

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2021

Margaréta Volníková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Príprava rekombinantných proteínov OspA
rodu *Borrelia* (*B. burgdorferi*, *B. garinii*,
B. afzelii)**

Bakalářská práce

Margaréta Volníková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: Mgr. Milada Stuchlová Horynová, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 20¹⁹20/20²⁰21

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Margaréta VOLNÍKOVÁ
Osobní číslo: R18664
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Příprava rekombinantných proteínů OspA rodu *Borrelia* (*B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. afzelii*)
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Vypracovanie rešerše na tému bakalárskej práce
2. Molekulárne genetické metódy
3. Príprava rekombinantných proteínov
4. Vypracovanie bakalárskej práce a multimedialnej prezentácie k obhajobe

Rozsah pracovnej zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Jazyk zpracování: Slovenština

Seznam doporučené literatury:

Koide S., Yang X., Huang X., Dunn J. J., Luft B. J. (2005): Structure-based Design of a Second-generation Lyme Disease Vaccine Based on a C-terminal Fragment of *Borrelia burgdorferi* OspA. *Journal of Molecular Biology* 350: 290-299.

Křupka M., Raška M., Beláková J., Horynová M., Novotný R., Weigl E. (2007): Biological Aspects of Lyme Disease Spirochetes: Unique Bacteria of the *Borrelia burgdorferi* Species Group. *Biomedical Papers* 151 (2): 175-186.

Křupka M., Zachová K., Weigl E., Raška M. (2011): Prevention of Lyme Disease: Promising Research or Sisyphean Task? *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 59: 261-275

Křupka M., Rubešová A., Holý O. (2019): Existuje chronická lymeská borelióza? *Alergie* 1 (4): 253-258


Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Milada Stuchlová Horynová, Ph.D.

Ústav imunologie

Datum zadání bakalářské práce: 2. prosince 2020
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

L.S.


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUČI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice
tel.: +420 585 634 901
-2-

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora: Margaréta Volníková

Názov práce: Príprava rekombinantných proteínov OspA rodu *Borrelia* (*B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. afzelii*)

Typ práce: Bakalárska práca

Pracovisko: Katedra buněčné biologie a genetiky, PŘF UP v Olomouci

Vedúci práce: Mgr. Milada Stuchlová Horynová, Ph.D. (Ústav imunologie, LF UP v Olomouci)

Rok obhajoby práce: 2021

Kľúčové slová: *Borrelia burgdorferi*, lymeská borelióza, OspA, molekulárne klonovanie, rekombinantné proteíny

Abstrakt:

Lymeská borelióza je najrozšírenejším ochorením prenášaným zvieracími vektormi v Severnej Amerike, Európe a Ázii. Pôvodcom je druhová skupina *Borrelia burgdorferi sensu lato*, zahŕňajúca niekoľko druhov, ktorých geografické rozšírenie je odlišné. Spôsobuje širokú škálu komplikácií a postihuje v tele viaceré systémy. Vedomosti ohľadom patogenézy, diagnostiky a liečby tohto ochorenia sa v poslednom čase výrazne prehĺbili, problematika vakcinácie však zostáva stále nedoriešená. Imunogénom vhodným pre vakcináciu sa ukázal byť OspA, ktorý sa nachádza vo vonkajšej membráne týchto baktérií. Problém odlišných sérotypov je v súčasnosti riešený tvorbou rekombinantných proteínov pozostávajúcich z častí OspA viacerých klinicky relevantných druhov borélií. Experimentálna časť tejto bakalárskej práce je zameraná na prípravu rekombinantného proteínu, konštruktu zloženého z troch fragmentov OspA rôznych druhov. Tento proteín bol exprimovaný v baktériách *Escherichia coli*, z ktorých bol izolovaný a purifikovaný. V časti tohto konštruktu dochádzalo k štiepeniu za vzniku monoméru, ktorý obsahoval časť s afinitnou značkou a bol vo vzorkách detegovaný spolu s pôvodným trimérom.

Počet strán: 62

Počet príloh: 0

Jazyk: Slovenský

Bibliographic identification

Author's first name and surname: Margaréta Volníková

Title: Preparation of the recombinant proteins OspA of the genus *Borrelia* (*B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. afzelii*)

Type of thesis: Bachelor thesis

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

Supervisor: Mgr. Milada Stuchlová Horynová, Ph.D. (Department of Immunology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University in Olomouc)

The year of presentation: 2021

Abstract:

Lyme disease is the most common disease transmitted by animal vectors in North America, Europe and Asia. It is caused by the species group *Borrelia burgdorferi sensu lato*, which includes several species whose geographical distribution is different. It causes a wide range of complications and affects several systems in the body. Knowledge about the pathogenesis, diagnosis and treatment of this disease has significantly deepened recently, but the issue of vaccination remains unsolved. An immunogen suitable for vaccination has been shown to be OspA, located in the outer membrane of these bacteria. The problem of different serotypes is currently being solved by the preparation of recombinant proteins composed of OspA fragments of several clinically relevant *Borrelia* species. The experimental part of this bachelor thesis is focused on the preparation of the recombinant protein, the construct composed of three OspA fragments of different *Borrelia* species. This protein was expressed in *Escherichia coli* and then was isolated and purified. Part of the protein was cleaved and formed a monomer which contained an affinity tag and was detected along with the original trimer.

Keywords: *Borrelia burgdorferi*, Lyme Disease, OspA, molecular cloning, recombinant proteins

Number of pages: 62

Number of appendices: 0

Language: Slovak

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením Mgr. Milady Stuchlovej Horynovej, Ph.D. s použitím uvedených literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa

.....

Margaréta Volníková

Rada by som sa poďakovala predovšetkým Mgr. Milade Stuchlovej Horynovej, Ph.D. za odborné rady pri práci v laboratóriu aj pri spracovávaní bakalárskej práce, za jej trpezlivosť, ochotu a čas, ktorý mi venovala. Taktiež by som sa chcela poďakovať ostatným pracovníkom Ústavu imunológie LF UP v Olomouci za pomoc a cenné rady.

OBSAH

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | ÚVOD..... | 1 |
| 2 | CIELE PRÁCE..... | 2 |
| 3 | LITERÁRNY PREHLAD..... | 3 |
| 3.1 | LYMSKÁ BORELIÓZA..... | 3 |
| 3.1.1 | Pôvodca lymskej boreliózy..... | 3 |
| 3.1.2 | Klinické príznaky..... | 4 |
| 3.1.3 | Prevenca, diagnostika a liečba..... | 5 |
| 3.2 | MIKROBIOLÓGIA RODU <i>BORRELLA</i> | 6 |
| 3.3 | MEMBRÁNOVÉ PROTEÍNY..... | 6 |
| 3.3.1 | OspA proteín..... | 8 |
| 3.4 | VAKCÍNY PROTI LYMSKEJ BORELIÓZE..... | 8 |
| 3.5 | MOLEKULÁRNE GENETICKÉ METÓDY..... | 10 |
| 3.5.1 | Restrikčné endonukleázy..... | 10 |
| 3.5.2 | Ligácia inzertu a vektora..... | 11 |
| 3.5.3 | Vektory využívané pri klonovaní..... | 12 |
| 3.5.4 | Expresné systémy..... | 13 |
| 3.5.5 | Izolácia a purifikácia rekombinantných proteínov..... | 15 |
| 3.5.6 | Alternatívne postupy pri klonovaní..... | 16 |
| 4 | MATERIÁL A METÓDY..... | 18 |
| 4.1 | BIOLOGICKÝ MATERIÁL..... | 18 |
| 4.2 | POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, SÚPRAVY A ROZTOKY..... | 18 |
| 4.3 | ZOZNAM POUŽITÝCH PRÍSTROJOV A ZARIADENÍ..... | 22 |
| 4.4 | POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNE A VYHODNOCOVACIE POSTUPY..... | 23 |
| 4.4.1 | Príprava linearizovaného klonovacieho vektora..... | 23 |
| 4.4.2 | Separácia linearizovaného klonovacieho vektora elektroforézou v agarózovom géli..... | 24 |
| 4.4.3 | Izolácia DNA z agarózového gélu..... | 26 |
| 4.4.4 | Klonovanie pomocou Seamless Cloning and Assembly Kit..... | 27 |
| 4.4.5 | Transformácia K3-pET28 do buniek <i>E. coli</i> DH5 α | 29 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.4.6 | Izolácia plazmidovej DNA z <i>E. coli</i> DH5 α | 30 |
| 4.4.7 | Restrikčná analýza plazmidu K3-pET28 v DH5 α bunkách <i>E. coli</i> | 31 |
| 4.4.8 | Elektroforetická separácia jednotlivých fragmentov po restrikcii v agarózovom géli | 34 |
| 4.4.9 | Transformácia plazmidu do buniek <i>E. coli</i> BL21 (DE3), izolácia DNA a restrikčná analýza..... | 34 |
| 4.4.10 | Produkcia rekombinantného proteínu K3 pomocou buniek <i>E. coli</i> kmeň BL21 (DE3) | 35 |
| 4.4.11 | SDS-PAGE elektroforéza | 36 |
| 4.4.12 | Western-blot..... | 38 |
| 4.4.13 | Kultivácia buniek pred izoláciou rekombinantného proteínu K3 | 39 |
| 4.4.14 | Izolácia rekombinantného proteínu K3 za natívnych podmienok | 40 |
| 5 | VÝSLEDKY | 42 |
| 6 | DISKUSIA..... | 51 |
| 7 | ZÁVER | 53 |
| 8 | LITERATÚRA | 54 |

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

| | |
|--------------------|---|
| APS | 10% persíran amónny |
| ATP | adenozíntrifosfát |
| BAC | bakteriálny umelý chromozóm (Bacterial Artificial Chromosome) |
| BptA | Borrelial persistence in ticks A |
| BSA | hovädzí sérový albumín (Bovine Serum Albumin) |
| ddH ₂ O | destilovaná deionizovaná voda |
| DMSO | dimetylsulfoxid |
| Dpb | proteín viažuci dekorín (Decorin Binding Protein) |
| EDTA | kyselina etyléndiamíntetraoctová |
| ELFO | elektroforetická separácia |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| Fla | flagelín |
| GST | glutatión-S-transferáza |
| His | histidín |
| IMAC | afinitná chromatografia na imobilizovaných iónoch kovu |
| IPTG | izopropyl- β -1-tiogalaktopyranozid |
| K | kanamycín |
| K3 | konštrukt 3 |
| LB | Luria-Bertani (živné médium) |
| Lmp1 | Surface-located membrane protein 1 |
| MBP | proteín viažuci maltózu (Maltose Binding Protein) |
| MCS | viacnásobné klonovacie miesto (Multiple Cloning Site) |
| Ni-NTA | nikel-nitrilotrioctová kyselina |
| OD ₆₀₀ | optická hustota pri vlnovej dĺžke 600 nm |
| Osp | Outer surface protein |
| PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovom géli |
| PBS | fosfátový pufer |
| PCR | polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction) |
| PVDF | polyvinylidénfluorid |
| SBP | peptid viažuci streptavidín (Streptavidin Binding Peptide) |
| SDS | dodecylsírany sodný |

| | |
|--------|--|
| ssDNA | jednovláknová deoxyribonukleová kyselina |
| T-DNA | Transforming DNA |
| TAE | Tris-acetát-EDTA |
| TEMED | N, N, N', N'-tetrametylétyldiamín |
| TRIS | tris(hydroxymetyl)aminometán |
| TROSPA | Receptory pre OspA (Thick Receptor for OspA) |
| S.O.C. | Super Optimal Broth with Catabolite repression (médium používané pri transformácii kompetentných buniek) |
| VlsE | Vmp-like sequence protein Expressed (Variable Major Protein E) |
| YAC | kvasinkový umelý chromozóm (Yeast Artificial Chromosome) |

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. č. 1: Príklad restričných endonukleáz štiepiacich za vzniku tupých a lepivých koncov

Obr. č. 2: Plazmid pET-28a(+)

Obr. č. 3: Separačný hrebienok použitý pri elektroforetickej separácii linearizovaného plazmidu pET-28b(+)

Obr. č. 4: Marker relatívnej molekulovej hmotnosti Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder

Obr. č. 5: Schématické zobrazenie inzertu K3

Obr. č. 6: Vzorec a výpočet hmotnosti inzertu potrebného pre reakciu

Obr. č. 7: Schéma postupu pri tvorbe rekombinantnej DNA molekuly K3-pET28

Obr. č. 8: Schéma restričného štiepenia plazmidu K3-pET28

Obr. č. 9: Marker relatívnej molekulovej hmotnosti PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa

Obr. č. 10: Elektroforetická separácia lineárneho fragmentu plazmidovej DNA vektora pET-28b(+), po štiepení restričnými endonukleázami *NcoI* a *BspI*

Obr. č. 11: Restričná analýza plazmidu K3-pET28 izolovaného z *E. coli*, kmeň DH5 α za použitia zmesi enzýmov *XbaI* + *ApaI*

Obr. č. 12: Restričná analýza plazmidu K3-pET28 izolovaného z *E. coli*, kmeň DH5 α za použitia enzýmov *EcoRV*, *PvuI* a *XbaI*

Obr. č. 13: Restričná analýza plazmidu 5-K3-pET28 izolovaného z *E. coli*, kmeň BL21 za použitia zmesi enzýmov *XbaI* + *ApaI*

Obr. č. 14: Restričná analýza plazmidu K3-5-pET28 izolovaného z *E. coli*, kmeň BL21 za použitia enzýmov *EcoRV*, *PvuI* a *XbaI*

Obr. č. 15: SDS elektroforetická separácia bunkového lyzátu po indukcií expresie proteínov

Obr. č. 16: Western blot po SDS elektroforetickej separácii bunkového lyzátu

Obr. č. 17: SDS elektroforetická separácia jednotlivých frakcií získaných Ni-NTA agarózovou chromatografiou

Obr. č. 18: Western blot po SDS elektroforetickej separácii jednotlivých frakcií z Ni-NTA agarózovej chromatografie

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka č. 1: Hlavné patogénne druhy *B. burgdorferi* s. l., ich výskyt a prenos

Tabuľka č. 2: Restriktčné endonukleázy použité na linearizáciu vektora

Tabuľka č. 3: Zložky reakcie pre prípravu linearizovaného klonovacieho vektora

Tabuľka č. 4: Restriktčné endonukleázy použité na restriktčnú analýzu K3-pET28

Tabuľka č. 5: Príprava reakčnej zmesi pre restriktčnú analýzu K3-pET28 pomocou enzýmov *EcoRV*, *PvuI* a *XbaI*

Tabuľka č. 6: Príprava reakčnej zmesi pre restriktčnú analýzu K3-pET28 pomocou enzýmov *XbaI* + *ApaI*

Tabuľka č. 7: Príprava deliaceho a zaostrovaného gélu na SDS-PAGE

Tabuľka č. 8: Očakávané fragmenty DNA po restriktčnej analýze plazmidu K3-pET28

Tabuľka č. 9: Hodnoty OD₆₀₀ namerané pri optimalizácii postupu kultivácie buniek *E. coli* BL21 (DE3) pre produkciu rekombinantného proteínu K3

1 ÚVOD

Lymfská borelióza je najčastejšie sa vyskytujúcim ochorením prenášaným zvieracími vektormi, spôsobujúcim širokú škálu komplikácií. Vyskytuje sa predovšetkým v Severnej Amerike, Európe a Ázii a spôsobuje ju druhová skupina spirochét *Borrelia burgdorferi sensu lato*, spomedzi ktorej sú najvýznamnejšími patogénnymi druhmi *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii*. Ich zastúpenie sa líši vzhľadom ku geografickému rozšíreniu.

V súčasnosti nie je v rámci humánnej medicíny dostupná vakcína, ktorá by zabránila tomuto ochoreniu. Nakoľko významným imunogénom sú OspA lipoproteíny v membráne týchto spirochét, rekombinantné vakcíny pozostávajúce z častí týchto proteínov by mohli byť vhodnou voľbou pre tvorbu imunitnej odpovede a vakcináciu. Príprava týchto rekombinantných proteínov je založená na technikách klonovania a expresie proteínov pomocou plazmidových vektorov a kompetentných kmeňov baktérií *Escherichia coli*.

2 CIELE PRÁCE

1. Vypracovanie rešerše na tému bakalárskej práce
2. Molekulárne genetické metódy
3. Príprava rekombinantných proteínov
4. Vypracovanie bakalárskej práce a multimedialnej prezentácie k obhajobe

3 LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 Lymská borelióza

Lymská borelióza je ochorenie postihujúce viaceré systémy, prenášané predovšetkým kliešťami rodu *Ixodes*. Do povedomia sa dostala, keď Steere *et al.* (1977) študovali pacientov s výskytom artritídy v štáte Connecticut v oblasti okolo mesta Lyme. V súčasnosti je najčastejším ochorením prenášaným zvieracími vektormi a rozšírená je v miernom pásme, najmä v USA, Európe a v Ázii. Spôsobujú ju spirochéty rodu *Borrelia* (druhovú skupinu *Borrelia burgdorferi sensu lato*), pričom výskyt jednotlivých druhov týchto spirochét, rovnako ako aj výskyt druhov kliešťov, ktorými je prenášaná, sa líšia geografickým rozmiestnením (Tabuľka č. 1) (Steere *et al.*, 2004).

Tabuľka č. 1: Hlavné patogénne druhy *B. burgdorferi s. l.*, ich výskyt a prenos (upravené podľa Steere *et al.*, 2004)

| Druh | Vektor | Výskyt |
|-----------------------------------|---------------------------|---|
| <i>Borrelia burgdorferi s. s.</i> | <i>Ixodes scapularis</i> | Severovýchod a sever strednej časti USA |
| | <i>Ixodes pacificus</i> | Západ USA |
| | <i>Ixodes ricinus</i> | Európa |
| <i>Borrelia garinii</i> | <i>Ixodes ricinus</i> | Európa |
| | <i>Ixodes persulcatus</i> | Ázia |
| <i>Borrelia afzelii</i> | <i>Ixodes ricinus</i> | Európa |
| | <i>Ixodes persulcatus</i> | Ázia |

3.1.1 Pôvodca lymskej boreliózy

Spirochéty rodu *Borrelia* izolované z kliešťa *Ixodes dammini* (*I. scapularis*) ako prví určili za pôvodcu tohto ochorenia Burgdorfer *et al.* (1982). Johnson *et al.* (1984) popisali tieto spirochéty a označili ich ako nový druh patriaci do rodu *Borrelia*. V súčasnosti je známe, že lymskú boreliózu spôsobuje druhová skupina spirochét *Borrelia burgdorferi sensu lato*, ktorá je tvorená viacerými druhmi. Najrozšírenejším

druhom z nich spôsobujúcim lymskú boreliózu v Severnej Amerike je *Borrelia burgdorferi sensu stricto* a pôvodcom tohto ochorenia v Ázii a Európe sú predovšetkým *Borrelia afzelii* a *Borrelia garinii* (Rudenko *et al.*, 2011). Dlho sa predpokladalo, že v USA je lymská borelióza u človeka spôsobená iba *B. burgdorferi sensu stricto*, avšak neskôr bol dokázaný aj výskyt patogénnej *B. mayonii* v západnej časti USA (Pritt *et al.*, 2016).

Vrátane spomenutých, je možné tento komplex dnes známych druhov rozdeliť na dve významné skupiny. Tie, ktoré sú patogénne pre človeka (*B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. kurtenbachii*, *B. lusitaniae*, *B. mayonii*, *B. spielmanii* a *B. valaisiana*) a tie, u ktorých nebola zatiaľ patogenita pre človeka potvrdená (*B. americana*, *B. andersonii*, *B. californiensis*, *B. carolinensis*, *B. chilensis*, *B. finlandensis*, *B. japonica*, *B. lanei*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica* a *B. yangtzensis*) (Křupka *et al.*, 2007; Rudenko *et al.*, 2011).

3.1.2 Klinické príznaky

Lymská borelióza sa prejavuje veľkým množstvom symptómov. Jej priebeh býva rozdelený do troch štádií. V prvej fáze (skorá lokalizovaná infekcia) sa v mieste uhryznutia kliešťom objavuje kožná lézia, erythema migrans. Vyskytuje sa v 70–80 % prípadov nákazy lymskou boreliózou. Vzniká po uplynutí inkubačnej doby 3–30 dní a v priebehu času dochádza k jej rozširovaniu, pričom jej priemer obvykle býva okolo 15 cm (Shapiro *et Gerber*, 2000; Steere *et Sikand*, 2003). Druhá fáza (skorá diseminovaná) sa objavuje týždne až mesiace od uhryznutia kliešťom, pričom dochádza k rozšíreniu infekcie. Objavujú sa sekundárne kožné lézie, ktoré spolu s erythemou migrans zvyknú ustúpiť do 3–4 týždňov. Počas tejto fázy pretrvávajú neurologické, srdcové a reumatologické problémy. Tretia fáza ochorenia (neskorá diseminovaná) nastupuje po mesiacoch až rokoch a vyskytujú sa kožné abnormality ako acrodermatitis chronica atrophicans, môžu sa vyskytovať opuchy kĺbov, únava, bolesti a rôzne neurologické príznaky (Parola *et Raoult*, 2001).

U niektorých pacientov aj po prekonaní antibiotickej liečby neustupujú problémy ako únava, kognitívne deficity, bolesti svalov, kĺbov, hlavy alebo psychické problémy. V anglickej literatúre je takýto stav nazývaný post-treatment Lyme disease syndrom, čo je možné preložiť ako postboreliový syndróm. Často je tento stav nazývaný chronická

lymská borelióza, čo však nie je presný názov, nakoľko nebola dokázaná perzistencia infekčných spirochét. (Křupka *et al.* 2019).

Infekcia najčastejšími druhmi, *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* a *B. afzelii* je spájaná s odlišnými klinickými príznakmi. Erythema migrans sa objavuje pri infekcii všetkými zo spomenutých druhov, neurologické prejavy bývajú spojené s infekciou *B. garinii*, vyskytujú sa častejšie v Európe a môžu zahŕňať napríklad meningitídu, encefalopatiu, bolesti hlavy, postihnutie hlavových nervov, ktoré môžu viesť k paralýze tváre. Vznik acrodermatitis chronica atrophicans býva najčastejšie spájaný s *B. afzelii* (van Dam *et al.*, 1993; Brouqui *et al.*, 2004).

3.1.3 Prevencia, diagnostika a liečba

Aktuálna možná prevencia spočíva v minimalizovaní kontaktu s kliešťom, napríklad vyhýbaním sa rizikovým oblastiam, nosením ochranného oblečenia, používaním repelentov, včasnej kontroly a prípadnom odstránení kliešťa. K prenosu borélií z kliešťa do tela hostiteľa nedochádza okamžite, ale až po určitom čase, a tak skoré odstránenie kliešťa aj po jeho prisatí môže infekciu zabrániť (Křupka *et al.*, 2014).

Pri diagnostike lymskej boreliózy je potrebné brať do úvahy klinické príznaky (erythema migrans), ako aj laboratórne výsledky. Dostupné laboratórne metódy používané pre diagnostiku sa delia na priame a nepriame. Keďže samotná kultivácia spirochét je zložitá a výsledky by neboli presné, preferujú sa nepriame sérologické metódy, stanovenie na základe protilátok metódou ELISA a potvrdenie výsledku presnejším western blotom. Menej často používanou metódou je priamy dôkaz DNA borélií pomocou PCR (Křupka *et al.*, 2014; Marques *et al.*, 2015).

Borélie sú citlivé voči širokému spektru antibiotík, pri liečbe sa využívajú predovšetkým betalaktámové a tetracyklínové antibiotika. Príkladom používaných antibiotík môžu byť doxycyklín, amoxicilín, pri neznášanlivosti, alergiách alebo rôznych kontraindikáciách napríklad azitromycín. V niektorých prípadoch, ako neuroborelióza alebo artritída sa odporúča intravenózna aplikácia napríklad ceftriaxonu alebo penicilínu G. Antibiotická liečba by nemala byť kratšia ako 2 týždne v dôsledku dlhej generačnej doby borélií (Křupka *et al.*, 2014).

3.2 Mikrobiológia rodu *Borrelia*

Rod *Borrelia* patrí do kmeňa spirochéty (Spirochetetae). Jedná sa o gramnegatívne mikroaerofilné baktérie. Stavba je podobná ako u ostatných spirochét, bunky sú špirálovitého tvaru, protoplazmatický valec zložený z cytoplazmy, vnútornej membrány a peptidoglykánu je obklopený vonkajšou membránou a z periplazmatického priestoru vychádza 7–11 bičikov z bazálnych diskov na každej strane valca (Johnson *et al.*, 1984; Barbour *et Hayes*, 1986).

V priemere majú baktérie hrúbku 0,2–0,25 μm a dĺžku dosahujú 10–30 μm (Hengge *et al.*, 2003). Pohyb je zabezpečený pomocou bičikov zložených z dvoch hlavných typov flagelínových proteínov, primárne FlaB (41 kDa) a menej zastúpeného FlaA (38 kDa) (Ge *et al.*, 1998). Na rozdiel od iných baktérii, tvar buniek nie je ovplyvnený peptidoglykánom v bunkovej stene, ale interakciou bičikov s periplazmatickým valcom, ktorý obťáčajú. Inaktiváciou génu kódujúceho FlaB došlo k vytvoreniu mutantov tyčinkovitého tvaru, ktoré stratili schopnosť pohybovať sa (Motaleb *et al.*, 2000). Od iných gramnegatívnych baktérii sa líšia predovšetkým vonkajšou membránou, ktorá neobsahuje lipopolysacharidy, ale fosfolipidy a glykolipidy (Steere *et al.* 2016).

Genóm *B. burgdorferi* pozostáva z lineárneho chromozómu dlhého približne 1 Mbp, cirkulárnych a lineárnych plazmidov, ktoré kódujú predovšetkým gény pre expresiu rôznych lipoproteínov, vrátane proteínov vonkajšej membrány. Obsahuje sadu proteínov pre replikáciu, transkripciu, transláciu a energetický metabolizmus, avšak neobsahuje gény pre biosyntetické reakcie. Chýbajú gény pre syntézu aminokyselín, mastných kyselín, enzýmových kofaktorov a nukleotidov. Obsahuje gény kódujúce enzýmy potrebné pre glykolýzu, čo naznačuje, že primárnym zdrojom energie je glukóza (Fraser *et al.*, 1997).

3.3 Membránové proteíny

Vonkajšia membrána baktérii rodu *Borrelia* je tvorená lipidovou dvojvrstvou s veľkým množstvom lipoproteínov (Steere *et al.* 2016). Proteíny vonkajšej membrány borélii majú veľkú úlohu v interakciách medzi hostiteľom a patogénom, sú dôležitým faktorom virulencie a majú význam vo vyhýbaní sa imunitnej odpovedi hostiteľa. Je

možné ich rozdeliť na lipidovo modifikované, ktoré sú lipidovými časťami ukotvené v membráne (napríklad OspA, OspB, OspC, OspD, OspE, OspF, DbpA, DbpB, CspA, VlsE, BptA) a tie, ktoré sú v membráne ukotvené jednou alebo viacerými transmembránovými doménami (napríklad P13, P66, BesC, BamA, Lmp1). Jednotlivé membránové proteíny majú rôzne funkcie, príkladom môže byť úloha OspA, OspB, OspD, BptA v rámci perzistencie v kliešťoch proteínov, OspC v prenose z vektora na hostiteľa, na adhéziu k hostiteľským bunkám slúžia napríklad DbpA a DbpB a na vyhýbanie sa imunitnej odpovedi predovšetkým VlsE (Kenedy *et al.*, 2012).

Počas enzootického cyklu sa *B. burgdorferi* musí prispôbiť rôznym podmienkam prostredia ako tráviaci trakt vektora, hemolymfa alebo krv stavovcov. Využívajú na to odlišnú expresiu membránových proteínov na povrch baktérií, podľa toho, či sa nachádzajú v tele vektorov alebo hostiteľov. V tele kliešťa je exprimovaný predovšetkým OspA a OspB kvôli adhézii k črevnému epitelu. Akonáhle sa do čreva kliešťa dostane krv, dôjde k zníženiu expresie týchto proteínov, vďaka čomu sa uvoľnia z črevného epitelu a prostredníctvom hemolymfy sa dostávajú k slinným žľazám. Súčasne dochádza k indukcii expresie proteínov potrebných na prenos do tela hostiteľa a následnú disemináciu do tkanív (Křupka *et al.*, 2011). V prípade, ak u kliešťa nedochádza ku kŕmeniu, exprimovaný je predovšetkým OspA proteín, v prípade kŕmenia OspC a zároveň dochádza k poklesu množstva OspA na povrchu (Schwan *et al.*, 1995). OspC má význam pri šírení baktérií v tkanivách hostiteľa a podieľa sa na ochrane pred imunitným systémom v začiatkovej fáze infekcie. Počas prechodu do diseminovanej fázy dochádza k poklesu OspC. Zásadnú úlohu v ochrane pred imunitným systémom zohráva VlsE, ktorý obmedzuje pôsobenie imunitnej odpovede vďaka vysokej antigénnej variabilite, ktorá je špecifická pre tento proteín a je daná génovou rekombináciou multidomého VlsE génu. Okrem spomenutých proteínov dochádza v tele hostiteľa k expresii ďalších, ako sú OspE a OspF, ktoré viažu H-faktor zapojený do regulácie aktivácie komplementovej kaskády, čím sú využívané pri unikaní nešpecifickej imunity (Zhang *et al.*, 1997; Křupka *et al.*, 2008). Významnými proteínmi umožňujúcimi adhéziu v cieľovom tkanive sú DpbA, DpbB, ktoré sa viažu na dekorín, a tak sprostredkovávajú adhérenciu k tkanivám (Guo *et al.*, 1995).

3.3.1 OspA proteín

OspA je prvým objaveným proteínom zo skupiny Osp a jeho relatívna molekulová hmotnosť je 31 kDa. Expresia OspA je kódovaná génom v lineárnom plazmide dlhom 49 kb. Exprimovaný je spoločne s génom pre 34 kDa proteín OspB, nakoľko sú lokalizované v jednom operóne (Barbour *et al.*, 1983; Howe *et al.*, 1986; Barbour *et al.*, 1987). K vonkajšej membráne je pripojený lipidovou časťou na N-terminálnom konci, pričom C-terminálny koniec je vystavený častejším interakciám s protilátkami a nachádza sa v jeho oblasti epitop pre T lymfocyty (Bergström *et al.*, 1989; Bockensted *et al.*, 1996). Funkcia OspA spočíva predovšetkým v prichytávaní borélií na stenu čreva u kliešťá prostredníctvom TROSPA receptorov. Jedná sa o glykoproteíny, ktorých väčšie množstvo sa nachádza u kliešťov v štádiu nymfy, ako u dospelých jedincov. Hladina mRNA kódujúcej TROSPA sa v prípade prítomnosti *B. burgdorferi* zvyšuje a pri kĺmení kliešťá sa znižuje, čo naznačuje súvis s cyklom týchto baktérií. K interakciám dochádza aj medzi OspA proteínmi vzájomne, čo môže *B. burgdorferi* uľahčovať prichytávanie na stenu čreva vektora (Pal *et al.*, 2000; Pal *et al.*, 2004). OspA je exprimovaný predovšetkým v tele vektora a v prípade prenosu na hostiteľa dôjde k zníženiu jeho expresie, čo umožní uvoľnenie borélií z tela vektora a vstup do tela hostiteľa (Schwan *et al.*, 1995).

3.4 Vakcíny proti lymfkej borelióze

V humánnej medicíne aktuálne nie je na trhu dostupná vakcína proti lymfkej borelióze. Jediná vakcína, ktorá bola schválená v USA, sa stretla s viacerými problémami. V súčasnosti sa preto k vývoju aktívne pristupuje predovšetkým výskumom zameraným na techniky rekombinantných proteínov. Pre imunizáciu sú zvažované rôzne membránové proteíny borélií, ako OspA, OspB, OspC, alebo DpbA. Komerčne sú dostupné vakcíny vo veterinárnej medicíne. Pre očkovanie psov boli schválené viaceré vakcíny založené na báze inaktivovaných baktérií, podjednotkové vakcíny založené na rekombinantnom OspA alebo OspA purifikovaný z extraktu borélií. Účinné sú však iba voči určitým kmeňom a je potrebné časté preočkovávanie, a preto aj v prípade

veterinárnej medicíny je vývoj vakcín proti tomuto ochoreniu stále dôležitý (Křupka *et al.*, 2011).

3.4.1 OspA a vakcinácia

OspA proteín bol prvým z antigénov *B. burgdorferi*, v prípade ktorého bolo zistené, že je schopný chrániť pred infekciou. Stal sa vhodným kandidátom pre tvorbu vakcín, keď bola u myši zistená tvorba protilátok po ich imunizácii pomocou *E. coli* exprimujúcich rekombinantný OspA proteín a purifikovaným OspA. Tieto protilátky ich následne chránili pred napadnutím rôznymi kmeňmi *B. burgdorferi* (Fikrig *et al.*, 1990).

V humánnej medicíne bola v roku 1998 v USA schválená rekombinantná OspA vakcína (Steere *et al.*, 1998), ktorá bola navrhnutá, aby poskytovala ochranu proti jednému kmeňu *B. burgdorferi*. Vakcína LYMERix od spoločnosti SmithKline Beecham Biologicals (teraz GlaxoSmithKline) bola dostupná na trhu od roku 1999 do roku 2002, kedy bola v dôsledku nízkeho predaja a podozrení zo závažných vedľajších účinkov stiahnutá z trhu (Křupka *et al.*, 2011). Potenciálne vedľajšie účinky, ktoré vyvolali obavy verejnosti, boli predmetom skúmania, avšak súvislosť závažných problémov s vakcináciou nebola dokázaná (Ball *et al.*, 2009; Plotkin, 2011).

Nakoľko lymfská borelióza je spôsobená viacerými sérotypmi *B. burgdorferi s.l.*, ktoré sú rôzne geograficky rozšírené, vývoj vakcín sa zameril na techniky rekombinantných proteínov, ktoré by zabezpečili ochranu voči viacerým z nich, pričom proteín OspA sa ukázal ako vhodný imunogén. Protilátky proti OspA dokážu blokovat' prenos borélií z kliešťov na hostiteľský organizmus viazaním sa na spirochéty v čreve kliešťa (de Silva *et al.*, 1996). Aktuálne postupy tvorby vakcín sa zameriavajú na vytvorenie fragmentu daného antigénu, ktorý by bol účinný voči viacerým sérotypom a zároveň by sa zmenšila jeho veľkosť. Novým prístupom v danej problematike je vytvorenie rekombinantného proteínu, ktorý kóduje C-terminálnu časť OspA, ktorá je dostatočná k vytvoreniu imunitnej odpovedi. Skrátenie fragmentov o zvyšnú časť a odstránenie neúčinných častí tiež môže viesť k zníženiu vedľajších účinkov, a tak k vytvoreniu bezpečnej vakcíny (Koide *et al.*, 2005; Comstedt *et al.*, 2014; Comstedt *et al.*, 2017).

Ďalším prístupom je vakcína založená na OspA antigéne sfúzovanom s ferritínovými časticami. V roku 2020 vedci v Českých Budějoviciach otestovali potenciálnu vakcínu založenú na tomto princípe. Na zvieracích modeloch dokázali

vysokú účinnosť, avšak, stále sú nutné klinické testy pred začatím jej používania (Kamp *et al.*, 2020).

3.5 Molekulárne genetické metódy

Objav štruktúry DNA, jej schopnosti niesť genetickú informáciu a základy centrálnej dogmy molekulárnej biológie viedli k možnosti rozvoja molekulárnych metód a génového inžinierstva. Významným pokrokom bol nástup technológií rekombinantnej DNA spojený s objavom restričných endonukleáz, enzýmov štiepiacich DNA vo vnútri reťazca. V súčasnosti sú pri klonovaní oproti pôvodným metódam využívané rôzne alternatívne postupy, čo dokazuje veľký rozvoj týchto metód. Základné kroky stále zahŕňajú fragmentáciu DNA pomocou restričných endonukleáz, ligáciu inzertu a vektora, prenos do buniek pre namnoženie alebo expresiu, skrining a výber daných klonov (Ashwini *et al.*, 2016).

3.5.1 Restričné endonukleázy

Restriícia DNA bola prvý raz popísaná ako hositeľom kontrolovaná modifikácia bakteriofága λ a objasnila mechanizmus, kedy konkrétny kmeň baktérií *E. coli* mohol byť infikovaný iba bakteriofágom nesúcim DNA produkovanú daným kmeňom, čiže infekcii predchádzal rast fága na danom kmeni baktérií. Infekcia určitého kmeňa fágom získaným z iného bola neúspešná a dochádzalo k štiepeniu fágovej DNA (Arber *et Dussoix*, 1962; Arber *et Linn*, 1969).

V súčasnosti sú známe restričné endonukleázy typu I, II a III, pričom pri klonovaní je pre svoje vlastnosti využívaný typ II. Rozpoznávajú krátke palindromatické sekvencie s dĺžkou obvykle 4–8 bp. V prítomnosti horečnatých iónov špecificky štiepia vlákno DNA v oblasti rozpoznávacieho miesta alebo v jeho blízkosti a pre svoju aktivitu nevyžadujú hydrolýzu ATP. V prípade, že komplementárne vlákna dvojzávitnice DNA sú štiepené v odlišnom mieste, môže dochádzať k vzniku lepivých (kohéznych) koncov s presahmi na 5' alebo 3' konci, a k vzniku tupých koncov, ak je štiepenie symetrické (Obr. č. 1). Restričné endonukleázy typu II sa líšia medzi sebou, a preto sa podľa rôznych kritérií, napríklad podľa rozpoznávacieho miesta, veľkosti alebo spôsobu

pôsobenia, rozdeľujú na niekoľko subtypov, ako sú IIP, IIS, IIF, IIT, IIB, IIG alebo IIM (Pingoud *et Jeltsch*, 2001).



Obr. č. 1: Príklad restriktčných endonukleáz štiepiacich za vzniku tupých a lepivých koncov

3.5.2 Ligácia inzertu a vektora

Restriktčnými endonukleázami je možné linearizovať vektor a vytvoriť konce tak, aby boli vzájomne komplementárne s koncami inzertu a aby ich bolo možné následne spojiť pomocou DNA-ligázy. Jedná sa o enzým, ktorý katalyzuje vznik fosfodiesterovej väzby medzi fosfátovou skupinou na 5' konci a hydroxylovou na 3' konci vlákna DNA. Je teda podmienkou, aby bol 3' koniec fosforylovaný a 5' hydroxylovaný. Prídavok fosfatázy je možné využívať, aby nedochádzalo k opätovnému spojeniu koncov vektora, pokiaľ bol rozštiepený pomocou jednej restriktčnej endonukleázy (Eun, 1996; Lessard, 2013).

Takýmto spôsobom je možné spájať lepivé aj tupé konce, pričom každý z týchto spôsobov má svoje výhody aj nevýhody. Spájanie tupých koncov je flexibilnejšie, nie je nutná komplementarita na koncoch spájaných molekúl DNA, avšak spájanie lepivých koncov je výhodnejšie a efektívnejšie. Enzymaticky je možné vytvoriť z lepivých koncov tupé použitím exonukleáz alebo dosyntetizovaním druhého vlákna v mieste presahu a naopak, z tupých koncov je možné pomocou exonukleáz vytvoriť lepivé. Pri lineárnych PCR produktoch však môže byť problém so štiepením niektorými restriktčnými endonukleázami, ktoré preferujú cirkulárnu DNA pred lineárnou. Využívaná býva vlastnosť *Taq* polymerázy syntetizovať presah adenínových báz na 3' konci dvojvlákna DNA, kedy je následne možné tento fragment zaligovať do vektora s presahom tymidínových báz na 5' konci (Celie *et al.*, 2016; Bertero *et. al.*, 2017).

3.5.3 Vektory využívané pri klonovaní

Funkciou klonovacích vektorov je sprostredkovať správne namnoženie požadovaného úseku DNA v živých bunkách. Existuje veľké množstvo komerčne predávaných klonovacích vektorov a je dôležité zvoliť správny, kedy je potrebné prihliadať na veľkosť inzertu, počet kópií, kompatibilitu s expresnými bunkami, selekčný marker, klonovacie miesta, prípadne iné špecializované funkcie (Preston, 2003). Dôležitými vlastnosťami klonovacieho vektora je teda prítomnosť replikačného počiatku, selekčný marker (najčastejšie gén pre rezistenciu voči antibiotiku) a minimálne jedno restričné miesto, ktoré je prítomné vo vektore iba jedenkrát a nenaruší počiatok replikácie ani selekčný marker. Väčšina používaných vektorov v súčasnosti obsahuje oblasť, v ktorej sú takéto restričné miesta zoskupené – MCS (polylinker). V prípade, ak je cieľom okrem amplifikácie DNA aj expresia proteínu, využívajú sa expresné vektory, v ktorých sa MCS (a následne oblasť s vloženým inzertom) nachádza v oblasti, ktorá bude po indukcii exprimovaná. Najčastejšie využívanými vektormi pri klonovaní bývajú plazmidové vektory, ďalšími môžu byť fágové vektory, kozmidy, fágomidy, umelé chromozómy a iné (Carter *et* Shieh, 2010).

Plazmidy sú dvojreťazcové miochromozómové DNA prítomné u mikroorganizmov, prevažne baktérií, ktoré im svojou prítomnosťou zabezpečujú užitočné vlastnosti, ako napríklad rezistencia voči antibiotiku, no nie sú pre ne nevyhnutné. Ich výhodou je malá veľkosť a schopnosť autonómnej replikácie. Vhodné sú pre klonovanie krátkych úsekov DNA (Carter *et* Shieh, 2010).

Fágové vektory využívajú lytický cyklus fága, po transdukcii do buniek a replikácií genetickej informácie dôjde k jej lýze a tým k uvoľneniu fágových častíc. Na médiu sa vytvoria oblasti zlyzovaných buniek, z ktorých sa následne izoluje rekombinantná DNA. Väčšina fágových klonovacích vektorov bola vytvorená na základe chromozómu fága λ , z ktorého je vyštiepená DNA pre lyzogénny cyklus a nahradená je inzertom. Nakoľko do fágových hlavičiek je možné zabaliť rekombinantnú molekulu DNA s veľkosťou 45–50 kb, inzerty vďaka vyštiepenej časti DNA môžu mať veľkosť približne do 10 kb (Preston, 2003).

Kozmidy obsahujú malú časť DNA z bakteriofága λ nesúcu *cos* miesta (kohézne miesta) z tohto fága, ktoré umožňujú zabalenie DNA do fágovej častice. Majú výhodu autonómnej replikácie a uľahčenie transformácie do buniek *E. coli*, ktorá je zabezpečená

fágom. Pretože nie sú prítomné ostatné gény fága λ , inzert môže mať veľkosť až 30–40 kb (Nora *et al.*, 2019).

Fágomidové vektory nachádzajú využitie v prípade fágového displeja (Paschke, 2006). Jedná sa o vláknitých fágov obsahujúcich replikačný počiatok plazmidu. Po vstupe fágomida do hostiteľskej bunky je možné pôsobením enzýmov premeniť ich ssDNA na replikačnú formu. Obvykle nekódujú obalové proteíny, prípadne kódujú jeden a pre svoj životný cyklus potrebujú pomocného fága, ktorý im poskytne určité potrebné enzýmy a štruktúrne proteíny. (Qi *et al.*, 2012).

Vývoj umelých chromozómov podmienila potreba replikovať aj veľké časti genómu, ktoré nebolo možné replikovať pomocou vyššie spomenutých vektorov. Boli vyvinuté napríklad YAC, BAC a umelé chromozómy odvodené z bakteriofága P1 – PAC (P1 artificial chromosome). Pomocou YAC je možné klonovať inzerty o veľkosti až niekoľko stoviek kb, obsahujú replikačný počiatok kvasinky, centroméru, teloméry kvasinky, selekčný marker a polylinker. BAC umožňujú prijať inzert s veľkosťou viac ako 300 kb a PAC okolo 130–150 kb (Burke *et al.*, 1987; Shizuya *et al.*, 1992; Ioannou *et al.*, 1994).

Okrem spomínaných vektorov sa používajú aj rastlinné vektory, kedy rastlinné bunky bývajú transformované najčastejšie prirodzenou infekciou pomocou Ti plazmidu baktérie *Agrobacterium tumefaciens*, z ktorého časť DNA, T-DNA býva zabudovaná do genetickej informácie hostiteľa. V takomto vektore býva odstránená onkogénna funkcia a časť sekvencie v oblasti T-DNA je nahradená cieľovou DNA (Zambryski *et al.*, 1983).

Okrem spomenutých v súčasnosti existuje veľké množstvo komerčne dostupných klonovacích vektorov, ktoré môžu niesť špeciálne vlastnosti, vďaka ktorým sú vhodné pre použitie v rôznych postupoch a metódach (Nora *et al.*, 2019).

3.5.4 Expresné systémy

Po ligácii vektora a inzertu je rekombinantná DNA vložená do hostiteľských buniek, ktoré môžu slúžiť buď pre namnoženie DNA alebo expresiu proteínu. Na transformáciu kompetentných buniek sú používané rôzne spôsoby, v prípade *E. coli* napríklad teplotný šok alebo elektroporácia. Samotné expresné systémy bývajú volené predovšetkým podľa vlastností cieľového proteínu (Lessard, 2013).

Prokaryotické systémy

Pri produkcii rekombinantných proteínov zostáva v súčasnosti výhodné využívanie bakteriálnych systémov vďaka nízkej cene, schopnosti rýchleho rastu a vysokej produktivite. Je však potrebné správne zvoliť adekvátny promótorový systém a typ organizmu pre produkciu požadovaného proteínu. Z prokaryotických organizmov sú pre expresiu bežne využívané kmene *E. coli* BL21 a K12, ďalej druhy rodu *Bacillus*, ako napríklad *Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*. Pre tvorbu rekombinantných proteínov sú najčastejšie zo spomenutých používané kmene gram-negatívnych baktérií *E. coli*. Výhodou je krátka generačná doba, jednoduchá práca a dostatočné znalosti o genetických a fyziologických vlastnostiach. V takomto prípade použitia je nutné následne proteín dôkladne purifikovať, pretože pre *E. coli* je typická produkcia endotoxínov (akumulácia lipopolysacharidu), ktoré môžu pôsobiť pyrogénne. Produkciu proteínu môže ovplyvňovať aj odlišné používanie kodónov pre jednotlivé aminokyseliny, ktoré môže viesť k problémom v produkcii požadovaného množstva proteínu. (Schmidt, 2004; Terpe, 2006).

Pre produkciu proteínu je vhodné gén klonovať za určitým regulovateľným promótorom, využívané sú napríklad promótor *lac*, syntetický *tac* a *trc*, ktoré sú indukovateľné analógom laktózy, IPTG, ďalej *araBAD* indukovateľný L-arabinózou (P_{BAD}), promótor *rhaP_{BAD}* indukovateľný L-ramnózou a iné. Jedným z najviac využívaných je promótor pre T7 RNA polymerázu, ktorý sa bežne v *E. coli* nenachádza a je možné pomocou neho indukovať expresiu použitím IPTG. T7 RNA polymeráza predlžuje reťazce rýchlejšie ako RNA polymeráza *E. coli* a navyše je možné ich používať selektívne (Studier *et* Moffatt, 1986; Terpe, 2006).

Vlastnosťou bakteriálnych systémov býva neschopnosť posttranslačnej modifikácie, ako napríklad glykozylácia, ktorá môže byť niekedy nevyhnutná pre biologickú aktivitu proteínu. Ďalším problémom môže byť absencia chaperónov a foldáz, prípadne hromadenie eukaryotických proteínov náchylných na denaturáciu vo forme nerozpustných inklúzných teliesok. V tomto prípade je vhodné použitie eukaryotických systémov, ako kvasinky, vláknité huby, hmyzie alebo cicavčie bunkové kultúry (Terpe, 2006; Růčková *et al.*, 2014).

Eukaryotické systémy

Kvasinky sú často používané v prípade, ak je potrebná posttranslačná modifikácia proteínu. Je možné ich kultivovať rýchlo a lacno a výhodou je, že nie sú ani pyrogénne a ani patogénne. Medzi používané druhy patria napríklad *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis* alebo *Hansenula polymorpha*. Okrem kvasiniek sú ako expresné systémy využívané aj vlákňité huby, ktoré majú oproti kvasinkám zložitejší posttranslačný modifikačný aparát. Vo farmaceutickom priemysle sa používajú na výrobu antibiotík alebo enzýmov druhy ako *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* alebo rôzne druhy *Fusarium*, avšak ich nevýhodou je málo preskúmaná fyziológia, ako napríklad mechanizmus glykozylácie a genetické vlastnosti (Schmidt, 2004).

Medzi eukaryotické expresné systémy patria aj cicavčie bunky, ktoré sú najviac podobné ľudským bunkám svojimi posttranslačnými modifikáciami, avšak ich kultivácia je nákladnejšia, komplikovanejšia a poskytujú nižšie množstvo produktu. Ďalším systémom, ktorý poskytuje výhody prokaryotických aj eukaryotických systémov sú hmyzie bunky transformované bakulovírusovými vektormi, ktoré sú odolné, ľahko sa s nimi manipuluje a sú dostatočne produktívne. Ich nevýhodou môžu byť nepresnosti posttranslačných modifikácií, proteázová aktivita a zhoršenie sekrécie a skladania proteínov v dôsledku bakulovírusovej infekcie. V súčasnosti sú používané viaceré modifikácie tohto systému pre získanie čo najvyššieho množstva rekombinantného proteínu (Schmidt, 2004; Růčková *et al.*, 2014).

3.5.5 Izolácia a purifikácia rekombinantných proteínov

Posledným z krokov pri tvorbe rekombinantného proteínu je jeho izolácia a purifikácia. Výrazne ju uľahčuje prítomnosť afinitnej značky (tagu) obvykle sfúzovanej s N- alebo C-koncovou časťou proteínu, vďaka ktorej je možné dosiahnuť vysokých výťažkov a čistoty rekombinantných proteínov. Využitie nachádzajú v prípade afinitnej chromatografie (IMAC), kedy sa vďaka tejto značke purifikovaný proteín zachytí na matici chromatografickej kolóny, odkiaľ je možné ho po premytí eluovať pridaním kompetitívneho ligandu, prípadne zmenou pH, iónovej sily alebo polarita. Bežne

používanými afinitnými značkami bývajú GST-tag, SBP-tag, MBP-tag a v neposlednom rade His-tag (Kuo *et al.*, 2011; Růčková *et al.*, 2014).

Najčastejšie používanou značkou je His-tag, ktorého výhody spočívajú predovšetkým v malej veľkosti a jeho minimálnom alebo žiadnom vplyve na vlastnosti proteínu. Okrem toho je možné používať ho v prípade práce za natívnych aj denaturačných podmienok a uľahčuje následnú detekciu proteínu s využitím imunochemických metód s protilátkami priamo sa viažúcimi na túto značku. Nevýhodou môže byť množstvo kontaminujúcich proteínov obsahujúcich zvyšky His, ktoré sa purifikujú spoločne s cieľovým proteínom, alebo nekompatibilita so všetkými expresnými systémami. Značky obsahujúce domény, ktoré sú schopné viazať ligand, ako MDB alebo GST sú väčšie a často majú vplyv na vlastnosti proteínu, preto zvyknú vyžadovať odstránenie (Wood, 2014).

3.5.6 Alternatívne postupy pri klonovaní

Okrem pôvodných postupov pri klonovaní sú v súčasnosti pri tvorbe rekombinantných proteínov v rámci techník molekulárnej biológie využívané ich rôzne variácie, ktoré minimalizujú nevýhody, ako napríklad závislosť na sekvencii pri používaní restričných endonukleáz, prípadne výskyt restričného miesta okrem MCS aj v cieľovej sekvencii. Ďalšou z nevýhod pri používaní klasických postupov môže byť vlastnosť niektorých endonukleáz preferenčne štiepiť cirkulárnu DNA, a preto nemusia dobre štiepiť lineárne produkty PCR. Neúplné štiepenie DNA a nízke výťažky ligácie znižujú účinnosť klonovania. Nutnosť kontroly restričných miest obmedzuje prípadné použitie tradičných metód založených na restrikcii a ligácii v niektorých prípadoch prípravy proteínov (Celie *et al.*, 2016; Bertero *et al.*, 2017; Ortega *et al.*, 2019).

Jedným z novších prístupov je PCR klonovanie, kedy dochádza k vzniku rekombinantnej molekuly plazmidovej DNA z PCR produktov, bez nutnosti štiepenia restričnými endonukleázami a nevyžadujú ani enzýmy ako rekombináza alebo ligáza. Existujú viaceré spôsoby PCR klonovania, v prípade ktorých sa vo väčšine prípadov využíva amplifikácia inzertu a vektora s komplementárnymi presahmi (Celie *et al.*, 2016).

Ďalším je klonovanie nezávislé na ligácii, pri ktorom nie je nutné použitie restričných endonukleáz, alkalickéj fosfatázy a ani DNA ligázy. Na 3' koniec inzertu je pomocou PCR s využitím špecifického primeru pridaná sekvencia a následne sa vytvorí

exonukleázou presahy na 5' konci. Podobne je amplifikovaný aj vektor, pričom sa vytvoria konce komplementárne k sekvencii inzertu. Po zmiešaní vektora s inzertom vzniknuté cirkulárne DNA molekuly nevyžadujú *in vitro* ligáciu pred transformáciou (Aslanidis *et de Jong*, 1990).

Seamless klonovanie umožňuje efektívne vkladanie jedného alebo viacerých fragmentov DNA do vektora nezávisle na sekvencii na základe homológnych koncov, podobne, ako v prípade klonovania nezávislom na ligácii. Následne je využívaná zmes enzýmov, exonukláza, ktorá tvorí presahy na 3' konci, DNA polymeráza, ktorá vyplní medzery vo fragmentoch a DNA ligáza, ktorá fragmenty spája. (Bertero *et al.*, 2017).

Ďalším možným spôsobom je klonovanie založené na rekombinácii, ktoré využíva rekombinázy, enzýmy schopné vymieňať fragmenty DNA medzi dvoma molekulami obsahujúcimi špecifické sekvencie. Nutná je prítomnosť vstupného (Entry Vector) plazmidu a následne zahŕňa rekombináciu do cieľového (Destination Vector) vektora. Bežne používaný je systém Gateway[®], ktorý je založený na miestne-špecifickej rekombinácii, kedy je možné pomocou integrázy bakteriofága λ preniesť segmenty DNA ohraničené miestami rekombinácie (*att*) do vektorov obsahujúcich taktiež rekombinačné miesta. Využíva zmesi enzýmov – BP a LR klonázy (Hartley *et al.*, 2000).

Aj napriek výhodám novo odvodených techník, ako sú možnosť spájania viacerých fragmentov alebo nezávislosť od sekvencie a prítomnosti restričných miest, je však klasické klonovanie stále veľmi často používané, a to najmä vďaka nižším finančným nákladom na reagenty a vektory a vďaka jednoduchosti vhodnej pre bežné využitie (Bertero *et al.*, 2017).

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Biologický materiál

- Kmeň *Escherichia coli*: OneShot® BL21(DE3) (Invitrogen, kat. č. C601003), genotyp: F- *ompT hsdSB* (rB-mB-) *gal dcm* (DE3); skladované pri teplote –80 °C
- Kmeň *Escherichia coli*: MAX Efficiency™ DH5α (Invitrogen, kat. č. 18258-012), genotyp: F- Φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rk-, mk+) *phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1*; skladované pri teplote –80 °C
- Konštrukt 3 (K3, trimér kódovaný tromi úsekmi OspA – PKa *B. burgdorferi*, PKo *B. afzelii*, TN OspA-TN); skladované pri teplote –80 °C
- Plazmidový vektor pET-28b(+) (Novagen, kat. č. 69865-3); skladované pri teplote –80 °C

4.2 Použité chemikálie, súpravy a roztoky

Použité chemikálie:

- 2-Merkaptoetanol (Amresco, kat. č. 0482)
- 10x CutSmart® Buffer (New England Biolabs, kat. č. B7204S)
- 10x NEBuffer™ 3 (New England Biolabs, kat. č. B7003S)
- 10x NEBuffer™ 4 (New England Biolabs, kat. č. B7004S)
- 100x Purified BSA (New England Biolabs, kat. č. B9001S)
- 30% akrylamidbisakrylamid (Serva, kat. č. 10687.01)
- Agar (Sigma-Aldrich, kat. č. A5054)
- Agaróza (Serva, kat. č. 11404.05)
- Aprotinín (Serva, kat. č. 13718.02)
- APS (Serva, kat. č. 13375.01)
- Blokovací roztok SuperBlock™ Blocking Buffer in PBS (Thermo Scientific, kat. č. 37518)
- Brómfenolová modrá (Sigma-Aldrich, kat. č. B0126)
- Coomassie Brilliant Blue G 250 (Serva, kat. č. 17524.01)

- ddH₂O
- Dihydrogénfosforečnan draselný (Lach-Ner, kat. č. 30016 -CP0- G0500-1)
- Etanol (VWR, kat. č. 20823.293)
- Fenylmetylsulfonylfluorid (Serva, kat. č. 32395.03)
- Gel Loading Dye, Purple (6x), no SDS (New England Biolabs, kat. č. B7024S)
- GelRed[®] Nucleic Acid 10000x in DMSO (BIOTIUM, kat. č. 41002)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, kat.č. G5516)
- Glycín (VWR, kat. č. 0167)
- Hydrogénfosforečnan sodný, dodekahydrát (Chemos, kat. č. A0026825)
- Hydrogénfosforečnan sodný, monohydrát (Chemos, A0204775)
- Chemiluminiscenčné farbivo SuperSignal[™] West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific, kat. č. 34578)
- Chlorid sodný (mikroCHEM, kat. č. A191472/01)
- Imidazol (OmniPur, kat. č. 5720)
- IPTG (OmniPur, Calbiochem, kat. č. 5800-OP)
- Izopropanol (Penta, kat. č. 17510-11000)
- Kyselina octová (VWR, kat. č. 20104.298)
- LB médium (VWR, kat. č. 84699.5000)
- Leupeptín (Serva, kat. č. 51867.02)
- Metanol (VWR, kat. č. BDH1135-1LP)
- *N*-butanol (Lach-Ner, kat. č. 20010-AT0-M1000-1)
- Ni-NTA agaróza (MC LAB, kat. č. NINTA-500)
- PageRuler[™] Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (Thermo Scientific, kat. č. 26619)
- Penta · His HRP Conjugate (QIAGEN, kat. č. 34460)
- Restrikčné endonukleázy *Apa*I, *Bln*I, *Eco*RV, *Nco*I, *Pvu*I, *Xba*I (New Engalnd Biolabs, kat. č. R0114S; R0585S; R0195S; R0193S; R0150S; R0145S)
- Tris (Amresco, kat. č. 0497)
- Tween 20 (Serva, kat. č. 37470.01)
- SDS (Calbiochem, kat. č. 428015)
- S.O.C. médium (Invitrogen, kat. č. 15544-034)
- TEMED (Serva, kat. č. 35925.01)

- Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs, kat. č. N0550S)

Použité súpravy:

- GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Kit (Invitrogen, kat. č. A13288)
- NucleoSpin® Plasmid (NoLid), Mini kit (MACHEREY-NAGEL, kat. č. 740499.50)
- QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, kat. č. 28704)

Použité roztoky:

- 50x TAE pufer; pH 8,5: v malom množstve ddH₂O zmiešať 242 g Trisu s 57,1 ml kyseliny octovej a 37,2 g Na₂EDTA · 2 H₂O, upraviť pH, doplniť do 1 l ddH₂O
- Pracovný roztok Gel Red®: k 100 ml elektródového pufru pridať 10 µl 10000x GelRed® Nucleic Acid 10000x in DMSO
- LB + K (50 µg/ml): 25 g práškového média obsahujúceho trypton 10 g/l, kvasničný extrakt 5 g/l a NaCl 10 g/l rozpustiť v 1 l ddH₂O, sterilizovať autoklávaním, po schladnutí na 60 °C pridať 1 ml kanamycínu 50 mg/ml a skladovať pri teplote 4 °C
- LB agar + K (50 µg/ml): 25 g práškového média obsahujúceho trypton 10 g/l, kvasničný extrakt 5 g/l a NaCl 10 g/l rozpustiť v 1 l ddH₂O, pridať 15 g agaru, sterilizovať autoklávaním, po schladnutí na 60 °C pridať 1 ml kanamycínu 50 mg/ml, naliať na Petriho misky, nechať stuhnúť a skladovať pri teplote 4 °C
- 10% persíran amónny (APS): 0,1 g persíranu amónneho rozpustiť v 1 ml ddH₂O
- 2x SDS nanášací redukujúci pufer pre proteíny: k 37,5 ml ddH₂O pridať 0,755 g Trisu, 7,79 ml glycerolu, 2,3 g SDS a 5 ml merkaptoetanolu a špičku lyžičky brómfenolovej modrej pre sfarbenie
- 4x Tris pufer; pH 8,8: približne v 150 ml ddH₂O rozpustiť 45,5 g Trisu a 1 g SDS, upraviť pH na 8,8 a doplniť ddH₂O do 250 ml
- 4x Tris pufer; pH 6,8: približne v 150 ml ddH₂O rozpustiť 15,125 g Trisu a 1 g SDS, upraviť pH na 6,8 a doplniť ddH₂O do 250 ml

- 5x SDS elektródový pufer: približne v 2 l ddH₂O rozpustiť 45,3 g Trisu, 216 g glycínu a 15 g SDS, doplniť do 3 l ddH₂O
- 1x SDS elektródový pufer: zmiešať 200 ml 5x SDS elektródového pufru a 800 ml ddH₂O
- Farbiaci roztok Coomasie Brilliant Blue: zmiešať 250 ml etanolu, 50 ml kyseliny octovej, pridať 0,5 g Coomasie Brilliant Blue, doplniť 200 ml ddH₂O
- Odfarbovací roztok: zmiešať 150 ml metanolu a 210 ml kyseliny octovej, doplniť do 3 l ddH₂O
- Towbinov transférový pufer: 600 ml metanolu zmiešať s malým množstvom ddH₂O, rozpustiť 9 g Trisu a 43,2 g glycínu, doplniť do 3 l ddH₂O
- Fixačný roztok: zmiešať 750 ml izopropanolu a 300 ml kyseliny octovej, doplniť do 3 l ddH₂O
- 10x PBS pufer; pH 7,5: približne v 2 l ddH₂O rozpustiť 240 g chloridu sodného, 6 g chloridu draselného, 40,08 g dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného a 6 g dihydrogenfosforečnanu draselného, upraviť pH a doplniť do 3 l ddH₂O
- 1x PBS + 0,05% Tween 20: zmiešať 100 ml zásobného roztoku 10x PBS a 900 ml ddH₂O, pridať 0,5 ml Tweenu 20
- 1x PBS pufer: zmiešať 100 ml 10x PBS pufer a 900 ml ddH₂O
- Blokovací pufer + 0,05% Tween 20: k 200ml SuperBlock™ Blocking Buffer in PBS pridať 0,1 ml Tweenu 20
- Natívny lyzačný pufer; pH 8: v malom množstve ddH₂O rozpustiť 6,06 g Trisu, 1,754 g chloridu sodného, 0,68 g imidazolu, upraviť pH hydroxidom sodným a doplniť do 1 l ddH₂O, tesne pred použitím pridať inhibítory proteáz, na 100 ml pridať 20 µl fenylmetylsulfonylfluoridu, 4 µl leupeptínu a 5,25 µl aprotinínu
- Natívny premývací pufer; pH 8: v malom množstve ddH₂O rozpustiť 6,9 g monohydrátu hydrogenfosforečnanu sodného, 17,54 g chloridu sodného, 1,36 g imidazolu, upraviť pH hydroxidom sodným a doplniť do 1 l ddH₂O, tesne pred použitím pridať inhibítory proteáz, na 100 ml pridať 20 µl fenylmetylsulfonylfluoridu, 4 µl leupeptínu a 5,25 µl aprotinínu
- Natívny elučný pufer; pH 8: v malom množstve ddH₂O rozpustiť 6,06 g Trisu, 17,54 g chloridu sodného, 34 g imidazolu, upraviť pH hydroxidom sodným, doplniť do 1 l ddH₂O, tesne pred použitím pridať inhibítory proteáz, na 100 ml pridať 20 µl fenylmetylsulfonylfluoridu, 4 µl leupeptínu a 5,25 µl aprotinínu

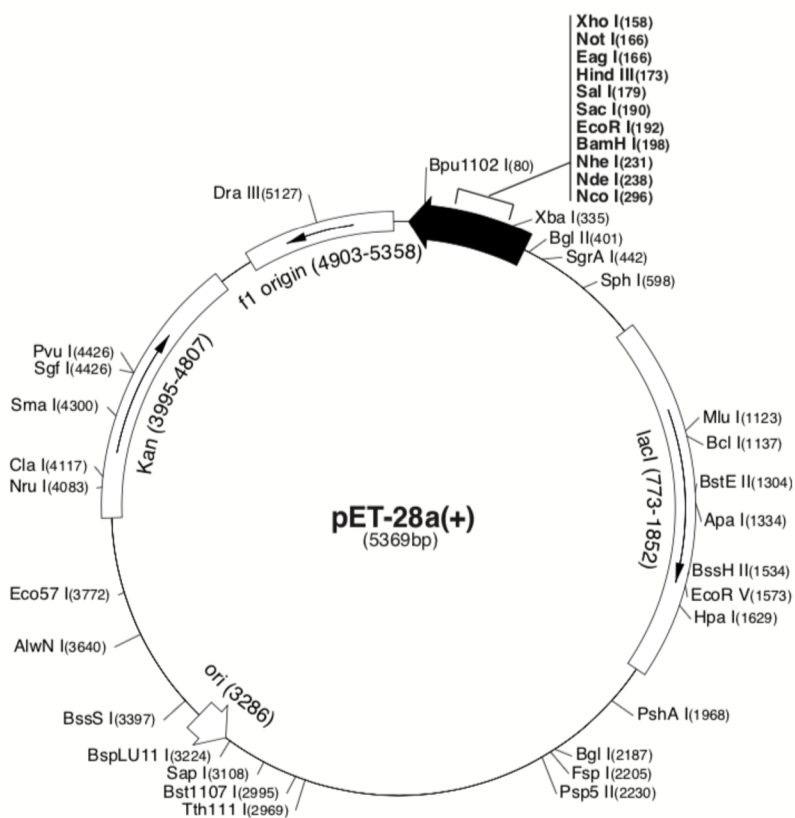
4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

- Automatické mikropipety (Thermo Scientific, Finnpipete)
- Centrifúga CR 312 (Jouan)
- Centrifúga High-Speed Refrigerated Centrifuge CR 22N (Himac)
- Centrifúga KR 25i (Jouan)
- Centrifúga MIKRO 22R (Hettich Zentrifugen)
- Centrifúga MPW – 150R (MPW med.instruments)
- Drtič ľadu IC20 (Waring)
- Elektrický zdroj pre elektroforézu PowerPac Universal (Bio-rad)
- Chladnička CNSI 3033 (Liebherr)
- Inkubátor Biological thermostat BT 120 M
- Inkubátor SAN40 CO₂
- Laboratórne váhy 1,25–500 g (Chirana)
- Laboratórne váhy EMB 200-2 (Kern)
- Laminárny box Biohazard box SafeFAST Top (DASIT Group)
- Minicentrifúga MPW-15 (MPW Med Instruments)
- Mraznička G 1231 (Liebherr)
- pH 210 Microprocesor pH Meter (HANNA instruments)
- Semidry Blotting System TE77X (Hoefer®)
- Sonikátor UP200S (Hielscher)
- Synergy HTX multi-mode reader (BioTek)
- Systém dokumentančný G-box, program: GeneSys (SYNGENE)
- Termoblok Block Heater SBH130D (Stuart)
- Trepáčka KS 260 basic (IKA)
- Trepáčka rolovacia SRT6D (Stuart)
- UV transiluminátor GelLogic 212PRO (CARESTREAM HEALTH)
- Vyhrievaná trepačka RPN 2510 (Amersham)
- Výrobník deionizovanej vody AQUAL 29 XL (Merci)
- Výrobník ľadu CB 316 (Brema)

4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

4.4.1 Príprava linearizovaného klonovacieho vektora

Ako klonovací vektor bol použitý plazmid pET28-b(+) (5368 bp) (Obr. č. 2). Aby bolo možné vytvoriť rekombinantnú molekulu DNA, bolo potrebné plazmid rozštiepiť a tým ho linearizovať pomocou restriktčných endonukleáz, ktoré majú vo vektore iba jedno restriktčné miesto. Použitý bol enzým *BlpI* a *NcoI* (Tabuľka č. 2), čím bol fragment DNA s dĺžkou 215 bp odštiepený zo zvyšku plazmidu. Nakoľko enzýmy majú požadovanú aktivitu pri špecifických podmienkach, boli im zabezpečené pomocou pufru CutSmart® Buffer (NEB) s pH 7,9 pri 25 °C. Postup pri restrikcii bol vopred optimalizovaný.



Obr. č. 2: Plazmid pET-28a(+); mapa pre pET-28b(+) je rovnaká – vektor je veľký 5368 bp, je nutné odčítať 1 bp za *BamHI*, v mieste 198 bp (Novagen); (prevzaté z: www.merckmilipore.com, návod k plazmidu pET28, Novagen)

Tabuľka č. 2: Restričné endonukleázy použité na linearizáciu vektora

| Restričná endonukleáza | Restričné miesto (5' → 3') | Poloha restričného miesta [bp] |
|------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| <i>BspI</i> | GC TNAGC | 80 |
| <i>NcoI</i> | C CATGG | 295 |

(| = miesto štiepenia daným restričným enzýmom, N = nukleotid)

Jednotlivé zložky restričnej zmesi s objemom 90 μ l boli pipetované podľa Tabuľky č. 3. Po zmiešaní vody, pufru, restričnej endonukleázy *NcoI* a plazmidovej DNA boli vzorky 1 h inkubované pri teplote 37 °C. Po 1h inkubácii bola pridaná restričná endonukleáza *BspI* a vzorky boli opäť inkubované 1 h pri teplote 37 °C.

Tabuľka č. 3: Zložky reakcie pre prípravu linearizovaného klonovacieho vektora

| Zložky restričnej zmesi | Koncentrácia | | Pipetovanie zložiek zmesi [μ l] | |
|-------------------------------|----------------|---------|---|--------------------------|
| | Pôvodná | Konečná | Pred 1. hod inkubácie | Pred 2. hod inkubácie |
| ddH ₂ O | – | – | 70,95 | – |
| CutSmart® Buffer | 10x | 1x | 9 | – |
| <i>NcoI</i> | 10 U/ μ l | 7 U | 0,7 | – |
| <i>BspI</i> | 10 U/ μ l | 12,5 U | – | 1,25 |
| Plazmidová DNA | 55 ng/ μ l | 500 ng | 9 | – |
| Reakcia celkom | | | 90 | |

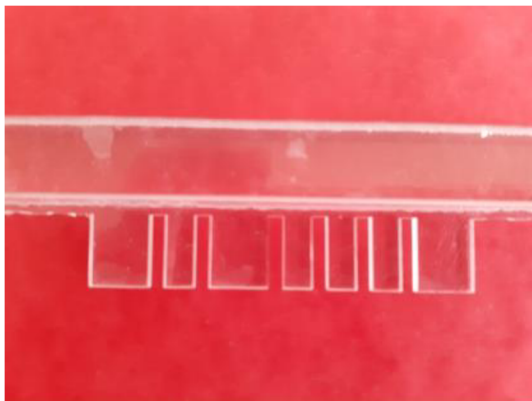
4.4.2 Separácia linearizovaného klonovacieho vektora elektroforézou v agarózovom géli

Na oddelenie linearizovaného plazmidu od zvyšku fragmentov bola využitá elektroforetická separácia v 1% agarózovom géli, pomocou ktorej sa molekuly zo zmesi

rozdelili jednosmerným elektrickým prúdom na základe ich relatívnej molekulovej hmotnosti.

Príprava 1% polyakrylamidového gélu

Gél bol pripravený navážením 1,2 g agarózy do 120 ml deionizovanej vody a rozvarením v mikrovlnnej rúre. Po rozvarení bolo pridaných 2,4 ml 50x TAE pufru a zmes bola naliata do predpripravenej elektroforetickej komôrky so separačným hrebienkom (Obr. č. 3). Po stuhnutí gélu bol odstránený hrebienok, gél bol vložený do elektroforetickej vaničky a zaliaty 750 ml 1x TAE pufru.



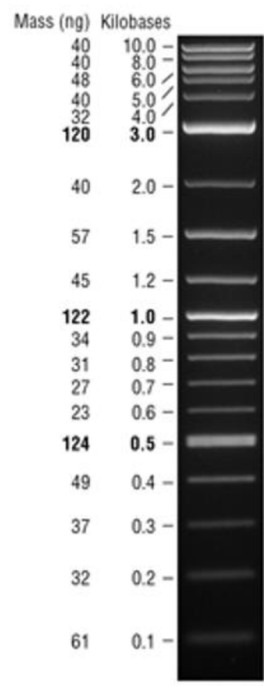
Obr. č. 3: Separálny hrebienok použitý pri elektroforetickej separácii linearizovaného plazmidu pET-28b(+)

Separácia linearizovaného vektora

K 90 μ l vzorke pripravenej restrikciou bolo pridaných 15 μ l nanášacieho pufru Gel Loading Dye, Purple (6x), no SDS. Do veľkej jamky bolo napipetovaných 70 μ l vzorky, do menšej jamky 20 μ l a do ďalšej 5 μ l markeru relatívnej molekulovej hmotnosti Quick-Load[®] Purple 1 kb Plus DNA Ladder (Obr. č. 4). Elektroforetická separácia prebiehala 45 min pri napätí 160 V.

Z gélu bol vyrezaný pás zahŕňajúci vzorku linearizovaného plazmidu a markeru relatívnej molekulovej hmotnosti a za stáleho miešania na trepačke pri 80 rpm bol 30 min farbený v 100 ml roztoku GelRed[®]. Zafarbený gél bol pozorovaný pomocou UV transiluminátora a na základe očakávanej dĺžky fragmentu 5153 bp bola zarezaním

zaznačená oblasť obsahujúca vektor pET-28. Vyrezaný prúžok gélu bol priložený naspäť k zvyšku a podľa zaznačeného miesta bola z nezafarbenej časti vyrezaná v danom mieste oblasť gélu obsahujúca tento vektor, ktorá bola následne odvážená a použitá na izoláciu DNA.



Obr. č. 4: Marker relatívnej molekulovej hmotnosti Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder (prevzaté z: www.neb.com)

4.4.3 Izolácia DNA z agarózového gélu

DNA bola izolovaná pomocou kitu QIAquick Gel Extraction Kit. Pracovný postup bol vykonaný podľa protokolu QIAquick Gel Extraction using a Microcentrifuge (QIAGEN, 2020). Všetky centrifugácie prebiehali 1 min pri laboratórnej teplote a pret'ažení 10000 g.

Táto súprava obsahuje kolónu s membránou z oxidu kremičitého, na ktorú sa naviaže DNA v pufri s vysokým obsahom solí a po následnom odstránení nečistôt pomocou špecifických pufrov sa DNA eluuje pufrom s nízkym obsahom solí alebo vodou (QIAGEN, 2020).

K vyrezanej časti gélu bolo pridané 3x viac pufru QG, ako bola jeho zistená hmotnosť (100 mg ~ 100 µl). Skúmavky s gélom boli 10 min inkubované pri teplote 50 °C a miešané pomocou vortexu každé 2–3 min tak, aby došlo k úplnému rozpusteniu gélu a farba vzorky bola žltá. Po úplnom rozpustení gélu bol pridaný rovnaký objem izopropanolu, ako bola odvážená hmotnosť gélu (100 mg ~ 100 µl), obsah skúmavky bol premiešaný.

Na kolónu vloženú do skúmavky bol dekantovaný obsah vzorky s rozpusteným agarózovým gélom a kolóna bola centrifugovaná. Objem pretečený kolónou do skúmavky bol vyliaty a na kolónu bolo pridaných 0,5 ml QG pufru, opäť prebiehala centrifugácia. Bolo pridaných 0,75 ml pufru PE s etanolom a kolóna bola centrifugovaná. Obsah skúmavky pretečený kolónou bol vyliaty a prázdna kolóna bola vysušená centrifugáciou.

Kolóna bola vložená do čistej mikroskúmavky a bolo na ňu napipetovaných 30 µl ddH₂O. Po 1min inkubácii pri laboratórnej teplote bola skúmavka s kolónou centrifugovaná, čím došlo k elúcii DNA.

Pre ďalšiu prácu bolo nutné zmerať koncentráciu DNA, či došlo k dostatočnému vyizolovaniu DNA z agarózového gélu pomocou Synergy HTX multi-mode reader. Na mikrodštičku pre meranie koncentrácie DNA bolo napipetovaných 4x po 2 µl ddH₂O, ktorá bola použitá ako blank. Následne bolo pipetované po 2 µl vzorky, prístrojom bola zmeraná koncentrácia. Podľa zistených hodnôt bolo vypočítané požadované množstvo vzorky potrebné pre ligáciu s inzertom (uvedené v návode kitu GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Kit).

4.4.4 Klonovanie pomocou Seamless Cloning and Assembly Kit

Na klonovanie bol použitý kit GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Kit, ktorý umožňuje pomocou zmesi enzýmov sfúzovať fragmenty DNA s homológnyimi koncami. Pomocou kitu bol zjednodušený postup oproti tradičným postupom klonovania o nutnosť používania restričných a ligačných enzýmov, nahradené sú enzýmovým mixom, ktorý je súčasťou kitu, čím sa eliminuje možnosť vzniku chýb. Postup bol vykonaný podľa protokolu GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Kit User Guide (Invitrogen, 2014). Inzertom bol konštrukt 3 (K3), lineárny úsek DNA dlhý 1556 bp,

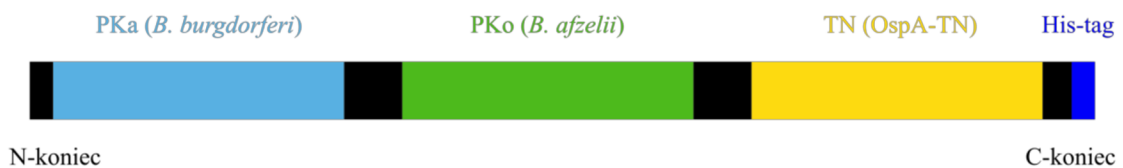
ktorý kóduje rekombinantný proteín - trimér zložený z fragmentov OspA proteínov rodu *Borrelia* (Obr. č. 5):

PKa OspA-PKa *B. burgdorferi*

PKo OspA-PKo *B. afzelii*

TN OspA-TN, N34, VS307, G25 *B. garinii*, *PWudll B. burgdorferi*.

Tento konštrukt, navrhnutý na Ústave imunológie za účelom tvorby rekombinantnej vakcíny proti lymfkej borelióze, bol pred samotným klonovaním a prácou s ním syntetizovaný firmou GenScript. DNA inzertu K3 bola podľa návodu od danej firmy rozpustená v ddH₂O tak, že jej koncentrácia predstavovala 20 ng/μl.



Obr. č. 5: Schématické zobrazenie inzertu K3; farebne sú odlišené jednotlivé časti triméru (PKa – bledomodrá, PKo – zelená, TN – žltá) pospájané linkermi (čierna farba) s His-tagom (6x histidín, tmavomodrá) v C-terminálnej časti sekvencie proteínu

Objem inzertu potrebného k reakcii bol vypočítaný podľa vzorca (Obr. č. 6) tak, aby molárny pomer inzert : vektor predstavoval 2 : 1. Keďže pôvodná koncentrácia inzertu bola 20 ng/μl a podľa výpočtu bolo k vzorke potrebné pridať 60 ng inzertu, pipetovaný objem roztoku s inzertom bol 3 μl.

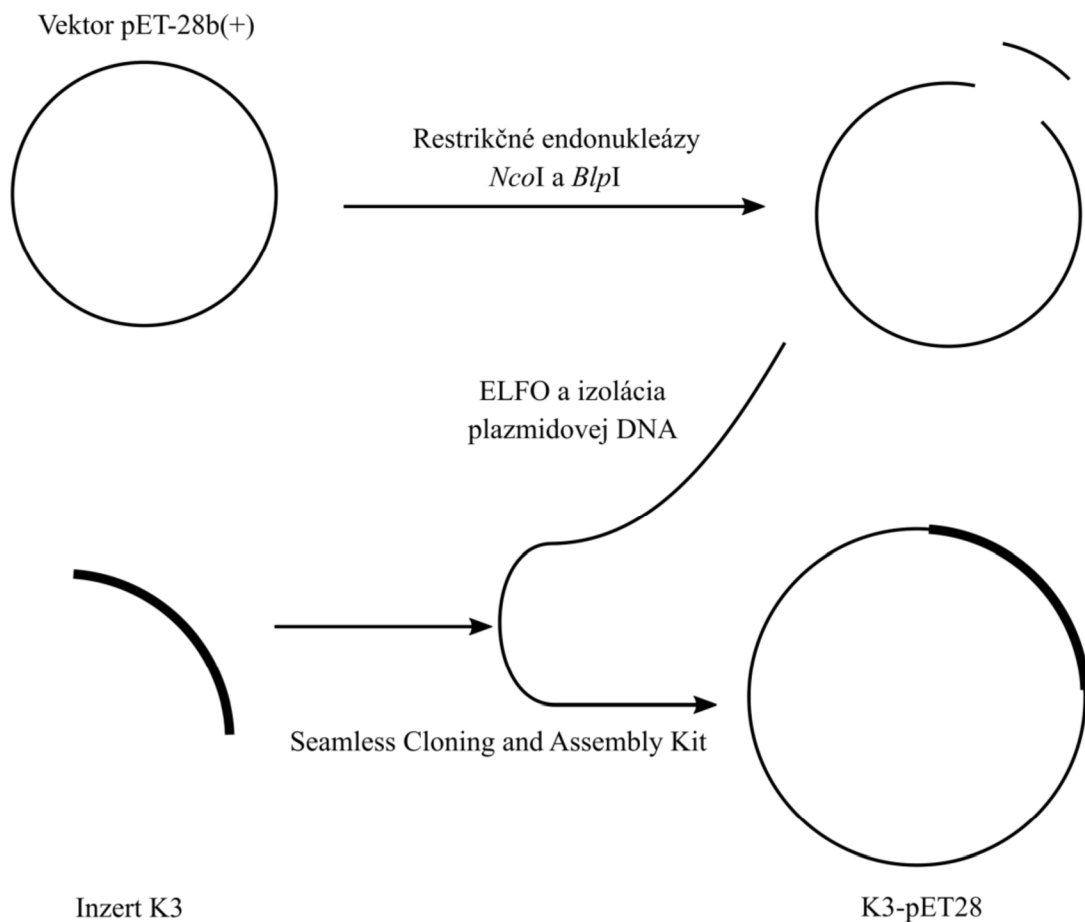
$$x \text{ ng inzert} = \frac{2 \times (\text{bp inzert}) \times (100 \text{ ng linearizovaný plazmid})}{(\text{bp linearizovaný plazmid})}$$

$$x \text{ ng inzert} = \frac{2 \times (1556 \text{ bp inzert}) \times (100 \text{ ng linearizovaný plazmid})}{(5152 \text{ bp linearizovaný plazmid})}$$

Obr. č. 6: Vzorec a výpočet hmotnosti inzertu potrebného pre reakciu

Do mikroskúmavky bola pipetovaná vzorka obsahujúca linearizovaný plazmid tak, aby sa v reakcii nachádzalo 100 ng (keďže zmeraná koncentrácia vyizolovanej

plazmidovej DNA predstavovala 11,025 ng/ μ l, do reakcie bolo pridaných 9 μ l). Pridané boli 4 μ l pufru 5x Reaction Buffer a 2 μ l deionizovanej vody, aby celkový objem reakcie predstavoval 18 μ l a ako posledné boli pridané 3 μ l roztoku inzertu podľa výpočtu potrebného objemu. Po zmiešaní všetkých zložiek potrebných na reakciu boli pridané 2 μ l 10x Enzyme Mix, zmes bola opatrne premiešaná a inkubovaná 30 min pri izbovej teplote. Vzniknutý K3-pET28 (Obr. č. 7) bol následne transformovaný do chemicko-kompetentných buniek.



Obr. č. 7: Schéma postupu pri tvorbe rekombinantnej DNA molekuly K3-pET28; zvýraznený úsek predstavuje inzert K3

4.4.5 Transformácia K3-pET28 do buniek *E. coli* DH5 α

Rekombinantná molekula DNA, K3-pET28 bola transformovaná do kompetentných buniek *E. coli* DH5 α . V prípade pozitívnej transformácie do buniek na

médium LB + K rástli len baktérie obsahujúce plazmid pET-28-b(+), nakoľko je v ňom zakódovaný gén pre rezistenciu voči kanamycínu.

8 μ l zo zmesi pripravenej v kapitole 4.4.4 bolo pridaných k 50 μ l buniek *E. coli* DH5 α , ktoré boli vopred rozmrazené na ľade a obsah skúmavky bol poklepaním na stenu skúmavky opatrne premiešaný, zmes bola vrátená na ľad a inkubovaná 30 min. Po inkubácii boli bunky umiestnené na 30 s do termobloku zahriateho na 42 °C, čím došlo k teplotnému šoku. Po zahriatí boli opäť umiestnené na ľad a bolo k nim pridaných 950 μ l S.O.C. média. Zmes bola inkubovaná 1 h pri teplote 37 °C za stáleho miešania na trepačke pri 200 rpm.

Na tri Petriho misky obsahujúce agar LB + K bola po 1h inkubácii zmes nanesená v rôznych koncentráciách (1 kvapka zmesi, na druhú 3 kvapky a na tretiu zvyšný objem skúmavky). Bunky boli rovnomerne rozotreté po povrchu média bakteriologickou hokejkou. Štvrtá miska slúžila ako negatívna kontrola. Misky boli umiestnené do inkubátora agarom nahor a boli inkubované cez noc pri teplote 37 °C.

4.4.6 Izolácia plazmidovej DNA z *E. coli* DH5 α

Príprava vzoriek na izoláciu DNA

Do siedmich skúmaviek bolo napipetovaných 5 ml tekutého autoklávaného média LB + K. Do 6 z nich bolo pridané po 1 kolónii baktérií K3-pET28 *E. coli* DH5 α z agarových platní inkubovaných na LB + K agare cez noc (každá kolónia predstavovala 1 klon), 7. skúmavka slúžila ako negatívna kontrola a obsahovala samotné LB + K. Skúmavky boli inkubované pri teplote 37 °C za stáleho miešania pri 125 rpm cez noc. Po inkubácii bolo zo skúmaviek odpipetované po 2 ml a tieto vzorky boli centrifugované 10 min pri 3000 g. Supernatant bol odsatý a z peletu bola izolovaná plazmidová DNA.

Izolácia plazmidovej DNA

Plazmidová DNA bola z buniek *E. coli* DH5 α izolovaná pomocou kitu NucleoSpin® Plasmid (NoLid), Mini kit. Pracovný postup bol vykonaný podľa protokolu Plasmid DNA purification User manual (MACHEREY-NAGEL, 2019). Všetky centrifugácie prebiehali pri laboratórnej teplote a preťažení 11000 g.

Pri použití tohto kitu bol pelet baktérii resuspendovaný pomocou pufru A1 s pridanou RNázou A. Plazmidová DNA bola z buniek uvoľnená SDS/alkalickou lýzou pomocou pufru A2. Lyzát bol neutralizovaný pomocou pufru A3, ktorý vytvoril vhodné podmienky pre naviazanie plazmidovej DNA na silikónovú membránu kolóny. Soli, metabolity a rozpustené makromolekulárne bunkové zložky, ktorými bola vzorka DNA kontaminovaná, boli z kolóny odstránené pufrom A4 s prídavkom etanolu. Plazmidová DNA bola následne eluovaná za podmienok nízkeho pôsobenia iónových síl.

K peletu bolo pridaných po 250 μ l pufru A1. Vortexovaním došlo k resuspendácii peletu a následne bolo pridaných po 250 μ l pufru A2 (modrej farby). Skúmavky boli 8x prevrátené, čím sa ich obsah premiešal a následne boli inkubované 5 min pri izbovej teplote. Pridaných bolo 300 μ l pufru A3 a skúmavky boli opäť 8x premiešané prevrátením, až kým nedošlo k vyzrážaniu (odfarbenie vzoriek - kontrola lyzačného procesu).

Skúmavky boli 10 min centrifugované a následne bol supernatant dekantovaný na kolónu vloženú do mikroskúmavky. Kolóna bola centrifugovaná 1 min. Obsah skúmavky pretečený kolónou bol vyliaty a bolo pridaných 600 μ l pufru A4. Kolóna bola centrifugovaná 1 min a obsah skúmavky bol vyliaty. Na vysušenie membrány kolóny bola kolóna dodatočne centrifugovaná 2 min. DNA bola eluovaná do čistej mikroskúmavky pridaním 30 μ l sterilnej ddH₂O, 1min inkubáciou pri laboratórnej teplote a následnou 1min centrifugáciou. Získaná plazmidová DNA bola následne použitá na restričnú analýzu. Získané klony boli označené (1–6)-K3-pET28.

4.4.7 Restričná analýza plazmidu K3-pET28 v DH5 α bunkách *E. coli*

Na overenie, či bol inzert správne zaklonovaný do plazmidu boli vybraté restričné endonukleázy (Tabuľka č. 4, Obr. č. 8), ktoré štiepili DNA v špecifických miestach. Restričnou analýzou bolo overené, či došlo k správne zaklonovaniu v prípade 6 klonov získaných predchádzajúcim postupom v kapitole 4.4.4 a 4.4.5. Na základe toho boli následnou elektroforetickou separáciou v agarózovom géli oddelené fragmenty DNA s očakávanou dĺžkou (počtom bázových párov), podľa zodpovedajúcich restričných miest daných enzýmov. Na zabezpečenie optimálnych podmienok pre požadovanú aktivitu restričných enzýmov boli použité pufre a hovädzí sérový albumín

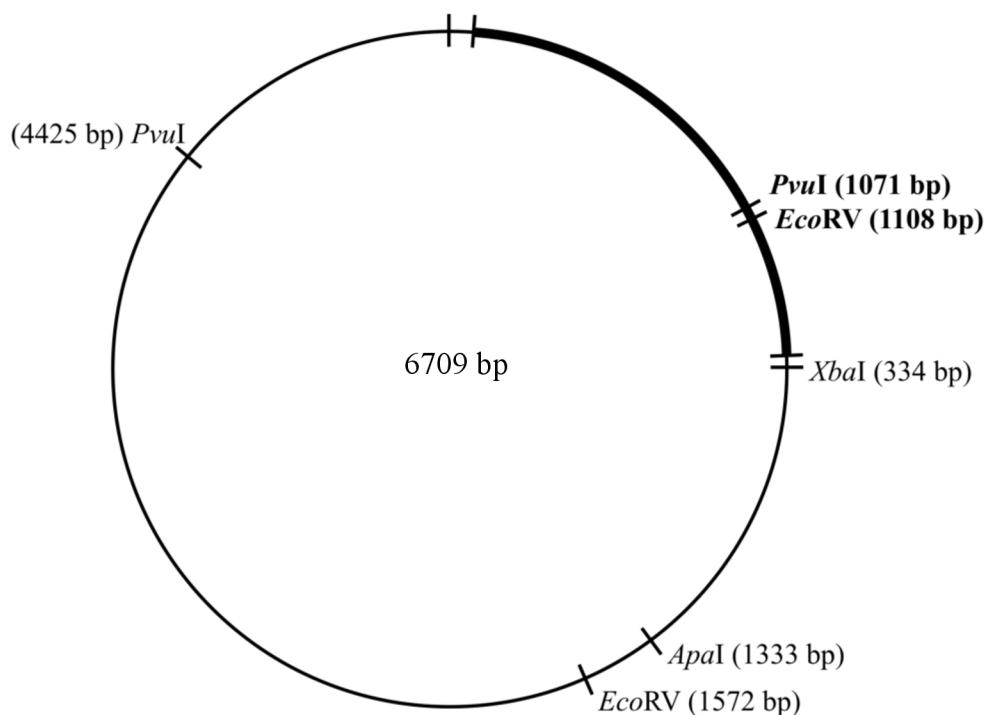
(BSA). Pri použití enzýmov *EcoRV* a *PvuI* sa jednalo o NEBuffer™ 3 a v prípade enzýmu *XbaI* a zmesi enzýmov *XbaI* + *ApaI* bol použitý pufer NEBuffer™ 4.

Podľa Tabuliek č. 5 a 6 boli enzýmy, pufer, BSA a voda spoločne pipetované do mikroskúmavky, tak, aby celkový objem predstavoval 98 µl (objem potrebný na 7 reakcií, z toho 6 bolo použitých pre restrikciu plazmidovej DNA a 7. pre prípadné straty pri pipetovaní). Zmes bola rozpipetovaná do ďalších mikroskúmaviek tak, aby objem v každej predstavoval 14 µl. Do 6 skúmaviek so 14 µl zmesi bol následne pridaný 1 µl vzoriek DNA a zmes bola 3 h inkubovaná pri 37 °C.

Tabuľka č. 4: Restrikčné endonukleázy použité na restrikčnú analýzu K3-pET28

| Restrikčná endonukleáza | Restrikčné miesto (5' → 3') | Poloha restrikčného miesta vo vektore [bp] | Poloha restrikčného miesta v inzerte [bp] |
|--------------------------------|------------------------------------|---|--|
| <i>ApaI</i> | GGGCC C | 1333 | – |
| <i>EcoRV</i> | GAT ATC | 1572 | 1108 |
| <i>PvuI</i> | CGAT CG | 4425 | 1071 |
| <i>XbaI</i> | T CTAGA | 334 | – |

(| = miesto štiepenia daným restrikčným enzýmom)



Obr. č. 8: Schéma restričného štiepenia plazmidu K3-pET28 (zvýraznené sú restričné miesta v inzerte)

Tabuľka č. 5: Príprava reakčnej zmesi pre restričnú analýzu K3-pET28 pomocou enzýmov *EcoRV*, *PvuI* a *XbaI*

| Zložka reakcie | Koncentrácia | | 15µl reakcia [µl] | 98µl reakčná zmes [µl] |
|---|-----------------|--------------------|-------------------|------------------------|
| | Pracovný roztok | Konečná | | |
| ddH₂O | – | – | 11,95 | 83,65 |
| Pufer | 10x | 1x | 1,5 | 10,5 |
| BSA | 100x | 1x | 0,15 | 1,05 |
| Enzým (<i>EcoRV</i>/<i>PvuI</i>/<i>XbaI</i>) | 20/10/20 U/µl | 8/4/8 U/reakcia | 0,4 | 2,8 |
| DNA | 30 ng/µl | 30 ng/reakcia | 1 | – |

Tabuľka č. 6: Príprava reakčnej zmesi pre restriktívnu analýzu K3-pET28 pomocou enzýmov *XbaI* + *ApaI*

| Zložka reakcie | Koncentrácia | | 15µl reakcia [µl] | 98µl reakčná zmes [µl] |
|------------------------------|-----------------|---------------|-------------------|------------------------|
| | Pracovný roztok | Konečná | | |
| ddH₂O | – | – | 11,55 | 80,85 |
| Pufer | 10x | 1x | 1,5 | 10,5 |
| BSA | 100x | 1x | 0,15 | 1,05 |
| Enzým 1 (<i>XbaI</i>) | 20 U/µl | 8 U/reakcia | 0,4 | 2,8 |
| Enzým 2 (<i>ApaI</i>) | 50 U/µl | 20 U/reakcia | 0,4 | 2,8 |
| DNA | 30 ng/µl | 30 ng/reakcia | 1 | – |

4.4.8 Elektroforetická separácia jednotlivých fragmentov po restrikcii v agarózovom géli

Rovnakým postupom ako v prípade kapitoly 4.4.2 bol pripravený 1% agarózový gél. Do každej mikroskúmavky so vzorkou bolo pridaných 2,6 µl nanášacieho pufru Gel Loading Dye, Purple (6x), no SDS, vzorky s pufrom boli premiešané pipetovaním nahor a nadol a následne nanosené do jednotlivých jamiek. Do krajných jamiek v agarózovom géli bolo pipetovaných 5 µl markeru relatívnej molekulovej hmotnosti Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder. Elektroforetická separácia prebiehala 40 min pri napätí 160 V. Gél bol za stáleho miešania na trepačke pri 80 rpm farbený pomocou roztoku GelRed® a následne pozorovaný pomocou dokumentačného systému G-box, program: GeneSys. Pre ďalšiu prácu bol vybraný jeden zo šiestich klonov, 5-K3-pET28.

4.4.9 Transformácia plazmidu do buniek *E. coli* BL21 (DE3), izolácia DNA a restriktívna analýza

Pri vybranom klone, kde bola predchádzajúcou restriktívnou analýzou overená prítomnosť rekombinantnej molekuly DNA, bola zmeraná koncentrácia DNA. Podľa zistenej koncentrácie bola k rozmrazeným bunkám *E. coli* BL21 (DE3) pridaná plazmidová DNA tak, aby jej množstvo predstavovalo 40 ng (zmeraná koncentrácia

predstavovala 10 ng/ μ l, k bunkám boli pridané 4 μ l vzorky). Zmes bola 30 min inkubovaná na ľade, následne zahriata pomocou termobloku predhriateho na teplotu 42 °C, čím došlo k teplotnému šoku a po 10 sekundách boli bunky vrátené na ľad, kde k nim bolo pridaných 250 μ l S.O.C. média. Zmes bola inkubovaná 1 h pri teplote 37 °C za stáleho miešania na trepačke pri 200 rpm. Vzorky boli nanesené na Petriho misky s LB + K agarom rovnako, ako v kapitole 4.4.5 a inkubované cez noc pri teplote 37 °C.

Po inkubácii cez noc boli odobraté kolónie do tekutého média LB + K, následne boli kultivované a vzorky boli pripravené na izoláciu plazmidovej DNA. Tento postup aj so samotnou izoláciou bol vykonaný rovnako ako v kapitole 4.4.6 s rozdielom, že po naviazaní plazmidovej DNA zo vzorky na kolónu bol pridaný premývací krok s pufrom AW a kolóna bola centrifugovaná 1 min pri 11000 g, následne bol obsah skúmavky vyliaty a pracované bolo opäť podľa predchádzajúceho postupu.

Na overenie transformácie plazmidu do buniek boli použité restriktčné endonukleázy rovnako ako v kapitole 4.4.7 a pracované bolo rovnakým postupom. Vzorky boli následne odoslané na sekvenáciu firmou SEQme.

4.4.10 Produkcia rekombinantného proteínu K3 pomocou buniek *E. coli* kmeň BL21 (DE3)

Po overení, že bunky *E. coli* BL21 (DE3) boli transformované plazmidom K3-pET28, bola zameraná koncentrácia izolovanej plazmidovej DNA vo vzorkách a následne boli vybrané klony 5/1-K3-pET28, 5/2-K3-pET28 a 5/4-K3-pET28, pri ktorých bolo potrebné overiť produkciu rekombinantného proteínu K3. Pred samotnou indukciou expresie bol optimalizovaný postup, pri ktorom bolo pozorované, ako rýchlo sa baktérie množia a hodnota OD₆₀₀ dosiahne 0,6, kedy baktérie budú v exponenciálnej fáze rastu.

0,1 ml kultúry bol pridaný k 5 ml LB + K a kultivovaný cez noc pri 37 °C a 125 rpm. Týmto spôsobom boli pripravené tri skúmavky a štvrtá, kontrola obsahovala médium LB + K. Druhý deň bola zameraná absorbancia, ktorá musela byť cca 1-1,2 a vzorka bola nariadená do 5 ml média tak, aby OD₆₀₀ bolo 0,1. Bunky boli kultivované pri 37 °C, 125 rpm a bola meraná absorbancia každých 30 min, až pokiaľ hodnota OD₆₀₀ nedosiahla 0,6, kedy sú bunky v exponenciálnej fáze rastu a je možné k nim pridať IPTG. Ako blank bol v prípade meraní použitý 1 ml LB média.

Po optimalizácii boli na druhý deň dané klony rovnakým spôsobom kultivované a po 3 hodinách, kedy dosiahla hodnota meraného OD_{600} 0,6, bolo k baktériám pridaných 50 μ l IPTG (koncentrácia pracovného roztoku bola 100 mmol/l a požadovaná koncentrácia pre indukciu expresie bola 1 mmol/l), čím došlo k indukcii expresie klonovaných génov. OD_{600} vzorky bolo od pridaní IPTG merané po 1 h, 3 h a po 4,5 h. Ako kontrola boli použité bunky bez IPTG, v prípade ktorých bolo OD_{600} merané po 3 a 4,5 h.

Zo skúmaviek bolo po 1 h, 3 h a 4,5 h odobraných po 100 μ l kultúry a 10 min centrifugovaných pri 8000 g. Supernatant obsahujúci médium bol odsatý, pelet bol resuspendovaný v 100 μ l PBS, opäť sцентрифugovaný a supernatant bol odsatý, čím došlo k premytiu. Následne bol pelet znovu resuspendovaný v 50 μ l PBS a k tomu bolo pridaných 50 μ l 2x SDS. Vzorky boli odložené pre následnú detekciu proteínu K3 SDS-PAGE elektroforézou a imunodetekciu pomocou western blotu. Pomocou týchto metód bola okrem rýchlosti produkcie rekombinantného proteínu porovnaná aj schopnosť produkcie K3 u jednotlivých klonov. Následne, po overení produkcie K3 boli vybrané klony zamrazené pri teplote -80 °C, pričom pred zmrazením bolo k 0,85 ml bunkovej kultúry pridaných 0,15 ml glycerolu. Takto bolo pripravených 6 skúmaviek a uchovaných pre ďalšiu prácu.

4.4.11 SDS-PAGE elektroforéza

Podľa očakávanej relatívnej molekulovej hmotnosti rekombinantného proteínu K3 bola zvolená koncentrácia deliaceho gélu 10 %. Pomocou 2x SDS došlo k denaturácii proteínu, ktorý získal záporný náboj. Následne sa v géli pohyboval pôsobením jednosmerného elektrického prúdu určitou rýchlosťou na základe relatívnej molekulovej veľkosti, v dôsledku čoho došlo k separácii od ostatných zložiek vzorky.

Príprava polyakrylamidového gélu

Bola zostavená aparatúra na prípravu polyakrylamidového gélu, použité bolo sklo s hrúbkou 0,75 mm. Deliaci 10% gél bol pripravený podľa Tabuľky č. 7 a pomocou pipety bol naliaty medzi sklá do výšky približne 2/3 skla a prevrstvený *N*-butanolom, čím

došlo k odstráneniu bublín a vyrovnaniu hladiny gélu. Po stuhnutí gélu bol *N*-butanol opláchnutý ddH₂O a prebytočná voda bola odsatá pomocou filtračného papiera.

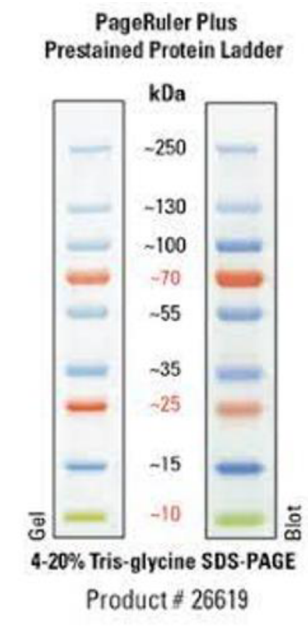
4% zaostrovací gél bol pripravený podľa Tabuľky č. 7. Po pridaní všetkých zložiek bol napipetovaný medzi sklá nad vrstvu deliaceho gélu až po okraj a následne bol pridaný hrebienok. Po stuhnutí gélu bol hrebienok odstránený a stuhnutý gél bol vložený do elektroforetickej komôrky.

Tabuľka č. 7: Príprava deliaceho a zaostrovacieho gélu na SDS-PAGE

| Zloženie 10% deliaceho gélu | |
|--|---------|
| 30% akrylamidbisakrylamid | 5 ml |
| 4x Tris pufer pH 8,8 | 3,75 ml |
| ddH ₂ O | 6,25 ml |
| APS | 75 µl |
| TEMED | 15 µl |
| Zloženie 4% zaostrovacieho gélu | |
| 30% akrylamidbisakrylamid | 1,3 ml |
| 4x Tris pufer pH 6,8 | 2,5 ml |
| ddH ₂ O | 6,2 ml |
| APS | 50 µl |
| TEMED | 10 µl |

Elektroforetická separácia

Vzorky získané v postupe 4.4.10. boli denaturované vložением do termobloku zahriateho na 95 °C po dobu 10 min. Do krajných jamiek v géli boli pipetované 3 µl markeru relatívnej molekulovej hmotnosti PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (Obr. č. 9) a do ďalších jamiek bolo pipetovaných 10 µl vzoriek. Elektroforetická separácia prebiehala 1,5 h pri napätí 140 V.



Obr. č. 9: Marker relativnej molekulovej hmotnosti PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (prevzaté z: www.thermofisher.com)

Farbenie pomocou Coomassie Brilliant Blue

Gél bol vložený na 30 min do fixačného roztoku, kde bol za stáleho miešania na trepačke pri 160 rpm fixovaný. Roztok bol vyliaty a gél bol na trepačke 30 min farbený pomocou Coomassie Brilliant Blue. Gél bol odfarbovaný výmenou odfarbovacieho pufru každých 30 min za stáleho miešania a následne ponechaný cez noc v odfarbovacom roztoku, čím boli odstránené zvyšky farby. Gél bol oskenovaný a na základe vytvorených bandov boli vyhodnotené výsledky izolácie rekombinantného OspA proteínu.

4.4.12 Western-blot

Separované proteíny SDS-PAGE elektroforézou boli v blotovacom zariadení pôsobením jednosmerného elektrického prúdu z gélu prenesené na PVDF membránu. Pomocou špecifickej protilátky Penta · His HRP Conjugate, ktorá sa viaže na His-tag proteínov a je konjugovaná s enzýmom chrenová peroxidáza, boli tieto proteíny obsahujúce His-tag vizualizované chemiluminiscenčným farbivom SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate, ktoré sa skladá z 2 zložiek, peroxidu a luminolu.

Pôsobením chrenovej peroxidázy konjugovanej s protilátkou naviazanou na His-tagoch došlo k reakcii so substrátom v chemiluminiscenčnom farbive a tým bola umožnená detekcia proteínov.

PVDF membrána bola aktivovaná namočením do metanolu. Metanol bol odliaty naspäť a membrána bola zaliata Towbinovým transférovým pufrom a umiestnená na trepačku, kde bola miešaná pri 160 rpm. Do Towbinovho transférového pufru boli namočené aj blotovacie papiere približne 30 min pred začatím blotovania. Z gélu získaného elektroforetickou separáciou bola odstránená časť so zaostrovacím gélom a deliaci gél so separovanými proteínmi bol taktiež vložený do Towbinovho pufru.

V blotovacom zariadení boli zostavené jednotlivé časti tak, že spodnú vrstvu tvoril blotovací papier, naň bola položená membrána a gél a na vrch bol opäť položený blotovací papier. Spomedzi vrstiev boli vytlačené vzduchové bubliny a boli preliate malým množstvom Towbinovho pufru. Blotovanie prebiehalo 1 h pri konštantnom prúde 80 mA a maximálnom napätí 20 V.

Po skončení blotovania bola membrána pinzetou opatrne vybraná a vložená cez noc do 20 ml blokovacieho pufru SuperBlock™ Blocking Buffer in PBS + 0,05% Tween 20 na trepačku za stáleho miešania pri 160 rpm pri 4 °C, čím sa zabránilo nešpecifickým väzbám protilátok na membránu. Potom bola pridaná protilátka anti-Penta · His HRP Conjugate v pomere 1:20000 a 1 h inkubovaná s membránou pri laboratórnej teplote za stáleho miešania na trepačke pri 160 rpm. Následne bola membrána oplachovaná 4x po 20 min v pufri 1x PBS + 0,05% Tween a 2x po 20 min premytá v roztoku 1x PBS. Po premytí membrány boli pridané 4 ml chemiluminiscenčného farbiva, ktorého zložky boli zmiešané v pomere 1:1 a tým boli proteíny vizualizované.

4.4.13 Kultivácia buniek pred izoláciou rekombinantného proteínu K3

1 ml kultúry *E. coli*, kmeň BL21 (DE3) obsahujúcich 5/4-K3-pET28 bol kultivovaný cez noc v 100 ml LB + K pri 37 °C a 125 rpm. Druhý deň bola zmeraná absorbancia, ktorá musela byť cca 1–1,2 a vzorka bola nariadená do 1 l LB + K tak, aby OD₆₀₀ bolo 0,1. Následne bolo postupované rovnako ako v kapitole 4.4.9.

Po 4,5 h bol 1 l kultúry odliatím rozdelený na polovicu a 15 min centrifugovaný na veľkoobjemovej centrifúge pri teplote 4 °C a 8000 g, čím boli bunky oddelené od

média. Supernatant bol odliaty a pelet resuspendovaný v 30 ml pufrí 1x PBS a opäť centrifugovaný. Pelet bol uskladnený pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.14 Izolácia rekombinantného proteínu K3 za natívnych podmienok

Príprava vzorky na izoláciu rekombinantného proteínu

Pelet buniek *E. coli* BL21 (DE3) obsahujúci proteín K3 bol pred prácou rozmrazený, odvážený a resuspendovaný v natívnom lyzačnom pufrí tak, že na 1 g peletu bolo pridaných 10 ml lyzačného pufru. Na lýzu buniek bola využitá sonikácia, kedy došlo k rozrušeniu bunkových štruktúr pôsobením ultrazvukových vln. Lyzát bol 15x sonikovaný po 15 s, pričom medzi jednotlivými sonikáciami bol umiestnený 1–2 min na ľade, aby nedošlo k prehrievaniu vzoriek. Po sonikácii bol lyzát 10 min centrifugovaný pri teplote $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 8000 g. Supernatant bol použitý na separáciu Ni-NTA chromatografiou a pelet bol uchovaný pre použitie pri elektroforetickej separácii.

Izolácia rekombinantného proteínu K3 pomocou Ni-NTA chromatografie

Ni-NTA chromatografiou boli na kolóne zachytené proteíny obsahujúce His-tag, kedy došlo k väzbe imidazolového kruhu v štruktúre histidínu na nikelnaté ióny, po premytí kolóny a odstránení nešpecificky sa viazajúcich proteínov boli zachytené proteíny eluované pomocou pufru s vysokým obsahom imidazolu (QIAGEN, 2003).

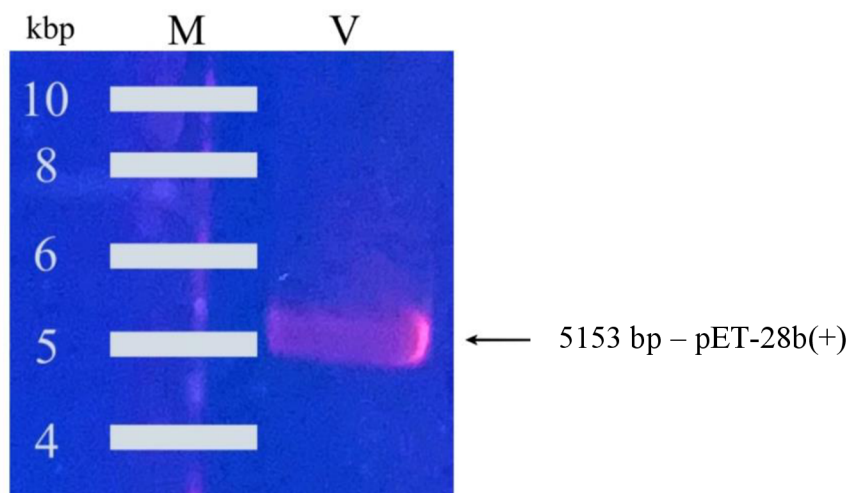
Na 10 ml supernatantu bol pridaný 1 ml Ni-NTA agarózy a zmes bola 30 min miešaná pomocou trepačky pri teplote $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prázdna chromatografická kolóna umiestnená v chladenom inkubátore pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bola ekvilibrovaná 10 ml deionizovanej vody. Zmes supernatantu s Ni-NTA agarózou bola po 30 min miešania nanosená na kolónu. Po pretečení kolónou bol obsah zbernej kadičky nanosený na kolónu znovu, pričom po opätovnom pretečení bol uchovaný na neskoršiu analýzu.

Kolóna bola 2x premytá pomocou natívneho premývacieho pufru a pufer pretečený kolónou bol zakaždým odložený na neskoršiu analýzu. Z kolóny boli eluované proteíny pomocou 2 ml natívneho elučného pufru na 1 g buniek, pričom boli zbierané 4 frakcie po 0,5 ml, ktoré boli použité pre detekciu SDS-PAGE elektroforézou a western-blotom. Zo vzoriek získaných Ni-NTA chromatografiou bolo odobratých 20 μl

a zmiešaných s 20 μ l 2x SDS pre elektroforézu a vzorky boli denaturované vloženíím do termobloku zahriateho na 95 °C po dobu 10 min. Do krajných jamiek v géli boli pipetované 3 μ l markeru relatívnej molekulovej hmotnosti a do ďalších jamiek bolo pipetovaných 10 μ l vzoriek: resuspendovaný lyzovaný pelet (P), lyzát buniek pretečený kolónou (FT), premývaci pufer pretečený kolónou po prvom a druhom premývaní (W1 a W2), jednotlivé frakcie získané elúciou (E) a pozitívna kontrola obsahujúca rekombinantné OspA proteíny. Následný postup bol vykonaný podľa kapitol 4.4.11 a 4.4.12.

5 VÝSLEDKY

Aby bolo možné zaklonovať inzert, plazmid pET-28b(+) bol linearizovaný pomocou restriktčných endonukleáz *NcoI* a *BlpI*, tak, aby došlo k vzniku lepivých koncov komplementárnych so sekvenciou inzertu. Restriktčným štiepením bol získaný lineárny fragment DNA s dĺžkou 5153 bp. Od zvyšného fragmentu s dĺžkou 215 bp bol elektroforézou v agarovom géli separovaný a pozorovaný pomocou UV transiluminátora (Obr. č. 10). Podľa vzdialenosti zistenej separáciou bol zo zvyšnej časti gélu vyrezaný úsek obsahujúci plazmidovú DNA, ktorá bola izolovaná. Hmotnosť vyrezanej časti gélu s plazmidom bola zistená ako 310 mg a tento údaj bol použitý pri izolácii, kedy bolo k vzorke pridaných 930 μ l pufru QG (viď: Materiál a metódy, kapitola 4.4.3). Následne bola zmeraná koncentrácia potrebná pre ďalší postup pri klonovaní, pričom bolo zistené, že izolovaná plazmidová DNA mala koncentráciu 11,025 ng/ μ l a čistotou (A_{260}/A_{280}) 1,703.



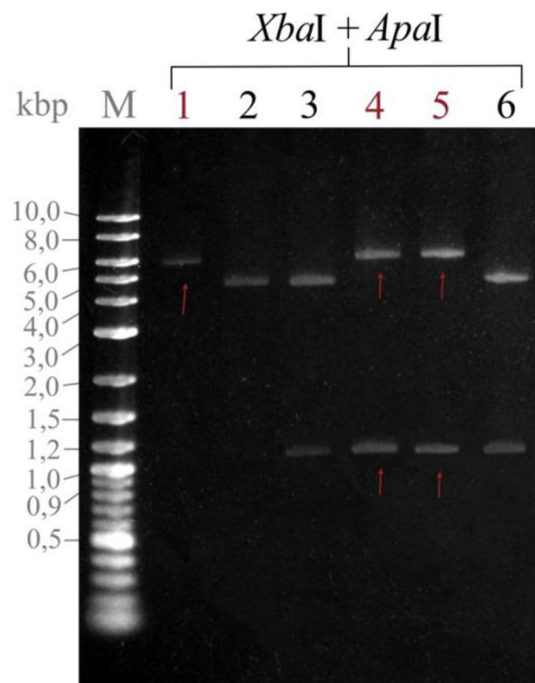
Obr. č. 10: Elektroforetická separácia lineárneho fragmentu plazmidovej DNA vektora pET-28b(+) po štiepení restriktčnými endonukleázami *NcoI* a *BlpI*; M – marker Quick-Load[®] Purple 1 kb Plus DNA Ladder (presnejší popis markeru viď: Materiál a metódy, kapitola 4.4.2); V – vzorka DNA; šípka značí linearizovaný plazmid pET-28b(+)

Inzert K3 bol zaklonovaný pomocou kitu GeneArt[®] Seamless Cloning and Assembly Kit a následne boli vzniknutým rekombinantným plazmidom transformované kompetentné bunky *E. coli*, kmeň DH5 α . Po kultivácii na agare LB + K, kedy bol na jednotlivé misky s agarom nanosený rôzny objem bakteriálnej kultúry, všetky misky

obsahovali kolónie baktérií v odlišnom množstve. Rast baktérií značil úspešnosť transformácie vďaka rezistencii voči kanamycínu kódovanej v plazmide pET-28b(+). Z baktérií bola izolovaná DNA a pre overenie správneho zaklonovania bola vykonaná restričná analýza plazmidu K3-pET28 zvolenými restričnými endonukleázami. Na základe štiepných miest v plazmide a inzerte boli vypočítané očakávané dĺžky jednotlivých fragmentov DNA (Tabuľka č. 8). Bolo zistené, že k správному zaklonovaniu došlo v prípade klonov 1-K3-pET28, 4-K3-pET28 a 5-K3-pET28 (Obr. č. 11 a 12), kedy dĺžky fragmentov v géli zodpovedali očakávaným.

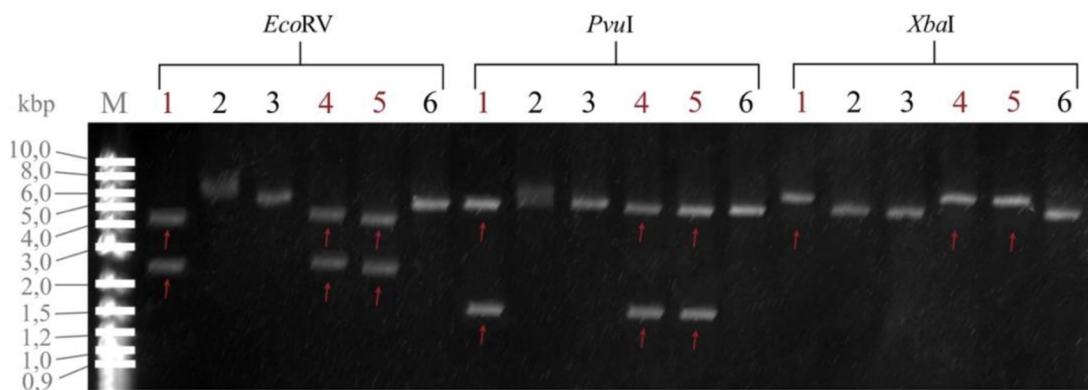
Tabuľka č. 8: Očakávané fragmenty DNA po restričnej analýze plazmidu K3-pET28

| Restričné endonukleázy | Dĺžka fragmentov DNA [bp] | |
|-----------------------------|---------------------------|------|
| <i>Xba</i> I + <i>Apa</i> I | 5710 | 999 |
| <i>Eco</i> RV | 4324 | 2385 |
| <i>Pvu</i> I | 5201 | 1508 |
| <i>Xba</i> I | 6709 | – |



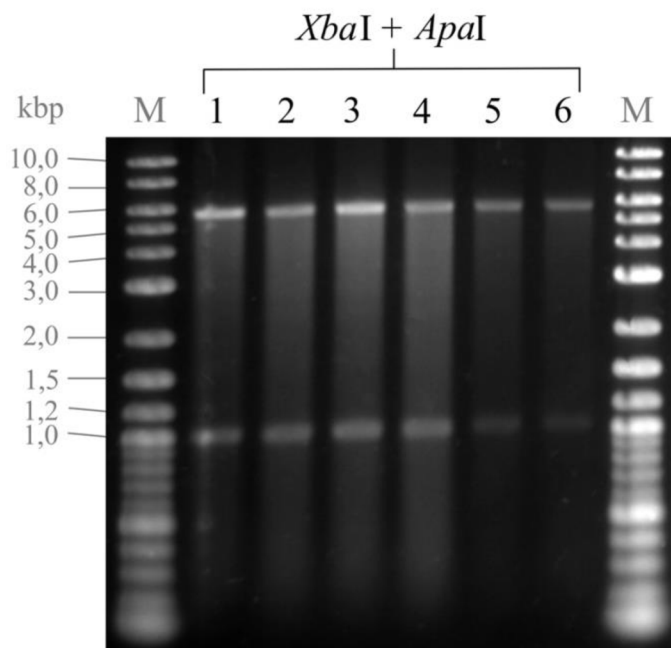
Obr. č. 11: Restričná analýza plazmidu K3-pET28 izolovaného z *E. coli*, kmeň DH5 α za použitia zmesi enzýmov *Xba*I + *Apa*I; M – marker Quick-Load[®] Purple 1 kb Plus DNA Ladder (presnejší popis markeru vid': Materiál a metódy, kapitola 4.4.2), 1–6 – vzorky

DNA izolovanej z jednotlivých klonov (1–6)-K3-pET28 štiepené restriktčnými endonukleázami *Xba*I + *Apa*I; červenou farbou a šípkami sú označené vzorky, v prípade ktorých došlo k správne zaklonovaniu

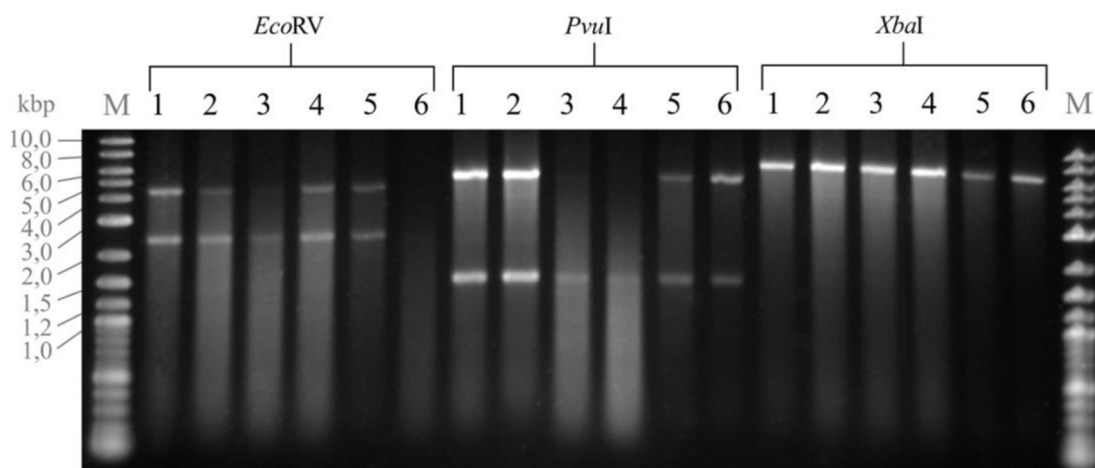


Obr. č. 12: Restriktčná analýza plazmidu K3-pET28 izolovaného z *E. coli*, kmeň DH5 α za použitia enzýmov *EcoRV*, *PvuI* a *XbaI*; M – marker Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder (presnejší popis markeru viď: Materiál a metódy, kapitola 4.4.2), 1–6 – vzorky DNA izolovanej z jednotlivých klonov (1–6)-K3-pET28 štiepené restriktčnými endonukleázami *EcoRV*, *PvuI* a *XbaI*; červenou sú označené vzorky, v prípade ktorých došlo k správne zaklonovaniu

Pre ďalší postup bola zvolená DNA klonu 5-K3-pET28, kedy zmeraná koncentrácia DNA vo vzorke predstavovala 10 ng/ μ l. Po transformácii buniek *E. coli* kmeň BL21 (DE3), ich kultivácii a izolácii DNA bola opäť vykonaná restriktčná analýza, rovnako ako v predchádzajúcom prípade. Na základe získaných elektroforetogramov bolo zistené, že v prípade všetkých klonov 5/(1-6)-K3-pET28 bola izolovaná plazmidová DNA a bunky boli transformované správne (Obr. č. 13 a 14). Vzorky boli overené aj sekvenáciou a pre produkciu proteínu K3 boli následne zvolené klony 5/1-K3-pET28, 5/2-K3-pET28 a 5/4-K3-pET28.



Obr. č. 13: Restričná analýza plazmidu 5-K3-pET28 izolovaného z *E. coli*, kmeň BL21 za použitia zmesi enzýmov *XbaI* + *ApaI*; M – marker Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder (presnejší popis markeru vid’ Materiál a metódy, kapitola 4.4.2), 1–6 – vzorky DNA izolovanej z jednotlivých klonov 5/(1–6)-K3-pET28 štiepené restriknými endonukleázami *XbaI* + *ApaI*



Obr. č. 14: Restričná analýza plazmidu K3-5-pET28 izolovaného z *E. coli*, kmeň BL21 za použitia enzýmov *EcoRV*, *PvuI* a *XbaI*; M – marker Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder (presnejší popis markeru vid’ Materiál a metódy, kapitola 4.4.2), 1–6 – vzorky DNA izolovanej z jednotlivých klonov 5/(1–6)-K3-pET28 štiepené restriknými endonukleázami *EcoRV*, *PvuI* a *XbaI*

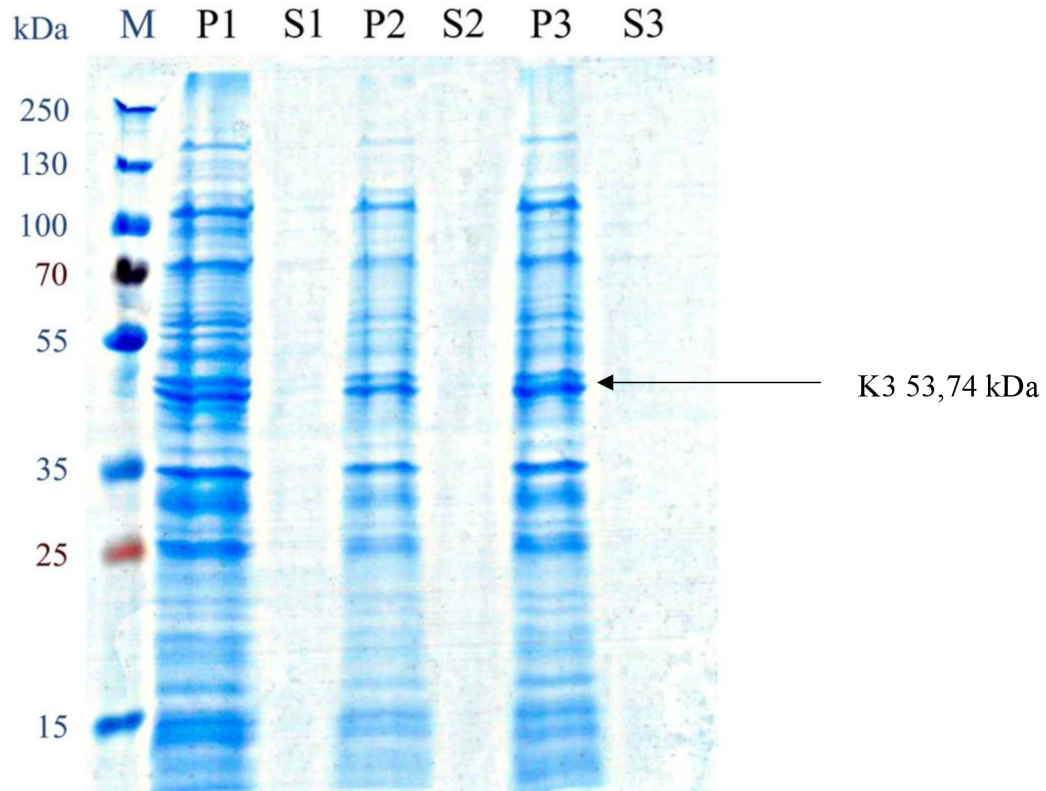
Pred samotnou kultiváciou buniek pre produkciu K3 proteínu a ich indukciou bola vykonaná optimalizácia postupu, pri ktorej bola každú pol hodinu meraná absorbancia vzorky (OD_{600}) (Tabuľka č. 9), čím bola zistená rýchlosť rastu baktérií. Po pridaní IPTG bola naďalej meraná absorbancia, pokiaľ hodnota OD_{600} nedosiahla 1, kedy by sa vo vzorke malo nachádzať dostatočné množstvo proteínov. Odobraním vzoriek v rôznom čase bola pomocou western blotu zistená rýchlosť produkcie proteínu K3.

Tabuľka č. 9: Hodnoty OD_{600} namerané pri optimalizácii postupu kultivácie buniek *E. coli* BL21 (DE3) pre produkciu rekombinantného proteínu K3

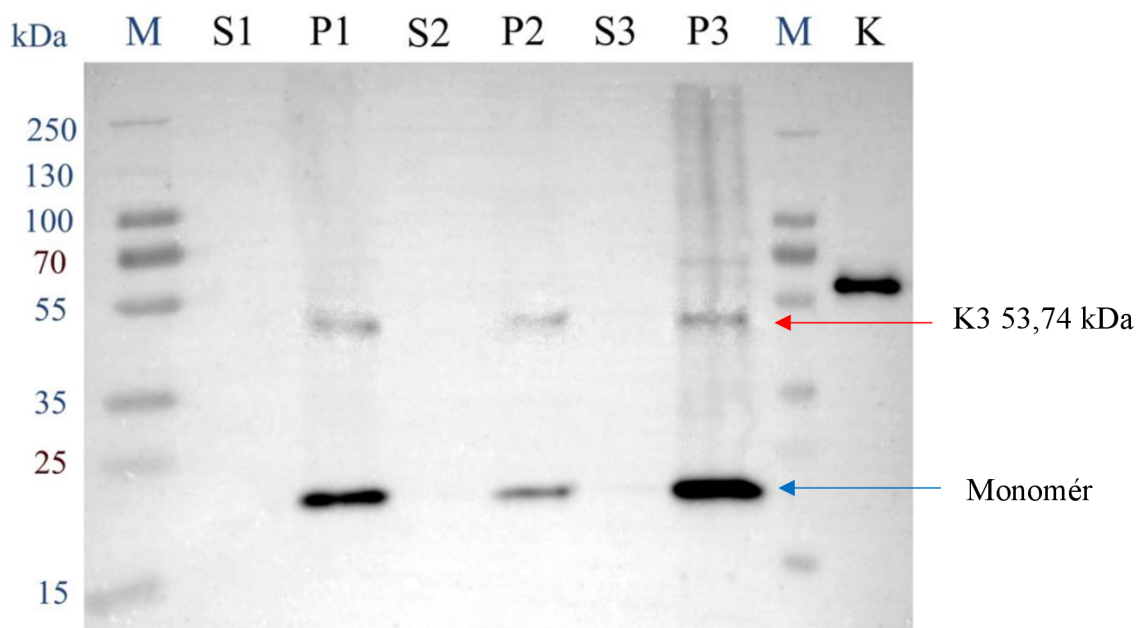
| Čas od začiatku merania [h] | Hodnota OD_{600} |
|-----------------------------|--------------------|
| 0 | 0,095 |
| 0,5 | 0,272 |
| 1 | 0,354 |
| 1,5 | 0,440 |
| 2 | 0,610 |
| Pridanie IPTG | |
| 3 | 0,717 |
| 5 | 0,967 |
| 6 | 1,072 |

Po optimalizácii postupu boli medzi sebou porovnané jednotlivé klony. Produkcia proteínu K3 po indukcii expresie bola overovaná pomocou SDS elektroforézy a western blotu, kedy z jednotlivých klonov boli odobrané vzorky, ktoré boli centrifugované a pelet bol resuspendovaný v PBS. Vzorky boli elektroforézou separované a vizualizované pomocou Coomassie Brilliant Blue. Pre väčšiu špecifitu bol použitý western blot s použitím protilátky proti His-tagom, ktoré sa nachádzali na C-terminálnom konci proteínu. Na výsledku SDS elektroforetickej separácie je možné pozorovať proteín K3 zodpovedajúci očakávanej molekulovej hmotnosti 53,74 kDa, ktorého molekulová hmotnosť bola zistená na základe aminokyselinovej sekvencie pomocou programu Sequence Manipulation Suite, Protein Molecular Weight (http://kfrserver.natur.cuni.cz/lide/fatima/bioinfo/sms2/protein_mw.html) (Obr. č. 15). Na membráne, kam boli proteíny preblotované, je možné okrem proteínu K3 pozorovať

aj proteín s His-tagom s molekulovou hmotnosťou približne 20 kDa, ktorý sa vo vzorkách vyskytoval v dominantnom množstve (Obr. č. 16). Nakoľko týmito metódami bola overená produkcia proteínu K3 u daných klonov a vzorka č. 3 bola zvolená pre následnú veľkoobjemovú purifikáciu pomocou Ni-NTA chromatografie.



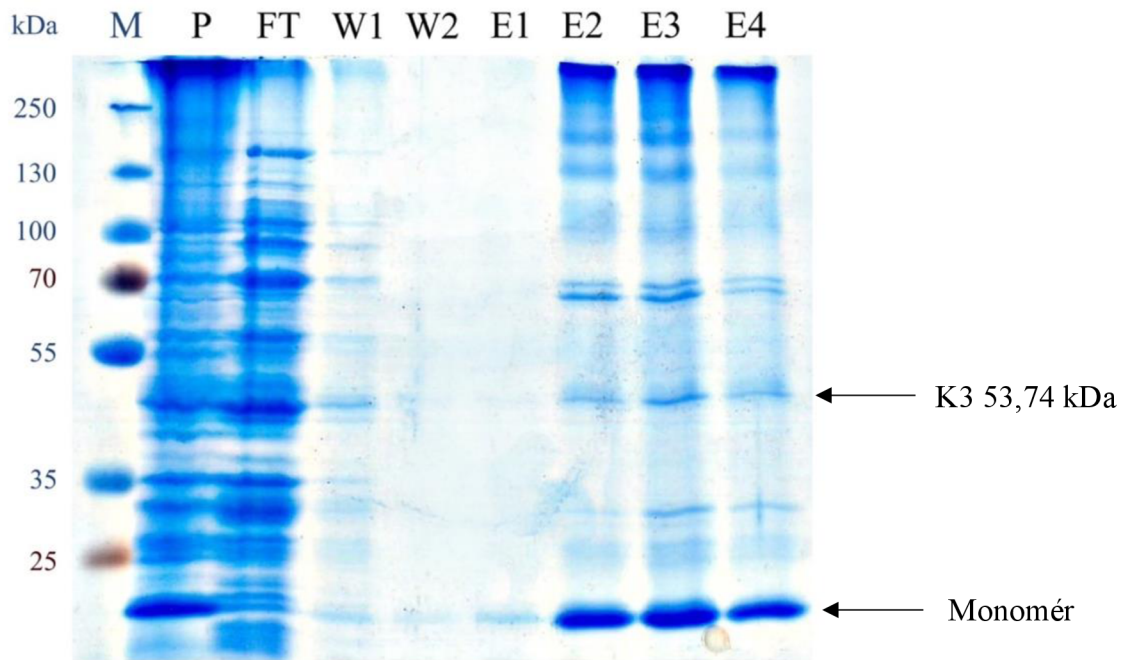
Obr. č. 15: SDS elektroforetická separácia bunkového lyzátu po indukcii expresie proteínov; M – marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (presnejší popis markeru vid': Materiál a metódy, kapitola 4.4.10), P1–3 – resuspendovaný pelet (bunkový lyzát), S1–3 – supernatant (médium)



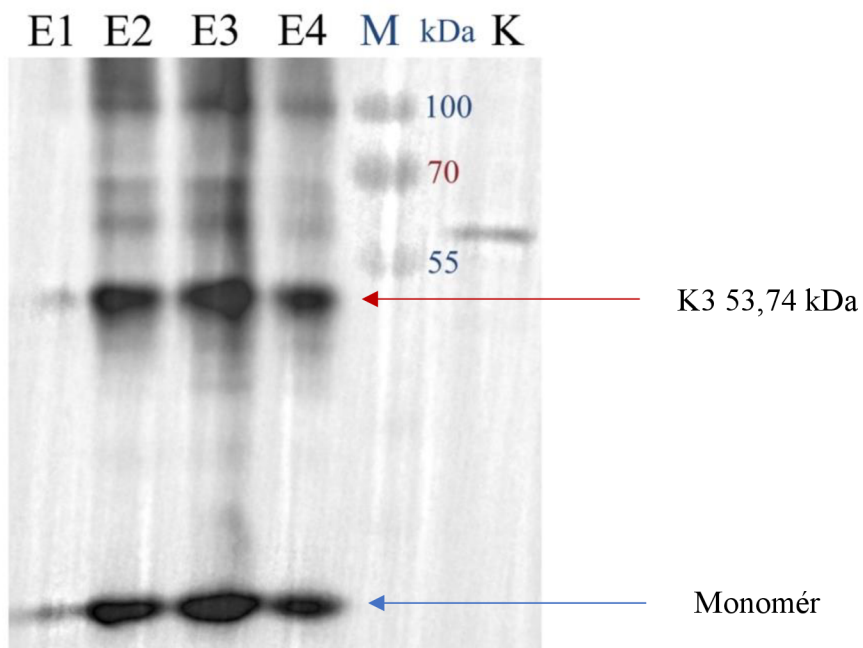
Obr. č. 16: Western blot po SDS elektroforetickej separácii bunkového lyzátu; M – marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (presnejší popis markeru vid’ Materiál a metódy, kapitola 4.4.10), P1–3 – resuspendovaný pelet (bunkový lyzáat), S1–3 – supernatant (médiu), K1 a 2 – pozitívna kontrola (vzorka obsahujúca proteín s His-tagom)

Po overení produkcie proteínu K3 boli dané klony baktérií *E. coli* BL21 (DE3) kultivované v 1 l média LB + K a následne centrifugované. Médiu bolo odsaté a bunky boli premyté 1xPBS a pred ďalšou prácou uložené do -20°C . V deň purifikácie boli bunky pomocou vortexu resuspendované v lyzačnom pufri a sonikované za pomoci sonikátora UP200S. Lyzáat bol následne použitý pre purifikáciu proteínu pomocou Ni-NTA chromatografie. Jednotlivé frakcie získané chromatografiou boli separované pomocou SDS elektrforézy a výsledok bol vizualizovaný farbením pomocou Coomassie Brilliant Blue a pomocou westetn blotu za použitia protilátky proti His-tagom, ktoré sa nachádzali na C-terminálnom konci proteínu. Jednotlivé frakcie zahŕňali resuspendovaný lyzovaný pelet (P), v prípade ktorého sa vyskytovalo veľké množstvo proteínov, FT, objem pretečený kolónou, kedy už došlo k naviazaniu proteínov s His-tagom na kolónu, W1 a W2, premývacie frakcie, ktoré obsahovali zvyšky ostatných proteínov a následne E1–4. V E1 sa nachádzalo malé množstvo proteínov, v E2 a E3 bolo eluované najväčšie množstvo a následne v E4 bola opäť koncentrácia proteínov nižšia. Na základe analýz bola zistená prítomnosť proteínu K3, dominantne sa vo vzorkách však vyskytoval proteín s molekulovou hmotnosťou približne 20 kDa (Obr. č. 17 a 18). Vzorky boli preto

následne poslané na analýzu pomocou hmotnostnej spektrometrie, kedy bolo zistené, že by sa mohlo jednať o proteín s molekulovou hmotnosťou približne 21,5 kDa, monomér odštiepený od C-terminálnej časti proteínu K3, tvorený sekvenciou TN-OspA a časťou sekvencie PKo (*B. afzelii*).



Obr. č. 17: SDS elektroforetická separácia jednotlivých frakcií získaných Ni-NTA agarózovou chromatografiou; M – marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (presnejší popis markeru vid' Materiál a metódy, kapitola 4.4.10), P – resuspendovaný lyzát buniek, FT – lyzát buniek pretečený kolónou, W1 a 2 – premývacia frakcia pretečená kolónou po prvom a druhom premývaní, E1–4 – jednotlivé frakcie získané elúciou



Obr. č. 18: Western blot po SDS elektroforetickej separácii jednotlivých frakcií z Ni-NTA agarózovej chromatografie; M – marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (presnejší popis markeru vid’ Materiál a metódy, kapitola 4.4.10), E1–4 – jednotlivé frakcie získané elúciou, K – pozitívna kontrola (vzorka obsahujúca proteín s His-tagom)

6 DISKUSIA

Aj napriek faktu, že za posledné roky sa značne prehĺbili znalosti o patogenéze, diagnostike a liečbe lymfkej boreliózy, aspekty samotnej prevencie stále nie sú doriešené. V súčasnosti nie je v humánnej medicíne dostupná profylaxia v podobe vakcíny a v minulosti dostupná vakcína založená na technike rekombinantného OspA čelila komplikáciám a neúspechu (Křupka *et al.*, 2011). Nakoľko lymfská borelióza je ochorenie spôsobené druhovou skupinou *Borrelia burgdorferi sensu lato*, ktorých povrchové proteíny sú variabilné, vakcíny navrhnuté na základe OspA jedného druhu nemusia byť účinné voči ostatným. Použitie takýchto vakcín vo svete by mohlo byť skomplikované aj odlišnou geografickou distribúciou jednotlivých druhov borelií. Novým prístupom k tejto problematike je tvorba rekombinantného proteínu kódujúceho C-terminálnu časť OspA niekoľkých klinicky relevantných druhov borelií, ktorá je dostatočná k indukcii imunitnej odpovede (Koide *et al.*, 2005; Comstedt *et al.*, 2014; Comstedt *et al.*, 2017). Za týmto účelom bol na Ústave imunológie Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci navrhnutý proteín K3 zložený z troch fragmentov OspA odlišných druhov *Borrelia burgdorferi s. l.*, ktorý je potenciálnym antigénom vhodným pri príprave vakcíny proti lymfkej borelióze.

Cieľom experimentálnej časti bakalárskej práce bola produkcia tohto rekombinantného proteínu K3, k čomu bol využitý plazmid pET-28b(+). Klonovanie bolo pre vyššiu účinnosť vykonané pomocou súpravy Seamless Cloning and Assembly kit (Invitrogen), kedy nie je nutné využívať ligázy a fosfatázy, postup klonovania sa tak zjednodušil. Vytvoreným rekombinantným plazmidom boli následne transformované kompetentné bunky *Escherichia coli* kmeň DH5 α . Správne zaklonovanie bolo overené restričnou analýzou vybraných klonov, ktoré niesli vďaka rekombinantnému plazmidu rezistenciu voči kanamycínu a rástli tak na médiu s prídavkom tohto antibiotika. Pre produkciu K3 bola následne plazmidová DNA izolovaná z *E. coli* DH5 α a boli ňou transformované expresné bunky *E. coli* BL21 (DE3). Restričnou analýzou a sekvenáciou bola overená správna transformácia týchto buniek rekombinantným plazmidom a následne bola expresia proteínu K3 indukovaná prídavkom IPTG v exponenciálnej fáze rastu baktérií. Produkcia proteínu bola overená pomocou SDS elektroforetickej separácie a western blotu, kedy vizualizácia bola umožnená špecifickými protilátkami proti His-tagom, ktoré rekombinantné proteíny obsahovali.

Bola zistená prítomnosť proteínu K3, a preto bol vybraný klon ďalej použitý pre veľkoobjemovú produkciu. Po rozrušení bunkových membrán boli proteíny izolované a purifikované Ni-NTA afinitnou chromatografiou, ktorá je účinným spôsobom purifikácie rekombinantných proteínov s využitím predovšetkým His-tagu. Podobne ako v prípade práce od Běláková *et al.* (2005), ktorí purifikovali rekombinantný OspA proteín, bola dokázaná úspešná izolácia proteínu Ni-NTA afinitnou chromatografiou za natívnych podmienok po následnej vizualizácii pomocou SDS elektroforézy a western blotu. V rámci tejto bakalárskej práce však bolo zistené, že proteín K3 sa produkoval v menšom množstve, ako bolo očakávané. Okrem triméru, proteínu K3 s molekulovou hmotnosťou 53,74 kDa bol na membráne pozorovaný aj proteín nesúci His-tag s molekulovou hmotnosťou približne 21,5 kDa, ktorý bol oproti triméru prítomný v dominantnom množstve. Na základe výsledkov z hmotnostnej spektrometrie bolo zistené, že sa jedná o fragment K3, monomér zložený z C-terminálneho konca proteínu obsahujúceho His-tag, fragmentu TN-OspA, linkeru a pravdepodobne určitej časti sekvencie PKo. Príčiny tohto štiepenia a nestability proteínu K3 budú predmetom ďalšieho výskumu, potrebného pre úspešnú prípravu rekombinantnej vakcíny proti lymfkej borelióze.

7 ZÁVER

Prvá časť práce je zameraná na problematiku lymskej boreliózy, literárna rešerš zahŕňa informácie o jej pôvodcovi – druhovej skupine baktérií *Borrelia burgdorferi s.l.*, tvorenej viacerými druhmi, ktorých zastúpenie sa líši vzhľadom ku geografickému rozšíreniu. Popísané sú základné prejavy tohto ochorenia, jeho diagnostika, liečba a prevencia, ktorá je v súčasnosti v humánnej medicíne možná. Popísaná je aj štruktúra týchto baktérií so zameraním na povrchový proteín OspA, ktorý sa ukázal byť účinným imunogénom, a tak je vhodným kandidátom pre tvorbu vakcín. Teoretická časť bakalárskej práce zahŕňa aj problematiku vakcinácie, súčasné prístupy pri tvorbe nových vakcín so zameraním na antigén OspA. Postupy pri tvorbe rekombinantných proteínov, klonovanie a aktuálne molekulárne a genetické metódy sú popísané v poslednej časti literárnej rešerše.

Praktická časť bakalárskej práce je zameraná na tvorbu rekombinantného proteínu K3, triméru zloženého z fragmentov OspA rôznych druhov borélií zo skupiny *B. burgdorferi s. l.*, ktorý by mohol byť vhodným antigénnym konštruktom, ako súčasť budúcej vakcíny proti lymskej borelióze. DNA kódujúca tento proteín bola vložená do plazmidu a namnožená pomocou kompetentných buniek *E. coli* DH5 α . Rekombinantnou plazmidovou DNA z vybraného klonu boli následne transformované expresné bunky *E. coli* BL21 (DE3) a expresia génov bola indukovaná prídavkom IPTG. Po overení produkcie tohto proteínu bol zo zvoleného klonu izolovaný Ni-NTA chromatografiou. Pomocou SDS PAGE a western blotu s využitím His-tagu na C-terminálnom konci K3 bola zistená okrem K3 aj prítomnosť monoméru obsahujúceho His-tag, ktorý vznikol odštiepením časti proteínu K3. Príčiny, prečo k tomuto štiepeniu dochádza, rovnako ako aj optimalizácia postupu pri izolácii a purifikácii, budú predmetom nasledujúceho výskumu.

8 LITERATÚRA

Arber, W., Dussoix, D. (1962). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 5(1), 18–36.

Arber, W., Linn, S. (1969). DNA Modification and Restriction. *Annual Review of Biochemistry*, 38(1), 467–500.

Ashwini, M., Murugan, S. B., Balamurugan, S., Sathishkumar, R. (2016). Advances in molecular cloning. *Molecular Biology*, 50(1), 1–6.

Aslanidis, C., de Jong, P. J. (1990). Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Research*, 18(20), 6069–6074.

Ball, R., Shadomy, S. V., Meyer, A., Huber, B. T., Leffell, M. S., Zachary, A., Belotto, M., Hilton, E., Bryant-Genevier, M., Schriefer, M. E., Miller, F. W., Braun, M. M. (2009). HLA type and immune response to *Borrelia burgdorferi* outer surface protein a in people in whom arthritis developed after Lyme disease vaccination. *Arthritis & Rheumatism*, 60(4), 1179–1186.

Barbour, A., Garon, C. (1987). Linear plasmids of the bacterium *Borrelia burgdorferi* have covalently closed ends. *Science*, 237(4813), 409–411.

Barbour, A. G., Hayes, S. F. (1986). Biology of *Borrelia* species. *Microbiological Reviews*, 50(4), 381–400.

Barbour, A. G., Tessier, S. L., Todd, W. J. (1983). Lyme disease spirochetes and ixodid tick spirochetes share a common surface antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *Infection and Immunity*, 41(2), 795–804.

Běláková, J., Křupka, M., Šebestová, M., Tuháčková, J., Vrzal, V., Raška, M., Weigl, E. (2005). PREPARATION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT OUTER SURFACE PROTEIN A (rOspA) OF *BORRELIA BURGENDORFERI SENSU STRICTO* AND *BORRELIA AFZELII*. *Biomedical Papers*, 149(2), 257–259.

- Bergström, S., Bundoc, V. G., Barbour, A. G. (1989). Molecular analysis of linear plasmid-encoded major surface proteins, OspA and OspB, of the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, 3(4), 479–486.
- Bertero, A., Brown, S., Vallier, L. (2017). Methods of Cloning. In *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (s. 19–39). Elsevier.
- Bockenstedt, L. K., Fikrig, E., Barthold, S. W., Flavell, R. A., Kantor, F. S. (1996). Identification of a *Borrelia burgdorferi* OspA T cell epitope that promotes anti-OspA IgG in mice. *Journal of Immunology*, 157(12), 5496–5502.
- Brouqui, P., Bacellar, F., Baranton, G., Birtles, R. J., Bjoërsdorff, A., Blanco, J. R., Caruso, G., Cinco, M., Fournier, P. E., Francavilla, E., Jensenius, M., Kazar, J., Laferl, H., Lakos, A., Lotric Furlan, S., Maurin, M., Oteo, J. A., Parola, P., Perez-Eid, C., ... Wilske, B. (2004). Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(12), 1108–1132.
- Burke, D., Carle, G., Olson, M. (1987). Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science*, 236(4803), 806–812.
- Burgdorfer, W., Barbour, A., Hayes, S., Benach, J., Grunwaldt, E., Davis, J. (1982). Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science*, 216(4552), 1317–1319.
- Carter, M., Shieh, J. C. (2010): *Molecular Cloning and Recombinant DNA Technology*. In *Guide to Research Techniques in Neuroscience* (s. 207–227). Elsevier.
- Celie, P. H., Parret, A. H., Perrakis, A. (2016). Recombinant cloning strategies for protein expression. *Current Opinion in Structural Biology*, 38, 145–154.
- Comstedt, P., Hanner, M., Schüler, W., Meinke, A., & Lundberg, U. (2014). Design and Development of a Novel Vaccine for Protection against Lyme Borreliosis. *PLoS ONE*, 9(11), e113294.

Comstedt, P., Schüler, W., Meinke, A., & Lundberg, U. (2017). The novel Lyme borreliosis vaccine VLA15 shows broad protection against *Borrelia* species expressing six different OspA serotypes. *PLoS ONE*, 12(9), e0184357.

de Silva, A. M., Telford, S. R., Brunet, L. R., Barthold, S. W., Fikrig, E. (1996). *Borrelia burgdorferi* OspA is an arthropod-specific transmission-blocking Lyme disease vaccine. *Journal of Experimental Medicine*, 183(1), 271–275.

Eun, H.-M. (1996). Ligases. In *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology* (s. 109–144). Elsevier.

Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K. A., Dodson, R., Hickey, E. K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J.-F., Fleischmann, R. D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A. R., Quackenbush, J., Salzberg, S., ... Venter, J. C. (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390(6660), 580–586.

Fikrig, E., Barthold, S., Kantor, F., Flavell, R. (1990). Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. *Science*, 250(4980), 553–556.

Ge, Y., Li, C., Corum, L., Slaughter, C. A., Charon, N. W. (1998). Structure and Expression of the FlaA Periplasmic Flagellar Protein of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Bacteriology*, 180(9), 2418–2425.

Guo, B. P., Norris, S. J., Rosenberg, L. C., Höök, M. (1995). Adherence of *Borrelia burgdorferi* to the proteoglycan decorin. *Infection and Immunity*, 63(9), 3467–3472.

Hartley, J. L., Temple, G.F., Brasch M.A. (2000). DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. *Genome Research*, 10(11), 1788–1795.

Hengge, U. R., Tannapfel, A., Tying, S. K., Erbel, R., Arendt, G., Ruzicka, T. (2003). Lyme borreliosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(8), 489–500.

Howe, T. R., LaQuier, F. W., Barbour, A. G. (1986). Organization of genes encoding two outer membrane proteins of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* within a single transcriptional unit. *Infection and Immunity*, 54(1), 207–212.

Invitrogen [online] (2014). GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Kit User Guide. Dostupné z: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/geneart_seamless_cloning_and_assembly_man.pdf [navštívené dňa 20.3.2021]

Ioannou, P. A., Amemiya, C. T., Ganes, J., Kroisel, P. M., Shizuya, H., Chen, C., Batzer, M. A., de Jong, P. J. (1994). A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nature Genetics*, 6(1), 84–89.

Johnson, R. C., Schmid, G. P., Hyde, F. W., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J. (1984). *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: Etiologic Agent of Lyme Disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(4), 496–497.

Kamp, H. D., Swanson, K. A., Wei, R. R., Dhal, P. K., Dharanipragada, R., Kern, A., Sharma, B., Sima, R., Hajdusek, O., Hu, L. T., Wei, C.-J., Nabel, G. J. (2020). Design of a broadly reactive Lyme disease vaccine. *Npj Vaccines*, 5(1), 33.

Kenedy, M. R., Lenhart, T. R., Akins, D. R. (2012). The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 66(1), 1–19.

Koide, S., Yang, X., Huang, X., Dunn, J. J., Luft, B. J. (2005). Structure-based Design of a Second-generation Lyme Disease Vaccine Based on a C-terminal Fragment of *Borrelia burgdorferi* OspA. *Journal of Molecular Biology*, 350(2), 290–299.

Krupka, M., Raska, M., Belakova, J., Horynova, M., Novotny, R., Weigl, E. (2007). Biological aspects of Lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomedical Papers*, 151(2), 175–186.

Křupka, M., Raška, M., Weigl, E. (2008). Lymeská borelióza - biologie, patogeneze, diagnostika a léčba. *Solen*, 2(5), 236-239.

Křupka, M., Rubešová, A., Holý, O. (2019). Existuje chronická lymeská borelióza? *Alergie*, 1(4), 253-258.

Křupka, M., Strojil, J., Raška, M. (2014). Současné možnosti diagnostiky, léčby a prevence lymeské boreliózy. *Praktické lékařnictvo*, 4(2-3), 79 – 82.

Krupka, M., Zachova, K., Weigl, E., Raska, M. (2011). Prevention of Lyme Disease: Promising Research or Sisyphean Task? *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 59(4), 261.

Kuo, W.-H. K., Chase, H. A. (2011). Exploiting the interactions between poly-histidine fusion tags and immobilized metal ions. *Biotechnology Letters*, 33(6), 1075–1084.

Lessard, J. C. (2013). Molecular Cloning. In: *Methods in Enzymology* (Roč. 529, s. 85–98). Elsevier.

MACHEREY-NAGEL [online] (2019). Plasmid DNA purification User manual. Dostupné z: <https://www.mn-net.com/media/pdf/45/51/02/Instruction-NucleoSpin-Plasmid.pdf> [navštívené dňa 7.5.2021]

Marques, A. R. (2015). Laboratory Diagnosis of Lyme Disease. *Infectious Disease Clinics of North America*, 29(2), 295–307.

Motaleb, M. A., Corum, L., Bono, J. L., Elias, A. F., Rosa, P., Samuels, D. S., Charon, N. W. (2000). *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), 10899–10904.

Nora, L. C., Westmann, C. A., Martins-Santana, L., Alves, L. de F., Monteiro, L. M. O., Guazzaroni, M.-E., Silva-Rocha, R. (2019). The art of vector engineering: Towards the construction of next-generation genetic tools. *Microbial Biotechnology*, 12(1), 125–147.

Ortega, C., Abreu, C., Oppezzo, P., Correa, A. (2019). Overview of High-Throughput Cloning Methods for the Post-genomic Era. In R. Vincentelli (Ed.), *High-Throughput Protein Production and Purification* (Roč. 2025, s. 3–32). Springer New York.

Pal, U., de Silva, A. M., Montgomery, R. R., Fish, D., Anguita, J., Anderson, J. F., Lobet, Y., Fikrig, E. (2000). Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *Journal of Clinical Investigation*, 106(4), 561–569.

Pal, U., Li, X., Wang, T., Montgomery, R. R., Ramamoorthi, N., deSilva, A. M., Bao, F., Yang, X., Pypaert, M., Pradhan, D., Kantor, F. S., Telford, S., Anderson, J. F., Fikrig, E. (2004). TROSPA, an *Ixodes scapularis* Receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell*, 119(4), 457–468.

Parola, P., Raoult, D. (2001). Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. *Clinical Infectious Diseases*, 32(6), 897–928.

Paschke, M. (2006). Phage display systems and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(1), 2–11.

Pingoud, A., Jeltsch, A. (2001). Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research*, 29(18), 3705–3727.

Plotkin, S. A. (2011). Correcting a Public Health Fiasco: The Need for a New Vaccine against Lyme Disease. *Clinical Infectious Diseases*, 52(suppl_3), 271–275.

Preston, A. (2003). Choosing a Cloning Vector. In N. Casali, A. Preston, *E. coli Plasmid Vectors* (Roč. 235, s. 19–26). Humana Press.

Pritt, B. S., Mead, P. S., Johnson, D. K. H., Neitzel, D. F., Respicio-Kingry, L. B., Davis, J. P., Schiffman, E., Sloan, L. M., Schriefer, M. E., Replogle, A. J., Paskewitz, S. M., Ray, J. A., Bjork, J., Steward, C. R., Deedon, A., Lee, X., Kingry, L. C., Miller, T. K., Feist, M. A., ... Petersen, J. M. (2016). Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: A descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(5), 556–564.

Qi, H., Lu, H., Qiu, H.-J., Petrenko, V., Liu, A. (2012). Phagemid Vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction. *Journal of Molecular Biology*, 417(3), 129–143.

QIAGEN [online] (2003). The QIAexpressionist™ A handbook for high-level expression and purification of 6×His-tagged proteins, 5th edition. Dostupné z: https://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAexpressionist_EN.pdf [navštívené dňa 7.5.2021]

QIAGEN [online] (2020). QIAquick® Spin Handbook. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/qiaquick-gel-extraction-kit/> [navštívené dňa 20.2.2021]

Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Oliver, J. H. (2011). Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2(3), 123–128.

Růčková, E., Müller, P., Vojtěšek, B. (2014): Protein Expression and Purification. *Klinická onkologie*, 27(suppl_1), 92–98.

Shapiro, E. D., Gerber, M. A. (2000). Lyme Disease. *Clinical Infectious Diseases*, 31(2), 533–542.

Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., Simon, M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(18), 8794–8797.

Schmidt, F. R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(4), 363–372.

- Schwan, T. G., Piesman, J., Golde, W. T., Dolan, M. C., Rosa, P. A. (1995). Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(7), 2909–2913.
- Steere, A.C., Coburn, J., Glickstein, L. (2004). The emergence of Lyme disease. *Journal of Clinical Investigation*, 113(8), 1093–1101.
- Steere, A.C., Malawista, S.E., Snyderman, D.R., Shope, R.E., Andiman, W.A., Ross, M.R., Steele, F.M. (1977). An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis & Rheumatism*, 20(1), 7–17.
- Steere, A. C., Sikand, V. K. (2003). The Presenting Manifestations of Lyme Disease and the Outcomes of Treatment. *New England Journal of Medicine*, 348(24), 2472–2474.
- Steere, A. C., Strle, F., Wormser, G. P., Hu, L. T., Branda, J. A., Hovius, J. W. R., Li, X., Mead, P. S. (2016). Lyme borreliosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 16090.
- Steere, A. C., Sikand, V. K., Meurice, F., Parenti, D. L., Fikrig, E., Schoen, R. T., Nowakowski, J., Schmid, C. H., Laukamp, S., Buscarino, C., Krause, D. S. (1998). Vaccination against Lyme Disease with Recombinant *Borrelia burgdorferi* Outer-Surface Lipoprotein A with Adjuvant. *New England Journal of Medicine*, 339(4), 209–215.
- Studier, F. W., Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 211–222.
- van Dam, A. P., Kuiper, H., Vos, K., Widjojokusumo, A., de Jongh, B. M., Spanjaard, L., Ramselaar, A. C. P., Kramer, M. D., Dankert, J. (1993). Different Genospecies of *Borrelia burgdorferi* Are Associated with Distinct Clinical Manifestations of Lyme Borreliosis. *Clinical Infectious Diseases*, 17(4), 708–717.

Wood, D. W. (2014). New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification. *Current Opinion in Structural Biology*, 26, 54–61.

Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Montagu, M. V., Schell, J. (1983). Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *The EMBO Journal*, 2(12), 2143–2150.

Zhang, J.-R., Hardham, J. M., Barbour, A. G., Norris, S. J. (1997). Antigenic Variation in Lyme Disease *Borreliae* by Promiscuous Recombination of VMP-like Sequence Cassettes. *Cell*, 89(2), 275–285.