aminokyselin dlouhý. Díky této relativně velké velikosti a proteolytické stabilitě může zvyšovat rozpustnost a expresi heterologních

proteinů. Protein A společně s rekombinantním proteinem může být purifikován pomocí afinitní chromatografie na IgG Sepharoze a vymyt pomocí pufru o nízkém pH. Další možností izolování Proteinu A společně s proteinovým komplexem je využití FellI peptidu, na který je navázán biotin. Toto spojení nazývaná se Bio-Ox má vysokou afinitu vůči IgG. Bio-Ox soutěží s Proteinem A o vazebné místo na IgG, což umožní úspěšné uvolnění rekombinantního proteinu [31].

4.3.2 LacZ

LacZ, známá také jako β -galaktosidáza nebo β -gal, je další afinitní značka používána od začátku rekombinantní technologie v *E. coli*. Stejně jako Protein A má velkou velikost a to dokonce 1024 aminokyselin. Tato extrémní velikost LacZ může někdy způsobit změnu aktivity purifikovaného proteinu. LacZ fúzní protein může být purifikován pomocí afinitní chromatografie na imobilizované *p*-amino-fenyl- β -D-thio-galactosidáze (APTG) a vymyt borátovým pufrům s vysokým pH. Navíc, LacZ fúzní proteiny jsou často nerozpustné. Tato nerozpustnost má výhody i nevýhody. Mezi výhody se dá počítat, že cílový protein, který je formován do inkluzních tělísek, umožňuje expresi genu, jenž je toxický pro *E. coli* [31].

4.3.3 Polyhistidin

Ačkoliv Protein A a LacZ jsou dnes stále často používané afinitní značky, bylo vytvořeno mnoho dalších afinitních značek, které vylepšují vlastnosti těchto prvotních značek. Jednou z nich je polyhistidinová afinitní značka. Polyhistidinová afinitní značka, zkráceně His-tag neboli His-kotva, je většinou složena ze šesti histidinů, ale může být složena jak ze dvou tak až z deseti těchto aminokyselin. Polyhistidin byl poprvé použit k očištění galaktózy dehydrogenázy pomocí afinitní chromatografie, kde jako stacionární fáze byl použit kov. Tato technika má zkratku IMAC, z anglických slov immobilized metal affinity chromatography. His-kotva je dnes asi nejvíce používaná afinitní značka, z tohoto důvodu mnoho společností poskytuje expresní vektory a purifikační reagentie určené k práci právě s ní, čímž se její použití ještě více zvyšuje. Kovové ionty, s kterými histidin často tvoří vazby, jsou: Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} a Fe^{3+} . Nejvíce využívaný iont je iont Ni^{2+} [31]. V případě polyhistidinu celý proces purifikace proteinu probíhá tak, že na chromatografické koloně je umístěn kov, například právě Ni, na který se naváže His-kotva s námi studovaným proteinem. Po

následném promytí, kdy se odstraní nenavázaná proteiny, se uvolní His-kotva z proteinu. Toto uvolnění je docíleno pomocí imidazolu, jelikož ten má větší afinitu ke kovům, takže se naváže na His-kotvu a protein je následně uvolněn [32,33]. Podstatnou výhodou histidinové kotvy je možnost purifikovat proteiny, na které působí denaturační podmínky. Tím pádem, proteiny, které agregovaly do inkluzních tělísek mohou být snadno rozpuštěny vhodným činidlem jako například močovinou nebo pomocí guanidinu-HCl a následně purifikované na IMAC. Opětovné složení cílového proteinu je poté snadno provedeno bez interakce s ostatními proteiny. Navíc His-kotva je malá afinitní značka, takže se poměrně snadno zavádí do genu našeho zájmu pomocí polymerázové řetězové reakce [30].

4.3.4 Glutathion S-transferáza

Další často používanou afinitní značkou je glutathion S-transferáza (GST). Glutathion S-transferáza patří do rodiny enzymů umožňující přenos síry z glutathionu na sloučeniny obsahující nitro skupinu nebo halogenidy, což vede k jejich detoxikaci. Poprvé byla GST použita v pGEX expresním vektoru bakterie *E. coli* k expresi a purifikaci proteinu parazitické tasemnice ovčí, latinsky *Taenia ovis*. V současnosti jsou pGEX vektory dostupné ve všech možnostech čtecího rámce a s třemi odlišnými protease cleavage sites (trombin, faktor Xa a PreScission), kteří dokáží odstranit GST. Stejně jako His-kotva, tak i GST společně s proteinem našeho zájmu je purifikován pomocí afinitní chromatografie tentokrát s použitím imobilizovaného kofaktoru glutathionu. Jako první tuto možnost demonstroval Smith a jeho spolupracovníci, kteří využili této specifické interakce glutathionu a GST. Konkrétně dokázali to, že eukaryotické proteiny připojeny na C-konec GST mohou být úspěšně purifikovány z lyzátu *E. coli* právě pomocí afinitní chromatografie s využitím glutathionu. Co se týká GST fúzních proteinů agregovaných do inkluzních tělísek jejich následná renaturace je možná po použití 6M guanidinu-HCl a opět purifikována pomocí afinitní chromatografie. Nevýhoda glutathionu při afinitní chromatografii skýtá v tom, že má poměrně krátkou životnost. Konkrétně může být zregenerován a opět použit pouze mezi 4 – 20 pokusy. Pokud budeme hovořit o množství vyprodukovaných proteinů, GST fúzní proteiny jsou exprimovány ve velkém množství v *E. coli* s průměrným výtěžkem kolem 10 mg/l. S tímto vysokým výtěžkem je samozřejmě spjata akumulace agregovaných proteinů v inkluzních těliscích [30,31].

4.3.5 Maltózu vázající protein

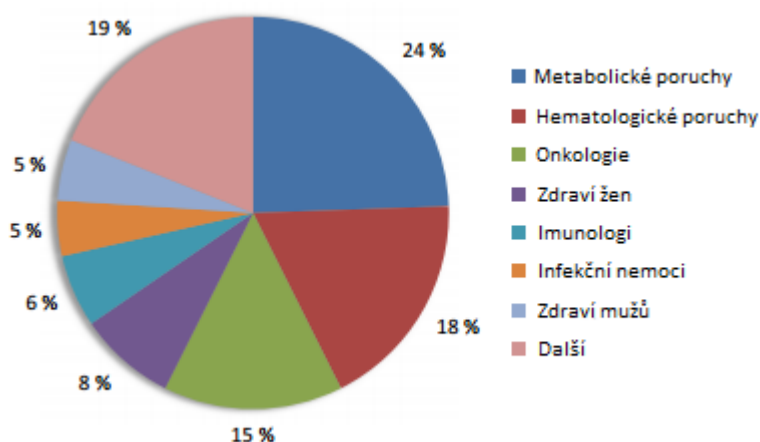
Maltózu vázající protein (MBP) je produkt genu *malE* nacházející se v *E. coli*. Maltóza vázající protein je exportována do periplazmatického prostoru, kde se specificky váže s maltózou nebo maltodextrinem a následně jeden z těchto cukrů transportuje do cytoplazmatické membrány. Při expresi je MBP často využívána ke zvýšení výtěžnosti a rozpustnosti fúzního partnera, kdy dosahuje výtěžnosti od 10 do 40 mg proteinu na 1 litr kultury. MBP společně s proteinem se vkládá do pMAL expresního vektoru, jenž umožňuje cytoplazmatickou i periplazmatickou expresi. Faktor Xa, enterokináza nebo genenáza I jsou proteázy, které se často využívají k odstranění MBP z vektoru. Purifikace může být prováděna pomocí jedнокrokové afinitní chromatografie obsahující imobilizovanou amylozu a následovanou kompetitivní elucí s maltózou. Vysoký výtěžek zmiňovaný na začátku toho odstavce samozřejmě může způsobovat akumulaci nerozpustných proteinů agregovaných do inkluzních tělísek, tak jako v případě GST fúzního proteinu. Navíc velká velikost MBP značky (45 kDa) může mít vliv na funkci proteinu [30,31].

5 *Escherichia coli* BL21 a BL21(DE3)

Escherichia coli, jak již bylo dříve zmíněno, patří k nejvíce používaným bakteriím v rekombinantní technologii. Často používány jsou konkrétně dva její kmeny a to BL21 a BL21(DE3) vytvořené F. Williamem Studierem a Barbarou A. Moffatovou. Jak už z názvu obou kmenů vyplývá, jsou si velice podobné. Hlavní rozdíl spočívá v tom, že BL21(DE3) obsahuje gen pro T7 RNA polymerázu pocházející z profága DE3, odvozeného z bakteriofága λ . T7 RNA polymeráza je v případě BL21(DE3) kontrolována *lacUV5* promotorem. BL21 se využívá k expresi bez T7 RNA polymerázy. Oba kmeny patří do B linie kmenů *E. coli*. Tuto linii charakterizuje absence Lon proteázy a OmpT proteázy, které v buňce degradují proteiny [34].

6 Proteiny produkované rekombinantní technologií

V dnešní době jsou produkovány stovky terapeutických proteinů pomocí rekombinantní technologie a přibližně 50 % z nich je schváleno ke klinickému použití [35]. První rekombinantní protein byl vytvořen roku 1976 a byl jím somatostatin, následovaný inzulínem roku 1982, jenž dnes patří k nejvíce prodávaným rekombinantním proteinům pod názvem Humulin [36]. Dále můžeme uvést erythropoetin vytvořený roku 1986 nebo interferon, vytvořen poprvé v témže roce, jenž se ukázal jako vysoce efektivní a bezpečný k léčbě hepatitidy C. Samozřejmě rekombinantní proteiny nejsou využívány pouze pro terapeutické účely, můžeme se s nimi setkat ve výživě jako doplněk stravy nebo například v kosmetice [36]. Pro ilustraci na (obr. 6) můžeme vidět procentuální zastoupení prodaných rekombinantních proteinů využívaných v terapii, kde téměř čtvrtinu zabírají proteiny proti metabolickým poruchám, dále s 18 % jsou proteiny vůči hematologickým poruchám a 15 % z celkového množství patří proteinům proti onkologickým problémům, jejichž produkce byla v posledních letech zvýšena z důvodu nárůstu nádorových onemocnění [37].



Obr. 6: Množství prodaných rekombinantních proteinů v procentech, respektive jejich místo, kde působí v terapii. Růžová část, znázorňující 19 % z celku, obsahuje zbylé terapeutické oblasti, jejichž množství nepřesáhlo 5 %. Jsou to oblasti jako kardiologie, centrální nervová soustava, dermatologie a další (upraveno) [37].

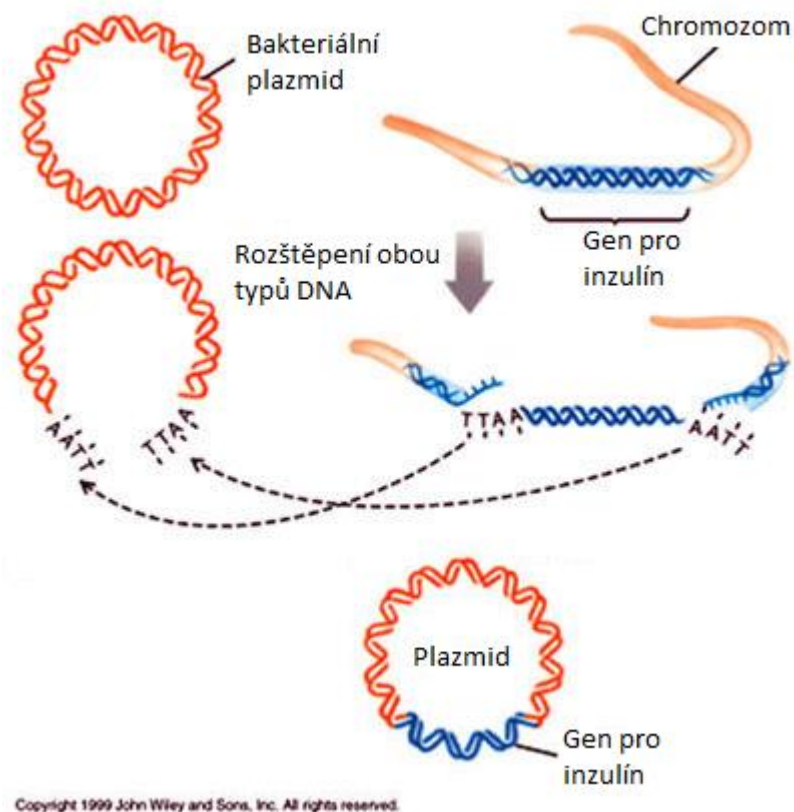
6.1 Lidský inzulín

Jak již bylo řečeno, lidský inzulín patří k nejvíce prodávaným rekombinantním proteinům. Hlavním důvodem je neustále se zvyšující počet lidí se zvýšenou hladinou krevního cukru, tedy s onemocněním zvaným jako cukrovka, latinsky diabetes mellitus. Při překročení hladiny cukru nad 5,5 mmol/l dochází k uvolňování inzulínu z β -buněk Langerhansonových ostrůvků do krve. Z krve je inzulín vychytáván receptory v buňce, kde umožňuje vstup glukózy do buněk, a tím dochází ke snížení hladiny cukru v krvi. Logicky tedy, pokud jsou Langerhansonovy ostrůvky porušeny nebo receptory v buňce z nějakého důvodu nefungují, nemůže být inzulín dopraven do buňky přirozeně a musí být do těla vpraven uměle [37].

Inzulín je tedy produkován β -buňkami Langerhansonových ostrůvků, které jsou přítomny na slinivce břišní. Vzniká jako jednoduchý polypeptid pre-pro-inzulín, který se štěpí na pro-inzulín. Pro-inzulín se v endoplazmatickém retikulu složí do správné konformace pomocí tří disulfidických vazeb a následně je transportován do Golgiho aparátu, kde je převeden na aktivní formu, tedy inzulín. Zralý inzulín se skládá z A-řetězce, obsahující 21 aminokyselin, B-řetězce složeného z 30 aminokyselin a C-peptidu [37,39].

Než se inzulín začal vyrábět rekombinantní technologií, byly pacienti léčení pomocí inzulínu získávaného ze slinivky prasat a krav. Tato metoda byla drahá a hlavně nedokázala pokrýt poptávku. V roce 1978 se začal inzulín vyrábět tak, že oba řetězce A i B byly exprimovány odděleně v *E. coli* a až po expresi došlo ke spojení. Tato metoda přinesla zlepšení, ale stále nebyla tak efektivní, a proto se dnes už tolik nepoužívá. Efektivnější a také vhodnější metoda pro produkci ve velkém měřítku se ukázala metoda, kdy je inzulín exprimován jako proinzulín. Při samotné expresi v *E. coli* jsou inzulínové prekurzory produkovány do inkluzních tělísek a plně funkční protein je získán následnou solubilizací a opětovným složením. Zvýšení solubilizace proteinu a následná pomoc při správném složení samozřejmě zajišťují molekulární chaperony. Molekulární chaperony jsou také nápomocné enzymu thiol disulfid oxidoreduktáza se zkratkou DsbA (z anglického oxidoreductase disulfide bond protein A), který po přidání do *E. coli* umožňuje proteinům vytvořit disulfidické vazby, díky čemuž se inzulín stává aktivním [38]. Vznik disulfidické vazby probíhá v periplazmatickém prostoru. Tuto metodu začala provádět firma Eli Lilly, která produkuje produkt Humulin, schválený

roku 1982, jakožto rekombinantní inzulín pro terapeutické účely k léčbě diabetických pacientů [39]. Nicméně počet diabetiků stále znepokojivě roste a dokonce se předpokládá, že v roce 2025 bude přibližně 300 miliónů lidí, trpících tímto onemocněním [40]. Požadavek na inzulín se tedy bude značně navyšovat (přibližně více než 16 000 kg za rok), s čímž souvisí i nároky na současné expresní vektory, jež nemůžou tento potenciální objem úspěšně pokrýt [37].



Obr. 7: Schématické znázornění vložení genu pro inzulín do bakteriálního plazmidu. Na začátku máme bakteriální plazmid a lidský chromozom obsahující gen pro inzulín. Restriktivní enzym rozštěpí oba typy DNA. Následně se gen pro inzulín připojí k plazmidu pomocí lepivých konců a spojí pomocí enzymu (upraveno) [41].

6.2 Lidský růstový hormon

Lidský růstový hormon (HGH z anglických slov human growth hormone), nazývaný také somatotropin, je protein složený ze 191 aminokyselin s molekulovou hmotností okolo 22 000. Jak z jeho názvu vyplývá, je důležitý pro správný růst, proto se monitoruje hlavně u dětí. Při nedostatku růstového hormonu dochází u lidí

k malému vzrůstu označovanému jako nanismus. Naopak při nadbytku HGH dochází u lidí ke zvětšenému růstu, který se nazývá gigantismus. HGH může být také využit při léčbě jiných potíží, jako například při zlomeninách kostí, popáleninách nebo při krvácejících vředech. Jelikož je růstový hormon druhově specifický, zesnulí lidé byli dlouho jediným zdrojem tohoto hormonu. Nicméně zvýšená poptávka a také některé problémy jako například výskyt Creutzfeldt-Jakobovy nemoci u dětí, které byly léčeny růstovým hormonem získaným z hypofýzy zesnulých pacientů, daly možnost vzniku somatotropinu pomocí rekombinantní technologie v *E. coli* [35]. Bakteriálně syntetizovaný HGH se označuje jako methionyl-HGH, protože se na něj váže methionin pocházející z AUG startovacího kodonu vložený na začátek genu pro HGH [42].

Při produkci HGH v *E. coli* se formuje samotný hormon do inkluzních tělísek, nicméně nedávný výzkum ukázal možnosti jak tomuto kroku předejít s využitím TAT systému (z anglických slov twin arginine translocation system). Tento systém umožňuje export správně složeného proteinu z cytoplazmatického prostředí do periplazmatického prostoru, kde je protein chráněn před agregací. K tomu dopomáhají dvě signální sekvence, TorA a Sufl umístěné na N-konci proteinu, v našem případě růstového hormonu, a gen pro DsbA umístěný na C-konci, který vykazuje chaperonovou aktivitu. V současnosti tedy bylo potvrzeno, že s využitím TAT systému klesá množství HGH v inkluzních těliscích, nicméně zda je hormon funkční a aktivní se musí ještě ověřit pomocí dalších výzkumů [43].

6.3 Ferritin

Ferritin je protein složený z 24 podjednotek, jehož hlavní funkce je uskladňovat železo, neboť železo je v nenavázané formě pro buňky toxické. Ferritin můžeme nalézt v mnoha orgánech, ovšem v každém má trochu jiné složení, lišící se počtem H- a L-podjednotek, ze kterých je složen. Například v srdci převládá podjednotka-H, kdežto v játrech nebo slezině nacházíme více podjednotku-L. V prostorovém uspořádání má ferritin tvar koule, kde na povrchu jsou umístěny jednotlivé podjednotky, které uvnitř ukrývají ionty železa o celkovém počtu dosahující až 4500 iontů železa na jednu molekulu ferritinu. I přes to, že H- a L-řetězce mají 53 % identických aminokyselinových sekvencí a podobnou třídimenzionální strukturu, složenou ze 4 dlouhých a 5 krátkých

alfa helixů, oba řetězce vykonávají odlišnou funkci během procesu ukládání železa [44,45].

Při vzniku rekombinantního ferritinu se jako složitější jeví příprava L-řetězce, který se formuje do inkluzních tělísek v *E. coli* s výtěžkem 2-5 mg na litr bakteriální kultury. Pokud chceme výtěžek rekombinantního L-řetězce (rLF z anglického recombinant L-chain) zvýšit, je nutné použít molekulární chaperony. Po použití molekulárních chaperonů dosáhneme výtěžku kolem 10 mg na litr bakteriální kultury. Celá exprese může probíhat v kmeni BL21 (DE3) bakteriální *E. coli* s použitím vektorů pET-28a a pG-Tf2 [45].

6.4 anti-BNP scFv

Výroba protilátek pomocí rekombinantní technologie je další důležité odvětví, kde se tato metoda uplatňuje. Jako je tomu například u protilátky proti natriuretickému peptidu B, označovanému také jako mozkový natriuretický peptid se zkratkou BNP (z anglických slov brain natriuretic peptide). BNP je hormon produkován většinou buňkami srdečních komor jakožto odpověď na zvýšené napětí a rozšíření srdeční komory. Zvýšené množství BNP nacházíme také u pacientů s poruchou levé komory. Další studie ukázaly potenciál BNP jako marker u pacientů se srdečním selháním [46].

Protilátka používaná k detekci BNP je jednořetězcový variabilní fragment scFv (z anglického single-chain variable fragment). scFv je fragment složený z variabilní domény těžkého a lehkého řetězce protilátky spojeného krátkým peptidem. Výhodou scFv je jeho malá velikost, díky které může prostupovat nádory a pevnou tkání a také to, že si nadále zachovává svoji schopnost navázat antigen jako normální protilátka. Menší velikost scFv oproti imunoglobulinu, ze kterého pochází, také umožňuje jeho produkci v prokaryotických systémech jako je *E. coli* [46].

Většina protilátek produkováných v *E. coli* se exprimuje do inkluzních tělísek a není tomu jinak ani u anti-BNP scFv. K rozpuštění agregované formy anti-BNP scFv a uvedení do aktivního stavu jsou samozřejmě využívány chaperony. Zajímavostí je, že při zkoumání vlivu chaperonů na expresi anti-BNP scFv došlo podle očekávání ke zlepšení rozpustnosti této protilátky, nicméně celkový výtěžek se snížil. To se dá připsat faktu, že při nadprodukcí chaperonů se může zpomalit rychlost exportu bílkovin v *E. coli* z důvodu prodloužené doby uvolňování nascentního polypeptidu. Tento efekt

je podobný expresi při snížené teplotě nebo při snížené koncentraci induktoru, kdy také dochází ke zpomalení produkce. Pokud hovoříme o induktoru, můžeme při expresi anti-BNP scFv použít L-arabinosu, která při správné koncentraci dokáže zvýšit výtěžek skoro až na trojnásobek. Bylo totiž ověřeno, že koncentrace L-arabinosy ovlivňuje stupeň exprese chaperonů, konkrétně GroEL, což má samozřejmě ve výsledku vliv na samotnou expresi rozpustného anti-BNP scFv viz (tab. 1) [46].

Tab. 1: Vliv koncentrace L-arabinosy na indukci chaperonu GroES/GroEL a následný vliv na výtěžek anti-BNP scFv v *E. coli* BL21 (upraveno) [46].

Koncentrace L-arabinosy [mM]	Koncentrace chaperonu GroEL [μg/ml]	Koncentrace anti-BNP scFv [μg/ml]
0	4,76	14,7
0,01	7,67	14,8
0,1	27,6	17,7
1	56,4	31,4
5	11,4	26,5

7 Závěr

Chaperony jsou proteiny, které v buňce hrají zásadní roli při skládání ostatních proteinů do své nativní konformace, kdy je velice důležité, aby jejich sekundární a terciární struktura byla složena správně, aby mohl protein správně plnit svoji biologickou funkci. V prokaryotické buňce nacházíme tři základní chaperonové komplexy a to: Trigger factor, DnaK-DnaJ-GrpE a GroEL-GroES. Tyto chaperonové komplexy tedy konkrétně slouží k navázání nově vznikajícího polypeptidového řetězce, kterému následně pomáhají s úspěšným složením nebo protein transportují z přeplněného buněčného prostředí, čímž zabraňují interakci s ostatními proteiny nebo molekulami a v neposlední řadě umožňují solubilizaci proteinu z agregované formy inkluzních tělísek, do kterých se většina proteinů formuje při vzniku pomocí rekombinantní technologie, čímž zvyšují následný výtěžek proteinu a jeho čistotu.

Proteiny vznikají rekombinantní technologií tak, že gen, který kóduje zvolený protein, vložíme do expresního vektoru. K tomuto genu můžeme před vložením připojit afinitní značky, které slouží k následné detekci proteinu a k jeho izolaci. Naopak expresní vektor většinou obsahuje selekční marker, díky kterému můžeme vyselektovat buňky s expresním vektorem obsahujícím náš gen. Dále expresní vektor obsahuje promotor, umožňující začátek transkripce a terminátor, zapířičňující naopak ukončení transkripce. Po vložení genu do expresního vektoru následuje tedy transformace do hostitelské buňky a následná kultivace, kdy dochází k pomnožení buněk. Po namnožení buněk spustíme samotnou syntézu heterologního proteinu pomocí vhodného induktoru. Na konec buňky sklídíme, vyčistíme protein a je hotovo. Touto technologií je dnes produkováno velké množství proteinů jako například lidský inzulin, růstový hormon nebo například ferritin.

8 Seznam literatury

1. **Susan Lindquist**, 'Protein Folding Sculpting Evolutionary Change', *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 74 (2009), 103–8.
2. **Stanislav Rosypal**, 'Úvod Do Molekulární Biologie', Třetí Série, *Brno Stanislav Rosypal*, (1998), 300.
3. **Raimon Sabata, Natalia S. de Groot, Salvador Ventura**, 'Protein Folding and Aggregation in Bacteria', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67.16 (2010), 2695–2715.
4. **Anja Hoffmann, Bernd Bukau, Günter Kramer**, 'Structure and Function of the Molecular Chaperone Trigger Factor', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Molecular Chaperones and Intracellular Protein Transport, 1803.6 (2010), 650–61.
5. **Elke Rüngeling, Thomas Laufen, Hubert Bahl**, 'Functional Characterisation of the Chaperones DnaK, DnaJ and GrpE from *Clostridium Acetobutylicum*', *FEMS Microbiology Letters*, 170.1 (1999), 119–23.
6. <https://pdbj.org/eprints/index_en.cgi?PDB%3A3a6m> [3. 3. 2017].
7. 'The Nobel Prize in Chemistry 1972'
<https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1972/> [22. 12. 2016].
8. **Michael Groll, Matthias Bochtler, Hans Brandstetter, Tim Clausen, Robert Huber**, 'Molecular Machines for Protein Degradation', *ChemBioChem*, 6.2 (2005), 222–56.
9. **François Baneyx, Mirna Mujacic**, 'Recombinant Protein Folding and Misfolding in *Escherichia Coli*', *Nature Biotechnology*, 22.11 (2004), 1399–1408.
10. **Gerald Schochetman, Chin-Yih Ou, Wanda K. Jones**, 'Polymerase Chain Reaction', *The Journal of Infectious Diseases*, 158.6 (1988), 1154–57.
11. **Colin Norman**, 'Cohen-Boyer Patent Finally Issued', *Science*, 225.4667 (1984), 1134–1134.
12. **Eduardo A. Ceccarelli, Germán L. Rosano**, '*Recombinant Protein Expression in Microbial Systems*', *Frontiers E-books*, (2014).
13. **François Baneyx**, 'Recombinant Protein Expression in *Escherichia Coli*', *Current Opinion in Biotechnology*, 10.5 (1999), 411–21.

14. **Benjamin G. Davis**, 'Mimicking Posttranslational Modifications of Proteins', *Science*, 303.5657 (2004), 480–82.
15. **Meena Rai, Harish Padh**, 'Expression Systems for Production of Heterologous Proteins', *Current Science*, 80.9 (2001), 1121–28.
16. **Thomas A. Kost, J. Patrick Condreay, Donald L. Jarvis**, 'Baculovirus as Versatile Vectors for Protein Expression in Insect and Mammalian Cells', *Nature Biotechnology*, 23.5 (2005), 567–75.
17. **G. Cesareni, M. Helmer-Citterich, L. Castagnoli**, 'Control of ColE1 Plasmid Replication by Antisense RNA', *Trends in Genetics*, 7.7 (1991), 230–35.
18. **Rong Fu Wang, Sidney R. Kushner**, 'Construction of Versatile Low-Copy-Number Vectors for Cloning, Sequencing and Gene Expression in Escherichia Coli', *Gene*, 100 (1991), 195–99.
19. 'Choice of Vector - E.coli Vectors - Vector Features - EMBL'
<https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/choice_vector/ecoli/vectorfeatures/> [21. 3. 2017].
20. **Daniel M. Stoebel, Antony M. Dean, Daniel E. Dykhuizen**, 'The Cost of Expression of Escherichia Coli Lac Operon Proteins Is in the Process, Not in the Products', *Genetics*, 178.3 (2008), 1653–60.
21. **Barry L. Wanner, Ryoji Kodaira, Frederick C. Neidhardt**, 'Regulation of Lac Operon Expression: Reappraisal of the Theory of Catabolite Repression', *Journal of Bacteriology*, 136.3 (1978), 947–54.
22. **Orawan Khaw, Sunutcha Suntrarachun**, 'Strategies for Production of Active Eukaryotic Proteins in Bacterial Expression System', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2.2 (2012), 159–62.
23. **Kouhei Tsumoto, Daisuke Ejima, Izumi Kumagai, Tsutomu Arakawa**, 'Practical Considerations in Refolding Proteins from Inclusion Bodies', *Protein Expression and Purification*, 28.1 (2003), 1–8.
24. **Kazuyo Nishihara, Masaaki Kanemori, Masanari Kitagawa, Hideki Yanagi, Takashi Yura**, 'Chaperone Coexpression Plasmids: Differential and Synergistic Roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in Assisting Folding of an Allergen of Japanese Cedar Pollen, Cryj2, in Escherichia Coli', *Applied and Environmental Microbiology*, 64.5 (1998), 1694–99.
25. **M.Mar Carrió, Antonio Villaverde**, 'Role of Molecular Chaperones in Inclusion Body Formation', *FEBS Letters*, 537.1–3 (2003), 215–21.

26. **Sukyeong Lee, Mathew E. Sowa, Yo-hei Watanabe, Paul B. Sigler, Wah Chiu, Masasuke Yoshida, Francis T.F. Tsai**, 'The Structure of ClpB: A Molecular Chaperone That Rescues Proteins from an Aggregated State', *Cell*, 115.2 (2003), 229–40.
27. **Teemu Korpimäki, Jussi Kurittu, Matti Karp**, 'Surprisingly Fast Disappearance of β -Lactam Selection Pressure in Cultivation as Detected with Novel Biosensing Approaches', *Journal of Microbiological Methods*, 53.1 (2003), 37–42.
28. **Isabelle Peubez, Nicolas Chaudet, Charlotte Mignon, Géraldine Hild et al.**, 'Antibiotic-Free Selection in E. Coli: New Considerations for Optimal Design and Improved Production', *Microbial Cell Factories*, 9 (2010), 65.
29. **Chuan-Wei Jang, Terry Magnuson**, 'A Novel Selection Marker for Efficient DNA Cloning and Recombineering in E. Coli', *PLOS ONE*, 8.2 (2013).
30. **Joakim Nilsson, Stefan Stahl, Joakim Lundeberg, Mathias Uhlén, Per-ake Nygren**, 'Affinity Fusion Strategies for Detection, Purification, and Immobilization of Recombinant Proteins', *Protein Expression and Purification*, 11.1 (1997), 1–16.
31. **Michelle E. Kimple, Allison L. Brill, Renee L. Pasker**, 'Overview of Affinity Tags for Protein Purification', *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan [et Al.]*, 73 (2013), Unit-9.9.
32. **Jerker Porath**, 'Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography', *Protein Expression and Purification*, 3.4 (1992), 263–81.
33. **A. Hoffmann, R. G. Roeder**, 'Purification of His-Tagged Proteins in Non-Denaturing Conditions Suggests a Convenient Method for Protein Interaction Studies.', *Nucleic Acids Research*, 19.22 (1991), 6337–38.
34. **Haeyoung Jeong, Hyun Ju Kim, Sang Jun Lee**, 'Complete Genome Sequence of Escherichia Coli Strain BL21', *Genome Announcements*, 3.2 (2015).
35. **Antonio Liras**, 'Recombinant Proteins in Therapeutics: Haemophilia Treatment as an Example', *International Archives of Medicine*, 1 (2008), 4.
36. **Laura Sanchez-Garcia, Lucas Martín, Ramon Mangués, Neus Ferrer-Miralles, Esther Vázquez, Antonio Villaverde**, 'Recombinant Pharmaceuticals from Microbial Cells: A 2015 Update', *Microbial Cell Factories*, 15 (2016).

37. **Nabih A. Baeshen, Mohammed N. Baeshan, Abdullah Sheikh, Roop S. Bora et al.**, 'Cell Factories for Insulin Production', *Microbial Cell Factories*, 13 (2014).
38. **Katleen Denoncin, Jean-François Collet**, 'Disulfide Bond Formation in the Bacterial Periplasm: Major Achievements and Challenges Ahead', *Antioxidants & Redox Signaling*, 19.1 (2013), 63–71.
39. **David V. Goeddel, Dennis G. Kleid, Francisco Bolivar, Herbert L. Heyneker et al.**, 'Expression in Escherichia Coli of Chemically Synthesized Genes for Human Insulin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76.1 (1979), 106–10.
40. **Sarah Wild, Gojka Roglic, Anders Green, Richard Sicree, Hilary King**, 'Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the Year 2000 and Projections for 2030', *Diabetes Care*, 27.5 (2004), 1047–53.
41. <<https://encyclofeedia.files.wordpress.com/2014/04/insulin-info.jpg>> [16.5.2017].
42. **Kenneth C. Olson, James Fenno, Norman Lin, Richard N. Harkins et al.**, 'Purified Human Growth Hormone from E. Coli Is Biologically Active', *Nature*, 293.5831 (1981), 408–11.
43. **Mohammad Reza Bagherinejad, Hamid Mir-Mohammad Sadeghi, Daryoush Abedi, C. Perry Chou et al.**, 'Twin Arginine Translocation System in Secretory Expression of Recombinant Human Growth Hormone', *Research in Pharmaceutical Sciences*, 11.6 (2016), 461–69.
44. **P. Rucker, F. M. Torti, S. V. Torti**, 'Recombinant Ferritin: Modulation of Subunit Stoichiometry in Bacterial Expression Systems', *Protein Engineering*, 10.8 (1997), 967–73.
45. **Wenyan Zou, Xiaoyu Liu, Jie Wang, Dianhua Chen et al.**, 'Expression, Purification, and Characterization of Recombinant Human L-Chain Ferritin', *Protein Expression and Purification*, 119 (2016), 63–68.
46. **Bo Hee Maeng, Dong Hyun Nam, Yong Hwan Kim**, 'Coexpression of Molecular Chaperones to Enhance Functional Expression of Anti-BNP scFv in the Cytoplasm of Escherichia Coli for the Detection of B-Type Natriuretic Peptide', *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 27.6 (2011), 1391–98.