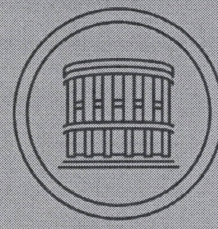
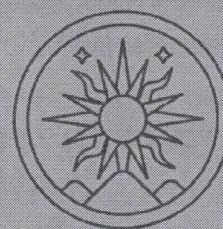


UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA

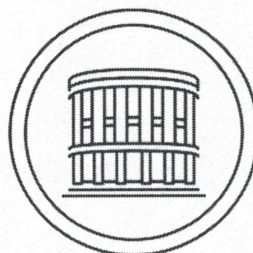
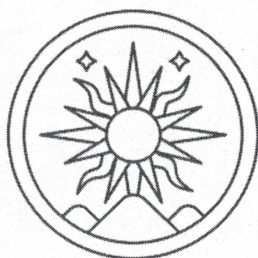


ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2022

ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV

ŠVK
PRIF UK
2022

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA**



**ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ
KONFERENCIA PriF UK 2022**

Zborník recenzovaných príspevkov

**27. Apríl 2022
Bratislava, Slovenská republika
Univerzita Komenského v Bratislave
ISBN 978-80-223-5385-4**

PREDSEDA ŠVK PriF UK

RNDr. Eva Viglašová, PhD.

ODBORNÝ VÝBOR

doc. RNDr. Alžbeta Blehová, CSc.
RNDr. Petra Švábová, PhD.
doc. RNDr. Hana Drahovská, CSc.
RNDr. Regina Sepšiová, PhD.
Mgr. Andrej Ficek, PhD.
doc. RNDr. Peter Kabát, CSc.
Mgr. Renáta Švubová, PhD.
RNDr. Nora Tóth Hervay, PhD.
doc. RNDr. Tomáš Derka, PhD.
doc. Mgr. Peter Mikulíček, PhD.
doc. Mgr. Ľuboš Molčan, PhD.
RNDr. Katarína Stebelova, PhD.
RNDr. Igor Matečný, PhD.
doc. Mgr. Marcel Horňák, PhD.
prof. Mgr. Radovan Šebesta, DrSc.
doc. RNDr. Michal Galamboš, PhD.
RNDr. Lukáš Félix Pašteka, PhD.
doc. RNDr. Monika Jerigová, PhD.
PaedDr. Tibor Nagy, PhD.
RNDr. Soňa Nagyová, PhD.
prof. Ing. Bohdan Juráni, CSc.
prof. RNDr. Agáta Fargašová, DrSc.
doc. RNDr. Katarína Pavličková, CSc.
doc. RNDr. Ján Milička, CSc.
prof. RNDr. Daniela Reháková, CSc.
RNDr. Tatiana Durmeková, PhD.
prof. RNDr. Otília Lintnerová, CSc.
RNDr. Jana Fridrichová, PhD.
doc. Mgr. Martin Ondrejka, PhD.
doc. RNDr. Renáta Fláková, PhD.

PODPREDSEDA ŠVK PriF UK

RNDr. Mária Chovancová, PhD.

Mgr. Táňa Sebechlebská, PhD.

ORGANIZAČNÝ VÝBOR

RNDr. Michaela Dörnhöferová, PhD.
RNDr. Kamila Koči, PhD.
Mgr. Paulína Pidíková
Mgr. Dominik Kostoláni
Mgr. Dagmara Gajanová
Mgr. Petr Papežík
Bc. Michaela Kardohelyová
Mgr. Adriana Jariabková
Mgr. Lenka Kramarová
Mgr. Dominik Šmida
RNDr. Vojtěch Przybyla, PhD.
Matej Choreň
MSc. Olena Rybnikova
Mgr. Alexandra Molnárová
Bc. Julián Vrábel
Alexandra Chrenová
Mgr. Dominik Juračka
Bc. Alexander Kmet'
Mgr. Silvia Ihnačáková
RNDr. Adela Joanna Hamerníková

Optimalizácia podmienok expresie chitinázy z *Drosera binata* v expresnom kmeni *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL

Veronika Mikitová^{1,2}, Miroslav Rajnec¹, Jana Libantová¹

¹Ústav genetiky a biotechnológií rastlín Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Centrum biológie rastlín a biodiverzity, Oddelenie molekulárnej biológie a biotechnológií, Akademická 2, 950 07 Nitra, Slovenská republika; veronika.mikitova@savba.sk

²Slovenská poľnohospodárska univerzita, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra biochémie a biotechnológie, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika

Abstract

Optimisation of expression conditions for the production of chitinase from *Drosera binata* in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL expression strain

The common feature of chitinases is the ability to break down chitin substrates. They're present in many different organisms like bacteria, fungi or plants. This fact may contribute to their big diversity. Chitinases can differ in the topology of the active site, catalytic mechanism or in the presence of auxiliary domains. The variety of properties in chitinases is something that must be considered, when searching for an ideal candidate in specific biotechnological application. Chitinases play also an important role during digestion in carnivorous plants. That's why we chose *Drosera binata* as the subject of our project. The purpose of this study was to find out, how different conditions affect the solubility of recombinant chitinase from *D. binata*, which in our previous experiments occurred in insoluble protein fraction. We came to conclusion that optimisation of temperature is more effective in maintaining the bioactivity of the expressed protein than lowering the concentration of inductor.

Keywords: *Drosera binata*; chitinases; recombinant protein; optimisation

Úvod a formulácia cieľa

Chitinázy (EC 3.2.2.14) patria medzi glykozyl hydrolázy štiepiace chitín. Chitinázy produkované vyššími rastlinami sú na základe štruktúry rozdelené do siedmych tried (I-VII). Odlišujú sa od seba molekulovou hmotnosťou, substrátovou špecificitou a mechanizmom katalýzy [1]. Aminokyselinová sekvencia chitináz triedy I obsahuje okrem hlavnej katalytickej domény aj chitín-väzbovú doménu, N-signálny peptid a prolínový mostík. Funkcia chitín-väzbovej domény spočíva v jej priľnutí k obalu chitínových kryštálov, čím napomáha ich rozrušeniu [2 – 3].

Chitín je druhý najrozšírenejší polysacharid v prírode po celulóze. Je prirodzenou súčasťou exoskeletu kôrovcov a hmyzu. Prítomný je aj v hýfách húb [4]. Abundancia chitínu preto predurčuje chitinázy k ich rozmanitému využitiu v biotechnológiach. Najväčšie oblasti biotechnologického využitia chitináz sú spracovanie odpadu z kôrovcov a ochrana poľnohospodárskych plodín voči hubovým škodcom a hmyzu [5]. Táto ochrana môže byť aplikovaná vo forme biologického prípravku obsahujúceho chitinázy. Biologické prípravky vykazujú vysokú špecificitu, čo je jednou z príčin ich nižšej efektivity v porovnaní so

širokospektrálnymi chemickými prípravkami. Preto hľadanie ďalších hydrolytických enzýmov z rôznych zdrojov je predmetom intenzívneho skúmania [6].

Expresné systémy sú nenahradiiteľnou súčasťou tvorby geneticky modifikovaných organizmov s následnou produkciou rekombinantných proteínov. Najčastejšie využívaným prokaryotickým expresným systémom je baktéria *Escherichia coli*. Expresia génov v *E. coli* systéme spočíva v dvoch hlavných molekulárnych mechanizmoch: v replikácii expresného vektora a v expresii cieľového génu (transkripcia + translácia) [7]. Expresiu rekombinantných proteínov v *E. coli* ovplyvňuje široká škála faktorov, ktoré môžu viesť k nízkej produkcii rekombinantného proteínu. Tieto problémy je do istej miery možné eliminovať alternáciou využiteľnosti kodónov hostiteľskej bunky [8].

Cieľom našej práce je zistiť, ako rôzne podmienky ovplyvňujú rozpustnosť rekombinantnej chitinázy z *Drosera binata*, ktorá sa v našich predchádzajúcich experimentoch vyskytovala v nerozpustnej proteínovej frakcii. Z rôznych faktorov ovplyvňujúcich rozpustnosť exprimovaných proteínov sme si vybrali – koncentráciu induktora a teplotu počas indukcie.

Materiál a metódy

V našich experimentoch sme použili dva typy expresných konštruktov pET32aDbChit a pET-K2DbChit. Do týchto vektorov bol vložený cDNA klon génu pre chitinázu bez sekvencie pre signálny peptid. Vektor pET32a(+) má ampicilínovú a chloramfenikolovú rezistenciu. Vektor pET-K2 je modifikáciou vektora pET32a(+), ktorá neobsahuje sekvenciu pre tioredoxín a disponuje kanamycínovou rezistenciou. Expresia génu v oboch vektoroch je pod kontrolou T7 promótoru.

Pre účely expresie rekombinantnej chitinázy bol využitý expresný kmeň *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL pričom bunky boli kultivované v tekutom Luria-Bertani (LB) médiu s pridaním selekčných antibiotík v závislosti od vektorovej konštrukcie.

Indukcia expresie rekombinantnej chitinázy prebehla podľa odporúčaní výrobcu s následnými modifikáciami kultivačných podmienok [9]. Pred samotnou indukciou sme odobrali 100 µl kontrolnej vzorky. K zvyšku kultúry bol pridaný induktor IPTG (izopropyl-β-D-1-tiogalaktopyranozid, Fermentas) do požadovanej finálnej koncentrácie (1 mM, resp. 0,5 mM) a kultivácia pokračovala 2 hodiny pri testovanej teplote indukcie (25, 30, resp. 37°C) s trepaním 220 rpm. Kultúra s exprimovaným rekombinantným proteínom bola rozdelená na 100 µl alikvóty, ktoré predstavovali indukované vzorky.

Separácia proteínov prebiehala na 12,5% polyakrylamidovom deliacom géli.

K vzorkám proteínov bolo pridaných 100 μ l 2x SDS-PAGE nanášacieho roztoku. Vzorky boli premiešané a denaturované zahriatím na 95°C počas 5 minút a následne nanášané na gél spolu s proteínovým štandardom Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (ThermoFisher Scientific). Polyakrylamidová gélová elektroforéza prebiehala v prítomnosti SDS tlmivého roztoku pri teplote 8°C a pri konštantnom napätí 200 V počas troch hodín. Po elektroforéze boli vzorky farbené pomocou komerčne dostupného kitu InVision™ His-tag In-gel Stain s cieľom detekcie His₆-tag sekvencií (Thermo Fisher Scientific, USA). Farbenie celkových proteínov bolo realizované cez noc v Coomassie brilliant blue G250 roztoku.

Výsledky a diskusia

V práci sme sa zamerali na objasnenie vplyvu teploty a koncentrácie induktora IPTG na expresiu chitinázy izolovanej z *Drosera binata* v prokaryotickom expresnom systéme *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL.

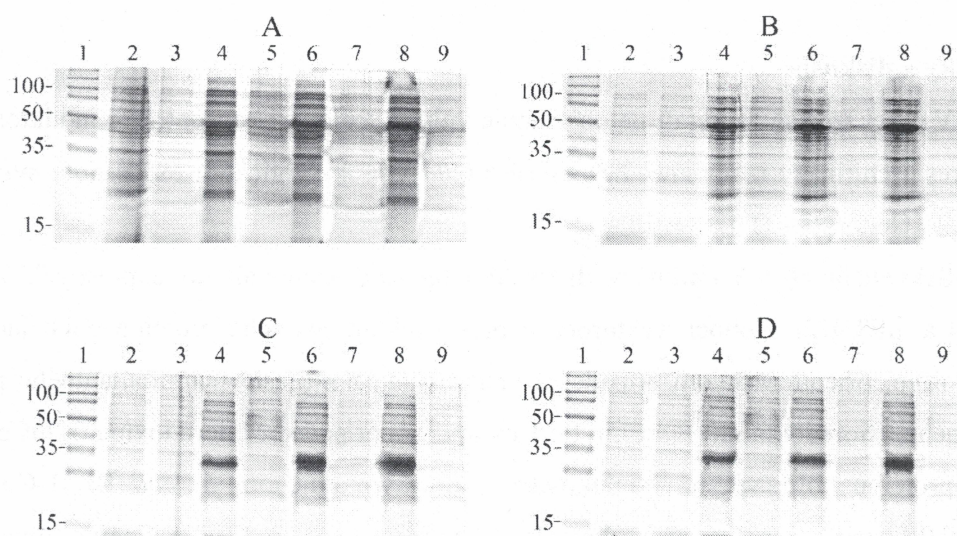
Sekvenciu cDNA chitinázy dĺžky 963 bp sme klonovali do expresných vektorov pET32a a pET-K2. V oboch vektoroch expresia rekombinantného proteínu bola riadená T7 promótorom, pričom v prvom prípade sa predpokladala expresia rekombinantného proteínu fúzaného s tioredoxínom (rDbChit-Trx) a v druhom prípade bez tioredoxínu (rDbChit). Obe formy proteínu boli úspešne produkované expresným kmeňom *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL pri odporúčaných podmienkach expresie (teplota 37°C a finálna koncentrácia induktora IPTG 1 mM).

V oboch prípadoch pri vysokej produkcii rekombinantného proteínu dochádzalo k ich agregácii do tzv. inklúzných teliesok. Zisk enzymaticky aktívneho proteínu z nerozpustných inklúzných teliesok predstavuje náročný proces s viacerými krokmi, zahŕňajúcimi solubilizáciu a refolding cieľového proteínu [10]. Modifikácia podmienok kultivácie buniek produkčného kmeňa môže znížiť tvorbu nežiadúcich agregátov, pričom medzi hlavné faktory ovplyvňujúce vznik inklúzných teliesok patria koncentrácia induktora a teplota pri ktorej beží expresia rekombinantného proteínu [11 – 12].

Produkcia oboch foriem rekombinantnej chitinázy z *Drosera binata* v bunkách expresného kmeňa bola indukovaná pomocou IPTG s využitím odporúčanej 1 mM, a tiež zníženej 0,5 M finálnej koncentrácie IPTG. Zníženie koncentrácie IPTG počas indukcie môže viesť k obmedzeniu tvorby inklúzných teliesok, pričom publikované štúdie uvádzajú širokú škálu koncentrácie IPTG, od 0,05 mM do 5 mM, pri ktorej sa dosiahla optimálna produkcia rekombinantného proteínu [13 – 14].

Koncentrácia induktora IPTG, pri ktorej dochádza k maximálnej produkcii

rekombinantného proteínu nemusí nevyhnutne predstavovať koncentráciu, pri ktorej je produkcia enzymaticky aktívneho proteínu najvyššia [15]. Naše experimenty nepreukázali závislosť produkcie oboch foriem rekombinantného proteínu od použitej koncentrácie IPTG induktora. Zníženie koncentrácie IPTG na 0,5 mM nemalo pri detekcii celkových proteínov (Obr. 1) ani pri fluorescenčnej detekcii rekombinantných His₆-tag sekvencií (Obr. 2) výrazný vplyv na tvorbu rekombinantného proteínu ani na zvýšenie jeho podielu v rozpustnej proteínovej frakcii.

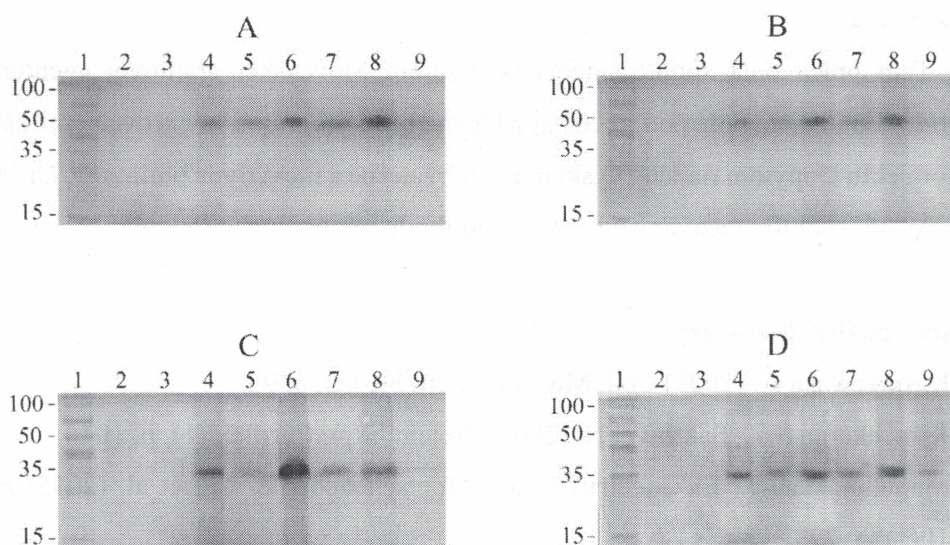


Obr. 1. Farbenie celkových proteínov s Coomassie Brilliant Blue G250

A – rDbChit-Trx, 0,5 mM IPTG; B – rDbChit-Trx, 1 mM IPTG; C – rDbChit, 0,5 mM IPTG; D – rDbChit, 1 mM IPTG; dráha 1 – proteínový štandard Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder; 2 – nerozpustná proteínová frakcia, neindukovaná kontrolná vzorka; 3 – rozpustná proteínová frakcia, neindukovaná kontrolná vzorka; 4; 6; 8 – nerozpustná proteínová frakcia, indukcia pri teplote 25°C, 30°C, resp. 37°C; 5; 7; 9 – rozpustná proteínová frakcia, indukcia pri teplote 25°C, 30°C, resp. 37°C

V pilotnom experimente bola expresia rekombinantnej chitinázy z *Drosera binata* realizovaná pri teplote 37°C, ako odporúčal producent expresného kmeňa. Maximálna rýchlosť rastu buniek *E. coli* sa dosahuje pri teplote 37 – 39°C, pričom táto teplota tiež korešponduje s maximálnou aktivitou *lac* promótoru. Avšak kultivácia buniek expresného kmeňa pri suboptimálnych teplotách môže viesť k redukcii nežiaducich metabolických odpovedí na produkciu rekombinantného proteínu, a tým zvyšovať jeho podiel v rozpustnej forme [16].

Preto sme sa pokúsili o optimalizáciu podmienok kultivácie znížením teploty na 30°C a 25°C. Viaceré štúdie dokumentujú produkciu enzymaticky aktívnej formy proteínu dosiahnutú prostredníctvom zníženia teploty počas indukcie exprese [17 – 18].



Obr. 2. Detekcia His₆-tag sekvencií rekombinantných chitináz pomocou InVision™ His-tag In-gel Stain
 A – rDbChit-Trx, 0,5 mM IPTG; B – rDbChit-Trx, 1 mM IPTG; C – rDbChit, 0,5 mM IPTG; D – rDbChit, 1 mM IPTG; dráha 1 – proteínový štandard Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder; 2 – nerozpustná proteínová frakcia, neindukovaná kontrolná vzorka; 3 – rozpustná proteínová frakcia, neindukovaná kontrolná vzorka; 4; 6; 8 – nerozpustná proteínová frakcia, indukcia pri teplote 25°C, 30°C, resp. 37°C; 5; 7; 9 – rozpustná proteínová frakcia, indukcia pri teplote 25°C, 30°C, resp. 37°C

Tento stav je pravdepodobne spôsobený zníženou rýchlosťou translácie, kedy dochádza k zlepšeniu správneho formovania štruktúry bioaktívnych proteínov a k obmedzeniu ich agregácie [19]. Pri rozdielnych teplotách bolo možné pri oboch formách rekombinantnej chitinázy z *Drosophila binata* detegovať rozdiely v jej produkcii a v obsahu v rozpustnej proteínovej frakcii, farbením celkových proteínov (Obr. 1), a aj fluorescenčnou detekciou His₆-tag sekvencií (Obr. 2). Výsledky ukázali, že so zvyšovaním teploty sa zvyšovala aj produkcia rekombinantnej chitinázy, na druhej strane však pri teplote 37°C bol detegovaný jej najnižší obsah v rozpustnej proteínovej frakcii. Pri produkcii oboch foriem chitinázy pri 30°C bol detegovaný ich najvyšší podiel v rozpustnej proteínovej frakcii.

Záver

V našej práci sme sa zamerali na optimalizáciu podmienok indukcie pri expresii rekombinantnej chitinázy z *D. binata* v *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL. Zníženie koncentrácie induktora na 0,5 mM nemalo detekovateľný vplyv na zvýšenie rozpustnosti proteínu. Suboptimálna teplota 30°C počas indukcie sa preukázala ako účinnejší faktor pri snahe o zachovanie bioaktivity exprimovaného proteínu.

Pod'akovanie

Táto práca bola spolufinancovaná grantom Slovenskej grantovej agentúry VEGA 2/0041/20. Publikácia bola podporená aj z Operačného programu Integrovaná infraštruktúra v rámci projektu Dopytom riadený výskum pre udržateľné a inovatívne potraviny, Drive4SIFood 313011V336, spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Kasprzewska A. (2003) Cell. Mo. Biol. Lett. 8(3), p. 809
- [2] Kirubakaran S. I., Sakthivel N. (2007) Protein Expr. Purif. 52(1), p. 1046
- [3] Madhuprakash J., El Gueddari N. E., Moerschbacher B. M., et al. (2015) PLoS One 10(1), p. 1932
- [4] Cletus J., Balasubramanian V., Vashisht D., et al. (2013) Biotechnol. Lett. 35(11), p. 1719
- [5] Islam R., Datta B. (2015) Int. J. Appl. Res. 1, p. 55
- [6] Neeraja C., Anil K., Purushotham P. (2010) Crit. Rev. Biotechnol. 30(3), p. 231
- [7] Baltz R. H., Demain A. L., Davies J. E. (2010) Manual of industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology. Press, Washington DC, USA, p. 273
- [8] Donovan R. S., Robinson C. W., Glick B. R. (1996) J. Ind. Microbiol. 16, p. 145
- [9] Agilent Technologies, USA [Citované: 25. marec 2022] <<https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/230240.pdf>>
- [10] Singh A., Upadhyay V., Upadhyay A. K., et al. (2015) Microb. Cell Fact. 14, p. 41
- [11] Larentis A. L., Nicolau J. F., dos Santos Esteves G., et al. (2014) BMC Res. Notes 7, p. 671
- [12] Kielkopf C. L., Bauer W., Urbatsch I. L. (2021) Cold Spring Harb. Protoc. 2, p. 70
- [13] Berrow N. S., Büsow K., Coutard B., et al. (2006) Acta Crystallogr. D. 62, p. 1218
- [14] Zhao H., Xu Y., Li X., et al. (2021) Protein J. 40, p. 245
- [15] Marbach A., Bettenbrock K. (2015) J. Biotechnol. 157(1), p. 82
- [16] Kaur J., Kumar A., Kaur J. (2018) Int. J. Biol. Macromol. 106, p. 803
- [17] Kleber-Janke T., Becker W. M. (2000) Protein Expr. Purif. 19(3), p. 419
- [18] Sørensen H. P., Mortensen K. K. (2005) Microb. Cell Fact. 19(3), p. 1
- [19] Falak S., Sajed M., Rashid N. (2022) Biologia 77, p. 893