

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

**Exprese, purifikace a bioinformatická analýza
enzymu serinové proteázy S01.A55 z larev bzučivky
zelené**

**Theodor Kutý
Jihočeský kraj**

České Budějovice 2021/22

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Exprese, purifikace a bioinformatická analýza enzymu serinové proteázy S01.A55 z larev bzučivky zelené

*Expression, purification and bioinformatical analysis of a serine
protease enzyme S01.A55 from the common green bottle fly
maggots*

Autoři: Theodor Kutý

Škola: Česko-anglické gymnázium s.r.o., Třebízského 1010/9, 37006 České
Budějovice 5

Kraj: Jihočeský kraj

Konzultant: RNDr. Zdeněk Franta Ph.D., RNDr. Květa Tůmová
České Budějovice 2021/22

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Českých Budějovicích dne 13.1.2022

Theodor Kutý

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval svému odbornému konzultantovi RNDr. Zdeňku Frantovi Ph.D. za možnost účastnit se tohoto výzkumu, skvělé vedení, srozumitelné seznámení s problematikou a principy metod.

Také děkuji laboratorní techničce Zuzaně Světelové za pomoc a „coaching“ v prostorách laboratoře. Celkově děkuji dalším členům týmu laboratoře z Jihočeské univerzity Přírodovědecké fakulty budovy C, za pomoc a přívětivé jednání.

Stejně tak děkuji vedení Česko-anglického gymnázia za možnost věnovat čas výzkumu i v době klasického vyučování. Děkuji své konzultantce a učitelce RNDr. Květě Tůmové, za připomínky a doporučení při psaní této práce.

V neposlední řadě děkuji také rodičům za pomoc a podporu.

Anotace

Bzučivka zelená (*Lucilia sericata*) může na první pohled působit jako obyčejná moucha, která pro člověka nenalezne využití. Opak je ale pravdou, jelikož larvy této mouchy se už od dávných dob využívají k podpoře hojení a čištění ran. Sliny těchto larev obsahují řadu trávicích enzymů umožňujících rozklad organické hmoty, a to je jednou z příčin účinnosti larvální terapie. Tato skutečnost vede ke snahám tyto enzymy identifikovat, vyrobit a analyzovat, což by mohlo mít za důsledek například vznik nového léčiva.

V genomu slinných žláz larev bzučivky zelené bylo objeveno několik druhů enzymů, z nichž největší část tvoří serinové proteázy, které umožňují štěpení peptidických vazeb mezi určitými aminokyselinami. Jedna z těchto nepopsaných proteáz se stala i předmětem této práce.

Ve své práci SOČ jsem se zabýval serinovou proteázou značenou *S01.A55* (dle databáze *MEROPS*). Hlavní cíle této práce tedy byly: (I.) Příprava expresního vektoru, pro rekombinantní produkci tohoto enzymu, (II.) produkce rekombinantního proteinu v bakteriích, (III.) purifikace získaného enzymu, (IV.) provedení bioinformatické analýzy, týkající se hlavně predikce struktury a porovnání programů (*AlphaFold2*, *Phyre2*), (IV.) srozumitelný popis metodiky a jejich principů pro neodbornou veřejnost.

Klíčová slova

Lucilia sericata, serinová proteáza, purifikace, plazmid, *E. coli*, exprese

Annotation

Common green bottle fly could seem like a basic fly with no use for humans. But the opposite is true as its larvae have been used in folks medicine for centuries for wound debridement. The saliva of these maggots contains a variety of digestion enzymes that enable them to process the organic (rotten) material which is one of the reasons for the effectivity of larval therapy. The overall performance of larval therapy (mostly in curing hard to heal wounds) leads to an effort to identify, produce, and analyse active substances (mostly enzymes), which could be exploited in human or veterinary medicine.

Transcriptomic analysis of salivary glands and gut tissue of these maggots, reveal various classes of proteolytic enzymes. Of which, the most common group were serine proteases, enzymes that cleave the peptide bonds. One of these proteases, newly identified in the salivary glands became the object of my research study.

In my SOČ work, I dealt with serine protease labelled S01.A55 (name derived from the MEROPS protease database). The main goals of this work are: (i) Preparation of an expression vector for the production of the recombinant enzyme, (ii) production of recombinant enzyme in bacterial expression system, (iii) purification of the enzyme, (iv) structure prediction and analysis, (v) comprehensibly describe and explain the methods and its principles to general audience.

Keywords

Lucilia sericata, serine protease, purification, plasmid, *E. coli*, expression

Obsah

1	Úvod	9
1.1	Motivace.....	9
1.2	Enzymy	10
1.2.1	Klasifikace	11
1.2.2	Struktura enzymů	12
1.3	Proteosyntéza	14
1.4	Serinové proteázy a jejich mechanismus	16
2	Cíle.....	18
3	Principy a fungování metod	18
3.1	Příprava expresního vektoru	18
3.1.1	Expresní vektor a gen	18
3.1.2	PCR.....	20
3.1.3	Elektroforéza DNA	21
3.1.4	Restrikční reakce.....	22
3.1.5	Ligace.....	23
3.1.6	Transformace	24
3.1.7	Kolony PCR.....	24
3.1.8	Miniprep a sekvenace	24
3.1.9	Maxiprep.....	25
3.2	Exprese	25
3.2.1	Pilotní exprese.....	25
3.2.2	SDS-PAGE elektroforéza	27
3.2.3	Western blot.....	28
3.2.4	Large scale produkce	29
3.3	Purifikace	29
4	Materiály a metody (Praktická část).....	31
4.1	Materiál	31
4.2	Klonování do pET28a-SUMO	31
4.2.1	Design primerů	31
4.2.2	Gradient PCR.....	32
4.2.3	PCR pomocí Q5 High-Fidelity DNA polymerase	32
4.2.4	Restrikce PCR produktu a klonovacího vektoru.....	33

4.2.5	Ligace T4 ligázou	33
4.2.6	Transformace do DH5 α E.coli.	33
4.2.7	Colony PCR	34
4.2.8	Miniprep a sekvenace	35
4.2.9	Maxiprep a izolace plazmidu	35
4.3	Expres ve vybraných kmenech E. Coli	35
4.3.1	Transformace a kultivace	36
4.3.2	Pilotní exprese.....	36
4.3.3	Příprava vzorků pro SDS-PAGE elektroforézu	37
4.3.4	SDS-PAGE gely	37
4.3.5	Western blot.....	38
4.3.6	Large scale produkce enzymu.....	39
4.3.7	Lyze bakterií	39
4.4	Purifikace	40
4.4.1	Příprava pufrů	40
4.4.2	Příprava vzorku pro purifikaci	40
4.4.3	Afinitní chromatografie	40
4.5	Renaturace dialýzou	41
4.6	Bioinformatická analýza	41
4.6.1	Predikce struktury	41
5	Výsledky	42
5.1	Klonování.....	42
5.2	Pilotní exprese.....	43
5.3	Western blot	46
5.4	Purifikace	47
5.5	Renaturace.....	48
5.6	Bioinformatická analýza	48
6	Diskuze	51
7	Závěr	52
8	Použitá literatura	54

1 Úvod

1.1 Motivace

Pro léčbu a čištění ran se už od dávných dob využívají larvy much. Znali je a používali už staří Mayové, či původní kmeny v Austrálii. Popularitu také získaly během Napoleonových tažení a během občanské války v Americe (Cazander et al., 2013). Larvální terapie byla definována v 30. letech 20. století doktorem Williamem Baerem a v této době dosáhla svého největšího rozmachu. Inovace a rozvoj antibiotik ve 40. letech spolu s moderními chirurgickými metodami však uvrhly larvální terapii do stínu, a dnes je považovaná za alternativní léčbu. To ale nic nemění na její účinnosti, která byla prokázána lékařskými studiemi. V současné době se larvální terapie využívá zejména pro chronické rány, například syndrom diabetické nohy nebo rány, kde nezabírají antibiotika. V moderní době jsou pak nejpoužívanější larvy **Bzučivky zelené** (*Lucilia sericata*), mouchy, která je jinak známá pro své charakteristické zeleně-metalické zbarvení.

V čem ale účinnost této metody vůbec spočívá? Odpověď lze nalézt už v samotné roli, kterou larvy hrají v ekosystému. Tam slouží jako rozkladači živící se například mršinami, či jinými organickými materiály. Tuto hmotu zpracovávají jak pomocí enzymů ve slinách, tak pomocí enzymů v trávicím traktu (o enzymech více v následující kapitole). Dále také musí ve svém přirozeném prostředí, které je plné bakterií a hniloby, nějak přežít, a tak produkují různé antibakteriální a dezinfekční látky, mezi kterými jsou enzymy také nedílnou součástí. Stejně jako to dokážou v přírodě, tak to zvládnou i u člověka, a jsou slibným nástrojem pro čištění špatně se hojících ran. Larvy bzučivky zelené se stávají nejvýhodnějším pomocníkem kvůli tomu, že se živí čistě „mrtvou“ (nekrotickou) tkání, a ránu tak, bez poškození zdravé tkáně, zvládnou vyčistit s velkou přesností, čímž si vysloužily i přezdívku „bio nůž“ (Čeřovský et al. 2010). Mimo to se jako příčina efektivity larvální terapie udává i samotný pohyb larev, který jakoby „masíruje“ poškozenou tkáň, čímž podporuje produkci dalších (zejména nízkomolekulárních látek), podporujících regeneraci tkáně. Stručně řečeno, sterilní larvy pomocí trávicích enzymů a dezinfekčních látek, které přirozeně produkují, odstraní z rány nekrotické tkáně a bakterie, čímž ránu dobře vyčistí, a to je nezbytný předpoklad pro úspěšné zahojení. (Sherman, 2014)

Pro mnoho lidí však může být použití larev spíše horrorem nežli spásou. Z důvodů, jak fobických, tak předsudkových. Přece jen se mnoha lidem už při vyslovení slova „larva“ vybaví dekadentní a naturalistické představy nebo nepříjemný šimravý pocit. Skutečně ohrožení lidé pak mohou odmítnout léčbu, která by je jinak zachránila. Tento problém se snaží vyřešit věda pomocí metod biochemie, molekulární biologie a genetiky zkoumáním látek produkovaných těmito larvami, což by mohlo vést třeba k vytvoření nového léčiva, kde by živých larev nebylo potřeba. Hlavním předmětem zájmu jsou pak látky, které se účastní nějakých reakcí, nebo je zprostředkovávají. Těmi jsou právě enzymy. Jeden takový enzym,

který byl nalezen v genomu larev bzučivky zelené, se stal i hlavním předmětem této práce. Studovaný enzym patří do rodiny serinových proteáz a nese předběžné označení **S01.A55**, které je využíváno v databázi enzymů *MEROPS*. Tento enzym larvy produkují ve svých slinných žlázách, což by mohlo znamenat, že se jedná o trávicí enzym, který se účastní třeba obranných reakcí, nebo samotného odstranění nekrotických tkání (Cazander et al., 2013).

Aby mohla být analýza tohoto enzymu vůbec uskutečněna, musí se ho získat v dostatečné množství. Hlavně touto otázkou se zabývá praktická část mé práce. Metody, jak tento typ enzymu získat jsou různé, může to být třeba izolace ze samotných larev. Každopádně prostředky a dnešní poznání umožňuje poněkud elegantnější způsob pomocí „genového inženýrství“, při kterém dokonce není larev, jako živého organismu, přímo potřeba. Metodiku podrobně rozepíšu v následujících kapitolách, ale stručně funguje asi takto:

Návod pro výrobu enzymu se nachází v genomu larvy, tudíž je zapsaný pomocí DNA. Podobně jako počítače fungují v binární soustavě na základě 1 a 0, tak DNA uchovává informace pomocí čtyř látek. Pomocí různých sekvencí a kombinací těchto čtyř látek pak uchovává informace potřebné pro výrobu enzymu. Jelikož enzym S01.A55 byl nalezen v genomu larvy, jeho sekvence DNA je známá. V dnešní době je možné objednat si úsek DNA na zakázku a pracovat s ním. Tento DNA úsek (návod), se pak ve vhodném formátu předá bakteriím, a ty enzym podle návodu vyrobí (**Expresce**). Enzym se z bakterií izoluje. (**Purifikace**)

Úspěšné produkci enzymu však předchází mnoho ověřovacích a přizpůsobovacích kroků, které se často nevyhnou komplikacím, jež se nedají předvídat. I tak je ale jasné, že tyto metody jsou, nejen pro výrobu enzymů, velmi mocným nástrojem. Na základě podobných principů pak mohou fungovat vakcíny, modifikace potravin nebo vývoj léků proti rakovině.

V neposlední řadě je užitečná i vizualizace. Struktura je totiž u enzymů stěžejní pro jejich vlastnosti a funkci. I pro počítače je velice náročné, až nemožné, přesně předvídat proteinové struktury. Většina struktur je proto zjišťována pomocí experimentálních metod. V roce 2020 však společnost od projektu Google Deepmind, přišla s programem AlphaFold2, který umí na základě neuronových sítí a strojového učení, předvídat strukturu s velikou přesností. Program byl později zpřístupněn i pro veřejnost v online podobě, a tak si dnes skoro každý může zkusit předpovědět strukturu enzymu/proteinu, pokud má jeho sekvenci. Znovu nutno dodat, že strukturu proteinů zatím nelze 100 % předvídat, takže obrázky vygenerované na základě predikce, nemusí odpovídat realitě, každopádně, je to bez experimentálních metod, momentálně asi nejlepší možnost. Proto se pokusím pomocí dvou programů **AlphaFold2** (Miridita et al., 2021), **Phire2** (Kelley LA et al., 2015) předpovědět strukturu S01.A55, a provést na základě výsledků, jednoduchou analýzu.

1.2 Enzymy

V živých organismech neustále probíhá obrovské množství chemických reakcí, které jsou pro život nezbytné. Některé z nich by však samostatně probíhaly velice dlouho, ba dokonce by ani

neproběhly, a proto je potřeba nějakých katalyzátorů („urychlovačů“ chemických reakcí). Příroda to vyřešila pomocí určitých skupin proteinů s katalytickými vlastnostmi, které se nazývají enzymy. Reakce katalyzují tak, že snižují hodnotu aktivační energie, která je potřebná k průběhu chemické reakce. Stejně jako ostatní proteiny, enzymy jsou velké organické molekuly, skládající se z řetězců aminokyselin vzájemně propojených peptidickými vazbami (-CO-NH-). Ve výsledku tak tvoří prostorovou strukturu, která jim poskytuje ony katalytické vlastnosti. Molekuly, které s enzymy za vzniku produktů reagují, se nazývají substráty. Někdy jsou enzymy substrátově velmi specifické (Glukosaoxidas reaguje snad jen s β -D-glukosou)(Robinson, 2015), nebo vážou substráty podobné. Jindy jsou specifické třeba jen skupinově, což znamená, že vykazují aktivitu vůči substrátům se stejnými funkčními skupinami (třeba právě proteázy, jako Trypsin). Výhodou je, že pro katalytické reakce jich není potřeba velká koncentrace a ani se „nespotřebují“(Robinson, 2015). Díky těmto vlastnostem enzymy nacházejí obrovského využití v biotechnologiích, analytických výzkumech, farmacii ale i v běžném životě (věděli jste, že enzymy jsou obsaženy v práškové prášce?) (Kirk et al., 2002).

1.2.1 Klasifikace

Jelikož chemických reakcí, které jsou katalyzovány, je řada typů, tak je i mnoho druhů enzymů. Jako je to i u dalších látek, tak z triviálního názvu toho nelze vždy moc zjistit, a proto z orientačních důvodů IUBMB zavedla rozdělení enzymů, dle funkce a reakcí, které katalyzují, do **7 kategorií**. Rozdělení je značeno čísly EC (*Enzyme Commission number*) (**Tabulka 1**). Tyto kategorie dále obsahují podkategorie, které umožňují zařadit většinu známých enzymů. Dohromady je to pak čtyřčíslné číslo. 1. Hlavní třída, 2. třída, 3. podtřída, 4. pořadové číslo (pořadí zařazení enzymu do kategorie). Přičemž první tři členy popisují reakce, kterých se enzym účastní. (Robinson, 2015)

Př. EC 3.4.23.1 – Pepsin

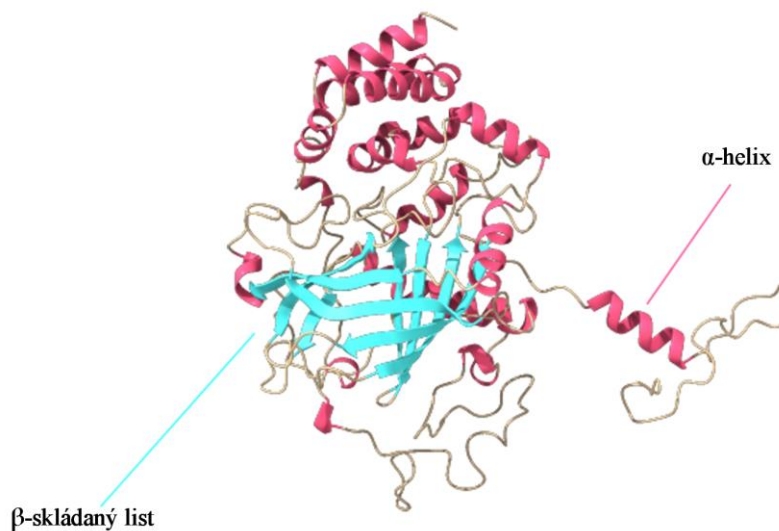
Kategorie	Název	Typ reakce
EC 1	Oxidoreduktázy	Oxidačně-redukční
EC 2	Transferázy	Přenos atomu/ funkční skupiny
EC 3	Hydrolázy	Hydrolýza
EC 4	Lyázy	Nehydrolytické štěpení vazeb, odstranění skupin
EC 5	Izomerázy	Izomerizace
EC 6	Ligázy	Spojení molekul
EC 7	Translokázy	Transport částic přes membrány

Tabulka 1. Rozdělení enzymů dle EC

1.2.2 Struktura enzymů

Základní stavební jednotky enzymů a proteinů jsou aminokyseliny. To jsou malé organické molekuly, obsahující dusík, karboxylovou skupinu a nějakou vedlejší strukturu. Enzymy jsou polypeptidy, které jsou tvořeny velkým počtem molekul aminokyselin navzájem propojených peptidickou vazbou – CO-NH-. Ve formě dlouhých řetězců však nemají energeticky nejvýhodnější prostorové uspořádání, a tak se přirozeně skládají, čímž vzniká prostorová struktura, která určuje enzymům vlastnosti. Za zmínku stojí i **C-konec** a **N-konec**, který udává primární struktura, a znamená že jedna z koncových aminokyselin končí karboxylovou skupinou a druhá aminovou skupinu.

Proces skládání proteinu má většinou čtyři fáze. V první fázi se spojí řetězec aminokyselin. V druhé se začnou tvořit první vodíkové vazby, a vznikají pravidelné struktury, které mají nejčastěji tvar šroubovice (tzv. **α -helix**) či skládaného listu (tzv. **β -skládaný list**) (**Obrázek 1.** monomer katalázy), když jsou pak tyto útvary vytvořené, struktura nese název sekundární. Ve třetí fázi spolu sekundární struktura a zbylé řetězce interagují, tvoří různé druhy vazeb, z nichž nejsilnější je disulfidický můstek (kovalentní vazba mezi dvěma atomy síry z cysteinů). Protein tak získává svou **terciární strukturu**. Tvar terciární struktury se obvykle rozlišuje na globulární a fibrilární. Pro většinu proteinů je toto finále, ale existují i takové, které se buď skládají z více řetězců, nebo se jedná o polymerní protein (více stejných proteinů vzájemně propojených). V takovém případě se jedná o strukturu kvartérní.

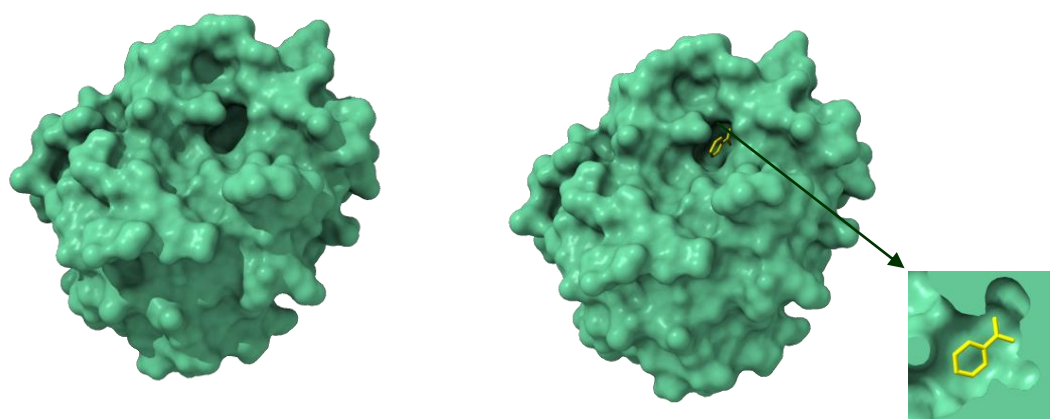


Obrázek 1. Terciární struktura katalázy (PDB ID: 2cag) s vyznačenými sekundárními strukturami zobrazená pomocí programů ChimeraX a Krita. Obrázek připravil: Autor

Enzymy většinou tvoří globulární struktury, což si lze představit jako třeba zmuchlanou nit' (Obrázek 1.). V šedesátých letech 20.století, nobelista Christian Anfinsen, provedl pokus¹, kterým dokázal, že tato složená struktura (alespoň u menších proteinů), je závislá na sekvenci aminokyselin (Protein folding and the thermodynamic hypothesis, 1950-1962 | Christian B. Anfinsen-Profiles in science). Zkratka pořadí a typ aminokyselin určují strukturu proteinů. Ne vždy je ale terciální struktura dostačující, protože enzymy také mohou procházet různými posttranslačními modifikacemi. Je k nim přidán třeba nějaký ion, pomocná struktura, nebo další enzym. Těmto přísadkům se říká **kofaktory** (ionty a látky, které se k enzymu vážou slabě; často třeba ionty zinku) a **koenzymy** (obecně větší molekuly, které se vážou silněji; například molekula NAD), a proteiny, které je mají se nazývají složené. Enzymy, u kterých není potřeba žádné modifikace, se nazývají jednoduché. Nutno také dodat, že aminokyseliny sice z velké části určují nativní strukturu proteinu, ale není jednoduché ji předpovídat, jelikož ani mechanismus jejich skládání není ještě zcela známý. Potom i z fyzikálního hlediska, kvůli vzájemnému působení a interakcím všech aminokyselin a jejich atomů v řetězci, se jedná o mnohodomenzionální problém, se kterým si ani počítač neporadí. Pro představu, kdybychom chtěli počítat konformaci dvou atomů, tak jejich vzájemné působení by se dalo vyjádřit pomocí potenciální energie. Když se k sobě budou dva atomy přibližovat, tak energie (Gibbsova volná energie) systému bude klesat, až do bodu nějaké nejmenší hodnoty, v té se pak molekuly vyskytují nejčastěji, protože je pro ně energeticky nejvýhodnější (druhý termodynamický zákon). Pokud se ale budou přibližovat nadále, tak začne celková potenciální energie systému prudce narůstat do obrovských hodnot. Pro dva atomy v jednom směru se toto dá vyjádřit grafem v rovině, pro dvě souřadnice atomů už je potřeba 3 dimenzionální prostor a pro více počet dimenzí narůstá. Právě kvůli počtu atomů v enzymech, což je v řádech tisíců, je pro určení potřeba spočítat energie obrovských množství konformací, a tak je potřeba i mnoho dimenzí (odtud mnohodomenzionální). (Wolynes et al., 1996)

Enzymy na svém povrchu tvoří tzv. **aktivní místa**, kde se vážou molekuly substrátů. Při povrchovém zobrazení enzymu, se často podobají jakýmsi tunelům či kapsám v enzymu, které jsou vytvářeny tak, aby se do nich mohly substráty navázat (**Obrázek 2.**; Trypsin s navázaným ligandem benzamidinem). V těchto komplexech se pak odehrávají důležité reakce. Zbytek struktury stabilizuje a dodává vhodné podmínky pro průběh reakce v aktivním místě. Tvar a elektrický náboj aktivního místa určují specifitu substrátů pro daný enzym (Robinson, 2015). Na enzymy se mohou navázat látky, které aktivní místa maskují, blokují či jinak brání navázání substrátu. Tyto molekuly se nazývají inhibitory a jsou předmětem návrhu mnohých léků, jelikož mohou třeba bránit nekontrolovanému bujení rakovinných buněk. Struktury enzymů se nahrávají do proteinové databáze PDB, kde jsou volně dostupné.

¹ Protein byl vystaven prostředí, ve kterém se všechny strukturní vazby přeruší, byl takzvaně denaturován (byl donucen zůstat ve formě řetězce). Potom byly tyto denaturující látky z prostředí pomalu odstraňovány a enzym znovu získal katalytické vlastnosti, z čehož vyplývá, že se zpátky složil do stejné struktury i přes to, že to dělal v prostředí rozdílném tomu nativnímu.



Obrázek 2. Povrchové zobrazení Trypsinu (PDB ID: 1H4W) s ligandem benzamidinem a bez ligandu, program ChimeraX. Obrázek připravil: Autor

1.3 Proteosyntéza

Princip, na kterém funguje produkce proteinů v laboratoři, je inspirován a založen na principu produkce proteinů v přírodě. Znalost tohoto principu je důležitá, jak pro pochopení metodiky, tak pro hlubší pochopení struktury enzymů. Proces tvorby proteinů v živých organismech se nazývá proteosyntéza.

Vše začíná u molekuly DNA, (**Obrázek 3.**) protože právě ta uchovává informace o výrobě proteinů. Má tvar dvojité šroubovice tvořené dvěma vlákny (jejich konce jsou často značeny 5' a 3' a jsou k sobě antiparalelní), které spolu drží díky nukleotidům. Nukleotidy jsou molekuly tvořené fosfátem, 2-deoxy-D-ribózou a dusíkatou bází. Právě v dusíkatých bázích a jejich vzájemné komplementaritě se skrývá důvtip přírody. DNA používá čtyři báze: Adenin (A), Thymin (T) jsou spojeny dvěma dusíkovými bázemi, kdežto Cytosin (C), Guanin (G) se vážou třemi. Komplementární znamená, že pokud je na jedné straně vlákna nukleotid s bází C, tak nukleotid naproti na druhém vlákně musí být G (**Obrázek 4.**) a dohromady spolu drží pomocí vodíkové vazby. Cytosin je komplementární ke guaninu a adenin k thyminu. Sekvence těchto nukleotidů v celé molekule DNA udává pořadí aminokyselin, ze kterých se protein bude skládat.



Obrázek 3. Schéma šroubovice DNA. Zdroj: Autor

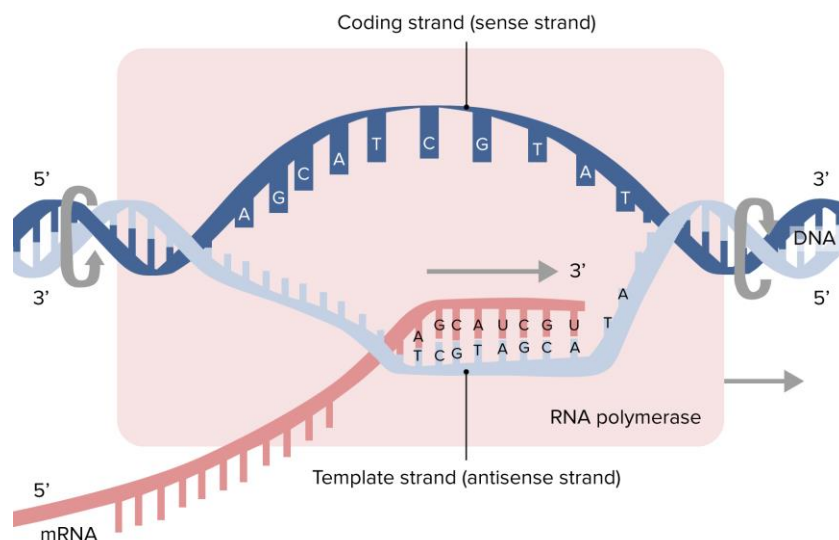


Obrázek 4. Schéma šroubovice DNA s barevně vyznačenými nukleotidy. Zdroj: Autor

Platí, že sekvence tří nukleotidů kóduje informace o jedné aminokyselině. Tyto trojice se nazývají **kodony** (také **triplety**). Problematické ale může být, že ne všechny organismy používají stejný kodon pro konkrétní aminokyselinu. Existují také speciální kodony, kterými jsou **start** a **stop kodon**, které signalizují, kde má řetězec proteinu začátek, a kde konec, což je často například; start: ATG, stop: TGA.

Příklad: sekvence CAG (cytosin, adenin, guanin) kóduje aminokyselinu glutamin, ale například pro některé řasy je glutamin kódován tripletem CAA (Keeling & Doolittle, 1996)

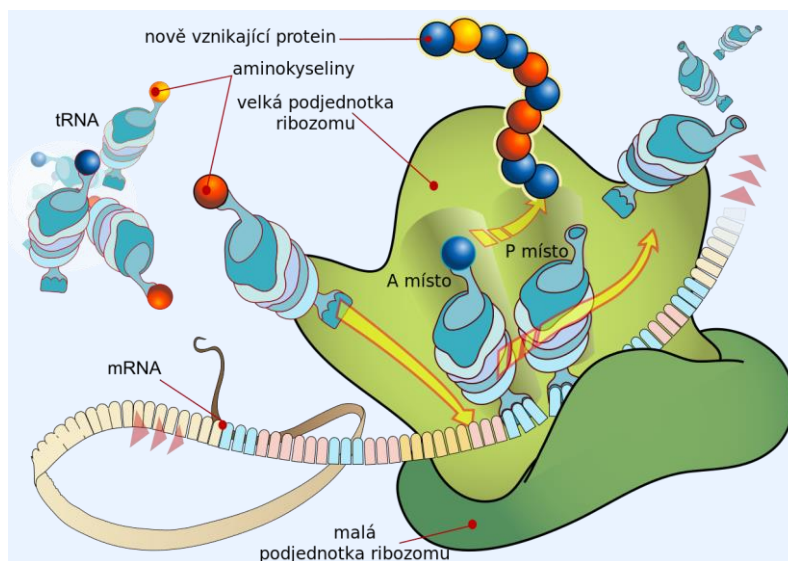
Jelikož DNA slouží k uchování informací, tak se proteiny nesyntetizují přímo kontaktem s ní. DNA je přepsána na základě komplementarity bází do RNA, která slouží jako předpis pro výrobu bílkovin. Tento postup (DNA>RNA>Protein) je nazýván Centrální dogma molekulární biologie a je klíčový pro všechny živé organismy. V jádře na DNA nasedne enzym (*RNA polymeráza*), který ji na daném místě „rozplete“ a vyrobí kopii části jednoho rozpleteného vlákna. Při tomto kopírování se komplementární báze k adeninu, tedy thymin, mění na uracil (U). Vzniká tak **mRNA** (*messenger RNA*), která je narozdíl od DNA, tvořena pouze jedním vláknem. Tento proces se nazývá **transkripce** (**Obrázek 5.**).



Obrázek 5. Transcription process and synthesis of mRNA. Schéma transkripce. Bledě růžový obdélník představuje RNA polymerázu pohybující se po vlákně. Zdroj: (Lecturio, 2021)

mRNA dále putuje z jádra do cytoplazmy, kde začíná proces zvaný **translace** (**Obrázek 6.**). Hlavní roli zde hrají **ribozomy** a **tRNA**. Ribozomy jsou makromolekulární objekty, které

nasedají na mRNA, jako dvě podjednotky (menší/větší, z obou stran), a slouží jako prostředek pro syntézu proteinů. Molekuly tRNA jsou typem RNA s danou strukturou, která putuje do ribozomů, a přináší aminokyseliny pro samotnou syntézu. Každá tRNA obsahuje takzvaný antikodon, kterým v ribozomu nasedá na komplementární kodon mRNA, tímto způsobem přinese správnou aminokyselinu. Aminokyselina v ribozomu zůstane, a spojí se peptidickou vazbou s další aminokyselinou, kterou přinese nová tRNA. Celý systém se pak posouvá po vlákně mRNA, dokud nenarazí na stop kodon. Během toho se na sebe aminokyseliny postupně vážou, vystupují z ribozomu a tvoří řetězec, který se pomalu skládá v nový protein. Ten se na konci uvolní a putuje na potřebné místo, podstoupí posttranslační úpravy, nebo začne vykonávat potřebnou práci. (Jelínek & Zicháček, 2014)



Obrázek 6. Schéma translace proteinu. Zdroj: (LadyofHats, 2011)

1.4 Serinové proteázy a jejich mechanismus

Enzym S01.A55, který je hlavním předmětem této práce, patří do skupiny serinových proteáz. Serinové proteázy jsou jednou z největších skupin, jelikož tvoří téměř třetinu všech proteolytických enzymů (Di Cera, 2009). Serinové proteázy se nachází ve virech, prokaryotických či eukaryotických organismech, kde se podílejí na mnoha důležitých procesech, jako například: trávení, imunita, srážlivost krve nebo apoptóza. Z chemického hlediska je jejich hlavní funkcí hydrolytické štěpení peptidických vazeb v řetězci mezi aminokyselinami (proto se nazývají proteolytické). Jméno jim dává aminokyselina serin, která zde slouží jako nukleofilní (poskytuje volný elektronový pár). Samostatný serin však není příliš reaktivní molekula, proto se v jeho blízkosti vyskytují i další dvě aminokyseliny, histidin a kyselina asparagová², které katalýzu proteolytické reakce umožní a stabilizují. Dohromady tyto tři aminokyseliny tvoří tzv. **katalytickou triádu**. V primární struktuře se ale

² Existují i výjimky, kde u serinových proteáz tvořily katalytickou triádu např. trojice Ser-His-Glu, His-Ser-His (Hedstrom, 2002)

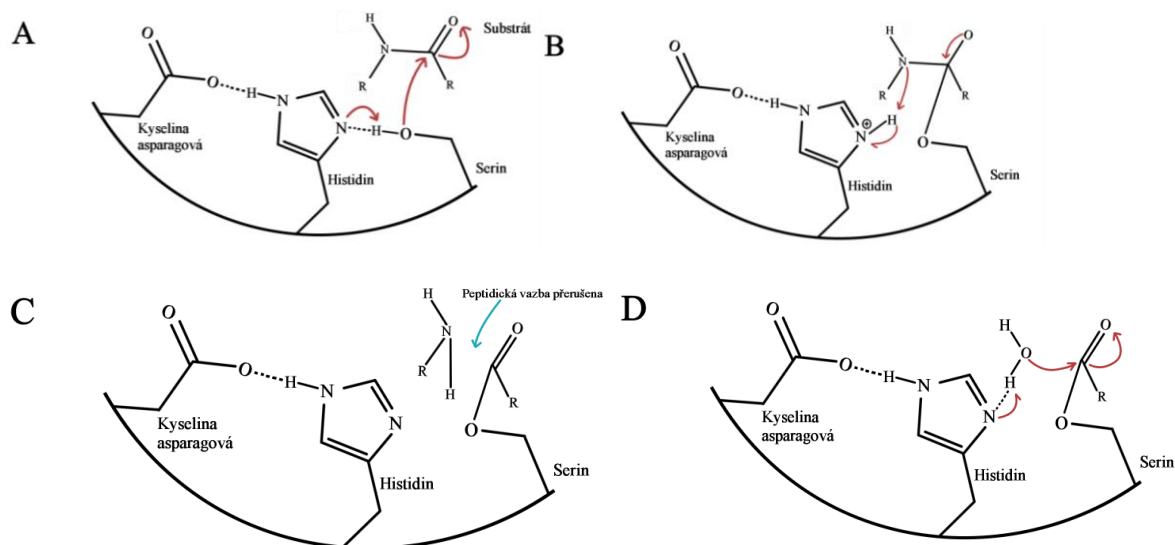
vůbec nemusí vyskytovat blízko sebe, což ukazuje, jak důležité je skládání proteinu, díky kterému se aminokyseliny dostanou do takové blízkosti/pozici, že spolu správně interagují.

Klasifikační systém databáze MEROPS, dělí serinové proteázy do 13 klanů a 40 rodin, podle specifity, sekvenční podobnosti nebo strukturní podobnosti. Enzym *S01.A55* patří do klanu PA (*Proteases of mixed nucleophile*), což je největší klan proteáz, které mají podobnou strukturu a reakční mechanismus podobný chymotrypsinu, i přes to, že jejich sekvenční podobnost může být malá. Tento klan ale netvoří pouze serinové proteázy, protože obecně jejich katalytická triáda může obsahovat, namísto serinu, cystein (proto „*mixed nucleophile*“). Podle toho se pak řadí do rodin S nebo C. Charakteristická je přítomnost dvou „barelů“ z β -skládaných listů (listy jsou prostorově uspořádány do jakýchsi válců) (**Obrázek 7.**). Aktivní místo obsahuje substrátově specifickou kapsu a katalytickou triádu nacházející se mezi těmito dvěma barely.



Obrázek 7. Znárodnění barelů z β -skládaných listů (růžově) PA rodiny proteáz (PBD ID: 1FXV) pomocí programu ChimeraX. Obrázek připravil: Autor

Katalytický mechanismus serinových proteáz je závislý na nukleofilním serinu. Ten ale sám osobě příliš reaktivní není, a proto je z jeho alkoholové skupiny OH uvolněn vodíkový kation a na molekule serinu zůstává záporně nabitý anion kyslíku. Onen vodíkový kation zachytí histidin pomocí reaktivního dusíku, ten je reaktivní, protože druhý dusík histidinu sdílí vodíkovou vazbu s kyselinou asparagovou, což celkově ovlivní elektronovou hustotu a umožní vytvoření aniontu kyslíku (Dr. G, 2019). Ten už je reaktivní a působí na karboxylovou skupinu substrátu (místo štěpení) (**Obrázek 8A**). Na ní přerušuje dvojnou vazbu s kyslíkem a vzniká další aniont kyslíku, zároveň však dusík, který je na tuto karboxylovou skupinu navázán, váže vodík odtrhnutý histidinem od serinu (**Obrázek 8B**), což způsobí roztrhnutí vazby mezi karboxylovou a amidovou skupinou (**Obrázek 8C**). Do prostoru reakce se pak dostane molekula vody a probíhá hydrolýza (**Obrázek 8D**), která na karboxylovou skupinu naváže alkoholovou a vrátí serin do původního stavu. Kvůli vzniku kyslíkových aniontů, obsahuje aktivní místo často také „oxianionovou“ kapsu, která reakci stabilizuje. (Hedstrom, 2002)



Obrázek 8. Schéma znázorňující mechanismus serinových proteáz. Černá křivka schématicky zobrazuje hlavní řetězec enzymu. Schéma připravil autor pomocí programu Krita.

2 CÍLE

Mezi hlavní cíle této práce patří: (I.) Příprava expresního vektoru, pro rekombinantní produkci tohoto enzymu, (II.) produkce rekombinantního proteinu v bakteriích (III.) purifikace získaného enzymu, (IV.) provedení bioinformatické analýzy, týkající se hlavně predikce struktury a porovnání programů (AlphaFold, Phyre2), (V.) srozumitelně popsat metodiku a její princip neodborné veřejnosti.

Obsahově se práce skládá nejdříve z části teoretické, tedy cíl V., pro uvedení problematiky pro čtenáře s minimálními, až žádnými znalostmi oboru. Zbytek práce se už bude zabývat samotným výzkumem.

3 PRINCIPY A FUNGOVÁNÍ METOD

3.1 Příprava expresního vektoru

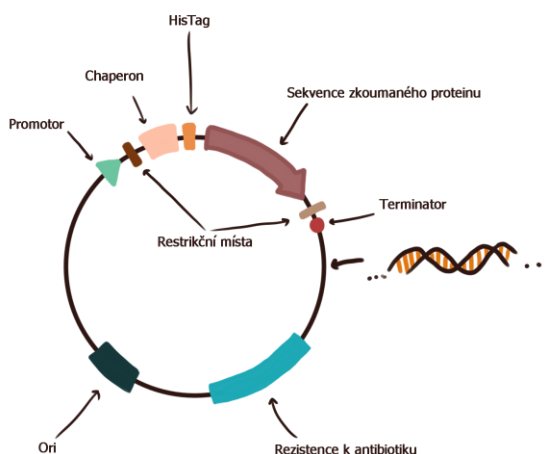
3.1.1 Expresní vektor a gen

Již jsem zmínil, že enzym bude produkován bakterií po poskytnutí „návodu“. Tento návod se dá obecně nazvat jako expresní vektor či expresní plazmid. Plazmid je menší kruhová molekula DNA schopná replikace. Plazmidy jsou typické hlavně pro bakterie a doplňují je o nějaké vedlejší vlastnosti, které mohou být často nezbytné pro přežití, jako například rezistence k antibiotikům. Bakterie si plazmidy mezi sebou předávají pomocí konjugace, což je tzv. horizontální přenos genů. Jelikož se jedná o menší molekulu, dobře se s ní pracuje, a s pomocí nástrojů molekulární biologie lze připravit specifické plazmidy s požadovanými

vlastnostmi, či geny. V našem případě byla použita kostra komerčního plazmidu, do které byl vložen gen kódující S01.A55 serinovou proteázou.

Jak takovému plazmidu rozumět a případně ho navrhnout? Níže se budu zabývat pouze plazmidy, které se využívají pro produkci proteinů v bakteriích. Každý plazmid obsahuje místo, na které nasedá replikační enzym a celý plazmid zkopíruje, což bakterie přirozeně využívají například při rozmnožování pomocí dělení nebo samotné replikaci. Toto místo se značí *ori* (od *origin*) a znamená replikační počátek. Dále je nezbytná schopnost **rezistence k antibiotikům**, takže pokud plazmid bakterie přijmou, tak v prostředí antibiotik vyrostou jenom ty bakterie, které se proti antibiotikům umí bránit, tudíž nám umožňují pozitivní selekci (výběr bakterií, které plazmid přijmou). Příkladem používaných antibiotik může být třeba kanamycin, ampicilin a chloramfenikol, ale záleží na typu použitého plazmidu. Rezistence samotná však k donucení transkripce genu v chtěný protein nestačí, jelikož by se v plazmidu využil pouze gen pro rezistenci a zbytek nikoliv, proto se do plazmidu umístí i sekvence promotorů. To jsou počáteční úseky genů, které signalizují, kam mají nasedat proteiny, které budou následně vytvářet mRNA určité sekvence. Jeden z nejčastěji používaných je T7 promotor, na který nasedá T7 RNA-polymeráza – pocházející z bakteriofága (virus infikující bakterie *Escherichia coli*). T7 promotor je využíván kvůli své vysoké specifitě a vlastnostem, protože transkripce genů pod T7 promotorem je citlivá na laktózu. Když se k bakteriím potom přidá laktóza, nebo látka která je jí podobná, tak se spustí mechanismus transkripce počínaje u T7 promotéru a genu který je za ním (**Obrázek 9**). V laboratoři se jako „spouštěč“ často používá látka IGPT (*Isopropyl β-D-1thiogalactopyranoside*) (Francis & Page, 2010). Přidávat lze i geny kódující fluorescenční proteiny, což se dá využít například ve fluorescenční mikroskopii. Často se s fluorescenčními GMO organismy lze setkat také v médiích, jako například při výrobě světélkující zmrzliny, piva či dokonce laboratorní myši. (The Thought Emporium, 2021)

K samotnému genu taky lze přidat různé pomocné prvky, které usnadní purifikaci, nebo správné složení proteinu. Pro purifikaci se často využívá histidinová kotva (známá jako HisTag). Ta je tvořena několika molekulami histidinu (nejčastěji 6-10), které se přidají na N – nebo C – konec proteinu. Specifických afinitních vlastností lze pak využít pro izolaci proteinu. Pro správné složení požadovaného proteinu lze využít látky zvané chaperony. Jedná se vesměs o menší proteiny, které svým způsobem skládání napomůžou skládání hlavních proteinů, na které jsou napojené (více v kapitole o bio infromatické analýze). V neposlední řadě zbývá přizpůsobit sekvenci plazmidu i genu tak, aby se správně spojily. To záleží především na restrikčních enzýmech, které štípou pouze konkrétní sekvence, takovým způsobem, aby se byly schopny napojit na jinou specifickou sekvenci. Následuje příprava genu, ve vhodném množství. (Francis & Page, 2010)



Obrázek 9. Schéma plazmidu s vyznačenými a popsány hlavními částmi. Sekvence proteinu ve tvaru šipky vyznačuje směr transkripce. Dvojitá šroubovice pouze poukazuje na reálný vzhled plazmidu. Zdroj: Autor

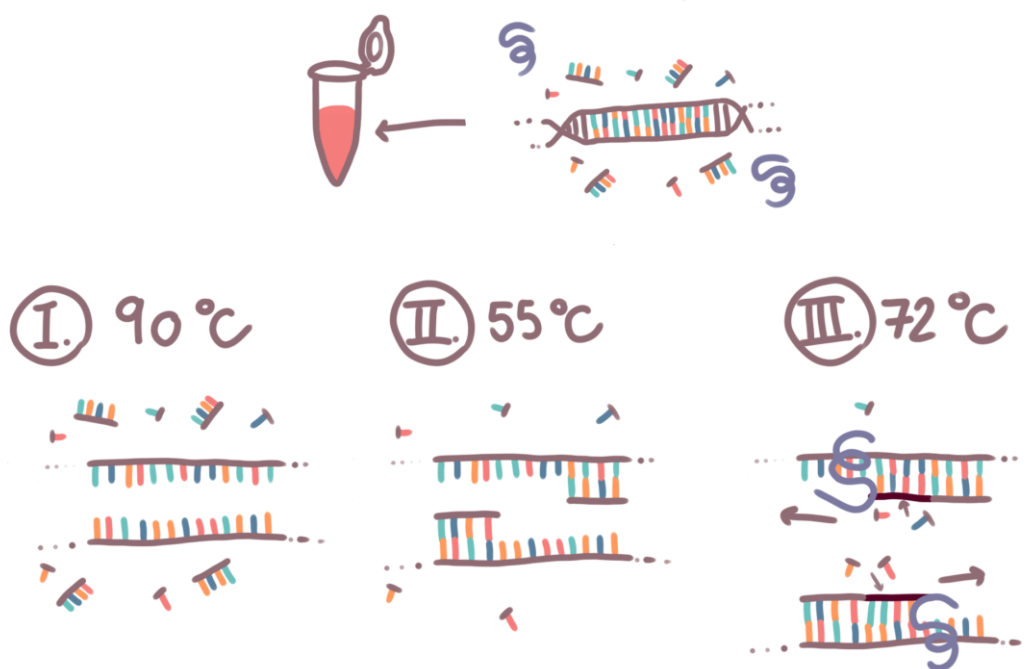
3.1.2 PCR

PCR neboli polymerázová řetězová reakce, umožní si vybraný gen amplifikovat (namnožit). Gen si sice můžeme objednat a nechat doručit v nějakém plazmidu, ale ten nemusí vždy vyhovovat podmínkám, či organismům, ve kterých je produkce proteinů plánovaná. Proto je potřeba připravit si plazmid vlastní, a to sice tím způsobem, že se z objednaného plazmidu amplifikuje specifická sekvence, která se potom vloží do nového plazmidu pomocí reakce ligace (spojovací). Tyto spojovací procesy jsou už komplikované chemické reakce, pro jejichž procesy je potřeba přesných koncentrací, a tak je důležité amplifikovat si chtěný gen. Často platí, že čím větší množství a koncentrace, tím lépe, protože vše lze následovně naředit.

PCR funguje na principu měnění teploty a komplementarity nukleotidů. Je vytvořen roztok, který obsahuje **primery**, nukleotidy a DNA polymerázu (syntetizuje novou DNA). Primery jsou krátké úseky DNA, které jsou vytvořené tak, aby komplementárně nasedly na specifický úsek DNA, a celkově tím vymezily úsek, který se bude „kopírovat“. Jsou potřeba dva; forward a reverse, jelikož DNA má dvě vlákna, každý primer potom nasedá na jedno vlákno, a DNA polymeráza od toho místa začne DNA doplňovat a tím vytvoří kopii. První fáze PCR se nazývá denaturace, během které se zvýší teplota na 90 °C, tím se přeruší vodíkové můstky mezi nukleotidy a dvě vlákna DNA se oddělí. DNA polymeráza tuto teplotu přežije, protože je teplotně velice odolná (izolována z termofilních organismů). V druhé fázi na vlákna nasednou primery, tato fáze se nazývá annealing a potřebná teplota pro správný průběh se pohybuje v rozmezí přibližně 40-65 °C a záleží na nukleotidovém složení primerů. V třetí fázi nasednou vedle 3' konce primerů DNA polymerázy, a začnou zbytek vlákna doplňovat (vytvoří komplementární vlákno). Ideální aktivační teplota enzymu je tady zhruba 72 °C, ale může se lišit podle typu použité polymerázy (**Obrázek 10.**). Toto je první cyklus, ale v něm ještě není úsek zcela vymezen, dá se říct, že pouze z jedné strany. Pro plné vymezení genu je

teda potřeba dvou cyklů, které už vymezí i druhou stranu. V dalších cyklech už se gen amplifikuje s exponenciálním nárůstem kopií. PCR má 30 i více cyklů. Přesné teploty nasedání primerů se ale mohou lišit, existují však metody, které je vypočítají teoreticky, nebo se zkrátka musí ozkoušet experimentálně. Proto se PCR provádí většinou při několika různých teplotách zároveň (gradientová PCR), aby se zjistilo, kdy se gen kopíruje nejvíce nebo jestli se vůbec kopíruje. Výsledek PCR se ověří pomocí metody zvané gelová elektroforéza. (Silverman, 1988)

PCR má velké využití pro analýzu a medicínskou diagnostiku, což jistě neujde mnoha lidem, kteří zažili pandemii COVID-19, kde byl tento pojem popularizován v souvislosti s testováním, na tuto nemoc. V testování na tuto nemoc by k již popsanému postupu stačilo přidat pouze jeden krok. Tím je přepsání virové RNA do cDNA (RNA doplněná o komplementární nukleotidy) pomocí specifického enzymu. Následovně už je princip stejný. Kvůli citlivosti a rychlosti se ale v oblasti diagnostiky používá spíše metoda real-time PCR, kde se množství amplifikované sekvence v každém PCR cyklu měří pomocí intenzity emitovaného fluorescenčního záření, které je k sekvenci dodáno ve speciálním primeru, nebo barvivu. (Biology with Animations, 2020)



Obrázek 10. Schéma zobrazující fungování PCR. I. Vysoká teplota rozdělí vlákna DNA, II. Primery nasednou na komplementární místa (ty jsou zde vyobrazeny ve formě RNA, ale v realitě jsou to úseky DNA, které se při 1. fázi rozdělí), III. DNA polymeráza doplní nukleotidy. Schéma nakreslil autor.

3.1.3 Elektroforéza DNA

Metoda, která umožní analýzu sekvence DNA podle její velikosti, se nazývá gelová elektroforéza. Když si znovu představíme šroubovici DNA, tak nukleotidy dohromady drží cukry a fosfátové skupiny, které jsou orientovány směrem ven. Fosfátové skupiny jsou

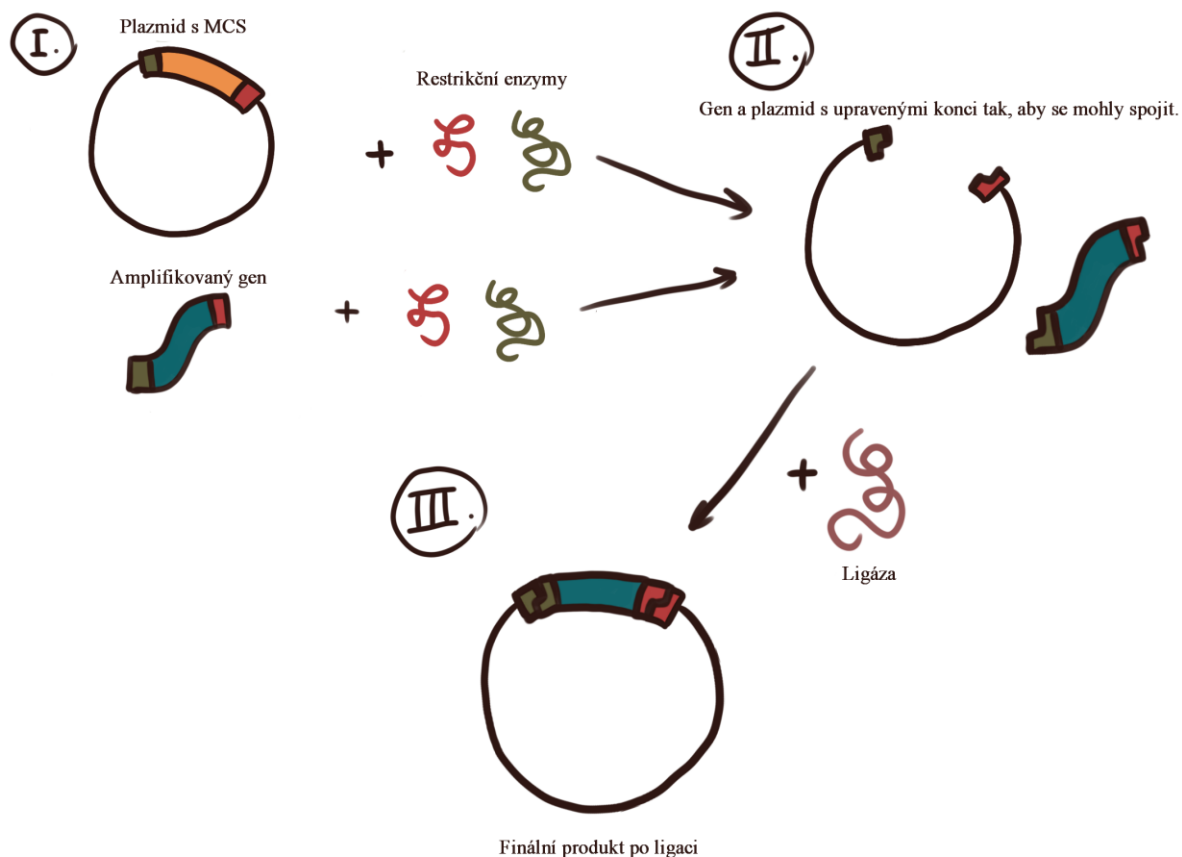
záporně nabitě, a díky tomu je celkový náboj DNA záporný. Toho se dá využít pomocí jednoduchého fyzikálního faktu, a to sice, že souhlasně nabité náboje se odpuzují, takže pokud bude DNA umístěna k zápornému zdroji elektrického proudu, tak se začne pohybovat směrem ke kladnému (neboli směrem od záporného). Nyní už zbývá jenom prostředí, ve kterém se DNA bude pohybovat, a na základě nějakého složení se v něm bude pohybovat pomalu nebo rychleji. Tímto prostředím, je gel z agarózy. Agaróza je polysacharid, takže gel z něj bude tvořen převážně různě orientovanými vlákny, připomínající například křoví. Ještě k tomu je nenabitý. Nechá-li se nyní gelem vést elektrický proud, a zároveň jsou v něm přítomny fragmenty DNA, tak rychleji se gelem provlečou krátké úseky DNA a pomaleji ty dlouhé. Když se tyto fragmenty zároveň obarví, speciálním barvivem, které neovlivní délku šroubovice, tak pod UV světlem, jsou pak viditelné takzvané „**bands**“ neboli proužky (obrázky viz. kapitoly v praktické části), které jsou podle velikosti fragmentu na gelu rozmístěny a dají se srovnat se vzorkem, který obsahuje fragmenty o definované velikosti (těmito referenčním fragmentům se říká **Ladder**). Jelikož sekvence, se kterou jsem pracoval, má známou velikost, tak ji lze porovnat, a zjistit její přítomnost. Efektem a možná i výhodou je, že výsledek je pozorovatelný pouhým okem. Z praktického hlediska se do gelu udělají, při jeho formaci, hřebínkem jamky. Gel je potom ponořen do pufru, který umožní vést elektrický proud. Do jamky se potom umístí vzorky smíchané s barvivem, které umožňuje sledovat průběh elektroforézy a zároveň díky nižší hustotě nedovolí vzorkům, aby unikly difuzí.

DNA se při této metodě ani nemusí nijak poničit, a z gelu se dá znovu izolovat. Velikosti genů se většinou udávají v kilobázích, kde kilo báze je ekvivalent 1000 párů nukleotidů. (Silverman, 1988)

3.1.4 Restrikční reakce

Po amplifikaci genu ho už jen stačí vložit do plazmidu a může se s ním začít pracovat v buňkách. Aby se ale mohl do vektoru vůbec vložit musí se upravit, pomocí restrikčních enzymů, které se vážou na konkrétní sekvenci DNA, kterou ustříhnou na konkrétním místě a vytvoří specifické konce. Tato konkrétní sekvence se vloží na primer, čímž si zaručíme místo štípání na amplifikovaném genu. Pro úpravu konců genu a plazmidu se použijí dva enzymy. Každý štípně gen i plazmid na jednom místě, a tím si zaručíme definovaný způsob vložení genu do plazmidu pomocí komplementárních konců (tzv. sticky ends), které pak dohromady do sebe zapadnou jako „puzzle“ (**Obrázek 11.**). Výběr těchto enzymů je závislý na dvou faktorech: (a) na sekvenci genu, se kterým pracujeme, jelikož by se mohlo stát, že by enzym přestříhl gen třeba na dvou místech nebo naopak vůbec; (b) laboratorní plazmidy obsahují místo označované jako Multiple cloning site (MCS), které obsahuje sekvence pro různé restrikční enzymy, pomocí nichž můžeme gen do plazmidu vložit. Restrikční enzymy sice plazmid rozdělí, ale ten se může znovu spojit dohromady, a proto je k plazmidu poté ještě přidán rSAP enzym (Shrimp alkaline phosphatase), který zabrání, opětovnému spojení plazmidu, tak že upraví jeho konce, aby se nemohly spojit (reakce defosforylace). (Silverman, 1988)

V dalším kroku, se gen i plazmid ještě purifikují (vyčistí), protože obsahují reaktanty z předchozí restrikční reakce. K tomu se používá komerčně dostupných kitů. Na závěr se u obou ještě změří koncentrace pomocí spektrofotometru.



Obrázek 11. Schéma vyobrazující restrikční reakci. I. Plazmid a gen jsou upraveny restrikčními enzymy (Barvy enzymů na obrázku korespondují s konci, které upravují. Probíhají oddělení). II. Upravené produkty. III. Ligace (viz následující kapitola). Schéma připravil autor.

3.1.5 Ligace

Gen a vektor je potřeba už jenom spojit. Sice jsou už upravené, aby do sebe nasedly, ale samy to nezvládnou, a proto je potřeba katalyzátor. Tímto katalyzátorem je enzym zvaný DNA-ligáza. Ligázy mají funkci spojování molekul, v tomto případě spojuje úseky DNA. V přírodě je to potřeba například kvůli opravě a replikaci genů. Přípravou roztoku obsahujícího vektor, gen, ligázu a buffer, který je potřeba pro fungování enzymu, se započne reakce, která gen a vektor spojí a vytvoří kruhový plazmid. Vše je potřeba namíchat ve správném molárním objemu, a nechat ve vhodné teplotě proběhnout. (Silverman, 1988)

Nastává ověřovací krok (kapitola Kolony PCR), který odhalí, které bakterie plazmid přijaly a jestli byl gen do plazmidu vůbec správně vložen (kapitola Miniprep a sekvenace). Přece jen jeho přípravě předchází poměrně velké množství složitých reakcí, kde se toho přirozeně může i hodně pokazit a vedle správných plazmidů vznikají i špatné, které by ohrozily výsledky

celého projektu. Takové komplikace mohou být třeba mutace nebo plazmidy, do kterých se gen ani nedostal. Ověření probíhá pomocí sekvenační reakce, kdy dojde k přečtení nukleotidové sekvence genu a plazmidu. Na základě výsledků tohoto kroku, už si lze namnožit ten správný plazmid (kapitola Maxiprep). To se nebude dělat pomocí PCR, ale přímo v bakteriích, a do těch je třeba plazmid nejdříve vložit.

3.1.6 Transformace

Transformace je proces, při kterém se do bakterií, vkládá plazmid. Plazmid lze do bakterií vkládat dvěma způsoby: (a) pomocí elektrického proudu (elektroporace); (b) pomocí náhlého, krátkého zvýšení teploty pomocí teplé vody (většinou 42 °C) (tzv. heatshock). V obou případech dojde k vytvoření pórů/otvorů v buněčné stěně bakterií a molekuly plasmidu se dostanou dovnitř pomocí difuze. Potom je přidáno médium, které obsahuje všechny potřebné živiny, a buňky se ve vhodném prostředí nechají zregenerovat (37 °C).

Následuje rozetření bakterií na plotny, které obsahují antibiotikum. Buňky se na plotny roztírají z důvodu selekce, abychom izolovali jednotlivé buněčné klony. Bakterie se na nich přes noc nechají narůst v teplotě 37 °C. Na plotnách se poté objeví malé kolonie bakterií, které plazmid převzaly (většinou vypadají jenom jako malé bílé tečky, ale pokud plazmid obsahuje třeba návod pro výrobu karotenu, tak by byly oranžové). Špičkou, nebo nějakým jiným sterilním předmětem, se kolonie setře a vhodí znovu do kapalného média, kde se bakterie namnoží, aby se s nimi dalo pracovat ve formě směsi a analyzují se na přítomnost požadovaného genu pomocí kolony PCR. (Invitrogen, 2010)

3.1.7 Kolony PCR

Na plotnách se objeví kolonie bakterií, které převzaly plazmid. Otázkou ale je, jestli plazmid obsahuje požadovaný gen, což odhalí Kolony PCR. Vybrané množství kolonií se setře špičkou a vymáchá ve sterilní vodě. Potom se špičkou na novou plotnu nanese bakterie organizovaně (například špičkou s bakteriemi udělat křížek), aby se po ověření vědělo, která kolonie je která, a mohlo se s nimi rovnou pracovat. Ze všech odebraných směsí se pak udělá PCR a její výsledek se vyhodnotí pomocí agarové elektroforézy. Kolonie, které plazmid převzaly se setrou špičkou a nechají růst přes noc v kapalném živném médiu při 37 °C na třepačce. Plazmidy se z pozitivních kolonií (Miniprepů) izolují pomocí komerčně dostupných kitů. Cílem je získat čistý plazmid bez bakteriální DNA.

3.1.8 Miniprep a sekvenace

Ze živného média, kde narostla vybraná kolonie bakterií s plazmidem je odebráno několik mililitrů (v řádu jednotek) do „ependorfky“ (malá zkumavka o objemu typickém 1,5ml s bezpečným uzávěrem). Směs se stočí v centrifuze, čímž se oddělí bakterie, které se usadí do spodní části ependorfky ve formě peletu, od supernatantu (tady živné médium). Supernatant se vylije a k peletu se postupně přidávají pufrý, které nejprve zničí buněčnou stěnu a následně denaturují buněčné proteiny a chromozomovou bakteriální DNA. Stáčením se oddělí

rozpustná (zejména plazmidová DNA) část od nerozpustné (precipitované proteiny a DNA). Potom se rozpustná část, za pomoci speciální malé zkumavky s filtrem (membrána s oxidem křemičitým), nechá pomocí centrifugace postupně profiltrovat. Stejným způsobem se potom filtr promyje pomocí pufrů. Do filtru se navážou všechny plazmidy. V posledním kroku se do zkumavky s filtrem přidá voda, v centrifuze se stočí, čímž dojde k uvolnění plazmidů z filtru. Koncentrace a jeho čistota se změří pomocí UV spektrofotometru. Čistý vzorek o definované koncentraci se posílá komerční instituci, která zvládne sekvence na zakázku přečíst. Potřeba je jen všechno dobře popsat a označit. Když se dostaví výsledky, tak se porovnají s původním návrhem plazmidu a vyberou se pouze ty kolonie, které převzaly ten opravdu správný. Plazmid je tedy na dosah ruky a nezbyvá nic jiného než si ho vyrobit do zásoby ve větší koncentraci pro použití v experimentech.

3.1.9 Maxiprep

Z plotny, na které byly organizovaně rozetřené kolonie, se setře ta, která se po sekvenaci ukázala být vhodnou. Vybraná kultura se znovu nechá narůst v živném médiu, pouze to bude celé ve větším objemu (okolo 200 ml). Podobné to bude i s izolací plazmidu z bakterií. Používá se k tomu větší vybavení a odlišný způsob filtrace, která se musí provést gravitačně, a ne v centrifuze, tudíž je to i časově náročnější způsob. Přirozeně bude i ve vyšší koncentraci než u miniprepu. Znovu se změří jeho koncentrace a plazmid se uskladní do obvyčejného mrazáku.

Celkový doposud popsaný proces se označuje i jako **klonování**.

3.2 Exprese

Proces, ve kterém začnou bakterie produkovat protein.

3.2.1 Pilotní exprese

Pilotní exprese je jeden z principiálně nejzásadnějších kroků zkoumání produkce proteinu. V tomto procesu dojde k odhalení podmínek, při kterých požadovaný protein vzniká a jaké bakterie ho zvládnou vyrobit. Vyberou se různé typy bakterií, do kterých je následně transformován plazmid. Znovu se nechají narůst, selektivně se odeberou z plotny a přes noc nechají narůst v živném médiu. U takto narostlé kultury se budou následovně testovat podmínky pro produkci žádaného enzymu. Mezi sledované faktory patří teplota, čas a přítomnost látky³, která expresi proteinu vynutí. Cílem je dosáhnout vhodné kombinace těchto faktorů tak, aby produkce proteinu byla nejvýhodnější. Z tohoto důvodu se směs s narostlou kulturou rozdělí do více zkumavek podle počtu testovaných možností, aby mohla být stejná kultura vystavena různým podmínkám. Bakterie se po rozdělení ještě nechají růst, dokud nedosáhnou ideální **OD₆₀₀** (optical density, 600 nm), což je faktor, který ukazuje, jak hustě

³ Zde byla jako „spouštěcí“ látka použita IPTG (*Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside*), která je i důvodem použití T7 promotéru.

jsou bakterie obsaženy v kapalině. Nejvhodnější hodnoty, pro započnutí exprese jsou OD₆₀₀ kolem 0,5 - 0,8. Při této hodnotě se bakterie *E. Coli* nachází v exponenciální fázi růstu, a tudíž při produkci nebudou ničím limitovány. Zároveň je odebrán referenční vzorek, který nám umožní monitorovat proteinový profil bakterií před začátkem produkce požadovaného proteinu.

Po přidání látky umožňující produkci požadovaného proteinu se monitoruje množství vyprodukovaného proteinu v různých experimentálních podmínkách. Po daných časových úsecích je z každé směsi odebrán malý vzorek (standartně 1ml), který se stočí na centrifuze, čímž se oddělí pelet (bakterie) od supernatantu (živné médium) a pelet se zamrazí. Zajímavé je pozorovat pelet, který se s pozdějším časem odběru logicky zvětšuje, pokud mají bakterie vhodné podmínky. Právě tímto způsobem lze získat vzorky, které se budou lišit podle experimentálních podmínek ovlivňujících produkci (dané časové úseky, různé teploty a přítomnosti látky umožňující produkci proteinu).

Nyní je potřeba si uvědomit, že mohou nastat různé scénáře. A to sice, že bakterie mohla enzym vyrobit správně a mohl by tak být rozpustný v prostředí cytoplazmy a vody. Nebo se mohlo stát, že bakterie ho z jakéhokoliv důvodu odmítne vyrobit či složit (vložený enzym není nativní, nebo se špatně složí...) a uzavře ho do tzv. **inkluzních tělísek**, což je útvar, do kterého bakterie ukládají nepotřebné látky, jež často mohou být právě špatně složené nebo nežádoucí proteiny (Singh et al., 2005). Proteiny uložené v inkluzních tělískách lze izolovat, ale potom je třeba ho ještě laboratorně správně složit, což není jednoduchý proces a celý postup to komplikuje (Bollag et al., 1996). Bakterie se nejdříve musí „rozbít“, abychom mohli oddělit látky rozpustné (proteiny v cytoplazmě) a nerozpustné, čehož se docílí centrifugací.

Rozbíjení bakteriálních buněk (lyze buněk/bakterií) u pilotní exprese se provádí pomocí opakovaného zmrazování v tekutém dusíku a tání. Odebrané pelety se nejdříve rozpustí v pufru, potom se vhodí do tekutého dusíku a následně rozmrazí při teplotě 42 °C. Toto se provede celkem 3x, aby se bakterie opravdu rozbily. Bakteriální lyzát se následně stočí na centrifuze na vysokých otáčkách a tím se oddělí **rozpustná** (supernatant) a **nerozpustná frakce** (pelet) do ependorfe. V tomto kroku je už velké množství vzorků, takže je třeba dbát na správné popsání a organizaci. I tady ale může nastat problém. Ne vždy se frakce oddělí perfektně a může vzniknout jakýsi sliz, který se těžko odděluje. Jedním vysvětlením může být třeba přítomnost velkého množství chromozomální DNA bakterií, která na sebe „lepí“ nerozpustnou frakci. V tomto případě je možnost přidat k směsi enzym DNázu (deoxyribonukleáza), která chromozomální DNA naštípe, což by mohlo pomoci správnému oddělení při opětovném stočení v centrifuze.

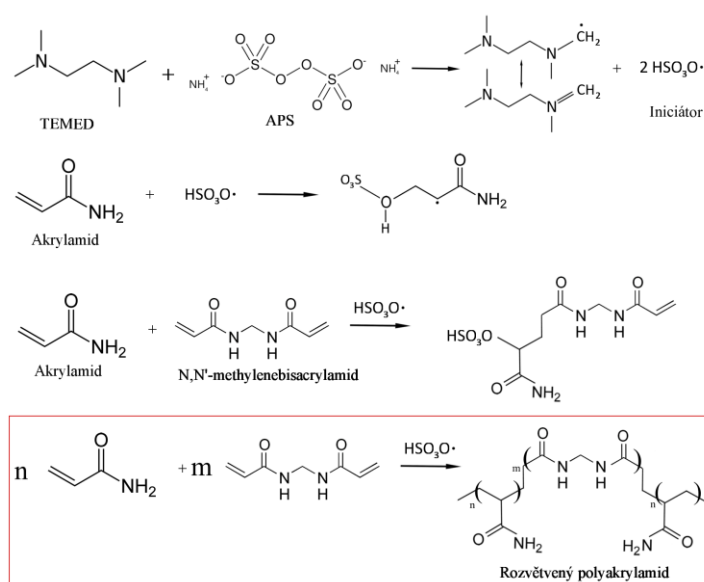
Rozpustné a nerozpustné proteiny jsou odděleny a zbývá je analyzovat. To se bude, podobně jako u DNA dělat pomocí velikosti na speciálním gelu. Ať už jsou ve frakcích proteiny složeny správně nebo ne, je potřeba je nejdříve všechny rozložit, aby se daly mezi sebou porovnávat podle délky řetězce aminokyselin. Ke vzorkům je přidán denaturační vzorkový pufr, β-mercaptoethanol (denaturační činidlo, které ve strukturách naruší pevné sulfidické můstky), dodecylsírán sodný (SDS, který proteinů udělí záporný náboj) a barvivo

(bromfenolová modř, která umožní sledovat průběh elektroforézy). Takto připravený vzorek se ještě nechá několik minut na 95 °C. Po tomto kroku jsou vzorky připraveny na elektroforézu. (Invitrogen, 2010)

3.2.2 SDS-PAGE elektroforéza

Proteiny se podobně jako DNA nechají prohnat gelem za pomoci elektrického proudu, aby se podle velikosti oddělily (jedná se spíše o hmotnost, ale ta je víceméně daná počtem aminokyselin. Uvádá se v kilodaltonech). Na rozdíl od DNA, kde gel je v horizontální poloze, tak SDS-PAGE je v poloze vertikální, a obecně je gel mnohem tenčí. Složitá je i jeho příprava, protože nestačí pouze agaróza, ale je nutno vyrobit ho polymerizací látky akrylamid, ve správných poměrech vůči velikosti proteinu (odvozené ze sekvence). Molekulárně má polyakrylamidový gel pravidelnou strukturu narozdíl od gelu agarového. Jeden gel ještě k tomu musí být složen ze dvou částí; první, ve které se vytvoří jamky musí být méně koncentrovaný, aby se vzorky při vedení proudem, stihly zarovnat, protože ne všude bude proteinů stejné množství, a ve druhé, která je už uzpůsobena velikosti zkoumaného proteinu.

Polymerizace akrylamidu se řadí mezi reakce iniciované radikálem (**Obrázek 12.**). Ten je vytvořen reakcí APS pufru (Ammonium persulfate) a TEMED (Tetramethylethyldiamin) činidla, které dohromady vytvoří hydrogensíranový anion, jenž „napadá“ molekuly akrylamidu, které jsou poté nuceny se v řetězcích vzájemně spojit. Pro síťování struktury tak, aby se mohly proteiny oddělit velikostně se přidává N, N'-metylenbisakrylamid, který rozvětví akrylamidové řetězce do pravidelných tvarů. Podle poměru těchto dvou látek lze regulovat schopnost gelu oddělovat proteiny velikostně. (Menter, 2000)



Obrázek 12. Reakční schéma syntézy rozvětveného polyakrylamidu pro přípravu gelu. V prvním řádku je popsán vznik radikálu, který iniciuje reakci. V druhém řádku je zobrazena propagace. V třetím řádku je znázorněno spojení akrylamidu a B-acrylamidu a v posledním samotná polymerizace. Zdroj: Autor (Program: Krita)

Gel se znovu zalije pufrem, který umožní vést proud a do jamek v gelu se umístí vzorky a ladder.

Př. Chtěli bychom pak odhalit podmínky produkce studovaného enzymu u jednoho genotypu bakterie *E. coli*, popsáním systémem by bylo zapotřebí 4 gelů, které by mohly být organizované následovně:

1. gel; teplota 30 °C, rozpustná frakce, sběry po 2, 4, 6 hodinách, přičemž ke každé hodině by byly dva vzorky: buď s přidanou látkou podporující expresi, nebo bez ní. + ladder
2. gel: 30 °C nerozpustná frakce + časové sběry, s a bez podpůrné látky, + ladder
3. gel; teplota 18 °C, rozpustná frakce, sběry po 3, 6, 24 hodinách, přičemž ke každé hodině by byly dva vzorky: buď s přidanou látkou podporující expresi, nebo bez ní. + ladder
4. gel: 18 °C, nerozpustná frakce + časové sběry, s a bez podpůrné látky, + ladder

Na gelech, ale nebude vidět výsledek hned a musí se vyvolat, podobně jako například fotografie z filmu. Gel je nejprve umístěn do fixing solution, která nechá gel „vyblednout“ a barvivo, které se přidalo do vzorků při jejich přípravě, tak zmizí. Potom je dvakrát umístěn do destilované vody za účelem propláchnutí a dále se umístí přes noc do barviva, které se naváže na proteiny fixované v gelu a zvýrazní je (podoba proužků). Znovu na gelech lze odlišit různé proteiny podle velikosti. Pokud je při nějakých podmínkách (teplota, čas) proužek výraznější než ostatní, je to v přítomnosti podpůrné produkční látky, a zároveň odpovídá požadovanému proteinu velikostně, tak se dá konstatovat, že se jedná o protein, jehož genová sekvence byla kolonována do plazmidu. Výsledek umožní rozhodnout, jaké podmínky nastavit bakteriím, pro produkci proteinu za dosažení velkého množství. Jedná se tak o silnou optimalizační metodu. Celkově je tato metoda velice využívána na jiné analytické studie proteinů a enzymů. (Bollag et al., 1996)

3.2.3 Western blot

Výsledky ale nemusí být vždy příliš výrazné. Protein může být produkován pouze v nerozpustné frakci a je potřeba si ověřit, jestli se nevyskytuje i ve frakci rozpustné (byť jen v malém množství). Pro citlivější detekci rekombinantních enzymů se používá právě western blotting (Yang et al., 2012). Nejprve se proteiny rozdělí podle velikosti pomocí SDS PAGE jako je popsáno výše. Z gelu po SDS elektroforéze se elektrickým proudem přenesou proteiny na membránu, která proteiny dokáže dobře navázat. Klíčová idea této metody tkví v protilátkách. V našem případě jsme využívali protilátek, které se navážou na HisTag v proteinu (primární). Následně se přidají ještě jedny protilátky (sekundární), které se navážou na předchozí protilátky. Tyto protilátky jsou spojené s křenovou peroxidázou. Po přidání specifického substrátu můžeme detekovat signál. Ještě před tím se ale musí membrána po nánosu proteinů z gelu tzv. blokovat. Je to kvůli tomu, že membrána váže všechny proteiny

včetně primárních imunoglobulinů (protilátek), které se mají vázat pouze na HisTag. Proto se po přenosu proteinů z SDS gelu membrána ještě nechá zablokovat umístěním do směsi s nějakými jinými dostupnými proteiny. To může být třeba i odtučněné usušené mléko rozpuštěné ve speciálním pufru. (Bollag et al., 1996)

3.2.4 Large scale produkce

Doslovný překlad názvu, produkce ve velkém měřítku, je dostatečně vypovídající. Bakterie se nechají narůst ve velkém množství a přizpůsobí se jim podmínky, podle výsledků z pilotní exprese. Bakterie se stočí v centrifuze ve větší nádobě, a rozpustí v pufru. V pilotní expresi by se buňky rozbíjely kapalným dusíkem, ale zde bude lýza probíhat pomocí vysokého tlaku za použití speciálního přístroje. Jím se nechá směs několikrát projít (2-3x), aby byl efekt dostatečný. Znovu jsou ve směsi dvě frakce: rozpustná a nerozpustná, které se oddělí pomocí centrifugace. V případě, že elektroforéza ukázala přítomnost proteinu v rozpustné frakci, tak se může vzít supernatant a přejít rovnou k purifikaci. Pokud by byl enzym uzavřen do inkluzních tělísek a ocitl se v nerozpustné frakci, je potřeba jej z nich nejdříve solubilizovat. V tomto případě je potřeba pracovat s usazeninou z centrifugace. Inkluzní tělíska se solubilizují v roztoku obsahující vysoké koncentrace chaotropních činidel, které naruší nekovalentní interakce proteinů. Následně se odstraní nerozpustná frakce centrifugací a supernatant se použije pro denaturační purifikaci. (Bollag et al., 1996)

3.3 Purifikace

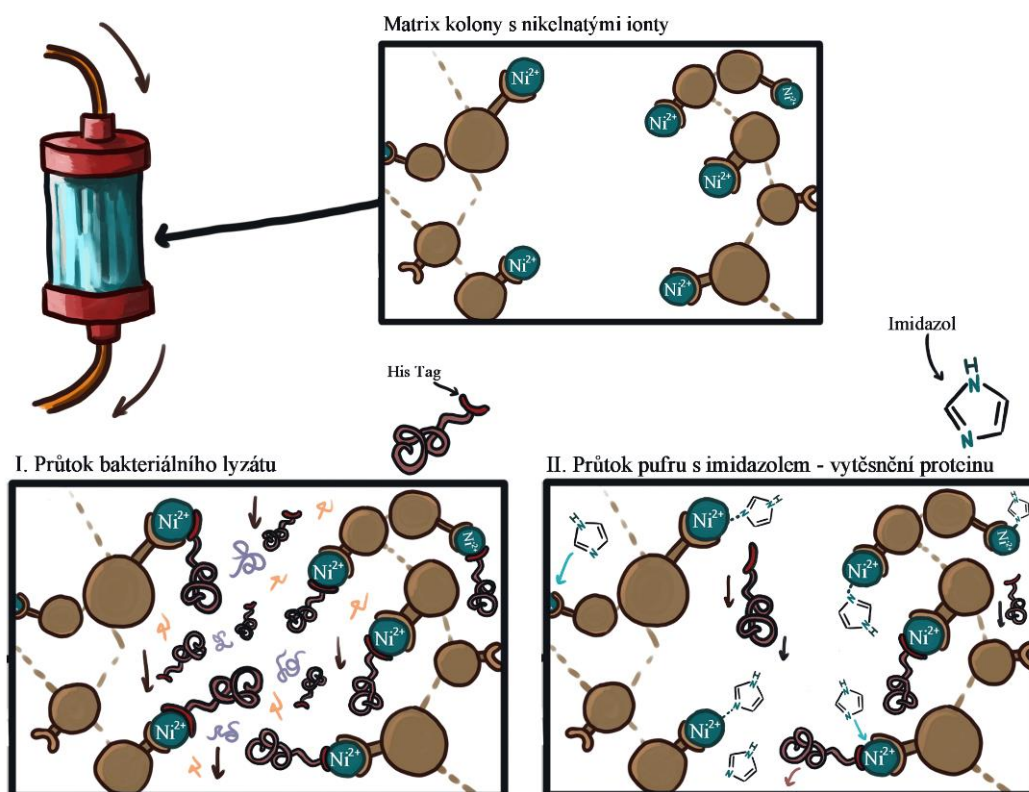
Nastává proces získání samotného enzymu pomocí procesu purifikace, což znamená získání proteinu v co největší „čistotě“ z bakteriální proteinové směsi. Metod, jak protein purifikovat je více, ale já budu popisovat pouze metodou jménem **afinitní chromatografie**. Je to hlavní důvod, proč se vůbec k původní aminokyselinové sekvenci přidával Histag. Využije se zde afinitních (schopnost vázat) vlastností histidinu vůči „filtru“ (odborně Kolona), která obsahuje ionty niklu Ni^{2+} , na které se histidinová kotva enzymu silně naváže a oddělí ho tak od ostatních proteinů ve vzorku.

Nejdříve je potřeba připravit vhodné pufrы. Ty se složením přizpůsobí zkoumanému proteinu a typu purifikace (nativní versus denaturační). Pro afinitní purifikaci potřebujeme dva pufrы: (a) ekvilibrační pufr, ve kterém se proteinová směs nanese na kolonu a (b) eluční pufr, který nám umožní uvolnit (eluovat) náš protein z kolony. V elučním pufru bude látka, která se na ionty v koloně bude vázat silněji (bude mít vyšší afinitu), než histidinová kotva a vytěsní tak protein, které se na kolonu navázal. Takovou látkou je třeba imidazol (byl použit i během tohoto výzkumu). Vytěsněná frakce by tím pádem měla obsahovat jenom zkoumaný protein. Purifikace může probíhat buď v nativních nebo denaturačních podmínkách. Složení pufrů pro tyto purifikace se liší přítomností denaturačního činidla (v tomto případě 6M močoviny), jinak je ale složení pufrů a průběh purifikace stejný.

K purifikaci proteinů se používá speciální zařízení, které míchá pufrы v požadovaných poměrech, prohání směs proteinů přes kolonu a sbírá frakce, které přes ní protekly. Zároveň

obsahuje velké množství senzorů, například pro elektrickou vodivost nebo absorpce UV, které umožní sledovat, kdy se protein nejlépe z kolony uvolní.

Když bakteriální lyzát proteče kolonou, tak se přes ní postupně začnou prolévat pufrý. Nejdříve se použije nízká molární koncentrace imidazolu (50mM), čímž se z kolony uvolní nespecificky navázané proteiny. Následně se bude koncentrace imidazolu graduálně zvyšovat až dosáhne svého maxima (1M). Je to kvůli tomu, aby byl protein izolován v co největší čistotě, protože na koloně se můžou nacházet další proteiny nesoucí histidinové oblasti ve své struktuře. S postupným zvyšováním koncentrace imidazolu se monitoruje UV absorpce a sbírají se jednotlivé frakce. Výsledek purifikace se vyhodnotí pomocí SDS-PAGE elektroforézy, čímž se zjistí, kdy se uvolnilo nejvíce proteinu z kolony. Toto zároveň, lze pozorovat i na hodnotách měření ze senzorů, které během purifikace počítač interpretuje grafem. Například u absorpce UV, lze pozorovat rostoucí hodnoty v závislosti na koncentraci imidazolu, a tak i pravděpodobné vytěšňování enzymu. Před další prací se vyhodnotí výsledek purifikace, a vzorky jsou buď dále purifikovány, nebo použity pro požadované účely. (Scopes, 1994)



Obrázek 13. Ilustrace zjednodušeného mechanismu purifikace. I. kolonou protéká bakteriální lyzát, což umožní proteinů s histidinovou kotvou navázat se na kolonu. Ostatní proteiny protečou, a tak na koloně zůstává pouze ten zkoumaný. II. Navázané proteiny vytěsní imidazol, který se na nikelnaté ionty váže silněji. Vytěsněný průtok se sesbírá, což ve výsledku ideálně přinese čistou směs s hledaným proteinem. Zdroj: Autor.

Stále zde uvádím jako jednu z možností stav, kdy se protein vyskytuje v inkluzních tělískách, v nerozpustné frakci a jeho purifikace probíhá v denaturačních podmínkách. Refolding je v podstatě opačný proces k denaturaci. Jednoduše se jedná o proces laboratorního složení

proteinu tak, aby nabyl svojí nativní struktury. Ale na rozdíl od denaturace je refolding obtížnější záležitost, jelikož stále ještě nikdo neví, jak přesně skládání proteinů funguje, takže laboratorní podmínky se těžko určují. Existuje však několik metod, které se často ukazují být efektivní.

Postupná dialýza (step down dialysis) je metoda, kdy je denaturovaný protein po purifikaci zpětně složen pomocí postupného snižování koncentrace denaturačního činidla. Aparatura obsahuje dialyzační membránu, která má přesně definovanou velikost pórů a propouští proteiny pouze do určité velikosti, dále už jenom nádobu, do které se membrána se směsí proteinů vloží a zalije se denaturačním pufrém. Při stále teplotě 4 °C se pak pufr z dialyzační nádoby po částech vylívá a postupně doplňuje pufrém, přizpůsobeným pro nativní podmínky proteinu, až do doby, než ho úplně nahradí. Ve střívku se poté mohou objevit precipitáty, které se ze směsi oddělí centrifugací, což by mělo vyústit v získání čistého, nativního enzymu. Horší tedy je, když se precipitát ukáže být zkoumaným proteinem. V takovém případě se zkrátka musí znovu zkusit refolding, ale například při jiných podmínkách a za použití jiných pufrů, či s přidavkem nějakého podpůrného činidla. (Bollag et al., 1996)

4 MATERIÁLY A METODY (PRAKTICKÁ ČÁST)

4.1 Materiál

Gen v plazmidu typu pASK37+ kódující enzym S01.A55 převzatý z genomu bzučivky zelené (*Lucilia sericata*) s optimalizovanými kodony pro produkci v *E. coli*, byl objednan u společnosti Eurofins Scientifics (Praha, ČR).

4.2 Klonování do pET28a-SUMO

4.2.1 Design primerů

Pro amplifikaci genu pomocí PCR byly podle sekvence a restrikčních enzymů navrženy primery. Syntetizovány a dodány byly společností Generi Biotech, s.r.o (Hradec Králové, ČR). Sekvence s tučně vyznačenými místy pro restrikční enzymy jsou znázorněny v tabulce (Tabulka 2.).

Primer	Sekvence	Klonovací vektor	Restrikční enzym
197- L.ser_S01.A55_SUMO-F	ATGGTA GGTCTC T AGGT CAG ATT CAG TCC CGG ATT GTT	pET28a-SUMO	Bsal
198- L.ser_S01.A55_SUMO-R	ATGGTA TCTAGA TAA GCG TTT CAT CGC ATT GCG	pET28a-SUMO	Xbal

Tabulka 2. Použité primery s vyznačenými místy, na které nasednou restriční enzymy.

4.2.2 Gradient PCR

Navržené primery byly nejdříve podrobeny gradient PCR experimentu, pro určení optimální annealingové teploty pro následující amplifikaci genu. Testováno bylo pět teplot; 50 °C, 52,6 °C, 55,9 °C, 58,5 °C, 60 °C. Počáteční denaturace byla 94 °C po dobu 1 minuty, následovalo střídání 30 cyklů; 94 °C po 10 sekundách, testované teploty po 30 sekundách a 72 °C po dobu 1,5 minuty (aktivace polymerázy + doplňování nukleotidů). Po dokončení 30 cyklů následovalo ještě 7 minut při teplotě 72 °C (final extension) a po ukončení byl roztok udržován při teplotě 16 °C. Reakce probíhala v termocykléru Biometra TOne (Analytik Jena).

PCR reakce byla namíchána podle PPP Master mix (Top-Bio) protokolu. Bylo smícháno 12,5 µl PPP Master mix roztoku s 1 µl roztoku pro Forward primer a s 1 µl roztoku pro Reverse primer (0,1µM koncentrace pro každý primer), 1 µl templátu (objednaného genu), a nakonec doplněna PCR H₂O do celkového objemu 25 µl (9,5 µl). PPP Mastermix používá základní typ DNA polymerázy: *Taq*.

Pro vizualizaci výsledků byl připraven agarózový gel následujícím postupem: 0,5 g rozpustné agarózy (SERVA Electrophoresis) bylo rozpuštěno v 50 ml 1x TAE bufferu, a bylo přidáno 5 µl barviva Serva DNA stain Clear G. Po doběhnutí PCR reakce byly vzorky umístěny na připravený gel. Výsledky experimentu ukázaly téměř stejnou efektivitu amplifikace u všech teplot a pro amplifikaci tak byla zvolena teplota 60 °C.

4.2.3 PCR pomocí Q5 High-Fidelity DNA polymerase

Pro amplifikaci genu byla použita Q5 DNA polymeráza (New England Biolabs), kvůli větší efektivitě, než má *Taq* polymeráza.

Pro amplifikaci genu bylo smícháno: 10 µl 5x Q5 reakčního pufru, 1 µl dNTPs (10mM), 2,5 µl roztok Forward primeru (10µM), 2,5 µl roztoku Reverse primeru (10µM), 1 µl templátu, 0,5 µl Q5 High-Fidelity DNA polymerázy, 10 µl 5x Q5 High GC Enhancer a doplněno Nuclease-free water do dosažení celkového objemu 50 µl.

Reakce probíhala ve stejném termocykléru jako Gradient PCR. Teploty reakce se střídaly následovně: Na začátku denaturace při teplotě 98 °C po dobu 30 sekund, po které následovalo 30 cyklů (po sobě jdoucích střídání teplot); denaturace při 98 °C po dobu 10 sekund, primer annealing 60 °C po dobu 15 sekund, aktivace polymerázy + doplnění nukleotidů při teplotě 72 °C po dobu 30 sekund. Po dokončení cyklů následovaly ještě 2 minuty při 72 °C (final extension). Roztok byl poté udržován při teplotě 16 °C.

Vzorek byl znovu puštěn na agarový gel a zpětně z něj byl i izolován pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel) sady, podle kroků v protokolu pro izolaci DNA z gelu. Koncentrace amplifikovaného genu byla naměřena na přístroji NanoPhotometer Pearl (Implen).

4.2.4 Restrikce PCR produktu a klonovacího vektoru

Byly zvlášť připraveny dvě restrikční reakce, první pro amplifikovaný gen a druhá pro vektor. Použité restrikční enzymy byly od společnosti New England Biolabs (Hitchin UK).

Pro amplifikovaný gen bylo dohromady do 50 μ l reakce namícháno; 8,19 μ l roztoku amplifikovaného genu (pro reakci je důležité mít amplifikovaného genu v roztoku 1 μ g), 5 μ l 10x CutSmart Buffer, 1 μ l Bsal, 1 μ l Xbal, a nakonec bylo vše doplněno Nuclease-free water (tedy 34,81 μ l).

Pro vektor bylo také dohromady do celkového objemu 50 μ l namícháno; 3 μ l roztoku s vektorem, 5 μ l 10x CutSmart Buffer, 1 μ l Bsal, 1 μ l Xbal, a znovu doplněno Nuclease-free water (tedy 40 μ l).

Obě reakce byly na 15 minut udržovány při teplotě 37 °C (zajišťující aktivitu restrikčních enzymů) a poté byly enzymy deaktivovány při 65 °C po dobu 20 minut.

Roztok s vektorovou DNA byl defosforylován pomocí Shrimp Alkaline phosphatase (New England Biolabs). Do roztoku bylo přidáno 2,5 μ l tohoto rSAP enzymu. Defosforylační reakce probíhala po dobu 30 minut při 37 °C a enzym byl deaktivován při 65 °C po dobu 5 minut.

Štípaný amplifikovaný gen i vektor byly poté purifikovány pomocí MN GEL and PCR cleaning kit. Koncentrace obou vzorků byly poté změřeny pomocí spektrofotometru.

4.2.5 Ligace T4 ligázou

Za účelem úspěšného spojení fragmentu s vektorem bylo potřeba vypočítat vhodný poměr, ve kterém se měly jednotlivé komponenty smíchat. Pro to byla použita internetová kalkulačka NEBio (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>), která podle naměřených koncentrací určila a vypočítala potřebné množství pro molární poměr 3:1 (gen ku vektoru).

Byla namíchána reakce do celkového objemu 20 μ l, která obsahovala; 2 μ l 10x T4 DNA ligase buffer, 2 μ l roztoku vektorové DNA (látkové množství 0,02pmol), 0,75 μ l roztoku amplifikovaného genu (látkové množství 0,06pmol), 1 μ l T4 DNA ligázy, a vše bylo doplněno Nuclease-free water (tedy 14,25 μ l).

Reakce byla poté pro ideální průběh udržována při teplotě 16 °C přes noc. Ráno byla T4 DNA ligáza deaktivována při teplotě 65 °C po dobu 10 minut.

4.2.6 Transformace do DH5 α *E.coli*.

Ligační směs byla následně použita pro transformaci buněk *E. coli* typu DH5 α (New England Biolabs). Přítomnost klonovaného genu v plazmidu byla ověřena pomocí colony PCR.

Bakterie udržované při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Byly vyndány a inkubovány na ledu po dobu 20 minut. K bakteriím byly poté přidány 2 μl ligační směsi (v této fázi jsou bakterie ještě „křehké“, a tak je lepší směs promíchat opatrně, třeba do ní lehce párkrát cvrknout) a čekalo se dalších 20 minut. Následoval heatshock ve vodě předehřáté na $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 sekund. Hned nato byly bakterie přemístěny na dvě minuty zpět na led a poté se k nim přidalo 250 μl předehřátého ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) S.O.C. média (New England Biolabs). Celá směs byla poté umístěna do třepačky (220rpm) předehřáté na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a inkubována po dobu 1 hodiny. Byly připraveny 2 kanamicinové LB-plotny. Po hodině bylo 50 μl vzorku rozetřeno na jednu Kanamicinovou LB-plotnu a zbytek vzorku byl rozetřen na druhou plotnu. Obě byly následovně inkubovány přes noc při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

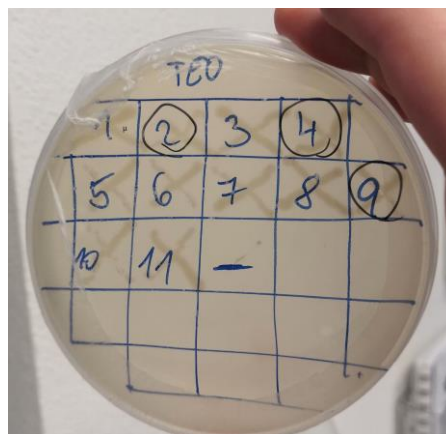
4.2.7 Colony PCR

Bylo předpřipraveno 12 PCR lahvíček a do každé bylo přidáno 20 μl ddH₂O (deionizovaná + destilovaná). Plastovou špičkou pro pipetu byla následovně setřena jedna kolonie, která narostla na LB-plotně přes noc, a špička byla poté vymáčána v lahvičce s ddH₂O. Stejnou špičkou byl poté na další připravenou kanamycinovou LB-plotnu udělán křížek. Dohromady 12x se takto, pokaždé novou špičkou, setřelo a vymáčalo 12 náhodně vybraných kolonií z plotny. V každé lahvičce byla tedy 1 vybraná kolonie a na nové plotně bylo jednotlivými špičkami uděláno dohromady 12 křížků. Přes plastové víčko plotny byla nakreslena mřížka, aby tak každý křížek (přesněji tedy kolonie) mohl být označený číslem.

Z každé z 12 lahviček byl odebrán 1 μl pro identifikaci pozitivních kolonií (těch, které opravdu obsahují plazmid s vloženým genem) pomocí colony PCR. Každá reakce obsahovala 1 μl odebrané kolonie, 12,5 μl Top-Bio PCR PPP Master Mix, 2,5 μl Forward primeru, 2,5 μl reverse primeru, 6,5 μl ddH₂O (celkový objem reakce je tedy 25 μl).

Reakce znovu probíhala v termocykléru který měl fáze nastavené na; primární denaturace při $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 6 minut (při této teplotě dojde k prasknutí buněk a uvolnění DNA do reakční směsi), po které následovalo 35 cyklů 3 fází: 1. denaturace při teplotě $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 sekund, 2. annealing při teplotě $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 sekund, 3. doplnění vláken polymerázou při teplotě $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 minuty. Po dokončení 35 cyklů následovalo finální doplnění vláken při teplotě $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 7 minut.

Pomocí 1 % agarového gelu, byla u jednotlivých vybraných kolonií ověřena přítomnost, či absence transformovaného plazmidu. Pozitivní kolonie byly označeny na víčku LB-plotny s křížky (**Obrázek 14.**).



Obrázek 14. LB-plotna (kanamycin) s v kroužku vyznačenými pozitivními koloniemi. Zdroj: Autor

4.2.8 Miniprep a sekvenace

Kolonie, které na gelu ukázaly přítomnost vkládaného plazmidu, byly, z LB-plotny s křížky, jednotlivě setřeny špičkami pro pipetu. Tyto špičky byly následovně vhozeny do zkumavek s 4 ml LB média, do kterého bylo přidáno také antibiotikum (kanamycin) zředěné na koncentraci 0,05mg/ml. Kolonie byly poté v třepačce ponechány přes noc při teplotě 37 °C.

Z každého vzorku byly poté izolovány plazmidy pomocí Nucleo-Spin Plasmid sady (Machery Nagel) podle High-copy plasmid isolation protokolu. Přičemž v posledním kroku se plazmidy z membrány neuvolňovaly do elučního pufru, ale do sterilní vody. Následovně se naměřily koncentrace vzorků pomocí spektrofotometru. Pro ověření správnosti sekvence genu v plazmidu, byly následovně vzorky odeslány na sekvenaci společnosti SEQme, s.r.o. (Dobříš)

4.2.9 Maxiprep a izolace plazmidu

Po ověření sekvenací byla správná kolonie setřena špičkou pro pipetu a vhozena do 180 ml LB média s 180 µl kanamycinu. V tomto prostředí se bakteriální kultura nechala při teplotě 37 °C přes noc narůst. Plazmidy byly poté izolovány podle protokolu z kitu Nucleo-Bond Xtra plasmid purification pro High-copy plasmid purification (Machery Nagel). Plazmidy byly podle stejného protokolu vysráženy a poté rozpuštěny ve sterilní vodě. Znovu byla naměřena koncentrace pomocí spektrofotometru.

4.3 Exprese ve vybraných kmenech *E. coli*⁴

Bylo vybráno několik typů *E. coli* v rámci optimalizace produkce. Použité genotypy bakterií jsou sepsány v tabulce 3. spolu s časy pro heatshock, použitými antibiotiky a dodavateli.

⁴ Exprese neprobíhala u všech bakterií ve stejnou dobu, spíše se postupně vybíraly druhy podle výsledků z těch předchozích. V této práci jsou ale sepsány všechny zároveň, protože postup je u všech víceméně stejný

Typ <i>E. coli</i>	Heatshock (42 °C)	Antibiotika
BL21(DE3) CodonPlus (Agilent)	20 sekund	Kanamycin
BL21(DE3) pLysS (Invitrogen)	30 sekund	Chloramphenicol, Kanamycin
C43(DE3) (Lucigen)	45 sekund	Kanamycin
C43(DE3) pLysS (Lucigen)	45 sekund	Chloramphenicol, Kanamycin
T7-Express (New England Biolabs)	10 sekund	Kanamycin
Rosetta Gami (DE3) (Novagen)	30 sekund	Kanamycin, tetracyclin

Tabulka 3. Použité typy bakterií *E. coli*, s vyznačenými časy pro heatshock a použitými antibiotiky

4.3.1 Transformace a kultivace

Bakterie byly vyndány z -80 °C a na ledu inkubovány po dobu 20 minut. Izolovaný plazmid z předchozích kroků byl zředěn na koncentraci 100ng/μl. Každý typ použitých bakterií byl poté smíchán s 1 μl zředěného plazmidu. Po smíchání byly bakterie ponechány 30 minut na ledu a následoval heatshock (dle **tabulky 3.**). Po heatshocku byly bakterie třepány při 220 rpm po dobu 1 hodiny v třepačce předehřáté na 37 °C. Následně byl každý typ *E. coli* rozetřen na dvě LB-plotny (na jedné 50 μl vzorku, na druhé zbytek), které obsahovaly příslušné antibiotikum pro každou kolonii. Na LB-plotnách se při 37 °C nechaly přes noc narůst kolonie.

Pro každý typ bakterií bylo do 50ml zkumavky (Falcon tube) přidáno 15 ml LB a 15 μl příslušných antibiotik (noční kultura). Z LB-ploten byla, pro každý typ zvlášť, špičkou setřena jedna náhodná kolonie a následně vhozena do předpřipravené zkumavky. Ty se nechaly přes noc narůst.

4.3.2 Pilotní exprese

Následujícího dne byly pro každý použitý typ bakterií připraveny čtyři 50 ml falcon zkumavky. Konkrétně to bylo kvůli rozdělení expresních podmínek na:

30 °C s přidáním IPTG, 30 °C bez IPTG

18 °C s přidáním IPTG, 18 °C bez IPTG

Každá zkumavka obsahovala: 10 ml LB média, 0,5 ml z noční kultury a 10 μl antibiotik příslušných použité kolonii. V této formě byly kolonie ve zkumavkách ponechány na třepačce (220rpm, 37 °C), dokud kultura nedosáhla hodnoty OD₆₀₀ v rozmezí 0,6 – 0,8. Pro měření OD₆₀₀ byl vždy odebrán 1 ml kolonie do kyvety, přičemž měření bylo uskutečněno pomocí NanoPhotometer Pearl (Implen). Od každého typu bakterií byl nyní odebrán 1 ml kolonie do ependorfy, který byl následovně stočen v centrifuze při 14 000rpm po dobu 1 minuty. Pelet

byl oddělen od supernatanu a následovně uschován v mrazáku⁵. Do určených zkumavek bylo přidáno IPTG v poměru 10 µl ku 10 ml obsahu zkumavky (finální koncentrace 1mM). Po přidání IPTG byly zkumavky rozděleny podle určených teplot (30 °C, 18 °C) do třepaček.

Následoval sběr vzorků po určených časových úsecích. Časové odběry probíhaly následovně:

Pro 30 °C to bylo po: 2, 4 a 6 hodinách (vzorky rozděleny podle přítomnosti IPTG)

Pro 18 °C to bylo po: 3, 6 a zhruba 24 (čekalo se přes noc) hodinách (vzorky také rozděleny podle přítomnosti IPTG)

Pro každý typ bakterie bylo tedy připraveno 12 ependorf zkumavek, do kterých se po uplynutí časových úseků sbíral 1 ml kolonie. Tyto vzorky byly po odebrání postupně stáčeny na centrifuze při 14 000rpm po dobu 1 minuty. Pelety tím byly odděleny od supernatantu a následně uschovány do mrazáku. Pro shrnutí se tímto docílilo rozdělení vzorků pro každý typ bakterie podle teploty, při kterých produkovaly enzym, času, a přítomnosti podpůrného expresního činidla (IPTG).

4.3.3 Příprava vzorků pro SDS-PAGE elektroforézu

Sesbírané a stočné vzorky nyní obsahovaly bakterie a v nich i protein. Pelety se tedy re suspendovaly přidáním 500 µl lysis pufru (50mM KH₂PO₄, 400mM NaCl, 100mM KCl, 10% glycerol, 0.5 % TritonX-100, 10mM imidazole, pH = 7.8). Ependorfky se směsí byly pak celkem 3x zamrazeny v tekutém dusíku a rozmrazeny při 42 °C (pomocí heatblocku). Vzorky byly následovně stočeny při 4 °C maximální rychlostí na centrifuze po dobu 5 minut. Stočením vznikly pelety, od kterých se odsál supernatant pipetou a přemístil se do jiné ependorf zkumavky. Takto se odebral a přemístil supernatant od každého vzorku. Celkově se tedy oddělila rozpustná frakce (supernatant) od nerozpustné (pelet) podle času odběru, přítomnosti IPTG, teploty a typu použité bakterie. Typy bakterií, u kterých se nepodařilo oddělit pelet od supernatantu hned a vznikl jakýsi sliz (pravděpodobně chromozomální DNA), byl přidán 1 µl DNázy (10µg/ml).

Do lahviček s pelety, tedy nerozpustnou frakcí, bylo přidáno 500 µl 1X SDS-PAGE sample pufru (Připraven přidáním 100 µl β-mercaptoethanolu do 900 µl 4X Laemmli sample buffer stock: 20 ml 0.5M Tris, 4 g SDS, 20 ml glycerolu, 0,1 g bromfenolové modři, H₂O do 45ml) v 1X PBS, ve kterém byly pomocí vortexu rozpuštěny, jak to jen bylo možné a poté 5 minut uvařeny na teplotě 95 °C. Do supernatantu byl přidáno 125µl 4X SDS-PAGE a následně byly vzorky také uvařeny při teplotě 95 °C.

4.3.4 SDS-PAGE gely

Byly připraveny 10 % (lze použít i 12,5 %) polyakrylamidové gely. Pro výrobu 8 gelů (10 %) bylo zapotřebí smíchat: 9,36ml 40 % akrylamidu, 19,76ml H₂O, 10ml 1,5M Tris (pH = 8,8),

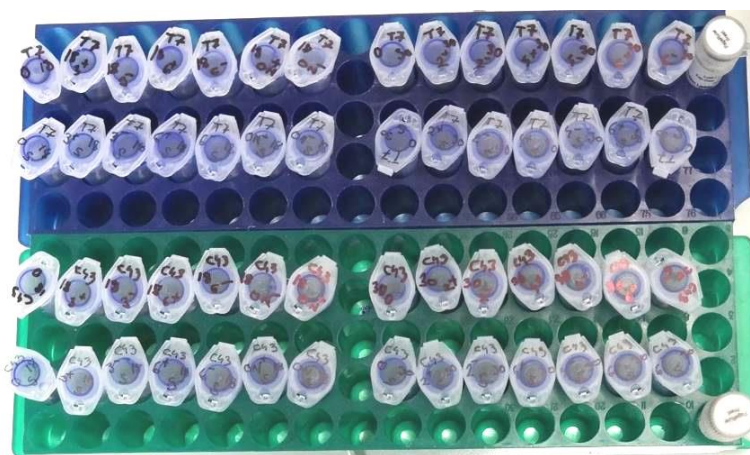
⁵ Zde se jedná o tzv. blank (nulová hodnota) vzorek, který se hodí později při porovnávání výsledků na gelu.

400µl 10 % SDS, 10 % APS (tento roztok vždy připravovat čerstvý), 40µl TEMED. Tato směs byla poté nalita do „forem“ ze sady od společnosti Bio-Rad, kde se gely nechaly polymerizovat. Byla také připravena směs pro 4 % polyakrylamidové gely, které se po polymerizaci prvního nalily na horní vrstvu 10 / 12,5 % gelů a vložil se do něj hřebínek, který vytvaroval jamky pro aplikaci vzorků.

Následně byly gely vloženy do aparátu a zality pufrům pro přenos elektrického proudu (množství záleželo na počtu gelů v aparátu). Na gel byly následně nasazeny vzorky po 10 µl a 1x 3 µl ladderu PageRuler Protein Prestained (Thermo Fisher Scientific) na každý gel (příkladné rozložení vzorků viz. kapitola SDS-PAGE elektroforéza v teoretické části nebo **Obrázek 15.**)

Elektroforéza probíhala 1,5 hodiny při konstantním napětí 100 V (to lze během lehce zvýšit, pro rychlejší dokončení). Gely byly po doběhnutí vyndány z „formy“, a samostatně rozděleny do nádob. V těch k nim byl nejdříve přidán 50% ethanol (tak aby byly gely ponořeny) a na třepačce se nechaly odbarvit po dobu 30 minut. Následovně byly 2x promyty ddH₂O, pokaždé po 10 minutách, a nakonec k nim bylo přidáno 20 ml Coomassie 250 Brilliant Blue a na třepačce se nechaly přes noc obarvit.

Stejným způsobem byly použity a vyrobeny gely pro analýzu proteinů po dialýze.



Obrázek 15. Vzorky připravené pro nasazení na gel. V každém stojánku je jeden typ bakterií (tady T7 a C43), které jsou do sloupců rozdělené podle rozpustných a nerozpustných frakcí. Na jeden gel vychází jeden sloupec ve stojáku. Zdroj: Autor

4.3.5 Western blot

Pro pokus o citlivější odhalení přítomnosti enzymu v rozpustné frakci, bylo vybráno třináct vzorků (dají se použít rovnou ty, které se použily na SDS-PAGE analýzu) různých bakterií s ohledem na výsledky z předchozího experimentu. Znovu byl připraven polyakrylamidový gel a byly na ně nasazeny vzorky s ladderem (10 µl z každého vzorku + 3 µl ladderu). Byla připravena membrána Trans-Blot Turbo Transfer pack (Bio-Rad), na kterou měly být

přeneseny proteiny z SDS PAGE gelu. Ta se nejprve nechala nasáknout v roztoku methanolu po dobu 15 minut a následně promyla v TBS-T pufru (Připraven přidáním 1 ml Tween 20 do zředěného 10X TBS pufru připraveného z: 60.5 g Tris, 87.66 g NaCl, pH = 7.6). Filtry, které byly součástí Trans-Blot sady, byly nasáknuty v TBS-T pufru. Na jeden takto nasáknutý filtr byla položena membrána, na ní poté SDS-PAGE gel se vzorky, a ten byl nakonec přikryt druhým nasáknutým filtrem. Vzniklý „sendvič“ byl poté přejet válečkem, aby se vytěsnilly vzduchové bublinky. Přenos enzymů na membránu probíhal za pomoci elektrického proudu v přístroji Trans Blot Turbo (Biorad) po dobu 30 minut. Když byl přenos hotový, membrána byla 3x promyta TBS-T pufrům po 10minutových intervalech. Dále byla membrána blokována (to později zabránilo navázání protilátek na membránu) ve 20 ml 5 % sušeného mléka pro blocking (Sigma-Aldrich), které bylo připraveno rozpuštěním 2,5 g sušeného mléka v 50 ml TBS-T. V mléku byla membrána ponechána 1 hodinu a pak 3x opláchnuta v TBS-T pufru po 10minutových intervalech. Nyní byly k membráně přidány primární protilátky v mléku v poměru 1 : 3000 (1 μ l protilátek ku 3000 μ l mléka), které se naváží na HisTag. Směs byla takto ponechána přes noc. Další den byla membrána opět promyta 3x v TBS-T po 10 minutách a k membráně byly přidány sekundární protilátky, tentokrát v poměru 1 : 5000, ale ne k mléku, nýbrž k TBS-T pufru. Takto byla membrána ponechána 1 hodinu. Membrána byla nakonec 3x promyta po 10 minutových intervalech v TBS-T pufru. Všechno promývání a vázání protilátek probíhalo na třepačce. Použité protilátky byly Monoclonal anti-polyhistidine antibody (Sigma) a goat Anti-mouse IgG-peroxidase antibody (Sigma). Pro detekci a vizualizaci byla membrána upravena podle postupu a činidel ze sady Opti-4CN Substrate kit (Bio-Rad).

4.3.6 Large scale produkce enzymu

Podle výsledků z polyakrylamidových gelů byly vybrány BL21 (DE3) bakterie pro large scale produkci enzymu. Byla provedena transformace a kultivace kultury přes noc selekcí antibiotikem stejným způsobem, jak už bylo popsáno. Ráno bylo 10 ml kultury smícháno s 200 ml LB média a příslušnými antibiotiky. Kultura se poté nechala narůst do dosažení OD₆₀₀ hodnoty v rozmezí 0,6-0,8. Po dosažení této hodnoty bylo k bakteriím přidáno 800 μ l IPTG. Kultura byla poté při teplotě 30 °C udržována po dobu 4 hodin na třepačce.

Po určené době byla bakteriální kultura přelita do dvou 1L nádob, které se poté nechaly točit v centrifuze (4200rpm, 15 minut) za účelem získání sedimentu z bakterií, s obsaženým enzymem. Z nádoby byla odlita kapalná část a usazenina z bakterií byla následovně zamražena.

4.3.7 Lyze bakterií

Lyze bakterií probíhala s pomocí vysokého tlaku v přístroji Microfluidizer LM20 (Microfluidics). Před zpracováním bakterií, byl stroj ještě pročištěn vodou a pufrům. Sesbíraná směs z rozbitých bakterií byla následně centrifugována po dobu 1 hodiny při teplotě 4 °C na 25 000rpm.

4.4 Purifikace

4.4.1 Příprava pufrů

Po získání informace o rozpustnosti enzymu z výsledků SDS-PAGE elektroforézy byly připraveny tři pufrы, potřebné k purifikaci (**Tabulka 4.**). Jejich pH bylo upraveno pomocí postupného přidávání 35 % HCl a KOH (o různých koncentracích, dle potřeby).

Solving buffer pH=9 (1 l)	Equilibration buffer pH=8,5 (0,5l)	Elution buffer pH=8,5 (0,5l)
6M Guanidium chloride	6M Urea	6M Urea
20mM TRIS	20mM TRIS	20mM TRIS
0,5M NaCl	100mM NaCl	100mM NaCL
5mM Imidazole	-	0,5M Imidazole
1mM Mercaptoethanol (70μl pro litr pufru; naředěním 14,2M)	-	-

Tabulka 4. Složení pufrů pro purifikaci (Do objemů lze hmotnost potřebných chemikálií dopočítat pomocí $M \times c_A \times V$)

4.4.2 Příprava vzorku pro purifikaci

Pelet z lyzovaných centrifugovaných bakterií byl rozpuštěn v Solving pufru (přes noc, při 4 °C na magnetické míchačce). Vzorek byl pak centrifugován po dobu 1 hodiny při teplotě 4 °C na 25 000rpm a výsledný supernatant použit pro afinitní purifikaci.

4.4.3 Afinitní chromatografie

Použitou metodou purifikace byla *Immobilized metal affinity chromatography*. Pro purifikaci bylo použita pumpa ÄKTA M2 Pure system (GE Healthcare), na kterou byla nasazena 5 ml HisTrap kolona (GE Healthcare). Systém byl následně promyt Ekvilibračním pufrém, poté elučním, a nakonec znovu ekvilibračním pufrém. Důvodem bylo pročištění kolony a vytvoření vhodného prostředí pro navázání enzymu na kolonu pomocí histidinové kotvy. Do systému byl následně napuštěn vzorek rozpuštěný v solving pufru při rychlosti průtoku 1 ml za minutu. Když začala UV hodnota stoupat, byla odebrána takzvaná flow-through frakce. Po napuštění celého vzorku se znovu do systému napustil ekvilibrační pufr, a při poklesu hodnoty UV jsme přestali sbírat flow-through frakci. Následně začalo promývání pomocí elučního pufru. Nejdříve byl použit 10% eluční pufr (50mM imidazol) pro vymytí nespecificky navázaných proteinů. V případě zvýšení UV jsme jímali frakci označenou jako 10 % wash. Protein byl z kolony uvolněn pomocí postupného zvyšování gradientu Imidazolu. Při zvýšení hodnoty UV jsme začali jímat frakce. Frakce byly sbírány každou minutu po 1 ml.

Dohromady bylo odebráno 12 vzorků podle koncentrace imidazolu. Systém byl následně pročištěn ekvilibračním pufrům, ddH₂O a uložen 20 % etanolu. Úspěšnost purifikace byla ověřena na SDS-PAGE gel a poté byla naměřena koncentrace.

4.4.4 Renaturace dialýzou

Podle spočítaného izoelektrického bodu enzymu byly připraveny tři pufrů o hodnotě pH 9. Jejich složení bylo následovné:

Pufr A: 4M Urea, 100mM NaCl, 50mM TRIS, 20mM β -mercaptoethanol (celé do 0,5 L)

Pufr B: 100mM NaCl, 20mM TRIS, 1mM β -mercaptoethanol (celé do 2 L)

Pufr C: 100mM, NaCl, 20mM TRIS (celé do 1 L)

Pufrů byly použité vychlazené a jejich pH bylo upraven pomocí HCl a KOH. Vzorek enzymu byl po purifikaci obsažen v elučním pufru.

Následovně byla připravena dialyzační membrána o propustnosti enzymů do velikosti 14kDa (Roth). Bylo použito zhruba 20 cm membrány, která byla z jednoho konce smotána a upevněna svorkou, z druhého konce byl nalit vzorek zředěný na koncentraci 0,1mg/ml. Druhý konec byl také smotán a upevněn svorkou. Do odměrného válce byl nalit 1L pufru A, a do něj bylo poté vloženo uzavřené střívko membrány se vzorkem. Aparatura byla poté ponechána v chladicí místnosti (4 °C) na magnetické míchačce na 260rpm. Večer byla odlita 1/3 objemu ve válci a dolita pufrům B. Druhého dne ráno se udělalo to samé a proces pokračoval, dokud nebyl pufr A plně nahrazen pufrům B. Následně byl pufr B nahrazen pufrům C a vzorek ponechán v chladicí místnosti na magnetické míchačce dalších 24 hodin. Střívko bylo po procesu vyndáno a směs v něm byla odpipetována a stočena po dobu 1 hodiny při 4 °C a 20 000rpm. Následovně byl odebrán vzorek ze supernatantu a sediment z precipitátu byl rozpuštěn v 1mL denaturačního pufru A. Vzorky byly následně upraveny pro SDS-PAGE analýzu, pro ověření přítomnosti enzymu buď v precipitátu, či v supernatantu.

4.5 Bioinformatická analýza

4.5.1 Predikce struktury

Predikce struktur byly vypočítané dvěma online verzemi programů AlphaFold2 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>) a Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). V obou případech byla poskytnuta jak sekvence se SUMO chaperonem a HisTagem, tak i bez něj, pro následovné porovnání. V zájmu porovnání poskytnuté sekvence s ostatními známými serinovými proteázami, byla porovnána s ostatními sekvencemi v databázi pomocí programu BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) (Altschul *et al.*, 1997). Tam bylo nastaveno hledání v databázi PDB,

kde nejpodobnější struktura byla následovně porovnána s těmi předpovězenými. Pro vizualizaci struktur a jejich porovnání byl použit volně dostupný program UCSF ChimeraX verze 1.2.5 od vývojářů z the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, with support from National Institutes of Health R01-GM129325 and the Office of Cyber Infrastructure and Computational Biology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (<https://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax/>). Hlavním záměrem bylo vzájemně porovnat struktury dvou předpovědí podle programů pomocí funkce zarovnání a výpočtu hodnoty RMSD, která ukazuje podobnost struktur na základě rozdílů polohy atomů proteinů v prostoru (čím menší je hodnota RMSD, tím podobnější jsou si porovnávané struktury) (Theobald, 2005). Dále bylo využito funkcí programu pro vyobrazení potenciálního aktivního místa a změření vzdáleností mezi aminokyselinami katalytické triády.

5 VÝSLEDKY

5.1 Klonování

Gradient PCR experiment ukázal téměř stejnou efektivitu amplifikace na všech zkoumaných teplotách (**Obrázek 16.**), a tak byla pro pokračování experimentu vybrána annealingová teplota primerů 60 °C. Použitá sekvence měla zhruba 900 párů nukleotidů.

V následujícím PCR experimentu pomocí Q5 polymerázy a purifikace z gelu pomocí protokolu v sadě bylo dosaženo koncentrace 112ng/μl amplifikovaného genu. Výsledky na gelu nebyly vyfotografovány, gel byl pouze umístěn na desku vyzařující Umodré světlo o vlnové délce 465 nm a část gelu s viditelným obsahem PCR amplikonu byla vyříznuta a izolována. Izolovaný fragment byl požit pro restrikční reakci.

Po dokončení restrikční reakce vektoru a genu S01.A55 bylo dosaženo koncentrací; vektor = 20,5ng/μl a amplifikovaný gen = 25ng/μl. Tyto hodnoty byly následně použity pro správné namíchání ligační reakce. Koncentrace po doběhnutí ligační reakce měřena nebyla a vytvořené plazmidy byly rovnou transformovány do kmenu E. Coli DH5α, pro následující Colony PCR.

Vybrané narostlé kolonie tohoto bakteriálního kmenu byly označeny a podrobeny Colony PCR experimentu, který po nasazení na gel ukázal přítomnost velikostně správného plazmidu u 3 kolonií z 12 (**Obrázek 17.**). Z těchto kolonií byly plazmidy následně izolovány jako miniprep za dosažení koncentrací: 2.kolonie = 26,9ng/μl, 4.kolonie = 39,9ng/μl, 9. kolonie = 28,9ng/μl (číselně označené kolonie jsou vidět na obrázku 12.). Takto byly vzorky poslány na sekvenaci, která odhalila správně vložený gen v plazmidu pouze u kolonie č. 4.

Z kolonie č. 4 byl připraven Maxiprep a z něj izolován plazmid za dosažení koncentrace 336ng/μl.

1582825169 syngene01 2/27/2020 5:39:29 PM 0.262 seconds
Dye SYBR Safe: Lights TLUM - Mid Wave: Filter UV06



Obrázek 16. Fotka gradient PCR profilu s vyznačeným ladderem a testovanými teplotami. K referenčnímu ladderu velikostně odpovídá sekvence zhruba 900bp. Je vidět, že efektivita amplifikace se Při různých teplotách příliš nemění. Zdroj: Autor

1620747871 syngene01 5/11/2021 3:44:31 PM 0.4912 seconds
Dye SYBR Safe: Lights TLUM - Mid Wave: Filter UV06

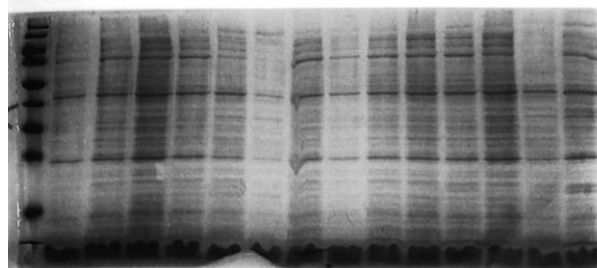


Obrázek 17. Fotka Kolony PCR profilu s červeně vyznačenými koloniemi s přijatým plazmidem a zeleně vyznačenými s přijatým správným plazmidem (ověřeno sekvenací). Zdroj: Autor

5.2 Pilotní exprese

Analýza 6 bakteriálních kmenů E. Coli odhalila produkci proteinu v podstatě vždy ve frakci nerozpustné (**Obrázky 18. – 23.**). V největším množství byl podle gelů enzym produkován pravděpodobně v nerozpustné frakci bakterie typu BL21 (DE3) kodon+ při teplotě 30 °C s IPTG po 4 hodinách (**Obrázek 18.**). Tento typ byl tak vybrán i pro large scale produkci a purifikaci. Jakožto jediný typ však nebyl kodon+ vybrán pro detekci v rozpustné frakci pomocí western blot, kvůli časové organizaci experimentu.

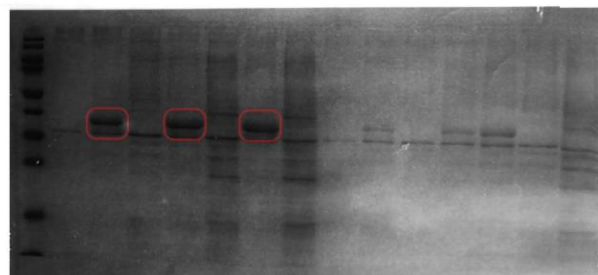
1644520440 syngene01 01/12/2021 2:07:00 PM 0.7158 seconds
Dye Coomassie Blue: Lights Upper White Light: Filter UV06



L 0 2+ 2 4+ 4 6+ 6
30 °C

Rozpustná frakce

1622558416 syngene01 6/1/2021 2:40:16 PM 0.7158 seconds
Dye Coomassie Blue: Lights Upper White Light: Filter UV06



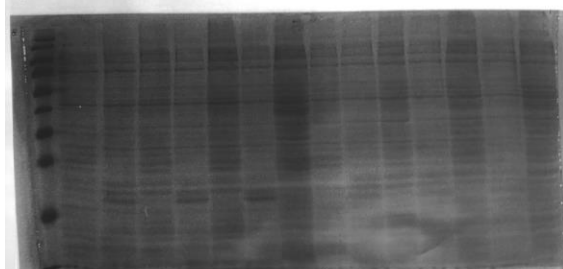
L 0 2+ 2 4+ 4 6+ 6 | 0 3+ 3 6+ ON+ 6 ON
30 °C 18 °C

BL21(DE) Codon+

Nerozpustná frakce

Obrázek 18. Profily SDS PAGE elektroforézy pro genotyp BL21 Codon+. Na obrázku lze pozorovat dva gely (rozpustná a nerozpustná frakce) s vyznačenými časy sběru (2, 4, 6...) s přítomností IPTG (+) a bez (nijak neoznačené hodinové sběry) a ladder (L). Produkovaný protein velikostně odpovídající (zhruba 40kDa) tomu hledanému je označený v čtverci (nerozpustná frakce 30 °C; 2+, 4+, 6+). V menším množství byl zřejmě také produkován i v nerozpustné frakci při 18 °C; 3+, 6+, ON+. ON=24h sběr přes noc (*overnight*). Zdroj: Autor

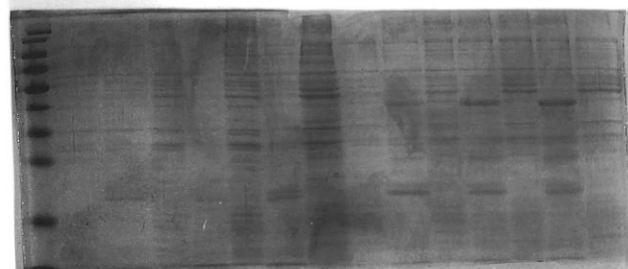
1634211524 syngene01 10/14/2021 11:38:44 AM 0.3411 seconds
Dye Coomassie Blue: Lights Upper White Light: Filter UV06



L 0 3+ 3 6+ 6
18 °C

Rozpustná frakce

1634211390 syngene01 10/14/2021 11:36:30 AM 1.7325 seconds
Dye Coomassie Blue: Lights Upper White Light: Filter UV06



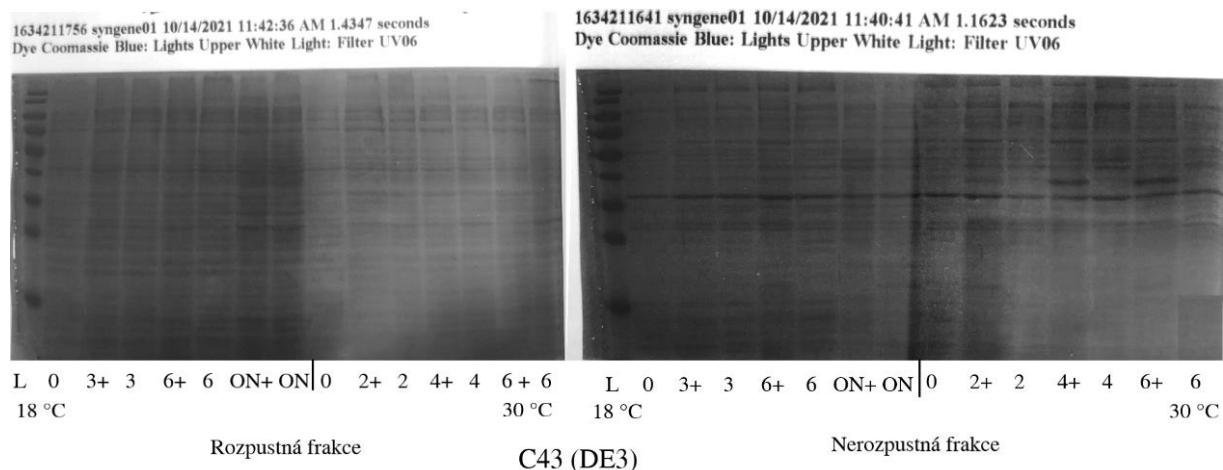
L 0 3+ 3 6+ 6
18 °C

T7 Express

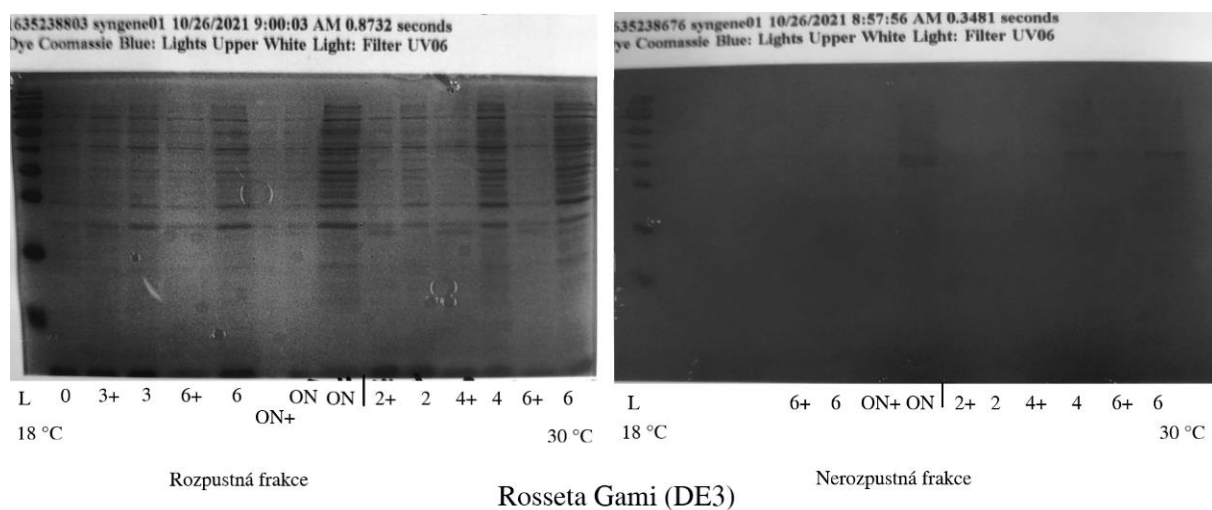
Nerozpustná frakce

30 °C

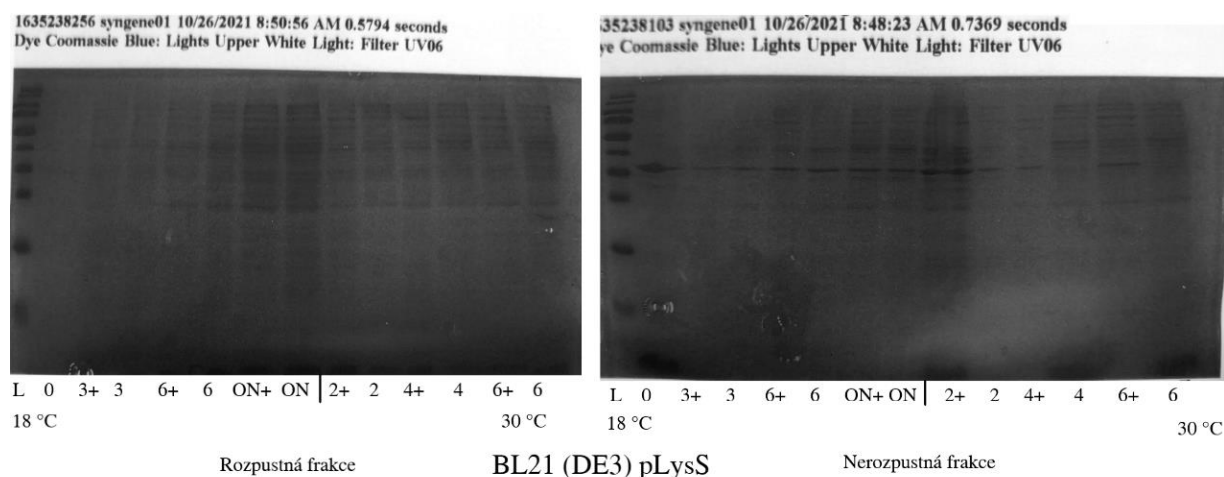
Obrázek 19. Profily SDS PAGE elektroforézy pro genotyp T7 Express. Znovu lze pozorovat dva gely, s produkcí enzymu viditelnou v nerozpustné frakci. Popis má stejnou systematiku jako na předchozím obrázku. Zdroj: Autor



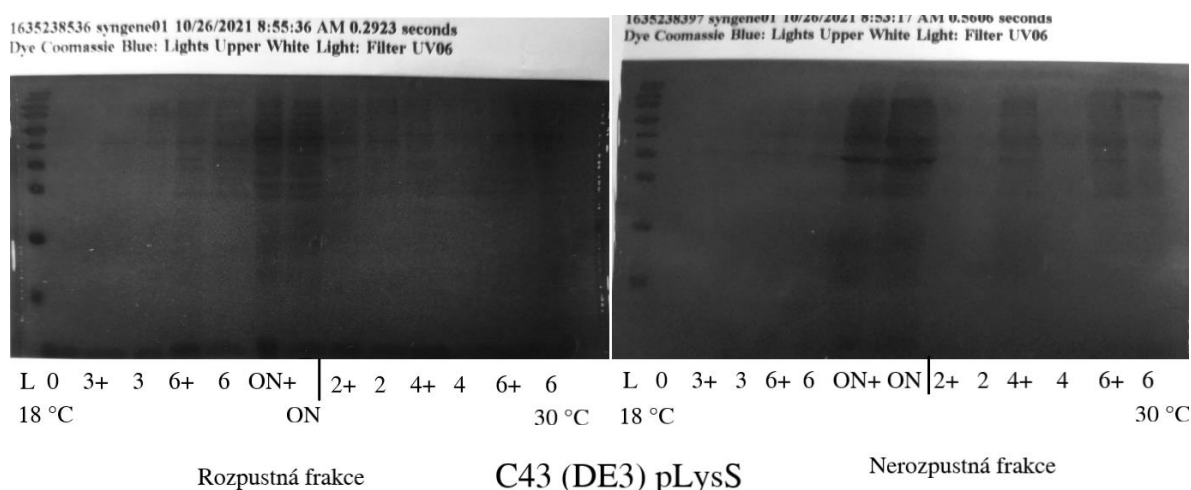
Obrázek 20. Profily SDS PAGE elektroforézy pro genotyp C43 (DE3). Produkce je znova vizuálně detekovaná pouze V nerozpustné frakci (30 °C; 4+, 6+). Systematika popisků je opět stejná. Zdroj: Autor



Obrázek 21. Profily SDS PAGE elektroforézy pro genotyp Rosseta Gami (DE3). U nerozpustné frakce je vynechán popis pár časových sběrů, protože na gelu nebylo vizuálně možno pozorovat téměř nic. Zdroj: Autor



Obrázek 22. Profil SDS PAGE elektroforézy pro genotyp BL21 (DE3) pLysS. Tady není produkce pozorovatelná ani v jednom případě. Zdroj: Autor.

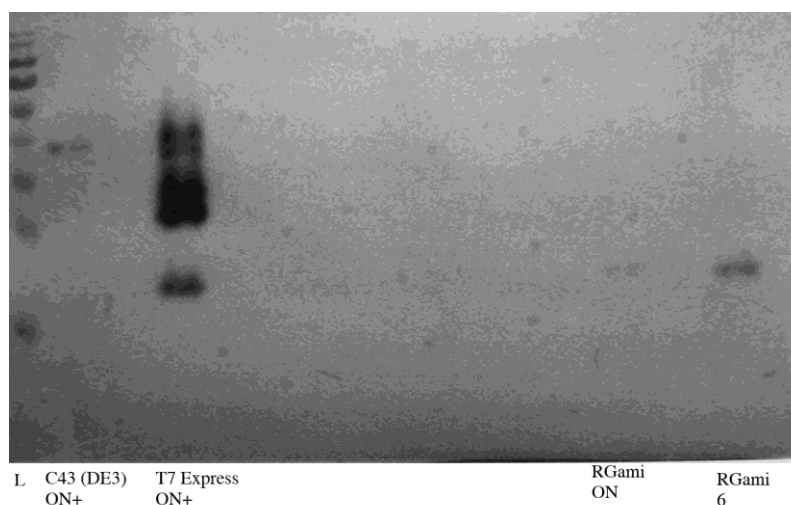


Obrázek 23. Profily SDS PAGE analýzy pro genotyp C43 (DE3) pLysS. NA obou obrázcích lze znovu pozorovat dva gely podle rozpustnosti frakce. Produkce, která stojí za povšimnutí se u tohoto genotypu nachází asi pouze při ON+, ON časových sběrech v obou frakcích (více ale v nerozpustné), jelikož na zbytku gelu jsou výsledky velmi slabě pozorovatelné. Zdroj: Autor.

5.3 Western blot

Z předchozích připravených vzorků všech typů bakterií, kromě BL21 kodon+, byly vybrány, takové, které by mohly v rozpustné frakci obsahovat alespoň malé množství enzymu. Vybrány byly na základě výsledků z pilotní exprese. Vyfocená membrána ukázala zajímavý výsledek u typu T7 s přítomností IPTG na teplotě 18 °C ponechané přes noc, kde byla struktura s HisTagem přítomná v docela velkém množství, ale neodpovídala velikosti enzymu, což by mohlo vypovídat něco o jeho chování v této bakterii. Dále byl enzym detekován i u bakterie C43 s přítomností IPTG na teplotě 18 °C ponechané přes noc. Tam byl detekován i ve správné velikosti, ale pravděpodobně v tak malém množství, že ani velká

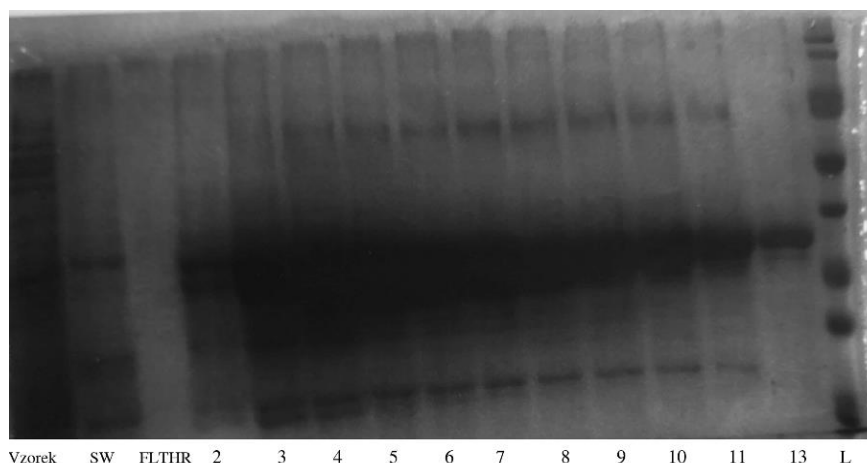
produkce v podmínkách laboratoře by neposkytla enzym v dostatečné množství pro další experimenty (**Obrázek 24.**).



Obrázek 24. Výsledky z western blot analýzy. Správná velikost je detekována u C43 (DE3) ON+, jenže ve stopovém množství. U T7 Express ON+ je pozorovatelný výrazný signál, který by mohl napovědět něco o chování enzymu v bakterii. Většina ostatních použitých vzorků ani nebyla označena, jelikož z nich nebyl detekován žádný signál. Stopový signál o jiné velikosti je zde také pozorovatelný u Rosetta Gami. Zdroj: Autor

5.4 Purifikace

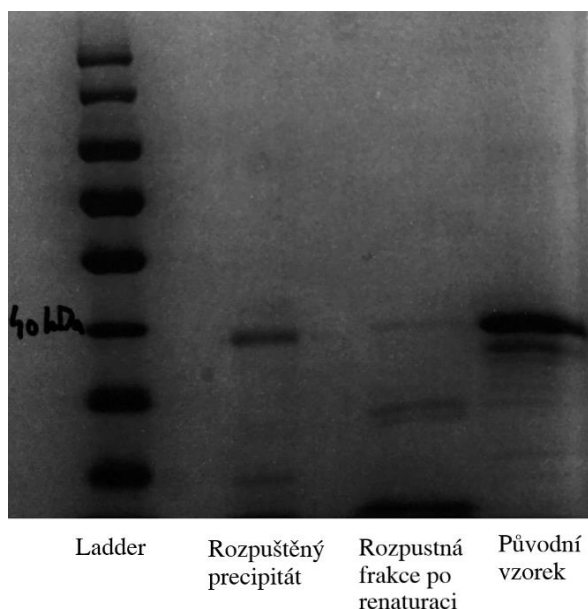
Izolovaná nerozpustná frakce z bakterií BL21 (DE3) kodon+ po lýze podstoupila denaturační purifikaci. Enzym se v denaturovaném stavu podařilo purifikovat při dosažení koncentrace 1,72mg/ml. Během purifikace se enzym uvolňoval téměř při každé analyzované koncentraci (**Obrázek 25.**) Imidazolu, takže finální směs byla slita ze všech těchto měřených vzorků.



Obrázek 25. Sběr minutových frakcí z purifikace vyobrazený na polyakrylamidovém gelu. SW=soft wash (10% imidazol pufr), FLTHR=Flow through. Na začátku lze pozorovat vysoké uvolňování proteinu a s postupným zvyšováním gradientu, čím dál menší množství uvolňované z kolony. 12 frakce chybí. Frakce byly po tomto kroku slity dohromady, protože enzym byl uvolňován při každém sběru. Zdroj: Autor

5.5 Renaturace

S01.A55 produkovaný bakteriálním kmenem E. Coli BL21 (DE3) kodon+ v nerozpustné frakci, podstoupil renaturační experiment pomocí dialýzy. Dohromady byl proveden pouze jeden pokus, při kterém se enzym vysrážel do bílých tělísek, což bylo ověřeno pomocí SDS-PAGE analýzy (**Obrázek 26.**). Renaturační podmínky nastavené tímto experimentem zřejmě nebyly ideální, protože se enzym nepodařilo získat v nativní formě, nýbrž ve sraženině.



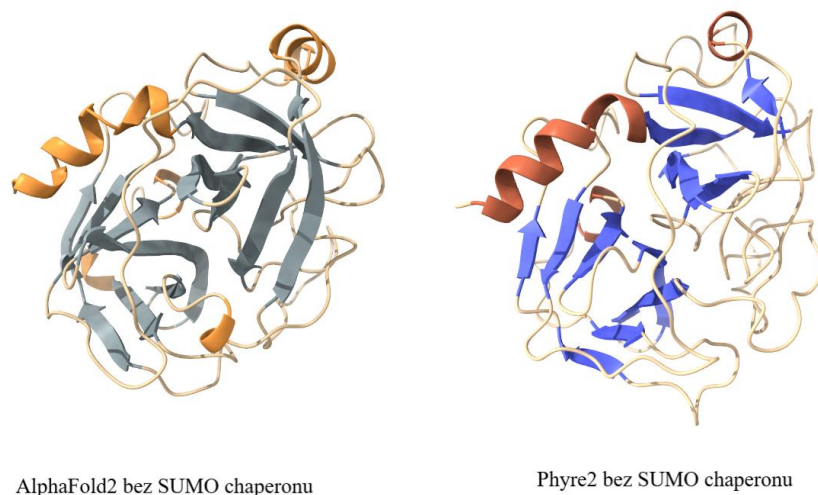
Obrázek 26. Kontrolní analýza obsahu kapaliny a precipitátu po refoldingu dialýzou. Lze vidět, že precipitát obsahuje téměř jen protein o velikosti podobné tomu zkoumanému, takže lze logicky vyvodit, že se jedná o něj, tudíž se ho nepodařilo získat v nativní formě. Zdroj: Autor

5.6 Bioinformatická analýza

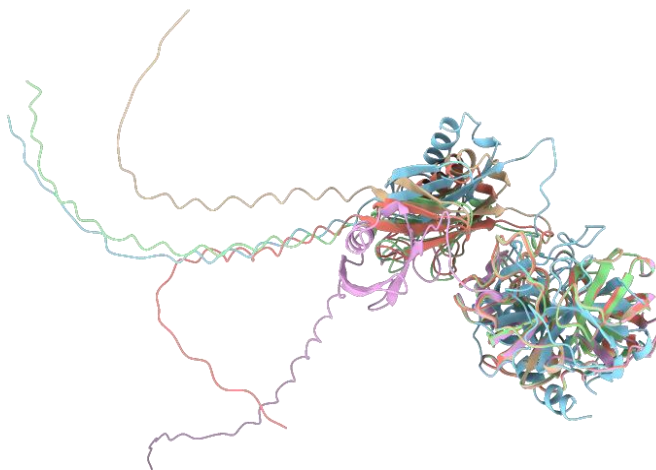
Vepsáním sekvence do online verze programu AlphaFold2 se podařilo získat 5 strukturních predikcí (tento počet byl stanoven v základním nastavení) ve formátu pdb (RMSD=0,278). Dalších pět se předpovědí se týkalo stejného enzymu, akorát bez přítomnosti SUMO chaperonu a HisTagu. Program Phyre2 poskytl 1 strukturní predikci pro celý protein a 1 pro protein bez chaperonu a HisTagu. Všechny 5 predikcí od AlphaFold2 bylo na sebe zarovnáno, v zájmu pozorování rozdílů predikcí (**Obrázek 28.**). Dále byla porovnána predikce AlphaFold2 a Phyre2 pro enzym jak se SUMO, tak bez něj (RMSD=0,848) (**Obrázek 27.**). Znatelný rozdíl lze pozorovat například mezi předpovědí struktury Phyre2 se SUMO chaperonem (**Obrázek 30.**) a předpovědí AlphaFold2 se SUMO chaperonem (**Obrázek 29.**). Tam výpočet Phyre2 ukazuje SUMO chaperon v mnohem větší blízkosti k struktuře enzymu než u AlphaFold2 predikcí. Phyre2 bez SUMO a se SUMO byl tedy pro zajímavost také porovnán (RMSD=0,873), pro zjištění, jak moc by přítomnost chaperonu mohla ovlivnit celkové prostorové uspořádání struktury.

Jako poslední byla vyhledána podobná sekvence pomocí BLAST v databázi PDB kvůli dostupnosti experimentálně ověřených struktur. Nejpodobnější se ukázal být koagulační trypsin z člověka (PDB: 1FXY), který porovnáním s predikcí AlphaFold2 dosáhl $\text{RMSD}=0,951$ (**Obrázek 32.**). Stejně porovnání bylo učiněno s predikcí Phyre2, kde byla dosažena hodnota $\text{RMSD}=0,830$.

U všech predikcí jsou dobře pozorovatelné 2 barely z β skládaných listů, mezi kterými jsou z jedné strany přítomny všechny aminokyseliny katalytické triády ve vzdálenostech umožňujících vzájemné propojení vodíkovými můstky (**Obrázek 31.**).



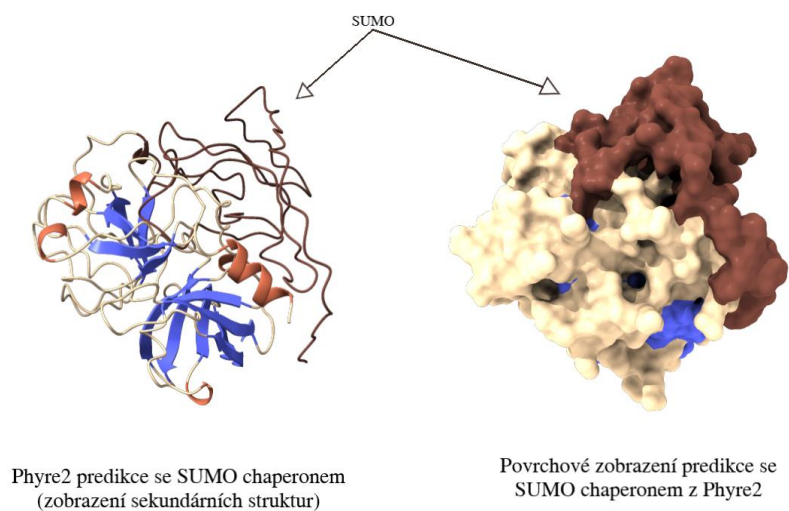
Obrázek 27. Zobrazení predikcí proteinů bez SUMO chaperonu s barevně vyznačenými sekundárními strukturami. Viditelné dva barely z beta skládaných listů. Při zarovnání dosahují hodnoty $\text{RMSD}=0,848$. Program: ChimeraX. Zdroj: Autor



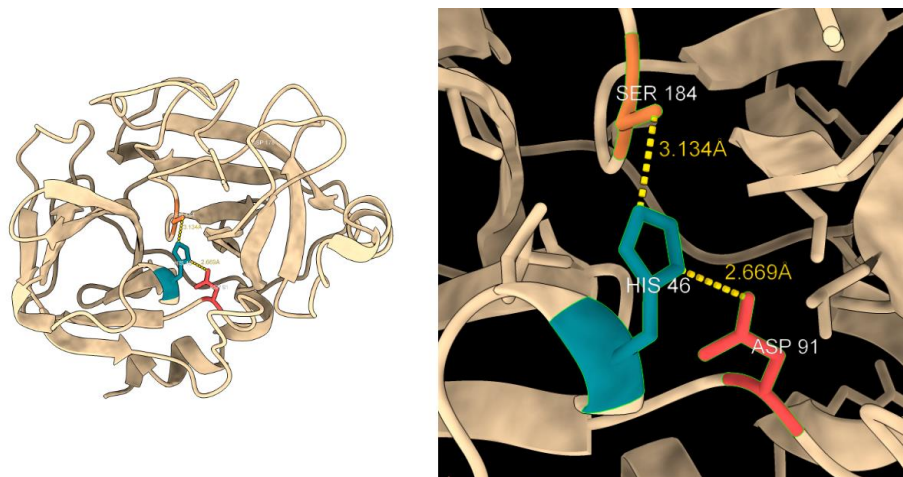
Obrázek 28. 5 zarovnaných predikcí se SUMO chaperonem z programu AlphaFold2. Na obrázku lze pozorovat 5 barevně odlišených strukturních predikcí, které by se vizuálně daly rozdělit na 2 části. Ta, z níž vystupuje dlouhý nesložený řetězec je právě SUMO chaperon. Program ChimeraX. Zdroj: Autor



Obrázek 29. Predikce struktury se SUMO chaperonem z programu AlphaFold2 s vyznačenými částmi celé struktury. Zdroj: Autor

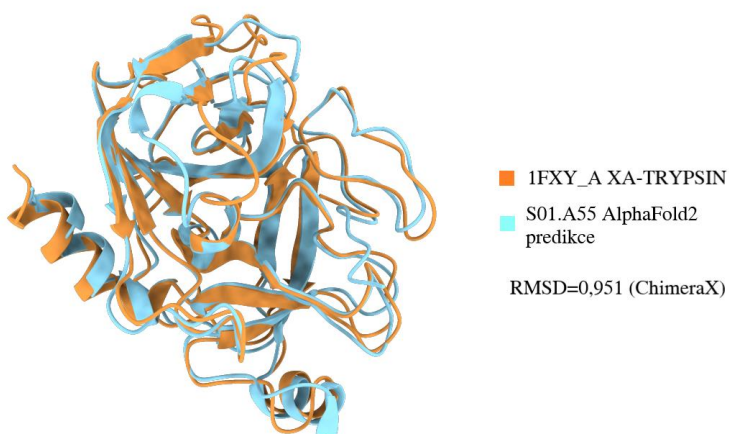


Obrázek 30. Predikce struktury se SUMO chaperonem (tmavě hnědá) v zobrazení sekundární struktury a povrchově. Porovnání pro uvědomění odlišnosti s predikcí od AlphaFold2, kde SUMO na enzym takto nepřiléhá. Zdroj: Autor



Obrázek 31. Vyobrazení pravděpodobné katalytické triády se změřenými vzdálenostmi mezi aminokyselinami. Na obrázku lze pozorovat barevně odlišené členy katalytické triády, jejichž vzájemné vzdálenosti jsou možná i dostatečné pro vytvoření vodíkových vazeb (<3.3Å) (viz. kyselina asparagová – histidin). Zdroj: Autor

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Chain A_COAGULATION FACTOR XA-TRYPSIN CHIMERA [Homo sapiens]	Homo sapiens	143	143	96%	4e-42	34.51%	228	1FXY_A



Obrázek 32. Lidský trypsin porovnaný s předpovězenou strukturou S01.A55 programem AlphaFold2. Na orní liště je screenshot z výsledku hledání v databázi PDB pomocí BLAST. Toto bylo učiněno hlavně z důvodu porovnání předpovězené struktury s reálně naměřenými daty ze struktury podobné, přestože pochází z jiného organismu. Zdroj: Autor (obrázek), struktura PDB: 1FXY_A, lišta: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

6 DISKUZE

Cílem práce bylo připravit plazmid pro expresi enzymu S01.A55 v bakteriích, následně tento enzym purifikovat a provést strukturní predikci.

V rámci této práce se podařilo připravit expresní vektor a vložit ho do bakterií *E. coli*. Už při expresi lze z výsledků pozorovat opakující se produkci proteinu hlavně v nerozpustné frakci u téměř všech použitých genotypů *E. coli*. Původně se exprese měla odehrát pouze v genotypu BL21 Codon+, do které se vkládaly veliké naděje, kvůli její úspěšnosti. Z ní byl

dále protein izolován denaturační purifikací, přičemž se ho nepodařilo získat v nativní formě. V této fázi by se mohly dále zkoušet další renaturační metody nebo lehce upravovat podmínky dialýzy, např. přidáním argininu k denaturačním pufrům, jako to bylo provedeno u podobných studií exprese chymotrypsinu (pod názvem Jonah proenzym) ze stejného druhu larev (Pöppel et al., 2016). Kvůli časovým důvodům byla však zvolena cesta ozkoušení co nejvíce dostupných genotypů *E. coli* pro zvýšení šance produkce v rozpustné frakci. Vzhledem k pozorovatelné produkci proteinu v nerozpustné frakci i nadále, lze uvažovat expresi v úplně jiném systému, jakým můžou být například samotné hmyzí buňky. Tuto cestu teoreticky podporuje i samotný původ proteinu, který je z eukaryotických systémů. Tady se nabízí otázka: jak efektivní by proces produkce byl v eukaryotických buňkách? Tato otázka tím pádem udává podklad pro budoucí studie. Dalším faktorem, který ovlivnil rozpustnost proteinu může být například umístění histidinové kotvy a SUMO chaperonu. Výsledky z western blot analýzy totiž ukazují u genotypu T7 (přes noc, + IPTG) detekovaný signál v rozpustné frakci, při různých velikostech menších, než je velikost enzymu podle sekvence. To by mohlo značit, že na N-konci enzymu se může nacházet sekvence pro nějaký proenzym (zymogen), který si protein sám odštípne pro aktivaci. Tím by se vysvětlovala naměřená velikost proteinů, u kterých se protilátky navázaly na histidinovou kotvu. Řešením pro tento problém by mohlo být umístění histidinové kotvy na C-konec enzymu a opětovná produkce ve stejném genotypu, při stejných podmínkách, což by teoreticky umožnilo získání enzymu v nativní formě bez potřeby denaturační purifikace.

I přes to, že na predikce by se nemělo příliš spoléhat (sám jsem ji zde zařadil spíše pro vizualizaci enzymu a programu AlphaFold2, který tento rok získal díky své přesnosti ocenění „Breakthrough of the year“ podle prestižního vědeckého časopisu *Science* (Service, 2021)), je zajímavé, že aktivní místo podle ní není nijak uzavřené. Zajímavý výsledek ale ukázala predikce struktury se SUMO sekvencí pomocí programu Phyre2, kde je SUMO protein „nesložený“ a pravděpodobně přímo interaguje s původní strukturou enzymu, což by mohlo narušit jeho vlastnosti. Porovnání obou predikcí se známou experimentální strukturou trypsinu (PDB: 1FXV_A) z člověka ukázala menší, a tedy asi přesnější hodnotu RMSD u programu Phyre2. Těžko takto ale vybrat lepší program pro tuto predikci, protože experimentálně naměřená struktura S01.A55, s níž by porovnání dávalo větší smysl, ještě není známá.

Všechny doposud popsané problematiky a jejich řešení by však vyžadovaly přípravu nového expresního plazmidu (kromě dalších pokusů s renaturací). V neposlední řadě mohla výsledek ovlivnit i časová organizace experimentu nebo nepostřehnutá chyba v provedení.

V případě úspěšné produkce nativního enzymu, lze pokračovat ve studiích pomocí reakčních esejí, či krystalizačních experimentů s následným popsáním struktury proteinu.

7 ZÁVĚR

Cílem práce bylo připravit expresní plazmid, vložit ho do bakterií, purifikovat produkovaný enzym S01.A55 a jako dodatek provést základní bioinformatickou analýzu, týkající se hlavně

predikce a zobrazení katalytické triády. Predikce se pojí také s posledním cílem, a tím byl popis metod neodbornému čtenáři, kterému by vizualizace struktury mohla pomoci s pochopením podstaty projektu.

Podle výsledků ze sekvenční analýzy se úspěšně podařilo připravit expresní plazmid a vložit ho do bakterií. Dále se podařilo zjistit podmínky produkce enzymu, které podle dostupných analytických metod ukázaly u téměř všech genotypů opakující se výskyt proteinu v nerozpustném stavu. Podle profilů byl tedy vybrán nejvhodnější genotyp bakterie pro provedení denaturační purifikace. Protein se podařilo purifikovat v denaturovaném stavu a následně byl proveden refolding pomocí dialýzy. Získat enzym v nativní formě se nepodařilo. Western blot analýza zformovala novou hypotézu o chování proteinu v některých genotypech zkoumaných bakterií a dala tak podklad pro následující experimenty. Podařilo se získat značné množství informací o podmínkách produkce. Dále byla provedena predikce struktury pomocí dvou grafických programů, jejichž výsledky byly vzájemně porovnány. Přesnost lze však ověřit pouze po získání experimentální struktury. Tento krok představuje výzvu pro budoucí výzkum enzymu S01.A55.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Bollag, D. M., Rozycky, M. D., & Edelstein S. J. (1996). *Protein Methods* (2nd edition). New York : Wiley-Liss, ISBN: 978-0-471-11837-4.
- Cazander, G., Pritchard, D. I., Nigam, Y., Jung, W., & Nibbering, P. H. (2013). Multiple actions of *Lucilia sericata* larvae in hard-to-heal wounds: Larval secretions contain molecules that accelerate wound healing, reduce chronic inflammation and inhibit bacterial infection. *BioEssays*, 35(12), 1083–1092. <https://doi.org/10.1002/bies.201300071>
- Čerovský, V., Žďárek, J., Fučík, V. et al. (2010) Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata* . *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 455–466. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0194-0>
- Di Cera, E. (2009). Serine Proteases. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/iub.186>. Serine
- Dr. G. (2019). *Serine Protease Mechanism*. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=OjWUIGPKpM>
- Francis, D. M., & Page, R. (2010). Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Current Protocols in Protein Science*, SUPPL. 61. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0524s61>
- Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, 102(12), 4501–4523. <https://doi.org/10.1021/cr000033x>
- Invitrogen. (2010). User Manual Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits. *Invitrogen user manual*, 25.
- Jelínek, J., & Zicháček, V. (2014). *Biologie pro gymnázia* (14th ed.). Nakladatelství Olomouc. ISBN: 9788071823384.
- Keeling, P. J., & Doolittle, W. F. (1996). A non-canonical genetic code in an early diverging eukaryotic lineage. *EMBO Journal*, 15(9), 2285–2290. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00581.x>
- Kelley, L., Mezulis, S., Yates, C. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10, 845–858 (2015). <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>

- Kirk, Ole; Borchert, Torben; Fuglsang, Claus (2002). "Industrial enzyme applications". *Current Opinion in Biotechnology*. 13 (4): 345–351. doi:10.1016/s0958-1669(02)00328-2
- LadyofHats. (2011). *Ribosome mRNA translation*cs. [https://cs.wikipedia.org/wiki/Translace_\(biologie\)#/media/Soubor:Ribosome_mRNA_translation_cs.svg](https://cs.wikipedia.org/wiki/Translace_(biologie)#/media/Soubor:Ribosome_mRNA_translation_cs.svg) k datu 9.1.2022
- Lecturio. (2021). *Transcription process and-synthesis of mRNA 1*. Lecturio. <https://www.lecturio.com/concepts/stages-of-transcription/> k datu 9.1.2022
- Menter, P. (2000). Acrylamide Polymerization—A Practical Approach. *Bio-Rad Tech Note*, 1156. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Acrylamide+Polymerization+?+A+Practical+Approach#0>
- Milot Mirdita, Konstantin Schütze, Yoshitaka Moriwaki, Lim Heo, Sergey Ovchinnikov, Martin Steinegger. ColabFold - Making protein folding accessible to all. *BioRxiv* 2021.08.15.456425; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.08.15.456425>
- Pöppel, A. K., Kahl, M., Baumann, A., Wiesner, J., Gökçen, A., Beckert, A., Preissner, K. T., Vilcinskis, A., & Franta, Z. (2016). A Jonah-like chymotrypsin from the therapeutic maggot *Lucilia sericata* plays a role in wound debridement and coagulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 70, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.11.012>
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/BSE0590001>
- Scopes RK (1994). *Protein Purification*. Springer. doi:10.1007/978-1-4757-2333-5. ISBN: 978-1-4419-2833-7.
- Service, R. (2021, December 16). *Science's 2021 breakthrough of the year: AI brings protein structures to all*. Science. Retrieved December 18, 2021, from https://www.science.org/content/article/breakthrough-2021#section_breakthrough
- Sherman, R. A. (2014). Mechanisms of maggot-induced wound healing: What do we know, and where do we go from here? *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/592419>
- Silverman, S. (1988). DNA cloning. *Analytical Biochemistry*, 172(1), 288. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90445-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90445-9)
- Singh, Surinder Mohan; Panda, Amulya Kumar (2005-04-01). "Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 99 (4): 303–310. doi:10.1263/jbb.99.303

- Theobald DL (2005). "Rapid calculation of RMSDs using a quaternion-based characteristic polynomial". *Acta Crystallogr A*. 61 (Pt 4): 478–480. Bibcode:2005AcCrA..61..478T. <https://doi:10.1107/S0108767305015266>
- The Thought Emporium. (2021, April 27). *A Chill Day of DNA Design (And Updates!) - Livestream*. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=3WkEiD2R7Ag>
- Wolynes, P. G., Luthey-Schulten, Z., & Onuchic, J. N. (1996). Fast-folding experiments and the topography of protein folding energy landscapes. *Chemistry and Biology*, 3(6), 425–432. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(96\)90090-3](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(96)90090-3)
- Yang, Ping-Chang; Mahmood, Tahrin (2012). "Western blot: Technique, theory, and trouble shooting". *North American Journal of Medical Sciences*. 4 (9): 429–434. doi:10.4103/1947-2714.100998