



FUNKČNÍ VZOREK

**Heterologní produkce lipidizovaných proteinů
a bakteriální display z expresního vektoru
pLipDis v *E. coli***

**RNDr. Lubomír Janda, Ph.D.
Mgr. Adam Norek, Ph.D.**

5683
2019

Funkční vzorek 5683/2019

Heterologní produkce lipidizovaných proteinů a bakteriální display z expresního vektoru pLipDis v *E. coli*

Autoři:

RNDr. Lubomír Janda, Ph.D.

Mgr. Adam Norek, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu:
"Rozvoj systému podpory Proof - of - concept na VÚVeL" TG03010038.
Dílčí projekt s názvem "Vývoj heterologního systému (pLipDis) pro produkci lipidizovaných proteinů a bakteriální display v *E. coli*" v rámci programu Technologické agentury ČR - program GAMA.

2019

ISBN 978-80-88233-80-0

Obsah

1. Úvod	3
2. Cíl metodiky funkčního vzorku	3
3. Popis funkčního vzorku	3
3.1. <i>Příprava expresního vektoru pLipDis</i>	3
3.2. <i>Inkorporace cílového proteinu do expresního vektoru pLipDis</i>	4
3.3. <i>Heterologní exprese lipidizovaných proteinů</i>	4
3.4. <i>Ověření výsledku</i>	5
4. Srovnání novosti výsledku	6
5. Uplatnění funkčního vzorku	7
6. Ekonomické aspekty	7
7. Seznam použité literatury	7
8. Dedikace	7

1. Úvod

Lipoproteiny představují minoritní skupinu proteinů, které však díky schopnosti ukotvení v plasmatické membráně hrají velmi významnou roli v interakci buněk s okolním prostředím. Tato třída proteinů je tedy velmi zajímavá nejen z hlediska fyziologického, ale také z pohledu technologického. Lipidizace uděluje molekulám proteinů unikátní vlastnosti. Příkladem může být zvýšená imunogenicita způsobená připojením mastných kyselin z bakteriální cytoplasmatické membrány, která nachází uplatnění v přípravě vakcín. Lipidickou komponentu lze využít také při imobilizaci proteinů na hydrofobních částicích (např. lipozomy). Navíc, ve spojení s mechanismy zodpovídajícími za vystavení exprimovaných proteinů přímo na povrchu hostitelské bakterie *E. coli* lze ověřovaný expresní systém využít i pro vysokokapacitní screening knihoven proteinových mutantů.

Expresní systém pLipDis je založen na využití přirozené lipoproteinové kaskády, kdy v přítomnosti signální sekvence dochází k translokaci exprimovaného proteinu přes vnitřní plazmatickou membránu, následnou modifikaci N-koncového cysteinu mastnými kyselinami pocházejícími z plazmatické membrány a transportem modifikovaného proteinu na vnější plazmatickou membránu transportní kaskádou.

2. Cíl metodiky funkčního vzorku

Cílem předkládané metodiky byl vývoj optimalizovaného postupu pro produkci proteinů s posttranslační modifikací mastnými kyselinami na N-terminální oblasti a jejich ukotvení do vnější plazmatické membrány gram negativní bakterie *E. coli*.

3. Popis funkčního vzorku

3.1. Příprava expresního vektoru pLipDis

Do kompatibilního expresního vektoru pUbEx20 byla vložena kazeta lipoproteinového genového konstruktů specifikovaná v užitém vzoru CZ 33390 U1 „Genový konstrukt pro produkci lipoproteinů a bakteriální display v *E. coli*, a jeho produkt“.

Expresní vektor pUbEx20 s indukovatelným promotorem a genem pro rezistenci ke kanamycinu byl linearizován pomocí štěpení restrikčními endonukleázami tak, aby byly vytvořeny kompatibilní kohézní konce umožňující vložení štěpeného lipoproteinového genového konstruktů. Vektor byl opracován restrikčními endonukleázami XbaI a NotI. 1 µg expresního vektoru byl inkubován s 10 jednotkami každého enzymu po dobu 60 minut při teplotě 37 °C v prostředí pufru CutSmart (NEB). Štěpená směs plazmidu byla separována na DNA gelové elektroforéze a fragment migrující do oblasti odpovídající velikosti linearizovaného vektoru (přibližně 5000 bp) byl vyříznut z gelu a izolován pomocí izolační soupravy NucleoSpin Gel and PCR Clean up (Macherey-Nagel). Izolované produkty štěpení, vektor pUbEx20 a genový konstrukt, byly ligovány pomocí T4 DNA ligázy v prostředí T4 ligačního pufru. Ke 100 ng plasmidové DNA bylo přidáno 10 ng izolovaného genového konstruktů a 10 jednotek T4 DNA ligázy. Ligační reakce probíhala při 16 °C 16 hodin. Následně byl produkt ligační reakce použit k transformaci chemokompetentních pomnožovacích buněk *E. coli* DH10B pomocí teplotního šoku (42 °C, 60 sec) v prostředí KCM. K transformaci bylo použito 50 ng ligovaného plazmidu. Transformované buňky byly vysety na ztužený LB agar s přísadkou 1% glukózy. Jako selekční marker bylo využito antibiotikum kanamycin ve finální koncentraci 100 µg/ml. Přítomnost genového konstruktů, jeho správná orientace a intaktnost byly ověřeny sekvenováním. Nový expresní plazmid byl anotován jako expresní vektor pLipDis.

3.2. Inkorporace cílového proteinu do expresního vektoru pLipDis

Funkčnost metodiky byla ověřena na dvou experimentálních příkladech. V prvním případě se jednalo o protein OspC (Outer Surface Protein C), jenž se v nativní formě exprimuje jako dimerní lipoprotein na povrchu bakterie *Borrelia* a jeho biochemické vlastnosti umožňují expozici do vnějšího prostředí. Ve druhém případě se jednalo o zelený fluorescenční protein (GFP), jenž je běžně exprimován v cytoplazmě jako intracelulární protein bez posttranslačních modifikací. Postup inkorporace genu kódujícího cílový protein je ve všech případech stejný.

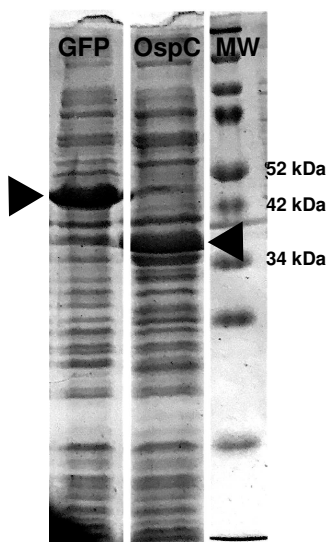
Gen pro cílový protein obsahující kompatibilní restriční místa (*NcoI*, *BamHI*) opracujeme restričními endonukleázami. 1 µg DNA kódující cílový protein (insert) inkubujeme s 10 jednotkami enzymů *NcoI* a *BamHI* po dobu 60 minut při teplotě 37 °C v prostředí pufru CutSmart (NEB). Štěpenou směs separujeme na DNA gelové elektroforéze a fragment migrující do oblasti odpovídající velikosti cílové DNA vyřežeme z gelu a izolujeme pomocí izolační soupravy NucleoSpin Gel and PCR Clean up (Macherey-Nagel). U přečištěného produktu stanovíme spektrofotometricky koncentraci DNA. Identickým způsobem linearizujeme připravený expresní vektor pLipDis. Následně smícháme 10 ng izolovaného insertu se 100 ng linearizovaného vektoru a ligujeme pomocí T4 DNA ligázy v odpovídajícím pufru 12 hodin při teplotě 16 °C.

Produkt ligační reakce použijeme k transformaci chemokompetentních pomnožovacích buněk *E. coli* DH10B pomocí teplotního šoku v prostředí KCM. Hluboce zamražené chemokompetentní buňky rozpustíme na ledu, přidáme 50 ng ligovaného plasmidu a šetrně zamícháme. Inkubujeme dále na ledu po dobu 30 min. a následně zkumavky ponoříme na 60 sekund do vodní lázně o teplotě 42 °C. Poté buňky vrátíme zpět na led a přidáme 200 µl LB média s 1% glukózou. Buňky necháme kultivovat při 37 °C za stálého míchání 180 otáček za minutu po dobu 60 min. Transformované buňky vysejeme na ztužený LB agar s přídavkem 1% glukózy a kanamycinu (100 µg/ml). Přítomnost odpovídajícího insertu ověříme sekvenací.

3.3. Heterologní exprese lipidizovaných proteinů

Plasmidy u nichž byla potvrzena přítomnost cílového genu (pLipDis_OspC, respektive pLipDis_GFP) transformujeme do expresních buněk *E. coli* BL21 RILP. 50 ng plasmidové DNA smícháme s 50 µl kompetentních buněk a transformujeme teplotním šokem (42 °C, 60 s) ve vodní lázni viz. kapitola 3.2. Transformované buňky vysejeme na kultivační plotny se ztuženým LB agarem, doplněným o 1% glukózu a kanamycin 100 µg/ml a kultivujeme 16 hodin při 37 °C. Z narostlých kolonií náhodně vybereme 15, kterými inokulujeme 20 ml LB média s kanamycinem (100 µg/ml) a 1% glukózou v 100 ml Erlenmayerových baňkách a kultivujeme při 37 °C 12 hodin.

5 ml buněčné kultury použijeme k inokulaci 500 ml sterilního autoindukčního média (složení: 10 g Trypton; 5 g Kvasniční extraktu; 3,3 g síran amonný; 50 mM fosfátový pufr pH 6,7; 0,5 g glukóza; 2 g Laktózy na 1 litr média). Kulturu inkubujeme při 22 °C za stálého míchání při 180 otáčkách za minutu na pultové třepače po dobu 18 hodin. Produkce cílových proteinů ověříme pomocí proteinové elektroforézy v denaturujících podmínkách.

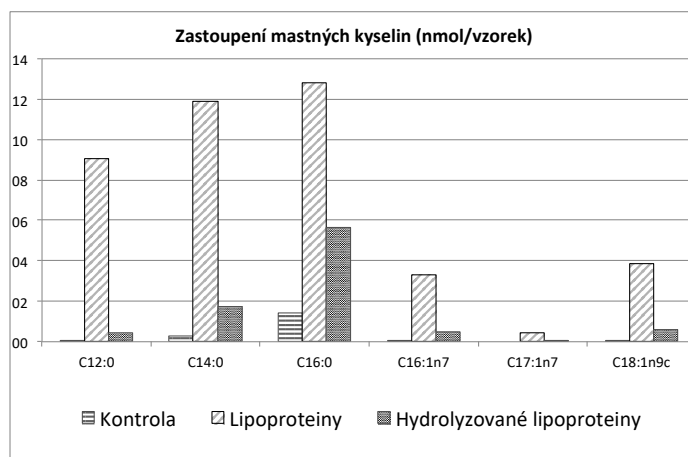


Obrázek 1: SDS-PAGE buněk exprimujících GFP (vlevo) respektive OspC (uprostřed) z plasmidu pLipDis. Odpovídající proteiny jsou označeny šipkou, hmotnostní standard (MW) vlevo.

3.4. Ověření výsledku

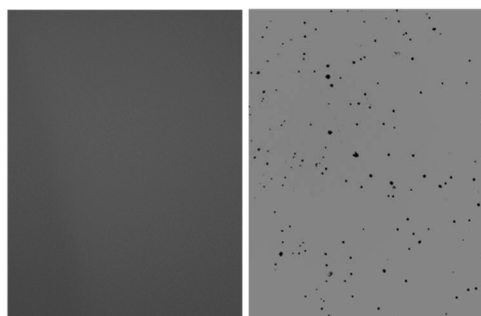
U exprimovaných proteinů ověříme účinnost post translační modifikace a lokalizaci na povrchu *E. coli*.

Lipidizaci ověříme pomocí analýzy mastných kyselin metodou hmotnostní spektrometrie. Indukované proteiny izolujeme pomocí afinitní chromatografie na Ni-NTA koloně a volné mastné kyseliny odstraníme gelovou filtrací. Izolované proteiny opracujeme bakteriální lipázou. K odmytí nespecificky navázaných lipidů použijeme dialýzu s faktorem ředění 1:10000. Redukce zastoupení mastných kyselin po opracování lipoproteinu lipázou (hydrolyzáza vazby diacylglycerolu na N-koncovém cysteinu) slouží jako průkaz, že detekované mastné kyseliny jsou na lipidizovaný protein vázány kovalentně.



Obrázek 2: Porovnání výskytu mastných kyselin u proteinů exprimovaných z pLipDis expresního vektoru určených pomocí plynové chromatografie a hmotnostní analýzy. Kontrola – proteiny bez lipoproteinové signální sekvence; Lipoproteiny – proteiny s lipoproteinovou signální sekvencí; Hydrolyzované lipoproteiny – lipoproteiny opracované lipázou.

Lokalizaci proteinů exprimovaných z vektoru pLipDis ověřujeme pomocí imunofluorescenční detekce a fluorescenční mikroskopie. Indukované buňky fixujeme prostým odparem na podložním skle, blokuje v 3% roztoku bovinního sérového albuminu v PBS (60 min). Blokované vzorky následně inkubujeme s monoklonální protilátkou vázající cílový protein v roztoku 1% bovinního sérového albuminu (60 min). K detekci specifické vazby použijeme sekundární anti-myší protilátku s fluorescenční značkou.



Obrázek 3: Inverzní fotografie snímku z fluorescenčního mikroskopu. Černé body odpovídají přítomnosti fluorescenčního signálu. Vlevo negativní kontrola, vpravo buňky exprimující protein z vektoru pLipDis.

4. Srovnání novosti výsledku

Příprava lipoproteinů v množstvích uplatnitelných v biotechnologických aplikacích je náročný proces, a to díky k rozsáhlé kaskádě podílející se na jejich syntéze. Ačkoliv existuje několik řešení samotné lipidace (Jones a Tryon 1995ⁱ; Leitao et al., 2000ⁱⁱ; Cullen et al., 2003ⁱⁱⁱ) následná lokalizace na vnější membráně gram-negativních bakterií a přesmyk lipoproteinu na povrchu bakterie, je v současných produkčních systémech nedořešena. Jednotlivé kroky syntézy, procesování a transportu lipoproteinů jsou ovlivněny nejen signální sekvencí molekuly prelipoproteinu (Babu et al., 2006^{iv}), ale také zastoupením aminokyselin za modifikovaným cysteinem (retenční signál), které rozhodují o zadržení lipoproteinu ve vnitřní membráně nebo jeho transportu na membránu vnější. Významnou úlohu hraje i afinita prelipoproteinu k jedné ze tří kaskád zodpovědných za jeho přenesení z cytoplazmy na vnitřní membránu. Tyto transportní mechanismy zároveň určují, zda bude protein transportován ve sbaleném (aktivním stavu), či jako rozvolněný polypeptidový řetězec k jehož foldingu dochází až v průběhu lipidizace a průchodu přes periplazmu (Calmettes et al., 2015^v).

Z našich předcházejících experimentů vyplývá, že o výsledné lokalizaci lipoproteinů rozhoduje nejen signální sekvence a retenční signál, ale také povaha proteinové partikule jako takové (sekvenční i strukturní). Na těchto zjištěních je založen i předkládaný projekt, jehož cílem je ověřit schopnost expresního vektoru pLipDis zajistit produkci lipoproteinů a lipidizovaných vazebných molekul na fúzním proteinovém nosiči.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Expresí lipoproteinů na vnější membráně *E. coli* umožňuje relativně snadný přístup k přirozeně posttranslačně modifikovaným molekulám. Popsaný postup produkce lipoproteinů nese potenciál uplatnění zejména v oblasti testování biochemických vlastností proteinů s enzymatickou aktivitou, případně produkce imunogenních proteinů vhodných pro přípravu vakcín a v neposlední řadě přípravě knihoven vazebných molekul ukotvených na povrchu *E. coli*. Díky přítomnosti korpuskulární částice usnadňující sbalování proteinu a zvyšující jeho rozpustnost lze v kombinaci například s průtokovou cytometrií snadno selektovat klony *E. coli* nesoucí protein (proteiny) o požadovaných vlastnostech a bez nutnosti další kroků přejít přímo k jejich expresi či purifikaci.

6. Ekonomické aspekty

V současnosti nelze ekonomické aspekty funkčního vzorku plně odhadnout. Potencionální komerční zisk bude záviset na tržní poptávce.

7. Seznam použité literatury

- 1.) Thomas S. Jones, Victor V. Tryon (1995); [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00496-S](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00496-S)
- 2.) Leitão et al. (2000); 145: 1639. <https://doi.org/10.1007/s007050070081>
- 3.) Paul A. Cullen et al. (2003); <https://doi:10.1128/IAI.71.5.2414-2421.2003>
- 4.) Babu et al. (2006); <http://doi.org/10.1128/JB.188.8.2761-2773>
- 5.) Calmettes et al. (2015); https://doi.org/10.1007/978-3-319-23603-2_14

8. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu

"Rozvoj systému podpory Proof - of - concept na VÚVeL" TG03010038. Dílčí projekt s názvem "Vývoj heterologního systému (pLipDis) pro produkci lipidizovaných proteinů a bakteriální display v *E. coli*" v rámci programu Technologické agentury ČR - program GAMA.

VÚVeL 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz