

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Lucie Vodolánová

Eukaryotické exprese kyselých proteas
Eukaryotic expression of acid proteases

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Petr Man, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Cyril Bařinka, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Petra Mana, Ph.D a konzultanta RNDr. Cyrila Bařinky, Ph.D a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze, dne

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala školiteli RNDr. Petru Manovi, Ph.D a konzultantovi RNDr. Cyrilu Bařinkovi, Ph.D za odborné vedení, konzultace a poskytnutí zázemí pro vypracování bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Barboře Havlínové a Mgr. Petře Baranové za ochotu, trpělivost a praktické rady při řešení práce. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině za podporu a poskytnutí výborných podmínek pro mé studium.

Abstrakt

Nepenthesin I a neprosin jsou kyselé proteasy, které se přirozeně vyskytují v trávících šťávách masožravých rostlin rodu *Nepenthes*. Oba enzymy jsou syntetizovány jako zymogeny, které jsou aktivovány v kyselém prostředí. Díky svým vlastnostem a štěpným preferencím jsou vhodné pro studium proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie či jako doplněk bezlepkové diety při celiakii. Protože v trávících šťávách rostlin *Nepenthes* se vyskytují v nízké koncentraci a prokaryotický expresní systém nevykazoval uspokojivé výsledky, je snaha o nalezení vhodnějšího expresního systému pro produkci jejich rekombinantních forem, který by produkoval enzymy se stejnými vlastnostmi jako ty přírodní a zároveň poskytoval vysoké výtěžky. Cílem této práce je příprava expresních vektorů s geny nepenthesinu I a neprosinu pro transfekci do eukaryotických expresních systémů buněk S2 a HEK 293.

Klíčová slova: kyselé proteasy, nepenthesin I, neprosin, expresní vektory

Abstract

Nepenthesin I and neprosin are acid proteases which are present in the pitcher fluid of carnivorous plants genus *Nepenthes*. Both enzymes are produced as zymogens which are activated in acidic conditions. Due to their properties and specific preferences, they are suitable for protein mass spectrometry or as a supplement in gluten-free diet of celiac patients. Quantity of the enzymes in the pitcher fluid is very low and the currently developer expression protocols do not show satisfactory results, we tried to find more suitable expression system. We would like to produce high quantities of enzymes, which will have the same stability as natural ones. The aim of this work is preparation of expression vectors with nepenthesin I and neprosin genes for transfection into eukaryotic expression systems of S2 and HEK 293 cells. *In Czech.*

Keywords: acid proteases, nepenthesin I, neprosin, expression vectors

Obsah

1	Seznam zkratek.....	3
2	Úvod	4
2.1	Aspartátové proteasy	4
2.1.1	Charakteristika.....	4
2.1.2	Rostlinné aspartátové proteasy	5
2.2	Láčkovky (<i>Nepenthes</i>)	6
2.3	Nepenthesin.....	7
2.4	Neprosin	8
2.5	Použití nepenthesinu I a neprosinu	8
2.5.1	Role proteas v proteomice	8
2.5.2	Vodík/deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií	9
2.5.3	Degradace glutenu jako terapie celiakie.....	11
3	Cíl práce.....	12
4	Materiál a metody	13
4.1	Materiál	13
4.1.1	Přístroje	13
4.1.2	Chemikálie.....	13
4.1.3	Primery, enzymy, vektory, kompetentní buňky	14
4.2	Metody	16
4.2.1	PCR	16
4.2.2	Čištění DNA sadou GenElute™ PCR Clean-Up Kit	16
4.2.3	Agarosová gelová elektroforesa	17
4.2.4	Štěpení insertů a vektorů	17
4.2.5	Defosforylace vektorů	18
4.2.6	Ligace	18

4.2.7	Transformace	18
4.2.8	Minipreparativní izolace DNA	19
4.2.9	Sekvenace	19
4.2.10	Midipreparativní izolace DNA	19
5	Výsledky	21
5.1	Příprava insertů	21
5.2	Štěpení vektorů a insertů, ligace	23
5.3	Transformace a izolace DNA	25
6	Diskuse	27
7	Závěr	30
8	Seznam literatury	31

1 Seznam zkratek

AMK	aminokyselina
AN-PEP	<i>Aspergillus niger</i> – prolyl endoproteasa
AP	aspartátová proteasa
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	endoplasmatické retikulum
H/D	vodík/deuteriová
LB	Luria Bertani
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
MM	Master Mix
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NAPSI	specifický segment aspartátových proteas nepenthesinového typu (nepenthesin-type aspartic protease specific insert)
Nepe	nepenthesin
Nepro	neprosin
PCR	polymerázová řetězová reakce
PSI	rostlinný specifický segment (plant specific insert)
SDS	dodecylsírán sodný (sodium dodecylsulphate)
S.O.C.	Super Optimal broth with Catabolite repression
TAE	tris-acetát-EDTA
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

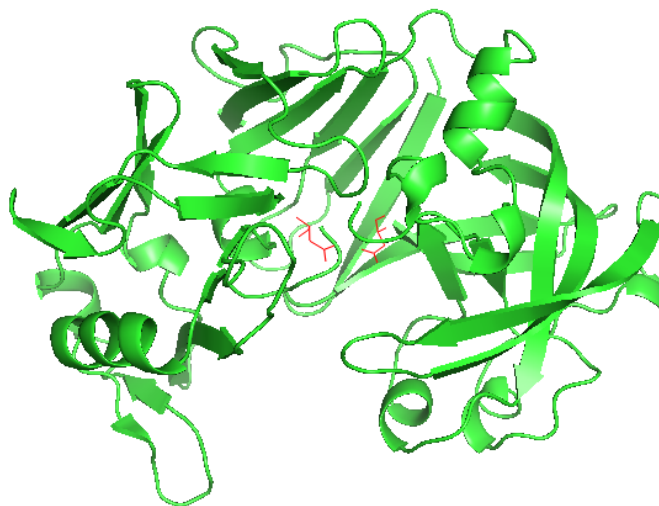
2 Úvod

2.1 Aspartátové proteasy

2.1.1 Charakteristika

Aspartátové proteasy (AP, EC 3.4.23) jsou rozšířenou skupinou proteolytických enzymů, které je možné najít ve zvířatech, rostlinách, kvasinkách, bakteriích, parazitech, houbách a virech [1], [2]. Podle databáze MEROPS jsou AP rozděleny do 16 skupin na základě jejich strukturní podobnosti [3]. Jednou z nich je skupina A1- enzymy podobné pepsinu, tedy AP syntetizované jako zymogeny schopné autoaktivace v kyselém prostředí [4], [5], které jsou silně inhibovány pepstatinem [6].

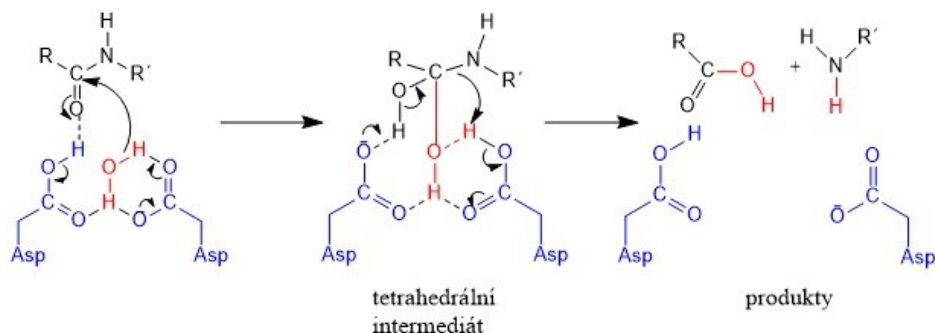
Enzymy A1 rodiny mají podobnou trojrozměrnou strukturu, která se skládá ze dvou laloků vytvářejících štěrbinu s aktivním místem. Aktivní místo aspartátových proteas obsahuje dva aspartátové zbytky (u pepsinu Asp32 a Asp215), jejichž postranní řetězce jsou umístěny ve středu aktivního místa pro vazbu substrátu. Aspartáty jsou součástí triád Asp-Thr-Gly, které jsou od sebe vzdálené 170 až 190 aminokyselin [1], [7], [8]. Terciární struktura pepsinu je zobrazena na *Obr. 1*.



Obrázek 1. Krystalová struktura prasečího pepsinu. Červeně jsou zvýrazněny aspartátové zbytky Asp32 a Asp215 v aktivním místě, které je umístěno mezi dvěma laloky enzymu, PDB ID: 5PEP [9], modelováno v programu PyMOL [10].

Mezi Asp je vodíkovými můstky vázána molekula vody, která se účastní hydrolytického štěpení peptidové vazby v substrátu. Mechanismus reakce je založen na předání protonu z molekuly vody Asp215, čímž se z ní stává nukleofil, který napadá karbonylový uhlík peptidové vazby. Poté Asp32 poskytnutím elektronu stabilizuje

karbonylový kyslík a dochází ke zrušení vazby mezi uhlíkem karbonylu a dusíkem [7]. Mechanismus reakce je ilustrován pomocí obrázku (Obr. 2).



Obrázek 2. Mechanismus katalýzy hydrolytické štěpné reakce aspartátových proteas, upraveno podle [11].

2.1.2 Rostlinné aspartátové proteasy

Rostlinné aspartátové proteasy jsou zastoupeny hned v několika skupinách AP v databázi MEROPS [3], přičemž nejvíce z nich je ve skupině enzymů podobných pepsinu A1. Stejně jako pepsin jsou i tyto enzymy aktivovány nízkým pH, inhibovány pepstatinem a obsahují dva aspartátové zbytky v aktivním místě. Odlišné je ale složení triád, ve kterých se Asp nacházejí, a to jsou triády Asp-Thr/Ser-Gly [12].

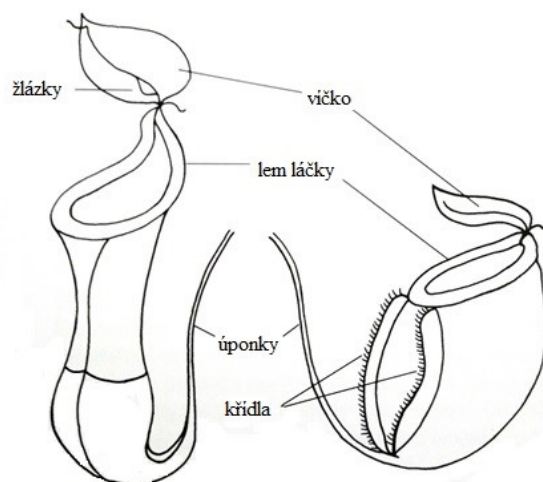
Rostlinné AP jsou dále děleny na dvě podskupiny, a to vakuolární AP a nepenthesiny. Enzymy obou těchto podskupin jsou syntetizovány jako preproformy, které obsahují N-terminální signální sekvenci o velikosti kolem 24 aminokyselin sloužící pro translokaci do ER, a prosegment, který se u podskupin liší. Zatímco u vakuolárních AP je to segment o velikosti asi 100 aminokyselin nazývaný rostlinný specifický segment (Plant specific insert, PSI), nepenthesiny obsahují tzv. specifický segment aspartátových proteas nepenthesinového typu (NAPSI) o velikosti 22 aminokyselin a PSI zcela postrádají [13], [14].

Rostlinný specifický segment je oblast o přibližně 100 aminokyselinách umístěný v C-terminálním laloku, která je při aktivaci enzymu částečně nebo zcela odstraněna. Předpokládá se, že PSI může mít hned několik funkcí. Pravděpodobně hraje důležitou úlohu při cílení enzymu do rostlinné vakuoly [2]. Egas et al. popsali další z možných funkcí PSI a to interakci proenzymů pomocí této domény s fosfolipidy v membráně a ovlivnění její permeability. Tento mechanismus by mohl být rostlinou používán jako ochrana proti patogenům nebo při buněčné smrti rostlinné buňky [15].

2.2 Láčkovky (*Nepenthes*)

Rod Láčkovka (*Nepenthes*) je vyšší dvouděložná rostlina z čeledi *Nepenthaceae*.

Jsou to plazivé, poléhavé, šplhavé keře nebo polokeře s lodyhami až 20 m dlouhými. Listy jsou podlouhlé a úzké zakončené úponky s láčkou v podobě konvice (ascidia). Konvice je nápadně červená a skvrnitá. Její barva má napodobovat tropické ovoce a tím lákat hmyz. Láčka má baňkovitý tvar, nahoře zakončený kluzkým tuhým lemem



Obrázek 3. Popis stavby konvice *Nepenthes* [16].

uzavřeným víčkem. Po straně konvice se zbíhají dvě zubatá křídla. Na povrchu konvice jsou nektarové žlázky, které lákají kořist. Nejvíce sekretu produkují žlázky na vnitřní straně lemu, což způsobuje sklouznutí kořisti přímo do láčky (Obr. 3). Uvnitř konvice jsou patrné dvě zóny. Jedna je lesklá, umístěna v dolní části, pokrytá mnohobuněčnými trávicími žlázkami. Ty produkují slizkou trávicí tekutinu s vysokou smáčivostí. Druhá zóna je umístěna v horní zúžené části konvice a je pokryta voskovým povlakem, který brání kořisti láčku opustit. Láčky u jednotlivých druhů se drobně liší [17], [18].

Láčkovky jsou dvoudomé rostliny, samčí a samičí květenství jsou podobná. Květenství je složeno z drobných čtyřčetných lístků zelenohnědé až hnědočervené barvy s nepříjemným zápachem. Květenství má hroznovitý tvar. Semena vzniklá oplozením jsou větrem roznášena díky svému vřetenovitému tvaru, který jim umožňuje plachtění vzduchem [18].

Láčkovky se obecně vyskytují v tropických oblastech. *Nepenthes distillatoria* (Obr. 4, str. 7) je jediný druh rostoucí na Cejlonu a to v mokřadech a džunglích do 700 m n. m.. *Nepenthes gracilis* (Obr. 5, str. 7) se vyskytuje v močálovitých džunglích do 800 m n. m. v Thajsku, na Malajském poloostrově, Sumatře, Borneu a Celebesu. Je to velice odolná rostlina, která je schopna růst i ve městech. Zajímavostí je, že její láčky jsou zelené a samčí a samičí květy se výrazně liší svým tvarem [18].



Obrázek 4. *Nepenthes distillatoria* [16].



Obrázek 5. *Nepenthes gracilis* [16].

2.3 Nepenthesin

Nepenthesiny (Nepe, MEROPS - A01.040) jsou rostlinné aspartátové proteasy rodiny A1, které se vyskytují v trávicích šťávách masožravých rostlin rodu *Nepenthes*, ale také u rodu *Drosera* a *Arabidopsis* [19]. Prvními izolovanými enzymy této skupin byly nepenthesin I a nepenthesin II z rostliny *Nepenthes distillatoria* [13].

Jedná se o enzymy syntetizované jako preproformy. Z aminokyselinové sekvence (Obr. 6) z *N. gracilllis* víme, že prepro-nepenthesin I se skládá ze 437 aminokyselin, přičemž signální peptid tvoří 24 zbytků, prosegment 56 zbytků a aktivní enzym je složen z 359 AMK. Velice podobná je i sekvence u nepenthesinu II. Nepenthesin I obsahuje šest N-glykosylačních míst, zatímco nepenthesin II nemá žádné. Molekulové hmotnosti aktivních enzymů jsou přepokládány okolo 45 kDa u glykosylovaného nepe I, u neglykosylovaného nepe I a nepe II je to 37 kDa. Oba mají shodně po 12 cysteinových zbytcích tvořících 6 disulfidických vazeb, které významně přispívají ke stabilitě enzymu např. oproti pepsinu. Vyšší počet cysteinů je způsoben přítomností NAPSII v sekvenci nepenthesinů [13]. Přesná terciární struktura zatím není publikována, ale z dat získaných v laboratoři dr. Dohnálka v Biocevu je zřejmé, že se velmi podobá struktuře pepsinu (Obr. 1, str. 4).

1	MASSLYSFLALSIIVYIFVAPTHSTSRALTALNHRHEAKVTGFQIMLEHVDSGKNLTKFQLL	60
61	ERAIERGSRRLQRLEAMLNPGSGVETSIVYAGDGEYLMNLSIGTPAQPFSAIMDTGSDLIW	120
121	TQCQPCQTQCFNQSTPIFNPQGSSTFSTLPCSSQLCQALSSPTCSNFCQYTYGYGDGSET	180
181	QGSMTETLTFGVSIPNITFGCGENNQGFQGGAGLVGMGRGPLSLPSQLDVTKFSYC	240
241	MTPIGSSTPSNLLGSLANSVTAGSPNTTLIQSSQIPTFYIITLNGLSVGSSTRLPIDPSA	300
301	FALNSNNGTGGIIDSGLTLYFVNAYQSVRQEFISQINLPVVNGSSSGFDLCFQTPSD	360
361	PSNLQIPTFVMHFDGGDLELPSENYFISPSNGLICLAMGSSSQGMSIFGNIQQQNMLVVY	420
421	DTGNSVVSFASAQCGAS	437

Obrázek 6. Aminokyselinová sekvence nepenthesinu I, červeně sekvence signálního peptidu, zeleně sekvence prosegmentu [13].

Aktivní nepenthesiny jsou nejvíce stabilní v rozmezí pH 2,5-3,0 (nepe I je stabilní až do pH 10) a při teplotách 45-55 °C. Oba enzymy jsou inhibovány pepstatinem a také diazoacetyl-D,L-norleucinmethylesterem v přítomnosti iontů mědi. Proteiny jsou specificky štěpeny za aminokyselinami typickými pro pepsin, ale navíc ještě za histidinem, argininem a lysinem. Na rozdíl od pepsinu je nepenthesin I značně nestabilní v přítomnosti denaturačních a redukčních činidel, což je asi zapříčiněno vyšším obsahem disulfidových vazeb [13].

2.4 Neprosin

Neprosin (Nepro, MEROPS - U74.001) je nedávno objevená prolyl endoproteasa extrahována z trávicí šťávy masožravé rostliny *Nepenthes ventrata* [20].

Co se struktury týče, zatím je známá pouze jeho aminokyselinová sekvence (Obr. 7). Enzym je syntetizován jako zymogen, který je aktivován v kyselém prostředí o pH kolem 2,5, stabilním zůstává až do pH 4,5. Molekulová hmotnost aktivního enzymu je 29 kDa. Neprosin je inhibován pepstatinem. Svou stabilitu si zachovává i v přítomnosti denaturačních a redukčních činidel. Optimální teplota pro jeho funkčnost se pohybuje mezi 37-50 °C. Neprosin specificky štěpí proteiny za prolinem a alaninem [20], [21].

1	MQAKFFTFVILSSVFYFNYPLAE ARSIQARLANKPKGTIKTIKGDDGEVVDCVDIYKQPA	60
61	FDHPLLKNHTLQMQpSSYASKVGEYNKLEQPWHKNGECPKGSIPIRRQVITGLPVVKKQF	120
121	PNLKFAPP SANTNHQYAVIAYFYGNASLQGANATINIWE PNLKNPNGDFSLTQIWI SAGS	180
181	GSSLNTIEAGWQVYYPGRTGDSQPRFFIYWTADGYTSTGCYDLTCPGFVQTNNYYAIGMAL	240
241	QPSVYGGQQYELNESIQRDPATGNWWLYLWGTVVGYPASIYNSITNGADTVEWGGEIYD	300
301	SSGTGGFH TTTQMGS GHFPTEGYGKASYVRDLQCVDTYGNVISPTANSFQGIAPAPNCYN	360
361	YQFQQGSSELYLFYGGPGCQ	380

Obrázek 7. Aminokyselinová sekvence neprosinu, červeně zvýrazněna sekvence signálního peptidu [20].

2.5 Použití nepenthesinu I a neprosinu

2.5.1 Role proteas v proteomice

Proteomika je moderní obor zabývající se komplexním studiem proteinů a jejich interakcí. Jedněmi ze základních nástrojů proteomiky jsou separační metody (elektroforesa a chromatografie) spojené s hmotnostní spektrometrií. Nejznámější aplikací proteomiky je oblast identifikace proteinů. Zde se využívají dva hlavní přístupy a to „bottom-up“, postavená na digesci proteinů pomocí proteas a následné LC-MS analýze, a „top-down“,

kdy je protein přímo analyzován MS a fragmentován až uvnitř spektrometru pomocí specifických technik [22], [23].

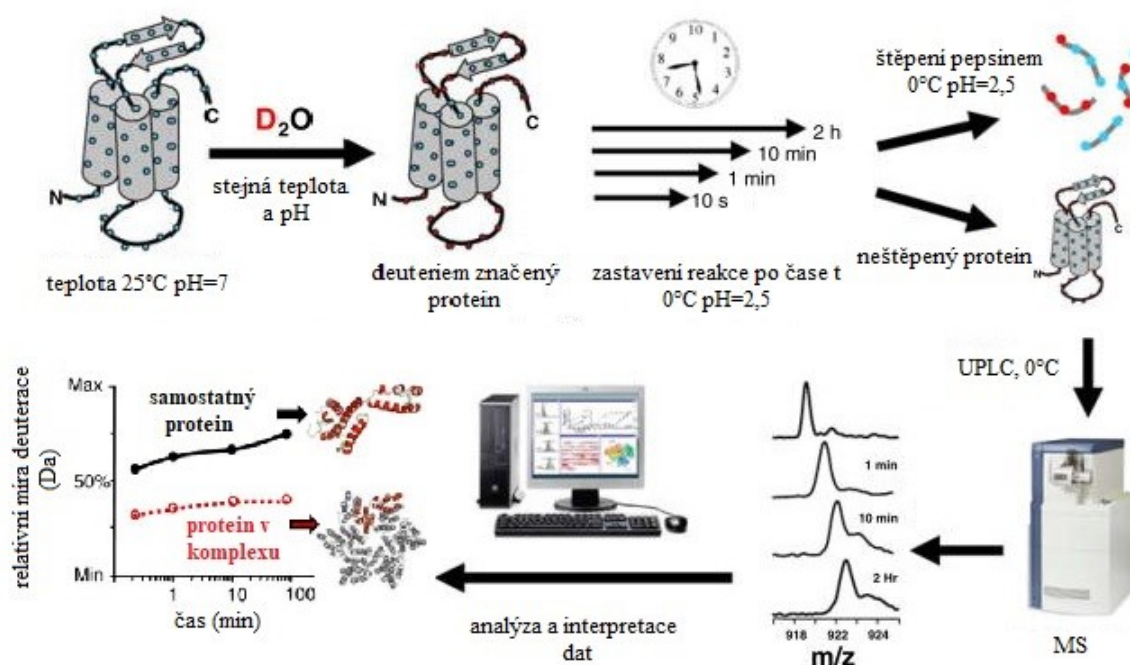
Ke štěpení proteinů v identifikační (kvalitativní) proteomice se nejčastěji používá trypsin. Je to velmi účinná a specifická proteasa štěpící na C-konci aminokyselin argininu a lysinu, pokud po nich nenásleduje prolin. Velkou výhodou jsou její relativně nízké pořizovací náklady a generování krátkých peptidů ideálních pro chromatografickou separaci. U trypsinu vysoké kvality (tzv. MS grade) je navíc přesně predikovatelný vzorec štěpení, což velmi usnadňuje interpretaci MS dat a identifikaci proteinů. Nevýhodou je, že generuje také velké množství peptidů kratších než 6 AMK, které nejsou identifikovatelné. Problémem pak je např. identifikace velmi bazických proteinů (např. histony), ze kterých trypsin generuje příliš krátké peptidy. Proto se hledají další specifické proteasy, které by generovaly co nejvíce detekovatelných peptidů, tedy by štěpily za méně častými aminokyselinami. Tím by vznikaly delší fragmenty, které jsou pro účely identifikace vhodnější (jejich hmotnost je unikátnější, než je tomu u krátkých peptidů). Zde se nabízí použití neprosinu, který štěpí především za prolinem a alaninem. Problémem je, že s využitím prokaryotického expresního systému, který velmi dobře funguje na nepenthesiny, není zatím možné připravit neprosin v dostatečném množství [24].

2.5.2 Vodík/deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií

Vodík/ deuteriová (H/D) MS je jednou z metod používaných ve strukturní biologii. Princip metody tkví ve sledování kinetiky deuterace proteinů v různých stavech např. v přítomnosti ligandu, při změně modifikace, denaturaci, interakci s dalším proteinem, při změně pH prostředí, apod. [25].

V nejčastěji využívaném uspořádání je sledován protein ve svém volném stavu a v přítomnosti ligandu (*Obr. 8*, str. 10). Analýza je prováděna za nativních, tzv. fyziologických podmínek (pH 7,5, 21 °C nebo 37 °C). Protein v obou stavech je naředěn do pufru z těžké vody (D₂O) a ve zvolených časech jsou odebrány vzorky k analýze. V nich je výměna výrazně zpomalena (zastavena) snížením pH na hodnotu 2,5 a ochlazením na 0 °C či zmražením v tekutém dusíku. Vzorky jsou následně postupně štěpeny proteasou a analyzovány pomocí LC-MS. Ze srovnání kinetiky deuterace dvou sledovaných stavů pak lze posuzovat strukturní změny indukované vazbou ligandu.

Samotná výměna je ovlivněna několika faktory. Strukturou postranních řetězců aminokyselin, teplotou, pH, přístupností rozpouštědla a zapojením vodíkových můstků. Chemické složení postranních řetězců, resp. sekvence, je danou a neměnnou vlastností každého proteinu. Teplotu a pH udržujeme během H/D výměny konstantní a z toho vyplývá, že studované změny odráží rozdíly v zapojení vodíkových můstků a v přístupnosti rozpouštědla. Aby bylo možné změny na proteinu lokalizovat, je v protokolu H/D MS využívána proteolýza na krátké fragmenty. Jelikož vzorek po výměně má nízké pH, je nutné využívat proteasy štěpící za těchto podmínek. Nejčastěji je využíván pepsin, který však v mnoha případech není schopen poskytnout štěpení s požadovanými parametry – plné pokrytí sekvence proteinu, délka peptidů mezi 6-12 AMK a řada překrývajících se peptidů [25].



Obrázek 8. Schéma průběhu vodík/deuteriové výměny spojené s hmotnostní spektrometrií, upraveno [26].

Proto se pepsin někdy používá v kombinaci s jinou kyselou proteasou, která má odlišnou specifitu štěpení. Případně jsou využívány tyto alternativní proteasy samostatně. Například nepenthesin I má oproti pepsinu tu výhodu, že kromě štěpení za hydrofobními zbytky, je schopen fragmentovat protein i za bazickými AMK (lysin, histidin, arginin). Naproti tomu neprosin štěpí především za prolinem a alaninem. Oba enzymy jsou stabilní při podmínkách H/D MS, tedy se zdají být dobrou alternativou k pepsinu [21], [27]. Nepenthesiny navíc vykazují až 1400× vyšší účinnost štěpení než pepsin, a tak se dají

použit v nižších koncentracích [28]. Dále se používá například aspergillopepsin nebo rhizopepsin, které stejně jako nepe I štěpí za bazickými AMK, ovšem poskytují jiné peptidy [29].

2.5.3 Degradace glutenu jako terapie celiakie

Celiakie je chronická autoimunitní enteropatie způsobená silnou imunitní reakcí T-buněk na pšeničný gluten a podobné proteiny z ječmene a žita. Projevuje se zánětem sliznice tenkého střeva (resp. atrofii klků), které tak není schopno vstřebávat živiny z potravy. Důsledkem je hubnutí, chudokrevnost, osteoporosa, střevní obtíže a celkový neprospěch organismu [30].

Gluten (lepek) se skládá převážně z proteinů gliadinu a gluteninu. Jejich aminokyselinová sekvence obsahuje vysoké zastoupení prolinu a glutaminu, které způsobují, že tyto proteiny nejsou dostatečně štěpeny v gastrointestinálním traktu a navázáním na MHC glykoproteiny 2. třídy, konkrétně specifické alely HLA-DQ2 a HLA-DQ8 na antigen prezentujících buňkách vyvolávají zánětlivou reakci v duodenu tenkého střeva. Dosud jedinou možností, jak snížit příznaky nemoci, bylo zavedení bezlepkové diety, tedy vyloučení všech potravin obsahující gluten. Některé studie prokázaly, že možnou alternativu představuje zahrnutí specificky štěpících endoproteas do stravy, které by přispěly ke větší degradaci glutenu a tedy by zamezily vzniku imunitní reakce [20], [31].

Jednou z popsaných endoproteas je prolyl endoproteasa *Aspergillus niger* (AN-PEP). Specificky štěpí v místech bohatých na prolin. Její aktivita byla detekována při pH 2-8, tedy je schopna štěpit gluten jak v prostředí žaludku, tak i na začátku tenkého střeva. Také je odolná vůči trávení pepsinem. AN-PEP podle studie degraduje štěpený i intaktní lepek a to v široké škále jejich druhů. Podle testu s T-buňkami peptidy vytvořené AN-PEP nevyvolávaly imunitní reakci [31], [32].

Jako lepší alternativu k AN-PEPu popsala v nedávné době skupina dr. Schriemera z University v Calgary kombinaci nepenthesinu a neprosinu. Jejich velkou výhodou je vysoká účinnost, která je až 25×vyšší než u AN-PEP. Nevýhodou ovšem zůstává jejich problematická příprava, která zatím brání klinickému testování [20].

Zkoumané endoproteasy ale nevykazují tak vysokou účinnost, aby mohly být použity samostatně pro zmírnění příznaků celiakie. Proto se o nich uvažuje spíše jako o doplňku při bezlepkové dietě [20].

3 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo připravit plasmidy nesoucí gen kódující aspartátové proteasy nepenthesin I a neprosin pro jejich expresi v eukaryotických buňkách.

- příprava insertů z plasmidů pET21a Nepe, pET28a Nepro, pMT/BiP/SLIN Nepe a pMT/BiP/SLIN Nepro
- restriční štěpení
- ligace genů Nepe a Nepro do expresního vektoru pMT/BiP/SLIN a genů SLIN Nepe a SLIN Nepro do expresních vektorů pSecTag Hygro A a pSecTag Hygro B
- transformace do kompetentních buněk *Escherichia coli*, izolace DNA a její sekvenace
- namnožení ověřených plasmidů

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Přístroje

přístroj:	název:	výrobce:
automatické pipety	Research plus (2,5;10;20;200;1000 µl)	Eppendorf
centrifuga	Centrifuga 5430 R Mini Spin	Eppendorf Eppendorf
inkubátor	EN 032	Nüve
pipetovací nástavec	Pipet Filler S1	Thermo Scientific
předvážky	SI-2002	Denver Instrument
spektrofotometr	NanoDrop One ^c	Thermo Scientific
termostat	Dry Bath Incubator Thermomixer Comfort	Major Science Eppendorf
thermocykler	T100 TM ThermalCycler	BIORAD
třepačka	Shaking Incubator MaxQ 5000	N-BIOTEK Inc. Thermo Scientific
UV transluminátor	UVT-20 M/W	Hero ab
vortex	Biovortex V1	BIOSAN
zdroj pro elektroforesu	ENDURO Power Supplies 300V	Labnet International Inc.

4.1.2 Chemikálie

výrobce:	chemikálie:
Sigma-Aldrich	agarosa Ampicillin 0,06 M kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) dodecylsíran sodný (SDS) Luria Bertani Broth (LB) Trizma base (2 M Tris) ORANGE G

	sada GenElute™ PCR Clean-Up Kit
Lachner	99% kyselina octová 96% ethanol
FisherScientific - Invitrogen	S.O.C. medium (2% trypton, 0,5% kvasnicový extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ a 20 mM glukosa) vektorová DNA pSecTag Hygro A vektorová DNA pSecTag Hygro B vektorová DNA pMT/BiP/V5 HisA (upraveno)
Biotium	GelRed® Nucleic Acid Gel Stain
MP biomedicals	glycerol
QIAGEN	sada QIAprep Spin Miniprep kit sada QIAGEN Plasmid Plus Midi kit
New England Biolabs Inc.	CutSmart NEBuffers 3.1
Fermentas	Fermentas GeneRuler 1kb DNA Ladder

název roztoku:	složení:
TAE pufr	2 M Tris, 5,7% ledová kyselina octová, 0,05 M EDTA
ORANGE G 5×	0,2% Orange G, 30% glycerol, 0,06 M EDTA

4.1.3 Primery, enzymy, vektory, kompetentní buňky

4.1.3.1 Primery

název:	sekvence:	výrobce:
Nepel_F1_BglII	5'-AAAAAGATCTATGACGTC AAGAACAGCTCTCAATC	Sigma-Aldrich
Nepel_RST_XhoI	5'-TTAACTCGAGTTATCACGA CGCACCACATTGAGCAG	Sigma-Aldrich
Nepro_F1_BglII	5'-AAAAAGATCTCGCAGCAT CCAAGCAAGACTGGCG	Sigma-Aldrich
Nepro_RST_XhoI	5'-TTAACTCGAGTTATCATTG	Sigma-Aldrich

	GCAACCTGGACCGCCG	
F_SFSLIN_1	5'–AAAGATATCGGTACCTCCT GGAGCCACCCCAATTCGAG	Sigma-Aldrich
F_SFSLIN_1A	5'–AACATGGCGCGCCTCCTGG AGCCACCCCAATTCGAG	Sigma-Aldrich
MT (forward)	5'–CATCTCAGTGCAACTAAA	Sigma-Aldrich
T7 (forward)	5'–TAATACGACTCACTATAGG G	Sigma-Aldrich
Bgh (reverse)	5'– TAGAAGGCACAGTCGAGG	Sigma-Aldrich

4.1.3.2 Enzymy

enzym:

výrobce:

<i>PfuUltra II</i> Hotstart PCR MM polymerasa	Aqilent Technologies Inc.
alkalická fosfatasa (FastAP™ Thermosensitive alk.phos.)	Thermo Scientific
BLUNT/TA ligasa Master Mix	New England Biolabs Inc.
<i>Bgl II</i> (restrikční místo A/GATCT)	New England Biolabs Inc.
<i>Xho I</i> (restrikční místo C/TCGAG)	New England Biolabs Inc.
<i>Asc I</i> (restrikční místo GG/CGCGCC)	New England Biolabs Inc.
<i>Kpn I-HF</i> (restrikční místo GGTAC/C)	New England Biolabs Inc.

4.1.3.3 Vektory

vektor:

výrobce:

pMT/BiP/V5-His A (prekurzor pro pMT/BiP/SLIN)	Fischer Scientific - Invitrogen
pSecTag Hygro A	Fischer Scientific - Invitrogen
pSecTag Hygro B	Fischer Scientific - Invitrogen

4.1.3.4 Kompetentní buňky

kompetentní buňky:

výrobce:

DH5α Subcloning Efficiency	New England Biolabs Inc.
genotyp: <i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	
DH5α Library Efficiency	Fischer Scientific - Invitrogen
genotyp: <i>F-φ80lacZΔM15 Δ((lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i>	

4.2 Metody

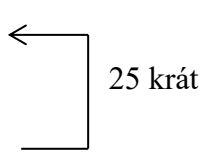
4.2.1 PCR

Pomocí PCR byla namnožena sekvence DNA enzymů nepenthesin I (nepe) a neprosin (nepro). Byla namíchána reakční směs, která obsahovala 20 ng DNA, 20 μ mol primerů (forward a reverse), 4 μ l sterilní vody a 10 μ l *Pfu II* polymerasy (2 \times Master Mix).

Připravená směs v mikrozkuhavce byla vložena do thermocykleru (BIO-RAD T100™ Thermal Cycler), na němž byl nastaven program podle tabulky (Tab. 1).

Tabulka 1. Program PCR.

Fáze	teplota [°C]	doba trvání [min]
1	95	2
2	95	0,5
3	55	0,5
4	72	1,5
5	72	5
6	4	do vypnutí



4.2.2 Čištění DNA sadou GenElute™ PCR Clean-Up Kit

Připravené PCR produkty byly přečištěny sadou GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich). Tato sada je určena pro čištění jednořetězcových a dvouřetězcových produktů PCR větších než 100 bp od ostatních složek reakce jako jsou primery, nukleotidy, DNA polymerasa, atd. Sadu lze však použít i pro přečištění DNA větší než 100 bp např. po štěpení restrikčními endonukleasami.

Izolační kolonka byla vložena do mikrozkuhavky a do ní bylo napipetováno 0,5 ml roztoku pro přípravu kolonky („Column Preparation Solution“) a mikrozkuhavka byla centrifugována 60 s na 11300 \times g. Roztok pod kolonkou byl odstraněn a do kolonky byl přidán vzorek, který byl připraven smícháním celého objemu směsi DNA a pětinasobného objemu vazebného roztoku („Binding Solution“). Mikrozkuhavka byla centrifugována 60 s na 11300 \times g. Roztok pod kolonkou byl vylit a kolonka byla promyta 0,5 ml promývacího roztoku („Wash Solution“); centrifugace 60 s na 11300 \times g. Po odstranění promývacího roztoku byly prázdné kolonky v mikrozkuhavkách opět centrifugovány

a to 2 min na 11300×g. Kolonka byla vyjmuta a přemístěna do nové mikrozkušavky. Poté bylo do ní napipetováno 35 µl elučního roztoku („Elution Solution“) a necháno inkubovat 3 minuty. Po inkubaci byla mikrozkušavka s kolonkou centrifugována 60 s na 11300×g. Kolonka byla odstraněna a koncentrace DNA v eluátu byla stanovena na přístroji Thermo Scientific NanoDrop One^c.

4.2.3 Agarosová gelová elektroforesa

Agarosový gel o koncentraci 0,8% byl připraven tak, že do 35 ml TAE pufru v Erlenmayerově baňce bylo přidáno 0,28 g agarosy. Směs byla zvážena a zahřívána do rozpuštění agarosy přibližně 1,5 min v mikrovlnné troubě. Poté byl rozdíl hmotnosti dorovnán destilovanou vodou a směs byla mírně ochlazená rotací baňky pod studenou vodou. Byl přidán 1 µl Gel Red. Roztok agarosy byl nalit do připravené vaničky utěsněné gumovým těsněním a byl přidán plastový hřebínek pro vytvoření jamek. Ze zatuhlého gelu byl hřebínek opatrně vyjmut a bylo odebráno gumové těsnění.

Elektroforetická nádoba byla naplněna TAE pufrem a byla do ní vložena vanička s připraveným gelem a naneseny vzorky (20-30 ng DNA + 1 µl ORANGE G 5×) spolu s DNA standardem (Fermentas GeneRuler 1kb DNA Ladder). Elektroforesa probíhala 35-50 min při napětí 90 V.

4.2.4 Štěpení insertů a vektorů

Ke štěpení byly použity restriční endonukleasy *Bgl II*, *Xho I*, *Asc I* a *Kpn I*. Jako pufr byl použit NEBuffers 3.1. a CutSmart od firmy New England Biolabs. Reakční směsi o celkovém objemu 40 µl pro jednotlivé inserty a vektory byly připraveny tak, aby výsledná směs obsahovala DNA o maximální koncentraci 100 ng/µl, enzymy aby tvořily maximálně 10% reakce a pufr byl 10× ředěný oproti původní koncentraci. Pokud takto připravená reakce nedosahovala objemu 40 µl, byla na tento objem doplněna sterilní H₂O.

Připravená reakční směs byla nechána inkubovat v termostatu při 37 °C přes noc. Štěpná reakce byla inaktivována přidáním SDS na výslednou koncentraci 1% a následnou 20-minutovou inkubací (Major Science Dry Bath Incubator) při 65 °C. U vektorů byla reakce inaktivována až po defosforylaci (kapitola 4.2.5). Poté byly všechny vzorky přečištěny sadou GenElute™ PCR Clean-Up Kit (postup v kapitole 4.2.2).

Aby byla ověřena účinnost štěpení, byla provedena agarosová elektroforesa, na níž byl nanesen původní a štěpený vektor, podle postupu v kapitole 4.2.3.

4.2.5 Defosforylace vektorů

Aby se rozštěpené vektory libovolně opět neuzavíraly, je nutné konce DNA defosforylovat, tedy odstranit fosfátové skupiny, přes které by se koncové nukleotidy mohly spojit. 3 µg DNA byly smíchány se 3 U alkalické fosfatasy (FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase) s přídatkem 5 µl pufru FastAp Buffer 10× o celkovém objemu 50 µl. Směs byla inkubována 10 min při 37 °C. Poté byl přidán roztok SDS na výslednou koncentraci 1% a alkalická fosfatasa byla denaturována zahříváním po dobu 5 min na teplotu 75 °C. Defosforylovaná DNA byla přečištěna sadou GenElute™ PCR Clean-Up Kit (postup v kapitole 4.2.2).

4.2.6 Ligace

Začlenění insertu do vektoru se provádělo ve směsi, která obsahuje 20-100 ng vektoru a trojnásobný molární přebytek DNA insertu o celkovém objemu 5 µl. Byla použita BLUNT/T4 ligasa Master Mix (New England Biolabs). Namíchané směsi byly nechány inkubovat při laboratorní teplotě 15 min.

4.2.7 Transformace

Ligační směs byla použita pro transformaci do buněk DH5α - Library Efficiency (*Escherichia coli*). Pro transformaci DNA před midiprepem byly použity buňky DH5α - Subcloning Efficiency.

Kompetentní buňky v mikrozkuřkách byly umístěny na led a ligační směs byla naředěna vodou v poměru 3:1 (vzorek DNA:sH₂O).

Do 20 µl buněk byl přidán 1 µl ligační směsi (přibližně 6 ng plasmidové DNA). Poté byla směs promíchána a nechána inkubovat na ledu po dobu 30 min. Po inkubaci byly vystaveny teplotnímu šoku (42 °C na 45 s) a poté umístěny na led na 2 min. K buňkám bylo přidáno 200 µl S.O.C. media a buněčná suspenze byla vložena do třepačky na 600 rpm, 1 hod při 37 °C. Buněčná suspenze byla centrifugována na 2400×g (Eppendorf Mini Spin) na 2 min, bylo odstraněno 130 µl supernatantu a ve zbylém objemu byla vzniklá peleta resuspendována. Suspenze byla přenesena na Petriho misku s agarem a selekčním antibiotikem, vytemperovaná na laboratorní teplotu. Buněčná suspenze byla rovnoměrně rozprostřena po misce skleněnými kuličkami a misky byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C (Nüve EN 032). Po inkubaci byly spočítány narostlé kolonie na miskách.

4.2.8 Minipreparativní izolace DNA

Z narostlých kolonií na agarové misce byly do sterilních uzavíratelných zkumavek se 2,1 ml LB média s antibiotikem sterilně odpíchnuty kolonie. Zkumavky byly inkubovány za přítupu vzduchu přes noc na 37 °C při třepání na 250 rpm (N-BIOTEK Inc. Shaking Incubator).

Po inkubaci byl obsah zkumavky přelit do mikrozukavky, která byla centrifugována 1 min na 11300×g. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a dále se pracovalo s bakteriální peletou pomocí sady QIAprep Spin Miniprep kit od firmy QIAGEN.

Peleta byla resuspendována v 250 µl pufru P1 (s RNasou A a barvivem Lyse Blue). Poté bylo přidáno 250 µl pufru P2 a po zmodrání se roztok nechal stát 4,5 min. Dále bylo přidáno 350 µl N3 pufru, po promíchání vznikla bílá sraženina, centrifugace 10 min na 11300×g. Supernatant byl přenesen do připravené mikrozukavky s kolonkou a centrifugován 1 min na 11300×g. Kolonka byla nejprve promyta 500 µl PB pufru (centrifugace 1 min na 11300×g) a následně 750 µl promývacího PE pufru s ethanolem (centrifugace 1 min na 11300×g). Poté byla prázdná kolonka opět centrifugována 1 min na 11300×g, přemístěna do čisté mikrozukavky a bylo do ní napipetováno 50 µl elučního EB pufru. Po 5-minutové inkubaci byla DNA z kolonky eluována centrifugací 1 min na 11300×g. Koncentrace vzorku byla změřena na spektrofotometru Thermo Scientific NanoDrop One^c.

4.2.9 Sekvence

Ověření správnosti vytvořených vektorů bylo zajištěno Sangerovu sekvenací DNA (GATC-biotech).

Pro sekvenaci bylo 400 až 500 ng DNA smícháno s 1 µl 25 µM sekvenačního primeru a vzorek byl doplněn do celkového objemu 10 µl sterilní vodou.

4.2.10 Midipreparativní izolace DNA

Expresní plasmidy byly namnoženy pomocí midiprepu pro pozdější transfekci do eukaryotických buněk.

Do vyklávaných Erlenmayerových baněk s uzávěrem bylo odměřeno 80 ml LB media, do kterého bylo přidáno 100 µg Ampicilinu. Tento roztok byl sterilně zaočkován jednou z vybraných kolonií z agarové misky. Inkubace probíhala v třepačce (Thermo Scientific MaxQ 5000) při 37 °C při 230 rpm přes noc.

Buněčná suspenze byla v 50 ml zkumavce centrifugována (Eppendorf Centrifuga 5430 R) při 4200×g, teplotě 4 °C po dobu 5 min. Supernatant byl odstraněn a dále se pracovalo s buněčnou peletou pomocí sady QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit.

K peletě byly přidány 4 ml pufru P1 (s RNasou A a LyseBlue) a peleta byla resuspendována na vortexu. Dále byly přidány 4 ml pufru P2, roztok byl kýváním promíchán do homogenní modré barvy a inkubován 3 min. Byly přidány 4 ml S3 pufru, roztok byl promíchán do vytvoření bílých sraženin. Roztok byl přefiltrován filtračním nástavcem do 15ml plastové zkumavky. K přefiltrovanému roztoku byly přidány 2 ml BB pufru a roztok byl nanesen na kolonku. Na spodní část kolonky byla připojena prostřednictvím silikonové hadičky prázdná stříkačka, do které byl roztok přes kolonku odsát a kolonka byla vložena do čisté mikrozukavky a bylo do ní napipetováno 700 µl ETR pufru, centrifugováno 1 min na 11300×g. Kapalina v mikrozukavce byla vylita a do kolonky bylo napipetováno 700 µl PE pufru, centrifugováno 1 min na 11300×g. Kapalina opět odstraněna a prázdná kolonka byla opět stočena 1 min na 11300×g. Kolonka byla přemístěna do nové mikrozukavky, byl přidán eluční EB pufr, necháno stát 5 min a poté stočeno 1 min na 11300×g. Eluce byla podle koncentrace výsledného eluátu dvakrát až třikrát opakována, přičemž se zmenšovaly objemy přidávaného EB pufru, aby nedošlo ke zbytečnému ředění produktu. Při první eluci bylo přidáno 200 µl pufru, při druhé 100 µl a při třetí 50 µl. Jejich koncentrace byla spektrofotometricky stanovena na přístroji Thermo Scientific NanoDrop One[®]. Všechny eluáty, které měly koncentraci DNA větší než 100 ng/µl byly smíchány a byla změřena koncentrace vzniklého roztoku.

Připravená plasmidová DNA pMT/BiP/SLIN Nepe a Nepro je určena pro transfekci do S2 buněk (*Drosophila Schneider 2 cells*) a plasmidová DNA pSecTag HA SLIN Nepe a pSecTag HB SLIN Nepe je určena pro transfekci do HEK buněk.

5 Výsledky

5.1 Příprava insertů

Pomocí PCR (kapitola 4.2.1) byly namnoženy sekvence DNA kódující cílové proteasy, které byly dále použity jako inserty pro ligaci do expresních vektorů.

Reakční směsi pro amplifikaci insertů Nepe a Nepro pro klonování do vektoru pMT/BiP/SLIN byly namíchány podle *Tab. 2* a jako templát byly použity dostupné plasmidy pET21a Nepe a pET28a Nepro.

Tabulka 2. Složení reakčních směsí pro přípravu insertů Nepe a Nepro.

Roztok	Objem [μl]	Roztok	Objem [μl]
10 ng/μl pET21a Nepe	2	10 ng/μl pET28a Nepro	2
10 μM Nepe1_F1_BglII	2	10 μM Nepro_F1_BglII	2
10 μM Nepe1_RST_XhoI	2	10 μM Nepro_RST_XhoI	2
sterilní H ₂ O	4	sterilní H ₂ O	4
<i>Pfu II</i> polymerasa (2×MM)	10	<i>Pfu II</i> polymerasa (2×MM)	10

Reakční směsi pro přípravu insertů SLIN Nepe a SLIN Nepro pro klonování do vektorů pSecTag HA a pSecTag HB byly namíchány podle *Tab. 3* a jako templáty byly použity dostupné plasmidy pMT/BiP/SLIN Nepe a pMT/BiP/SLIN Nepro.

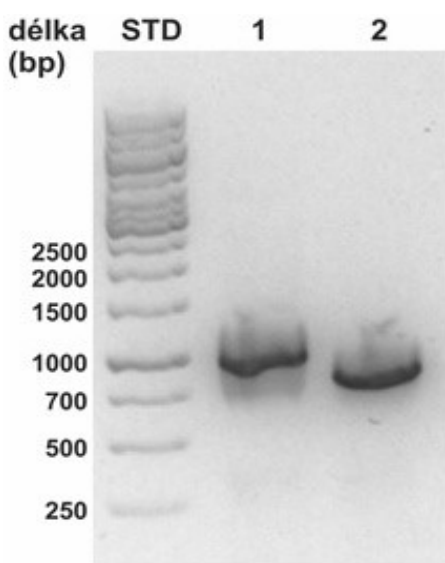
Tabulka 3. Složení reakčních směsí pro přípravu insertů SLIN Nepe a SLIN Nepro.

Roztok	Objem [μl]	Roztok	Objem [μl]
10 ng/μl DNA (pMT/BiP/SLIN Nepe)	2	10 ng/μl DNA (pMT/BiP/SLIN Nepro)	2
10 μM F_SFSLIN_1	2	10 μM F_SFSLIN_1A	2
10 μM Nepe1_RST_XhoI	2	10 μM Nepro_RST_XhoI	2
sterilní H ₂ O	4	sterilní H ₂ O	4
<i>Pfu II</i> polymerasa (2×MM)	10	<i>Pfu II</i> polymerasa (2×MM)	10

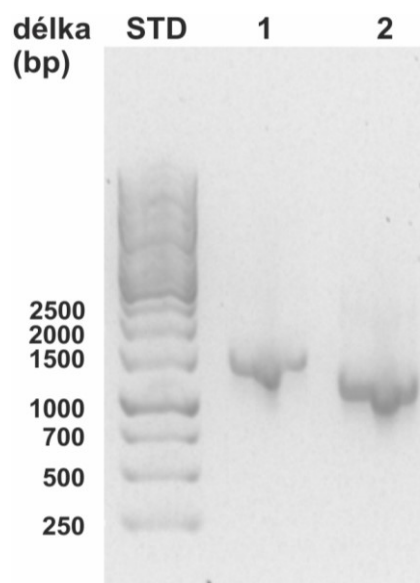
Produkty PCR byly pročištěny sadou GenElute™ PCR Clean-Up Kit, byla změřena jejich koncentrace v eluátu (*Tab. 4*) a následně byly naneseny na agarosovou elektroforesu pro zjištění velikostí. Výsledné gely jsou zobrazeny na *Obr. 9* a *Obr. 10*.

Tabulka 4. Koncentrace a celkové množství PCR produktů v eluátu.

PCR produkt	koncentrace [ng/μl]	množství DNA [ng]
Nepe	74	2516
Nepro	38	1292
SLIN Nepe	36	1224
SLIN Nepro	47	1598



Obrázek 9. Fotografie výsledku z agarosové elektroforesy po amplifikaci insertů Nepe (1) a Nepro (2). STD značí DNA délkový standart. Délky fragmentů STD jsou vyznačeny vlevo. Předpokládané velikosti: 1250 bp pro Nepe a 1100 bp pro Nepro.



Obrázek 10. Fotografie výsledku z agarosové elektroforesy po amplifikaci insertů SLIN Nepe (1) a SLIN Nepro (2). STD značí DNA délkový standart. Délky fragmentů STD jsou vyznačeny vlevo. Předpokládané velikosti: 1396 bp pro SLIN Nepe a 1221 bp pro SLIN Nepro.

Předpokládané velikosti insertů byly 1250 bp pro Nepe, 1100 bp pro Nepro, 1396 bp pro SLIN Nepe a 1221 bp pro SLIN Nepro. Na gelu na *Obr. 9* jsou viditelné dva proužky, u nepe o velikosti kolem 1000 bp a u nepro kolem 850 bp, což přibližně odpovídá očekávaným velikostem daných PCR produktů. Na gelu z *Obr. 10* jsou rovněž patrné dva

proužky, u SLIN Nepe o přibližné velikosti 1400 bp a u SLIN Nepro o velikosti 1200 bp, což odpovídá předpokladům.

5.2 Štěpení vektorů a insertů, ligace

Pro spojení vektoru s insertem bylo nezbytné je štěpit stejnými restrikčními endonukleasami, aby mohlo dojít k začlenění insertu do vektoru (postup v kapitole 4.2.4).

Ke štěpení insertů Nepe a Nepro a vektoru pMT/BiP/SLIN byly použity restrikční endonukleasy *Bgl II* a *Xho I* a pufr NEBuffers 3.1. Konkrétní složení reakční směsi je popsáno v *Tab. 5*.

Tabulka 5. Složení reakčních směsí štěpení insertů Nepe a Nepro a vektoru pMT/BiP/SLIN.

	pMT/BiP/SLIN	Nepe	Nepro
DNA	2,9 µg	2 µg	1 µg
NEBuffers 3.1	4 µl	4 µl	4 µl
<i>Bgl II</i>	20 U	10 U	10 U
<i>Xho I</i>	20 U	10 U	10 U
sH ₂ O	21 µl	7,5 µl	7,5 µl
celkový objem	40 µl	40 µl	40 µl

Ke štěpení insertů SLIN Nepe a SLIN Nepro a vektorů pSecTag Hygro A a pSecTag Hygro B byly použity restrikční endonukleasy *Asc I*, *Kpn I* a *Xho I* a pufr CutSmart. Složení reakční směsi je popsáno v *Tab. 6*.

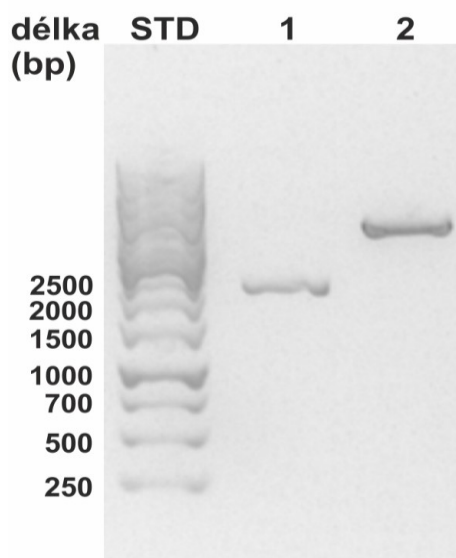
Tabulka 6. Složení reakčních směsí štěpení insertů SLIN Nepe a SLIN Nepro a vektorů pSecTag Hygro A a pSecTag Hygro B.

	pSecTag HA	pSecTag HB	SLIN Nepro	SLIN Nepe
DNA	3 µg	3 µg	1 µg	1,3 µg
CutSmart	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
<i>Asc I</i>	20 U	-	10 U	-
<i>Kpn I</i>	-	20 U	-	10 U
<i>Xho I</i>	20 U	20 U	10 U	10 U
sH ₂ O	25 µl	16 µl	5,5 µl	6 µl
celkový objem	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl

Po defosforylaci a inaktivaci štěpné reakce vektoru pMT/BiP/SLIN (kapitola 4.2.5) byla provedena agarosová elektroforesa (kapitola 4.2.3) na níž byl nanesen původní a štěpený vektor, aby byla ověřena účinnost štěpné reakce (Obr. 11).

Předpokládaná velikost vektoru pMT/BiP/SLIN je 3712 bp. Na gelu (Obr. 11) jsou vidět dva proužky; neštěpený vektor o velikosti přibližně 3000 bp a štěpený vektor, který podle standardu odpovídá velikosti okolo 5000 bp. Štěpený vektor se zdá být mnohem větší než původní v důsledku linearizace DNA vektoru štěpnou reakcí, což zapříčinilo jeho menší pohyblivost v gelu.

Inaktivované směsi byly pročištěny sadou GenElute™ PCR Clean-Up Kit a byla spektrofotometricky stanovena koncentrace DNA v těchto směsích (Tab. 7). Z eluátů dále byla namíchána ligační směs, která obsahuje DNA vektoru a insertu v molárním poměru 1:3 (kapitola 4.2.6). Ligací vznikly plasmidy pMT/BiP/SLIN Nepe, pMT/BiP/SLIN Nepro, pSecTag HA SLIN Nepro a pSecTag HB SLIN Nepe. Zároveň s nimi byla připravena i negativní kontrola (štěpený vektor bez insertu).



Obrázek 11. Fotografie výsledku ze štěpení vektoru pMT/BiP/SLIN a následné defosforylaci. V dráze 1 výchozí plasmid, v dráze 2 štěpený (linearizovaný) plasmid. STD značí DNA délkový standart. Délky fragmentů STD jsou vyznačeny vlevo.

Tabulka 7. Koncentrace a hmotnost štěpené DNA vektorů a insertů.

štěpená DNA	koncentrace [ng/μl]	hmotnost DNA [ng]
Nepe	39	1326
Nepro	21	714
pMT/BiP/SLIN	79	2686
SLIN Nepe	20	680
SLIN Nepro	29	986
pSecTag Hygro A	76	2584
pSecTag Hygro B	16	544

5.3 Transformace a izolace DNA

Ligační směsi byly použity pro transformaci vzniklého plasmidu do buněk. Byly použity buňky *Escherichia coli* DH5 α Library Efficiency (ThermoFisher) a transformace byla provedena postupem popsáným v kapitole 4.2.7. Po inkubaci na agarové misce byly vzniklé kolonie spočítány (Tab. 8) a poté některé z nich vybrány pro minipreparativní izolaci.

Tabulka 8. Počty kolonií transformovaných buněk DH5 α .

pMT/BiP/SLIN Nepe	100	pSecTag HB SLIN Nepe	20
pMT/BiP/SLIN Nepro	180	pSecTag HA SLIN Nepro	40
negativní kontrola (pMT/BiP/SLIN)	46	negativní kontrola (pSecTag HA)	0
		negativní kontrola (pSecTag HB)	0

Do LB media s ampicilinem ve sterilních zkumavkách byly zaočkovány vybrané kolonie transformovaných buněk. Po inkubaci a izolaci DNA z buněk postupem popsáným v kapitole 4.2.8 byla spektrofotometricky stanovena její koncentrace v eluátu, která byla přepočtena na celkové množství izolované DNA (Tab. 9). Izolované DNA byly poslány na sekvenaci Sangerovou metodou pro ověření správnosti plasmidů. Ze srovnání výsledků ze sekvenačních reakcí s teoretickou sekvencí bylo zjištěno, že se nám podařilo připravit správné plasmidy pMT/BiP/SLIN Nepe, pMT/BiP/SLIN Nepro a pSecTag HB SLIN Nepe. I přes opakované ligace, transformace a izolace DNA se však nepodařilo připravit plasmid pSecTag HA SLIN Nepro.

Tabulka 9. Hmotnostní výtěžek DNA z minipreparativní izolace.

plasmid	množství DNA [μ g]
pMT/BiP/SLIN Nepe	29,7
pMT/BiP/SLIN Nepro	22,3
pSecTag HB SLIN Nepe	14,2

Plasmidy pMT/BiP/SLIN Nepe a pMT/BiP/SLIN Nepro byly dále transformovány do kompetentních buněk DH5 α Subcloning Efficiency (New England Biolabs) a poté byla vybraná kolonie z obou misek zočkována do 80 ml LB media s ampicilinem. Po inkubaci a midipreparativní izolaci DNA byla v eluátech každého plasmidu spektrofotometricky

stanovena koncentrace a následně vypočteno celkové množství DNA (*Tab. 10*). Tato DNA pak byla použita k transformaci Schneiderových S2 buněk a selekci populace S2 buněk exprimujících cílové proteasy.

Tabulka 10. Hmotnostní výtěžek DNA z midipreparativní izolace

plasmid	množství DNA [μg]
pMT/BiP/SLIN Nepe	573,3
pMT/BiP/SLIN Nepro	1061,8

6 Diskuse

Cílem práce bylo připravit expresní plasmidy pro eukaryotické buňky S2 a HEK nesoucí geny pro kyselé aspartátové proteasy nepenthesin I a neprosin. Oba enzymy se přirozeně nacházejí v trávici šťávě masožravých rostlin rodu *Nepenthes*, ovšem ve velmi nízké koncentraci, která nedovoluje jejich detailnější studium. Proto se výzkumné skupiny snaží najít vhodný expresní systém, který by poskytoval dostatečně vysoké výtěžky rekombinantních enzymů, které budou stabilní jako jejich formy v trávicích šťávách. V naší skupině se využívá expresní systém buněk *E. coli*. Ty poskytují vysoké výtěžky nepenthesinu I, ale problémem je jeho nízká stabilita způsobená pravděpodobně vlivem chybějící glykosylace. Neprosin se v *E. coli* daří připravit pouze v nízkém výtěžku.

Molekula nepenthesinu I obsahuje 6 disulfidických vazeb a 6 potenciálních N-glykosylačních míst. Prokaryotický expresní systém tak není pro heterologní expresi zcela vhodný, protože neumožňuje připojení N-vázaných cukrů a navíc redukční prostředí cytoplasmy *E. coli* nepodporuje účinnou tvorbu disulfidických můstků. V současnosti je tak nutné nepenthesin I produkovaný v *E. coli* renaturovat a to za podmínek, které zapojení disulfidů umožňují. Alternativou rovněž byla sekrece do periplazmatického prostoru, která ale poskytovala mnohem nižší výtěžky. Nepenthesin I produkovaný v bakteriích má sice po renaturaci *in vitro* správně zapojené disulfidické můstky, ale jak bylo experimentálně prokázáno, tak vykazuje nižší stabilitu vůči autodigesti a denaturaci než přirozený nepenthesin I izolovaný z láček. Příčinou by mohla být chybějící N-glykosylace, jejíž stabilizující efekt na strukturu proteinu je doložený v literatuře.

Proto byly zvoleny eukaryotické expresní systémy S2 buněk a HEK buněk, které by mohly poskytovat lepší výsledky, jelikož současně umožňují N-glykosylaci a zajišťují správné spojení disulfidických můstků.

Nejprve bylo nutné připravit úseky DNA kódující oba enzymy, které budou dále použity jako inserty do expresních vektorů. Pomocí PCR a vhodně zvolených primerů byly amplifikovány inserty Nepe a Nepro z plasmidů pET21a Nepe a pET28a Nepro poskytnutých školitelem; a dále inserty SLIN Nepe a SLIN Nepro z plasmidů pMT/BiP/SLIN Nepe a pMT/BiP/SLIN Nepro, které byly připraveny v rámci této bakalářské práce. Velikost PCR produktů byla ověřena na agarosové elektroforese, výsledné gely jsou zobrazeny na *Obr. 9* a *Obr. 10* na str. 22. Velikosti DNA všech insertů odpovídá předpokládaným velikostem PCR produktů.

Vektory pMT/BiP/SLIN, pSecTag HA a HB a inserty z PCR byly štěpeny pomocí restričních endonukleas. Jestli štěpení proběhlo, bylo zjištěno nanesením vzorku na agarosovou elektroforesu. Na *Obr. 11* na str. 24 je zobrazen výsledný gel. Z něho je patrné, že štěpený vektor odpovídá větší velikosti než vektor původní. To je způsobené linearizací původně cirkulárního vektoru po štěpení, což zapříčinilo jeho menší pohyblivost gelem. Štěpení tedy úspěšně proběhlo. Do tohoto kroku proběhlo vše bez zjevných obtíží.

Dále byly namíchané ligační směsi, z nichž měly vzniknout výsledné expresní plasmidy. Po inkubaci byla ligační směs použita pro transformaci do kompetentních buněk DH5a (*E. coli*). Po inkubaci byly spočítány vzniklé kolonie (jejich počty jsou uvedeny v *Tab. 8*, str. 25). Z tabulky vidíme, že na misce s negativní kontrolou (tedy štěpeným vektorem pMT/BiP/SLIN bez insertu) vyrostlo 46 kolonií, což v poměru k nárůstům buněk s vytvořenými plasmidy naznačuje možnou nedokonalou defosforylaci, která způsobila opětovné spojení konců linearizované DNA bez přijetí insertu. Vybrané kolonie byly zaočkovány do LB media s ampicilinem (plasmid v sobě nese rezistenci vůči ampicilinu). Z minipreparativní izolace každé kolonie byla získána plasmidová DNA, která byla poslána na sekvenaci. Z misky s plasmidem pMT/BiP/SLIN Nepe byla správná 1 ze 2 odebraných kolonií a s plasmidem pMT/BiP/SLIN byla správná 1 ze 4. Správná DNA plasmidu pSecTag HB SLIN Nepe byla izolována z obou odebraných kolonií. DNA plasmidu pSecTag HA SLIN Nepro se nepodařilo izolovat. Příčin může být několik, od špatné amplifikace insertu SLIN Nepro (při sekvenaci byl v některých koloniích přítomen původní plasmid pMT/BiP/SLIN Nepro), nedostatečná defosforylace vektoru, který se zavřel a nepřijal insert, neochota kompetentních buněk přijmout připravený plasmid, atd.

Plasmidy pMT/BiP/SLIN Nepe a pMT/BiP/SLIN Nepro byly následně Mgr. Petrou Baranovou transfekovány do S2 buněk a proběhla produkce obou proteinů. Následnou analýzou produkovaných proteinů bylo zjištěno, že se oba proteiny produkují v předpokládané délce a jsou glykosylované. Také se potvrdilo, že jsou obě proteasy v kyselém prostředí aktivní a štěpí substrátové proteiny dle očekávaných preferencí. Dále bude studována glykosylace obou enzymů a jejich stabilita po aktivaci. Také byla provedena transfekce plasmidu pSecTag HB SLIN Nepe do buněk HEK293, exprese ovšem neproběhla.

Zajímavé je, že nepenthesin I se podařilo připravit pouze v S2 buňkách a ne v HEK293. Důvod, proč se to v HEK buňkách nepodařilo, neznáme, nicméně toto zjištění

je v souladu s dostupnou literaturou a našimi interními daty, která ukazují, že pro přípravu rekombinantních proteinů je v principu velmi výhodné použít modulární systémy, které umožňují (i) expresi v různých produkčních organizmech a (ii) připojení různých kombinací purifikačních značek na N- nebo C- konec cílového proteinu. Je třeba zdůraznit, že se často jedná o časově a finančně dosti náročný postup, protože předem bohužel není možné určit, která kombinace purifikačních značek a expresních systému povede ke kýženému výsledku. V naší laboratoři například exprese histondeacetylas s N-terminální fúzí s HALO tagem obecně zvyšuje úroveň exprese přibližně 100×.

7 Závěr

Podářilo se připravit ři expresní plasmidy, konkrétně pMT/BiP/SLIN Nepe a pSecTag HB SLIN Nepe kódující kyselou aspartátovou proteasu nepethesin I a pMT/BiP/SLIN Nepro kódující kyselou proteasu neprosin.

Nezdarilo se připravit expresní plasmid pSecTag HA SLIN Nepro.

8 Seznam literatury

- [1] D. R. Davies, „The Structure and Function of the Aspartic Proteinases", *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, roč. 19, č. 1, s. 189–215, 1990.
- [2] B. M. Dunn, „Structure and Mechanism of the Pepsin-Like Family of Aspartic Peptidases", *Chem. Rev.*, roč. 102, č. 12, s. 4431–4458, pro. 2002.
- [3] N. D. Rawlings, M. Waller, A. J. Barrett, a A. Bateman, „MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors", *Nucleic Acids Res*, roč. 42, č. D1, s. D503–D509, led. 2014.
- [4] A. R. Khan a M. N. G. James, „Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes", *Protein Science*, roč. 7, č. 4, s. 815–836, pro. 2008.
- [5] M. N. G. James a A. R. Sielecki, „The mechanism of activation of porcine pepsinogen (reply)", *Nature*, roč. 322, č. 6080, s. 664, srp. 1986.
- [6] J. Marcinišzyn, J. S. Huang, J. A. Hartsuck, a J. Tang, „Mechanism of intramolecular activation of pepsinogen. Evidence for an intermediate delta and the involvement of the active site of pepsin in the intramolecular activation of pepsinogen.", *J. Biol. Chem.*, roč. 251, č. 22, s. 7095–7102, lis. 1976.
- [7] B. M. Dunn, „Overview of Pepsin-like Aspartic Peptidases", *Current Protocols in Protein Science*, roč. 25, č. 1, s. 21.3.1-21.3.6, 2001.
- [8] B. Dunn, „Splitting image", *Nat. Struct. Biol.*, roč. 4, č. 12, s. 969–972, pro. 1997.
- [9] D. S. Goodsell, S. Dutta, C. Zardecki, M. Voigt, H. M. Berman, a S. K. Burley, „The RCSB PDB “Molecule of the Month”: Inspiring a Molecular View of Biology", *PLOS Biology*, roč. 13, č. 5, s. e1002140, kvě. 2015.
- [10] *The PyMOL Molecular Graphics System*. 2017.
- [11] J. G. V. Donald Voet, *Biochemistry*. USA: Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, Inc, 2011.
- [12] N. D. Rawlings a A. J. Barrett, „[7] Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism", in *Methods in Enzymology*, roč. 248, Academic Press, 1995, s. 105–120.
- [13] S. B. P. Athauda *et al.*, „Enzymic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases", s. 12, 2004.
- [14] I. Simões a C. Faro, „Structure and function of plant aspartic proteinases: Plant aspartic proteinases", *European Journal of Biochemistry*, roč. 271, č. 11, s. 2067–2075, kvě. 2004.
- [15] C. Egas *et al.*, „The Saposin-like Domain of the Plant Aspartic Proteinase Precursor Is a Potent Inducer of Vesicle Leakage", *J. Biol. Chem.*, roč. 275, č. 49, s. 38190–38196, srp. 2000.
- [16] Charles Clarke, *Nepenthes of Borneo*. Malaysia: Natural History Publication, 2006.
- [17] prof. dr. František A. Novák, „Nepenthes - láčkovkokvěté", in *Vyšší rostliny I - Tracheophyta*, 2. vydání., Praha: Academia, nakladatelství Československé akademie věd, 1972, s. 334–336.
- [18] Miloslav Studnička, „Rod Láčkovek (Nepenthes), rostlin s nejobjemnějšími trávicími orgány", in *Masožravé rostliny - objekt badatelů, dobrodruhů a snilků*, 1. vydání., roč. 2006, Praha: Academia, s. 270–303.
- [19] K. Takahashi, H. Niwa, N. Yokota, K. Kubota, a H. Inoue, „Widespread tissue expression of nepenthesin-like aspartic protease genes in *Arabidopsis thaliana*", *Plant Physiology and Biochemistry*, roč. 46, č. 7, s. 724–729, čvc. 2008.
- [20] M. Rey *et al.*, „Addressing proteolytic efficiency in enzymatic degradation therapy for celiac disease", *Scientific Reports*, roč. 6, s. 30980, srp. 2016.

- [21] C. U. Schröder *et al.*, „Neprosin, a Selective Prolyl Endoprotease for Bottom-up Proteomics and Histone Mapping", *Mol Cell Proteomics*, roč. 16, č. 6, s. 1162–1171, čer. 2017.
- [22] J. R. Yates, C. I. Ruse, a A. Nakorchevsky, „Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications", *Annu Rev Biomed Eng*, roč. 11, s. 49–79, 2009.
- [23] B. Aslam, M. Basit, M. A. Nisar, M. Khurshid, a M. H. Rasool, „Proteomics: Technologies and Their Applications", *J Chromatogr Sci*, roč. 55, č. 2, s. 182–196, úno. 2017.
- [24] L. Tsiatsiani a A. J. R. Heck, „Proteomics beyond trypsin", *The FEBS Journal*, roč. 282, č. 14, s. 2612–2626, 2015.
- [25] J. R. Engen, „Analysis of Protein Conformation and Dynamics by Hydrogen/Deuterium Exchange MS", *Anal. Chem.*, roč. 81, č. 19, s. 7870–7875, říj. 2009.
- [26] S. R. Marcsisin a J. R. Engen, „Hydrogen exchange mass spectrometry: what is it and what can it tell us?", *Anal Bioanal Chem*, roč. 397, č. 3, s. 967–972, čer. 2010.
- [27] A. Kadek, H. Mrazek, P. Halada, M. Rey, D. C. Schriemer, a P. Man, „Aspartic protease nepenthesin-1 as a tool for digestion in hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry", *Anal. Chem.*, roč. 86, č. 9, s. 4287–4294, kvě. 2014.
- [28] M. Rey, M. Yang, K. M. Burns, Y. Yu, S. P. Lees-Miller, a D. C. Schriemer, „Nepenthesin from monkey cups for hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry", *Mol. Cell Proteomics*, roč. 12, č. 2, s. 464–472, úno. 2013.
- [29] L. Cravello, D. Lascoux, a E. Forest, „Use of different proteases working in acidic conditions to improve sequence coverage and resolution in hydrogen/deuterium exchange of large proteins", *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, roč. 17, č. 21, s. 2387–2393, 2003.
- [30] W. Dickey a N. Kearney, „Overweight in celiac disease: prevalence, clinical characteristics, and effect of a gluten-free diet", *Am. J. Gastroenterol.*, roč. 101, č. 10, s. 2356–2359, říj. 2006.
- [31] D. Stepniak *et al.*, „Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease", *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, roč. 291, č. 4, s. G621-629, říj. 2006.
- [32] L. Tsiatsiani, M. Akeroyd, M. Olsthoorn, a A. J. R. Heck, „Aspergillus niger Prolyl Endoprotease for Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry and Protein Structural Studies", *Anal. Chem.*, roč. 89, č. 15, s. 7966–7973, 01 2017.

