

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Využití sekvencí inteinového typu při purifikaci
heterologně produkováných proteinů**

Bakalářská práce

Jan Jurečka

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: Doc. Mgr. Petr Galuszka, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Doc. Mgr. Petra Galuszky, Ph.D., s použitím zdrojů uvedených v závěru práce.

V Olomouci dne

Podpis:

SOUHRN

Tato bakalářská práce se věnuje využití sekvencí inteinového typu při proteinové purifikaci.

V teoretické části jsou popsány základy metod molekulárního klonování se zaměřením na plasmidové vektory. Dále jsou v teoretické části popsány různé bakteriální expresní systémy, např. sekrece proteinů do inkluzních tělísek. V další kapitole je popsán systém purifikace pomocí inteinové sekvence, mechanismy sestřihu inteinů, jejich šíření v organismu a komerční systémy které inteinové sekvence používají.

Cílem experimentální části bylo klonování plasmidu nesoucí gen pro expresi katelicidinu (protein zájmu) zřezovaný s inteinovou sekvencí a funkční ověření připraveného vektoru v *E. coli*, tedy transformace, heterologní exprese, purifikace a detekce proteinového produktu.

Klonování bylo úspěšné a exprese a purifikace po překonání určitých komplikací také.

SUMMARY

This bachelor's thesis discusses the usage of intein-type sequences in protein purification.

The theoretical part describes the basics of molecular cloning, focusing on plasmid vectors. Next, the theoretical part describes various bacterial expression systems, for example protein secretion into inclusion bodies. The next chapter describes the system of purification using intein sequences, mechanisms of intein cleavage, their spread in the organism and commercial systems that utilize intein sequences.

The goals of the experimental part were cloning the plasmid carrying a gene for cathelicidin expression (target protein) fused with an intein sequence and functional verification of the prepared vector in *E. coli*, i.e. transformation, heterologous expression, purification and detection of the protein product.

The cloning was successful and after overcoming certain complications, so was the expression and purification.

Poděkování: Chtěl bych poděkovat vedoucímu bakalářské práce Doc. Mgr. Petrovi Galuszkovi, Ph.D., za odborné vedení, připomínky a čas, který mi věnoval. Mé poděkování patří také pracovníkům Centra Regionu Haná za pomoc při zpracování experimentální části.

OBSAH

1	Seznam použitých zkratk	1
2	Úvod	3
3	Cíl práce	4
4	Současný stav řešené problematiky	5
4.1	Metody molekulárního klonování	5
4.1.1	Obecné vlastnosti klonovacích vektorů	5
4.1.2	Plasmidové vektory	5
4.1.2.1	Polylinker	7
4.1.2.2	Replikace a šíření plasmidu v populaci	7
4.2	Bakteriální expresní systémy	9
4.2.1	Sekrece proteinů do inkluzních tělísek	9
4.2.1.1	Metody získání proteinů z inkluzních tělísek	10
4.2.2	Sekrece proteinů do periplasmy a mimo buňku	10
4.3	Purifikace pomocí inteinových sekvencí	11
4.3.1	Struktura inteinu a princip sestřihu exteinů	11
4.3.2	Šíření inteinů v organismu	13
4.3.3	Zlom inteinové sekvence	14
4.3.4	Využití inteinových sekvencí v purifikaci proteinů	14
4.3.4.1	Mutagenese aminokyselinových motivů	14

4.3.4.2	Purifikace pomocí afinitních značek	15
4.3.4.3	PHB systém	15
4.3.4.4	Samoštěpící řízní sekvence inteinů a elastinů	16
5	Materiál a metoda	18
5.1	Biologický materiál.....	18
5.2	Chemikálie	18
5.3	Enzymy, příslušné pufrы a komponenty pro molekulární biologii	19
5.4	Použité kity	19
5.5	Přístroje.....	20
5.6	Roztoky.....	20
5.7	Postupy.....	21
5.7.1	Transformace kompetentních bakteriálních buněk elektroporací	21
5.7.2	Očkování bakterií na agarovou plotnu a do tekutého média	21
5.7.3	Izolace plasmidu	21
5.7.4	Restrikce	22
5.7.5	Ligace	22
5.7.6	Agarosová elektroforéza.....	22
5.7.7	Expresе proteinu	22
5.7.8	Purifikace pomocí ELP motivu	23
5.7.9	Purifikace pomocí chitin-vazebné domény	23

5.7.10	Polyakrylamidová elektroforéza.....	24
5.7.11	Barvení gelu pomocí stříbra	24
5.7.12	Barvení gelu pomocí Coomassie brilliant blue.....	25
6	Výsledky.....	26
6.1	Použité konstrukty	26
6.1.1	Strategie I.....	26
6.1.2	Strategie II	27
6.2	Klonování.....	28
6.3	Proteinová exprese.....	31
6.3.1	Strategie I – čištění pomocí ELP motivu.....	31
6.3.2	Strategie II – čištění pomocí chitin-vazebné domény	31
7	Diskuze	33
8	Závěr.....	35
9	Literatura	36

1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DTT – 1,4-dithiotreitol

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

ELP – elastin-like polypeptide

Gu-HCl – guanidin hydrochlorid

HED – homing endonuclease domain

IPTG – Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

LB – Luria-Bertani

LDS – dodecylsulfát lithný

MCS – multiple cloning site

MES - 2-[N-morpholino]ethansulfonová kyselina

Na-HEPES – 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonan sodný

NEB – New England Biolabs

ORI – origin of replication

PBS – phosphate-buffered saline

PHB – polyhydroxybutyrát

SDS – dodecylsulfát sodný

SEC – general secretion

SOC – Super optimal broth with catabolite repression

TAE – TRIS-acetát EDTA

TAT – twin arginin translocation

Tris - trisaminomethan

TS – thymidylát syntáza

2 ÚVOD

Pro purifikaci heterologně produkovaných proteinů se dá použít několika způsobů. Jedním způsobem je použití inteinové sekvence. Inteinová sekvence je afinitní značka, která má tu výhodu, že ji není třeba ze vzorku odstraňovat manuálně. Inteinová sekvence je totiž schopna samostatného sestřihu a následné ligace sousedících částí.

3 CÍL PRÁCE

Vypracování literární rešerše na téma heterologní exprese proteinů a využití stabilizačních sekvencí se zaměřením na inteiny.

Klonování plasmidu nesoucí gen zájmu zřezovaný s inteinovou sekvencí

Funkční ověření připraveného vektoru v *E. coli* – transformace, heterologní exprese, purifikace a detekce proteinového produktu

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Proteiny je možné heterologně exprimovat v několika typech buněk. Buďto v buňkách bakteriálních (z pravidla laboratorní kmeny druhu *Escherichia coli*) nebo kvasinkových, ale heterologně exprimované proteiny lze také izolovat z buněk savčích nebo buněk transgenních rostlin. Před samotnou expresí je nejprve nutné gen kódující cílový protein inkorporovat do genomu rekombinantního organismu nebo ho vnést do organismu na autonomně se replikujícím vektoru. K tomuto slouží metody molekulárního klonování.

4.1 Metody molekulárního klonování

4.1.1 Obecné vlastnosti klonovacích vektorů

Podstatou molekulárního klonování a exprese heterologního proteinu v bakteriích je vnesení genu kódující cílový protein do expresního vektoru. Ke klonování se používají různé typy vektorů, ale všechny musejí splňovat stejné podmínky. Klonovací vektor musí být schopný replikovat sebe a vložený DNA segment autonomně, nezávisle na genomu hostitelského mikroorganismu.

Vektor musí obsahovat buď mnohočetné klonovací místo (tzv. polylinker), které je možné specifickými restrikčními endonukleázami otevřít a inkorporovat do něj sekvenci zájmu nebo krátké sekvence umožňující rekombinaci klonovaného genu ohraničeného sekvencemi komplementárními (např. GATEWAY® klonovací systém). Polylinker obsahuje vždy několik restrikčních míst pro různé endonukleázy. Pro úspěšnou ligaci sekvence zájmu do vektoru je nutné, aby lepidivé konce sekvence zájmu a lepidivé konce naštěpeného vektoru byly stejné, tj. je třeba použít stejné restrikční endonukleázy.

Přenos vektoru do hostitelské buňky není vždy stoprocentní, a proto je třeba transformované buňky odlišit od netransformovaných. Jako jedna z možností selekce se používá přítomnost genu pro resistance k antibiotikům, které nejsou v hostitelské buňce běžně přítomny. Není-li transformace úspěšná, geny pro resistenci nejsou přítomny a buňky nevyrostou na selekčním médiu obsahující dané antibiotikum.

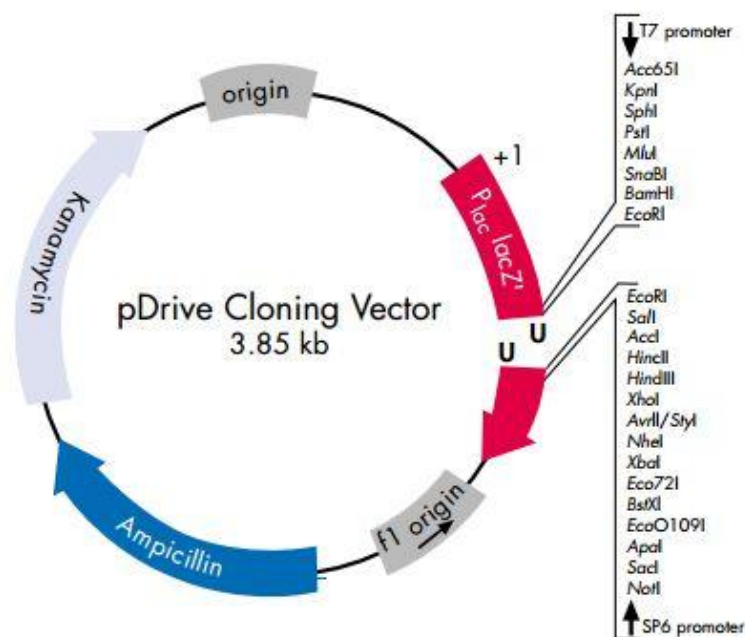
4.1.2 Plasmidové vektory

Plasmidové vektory jsou nejpoužívanějším typem vektorů. Jejich výhodami je jejich jednoduchý a levný způsob izolace a jejich schopnost replikovat se v hostitelské buňce do

vysokého počtu kopií. Jejich přítomnost a replikace v buňce navíc není pro buňku letální, na rozdíl od kosmidů. Jejich velikost je různá, v rozsahu několika tisíc páru bazí až do několika stovek kb. Jako hostitel pro plasmidy používané v molekulárně biologických metodách jsou používány bakterie druhu *E. coli*. Pro účely klonování je výhodnější používat plasmidy menší synteticky připravené než plasmidy běžně se vyskytující v bakteriálních buňkách.

Plasmidové molekuly musejí nést místo počátku replikace (zvané ORI: z anglického origin). Toto místo bývá zpravidla dlouhé 500 – 100 páru bazí. Enzymy hostitelské buňky se vážou na počátek replikace a umožňují tak i replikaci ligované sekvence zájmu. Schéma plasmidového vektoru je znázorněno na obrázku 1.

Obr. 1: Schéma plasmidového vektoru typu pDRIVE



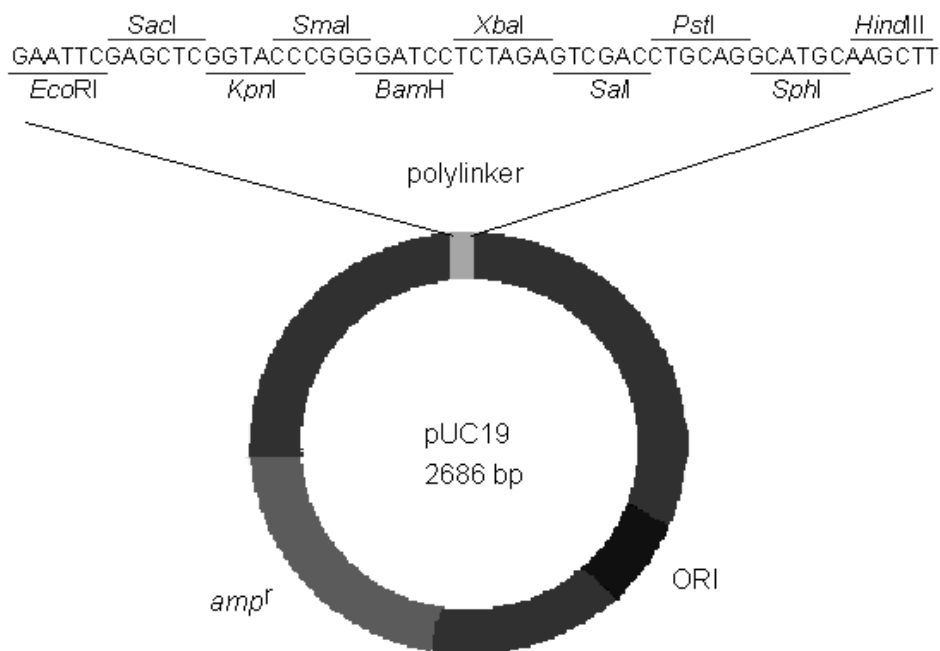
Červená šipka označuje sekvenci zodpovědnou za tvorbu beta-galaktosidázy. U/U označuje místo polylinkeru. Modré šipky s označením Ampicilin a Kanamycin označují umístění sekvence pro resistance k těmto antibiotikům. Origin značí počátek replikace a f1 origin označuje jiný typ replikačního počátku, odvozeného od bakteriofága.

Převzato z <https://www.qiagen.com/es/resources/resourcedetail?id=4d546584-2550-4806-a663-995fef1431d9&lang=en>

4.1.2.1 Polylinker

Mnohočetné klonovací místo (dále MCS – multiple cloning site) se za normálních okolností v plasmidu nevyskytuje. Jedná se o sekvenci vytvořenou uměle a inkorporovanou například do místa genu exprimujícího beta podjednotku beta-galaktosidázy (v případě plasmidů ze série pUC). MCS může nést desítky restrikčních míst, každé pro jiný typ restrikční endonukleázy. Takto vysoký počet restrikčních míst umožňuje přesný výběr velikosti a obsahu (co do konkrétní sekvence nukleotidů) fragmentu DNA, který nese klonovaný gen zájmu. Tento výběr je dán výběrem konkrétního místa na sekvenci zájmu a poté identického místa v plasmidové DNA a tak docílení kompatibilních lepivých konců.

Obr. 2: Schéma znázorňující příklad sekvence nukleotidů a rozložení restrikčních míst v místě polylinkeru u plasmidu typu pUC19



ORI značí místo počátku replikace, amp^r místo genu pro resistenci k ampicilinu.

Převzato z: <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch9A4.htm>

4.1.2.2 Replikace a šíření plasmidu v populaci

Replikace plasmidu je iniciována v místě počátku replikace (ORI). Plasmid sám nenese žádné geny, zodpovědné za expresi replikačních enzymů, proto je jeho replikace zcela závislá na hostitelském genomu. Důležitým proteinem je iniciační hostitelský faktor (IHF). Tento protein se naváže v místě počátku a umožňuje nasedání transkripčních proteinů. Sekvence

počátku replikace je bohatá na A-T báze z důvodu snadné denaturace dvou vodíkových vazeb a rozvolnění dvoušroubovice DNA.

ORI sekvencí je několik typů a liší se zejména mírou replikace. Morgan K. (2014) uvádí příklad, kde ORI plasmidu pMB1 zajišťuje pouze 20 kopií na buňku, zatímco u plasmidu pUC až 700. Přitom se ORI těchto dvou plasmidů liší pouze ve dvou bazích.

Počet kopií plasmidu ovlivňují i jiné faktory. Zejména velikost inzertu a také to, jestli se nejedná o produkt pro hostitelskou buňku toxický. Dále pak kmen buněk (jde-li o bakterie) a kultivační podmínky.

V nativních podmínkách dochází mezi bakteriemi ke konjugaci, kdy si předávají jednotlivé plasmidy. Tímto způsobem se v populaci šíří resistance k antibiotikům a jiné geny důležité pro přežití. U klonovacích vektorů přenos konjugací ve většině případů nenastává (kromě přenosu plasmidu z *Agrobacterium tumefaciens* do rostlinných buněk). Trieu-Cot, P. *et al.* (1987) však objevili způsob, jak umožnit přenos plasmidů, běžně nepodléhajících konjugaci, mezi *E. coli* a různými gram-pozitivními bakteriemi. Vektor, který vyvinuli, nese označení pAT187 a má počátek replikace z plasmidu pBR332 a ze streptokokálního plasmidu pAM β 1, který má široký okruh hostitelů. Dále nese gen pro resistenci vůči kanamycinu, který se vyskytuje jak u gram-negativních, tak u gram-pozitivních bakterií. Místo počátku přenosu (ORI_t – origin of transfer), důležité pro zahájení přenosu konjugací, má z plasmidu pRK212.1, který je sám schopen přenosu.

4.2 Bakteriální expresní systémy

Pro heterologní expresi proteinů se nejčastěji používají bakteriální hostitelské buňky, zejména druhu *Escherichia coli*. Tyto buňky mají několik výhod, zejména nízkou finanční náročnost celého expresního procesu, vysokou míru proliferace a nízkou míru mutací. Mezi nevýhody patří absence eukaryotních posttranslačních mechanismů a tendence tvořit látky lipoproteinové povahy (často označované jako endotoxiny) a tak kontaminovat exprimovaný protein. Exprimovaný protein je buď sekretován do cytoplasmy, uzavřen v inkluzních tělískách, nebo do periplasmy.

4.2.1 Sekrece proteinů do inkluzních tělísek

Inkluzní tělíška jsou částice válcovitého či vejčitého tvaru, o objemu asi $2 \mu\text{m}^3$, pozorovatelné světelným mikroskopem (Carrió *et al.* 1998). Většina z nich se nachází v prostoru cytoplasmy, některé, jako například tělíška nesoucí β -laktamázu, se však mohou nacházet i v periplasmatickém prostoru (Georgiou *et al.* 1998). Jsou velmi hydratované a vykazují porézní strukturu. Jejich výhodou je snadný způsob purifikace rekombinantního proteinu zájmu a fakt, že proteiny uzavřeny v inkluzních tělískách jsou při purifikaci prostorově izolovány od homogenátu lyzovaných bakteriálních buněk.

Jednou z nevýhod sekrece proteinů do inkluzních tělísek je přítomnost chaperonů. Carrió a Villaverde (2002) objevili dva typy chaperonů, které pojmenovali DnaK a GroEL. Tyto chaperony zásadním způsobem denaturují rekombinantní protein a ten je třeba při purifikaci znovu poskládat (anglicky „refold“), aby se dosáhlo nativní konformace. Tento jev však svým způsobem unikátní, neboť chaperony obecně naopak pomáhají při skládání proteinu.

Dalším mechanismem obrany bakteriální buňky proti rekombinantním proteinům je působení proteáz. Proteázová aktivita je někdy součástí samotných chaperonů. Huang *et al.* (2001) spekulují o tom, jestli je výběr folding/proteáza zcela náhodný, jestli se bakterie rozhodne pro spuštění proteolytických pochodu až po neúspěšném foldingu pomocí chaperonů a nebo jestli o použité strategii rozhoduje specifická sekvence na rekombinantním proteinu. Inhibice proteázového systému vede ke zvýšené agregaci proteinů a ke tvorbě větších inkluzních tělísek (Corchero *et al.* 1996).

4.2.1.1 Metody získání proteinů z inkluzních tělísek

Singh, S. M. a Panda, A. K. ve své práci o získávání proteinů z inkluzních tělísek z roku 2005 uvádějí, že tradiční postup získání nativního proteinu z inkluzních tělísek zahrnuje izolaci inkluzních tělísek z bakteriální buňky, solubilizaci proteinových agregátů, refolding a purifikaci rozpustných proteinů. Inkluzní tělíška jsou často separovány od bakteriálního lyzátu centrifugací. Proteinové agregáty jsou poté solubilizovány pomocí chaotropních látek, jako například močovina o koncentraci 6-8 mol/l nebo detergentů jako je SDS. Refolding proteinů probíhá během odstranění chaotropních látek za působení renaturačního pufru. Složení renaturačního pufru závisí na povaze proteinu. Obsahuje-li protein disulfidové vazby, je třeba do pufru zahrnout jak oxidační, tak redukční činidla (Vallejo, L. F. a Rinas, U. 2004). Jedním ze způsobů oxidace je přidání směsi oxidovaných a redukovaných látek thiolové povahy, jako například glutathion, cystein nebo cystamin o koncentracích 5-15 mmol/l s poměrem oxidovaných sloučenin ku redukovaným 1:1 až 5:1 (Rudolph, R. a Lillie, L. 1996).

4.2.2 Sekrece proteinů do periplasmy a mimo buňku.

Většina proteinů, které mají být sekretovány ven z buňky skončí v periplasmatickém prostoru. Mezi výhody sekrece proteinů do periplasmatického prostoru patří možnost tvorby disulfidických vazeb, díky oxidujícímu prostředí, dále pak snížená míra proteolytických procesů a možnost tvorby rekombinantních proteinů, které by byly v cytoplasmě pro buňku toxické. Nejzákladnějším sekrečním systémem jsou Sec a Tat dráhy (Natale, P. *et al.* 2008).

Sec (general secretion) sekreční dráha transportuje proteiny zejména v jejich nesloženém stavu. Tat dráha (Twin arginin translocation) naproti tomu sekretuje složené proteiny (Robinson, C. a Bolhuis, A. 2004). Signální sekvencí pro Tat dráhu jsou dva argininy na N konci složeného proteinu (Müller, M. 2005). U gram pozitivních bakterií jako je např. *Bacillus subtilis* jsou některé proteiny transportovány Tat dráhou vně buňky, zatímco u gram negativních bakterií zůstávají v periplasmatickém prostoru.

4.3 Purifikace pomocí inteinových sekvencí.

Pro purifikaci proteinů se běžně používají afinitní značky. Fungují tím způsobem, že umožňují vychytávání cílového proteinu, s kterým jsou zfužovány, s afinitním sorbentem a tímto způsobem protein izolovat od proteinového pozadí vzorku. Jedním příkladem je polyhistidinová značka, která se skládá z šesti po sobě jdoucích histidinových zbytků (Lilius, G. *et al.* 1991). Histidin tvoří koordinační vazbu s ionty přechodných kovů, jako např. Co^{2+} , Cu^{2+} nebo Ni^{2+} . Tyto ionty jsou součástí sorbentu v chromatografické koloně a po nanesení vzorku se na klonu zachytí pouze protein obsahující histidinovou značku. Dalším příkladem je maltosa-vazebná doména, která proteinu umožňuje být zachycen na amylosové koloně. Nevýhodou těchto značek je, že aby byl získán nativní protein, tak je třeba po purifikaci ještě odstranit samotnou značku. Řešením tohoto problému je použití inteinových sekvencí.

Intein (INTervening proteIN) je úsek uvnitř proteinové sekvence, který je schopen sám sebe vystříhnout (Perler, F.B. *et al.* 1994). Při běžné purifikaci proteinů je třeba odstranit purifikační značku pomocí proteasových systémů. Inteinové sekvence však umožňují odstranění nežádoucích částí bez jakéhokoliv vnějšího zásahu dalšího proteinu. Po vyštěpení inteinové sekvence dojde automaticky k ligaci (vytvoření peptidové vazby) dvou postranních částí, které intein obklopovaly (tyto části jsou zvané exteiny) (Volkman, G. *et al.* 2012).

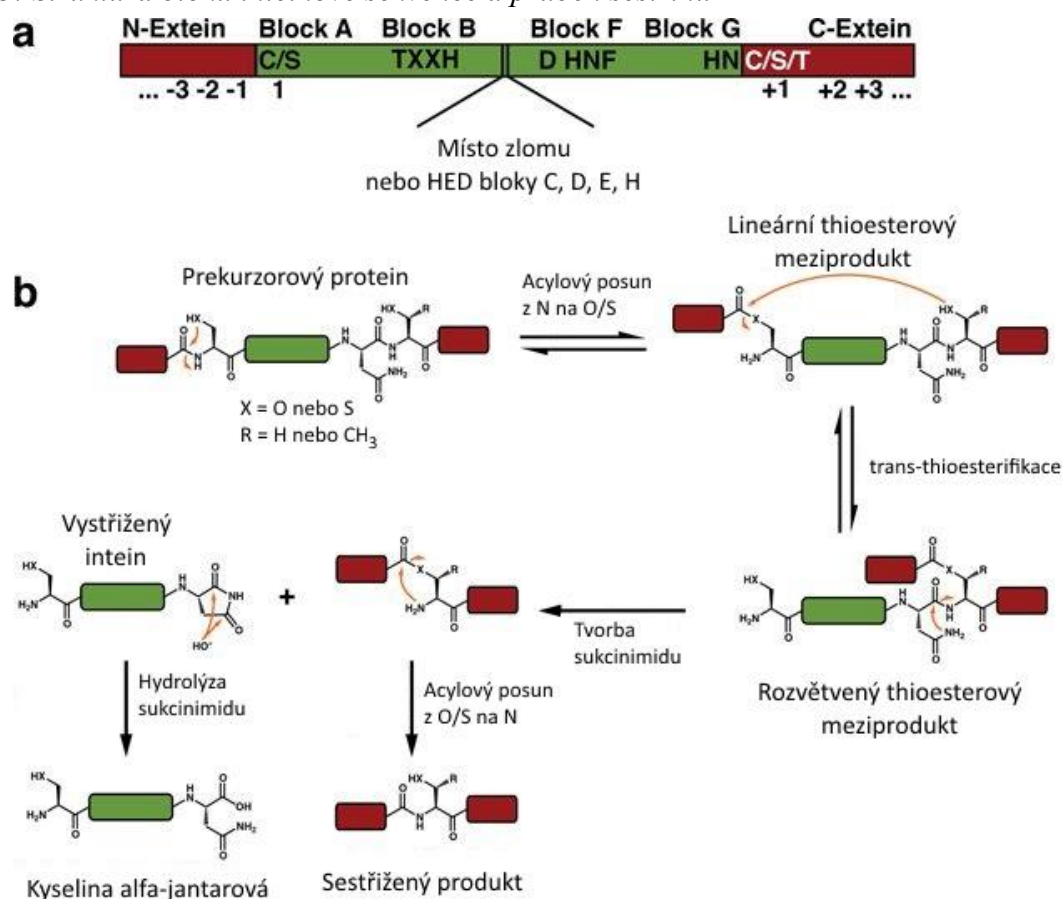
Existuje teorie, že inteiny nemají pro organismus žádný biologický význam, a že jde v podstatě o sobecké elementy DNA (Shaha, N. H. *et al.* 2014). Nacházejí se v proteinech esenciálních pro replikaci, transkripci a údržbu DNA a to zejména v oblastech kolem aktivního místa enzymu nebo receptor-ligand vazebného místa (Petrokovski, S. *et al.* 2001). Neexistuje však důkaz, že by jejich přítomnost poskytovala hostitelskému organismu vyšší fitness oproti organismu bez inteinových sekvencí.

4.3.1 Struktura inteinu a princip sestřihu exteinů

Principem sestřihu inteinů je tvorba peptidové vazby mezi dvěma exteiny. Před samotným vznikem vazby však musí dojít k aktivaci peptidové vazby spojující N-extein a N-konec inteinu. Tento proces se označuje jako acylový posun a dochází při něm k atakování dusíku z peptidové vazby sírou nebo kyslíkem cysteinu, nebo serinu z řetězce inteinu (část inteinu obsahující cystein nebo serin se označuje jako blok A). Acylový posun je umožněn přítomností takzvaného TXXH motivu, kde T označuje treonin, H histidin a X

libovolnou aminokyselinu. Tento motiv se nachází v bloku B. V acylovém posunu hraje roli i blok F, konkrétně v něm se nacházející kyselina asparagová. THHX motiv a aspartát spolu reagují za vzniku lineárního thioesterového meziprojektu. Poté následuje thioesterifikace nukleofilním atakem prvního aminokyselinového zbytku C-exteinu, na kterém se nachází cystein, serin, nebo treonin. Výsledný thioesterový meziprojekt je cyklizován pomocí asparaginu na C-konci inteinu. Tomu napomáhá histidin vyskytující se v bloku F a bloku G. Výsledkem reakce je vystřížení inteinu ve formě imidu kyseliny jantarové a dva exteiny spojené, ne však ještě peptidovou vazbou. Peptidová vazba vzniká poté samovolně (Frutos, S. *et al.* 2010). Inteín je samovolně hydrolyzován do α nebo β isomeru derivátu kyseliny jantarové. Pro schéma rozložení bloků a průběh sestřihu viz obrázek 3.

Obr. 3: Struktura bloků inteinové sekvence a průběh sestřihu



A – Rozložení bloků v inteinové sekvenci. Čísla označují způsob číslování pozic aminokyselin. Písmena označují aminokyseliny podle standardního názvosloví.

B – Průběh reakce sestřihu, při které dochází k vyštěpení inteinu z prekursorového proteinu za vzniku sestřizovaného exteinu a derivátu kyseliny jantarové (alfa nebo beta isomeru).

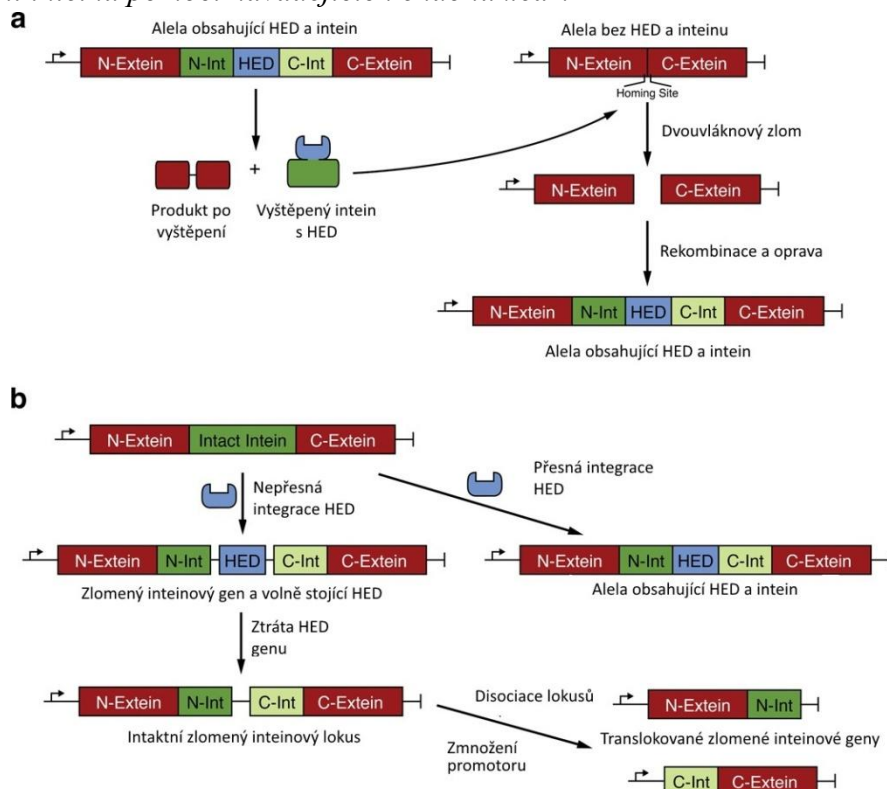
Převzato a přeloženo z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3949740/>

4.3.2 Šíření inteinů v organismu

Petrokovski, S. *et al.* (2001) uvádí 4 důvody, podle kterých dokazuje to, že inteiny se nepřenášejí pouze vertikálně z rodiče na potomka, ale i horizontálně v rámci genomu jednoho jedince nebo více jedinců, a že v rámci přenosu může dojít i k jejich ztrátě: 1) Inteiny jsou integrovány v mnoha typech proteinů. 2) U příbuzného organismu, geny ortologní ke genům původního organismu inteiny nést nemusí. 3) Během evoluce došlo k jejich vymizení a mnohobuněčné organismy inteiny nemají vůbec. 4) Alelické geny inteinů (integrované do stejného místa ortologních genů) obvykle vykazují vyšší homologii než jejich hostitelské geny.

Většina inteinů obsahuje speciální HED doménu (homing endonuclease domain – navádějící endonukleáza). HED zajišťují dvouvláknový zlom na specifickém místě, které neobsahuje inteinovou nebo HED sekvenci hostitelského genu. Tímto je zajištěna integrace genu inteinu do nového genu. Po začlenění inteinu do cílové sekvence je HED doména odstraněna a dochází ke zlomu inteinové sekvence. Znázorněno na obrázku 4.

Obr. 4: Šíření inteinů pomocí navádějících endonukleáz.



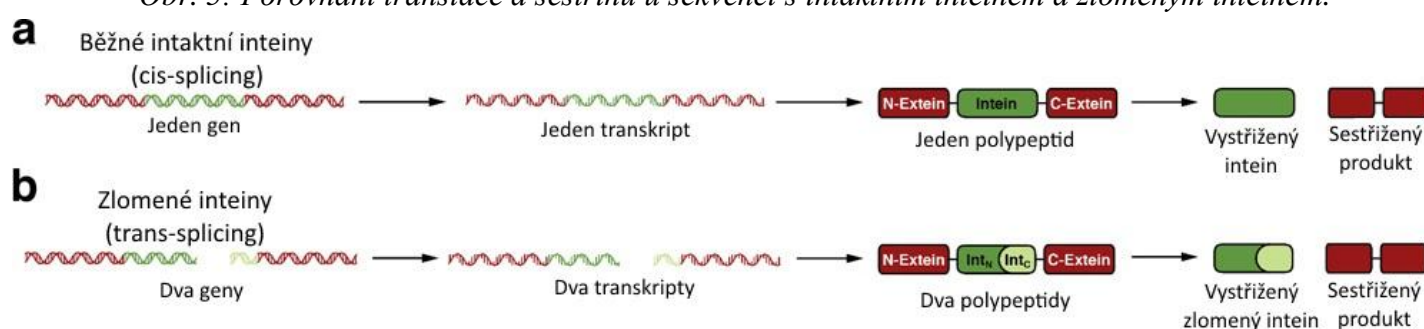
A – aktivita navádějící endonukleázy za účelem přeměny alely bez inteinu na alelu obsahující intein. B – Navrhovaný mechanismus štěpení inteinu důsledkem aberantní navádějící endonukleázy následovaný chromozomálním přesmykem. (Dassa, B. *et al.* 2009).

Převzato a přeloženo z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3949740/>

4.3.3 Zlom inteinové sekvence

Většina genů obsahujících inteiny se vyskytuje v intaktním stavu. Malé množství (asi 5 % známých inteinů) se však vyskytuje a je transkribován ve formě dvou rozdílných polypeptidů: N-intein a C-intein, z nichž každý je zfuzován s jedním exteinem (Perler, F. B. 2002). Při translaci dojde k nekovalentní vazbě N a C inteinů dohromady. Translace intaktních sekvencí obsahující intein se označuje jako *cis-splicing* a u translace sekvencí, u kterých došlo ke zlomu, hovoříme o procesu *trans-splicing*. Viz obrázek 5.

Obr. 5: Porovnání translace a sestřihu u sekvencí s intaktním inteinem a zlomeným inteinem.



A- Sekvence s intaktním inteinem se chová jako jeden gen a dává vzniku jednomu produktu.

B – sekvence se zlomeným inteinem se chová jako dva geny a produkuje dva polypeptidy, které jsou však na konci procesu spojeny do jednoho.

Převzato a přeloženo z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3949740/>

4.3.4 Využití inteinových sekvencí v purifikaci proteinů

4.3.4.1 Mutagenese aminokyselinových motivů

Pro sestřih inteinů není přítomnost HED nutná. Delecí této domény jsou vytvořeny mini inteiny se sníženou, ale přesnou aktivitou sestřihu (Derbyshire, V. *et al.* 1997). Pro znovuzískání vysoké aktivity navrhuje Chong, S. *et al.* (1999) mutaci konzervovaných aminokyselinových motivů. Tyto mutace regulují aktivitu inteinu vytvářet zlom na jednom nebo obou koncích inteinové sekvence (místo styku s exteinem). I tyto mutace však vedly k nízké aktivitě, špatné stabilitě prekurzorového proteinu nebo nerozpustnosti (Shingledecker, K., *et al.* 1998). Wood, D. W. *et al.* (1999) provedli sérii pokusů, při které hledali mutovaný mini-intein s dostatečnou aktivitou. Protein, zfuzovaný s inteinem byl enzym thymidylát syntáza (dále TS). Tento enzym umožňuje selekci takovým způsobem, že *E. coli* bez TS není

schopná růst na médiu s deficiencí thyminu (Belfort, M. 1984). Konstrukt byl navržen tak, aby jen ty proteiny, u kterých došlo k sestřihu inteinu, měly aktivní TS. Bakterie obsahující tento konstrukt rostly na médiu s deficiencí thyminu při 37 °C. Pokus probíhal tak, že nechali fuzní proteiny náhodně mutovat, a ty bakterie, které na médiu rostly, byly odebrány a intein byl osekvenován. Jedním z funkčních mutovaných mini-inteinů byl intein obsahující mutaci valinu v pozici 67 na leucin. Právě tyto mutované mini-inteiny, bez HED sekvence, jsou používány v dalších purifikačních metodách.

4.3.4.2 Purifikace pomocí afinitních značek

Samoštěpící vlastnost inteinů umožňuje efektivní využití různých afinitních značek. Tato značka je navázána buď na C-konec nebo na N-konec a může být odštěpena od cílového proteinu pryč, a to bez nutnosti působení proteáz. Další výhodou je to, že štěpící reakce může proběhnout na afinitní koloně a značka spolu s inteinem může být ze vzorku vymyta (Banki, M. R. *et al.* 2005).

Příkladem systému využívajícího tohoto mechanismu je systém vyvinutý firmou New England Biolabs (NEB). Intein jimi vyvinutý je založen na inteinu kvasinkové podjednotky A vakuolární ATPázy (Chong, S. *et al.* 1997). Tento intein umožňuje navázání proteinu zájmu na N-konec a jeho odštěpení za působení 30 mmol/l DTT (1,4-dithiotreitol) nebo β -merkaptoetanolu, a to za širokého rozpětí pH 5,5-9,0. Jako afinitní značka je použita chitin vazebná doména. Tento systém označila firma NEB jako IMPACT. Nově NEB dodává i systém IMPACT-CN, který umožňuje vazbu proteinu zájmu i na C-konec.

4.3.4.3 PHB systém

Polyhydroxybutyráty (PHB) jsou typem biodegradovatelných polymerů produkovaných různými organismy za účelem ukládání nadbytečného uhlíku při absenci kyslíku, dusíku nebo fosforu (Slater, S. *et al.* 1992). Po expresi zaujímají PHB tvar malých granulí, a jejich tvorba závisí na organismu, zdroji uhlíku a míře exprese proteinů fasinů (Wieczorek, R. *et al.* 1995). Banki, M. R. *et al.* (2005) využili afinity fasinových proteinů k PHB a vyvinuli nový purifikační systém. Principem je to, že expresní buňka nese dva plasmidy: jeden na expresi genů syntetizujících PHB a druhý na expresi proteinu zájmu, zfuzovaného s fasinovou značkou a inteinem. Vysoká molekulová hmotnost PHB granulí umožňuje jejich izolaci a purifikaci navázaného cílového proteinu, který je ještě sám purifikován sestřihem inteinu.

Právě sestřih inteinu, a takto odstraněné fasinové značky, zajistí separaci cílového proteinu z PHB granulí. Tento systém je komerčně dostupný díky ne moc obtížné syntéze PHB granulí z levných zdrojů uhlíku, jako například glukózy nebo kyseliny mléčné.

4.3.4.4 *Samoštěpící fúzní sekvence inteinů a elastinů*

Banki, M. R. *et al.* (2005) navrhuje metodu purifikace proteinů pomocí samoštěpících sekvencí na bázi elastinu a inteinu. Purifikace tímto způsobem nevyžaduje použití afinitních značek nebo purifikaci pomocí afinitní chromatografie.

Tyto samoštěpící sekvence se skládají ze dvou domén. Jednou z nich je peptid na bázi elastinu (dále ELP – elastin-like peptide). Jedná se o repetitivní sekvenci pěti aminokyselin, VPGXG, kde X označuje jakoukoliv aminokyselinu kromě prolinu. Schopnost ELP je reversibilní precipitace po zahřátí na určitou teplotu, a sice 30-40 °C (McPherson, D.T. *et al.* 1992). Tato teplota se označuje jako teplota fázové tranzice (T_t) a závisí na relativní molekulární hmotnosti ELP a může být i ovlivněna koncentrací solí nebo vlastnostmi doprovodných fúzních proteinů (Trabbic-Carlson, K. *et al.* 2004).

ELP je zřezávána se samoštěpícím inteinem a po navázání na genovou sekvenci zájmu je konstrukt exprimován v *E. coli*. Při izolaci produktu z bakteriálních buněk centrifugací je teplota držena pod T_t , aby byl produkt rozpuštěn v médiu. Poté dojde k zahřátí nad T_t za přítomnosti solí, čímž dojde ke konformační změně ELP a následné precipitaci produktu. Tato změna rozpustnosti ovlivňuje jen ELP a ne ostatní domény konstruktů. Precipitovaný ELP může být následně separován od zbytku konstruktů pomocí druhé centrifugační fáze a znovu rozpuštěn v pufru o pH 6,0 za nízké teploty. Následně dojde k automatickému vystřížení inteinové sekvence, která se dá poté ze vzorku úplně odstranit další centrifugací, přidáním solí a zahřátím. Výsledkem je čistý protein v nativním stavu.

Banki, M. R. *et al.* (2005) touto metodou purifikovali chloramfenikol acetyl transferázu zřezávanou s ELP a inteinem. Došli k tomu, že přítomnost ELP motivu sice snižuje bakteriální růst, nicméně při 18 °C naopak docházelo k velmi silné expresi, a to i bez indukce. Po centrifugaci lyzovaných buněk přidali NaCl do koncentrace 2,5 mol/l a lyzát zahřáli na 30 °C. Po další centrifugaci nanесли supernatant na polyakrylamidový gel a zjistili, že obsah fúzního proteinu v supernatantu je velmi nízký. To naznačuje, že změnou teploty a vysolením

došlo k precipitaci fuzního proteinu a jeho sedimentaci. Pro srovnání purifikovali touto metodou několik dalších proteinů.

5 MATERIÁL A METODA

5.1 Biologický materiál

Escherichia coli kmen TOP10

Escherichia coli kmen BL21 Star

Escherichia coli kmen BL21(DE3)pLysS

5.2 Chemikálie

Agar: Merck Millipore, Německo

Agaróza: Amresco, USA

Coomassie brilliant blue R-250: Sigma-Aldrich, USA

Dihydrogenfosforečnan draselný: Sigma-Aldrich, USA

DTT: Sigma-Aldrich, USA

Dusičnan stříbrný: NeoLab, Německo

Ethanol: LachNer, Česká republika

Ethidium bromid: NeoLab, Německo

Formaldehyd: LachNer, Česká republika

Hydrogenfosforečnan disodný: Sigma-Aldrich, USA

Hydroxid sodný: Penta, Česká republika

Chlorid draselný: Sigma-Aldrich, USA

Chlorid hořečnatý: Promega, USA

Chlorid sodný: Sigma-Aldrich, USA

IPTG: Duchefa, Nizozemsko

Kvasinkový extrakt: Sigma-Aldrich, USA

Ledová kyselina octová: LachNer, Česká republika

Methanol: LachNer, Česká republika

Na-HEPES: Roth, Německo

EDTA: Penta, Česká republika

Glycerol: LachNer, Česká republika

Síran hořečnatý: Penta, Česká republika

Thiosíran sodný: Lachema, Česká republika

Tris-HCl: Duchefa, Nizozemsko

Triton-X: Sigma-Aldrich, USA

Trypton: Duchefa, Nizozemsko
Uhličitan sodný: NeoLab, Německo
Voda bez obsahu nukleáz: QIAGEN, USA
 β -merkapt ethanol: Sigma-Aldrich, USA

5.3 Enzymy, příslušné pufrы a komponenty pro molekulární biologii

BseYI: NEB, USA
Kanamycin: Duchefa, Nizozemsko
NcoI: New England Biolabs, USA
pET28b+ vektor: Novagen, USA
Restrikční pufr 3.1 10 \times : NEB, USA. Složení: 100 mmol/l NaCl, 50 mmol/l Tris-HCl, 10 mmol/l MgCl₂, 100 μ g/ml BSA, pH 7,9
T4 DNA ligáza, 1 U/ μ l: ThermoFisher Scientific, USA
T4 ligační pufr, 10 \times : ThermoFisher Scientific, USA. Složení: 400 mmol/l Tris-HCl, 100 mmol/l MgCl₂, 100 mmol/l DTT, 5 mmol/l ATP
XhoI: NEB, USA

5.4 Použité kity

QIAprep Spin Miniprep Kit: QIAGEN, Německo

Obsah kitu: P1 pufr: 50 mmol/l Tris-HCl pH 8,0, 10 mmol/l EDTA, 100 μ g/ml RNáza A
P2 pufr: 200 mmol/l NaOH, 1 % SDS
N3 pufr: 4,2 mol/l Gu-HCl, 0,9 mol/l octan draselný, celkové pH 4,8
PB pufr: 5 mol/l Gu-HCl, 30 % isopropanol
PE pufr: 10 mmol/l Tris-HCl pH 7,5, 80 % etanol
EB pufr: 10 mmol/l Tris-HCl pH 8,5

IMPACT Kit: NEB, USA

Obsah kitu: chitinová matrice, 1 mol/l DTT

Bolt Mini Gels: ThermoFisher Scientific, USA

Obsah kitu: dvanáctijamkový polyakrylamidový gel

Bolt LDS nanášecí pufr 4 \times : 106 mmol/l Tris-HCl, 141 mmol/l Tris, 2 % LDS,
10 % glycerol, 0,51 mmol/l EDTA, 0,22 mmol/l SERVA blue G250, 0,175
mmol/l fenolová červeň, celkové pH 8,5
Bolt redukční činidlo 10 \times : 500 mmol/l DTT

MES elektrodový pufr 20×: 50 mmol/l MES, 50 mmol/l Tris, 0,1 % SDS, 1 mmol/l EDTA, celkové pH 7,3

5.5 Přístroje

Analytické váhy: ABT, Kern, Německo

Elektroforetická vana vertikální: Mini Gel Tank, ThermoFisher Scientific, USA

Elektroporační stanice: Personal Electroporation Pak ECM399, BTX, Velká Británie

Chlazená centrifuga: 5810R, Eppendorf, Německo

Laboratorní váhy: Mark S Bel balance, BEL, Itálie

Laminární box s vertikálním prouděním: Merci, Česká republika

Mini centrifuga/vortex: Combi-spin FVL-2400N, Biosan, Lotyšsko

Oběhová plošinová třepačka: Unimax 1010, Heidolph, Německo

pH metr: 3505, Jenway, Velká Británie

Stolní centrifuga chlazená: ScanSpeed 1730R, Labogene, Dánsko

Stolní centrifuga: 5427R, Eppendorf, Německo

Sušárna horkovzdušná: Memmert, Verkon, Česká republika

Temperovaná suchá lázeň: Cool-hotter, Alex Red, Israel

Transiluminátor: Gel Doc EZ, Biorad, USA

Ultrazvukový homogenizátor: 3000MP, BioLogics, USA

UV/VIS spektrofotometr: Agilent, USA

5.6 Roztoky

Kolonový pufr: 20 mmol/l Na-HEPES pH 8,5, 500 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 0,1-0,5 % Triton-X

LB agar: do 1 l LB média 12 g práškového agaru

LB médium: do 1 l 10 g tryptonu, 10 g NaCl, 5 g kvasinkového extraktu, pH 7,2

Marker 1kb+: ThermoFisher Scientific, USA

nanášecí DNA barvivo 6× (bromfenolová modř): ThermoFisher Scientific, USA

PBS pufr: do 1 l 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 KH₂PO₄ celkové pH 7,2

SDS vzorkový pufr 3×: 188 mmol/l Tris-HCl pH 6,8, 3 % SDS, 30 % glycerol, 0,01 % bromfenolová modř, 15 % β-merkptoethanol

SOC médium: 2 % trypton, 0,5 % kvasinkový extrakt, 10 mmol/l NaCl, 2,5 mmol/l KCl, 10 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l MgSO₄, 20 mmol/l glukóza

Stříhací pufr: 20 mmol/l Na-HEPES pH 8.5, 500 mmol/l NaCl, 50 mmol/l DTT, 1 mmol/l EDTA

TAE pufr 50×: do 1 l 242 g Tris-HCl, 57,1 ml ledové kyseliny octové a 19,61 g EDTA

5.7 Postupy

5.7.1 Transformace kompetentních bakteriálních buněk elektroporací

Roztok plasmidu (1 μ l) nebo ligační směs byla přidána do mikrozkušavky k elektrokompetentním buňkám *E. coli*. Vzorek byl promíchán a nechán 3 minuty odstát. Směs byla přidána do elektroporační kyvety a umístěna do elektroporační stanice. Transformace probíhala 3-5 ms při 1800V. Po transformaci bylo do kyvety přidáno 200 μ l SOC roztoku o teplotě 37 °C, směs byla promíchána a přenesena zpět do mikrozkušavky. Poté se transformované buňky umístily na třepačku na minimálně 30 minut při 37 °C.

5.7.2 Očkování bakterií na agarovou plotnu a do tekutého média

Narostlé buňky byly zaočkovány na LB-agarovou plotnu se selekčním tlakem v podobě kanamycinu. Očkování probíhalo tak, že z mikrozkušavky obsahující bakterie bylo odebráno 200 μ l suspenze a pomocí sterilní bakteriologické kličky rozetřeno na Petriho misku s LB-agarem. Zaočkované misky byly inkubovány přes noc při 37 °C. Po inkubaci se provedlo zaočkování do tekutého LB média (také s kanamycinem) tak, že z Petriho misky byla náhodně vybrána vždy jedna kolonie a ta pak pomocí párátko přenesena do 7 ml LB média ve skleněné zkumavce. Směs byla protřepána a umístěna přes noc na třepačku na 37 °C.

5.7.3 Izolace plasmidu

Před samotnou izolací plasmidu komerčním kitem byly bakterie centrifugovány 3 minuty při 13 000× g (všechny centrifugační kroky v tomto postupu jsou prováděny při 13 000× g). Centrifugace probíhala v mikrozkušavce do které bylo postupně přidáváno a po sedimentaci odléváno všech 7 ml inokulovaného média. LB médium bylo odlito a k bakteriím bylo přidáno 250 μ l pufru P1. Bakterie byly důkladně resuspendovány. K resuspendovaným buňkám bylo přidáno 250 μ l pufru P2 a obsah zkumavky byl ihned promíchán převrácením (4-6 krát). Lyzační reakce probíhala maximálně 5 minut. Poté bylo ke vzorku přidáno 350 μ l pufru N3 a obsah zkumavky byl ihned promíchán (4-6 krát). Směs byla poté centrifugována 10 minut. Supernatant byl aplikován na QIAprep spin kolonu a ta byla centrifugována 30-60 s. To, co proteklo, bylo vylito a do kolony bylo přidáno 500 μ l

pufu PB a směs byla opět 30-60 s centrifugována. Spodní fáze pod kolonou byla opět vylita, na kolonu bylo přidáno 750 μ l pufu PE a směs bylo znovu 30-60 s centrifugována. Po vylití spodní fáze byla centrifugace ještě jednou zopakována, aby došlo k odstranění veškerého pufu z frity. Kolona byla vyjmuta ze zkumavky a umístěna do čistého. Pro vymytí DNA bylo přidáno 20 μ l EB pufu, zkumavka se nechala stát 1 min a poté byla provedena centrifugace po dobu 1 min.

5.7.4 Restrikce

Restrikční reakce byla připravována do 20 μ l celkového objemu, z čehož 2 μ l zaujímal pufr 3.1, 1 μ l každý enzym (NcoI a XhoI) a do dvaceti μ l byl objem doplněn deionizovanou vodou. DNA do reakce bylo 1 μ g. Reakce probíhala 2-3 hodiny při 37 °C a následně byla po 10 minut zastavována při 70 °C.

5.7.5 Ligace

Ligační reakce se prováděla se vzorkem bezprostředně po restrikci. Složení reakce bylo následující: 20-100 ng linearizovaného plasmidového vektoru pET28b+, insertu (získaného z restrikční reakce) v poměru ku vektoru 1:1 nebo 5:1, 2 μ l ligačního pufu, 1 μ l ligázy a zbytek do dvaceti μ l vody bez obsahu nukleáz. Reakce probíhala přes noc při 16 °C.

5.7.6 Agarosová elektroforéza

Agarosová elektroforéza je prováděna s insertem zaklonovaným ve vektoru pET pro kontrolu úspěšnosti ligace. Gel byl složen z 1 % agarosy v TAE pufru. Po nalití gelu do elektroforetické vany bylo přidáno 7 μ l ethidium bromidu a gel byl důkladně promíchán. Před nanesením na gel bylo ke vzorkům přidáno nanášecí barvivo (na 20 μ l vzorku 3,33 μ l barviva). Byl použit marker o rozsahu 1kb+. Jako elektrodový pufr byl použit TAE pufr. Elektroforéza probíhala 20 minut za konstantního napětí 120 V.

5.7.7 Expres proteinu

Pro expresi proteinu bylo zaočkováno 50 ml LB média se selekčním tlakem v podobě kanamycinu. Objem inokulátu byl 200 μ l. Po inokulaci byly buněčné kultury umístěny na třepačku na 37 °C a po dosažení OD hodnoty alespoň 0,6 byly indukovány pomocí 0,4 mmol/l IPTG a teplota byla snížena na 18 °C. Takto byly kultury ponechány přes noc.

5.7.8 Purifikace pomocí ELP motivu

Po expresi byla buněčná suspenze centrifugována 15 minut na $5\,000\times g$ při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a supernatant byl vylit. Pelet byl rozpuštěn ve vychlazeném PBS pufru v poměru 35 ml pufru na množství peletu z 1 l buněčné kultury. Následně byly buňky za stálého chlazení na ledu ultrazvukem rozbity ve dvou třiminutových cyklech, kdy byl vždy ultrazvuk opakovaně 10 s zapnut, 20 s vypnut. Mezi cykly byla suspenze promíchána. Směs byla po lyzi opět centrifugována, tentokrát 15 minut na $18\,000\times g$ při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dále se pracovalo se supernatantem.

K supernatantu bylo přidáváno NaCl tak, aby výsledná koncentrace byla 3 mol/l. Vzorek není třeba v této fázi chladit. Poté byl vzorek centrifugován 15 minut na $18\,000\times g$ při laboratorní teplotě. Supernatant byl vylit.

Pelet byl resuspendován ve 3 ml PBS. Následovala další centrifugační fáze, 10 minut na $18\,000\times g$ při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po této centrifugační fázi byl pelet resuspendován opět v 3 ml PBS a mohl být analyzován na polyakrylamidovém gelu.

5.7.9 Purifikace pomocí chitin-vazebné domény

Po expresi bylo z buněčné suspenze odebráno 40 μl jako nepřečištěný extrakt. Zbytek buněčné suspenze byl po expresi centrifugován 15 minut na $5\,000\times g$ při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a supernatant byl vylit. Pelet byl rozpuštěn ve vychlazeném kolonovém pufru v poměru 100 ml pufru na množství peletu z 1 l buněčné kultury. Následně byly buňky za stálého chlazení na ledu ultrazvukem rozbity (stejným způsobem jako při purifikaci ELP motivu). Směs byla opět centrifugována, tentokrát 30 minut na $15\,000\times g$ při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dále se pracovalo se supernatantem.

Pro purifikaci pomocí chitin-vazebné domény byly použity chitinové kolony. Kolony byly připraveny tak, že do plastové kolony s širokým hrdlem bylo nanášeno 3 ml chitinové matrice a celá kolona byla následně promyta postupně deseti objemy kolonového pufru. (při třech mililitrech chitinové matrice šlo o 30 ml).

Vzorek byl nanášen na kolony a ponechán samovolně protékat. Vždy jak protekl, byla protečená fáze opět nanášena na kolonu. Tento proces byl opakován čtyřikrát. Protečená fáze byla uschována. Kolona byla následně promyta alespoň dvaceti objemy kolonového pufru.

Sestřih proteinu (oddělení cílového proteinu od úseku inteinu a chitin-vazebné domény) na koloně byl indukován promytím třemi objemy stříhacího pufru, s obsahem DTT. Při tomto kroku bylo použito vakuum na urychlení, neboť DTT nesmí moc dlouho interagovat s proteinem. Poté byl průtok uzavřen a kolony byly umístěny přes noc na 4 °C.

Pro eluci cílového proteinu byl použit kolonový pufr. Protein by měl být přítomen v několika prvních frakcích.

Pro regeneraci byly chitinové kolony promyty třemi objemy 0,3 mol/l NaOH, následně bylo na kolonách NaOH ponecháno po dobu 30 minut, poté byly kolony promyty sedmi objemy 0,3 mol/l NaOH, dvaceti objemy vody a pěti objemy kolonového pufru. Pro další použití jsou kolony umístěny na 4 °C s kolonovým pufrem s obsahem 0,02 % azidu sodného.

5.7.10 Polyakrylamidová elektroforéza

Před nanesením na polyakrylamidový gel byly vzorky smíchány s 5 µl Bolt LDS nanášecího pufru, 2 µl Bolt redukčního činidla a objem byl doplněn do 20 µl deionizovanou vodou. Proteinu v reakci bylo 0,2 µg. Následně byly vzorky 10 minut zahřívány na 70 °C. Jako elektroodový pufr byl použit MES pufr. Elektroforéza probíhala 40 minut za stálého napětí 200 V.

5.7.11 Barvení gelu pomocí stříbra

Po provedení polyakrylamidové elektroforézy je možné gel barvit pomocí stříbra. Všechny následující kroky probíhají za laboratorní teploty a za stálého míchání. Nejprve je gel 30 minut fixován v roztoku obsahující 50 % ethanol a 10 % kyseliny octovou. Dále je gel 15 minut inkubován v roztoku pěti procentního ethanolu a jednoprocenní kyseliny octové. Dalším krokem je vymytí inkubačního roztoku deionizovanou vodou, a to třikrát po sobě po dobu pěti minut. Následuje jednominutová inkubace v čerstvě připraveném $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,05 g v 250 ml dH_2O). Poté byl gel promýván třikrát po sobě po 30 sekund deionizovanou vodou. Následně byl gel 20 minut inkubován v roztoku AgNO_3 (0,2 g v 100 ml dH_2O) se 75 µl 37 % formaldehydu. Následovalo důkladné vymytí dusičnanu stříbrného deionizovanou vodou. Posledním krokem je umístění gelu do 100 ml vývojky, která se skládá z 6 g Na_2CO_3 , 50 µl 37% formaldehydu a 2 ml již předtím používaného roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Po zviditelnění proteinů byla reakce zastavena umístěním gelu do 5 % kyseliny octové.

5.7.12 Barvení gelu pomocí Coomassie brilliant blue

Pro obarvení polyakrylamidového gelu pomocí Coomassie brilliant blue je gel nejprve přes noc fixován v roztoku obsahující 50 % methanol a 10 % kyselinu octovou za stálého míchání. Následně byl gel 20 minut barven v roztoku obsahujícím 50 % methanol, 10 % kyselinu octovou a 0,1 % Coomassie brilliant blue R-250. Gel se po tomto kroku zbarví do modra. Pro odbarvení byl gel umístěn do roztoku obsahujícího 40 % metanol a 10 % kyselinu octovou. V tomto roztoku byl ponechán, dokud se pozadí zcela neodbarvilo a nezbyly jen proteinové signály. Nakonec byl gel umístěn do 5 % kyseliny octové.

6 VÝSLEDKY

6.1 Použité konstrukty

Nejprve byly firmou GeneArt navrženy dva konstrukty. Tyto konstrukty byly označeny jako Strategie I a Strategie II. Oba konstrukty byly firmou zaklonovány do vektoru pRQ.

6.1.1 Strategie I

Strategie I je složena z ELP motivu, katelicidinu a inteinu. Sekvence je znázorněna na následujícím schématu. Katelicidin je kódován lidským FALL39 genem. Intein pochází z pTWIN2 vektoru z IMPACT systému firmy NEB. Velikost klonovaného konstruktu je 1553 bp

```
GGATCCCGTACGATGGCAACTACTAGGTTTCCATCATTGTTGTTTTACTCCTATATTTTTCT
CTTGTGCAATGGGTCCATGGCTGTGCCAGGGGCTGGGTGCCAGGCGTCGGGGTGCCCGGCG
TTGGGGTTCCAGGCGTGGGCGTTCCCGGCGGGGGGTGCCAGGCGCTGGCGTTCCAGGGGGC
GGGGTGCCGGGGTTCGGCGTGCCGGGCGTGGGCGTTCCGGGGGGCGGCGTTCCCGGGGCTGG
CGTGCCAGGGTTGGCGTTCCCGGCGTGGGCGTCCAGGCGTCGGCGTGCCGGGGGGGGCG
TGCCAGGGGCTGGCGTCCCGGGCGGCGGCGTTCCAGGCGTCGGGGTTCCAGGCGTTGGCGTC
CCAGGGGGGGGGTTCCCGGCGTGGCGTGCCGGGCGTCCCGGGTCCCGGGTTCGGCGTGCC
CGGCGTTGGGGTGCCGGGCGGCGGGTTCCCGGGGCTGGCGTTCCAGGCGGGGGGGTCCCGG
GCGTCCGGGGTTCCGGGCGTGGGCGTGCCAGGCGGCGGGTCCAGGGGCTGGCGTGCCGGGG
GTGGGGGTCCAGGCGTTGGCGTGCCGGGCGTCCGGGGTCCCGGGGGGGGGTTCCGGGGGG
TGGCGTTCCGGGGGGGGCGTGCCGGGCGTGGGGTCCAGGGTCCGGGTGCCAGGCGGGG
GCGTCCAGGCGTGGCGTGCCGGGCGTTGGCGTGCCGGGGTTGGCGTCCCGGGGGTTGGC
GTTCCAGGCGGCGGCGTGCCAGGCGTGGCGTTCCCGGCGGCGGCGTCCAGGCGTTGGCGT
CCCGGGCGTGGGCGTGCCGGGCGGGGGCGTCCCGGCGTGGCGTCCAGGCGTTGGGGTTC
CAGGGTTGGGGTCCCGGGGTTGGCGTCCCGGGCGGGGGGTTCCAGGGGCTGGCGTGCC
GGCGGCGGGGTCCCGGGCGTGGGGTCCCGGCGTGGGGTCCAGGGGGCGGCGTTCCGGG
GGCTGGGAACAACGGCAACAACGGGCTTGAGCTTCGCGAGTCTGGCGCCATCTCCGGCGATT
CTCTATTTCTCTTGCCTCCACCGGCAAGAGGGTGTCCATCAAGGACCTGCTCGACGAGAAG
GACTTCGAGATCTGGGCCATCAACGAGCAGACCATGAAGCTCGAATCCGCCAAGGTGTCCAG
GTTTTTCTGCACGGGCAAGAAGCTCGTCTACATCCTCAAGACCAGGCTCGGCAGGACCATTA
AGGCCACCGCTAACCATCGGTTCCCTACCATCGACGGCTGGAAGAGGCTCGATGAGCTGTCC
CTCAAGGAGCATATTGCCCTCCCGAGGAAGCTTGAGTCTCCTCACTTCAGCTCAGCCCCGA
GATCGAGAAGCTCTCCAGTCCGACATCTACTGGGACTCCATCGTGAGCATCACCGAGACCG
GCGTTGAGGAGGTGTTGATCTTACCGTGCCAGGCCCGCATAACTTCGTGGCCAACGACATC
ATCGTGACAACGGCCGTGCTCTCCTTGGCGATTTCTTCCGCAAGTCCAAGGAGAAGATCGG
CAAGGAGTTCAAGAGGATCGTCCAGAGGATCAAGGACTTCTCCGCAACCTCGTGCCAAGGA
CCGAGTCTTGACTCGAG
```

V bakterii dochází translací ke vzniku následující sekvence aminokyselin:

MAVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGV
VPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGV
GGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGG
GVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGV
PGGGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGVPGGGVPGVGVPGVGVPGGGVPGAGNNG
NNGLELRESGAISGDSLISLASTGKRVS IKDLLDEKDFE IWAINEQTMKLESAKVS RVFCTG
KKLVY I LKTRLGRTIKATANHRFLTIDGWKRLDEL SLKEHIALPRKLESSSLQLSPEIEKLS
QSDIYWDSIVSITETGVVEE VFDLTVPGPHNFVANDI IVHNG RALLGDFFRKSKEKIGKEFKR
IVQRIKDFLRNLVPRTES

CCATGG – restrikční místo pro NcoI

GCTGGG – restrikční místo pro BseYI

CTCGAG – restrikční místo pro XhoI

Světle modrá – elastin

Šedá – intein

Zelená – katelicidin

Elastin ohraničený restrikčními místy pro BseYI lze kdykoliv vyštěpit. Restrikční místa pro NcoI a XhoI byly použity pro zaklonování do expresního vektoru pET.

6.1.2 Strategie II

Strategie II na rozdíl od Strategie I neobsahuje ELP motiv, obsahuje však chitin- vazebnou doménu získanou z pTXB1 plasmidu, který je součástí IMPACT systému. Obsahuje rovněž intein. Velikost klonovaného konstruku je 908 bp.

GGATCCCGTACGATGGCAACTACTAGGTTTCCATCATTGTTGTTTTACTCCTATATTTTTCT
CTTGTGCAATGGGTCCATGGCTCTTCCTTGGCGATTTCTTCCGCAAGTCCAAGGAGAAGATCG
GCAAGGAGTTCAAGAGGATCGTCCAGAGGATCAAGGACTTCCTCCGCAACCTCGTGCCAAGG
ACCGAGTCTTGCATTACCGGCGACGCTCTTGTGTCCTCCAGAGGGCGAGTCTGTGAGGAT
CGCTGATATTGTGCCAGGCGCCAGGCCGAACCTCCGACAACGCTATTGATCTCAAGGTGCTCG
ACAGGCACGGCAACCCAGTTCTCGCCGACAGGCTTTTCCATTCCGGCGAGCATCCAGTGTAC
ACCGTGAGGACCGTTCGAGGGCCTCAGGGTGACCGGCACCGCCAACCCACTCCTCTGCCT
TGTGGATGTTGCCGGCGTTCCAACCCTCCTGTGGAAGCTCATCGACGAGATCAAGCCAGGCG
ACTACGCCGTGATTCAGAGGTCTGCCTTCTCCGTGGATTGCGCCGGCTTCGCCAGGGGCAAG
CCAGAGTTCGCCCAACCACCTACACCGTGGGCGTGCCAGGCCTCGTGCGCTTCCTTGAGGC
CCATCACAGGGACCCAGATGCCAGGCTATCGCTGACGAGCTTACCGACGGCAGGTTCTACT
ACGCCAAGGTGGCCTCTGTTACCGATGCTGGCGTGCAGCCAGTTTACTCCCTCAGGGTTGAC
ACCGCCGACCACGCCTTCATTACCAACGGCTTCGTGTCTCACGCCACCGGCCTTACCGGCCT

CAACTCCGGCCTCACCACCAACCCAGGCGTGTCCGCCTGGCAGGTCAACACCGCCTACACGG
CTGGGCAGCTCGTGACCTACAACGGCAAGACCTACAAGTGCCTCCAGCCGCATACCTCTCTT
GCTGGTTGGGAGCCATCTAACGTTCCAGCCCTTTGGCAGCTCCAGTGAAGTGGGAAGGACGA
GCTCTGACTCGAG

V bakterii dochází translací ke vzniku následující sekvence aminokyselin:

MATTRFPSLLFYSYIFLLCNGSMALLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTESC
ITGDALVALPEGESVRIADIVPGARPNSDNAIDLKVLDRHGPNVLADRLFHSGEHPVYTVRT
VEGLRVTGTANHPLLCLVDVAGVPTLLWKLIDEIKPGDYAVIQRSAFSVCAGFARGKPEFA
PTTYTVGVPGLVRFLEAHRDPDAQIADELTDGRFYAKVASVTDAGVQPVYSLRVDTADH
AFITNGFVSHATGLTGLNSGLTTNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWE
PSNVPALWQLQ

CCATGG – restrikční místo pro NcoI

GCTGGG – restrikční místo pro BseYI

CTCGAG – restrikční místo pro XhoI

Fialová – chitin-vazebná doména

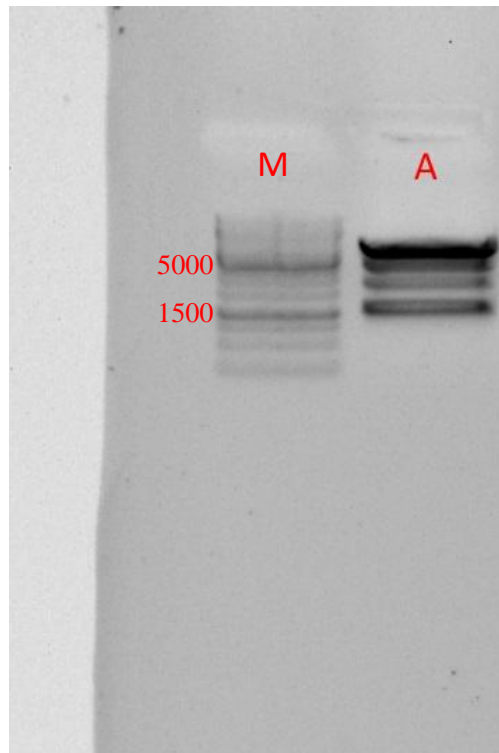
Šedá – intein

Zelená – katelicidin

6.2 Klonování

Po úspěšné transformaci elektrokompetentních bakterií plasmidem pRQ s vloženým konstruktem a jeho izolaci byl konstrukt překlonován do expresního vektoru pET28b+. Pro restrikci byly použity enzymy NcoI a XhoI (pro oba konstrukty). Klonovací reakci před ligací je možné pozorovat na následujících obrázcích.

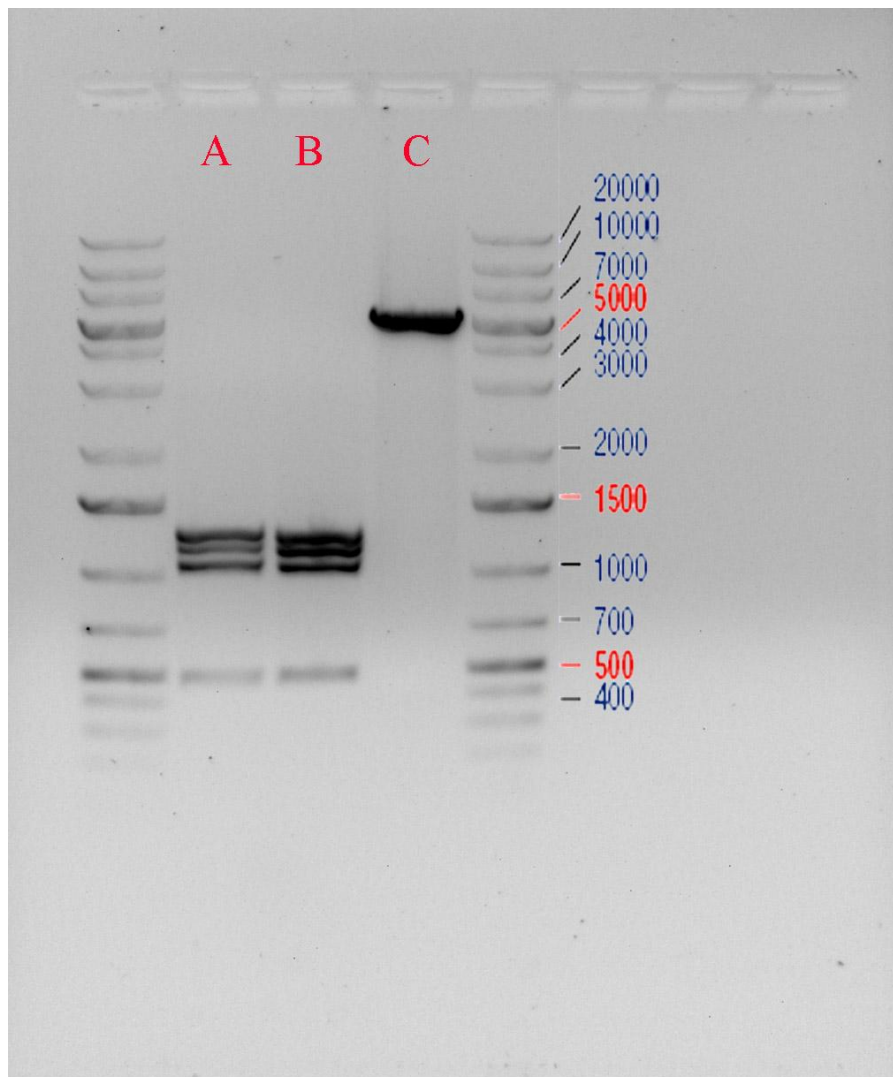
Obr. 6: Kontrolní restriční reakce strategie I pomocí enzymů *NcoI* a *XhoI* před ligací.



Dráha A: Naštěpený plasmid pRQ se strategií I. Reakce byla pouze kontrolní a sloužila k potvrzení, že enzymy *NcoI* a *XhoI* pRQ plasmid se strategií I skutečně štěpí. Nicméně lze pozorovat přítomnost různých bandů, a to spodní band, který svou velikostí odpovídá klonovanému fragmentu Strategie I (1553 bp), prostřední 2 bandy odpovídající nenaštěpenému plasmidu pRQ a vrchní band, který odpovídá zbytku plasmidu pRQ po vyštěpení Strategie I.

Dráha M: standard 1 kb+

Obr. 7: Restrikční reakce strategie II pomocí enzymů *NcoI* a *XhoI* před ligací.



Dráha A a B: Naštěpený plasmid pRQ se strategií II. 3 bandy o velikostech mezi 1000 – 1300 bp. Spodní band odpovídá klonovanému konstrukt o velikosti přibližně 908 bp, prostřední band je nenaštěpený plasmid pRQ a vrchní band odpovídá zbytku plasmidu pRQ bez strategie II

Dráha C: Linearizovaný plasmid pET28b+

Použitý standard byl 1 kb+.

6.3 Proteinová exprese

6.3.1 Strategie I – čištění pomocí ELP motivu

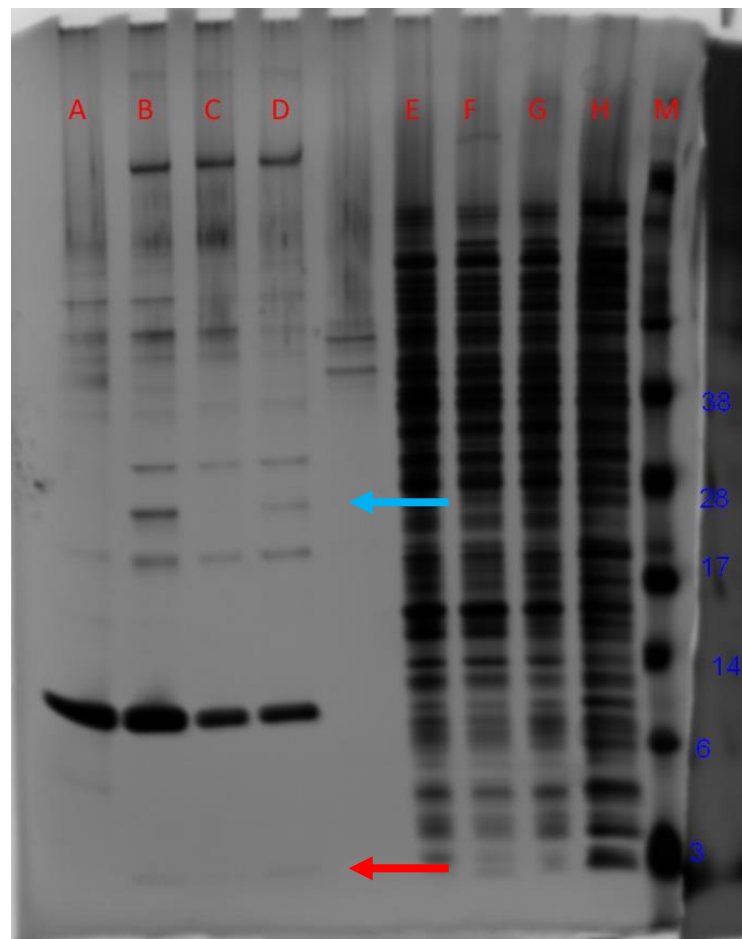
Čištění pomocí elastinové sekvence bohužel nepřineslo žádné výsledky (viz diskuze).

6.3.2 Strategie II – čištění pomocí chitin-vazebné domény

Po expresi proteinového konstruktu Strategie II z bakterií *E. coli* kmene BL21 Star nebyly dosaženy žádné výsledky (viz diskuze). Nicméně byl konstrukt transformován do jiného kmene, a sice BL21(DE3)pLysS. Tento kmen se od BL21 Star liší tím, že veškerá exprese transformovaného plasmidu nastává až po indukci. Pro indukci bylo použito 0,4 mmol/l IPTG a exprese probíhala přes noc při 37 °C. Proces po expresi byl stejný, jako s kmenem BL21 Star.

S proteinovou frakcí získanou z čištění pomocí chitin-vazebné domény byla provedena SDS-PAGE. Na gel byly naneseny jak vzorky lyzátu v kolonovém pufru, tak vzorky po přečištění. Gel byl barven pomocí Coomassie Brilliant Blue.

Obr. 8: Polyakrylamidový gel se vzorky Strategie II ve formě lyzátu a po přečištění.



Řady A-D: Vzorky po přečištění na chitinové matrici. Řada A a C je prázdný pET28b+ vektor.

Řady E-F: Vzorky lyzátu v kolonovém pufriu. Řada E a G je prázdný pET28b+ vektor.

Proteinové produkty v řadách B a D označené červenou šipkou jsou pravděpodobně katelecidin, neboť svou velikostí odpovídají nativnímu katelecidinu, a sice 4,5 kDa. Prázdný pET28b+ vektor slouží jako negativní kontrola.

Modrou šipkou je označen zbytek Strategie II bez katelecidinu, a sice intein a chitin-vazebná doména. Prázdný pET28b+ opět slouží jako negativní kontrola.

7 DISKUZE

Klonování do expresního vektoru pET28b+ proběhlo bez problémů. Restrikční enzymy štěpily specificky a u ligační reakce docházelo k ligaci fragmentu zájmu. Po provedení elektroforézy na agarosovém gelu byly jasně pozorovatelné bandy odpovídající vyštěpenému konstrukt, prázdnému vektoru a nenaštěpenému vektoru. SDS-PAGE se Strategií I neposkytla žádné výsledky ale se Strategií II ano. Na gel byly nanášeny vzorky lyzátu v kolonovém pufru a vzorky po přečištění na chitinové matrici. Oproti negativní kontrole (prázdny pET28b+ vektor) byly v přečištěných vzorcích vidět dva důležité bandy: jeden odpovídající odštěpenému inteinu a chitin-vazebné doméně, a druhý odpovídající purifikovanému katelicidinu. Purifikovaný katelicidin měl velikost 4,5 kDa. Ve vzorcích lyzátu bylo příliš výrazné pozadí na to, aby šlo podobný signál pozorovat.

Jeden z důvodů negativních výsledků získaných při izolaci z kmene BL21 Star mohl být ten, že proteinový produkt je ukládán do inkluzních tělísek, ze kterých nebyl purifikován. Další možností je to, že byl v bakteriální buňce protein rozpoznán jako cizí a tedy ihned degradován. Samotný katelicidin je navíc pro buňku toxický, což přispívá možnosti mutace konstrukt a zastavení exprese. Mutace v buňce probíhá náhodně, ale mutace v místě konstrukt je pro buňku výhodná, a tak přežívají zejména mutované buňky. Selektivním tlakem nebyly selektovány pouze buňky s funkčním konstruktem, ale všechny buňky úspěšně transformované vektorem pET28b+. Je tedy velmi pravděpodobné, že pro purifikaci byly použity buňky s mutovaným, a tedy nefunkčním konstruktem.

Pro řešení tohoto problému byl použit bakteriální kmen BL21(DE3)pLysS. Od kmene BL21 Star se liší tím, že nese dva plasmidy: pLys a pET. Exprese pET plasmidu je závislá na přítomnosti virové T7 polymerázy. Gen pro expresi T7 polymerázy je uměle vnesen do bakteriálního chromosomu u celé řady expresních buněk. Gen pro expresi T7 polymerázy je regulován lac-operonem; v přítomnosti laktózy, nebo jejího analogu IPTG (indukce), tedy dochází k expresi T7 polymerázy a následně k expresi genu v polylinkeru. Problémem ovšem je, že ke slabé expresi dochází už před indukcí IPTG, neboť v buňce jsou přítomny stopy laktózy. Tento jev se nazývá „leakage“ promotoru. Tomuto jevu zabraňuje druhý plasmid: pLys. Tento plasmid produkuje lysosym, který inhibuje T7 polymerázu, jejíž expresi způsobují zmíněné stopy laktózy. IPTG je velice silným induktorem lac-operonu a spustí

expresi velkého množství T7 polymerázy, že lysosym nestíhá nadbytek polymerázy inhibovat a exprese T7 promotoru na pET plasmidu je zahájena.

Postup práce s BL21(DE3)pLysS buňkami byl po transformaci následující:

Nejprve byly buňky jednu hodinu inkubovány v SOC médiu při 37 °C. Následně byly buňky přeneseny do 250 ml LB média obsahujícího 50 mg/l kanamycin a 25 mg/l chloramfenikol. Po osmi a půl hodinách, během kterých nebyl pozorován žádný nárůst OD_{600} , byla provedena indukce pomocí 0,4 mmol/l IPTG. Expresa probíhala přes noc při 37 °C a při 17 °C. Bakterie, které byly inkubované při 37 °C, vykazovaly větší růst než bakterie inkubované při 17 °C. U buněk nesoucích pouze prázdný pET28b+ vektor byl pozorován vyšší růst ($OD_{600} = 0,203$) než u buněk nesoucích Strategii II ($OD_{600} = 0,065$). Z toho lze usuzovat, že konstrukt bakterie skutečně negativně ovlivňuje.

8 ZÁVĚR

Byly vytvořeny dva konstrukty v plasmidovém vektoru pRQ. Strategie I, která nese peptid zájmu katelicidin sfuzovaný s inteinem a ELP motivem. Dále Strategie II, která nese katelicidin sfuzovaný s inteinem a chitin-vazebnou doménou. Konstrukty byly pomocí restričních enzymů NcoI a XhoI zaklonovány do expresního vektoru pET28b+. Klonovaný plasmid byl elektroporací transformován do expresních buněk *E. coli* kmene BL21 Star a v případě Strategie II, po dosažení negativních výsledků, do kmene BL21(DE3)pLysS. Po indukci a expresi byly proteinové konstrukty purifikovány. Strategie I pomocí ELP motivu a Strategie II pomocí chitin-vazebné domény. S oběma konstrukty byla provedena denaturační elektroforéza na polyakrylamidovém gelu. V případě strategie I nebylo dosaženo žádných publikovatelných výsledků, ale v případě strategie II byl pokus úspěšný: na gelu byl vidět produkt o velikosti 4,5 kDa, což odpovídá velikosti nativního katelicidinu. Signál byl však slabý, neboť přítomnost konstruktu bakterie negativně ovlivňuje a proto jich jen málo přežilo a bylo schopno katelicidin exprimovat. Produkovat tyto konstrukty v bakteriálních buňkách tedy není moc výhodné.

9 LITERATURA

Banki, M.R., Feng, L., Wood, D.W. (2005): Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags. *Nature methods* 2: 659 - 661.

Banki, M.R., Gerngross, T.U., Wood, D.W. (2005): Novel and economical purification of recombinant proteins: intein-mediated protein purification using in vivo polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association. *Protein Science* 14: 1387 - 1395.

Banki, M.R., Wood, D.W. (2005): Inteins and affinity resin substitutes for protein purification and scale up: *Microbial Cell factories* 4: 356 - 372-

Belfort, M., Pedersen-Lane, J. (1984). A genetic system for analyzing *E. coli* thymidylate synthase. *Journal of Bacteriology* 160, 371 - 378.

Dassa, B., London, N., Stoddard, B.L., Schueler-Furman, O., Pietrokovski, S. (2009):. Fractured genes: novel genomic arrangement involving new split inteins and a new homing endonuclease family. *Nucleic Acids Research* 37: 2560 - 2573.

Derbyshire, V., Wood, D.W., Wu, W., Dansereau, J.T., Dalgaard, J.Z., Belfort, M. (1997) Genetic definition of a protein-splicing domain: functional mini-inteins support structure predictions and a model for intein evolution. *PNAS* 94: 11466 - 11471.

Erin R. Green, E.R., Mecsas, J. (2016): Bacterial Secretion Systems – An overview. *Microbiology Spectrum* 4: 245 - 256.

Frutos, S., Goger, M., Giovani, B., Cowburn, D., Muir, T.W. (2010): Branched intermediate formation stimulates peptide bond cleavage in protein splicing. *Nature Chemical Biology* 6: 527 - 533.

Chong, S., Mersha, F.B., Comb, D.G., Scott, M.E., Landry, D., Vence, L.M., Perler, F.B., Benner, J., Kucera, R.B., Hirvonen, C.A., Pelletier, J.J., Paulus, H., Xu, M.Q. (1997): Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene* 192: 271 - 281.

Chong, S., Williams, K.S., Wotkowicz, C., Xu, M. (1998): Modulation of protein splicing of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane ATPase intein. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 10567 - 10577.

Lilius, G., Persson, M., Bulow, L., Mosbach, K. (1991): Metal affinity precipitation of proteins carrying genetically attached polyhistidine affinity tails. *European Journal of Biochemistry* 198: 499 - 504.

McPherson, D.T., Morrow, C., Minehan, D.S., Wu, J., Hunter, E., Urry, D.W. (1992): Production and Purification of a Recombinant Elastomeric Polypeptide, G-(VPGVG)₁₉-VPGV, from *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* 8: 347 - 352 .

Müller, M. (2005): Twin-arginine-specific protein export in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology* 156: 131 - 136.

Natale, P., Bruser, T., Driessen, A.J. (2008): Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-distinct translocases and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778: 1735 - 1756.

Perler, F.B. (2002): InBase, the intein database. *Nucleic Acids Research* 30: 383 - 384.

Perler, F.B., Davis, E.O., Dean, G.E., Gimble, F.S., Jack, W.E., Neff, N., Noren, C.J., Thorner, J., Belfort, M. (1994): Protein splicing elements: inteins and exteins--a definition of terms and recommended nomenclature. *Nucleic Acids Research* 22:1125 - 1127.

Petrokovski S. (2001): Intein spread and extinction in evolution. *Trends in Genetics* 17: 465 - 472.

Robinson, C., Bolhuis, A. (2004): Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1694: 135 - 147.

Rudolph, R. and Lilie, H. (1996): In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB Journal* 10: 49 - 56.

Shah, N.H., Muira, T.W. (2014): Inteins: Nature's Gift to Protein Chemists, *Chemical Science* 5: 446 - 461.

Shingledecker, K., Jiang, S., Paulus, H. (1998): Molecular dissection of the *Mycobacterium tuberculosis* RecA intein: design of a minimal intein and of a transsplicing system involving two intein fragments. *Gene* 207: 187 - 195.

Singh, S.M., Panda, A.K. (2005): Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99: 303 - 310.

Slater, S., Gallaher, T., Dennis, D. (1992): Production of poly-(3-hydroxybutyrate- co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1089 - 1094.

Trabbic-Carlson, K., Meyer, D.E., Liu, L., Piervincenzi, R., Nath, N., LaBean, T., Chilkoti, A. (2004): Effect of protein fusion on the transition temperature of an environmentally responsive elastin-like polypeptide: a role for surface hydrophobicity? *Protein Eng Des El* 17: 57 - 66.

Trieu-Cuot, P., Carlier, C., Martin, P., Courvalin, P. (1987): Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to Gram-positive bacteria. *FEMS microbiology reviews* 48: 289 - 294.

Vallejo, L.F., Rinas, U. (2004): Strategy for recovery of active protein through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories* 3: 2 - 12.

Villaverde, A., Mar Carrió, M. (2003): Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology letters* 25: 1385 - 1395.

Volkman, G., Mootz, H.D. (2012): Recent progress in intein research: from mechanism to directed evolution and applications. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70: 1185 - 1206.

Wieczorek, R., Pries, A., Steinbuchel, A., Mayer, F. (1995): Analysis of a 24- kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology* 177: 2425 - 2435.

Wood, D.W., Wu, W., Belfort, G., Derbyshire, V., Belfort, M. (1999): A genetic system yields self-cleaving inteins for bioseparations. *Nature biotechnology* 5: 926 - 933.