

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Medicinální chemie



*Andrea Tichá*

*Expres a purifikace proteinu s inkorporovaným foto-methioninem – využití světlem  
iniciovaného síťování k mapování protein-proteinových interakcí*

Expression and purification of protein containing photo-methionine – the use of photo-  
induced cross-linking to map protein-protein interaction

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Mgr. Renata Ptáčková, Ph.D.

Praha, 2019

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Podpis

## **Poděkování**

Nejprve bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Renatě Ptáčkové, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, za trpělivost, jak při práci v laboratoři, tak při opravování mé bakalářské práce. Zároveň jí děkuji za cenné rady a poznámky k vypracovávání.

Dále bych také poděkovala doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D. a RNDr. Tomášovi Ječmenovi, Ph.D. za rady či připomínky a poskytnutí užitečných informací. Jsem ráda, že jsem mohla pracovat v tomto kolektivu.

## **Abstract**

Protein 14-3-3 $\zeta$  is an important protein that plays a role in the regulation of cell survival and keeps cell from stress and possible apoptosis. A photo-activatable group can be incorporated into the protein to detect protein-protein interaction by photo induced crosslinking. The aim of this work was to create protein with incorporated photo-methionine in auxotrophic bacteria *E. coli* B834 and to optimize expression conditions. Photo-methionine is structurally very similar to natural methionine, so photo-methionine can be incorporated into the protein by host aminoacyl tRNA synthetase. It has been studied how the rate of incorporation varies depending on production time. After 3 or 6 hours, up to 70 % incorporation of photo-methionine was achieved compared to about 50 % after one hour.

Keywords: 14-3-3 $\zeta$ , *E. coli* B834, incorporation of photo-methionine, photo induced crosslinking

## **Abstrakt**

Protein 14-3-3 $\zeta$  je protein, který hraje velkou roli v regulaci buněčného přežití a ochraňuje buňku před stresem a možnou apoptózou. K zjištění protein-proteinových interakcí pomocí světlem iniciovaného síťování je možné do proteinu inkorporovat foto-aktivovatelnou skupinu. Cílem této práce bylo exprimovat protein s inkorporovaným foto-methioninem v auxotrofních bakteriích *E. coli* B834 a optimalizovat podmínky exprese. Jelikož foto-methionin je strukturně velmi podobný přirozenému methioninu, tak může být začleněn do proteinu pomocí hostitelské aminoacyl tRNA syntetázy. Bylo studováno, jak se mění míra inkorporace v závislosti na době produkce. Po 3 nebo 6 hodinách bylo dosaženo až 70 % inkorporace foto-methioninu oproti přibližně 50 % po jedné hodině.

Klíčová slova: 14-3-3 $\zeta$ , *E. coli* B834, inkorporace foto-methioninu, světlem iniciované síťování

## Obsah

<b>Poděkování</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>Abstrakt</b> .....	<b>5</b>
<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Teoretický úvod</b> .....	<b>8</b>
1.1 Bakteriální exprese.....	8
1.1.1 E. coli B834 (DE3).....	9
1.1.2 Expresní vektor.....	9
1.1.3 Exprese rekombinantního proteinu.....	11
1.2 Inkorporace nepřírodných aminokyselin do proteinů.....	12
1.2.1 Principy inkorporace nepřírodných aminokyselin do proteinů.....	13
1.2.2 Foto-methionin a foto-leucin.....	14
1.3 Síťování proteinů .....	15
1.3.1 Chemické síťování.....	15
1.3.2 Světlem iniciované síťování .....	16
1.3.3 Světlem iniciované síťování pomocí foto-methioninu .....	16
1.4 Hmotnostní spektrometrie.....	17
1.4.1 MALDI-TOF .....	17
1.5 Protein 14-3-3 .....	18
<b>2. Cíle práce</b> .....	<b>20</b>
<b>3. Materiál a metody</b> .....	<b>21</b>
3.1 Seznam použitých přístrojů.....	21
3.2 Seznam použitých chemikálií .....	21
3.3 Bakteriální buňky a plazmidy .....	23
3.4 Seznam použitých pufrů a roztoků.....	23
3.5 Metody .....	24
3.5.1 Inokulace bakterií .....	24
3.5.2 Příprava kompetentních buněk .....	24
3.5.3 Transformace buněk .....	25
3.5.4 Izolace plazmidové DNA .....	25
3.5.5 Produkce proteinu.....	26
3.5.6 SDS-PAGE .....	26
3.5.7 Izolace proteinu .....	28
3.5.8 Dialýza a koncentrace.....	29
3.5.9 Stanovení koncentrace pomocí BCA.....	29
3.5.10 MALDI-TOF MS analýza .....	29
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>31</b>
4.1 Produkce proteinu s foto-methioninem.....	31
4.2 Izolace proteinu.....	32
4.3 Stanovení míry inkorporace foto-methioninu .....	34
<b>5. Diskuze</b> .....	<b>39</b>
<b>Závěr</b> .....	<b>41</b>
<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>42</b>

## Seznam použitých zkratk

ACN	acetonitril
bp	pár bazí (z angl. base pair)
BCA	kyselina bicinchoninová (z angl. bicinchoninic acid)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
c	koncentrace (v mol.dm <sup>-3</sup> , pokud není jinak uvedeno)
DTT	dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI-FTICR	ionizace elektrosprejem s kombinací iontové cyklotronové rezonance s fourierovou transformací (z angl. electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance)
fM	L-foto-methionin
fL	L-foto-leucin
IPTG	isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
Da	Dalton, jednotka hmotnosti
LB	médium Luria Broth
MALDI	desorpce a ionizace laserem za asistence matrice (z angl. matrix assisted laser desorption/ionization)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
PIXL	světlem iniciované síťování (z angl. photo-induced cross-linking)
rpm	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (z angl. sodium dodecylsulphatepolyacrylamide gel electrophoresis)
t	čas (v s, není-li uvedeno jinak)
TOF	analyzátor při hmotnostní spektrometrii měřící dobu letu částice (z angl. time of flight)
UV	ultrafialová část spektra elektromagnetického záření (z angl. ultraviolet)
v/v	objemová procenta
w/v	poměr hmotnost/objem

# 1. Teoretický úvod

## 1.1 Bakteriální exprese

V různých hostitelích se mohou exprimovat rekombinantní proteiny, a to díky pokrokům v technologii klonování. Nalezení vhodného systému pro produkci rekombinantního proteinu s nejvyšší biologickou aktivitou je jeden z hlavních problémů. Systémy mohou být prokaryotické (*E. coli*, *B. subtilis*) či eukaryotické (kvasinky, hmyzí či savčí buňky).<sup>1,2</sup>

Jednoduchost, vysoký výtěžek rekombinantního proteinu a časová i finanční nenáročnost jsou výhody bakteriálního expresního systému, mezi nevýhody bakteriálního systému patří to, že neumožňují posttranslační modifikace, což následně může ovlivnit terciární strukturu proteinu, dále také tvorba inkluzních tělísek či srážení produkovaných proteinů. Další nevýhodou může být právě i zmiňovaný vysoký výtěžek proteinu, který se může akumulovat a metabolismus hostitele ho nemusí akceptovat, což může způsobit buněčný stres. V bakteriích lze exprimovat pouze proteiny určité velikosti, největší molekulová hmotnost proteinu je okolo 150 kDa.<sup>3,4</sup>

Mezi dominantní expresní systémy patří systém *Escherichie coli*, který je velmi často využíván v laboratořích, ale také se používá jako měřítko pro srovnávání různých expresních platforem či pro komerční účely.<sup>5</sup>

V posledních letech bylo dosaženo významných pokroků i u jiných alternativních bakteriálních expresních systémů. *Lactococcus lactis* se jeví jako vhodný expresní systém pro membránové proteiny. K produkci nestabilních proteinů existují jiné expresní systémy například halofilních bakterií, korynebakterií nebo bakterií rodu *Streptomyces*.<sup>6</sup>

Jak již bylo zmíněno, *Escherichia coli* jako hostitelský organismus má mnohé výhody, a proto patří mezi nejčastěji používané bakterie k produkci rekombinantních proteinů. Mezi jednu z výhod patří její kinetika růstu ve vhodném prostředí, kde se může buňka zdvojit již za dobu 20 minut. Takto je možné získat stacionární fázi inokulované kultury, která je zředěna 1/100 nasycenou výchozí kulturou, během několika hodin. Další výhodou může být i transformace plazmidem, která je snadná a rychlá. Avšak exprese rekombinantního proteinu může značně zatížit mikroorganismus a tím snížit jeho generační dobu. *Escherichie coli* je prokaryotním systémem, díky čemuž může být náročné exprimovat heterologní eukaryotické proteiny, které by byly správně modifikovány a může být složité usnadnit sekreci exprimovaného proteinu ve vysokém výtěžku.<sup>4</sup>

### 1.1.1 *E. coli* B834 (DE3)

Kmen bakterií *E. coli* B834 je auxotrofním kmenem odvozeným od kmene BL21<sup>7</sup>, který neumí syntetizovat methionin a je komerčně dostupný jako derivát  $\lambda$ DE3. Tento kmen byl použit k specifickému značení proteinů a také na deriváty selenomethionylových proteinů, které byly následně využity k rentgenové krystalografii.<sup>8</sup> Ve výzkumech se ukázal kmen B834 (DE3) tolerantnější k expresi než kmen BL21 (DE3), i když jsou oba kmeny téměř identické.<sup>9</sup> Předpokládá se, že kmeny jsou více odlišné než jen kvůli methioninové auxotrofii. Kmen BL21 (DE3) dlouho sloužil jako modelový organismus pro biotechnologické využití jako například pro výrobu rekombinantních proteinů. Rychlý růst buněk v minimálním médiu, nízká produkce acetátu, pokud se buňky pěstují s vysokou koncentrací glukózy nebo nízká četnost proteáz (enzymy štěpící bílkoviny) patří nesporně k výhodám tohoto kmene.<sup>10</sup> Další auxotrofní kmeny byly odvozeny od *E. coli* K-12 (např. Met auxotrofní *E. coli* K-12 JW3973-1 nebo Leu auxotrofní *E. coli* K-12 JW5807-2<sup>11</sup>), těchto takto odvozených kmenů je přes 300, ovšem těmto kmenům na rozdíl od Met auxotrofního derivátu DE3 kmene B834 chybí gen pro T7 RNA polymerázu, který je nezbytný pro klasický systém indukce exprese proteinu pomocí isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosidu (IPTG).<sup>12</sup>

### 1.1.2 Expresní vektor

Expresní vektor je většinou plasmidová DNA nebo virus, který je vložen do buňky a slouží k expresi proteinu. Do cílové buňky se vloží specifické plasmidy, které vkládají specifický gen. Expresní vektor je základním kamenem produkce proteinů. Expresní plasmidy do buňky vkládáme procesem transformace. Zvýšení propustnosti membrány lze docílit pomocí chemických činidel nebo elektroporací, takovéto buňky jsou poté označovány jako kompetentní.<sup>2</sup>

Expresní vektor má:

- Promotor – místo, kam nasedá polymeráza a iniciuje transkripci inzertu. V případě *E. coli* se nejčastěji využívá T7 promotor, na který nasedá T7 RNA polymeráza, která pochází z genomu bakteriofága T7. Pro expresi je nutné vybrat příslušný kmen *E. coli*, který obsahuje příslušný gen pro T7 RNA polymerázu. T7 RNA polymeráza se vysoce specificky váže k T7 promotoru, který je aktivovaný pomocí IPTG.<sup>13,14</sup>
- Počátek transkripce – místo, kde začíná polymeráza syntetizovat mRNA pro požadovaný rekombinantní protein.
- Regulační sekvence – místa interakce, kde interagují tzv. regulační proteiny (aktivátory či represory) transkripce. V případě *E. coli* je to nejčastěji sekvence *lacI*, jejíž genový produkt *lac*

repressor se bez přítomnosti IPTG váže na lac operátor na DNA vektoru, v blízkosti promotoru T7 a tím blokuje aktivitu T7 RNA polymerázy a tedy transkripci, pokud se ovšem lac repressor naváže na IPTG, tak umožní nasednout T7 RNA polymeráze na promotor a tím zahájit transkripci.

-Klonovací místo – úsek vektorové DNA, který obsahuje několik sekvencí pro restriční endonukleázy a díky tomu slouží jako univerzální klonovací místo. Je možné zde klonovat inzert.

-Terminátor – zde se transkripce inzertu ukončuje.

-Počátek replikace – aby mohla být transkripce úspěšná, je nutné, aby byl plazmid nejprve replikován. Pro expresi je nutné mít vysoký počet kopií plasmidu, například u *E. coli* se tento počet kopií pohybuje okolo 20 až 40 kopií na buňku.<sup>15</sup>

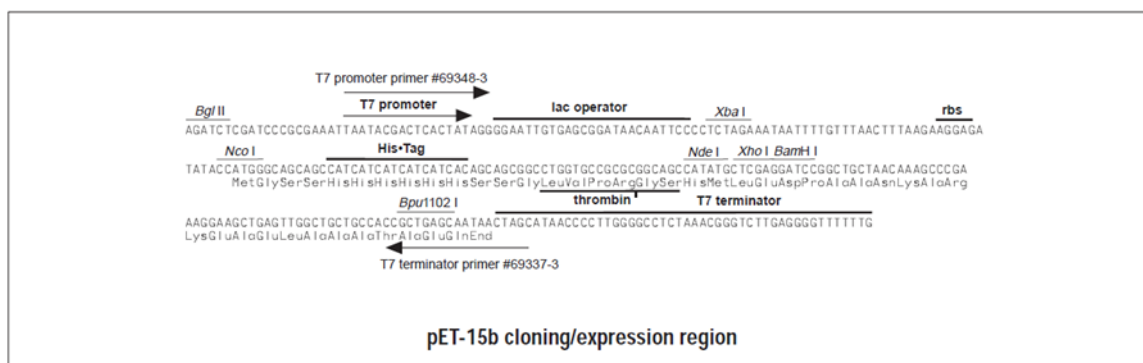
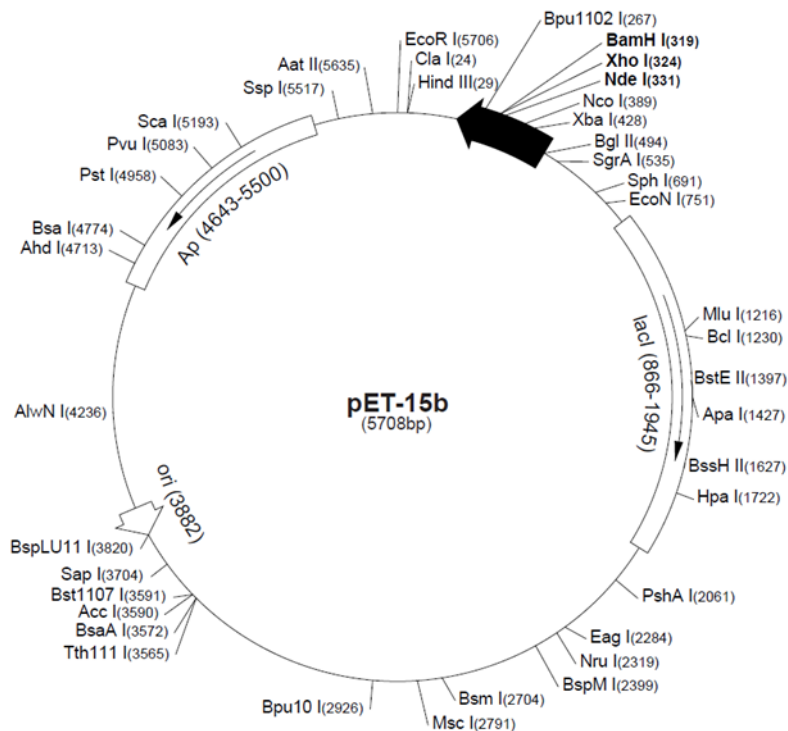
Také se do expresních vektorů mohou vnést další sekvence, které jsou určitou výhodou pro další využití (např. selekce transformovaných buněk, purifikace produkovaného proteinu). Například se vkládají tzv. *bla* kódující sekvence, které umožňují vložit do buňky rezistenci na antibiotika a buňka tak může růst i v médiu, které obsahuje dané antibiotikum. Tato sekvence kóduje například enzym pro  $\beta$ -laktamázu, což způsobuje rezistenci proti penicilinu či ampicilinu.<sup>16</sup>

Dále je možné do exprimovaných proteinů dát tzv. tagy, což usnadňuje následnou purifikaci proteinu. Takto se do proteinu přidává například His tag, který kóduje histidinovou kotvu a umožňuje následnou purifikaci pomocí afinitní chromatografie.<sup>16</sup>

Jako příklad lze uvést expresní vektor pET-15b o velikosti 5,7 kbp s replikačním počátkem pBR322 vhodným pro produkci v *E. coli*, který nese gen pro rezistenci na ampicilin a pro polyhistidinovou kotvu, která je připojována na N-konec proteinu (**Obr.1** na str.11).

**pET-15b sequence landmarks**

T7 promoter	463-479
T7 transcription start	452
His•Tag coding sequence	362-380
Multiple cloning sites ( <i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
lacI coding sequence	(866-1945)
pBR322 origin	3882
<i>bla</i> coding sequence	4643-5500

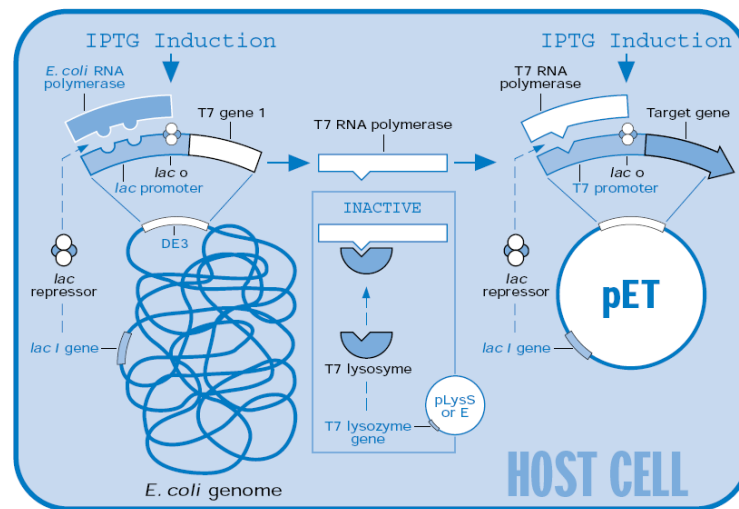


**Obř. 1:** Mapa expresního vektoru pET-15b. Převzato a upraveno.<sup>17</sup>

### 1.1.3 Expese rekombinantního proteinu

Pro expresi v *E. coli* se používá T7 promotor bakteriofága, jak již bylo zmíněno v předešlé kapitole. Aktivita tohoto promotoru je dána regulovanou transkripční jednotkou, která dodává specifickou T7 RNA polymerázu.<sup>18</sup> Tato T7 RNA polymeráza je 5x rychlejší než RNA polymeráza, která je součástí genomu *E. coli*.<sup>13</sup> Indukovatelný expresní systém se vytvořil tak, že gen pro bakteriofágovou T7 RNA polymerázu byl umístěn pod kontrolu regulačních prvků lac operonu, který je součástí genomu *E. coli*. Indukovanou expresí či infekcí bakteriofágem je nutné dodat hostitelským buňkám T7 RNA polymerázu, která je nutná k expresi rekombinantního proteinu. V buňce se mohou nacházet regulační proteiny, což jsou aktivátory nebo inhibitory. V lac operonu v místě operátoru je přítomný lac represor, který bez

indukce IPTG brání expresi. Pomocí indukce IPTG je přepsán gen pro T7 RNA polymerázu a může být zahájena exprese cílového proteinu, T7 RNA polymeráza může nasednout na T7lac promotor (viz Obr. 2), který je stejně jako lacUV5 promotor v genomu *E. coli* blokován lac represorem v nepřítomnosti IPTG. Před indukcí IPTG probíhá tzv. bazální exprese T7 RNA polymerázy, a pokud je cílový produkt této exprese pro buňku toxický, selektují se jen mutované bakteriální klony, které neprodukují rekombinantní protein.<sup>14</sup> V tomto případě je vhodné použít kmen, který navíc obsahuje např. vektor pLysS produkující T7 lysozym, který inhibuje bazální transkripci (**Obr.2**), která je následně přehlušena silnou IPTG indukcí.



**Obr. 2:** Schéma indukce pomocí IPTG v hostitelských buňkách *E. coli* (DE3) / (DE3)pLysS transformovaných vektorem pET s vloženým genem pro expresi cílového proteinu. Převzato a upraveno.<sup>17</sup>

## 1.2 Inkorporace nepřírozených aminokyselin do proteinů

Proteiny se sestávají z 20 základních aminokyselin, které je možné kódovat pomocí genetického kódu. Včleňování nepřírozených aminokyselin poskytuje molekulárním biologům a chemikům možnost studovat strukturu a dynamiku proteinů, ale také studovat aktivitu v živých buňkách a různé interakce. Pro místně specifické značení se do proteinů inkorporují nepřírozené aminokyseliny s bioorthogonální reaktivitou, což má využití v mikroskopii či spektrometrii.<sup>19</sup>

Proteinové inženýrství využívá schopnost včlenit do klasické biologické syntézy proteinů i nepřírozené aminokyseliny. V současnosti bylo použito a navrženo, jak včlenit nepřírozené aminokyseliny do proteinu, avšak s ohledem na širší aplikaci nepřírozených aminokyselin se neustále vyvíjí nové přístupy. Schopnost začlenit kotranslačně aminokyseliny do produkovaných proteinů v buňce, buď v specifických místech pomocí genetické expanze

kódu, nebo prostřednictvím inkorporace specifického zbytku v celém proteasomu (viz kapitola 1.2.1), se v posledních 15 letech rapidně vyvíjela.<sup>20</sup>

### 1.2.1 Principy inkorporace nepřírodních aminokyselin do proteinů

V 50. a 60. letech 20. století byla definována základní mechanika translace proteinu. Vymezení vztahu mezi tripletovými nukleotidovými kodony a aminokyselinami značně posunulo výzkum a zjistilo se, že kodony, které byly trinukleotidy, kódovaly specifickou aminokyselinu. Následně se vymezily kodony iniciační, které zahajovaly translaci a také stop kodony, které ukončovaly syntézu polypeptidu. Ve stejném období byly objeveny aminoacyl tRNA syntetázy a tzv. messenger RNA (mRNA). Základem genetického kódu byla stanovena aminoacylace tRNA syntetázami. Za přiřazování správné aminokyseliny na tzv. transferovou RNA mohou právě aminoacyl tRNA syntetázy. Současně se zjišťováním průběhu translace byla studována i možnost, jak začlenit nepřírodní aminokyseliny do proteinů.

Díky studii analogů rostlinných aminokyselin bylo zjištěno, že tyto aminokyseliny mohou být inkorporovány do proteinů. Aminoacyl tRNA syntetáza je hlavním kontrolním mechanismem, který zabraňuje inkorporaci analogu. K včlenění analogu do rostoucího polypeptidového řetězce je nutné obejít specifitu syntetázy.<sup>21</sup> Toho lze dosáhnout na základě strukturní podobnosti analogu s přírodní aminokyselinou, kdy může docházet k přidělení kodonu standardní aminokyseliny, a tak může docházet k substituci přírodní aminokyseliny příslušným strukturním analogem v celé sekvenci proteinu. Jako příklad lze uvést bakterie *E. coli*, jejichž methionyl-tRNA syntetáza je schopna místo standardního methioninu zpracovat foto-methionin.<sup>23,24,25</sup>

Při translaci dochází ke konkurenci mezi přírodní aminokyselinou a jejím analogem a díky tomu je výtěžek produkce s inkorporovanou nepřírodní aminokyselinou malý nebo až nulový. Proto bylo nutné optimalizovat proces exprese rekombinantních proteinů a k zvýšení inkorporace analogu se provádí rekombinantní exprese v minerálním médiu, ve kterém se nenachází přírodní methionin, a navíc se do minerálního média přidává směs aminokyselin, která blokuje syntézu methioninu.<sup>25</sup>

V prvním případě, kdy byl nahrazena přírodní aminokyselina jejím analogem, lze použít auxotrofní kmen, který zvyšuje následnou produkci proteinu s analogem, respektive míru inkorporace analogu. Použitím auxotrofního kmene lze dosáhnout zvýšení inkorporace, jelikož takovéto kmeny nedokáží syntetizovat konkrétní aminokyselinu a poté je zdrojem této aminokyseliny právě dané médium.<sup>21</sup>

Další způsob je způsob založený na genetické manipulaci, kdy inkorporace nepřírozené aminokyseliny, která se vkládá na určené místo, probíhá pomocí orthogonální aminoacyl tRNA syntetázy a k ní odpovídající tRNA, která je zároveň odpovídající k terminačnímu kodonu.<sup>20</sup>

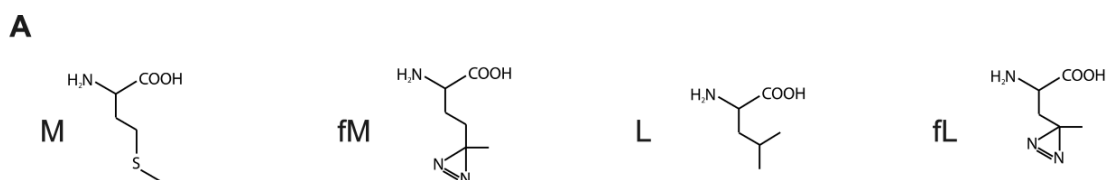
### 1.2.2 Foto-methionin a foto-leucin

Komerčně dostupné foto-aktivovatelné deriváty aminokyselin methioninu a leucinu nebo isoleucinu se používají ke studiu protein-proteinových interakcí.

Aminokyseliny, které nejsou přirozené jsou pro buňky často toxické. Z tohoto důvodu byla sledována biosyntéza bílkovin začleněním [3H] fenylalaninu a stanovovala se životaschopnost buněk, které byly pěstovány v přítomnosti či nepřítomnosti foto-aminokyselin vyloučením tryptofanové modři. Jelikož v kompletním růstovém médiu nebyl dostatek dvou esenciálních aminokyselin (leucinu a methioninu), byla tato biosyntéza snížena přibližně na 65 %. Přidáním foto-leucinu a foto-isoleucinu nemělo žádný podstatný účinek, zatímco pokud se přidal do média foto-methionin zvýšila se biosyntéza. Z této studie se pak stanovilo, že i když buňky rostly pomaleji než v kompletním růstovém médiu, tak nebyla jejich životaschopnost či morfologie ovlivněna.<sup>26</sup>

Fotochemicky značené aminokyseliny obsahují diazirinový kruh, což je slabý chromofor a ten při fotolýze při vlnové délce 350-370 nm vylučuje molekulu N<sub>2</sub> a karbén. Karbén je vysoce reaktivní, atakuje okolní molekuly a následně dochází ke vzniku produktu, který obsahuje dvojnou vazbu. Foto-leucin a foto-methionin, kteří mají diazirinový kruh ve své struktuře, se svými sterickými vlastnostmi podobají přírodnímu leucinu a methioninu (viz **Obr.3** na str.15), díky čemuž mohou být takto fotochemicky značené aminokyseliny začleněny do syntetických nebo buněčně exprimovaných proteinů.<sup>27</sup>

Díky schopnosti začlenění fotochemicky značené molekuly do struktury proteinů v *E. coli*, lze např. sledovat interakce proteinů. Právě pro inkorporaci foto-leucinu či foto-methioninu bylo vytvořeno DMEM-LM (Dulbecco's Modified Eagle's Limiting Medium). Přidáním analogu do limitního média můžeme zajistit inkorporaci těchto analogů do proteinů díky toleranci translačního buněčného mechanismu<sup>28,29</sup>



**Obr.3:** Strukturní vzorce methioninu a leucinu, vedle přirozených aminokyselin se nachází jejich forma foto-labilních analogů. Převzato a upraveno.<sup>30</sup>

### 1.3 Síťování proteinů

#### 1.3.1 Chemické síťování

Spojení dvou či více funkčních skupin proteinu kovalentní vazbou, inter nebo intramolekulárně prostřednictvím síťovacího činidla, je označováno jako chemické síťování. Síťovací činidla jsou malé organické molekuly, které reagují svými reaktivními skupinami s konci postranních řetězců aminokyselin jako například s  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SH}$  nebo  $-\text{NH}_2$ . Síťovací činidla se dělí do různých kategorií podle reaktivity, délky raménka molekuly síťovacího činidla a tyto kategorie mají různou funkci a aplikaci.

Mapovat interagující proteiny a jejich rozhraní přímo v buňce je možné pomocí chemického síťování s hmotnostně spektrometrickou analýzou, ale také lze chemické síťování použít například ke studiu připojení proteinu k pevnému nosiči či pro studium membránových proteinů.<sup>31</sup>

Existují dva přístupy provedení XL-MS (z angl. crosslinking mass spectrometry), ty se označují „top down“ a „bottom up“, které umožňují studovat produkty síťování celé nebo rozštěpené. V přístupu „bottom up“ je nejprve provedena separace proteinu, která probíhá pomocí chromatografie například afinitní či iontové a následně probíhá rozdělení podle velikosti elektroforézou na dodecylsulfát-polyakrylamidovém gelu. Následně je provedeno enzymatické štěpení a poté se provede hmotnostní analýza pomocí níž se identifikují produkty, které jsou spojeny vazbou na základě výsledných proteolytických peptidů.<sup>31</sup> Díky tandemové hmotnostní spektrometrii u dvou síťovaných peptidů jsou k dispozici informace o sekvenci vázaných peptidů a také i informace o místech, kde dochází k síťování. Druhý přístup („top down“) se používá pro síťované proteiny, které nejsou před hmotnostní analýzou štěpeny. Pro tento přístup je následná identifikace provedena pomocí ESI-FTICR a je používán hlavně pro stanovení trojrozměrné struktury proteinu s nízkým rozlišením.<sup>32</sup>

Díky chemickému síťování v kombinaci s hmotnostní spektrometrií a bioinformatikou našla tato metoda své uplatnění i při studiu velkých proteinových komplexů.<sup>33</sup> Chemické síťování má širokou škálu možností aplikace.

### 1.3.2 Světlem iniciované síťování

Pro zkoumání konformace proteinů a protein-proteinových interakcí v jejich přirozeném buněčném prostředí je v současnosti slibná technika foto-indukovaného síťování, jde o speciální případ síťování proteinů využívající fotochemické reakce – světlem iniciované síťování (PIXL, z angl. photo-induced cross-linking). Tato aplikace vyžaduje zavést foto-aktivovatelné skupiny do struktury proteinu. Foto-aktivovatelné analogy aminokyselin se zavedenou diarizinovou skupinou jako například foto-leucin, foto-isoleucin a foto-methionin byly zavedeny v roce 2005.<sup>26</sup>

Proteiny obsahující foto-aktivovatelnou skupinu je nutné ozářit UV zářením, a tak poskytují meziprodukty s krátkým poločasem života a díky tomu vznikají nové kovalentní vazby. Tato foto-aktivovatelná značka by měla být ideálně chemicky stabilní, také je nutné, aby probíhala fotolýza této značky ve vlnových délkách, které nepoškozují protein. Pro zkoumání membránových proteinů může být použita i tato metoda, jelikož se nezaměřuje pouze na lysinové zbytky jako je tomu u běžně používaných chemických síťovacích činidel, ale může být cílena na hydrofobní oblasti v proteinu. Spojení hmotnostní spektrometrie a foto-aktivovatelných analogů aminokyselin je velice atraktivní.

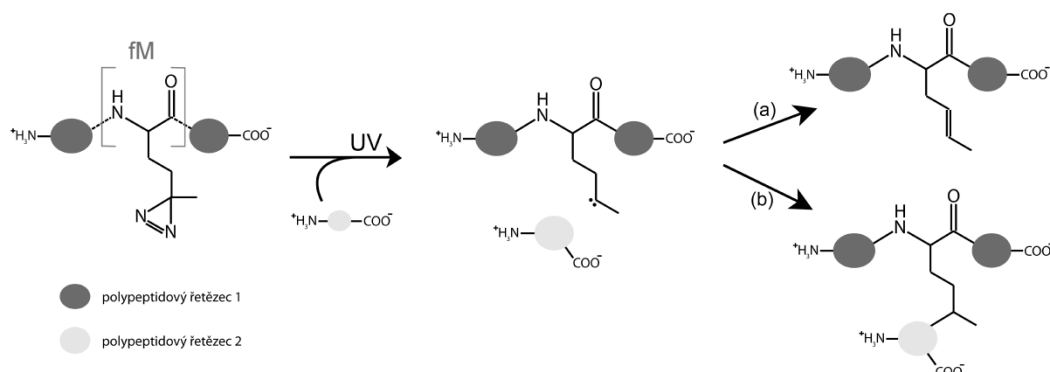
Výsledky hmotnostní analýzy odráží konformaci a flexibilitu proteinu, když se síťování provádí v nativním prostředí. Další výhodou je i to, že hmotnostní analýza vyžaduje pouze malé množství analytu a je rychlá. Díky této metodě lze zjistit terciární strukturu proteinu, ale i protein–proteinové rozhraní. Vzhledem k bohaté chemii diarizinu lze zjistit sekundární strukturní informace o studovaném proteinu (přesně zmapovat interakce proteinů a rozlišit zda se jedná o stabilní nebo přechodné interakce).<sup>28,34</sup>

V biokonjugačních technikách se používají značící a síťovací sloučeniny například fotoreaktivní skupiny jako arylazidy, azido-methyl-kumariny, benzofenony, antrachinony, určité diazo – sloučeniny, diariziny a deriváty psoralenu. Pro výzkum proteinové biologie patří mezi nejvýznamnější diariziny a arylazidy. Fenylazidy, benzofenony a diariziny po ozáření UV světlem generují radikály a ty poté nespecificky reagují se zbytky aminokyselin.<sup>35</sup>

### 1.3.3 Světlem iniciované síťování pomocí foto-methioninu

Diariziny, které patří mezi nejmenší foto-reaktivní skupiny a jsou obsaženy ve foto-aktivovatelných aminokyselinách (např. foto-methioninu či foto-leucinu), se ozářením UV zářením o vlnové délce 330-370 nm rozpadají na molekulu dusíku a biradikál karbenu, který je vysoce reaktivní a reaguje s jakýmkoli aminokyselinovým zbytkem v jeho okolí (viz Obr. 4 na str.17). Tvoří jen krátké vazby okolo 5 Å.<sup>22,36</sup>

Výtěžky foto-značení jsou většinou malé z důvodu reakce karbénového biradikálu s molekulami vody. Tato skutečnost je pozitivem, jelikož tato reakce minimalizuje nespecifické značení. V posledních letech se výzkum zaměřuje na značení pomocí diazirinu.<sup>37</sup>



**Obr.4:** Schéma síťování pomocí foto-methioninu (fM). V prvním kroku reakce probíhá osvětlení pomocí UV. Tímto ozářením vzniká vysoce reaktivní karbén, který reaguje dvěma způsoby. V kroku (a) dochází k terminaci a vytvoření dvojné vazby a v kroku (b) dochází ke vzniku inter a intramolekulárních produktů, jelikož zmíněný karbén napadá CH a NH skupiny blízkých aminokyselin. Převzato a upraveno.<sup>30</sup>

#### 1.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je základní analytická metoda, pomocí které lze analyzovat poměrně širokou škálu vzorků. Nejdříve se dané vzorky musí ionizovat, následně probíhá separace podle hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ) a poté probíhá samotná detekce. Tato analyzační metoda má velké výhody, jelikož spotřeba vzorku při analýze je minimální a umožňuje přesně určit hmotnost analyzované molekuly. Biomolekuly jsou polární, velké, a ne velmi snadno převeditelné do plynné fáze, kvůli čemuž se pro analýzu biomolekul hmotnostní spektrometrie začala používat až v 90. letech. Měkké ionizační techniky, které se vyvinuly později, byly pro studium biomolekul významné, protože zabraňují nežádoucí změně struktury, fragmentaci a dají se připravit ionty plynné fáze přímo z molekul roztoku.<sup>38,39</sup>

##### 1.4.1 MALDI-TOF

MALDI-TOF, z anglického Matrix-assisted laser desorption ionization, je jednou ze dvou metod „měkké ionizace“, která ionizuje molekulu pomocí laserové desorpce. Tato metoda je většinou kombinovaná s TOF (time of flight) dektektorem, který měří dobu průletu částice, která je potřebná pro překonání určité dráhy. Generování protonovaných molekul plynu probíhá tak, že se velký nadbytek matrice vysráží s molekulami analytu, které se pipetují na kovový substrát a směs se nechá zaschnout. Pomocí nanosekundových laserových pulsů, čímž jsou obvykle dusíkové lasery s vlnovou délkou 337 nm, se ozáří pevná látka. Maticí pro

biomolekuly je malá organická látka s vlnovou absorbcí laseru a pro biomolekuly se standardně používá kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová (HCCA), 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (sinapová, SA), 2,5-dihydroxybenzoová (gentisová, DHB), 4-hydroxy-3-methoxyskořicová (ferulová, FA). Matrice se volí dle toho, kolik energie poskytují během ionizace, desorpce a také dle stupně fragmentace. Pokud ionty musí být stabilní po dobu milisekund volí se kyselina kyanoskořicová jako matrice, která vede k vyšší citlivosti v MALDI. Intenzita signálu je závislá na začlenění peptidu do krystalů, zachycení nebo zadržení protonu během procesu desorpce.<sup>40,41</sup>

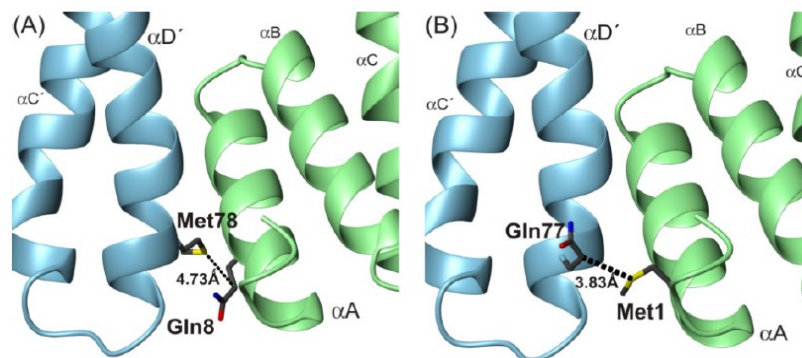
### 1.5 Protein 14-3-3

Protein 14-3-3 je exprimován každou eukaryotickou buňkou a u savců se skládá ze sedmi izoformem a účastní se regulace mnoha buněčných procesů. Rodina těchto proteinů se obvykle vykytuje v cytosolu, ale často se navazují na membránové proteiny. Tyto proteiny byly objeveny v roce 1967 v savčím mozku a byly pojmenovány 14-3-3, jelikož se eluovaly ve 14 frakci a byly na pozici 3.3 na gelu. Tvoří a fungují jako homodimery a heterodimery. Jejich struktura je vysoce helikální, dimery tvoří typické pohárkové struktury s velkým záporně nabitým centrálním kanálem. Dimerní struktury těchto sedmi izoformem proteinů u savců jsou velmi podobné, avšak mají rozdíly v relativní poloze monomerů, v úhlech mezi nimi a tím se mění jejich vazebná specifita. Vnitřní část vazebného kanálu a dimerní rozhraní jsou konzervované, na vnějším povrchu jsou variabilní aminokyselinové zbytky, které se liší mezi izoformami proteinů 14-3-3 a to může hrát roli ve specifických interakcích s cílovými proteiny. Velmi variabilní je C-konec ve všech 14-3-3 izoformách, liší se v sekvenci aminokyselin napříč izoformami a tento konec je důležitý při regulaci vazebných vlastností proteinů 14-3-3. Pro funkci a vazbu proteinů je důležitá pohárková struktura dimerů 14-3-3. Dvěma způsoby vazby vážou na sebe proteiny 14-3-3 threoninové a serinové shodné vazebné motivy.<sup>5,42,43</sup>

Tyto proteiny také váží nestandardní fosforylovaná serinová a threoninová místa, která nejsou optimálními konsenzuálními motivy. Bylo zjištěno, že mohou vázat nefosforylované cíle, v některých případech například protein Bax, nezávislý na fosforylaci, který je klíčovým regulačním mechanismem apoptózy.<sup>44</sup> Proteiny 14-3-3 jsou schopné vázat dvě shodné sekvence na jeden cílový protein. Je známo přes 200 vazebných partnerů pro protein 14-3-3, z důvodu dimerizace a různých způsobů, jak specifikovat cíle. Dimery proteinů 14-3-3 mohou podstoupit posttranslační modifikace jako například fosforylaci, alkylaci a acylaci, polyglykosylace a změny v důsledku oxidačního stresu, což může mít na proteiny 14-3-3 řadu účinků jako např.

funkční regulaci, vliv na cílové interakce, specifitu dimerizace nebo například lokalizaci v buňkách.<sup>5,45</sup>

V této práci byl použit pro optimalizaci inkorporace foto-methioninu během exprese v bakteriálních buňkách lidský protein 14-3-3 $\zeta$  (31kDa), který hraje zásadní roli v modulaci cest buněčného přežití, ochraňuje buňky před stresem i před smrtí buňky vyvolané chemoterapií. Prokázalo se, že u mnoha typů rakovin byla zvýšená exprese tohoto proteinu, a u rakoviny prsu to ukazuje na špatné klinické výsledky. Proto se tato izoforma stala potencionálním terapeutickým cílem u rakoviny prsu. Izoforma 14-3-3 $\zeta$  jako i ostatní z rodiny proteinů 14-3-3, reaguje s velkou sítí proteinů, z nichž některé jsou zapojeny do signalizace apoptózy. Tato izoforma obsahuje ve své sekvenci šest methioninových zbytků, díky vhodnému umístění methioninů v sekvenci proteinu (Met1, Met22, Met26, Met78 v N-koncové oblasti, Met121 – ve vazebném žlábků a Met218 na C-konci) lze studovat strukturu třech hlavních oblastí ovlivňujících funkci tohoto proteinu. Pomocí foto-methioninu lze aplikovat světlem iniciované síťování v kombinaci s MS (PIXL-MS) viz **Obr.5**.<sup>28</sup>



**Obr.5:** Vizualizace homodimeru lidského regulačního proteinu 14-3-3 $\zeta$ . Na obrázku je vidět znázornění nově nalezených interakcí díky použití PIXL-MS. Kombinací výsledků z hmotnostní spektrometrie, tandemové hmotnostní spektrometrie a již zjištěných rentgenostrukturálních dat je možné daný protein vizualizovat. Monomery jsou barevně odlišeny a jednotlivé helixy H1-H4 jsou popsány jako  $\alpha A$ ,  $\alpha B$ ,  $\alpha C$ ,  $\alpha D$ .

Převzato a upraveno.<sup>22</sup>

## 2. Cíle práce

Cílem této práce bylo připravit v expresním systému *Escherichie coli* B843 (DE3) modelový protein 14-3-3 $\zeta$  s inkorporovaným foto-methioninem. Určit míru inkorporace foto-methioninu pomocí MS po expresi proteinu za daných podmínek po 1, 3 a 6 hodinách a stanovit tak optimální dobu produkce.

Následně takto připravený protein s integrovaným foto-methioninem bude využit ke studiu protein – proteinových interakcí pomocí světlem iniciovaného síťování. Optimalizovaný protokol bude použit pro přípravu mutantních variant proteinu 14-3-3 $\zeta$  a dalších biologicky významných proteinů.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1 Seznam použitých přístrojů

**Inkubátor** – economy incubator size 1, Gallenkamp

**Třepačka s inkubátorem** –KS 4000 iControl, IKA

**Pipety** – Eppendorf, Gilson

**Špičky** – Eppendorf, Gilson

**Spektrofotometr** – DS-11+, DeNovix

Sunrise Microplate Absorbance Reader with XFLUOR V4.51, Tecan

**Předvážky** – SP401 Scout Pro, Ohaus

**Analytické váhy** – Discovery Model DV214C, Ohaus

**Míchačka** – Variomag Mono Komet, Thermo Scientific

**pH Metr** – inoLab pH 7110, WTW

**Sada na elektroforézu** – SE200, Hoefer Scientific Instruments

Mini-PROTEAN Tetra Cell, Biorad

**Zdroj na elektroforézu** –Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150, Pharmacia

**Sonikační lázeň** – Elma

**Ultrazvuková sonda** – Sonopuls HD3100 se sondou KE 76, Bandelin

Ultrasonic Processor UP100H, Hielscher

**Centrifuga** – Universal 320R, rotor 4250, Hettich

**Minicentrifuga** – MiniSpin, rotor F-45-12-11, Eppendorf

**Pumpa** – Minipuls Evolution F110701, Gilson

**Třepačka** – Rocker 2D basic, IKA

**Hmotnostní spektrofotometr** – MALDI-TOF, Ultraflex III, Bruker Daltonics

**Vakuový koncentrátor** – CentriVap micro IR, Labconco

#### 3.2 Seznam použitých chemikálií

**Lachema** – NH<sub>4</sub>Cl

L-Phe

CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

KCl

NiSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O

Methanol

**Sigma** – Glukosa

MgSO<sub>4</sub>

Thiamin hydrochlorid

L- Ile

L-Lys

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

CuSO<sub>4</sub> (4 % w/w)

Kyselina bichoninová (BCA Solution I)

Tris-Cl

Iodacetamid

Coomassie Brilliant Blue R-250

Lysozym

**Fluka** – NaCl

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O

EDTA

Tetramethylethylendiamin

Amonium persulfate

Dodecylsulfát sodný

Trifluoroctová kyselina

**Roth** –Dithiotreitol

Imidazol

Acrylamide

Ampicilin, sodná sůl

Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid

Bromfenolová modř

**U.S. Biochemical** - L-Valin

L – Leucin

L – Threonin

**Merck** – Acetonitril

4 - ethylmorfolin

H<sub>2</sub>O

Amicon Ultra 15 ml Centrifugal Filters 30000 NMWL

**Lachner** –  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Glycerol

**Penta** –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

Kyselina octová

**Bio Basic** – Trypton

**Biorad** – Precision Plus Protein Dual Color Standards

**Oxoid** – Kvasničný extrakt

**Thermo Scientific** – L – foto – methionin

PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder

**Roche**- Complete EDTA – free Protease Inhibitor Coctail

**Serva** – Bis-acrylamide

**Promega** – Trypsin

**Bruker Daltonics** – kyselina  $\alpha$ -kyanoskořicová

### 3.3 Bakterální buňky a plazmidy

**Novagen** – *Escherichia coli* B834 (DE3)

**Coli Genetic Stock Center** – *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

**Plazmid poskytnut prof. Tomášem Obšilem, Ph.D.** – pET – 15b 14-3-3WT

### 3.4 Seznam použitých pufrů a roztoků

**SOC médium:** 20mM glukóza, 10mM  $\text{MgCl}_2$ , 10mM NaCl, 10mM  $\text{MgSO}_4$ , 2,5mM KCl, 0,5 % (w/v) kvasničný extrakt, 2 % (w/v) trypton

**Médium LM-M9 (MM-M9):** M9 základ\*, 0,4 % (w/v) glukosa, 5mM  $\text{MgSO}_4$ , směs aminokyselin\*\*, 0,01 % (w/v) vitamín B<sub>1</sub> (thyamin hydrochlorid), 30 mg/ml foto-Met, 0,1mM  $\text{CaCl}_2$ , roztok kovů\*\*\*

**\*M9 základ:** 42mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 22mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 18mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 8,6mM NaCl

**\*\*Směs aminokyselin:** 0,1 % (w/v) L-lysin, 0,1 % (w/v) L-fenylalanin, 0,1 % (w/v) L-threonin, 0,05 % (w/v) L-isoleucin, 0,05 % (w/v) L-valin, 0,05 % (w/v) L-leucin

**\*\*\*Roztok kovů:** 80,6mM EDTA, 2,15mM  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 92,5mM  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,56mM  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 13,5mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 10,6mM  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1,62mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$

**PBS:** 10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,8mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137mM NaCl, 2,7mM KCl; pH 7,4

**LB médium:** 1 % (w/v) trypton, 0,5 % (w/v) kvasničný extrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,4

**Nanášecí pufr (pětkrát koncentrovaný):** 250mM Tris/HCl, 500mM dithiotreitol, 10 % (w/v) dodecylsulfát sodný, 0,5 % (w/v) bromfenolová modř, 50 % (w/v) glycerol

**Odbarvovací roztok:** 35 % (v/v) ethanol, 10 % (v/v) kyselina octová

**Separáčnı gel 12 % (5 ml):** 1,7 ml vody, 1,3 ml 1,5M Tris/HCl (pH = 8,8), 2,0 ml 29,5 % (w/v) akrylamidu s 0,8 % (w/v) N, N'-methylenbisakrylamidem, 50  $\mu$ l 10 % (w/v) dodecylsulfátu sodného, 2  $\mu$ l tetramethylethyldiaminu, 50  $\mu$ l 10 % (w/v) ammonium persulfátu

**Zaostřovací gel 3 % (2 ml):** 1,4 ml vody, 0,25 ml 1,5M Tris/HCl (pH = 6,8), 0,33 ml 29,5 % (w/v) akrylamidu s 0,8 % (w/v) N, N'-methylenbisakrylamidem, 20  $\mu$ l 10 % (w/v) dodecylsulfát sodný, 2  $\mu$ l TEMED, 20  $\mu$ l 10 % (w/v) ammonium persulfátu

**Lyzační pufr:** 0,5M NaCl, 0,5mM DTT, 1mM imidazol, rozpuštěno v roztoku PBS

**Pufr E:** 0,5M NaCl, 0,5mM DTT, 1mM imidazol, rozpuštěno v roztoku PBS, pH 8,0

**Pufr F:** 0,5M NaCl, 0,5mM DTT, 0,6M imidazol, 10 % (v/v) glycerol, rozpuštěno v roztoku PBS, pH 8,0

**Pufr EF (45 ml):** 40 ml pufru E, 5 ml pufru F

**Pufr 1 – dialyzační:** 20mM Tris, 5mM EDTA, 0,5mM DTT, 10 % (v/v) glycerol, pH 7,5

**Pufr 2 – dialyzační:** 20mM Tris, 1mM EDTA, 0,5mM DTT, 10 % (v/v) glycerol, pH 7,5

**Roztok na regeneraci nosiče:** 0,5M NaCl, 0,05M Tris, 0,05M EDTA

**Síran nikelnatý:** 0,1M NiSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O

**Štěpící ethylmorfolinový pufr:** 25mM ethylmorfolin, 5 % (v/v) acetonitril, pH 8,1

## 3.5 Metody

### 3.5.1 Inokulace bakterií

S buňkami bylo pracováno u plamene a byl používán sterilní materiál a pomůcky. Z agarové plotny s LB médiem, na kterou byly očkovány buňky *Escherichia coli* B834(DE3) ze zásobní glycerolové konzervy, byly vypíchnuty dvě různé kolonie a přeneseny do 15 ml falkony, která obsahovala 3 ml LB média. Falkony s mírně povoleným víčkem byly umístěny do třepačky, kde byly třepány při 37 °C a 200 rpm do druhého dne.

### 3.5.2 Příprava kompetentních buněk

Nejprve byly z bakterií *Escherichia coli* B834(DE3) připraveny kompetentní buňky. Díky ledově vychlazenému chloridu vápenatému je možné zvýšit propustnost plazmatické membrány. Z tzv. noční kultury (viz kapitola Inokulace bakterií) bylo odebráno 250  $\mu$ l a následně bylo očkováno do 25 ml LB média v Erlenmayerově baňce. Kultura byla kultivována na třepačce při 37 °C a 200 rpm do optické hustoty přibližně 0,5, která byla měřena při vlnové délce 600 nm. Následně byla kultura inkubována po dobu 5 minut na ledu. Kultura byla centrifugována 5 minut při 5000 rpm (centrifuga Universal 320R, rotor 4250, Hettich) a teplotě 4 °C, supernatant byl odlit a každá peleta byla resuspendována v 5 ml 100mM CaCl<sub>2</sub> v 10mM

Tris – Cl (pH 7,4) a takto připravené pelety byly inkubovány na ledu po dobu 10 minut. Následně byly buňky centrifugovány při 5000 rpm (centrifuga Universal 320R, rotor 4250, Hettich) a 4 °C po dobu 5 minut. Peleta byla resuspendována na ledu v 1 ml 50mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % glycerol v 10mM Tris-Cl (pH 7,4). Kompetentní buňky byly uchovány při 4 °C a rozděleny po 100 µl do mikrozkušavek a skladovány v –80°C.

### 3.5.3 Transformace buněk

Suspenze kompetentních buněk o objemu 100 µl *Escherichia coli* B834(DE3) (auxotrofní bakterie, které neumí nesyntetizovat methionin) byla nechaná rozmraznout na ledu. Po rozmrznutí bylo odebráno 50 µl kompetentních buněk do nové mikrozkušavky. Do jedné mikrozkušavky byla přidána plazmidová DNA pET-15b 14-3-3WT o c(DNA)= 40 ng/µl a objemu 0,5 µl. V původní mikrozkušavce byly buňky, které plazmid neobsahovaly a ty nám sloužily jako negativní kontrola. Obě směsi byly lehce promíchány a nechány 20-30 min na ledu. Následně byl proveden tzv. teplotní šok, kdy byly buňky přeneseny z ledu do inkubátoru a zde při teplotě 42 °C po dobu 90 sekund byly buňky transformovány plazmidem. Ihned poté byly uloženy na led. Po 3 min bylo do každé mikrozkušavky přidáno 500 µl SOC média. Směsi byly promíchány a inkubovány po dobu 60 min při teplotě 37 °C s třepáním při frekvenci 200 rpm. Buňky byly nanášeny na předem připravené plotny s LB agarem, které obsahovaly ampicilin o koncentraci 100 µg/ml a rozetřeny sterilní ohnutou tyčinkou. Plotny byly po vsáknutí suspenze obráceny dnem vzhůru a inkubovány přes noc při teplotě 37 °C v inkubátoru.

### 3.5.4 Izolace plazmidové DNA

Námi používaný plazmid byl izolován pomocí sady QIAprep® Spin MiniprepKit pro izolaci plazmidové DNA. Izolace byla provedena z noční kultury buněk *Escherichia coli* DH5α transformovaných plazmidem pET-15b 14-3-3WT, která byla připravena ve 3 ml LB média s ampicilinem (postup pro přípravu kompetentních buněk a jejich transformaci byl stejný jako v případě auxotrofního kmene *E. coli*, viz kapitoly Inokulace bakterií, Příprava kompetentních buněk a Transformace buněk). Bylo postupováno dle návodu, který je od výrobce přiložen k sadě. K určení koncentrace plazmidu byla měřena absorbance na spektrofotometru (DeNovix DS-11+). Nejprve byl měřený blank, u kterého byla použita destilovaná voda a poté byla měřena absorbance plazmidové DNA při 280, 260 a 230 nm tak, že byl nanášen vzorek o objemu 1 µl a přístroj přímo určil koncentraci DNA. Z poměru  $A(260\text{ nm}) / A(280\text{ nm})$  můžeme zjistit, zda námi připravený plazmid není kontaminovaný proteiny a

z poměru  $A(260\text{ nm})/A(230\text{ nm})$  můžeme určit poměr organických nečistot v plazmidové DNA. Takto připravený plazmid byl uchován do zásoby při  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5.5 Produkce proteinu

Experiment byl prováděn se dvěma různými klony a každý klon pro účely optimalizace doby produkce proteinu byl inokulován třikrát (celkem tedy šest kultur). Do 250 ml Erlenmayerových baněk, které obsahovaly 50 ml LB s ampicilinem o koncentraci  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ , bylo přeneseno 0,5 ml noční kultury připravené ve 3 ml LB média s ampicilinem z buněk *Escherichia coli* B834(DE3) transformovaných plazmidem pET-15b 14-3-3WT a Erlenmayerovy baňky byly třepány při teplotě  $37^{\circ}\text{C}$  a 200 rpm. Po 2 hodinách byla pro každý klon změřena optická hustota při 600 nm, která měla dosahovat hodnot mezi 0,7-0,8 a kultura byla promývána vychlazeným roztokem PBS. Proces promývání se sestával z centrifugace při 5000 rpm po dobu 5 minut při  $4^{\circ}\text{C}$  (centrifugace Universal 320R, rotor 4250, Hettich). Následně byl supernatant odlit a peleta byla resuspendována v 25 ml PBS. Vzorek byl poté znovu centrifugován za stejných podmínek a supernatant znovu odlit. Poté bylo přidáno 49 ml MM-M9 a následně byla kultura nechána hladovět při teplotě  $30^{\circ}\text{C}$  s třepáním 200 rpm po dobu 13 hodin. Po 13 hodinách byl přidán 1 ml foto-methioninu do finální koncentrace  $30\text{ mg/ml}$ . Po 15 minutách inkubování při  $30^{\circ}\text{C}$  a 200 rpm byl odebrán 1 ml z každé kultury. K měření optické hustoty při 600 nm bylo použito 0,5 ml kultury a 0,5 ml bylo použito jako vzorek na elektroforézu. Ke všem kulturám bylo přidáno IPTG do finální koncentrace  $0,5\text{ mM}$ . Takto indukované kultury byly nechány v inkubátoru při  $30^{\circ}\text{C}$  a 200 rpm. Produkce proteinu byla ukončena po 1,3 anebo 6 hodinách v případě obou klonů. Stejným způsobem jako před indukcí byl po ukončení produkce odebrán 1 ml z každé kultury na stanovení OD (600 nm), z čehož byl 0,5 ml použit na elektroforézu. Falkony, ze kterých byl odebrán 1 ml, byly následně centrifugovány po dobu 5 minut při 9000 rpm při  $4^{\circ}\text{C}$  (centrifuga Universal 320R, rotor 4250). Z centrifugované falkony byl odlit supernatant, peleta byla zamražena na izolaci proteinu. Vzorky, připravené na elektroforézu byly nejprve centrifugovány 5 minut na 9000rpm (MiniSpin, rotor F-45-12-11, Eppendorf) a následně resuspendovány ve  $100\text{ }\mu\text{l}$  destilované vody.

### 3.5.6 SDS-PAGE

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s použitím dodecylsulfátu sodného se nejčastěji používá k separaci proteinů. SDS-PAGE se skládá ze dvou gelů – rozdělovacího a zaostřovacího gelu viz podkapitola Příprava polyakrylamidových gelů na SDS-PAGE–

Tab.1 a Tab.2. Na SDS-PAGE byl odebrán vzorek a následně k němu byl přidán potřebný objem 5x koncentrovaného pufru. Každý takto připravený vzorek byl povařen po dobu 5 minut, vzorky kultury odebírané během produkce proteinu byly před nanášením na gel ještě sonikovány, a krátce centrifugován na stolní minicentrifuze MiniSpin, Eppendorf . Na gel byl nanášen marker (PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific nebo Precision Plus Protein Dual Color Standards, Biorad), který byl připraven z 5  $\mu$ l zásobního roztoku markeru a 15  $\mu$ l vody a poté byly do každé jamky nanášeny vzorky po 20  $\mu$ l. K separaci byl použit 12 % polyakrylamidový gel. Elektroforéza probíhala při 200 V a 20 mA na jedno sklo. Po ukončení elektroforézy byly gely z aparatury vyjmuty, barveny pomocí Coomassie Brilliant Blue – R250 (CBB-R250) (0.25 % w/v Coomassie Brilliant Blue R-250; 45 % v/v methanol; 10 % v/v octová kyselina) za kontinuálního třepání po dobu přibližně 1 hodiny a poté byl gel přenesen do odbarvovací lázně (35 % v/v ethanol; 10 % v/v octová kyselina), kde byl za stálého třepání a měnění odbarvovacího roztoku odbarven.

**Tab. 1:** Příprava 12 % rozdělovacího polyakrylamidového gelu

Složení pro přípravu 5 ml	V[ml]
H <sub>2</sub> O	1,6
30 % akrylamidový mix	2,0
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3
10 % SDS	0,05
10 % amonium persulfát	0,05
TEMED	0,002

**Tab. 2:** Příprava 5 % zaostřovacího gelu

Složení pro přípravu 2 ml	V[ml]
H <sub>2</sub> O	1,4
30 % akrylamidový mix	0,33
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,25
10 % SDS	0,02
10 % amonium persulfát	0,02
TEMED	0,004

### 3.5.7 Izolace proteinu

Buněčné pelety byly rozmrazeny a každá peleta umístěná na ledu byla resuspendována 4 ml lyzačního roztoku, který obsahoval inhibitory proteas. Lyzační roztok byl připraven přidáním 1 tablety na 25 ml roztoku. Poté byl k resuspendovaným peletám přidán lysozym do finální koncentrace 100 µg/ml a roztok byl ponechán inkubovat na ledu 45 minut. Každá peleta byla sonikována ultrazvukovým homogenizátorem Bandelin Sonopuls se sondou KE 76 celkem 3 minuty v devíti cyklech, vždy 20 sekund sonikace a 10 sekund pauza. Při sonikaci byly falkony chlazeny pomocí ledové tříště, ve které byly umístěny. V dalším kroku bylo odebráno 16 µl solubilizátu na SDS – PAGE, pro sledování průběhu izolace. Sonikované buňky po lyzaci byly centrifugovány 45 minut při 9000 rpm a 4 °C (centrifuga Universal 320R, rotor 4250), byl odebrán vzorek 16 µl supernatantu i pelety, která byla nejdříve resuspendována ve 4 ml destilované vody (na SDS – PAGE). K purifikaci byla použita afinitní chromatografie (His kotva, Ni-NTA) a použita byla mini aparatura a pumpa (Minipuls Evolution, Gilson). Pro afinitní chromatografii se jako nosič používá nejčastěji agaróza s kovaletně navázaným ligandem. Ligand váže ion těžkého kovu, kterým je nejčastěji Ni<sup>2+</sup>. Histidinová kotva je běžnou metodou purifikace rekombinantních proteinů a jedná se o sekvenci 6-10 histidinů, které jsou připojeny na C– nebo N – konec rekombinantního proteinu. Nejprve došlo ke zregenerování 3 ml agarosy jejím promytím destilovanou vodou o objemu přibližně 30 ml, dále 30ml roztoku na regeneraci, následně opět 30 ml destilované vody, poté 30 ml roztoku NiSO<sub>4</sub> a znovu destilovanou vodou, dokud nedošlo k vymytí nenavázaných Ni<sup>2+</sup>, což bylo způsobeno přibližně 100 ml destilované vody. Pufry, které byly použity k promývání nebo ekvilibraci byly nanášeny na kolonu vychlazené. Poté byl daný nosič ekvilibrován pomocí pufrem E při rychlosti 12 rpm 2x přibližně desetinásobkem objemu nosiče. Na nosič byl následně nanesen buněčný lyzát při 8 rpm a první 2 ml byly jímány do odpadu (mrtvý objem kolony). Po průchodu kolonou byl vzorek jímán a opět nanesen na kolonu, abychom docílili co největšího zachyceného množství. Bylo odebráno 16 µl vzorku na SDS-PAGE. Kolona byla promyta přibližně desetinásobkem objemu nosiče nejprve pufrem E a poté pufrem EF a bylo z ní jímáno 5 frakcí, přičemž před každou frakcí byly vždy 2 ml odpuštěny, při 12 rpm po 1,5 ml do mikrozkuumavek. Aby byl protein z nosiče vymyt, byl promyt pufrem F, který obsahuje větší množství imidazolu a bylo sbíráno 5 frakcí po 1,5 ml při 12 rpm. Následně byla kolona regenerována a použita na další vzorky při použití stejného postupu. Odebírané vzorky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz kapitola 3.4.6). Eluční frakce, které obsahovaly protein byly spojeny a následně dialyzovány a koncentrovány.

### 3.5.8 Dialýza a koncentrace

Spojené eluční frakce byl nejprve dialyzovány tak, že byly vzorky přeneseny do dialyzačního střívka, které bylo uzavřeno pomocí svorek a následně byly vloženy do 1 l dialyzačního pufru 1, který byl předem vychlazený. Dialýza probíhala za stálého míchání přibližně 2 hodiny. Poté byly vzorky přeneseny do 1 l dialyzačního pufru 2, kde dialýza probíhala přes víkend v lednici. Dialyzované vzorky byly koncentrovány pomocí filtru Amicon Ultra-15 s maximální propustností 30 kDa. Eluční frakce byly centrifugovány při 4000 rpm a 4°C (centrifuga Universal 320R, rotor 1620-A, Hettich) do zakoncentrování vzorku na přibližně 1 ml.

### 3.5.9 Stanovení koncentrace pomocí BCA

K této metodě se využívá kyselina bichinoninová (BCA), vytváří komplexy s  $\text{Cu}^{II}$ , které se tvoří reakcí  $\text{Cu}^{II}$  s peptidovými vazbami. Nejprve byl ze zásobního roztoku BSA o koncentraci 12 mg/ml připraven roztok o koncentraci 1 mg/ml. Z tohoto roztoku byly následně připraveny standardy o koncentraci 0; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75 a 1 mg/ml. Roztok C byl připraven smícháním roztoku A a B v poměru 50:1. Následně byly všechny vzorky a standardy pipetovány v triplicátech po 15  $\mu\text{l}$  do mikrotitrační destičky. Ke každému vzorku bylo přidáno 120  $\mu\text{l}$  roztoku C a destička byla nechána inkubovat při 37 °C po dobu 30 minut. Následně byla změřena absorbance při 562 nm.

### 3.5.10 MALDI-TOF MS analýza

Byly analyzovány finální preparáty a frakce z průběhu izolace. Z gelu byl vyříznut proužek, který odpovídal velikosti proteinu 14-3-3 (okolo 30 kDa). Následně byly proužky nakrájeny na malé kostičky a přeneseny do mikrozkuhavky se 100  $\mu\text{l}$  odbarvovacího roztoku, který byl připraven smísením acetonitrilu se 100mM ethylmorfolinovým pufrům o pH 8,1 v poměru 1:1 (v/v). Takto byly dány sonikovat do sonikační lázně, dokud nebyly odbarveny. Odbarvovací roztok byl po odbarvení odpipetován, bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  acetonitrilu ke kostičkám. Následně bylo promícháno a odpipetován acetonitril. Stejně bylo postupováno v případě 100  $\mu\text{l}$  vody od firmy Merck. Tento postup byl opakován a poté byl preparát uchován v 50 % acetonitrilu. Acetonitril byl z roztoku odsát a vzorky byly dány usušit po dobu 10 minut pod vakuem. K vysušeným vzorkům bylo přidáno 15  $\mu\text{l}$  30x ředěného trypsinu (zásobní roztok o koncentraci 0,1 mg/ml) ve 25mM ethylmorfolinovém pufru s 5 % acetonitrilem o pH 8,1, a zároveň byla připravena kontrola bez vzorku, směs byla takto nechána inkubovat přes noc při 37°C. Ke směsi bylo přidáno 6,25  $\mu\text{l}$  roztoku, který byl připraven smísením acetonitrilu a 5 %

(v/v) kyseliny trifluoroctové v poměru 9:1, směs byla sonikována 5 minut. Přidáním tohoto roztoku bylo zastaveno enzymové štěpení a došlo k extrakci peptidů z gelu. Na MALDI terčík bylo nejprve nanášeno 0,5  $\mu$ l peptidové směsi a ten byl převrstven po zaschnutí 0,5  $\mu$ l kyseliny  $\alpha$ -kyanoskořicové (5 mg/ml v 50 % acetonitrilu s 0,1 % kyselinou trifluoroctovou (v/v)), která je pro MALDI matricí. Následně byla změřena spektra na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF, Ultraflex III, Bruker Daltonics.

## 4. Výsledky

### 4.1 Produkce proteinu s foto-methioninem

Transformace buněk *E. coli* B834 (DE3) byla provedena metodou teplotního šoku, kdy do buněk byl vnesen expresní plazmid pET-15b 14-3-3WT a buňky byly úspěšně transformovány. Tento plazmid obsahuje rezistenci na antibiotikum ampicilin. Na agarových plotnách při teplotě 37°C přes noc narostly kolonie bakterií transformovaných plazmidem. Na kontrolních plotnách nenarostly žádné kolonie.

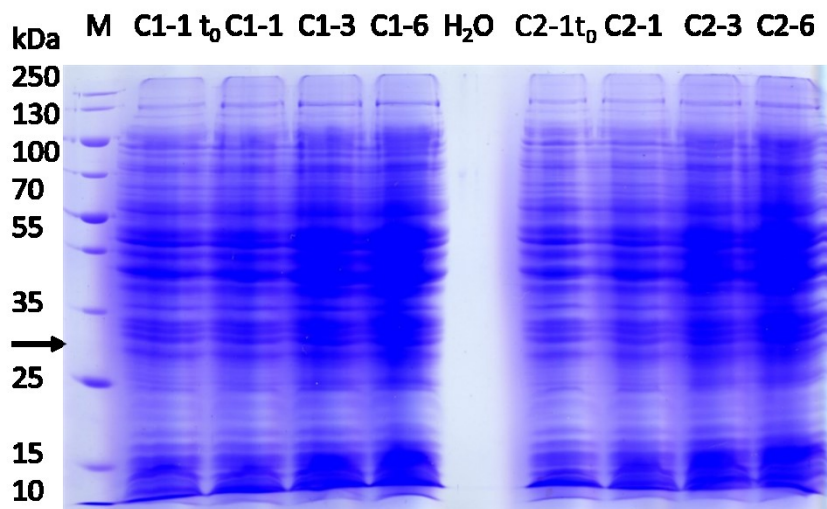
Z těchto kolonií byly náhodně vybrány 2 klony, které jsme použily následně pro expresi proteinu. Z kultury připravené z každého klonu bylo zaočkováno vždy 3x do LB média a bylo sledován nárůst buněk pomocí hodnoty OD<sub>600</sub> (viz **Tab.3**). Vzorky byly označeny písmenem C (podmínka produkce – před indukcí exprese proteinu 1x promytí buněk a 12 hodin hladovění), číslem klonu 1 nebo 2 a délkou produkce 1, 3 nebo 6 hodin.

**Tab.3:** Hodnoty OD<sub>600</sub> při kultivaci bakterií a produkci proteinu.

Po kultivaci v LB				Po hladovění (před expresí)				Po 1, 3 nebo 6 hod. produkce			
	OD <sub>600</sub>		OD <sub>600</sub>		OD <sub>600</sub>		OD <sub>600</sub>		OD <sub>600</sub>		OD <sub>600</sub>
C1-1	0,802	C2-1	0,791	C1-1	1,173	C2-1	1,083	C1-1	1,320	C2-1	1,219
C1-3	0,751	C2-3	0,830	C1-3	1,232	C2-3	1,097	C1-3	1,615	C2-3	1,467
C1-6	0,848	C2-6	0,797	C1-6	1,240	C2-6	1,045	C1-6	2,232	C2-6	1,762

Buňky byly sklizeny při OD<sub>600</sub> přibližně 0,75 – 0,85. Po 12 hodinách hladovění byla OD<sub>600</sub> okolo 1,0 – 1,2. Následně byl přidán foto-methionin a za 15 minut byla pomocí IPTG zahájena exprese proteinu. Produkce byla ukončena v různých časech a byla změřena OD<sub>600</sub> (hodnoty viz **Tab.3**). Dle očekávání absorbance v průběhu produkce narůstala, avšak ne tak rapidně v důsledku zatížení buněk produkcí proteinu. Nárůst absorbance byl pozorován i u hladovění v minimálním médiu, avšak nebyl tak markantní jako při kultivaci v LB médiu, které obsahuje velké množství aminokyselin.

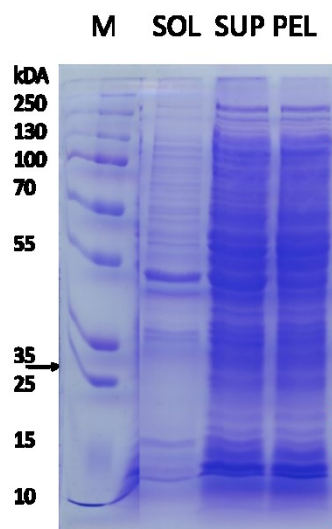
Na **Obr.6** na str.32 na následující straně je znázorněna produkce proteinu v jednotlivých vzorcích. Z tohoto gelu není zřejmý požadovaný protein 14-3-3 ani po 6 hodinách produkce, na gelu je vidět velké množství proteinů *E. coli*, které ho překrývají z důvodu 12 hodinového hladovění. Z tohoto důvodu je pro určení míry inkorporace fM nutné provést purifikaci proteinu z buněčného lyzátu, metoda štěpení proteinu v gelu a MALDI-TOF MS by nešla využít kvůli překryvu požadovaného proteinu jinými proteiny z *E. coli*. Následně po purifikaci je možné provést stanovení míry inkorporace.



**Obr.6:** Vizualizace produkce proteinu na 12 % SDS-PAGE. M - označuje marker neboli standard molekulových hmotností (PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific), C1-1<sub>t<sub>0</sub></sub> - znázornění před produkcí proteinu u vzorku C1-1, dále klon 1 (C1) po 1, 3, 6 hodinách produkce a poté následuje C2-1<sub>t<sub>0</sub></sub> - znázornění před produkcí proteinu u vzorku C2-1, poté následují klon 2 (C2) po 1,3 a 6 hodinách produkce. Šipka znázorňuje molekulovou hmotnost požadovaného proteinu.

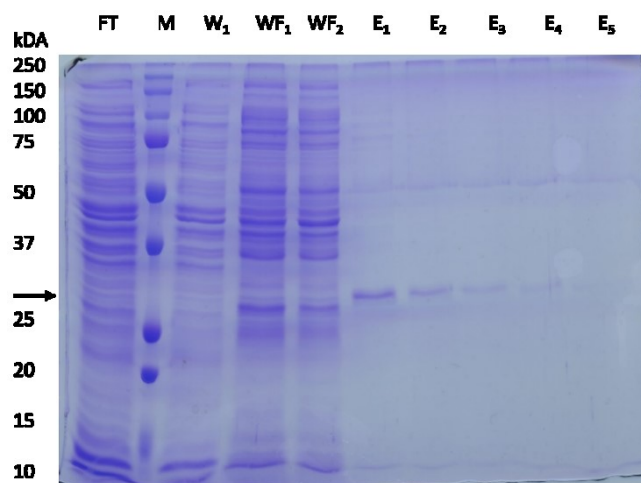
#### 4.2 Izolace proteinu

Buněčné stěny buňky byly destruovány pomocí působení lysozymu a následně i pomocí sonikace. U sonikace bylo důležité, aby byly falkony chlazeny, jelikož pokud by došlo k zvýšení teploty mohl by nám protein denaturovat. K odstranění zbytků buněk byl roztok centrifugován a následně odebrán supernatant, ve kterém se požadovaný protein nacházel. Výsledky lyzace pro vzorek C1-3(klon 1 po 3 hodinách produkce) jsou zobrazeny na **Obr.7** na str.33.



**Obr. 7:** Výsledky lyzace buněk C1-3(klon 1 po 3 hodinách produkce) na 12 % SDS-PAGE. V první dráze je marker PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder a následně solubilizát (SOL, buňky po lyzaci pomocí lysozymu a sonikaci), supernatant (SUP, buněčný lyzát nanášený na kolonu (Ni-NTA)) a peleta (PEL, odpadní peleta po rozbití buněk). Žipka značí molekulovou hmotnost odpovídající požadovanému proteinu.

Následně byla provedena afinitní chromatografie, kde se pomocí histidinové kotvy zachytil náš požadovaný protein a byl následně eluován. Průběh nanášení proteinu na kolonu, promývání a eluce jsou znázorněny na **Obr.8**.



**Obr. 8:** Vizualizace purifikace proteinu na 12 % SDS-PAGE pro vzorek C1-3. FT –buněčný lyzát prošlý kolonou, M – marker (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Biorad), W – promývání pomocí pufru E s koncentrací imidazolu 1mM, WF – promývání pomocí pufru EF s koncentrací imidazolu 68mM, E – eluce pomocí pufru F o koncentraci imidazolu 0,6M. Číslo značí pořadí, ve kterém byly dané frakce jímány.

Na **Obr.8** je vidět, že ve frakci WF (promývání pufrem s přísávkem imidazolu), která neměla obsahovat izolovaný protein, ovšem na gelu je vidět, že je vymýván protein o stejné velikosti. Bylo vyloučeno, že je to požadovaný protein 14-3-3 pomocí hmotnostní spektrometrie. Výsledek purifikace je ukázán pouze na klonu 1 po 3 hodinách produkce (vzorek C1-3). U ostatních vzorků byl výsledek podobný.

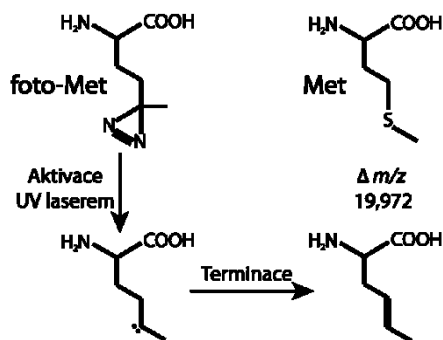
Byly stanoveny finální výtěžky proteinu pomocí BCA viz **Tab.4**. Z **Tab.4** lze vidět, že dle očekávání výtěžky stoupají s dobou produkce a také to, že u obou klonů jsou tyto výtěžky velmi podobné. Po 3 hodinách bylo získáno téměř dvakrát více proteinu a po 6 hodinách byly výtěžky dokonce 3x až 4x větší oproti 3 hodinám.”

**Tab. 4:** Finální výtěžky proteinu stanoveny pomocí BCA s využitím standartu hovězího sérového albuminu.

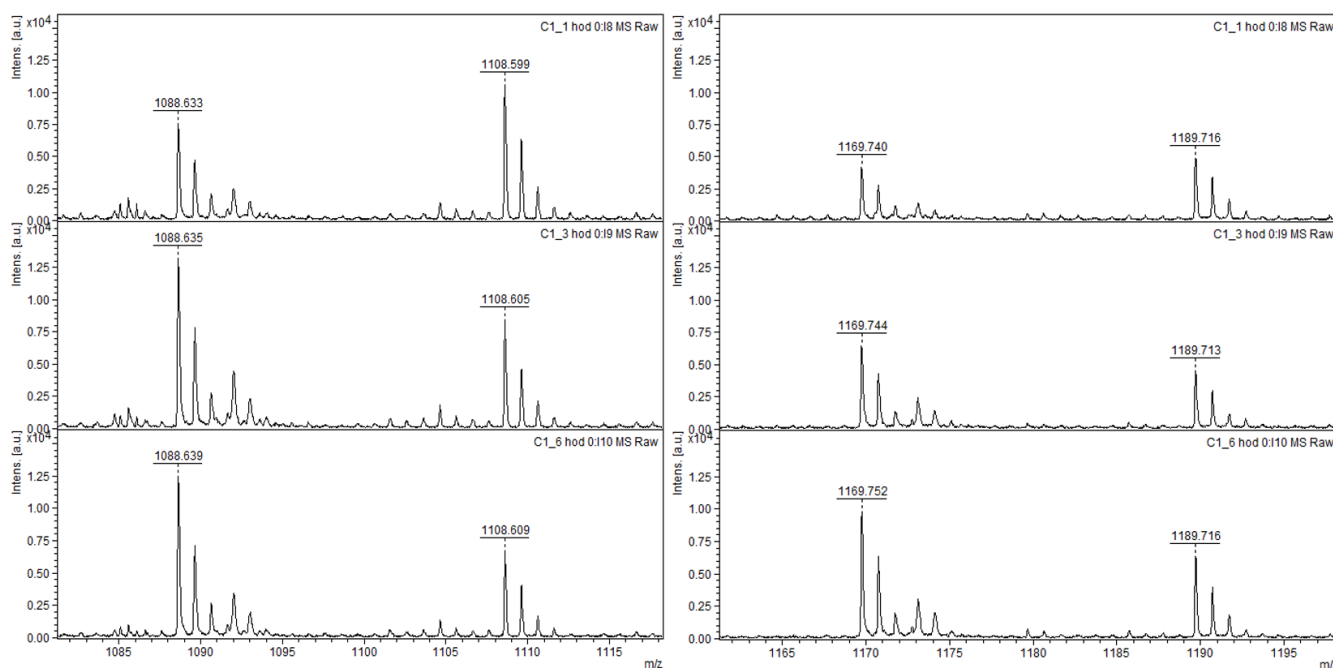
Vzorek	Množství proteinu [mg]
C1-1	0,33
C1-3	0,50
C1-6	2,09
C2-1	0,36
C2-3	0,66
C2-6	1,72

#### 4.3 Stanovení míry inkorporace foto-methioninu

Z finálních preparátů na gelu byly vyříznuty úseky obsahující protein, proteolyticky štěpeny a následně pomocí hmotnostní spektrometrie byla zjištěna míra inkorporace. V rámci každého vzorku bylo spektrum proměřeno 5x, takže hodnoty jsou průměry pěti měření. V každém spektru byly srovnány signály dvou dvojic peptidů, první z dvojice peptid o  $m/z$  1108 [178-186] EMQPTHPIR a peptid s foto-methioninem o  $m/z$  1088 EfMQPTHPIR, peptid o  $m/z$  1189 [232-241] DSTLIMQLLR s peptidem, který obsahoval foto-methionin o  $m/z$  1169 [232-241] DSTLI<sup>f</sup>MQLLR. V případě, že je inkorporovaný foto-methionin je hmota o 20 jednotek nižší viz **Obr.9** na str.35. Stanovení inkorporace foto-methioninu bylo určeno srovnáním signálů ve spektru, respektive srovnáním ploch pod píkem pro peptid s Met a peptid s foto-Met pro dvě dvojice peptidů viz **Obr.10** na str.35.



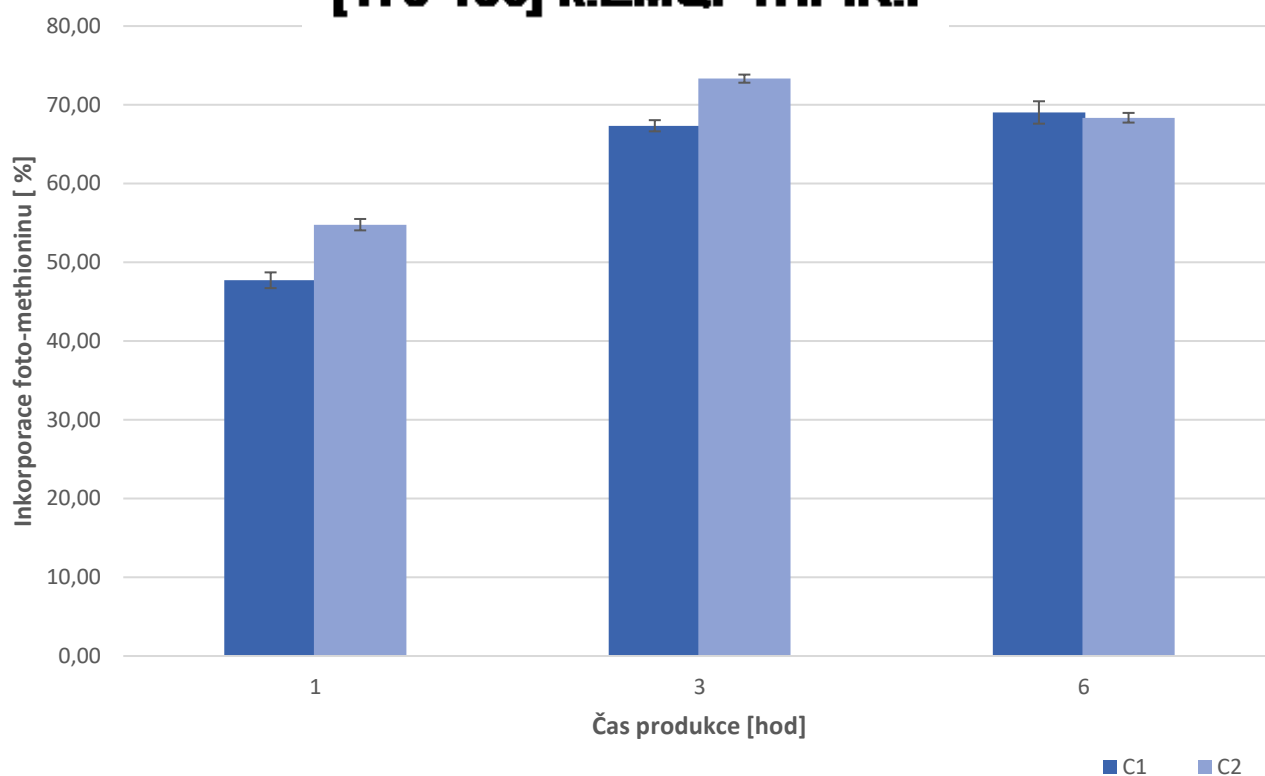
**Obr.9:** Fotoaktivace pomocí UV laseru a následná terminace reaktivního karbenu. Převzato a upraveno.<sup>22</sup>



**Obr.10:** Vlevo – výřez hmotnostního spektra z MALDI-TOF analýzy pro klon 1 (C1) v čase produkce 1, 3 a 6 hodin pro peptid o  $m/z$  1108,56 [178-186] EMQPTHPIR.

Vpravo – výřez hmotnostního spektra MALDI-TOF pro klon 1 v čase 1,3 a 6 pro peptid o  $m/z$  1189 [232-241] DSTLIMQLLR. U druhého klonu byla hmotnostní spektra obdobná.

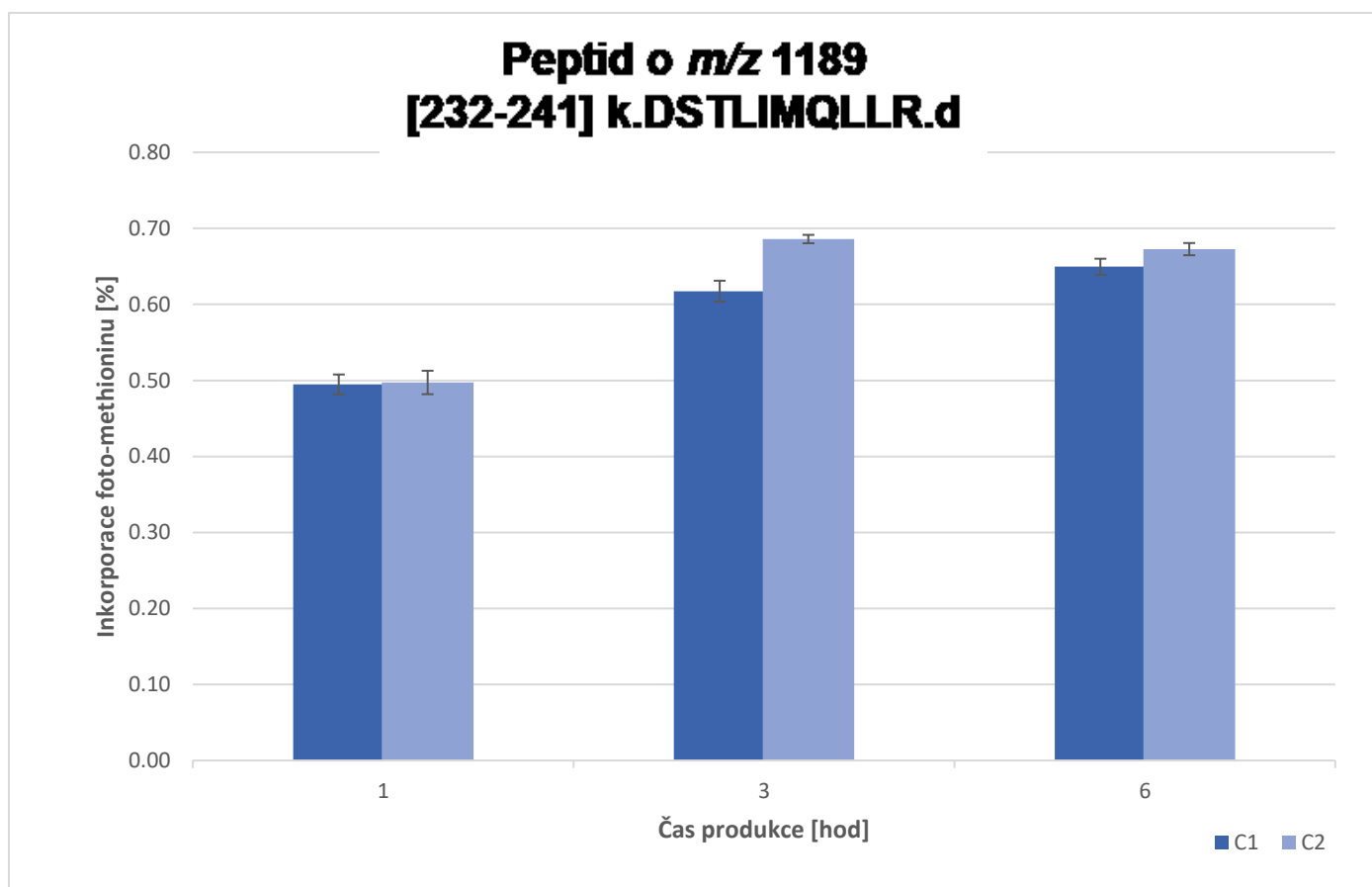
## Peptid o $m/z$ 1108 [178-186] k.EMQPTHPIR.I



**Obr. 11:** Grafické znázornění inkorporace foto-methioninu po 1, 3 a 6 hodinách exprese u klonu 1 (C1) a 2 (C2) pro peptid o  $m/z$  1108 [178-186] EMQPTHPIR.

**Tab. 5:** Hodnoty inkorporace foto-methioninu v peptidu o  $m/z$  1108 [178-186] EMQPTHPIR

	Inkorporace [%]	Odchylka
<b>C1-1</b>	47,72	1,00
<b>C2-1</b>	54,78	0,72
<b>C1-3</b>	67,34	0,71
<b>C2-3</b>	73,32	0,52
<b>C1-6</b>	69,03	1,42
<b>C2-6</b>	68,36	0,61



**Obr. 12:** Grafické znázornění inkorporace foto-methioninu po expresi v 1,3 a 6 hodinách u klonu 1 a 2 v peptidu [232-241] DSTLIMQLLR o  $m/z$  1189.

**Tab.6:** Hodnoty inkorporace foto-methioninu v peptidu o  $m/z$  1189 [232-241] DSTLIMQLLR.

	Inkorporace [%]	Odchylka
<b>C1-1</b>	49,47	1,31
<b>C2-1</b>	49,73	1,54
<b>C1-3</b>	61,74	1,38
<b>C2-3</b>	68,60	0,55
<b>C1-6</b>	64,95	1,06
<b>C2-6</b>	67,27	0,80

Z **Obr.11** na str.36 a **Obr.12** a **Tab.5** na str. 36 a **Tab.6** je vidět , že hodnota inkorporovaného foto- methioninu se zvyšuje s rostoucím časem exprese, u obou klonů je obdobný výsledek pro oba peptidy, resp. různé Met v sekvenci proteinu. Nejnižší inkorporaci

Ize sledovat u obou klonů po 1 hodině exprese a to přibližně 50 %. Nejvyšší inkorporaci lze sledovat po 3 a 6 hodinách exprese a to až 70 %, je vidět, že míra inkorporace u obou klonů se po 3 a 6 hodinách exprese výrazně neliší.

## 5. Diskuze

Tato bakalářská práce se zaměřovala na purifikaci a optimalizaci exprese proteinu s inkorporovaným foto-methioninem. Protein 14-3-3 $\zeta$ , který byl v tomto experimentu inkorporován foto-methioninem, je důležitým regulačním proteinem s významnou apoptickou funkcí. Díky právě inkorporované foto-skupině, lze dále sledovat funkci či protein-proteinové interakce, které nám mohou prozradit cenné informace o funkci či terciální struktuře.

V této bakalářské práci jsme chtěli optimalizovat podmínky exprese, podmínky exprese již byly studovány v práci, kde byl poprvé inkorporován foto-methionin do proteinu v expresním systému *E. coli* BL-21 (DE3) Gold a tento systém je běžně užíván pro expresi rekombinantních proteinů. V těchto proteinech se pohybovala inkorporace okolo 30-60 %.<sup>23,24,25,47</sup> K použití metody PIXL takto připravené proteiny stačily, ovšem výsledky se lišily s každým experimentem. Proto byly zkoušeny další experimenty s kmeny *E. coli*, které měly deletovanou dráhu pro syntézu methioninu. U kmenu *E. coli* K-12 JW3973 (Coli Genetic Stock Center) bylo potřeba vložit kromě plazmidu díky kterému je v buňce možné produkovat požadovaný protein i gen kódující T7 RNA polymerázu. Výsledky tohoto experimentu byly velmi dobré, jelikož inkorporace foto-methioninu byla téměř 100 % a také bylo možné přidáním stopového množství methioninu do média regulovat míru inkorporace foto-methioninu.<sup>30</sup> Avšak tyto experimenty bylo těžké zopakovat, což se potvrdilo experimenty v rámci této bakalářské práce, jelikož z počátku jsme zkoušeli pracovat s tímto kmenem a v rámci tohoto experimentu se nepodařilo produkovat protein. Důvodem tohoto problému může být to, že byl zmutován používaný kmen či již zmíněný složitější expresní systém. Obdobné experimenty byly provedeny také s foto-leucinem v *E. coli* BL-21(DE3) Gold a následně i s leucin auxotrofním kmenem *E. coli* K-12 JW5807-2, avšak ani s jedním z těchto kmenů se nepodařilo získat foto-leucin inkorporovaný v proteinu, a to zřejmě z důvodu, že je vysoká specifita leucyl-tRNA syntetázy a poté taky díky dobře vyvinutému opravnému mechanismu tohoto enzymu.<sup>47</sup>

Po neúspěšné expresi v buňkách *E. coli* K-12 JW3973 byl zvolen jiný vhodnější auxotrofní kmen *E. coli* B834 (DE3), tento kmen není samostatně schopný syntézy methioninu. V rámci tohoto kmene bylo produkováno více proteinů s inkorporováním foto-methioninu s podobnými výsledky (okolo 50 % inkorporace fM). V této práci bylo navázáno na předešlé experimenty vedoucí k optimalizaci podmínek pro expresi. Byl porovnán standardní protokol A (před indukcí produkce proteinu 1x promytí buněk a 15 minut hladovění, produkce proteinu 3 hodiny) s protokolem B, kdy byly buňky před indukcí produkce promyty 3x anebo C, kdy byla doba hladovění prodloužena na 12 hodin. Z hlediska míry inkorporace foto-methioninu

vyšla podmínka C (promývání buněk před indukcí produkce 1x a 12hodinové hladovění) jako nejlepší, a proto bylo pokračováno s těmito podmínkami i dále.

Nevýhodou této podmínky byl nižší výtěžek, za cílem dosáhnout vyššího výtěžku se nabízelo prodloužení doby produkce proteinu, a proto byl v rámci této bakalářské práce sledován vliv doby produkce na míru inkorporace foto-methionin. Na základě toho byly zkoušeny doby produkce proteinů 1, 3 a 6 hodin.

Z **Obr.11** na str.36 a **Obr.12** na str.37 a také z **Tab. 5** na str.36 a **Tab. 6** na str.37 je vidět, že s rostoucí dobou produkce, roste inkorporace foto-methioninu do proteinu, což jsou opačné výsledky jako u biosyntézy cytochromu  $b_5$  v *E. coli* BL-21 (DE3) Gold, kde naopak při delším času klesala míra inkorporace foto-methioninu.<sup>23</sup> V našem experimentu byla nejnižší inkorporace po hodině přibližně 50 %, ale po 3 a 6 hodinách tato hodnota dosahovala až 70 %. V případě biosyntézy v *E. coli* BL-21 (DE3) Gold je příčinou snižující se inkorporace pravděpodobně rychlé obnovení biosyntézy methioninu, ta je nejprve blokována přidáním aminokyselin s inhibičním efektem. Zvýšit výtěžek produkce proteinu v *E. coli* B834(DE3) je možné prodloužením doby produkce, aniž by byla ovlivněna míra inkorporace foto-methioninu. V této práci je ukázáno trojnásobné až čtyřnásobné zvýšení výtěžku prodloužením doby produkce ze 3 hodin na 6 hodin (viz **Tab.4** na str.34). Protein 14-3-3 s inkorporovaným foto-methioninem bude využit pro optimalizaci protokolu na přípravu tohoto proteinu a ke studiu protein-proteinových interakcí. V této práci byly experimenty prováděny na modelovém proteinu 14-3-3ζ, díky tomu se mohou výsledky lišit v závislosti na proteinu, jeho velikosti či na obsahu methioninových zbytků.

## **Závěr**

V bakteriálních buňkách *E. coli* B834(DE3) byl úspěšně exprimován protein 14-3-3ζ s inkorporovaným foto-methioninem. V návaznosti na optimalizaci podmínek exprese byla optimalizována doba produkce s cílem dosáhnout vyššího výtěžku proteinu. Po 6 hodinách produkce bylo získáno třikrát až čtyřikrát více proteinu oproti 3 hodinám a bylo zjištěno, že i po 6 hodinách byla inkorporace foto-methioninu až 70 % u obou testovaných klonů v případě obou studovaných peptidů. Zároveň bylo ověřeno, že navržený protokol pro inkorporaci foto-methioninu poskytuje stabilně dobré výsledky a může být využit k přípravě proteinů pro účely PIXL.

## Seznam použité literatury

- (1) High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives | Open Biology  
[https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsob.160196?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed](https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsob.160196?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed) (accessed Apr 25, 2019).
- (2) Taheri, T.; Seyed, N.; Mizbani, A.; Rafati, S. Leishmania-Based Expression Systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100* (17), 7377–7385.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7712-4>.
- (3) Cavuoto, P.; Fenech, M. F. A Review of Methionine Dependency and the Role of Methionine Restriction in Cancer Growth Control and Life-Span Extension. *Cancer Treat. Rev.* **2012**, *38* (6), 726–736. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.01.004>.
- (4) Rosano, G. L.; Ceccarelli, E. A. Recombinant Protein Expression in *Escherichia Coli*: Advances and Challenges. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>.
- (5) Cornell, B.; Toyo-Oka, K. 14-3-3 Proteins in Brain Development: Neurogenesis, Neuronal Migration and Neuromorphogenesis. *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, *10*, 318.  
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00318>.
- (6) Chen, R. Bacterial Expression Systems for Recombinant Protein Production: *E. Coli* and Beyond. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30* (5), 1102–1107.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.013>.
- (7) Wood, W. B. Host Specificity of DNA Produced by *Escherichia Coli*: Bacterial Mutations Affecting the Restriction and Modification of DNA. *J. Mol. Biol.* **1966**, *16* (1), 118–133.
- (8) Leahy, D. J.; Hendrickson, W. A.; Aukhil, I.; Erickson, H. P. Structure of a Fibronectin Type III Domain from Tenascin Phased by MAD Analysis of the Selenomethionyl Protein. *Science* **1992**, *258* (5084), 987–991.
- (9) Doherty, A. J.; Ashford, S. R.; Brannigan, J. A.; Wigley, D. B. A Superior Host Strain for the Over-Expression of Cloned Genes Using the T7 Promoter Based Vectors. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23* (11), 2074–2075. <https://doi.org/10.1093/nar/23.11.2074>.
- (10) Kim, S.; Jeong, H.; Kim, E.-Y.; Kim, J. F.; Lee, S. Y.; Yoon, S. H. Genomic and Transcriptomic Landscape of *Escherichia Coli* BL21(DE3). *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45* (9), 5285–5293. <https://doi.org/sh>.

- (11) Coli Genetic Stock Center <http://cgsc2.biology.yale.edu/> (accessed Apr 29, 2019).
- (12) Shaw, K. J.; Berg, C. M. ESCHERICHIA COLI K-12 AUXOTROPHS INDUCED BY INSERTION OF THE TRANSPOSABLE ELEMENT Tn5. *Genetics* **1979**, *92* (3), 741–747.
- (13) Studier, F. W.; Moffatt, B. A. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. *J. Mol. Biol.* **1986**, *189* (1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2).
- (14) Dubendorf, J. W.; Studier, F. W. Controlling Basal Expression in an Inducible T7 Expression System by Blocking the Target T7 Promoter with Lac Repressor. *J. Mol. Biol.* **1991**, *219* (1), 45–59. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90856-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90856-2).
- (15) Baneyx, F. Recombinant Protein Expression in Escherichia Coli. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10* (5), 411–421. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00003-8).
- (16) Ahmad, I.; Nawaz, N.; Darwesh, N. M.; ur Rahman, S.; Mustafa, M. Z.; Khan, S. B.; Patching, S. G. Overcoming Challenges for Amplified Expression of Recombinant Proteins Using Escherichia Coli. *Protein Expr. Purif.* **2018**, *144*, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.11.005>.
- (17) Novagen pET System <https://www.csun.edu/~hcbio027/biotechnology/lec4a/petsys.html> (accessed Apr 29, 2019).
- (18) Tabor, S.; Richardson, C. C. A Bacteriophage T7 RNA Polymerase/Promoter System for Controlled Exclusive Expression of Specific Genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, *82* (4), 1074–1078. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.4.1074>.
- (19) Neumann-Staubitz, P.; Neumann, H. The Use of Unnatural Amino Acids to Study and Engineer Protein Function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *38*, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.06.006>.
- (20) Lang, K.; Chin, J. W. Cellular Incorporation of Unnatural Amino Acids and Bioorthogonal Labeling of Proteins. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (9), 4764–4806. <https://doi.org/10.1021/cr400355w>.
- (21) Hendrickson, T. L.; Crécy-Lagard, V. de; Schimmel, P. Incorporation of Nonnatural Amino Acids Into Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73* (1), 147–176. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.012803.092429>.
- (22) Ptáčková, R.; Ječmen, T.; Novák, P.; Hudeček, J.; Stiborová, M.; Šulc, M. The Application of an Emerging Technique for Protein–Protein Interaction Interface Mapping: The Combination of Photo-Initiated Cross-Linking Protein Nanoprobes with

- Mass Spectrometry. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (6), 9224–9241.  
<https://doi.org/10.3390/ijms15069224>.
- (23) Koberova, M.; Jecmen, T.; Sulc, M.; Cerna, V.; Kizek, R.; Hudecek, J.; Hodek, P. Photo-Cytochrome B5 – A New Tool to Study the Cytochrome P450 Electron-Transport Chain. *Int J Electrochem Sci* **2013**, *8*, 10.
- (24) Ječmen, T.; Ptáčková, R.; Černá, V.; Dračínská, H.; Hodek, P.; Stiborová, M.; Hudeček, J.; Šulc, M. Photo-Initiated Crosslinking Extends Mapping of the Protein-Protein Interface to Membrane-Embedded Portions of Cytochromes P450 2B4 and Bs. *Methods San Diego Calif* **2015**, *89*, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.07.015>.
- (25) Egli, M. Diffraction Techniques in Structural Biology. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2010**, *Chapter 7*, Unit 7.13. <https://doi.org/10.1002/0471142700.nc0713s41>.
- (26) Suchanek, M.; Radzikowska, A.; Thiele, C. Photo-Leucine and Photo-Methionine Allow Identification of Protein-Protein Interactions in Living Cells. *Nat. Methods* **2005**, *2* (4), 261–267. <https://doi.org/10.1038/nmeth752>.
- (27) Shaffer, C. J.; Marek, A.; Nguyen, H. T. H.; Tureček, F. Combining Near-UV Photodissociation with Electron Transfer. Reduction of the Diazirine Ring in a Photomethionine-Labeled Peptide Ion. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2015**, *26* (8), 1367–1381. <https://doi.org/10.1007/s13361-015-1139-5>.
- (28) Piotrowski, C.; Ihling, C. H.; Sinz, A. Extending the Cross-Linking/Mass Spectrometry Strategy: Facile Incorporation of Photo-Activatable Amino Acids into the Model Protein Calmodulin in Escherichia Coli Cells. *Methods* **2015**, *89*, 121–127.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.02.012>.
- (29) L-Photo-Methionine - Thermo Fisher Scientific  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/22615?SID=srch-srp-22615>  
(accessed May 7, 2019).
- (30) Ptáčková R.: Disertační práce. PŘF UK Praha 2014. 34.
- (31) Sinz, A. Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry to Map Three-Dimensional Protein Structures and Protein–Protein Interactions. *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *25* (4), 663–682. <https://doi.org/10.1002/mas.20082>.
- (32) Novak, P.; Young, M. M.; Schoeniger, J. S.; Kruppa, G. H. A Top-down Approach to Protein Structure Studies Using Chemical Cross-Linking and Fourier Transform Mass Spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom. Chichester Engl.* **2003**, *9* (6), 623–631.  
<https://doi.org/10.1255/ejms.590>.

- (33) Leitner, A.; Faini, M.; Stengel, F.; Aebersold, R. Crosslinking and Mass Spectrometry: An Integrated Technology to Understand the Structure and Function of Molecular Machines. *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41* (1), 20–32.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.10.008>.
- (34) Arora, B.; Tandon, R.; Attri, P.; Bhatia, R. Chemical Crosslinking: Role in Protein and Peptide Science. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2017**, *18* (9), 946–955.  
<https://doi.org/10.2174/1389203717666160724202806>.
- (35) Brodie, N. I.; Makepeace, K. A. T.; Petrotchenko, E. V.; Borchers, C. H. Isotopically-Coded Short-Range Hetero-Bifunctional Photo-Reactive Crosslinkers for Studying Protein Structure. *J. Proteomics* **2015**, *118*, 12–20.  
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.08.012>.
- (36) Iacobucci, C.; Götze, M.; Piotrowski, C.; Arlt, C.; Rehkamp, A.; Ihling, C.; Hage, C.; Sinz, A. Carboxyl-Photo-Reactive MS-Cleavable Cross-Linkers: Unveiling a Hidden Aspect of Diazirine-Based Reagents. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (4), 2805–2809.  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04915>.
- (37) Dubinsky, L.; Krom, B. P.; Meijler, M. M. Diazirine Based Photoaffinity Labeling. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (2), 554–570. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.06.066>.
- (38) Mehmood, S.; Allison, T. M.; Robinson, C. V. Mass Spectrometry of Protein Complexes: From Origins to Applications. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2015**, *66* (1), 453–474. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040214-121732>.
- (39) Holding, A. N. XL-MS: Protein Cross-Linking Coupled with Mass Spectrometry. *Methods* **2015**, *89*, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.06.010>.
- (40) Mann, M.; Hendrickson, R. C.; Pandey, A. Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70* (1), 437–473.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.437>.
- (41) Kang, L.; Li, N.; Li, P.; Zhou, Y.; Gao, S.; Gao, H.; Xin, W.; Wang, J. MALDI-TOF Mass Spectrometry Provides High Accuracy in Identification of Salmonella at Species Level but Is Limited to Type or Subtype Salmonella Serovars. *Eur. J. Mass Spectrom. Chichester Engl.* **2017**, *23* (2), 70–82. <https://doi.org/10.1177/1469066717699216>.
- (42) Brandwein, D.; Wang, Z. Interaction between Rho GTPases and 14-3-3 Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (10), 2148. <https://doi.org/10.3390/ijms18102148>.
- (43) Weerasekara, V. K.; Panek, D. J.; Broadbent, D. G.; Mortenson, J. B.; Mathis, A. D.; Logan, G. N.; Prince, J. T.; Thomson, D. M.; Thompson, J. W.; Andersen, J. L.

Metabolic-Stress-Induced Rearrangement of the 14-3-3 $\zeta$  Interactome Promotes Autophagy via a ULK1- and AMPK-Regulated 14-3-3 $\zeta$  Interaction with Phosphorylated Atg9. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34* (24), 4379–4388. <https://doi.org/10.1128/MCB.00740-14>.

- (44) Nomura, M.; Shimizu, S.; Sugiyama, T.; Narita, M.; Ito, T.; Matsuda, H.; Tsujimoto, Y. 14-3-3 Interacts Directly with and Negatively Regulates pro-Apoptotic Bax. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (11), 6753. <https://doi.org/10.1074/jbc.A114.207880>.
- (45) Obsilova, V.; Herman, P.; Vecer, J.; Sulc, M.; Teisinger, J.; Obsil, T. 14-3-3 $\zeta$  C-Terminal Stretch Changes Its Conformation upon Ligand Binding and Phosphorylation at Thr232. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (6), 4531–4540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306939200>.
- (46) Ječmen, T.; Ptáčková, R.; Kavan, D.; Černá, V.; Hodek, P.; Stiborová, M.; Hudeček, J. J.; Šulc, M. Quantification of Interactions between Cytochrome P450 2B4 and Cytochrome B5 in a Functional Membrane Complex. *Neuro Endocrinol. Lett.* **2014**, *35* (Suppl), 114–122.
- (47) Chen, J.-F.; Guo, N.-N.; Li, T.; Wang, E.-D.; Wang, Y.-L. CP1 Domain in Escherichia Coli Leucyl-TRNA Synthetase Is Crucial for Its Editing Function. *Biochemistry* **2000**, *39* (22), 6726–6731. <https://doi.org/10.1021/bi000108r>.