

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Biologická fakulta**



**Studium vlivu posttranslačních modifikací na strukturu proteinu
za využití *Leishmania tarentolae* jako expresního systému: vývoj
metodiky isotopického značení proteinů**

Bakalářská práce

**Vypracovala: Jana Matulová
Vedoucí práce: Mgr. Silvie Trantírková PhD**

České Budějovice, 2007

Matulová J., 2007: Studium vlivu posttranslačních modifikací na strukturu proteinu za využití *Leishmania tarentolae* jako expresního systému: vývoj metodiky isotopického značení proteinů [Influence of posttranslation modifications on protein structure: development of methodology for isotopic labeling of proteins in *Leishmania tarentolae* expression system, Bc. Thesis, in Czech].

Anotace:

We have established a cost efficient approach for isotopic labeling of proteins using *Leishmania tarentolae* expression system. The method is based on cultivation *L. tarentolae* in a rich complex (BHI) medium supplemented with labeled amino acid(s). This approach leads to low level isotope enrichment, which implies the decreased sensitivity of NMR experiment. In the same time this approach leads to a two to three fold increase of the yield of the recombinant protein. Importantly, it leads to 5 – 10 fold reduction of the overall costs as compared to the recently established protocol (Niculae et al., 2006).

In parallel, we have attempted to estimate the suitability of *L. tarentolae* for *in-cell* NMR spectroscopy.

Tato práce byla podpořena grantem uděleným Studentskou grantovou agenturou Biologické fakulty v roce 2006.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 8.5.2007

.....

Jana Matulová

Ráda bych tuto práci věnovala svému tátovi, za jeho nezlomnou víru ve mně a snad i pochopení. (Vím, že bys byl hrdý.)

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Lukášovi a Silvě Trantírkovým za jejich trpělivé vedení, všem dalším členům Laboratoře strukturní biologie za jejich nezapomenutelnou oporu a cenné rady a stejně tak členům Laboratoře molekulární biologie parazitických protozoí v čele s Julou Lukešem. Za spolupráci také děkuji laboratořím Kirilla Alexandrova a Volkera Dötsche.

Mé velké díky patří mým přátelům a rodině, bez kterých bych neměla sílu ani důvod snažit se dál.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Charakteristika <i>Leishmania tarentolae</i>	1
1.2 Rekombinantní proteiny, „rational drug“ design a strukturní proteomika	3
1.2.1 <i>In-cell</i> NMR spektroskopie	4
1.2.2 Expresní systémy	5
1.3 <i>Leishmania tarentolae</i> jako expresní systém	6
1.4 Cíle práce	9
2. Metody	10
2.1 Kultivace <i>L. tarentolae</i>	10
2.2 Stanovení koncentrace buněk <i>L. tarentolae</i> v kultuře	10
2.3 Srovnání růstového fenotypu v komplexním a syntetickém médiu	10
2.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE)	11
2.4.1 Příprava lyzátů	11
2.4.2 Příprava gelu	11
2.4.3 Vlastní elektroforéza a barvení gelu	11
2.5 Western analýza	11
2.5.1 Přenos na membránu	12
2.5.2 Inkubace s protilátkou a vyvolání	12
2.6 Izolace EGFP pomocí organické extrakce	12
2.7 NMR spektrální analýza proteinu EGFP	13
2.8 Test přežívání a sedimentace <i>L. tarentolae</i> v NMR kyvetě	13
2.9 Izolace genomické DNA fenol-chloroformovou extrakcí	14
2.10 PCR amplifikace	14
2.10.1 Použité primery	14
2.10.2 Složení a podmínky reakce	15
2.11 Elektroforéza v agarózovém gelu	15
2.12 Izolace DNA z gelu	15
2.13 Ligace	16
2.14 Příprava kompetentních buněk	16
2.15 Transformace bakterií metodou heat-shock	17
2.16 Izolace plasmidové DNA	17
2.16.1 Izolace plasmidové DNA metodou alkalické lýze	17
2.17 Stanovení koncentrace DNA	17
2.18 Restrikční reakce	18
2.19 Sekvenace insertu	18
2.20 Elektroporace <i>L. tarentolae</i>	19
3. Materiál	20
3.1 Organismy	20
3.2 Vektory	20
3.3 Pufry a média	21
3.4 Ostatní chemikálie	22
4. Výsledky	24
4.1 Optimalizace isotopického značení proteinu během exprese v <i>L. tarentolae</i>	24
4.2 Určení míry přežívání a sedimentace <i>L. tarentolae</i> v NMR kyvetě	27
4.3 Příprava expresního vektoru	27

4.4 Příprava transgenních linií a test overexprese	31
4.5 Test přítomnosti plasmidu v elektroporovaných klonech	33
5. Diskuze	35
6. Shrnutí	37
7. Literatura	38

1. Úvod

1.1 Charakteristika *Leishmania tarentolae*

Leishmania tarentolae je jednobuněčný eukaryotní parazit, patřící mezi protozoa řádu Kinetoplastida, čeleď Trypanosomatidae /Lainson a Shaw, 1987/. Zástupci této čeledi jsou jednobíčíkatí, široce rozšíření paraziti, napadající různorodé organismy od prvoků, rostlin, přes bezobratlé až po obratlovce. Rod *Leishmania* zahrnuje parazity heteroxenní (tj. infikující během svého životního cyklu různé druhy hostitele), kteří střídavě infikují obratlého hostitele a hmyzího přenašeče /Hausmann a kol., 2003/. Tímto přenašečem je v Novém světě dvoukřídlý hmyz rodu *Lutzomyia*, zatímco ve Starém světě jde o rod *Phlebotomus* /Alexander a kol., 1999/.

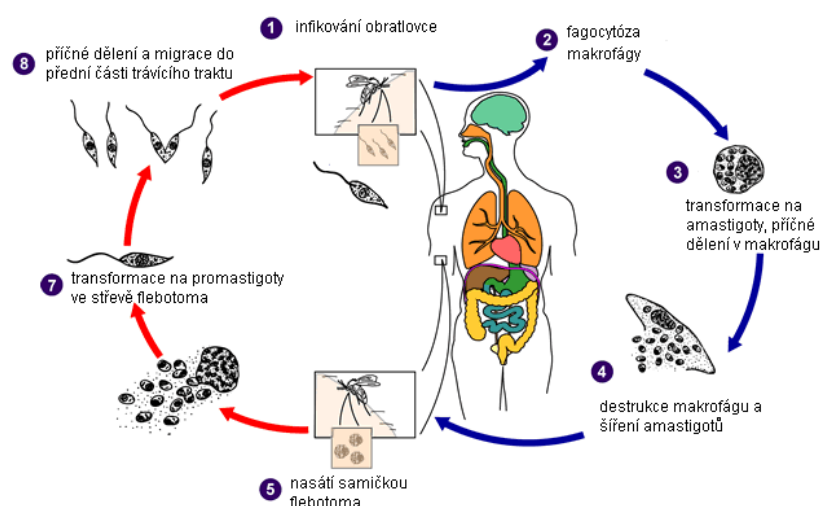
Klinicky významné druhy *Leishmania* způsobují u člověka několik závažných onemocnění, souhrnně nazývaných leishmanióza. Ty je možno rozdělit dle napadených orgánů na kožní, viscerální a mukózní formu, přičemž nejzávažnější je forma viscerální (známá také jako nemoc kala-azar), postihující vnitřní orgány a provázená většinou horečkou, kachexií, hepatosplenomegálií a pancytopenií /Herwaldt, 1999/.

Vzhledem k tomu, že v evoluci eukaryot došlo velmi brzy k vývojovému oddělení Trypanosomatid, existují u nich různé metabolické a genetické mechanismy, které se u vyšších eukaryot nevyskytují. Toto je spolu s jejich klinickým významem činí velmi atraktivním objektem výzkumu. Mezi významné odlišnosti patří například polycistronická transkripce s následným sestřihem mRNA formou trans, výskyt specifických organel jako jsou glykosomy, dále rozsáhlé posttranskripční modifikace mitochondriální RNA známé jako editace RNA či skutečnost, že některé sekvence kódující proteiny mohou být transkribovány RNA polymerázou I¹ /Campbell a kol., 2003/. Jméno řádu Kinetoplastida daly právě organely analogické mitochondriím zvané kinetoplasty, které obsahují dva typy kruhové DNA. První typ, tzv. „maxicircles“, kóduje ribosomální RNA a některé mitochondriální proteiny, přičemž mnohé transkripty těchto genů jsou podrobeny editaci za účasti malých „guide RNA“, které jsou kódovány druhým typem DNA, tzv. „minicircles“ /Shapiro a Englund, 1995/.

Životní cyklus rodu *Leishmania* zahrnuje několik stádií. Při sání samičky přenašeče na infikovaném hostiteli jsou nasáty i makrofágy, obsahující amastigoty. Ti jsou posléze uvolněni do střevního traktu flebotoma a přeměňují se na promastigoty, kteří jsou zpočátku neinfekční. Jde o formu procyklickou, která má povrch pokrytý relativně krátkými

¹U většiny eukaryot je RNA polymeráza I zodpovědná za transkripci ribosomální RNA a sekvence kódující proteiny jsou přepisovány RNA polymerázou II. V případě Kinetoplastid je však tato polymeráza odpovědná také za expresi variabilních povrchových glykoproteinů a repetitivních kyselých procyklických proteinů.

molekulami lipofosfoglykanu (LPG), které se vážou na lektinům podobné struktury střevního epitelu /Solbach a Laskay, 1996/. Po několika dnech binárního dělení migrují promastigoti směrem k ústní části zažívacího traktu, enzymaticky narušují stomodeální valvu, která normálně uzavírá přechod mezi stěvem a hltanem a zabraňuje zpětnému toku potravy /Schlein, 1993/. Zároveň s migrací se promastigoti mění na infekční metacyklickou formu, která se již dále nedělí /Hammarton a kol., 2003/. Při dalším sání jsou paraziti vyvrhnuti do krevního řečiště obratlovce, kde jsou konfrontováni s komplementem, který by mohl způsobit jejich lýzi. Procyklické formy jsou komplementem skutečně z devadesáti procent eliminovány, avšak jejich metacyklické protějšky komplement sice aktivují, ale lyzovány nejsou. Je to způsobeno zesílenou vrstvou LPG, díky které nemá sestavení tzv. „membrane attack complex“ žádný poškozující účinek na příliš vzdálenou membránu parazita. Navázání C3b složek komplementu má však za následek, že paraziti jsou velice snadno rozpoznáváni a fagocytováni buňkami retikuloendoteliálního systému, převážně makrofágy. V této fázi paraziti ztrácí bičík a přeměňují se na amastigoty, kteří se po fúzi fagosomu s lyzozomem množí ve vzniklé parazitoformní vakuole příčným dělením /Alexander a kol., 1999/. Napadené makrofágy posléze praskají a uvolňují amastigoty, kteří napadají další makrofágy buď v okolí místa vpichu (dermotropní druhy) nebo migrují retikuloendoteliálním systémem (druhy viscerální) /Hepburn, 2000/. Při dalším sání flebotoma se cyklus uzavírá.



Obr. 1.1 Životní cyklus rodu *Leishmania*. Upraveno dle www.dpd.cdc.gov/dpdx.

V této práci byl použit zástupce zmíněného rodu, *Leishmania tarentolae*, jako expresní systém. Předmětem mé práce byla převážně optimalizace jeho využití v oblasti studia struktury rekombinantních proteinů pomocí nukleární magnetické rezonance.

Leishmania tarentolae (obr. 1.2 A) byla vyizolována z ještěrky *Tarentola annularis* (obr. 1.2 B) a patří mezi *Leishmania* napadající plazy, přenášené flebotomy rodu *Sergentomyia* /Lainson a Shaw, 1987/. O jejich taxonomickém zařazení stále ještě není jednoznačně rozhodnuto a mnozí autoři zastávají názor, že tito parazité by měli tvořit samostatný rod *Sauroleishmania*. Tato klasifikace byla v roce 1990 potvrzena i Světovou zdravotnickou organizací, přesto je mnoho autorů stále přesvědčených o správnosti jejich zařazení do rodu *Leishmania* /Kazemi a kol., 2004; Momen a Cupolillo, 2000; Noyes a kol., 1998; Motazedian a kol., 1996/.



Obr 1.2 A) *Leishmania tarentolae* exprimující EGFP, snímek z fluorescenční mikroskopie. B) *Tarentola annularis*, přirozený hostitel *L. tarentolae*.

1.2 Rekombinantní proteiny, „rational drug design” a strukturní proteomika

Jednou z nejdůležitějších oblastí využití rekombinantních proteinů je medicína, kde jsou mnohé z těchto proteinů používány jako terapeutika či bezpečné vakcíny. Tak je již po dlouhou dobu používán například rekombinantní insulin k léčbě diabetu, erythropoetin k léčbě anémií, hemoglobin k substituci krevních deficiencí či DNáza k ředění hlenu u cystické fibrózy /Koths, 1995/.

V poslední době se však na klinické scéně objevilo i další pole působnosti rekombinantních proteinů, a tím je tzv. „rational drug design”. Jde o přístup k vývoji nových léků, při kterém je většinou nejdříve určena klíčová struktura cílového receptoru, na jejímž základě jsou navrženy ligandy, které jsou následně nasyntetizovány a testovány jako inhibitory daného receptoru /Stockman, 1998/. Určení struktury proteinu se zde stává klíčovým krokem a při jejím řešení hrají hlavní roli dva přístupy – nukleární magnetická resonance (NMR) a rentgenová krystalografie.

Rentgenová krystalografie je metoda použitelná pro proteiny prakticky všech velikostí, vyskytujících se v buňce. Mezi nevýhody této metody patří mimo jiné požadavek na vysokou čistotu vzorku (>95%) či náročná optimalizace podmínek krystalizačního procesu

/Jung a Lee, 2004/. Závažným nedostatkem metody je fakt, že měření probíhá v pevné fázi a takto získaná informace o struktuře tudíž nemusí vypovídat nic o skutečné struktuře molekuly v živém systému. Z charakteru metody také vyplývá další nedostatek, a tím je poskytnutí pouze statického pohledu na prostorové uspořádání.

NMR spektroskopie je naopak metoda, která umožňuje měření i v roztoku, což nám dává možnost do určité míry simulovat přirozené prostředí proteinu a navíc i sledovat dynamiku. Narozdíl od rentgenové krystalografie nevyžaduje NMR krystalizaci vzorku, avšak maximální velikost proteinu, u kterého je ještě možné získat NMR spektra o dostatečné kvalitě, je 40 kDa. Na druhou stranu se na základě údajů z databáze genových sekvencí předpokládá, že se proteiny větší než tato hranice skládají ze strukturně nezávislých modulů o cca 175 aminokyselinách, což hovoří ve prospěch NMR spektroskopie /Jung a Lee, 2004/.

1.2.1 *In-cell* NMR spektroskopie

Tzv. *in vivo* NMR spektroskopie se donedávna zabývala chováním malých molekul v organismech či buňkách a umožnila mapovat celé metabolické dráhy. Pro studium konformace a dynamiky makromolekul v jejich přirozeném prostředí se vžil název *in-cell* NMR spektroskopie a jejím cílem je sledování změn ve struktuře biologické makromolekuly a jejích interakcí s jinými buněčnými komponenty /Serber a Dötsch, 2001/. Tyto změny mohou být zapříčiněny např. posttranslačními modifikacemi jako jsou glykosylace a fosforylace či v důsledku vazebných interakcí. Za současného stavu je nepravděpodobné, že by *in-cell* NMR nahradila klasické *in vitro* metody, které poskytují mnohem přesnější informace o struktuře molekuly a mají výhodu větší stability během měření. Smysl této metody spíše spočívá v umožnění srovnání *in-cell* NMR spekter s daty získanými *in vitro* a tudíž v poskytnutí možnosti přezkoumat, zda jsou v konkrétních případech *in vitro* získaná data biologicky relevantní /Serber a kol., 2005/.

Pro *in-cell* NMR byly popsány dva rozdílné přístupy. Jeden využívá jako hostitele vajíčka africké žáby *Xenopus laevis*, do kterých je makromolekula injikována v již isotopicky značené, izolované formě /Sakai a kol., 2006/. Druhým přístupem je měření spekter přímo v buňkách, ve kterých probíhá exprese rekombinantního proteinu, a metodika byla zatím popsána pouze pro bakteriální hostitele. Značení proteinu probíhá při jeho expresi, kdy jsou do něj inkorporovány isotopicky značené nízkomolekulární látky, nejčastěji aminokyseliny. Nejběžněji používanými značkami jsou isotopy ^{13}C a ^{15}N .

Stanovením klíčových parametrů pro studium proteinů pomocí *in-cell* NMR se v roce 2001 zabýval Serber a kolektiv. Jejich pokusy ukázaly, že nejdůležitějším faktorem je míra overexprese, která úzce souvisí s charakterem použitého média a růstových podmínek.

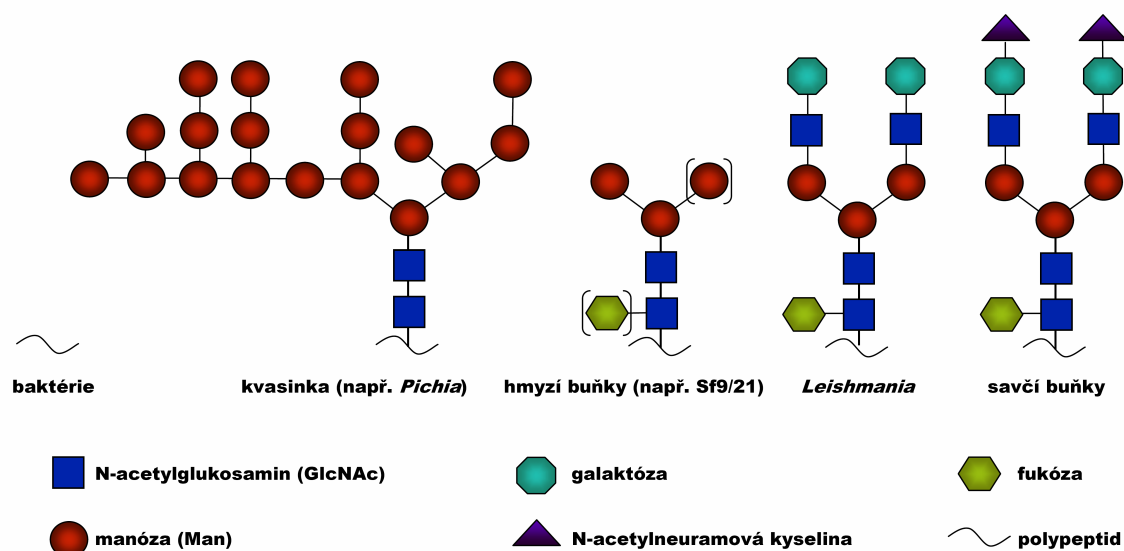
Nejkvalitnějších výsledků bylo dosaženo za využití přenosu buněk do čerstvého média těsně před expresí a použitím komplexního média v průběhu exprese /Serber a kol., 2001/. Minimální míra overexprese potřebná k získání *in-cell* NMR spekter se pohybuje v případě značení pomocí ^{15}N kolem 1-2% celkového množství intracelulárních rozpustných proteinů či zhruba 200-300 μM intracelulární koncentrace /Reckel a kol., 2005/.

Dalším důležitým faktorem je schopnost organismu přežít v NMR kyvetě po celou dobu měření spekter bez výrazných metabolických změn a sedimentace, což je vzhledem k vysokým koncentracím kultury v kyvetě a s tím spojené nedostupnosti kyslíku a dalších živin obtížně dosažitelné. Tyto faktory jsou závislé hlavně na typu použitých buněk, technice měření a charakteru použitého média /Serber a kol., 2005/.

1.2.2 Expresní systémy

Vzorok jak pro rentgenovou krystalografii, tak pro NMR spektroskopii je třeba získat většinou ve formě rekombinantních proteinů, což nás staví před volbu vhodného expresního systému. Doposud nejvíce užívaným organismem byla bakterie *Escherichia coli*, a to hlavně díky levné kultivaci, jednoduché manipulaci spojené s krátkou generační dobou a skutečnosti, že většina metabolických procesů u ní byla již dříve prozkoumána. Bohužel bylo zjištěno, že pouze 15-20 % malých proteinů je vhodných k expresi v *E. coli* s následnou strukturní analýzou. U ostatních narážíme na mnohé problémy, většinou spojené s nesprávným sbalením proteinu či jeho nerozpustností, následovanou vypadáváním do inkluzních tělísek /Edwards a kol., 2000/. *E. coli* navíc postrádá posttranslační modifikace, což ji činí nepoužitelnou k produkci glykoproteinů, které se v eukaryotních organismech vyskytují ve velkém množství.

Výše popsané komplikace lze řešit volbou jiného expresního systému. Dalším velmi oblíbeným organismem je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, která roste do vysokých koncentrací a sekretuje velká množství rekombinantních proteinů. Jde o eukaryotní organismus, který sice provádí N-glykosylaci, bohužel však velmi odlišné struktury ve srovnání se savčími buňkami (viz obr. 1.4) /Sodoyer, 2004/. To může mít velký dopad jak na biologickou aktivitu rekombinantního proteinu a jeho životnost v organismu, tak i na prostorovou strukturu, tolik důležitou pro „rational drug design“. Přestože již byly popsány úspěchy s „polidštěním“ glykosylačních drah u kvasinky *Pichia pastoris*, je tento expresní systém stále ještě ve vývoji /Wildt a Gerngross, 2005/.



Obr.1.4 Srovnání N-glykosylace některých organismů, používaných pro expresi proteinů. Upraveno dle Jena Bioscience /www.jenabioscience.com/.

Další alternativu představují savčí buněčné linie, které byly doposud používány pro expresi proteinů, pro které je glykosylace důležitá pro jejich funkci. Proteiny takto získané jsou bohužel glykosylovány nehomogenně a navíc je tento systém nákladný jak z finančního, tak i časového hlediska /Edwards a kol., 2000; Wildt a Gerngross, 2005/.

Lákavou představou zvláště pro zastánce perorální vakcinace je produkce rekombinantních proteinů v transgenních rostlinách či zvířatech. Budoucnost transgenních rostlin jakožto expresních systémů je slibná, u systémů založených na zvířatech bude třeba zvážit náklady, technickou náročnost i otázku časové dostupnosti /Sodoyer, 2004/.

1.3 *Leishmania tarentolae* jako expresní systém

Trypanosomatidae produkují velké množství glykoproteinů, které mohou tvořit až více než 10% jejich proteomu a nejspíše vzhledem k parazitickému způsobu života se často oligosacharidové složky jejich glykoproteinů podobají těm savčího typu /Breitling a kol., 2002/. Toto ve spojení s existencí již dobře vypracovaných technik jejich genetické manipulace /Clayton, 1999/ učinilo parazity čeledi Trypanosomatidae vhodnými kandidáty pro využití k overexpresi proteinů. Již v roce 1990 byla popsána stabilní exprese genu pro resistenci na neomycin v *Leishmania enriettii*, i když cílem této práce byla analýza sekvencí potřebných pro sestřih mRNA formou trans /Laban a kol., 1990/. Jen o pár let později byl použit transgenní kmen *Leishmania major* k expresi biologicky aktivního interferonu gamma /Tobin a kol., 1993/ a záhy poté byl navržen první eukaryotický expresní systém, založený na

Leishmania sp. V této práci byla popsána produkce biologicky aktivního lidského proteinu p53 v *Leishmania major*, pro jehož funkci tumorového supresoru je klíčová jeho struktura a řádná posttranslační fosforylace /Zhang a kol., 1995/. *Trypanosoma cruzi* byla též použita k produkci rekombinantních proteinů, konkrétně savčích cytokinů interferonu-gamma (IFN γ) a interleukinu-2 (IL-2). I v tomto případě byla prokázána správná biologická aktivita, přestože IL-2 postrádal O-glykosylaci, což by mohlo mít vliv na jeho životnost v buňce /La Flamme a kol., 1995/.

Všechny výše uvedené pokusy byly však provedeny na druzích patogenních pro člověka, které navíc vyžadují suplementaci média fetálním telecím sérem. Toto ve spojení s relativně dlouhou generační dobou výrazně limitovalo možnost jejich širšího využití jako expresního systému. Řešením těchto komplikací se ukázala být pro člověka nepatogenní *Leishmania tarentolae*, kterou je možno pěstovat v levném médiu bez suplementace sérem, dosahující koncentrací v řádu 10^8 buněk/ml média a rostoucí s generační dobou 4 h v třepaném médiu či 7 h ve statické kultuře /www.jenabioscience.com/.

V práci Breitlinga a kol. bylo ukázáno, že v tomto systému je možné získat až 30 mg rekombinantního proteinu² na 1 litr suspenzní kultury. Pro posouzení vhodnosti systému k produkci posttranslačně modifikovaných proteinů byl exprimován lidský erythropoetin (EPO), který byl po izolaci biologicky aktivní. Další analýzou získaného EPO bylo ukázáno, že obsahoval savčí typ N-glykosylace a Man₃GlcNAc₂ jádro (viz obr.1.4) přítomné u více než 90% daných glykanů. Exprimovaný EPO byl navíc *L. tarentolae* aktivně sekretován a signální peptid byl homogenně odštěpován v přirozené pozici /Breitling a kol., 2002/. K expresi proteinů zde bylo využito faktu, že integrace jejich sekvence do genu pro RNA malé ribosomální podjednotky má za následek stabilní vysokou hladinu exprese. Takto umístěná sekvence je transkribována polymerázou I, což snižuje pravděpodobnost, že bude transkripce utlumena regulačními mechanismy buňky. /Mißlitz a kol., 2000; Sodoyer 2004/

Tento systém byl dále zdokonalen konstrukcí kmene *L. tarentolae* exprimujícího souběžně T7 RNA polymerázu (T7 pol) a tetracyklinový represor, zajišťující inducibilní expresi heterologního genu, pokud je umístěn za T7 promotorem kontrolovaným tetracyklinem /Kushnir a kol., 2005/. Výhodou vysoce procesivní T7 polymerázy je fakt, že nemůže být kontrolována regulačními mechanismy buňky a zaplaví ji tak heterologní mRNA. Bohužel je tento princip nepoužitelný pro standardní eukaryotické systémy, vzhledem k provázanosti transkripce s úpravami RNA. T7 pol transkripty zůstávají v eukaryotických

²Jako referenční protein byl použit zelený fluorescenční protein (GFP).

buňkách neupraveny (chybí čepička a polyadenylace), tudíž nejsou rozeznávány ribosomy a výtěžek rekombinantních proteinů je nulový /Dower a Rosbash, 2002/. V případě zástupců čeledi Trypanosomatidae však již bylo dokázáno, že jsou schopni ve velké míře překládat mRNA vytvořenou cizorodými polymerázami jako je T7 či T3 /Wirtz a kol., 1994/. Dostupnost inducibilního expresního systému představuje velkou výhodu pro produkci toxických či nestabilních proteinů.

Možnost a způsob využití *L. tarentolae* k isotopickému značení rekombinantních proteinů, což je podmínkou pro použití v NMR spektroskopii, byla předmětem další studie. Využito bylo přirozené auxotrofie *L. tarentolae* pro aminokyseliny valin, leucin, arginin, histidin, tryptofan, fenylalanin, serin, tyrosin, threonin, a lysin /Krassner a Flory, 1971/. Tato skutečnost umožňuje v případě kultivace v definovaném médiu značení všech residuí jedné či více aminokyselin v proteinu jednoduchou záměnou přirozené aminokyseliny za isotopicky značenou. V práci Niculae a kol. byla popsána úspěšná produkce ^{15}N – valinem značeného EGFP („enhanced green fluorescent protein”), jehož NMR spektrální analýza ukázala všech 18 valinových residuí, nacházejících se v tomto proteinu. Kultivace v definovaném médiu má však za následek snížený růst kultury a nižší výtěžky rekombinantního proteinu /Niculae a kol., 2006/. Použití syntetického média navíc výrazně zvyšuje náklady experimentu, což významně limituje jeho použití ve větším měřítku.

1.5 Cíle práce

Vzhledem k vysokým nákladům na získání isotopicky značeného proteinu za využití *L. tarentolae* jako expresního systému pomocí metody popsané v roce 2006 /Niculae a kol., 2006/ bylo hlavním cílem této práce zjistit, zda je možné snížit náklady a zvýšit výtěžnost isotopického značení proteinu použitím komplexního média s nadbytkem isotopické značky, aniž by tím byla snížena kvalita NMR spekter.

Dalším cílem bylo zjistit, zda je tento systém vhodný pro použití k *in-cell* NMR studiím struktury proteinů. Pro tento účel jsme se rozhodli vytvořit transgenní linii *L. tarentolae* inducibilně overexprimující calmodulin. Jde o široce rozšířený eukaryotní protein, hrající hlavní roli v regulačních mechanismech buňky spojených s vápníkovými ionty. Jeho velikost přibližně 17 kDa jej činí vhodným objektem strukturních analýz pomocí NMR spektroskopie. Dalšími důvody, proč jsme zvolili právě tento protein, je jeho přirozený výskyt v *L. tarentolae* a skutečnost, že již byl podroben mnoha strukturním analýzám včetně *in-cell* NMR spektroskopie v *E. coli* / Serber a kol., 2001; Finn a Forsén, 1995/.

2. Metody

2.1 Kultivace *L. tarentolae*

Promastigoti *L. tarentolae* byli kultivováni v médiu BHI suplementovaným heminem (5 µg/ml média) s přídatkem penicilinu (50 jednotek/ml média) a streptomycinu (50 µg/ml média) pro snížení pravděpodobnosti kontaminace bakteriemi. V případě kmenu T7-TR byly ke kultuře přidávány selekční antibiotika nourseothricin (100 µg/ml média) a hygromycin (100 µg/ml média), kmen inducibilně exprimující EGFP byl navíc podroben selekci neomycinem (případně G 418, 50 µg/ml média) a stejně tomu bylo v případě buněk transformovaných plasmidem pUC LAC2#1 CAM. Pro indukci exprese byl přidáván tetracyklin v konečné koncentraci 5 µg/ml.

Kultivace probíhala při 26 °C za stálého třepání 60-80 rpm a kultura byla ředěna 1:10 čerstvým médiem po dosažení koncentrace 10^7 - 10^8 buněk/ml. Zároveň byla mikroskopicky kontrolována vitalita a případná kontaminace suspenzní kultury.

Pro dlouhodobější uchovávání kultury byly vzorky zamražovány v kryozkumavkách (Techno Plastic Products; 1,2 ml) s glycerolem o výsledné koncentraci 10% prostřednictvím zařízení NALGENE™ Cryo 1 °C Freezing Container (Nalgene) v -80 °C a při stejné teplotě i dále skladovány.

2.2 Stanovení koncentrace buněk *L. tarentolae* v kultuře

Koncentrace buněk byla stanovena pomocí přístroje Beckman Cellcounter Z1 (Beckman Coulter), který pracuje na principu detekce změn elektrického odporu způsobeného nevodivými částicemi, zde buňkami, v elektrolytu.

Při stanovení míry přežívání kultury *L. tarentolae* v NMR kyvetě byla koncentrace živých buněk stanovena pomocí Bürkerovy počítací komůrky (Brand). Bürkerova komůrka je speciální silné podložní sklo, v jehož střední části se nachází síť vrypů tvořící čtvercová políčka o známé ploše a hloubce. Tím vznikají prostory o přesně definovaném objemu a počet buněk v nich je počítán za využití mikroskopu. Pro naše účely jsme zvolili počítání buněk v objemu nad čtvercem o obsahu $2,5 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$.

2.3 Srovnání růstového fenotypu v komplexním a syntetickém médiu

Dva objemy kultury obsahující cca $1,5 \times 10^7$ buněk *L. tarentolae* byly centrifugovány 13 minut při 1000 g (centrifuga 2K15, Sigma), pelety resuspendovány v 1 ml PBS a

centrifugace byla opakována za stejných podmínek. Jeden pelet byl resuspendován v 5 ml komplexního média a druhý ve stejném objemu média syntetického, oba byly indukovány tetracyklinem (5 µg/ml suspenze) a kultivovány za podmínek popsaných výše (2.1). V čase 0, 4, 8, 16 a 24 hodin po indukci byly měřeny koncentrace jednotlivých kultur.

2.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE)

2.4.1 Příprava lyzátů

Objem kultury obsahující $2,5 \times 10^7$ buněk byl centrifugován při 2000 rpm po dobu 10 minut (centrifuga Eppendorf MiniSpin plus) a pelet byl resuspendován v 80 µl vzorkového pufu. Suspenze byla 10 minut inkubována při min. 95 °C a uchovávána při -20 °C. Vždy před dalším použitím byly lyzáty opětovně podrobeny zahřátí na 95 °C po dobu 10 minut.

2.4.2 Příprava gelu

K 10 ml 12% separačního gelu bylo přidáno 100 µl 10% APS a 10 µl TEMED a směs byla okamžitě nalita mezi dvě dobře utěsněná elektroforetická skla do výšky 2 – 3 cm od horní hrany skel. Pro vyrovnání hladiny byla směs přelita cca 100 µl n-butanolu. Po zatuhnutí byl n-butanol opatrně vymyt destilovanou vodou a ta byla odsána pomocí filtračního papíru. K 5 ml 5% zaostřovacího gelu bylo přidáno 50 µl 10% APS a 5 µl TEMED, směs byla nalita mezi elektroforetická skla na ztuhnutý separační gel až k horní hraně skel a ihned byl mezi skla vložen hřeben, tvarující jamky. Po zatuhnutí byl hřeben vyjmut, jamky promyty destilovanou vodou a po sestavení vertikální elektroforetické soupravy (Owl; Hoefer) byly vany naplněny elektrodovým pufrem.

2.4.3 Vlastní elektroforéza a barvení gelu

Do jamek byly naneseny vzorky v objemu 10 µl (cca 4×10^6 buněk) a pro srovnání velikosti proteinů byl do jedné jamky nanesen proteinový standard. Elektroforéza probíhala zpočátku při 80 V a poté co vzorky dosáhly separačního gelu bylo napětí zvýšeno na 150 V.

Po ukončení separace byl gel opatrně vyjmut ze skel, hodinu inkubován v roztoku Coomassie blue a přenesen do odbarvovacího roztoku, kde byl ponechán až do odbarvení pozadí.

2.5 Western analýza

Za účelem srovnání míry produkce EGF proteinu v závislosti na použitém kultivačním médiu byly použity podmínky přípravy suspenzní kultury popsané v kapitole 2.3. Objem jednotlivých vzorků zde byl zvýšen na 20 ml a cílová koncentrace buněk v době indukce byla

cca 4×10^6 buněk/ml. V čase 0, 4, 8, 16 a 24 hodin po indukci byly dle naměřené koncentrace jednotlivých kultur odebrány vzorky buněčné suspenze a z nich připraveny lyzáty, které byly použity pro SDS PAGE (2.4). Po optimalizaci množství biomasy nanášené na gel byla provedena SDS PAGE bez barvení Coomassie blue a tento gel byl použit pro western analýzu.

2.5.1 Přenos na membránu

Proteiny z SDS polyakrylamidového gelu byly přeneseny na nitrocelulóзовou membránu BioTrace®NT (PALL) pomocí elektroblotu Semidry Blot (Bio-Rad).

Z gelu byla odříznuta část tvořená zaostřovacím gelem a ve stejné velikosti jako gel separační byly ustříženy 3MM blotovací papíry (Whatman) a nylonová membrána. Gel i papíry byly na několik minut namočený do transferového pufru a poskládány na elektroblot v tomto pořadí: 8x blotovací papír / membrána / gel / 8x blotovací papír. Velikost proudu byla vypočítána jako $I \text{ [mA]} = 5,5 \times S \text{ [cm}^2\text{]}$, kde S je plocha gelu. Elektroblot probíhal po dobu 60 minut, po přenosu byla membrána i gel 3 minuty barveny pomocí Ponceau a membrána byla poté odbarvena v PBS s 0,05% Tween 20 (PBS Tween). Přes noc byla membrána blokována v 5% nízkotučném mléce v PBS Tween (PBS-TM).

2.5.2 Inkubace s protilátkou a vyvolání

Druhý den byla membrána promývána v PBS Tween 5x po 5 minutách, poté zatavena do fólie s 10 ml primární anti-EGFP protilátky (Sigma-Aldrich) naředěné 1:1000 v PBS-TM a inkubována 2 hodiny za stálého míchání při pokojové teplotě. Po inkubaci byla membrána opět promývána v PBS Tween 5x po 5 minutách a následovala inkubace 1 hodinu a 45 minut za stejných podmínek se sekundární anti-mouse protilátkou (Sigma-Aldrich) naředěnou 1:1000 v PBS-TM. Tato protilátka byla značená peroxidázou. Po skončení inkubace bylo opakováno vymývání (viz výše) a na membránu byl nanesen substrátový roztok ECL (1 ml složky 1 smíchaný s 1 ml složky 2; Pierce) a nechán působit 1 minutu. Signál byl vyvolán na BioMax MS autoradiografický film (Kodak) s dobou expozice 30 sekund, 1 minutu 30 sekund a tři minuty.

2.6 Izolace EGFP pomocí organické extrakce

(Niculae a kol., 2006; Yakhin a kol., 1998)

Kultura *L. tarentolae* #5 v objemu 400 ml byla centrifugována 15 min při 1000 g (centrifuga 2K15, Sigma), resuspendována v 900 ml kultivačního média, indukována tetracyklinem (5 µg/ml suspenzní kultury) a kultivována přes noc za normálních podmínek.

Druhý den byly buňky centrifugovány 15 minut při 1000 g a resuspendovány ve 200 ml pufru A. Následovala sonikace 3 x 20 sekund s pauzami po 10 sekundách a směs byla zamražena v tekutém dusíku. Po rozpuštění ve vodní lázni při 37 °C byl postup ještě dvakrát opakován. Homogenát byl ultracentrifugován při 30 000 g a 4 °C po dobu 15 minut (L8-M Ultracentrifuge, Beckman). K odebranému supernatantu byl přidán síran amonný (konečná koncentrace 1,6 M) a triethanolamin (konečná koncentrace 100 mM), směs byla hodinu inkubována na ledu a precipitované proteiny byly odstraněny centrifugací 20 minut při 6000 rpm, 4 °C. K supernatantu byl přidán síran amonný v konečné koncentraci 2,8 M. Tato směs byla dvakrát extrahována nejprve čtvrtinou a pak šestnáctinou objemu etanolu. Po přidání etanolu byla směs minutu třepána, vodní a organická fáze byly odděleny centrifugací 5 minut při 4000 rpm a alkoholová fáze byla odebrána. K ní byla přidána čtvrtina objemu n-butanolu, směs byla 30 sekund třepána a pak centrifugována za stejných podmínek jako v posledním kroku. Horní organická fáze byla odstraněna, k dolní vodní fázi byl přidán stejný objem chloroformu a bylo opakováno třepání a centrifugace. Horní vodní fáze, obsahující EGFP, byla odebrána.

Pro účely NMR spektrální analýzy byl EGF protein izolován z celkového objemu 9 litrů suspenzní kultury *L. tarentolae* #5. Buňky byly hodinu před indukcí overexprese tetracyklinem centrifugovány a resuspendovány v 9 litrech komplexního média s ¹⁵N značeným valinem v koncentraci 150 mg/l. Buněčná kultura byla centrifugována 24 hodin po indukci, EGFP byl izolován postupem popsáním výše a zakoncentrován pomocí zařízení Amicon (Millipore) s membránou o hodnotě cut-off 10 kDa.

2.7 NMR spektrální analýza proteinu EGFP

Spektrální analýza EGF proteinu byla provedena v Ústavu biomolekulární NMR a EPR ve Frankfurtu na spektrometru Bruker Avance 750 MHz při teplotě 298 K. Doba měření byla 5 hodin a spektra byla vyhodnocena pomocí standardních Bruker NMRSuite programů.

2.8 Test přežívání a sedimentace *L. tarentolae* v NMR kyvetě

100 ml buněčné kultury v pozdní růstové fázi bylo centrifugováno 15 minut při 1000 g (centrifuga 2K15, Sigma), resuspendováno v 10 ml syntetického média Custom Synthetic LEXSY Broth (Jena Bioscience) a znovu centrifugováno za stejných podmínek. Pelet byl resuspendován ve 200 ml téhož syntetického média suplementovaného heminem, kultura byla indukována tetracyklinem a dvě hodiny kultivována za normálních podmínek. Poté byla

kultura centrifugována za výše popsaných podmínek, pelet byl resuspendován v 500 μ l syntetického média a přenesen do NMR kyvety. V časových intervalech 10, 20, 40, 80 a 120 minut po přenesení byly z kyvety ve stejné vzdálenosti ode dna odebírány vzorky, u kterých byla měřena koncentrace živých buněk pomocí Bürkerovy komůrky.

2.9 Izolace genomické DNA fenol-chloroformovou extrakcí

Genomická DNA byla izolována z cca 10^8 buněk *L. tarentolae*. Objem suspenzní kultury obsahující daný počet buněk byl centrifugován 10 minut při 4000 rpm (centrifuga EBA 20, Hettich) a pellet resuspendován ve 3 ml NET-50 s N-laurylsarkosinem (výsledná koncentrace 3 mg/ml) a pronázou E (výsledná koncentrace 0,25 mg/ml) a inkubován 2 hodiny při 4 °C. K výslednému roztoku byl přidán stejný objem fenolu, směs byla 10 minut třepána a následně 10 minut centrifugována při 3000 rpm. Vodní fáze byla odebrána a tento krok byl ještě třikrát opakován. Po vymizení proteinu v interfázi byl k odebrané vodní fázi přidán stejný objem roztoku fenolu a chloroformu s isoamylalkoholem (poměr 24:1), směs byla opět 10 minut třepána a pak 10 minut centrifugována při 3000 rpm. K odebrané vodní fázi byl přidán stejný objem chloroformu s isoamylalkoholem a proces třepání a centrifugace byl opakován. Nyní odebraná vodní fáze byla přesrážena desetinou objemu octanu sodného a 2,5 objemu 96% etanolu. Po inkubaci v -80 °C po dobu deseti minut byla směs centrifugována 15 minut při 10000 g (centrifuga Multifuge 3S-R, Heareus), pelet byl promyt 70% etanolem vychlazeným na -20 °C a vzápětí opět centrifugován 5 minut při 13000 rpm (centrifuga Eppendorf MiniSpin plus). Supernatant byl opatrně odsán a pelet po vysušení při pokojové teplotě rozpuštěn v 50 μ l destilované vody.

2.10 PCR amplifikace

Cílem byla amplifikace genu pro calmodulin, vyskytující se přirozeně v buňkách *L. tarentolae*. Produkt amplifikace byl posléze analyzován pomocí elektroforézy v agarózovém gelu (2.11) a z gelu vyizolován (2.12). V případě průkazu přítomnosti plasmidu v elektroporovaných buňkách *L. tarentolae* bylo cílem amplifikovat úsek genu pro resistenci na neomycin, nesený plasmidem pUC LAC2#1.

2.10.1 Použité primery:

CALM1fw: 5'- CCA TGG CGG ATC AGC TGT CC – 3'

CALM1rv: 5'- ACG CGT CTA CTT GCT CAT CAT C – 3'

Pro účely překlonoání mezi vektory bylo do CALM1fw včleněno restriční místo pro NcoI (CCATGG) a do CALM1rv restriční místo pro MluI (ACGCGT).

neoFW: 5'-TGA ACA AGA TGG ATT GCA CG – 3'

neoRV: 5'-TCA AGA AGG CGA TAG AAG GC – 3'

2.10.2 Složení a podmínky reakce:

1 μ l genomické DNA³ (10 - 50 ng, použity 3 různé koncentrace) + 1 μ l každého primeru (10 pmol) + 2,5 μ l 10x reakčního pufru + 1 μ l Taq DNA polymerázy (1 jednotka) + 0,25 mM dNTPs + destilovaná voda do celkového objemu 25 μ l

Reakce byla provedena na přístroji MiniCycler™ (MJ Research) za těchto podmínek:

- 1/ počáteční denaturace 5 minut při 95 °C
 - 2/ denaturace 1 minuta při 95 °C
 - 3/ nasedání oligonukleotidů 1 minuta při 60 °C (shodné pro obě sady primerů)
 - 4/ elongace 1 minuta při 72 °C
- kroky 2 – 4 byly 35 krát opakovány
- 5/ dosyntetizování nedokončených vláken 10 minut při 72 °C

2.11 Elektroforéza v agarózovém gelu

Agaróza byla rozpuštěna v 1xTAE pufru do výsledné koncentrace 0,75% zahřátím v mikrovlnné troubě a nalita do elektroforetické formy s hřebenem. Po ztuhnutí byl hřeben vyjmut, gel přelit 1xTAE puftrem a do vzniklých jamek byly nanášeny vzorky DNA smíchné s DNA nanášecím puftrem (0,1 celkového objemu). Pro stanovení velikosti fragmentů byl do jedné z jamek nanášen 2-Log DNA Ladder. Elektroforéza probíhala při 60-90 V v horizontální elektroforetické vaně (model B1, Owl) a po skončení byl gel obarven v 1xTAE pufru s ethidium bromidem v koncentraci 0,5 ng/ml. DNA byla poté vizualizována prostřednictvím UV transiluminátoru (UVP).

2.12 Izolace DNA z gelu

Produkty PCR očekávané velikosti byly vykrojeny z gelu a z něj následně izolovány pomocí komerční soupravy Gel Extraction Spin Kit (Genomed) či Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research), obojí dle instrukcí výrobce.

³ Pro negativní kontrolu byla genomická DNA nahrazena vodou.

Alternativním postupem izolace bylo umístění gelu obsahujícího DNA mezi dvě vrstvy parafilmu (Pechiney Plastic Packaging), jeho silné stlačení prstem a odsání takto vytlačeného pufru, který obsahoval DNA. Roztok pufru s DNA byl následně přesrážen 96% etanolem o teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, inkubován 5 minut na ledu a centrifugován 15 minut při maximální rychlosti (centrifuga Eppendorf MiniSpin plus). Pelet byl promyt 70% etanolem a po centrifugaci 5 minut při maximální rychlosti vysušen a rozpuštěn v destilované vodě.

2.13 Ligace

Vyizolované fragmenty byly zaligovány do plasmidu pGEM T-easy. Ligační směs byla připravena smícháním $2,5\ \mu\text{l}$ 2x ligačního pufru + $0,5\ \mu\text{l}$ plasmidu + $1\ \mu\text{l}$ insertu + $0,5\ \mu\text{l}$ T4 DNA ligázy + $0,5\ \mu\text{l}$ vody a ponechána přes noc při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Při klonování vyštěpeného insertu do expresního plasmidu bylo použito $\sim 150\ \text{ng}$ insertu a $\sim 10\text{-}50\ \text{ng}$ plasmidu, který byl podroben štěpení stejnými restrikčními enzymy jako insert (v tomto případě NcoI a MluI). Poměry ostatních složek zůstaly zachovány, objem byl odpovídajícím způsobem zvětšen.

2.14 Příprava kompetentních buněk

Na LB kultivační půdu bez antibiotik bylo rozetřeno nepatrné množství suspenzí kultury netransformovaných kompetentních buněk (skladováno v SOB médiu s 10% glycerolem při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) a inkubována při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ přes noc. Jednotlivé kolonie byly přeneseny do 3 ml SOB média s MgCl_2 (0,01 M) a kultivovány za stálého třepání 220 rpm cca 16 hodin při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. 240 ml SOB média s MgCl_2 (0,01 M) bylo inukolováno 1 ml suspenzí kultury z minulého kroku a kultivováno při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ za stálého třepání 220 rpm až do dosažení absorbance 0,5 při vlnové délce 600 nm (měřeno na spektrofotometru Lambda 35, Perkin Elmer). V tomto bodě byla kultura umístěna na led po dobu 10 min s následnou centrifugací 10 minut při 2000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (centrifuga 2K15, Sigma). Pelet byl resuspendován v 80 ml TB pufru o teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a za občasného promíchání inkubován 10 minut na ledu. Následně byla suspenze centrifugována 10 minut při 1000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, pelet byl resuspendován ve 20 ml TB pufru vychlazeného na teplotu $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a do směsi byl přidán DMSO v konečné koncentraci 7%. Po inkubaci na ledu po dobu 10 minut byla suspenze přenesena po 200 μl do předmražených mikrozkupek a okamžitě zamražena v tekutém dusíku. Takto připravené kompetentní buňky byly skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.15 Transformace bakterií metodou heat-shock

Kompetentní buňky DH5 α byly vyjmuty z -80 °C a ponechány na ledu roztát. Ke 100 μ l kompetentních buněk bylo přidáno 5 μ l ligační směsi a suspenze byla inkubována 30 minut na ledu. Vlastní transformace proběhla při 42 °C po dobu jedné minuty s následným okamžitým zchlazením na ledu po dobu 2 minut. K transformovaným buňkám bylo přidáno 300 μ l SOC média a směs byla 45 minut třepána při 37 °C, 210 rpm a následně byly vysety na bakteriální půdu s ampicilinem a umístěny přes noc do termostatu o teplotě 37 °C. Pokud ligovaný vektor obsahoval LacZ fragment, umožňující tzv. „blue-white” selekci, bylo na plotnu rozetřeno 40 μ l 2% X-galu.

2.16 Izolace plasmidové DNA

Vybrané kolonie z plotny byly inokulovány do 3 ml LB média s ampicilínem (100 μ g/ml) a přes noc třepány při 37 °C, 210 rpm. Kultura byla stočena při 14000 rpm (centrifuga Eppendorf MiniSpin plus) a plasmidová DNA izolována buď metodou alkalické lýze anebo pomocí komerční soupravy Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed) či Zyppey Plasmid Miniprep II Kit (Zymo research) dle pokynů výrobce.

2.16.1 Izolace plasmidové DNA metodou alkalické lýze

Pelet byl resuspendován v 50 μ l TEG a bylo k němu přidáno 100 μ l čerstvě připraveného 0,2 M NaOH s 1% SDS. Po promíchání bylo přidáno 75 μ l 3 M acetátu sodného. Směs byla opět opatrně promíchána převrácením mikrozkušavky, doplněna 225 μ l 5 M LiCl a centrifugována 5 minut při 14000 rpm. Supernatant byl odebrán a k němu bylo přidáno 900 μ l 90% etanolu o teplotě -20 °C a roztok byl 5 minut inkubován na ledu. Následně byl 15 minut centrifugován při maximální rychlosti, pelet byl promyt 200 μ l 70% etanolu o teplotě -20 °C a krátce centrifugován při maximální rychlosti. Supernatant byl opatrně odsán a pelet resuspendován v 30 μ l destilované vody.

2.17 Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla stanovena pomocí spektrofotometru Lambda 35 (Perkin Elmer) při vlnové délce 260 nm, přičemž byla ze získané hodnoty vypočítána dle následujícího vztahu:

$$c [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times 50 / l [\text{cm}]$$

kde 50 je koeficient dsDNA neznámé sekvence a l je délka optické dráhy.

2.18 Restrikční reakce

Pro kontrolu přítomnosti insertu byly provedeny restrikce v objemu 10 μ l. Složení reakce bylo 1 μ l 10x pufru + 2 jednotky restrikčního enzymu + 5 μ l plasmidové DNA + 1 μ l BSA⁴ + 1 μ l Tritonu X-100⁴ + 0,2 μ l RNázy (100 mg/ml, přidána pouze v případě restrikce plasmidů izolovaných metodou alkalické lýze) + doplněno destilovanou vodou do 10 μ l.

Pro účely následné ligace byly restrikce provedeny v objemu 30 μ l, poměry složek byly zachovány.

Restrikce byly inkubovány 3 hodiny při 37 °C, analyzovány elektroforézou v agarózovém gelu (2.10) a případně izolovány z gelu (2.11) a ligovány (2.12).

2.19 Sekvenace insertu

Vzhledem k malé velikosti insertu bylo možné použít amplifikační primery CALM1fw a CALM1rv z bodu 2.10.

Sekvenační reakce byla namíchána za použití Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) a její složení bylo: 2 μ l PET + 6 μ l 2,5x sekvenačního pufru + 1 μ l primeru (10 pmol) + 700 ng plasmidové DNA + doplnit vodou do 20 μ l. Reakce byla provedena na přístroji T3000 Thermocycler (Biometra) za těchto podmínek:

- 1/ počáteční denaturace 2 minuty při 94 °C
 - 2/ denaturace 1 minuta při 94 °C
 - 3/ nasedání oligonukleotidů 1 minuta při 60 °C
 - 4/ elongace 4 minuty při 60 °C
- kroky 2-4 byly 32 krát opakovány

Vyhodnocení signálů bylo provedeno na kapilárním sekvenátoru ABI (Perkin Elmer).

2.20 Elektroporace *L. tarentolae*

Pro účely elektroporace byla připravena plasmidová DNA izolovaná ze 100 ml suspenzní kultury *E. coli* pomocí komerční soupravy QIAgen Plasmid Midi Kit (Qiagen) dle návodu výrobce. Kmen *L. tarentolae* T7-TR byl elektroporován cirkulárním plasmidem pUC LAC2#1 CAM, případně pUC LAC2#1 EGFP.

Objem suspenzní kultury v pozdní růstové fázi obsahující 4 x 10⁸ buněk byl centrifugován 10 minut při 1500 g a 20 °C (centrifuga Multifuge 3S-R, Heareus), resuspendován ve 2 ml cytomixu a znovu centrifugován za stejných podmínek. Buňky byly

⁴ Tyto složky byly přidány pouze v případě, že byly enzymem vyžadovány.

resuspendovány v 1 ml cytomixu a 5 minut ponechány při pokojové teplotě. Mezitím byly elektroporační kyvety (4 mm gap cuvette, BTX) a mikrozkuhavky s DNA umístěny na led. Po 5 minutách bylo přemístěno 500 μ l buněčné suspenze do elektroporační kyvety a ponecháno na ledu po dobu 10 minut. Posléze bylo přidáno 10 ng plasmidové DNA⁵ v 50 μ l vody a byla provedena elektroporace v BTX elektroporátoru ECM-630 dvěma pulzy o 1500 V/25 μ F/ 500 Ω s pauzou 10 sekund mezi pulzy. Kyvety byly okamžitě umístěny na led a po inkubaci přesně 10 minut byla suspenze buněk přenesena do kultivačního média předehřátého na 26 °C.

Po 16-24 hodinách kultivace bylo přidáno selekční antibiotikum G 418 (50 μ g/ml) a stav kultury byl sledován. Rozšířenou alternativu představuje vysévání na kultivační půdu obsahující selekční antibiotika, což nám umožní vyselektovat přímo jednotlivé klony. V tomto případě byly stočeny 2 ml kultury, resuspendovány ve zbytkovém médiu a max. 100 μ l suspenze bylo opatrně a co nejrychleji rozetřeno na kultivační půdu. Po sedmi dnech kultivace při 26 °C byly jednotlivé kolonie přeneseny do 200 μ l média v mikrotitrační destičce s 96 jamkami (TPP). Po makroskopickém zaznamenání zákalu a mikroskopické kontrole přítomnosti *L. tarentolae* byla kultura přenesena do 1 ml média v mikrotitrační destičce s 24 jamkami. Jakmile bylo zaznamenáno zřetelné zakalení i tohoto objemu, byla již suspenze kultivována za podmínek popsaných v kapitole 2.1.

⁵ Při kontrolní elektroporaci byla DNA nahrazena čistou vodou.

3 Materiál

3.1 Organismy

Leishmania tarentolae divokého typu

Leishmania tarentolae kmen T7-TR (exprimuje T7 polymerázu a tetracyklinový represor pod selekcí hygromycinem a nourseothricinem)

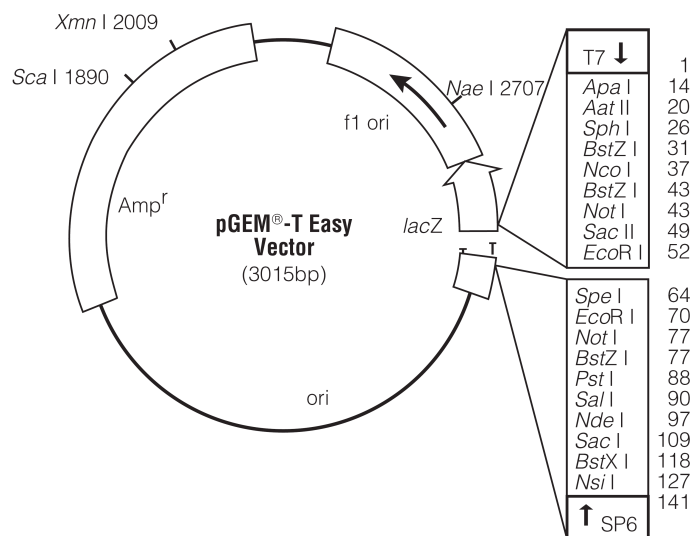
Leishmania tarentolae kmen #5 inducibilně exprimující EGFP

Escherichia coli DH5 α kompetentní buňky

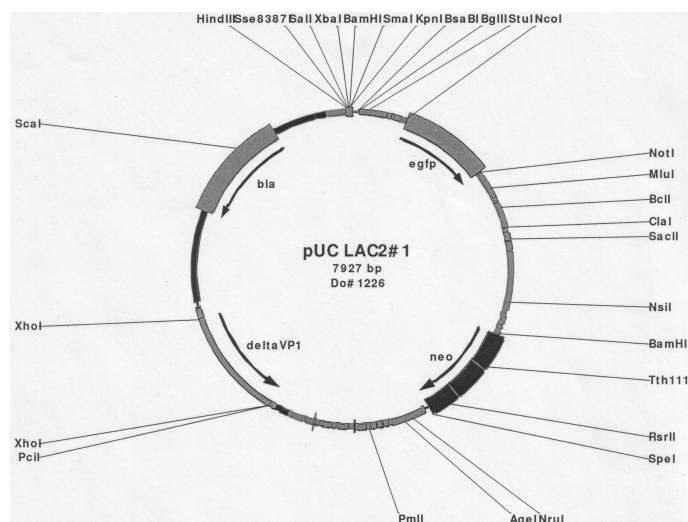
3.2 Vektory

pGEM T-easy (obr. 3.1) – plasmid užívaný pro klonování PCR produktů, nese rezistenci na ampicilin a LacZ fragment umožňující tzv. „blue-white” selekci (Promega)

pUC LAC2#1 (obr. 3.3) – episomální expresní plasmid konstruovaný pro expresi proteinů v *L. tarentolae*, nese geny pro rezistenci na neomycin (*L. tarentolae*) a ampicilin (*E. coli*)



Obr. 3.1 pGEM T-easy



Obr. 3.3 pUC LAC2#1

3.3 Pufry a média

Bakteriální půda: 2 g Tryptone Casein Peptone (Amresco) + 1 g Yeast Extract Bacteriological (Amresco) + 2g NaCl (Lach-Ner) + 3 g Agar Bacteriological (Amresco) + doplnit do 200 ml destilovanou vodou, sterilizovat autoklávováním a po zchladnutí na cca 60°C přidat ampicilin (Roth) v konečné koncentraci 100 µg/ml

BHI médium: 37g BHI (Fluka) rozpustit v 1 l vody, sterilizovat autoklávováním

Coomassie blue: 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R250 (Lach-Ner) rozpustit ve 250 ml odbarvovacího roztoku (viz dále)

Cytomix: 120 mM KCl (Lach-Ner) + 0,15 mM CaCl₂ (Lach-Ner) + 10 mM K₂HPO₄ (Lach-Ner) + 25 mM HEPES (USB) + 2 mM EDTA (Lach-Ner) + 5 mM MgCl₂ (Lach-Ner), pH 7.6

5x elektroodový pufr: 15 g Tris + 72 g glycin + 5 g SDS; pH 8,3

Kultivační půda pro *L. tarentolae*: připravit 50 ml média: 35 ml 2x BHI + 10 ml inaktivovaného fetálního telecího séra (PAA) + 4 ml 1 M HEPES, pH 7,4 + hemin (10 µg/ml) + penicilin (200 jednotek/ml) + streptomycin (200 µg/ml) + nourseothricin (200 µg/ml) + hygromycin (200 µg/ml) + neomycin (50 µg/ml); přidat 50 ml tekutého 2% agaru o teplotě 55°C, promíchat a nalít po 25 ml (bez bublin!) do petriho misek, 15 minut nechat otevřené vyschnout a použít nejpozději ten samý den

LB médium: 1 g Tryptone Casein Peptone + 0,5 g Yeast Extract Bacteriological + 1 g NaCl + doplnit destilovanou vodou do 100 ml, sterilizovat autoklávováním

NET-50: 50 mM EDTA + 100 mM NaCl + 10 mM Tris-HCl (Lach-Ner); pH 8.0

Odbarvovací roztok (SDS PAGE): 45% methanol (Lach-Ner) + 10% kyselina octová (Lach-Ner)

10x PBS: 40 g NaCl + 1 g KCl + 17,9 g Na₂HPO₄·12 H₂O (Lach-Ner) + 1,2 KH₂PO₄ + doplnit destilovanou vodou do 500 ml; pH 7,4

Pufr A: 20 mM Tris-HCl, pH 8 + 150 mM NaCl + 5 mM EDTA + 1 mM PMSF (Fluka)

SOB médium: 10 g Tryptone Casein Peptone + 2,5 g Yeast Extract Bacteriological + 0,25 g NaCl + 5 ml 250 mM KCl + doplnit vodou na 500 ml; pH 7

SOC médium: identické se SOB, navíc 20 mM glukóza (Lach-Ner)

50x TAE pufr: 242 g Tris-base + 57,1 ml ledové kyseliny octové + 100 ml 0,5 M EDTA + doplnit destilovanou vodou do 1 l

TB pufr: 10 mM PIPES (Sigma) + 15 mM CaCl₂ + 250 mM KCl + 55 mM MnCl₂ (Lach-Ner); pH 6.7 (sterilizovat autoklávováním před přidáním MnCl₂ a ten přidat posléze ve formě filtrem sterilizovaného roztoku)

TEG: 25 mM Tris-HCl + 10 mM EDTA + 50 mM glukóza

Transferový pufr (western): 11,64 g Tris-HCl + 5,86 g glycinu (Roth) + 7,5 g SDS (Roth) + 400 ml methanolu + doplnit destilovanou vodou do 2 l

Vzorkový pufr (SDS PAGE): 50 mM Tris-HCl + 2% SDS + 10% glycerol + 0,1% Bromfenolová modř (Lach-Ner) + 1 M dithiothreitol (Sigma) + 1% Triton X-100 (Fluka)

5% akrylamidový gel (zásobní roztok): 40 ml 30% akrylamid (AA:bisAA v poměru 29:1) + 30,4 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8 + 2,4 ml 10% SDS + 168 ml destilované vody

12% akrylamidový gel (zásobní roztok): 100 ml 30% akrylamid (AA:bisAA v poměru 29:1, Roth) + 62,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 + 2,5 ml 10% SDS + 82,5 ml destilované vody

3.4 Ostatní chemikálie

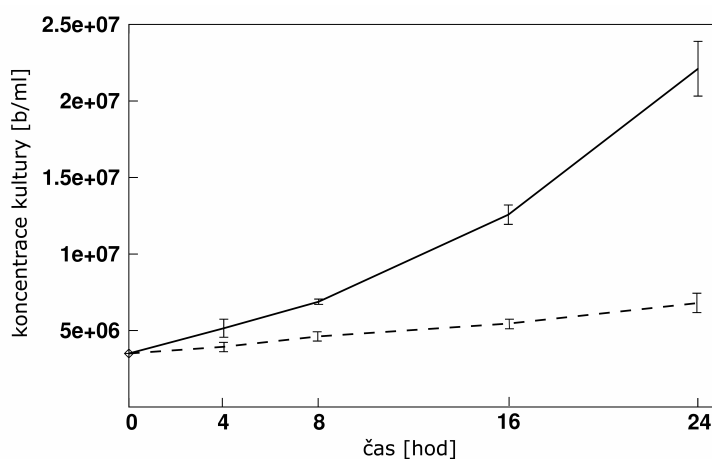
2-Log DNA Ladder (New England BioLabs), acetát sodný (Lach-Ner), agaróza (Serva), APS (peroxosíran amonný, Lach-Ner), BSA (New England BioLabs, Takkara), Custom Synthetic LEXSY Broth (Jena Bioscience), DMSO (Sigma), DNA nanášecí pufr (Takkara), dNTPs (Takkara), etanol (Lach-Ner), ethidium bromid (Sigma), fenol (Lach-Ner), G 418 (Gibco), glycerol (Lach-Ner), hemin (Fluka), hygromycin (Invitrogen), chloroform (Lach-Ner), IPTG (Roth), isoamylalkohol (Lach-Ner), LiCl (Lach-Ner), L-valin ¹⁵N (Cambridge

Isotope Laboratories), n-butanol (Lach-Ner), N-laurylsarkosin (Sigma), NaOH (Lach-Ner), nourseothricin (Jena Bioscience), pronáza E (Fluka), proteinové standardy Precision Plus Protein Standards - All Blue nebo Unstained (Bio-Rad), restrikční enzymy a příslušné pufr (MluI, NcoI, NotI; New England BioLabs, Takkara), RNáza A (Quiagen), síran amonný (Lach-Ner), sušené nízkotučné mléko (Laktino), T4 DNA ligáza a příslušný pufr (New England BioLabs), Taq DNA polymeráza a příslušný pufr (Top-Bio, Takkara), TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin; Aldrich), tetracyklin (Sigma), triethanolamine (Fluka), Triton X-100 (New England BioLabs, Takkara), Tween 20 (Sigma), X-gal (Duchefa Biochemie)

4. Výsledky

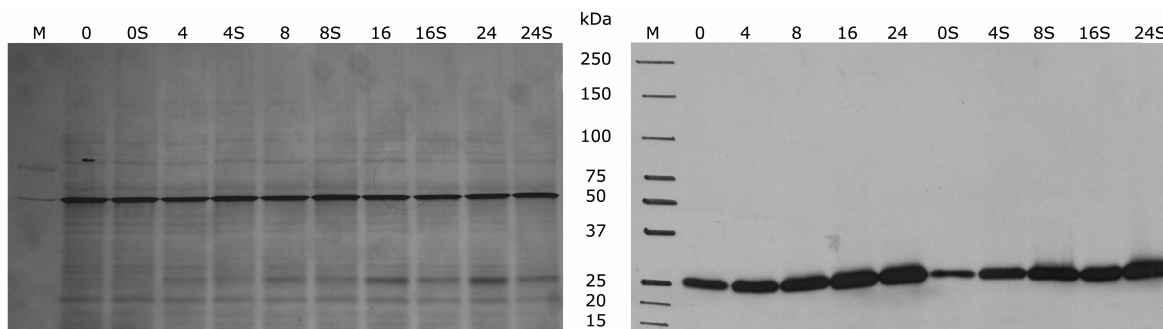
4.1 Optimalizace isotopického značení proteinu během exprese v *L. tarentolae*

Vzhledem k vysoké ceně syntetického média, ve kterém normálně značení probíhá, jsme chtěli prokázat, zda a s jakou kvalitou a výtěžností lze použít isotopického značení v médiu komplexním. Pro posouzení vlivu média na tvorbu biomasy byly stanoveny růstové křivky *L. tarentolae* kmene #5 v médiu syntetickém i komplexním za podmínek odpovídajících expresi proteinu, tj. s přenosem do čerstvého média a indukci. Koncentrace buněčné suspenze byla stanovena bezprostředně po indukci tetracyklinem a 4, 8, 16 a 24 hodin po indukci (viz obr. 4.1). Po 16 a 24 hodinách kultivace je koncentrace buněk kultivovaných v komplexním médiu 2,5 a 5 násobná ve srovnání se suspenzí kultivovanou v médiu definovaném.



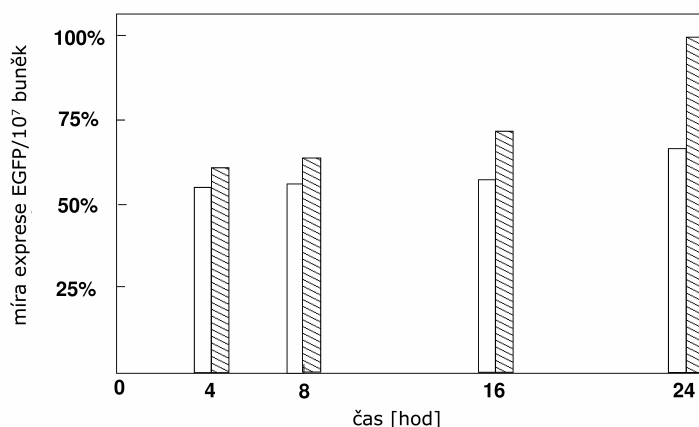
Obr. 4.1 Růstové křivky *L. tarentolae* kultivované v komplexním médiu (plná čára) a kultivované v médiu definovaném (přerušovaná čára).

Abychom prokázali, zda a do jaké míry se liší i produkce samotného proteinu v závislosti na charakteru kultivačního média, byly ve stejných časových intervalech před a po indukci tetracyklinem odebírány vzorky suspenzní kultury kultivované v jednotlivých médiích a následně podrobeny western analýze (viz obr. 4.2).



Obr. 4.2 Western analýza exprese EGFP v závislosti na použitém kultivačním médiu. Vlevo kontrola vyváženosti vzorků nanášených na gel, vpravo fotka radiografického filmu s vyvolanou lokalizací EGF proteinu. Čísla označují hodiny po indukci, sloupce bez dalšího označení představují lyzáty buněk kultivovaných v komplexním médiu. S označuje lyzáty buněk z média syntetického.

Jak je vidět z obrázku 4.3, představujícího kvantitativní analýzu signálu zachyceného na radiografický film, činí rozdíl v úrovni exprese proteinu po 24 hodinách kultivace až 30% ve prospěch buněk kultivovaných v komplexním médiu.



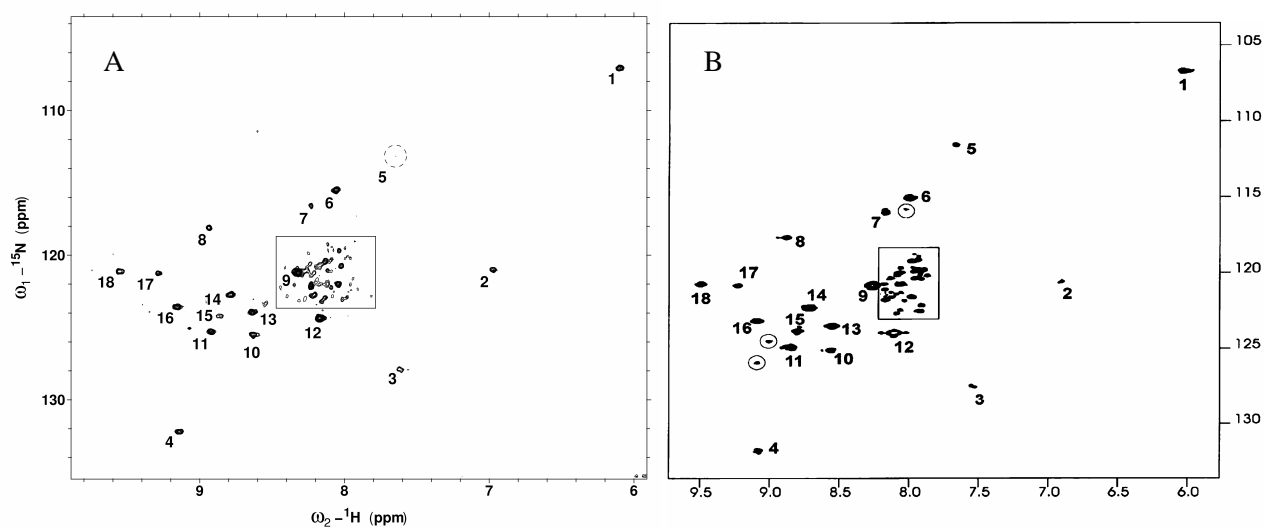
Obr. 4.3 Míra exprese EGF proteinu během 24 hodin v případě kultury kultivované v syntetickém médiu (bílé sloupce) a kultury kultivované v komplexním médiu (šrafované sloupce) vztažená na 10^7 buněk.

Za účelem naměření NMR spekter byl izolován EGF protein (viz obr. 4.4) z 9 litrů suspenzní kultury *L. tarentolae* kmene #5, indukovaného tetracyklinem a kultivovaného během exprese v komplexním médiu s ^{15}N značeným valinem v koncentraci 150 mg/l.



Obr. 4.4 Purifikovaný EGF protein.

Na získaném 2D ^1H - ^{15}N TROSY spektru EGF proteinu o koncentraci 0,9 mM (viz obr. 4.5 A) bylo možné identifikovat všech 18 očekávaných signálů, odpovídajících 18 valinovým reziduíům, která jsou v této variantě proteinu obsažena. Pouze resonance odpovídající valinu číslo pět byla velmi slabá. Navíc byla naměřena skupina resonancí, odpovídajících nejspíše degradačním produktům proteinu vzniklým během měření či špatně sbalené frakci proteinu (oblast spektra označená rámečkem). Celkově bylo však toto spektrum téměř totožné se spektrem stejného proteinu, který byl získán expresí v syntetickém médiu s plně značeným valinem (viz obr. 4.5 B) /Niculae a kol., 2006/.



Obr. 4.5 A) 2D ^1H - ^{15}N TROSY NMR spektrum 0.9 mM ^{15}N -Val značeného EGFP (získán expresí v komplexním médiu za přítomnosti nadbytku ^{15}N -Val) v 90% $^1\text{H}_2\text{O}$ /10% $^2\text{H}_2\text{O}$, 50 mM NaPi, pH = 7 při 298 K, měřeného na 750 MHz Bruker Avance NMR spektrometru. Kroužkem je označena slabá resonance valinu číslo 5, v rámečku se nachází skupina resonancí odpovídajících pravděpodobně degradačním produktům proteinu či jeho nesbalené frakci. B) 2D ^1H - ^{15}N TROSY NMR spektrum plně ^{15}N -Val značeného EGF proteinu, získaného expresí v syntetickém médiu /Niculae a kol., 2006/.

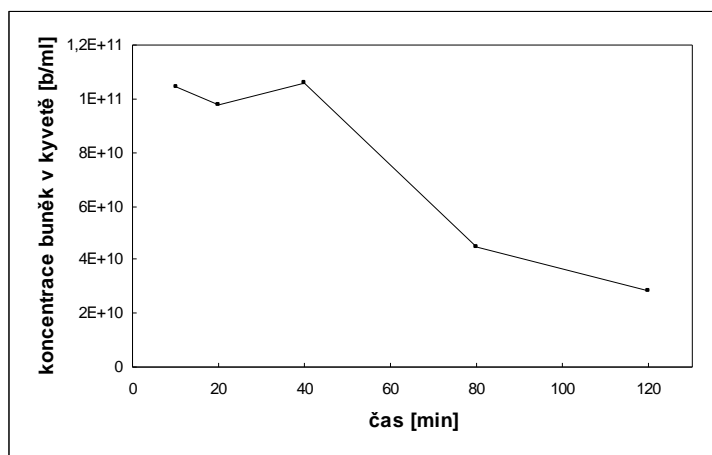
4.2 Určení míry přežívání a sedimentace *L. tarentolae* v NMR kyvetě

Abychom mohli předběžně posoudit, zda je *L. tarentolae* schopna přežít v NMR kyvetě během měření *in-cell* NMR spekter (viz obr. 4.6), provedli jsme simulaci přípravy na měření a v časových intervalech 10, 20, 40, 80 a 120 minut po přenosu buněk do NMR kyvety jsme měřili koncentraci živých buněk pomocí Bürkerovy komůrky.



Obr. 4.10 NMR kyveta se vzorkem *L. tarentolae* v objemu 500 μ l.

Po 80 minutách již byl zaznamenán prudký pokles koncentrace živých buněk (viz obr. 4.11) a v kyvetě byla makroskopicky pozorovatelná mírná sedimentace buněk projevující se projasněním několikamilimetrové vrstvy vzorku u hladiny.



Obr. 4.11 Křivka koncentrace buněk v NMR kyvetě v závislosti na čase od přenosu do kyvety.

4.3 Příprava expresního vektoru

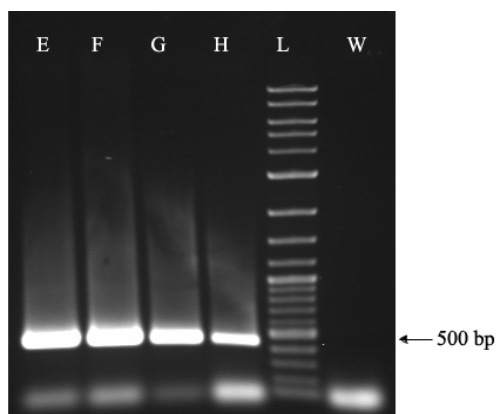
Dle nukleotidové sekvence calmodulinu *L. tarentolae* byly navrženy primery CALM1fw a CALM1rv (viz obr. 4.6), jimiž byla pomocí PCR naamplifikována protein-kódující sekvence genu pro calmodulin o velikosti 450 bazí (viz obr. 4.7). Jako templát byla použita genomová DNA *L. tarentolae* divokého typu.


```

cg→ → → → → → → →
1  atggcggatc agctgtccaa cgagcagatc tccgagttca aggaggcctt ttccctcttt
61  gacaaggatg gcgacggcac catcaccacc aaggagctcg gcaccgtcat gcgctcgcctc
121 ggccagaacc ccaccgaggc ggagctgcag gacatgatca acgaggtgga ccaggacggc
181 agcggcacca tcgacttccc cgagttcttg acgctgatgg cgcgcaagat gcaggactcc
241 gactcggagg aggagatcaa ggaggcgttc cgcgtgttcg acaaggacgg caacggcttc
301 atctccgcgg cggaggtgcg ccacgtcatg accaagctcg gcgagaagcg tacagacgag
361 gaggtggacg agatgatccg cgaggccgac gtggatggcg acggtcaaat caactacgag
421 gagtttgtga agatgatgat gagcaagtag
      ← ← ← ← ← ← ←acgcgt

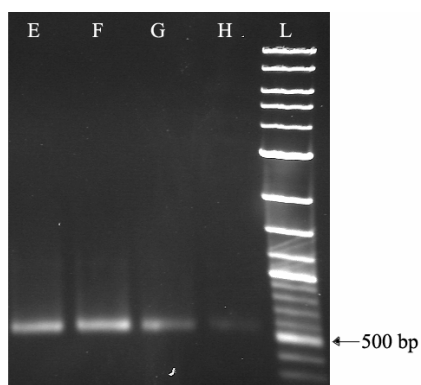
```

Obr. 4.6 Sekvence genu pro calmodulin. Podtržené úseky byly použity k návržení primerů, nad a pod jsou zobrazeny báze přidané k sekvenci za účelem vytvoření restrikčních míst NcoI a MluI. Šipky ukazují směr elongace.



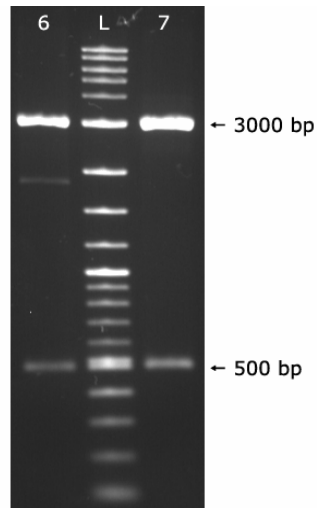
Obr. 4.7 Výsledek PCR amplifikace. E-H: produkty PCR genu pro calmodulin, L: 2-Log DNA Ladder, W: negativní kontrola (PCR reakce provedená s vodou).

Produkty amplifikace byly z gelu vyříznuty, izolovány a jejich kvalita i kvantita byla zkontrolována analýzou v agarózovém gelu (viz obr 4.8). Takto získané fragmenty byly díky jednobazovým A převisům, nespécificky přidaným Taq polymerázou ke koncům amplifikovaných fragmentů, ligovány do plasmidu pGEM T-easy a ligační směsí byly transformovány kompetentní buňky DH5 α .



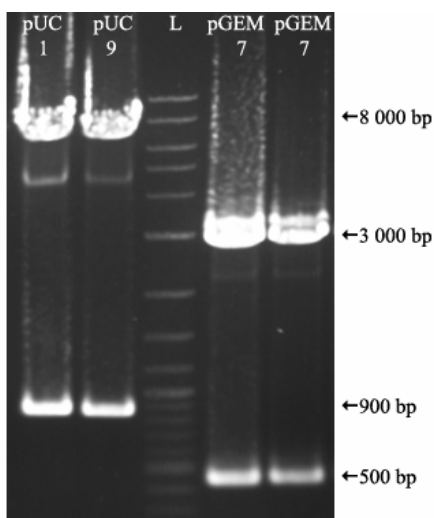
Obr. 4.8 Kontrola izolace PCR produktů z gelu. E-H: izolované fragmenty, L: 2-Log DNA Ladder.

Klony bakterií transformovaných plasmidem s integrovaným fragmentem byly vybrány na základě jejich bílé barvy vyplývající z přerušení LacZ fragmentu na plasmidu insertem. Přítomnost insertu byla ověřena restriční analýzou izolovaných plasmidů pomocí restričních míst Nco I a Mlu I, vnesených do fragmentu při PCR navrženými primery (viz obr. 4.9).



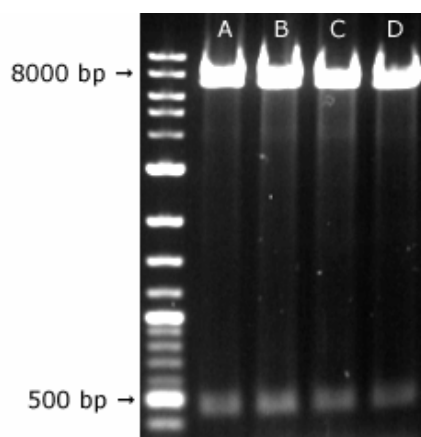
Obr. 4.9 Restriční analýza izolovaných plasmidů pomocí NcoI a MluI. 6: pGEM T-easy klon 6, L: 2-Log DNA Ladder, 7: pGEM T-easy klon 7.

Soubežně byl do kompetentních buněk transformován plasmid pUC LAC2#1. Po izolaci byl podroben restriční analýze taktéž pomocí enzymů NcoI a MluI a pozitivní klony 1 a 9 (tj. vyštěpující 2 fragmenty – jeden o velikosti cca 7,1 kb, odpovídající plasmidu, a druhý o velikosti cca 0,8 kb, odpovídající genu pro EGFP s krátkým úsekem původního plasmidu) byly zároveň s pGEM T-easy klonem 7 kultivovány v objemu 100 ml. Z těchto suspenzních kultur byly izolovány plasmidy pomocí komerční soupravy QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen) dle pokynů výrobce. Cca 100 ng jednotlivých plasmidů pak bylo podrobena restriční analýze pomocí enzymů NcoI a MluI (viz obr. 4.10). Z tohoto gelu byly vyizolovány fragmenty o velikosti 7,2 kb v případě pUC LAC2#1, představující otevřený plasmid bez vyštěpeného genu pro EGFP, a fragmenty o velikosti 0,5 kb v případě pGEM T-easy, představující gen pro calmodulin.



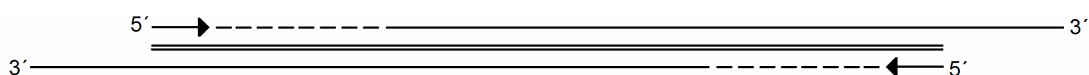
Obr. 4.10 Výsledek restrikce izolovaných plasmidů NcoI a MluI. pUC 1 a 9: pUC LAC2#1 klon 1 a 9, pGEM 7: pGEM T-easy klon 7.

Tyto fragmenty s kohezivními konci byly ligovány a transformovány do kompetentních buněk. Po izolaci plasmidů a jejich restrikční analýze pro overení přítomnosti insertu a plasmidu správné velikosti (viz obr. 4.11) byla sekvence insertu u čtyř klonů osekvenována.



Obr. 4.11 Kontrolní restrikce plasmidu pUC LAC2#1/CAM enzymy NcoI a MluI. A-D: pUC LAC2#1/CAM klony A-D.

Vzhledem k malé velikosti genu pro calmodulin bylo k sekvenaci možné použít amplifikační primery, sekvence pak byla získána složením jednoznačných úseků sekvenační reakce z každé strany. Z charakteru metody totiž vyplývá, že úsek prvních několika desítek bazí za sekvenačním primerem nelze zpravidla s jistotou určit (viz obr. 4.12). K vyhodnocení signálů byl použit program Sequence scanner, pro skládání a srovnávání sekvencí byl použit program DNA STAR.



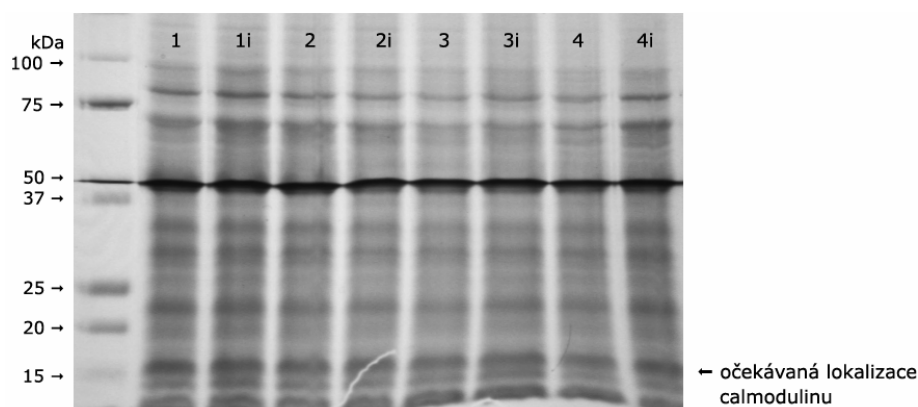
Obr. 4.12 Schéma sekvenace insertu pomocí amplifikačních primerů. Nahoře sekvenace z primeru CALM1fw, dole sekvenace z primeru CALM1rv. Dvojitá čára představuje insert, šipky primery, přerušovaná čára představuje sekvenci nejednoznačnou a plnou čarou je zakreslena sekvence jednoznačná. Složením úseků jednoznačné sekvence je možno získat celou nukleotidovou sekvenci calmodulinu.

Srovnáním osekvenovaného insertu s původní sekvencí genu pro calmodulin bylo ověřeno, že během přípravy expresního vektoru pUC LAC2#1/CAM nedošlo k žádné mutaci v námi sledované sekvenci. Tato by mohla způsobit záměnu aminokyselin a tím potenciálně ovlivnit strukturu či chování molekuly.

4.4 Příprava transgenních linií a test overexprese

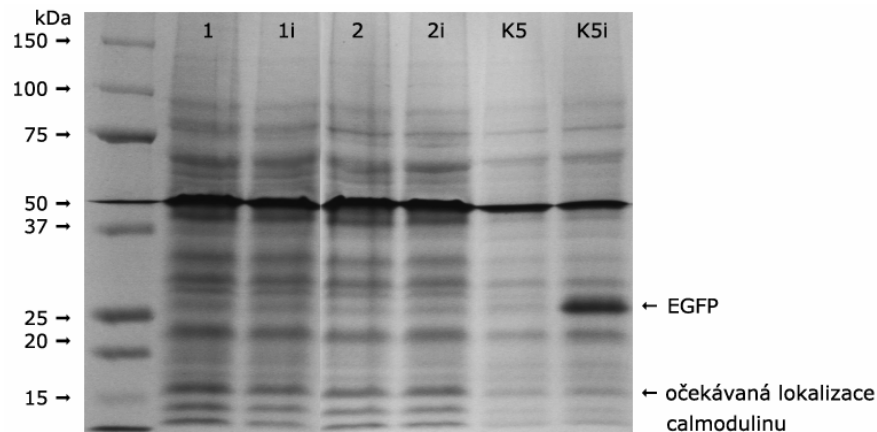
Kmen *L. tarentolae* T7-TR byl opakovaně elektroporován 10 ng plasmidové DNA, avšak v případě selekce transgenů v suspenzní kultuře nebyl žádný ze vzorků dostatečně životaschopný. Teprve při použití selekce metodou vysévání suspenzní kultury na kultivační půdu s antibiotiky byly připraveny klony stabilně resistentní na neomycin. Resistence k tomuto antibiotiku je nesena plasmidem pUC LAC2#1/CAM.

Indukce tetracyklinem by měla vyvolat expresi calmodulinu z plasmidu ve velkém množství, což bylo testováno pomocí SDS PAGE lyzátů buněčné kultury před a po indukci tetracyklinem (viz obr 4.13). Otestováno bylo celkem 24 klonů, ovšem inducibilní overexprese calmodulinu nebyla zaznamenána u žádného.



Obr. 4.13 SDS PAGE elektroporovaných klonů *L. tarentolae* před a po indukci tetracyklinem. Sloupce označené pouze číslem představují vzorek před indukcí, ty označené i představují vzorek 18 h po indukci. Šipkou vpravo je označena pravděpodobná lokalizace calmodulinu, u nějž není zaznamenatelný nárůst po indukci. Vlevo je proteinový standart Precision Plus (Bio-Rad).

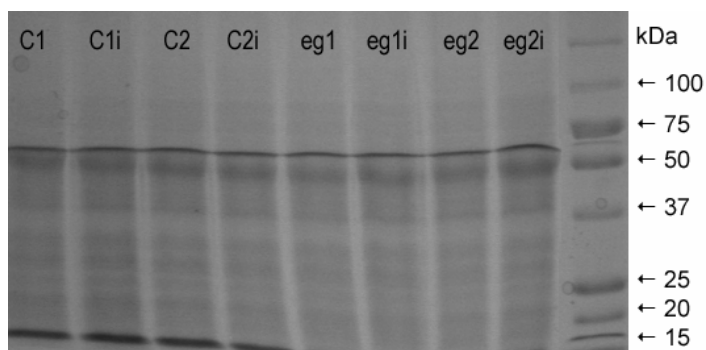
Pro kontrolu, zda absence overexprese nebyla způsobena nefunkčním tetracyklinem, byla u dvou klonů zopakována indukce tetracyklinem zároveň s klonem K5, inducibilně exprimujícím protein EGFP. V případě klonu K5 došlo k výrazné expresi proteinu EGFP, u klonů elektroporovaných plasmidem pUC LAC2#1/CAM opět nárůst v expresi calmodulinu zaznamenán nebyl (viz obr. 4.14)



Obr. 4.14 SDS PAGE klonů *L. tarentolae* před a po indukci tetracyklinem. Sloupce označené 1 a 2 představují klony elektroporované plasmidem pUC LAC2#1/CAM, sloupec K5 představuje klon inducibilně exprimující EGFP. Označení i poukazuje na vzorky 18 h po indukci tetracyklinem. V případě klonu K5 došlo k inducibilní overexpresi proteinu EGFP, zatímco u klonů elektroporovaných plasmidem pUC LAC2#1/CAM ke zvýšení exprese calmodulinu nedošlo. Toto ukazuje, že tetracyklin použitý k indukci nebyl závadný.

Elektroporace byla posléze zopakována a jako pozitivní kontrola byl jeden vzorek elektroporován původním plasmidem pUC LAC2#1/EGFP. Misky se vzorkem elektroporovaným vodou (negativní kontrola) obsahovaly celkem jednu kolonii, což poukazuje na nízkou tendenci *L. tarentolae* přirozeně získávat resistenci na neomycin.

Jak ukázala následující SDS PAGE lyzátů nově elektroporovaných klonů před a po indukci tetracyklinem, expresi se nepodařilo indukovat dokonce ani v případě původního plasmidu (viz obr. 4.15). Testováno bylo 20 klonů elektroporovaných pUC LAC2#1/CAM a 10 klonů elektroporovaných pUC LAC2#1/EGFP.

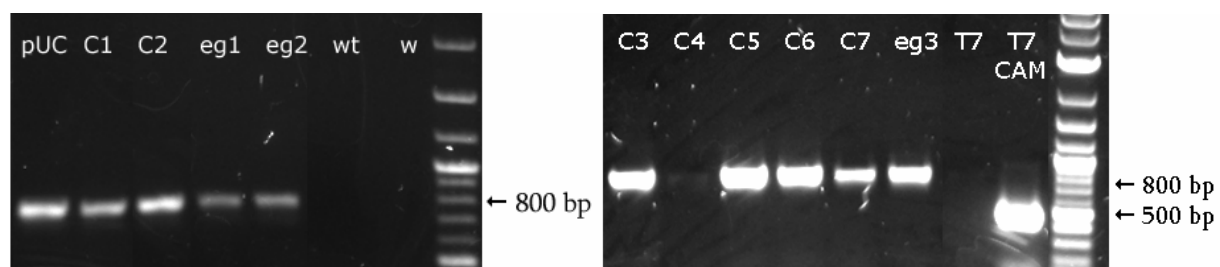


Obr.4.15 SDS PAGE lyzátů *L. tarentolae* před a 18 hodin po indukci tetracyklinem. C 1 a 2: klony elektroporované plasmidem pUC LAC2#1/CAM; eg 1 a 2: klony elektroporované plasmidem pUC LAC2#1/EGFP. Indukce není pozorovatelná ani u calmodulinu (17 kDa), ani EGFP (27 kDa).

4.5 Test přítomnosti plasmidu v elektroporovaných klonech

K potvrzení přítomnosti plasmidu v elektroporovaných klonech *L. tarentolae* byla vyizolována genomová DNA, která byla použita jako templát pro PCR. Amplifikován byl úsek plasmidu dlouhý 777 bazí, nacházející se v oblasti plasmidu kódující resistenci na neomycin. Použity byly primery neoFW a neoRV.

PCR potvrdila přítomnost plasmidu v téměř všech testovaných klonech (viz obr. 4.16; celkem testováno 10 elektroporovaných plasmidem pUC LAC2#1/CAM a 5 elektroporovaných pUC LAC2#1/EGFP). Jako negativní kontroly byly provedeny PCR s vodou, genomovou DNA *L. tarentolae* divokého typu a kmene T7-TR (s genomovou DNA kmene T7-TR byla navíc provedena PCR za použití primerů CALMfw/CALMrv pro kontrolu, zda není absence PCR produktu způsobena špatnou kvalitou DNA či její nesprávnou koncentrací). V pozitivní kontrole byla jako templát použita plasmidová DNA pUC LAC 2#1/CAM.



Obr. 4.16 PCR potvrzení přítomnosti plasmidu v jednotlivých klonech *L. tarentolae*. pUC: templáten plasmidová DNA pUC LAC2#1/CAM; C1-7: templátem genomová DNA klonů C1-7 elektroporovaných plasmidem pUC LAC2#1/CAM; eg1-3: templátem genomová DNA klonů eg1-3 elektroporovaných pUC LAC2#1/EGFP; wt: templátem genomová DNA *L. tarentolae* divokého typu; T7: templátem genomová DNA kmene T7-TR; T7 CAM: templátem genomová DNA kmene T7-TR, použity primery CALMfw/CALMrv; w: templát nahrazen vodou.

5. Diskuze

V předkládané bakalářské práci jsem se zabývala především optimalizací protokolu pro isotopické značení proteinů během jejich exprese v *Leishmanii tarentolae*, které bylo při použití dříve popsaného postupu limitováno vysokými náklady a nízkou výtěžností exprimovaného proteinu /Niculae a kol., 2006/.

V první fázi jsme srovnávali růst *L. tarentolae* v závislosti na použitém médiu. Použito bylo komerční syntetické médium dodávané firmou Jena Bioscience a standardní BHI médium od firmy Fluka. Při srovnání růstových křivek je zřejmé, že v případě komplexního média je po 24 hodinách koncentrace kultury až 5-ti násobná ve srovnání s médiem definovaným. Připočítáme-li navíc až o 35% vyšší produkci EGFP vztaženou na jednotku biomasy, je zřejmé, že kultivací v komplexním médiu je možné dosáhnout několikanásobného zvýšení výtěžnosti proteinu.

Posléze byl izolován EGF protein exprimovaný *L. tarentolae* během kultivace v komplexním médiu s ^{15}N značeným valinem v koncentraci 150 mg/l, což představuje 6-ti násobek koncentrace použité v původním protokolu se syntetickým médiem. Takto získaný protein obsahuje residua značené aminokyseliny s mnohem menší pravděpodobností, a to v důsledku naředění značené aminokyseliny neznačenou, přítomnou v komplexním médiu. Získaná NMR spektra tohoto vzorku však ukázala, že dosažená míra značení je plně postačující k identifikaci všech reziduí dané aminokyseliny, která se v proteinu nacházejí.

Vysoká ekonomická náročnost přípravy NMR vzorků je v případě jiných expresních systémů jako je *E. coli* či *Pichia pastoris* spojena především s vysokou cenou isotopické značky. V případě *L. tarentolae* převyšují náklady na syntetické médium mnohonásobně všechny ostatní náklady a jeho cena je asi 100 krát vyšší než cena média komplexního. I za použití šestinásobné koncentrace značené aminokyseliny byly v našem případě náklady na přípravu vzorku pro NMR spektrální analýzu sníženy až téměř na desetinu. Takto výrazné snížení ceny vzorku činí tuto metodu ekonomicky udržitelnou pro širší použití v oblasti strukturní biologie a lze navíc předpokládat, že by tento princip mohl být použitelný i v jiných obdobných případech, jako je například expresní systém založený na buněčných liniích z vaječníků čínských křečků.

V navazujících pokusech jsem se zabývala posouzením vhodnosti *L. tarentolae* k *in-cell* NMR spektroskopii. V první fázi byla sledována schopnost *L. tarentolae* přežít za podmínek měření *in-cell* NMR. Výsledky ukázaly, že zmíněná spektra je nutné naměřit

přibližně do 1 hodiny, protože později měření znemožní vysoká úmrtnost buněk, spojená se zvýšenou sedimentací, změnami vnitřního prostředí buněk a degradací proteinu.

V další fázi jsme přistoupili ke konstrukci transgenní linie *L. tarentolae*, která by měla inducibilně overexprimovat calmodulin. Tato linie by byla posléze podrobena *in-cell* NMR spektrální analýze. Za tímto účelem byla v plasmidu pUC LAC2#1, získaném od Dr. Kirilla Alexandrova (Max Planck Institute of molecular Physiology, Dortmund), zaměněna sekvence genu pro EGFP sekvencí genu pro calmodulin. Takto upravený plasmid byl následně elektroporován do již transgenních buněk *L. tarentolae*, exprimujících T7 pol a tetracyklinový represor. I přes ustavení stabilních linií nebylo možné vyvolat ani u jednoho klonu inducibilní expresi. Při dalším opakování elektroporace byla provedena i kontrolní elektroporace původním plasmidem, nesoucím gen pro EGFP. Indukce overexprese však nebyla úspěšná ani v tomto případě.

Možným vysvětlením by byla nefunkčnost plasmidu v důsledku poškození oblasti důležité pro jeho expresní funkci, které by mohlo být způsobeno např. transportem či dalšími manipulacemi. Jiným vysvětlením by mohly být nežádoucí změny elektroporovaných buněk, u kterých je pro expresi rekombinantních proteinů klíčová správná funkce T7 RNA polymerázy. V případě jejího poškození by byla absence overexprese nevyhnutelným důsledkem.

Z korespondence s Dr. Kirillem Alexandrovem se zdá, že druhá varianta vysvětlení je pravděpodobně skutečným důvodem. Napovídá tomu fakt, že v jejich laboratoři došlo k podobné situaci, kterou bylo možno vyřešit použitím jiné linie transgenní *L. tarentolae* exprimující T7 pol a tetracyklinový represor. V současné době probíhá příprava na elektroporace nově zaslané linie *L. tarentolae*, která by měla inducibilně overexprimovat z tohoto plasmidu podporovat.

5. Shrnutí

V rámci této práce byly optimalizovány podmínky isotopického značení proteinu během exprese v *L. tarentolae*. Tento postup je založen na kultivaci inducibilního expresního kmene *L. tarentolae* v levném komplexním BHI médiu doplněném isotopicky značenými aminokyselinami. Ty jsou úmyslně dodány do komplexního média nedefinovaného složení v nadbytku převyšujícím reálnou potřebu *L. tarentolae*. Do exprimovaného proteinu je tak inkorporována aminokyselina jak v značené, tak i v meznačené formě, což by mělo vést ke snížení senzitivity NMR experimentu. Tato zdánlivá nevýhoda použití BHI média při značení je však vyvážena 2 – 3 násobným zvýšením výtěžnosti proteinu a hlavně desetinásobným snížením nákladů na přípravu vzorku ve srovnání s dříve popsáním postupem /Niculae a kol., 2006/. NMR spektrální analýza takto získaného EGF proteinu ukázala, že míra značení je plně dostačující k získání NMR spekter o dostatečném rozlišení.

Zde prezentovaný postup znamená zpřístupnění expresního systému založeného na *L. tarentolae* k běžnému použití pro účely NMR spektrálních analýz rekombinantních proteinů. Získaná data se stala podkladem pro článek, který byl zaslán do Journal of Biomolecular NMR.

Dalším cílem bylo posouzení vhodnosti *L. tarentolae* k *in-cell* NMR spektroskopii. Byl připraven expresní vektor, který by měl umožnit vytvoření transgenní linie *L. tarentolae* exprimující calmodulin v dostatečné míře potřebné pro *in-cell* NMR spektroskopii. Tato část projektu ještě nebyla dokončena a v současné době probíhají přípravy na elektroporace nově zasláné linie *L. tarentolae*.

7. Literatura

- › J. Alexander, A. R. Satoskar, D. G. Russel, *Leishmania* species: models of intracellular parasitism, *J. Cell. Sci.* 112 (1999) 2993-3002.
- › R. Breitling, S. Klingner, N. Callewaert, R. Pietrucha, A. Geyer, G. Ehrlich, R. Hartung, A. Müller, R. Contreras, S. M. Beverley, K. Alexandrov, Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production, *Protein Expr. Purif.* 25 (2002) 209-218.
- › D. A. Campbell, S. Thomas, N. R. Sturm, Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?, *Microbes Infect.* 5 (2003) 1231-1240.
- › E. Clayton, Genetic manipulation of kinetoplastida, *Parasitol. Today* 15 (1999) 372-378.
- › K. Dower, M. Rosbash, T7 RNA polymerase-directed transcripts are processed in yeast and link 3' end formation to RNA nuclear export, *RNA* 8 (2002) 686-697.
- › M. Edwards, C. H. Arrowsmith, D. Christendat, A. Dharamsi, J. D. Friesen, J. F. Greenblatt, M. Vedadi, Protein production: feeding the crystallographers and NMR spectroscopist, *Nat. Struct. Biol.* 7 (2000) 970-972.
- › B. E. Finn, S. Forsén, The evolving model of calmodulin structure, function and activation, *Structure* 3 (1995) 7-11.
- › C. La Flamme, F. S. Buckner, J. Swindle, J. Ajioka, W. C. Van Voorhis, Expression of mammalian cytokines by *Trypanosoma cruzi* indicates unique signal sequence requirements and processing, *Mol. Biochem. Parasitol.* 75 (1995) 25-31.
- › T. C. Hammarton, J. C. Mottram, C. Doerig, The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation, *Prog. Cell. Cycle. Res.* 5 (2003) 91-101.
- › K. Hausmann, N. Hülsmann, *Protozoologie*, Academia, Praha, 2003.
- › N. C. Hepburn, Cutaneous leishmaniasis, *Clin. Exp. Dermatol.* 25 (2000) 363-370.
- › B. L. Herwaldt, Leishmaniasis, *Lancet* 354 (1999) 1191-1198.
- › J. W. Jung, W. Lee, Structure-based functional discovery of proteins: structural proteomics, *J. Biochem. Mol. Biol.* 37 (2004) 28-34.
- › B. Kazemi, G. H. Tahvildar-Bideroni, S. R. Hashemi Feshareki, E. Javadian, Isolation a lizard *Leishmania* promastigote from its natural host in Iran, *J. Biol. Sci.* 4 (2004) 620-623.
- › K. Koths, Recombinant proteins for medical use: the attractions and challenges, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6 (1995) 681-687.
- › S. M. Krassner, B. Flory, Essential amino acids in the culture of *Leishmania tarentolae*, *J. Parasitol.* 57 (1971) 917-920.

- S. Kushnir, K. Gase, R. Breitling, K. Alexandrov, Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*, *Protein Expr. Purif.* 42 (2005) 37-46.
- A. Laban, J. F. Tobin, M. A. Curotto de Lafaille, D. F. Wirth, Stable expression of the bacterial *neo^r* gene in *Leishmania enriettii*, *Nature* 343 (1990) 572-574.
- R. Lainson, J. J. Shaw, Evolution, classification and geographical distribution, in: W. Peters, E. Killick-Kendrick (Eds.) *The Leishmaniases in Biology and Medicine*, Vol. I, Academic Press Inc., Orlando, 1987, pp. 1-120.
- A. Mißlitz, J. C. Mottram, P. Overath, T. Aebischer, Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes, *Mol. Biochem. Parasitol.* 107 (2000) 251-261.
- H. Momen, E. Cupolillo, Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95 (2000) 583-588.
- H. Motazedian, H. Noyes, R. Maingon, *Leishmania* and *Sauroleishmania*: the use of random amplified polymorphic DNA for the identification of parasites from vertebrates and invertebrates, *Exp. Parasitol.* 83 (1996) 150-154.
- A. Niculae, P. Bayer, I. Cirstea, T. Bergbrede, R. Pietrucha, M. Gruen, R. Breitling, K. Alexandrov, Isotopic labeling of recombinant proteins expressed in the protozoan host *Leishmania tarentolae*, *Protein Expr. Purif.* 48 (2006) 167-172.
- H. A. Noyes, M. L. Chance, *Leishmania (Sauroleishmania)*: a comment on classification, *Parasitol. Today* 14 (1998) 167.
- S. Reckel, F. Löhr, V. Dötsch, In-cell NMR spectroscopy, *Chembiochem* 6 (2005) 1601-1606.
- T. Sakai, H. Tochio, T. Tenno, Y. Ito, T. Kokubo, H. Hiroaki, M. Shirakawa, In-cell NMR spectroscopy of proteins inside *Xenopus laevis* oocytes, *J. Biomol. NMR* 36 (2006) 179-188.
- Z. Serber, L. Corsini, F. Durst, V. Dötsch, In-cell NMR spectroscopy, *Methods Enzymol.* 394 (2005) 17-41.
- Z. Serber, V. Dötsch, In-cell NMR spectroscopy, *Biochemistry* 40 (2001) 14318-14323.
- Z. Serber, R. Ledwidge, S. M. Miller, V. Dötsch, Evaluation of parameters critical to observing proteins inside living *Escherichia coli* by in-cell NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 8895-8901.
- T. A. Shapiro, P. T. Englund, The structure and replication of kinetoplastid DNA, *Annu. Rev. Microbiol.* 49 (1995) 117-143.

- Y. Schlein, Leishmania and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission, Parasitol. Today 9 (1993) 255-258.
- R. Sodoyer, Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals, BioDrugs 18 (2004) 51-62.
- W. Solbach, T. Laskay, Evasion strategies of *Leishmania* parasites, in: F. J. Tapia, G. Cáceres-Dittmar, M. A. Sánchez (Eds.) Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis, Springer-Verlag, Heidelberg, 1996, pp. 25-47.
- B. J. Stockman, NMR spectroscopy as a tool for structure-based drug design, Prog. NMR Spect. 33 (1998) 109-151.
- J. F. Tobin, S. L. Reiner, F. Hatam, S. Zheng, C. L. Leptak, D. F. Wirth, R. M. Locksley, Transfected *Leishmania* expressing biologically active IFN-gamma, J. Immunol. 150 (1993) 5059-5069.
- S. Wildt, T. U. Gerngross, The humanization of N-glycosylation pathways in yeast, Nat. Rev. Microbiol. 3 (2005) 119-128.
- E. Wirtz, C. Hartmann, C. Clayton, Gene expression mediated by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases in transgenic trypanosomes, Nucleic Acids Res. 22 (1994) 3887-3894.
- A. V. Yakhin, L. M. Vinokurov, A. K. Surin, Y. B. Alakhov, Green fluorescent protein purification by organic extraction, Protein Expr. Purif. 14 (1998) 382-386.
- W. W. Zhang, H. Charest, G. Matlashewski, The expression of biologically active human p53 in *Leishmania* cells: a novel eukaryotic system to produce recombinant proteins, Nucleic Acids Res. 23 (1995) 4073-4080.

Internetové zdroje:

- www.jenabioscience.com
- www.dpd.cdc.gov/dpdx