Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2022 **Bc. Adéla Burianová**

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky

Příprava proteinu pro TET-assisted pyridine borane sequencing

Diplomová práce

Bc. Adéla Burianová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

Vedoucí práce: prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Adéla BURIANOVÁ
Osobní číslo:	R20904
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Molekulární a buněčná biologie
Téma práce:	Příprava proteinu pro TET-assisted pyridine borane sequencing
Zadávající katedra:	Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Vypracováním teoretické části diplomové práce student prokáže schopnost orientovat se v tématech

- detekce epigenetické metylace cytozinu včetně metod masivně paralelního sekvenování,
- genetického inženýrství při expresi a purifikaci proteinů v savčím expresním systému,
- pracovat s odbornými cizojazyčnými texty a
- řádně citovat.

V praktické části student prokáže schopnost samostatně:

- naplánovat,
- provést a
- vyhodnotit laboratorní experiment.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

CAO, B., X. WU, J. ZHOU, H. WU, et al. Nick-seq for single-nucleotide resolution genomic maps of DNA modifications and damage. Nucleic Acids Res, Jul 9 2020, 48(12), 6715-6725.

ERGER, F., D. NÖRLING, D. BORCHERT, E. LEENEN, et al. cfNOMe - A single assay for comprehensive epigenetic analyses of cell-free DNA. Genome Med, Jun 24 2020, 12(1), 54.

FENG, S., Z. ZHONG, M. WANG AND S. E. JACOBSEN Efficient and accurate determination of genome-wide DNA methylation patterns in Arabidopsis thaliana with enzymatic methyl sequencing. Epigenetics Chromatin, Oct 7 2020, 13(1), 42.

GAO, Y., L. LI, P. YUAN, F. ZHAI, et al. 5-Formylcytosine landscapes of human preimplantation embryos at single-cell resolution. PLoS Biol, Jul 2020, 18(7), e3000799.

CHEN, L. Q., W. S. ZHAO AND G. Z. LUO Mapping and editing of nucleic acid modifications. Comput Struct Biotechnol J, 2020, 18, 661-667.

KLOBUČAR, T., E. KREIBICH, F. KRUEGER, M. AREZ, et al. IMPLICON: an ultra-deep sequencing method to uncover DNA methylation at imprinted regions. Nucleic Acids Res, Sep 18 2020, 48(16), e92.

LAM, D., P. L. LUU, J. Z. SONG, W. QU, et al. Comprehensive evaluation of targeted multiplex bisulphite PCR sequencing for validation of DNA methylation biomarker panels. Clin Epigenetics, Jun 22 2020, 12(1), 90.
LIU, Y., P. SIEJKA-ZIELIŃSKA, G. VELIKOVA, Y. BI, et al. Bisulfite-free direct detection of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at base resolution. Nat Biotechnol, Apr 2019, 37(4), 424-429.
ORJUELA, S., D. MACHLAB, M. MENIGATTI, G. MARRA, et al. DAMEfinder: a method to detect differential allele-specific methylation. Epigenetics Chromatin, Jun 1 2020, 13(1), 25.

Vedoucí diplomové práce: prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.
Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání diplomové práce: 5. listopadu 2020
Termín odevzdání diplomové práce: ~~31. července 2021~~
31-07-2022

L.S.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice
tel.: +420 585 634 [illegible]

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 5. listopadu 2020

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení: Bc. Adéla Burianová

Název práce: Příprava proteinu pro TET-assisted pyridine borane sequencing

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2022

Klíčová slova: epigenetika**,** metylace cytozinu, 5-metylcytozin, TET asistované pyridin boranového sekvenování, Tet enzym, detekce metylace DNA, analýza metylomu

Počet stran: 57

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Souhrn: Epigenetické modifikace se významně podílejí na regulaci genové exprese v živých organismech. Metylace cytozinů je jednou z nejlépe prostudovaných epigenetických modifikací DNA a její detekce má velký potenciál pro lékařské i forenzní účely. V průběhu let byla představena celá řada metod umožňujících detekci metylace cytozinu, a i nadále je tento směr oblastí intenzivního vývoje. Nejrozšířenější metodou detekce metylace DNA zůstává bisulfitové sekvenování i přesto, že přináší zkreslené výsledky v důsledku degradace analyzované DNA. Tento problém by mohl být překonán použitím metody TET asistovaného pyridin boranového sekvenování, která používá reakce šetrné k DNA. V průběhu TET asistovaného pyridin boranového sekvenování je DNA nejprve podrobena působení Tet enzymu, který převádí 5-metylcytozin na 5-karboxycytozin, který je v navazující reakci převeden na dihydrouracil působením pyridin boranu. Dihydrouracil je v následné PCR reakci čten a amplifikován jako tymin, což umožňuje rozlišení původního 5-metylcytozinu od původního cytozinu.

Cílem experimentální části této diplomové práce bylo připravit rekombinantní mTet1CD enzym pro metodu TET asistovaného pyridin boranového sekvenování.

Plazmid nesoucí sekvenci pro katalytickou podjednotku mTet1 enzymu značenou Flag značkou byl amplifikován v kompetentních bakteriích a izolován. Plazmidem byla transfekována savčí suspenzní buněčná linie Expi293 a mTet1CD protein byl exprimován. Cílový mTet1CD protein byl purifikován za využití afinitního gelu. Z 540 ml buněčné suspenze se podařilo získat 160 μg mTet1CD enzymu, tedy množství použitelné pro 10 reakcí v metodě TET asistovaného pyridin boranového sekvenování. Kontrola úspěšnosti transfekce a průběhu purifikace proteinu byla provedena pomocí SDS-PAGE

a Western blottingu. Při kontrole průběhu purifikace bylo zjištěno, že při purifikaci dochází z 3,5 % k degradaci připravovaného mTet1CD enzymu.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Adéla Burianová

Title: Protein preparation for TET-assisted pyridine borane sequencing

Type of thesis: Master thesis

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc

Supervisor: prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.

The year of presentation: 2022

Keywords: epigenetics, cytosine methylation, 5-methylcytosine, TET-assisted pyridine borane sequencing, Tet enzyme, detection of DNA methylation, methylome analysis

Number of pages: 57

Number of appendices: 0

Language: Czech

Summary: Epigenetic modifications are significantly involved in regulation of gene expression in living organisms. Cytosine methylation is one of the best studied epigenetic modifications and its detection has a great potential in terms of clinical diagnostics and forensic purposes. Many methods enabling detection of DNA methylation have been introduced over the years and detection of DNA methylation continues to be a field of intensive development. The most common method for detection of DNA methylation is bisulfite sequencing, despite its biased results caused by degradation of analyzed DNA. This limitation could be overcome by TET-assisted pyridine borane sequencing, which uses mild chemical reactions. During TET-assisted pyridine borane sequencing Tet enzyme is used to convert 5-methylcytosine to 5-carboxycytosine, which is then converted to dihydrouracil by pyridine borane reaction. In subsequent PCR reaction dihydrouracil is amplified as thymine enabling to distinguish the original cytosine from original 5-methylcytosine.

The focus of the experimental part of my thesis is preparation of recombinant mTet1CD enzyme for TET-assisted pyridine borane sequencing.

The plasmid carrying the sequence of mTe1 catalytic domain labelled by Flag-tag was amplified and isolated using competent bacteria. The mammalian suspension Expi293 cell line was transfected with the plasmid and mTet1CD protein was expressed. The Tet1CD protein was purified using affinity gel. I managed to gain 160 μg mTet1CD enzyme from 540 ml of cell culture, which equals the amount of mTet1CD enzyme for 10 reactions in TET-assisted pyridine borane sequencing method. SDS-PAGE

and Western blotting were used for the verification of transfection success and for the control of purification process. During the control of purification process it was discovered, that 3.5 % of the final mTet1CD enzyme was degraded.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. Mgr. Jiřího Drábka, Ph.D. a za použití literárních zdrojů uvedených v seznamu literatury.

V Olomouci dne: …… …….

Bc. Adéla Burianová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce panu prof. Mgr. Jiřímu Drábkovi, Ph.D. za jeho ochotu, odborné vedení, cenné rady a čas, který mi věnoval. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Ivě Protivánkové a zbývajícímu kolektivu pracoviště Laboratoře integrity genomu z Ústavu molekulární a translační medicíny za velice vlídný přístup a asistenci při experimentální části této práce. Poděkování patří také Mgr. Martinu Mistríkovi, Ph.D. z Laboratoře integrity genomu za umožnění použití prototypu třepačky pro kultivaci suspenzních buněk a dr. Chunxiao Song z Ludwig Institute for Cancer Research, University of Oxford za laskavé poskytnutí používaného plazmidu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, která mi byla v průběhu celého studia velkou podporou.

Projekt byl podpořen granty VI20202022123, LM2018133, LM2018125, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868, EF16_013/0001674, IGA LF UP 2022_012.

Obsah

1 Úvod ... 1
2 Cíle práce ... 2
3 Literární přehled ... 3
3.1 Epigenetika ... 3
3.1.1 Úvod do epigenetiky ... 3
3.1.2 Kovalentní modifikace DNA se zaměřením na metylaci cytozinů ... 3
3.1.3 Změny metylačního profilu v průběhu života jedince ... 4
3.1.4 Základní faktory asociované s metylací DNA ... 5
3.1.5 Důležitost analýzy metylace DNA ... 7
3.2 Metody detekce epigenetické metylace cytozinů ... 9
3.2.1 Metody založené na afinitním obohacení o metylovanou DNA ... 10
3.2.2 Metody založené na použití specifických restrikčních enzymů ... 12
3.2.2.1 Metody využívající metylačně citlivé restrikční enzymy (MSRE) ... 12
3.2.2.2 Metody využívající metylačně závislé restrikční enzymy (MDRE) ... 13
3.2.2.3 Metody založené na kombinaci metylačně citlivých a metylačně závislých enzymů ... 14
3.2.3 Metody založené na specifických chemických reakcích ... 14
3.2.3.1 Metody využívající hydrogensiřičitan sodný ... 15
3.2.3.2 Metody využívající jiných chemických reakcí ... 17
3.2.4 Metody založené na specifických enzymatických reakcích ... 17
3.2.5 Metody přímo detekující DNA metylaci ... 19
3.3 Exprese a purifikace rekombinantních proteinů ... 22
3.3.1 Expresní systémy ... 22
3.3.2 Purifikace rekombinantních proteinů ... 24
4 Materiál a metody ... 26
4.1 Biologický materiál ... 26
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky ... 26
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení ... 29
4.4 Použité experimentální postupy ... 30
4.4.1 Amplifikace plazmidu ... 30
4.4.1.1 Příprava LB média pro kultivaci transformovaných bakterií ... 30
4.4.1.2 Transformace kompetentních bakterií ... 30
4.4.1.3 Izolace plazmidu z transformovaných bakterií ... 30
4.4.2. Exprese a purifikace mTet1CD proteinu ... 30

4.4.2.1 Kultivace Expi293 buněk 30
4.4.2.2 Transfekce Expi293 buněk 31
4.4.3 Kontrola úspěšnosti transfekce a průběhu purifikace mTet1CD 32
4.4.3.1 Příprava buněčných lyzátů pro kontrolu úspěšnosti transfekce. 32
4.4.3.2 Polyakrylamidová elektroforéza v denaturačních podmínkách (SDS-PAGE) 32
4.4.3.3 Western blotting 32
5 Výsledky 34
5.1 Výsledek amplifikace plazmidu mTet1CD (pcDNA3-Flag) 34
5.2 Výsledek kontroly úspěšnosti transfekce Expi293 buněk plazmidem mTet1CD (pcDNA3-Flag) a exprese mTet1CD proteinu. 34
5.3 Výsledný výtěžek rekombinantního mTet1CD enzymu. 35
5.4 Výsledek kontroly průběhu purifikace mtet1CD enzymu 36
6 Diskuse 40
7 Závěr 44
8 Literatura 45

Seznam zkratek

5cC	5-karboxycytosin
5fC	5-formylcytozin
5hmC	5-hydroxymetylcytozin
5mC	5-metylcytozin
APOBEC3A	apolipoprotein B mRNA upravující enzym, katalytická subjednotka 3A
BER	bázová excizní oprava
BS-seq	bisulfitové sekvenování
cfNOMe	metoda nukleozomové obsazenosti a metylačního profilování na bezbuněčné DNA (cell-free DNA-bsaed Nucleosome Occupancy and Methylation profiling)
CFPS	cell-free syntéza proteinů (cell-free protein synthesis)
cfTAPS	TAPS pro cell-free
CHO	buňky vaječníků čínského křečka (chinese hamster ovary cells)
COBRA	kombinovaná bisulfitová restrikční analýza (Combined Bisulfite Restriction Analysis)
Ct	prahový cyklus (cycle of treshold)
DAMEfinder	alelicky specifický vyhledávač diferenciální metylace (Differential Allele-specific Methylation finder)
DHU	dihydrouracil
Dnmt	DNA metyltransferáza
DTT	dithiothreitol
eeTAPS	endonukleázové obohacení TAPS (endonuclease enrichment TAPS)
EM-seq	enzymatické metylační sekvenování (Enzymatic Methyl-seq)
HELP	obohacení malými HpaII fragmenty pomocí ligace zprostředkované PCR (HpaII tiny fragment enrichement by ligation mediated PCR)
HEPES	2-[4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinyl] etansulfonová kyselina
IMPLICON	metoda imprintovaných amplikonů (Imprint amplicon)
lrTAPS	TAPS pro dlouhá čtení (long read TAPS)
MBD	metyl-CpG vazebná domén (methyl-DNA binding domain)
MDRE	metylačně závislé restrikční enzymy (methylation dependent restriction enzmes)
MeD-seq	sekvenování metylované DNA (Methylated DNA sequencing assay)
MeDIP	imunprecipitace metylované DNA (Methyl-DNA Immunoprecipitation)
MiGS	MBD-izolované genomové sekvenování (MBD-isolated genome sequencing)
MS-AP-PCR	metylačně citlivé PCR s náhodnými primery (Methylation sensitive arbitrarily primed PCR)

MS-HRM	metylačně senzitivní analýza tání s vysokým rozlišením (Methylation-sensitive high resolution melting)
MSP	metylačně specifická PCR (Methylation specific PCR)
MSRE	metylačně citlivé restrikční enzymy (methylation-sensitive restriction enzymes)
NGS	sekvenování nové generace (New Generation Sequencing)
oxBS-seq	oxidativní bisulfitové sekvenování (Oxidative bisulfite sequencing)
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza (polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEI	polyetylenimin
PMSF	fenylmetylsulfonyl fluorid
qAMP	kvantitativní analýza DNA metylace za využití real-time PCR (Quantitative analysis of DNA methylation using real-time PCR)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RLGS	genomické skenování restrikčního omezení (Restriction landmark genomic scanning)
SAM	S-adenosylmetionin
SDS	Dodecylsíran sodný
SIMON	jednoduchá interference pro metylom založená na NGS (Simple Inference for Methylome based On NGS)
SMRT	sekvenování jedné molekuly v reálném čase (single molecule real-time sequencing)
TAPS	TET asistované pyridin boranové sekvenování **(**TET-assisted pyridine borane sequencing)
TEMED	tetrametyletylendiamin
TDG	tymin-DNA-glukizidáza
Tris	tris(hydroxymetyl)-aminometan
WGBS	celogenomové bisulfitové sekvenování (Whole-genome bisulfite sequencing)
ZnF	zinkový prst (zinc finger)

Seznam obrázků

Obr. 1: Cesty metylace DNA.

Obr. 2: Schéma aktivní demetylace DNA iniciované Tet enzymem.

Obr. 3: Přehled metod detekce epigenetické metylace cytozinů v DNA.

Obr. 4: Přehled metod detekce metylace cytozinů v DNA, které jsou založené na afinitním obohacení o metylovanou DNA.

Obr. 5: Schéma metody afinitního zachycení s metyl-CpG vazebnou doménou (MBD-capture).

Obr. 6: Přehled metod detekce metylace cytozinů v DNA, které jsou založené na použití specifických restrikčních enzymů.

Obr. 7: Přehled metod detekce metylace cytozinů v DNA, které jsou založené na specifických chemických reakcích.

Obr. 8: Přehled metod detekce metylace cytozinů v DNA, které jsou založené na specifických enzymatických reakcích.

Obr. 9: Přehled reakcí metody TET asistovaného pyridin boranového sekvenování (TAPS).

Obr. 10: Porovnání výsledků bisulfiového sekvenování a metody TET asistovaného pyridin boranového sekvenování (TAPS).

Obr. 11: Přehled metod přímo detekující metylaci cytozinů v DNA.

Obr. 12: Schéma afinitní purifikace cílového proteinu.

Obr. 13: Prototyp přístroje na kultivaci suspenzních buněk.

Obr. 14: Výsledek kontroly úspěšnosti transfekce buněčné linie Expi293 plazmidem mTet1CD (pcDNA3-Flag).

Obr. 15: Kontrola přesátí separovaných proteinů na nitrocelulózovou membránu pomocí barvení s Ponceau S pro vzorky určené ke kontrole průběhu purifikace rekombinantního mTet1CD proteinu.

Obr. 16: Výsledek kontroly úspěšnosti purifikace mTet1CD proteinu.

1 Úvod

Epigenetika je vědní obor zabývající se studiem dědičných změn genové exprese, které nezahrnují změny v primární sekvenci DNA. Mezi základní epigenetické mechanismy patří kovalentní modifikace DNA, posttranslační modifikace histonů, histonové varianty a některé typy RNA. Nejlépe prostudovanou kovalentní modifikací DNA je metylace cytozinů. Metylace cytozinů je nejčastěji spojována s transkripční inaktivací, ale dle novějších poznatků může způsobovat i aktivaci transkripce. Změny metylace jsou v určitých oblastech genomu vázány na věk jedince, a proto může být analýza metylace použita k určení věku jedince ze vzorku jeho DNA. Tohoto faktu je možné využít například pro forenzní účely.

V průběhu času byla vyvinuta celá řada metod umožňujících detekci metylace cytozinů. Starší metody umožňují především analýzu metylace omezenou na cílové oblasti genomu. S rozvojem mikroarrayí a sekvenačních metod nové generace se analýza metylace rozšířila i pro celogenomové použití. Metody umožňující detekci metylace cytozinů můžeme rozdělit na metody založené na afinitním obohacení o metylovanou DNA, metody založené na použití specifických restrikčních enzymů, metody založené na specifických chemických reakcích, metody založené na specifických enzymatických reakcích a metody přímo detekující DNA metylaci.

Pro některé z metod analýzy metylace DNA je nezbytné použití specifických proteinů a enzymů, které je nutné připravit jako rekombinantní proteiny. Příprava rekombinantních proteinů se sestává z konstrukce expresního vektoru, vpravení vektoru do vybraného expresního systému, exprese rekombinantního proteinu a jeho následné izolace a purifikace. Rekombinantní proteiny mohou být exprimovány v buněčných kulturách bakterií, kvasinek, savců, rostlin nebo hmyzu, v transgenních rostlinách a živočiších nebo pomocí cell-free technik. Pro purifikaci rekombinantních proteinů se nejčastěji využívá afinitních fúzních značek, které umožňují selektivní zachycení cílového proteinu na afinitním substrátu a jeho specifickou eluci.

2 Cíle práce

Cílem teoretické části diplomové práce bylo sepsat rešerši pojednávající o metodických přístupech k detekci metylace cytozinů. Cílem praktické části diplomové práce bylo exprimovat a purifikovat rekombinantní enzym mTet1CD pro metodu TET asistovaného pyridin boranového sekvenování (TAPS, TET-assisted pyridine borane sequencing), která umožňuje detekci metylace cytozinů.

3 Literární přehled

3.1 Epigenetika

3.1.1 Úvod do epigenetiky

Stabilita a flexibilita jsou velmi důležitými vlastnostmi genomu. Genetická informace musí být spolehlivě propagována jak v rámci vývoje jedince, tak napříč generacemi. Zároveň ale musí genom mnohobuněčných organismů umožňovat tvorbu různých buněčných typů, z nich každý musí být schopen reagovat na změny prostředí (Kohli *et* Zhang, 2013). Schopnost eukaryotických buněk udržet si rozdílný fenotyp i přesto, že obsahují totožnou genetickou informaci, je zajištěna možností regulace genové exprese (Biswas *et* Rao, 2018).

S regulací genové exprese úzce souvisí pojem epigenetika, který byl poprvé představen v roce 1942 C. H. Waddingtonem. Význam pojmu epigenetika byl následně během let mnohokrát modifikován. Dnes může být epigenetika chápána jako studium změn v genové expresi, které jsou mitoticky a/nebo meioticky dědičné a nezahrnují změny v primární sekvenci DNA (Dupont *et al*., 2009; Deans *et* Maggert, 2015). Mezi epigenetické faktory řadíme kovalentní modifikace DNA, posttranslační modifikace histonů, histonové varianty a někdy mezi ně bývají řazeny i některé typy RNA (Dupont *et al*., 2009; Daxinger *et* Whitelaw, 2012; Skvortsova *et al*., 2018).

3.1.2 Kovalentní modifikace DNA se zaměřením na metylaci cytozinů

Kovalentní modifikace DNA bází je jedním z hlavních epigenetických mechanismů regulujících genovou expresi u rostlin i živočichů (Kumar *et al*., 2018). I přesto, že existence těchto modifikací byla popsána již v roce 1948, až o více než 20 let později byla poprvé navržena a v 80. letech pak několika studiemi potvrzena jejich role při modulaci genové exprese (Dupont *et al*., 2009; Moore *et al.*, 2013). Nejlépe prostudovanou kovalentní modifikací DNA je metylace cytozinů, mimo to sem řadíme i hydroxymetylaci, formylaci a karboxylaci cytozinu a metylaci adeninu (Biswas *et* Rao, 2018; Kumar *et al*., 2018),

Metylace cytozinu označuje připojení metylové skupiny (-CH_3) na pátý uhlík pyridinového kruhu cytozinu za vzniku 5-metylcytozinu (5mC). Úroveň metylace se liší jak mezi jednotlivými druhy, tak i mezi jednotlivými oblastmi genomu u konkrétního druhu i jedince (Daxinger *et* Whitelaw, 2012; Kumar *et al*., 2018). U člověka jsou více než 4 % všech cytozinů v genomu metylovány a největší zastoupení 5mC se nachází v CpG ostrůvcích (Kohli *et* Zhang, 2013; Breiling *et* Lyko, 2015; Kumar *et al*., 2018). CpG ostrůvky jsou oblasti genomu, kde jsou akumulovány dinukleotidy cytozinu a guaninu. V genomu savců jsou CpG místa metylovány ze 70 - 80 % (Li *et* Zhang, 2014). Lidský genom obsahuje něco okolo 30 000 CpG dinukleotidů, ze kterých se každý může vyskytovat v metylovaném nebo demetylovaném stavu. Počet možných metylačních vzorů v haploidním genomu (2 na 30 000) tedy

převyšuje počet atomů ve známém vesmíru (10 na 28). Tento fakt zvyšuje jak potencionální informační obsah genomu, tak ale i obtížnost statistické analýzy (Edwards *et al.*, 2017; Bestor *et al*., 2015).

Metylace cytozinů je klasicky asociována s transkripčně neaktivním stavem genů a ve specifických oblastech genomu může pomoci formovat buněčný program v průběhu vývoje jedince. Dlouhodobě hypermetylované oblasti potom hrají důležitou roli v procesech imprintingu, inaktivace X-chromozomu a potlačení aktivity mobilních genetických elementů (Kohli *et* Zhang, 2013; Li *et* Zhang, 2014). Metylace cytozinů v oblasti promotoru může potlačovat expresi genů tím, že zabrání navázání specifických transkripčních faktorů nebo může vázat mediátory remodelace chromatinu a další represory genové exprese (Dupont *et al*., 2009; Bogdanović *et* Lister, 2017). Novější studie nasvědčují tomu, že funkce 5-metylcytozinu a jeho oxidovaných derivátů, jako například 5-hydroxymetylcytozinu (5hmC), může být mnohem komplexnější, než se původně předpokládalo. V závislosti na typu buňky by 5mC mohl být schopný interagovat s řadou transkripčních modulátorů, a dokonce mít spojitost s transkripční aktivací (Spruijt *et al.*, 2013; Bogdanović *et* Lister, 2017).

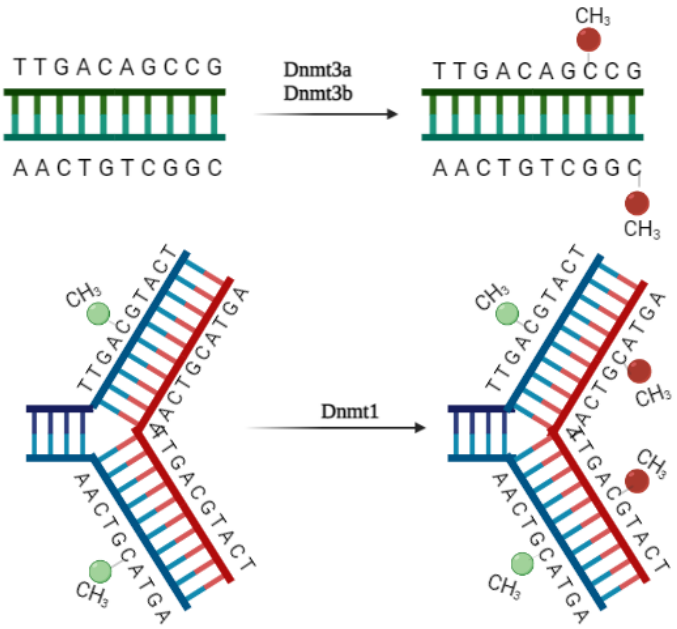
3.1.3 Změny metylačního profilu v průběhu života jedince

Epigenetické značky ustálené v tkáních během života organismu nemají význam ve vztahu k další generaci. Pouze epigenetický profil gamet má potenciál přispět k fenotypu potomka (Daxinger *et* Whitelaw, 2012). Zatímco v somatických buňkách je metylační profil genomu poměrně stabilní, metylační profil v průběhu preimplantačního vývoje a formace zárodečné linie vykazuje značnou dynamiku. Ihned po oplodnění vajíčka spermií dochází k téměř celkové demetylaci otcovského jádra následované významným poklesem celkové metylace DNA v zygotě. Nejnižší hladiny metylace je dosaženo ve fázi blastocysty. Embryologický genom je remetylován po nidaci, kdy také dochází ke ztrátě pluripotence buněk (Skvortsova *et al*. 2018; Bogdanović *et* Lister, 2017). V průběhu této komplexní demetylace zůstává část cytozinů metylována a vykazuje typ mezigenerační dědičnosti, kterou nazýváme imprinting (Liberman *et al*., 2019).

Po nidaci se z části epiblastových buněk tvoří primordiální zárodečné buňky, které jsou prekurzory buněk zárodečných. Tyto buňky při svém vzniku musí projít epigenetickým reprogramačním procesem, který zahrnuje i téměř celogenomové vymazání metylačního profilu (Kohli *et* Zhang, 2013). U těchto buněk je znovu obnoven metylační profil, kdy mimo jiné je v závislosti na pohlaví jedince ustálen imprinting genů v gonádách (Skvortsova *et al*. 2018). Nicméně byly identifikovány oblasti genomu, které jsou k demetylaci v této fázi vývoje imunní, zachovávají si svůj metylační profil a mohou být tak transgeneračně epigeneticky děděny. Mnoho z těchto lokusů je spojováno s nervovou nebo metabolickou funkcí (Tang *et al*., 2015). Příkladem epigenetického transgeneračně dědičného efektu může být vliv stravy pregnantní matky na fenotyp potomstva (Ahmed, 2010). V pozdějším vývoji jedince probíhají epigenetické změny v menším rozsahu v reakci na vnitřní a vnější změny (Li *et* Zhang, 2014).

3.1.4 Základní faktory asociované s metylací DNA

Obecně můžeme klíčové faktory asociované s epigenetickými změnami rozdělit na zapisovače (writers), mazače značek (erasers) a čtenáře (readers). Mezi zapisovače patří komponenty schopné modifikovat heterocyklické báze nebo specifické aminokyselinové zbytky histonů, mazači značek jsou komponenty schopné tyto epigenetické značky odstraňovat a čtenáři jsou rozmanitá skupina proteinů, které dokážou epigenetické značky rozeznávat a interpretovat jejich informaci (Biswas *et* Rao, 2018; Kumar *et al*., 2018).

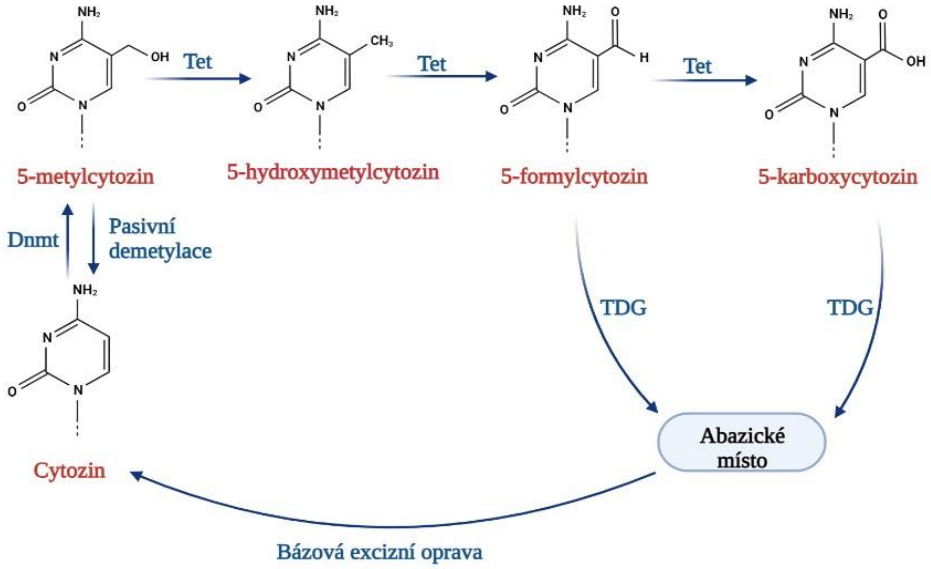


Obr. 1: Cesty metylace DNA. Dnmt3a a Dnmt3b metylují nemodifikovanou DNA *de novo*. Dnmt1 zajišťuje metylaci dceřiného vlákna podle vzoru vlákna mateřského při replikaci DNA. Vytvořeno v Biorender.com dle Moore *et al.*, 2013.

V případě metylace DNA jsou zapisovači DNA metyltransferázy (Dnmt). Dnmt katalyzují přenos metylové skupiny z donorové molekuly S-adenosylmetioninu (SAM) na pátý uhlík cytozinu v DNA. DNA metyltransferázy jsou evolučně konzervovanou rodinou enzymů, do které u savců řadíme pět zástupců: Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b a Dnmt3L (Moore *et al.*, 2013; Biswas *et* Rao, 2018). Po replikaci DNA je nově syntetizované vlákno rozpoznáno Dnmt1, která kopíruje metylační vzor z mateřského vlákna na nově syntetizované vlákno dceřino, což dělá z DNA metylace dědičnou značku. Dnmt2 je jedinou metyltransferázou, která katalyzuje metylaci RNA. Dnmt3a a Dnmt3b jsou známy jako *de novo* metyltransferázy a mají funkci v gametogenezi a ranné embryogenezi (viz Obr. 1). Dnmt3L sám o sobě nemá katalytickou aktivitu, ale může se vázat s Dnmt3a a Dnmt3b a stimulovat jejich metyltransferázovou aktivitu (Moore *et al.*, 2013; Biswas *et* Rao, 2018; Liberman *et al*., 2019).

Epigenetické značky mohou být odstraněny při potřebě modifikovat expresi genů v daném lokusu v určité buňce. K DNA demetylaci může docházet buď pasivní nebo aktivní cestou. K pasivnímu odstranění metylovaných cytozinů dochází v průběhu replikace DNA, kdy v případě nepřítomnosti funkční Dnmt1 zůstává nově syntetizované vlákno nemetylované (Fu *et* He, 2012; Moore *et al.*, 2013; Biswas *et* Rao, 2018).

Aktivní DNA demetylace se může objevovat jak u dělících se, tak i u nedělících se buněk. Jedná se o proces podmíněný průběhem enzymatické reakce (Moore *et al.*, 2013). Demetylace probíhá prostřednictvím série chemických reakcí, které 5mC dále modifikují deaminací a/nebo oxidací za vzniku produktů, které jsou rozpoznávány a nahrazovány klasickým cytozinem (Moore *et al.*, 2013; Chen *et al*., 2017; Kumar *et al*., 2018). Aktivní demetylace DNA může být zprostředkována prostřednictvím rodiny enzymů Tet (ten-eleven translocation, rekurentní translokace t(10;11)(q22;q23), mezi chromozómy 10 a 11, tvořící fúzní protein MLL-TET1 u pacientů trpících akutní myeloidní leukemií (Lorsbach *et al*., 2003)). Dioxygenázová rodina Tet enzymů má u savců tři členy: Tet1, Tet2 a Tet3 (Bogdanović *et* Lister, 2017; Chen *et al*., 2017). Tet enzymy se podílejí na konverzi 5mC na 5-hydroxymetylcytozin (5hmC) a pak dále přes 5-formylcytozin (5fC) na 5-karboxycytozin (5caC). 5hmC je u živočichů stabilní epigenetickou značkou (Bogdanović *et* Lister, 2017; Kumar *et al*., 2018). 5fC a 5caC báze jsou rozpoznávány a z daného místa vystřiženy pomocí tymin-DNA-glukozidázy (TDG). Dochází ke vzniku abazického místa, které je zaplněno nemodifikovaným cytozinem pomocí mechanismu bázové excizní opravy (BER) (viz Obr. 2) (Rasmussen *et* Helin, 2016; Chen *et al*., 2017). Tet proteiny jsou multidoménové enzymy. Katalytická oblast na C-konci obsahuje dvouvláknovou β-helix doménu, na cystein bohatou doménu a vazebná místa pro kofaktory. Tet1 a Tet3 navíc nesou na N-konci CXXC doménu, která se váže na DNA (Kohli *et* Zhang, 2013; Rasmussen *et* Helin, 2016; Biswas *et* Rao, 2018). Variabilita v molekulární struktuře jednotlivých izoforem Tet ovlivňuje jejich distribuci. Tet1 odstraňuje imprintované značky v primordiálních zárodečných buňkách, zatímco Tet3 odstraňuje rodičovské metylační značky v zygotě. Tet2 hraje podstatnou roli v průběhu hematopoézy (Gu *et al*., 2011; Yamaguchi *et al*., 2013; Solary *et al*., 2014; Biswas *et* Rao, 2018).



Obr. 2: Schéma aktivní demetylace DNA iniciované Tet enzymem. Metylace DNA (5-metylcytozin) je vytvořen a udržován působením Dnmt enzymů. 5-metylcytozin může být oxidován působením Tet enzymu přes 5-hydroxymetylcytozin, 5-formylcytozin až na 5-karboxycytosin. 5-formylcytozin a 5-karboxycytosin mohou být působením tymin-DNA-glukozidázy (TDG) vystřiženy za tvorby abazického místa, které je v průběhu bázové excizní opravy nahrazeno cytozinem. Vytvořeno v Biorender.com dle Kohli *et* Zhang, 2013.

Metylované cytoziny jsou rozeznány skupinou proteinů nazývaných čtenáři, které zprostředkovávají efekt těchto změn a rekrutují chromatin remodelující komplexy asociované s transkripční represí. Mezi tyto proteiny řadíme tři proteinové rodiny: proteiny obsahující metyl-CpG vazebnou doménu (MBD), proteiny obsahující SRA doménu a proteiny se zinkovým prstem (ZnF, zinc finger proteins) (Moore *et al.*, 2013; Biswas *et* Rao, 2018).

3.1.5 Důležitost analýzy metylace DNA

Epigenetické změny jsou důležité při determinaci buněčného růstu, vývoje, diferenciace a tolerance na abiotický i biotický stres (Kumar *et al*., 2018). Mnoho komplexních nemocí jako cukrovka typu II, schizofrenie, autoimunitní nemoci nebo rakovina není možné vysvětlit pouze jednoduchou změnou v genetické informaci. Změny epigenetického profilu mohou také přispívat ke vzniku těchto onemocnění, což přináší potenciální nové cíle léčby (Li *et* Zhang, 2014).

Metylace DNA se v určitých lokusech genomu mění s věkem jedince, kdy možnost predikce věku z DNA získané jako důkaz na místě činu může mít značnou cenu pro využití při forenzním vyšetřování. Změny epigenetického profilu DNA vázané na věk byly popsány jako dva fenomény: epigenetický drift a epigenetické hodiny. Epigenetický drift je ovlivněn prostředím, ve kterém jedinec stárne a vysvětluje rozdíly mezi lidskými epigenomy u jedinců se stejným věkem. Naopak epigenetické hodiny ukazují na změnu metylačního profilu, která je společná pro všechny jednotlivce stejného věku, a proto můžou být tyto lokusy použity pro predikci věku. Rozvoj mikroarrayí a sekvenačních technologií

vedl k identifikaci celé řady lokusů, jejichž metylace je asociovaná s věkem a byla vytvořena řada predikčních modelů věku pro lidskou genomickou DNA různého původu (krev, sliny, spermie, zuby). Ovšem pro lepší možnosti využití těchto modelů, by bylo potřebné identifikovat další lokusy, jejichž metylace je asociovaná s věkem, optimalizovat použití moderních metod detekce metylace a vyvinout software pro interpretaci získaných dat (Jung *et al*., 2017).

Detekce metylace DNA má podstatný význam pro vědecké, diagnostické, ale i forenzní účely. Proto se v posledních letech intenzivně pracuje na vývoji spolehlivých metod pro detekci metylace DNA (Chen *et al*., 2017; Kumar *et al*., 2018).

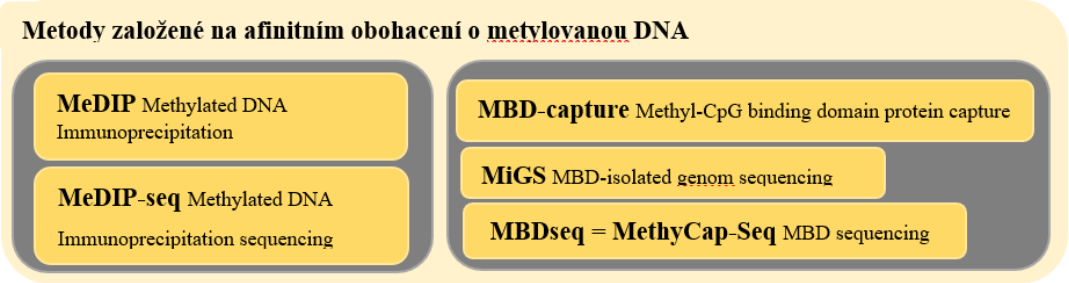
3.2 Metody detekce epigenetické metylace cytozinů

Detekce rozmístění nukleotidových modifikací v rámci genomu je nenahraditelné pro studium jejich funkcí (Chen et al., 2020). V rámci této kapitoly diplomové práce byl vytvořen přehled metod, které umožňují detekci metylace DNA (viz Obr.3).

Obr. 3: Přehled metod detekce epigenetické metylace cytozinů v DNA.

3.2.1 Metody založené na afinitním obohacení o metylovanou DNA

Metody využívající afinitní obohacení o metylovanou DNA jsou založené na specifickém zachycení metylovaných úseků genomu (Serre *et al*., 2010). Obohacená frakce by pak měla obsahovat výrazně větší počet modifikovaných cytozinů než původní vzorek DNA, což usnadňuje následnou analýzu (Chen *et al*., 2020). Používají se dva základní přístupy pro obohacení o metylovanou DNA: imunprecipitace metylované DNA (MeDIP, methyl-DNA immunoprecipitation) a afinitní zachycení s metyl-CpG vazebnou doménou (MBD-capture, methyl-CpG binding domain protein capture) (viz Obr. 4) (Nair *et al*., 2014; Ross *et al*., 2014).

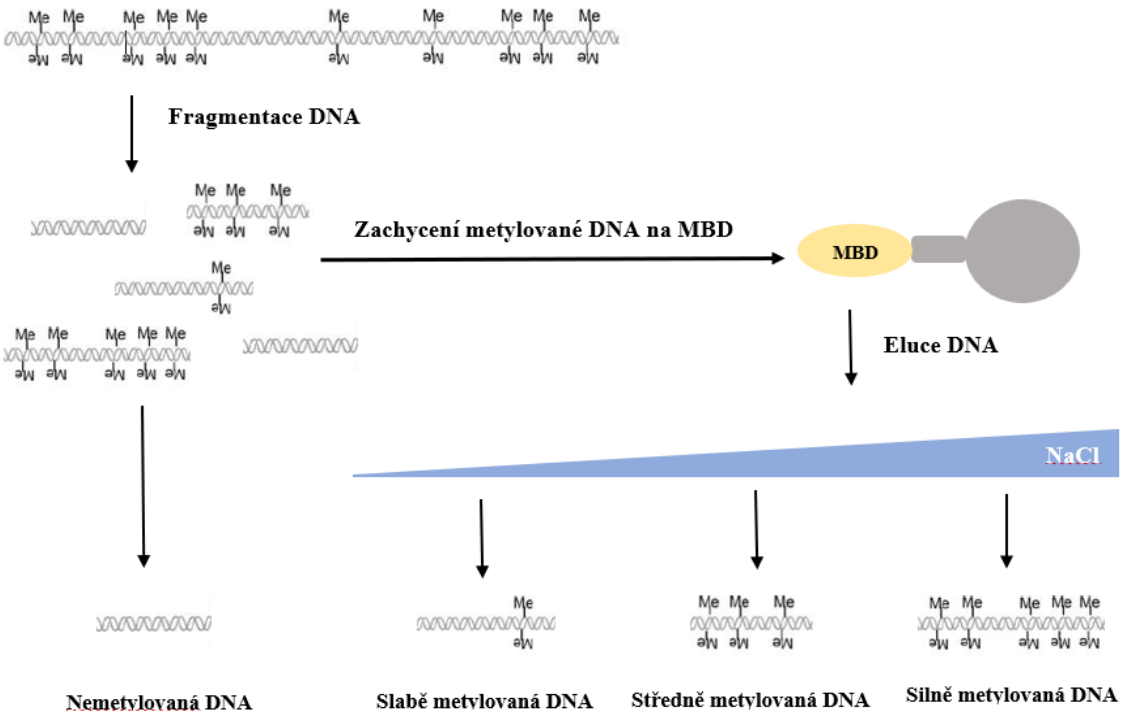


Obr. 4: Přehled metod detekce metylace cytozinů v DNA, které jsou založené na afinitním obohacení o metylovanou DNA.

Metoda MeDIP využívá monoklonálních protilátek cílených proti 5mC. Analyzovaná DNA je nejprve fragmentována sonikací na náhodné úseky o délce 300 – 600 bp. Fragmenty DNA jsou denaturovány, protože používané protilátky mají vyšší afinitu k 5mC v jednovláknové DNA. Dalším krokem je imunoprecipitace. Precipitovaná DNA může být použita k analýze metylačního statusu konkrétních genů za využití specifických primerů, nebo může být využita pro hybridizaci na mikroarraye (MeDIP-chip), případně pro sekvenování (MeDIP-seq) (Jacinto *et al*., 2008). Tyto metody jsou limitovány nízkým rozlišením pouze na úrovni zachycených fragmentů a neumožňují přesnou lokalizaci modifikace (Trimarchi *et al*., 2012; Nair *et al*., 2014; Chen *et al*., 2020). Metodu MeDIP tedy není možné použít k určení absolutní úrovně metylace (Down *et al*., 2008). V metodě MeDIP precipituje jednovláknová DNA, která obsahuje, byť jen jedno metylované CpG místo (Nair *et al*., 2014), takže výsledky se získají i pro slabě metylované oblasti, které nemusejí být biologicky relevantní (Serre *et al*., 2010).

Metoda pracující na základě **afinitního zachycení s MBD** využívá rekombinantní metyl-CpG vazebnou doménu MBD2 proteinu k precipitaci sekvencí s vysokou hustotou metylace po náhodném fragmentování dvouvláknové DNA pomocí sonikace. Metylovaná DNA je zachycena na MBD doméně vázáné v afinitní koloně, a následně kontrolovaně eluována po frakcích v závislosti na hustotě metylovaných CpG (Brinkman *et al*. 2010). Pro eluci je použito činidlo s postupně se zvyšující koncentrací solí. Frakce s menší koncentrací solí uvolňuje fragmenty s menším počtem metylovaných skupin, zatímco frakce s vyšším obsahem solí eluují vícenásobně metylovanou DNA (viz Obr. 5) (Nair

et al., 2014). MBD se s vyšší afinitou váže na oblasti, kde se vyskytuje více metylovaných cytozinů v těsné blízkosti a bude proto přednostně vychytávat biologicky relevantní mnohonásobně metylované fragmenty (Serre *et al*., 2010).



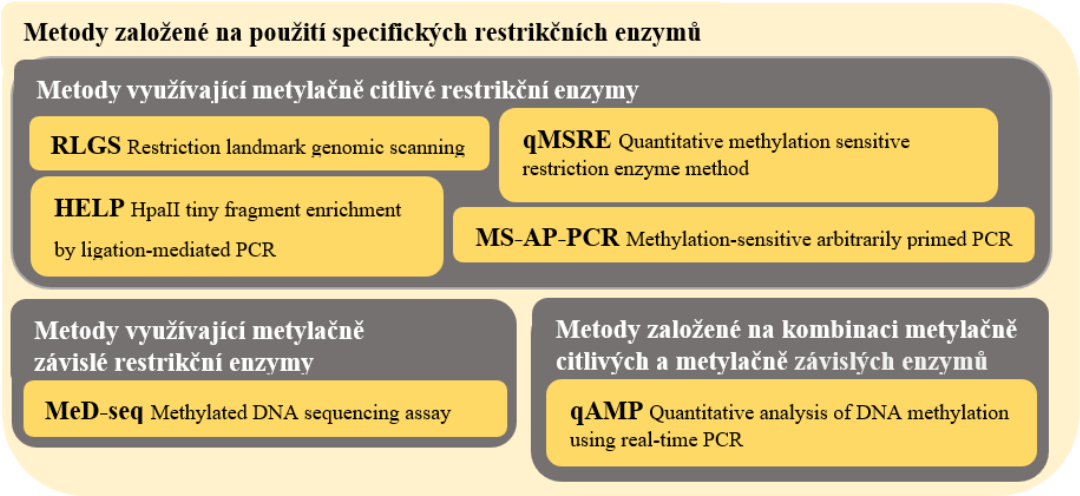
Obr. 5: Schéma metody afinitního zachycení s metyl-CpG vazebnou doménou (MBD-capture). DNA je fragmentována. Metylovaná DNA je vázána na MBD v afinitní koloně. Navázaná DNA je eluována po frakcích na základě úrovně metylace, pomocí roztoků chloridu sodného s postupně se zvyšující molární koncentrací. Vytvořeno v Biorender.com dle Nair *et al*., 2014.

Metody založené na afinitním obohacení o metylovanou DNA byly původně omezeny na lokalizované úseky genomu. Dnes mohou některé z těchto technik umožňovat i celogenomové metylační analýzy za využití mikroarrayí nebo sekvenování (Nair *et al*., 2014). Spojení metod založených na obohacení metylovanou DNA s technikami sekvenování nové generace vedlo k vývoji metod jako například MBD-izolované genomové sekvenování (MiGS, MBD-isolated genome sequencing), MBDseq = MethyCap-Seq nebo MeDIP-seq. Tyto techniky umožňují celogenomovou analýzu a představují finančně výhodnější řešení v porovnání s celogenomovým bisulfitovým selvenováním, protože je výrazně snížena komplexita analyzovaných frakcí (Aberg *et al*. 2015; Bhasin *et al*., 2016).

Jedná se o poměrně spolehlivé a levné metody, které ovšem neumožňují identifikaci metylace na úrovni jednotlivých bází a neposkytují kvantitativní určení metylace (Zhao *et al*. 2020).

3.2.2 Metody založené na použití specifických restrikčních enzymů

Restrikční enzymy, které je možné použít při analýze metylace DNA, můžeme rozdělit do dvou základních skupin: metylačně citlivé restrikční enzymy (MSRE, methylation-sensitive restriction enzymes) a metylačně závislé restrikční enzymy (MDRE, methylation dependent restriction enzmes) (Qakes *et al.*, 2014). MSRE štěpí pouze nemetylovanou DNA a metylovaná DNA zůstává neporušená, zatímco MDRE specificky rozeznává metylované oblasti (viz Obr. 6) (Boers *et al.*, 2018).



Obr. 6: Přehled metod detekce metylace cytozinů v DNA, které jsou založené na použití specifických restrikčních enzymů.

3.2.2.1 Metody využívající metylačně citlivé restrikční enzymy (MSRE)

Metylačně citlivé restrikční endonukleázy se vyvinuly u bakterií jako obraná strategie. Tato strategie umožňuje bakteriím selektivně ničit DNA bakteriofágu, ale zároveň jejich vlastní genetickou informaci, která je chráněna metylací, ponechat nedotčenou (Kanel *et* Huber, 2013).

Metody využívající MSRE můžou být rozděleny na základě toho, kterou z následujících technik využívají při vyhodnocení: elektroforéza, PCR, qPCR nebo mikroarraye. Obecně můžeme o těchto metodách říct, že úroveň metylace je hodnocena relativní kvantifikací na základě porovnání. Můžou být porovnávány výsledky naštěpeného vzorku DNA a kontroly, výsledky vzorku štěpeného dvěma enzymy s rozlišnými vlastnostmi ve vztahu k metylaci nebo výsledky dvou různých tkání, případně vzorků zdravé a nemocné tkáně (Zilberman *et* Henikoff, 2007).

Analýzu pomocí gelové elektroforézy využívá metoda genomického skenování restrikčního omezení (RLGS, Restriction landmark genomic scanning). RLGS využívá metylačně citlivých restrikčních enzymů (např. *NotI*) a dvoudimenzionální elektroforézy. DNA je naštěpena MSRE a místa vzniklá po štěpení jsou radioaktivně značena. Výsledkem analýzy je dvoudimenzionální vzor RLGS fragmentů (Smiraglia *et al.*, 2007). Absence RLGS fragmentu je způsobena metylací restrikčního místa, která znemožňuje štěpení a následné značení (Rush *et* Plass, 2002). Metoda RLGS sice neumožnuje

identifikace metylace na úrovni jednotlivých bází, ale jedná se o vysoce reprodukovatelnou metodu, která může být použita k porovnání metylačních profilů mezi dvěma vzorky (např. vzorek ze zdravé a rakovinné tkáně) (Smiraglia *et al.*, 2007). Největší limitací této metody je fakt, že umožňuje hodnocení metylace pouze v restrikčním motivu použitého enzymu a nepokrývá tak všechny CpG v genomu (Smiraglia *et al.*, 2007). Mezi další nevýhody této metody patří nutnost použití velkého množství DNA, a složitá evaluace výsledných dvoudimenzionálních vzorů (Liang *et al.*, 2002).

Použití metylačně specifických restrikčních enzymů v kombinaci s PCR reakcí přineslo například metodu metylačně citlivé PCR s náhodnými primery (MS-AP-PCR, methylation sensitive arbitrarily primed PCR). MS-AP-PCR je provedena naštěpením genomické DNA metylačně senzitivním restrikčním enzymem. Následně probíhá PCR reakce, kdy prvních několik cyklů probíhá amplifikace při nižší teplotě nasedání primerů, která je pak v dalších cyklech zvyšována (Peinado *et al.*, 1997; Liang *et al.*, 2002). Při nižší teplotě dochází k nasedání primerů na mnoho sekvencí genomu. Se zvyšující se teplotou se zvyšuje přesnost nasedání primerů a jsou tedy dále amplifikovány pouze fragmenty, kde primery nasedají přesně. Vznikající fragment mohou být analyzovány po separaci pomocí elektroforézy (Peinado *et al.*, 1997). V tomto případě je použití této metody limitováno pouze pro porovnání metylačních profilů dvou vzorků (Liang *et al.*, 2002).

Při využití qPCR v kombinaci s restrikčními enzymy je DNA nejprve štěpena metylačně citlivými restrikčními enzymy a následně probíhá PCR reakce s primery, které jsou specifické k cílovému místu. Dochází tedy pouze k amplifikaci sekvencí, které jsou metylovány a nejsou tedy štěpeny. Detekce amplikonů může být provedena i pouze elektroforézou, ale pro kvantitativní hodnocení je třeba použít qPCR například za využití SYBR Green (Kanel *et* Huber, 2013).

Na využití mikroarrayí pro detekci je závislá metoda obohacení malými *HpaII* fragmenty pomocí ligace zprostředkované PCR (HELP, *HpaII* tiny fragment enrichment by ligation mediated PCR). Tato metoda využívá vedle MSRE *HpaII* i restrikční enzym *MspI*, který rozpoznává stejné restrikční místo jako *HpaII*, ale štěpí DNA bez ohledu na její metylační stav. Použití tohoto druhého restrikčního enzymu umožňuje kvantifikaci úrovně metylace v rámci genomu (Suzuki *et* Greally, 2010). DNA je rozdělena na dva vzorky, kdy každý z nich je podroben působení jednoho z těchto restrikčních enzymů. Ke vzniklým koncům jsou ligovány oligonukleotidy, které slouží jako templát pro PCR primery. Amplifikované fragmenty jsou značeny fluorochromy, různými pro *HpaII* a *MspI* fragmenty pomocí náhodné vazby primerů a společně hybridizovány na genomickou mikroarray (Khulan *et al*., 2006). Asi jen 8 % CpG obsahují restrikční místo pro *HpaII*, což také představuje limit pro tuto metodu (Irizarry *et al*., 2008).

3.2.2.2 Metody využívající metylačně závislé restrikční enzymy (MDRE)

Mezi metylačně dependentními restrikčními enzymy můžeme najít takové, které rozpoznávají metylovaný cytozin a štěpí vždy ve stejné vzdálenosti od této modifikace. V případě symetricky

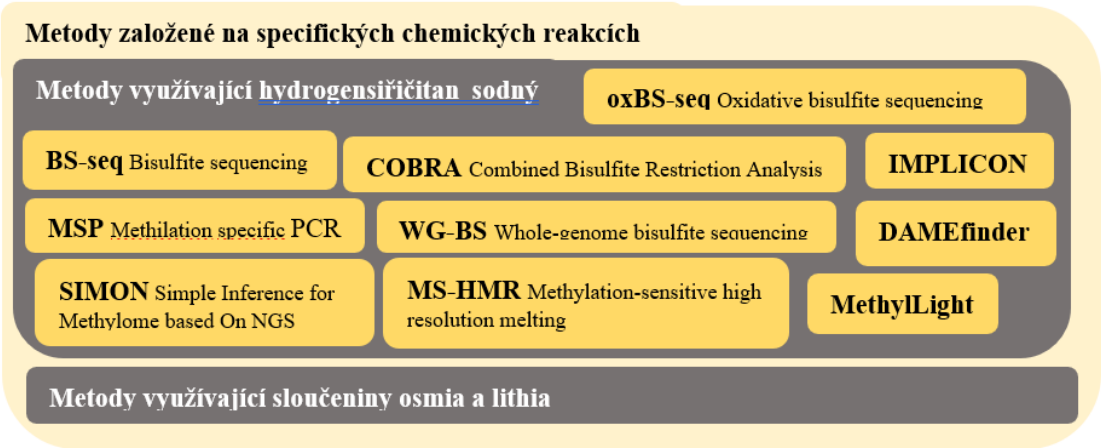
metylovaných CpG pak dochází ke tvorbě fragmentů konstantní velikosti, které vždy nesou modifikovaný cytozin. Mezi enzymy s touto schopností řadíme *MspJI* a jeho homology, například *FspEI*, *LpnPI* a *AspBHI* (Cohen-Karni *et al*., 2011). Na tomto principu je založena technika sekvenování metylované DNA (MeD-seq, methylated DNA sequencing assay), která využívá digesci s restrikčním enzymem *LpnPI*, který tvoří 32 bp fragmenty metylované DNA v případě symetricky modifikovaných CpG. Po naštěpení jsou na fragmenty připojeny adaptory a je provedena velikostní selekce fragmentů. Fragmenty o dané velikosti jsou dále amplifikovány pomocí PCR a sekvenovány. Výsledek je bioinformaticky a analyticky vyhodnocován. Jedná se o metodu, která díky použití sekvenování umožňuje analýzu metylace při rozlišení na jeden nukleotid. Sekvenování je výrazně zjednodušeno výběrem pouze metylovaných sekvencí. Tato technika umožňuje analyzovat více než 50 % všech CpG v rámci genomu (Boers *et al*., 2018).

3.2.2.3 Metody založené na kombinaci metylačně citlivých a metylačně závislých enzymů

Objevují se i metody, které pro zpřesnění analýzy používají kombinaci metylačně citlivých a metylačně závislých restrikčních enzymů. Příkladem takovéto technologie je kvantitativní analýza DNA metylace za využití real-time PCR (qAMP, quantitative analysis of DNA methylation using real-time PCR). V této metodě je DNA rozdělena na dva vzorky, kdy každý vzorek je podroben působení jednoho z typů restrikčních enzymů. U obou digestů je provedena qPCR reakce s primery, které specificky amplifikují zkoumané oblasti obsahující informativní restrikční místo. Výsledek je hodnocen na základě porovnání průměrných Ct hodnot vzorků štěpených pomocí MSRE a MDRE. Jedná se o metodu, která umožňuje rychlou analýzu metylace cílových lokusů, ale její využití je omezené na místně specifickou analýzu úrovně metylace (Qakes *et al*., 2014).

3.2.3 Metody založené na specifických chemických reakcích

Jsou známy chemické látky, které specificky reagují pouze s modifikovanými nebo naopak nemodifikovanými bázemi. Tato vlastnost může být výhodně využita při analýze metylace DNA (viz Obr. 7) (Chen *et al*., 2020).



Obr. 7: Přehled metod detekce metylace cytozinů v DNA, které jsou založené na specifických chemických reakcích.

3.2.3.1 Metody využívající hydrogensiřičitan sodný

Bisulfitové sekvenování je označováno jako zlatý standard detekce 5mC. Tato metoda využívá schopnosti hydrogensiřičitanu sodného (bisulfitu sodného) rozdílně reagovat s metylovanými a nemetylovanými cytoziny (Zhao *et al*. 2020). Bisulfit sodný způsobuje deaminaci nemetylovaných cytozinů za vzniku uracilu, zatímco metylované cytoziny jsou chemicky chráněny a zůstávají reakcí nedotčeny. Při následující PCR reakci jsou vzniklé uracily v templátovém vláknu čteny jako tyminy. Na základě porovnání sekvence nativní DNA se sekvencí DNA, která byla vystavena působení hydrogensiřičitanu sodného, je možné metylované cytoziny detekovat (Kanel *et* Huber, 2013; Blewitt *et al*., 2019). Použití bisulfitové konverze pro analýzu metylace bylo poprvé představeno v roce 1992 australskou genetičkou Marianne Formerovou. V této původní verzi metody se k detekci využívalo Maxamovo-Gilbertovo chemické sekvenování (Frommer *et al*., 1992). Tato metoda v průběhu let prošla řadou vylepšení a modernizací. Vývoj modernějších sekvenačních metod a jejich využití v souvislosti s bisulfitovým sekvenováním dnes umožňuje celogenomovou analýzu metylace s rozlišením na úrovni jedné báze (WGBS, Whole-genome bisulfite sequencing).

Bisulfitová konverze při analýze metylace je hojně využívaná a vyznačuje se mnoha výhodami, ale zároveň nese i řadu limitací. Mezi nejzásadnější nevýhody se řadí časová, pracovní a finanční náročnost (Irizarry *et al*., 2008). Navíc je tato metoda založena na poměrně drsné chemické reakci, která způsobuje degradaci templátové DNA. Její využití tedy není vhodné pro vzorky obsahující malé množství DNA (Tanaka *et* Okamoto, 2007). Spolehlivost a přesnost získaných výsledků je závislá na efektivitě přeměny nemetylovaných cytozinů na uracily (Zilberman *et* Henikoff, 2007; Hernández *et al*., 2013). Vzhledem k tomu, že většina cytozinů v lidském genomu (> 95 %) se nachází v nemetylovaném stavu, musí zde dojít k přeměně v mnoha pozicích genomu, což vede ke snížení komplexity sekvence, nižší kvalitě sekvenování a nerovnoměrnému pokrytí genomu (Adusumalli *et al*., 2015; Olova *et al*., 2018; Liu *et al*., 2019).

I přes tyto nevýhody poskytuje metoda bisulfitového sekvenování kvalitativní, kvantitativní a poměrně efektivní přístup k identifikaci 5mC s přesností na úrovni jedné báze (Li et Tollefsbol, 2011). Proto také byla v průběhu let vyvinuta řada dalších technik analýzy metylace založených na tomto principu.

Mezi metody, které vychází z využití bisulfitové konverze, patří metylačně specifická PCR (MSP, Methylation specific PCR), kombinovaná bisulfitová restrikční analýza (COBRA, Combined bisulfite restriction analysis), metoda MethylLight, metoda metylačně senzitivní analýzy tání s vysokým rozlišením (MS-HRM, Methylation-sensitive high resolution melting), testování metylomu založené na sekvenování nové generace (SIMON, Simple Inference for Methylome based On NGS), alelicky specifický vyhledávač diferenciální metylace (DAMEfinder, Differential Allele-specific Methylation finder), metoda imprintovaných amplikonů (IMPLICON, Imprint amplicon) a oxidativní bisulfitové sekvenování (oxBS-seq, Oxidative bisulfite sequencing).

Metylačně specifická PCR umožňuje určit metylační status cílové oblasti za využití specifických primerů. Tyto primery specificky nasedají buď na bisulfitovou reakcí převedené sekvence, tedy metylované nebo na působením bisulfitu neovlivněné oblasti, tedy nemetylované (Derks et al., 2004; Hernández *et al*., 2013). Metoda COBRA ve svém postupu spojuje bisulfitovou reakci s následným naštěpením PCR produktů pomocí restrikčních enzymů (Xiong *et* Laird, 1997; Brena *et al*., 2006). MethylLight je vysoce citlivá metoda založená na použití real-time PCR. MethylLight se spoléhá na použití metylačně specifických primerů v kombinaci s metylačně specifickými fluorescenčními próbami (Eads *et al*, 2000; Campan *et al*., 2018). MS-HRM využívá skutečnosti, že metylovaná a nemetylovaná DNA se po průběhu bisulfitové reakce a následné PCR liší v sekvenci produktů a tím také v profilech tání (Wojdacz *et* Dobrovic, 2007). Metoda SIMON využívá sekvenování nové generace pro cílenou analýzu oblastí zájmu. Tato technika by měla v porovnání s metodou celogenomového bisulfitového sekvenování poskytnout větší hloubku analýzy a snížit pracovní a finanční náročnost, ale neumožňuje analýzu celého genomu (Vial-Pradel *et al*., 2019). Metoda DAMEfinder byla vyvinuta pro efektivní zkoumání oblastí genomu, které vykazují ztrátu nebo zisk alelicky specifické metylace ve vzorcích pocházejících ze dvou různých stavů (například zdravá a nemocná tkáň). Tato metoda využívá data získaná bisulfitovým sekvenováním pro výpočet skóre alelicky specifické metylace pro všechny CpG místa v genomu pro každý vzorek a následně umožňuje kvantifikaci změny alelicky specifické metylace mezi zkoumanými stavy. Může proto pomoci při rozluštění komplexity DNA metylace a jejího vlivu na vznik nemocí (Orjuela *et al*., 2020). Analýza metylace DNA v několika imprintovaných oblastech současně je umožněna metodou IMPLICON. Tato technika využívá DNA ošetřenou bisulfitem pro konstrukci amplikonových knihoven, které pokrývají většinu imprintovaných oblastí. Takto je vytvořen soubor dat, který může být jednoduše použit pro analýzu genomového imprintingu (Klobučar *et al*., 2020). Bisulfitové reakci podléhá nejen 5mC, ale také méně častá, ale pořád přirozeně se vyskytující modifikace DNA 5hmC. To vede k tomu, že pomocí klasického bisulfitového

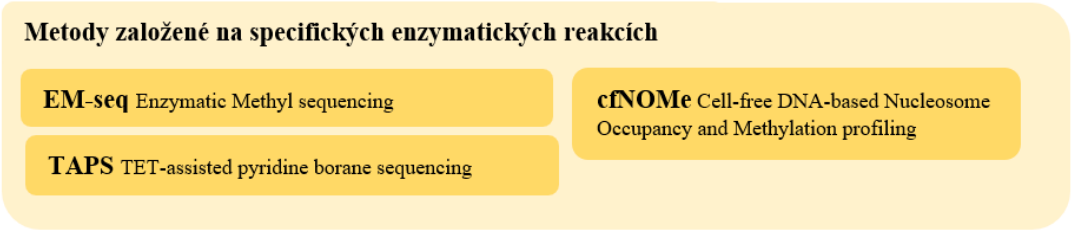
sekvenování není možné tyto dvě modifikace rozlišit a obě jsou tak detekovány jako metylace DNA. Moznost rozlišení těchto dvou kovalentních modifikací umožňuje metoda oxidativního bisulfitového sekvenování. V rámci této metody je 5hmC specificky oxidován na 5fC. 5fC je konvertován na uracil při probíhající bisulfitové reakci, což umožňuje jeho odlišení od 5mC (Booth *et al.*, 2013).

3.2.3.2 Metody využívající jiných chemických reakcí

Dalším chemickým činidlem, které může být využito při detekci metylace, jsou sloučeniny osmia. Kombinace osmianu draselného, hexakyanoželezitanu draselného jako aktivátoru a bipyridinu jako reakci urychlujícího ligandu umožňuje selektivní oxidaci 5mC. Produktem této oxidační reakce je komplex 5mC glykolu s dioxidoosmiem a bipyridinem. Oxidované vlákno DNA je štěpeno v místě oxidované pyrimidinové báze působením horkého piperidinu. Zda byla DNA štěpena, tedy zda obsahovala 5mC, je možné ověřit porovnáním velikostí fragmentů DNA za využití elektroforetické separace. Pro detekci je taky možné využít značeného bipyridinu, který může být po inkorporaci do vznikajícího komplexu detekován fluorescenčně nebo elektrochemicky (Tanaka *et al.*, 2007; Okamoro, 2014). Další možností detekce metylace pomocí chemických činidel je využití kombinace V_2O s LiBr nebo $NaIO_4$ s LiBr, ale problémem je poměrně nízká citlivost těchto metod (Bareyt *et* Carell, 2008).

3.2.4 Metody založené na specifických enzymatických reakcích

Některé přirozeně se vyskytující enzymy jsou schopny rozpoznávat metylovanou DNA *in vivo* a jsou tedy vhodnými adepty pro využití při detekci těchto modifikací (viz Obr. 8) (Chen *et al.*, 2020).



Obr. 8: Přehled metod detekce metylace cytozinů v DNA, které jsou založené na specifických enzymatických reakcích.

Enzymatické metylační sekvenování (EM-seq, Enzymatic Methyl-seq) využívá dvojice po sobě jdoucích enzymatických reakcí. V první reakci je použit enzym Tet2 pro převod 5mC přes 5hmC a 5fC až na finální oxidační produkt 5caC. V druhém kroku je použit enzym APOBEC3A (apolipoprotein B mRNA upravující enzym, katalytická subjednotka 3A), který způsobuje deaminaci cytidinu u metylované i nemetylované DNA, ale má jen zanedbatelný vliv na oxidované formy 5-metylcytozinu. V druhé reakci jsou tedy pouze nemodifikované cytoziny převedeny na uracil (Vaisvila *et al.*, 2019; Feng *et al.*, 2020). Výsledný produkt těchto reakcí odpovídá produktům bisulfitového sekvenování a proto zde může být použito stejných analytických postupů. Jedná se o první metodu, která využívá pouze enzymatických reakcí pro mapování 5mC s rozlišením na jednu bázi. Tyto

enzymatické reakce nezpůsobují porušení a fragmentaci analyzované DNA, tak jak tomu je například u bisulfitového sekvenování, což vede k zisku přesnějších sekvenčních dat (Sun *et al*. 2021).

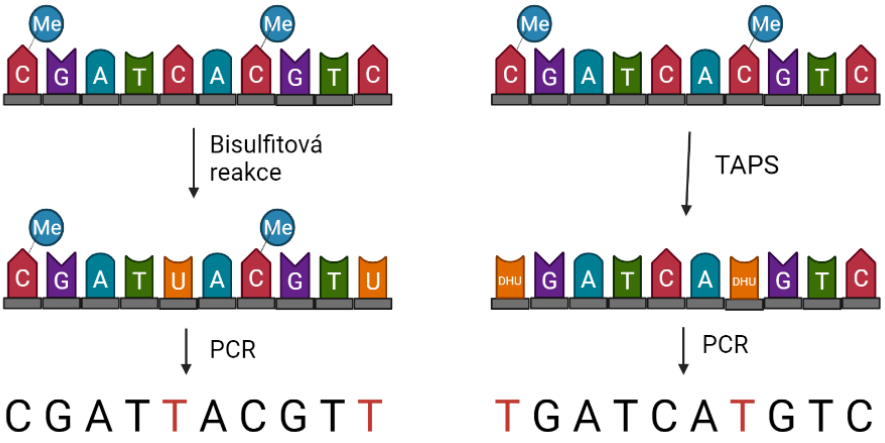
Enzymatické reakce pro detekci metylace využívá i **metoda nukleozomové obsazenosti a metylačního profilování na volné cirkulující DNA (cfNOMe, cell-free DNA-based Nucleosome Occupancy and Methylation profiling)**. Tato metoda umožňuje měření metylace DNA a obsazenost nukleozomy v rámci jedné analýzy na volné cirkulující (mimobuněčné, cell-free) DNA (Erger *et al.*, 2020). Cell-free DNA je termín, který se používá pro DNA, která se nachází mimo buňky ve všech tělních tekutinách člověka. Ve srovnání s biopsií je tato DNA méně invazivním zdrojem biologických i patologických informací (Bronkhorst *et al*., 2021). Příkladem použití je prenatální screening za využití cell-free DNA získané z krve matky (Zhang *et al*., 2019) nebo takzvaná tekutá biopsie (liquid biopsy) u biologické léčby nemalobuněčného karcinomu plic. Metoda cfNOMe využívá enzymatické konverze cytozinů, obdobně jako metoda EM-seq, která je doplněna o specializované bioinformatické postupy. Metoda by měla přinést komplexnější a levnější profilování cell-free DNA (Erger *et al.*, 2020).

Metoda **TET asistovaného pyridin boranového sekvenování (TAPS, TET-assisted pyridine borane sequencing)** kombinuje oxidaci 5mC a 5hmC na 5caC za využití Tet1 enzymu s následnou redukcí 5caC na dihydrouracil (DHU) působením pyridin boranu. Následná PCR reakce amplifikuje DHU jakožto derivát uracilu na tymin. Nakonec jsou 5mC a 5hmC detekovány na základě jejich převodu na tymin, zatímco nemodifikované cytoziny zůstávají těmito reakcemi neovlivněny (viz Obr. 9). Obě tyto reakce jsou velice šetrné k testované DNA a nezpůsobují její degradaci (Liu *et al*., 2019).

Obr. 9: Přehled reakcí metody TET asistovaného pyridin boranového sekvenování (TAPS). V první reakci je 5-metylcytozin (5mC) a 5-hydroxymetylcytozin (5hmC) oxidován Tet enzymem na 5-karboxycytozin (5caC). 5caC je redukován pyridin boranem na dihydrouracil (DHU). DHU je PCR reakcí čten jako tymin. Vytvořeno v Biorender.com dle Liu *et al*., 2019.

Metoda TAPS se v porovnání s bisulfitovým sekvenováním vyznačuje rovnoměrnějším pokrytím a nižšími sekvenčními náklady, čímž umožňuje kvalitnější, komplexnější a levnější metodu analýzy metylace DNA (viz Obr. 10). Tato metoda je schopná pracovat i s 1 ng DNA, což naznačuje významný potenciál této metody i pro forenzní i klinické využití. TAPS detekuje kromě 5mC i méně často se vyskytující 5hmC. Pokud chceme selektivně detekovat pouze 5mC je možné využít β-glukozyltransferázu, která označuje 5hmC glukózou, a tak tuto bázi chrání před působením Tet enzymu a pyridin boranu. Tato modifikace TAPS metody je označována jako TAPSβ. Další možnou

modifikací této metody, která je označována jako CAPS, je použití chemického oxidačního činidla perruthenátu sodného jako náhrady Tet enzymu pro selektivní detekci 5hmC (Liu *et al.*, 2019).



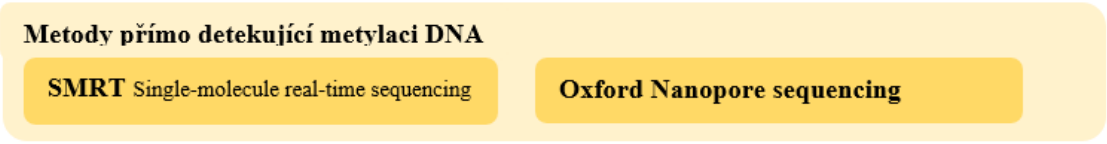
Obr. 10: Porovnání výsledků bisulfiového sekvenování a metody TET asistovaného pyridin boranového sekvenování (TAPS). Při bisulfitové reakci jsou nemodifikované cytoziny převáděny na uracil. Při TAPS jsou metylované cytoziny převáděny na dihydrouracil (DHU). Uracil i dihydrouracil jsou v následné PCR čteny jako tymin. Vytvořeno v Biorender.com dle Zhao *et al*. 2020.

Díky velkému potenciálu této metody došlo ke vzniku řady jejich modifikací, které dále rozšiřují možnosti jejího využití. Celogenomové sekvenování představuje sice nejkomplexnější analýzu metylace, ale i přes snížení nákladů, které metoda TAPS v tomto ohledu přinesla, jsou sekvenační náklady limitací. Řešení přináší modifikace TAPS pojmenovaná jako endonukleázové obohacení TAPS (endonuclease enrichment TAPS, eeTAPS). EeTAPS využívá štěpení endonukleázou, která rozeznává dihydrouracil, tedy produkt TAPS konverze. Vzniklé fragmenty jsou použity pro přípravu sekvenační knihovny, ve které začátek a konec každého fragmentu odpovídá metylovanému místu. Toto umožňuje mCpG aby byly obohaceny, zatímco zastoupení většiny genomu bez metylovaných míst je omezeno (Cheng *et al.*, 2021). Příkladem další zajímavé adaptace TAPS metody je její optimalizace pro použití na cell-free DNA v metodě označované jako cfTAPS (TAPS pro cell-free DNA) (Siejka-Zielińska *et al.*, 2021).

3.2.5 Metody přímo detekující DNA metylaci

Mezi nejvýznamnější omezení masivně paralelního sekvenování na systémech firmy Illumina patří krátké čtení. Nanoporové sekvenování od firmy Oxford Nanopore Technologies a sekvenování jedné molekuly v reálném čase (SMRT, Single-molecule real-time sequencing), které představila firma Pacific Biosciences umožňuje produkci dlouhých čtení na neamplifikované DNA (Van Dijk *et al.*, 2018). Hlavní výhoda těchto strategií spočívá především v jejich schopnosti sekvenovat neupravenou DNA a detekovat její modifikace na základě jejich vlivu na sekvenční signál (viz Obr. 11). Významnou limitací těchto přístupů je fakt, že je vyžadován vklad neupravené a neamplifikované DNA v řádu

mikrogramů, což může znemožnit použití těchto metod pro menší množství DNA (Liu *et al*., 2020; Blewitt *et al*., 2019).



Obr. 11: Přehled metod přímo detekující metylaci cytozinů v DNA.

Metoda sekvenování jedné molekuly v reálném čase (SMRT)

SMRT technologie je založena na sekvenování syntézou (Blewitt *et al*., 2019). DNA polymeráza katalyzuje inkorporaci fluorescenčně značeného nukleotidu do komplementárního řetězce a sekvence je čtena na základě detekce těchto fluorescenčních pulzů. O který nukleotid se jedná je detekováno na základě barvy světelného pulzu. Modifikace bází má vliv na kinetiku polymerázy. Informace o kinetice polymerázy jsou získávány na základě měření času mezi připojením jednotlivých nukleotidů a délky trvání fluorescenčního pulzu (Flusberg et al., 2010). 5mC má, v porovnání s jinými modifikacemi DNA, nevýrazný efekt na kinetiku polymerázy, což představuje problém pro detekci této modifikace. Pro přímou detekci 5mC je proto vyžadováno výrazné zvýšení pokrytí při sekvenování. Alternativním řešením jsou arteficiální modifikace 5mC, které umožní zvýšení kinetického efektu této báze, například za využití glykozylace nebo převedení na 5caC pomocí Tet (Clark *et al*., 2013).

Metoda nanopórového sekvenování

Nanopórové sekvenování je založeno na měření změn v proudění iontů nanopórem. Při průchodu DNA vlákna pórem je možné detekovat změny v proudění iontů, které jsou způsobeny rozdíly mezi nukleotidy, které se v tu chvíli v póru nachází. Tyto změny v proudění iontů jsou rozděleny na samostatné události, ke kterým je přiřazena doba trvání, průměrná amplituda a odchylka. Sekvence událostí je potom počítačově interpretována jako sekvence 3 - 6 nukleotidů pomocí grafických modelů. Modifikace bázi DNA způsobují odchylky v nezpracovaném signálu, což umožňuje jejich detekci (Jain *et al*., 2016). Detekce bázových modifikací pomocí nanopórového sekvenování je stále oblastí aktivního vývoje. Objevují se nové metody využívající například technologie hlubokého učení (deep learning) (Ni *et al*., 2019). Zatím není znám rozsah modifikací, které jsme pomocí nanopórového sekvenování rozlišit a jsou neznámé i přesné limity citlivosti (Blewitt *et al*., 2019).

Tyto metody umožňující přímou detekci metylace v sobě skrývají obrovský potenciál do budoucna, ovšem v tuto chvíli zůstává jejich přesnost nižší než u bisulfitového sekvnování (Blewitt *et al*., 2019).

S možností, jak překonat limitace detekce metylace pomocí sekvenování dlouhých čtení přichází metoda lrTAPS (long-read TAPS), která kombinuje převod 5mC na dihvdrouracil pomocí

metody TAPS se sekvenováním dlouhých čtení. TAPS reakce zachovávají bez poškození dlouhé molekuly DNA přes 10 kb, což je zásadní pro sekvenování dlouhých čtení. V případě SMRT je pak 5mC detekován na základě změny fluorescence spíše než na základě změn kinetiky polymerázy, což výrazně snižuje nároky na pokrytí. U nanopórového sekvenování TAPS umožňuje, aby byl 5mC detekován jako nemodifikovaná báze (tymin), což snižuje potřebnou komplexitu analýzy, a tak vede ke zlepšení přesnosti (Liu *et al*., 2020).

3.3 Exprese a purifikace rekombinantních proteinů

Metody produkce rekombinantních proteinů mají nezastupitelný význam pro strukturní a biofyzikální studie, funkční testy a studium proteinů *in vivo* a *in vitro*. Mimo to našly tyto techniky využití pro terapeutické aplikace ve farmakologii, v biotechnologiích i akademické sféře (Assenberg *et al*., 2013). Pro některé z metod analýzy metylace DNA je nezbytné použití specifických proteinů a enzymů, které je proto nutné jako rekombinantní proteiny připravit.

Proces produkce rekombinantních proteinů se skládá z několika kroků. Nejprve je připraven expresní vektoru nesoucí sekvenci cílového proteinu, tento vektor je vpraven do hostitelského organismu neboli expresního systému. V expresním systému je protein exprimován, a nakonec je vytvořený protein izolován a purifikován (Růčková *et al*., 2014). Neexistuje žádný univerzální expresní systém, který by zaručoval vysoký výtěžek rekombinantního proteinu. Každý produkovaný protein má odlišný původ, vlastnosti, požadavky na kvalitu, biologickou funkčnost, rychlost produkce a výtěžek (Verma *et al*., 1998; Sanchez *et* Demain, 2012).

3.3.1 Expresní systémy

Proteiny mohou být exprimovány v buněčných kulturách bakterií, kvasinek, savců, rostlin nebo hmyzu, v transgenních rostlinách a živočiších, případně existují i cell-free techniky (Sanchez *et* Demain, 2012).

Escherichia coli je jedním z nejdříve používaných a zároveň dodnes široce rozšířeným hostitelským organismem pro produkci heterologních proteinů (Demain *et* Vaishnav, 2009). Tento expresní systém je velice často využíván díky rychlému růstu bakterií, jednoduché manipulaci s nimi a finanční nenáročnosti (Verma *et al*., 1998; Assenberg *et al*., 2013). Tento systém je velice dobrý pro expresi proteinů, u kterých nevyžadujeme posttranslační modifikace (Demain *et* Vaishnav, 2009). Exprese eukaryotických proteinů v *E. coli* často vede k jejich akumulaci ve formě inkluzních tělísek. Proteiny, které jsou produkovány jako inkluzní tělíska, jsou často neaktivní, nerozpustné a vyžadují přeskládání struktury (Demain *et* Vaishnav; 2009; Wingfield, 2015). Kromě *E. coli* se používají i další bakteriální expresní systémy jako zástupci rodu *Bacillus*, *Ralstonia eutropha* nebo *Staphylococcus carnosus* (Demain *et* Vaishnav, 2009). Bakteriální expresní systémy jsou stále často používány, ovšem se zvyšující se poptávkou po proteinech s větší komplexitou (posttranslační modifikace) se často přechází k využití eukaryotních expresních systémů (Assenberg *et al*., 2013).

Kvasinky jakožto eukaryotní organismy nabízí v porovnání s bakteriálními systémy řadu výhod. Nejvýznamnějšími výhodami je průběh posttranslačních modifkací na vznikajících proteinech a sekrece hotových proteinů do kultivačního média, což výrazně zjednodušuje izolaci a purifikaci (Graumann *et* Premstaller, 2006). Práce s kvasinkami je jednodušší a levnější než práce s buňkami hmyzu nebo savců (Demain *et* Vaishnav, 2009; Porro *et al*., 2011). I přesto, že v kvasinkách probíhají posttranslační

modifikace včetně glykozylace proteinů, se tyto glykozylační značky můžou výrazně lišit od glykozylačních vzorů vyšších organismů. Tato odlišná modifikace proteinů může v některých případech představovat problém a je pak nutné zvolit jiný expresní systém (Graumann *et* Premstaller, 2006). Dva nejčastěji používané kvasinkové expresní systémy jsou *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia pastoris* (Demain *et* Vaishnav, 2009).

Nejčastější hmyzí buněčné linie používané jako expresní systémy jsou odvozené od zástupců řádů motýlů a dvoukřídlích (Geisler et. Jarvis, 2018). Nejčastěji používaným vektorem pro buňky hmyzu je bakulovirus. Rekombinantní bukulovirus kódující cílový protein umožňuje jeho expresy po infekci hmyzí buňky tímto rekombinantním virem (Contreras-Gómez *et al*., 2014). Alternativně je možná exprese rekombinantního proteinu po transientní nebo stabilní transfekci pro hmyz specifickým expresním plazmidem (Geisler *et* Jarvis, 2018). Hmyzí buňky jsou schopné provádět poměrně komplexní posttranslační modifikace, ovšem v případě, že cílový protein vyžaduje nějaké druhově nebo tkáňově specifické modifikace, je nutné použít specializovanější expresní systém (Demain *et* Vaishnav, 2009).

Vláknité houby jako *Aspergillus niger* jsou atraktivním hostitelem pro rekombinantní DNA technologie díky své jednoduché kultivaci a schopnosti produkovat velké množství biologicky aktivních proteinů s posttranslačními modifikacemi. Cizí geny mohou být vloženy pomocí plazmidu do chromozomů těchto hub, kde jsou stabilně inkorporovány jako tandemové repetice, což poskytuje dlouhodobou genetickou stabilitu (Demain *et* Vaishnav, 2009; Wang *et al*., 2020). Na rozdíl od expresních systémů využívajících bakterie nebo kvasinky je systém využívající vláknité houby stále v procesu vývoje kvůli své komplexitě. Pro některé heterologní proteiny tento systém zatím umožňuje pouze nízké výtěžky rekombinantního proteinu (Sakekar *et al*., 2021).

Expresní systémy využívající savčích buněk jsou schopné produkovat správně složené proteiny s příslušnými posttranslačními modifikacemi, což je důležité pro správnou biologickou aktivitu připravovaných proteinů. Hlavní výhodou tohoto expresního systému je, že signály pro syntézu, zpracování a sekreci eukaryotních proteinů jsou efektivně rozpoznávány savčími buňkami. Nicméně mohou být pozorovány mezidruhové rozdíly v této signalizaci (Khan, 2013). Nejvíce rozšířenými hostitelskými buněčnými liniemi jsou: buněčná linie derivovaná z buněk vaječníků čínského křečka (CHO, Chinese hamster ovary cells) a buněčné linie odvozená z myších myelomových buněk, což zahrnuje buňky NS0 a Sp2/0 (Grifffin *et al*., 2007). Tyto buněčné linie ovšem mohou tvořit glykoproteiny nesoucí glykany, lišící se od produktů glykozylace probíhající v lidských buňkách. Tento problém řeší použití expresního systému využívajícího buněčnou linii HEK293, který se stává čím dál více využívaným. Buněčná linie HEK293 byla odvozena od lidských embryonálních ledvinových buněk (Büssow, 2015; Chin *et al*., 2019). Limitací savčího expresního systému je vyšší finanční a časová náročnost ve srovnání s předchozími systémy (Khan, 2013).

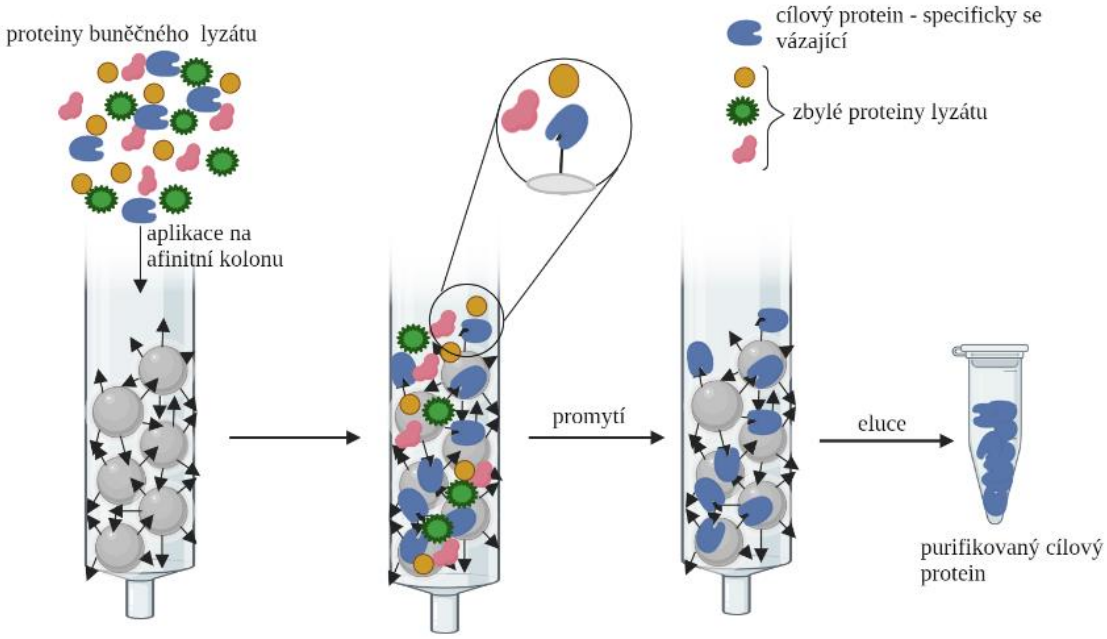
Další možností přípravy rekombinantních proteinů je využití transgenních zvířat a rostlin. Transgenní zvířata jsou používána k produkci proteinů v mléku, vaječném bílku, krvi nebo moči (Demain *et* Vaishnav, 2009). Použití transgenních zvířat nabízí atraktivní možnost vzhledem k nízké produkční ceně proteinu spojené s vysokým výtěžkem a kvalitou rekombinantního proteinu (Bertolini *et al*., 2016). Limitací tohoto přístupu je obtížná separace připravovaných proteinů od zbylých proteinů transgenního živočicha a také nutnost dbát na to, aby transgenní živočich nebyl nakažen patogeny, které by mohly způsobit kontaminaci připravovaného proteinu (Houdebine, 2018). Transgenní rostliny jsou v dnešní době hojně využívány pro produkci rekombinantních proteinů s terapeutickým využitím. Jedná se o expresní systém, který se vyznačuje svojí cenovou výhodností, rychlou produkcí proteinu a umožněním posttranslačních modifikací (Demain *et* Vaishnav, 2009; Sethi *et al*., 2021). Tyto technologie jsou založeny na vytváření geneticky modifikovaných zvířat a rostlin, což vede k tomu, že se často setkávají ze strany části veřejnosti s odporem, a také se k tomu váže poměrně přísná legislativa a administrativa (Houdebine, 2018; Sethi *et al*., 2021).

Cell-free syntéza proteinů (CFPS, cell-free protein synthesis) označuje expresi rekombinantních proteinů bez přítomnosti živé buňky. Tato metoda využívá buněčný extrakt nebo jen individuální purifikované enzymy jako transkripční a translační systém (Yue *et al*., 2019; Whitfield *et al*., 2020). Není zde vliv nežádoucích genetických regulací, protože genomická DNA je odstraněna a není zde požadavek na buněčnou životnost (Hodgman *et* Jewett, 2012). CFPS je prováděna v tekutině, na papírovém podkladu nebo v mikrogelech (agarózový, hyaluronový, polyakrylamidový, fibrinový) (Whitfield *et al*., 2020). CFPS je inovativní technikou, která je zatím drahá a neefektivní (Benítez-Mateos *et al*., 2020).

3.3.2 Purifikace rekombinantních proteinů

Purifikace rekombinantního proteinu je obecně proces vedoucí k zisku cílového proteinu z komplexní směsi. Pro purifikační proces se používají podobné postupy nezávisle na tom, jaký typ hostitele byl pro přípravu proteinu použit (Kosobokova et al., 2016). Purifikace rekombinantních proteinů byla dříve prováděna za využití standardních chromatografických metod, ale již několik let se téměř výhradně používá afinitních fúzních značek (Wingfield, 2015). Fúzní afinitní značky jsou nejčastěji krátké sekvence aminokyselin fúzované s produkovaným rekombinantním proteinem (Young et al., 2012). Selektivní interakce afinitní značky se specifickým ligandem a eluce za specifických podmínek umožňuje vysoce efektivní purifikaci cílového proteinu (viz Obr. 12). Mezi často využívané afinitní značky patří například c-myc, Flag, polyArg, polyHis, Strep-tag a další. Tyto

jednotlivé značky se liší v aminokyselinové sekvenci, vazebném substrátu a elučních podmínkách (Kosobokova et al., 2016).



Obr. 12: Schéma afinitní purifikace cílového proteinu. Proteinová směs je nanesena na afinitní kolonu, kde se cílový protein specificky váže na ligandy v chromatografické matrici. Při promytí jsou nenavázané proteiny odplaveny. Cílový protein je eluován. Vytvořeno v Biorender.com dle Růčková *et al*., 2014.

Při výběru afinitních značek je třeba zvážit kolik značek použít, kam tyto značky v rámci proteinu umístit a zda je nutné tyto značky po vytvoření proteinu odstranit (Wingfield, 2015). Počet a umístění značek je nutné volit tak, aby neomezovaly expresi a skládání vznikajícího proteinu, ale aby zároveň umožnily efektivní zachycení na afinitním substrátu. V případě, že použitá značka neovlivňuje terciální strukturu molekuly ani její biologickou aktivitu, není nutné ji po purifikaci odstraňovat. V některých případech může mít použití značky dokonce pozitivní vliv na úroveň exprese nebo rozpustnost proteinu. V případě, že značka má vliv na strukturní nebo biologické vlastnosti proteinu, je nutné její odstranění po purifikaci. Toho je možné dosáhnout při použití specifické sekvence před sekvencí afinitní značky, která je místně-specificky rozpoznávána a štípána vybranou proteázou (Young *et al*., 2012; Kosobokova *et al.,* 2016).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Pro amplifikaci plazmidu byl použit bakteriální kmen *Escherichia coli* Top10 (*F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*), který je komerčně dostupný pod názvem One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, C404003).

Pro expresi mTet1CD proteinu byla použita suspenzní buněčná linie Expi293F (Gibco, A14527) (RRID:CVCL_D615), která je odvozena od buněčné linie HEK293-F (RRID:CVCL_6642). HEK293-F je variantou buněčné linie HEK293 (RRID:CVCL_0045), která byla vytvořena transformací lidských embryonálních ledvinových buněk za využití fragmentů DNA lidského adenoviru typu 5 (Thomas *et* Smart, 2005; Yuan *et al*., 2018).

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- Plazmid mTet1CD (pcDNA3-Flag): mTet1CD katalytická doména (NM_001253857.2, 4371-6392) s N-terminálním Flag značením byla klonována do pcDNA3-Flag plazmidu mezi *KpnI* a *BamH1* restrikční místa (Liu *et al*., 2019). Plazmid byl laskavě poskytnut dr. Chunxiao Song z Ludwig Institute for Cancer Research, University of Oxford, Oxford, UK.
- FreeStyle™ 293 Expression Medium (Gibco, 12338018)
- Polyetylenimin, PEI (Polysciences, 23966-1)
- UltraPure™ 1 M Tris-HCI Buffer, pH 7,5 (Invitrogen, 15567027)
- Chlorid sodný 5 M (Invitrogen, AM9759)
- Triton X-100 (Sigma, T8787)
- cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free (Sigma, 11873580001)
- Fenylmetylsulfonyl fluorid, PMSF (ThermoScientific, 36978)
- 2-[4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinyl] etansulfonová kyselina, HEPES (Sigma, H3375)
- Dithiothreitol, DTT (Fluorochem, M02712)
- ANTI-Flag M2 Affinity Gel (Sigma, A2220)
- 3X Flag peptid (MedChemExpress, HY-P0319A)
- Glycin (Sigma, G7126)
- Fosfátový pufr, PBS (Gibco, 14190144)
- Penicilin-Streptomycin (Sigma, P4333)
- LB BROTH HIGH SALT (Duchefa Biochemie, L1704.2500)
- LURIA BROTH AGAR, MILLER (Duchefa Biochemie, L1718.1000)

- Ampicilin (Sigma, A9518)
- Isopropanol (Penta, 17500-11000)
- Etanol 70% (Penta, 70392-11001)
- Akrylamid/Bis-akrylamid 30% 29:1 (Bio-Rad, 1610156)
- Tetrametyletylendiamin, TEMED (Sigma, T9281)
- Tris(hydroxymetyl)-aminometan, Tris (Serva, 3718004)
- Dodecylsíran sodný, SDS (Sigma, 71729)
- marker relativních molekulových hmotností: Precision Plus ProteinTM Dual Colour Standards (Bio-Rad, 1610374)
- Glycerol (Penta, 14530-11000PE)
- Tris-EDTA pufr, TE pufr (Sigma, 93283)
- Kyselina chlorovodíková 35% (Penta, 19350-11000)
- Metanol (Penta, 21210-20005)
- Ponceau S (Sigma, P3504)
- Kyselina octová 99% (Penta, 19970-11000)
- Bromfenolová modř (Sigma, 114391)
- Polysorbat 20, Tween 20 (MP Biomedicals, 103168)
- Sušené mléko odtučněné (SIMANOL)
- SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (ThermoScientific, 34577)
- SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoScientific, 34094)
- Primární protilátky
    - Mouse monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody 1:2000 (Sigma-Aldrich, F3165)
    - Rabbit monoclonal anti-GAPDH antibody 1:1000 (Cell Signalling Technology, 14C10)
- Sekundární protilátky
    - Donkey anti-rabbit IgG-HRP, 1:1000 (GE Healthcare, NA934)
    - Goat anti-mouse IgG-HRP, 1:1000 (GE Healthcare, NA931)

Použité soupravy

- NucleoBond Xtra Midi/Maxi kit (Macherey-Nagel, 740410.10)

Použité kolony

- Econo-Pac® Chromatography Column (Bio-rad, 7321010)
- Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Unit MWCO = 30 kD (Merck, UFC803024)
- Bio-Spin® P-30 Gel Columns, Tris Buffer (Bio-rad, 7326231)

Použité roztoky a jejich příprava

Příprava roztoků pro purifikaci proteinu

- Lyzační pufr
    - 50 mM Tris-Cl pH = 7,5, 500 mM NaCl, 1X cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100, dH_2O
- TBS
    - 50 mM Tris pH = 7,5, 150 mM NaCl, dH_2O
- Eluční pufr
    - 20 mM HEPES pH = 8,0, 150 mM NaCl, 0,1 mg/ml 3X Flag peptid, 1X cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, 1 mM PMSF, dH_2O
- Skladovací pufr
    - 20 mM HEPES pH = 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, dH_2O
- Glycinový pufr
    - 0,1 M glycin, H_2O, úprava pH na hodnotu 3,5 pomocí HCl

Příprava roztoků pro SDS-PAGE a Western Blotting

- 10x TBS
    - 0,2 M Tris, 1,37 M NaCl, dH_2O úprava pH na hodnotu 7,6 pomocí HCl
- 10x Elektroforetický pufr
    - 2 M glycin, 0,25 M Tris, 35 mM SDS, dH_2O
- 10x Transferový pufr
    - 2 M glycin, 0,25 M Tris, dH_2O
    - Při přípravě 1x Transfer pufru ředěno: 1:1:8 10x Transferový pufr : metanol : dH_2O
- Ponceau S
    - 7,5 mM Ponceau S, 875 mM kyselina octová
- 4x LSB
    - 0,2 M Tris-HCl pH = 6,8, 280 mM SDS, 5,5M glycerol, 0,175 % bromfenolová modř, 0,45 M DTT
- Gel separační
    - 30% akrylamid mix, 1,5 mM Tris (pH 8,8), 10% SDS, 10% APS, TEMED, dH_2O
- Gel zaostřovací
    - 30% akrylamid mix, 0,5 mM Tris (pH 6,8), 10% SDS, 10% APS, TEMED, dH_2O
- Blokační směs
    - 1xTBS, 0,1% Tween 20, 5% sušené odtučněné mléko

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- CO_2 inkubátor – HERAcell 150i (Thermo Scientific)
- Suchá lázeň – Genius Dry Bath Incubator (Major Science)
- Vortex – Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
- Centrifuga – ROTINA 420R centrifuge (Hettich)
- Třepačka – prototyp přístroje na kultivaci suspenzních buněk vytvořený v Laboratoři integrity genomu na Ústavu molekulární a translační medicíny Mgr. Martinem Mistríkem, Ph.D. (viz Obr. 13)

Obr. 13: Prototyp přístroje na kultivaci suspenzních buněk. Přístroj byl vytvořený v Laboratoři integrity genomu Mgr. Martinem Mistríkem, Ph.D.

- Laminární box – Herasafe, KS series (Thermo Scientific)
- Analyzátor buněčné viability – Vi-CELL XR Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter)
- Třepačka – Orbital Shaker PSU-10i (Biosan)
- Spektrofotometr – NanoPhotometer (Implen)
- Termoblok – ThermoMixer Comfort (Eppendorf)
- Zdroj pro elektroforézu a Western blot – Electrophoresis power supply CS-3AMP (Cleaver Scienific)
- Detekční systém – ChemiDoc MP Imaging System (BioRad)

4.4 Použité experimentální postupy

4.4.1 Amplifikace plazmidu

4.4.1.1 Příprava LB média pro kultivaci transformovaných bakterií

Byla připravena LB média (médium s agarem a tekuté médium) dle pokynů výrobce. Připravená média byla sterilizována autoklávováním. LB médium s agarem bylo ponecháno zchladnout na teplotu kolem 50 °C a poté do něj bylo přidáno antibiotikum ampicilin do finální koncentrace 100 µg/ml. LB médium s agarem a selekčním antibiotikem bylo rozlito do Petriho misek po 25 ml. Po ztuhnutí byly misky s médiem uloženy při 4 °C dnem vzhůru do dalšího dne. Tekuté médium bylo po autoklávování uloženo při 4 °C.

4.4.1.2 Transformace kompetentních bakterií

Kompetentní bakterie byly rozmrazeny na ledu. Petriho misky s LB médiem byly vytemperovány na teplotu 37 °C. K 50 µl kompletních bakterií byl přidán 1 µl plazmidové DNA (koncentrace 1 ng/µl), směs byla jemně promíchána a inkubována 20 minut na ledu. Kompetentní bakterie byly transformovány pomocí teplotního šoku tak, že byly společně s DNA inkubovány v suché lázni při 42 °C po dobu 45 s a následně byla směs okamžitě umístěna na 2 minuty na led. K bakteriím bylo přidáno 850 µl tekutého LB média a následovala kultivace 60 minut při 37 °C na rotační třepačce. Transformované kompetentní bakterie byly centrifugovány 2 minuty při 5 000 g a 22 °C. 800 µl supernatantu bylo odpipetováno a peleta byla resuspendována ve zbylém médiu. Resuspendované kompetentní bakterie byly přeneseny na povrch vytemperovaného LB média s ampicilinem v Petriho misce a rozetřeny sterilní skleněnou hokejkou. Petriho misky s transformovanými bakteriemi byly inkubovány dnem vzhůru při 37 °C do dalšího dne.

4.4.1.3 Izolace plazmidu z transformovaných bakterií

Pro izolaci plazmidu byl použit komerčně dostupný kit NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel). Izolace byla provedena dle pokynů výrobce pro purifikaci mnohokopiového plazmidu. Izolovaný plazmid byl rozpuštěn v TE pufru a koncentrace plazmidové DNA byla stanovena spektrofotometricky. Získaný plazmid byl uložen při -20 °C.

4.4.2. Exprese a purifikace mTet1CD proteinu

4.4.2.1 Kultivace Expi293 buněk

Buňky Expi293 byly kultivovány ve FreeStyle 293 expresním médiu doplněném o kombinaci antibiotik penicilin a streptomycin v koncentraci 0,3 %. Buňky byly kultivovány v inkubátoru ve vlhkém prostředí při 37 °C a 5% CO_2 za stálého třepání při nastavení třepačky SPD180/STP420. Každé 3 – 4 dny byla provedena pasáž buněk: buňky byly spočítány a byla stanovena jejich viabilita pomocí

analyzátoru buněčné viability. Na základě toho byla ponechána v kultivační lahvi jen část buněk, tak aby po doplnění čerstvým médiem do požadovaného objemu byla finální koncentrace živých buněk 0,3 x 10^6 buněk na ml. Pasáž probíhala za sterilních podmínek v laminárním boxu.

4.4.2.2 Transfekce Expi293 buněk

Transfekce byla prováděna ve třech kultivačních lahvích souběžně. Buňky byly vysety do kultivační lahve v koncentraci 0,5 x 10^6 buněk na ml do objemu 180 ml kultivačního média. Buňky byly kultivovány při 37 °C a 5% CO_2 za stálého třepání SPD180/STP420 po dobu 24 h, koncentrace buněk za tuto dobu dosáhla hodnoty kolem 1 x 10^6 buněk na ml. Byla připravena transfekční směs tak, že k 18 ml PBS bylo přidáno 540 µl polyetyleniminu (PEI, o koncentraci 1 mg/ml) a 180 µg plazmidové DNA. Transfekční směs byla řádně promíchána a inkubována po dobu 20 minut při pokojové teplotě. PBS obsahující DNA a PEI bylo pomalu přidáno k 180 ml buněčné kultury a promícháno. Byla připravena i kontrolní kultivační lahev, kdy k 180 ml buněčné suspenze o koncentraci 1 x 10^6 buněk na ml bylo přidáno 18 ml PBS s 540 µl polyetyleniminu (PEI, o koncentraci 1 mg/ml). Transfekované i kontrolní buňky byly kultivovány při 37 °C, 5% CO_2 a za stálého třepání SPD180/STP420 po dobu 48 hodin. Po 48 hodinách byly buňky spočítány a byla zkontrolována jejich viabilita. Z transfekční i kontrolní lahve bylo odebráno po 1 milionu buněk pro kontrolu úspěšnosti transfekce a zbytky transfekovaných buněčných suspenzí byly centrifugovány při 3 000 g a 4 °C po dobu 20 minut, Po centrifugaci byly buňky udržovány na ledu. Supernatant byl odstraněn a dále se pokračovalo purifikačním protokolem.

4.4.2.3 Purifikace mTet1CD proteinu

Peleta byla resuspendována v 18 ml lyzačního pufru. Resuspendované směsi ze tří transfekcí byly spojeny do jedné směsi (54 ml), která byla inkubována na ledu po dobu 20 minut. Lyzát byl pročištěn centrifugací při 16 500 g a 4 °C po dobu 60 minut. Supernatant byl odebrán do čisté nádoby. Zvlášť bylo uchováno 5 µl pro SDS-PAGE (vzorek SDS-PAGE 1). Bylo připraveno 1,5 ml ANTI-Flag afinitního gelu v prázdné chromatografické koloně, skladovací pufr se nechal protéct z kolony. Gel byl promyt třemi objemy (4,5 ml) 1x TBS. Gel byl promyt třikrát se dvěma objemy (3 x 3 ml) glycinového pufru. Gel byl promyt pětkrát se dvěma objemy (5 x 3 ml) 1x TBS. Gel byl promyt třikrát se dvěma objemy (3 x 3 ml) lyzačního pufru. Po každém promývacím kroku se nechal gel vysušit, než se pokračovalo s dalším krokem. Afinitní gel byl resuspendován v 6 ml lyzačního pufru a směs byla přesunuta do nádoby obsahující supernatant s proteiny. Vzniklá směs byla inkubována při 4 °C za stálého třepání po dobu 30 minut. Směs byla přesunuta zpět do kolony umístěné v chladové místnosti o teplotě 4 °C a tekutina se nechala projít kolonou s afinitním gelem. Z prošlé tekutiny bylo 5 µl uchováno pro SDS-PAGE (vzorek SDS-PAGE 2). Gel byl promyt třikrát s desíti objemy (3 x 15 ml) 1x TBS. Z každé prošlé frakce bylo uchováno 5 µl pro SDS-PAGE (vzorek SDS-PAGE 3-5). Gel byl resuspendován s jedním objemem (1,5 ml) elučního pufru a inkubován 5 minut. Následně byla jímána

procházející frakce. Tento eluční krok byl opakován celkem pětkrát. Z každé frakce bylo odebráno 5 µl pro SDS-PAGE (vzorek SDS-PAGE 6-10). Eluovaný protein byl zakoncentrován na Amicon Ultra 30 kDa filtru, dokud nebyla koncentrace mezi 2,5 – 5 mg/ml. Bylo uchováno 5 µl eluátu pro SDS-PAGE (vzorek SDS-PAGE 11). Na Bio-Spin P-30 gelové koloně byl vyměněn pufr, ve kterém se protein nacházel za pufr skladovací. K proteinu ve skladovacím pufru byl přidán glycerol do koncentrace 30 %. Bylo odebráno 5 µl pro SDS-PAGE (vzorek SDS-PAGE 12). Finální koncentrace proteinu byla měřena spektrofotometricky. Protein byl alikvotován a uchován při – 80 °C.

4.4.3 Kontrola úspěšnosti transfekce a průběhu purifikace mTet1CD

4.4.3.1 Příprava buněčných lyzátů pro kontrolu úspěšnosti transfekce.

1 milion buněk odebraný z transfekované nebo kontrolní buněčné suspenze byl centrifugován při 200 g a 4 °C po dobu 5 minut. Supernatant byl odsát a pelet byl resuspendován v 250 µl 1x LSB, došlo ke vzniku slizovité hmoty. Směs byla v mikrozkumavce vložena do nahřátého termobloku při 98 °C a 1400 rpm na 8 minut. Lyzát byl uložen do – 20 °C do doby, než byla prováděna elektroforéza.

4.4.3.2 Polyakrylamidová elektroforéza v denaturačních podmínkách (SDS-PAGE)

Byla připravena aparatura pro nalití gelů. Pro separaci byl použit 8% polyakrylamidový separační gel a 5% polyakrylamidový zaostřovací gel. Zhruba 5 ml separačního gelu bylo nalito mezi 1,0 mm skla, gel byl překryt tenkou vrstvou isopropanolu. Gel byl ponechán 45 minut tuhnout. Po ztuhnutí byl isopropanol odlit a povrch gelu byl opláchnut destilovanou vodou. Zbytek vody byl odsát filtračním papírem. Na vrstvu separačního gelu byl nalit gel zaostřovací téměř až po horní okraj skel, do gelu byl zasazen hřebínek. Gel byl ponechán 20 minut tuhnout. Po ztuhnutí gelu byla sestavena aparatura pro vertikální SDS-PAGE. Elektroforetická vana byla po rysku naplněna elektroforetickým pufrem, hřebínek byl vytažen z gelu. Vzorky pro kontrolu úspěšnosti transfekce byly rozmrazeny. Vzorky pro kontrolu průběhu purifikace byly připraveny přidáním 1,8 µl 4x LSB k 5 µl uchovaných vzorků. Do první jamky bylo vždy naneseno 6 µl markeru relativních molekulových hmotnosti. Dále bylo nanášeno po 6 µl na jamku vzorků pro kontrolu průběhu purifikace a 13 µl na jamku vzorků pro kontrolu úspěšnosti transfekce. Aparatura byla uzavřena a byla spuštěna separace. Separace probíhala při napětí 80 V 20 minut a pak následně při 150 V 1 hodinu. Po dokončení separace byla aparatura rozebrána a gel byl přemístěn na Western blot.

4.4.3.3 Western blotting

Pro jeden gel bylo do transferového pufru namočeno 6 kusů filtračního papíru o rozměrech 10,1 x 7, 6 cm a jedna 0,45 µm nitrocelulózová membrána o rozměrech 9 x 7 cm. Do tácu s transferovým pufrem byl přenesen gel. Na kazetu blotovacího zařízení byly umístěny 3 kusy filtračního papíru, membrána, gel a na konec další 3 kusy filtračního papíru. Při vrstvení byly jednotlivé komponenty uhlazovány válečkem, aby nedocházelo k tvorbě bublin. Blotovací zařízení bylo uzavřeno

a přístroj byl spuštěn. Transfer probíhal při konstantním napětí 13 V po dobu 1 hodiny. Po průběhu transferu bylo blotovací zařízení otevřeno, gel a filtrační papíry byly vyhozeny a membrána byla třikrát promyta destilovanou vodou. Membrána byla 3 minuty inkubována v barvivu Ponceau S na třepačce. Ponceau S bylo odlito a membrána byla promývána destilovanou vodou, dokud se nepřestala vymývat barva. Membrána byla přenesena na filtrační papír a byla ponechána uschnout. Z membrány byly vyříznuty oblasti, kde by se měl vyskytovat cílový protein m1TetCD (50 – 250 kDa) a oblast obsahující GAPDH (25 – 50 kDa). Vyříznuté části byly 3 minuty odbarvovány v 1x TBS a 0,1% Tweenu 20 na třepačce. Odbarvené části membrány byly inkubovány v blokační směsi po dobu 1 hodiny. Blokační směs byla odlita a části membrány byly třikrát po 10 minutách promyty v 1x TBS a 0,1% Tweenu 20 na třepačce. Na vyříznuté části membrány uložené v uzavíratelné krabičce byly aplikovány primární protilátky, ředěné v blokační směsi. Na část membrány, která by měla obsahovat cílový protein mTet1CD, byla použita primární protilátka monoklonální ANI-FLAG M2 (ředění 1:2000) a na část obsahující GAPDH byla použita anti-GAPDH protilátka (ředění 1:1000). Do krabičky byly umístěny i namočené ubrousky pro udržení vlhkosti. Uzavřená krabička byla uložena při 4 °C do dalšího dne. Další den byly kousky membrány třikrát po 10 minutách promyty v 1x TBS a 0,1% Tweenu 20 na třepačce. Membrány byly umístěny do uzavíratelné krabičky a byly na ně aplikovány sekundární protilátky. Na část membrány, která by měla obsahovat cílový protein mTet1CD, byla použita sekundární protilátka anti-mouse (ředění 1:1000) a na část obsahující GAPDH byla použita sekundární protilátka anti-rabbit (ředění 1:1000). Membrány byly se sekundárními protilátkami v uzavřené krabičce inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě. Kousky membrány byly třikrát po 10 minutách promyty v 1x TBS a 0,1% Tweenu 20 na třepačce. Bylo připraveno vyvolávací činidlo spojením činidel SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate a SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate v poměru 3:1. Membrány byly vloženy do detekčního přístroje ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) a převrstveny vyvolávacím činidlem. Vyvolávací činidlo bylo necháno 5 minut působit v zavřeném přístroji a následně byly membrány vyfoceny a snímky byly analyzovány za využití pogramu Image Lab Software.

5 Výsledky

Cílem práce bylo připravit rekombinantní enzym mTet1CD pro metodu TET asistovaného pyridin boranového sekvenování (TAPS).

Pro produkci rekombinantního proteinu mTet1CD byl použit plazmid označený jako mTet1CD (pcDNA3-Flag). Jednalo se o plazmid pcDNA3-Flag nesoucí mezi restrikčními místy *KpnI* a *BamH1* sekvenci pro mTet1CD katalytickou doménu s N-terminálním Flag značením.

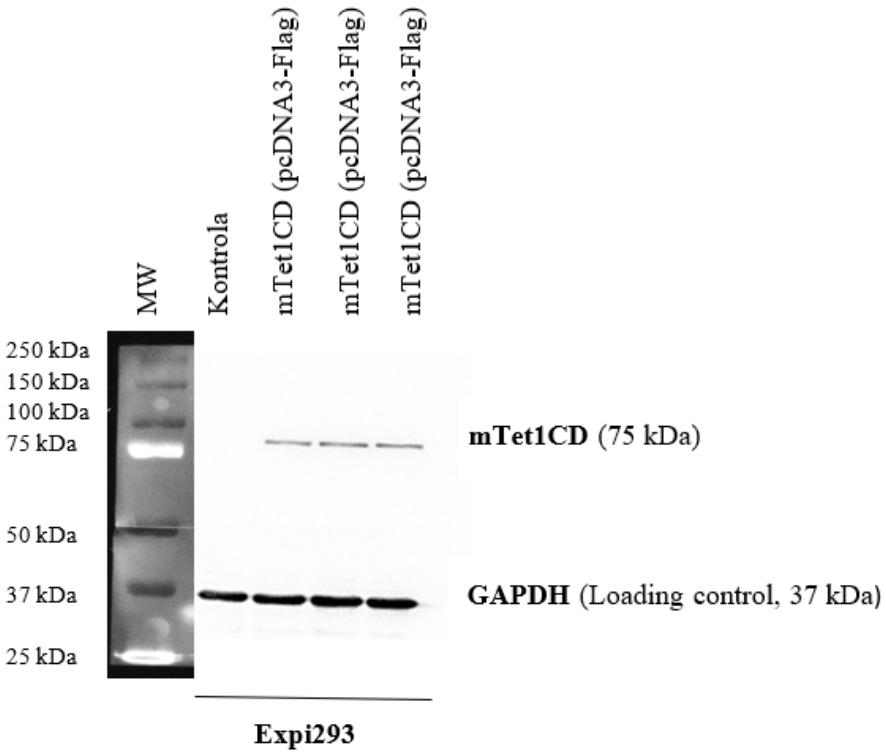
5.1 Výsledek amplifikace plazmidu mTet1CD (pcDNA3-Flag)

Nejprve byla provedena amplifikce plazmidu, aby bylo zajištěno jeho dostatečné množství pro další práci. Amplifikace plazmidu byla provedena úspěšně. Koncentrace amplifikovaného plazmidu byla stanovena spektrofotometricky. Při amplifikaci bylo získáno 700 µl plazmidové DNA o koncentraci 3 420 $ng \cdot \mu l^{-1}$. Z amplifikace se tedy podařilo získat 2 394 µg mTet1CD (pcDNA3-Flag) plazmidu. Poměr A (260 nm) /A (280 nm) byl 1,83, což naznačuje, že získaná plazmidová DNA nebyla znečištěná proteiny ani RNA. Poměr A (260 nm) / A (230 nm) byl 2,36, což naznačuje, že získaná DNA nebyla kontaminovaná organickými sloučeninami.

5.2 Výsledek kontroly úspěšnosti transfekce Expi293 buněk plazmidem mTet1CD (pcDNA3-Flag) a exprese mTet1CD proteinu.

Jakmile bylo připraveno dostatečné množství plazmidové DNA, přešlo se k transfekci Expi293 buněk a expresi mTet1CD proteinu. Transfekce byla prováděna ve třech kultivačních lahvích souběžně, čtvrtá kultivační láhev byla použita jako kontrolní (neobsahovala plazmidovou DNA). Kontrola úspěšnosti transfekce byla provedena elektroforetickou separací proteinů buněčného lyzátu pomocí SDS-PAGE a následnou detekcí za využití Western blottingu. Pro průkaz cílového mTet1CD proteinu při Western blottingu byla použita primární protilátka cílená proti Flag značce. Jako referenční protein pro kontrolu nanesení vzorku (loading control) byl použit protein GAPDH (velikost 37 kDa).

Transfekce a exprese proběhly úspěšně. V jamkách obsahující buněčné lyzáty Expi293 buněk transfekovaných pcDNA3-Flag (mTet1CD) plazmidem jsme pozorovali produkty o velikosti 37 kDa, odpovídající proteinu pro kontrolu nanesení GAPDH a produkty o velikosti 75 kDa, odpovídající cílovému mTet1CD enzymu. V jamce obsahující buněčný lyzát z kontrolní kultivační lahve byl pozorován jen jeden produkt o velikosti 37 kDa, odpovídající proteinu GAPDH (viz Obr. 14). Výsledek kontroly transfekce dopadl dle očekávání.



Obr. 14: Výsledek kontroly úspěšnosti transfekce buněčné linie Expi293 plazmidem mTet1CD (pcDNA3-Flag). Kontrola byla provedena pomocí SDS-PAGE a Western blottingu. V první jamce (MW) se nacházel marker relativních molekulových hmotností Precision Plus ProteinTM Dual Colour Standards. V druhé jamce se nacházel kontrolní vzorek. V následujících třech jamkách se nacházely vzorky lyzátu Expi293 buněk transfekovaných plazmidem mTet1CD (pcDNA3-Flag). O velikosti 37 kDa byl detekován u všech vzorků protein GAPDH jako kontrola nanesení vzorků. Pomocí primární protilátky cílené proti Flag značce byl detekován cílový protein mTet1CD o velikosti 75 kDa ve vzorcích transfekovaných buněk. Pro cílové proteiny značené protilátkami byl detekován chemiluminiscenční signál při nastavení detekčního přístroje: Blots – Chemi Hi Resolution. Marker relativní molekulové hmotnosti není značený protilátkami, tedy ho není možné při daném nastavení detekovat. Pro zviditelnění markeru relativní molekulové hmotnosti bylo použito nastavení detekčního přístroje Blots – Stain Free Blot s invertovanými barvami. Výsledný snímek pak vznikl spojením snímků pro cílové proteiny a snímku pro marker relativní molekulové hmotnosti.

5.3 Výsledný výtěžek rekombinantního mTet1CD enzymu.

Poté, co bylo ověřeno, že transfekce a exprese proběhly úspěšně, byly buněčné suspenze ze tří transfekčních kultivačních lahví spojeny a přešlo se k lýzi buněk a purifikaci cílového proteinu. Purifikace proběhla úspěšně, výsledná koncentrace cílového mTet1CD proteinu byla zjišťována spektrofotometricky. Bylo získáno 140 µl proteinu o koncentraci 1,15 $\mu g \cdot \mu l^{-1}$. Z 540 ml buněčné suspenze se tedy podařilo získat 160 µg mTet1CD proteinu (140 * 1,15 = 160 µg).

V postupu metody TAPS se pro jednu reakci používá enzym mTetCD1 o finální koncentraci 4 $\mu mol \cdot l^{-1}$ v objemu 50 µl. Molární hmotnost mTet1CD proteinu je 75 400 $g \cdot mol^{-1}$. Pro jednu reakci je

tedy potřeba 15 µg mTet1CD enzymu ($4 \cdot 10^{-6} * 7{,}54 \cdot 10^{4} * 5 \cdot 10^{-5} = 1{,}508 \cdot 10^{-5}$ g = 15,08 µg). Množství enzymu Tet1CD získané z 540 ml buněčné suspenze je dostačující pro 10 oxidačních reakcí v postupu metody TAPS (161 / 15 = 10,7).

5.4 Výsledek kontroly průběhu purifikace mtet1CD enzymu

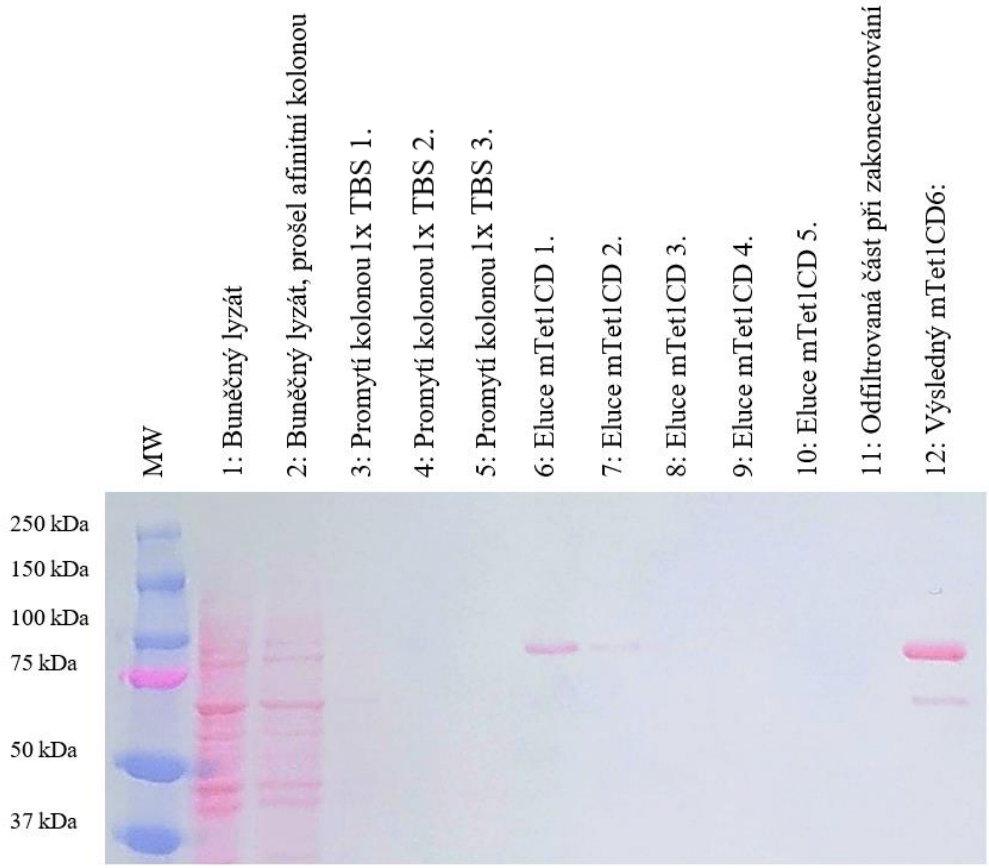
Kontrola průběhu purifikace mTet1CD proteinu byla provedena pomocí SDS-PAGE a následného Western blottingu. V různých fázích purifikace byly odebírány vzorky pro kontrolu, celkem bylo odebráno 12 vzorků (SDS-PAGE 1 – 12) (viz Tab. 1). Kontrola průběhu purifikace byla důležitá, pro ověření, zda se cílový mTet1CD protein nachází ve fázích purifikace, kde ho očekáváme (vzorky SDS-PAGE 1, 6-10 a 12), ale zároveň nedochází k jeho ztrátám v žádné jiné fázi (vzorky SDS-PAGE 2-5 a 11).

Tab. 1: Seznam vzorků odebíraných v průběhu purifikace mTet1CD proteinu pro kontrolu jejího průběhu.

Označení vzorku	Obsah vzorku
SDS-PAGE 1	Buněčný lyzát
SDS-PAGE 2	Buněčný lyzát, prošlý afinitní kolonou
SDS-PAGE 3	Promytí kolonou 1x TBS 1.
SDS-PAGE 4	Promytí kolonou 1x TBS 2.
SDS-PAGE 5	Promytí kolonou 1x TBS 3.
SDS-PAGE 6	Eluce mTet1CD 1.
SDS-PAGE 7	Eluce mTet1CD 2.
SDS-PAGE 8	Eluce mTet1CD 3.
SDS-PAGE 9	Eluce mTet1CD 4.
SDS-PAGE 10	Eluce mTet1CD 5.
SDS-PAGE 11	Odfiltrovaná část při zakoncentrování
SDS-PAGE 12	Výsledný mTet1CD

Vzorky byly v uvedeném pořadí naneseny na gel, byla provedena SDS-PAGE a následné přenesení separovaných proteinů na nitrocelulózovou membránu pomocí Western blottingu. Kontrola přenosu proteinů na membránu byla provedena pomocí barvení Ponceau S, které nespecificky barví proteiny. Ve vzorcích SDS-PAGE 1 a 2 je možné pozorovat mnoho separovaných proteinů, což je v souladu s očekáváním, protože tyto vzorky obsahují kompletní buněčný lyzát a buněčný lyzát po průchodu afinitní kolonou. Dále se proteiny vyskytují ve vzorcích SDS-PAGE 6, 7 a 12, kde je pozorovatelný protein o velikosti kolem 75 kDa, který by mohl odpovídat cílovému mTet1CD proteinu. Ve vzorku 12, který by měl obsahovat jen cílový mTet1CDprotein, je pozorovatelný ještě další protein o velikosti menší než 75 kDa, což naznačuje možnou fragmentaci cílového produktu nebo výskyt

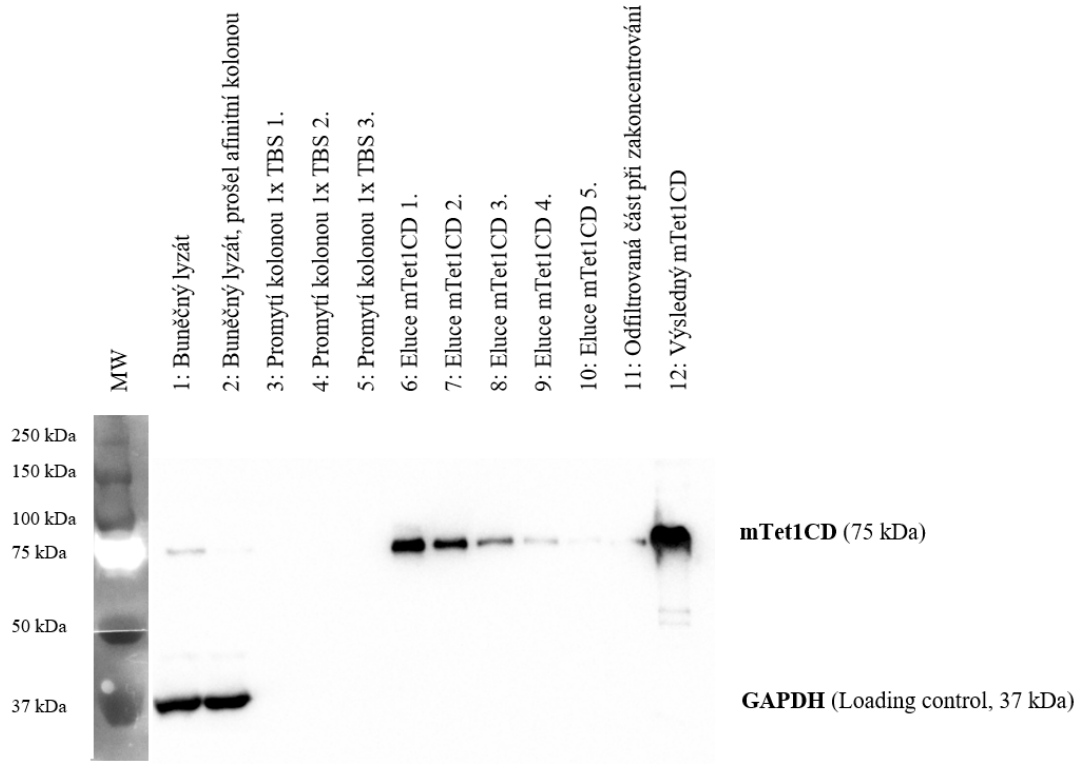
nějakých kontaminačních proteinů. Ve zbylých vzorcích není pozorován výskyt žádných obarvených proteinů (viz Obr. 15). Barvení pomocí Ponceau S je nespecifické a zbarvení je pozorovatelné pouze při vyšší koncentraci proteinům na membráně, takže bylo pokračováno se specifickým barvením pomocí protilátek s vyšší citlivostí.



Obr. 15: Kontrola přesátí separovaných proteinů na nitrocelulózovou membránu pomocí barvení s Ponceau S pro vzorky určené ke kontrole průběhu purifikace rekombinantního mTet1CD proteinu. Proteiny ve vzorcích byly separovány pomocí SDS-PAGE a přeneseny na nitrocelulózovou membránu pomocí Western blottingu. Přenesené proteiny byly barveny pomocí Ponceau S. V první jamce (MW) se nacházel marker relativních molekulových hmotností Precision Plus ProteinTM Dual Colour Standards. V následujících dvanácti jamkách byly aplikovány vzorky pro kontrolu průběhu purifikace sbírané v různých fázích purifikace mTet1CD proteinu.

Pro průkaz cílového mTet1CD proteinu při Western blottingu byla použita primární protilátka cílená proti Flag značce. Jako referenční protein (loading control) byl použit protein GAPDH (velikost 37 kDa). V tomto případě má protein GAPDH význam spíše jako reprezentace chování přirozených buněčných proteinů při purifikaci než jako kontrola nanesení vzorku. Referenční protein GAPDH byl detekován pouze ve vzorcích SDS-PAGE 1. a 2. kde byl aplikován vzorek celkového buněčného lyzátu

a vzorek buněčného lyzátu po průchodu afinitní kolonou. Protein GAPDH tedy kolonou prošel bez zachycení, dle očekávání. Ve vzorku SDS-PAGE 1. byl detekován mTet1CD protein, zatímco ve vzorku 2. tento protein potvrzen nebyl, což odpovídá tomu, že došlo ke správnému navázání mTet1CD proteinu na afinitní substrát. Ve vzorcích SDS-PAGE 3. – 5., které reprezentují vzorky získané po promytí kolony pomocí 1x TBS, nebyl detekován žádný protein, což odpovídá tomu, že při promytí nedocházelo ke ztrátám navázaného mTet1CD proteinu. Vzorky SDS-PAGE 6. – 10. pocházely z jednotlivých elučních frakcí. U těchto vzorků bylo možné pozorovat mTet1CD protein s postupně se snižující intenzitou signálu, a tedy s postupně se snižující koncentrací proteinu. Ve vzorku z posledního opakování eluce (vzorek SDS-PAGE 10.) byl detekován pouze slabý náznak signálu mTet1CD proteinu. Bylo tedy předpokládáno, že došlo k uvolnění veškerého mTet1CD proteinu z afinitní kolony. Ve vzorku SDS-PAGE 11. nebyl pozorován žádný protein, což potvrzuje, že při zakoncentrování získaného mTet1CD proteinu nedošlo k jeho ztrátám odfiltrováním. Ve vzorku SDS-PAGE 12. obsahujícím finální rekombinantní mTet1CD protein, byly identifikovány kromě produktu o velikosti 75 kDa i další produkty velikostech mezi 75 kDa a 50 kDa o nižší koncentraci, stejně jak bylo pozorováno při barvení s Ponceu S (viz Obr. 16).



Obr. 16: Výsledek kontroly úspěšnosti purifikace mTet1CD proteinu. Kontrola byla provedena pomocí SDS-PAGE a Western blottingu. V první jamce (MW) se nacházel marker relativních molekulových hmotností Precision Plus ProteinTM Dual Colour Standards. V následujících dvanácti jamkách byly aplikovány vzorky pro kontrolu průběhu purifikace sbírané v různých fázích purifikace mTet1CD proteinu. Pomocí primární protilátky cílené proti Flag značce byl detekován cílový protein mTet1CD o velikosti 75 kDa ve vzorcích 1, 6-10 a 12. O velikosti 37 kDa byl detekován protein GAPDH ve vzorcích 1 a 2. Ve vzorku 12 bylo detekováno více proteinů značených Flag značkou o velikosti menší než 75 kDa. Pro cílové proteiny značené protilátkami byl detekován chemiluminiscenční signál při nastavení detekčního přístroje: Blots – Chemi Hi Resolution. Marker relativní molekulové hmotnosti není značený protilátkami, tedy ho není možné při daném nastavení detekovat. Pro zviditelnění markeru relativní molekulové hmotnosti bylo použito nastavení detekčního přístroje Blots – Stain Free Blot s invertovanými barvami. Výsledný snímek pak vznikl spojením snímků pro cílové proteiny a snímku pro marker relativní molekulové hmotnosti.

Tyto menší produkty tedy také nesou Flag značku, což vede k předpokladu, že v průběhu purifikace docházelo k částečnému rozpadu cílového rekombinantního mTet1CD proteinu. Ovšem degradované proteiny tvořily jen velmi malou část získaného mTet1CD enzymu. Pomocí relativní kvantifikace bylo zjištěno, že poměr intaktního mTet1CD proteinu o velikosti 75 kDa a jeho fragmentů je 27,81, tedy že fragmentovaná část tvořila 3,5 % z celkového získaného mTet1CD enzymu. Relativní kvantifikace byla provedena pomocí softwaru ImageJ na základě postupu dle Hossein Davarinejad: Quantifications of Western Blots with ImageJ. Dostupné na: www.yorku.ca/yisheng/Internal/Protocols/ImageJ.pdf.

Rekombinantní protein mTet1CD pro metodu TAPS se podařilo úspěšně připravit, ovšem při purifikaci tohoto proteinu dochází v malé míře (3,5 %) k rozpadu cílového proteinu.

6 Diskuse

Detekce metylace cytozinů našla uplatnění v oblasti vědy, lékařské diagnostiky i pro forenzní účely. Byla vyvinuta celá řada metod umožňujících detekci a analýzu metylace cytosinů, ovšem zlatým standardem v tomto ohledu zůstává metoda bisulfitového sekvenování (Chen *et al*., 2017; Kumar *et al*., 2018). Navzdory svým mnohým výhodám a častému použití nese metoda bisulfitového sekvenování i řadu limitací, jako je degradace testované DNA a snížení komplexity sekvence. Snaha překonat tyto limitace vede k vývoji a zdokonalení technik pro detekci 5-metylcytozinu. Příkladem novější alternativní metody, která slibuje překonání limitací bisulfitového sekvenování, je metoda TET asistovaného pyridin boranového sekvenování (TAPS). Metoda TAPS využívá dvojice k DNA šetrných reakcí, kdy je 5-metylcytozinu nejprve oxidován působením Tet enzymu a následně redukován za přítomnosti pyridin boranu (Liu *et al*., 2019).

Experimentální část této diplomové práce se věnovala přípravě mTet1CD proteinu pro metodu TET asistovaného pyridin boranového sekvenování. Rekombinantní mTet1CD protein byl připravován na základě postupu dle Liu *et al*., 2019. Plazmidovým konstruktem, nesoucím sekvenci pro katalytickou doménu mTet1 značenou Flag značkou, byla transfekována buněčná linie Expi293. Po expresi byly transfekované buňky lyzovány a cílový protein byl purifikován na ANTI-Flag afinitním gelu.

Kvůli parametrům použité třepačky bylo možno v jedné kultivační lahvi kultivovat maximálně 180 ml buněčné suspenze. Transfekce byla prováděna ve třech kultivačních lahvích souběžně, buněčné suspenze z těchto tří lahví byly pro purifikační krok spojeny. Celkem bylo v jednom cyklu přípravy mTet1CD proteinu pracováno s 540 ml buněčné suspenze. Z 540 ml buněčné suspenze bylo získáno 160 µg mTet1CD proteinu. V postupu dle Liu *et al*., 2019 bylo pracováno s 1 000 ml buněčné suspenze, kdy transfekce probíhala v jedné kultivační lahvi. Postup uvádí, že byl optimalizován pro produkci až 500 µg mTet1CD proteinu z 1 000 ml buněčné suspenze. Při přepočtu na 540 ml buněčné suspenze by se mělo jednat o produkci až 270 µg mTet1CD proteinu. Mnou získaný výtěžek mTet1CD odpovídal 59,3 % výtěžku uvedeného v postupu (160 / 270 * 100 % = 59,3 %). Při provedení kontroly průběhu purifikace pomocí SDS-PAGE a Western blottingu nebylo odhaleno, že by docházelo ke ztrátám mTet1CD proteinu v žádném z promývacích nebo koncentrováních krocích. Z výsledků kontroly purifikace pro eluční kroky usuzuji, že mTet1CD protein navázaný na afinitní koloně byl při eluci uvolněn. Nepředpokládám tedy, že by nižší výtěžek proteinu byl způsoben ztrátami při purifikaci. Další možností je, že došlo k nižší úspěšnosti transfekce nebo exprese v Expi293 buňkách, případně mohlo dojít k neúplné extrakci vytvořeného mTet1CD proteinu při lýzi. Tento předpoklad odpovídá také tomu, že postup pro produkci rekombinantního proteinu mTet1CD byl sledován přesně podle Liu *et al*., 2019, až na dva kroky: buňky byly kultivovány v menších objemech, které byly následně spojeny a pro lýzu buněk bylo použito nastavení centrifugy 16 500 g 60 minut místo 30 000 g 30 minut.

Buněčná linie Expi293 je specializovaná pro produkci rekombinantních proteinů. Z literatury víme, že buněčná linie Expi293 byla použita pro transfekci a expresi i v menších objemech než 1 l, například v objemu 100 ml pro produkci rekombinantního SARS-CoV-2 konstruktu (García-Cordero *et al*., 2021) nebo v 6-jamkové kultivační destičce pro produkci rekombinantního lidského fibrinogenu. V případě produkce lidského fibrinogenu v Expi293 buňkách bylo dokonce používáno stejného transfekčního činidla polyetyleniminu jako v mém experimentu (Popovic *et al*., 2022). I komerčně dostupný transfekční kit používající buněčnou linii Expi293 uvádí možné použití pro rozmezí objemů 800 µl – 800 ml (ThermoScientific, A14525). V žádném z uvedených zdrojů není zmínka, že by kultivace a transfekce Expi293 buněk v menších objemech nějak ovlivňovala výtěžek rekombinantního proteinu. I použité transfekční činidlo polyetylenimin je standardně využíváno pro transfekce savčích buněk i v objemech pod 100 ml (Longo *et al*., 2013). Žádný ze zmíněných faktů nenasvědčuje tomu, že by nižší výtěžek mTet1CD mohl být způsoben kultivací Expi293 v menších objemech, než uvádí postup dle Liu *et al*., 2019.

Dalším krokem, který se lišil od postupu dle Liu *et al*., 2019 a mohl by potencionálně přispět ke sníženému výtěžku mTet1CD proteinu, byl stáčecí krok při lýze buněk. Nebyla dostupná centrifuga umožňující nastavení 30 000 g, proto bylo použito maximální možné nastavení rychlosti a to 16 500 g. Při snížení centrifugační síly byl prodloužen centrifugační čas na 60 min, aby bylo dosaženo čirého supernatantu bez buněčných zbytků. Snížení centrifugační síly a prodloužení centrifugačního času může mít vliv například na obsah některých proteinů v supernatantu při přípravě vzorků krevní plazmy (Lesche *et al.*, 2016; Møller *et al*., 2017). Nicméně všechny z dříve zmíněných zdrojů využívající Expi293 buňky pro produkci rekombinantních proteinů, používají výrazně nižší centrifugační sílu než 30 000 g pro extrakci vytvořených proteinů.

Při kontrole průběhu purifikace mnou připraveného mTet1CD pomocí SDS-PAGE a Western blottingu bylo zjištěno, že výsledný zakoncentrovaný protein obsahuje kromě očekávaného mTet1CD proteinu o velikosti 75 kDa i menší produkty nesoucí Flag značku. U těchto produktů o menší velikosti předpokládám, že se jedná a fragmenty cílového mTet1CD enzymu, tedy že v průběhu purifikace docházelo k jeho částečné degradaci. Fragmentovaný protein tvořil 3,5 % získaného mTet1CD. K degradaci proteinů v průběhu purifikace dochází nejčastěji v důsledku působení proteáz. Proteázy jsou enzymy běžně se vyskytující v živých buňkách, kde je ale jejich nechtěnému působení zabráněno jejich fyzickým oddělení od zbylých buněčných proteinů v buněčných kompartmentech. Při lýzi buněk, což je prvním krokem purifikace rekombinantních proteinů, dochází k uvolnění proteáz mezi zbylé proteiny (Ryan *et* Henehan, 2017). Zabránění degradace cílového proteinu je umožněno použitím následujících strategií: přídavek proteázových inhibitorů, práce v chladu a rychlé provedení purifikace (Ryan *et* Henehan, 2013). Součástí lyzačního i elučního pufru použitého v mém experimentu byly inhibitory proteáz cOmplete Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free a fenylmetylsulfonyl fluorid (PMSF). PMSF inhibuje serinové proteázy a cOmplete Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free inhibuje

široké spektrum serinových i cysteinových proteáz. PMSF je standardně využíván při purifikacích (Ryan *et* Henehan, 2017). Při provádění mého experimentu byla afinitní kolona umístěna v chladové místnosti při teplotě 4 °C a i po eluci byl cílový protein udržován na ledu. Jediným bodem prevence působení proteáz, který nebyl u mého experimentu splněn, byla rychlost práce. Celý purifikační protokol trvalo provést téměř 10 hodin, ale časově nejnáročnější částí byl průtok buněčného lyzátu kolonou a následné promývání kolony. Zrychlení afinitní purifikace pro proteiny značené Flag značkou je možné například pomoci imuno-afinitní vysokorychlostní chromatografie, ovšem tam už nestačí použití standardního ANTI-Flag afinitního gelu, ale je vyžadováno použití protilátek cílených proti Flag značce, které jsou imobilizovány na skleněné kuličky s póry (Schuster *et al*., 2000).

Pro produkci dostatečného množství mTet1CD enzymu pro větší pokus (například provedení TAPS metody pro 100 vzorků) by nejspíše největším problém představovala kultivace potřebného množství Expi293 buněk. Při výtěžnosti 160 µl mTet1CD proteinu z 540 ml buněčné suspenze by pro přípravu dostatečného množství proteinu pro 100 TAPS reakcí bylo nutné provést transfekci u 5 400 ml buněčné suspenze. Tento problém by mohl být vyřešen použitím orbitální třepačky pro kultivační lahve s větším objemem. Jsou dostupné i orbitální třepačky umožňující kultivaci až čtyř 6l kultivačních lahví najednou (Innova® 43/43R, Eppendorf). Další problém by mohl nastat při purifikaci na afinitní koloně. Z 5 400 ml buněčné suspenze by vzniklo 540 ml buněčného lyzátu, čemuž by odpovídalo použití 15 ml ANTI-Flag afinitního gelu. Použitá kolona (Econo-Pac® Chromatography Column, Bio-rad) sice umožňuje použití až 20 ml gelu do jedné kolony, ale použití tak velkého objemu by výrazně prodloužilo čas tohoto purifikačního kroku. Už při použití 1,5 ml gelu a 54 ml buněčného lyzátu při mém experimentu trval tento krok několik hodin. Lepším řešením by tedy bylo provádět purifikaci na několika kolonách souběžně s menším objemem nebo případně vyzkoušet již zmíněnou imuno-afinitní vysokorychlostní chromatografii. V mém experimentu jsem pro transfekci používala buněčnou suspenzi o koncentraci 1 x 10^6 buněk na ml, ovšem například pro přípravu rekombinantního fibrinogenu (Popovic *et al*., 2022) nebo rekombinantního SARS-CoV-2 konstruktu (García-Cordero *et al*., 2021) se používaly Expi293 buňky v koncentraci 3 x 10^6 buněk na ml. Pro produkci mTet1CD proteinu ve větším množství by bylo nejspíše vhodné vyzkoušet, jaký vliv na výtěžek by měla vyšší koncentrace buněk, protože zvýšení koncentrace buněk by mohlo vést ke snížení potřebných kultivačních objemů.

Metoda TET asistovaného pyridin boranového sekvenování (TAPS) není jedinou, která pro své fungování vyžaduje použití Tet enzymu. Tet enzym je používán například v metodě Tet asistovaného bisulfitového sekvenování (TAB-seq, Tet-Assisted Bisulfite Sequencing), která umožňuje rozlišení 5hmC od 5mC při bisulfitovém sekvenování. Pro tuto metodu byl Tet enzym také připraven jako rekombinantní protein. Pro produkci proteinu byl také použit plazmidový konstrukt nesoucí sekvenci Tet enzymu značenou pomocí Flag značky, ovšem pro expresi byl v tomto případě použit bakulovirový expresní systém. Purifikace byla také provedena na ANTI-Flag afinitním gelu. Tento postup ovšem

neuvádí žádnou informaci týkající se výtěžku Tet enzymu pomocí bakulovirového expresního systému (Yu *et al*., 2018).

Před použitím připraveného rekombinantního mTet1 enzymu pro TAPS je nutné ještě ohodnotit jeho funkční úspěšnost. Funkčnost enzymu může být ověřena použitím TAPS reakcí na modelovou DNA obsahující plně metylované CpG místa pomocí restrikční analýzy nebo sekvenování. Restrikčních enzymů je možné využít, pokud máme modelovou DNA navrženou tak, že při převodu metylovaných cytosinů dojde ke ztrátě restrikčního místa, a tedy ke ztrátě fragmentu, což může být hodnoceno pomocí elektroforetické separace. Sekvenování umožní přímo ohodnotit převod 5mC na T (Liu *et al*., 2019).

Metoda TET asistovaného pyridin boranového sekvenování (TAPS) umožňuje překonat limitace metody bisulfitového sekvenování, kterými jsou degradace testované DNA a významné snížení komplexity sekvence (Liu *et al*., 2019). Ovšem TAPS není jedinou metodou, která překonání limitací bisulfitové metody umožňuje. Pro analýza metylace ve zvolených lokusech, je možné použít například metodu kombinující metylačně citlivé restrikční enzymy s qPCR (qMSRE, Quantitative methylation sensitive restriction enzyme method). Nevýhodou této metody je nutnost návrhu primerů specifických k metylačně citlivému restrikčnímu místu ve zvoleném cílovém lokusu (Kanel *et* Huber, 2013). Pro místně specifickou analýzu metylace je možné využít také kvantitativní analýzu DNA metylace za využití real-time PCR (qAMP, quantitative analysis of DNA methylation using real-time PCR), která je založena na použití metylačně citlivých i metylačně závislých enzymů a umožňuje rychlou analýzu cílových oblasti. Ale opět je závislá na tom, že zvolený cílový CpG je součástí restrikčního místa, pro které je nutné navrhnout specifické primery (Qakes *et al.,* 2014). Možnost celogenomové analýzy metylace přináší metoda enzymatického metylačního sekvenování (EM-seq, Enzymatic Methyl-seq), která využívá dvojice enzymů Tet2 a APOBEC3A pro převod nemetylovaných cytozinů na uracil. Použití enzymatických reakcí je velice šetrné k DNA a nezpůsobuje tak degradaci vzorku, ale stejně jako u bisulfitového sekvenování dochází k převodu všech nemetylovaných cytozinů, což vede ke snížení komplexity sekvence a snížení kvality sekvenování (Vaisvila *et al.,* 2019). Přímou detekci DNA bez jakékoliv předchozí úpravy DNA umožňují sekvenační metody dlouhých čtení (SMRT, Single-molecule real-time sequencing a Oxford Nanopore sequencing). Ovšem zatím je přesnost těchto metod ve srovnání s bisulfitovým sekvenováním nižší (Blewitt *et al*., 2019).

7 Závěr

Diplomová práce se soustředila na přípravu Tet1 enzymu pro metodu TET asistovaného pyridin boranového sekvenování (TAPS, TET-assisted pyridine borane sequencing), která umožňuje analýzu metylace cytozinů. Metoda TAPS představuje k DNA šetrnou alternativu k nejčastěji používané metodě bisulfitového sekvenování. Metoda TAPS by potencionálně mohla být využita při detekci metylace pro určení věku jedince z DNA.

V rámci teoretické část diplomové práce byla vypracována rešerše na téma epigenetických mechanismů se zaměřením na metylaci cytozinů, přehled metod umožňujících detekci metylace a možnosti exprese a purifikace rekombinantních proteinů.

Experimentální část si kladla za cíl přípravu mTet1CD enzymu. Pro přípravu mTet1CD enzymu byl použit plazmid mTet1CD (pcDNA3-Flag) nesoucí sekvenci pro katalytickou doménu mTet1 enzymu značenou pomocí Flag značky. Plazmid mTet1CD (pcDNA3-Flag) byl amplifikován v kompetentních bakteriích a následně izolován. Jako expresní systém byla použita savčí buněčná linie Expi293, která byla transfekována plazmidem mTet1CD (pcDNA3-Flag) za pomoci chemického činidla polyetyleniminu. Vytvořený mTet1CD protein byl z buněk uvolněn lýzí a purifikován pomocí afinitní chromatografie. Kontrola úspěšnosti transfekce a průběhu purifikace byla provedena pomocí SDS-PAGE a Western blottingu.

Z 540 ml buněčné suspenze Expi293 se podařilo získat 160 μg mTet1CD enzymu, tedy množství použitelné pro 10 reakcí v metodě TET asistovaného pyridin boranového sekvenování. Při kontrole průběhu purifikace bylo zjištěno, že dochází z 3,5 % k rozpadu finálního mTet1CD enzymu v průběhu purifikace.

Enzym mTet1CD se podařilo úspěšně připravit, ovšem pro jeho použití pro metodu TAPS bude nutné provést ještě ověření jeho funkčnosti.

8 Literatura

Aberg K. A., Xie l., Chan R. F., Zhao M., Pandey A. K., Kumar G., Clark S. L., van den Oord E. J. C. G. (2015): Evaluation of Methyl-Binding Domain Based Enrichment Approaches Revisited. PLOS ONE 10(7), doi:10.1371/journal.pone.0132205.

Adusumalli S., Mohd Omar M. F., Soong R., Benoukraf T. (2015): Methodological aspects of whole-genome bisulfite sequencing analysis. Briefings in Bioinformatics 16(3): 369-379, doi:10.1093/bib/bbu016.

Ahmed F. (2010): Epigenetics: Tales of adversity. Nature 468(7327): S20, doi:10.1038/468S20a.

Assenberg R., Wan P. T., Geisse S., Mayr L. M. (2013): Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. Current Opinion in Structural Biology 23(3): 393-402, doi:10.1016/j.sbi.2013.03.008.

Bareyt S., Carell T. (2008): Selective Detection of 5-Methylcytosine Sites in DNA. Angewandte Chemie International Edition 47(1): 181-184, doi:10.1002/anie.200702159.

Benítez-Mateos A. I., Zeballos N., Comino N., Moreno de Redrojo L., Randelovic T., López-Gallego F. (2020): Microcompartmentalized Cell-Free Protein Synthesis in Hydrogel μ-Channels. ACS Synthetic Biology 9(11): 2971-2978, doi:10.1021/acssynbio.0c00462.

Bertolini L. R., Meade H., Lazzarotto C. R., Martins L. T., Tavares K. C., Bertolini M., Murray J. D. (2016): The transgenic animal platform for biopharmaceutical production. Transgenic Research 25(3): 329-343, doi:10.1007/s11248-016-9933-9.

Bestor T. H., Edwards J.R., Boulard M. (2015): Notes on the role of dynamic DNA methylation in mammalian development. Proceedings of the National Academy of Sciences 112(22): 6796-6799, doi:10.1073/pnas.1415301111.

Bhasin J. M., Hu B., Ting A. H. (2016): MethylAction: detecting differentially methylated regions that distinguish biological subtypes. Nucleic Acids Research 44(1): 106-116, doi:10.1093/nar/gkv1461.

Biswas S., Rao C. M. (2018): Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. European Journal of Pharmacology 837: 8-24, doi:10.1016/j.ejphar.2018.08.021.

Blewitt M., Gouil Q., Keniry A. (2019): Latest techniques to study DNA methylation. Essays in Biochemistry 63(6): 639-648, doi:10.1042/EBC20190027.

Boers R., Boers J., Hoon B. D., Kockx C., Ozgur Z., Molijn A., IJcken W., Laven J., Gribnau J. (2018): Genome-wide DNA methylation profiling using the methylation-dependent restriction enzyme LpnPI. Genome Research 28(1): 88-99, doi:10.1101/gr.222885.117.

Bogdanović O., Lister R. (2017): DNA methylation and the preservation of cell identity. Current Opinion in Genetics & Development 46: 9-14, doi:10.1016/j.gde.2017.06.007.

Booth M. J., Ost T. W. B., Beraldi D., Bell N. M., Branco M. R., Reik W., Balasubramanian S. (2013): Oxidative bisulfite sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. Nature Protocols 8(10): 1841-1851, doi:10.1038/nprot.2013.115.

Breiling, A., and Lyko, F. (2015). Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. Epigenetics Chromatin 8:24, doi:10.1186/s13072-015-0016-6.

Brena, R. M., Auer H., Kornacker K., Hackanson B., Raval A., ByrdJ. C., Plass C. (2006): Accurate quantification of DNA methylation using combined bisulfite restriction analysis coupled with the Agilent 2100 Bioanalyzer platform, Nucleic Acids Research 34(3): e17, doi:10.1093/nar/gnj017.

Brinkman A. B., Simmer F., Ma K., Kaan A., Zhu J., Stunnenberg H. G. (2010): Whole-genome DNA methylation profiling using MethylCap-seq. Methods 52(3): 232-236, doi:10.1016/j.ymeth.2010.06.012.

Bronkhorst A. J., Ungerer V., Diehl F., Anker P., Dor6 Y., Fleischhacker M., Gahan P. B., Hui L., Holdenrieder S., Thierry A. R. (2021): Towards systematic nomenclature for cell-free DNA. Human Genetics 140(4): 565-578, doi:10.1007/s00439-020-02227-2.

Büssow K. (2015): Stable mammalian producer cell lines for structural biology. Current Opinion in Structural Biology 32: 81-90, doi:10.1016/j.sbi.2015.03.002.

Campan M., Weisenberger D. J., Trinh B., Laird P. W. (2018): MethyLight and Digital MethyLight. Methods in Molecular Biology 1708: 497–513, doi:10.1007/978-1-4939-7481-8_25.

Celie P. H. N., Parret A. H. A., Perrakis A. (2016): Recombinant cloning strategies for protein expression. Current Opinion in Structural Biology 38: 145-154, doi:10.1016/j.sbi.2016.06.010.

Chen Y., Hong T., Wang S., Mo J., Tian T., Zhou X. (2017): Epigenetic modification of nucleic acids: from basic studies to medical applications. Chemical Society Reviews 46(10): 2844-2872, doi:10.1039/C6CS00599C.

Chen L. Q., Zhao W. S., Luo G. Z. (2020): Mapping and editing of nucleic acid modifications. Computational and Structural Biotechnology Journal 18: 661-667, doi:10.1016/j.csbj.2020.03.010.

Cheng J., Siejka-Zielińska P., Liu Y., Chandran A., Kriaucionis S., Song C. X. (2021): Endonuclease enrichment TAPS for cost-effective genome-wide base-resolution DNA methylation detection. Nucleic Acids Research 49(13), e76, doi:10.1093/nar/gkab291.

Chin C. L., Goh J.B., Srinivasan H., Liu K. I., Gowher A., Shanmugam R., Lim H. L., Choo M., Tang W. Q., Tan H. A., Nguyen-Khuong T., Tan M. H., Ng S. K. (2019): A human expression system based on HEK293 for the stable production of recombinant erythropoietin. Scientific Reports 9(1): 16768, doi:10.1038/s41598-019-53391-z.

Clark T. A., Lu X., Luong K., Dai Q., Boitano M., Turner S. W., He C., Korlach J. (2013): Enhanced 5-methylcytosine detection in single-molecule, real-time sequencing via Tet1 oxidation. BMC Biology 11(1): 4, doi:10.1186/1741-7007-11-4.

Cohen-Karni, D., Xu D., Apone L., Fomenkov A., Sun Z., Davis P. J., Morey Kinney S. R., Yamada-Mabuchi M., Xu S., Davis T., Pradhan S., Roberts R. J., Zheng Y. (2011): The MspJI family of modification-dependent restriction endonucleases for epigenetic studies. Proceedings of the National Academy of Sciences 108(27): 11040-11045, doi:10.1073/pnas.1018448108.

Contreras-Gómez A., Sánchez-Mirón A., García-Camacho F., Molina-Grima E., Chisti Y. (2014). Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. Biotechnology Progress 30(1): 1-18, doi:10.1002/btpr.1842.

Daxinger, L., Whitelaw, E. (2012): Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. Nat Rev Genet 13: 153–162, doi:10.1038/nrg3188.

Deans C., Maggert K. A. (2015): What Do You Mean, “Epigenetic”?, Genetics 199(4): 887-896, doi:10.1534/genetics.114.173492.

Demain A. L., Vaishnav P. (2009): Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnology Advances 27(3): 297-306, doi:10.1016/j.biotechadv.2009.01.008.

Derks S., Lentjes M. H. F. M., Hellebrekers D. M. E. I., De Bruïne A. P., Herman J. G., Engeland M. (2004): Methylation-Specific PCR Unraveled. Analytical Cellular Pathology 26(5-6): 291-299, doi:10.1155/2004/370301

Down T. A, Rakyan V.K., Turner D.J., Flicek P, Li H., Kulesha E., Gräf S., Johnson N., Herrero J., Tomazou E. M., Thorne N. P., Bäckdahl6 L., Herberth M., Howe K. l., Jackson D. K., Miretti M. M., Marioni J. C., Birney E., Hubbard TJ. P., Durbin R., Tavaré S., Bec S (2008): A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis. Nature Biotechnology 26(7): 779-785, doi:10.1038/nbt1414.

Dupont C., Armant D., Brenner C. (2009): Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. Seminars in Reproductive Medicine 27(05): 51-357, doi:10.1055/s-0029-1237423.

Eads C. A., Danenberg K. D., Kawakami K., Saltz L. B., Blake C., Shibata D., Danenberg P. V., Laird P. W. (2000): MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. Nucleic Acids Research 28(8): E32, doi:10.1093/nar/28.8.e32.

Edwards J. R., Yarychkivska O., Boulard M., Bestor T. H. (2017): DNA methylation and DNA methyltransferases. Epigenetics & Chromatin 10(1), doi:10.1186/s13072-017-0130-8.

Erger F., Nörling D., Borchert D., Leenen E., Habbig S., Wiesener M. S., Bartram M. P., Wenzel A., B. Christian, Toliat M. R., Nürnberg P., Beck B. B., Altmüller J. (2020): CfNOMe — A single assay for comprehensive epigenetic analyses of cell-free DNA. Genome Medicine 12(1): 54, doi:10.1186/s13073-020-00750-5.

Feng S., Zhong Z., Wang M., Jacobsen S. E. (2020): Efficient and accurate determination of genome-wide DNA methylation patterns in Arabidopsis thaliana with enzymatic methyl sequencing. Epigenetics & Chromatin 13(1): 42, doi:10.1186/s13072-020-00361-9.

Flusberg B. A., Webster D. R., Lee J. H., Travers K. J., Olivares E. C., Clark T. A., Korlach J., Turner S. W. (2010): Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. Nature Methods 7(6): 461-465, doi:10.1038/nmeth.1459.

Frommer M., McDonald L. E., Millar D. S., Collis C. M., Watt F., Grigg G. W., Molloy, Paul C. L. (1992): A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proceedings of the National Academy of Sciences 89(5): 1827-1831, doi:10.1073/pnas.89.5.1827.

Fu Y., He C. (2012): Nucleic acid modifications with epigenetic significance. Current Opinion in Chemical Biology 16(5-6): 516-524, doi:10.1016/j.cbpa.2012.10.002.

García-Cordero J., Mendoza-Ramírez J., Fernández-Benavides D., Roa-Velazquez D., Filisola-Villaseñor J., Martínez-Frías S. P., Sanchez-Salguero E. S., Miguel-Rodríguez C. E., Montero J. L. M., Torres-Ruiz J. J., Gómez-Martín D., Argumedo L. S., Morales-Ríos E., Alvarado-Orozco J. M., Cedillo-Barrón L. (2021): Recombinant Protein Expression and Purification of N, S1, and RBD of SARS-CoV-2 from Mammalian Cells and Their Potential Applications. Diagnostics 11(10):1808, doi:10.3390/diagnostics11101808.

Geisler C., Jarvis D. L. (2018): Adventitious viruses in insect cell lines used for recombinant protein expression. Protein Expression and Purification 144: 25-32, doi:10.1016/j.pep.2017.11.002.

Graumann K., Premstaller A. (2006): Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. Biotechnology Journal 1(2): 164-186, doi:10.1002/biot.200500051.

Griffin T. J., Seth G., Xie H., Bandhakavi S., Hu W. S. (2007): Advancing mammalian cell culture engineering using genome-scale technologies. Trends Biotechnol 25(9):401-8, doi: 10.1016/j.tibtech.2007.07.004.

Gu, T.P., Guo, F., Yang, H., Wu, H.P., Xu, G.F., Liu, W., Xie, Z.G., Shi, L., He, X., Jin, S.G., Iqbal, K., Shi, Y.G., Deng, Z., Szabo, P.E., Pfeifer, G.P., Li, J., Xu, G.L. (2011): The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. Nature 477: 606–610, doi: 10.1038/nature10443.

Hernández H. G., Tse Y. M., Pang S. C., Arboleda H., Forero D. A. (2013): Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis. BioTechniques 55(4): 181-197, doi:10.2144/000114087.

Hodgman C. E., Jewett M. C. (2012): Cell-free synthetic biology: Thinking outside the cell. Metabolic Engineering 14(3): 261-269, doi:10.1016/j.ymben.2011.09.002.

Houdebine L. M. (2018): Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. Revue Scientifique et Technique de l'OIE 37(1): 131-139, doi:10.20506/rst.37.1.2746.

Irizarry R. A., Ladd-Acosta C., Carvalho B., Wu H., Brandenburg S. A., Jeddeloh J. A., Wen B., Feinberg A. P. (2008): Comprehensive high-throughput arrays for relative methylation (CHARM). Genome Research 18(5): 780-790, doi:10.1101/gr.7301508.

Jacinto F. V., Ballestar E., Esteller M. (2008): Methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP): Hunting down the DNA methylome. BioTechniques 44(1): 35-43, doi:10.2144/000112708.

Jain M., Olsen H. E., Paten B., Akeson M. (2016): The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. Genome Biology 17(1):239, doi:10.1186/s13059-016-1103-0.

Jung S. E., Shin K. J., Lee H. Y. (2017): DNA methylation-based age prediction from various tissues and body fluids. BMB Reports 50(11): 546-553, doi:10.5483/BMBRep.2017.50.11.175.

Kanel T., Huber A. R. (2013): DNA methylation analysis. Swiss Medical Weekly 143: w13799, doi:10.4414/smw.2013.13799.

Khanh K. H. (2013): Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications. Advanced Pharmaceutical Bulletin 3(2): 257-263, doi:10.5681/apb.2013.042.

Khulan B., Thompson R. F., Ye K., Fazzari M. J., Suzuki M., Stasiek E., Figueroa M. E., Glass J. L., Chen Q., Montagna C., Hatchwell E., Selzer R. R., Richmond T. A., Green R. D., Melnick A., Greally J. M. (2006): Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation: The HELP assay. Genome Research 16(8): 1046-1055, doi:10.1101/gr.5273806.

Klobučar T., Kreibich E., Krueger F., Arez M., Pólvora-Brandão D., Meyenn F., Rocha S. T., Eckersley-Maslin M. (2020): IMPLICON: an ultra-deep sequencing method to uncover DNA methylation at imprinted regions. Nucleic Acids Research 48(16): E92, doi:10.1093/nar/gkaa567.

Kohli R. M., Zhang Y. (2013): TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. Nature 502(7472): 472-479, doi:10.1038/nature12750.

Kosobokova E. N., Skrypnik K. A., Kosorukov V. S. (2016): Overview of fusion tags for recombinant proteins. Biochemistry 81(3): 187-200, doi:10.1134/S0006297916030019.

Kumar S., Chinnusamy V., Mohapatra T. (2018): Epigenetics of Modified DNA Bases: 5-Methylcytosine and Beyond. Frontiers in Genetics 9, doi:10.3389/fgene.2018.00640.

Lesche D., Geyer R., Lienhard D., Nakas C. T., Diserens G., Vermathen P., Leichtle A. B. (2016): Does centrifugation matter? Centrifugal force and spinning time alter the plasma metabolome. Metabolomics 12(10): 159, doi:10.1007/s11306-016-1109-3.

Li E., Zhang Y. (2014): DNA Methylation in Mammals. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 6(5), doi:10.1101/cshperspect.a019133.

Li Y., Tollefsbol T. O. (2011): DNA Methylation Detection: Bisulfite Genomic Sequencing Analysis. Methods in Molecular Biology 791: 11-22, doi:10.1007/978-1-61779-316-5_2.

Liberman N., Wang S. Y., Greer E L. (2019): Transgenerational epigenetic inheritance: from phenomena to molecular mechanisms. Current Opinion in Neurobiology 59: 189-206, doi:10.1016/j.conb.2019.09.012.

Liu Q., Georgieva D. C., Egli D., Wang K. (2019): NanoMod: a computational tool to detect DNA modifications using Nanopore long-read sequencing data. BMC Genomics 20(S1): 78, doi:10.1186/s12864-018-5372-8.

Liu Y., Cheng J., Siejka-Zielińska P., Weldon C., Roberts H., Lopopolo M., Magri A., D'Arienzo V., Harris J. M., McKeating J. A., Song C. X. (2020): Accurate targeted long-read DNA methylation and hydroxymethylation sequencing with TAPS. Genome Biology 21(1), doi:10.1186/s13059-020-01969-6.

Liu Y., Siejka-Zielińska P., Velikova G., Y. Bi, F. Yuan, M. Tomkova, Bai Ch., Chen Lei., Schuster-Böckler B., C. X. Song (2019): Bisulfite-free direct detection of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at base resolution. Nature Biotechnology 37(4): 424-429, doi:10.1038/s41587-019-0041-2.

Liang G., Gonzalgo M. L., Salem C., JONES P. A. (2002): Identification of DNA methylation differences during tumorigenesis by methylation-sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction. Methods 27(2): 150-155, doi:10.1016/S1046-2023(02)00068-3.

Longo P. A., Kavran J. M., Kim M. S., Leahy D. J. (2013): Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI). Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Elsevier, 2013: s. 227-240, doi:10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5.

Lorsbach R. B, Moore J., Mathew S., Raimondi S. C., Mukatira S. T., Downing J.R. (2003): TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). Leukemia 17(3):637-64, 10.1038/sj.leu.2402834.

Moore L. D., Le T., Fan G. (2013): DNA Methylation and Its Basic Function. Neuropsychopharmacology 38(1): 23-38, doi:10.1038/npp.2012.112.

Møller M. F., Søndergaard T. R., Kristensen H. T., Münster A. M B. (2017): Evaluation of a reduced centrifugation time and higher centrifugal force on various general chemistry and immunochemistry analytes in plasma and serum. Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine 54(5): 593-600, doi:10.1177/0004563216674030.

Nair S. S., Coolen M. W., Stirzaker C., Song J. Z., Statham A. L., StrbenaC D., Robinson M. D., Clark S. J. (2014): Comparison of methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP) and methyl-CpG binding domain (MBD) protein capture for genome-wide DNA methylation analysis reveal CpG sequence coverage bias. Epigenetics 6(1): 34-44, doi:10.4161/epi.6.1.13313.

Ni P., Huang N., Zhang Z., Wang D. P., Liang F., Miao Y., Xiao C. L., Luo F., Wang J. (2019): DeepSignal: detecting DNA methylation state from Nanopore sequencing reads using deep-learning. Bioinformatics 35(22): 4586-4595, doi:10.1093/bioinformatics/btz276.

Oakes C. C., Salle S. L., Robaire B., Trasler J. M. (2014): Evaluation of a Quantitative DNA Methylation Analysis Technique using Methylation-Sensitive/Dependent Restriction Enzymes and Real-Time PCR. Epigenetics 1(3): 146-152, doi:10.4161/epi.1.3.3392.

Okamoto A. (2014): DNA-Osmium Complexes: Recent Developments in the Operative Chemical Analysis of DNA Epigenetic Modifications. ChemMedChem Reviews 9(9): 1958-1965, doi:10.1002/cmdc.201402114.

Olova N., Krueger F., Andrews S., Oxley D., Berrens R. V., Branco M. R., REIK W. (2018): Comparison of whole-genome bisulfite sequencing library preparation strategies identifies sources of biases affecting DNA methylation data. Genome Biology 19(1), doi:10.1186/s13059-018-1408-2.

Orjuela S., Machlab D., Menigatti M., Marra G., Robinson M. D. (2020): DAMEfinder: a method to detect differential allele-specific methylation. Epigenetics & Chromatin 13(1): 25, doi:10.1186/s13072-020-00346-8.

Peinado M. A., Malkhosyan S., Velazquez A., Perucho M. (1992): Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. Proceedings of the National Academy of Sciences 89(21): 10065-10069, doi:10.1073/pnas.89.21.10065.

Popovic G., Kirby N. C., Dement T. C., Peterson K. M., Daub C. E., Belcher H. A., Guthold M., Offenbacher A. R., Hudson N. E. (2022): Development of Transient Recombinant Expression and Affinity Chromatography Systems for Human Fibrinogen. International Journal of Molecular Sciences 23(3): 1054, doi:10.3390/ijms23031054.

Porro D., Gasser B., Fossati T., Maurer M., Branduardi P., Sauer M., Mattanovich D. (2011): Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. Applied Microbiology and Biotechnology 89(4): 939-948, doi:10.1007/s00253-010-3019-z.

Rand A. C., Jain M., Eizenga J. M., Musselman-Brown A., Olsen H. E., Akeson M., Paten B. (2017): Mapping DNA methylation with high-throughput nanopore sequencing. Nature Methods 14(4): 411-413, doi:10.1038/nmeth.4189.

Rasmussen K. D., Helin K. (2016): Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. Genes & Development 30(7): 733-750, doi:10.1101/gad.276568.115.

Ross J. P., Shaw J. M., Molloy P. L. (2014): Identification of differentially methylated regions using streptavidin bisulfite ligand methylation enrichment (SuBLiME), a new method to enrich for methylated DNA prior to deep bisulfite genomic sequencing. Epigenetics 8(1): 113-127, doi:10.4161/epi.23330.

Rush L. J., Plass C. (2002): Restriction landmark genomic scanning for DNA methylation in cancer: past, present, and future applications. Analytical Biochemistry 307(2):191-201, doi:10.1016/S0003-2697(02)00033-7.

Růčková E., Müller P., Vojtěšek B. (2014): Protein Expression and Purification. Klinická onkologie 27: S92-S98, doi:10.14735/amko20141S92.

Ryan B. J., Henehan G. T. (2013): Overview of Approaches to Preventing and Avoiding Proteolysis During Expression and Purification of Proteins. Current Protocols in Protein Science 71(1), doi:10.1002/0471140864.ps0525s71.

Ryan B. J., Henehan G. T. (2017): Avoiding Proteolysis During Protein Purification. In: Walls D., Loughran S. T. (ed.): Protein Chromatography, s. 53-69, Springer New York, New York, doi:10.1007/978-1-4939-6412-3_4.

Sakekar A. A., Gaikwad S. R., Punekar N. S. (2021): Protein expression and secretion by filamentous fungi. Journal of Biosciences 46(1):5, doi:10.1007/s12038-020-00120-8.

Sanchez S., Demain A. (2012): Special issue on the production of recombinant proteins. Biotechnology Advances 30(5): 1100-1101, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.12.004.

Schuster M., Wasserbauer E., Neubauer A., Jungbauer A. (2000): High speed immuno-affinity chromatography on supports with gigapores and porous glass. Bioseparation 9(5): 259-268, doi:10.1023/A:1011130821804.

Sethi L., Kumari K., Dey N. (2021): Engineering of Plants for Efficient Production of Therapeutics. Molecular Biotechnology 63(12): 1125-1137, doi:10.1007/s12033-021-00381-0.

Serre D., Lee B. H., Ting A.H. (2010): MBD-isolated Genome Sequencing provides a high-throughput and comprehensive survey of DNA methylation in the human genome. Nucleic Acids Research 38(2): 391-399, doi:10.1093/nar/gkp992.

Siejka-Zielińska P., Cheng J., Jackson F., Liu Y., Soonawalla Z., Reddy S., Silva M., Puta L., McCain M. V., Culver E. L., Bekkali N., Schuster-Böckler B., Palamara P. F., Mann D., Reeves H., Barnes E., Sivakumar S., Song C. X. (2021): Cell-free DNA TAPS provides multimodal information for early cancer detection. Science Advances 7(36), doi:10.1126/sciadv.abh0534.

Simpson J. T., Workman R. E., Zuzarte P. C., David M., Dursi L. J., Timp W. (2017): Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing. Nature Methods 14 (4): 407–410, doi:10.1038/nmeth.4184.

Skvortsova K., Iovino N., Bogdanović O. (2018): Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. Nature Reviews Molecular Cell Biology 19(12): 774-790, doi:10.1038/s41580-018-0074-2.

Smiraglia D. J., Rkazhiyur-Mannar R., Oakes C. C., Wu. Y. Z., Liang P., Ansari T., Su J., Rush L. J., Smith L. T., Yu Li, Liu C., Dai Z., Chen S. S., Wang S. H., Costello J., Ioshikhes I., Dawson D. W., Hong J. S., Teitell M. A., Szafranek A., Camoriano M., Song F., Elliott R., Held W., Trasler J. M., Plass C., Wenger R. (2007): Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) spot identification by second

generation virtual RLGS in multiple genomes with multiple enzyme combinations. BMC Genomics 8(1), doi:10.1186/1471-2164-8-446.

Solary, E., Bernard, O.A., Tefferi, A., Fuks, F., Vainchenker, W. (2014): The Ten-Eleven translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. Leukemia 28: 485–496, doi:10.1038/leu.2013.337.

Spruijt C. G., Gnerlich F., Smits A. H., Pfaffeneder T, Jansen P. W. T. C., Bauer C., Munzel M., Wagner M., Muller M., Khan F., Eberl H. C., Mensinga A., Brinkman A. B., Lephikov K., Muller U., Walter, J., Boelens R., van Ingen H., Leonhardt H., Carell T., Vermeulen M. (2013): Dynamic Readers for 5-(Hydroxy)Methylcytosine and Its Oxidized Derivatives. *Cell* 152(5):1146-1159, doi:10.1016/j.cell.2013.02.004.

Stoiber M., Quick J., Egan R., Lee J. E., Celniker S., Neely, R. K., Loman N., Pennacchio L. A., Brown J. (2017): *De novo* Identification of DNA Modifications Enabled by Genome-Guided Nanopore Signal Processing. BioRxiv, doi:10.1101/094672.

Sun Z., Vaisvila R., Hussong L. M., Yan B., Baum C., Saleh L., Samaranayake M., Guan S., Dai N., Corrêa I. R., Pradhan S., Davis T. B., Evans T. C., EttwillerL. M. (2021): Nondestructive enzymatic deamination enables single-molecule long-read amplicon sequencing for the determination of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution. Genome Research 31(2): 291-300, doi:10.1101/gr.265306.120.

Suzuki M., Greally J. M. (2010): DNA methylation profiling using HpaII tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR (HELP). Methods 52(3): 218-222, doi:10.1016/j.ymeth.2010.04.013.

Tanaka K., Okamoto A. (2007): Degradation of DNA by bisulfite treatment. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 17(7): 1912-1915, doi:10.1016/j.bmcl.2007.01.040.

Tanaka K., Tainaka K., Kamei T., Okamoto A. (2007): Direct Labeling of 5-Methylcytosine and Its Applications. Journal of the American Chemical Society 129(17): 5612-5620, doi:10.1021/ja068660c.
Tang W. W. C., Dietmann S., Irie N., Leitch H. G., Floros V. I., Bradshaw C. R., Hackett J. A., Chinnery P. F., Surani M. A. (2015): A Unique Gene Regulatory Network Resets the Human Germline Epigenome for Development 161(6): 1453-1467, doi:10.1016/j.cell.2015.04.053.

Thomas P., Smart T. G. (2005): HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. Journal of Pharmacological and Toxicological Mmethods 51(3): 187-200, doi:10.1016/j.vascn.2004.08.014.

Trimarchi M. P., Murphy M., Frankhouser D., Rodriguez B. A. T., Curfman J., Marcucci G., Yan P., Bundschuh R. (2012): Enrichment-based DNA methylation analysis using next-generation sequencing: sample exclusion, estimating changes in global methylation, and the contribution of replicate lanes. BMC Genomics 13(S8), doi:10.1186/1471-2164-13-S8-S6.

Vaisvila R., Ponnaluri V. K. C., Sun Z., Langhorst B. W., Saleh L., Guan S., Dai N., Campbell M. A., Sexton B., Marks K., Samaranayake M., Samuelson J. C., Church H. E., Tamanaha E., Corrêa I. R., Pradhan S., Dimalanta E. T., Evans T. C., Williams L., Davis T. B. (2019(): Enzymatic methyl sequencing detects DNA methylation at single-base resolution from picograms of DNA. Genome Research 31(7): 1280-1289, doi:10.1101/gr.266551.120.

Van Dijk E. L., Jaszczyszyn Y., Naquin D., Thermes C. (2018): The Third Revolution in Sequencing Technology. Trends in Genetics 34(9): 666-681, doi:10.1016/j.tig.2018.05.008.

Verma R., Boleti E., George A. J. T. (1998): Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. Journal of Immunological Methods 216(1-2): 165, doi:10.1016/S0022-1759(98)00077-5.

Vial-Pradel S., Hasegawa Y., Nakagawa A., Miyaki S., Machida Y., Kojima S., Machida C. Takahashi H. (2019): SIMON: Simple methods for analyzing DNA methylation by targeted bisulfite next-generation sequencing. Plant Biotechnology 36(4): 213-222, doi:10.5511/plantbiotechnology.19.0822a.

Wang Q., Zhong C., XIAO H. (2020): Genetic Engineering of Filamentous Fungi for Efficient Protein Expression and Secretion. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 8:293, doi:10.3389/fbioe.2020.00293.

Whitfield C. J., Banks A. M., Dura G., Love J., Fieldsend J. E., Goodchild S. A., FULTON D. A., Howard T. P. (2020): Cell-free protein synthesis in hydrogel materials. Chemical Communications 56(52): 7108-7111, doi:10.1039/D0CC02582H.

Wingfield P. T. (2015): Overview of the Purification of Recombinant Proteins. Current Protocols in Protein Science 80(1): 6.1.1-6.1.35, doi:10.1002/0471140864.ps0601s80.

Wojdacz T. K., Dobrovic A. (2007): Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. Nucleic Acids Research 35(6): E41, doi:10.1093/nar/gkm013.

Xiong Z., Laird P. W. (1997): COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. Nucleic Acids Research 25(12): 2532-2534, doi:10.1093/nar/25.12.2532.

Yamaguchi, S., Shen, L., Liu, Y., Sendler, D., Zhang, Y. (2013): Role of Tet1 in erasure of genomic imprinting. Nature 504: 460–464, doi: 10.1038/nature12805.

Young C. L., Britton Z. T., Robinson A. S. (2021): Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. Biotechnology Journal 7(5): 620-634, doi:10.1002/biot.201100155.

Yu M., Han D., Hon G. C., He C. (2018): Tet-Assisted Bisulfite Sequencing (TAB-seq). In: Tos, J. (ed.): DNA Methylation Protocols, s. 645-663, Springer New York, New York, doi:10.1007/978-1-4939-7481-8_33.

Yuan J., Xu W. W, Jiang S., Yu H., Poon H. F. (2018): The Scattered Twelve Tribes of HEK293. Biomedical and Pharmacology Journal 11(2): 621-623, doi:10.13005/bpj/1414.

Yue K., Zhu Y., Kai L. (2019): Cell-Free Protein Synthesis: Chassis toward the Minimal Cell. Cells 8(4): 315, doi:10.3390/cells8040315.

Zhang J., Li J., Saucier J. B., Feng Y., Jiang Y., Sinson J., McCombs A. K., SchmittE. S., Peacock S., Chen S., Dai H., Ge X., Wang G., Shaw C. A., Mei H., Breman A., Xia F., Yang Y., Purgason A., Pourpak A., Chen Z., Wang X., Wang Y., Kulkarni S., Choy K. W., Wapner R. J., Van den Veyver I. B. Beaudet A., Parmar S., Wong L. J., Eng C. M. (2019): Non-invasive prenatal sequencing for multiple Mendelian monogenic disorders using circulating cell-free fetal DNA. Nature Medicine 25(3): 439-447, doi:10.1038/s41591-018-0334-x.

Zhao L. Y., SONG J., Liu Y., Song C. X., Yi C. (2020): Mapping the epigenetic modifications of DNA and RNA. Protein & Cell 11(11): 792-808, doi:10.1007/s13238-020-00733-7.

Zilberman D., Henikoff S. (2007): Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. Development 134(22): 3959-3965, doi:10.1242/dev.001131.