

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie



Tomáš Bortel

**Expres a purifikace proteinů s nepřirozenými
aminokyselinami a studium jejich struktury pomocí
chemické nebo fotochemické modifikace a hmotnostní
spektrometrie**

Expression and purification of proteins with unnatural amino acids and
determination of their structure by combination of chemical or photochemical
modification and mass spectrometry

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Tomáš Ječmen, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně pod vedením RNDr. Tomáše Ječmena, PhD. a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 15.6.2020

.....

Abstract

Azurin, a blue copper cupredoxin from *P. aeruginosa*, functions as an electron transporter in denitrification processes. It is being widely used as a model in protein electron transport studies¹⁻⁴.

Azurin containing methionine was expressed as a recombinant protein in *E. coli* B834 in 900 ml of LB medium. It was isolated and purified using protein precipitation, dialysis and FPLC chromatography (using SP Sepharose). The intense blue-colored final concentrate was characterized using UV-Vis spectroscopy to have spectral purity coefficient (A_{280}/A_{625}) of 0,17. Total amount of produced and isolated azurin was determined using this method to be 3,5 mg.l⁻¹ of medium. The final concentrated solution of 200 µl was also characterized using bicinchoninic acid protein assay, with a result of total protein amount of 1,01±0,61 mg.l⁻¹ of medium.

To assess the rate of protein incorporation, azurin was also expressed with unnatural amino acid d₃-methionine in 30 ml of MM-M9. Rate of protein incorporation was assessed using SDS-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry to be 100 %.

Azurin was also expressed with second synthetic amino acid, azidohomoalanine, using the protocol for incorporation of photo-methionine^{7,8}. Mass spectrometry of several azurin-containing electrophoresis zones was performed, albeit with inconclusive data about amino acid incorporation. Methodology for incorporation needs to be tested and optimized to get results similar to expressions with photo-methionine prior to large-scale expression and purification.

Final product will be used to gather data about differences in electron transfer path and rate constant compared to azurin containing just methionine.

Azurin, electron transport, unnatural amino acids

IN CZECH

Abstrakt

Azurin, malý cupredoxin z bakterie *P. aeruginosa*, se podílí na přenosu elektronů v denitrifikačních procesech. V biochemii slouží jako model elektronového transportu v proteinech¹⁻⁴.

Za účelem izolace byl azurin exprimován jako rekombinantní protein v transformovaných bakteriích *E. coli* B834 v 900 ml LB média. Protein byl izolován a purifikován použitím metody srážení proteinů, dialýzy a FPLC chromatografie použitím nosiče SP Sepharosy. Intenzivně modrý získaný koncentrát byl charakterizován spektrofotometricky. Koeficient čistoty (A_{280}/A_{625}) byl určen na hodnotu 0,17. Množství azurinu bylo spektrofotometricky určeno na hodnotu 3,6 mg.l⁻¹ média. Koncentrát o objemu 200 µl byl taky charakterizován metodou BCA. Celkové množství proteinu v koncentrátu bylo 1,01±0,61 mg.l⁻¹ použitého média.

Za účelem ověření míry inkorporace byl ve 30 ml MM-M9 média exprimován azurin se syntetickou aminokyselinou d₃-methioninem. Deuterovaná nepřírozená aminokyselina byla inkorporována do proteinu pro otestování metodiky a určení míry inkorporace d₃-methioninu pomocí SDS-PAGE a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Míra inkorporace byla 100 %.

Azurin byl exprimován také s druhou syntetickou aminokyselinou, azidohomoalaninem za stejných podmínek. Na elektroforetických zónách obsahující azurin s azidohomoalaninem byla provedena analýza pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Míru inkorporace aminokyseliny se bohužel touto metodou nepodařilo určit. Metodika inkorporace azidohomoalaninu byla převzata z experimentální inkorporace foto-methioninu do proteinů^{7,8}. Pro inkorporaci azidohomoalaninu musí být dále optimalizována, neboť její přímé využití se ukázalo jako nevhodné pro získání obdobných výsledků jako s fotomethioninem.

Konečný preparát z této syntézy bude použit na získání dat ohledně trasy přenosu elektronu, rychlostní konstanty jeho přenosu a redoxního potenciálu v porovnání s azurinem obsahujícím methionin, izolovaný v rámci této práce.

Azurin, elektronový transport, nepřírozené aminokyseliny

Poděkování

Děkuji mému školiteli, RNDr. Tomáši Ječmenovi, PhD., za trpělivé vedení, zodpovězení všech nekončících dotazů a opravu chyb (včetně gramatických). Rovněž děkuji doc. Miroslavovi Šulcovi, PhD. za mnoho užitečných laboratorních i nelaboratorních „tipů a triků“ a za data z hmotnostní spektrometrie. V neposlední řadě patří díky mojí rodině za jejich podporu v psaní této práce.

1. Seznam zkratk a symbolů	8
2. Úvod.....	10
3. Literární přehled	11
3.1 Proteosyntéza.....	11
3.2 Aminoacyl-tRNA synthetasy	12
3.2.1. Methionyl-tRNA synthetasa	13
3.3 Inkorporace nepřírodních aminokyselin do proteinů	15
3.3.1. Lokální nahrazení.....	15
3.3.2. Globální nahrazení.....	17
3.3.3. Vliv inkorporace syntetických aminokyselin na růst bakterií	18
3.3.4. Využití syntetických aminokyselin v proteinech.....	19
3.3.4.1. Značení proteinů.....	19
3.3.4.2. Modifikace proteinů a studium jejich struktury.....	19
3.3.4.3. Unikátní reakce.....	20
3.4 Reakce azidu s alkyny	20
3.5 Azidohomoalanin.....	22
3.6 Elektronový přenos.....	23
3.6.1. Elektronový přenos v proteinech	23
3.7 Cupredoxiny	25
3.7.1. Azurin.....	25
3.7.1.1. Elektronový přenos v azurinu	27
4. Cíle.....	29
5. Materiál a metody	30
5.1 Chemikálie	30
5.2 Biologický materiál	31
5.3 Přístroje	32
5.4 Metody	33
5.4.1. Transformace kompetentních bakterií.....	33
5.4.2. Expresce rekombinantního proteinu se syntetickou aminokyselinou	33
5.4.3. Expresce a purifikace azurinu s methioninem	34
5.4.4. Příprava minerálního média M9.....	36
5.4.5. Zpracování vzorku na elektroforézu.....	37
5.4.5.1. Vzorek z bakteriální kultury	37
5.4.5.2. Vzorek z purifikace proteinu / chromatografické frakce.....	37

5.4.6.	Elektroforéza	38
5.4.7.	Příprava vzorků na hmotnostní spektrometrii	39
5.4.8.	Spektrofotometrie	39
5.4.9.	Stanovení proteinů pomocí metody bicinchoninové kyseliny	40
6.	Výsledky	41
6.1	Transformace kompetentních buněk	41
6.2	Expres azurinu s d ₃ -methioninem	41
6.3	Expres azurinu s azidohomoalaninem	44
6.4	Expres, izolace a purifikace azurinu s methioninem	45
6.4.1.	Charakterizace konečného preparátu	49
7.	Diskuze	51
8.	Závěr	55
9.	Seznam literatury:	56

1. Seznam zkratek a symbolů

Aha – azidohomoalanin

Asp – kyselina asparagová

BCA – bicinchoninová kyselina (z anglického Bicinchoninic acid)

BONCAT – značkování bioorthogonálními nepřírozenými aminokyselinami (z anglického BioOrthogonal Non Canonical Amino acid Tagging)

BSA – albumin z hovězího krevního séra (z anglického Bovine Serum Albumin)

CuAAC – cykloadice azidu na alkyn katalyzovaná měďnatými ionty (z anglického Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition)

dH₂O – deionizovaná voda

EPR – elektronová paramagnetická rezonance

FPLC – rychlá proteinová kapalinová chromatografie (z anglického Fast Protein Liquid Chromatography)

IAA – 2-jodacetamid

IPTG – isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid

Leu – leucin

MALDI-TOF – desorpce a ionizace laserem v přítomnosti matrice – analýza doby času letu (z anglického Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight)

Met – methionin

MetRS – methionyl-tRNA synthetasa

MM-M9 – minerální médium M9

mRNA – mediátorová RNA

MS – hmotnostní spektrometrie (z anglického Mass Spectrometry)

NMR – nukleární magnetická rezonance

OD₆₀₀ – Optická hustota při vlnové délce 600 nm (z anglického Optical Density)

Phe – fenylalanin

RPM – otáčky za minutu (z anglického Revolutions Per Minute)

Ser – serin

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného

SOC – super optimální médium se schopností represe katabolitů (z anglického Super Optimal broth with Catabolite repression)

SPAAC – cykloadice azidů na alkyny katalyzovaná vazebným pnutím (z anglického Strain Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition)

TCEP – tris(2-karboxyethyl)fosfin

TFA – trifluoroacetát

Tris – tris(hydroxymethyl)aminometan

tRNA – transferová RNA

Trp – tryptofan

Tyr – tyrosin

UV-Vis – UV+vizuální část spektra

Val – valin

2. Úvod

Proteiny jsou komplexní přírodní látky, základ kterých tvoří jeden, nebo víc řetězců složených z jednotlivých aminokyselin. Buňka používá 20 přirozených aminokyselin na syntézu proteinů⁵. Ve specifických podmínkách dokáže však buňka inkorporovat syntetické nepřirozené aminokyseliny do aminokyselinové sekvence proteinů⁶. Tuhle metodou je možné do proteomu buňky vpravit funkční skupiny, které mohou ovlivnit strukturu a funkci proteinů.

Za účelem studia struktury a funkce kolegové v laboratoři úspěšně připravili několik proteinů^{7,8}, ve kterých byl methionin nahrazen syntetickou aminokyselinou, fotomethioninem. Jde o sloučeninu, která je strukturně podobná methioninu, ale místo atomu síry obsahuje diazirinový kruh⁸.

Mým úkolem bylo, s využitím zkušeností a postupu optimalizovaného kolegy, nahradit methionin jinou syntetickou aminokyselinou, azidohomoalaninem, obsahujícím azidovou skupinu ($-N_3$).

Jako modelový protein jsem si vybral azurin, bakteriální cupredoxin používaný jako model elektronového transportu v proteinech⁹. V něm se nachází methionin v blízkosti aktivního centra, kde má roli ligandu pro koordinaci iontu mědi. Jeho záměna za azidohomoalanin může kvůli azidové skupině mít vliv na dráhu a rychlostní konstantu elektronového transportu

Porovnání s údaji z azurinu obsahujícího methionin může pomoci upřesnit, potvrdit nebo vyvrátit hypotézy o způsobu přenosu elektronů v proteinech.

3. Literární přehled

Proteiny jsou biopolymery složené z proteinogenních aminokyselin. V organismu vykonávají nesčíslné množství funkcí. Dělí se na mnoho skupin, například strukturní proteiny, enzymy, transportní proteiny, nebo signální proteiny. Všechny se ale syntetizují stejně - procesem proteosyntézy⁵.

Ve všech živých soustavách se vyskytuje 20 L- α -aminokyselin. Tyto aminokyseliny, označované jako proteinogenní, jsou univerzálně používány všemi živými systémy. Aminokyseliny jako formyl-methionin, selenocystein, nebo pyrrolysin se taky vyskytují, ale ne ve všech živých soustavách, proto jsou klasifikovány jako speciální proteinogenní aminokyseliny⁵.

3.1 Proteosyntéza

Genetická informace organismu je uložena v každé buňce samostatně, v systému obsahujícím obrovské množství kombinací čtyř nukleových bází, zvaném DNA. Informace je uložena v úsecích DNA zvaných geny. Když je potřeba vyrobit nějaký protein, buňka vyšle signál na operon, krátkou sekvencí nukleotidů před genem kódujícím daný protein. Ten umožní rozpletení DNA a zahájení procesu transkripce⁵.

Transkripce je proces, během kterého se genetická informace přepisuje z DNA do nově vytvářené molekuly mRNA pomocí komplementarity nukleových bází. Poté se molekula mRNA oddělí, upraví posttranskripčními modifikacemi a zamíří k ribozomu⁵.

Po navázání začne ribozom párovat molekulu mRNA s komplementárními molekulami aminoacyl-tRNA. To jsou molekuly, které obsahují rameno s trojmístní sekvencí nukleotidů, zvanou antikodon. Na 3' konci sekvence mají navázanou jednu z dvaceti proteinogenních aminokyselin, přičemž každý antikodon reprezentuje specifickou aminokyselinu. Podle antikodonů se komplementárně párují jedna po druhé od začátku mRNA, přičemž ribozom odděluje jejich navázané aminokyseliny a tvorbou peptidové vazby mezi nimi je spojuje do nově vytvořeného proteinu^{5,6}.

Trojice nukleových bází v DNA, kodony, tedy určují pořadí sekvence aminokyselin. Možných je celkem $4^3 = 64$ třímístných uspořádání. Všeobecně se vyskytujících 20 přirozených aminokyselin je kódovaných 61 kodony, přičemž většina

aminokyselin je kódovaná více než jedním kodonem. Tři zbylé kodony slouží jako signály pro zastavení translace^{5,6}.

Správné pořadí aminokyselin zajišťují hlavně dva procesy: správná vazba aminokyseliny s příslušnou tRNA za tvorby aminoacyl-tRNA a správné párování aminoacyl-tRNA s mRNA⁶.

3.2 Aminoacyl-tRNA synthetasy

Enzymy syntetizující molekuly aminoacyl-tRNA nezbytné pro translaci jsou aminoacyl-tRNA synthetasy. Katalyzují dvoukrokovou reakci, sestávající z aktivace specifické aminokyseliny pomocí ATP a následné ligaci aktivované aminokyseliny na 2' nebo 3' hydroxyl terminálního adenosinu odpovídající tRNA. Buňka většinou obsahuje jednu aminoacyl tRNA synthetasu pro každou proteinogenní aminokyselinu^{5,6}.

Každá aminoacyl-tRNA synthetasa obsahuje místo pro navázání tRNA a příslušné aminokyseliny. Molekula tRNA se na aminoacyl-tRNA synthetasu váže na strukturu pozůstávající z pěti paralelních β -listů spojených α -helixy, pojmenovanou „Rossmannův ohyb“¹¹. Tato struktura obsahuje taky vazebné místo pro ATP¹². V případě aminokyseliny správnou vazbu zajišťuje vazebné místo evolučně vyvinuto k velmi vysoké substrátové přesnosti⁶.

Kdyby aminoacyl-tRNA synthetasa vysokou substrátovou přesnost neměla, mohlo by to vyústit v záměnu aminokyselin v sekvenci proteinu. Ta může způsobit mnohé problémy vyplývající ze špatného složení proteinu (například záměna Val za Glu v hemoglobinu způsobuje srpkovitou anemii)¹³.

V buňce se vyskytují molekuly, které se liší od požadované přirozené aminokyseliny jen jedinou methylovou skupinou. I tak malý rozdíl ve struktuře molekuly způsobuje, že disociační konstanta vazby se liší o několik řádů. Například Isoleucyl-tRNA synthetasa váže valin s disociační konstantou o 10^4 - 10^5 vyšší než isoleucin. Podobná situace je u alanyl-tRNA synthetasy vůči glycinu¹⁴.

V případě některých aminoacyl-tRNA synthetas existuje kontrolní systém takzvaného „dvojitého síta“. V podstatě jde o dvojitou kontrolu. Prvotní kontrola spočívá ve vazbě aminokyseliny na vazebné místo. Aminokyseliny, které do vazebného místa nepatří, k němu nemají afinitu, nebo jejich disociační konstanta s enzymem je

o několik řádů vyšší¹⁴. Druhá kontrola spočívá v odstranění strukturně podobných molekul. O tu se většinou stará samostatná část aminoacyl tRNA synthetasy kontrolou nevazebnou interakcí s už navázanou molekulou. Tím enzym buď potvrdí identitu substrátu a naváže ho na tRNA nebo molekulu z vazebného místa odstraní¹³.

3.2.1. Methionyl-tRNA synthetasa

Methionyl-tRNA synthetasa má vazebné místo evolučně vyvinuto pro proteinogenní aminokyselinu methionin. Synthetizuje methionyl-tRNA⁵. Její vazebné místo pro aminokyselinu je poněkud volnější, než je tomu u ostatních aminoacyl-tRNA synthetas¹⁵.

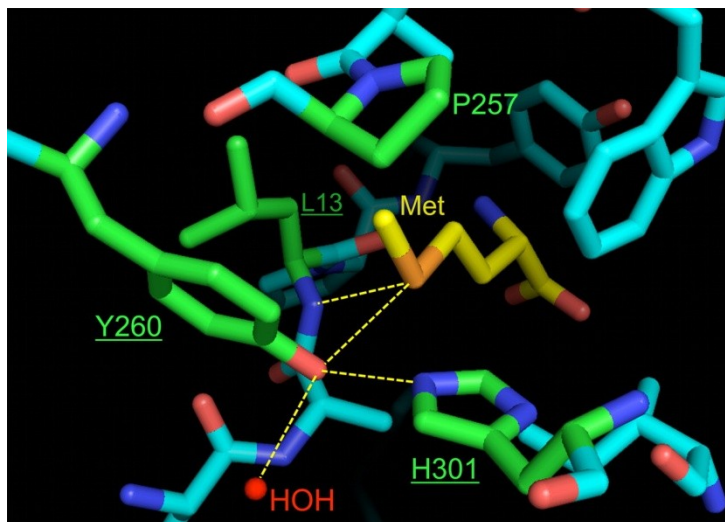
V případě methionyl-tRNA synthetasy je možné navázání homocysteinu místo methioninu. Homocystein je neproteinogenní aminokyselina, která se v živých soustavách vyskytuje jako meziprodukt různých biochemických drah. Jelikož se od methioninu liší pouze absencí methylové skupiny na atomu síry, může se navázat do vazebného místa aminoacyl-tRNA synthetasy¹⁶.

Aby homocystein nebyl inkorporován do proteinů místo methioninu, methionyl-tRNA synthetasa má vyvinutou o 2 řády nižší disociační konstantu proti homocysteinu¹⁶. To však pro zabránění ligaci homocysteinu na tRNA nestačí. Vazebné místo má proto vyvinutý opravný mechanismus pro odlišení aminokyselin v případě takové záměny¹³.

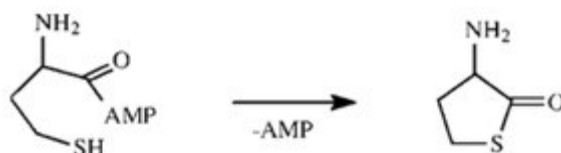
Síra v thioetheru methioninu interaguje s hydroxylovou skupinou Tyr-260 a α -amidem Leu-13, čím vytěsňuje navázanou molekulu vody (obr. 3.1)¹⁷. Homocystein má místo thioetheru, na kterém je navázaná methylová skupina jen thiol. Ten reaguje s blízkou aminokyselinou Asp-259. Tato aminokyselina plní funkci receptoru thiolu je klíčová ke kontrole substrátu. V případě navázání molekuly obsahující thiol katalyzuje cyklizaci molekuly thiolakton (obr. 3.2), který je následně z buňky vyloučen nebo enzymaticky zpracován na methionin¹⁶.

Hydrofobní methylová skupina methioninu interaguje s hydrofobním úsekem vazebního místa tvořeným Trp-305 a Tyr-15. Mechanismus byl potvrzen pomocí mutací Trp-305 a Tyr-15 methionyl-tRNA synthetasy *E. coli*. Tato mutace se projevila mnohonásobným zvýšením poměru homocysteinyl-tRNA k methionyl-tRNA¹⁸.

Správné navázání methioninu způsobí celoenzymovou změnu konformace, která umožní navázání aminokyseliny na příslušnou tRNA¹⁷.



Obr. 3.1 Vizualizace vazebného místa pro methionin v MetRS. Převzato z¹⁹.



Obr. 3.2 Cyklizace homocysteinu katalyzovaná methionyl-tRNA synthetasou za vzniku thiolaktonu cysteinu. Převzato z¹⁸.

I když mají aminoacyl-tRNA synthetasy mechanismy jak se vyhnout špatné aminoacylaci příslušné tRNA, tyto mechanismy jsou evolučně vyvinuty jen pro přirozeně se vyskytující strukturně podobné molekuly²³. V přírodě obecně vzácné isosterické molekuly, neumí methionyl-tRNA synthetasa odstranit²⁰. Norleucin, je neproteinogenní aminokyselina isosterická s methioninem²⁰. Je přirozeně produkován některými kmeny bakterií. S disociační konstantou o dva řády vyšší proti methioninu je methionyl-tRNA synthetasou vázán na tRNA a inkorporován do proteinů²¹.

Stejné chování je pozorováno u syntetického derivátu methioninu, foto-methioninu. Ten má místo síry v thioetheru navázán δ -uhlík, na něm diazirinový kruh a methylovou skupinu^{7,8}.

3.3 Inkorporace nepřirozených aminokyselin do proteinů

I když si evoluce našla způsoby jak zabránit inkorporaci nesprávné aminokyseliny do proteinu, člověk dokázal tyto překážky obejít a do proteinů inkorporovat aminokyseliny, které tam nepatří. Existují dva hlavní principy inkorporace nepřirozených aminokyselin, a to globální a lokální nahrazení aminokyselin⁶.

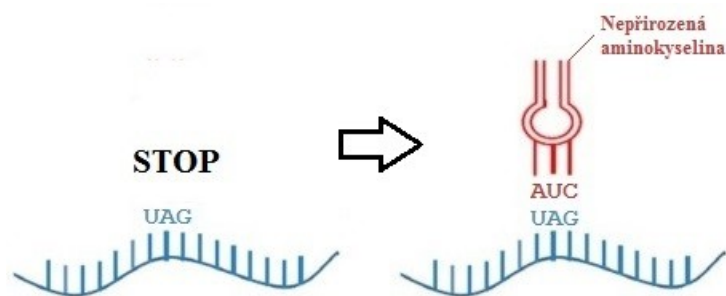
3.3.1. Lokální nahrazení

Při lokálním nahrazení se nahradí či vloží jedna, nebo více aminokyselin v daných proteinech²⁴.

Do této metody patří metoda inkorporace aminokyseliny pomocí stop kodonu. Do buňky se přidá gen kódující aminoacyl-tRNA synthetasu, která spojuje nepřirozenou aminokyselinu s mutovanou hererologní tRNA komplementární k jednomu ze stop kodonů (obr. 3.3a)²⁵.

Takhle bylo možné například inkorporovat mutovanou tyrosyl-tRNA synthetasu společně s tyrosyl-tRNA kódující stop kodon u *E. coli* z archeontu *M. jannaschii*²⁴. Bakterie si tak zachovala vlastní tyrosyl-tRNA synthetasu a exprimuje taky mutovanou tyrosyl-tRNA synthetasu, která už nepoužívá tyrosin ale jinou, syntetickou aminokyselinu. Tím u ní vzrostl počet proteinogenních aminokyselin na 21 (cit.²⁵).

I nejméně používaný stop kodon, UAG, u *E. coli* zastavuje translaci přibližně 320 genů (cit.²⁶). Takové nahrazení může proto výrazně ovlivnit genovou expresi organismu. Proto se při podobné proceduře mutují UAG stop kodony v celém expresním systému na jiné stop kodony. UAG se vnese jen na požadované místo, kde se má navázat 21. aminokyselina²⁵.



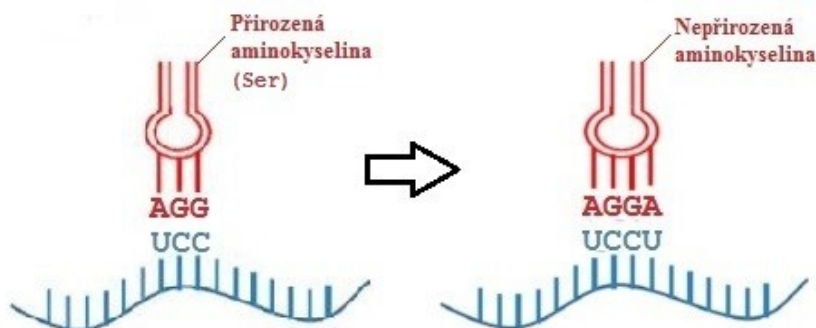
Obr. 3.3a Schematické znázornění metody využití stop kodonu pro inkorporaci syntetické aminokyseliny. Modrá – mRNA, červená – aminoacyl-tRNA. Převzato a upraveno z²⁷.

Možností je taky přidání syntetické tRNA, která se váže na čtyřmístný, ne trojmístný kodon mRNA (kvadruplet) (obr. 3.3b)²⁸. Tímhle způsobem byl například inkorporován L-homoglutamin v bakteriích *E. coli* pomocí mutantní formy lysyl-tRNA synthetasy z organismu *P. horikoshii* a tRNA s antikodonem AGGA. Byly použity mutované bakterie, které v genetickém kódu obsahovali antikodon proti AGGA jen na místech pro novou aminokyselinu²⁸.

V buňce se ale stále vyskytuje aminoacyl-tRNA s antikodonem AGG, kterou bude ribozom pro navázání na tRNA preferovat²⁹. Tím se nejen syntetická aminokyselina do proteinu ve většině případů nedostane, posune se taky čtecí rámec mRNA. V případě navázání dané přirozené aminoacyl-tRNA se pak syntetizuje zcela jiný zbytek proteinu.

Vyřešení problému s kvadrupletem představuje mutagenese ribozomu. Ta se provede tak, aby přijímal kromě aminoacyl-tRNA s kodonem AGG taky aminoacyl-tRNA s kodonem AGGA²⁹.

S použitím čtyřmístných kodonů a cílenou mutagenézí ribosomu je teoreticky možné kódovat až $4^4 = 256$ kodonů.



Obr. 3.3b Schematické znázornění využití tRNA se čtyřmístným antikodonem na inkorporaci nepřirozené aminokyseliny. Modrá – mRNA, červená – aminoacyl-tRNA. Převzato a upraveno z²⁷.

Další možností, která by dokázala zvýšit počet aminokyselin inkorporovatelných do proteinů je zvýšení počtu nukleových bází v DNA nebo v RNA. Do genomu byly inkorporovány orthogonální syntetické báze iso-cytidin a iso-guanosin³⁰. Taky byly inkorporovány báze, které spolu neinteragují vodíkovými můstky, ale hydrofobní interakci, jako difluorotoluen a 4-methylbenzylimidazol³¹.

Lokální nahrazení je nesmírně perspektivní v možnosti inkorporace syntetických aminokyselin jen na určená místa. Metodika jejich inkorporace je ale hodně složitá a pracná. Často zahrnuje celogenomové mutace organismu, vyžaduje knihovny mutantních forem enzymů a několik bakteriálních transformací^{6,25,28}.

3.3.2. Globální nahrazení

Jednodušší způsob inkorporace nepřírodních kyselin do proteinů využívá metodu globálního nahrazení aminokyseliny. Při této metodě se do organismu přidá syntetická aminokyselina strukturně podobná s některou přírodní aminokyselinou. Využívá se substrátové promiskuity (schopnosti vazebného místa pro aminokyselinu přijmout molekulu jinou než danou aminokyselinu) aminoacyl-tRNA synthetas. Enzym bude katalyzovat vznik příslušné aminoacyl-tRNA, obsahující však nepřírodní kyselinu místo přírodní⁶(obr. 3.3c).

Substrátová promiskuita ale není u aminoacyl-tRNA synthetas běžná z důvodů uvedených v kapitole 3.2. Nutností je racionální návrh syntetické aminokyseliny, hlavně vyhnutí se přírodním editačním mechanismům aminoacyl-tRNA synthetasy. Enzymy budou ale stále preferovat jejich přírodní substrát jestli je přítomen kvůli jeho nižší disociační konstantě vůči enzymu. Disociační konstanta v tomto případě určuje poměr tRNA aminoacylované přírodní aminokyselinou ke tRNA aminoacylované nepřírodní aminokyselinou. I malé množství nahrazované kyseliny v médiu nebo v cytosolu buňky může negativně ovlivnit míru inkorporace.

Pro inkorporaci se tedy používají metody, kterým by se vyšší disociační konstanta obešla. Například zvýšení koncentrace syntetické aminokyseliny relativně ke přírodnímu analogu a použití takové, která má disociační konstantu co nejnižší⁶.

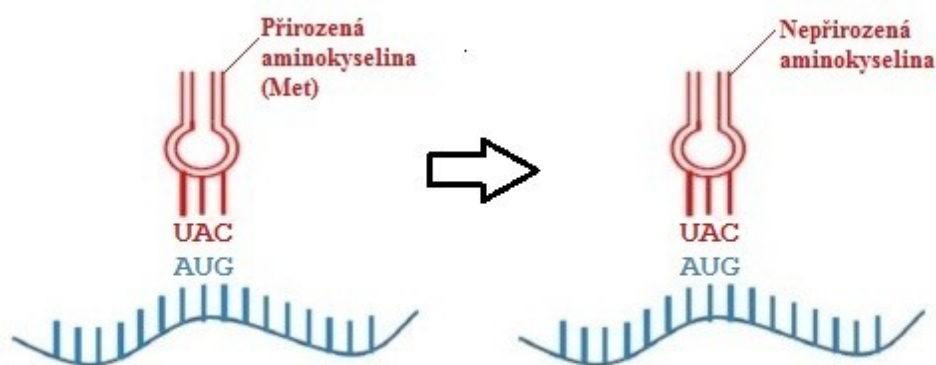
Pro globální nahrazení aminokyseliny se nejčastěji používají auxotrofní kmeny organismů, které mají zablokovanou biosyntetickou dráhu nahrazované aminokyseliny. S použitím minimálního média neobsahující přírodní analog, auxotrofního kmenu a správné aminokyseliny může míra inkorporace dosáhnout až 100% (cit.⁶).

Methionin je jedna z nejčastěji nahrazovaných aminokyselin. Je to tak hlavně kvůli už zmiňované substrátové promiskuitě methionyl-tRNA synthetasy. Ta má poněkud volnější vazebné místo pro aminokyselinu. Nahrazení methioninu je proto jednodušší než nahrazení jiných aminokyselin¹⁵.

Mimo MetRS bylo pro inkorporaci nepřírodních aminokyselin použito mnoho dalších tRNA synthetas. Nahrazeny byly například Trp^{32,33}, Tyr^{28,34}, Phe^{35–37}, Leu³⁸, Ser³⁹ atd. více než sto různými aminokyselinami²⁷.

Použitím auxotrofních kmenů bakterií pro dvě a více kanonických aminokyselin je dokonce možné dosáhnout inkorporaci dvou nebo více nepřírodních analogů najednou^{36,40}.

Substrátovou promiskuitu aminoacyl-tRNA synthetasy je možné uměle „podpořit“ mutacemi. Daná syntetická aminokyselina bude mít v tom případě nižší disociační konstantu vůči vhodně mutované aminoacyl-tRNA synthetase v porovnání s přírodní aminokyselinou. Bude proto preferovat syntetickou aminokyselinu a vázat ji na příslušnou tRNA (obr. 3.3c). Takhle byla například upravena methionyl-tRNA synthetasa pro větší afinitu k aminokyselině azidonorleucin než k methioninu¹⁹.



Obr. 3.3c Schematické znázornění inkorporace nepřírodné aminokyseliny pomocí substrátové promiskuity aminoacyl-tRNA synthetasy, nebo pomocí její cílené mutagenese. Modrá – mRNA, červená – aminoacyl-tRNA. Převzato a upraveno z ²⁷.

3.3.3. Vliv inkorporace syntetických aminokyselin na růst bakterií

Bakteriální kultury pěstované v médiích s nepřírodními aminokyselinami vykazují nižší buněčnou hustotu než v kontrolních médiích. Důvod je pravděpodobně v mírném pozměnění funkcí proteinů se syntetickou aminokyselinou v řetězci^{6,33}.

V případě málo pozměněných aminokyselin je ale možné upravit organismus samotný, aby syntetickou aminokyselinu používal bez nežádoucích účinků. Kultury *E. coli* byly přizpůsobeny médiu obsahující 4-fluorotryptofan místo tryptofanu. Po

mutaci enzymů využívajících tryptofan byla buněčná hustota v kultuře zvýšena oproti kontrolní kultuře bez mutací³³.

3.3.4. Využití syntetických aminokyselin v proteinech

Inkorporované aminokyseliny mohou obsahovat řetězce schopné specializovaných funkcí. Existuje mnoho možných využití inkorporovaných syntetických aminokyselin⁶.

3.3.4.1. Značení proteinů

Nepřirozené kyseliny se mohou využít na značení proteinů. Proteiny přirozeně obsahují tryptofan, který vykazuje slabou přirozenou fluorescenci. Při té je ale absorpce i emise v UV oblasti, navíc má nízkou fotostabilitu⁴¹. Proto byly vyvinuty nepřirozené aminokyseliny vykazující silnější fluorescenci, například 4-kyanotryptofan³², nebo dansylalanin⁴².

Syntetická aminokyselina d₃-methionin byla použita jako značka v hmotnostní spektrometrii⁴³. Aminokyselina ε-N-[(2-propynyloxy)karbonyl]-L-lysin byla použita na navázání značky v Ramanově spektrometrii⁴⁴.

Bakteriální ribonukleotid reduktasa katalyzuje reakci, která vyžaduje velmi dlouhý přenos elektronu přes enzym. Byly u něj studovány rozdíly v elektronovém přenosu po inkorporaci řady syntetických aminokyselin místo tryptofanu⁴⁵.

Inkorporace fluorovaných aminokyselin poskytuje možnosti pro analýzu proteinů pomocí ¹⁹F NMR^{20,46}. Navíc je fluorované aminokyseliny možné využít ke zvýšení stability proteinů, potenciálně na vytvoření hyperstabilních proteinových konformací⁴⁷.

3.3.4.2. Modifikace proteinů a studium jejich struktury

Dalším využitím je modifikace přirozeného proteinu a jeho vylepšení pro specifickou funkci. Zelený fluorescenční protein (GFP), byl v aktivním centru modifikován nepřirozenými aminokyselinami a tím bylo změněno jeho absorpční a emisní maximum³⁵.

Jedno z vůbec prvních využití inkorporace syntetických aminokyselin do proteinů byla záměna methioninu za selenomethionin pro použití v rentgenové krystalografii⁴⁸. Atom selenu způsobuje odlišný rozptyl rentgenových paprsků, čím byl vyřešen fázový problém při určování struktury proteinu.

Je taky možné upravit enzymy pro vyšší aktivitu vůči substrátu. Aktivita bakteriálních fosfotriesteras byla vylepšena 8-11 krát pomocí syntetických aminokyselin³⁸.

3.3.4.3. Unikátní reakce

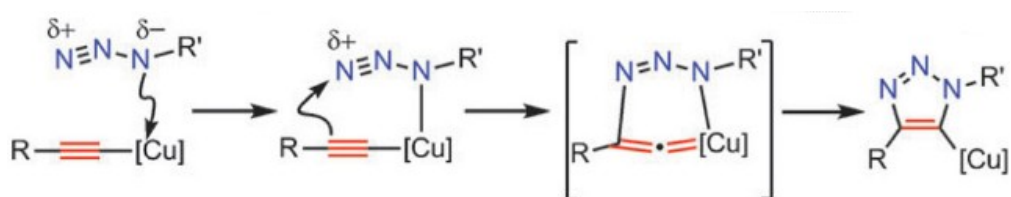
Další možností je zavedení aminokyselin, které obsahují funkční skupiny schopné unikátních bioorthogonálních reakcí (reakcí schopných proběhnout v organismu, které nenarušují přirozené reakce)⁴⁹.

Foto-methionin obsahuje místo síry diazirinový kruh, který po ozáření UV světlem disociuje na nestabilní karben. Tento reaktivní radikál se váže na nejbližší vhodnou molekulu. Lze ním zachytit nevazebné interakce kovalentní vazbou, proto je vhodný na studování interakcí proteinů^{7,8}.

Syntetické aminokyseliny v proteinech jsou schopny i substrátově specifických biokompatibilních konjugačních reakcí. Jedním z příkladů jsou aminokyseliny obsahující azidy nebo alkyny.⁵⁰

3.4 Reakce azidu s alkyny

Pojem „Click chemistry“ definuje reakce, které jsou jednoduché, mají velmi vysoké výtěžky, málo, nebo žádné vedlejší produkty a probíhají v mnoha podmínkách^{49,51,52}. Jednou z těchto reakcí je [3+2] cykloadice azidů s alkyny, za vzniku pětičlenného heterocyklického triazolu⁵².



Obr. 3.4 Mechanismus reakce CuAAC. Převzato a upraveno z⁵².

Reakce není ve většině případů ovlivněna sterickými a elektronickými vlastnostmi zbytků molekul napojených na azid a alkyne. Heterocyklický 1,2,3-triazol má výhodné vlastnosti vysoké chemické stability, aromatický charakter a schopnost podílet se na vodíkových vazbách⁵².

Jako první se v biochemii začala využívat cykloadice azidů na alkyn katalyzovaná měďnými ionty (Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition), CuAAC (obr. 3.4). Ty jsou ale pro živé organismy cytotoxické⁵².

Reakce dokáže probíhat i bez použití měďných iontů. V tom případě ale alkynová skupina musí být součástí osmi a více členné organické cyklické molekuly. Jde o cykloadici azidů na alkyn katalyzovanou vazebným pnutím, nazvanou SPAAC (strain promoted azide-alkyne cycloaddition)¹⁰. Nevýhodou je poločas reakce v řádech hodin⁵³ v porovnání s CuAAC, která má poločas reakce v řádu minut⁵⁴. To může výrazně ovlivnit výsledky experimentu⁵⁵.

Předchozí reakce využívá metoda BONCAT, kdy se protein označovaný azidovým derivátem přirozené aminokyseliny spojí se synteticky navrženou molekulou obsahující alkyn a „kotvu“ pro navázání protilátky^{49,50,55}. Kotva se často skládá z alkynovaného biotinu, přičemž se využívá velmi vysoká afinita biotinu k bakteriálnímu proteinu streptavidinu^{50,56}.

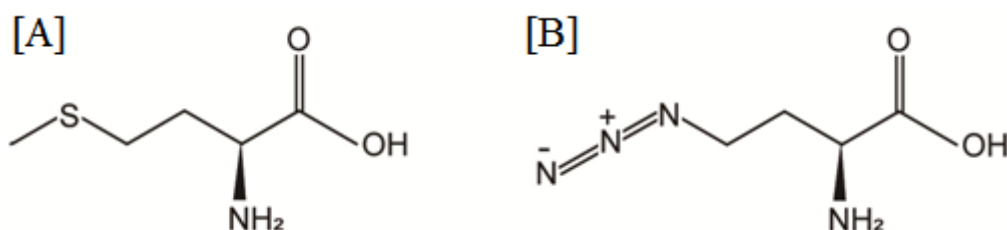
Takto označované proteiny mohou být kvantifikované pomocí imunoblotovací analýzy, nebo odděleny od zbytku buňky afinitní chromatografií a identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie, nebo NMR³⁴. Touto metodou se dají identifikovat proteiny syntetizované v poměrně krátkém časovém úseku inkubace po inkorporaci syntetické aminokyseliny (minuty, hodiny)^{49,50}.

Pomocí reakcí alkynů s azidy byly také studovány interakce virů s buňkami^{57,58}, vývoj nových léčiv⁵³, nebo byly zkoumány způsoby léčby rakoviny⁵³.

3.5 Azidohomoalanin

Azidohomoalanin (obr. 3.5B) je syntetická α -aminokyselina přibližně isosterická s methioninem (obr. 3.5A)^{59,60}. Od methioninu se liší o čtyři procenta nižší relativní molekulovou hmotností (Met – 149,2, Aha – 144,1).

Místo methylovaného thioetheru obsahuje azidovou skupinu. Ta se vyznačuje silným dipólovým charakterem, rezonancí a vysokou elektronovou hustotou⁵⁶. Je taky silně nukleofilní a je dobrým akceptorem vodíkových můstků⁶¹. Azidová skupina na azidohomoalaninu, stejně jako ostatní organické azidy, není ve formě iontů a proto není toxická⁶. Na methionyl-tRNA synthetasu se váže s disociační konstantou přibližně o 10^3 vyšší¹⁴.



Obr. 3.5 Vzorec methioninu [A] a azidohomoalaninu [B]

Byl úspěšně inkorporován mimo bakteriálních kultur taky do proteinů buněčné linie HEK293⁵⁵. Taky do proteinů vyšších organismů, například do *D. rerio*⁴⁹, *X. laevis*⁶², nebo *M. musculus*⁶³.

Azidohomoalanin má charakteristický absorpční pás v infračervené oblasti⁵⁹. Jeho absorpční maximum v této oblasti reaguje na změny okolí do proteinu inkorporovaného azidohomoalaninu změnou vlnové délky absorpce. Může být proto použit na značkování proteinů i bez jeho hlavního využití, což je studium proteinů pomocí reakcí CuAAC nebo SPAAC (Kapitola 3.4)^{52,59}.

Nicméně azidohomoalanin nahrazuje methionin. Ten je ve své volné formě nenahraditelný. Methionin je ve formě S-adenosyl methioninu důležitým buněčným donorem methylové skupiny⁶⁴. V jeho absenci může být ovlivněna například genová exprese⁶⁵, metabolismus aminokyselin (methionin je prekurzor pro syntézu cysteinu)⁶⁶, nebo syntéza glutathionu⁶⁶.

Methionin je v proteinech částečně nahraditelný. Nemá v proteinech katalytickou funkci jako například cystein. Má ale vedlejší strukturní funkci. Síra na bočním řetězci

interaguje s aromatickými aminokyselinami, čím stabilizuje vyšší proteinové struktury⁶⁷.

Methionin se taky vyskytuje v mnoha aktivních centrech enzymů, kde slouží jako ligand pro koordinaci kovových center⁶⁸. V případě nahrazení by ho sice azidohomoalanin pravděpodobně ve funkci ligandu iontů kovu nahradil, změnilo by to ale redoxní potenciál proteinu, co může ovlivnit jeho funkci⁴.

3.6 Elektronový přenos

Elektronový přenos mezi dvěma molekulami popisuje Markusova teorie známá už více než 60 let⁶⁹. Předpokladem je přiblížení se molekul donoru a akceptoru elektronu a degenerace (vyrovnání energie) jejich orbitalů. Když je toto splněno, elektron přeskočí z jedné molekuly na druhou. Jde o chemickou reakci regulovanou hnací silou (změnou Gibbsovy energie systému), teplotou a vzdáleností přenosu elektronu. Markusova teorie zavádí dva další parametry: λ , reorganizační energii (energií nutnou na excitaci reaktantu pro synchronizaci energetických hladin s druhým reaktantem) a H_{AB} , sílu, kterou na sebe reaktanty působí v meziprojektu^{69,70}. Z těchto parametrů se určuje rychlostní konstanta přenosu elektronu k_{ET} [s^{-1}]⁶⁹.

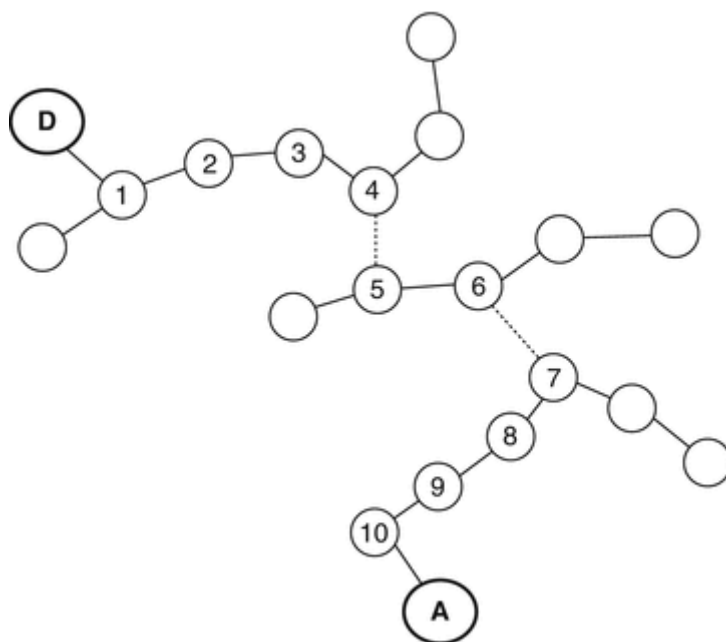
3.6.1. Elektronový přenos v proteinech

Mnoho biologických redoxních reakcí vyžaduje přenos elektronu na dlouhou vzdálenost⁷¹. Mezi příklady patří fotosyntetický systém rostlin, nebo dýchací řetězec bakterií, kvasinek a eukaryot⁷¹. Přenos probíhá mezi jednotlivými kofaktory a prosthetickými skupinami schopnými redoxních reakcí přes proteinové elektronové přenašeče.

V proteinech je elektronový přenos zpracováván pomocí jednotlivých skoků elektronu⁷¹ přes takzvané „částkové bloky“, které spolu tvoří dráhu, přes kterou elektron přeskočí⁶⁶. Částkovým blokem může být kovalentní vazba, vodíková vazba nebo skok přes prázdný prostor^{72,73}.

Hlavní trasy přenosu elektronu v proteinech většinou pozůstávají ze sekvence peptidových vazeb. Když je dráha přes peptidovou sekvenci příliš dlouhá, elektron využije méně výhodných skoků mezi peptidovými řetězci (obr. 3.6, str. 24)⁶⁶.

Tahle situace vytváří komplexní problém nutnosti vytvoření mnoha mezistavů jednotlivých vazeb a orbitalů než se elektronový transport dokončí. Naštěstí, pro určení rychlostní konstanty celkového přenosu elektronu je možné tyto parametry zanedbat⁷⁰



Obr. 3.6 Příklad dráhy elektronu přes protein. Dráha přechází přes tři části peptidové sekvence po chemických vazbách a přes dva prostorové skoky. D = donor elektronu, A = akceptor elektronu, čísla reprezentují pozice elektronu po skoku přes jednotlivé bloky. Převzato z⁶⁶.

Přirozeně se vyskytující meziproteinové elektronové přenosy nejsou vhodné pro studium elektronového transportu. Výměna elektronů mezi dvěma proteiny probíhá velmi rychle a vzniklý komplex se taky rychle rozpadá⁷⁴.

Místo toho se pro výzkum používá intraproteinový elektronový přenos. Jedna z metod jeho vyvolání je pomocí koordinačních komplexů kovů. Často se používají komplexy ruthenia, například $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (cit.^{70,75,76}), nebo rhenia $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Dmp})(\text{H}_2\text{O})]^+$ (cit.^{77,78}). Tyto komplexy se navážou na povrch proteinu, jestli je přítomna vhodná aminokyselina (většinou se navážou na imidazolový kruh histidinu, čím vytěsní vodu jako svůj koordinační ligand)⁶⁸. Po navázání a indukované fotolýze se komplex obsahující ruthenium nebo rhenium redukuje a přijímá elektron z aktivního centra proteinu^{70,75,76}.

Rychlostní konstanta přenosu elektronu se pak dá zjistit ze změn absorbancí v absorpčních maximách UV-Vis spektra odpovídající změně oxidačních čísel aktivního centra enzymu a navázaného komplexu kovu^{70,75,76}.

Další technika, dynamická ^{15}N NMR spektrometrie je už mnohem vyspělejší. Protein označovaný ^{15}N se vloží do NMR přístroje a indukuje se redoxní reakce. Přístroj během reakce sbírá data z nukleární magnetické rezonance jader ^{15}N . Z nich se pak dají určit změny uspořádání okolí těchto jader, které zahrnují i pozice a energie meziproduktů elektronového transportu^{72,79}. Z analýzy NMR spekter se určí vazby, které vykazují fluktuace energetických hladin. Z nich je možné určit trasu pohybu elektronu přes protein⁷².

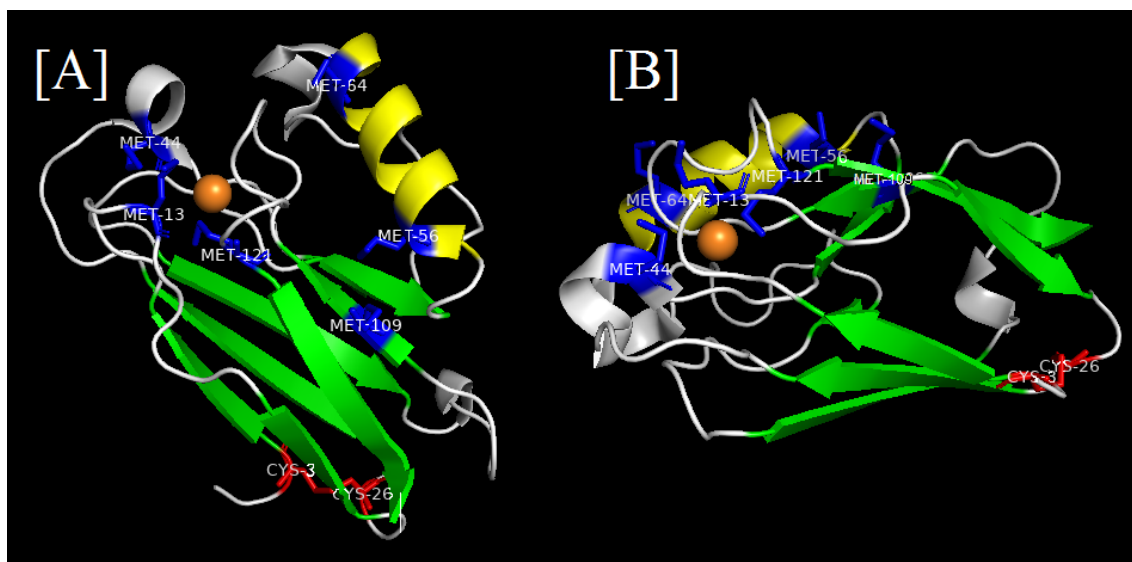
3.7 Cupredoxiny

Cupredoxiny jsou malé rozpustné proteiny (10-14 kDa) obsahující v aktivním místě měď. Plní funkci elektronových přenašečů v různých biologických systémech, například v bakteriální a rostlinné fotosyntéze, nebo u denitrifikačních procesů u bakterií^{4,80}. Mají podobné prostorové struktury, relativně vysoké redoxní potenciály a silný absorpční pás v oblasti vlnových délek kolem 600 nm.

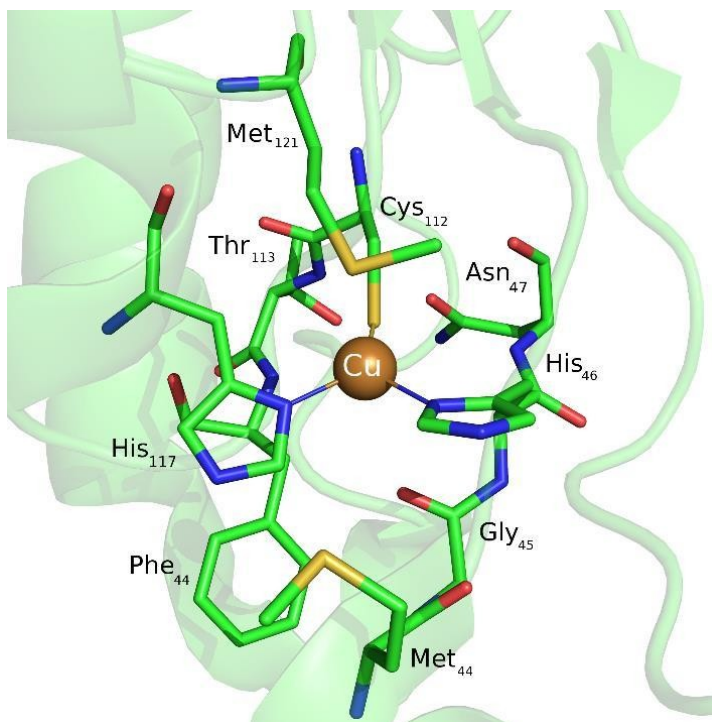
3.7.1. Azurin

Azurin je cupredoxin pocházející z bakterie *P. aeruginosa*. Tvoří ho sekvence 128 aminokyselin poskládaných do jednoho α -helixu, různých neuspořádaných struktur a sedmi β -skládaných listů, které tvoří terciární strukturu β -barelu s aktivním místem poměrně blízko povrchu¹ (Obr. 3.6, str. 26).

Tři primární ligandy vázající měď v aktivním centru tvoří deformované trigonální planární uspořádání. Jsou to: δN His-117, δN His-46 a thiolát s Cys-112. Dalšími slabšími ligandy jsou síra v Met-121 a karbonylový kyslík v Gly-45. Všech pět koordinačních ligandů pak tvoří koordinační strukturu trigonální bipyramidy (Obr. 3.7, str. 27).



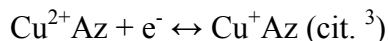
Obr. 3.6 Struktura azurinu vizualizovaná shora [A] a ze strany [B]. Vizualizováno pomocí programu PyMol (PDB kód 4AZU). Methioniny vyznačené modře, disulfidová vazba vyznačená červeně.



Obr. 3.7 Vazebné místo mědi v azurinu (4AZU). Převzato z².

3.7.1.1. Elektronový přenos v azurinu

Měď v jeho aktivním centru je schopna redoxních reakcí s potenciálem $E^0 = 310 \text{ mV}$ (cit. ⁸¹) dle následující rovnice:



Přirozená funkce azurinu je přenos elektronu mezi dusitan reduktasou a cytochromem c_{551} . Není to ovšem jediný elektronový přenos, který zprostředkovává⁷². Nemá proto příliš specifické vazebné místo, kterým by se na redoxní partnery vázal. Místo toho se na ně váže hydrofobním úsekem na povrchu v blízkosti aktivního centra. V centru tohoto hydrofobního úseku se nachází His-117, jeden z ligandů pro koordinaci mědi. Tato aminokyselina pravděpodobně zprostředkovává meziproteinový přenos elektronů⁷².

Jako model elektronového transportu v proteinech je azurin intenzivně studovaný bioanorganickými a biofyzikálními chemiky¹⁻⁴. Byl vybrán díky svým unikátním vlastnostem. Mimo koordinovaného atomu mědi má robustní strukturu, která snese několikanásobné mutace a na povrchu má několik histidinů, na které se dají koordinovat už zmíněné komplexy kovů^{71,77,78}. Taky obsahuje disulfidový můstek mezi Cys-3 a Cys-26 (obr. 3.6), který je možné redukovat pomocí pulzní radiolýzy⁷², čím se spustí intraelektronový přenos. Ten probíhá z mědi v aktivním centru přes β -barel proteinu k redukovanému disulfidovému můstku⁷².

Bylo zjištěno, že elektron preferuje dvě dráhy, pravděpodobně kvůli tepelným fluktuacím na časové škále pikosekund. Jedna dráha zahrnuje přesun po 27 kovalentních vazbách a jednom vodíkovém můstku, druhá zas přesun po 21 kovalentních vazbách, přes dva vodíkové můstky a jednu delší mezeru o délce $4 \text{ \AA}$ (cit. ⁷²).

V blízkosti drah publikovaných v Zhuravleva et. al⁷² se nachází Met-109 a Met-121. Met-121 se nachází přímo v aktivním centru. Všechny čtyři zbylé methioniny se pak nachází v relativní blízkosti aktivního centra (obr. 3.6).

Po inkorporaci azidohomoalaninu (kapitola 3.5) a nahrazení methioninu se do azurinu dostanou azidové skupiny. Met-121 nahradí Aha-121 a změnou ligandu koordinujícího měď v aktivním centru změní redoxní potenciál proteinu. V publikovaných výzkumech nahrazení methioninu jako ligandu mědi řadou

nepřirozených aminokyselin (difluoromethionin, trifluoromethionin, norleucin) změnilo redoxní potenciál proteinu v rozsahu 600 mV (cit. ⁴).

Tato záměna na pozici 121 může taky změnit rychlostní konstantu přenosu elektronu a trasu přenosu v okolí aktivního centra. Trasu přenosu kolem β -barelu azurinu⁷² může pak ovlivnit záměna na pozici 109.

V hydrofobním úseku azurinu se nacházejí aminokyseliny Met-44 a Met-64 (cit. ³). Nahrazení těchto aminokyselin může způsobit změnu interakce azurinu s jeho redoxními partnery.

Všechny methioniny azurinu kromě Met-121 mají boční řetězce na povrchu proteinu (obr.3.6). Po jejich nahrazení azidohomoalaninem by proto byly ideální na konjugační reakce s alkynty (CuAAC, SPAAC; kapitola 3.5).

Porovnání rychlostní konstanty přenosu elektronů a trasy intraproteinového transportu elektronů z azurinu obsahujícího azidohomoalanin a přirozené formy azurinu obsahující methionin může odhalit rozdíly. Ty mohou přispět ke hlubšímu pochopení mechanismů elektronových transportů a faktorů, které je ovlivňují. Jejich pochopení je jeden se „svatých grálů“ chemie 21. století⁸².

4. Cíle

1. Exprese nepřírozené kyseliny d_3 -methionin v rekombinantním bakteriálním proteinu azurinu v malém objemu média pro otestování míry inkorporace pomocí hmotnostní spektrometrie
2. Inkorporace nepřírozené aminokyseliny azidohomoalaninu do elektronového přenašeče azurinu v malém objemu média pro otestování metodiky produkce ve velkém objemu média a míry inkorporace pomocí SDS--PAGE a hmotnostní spektrometrie
3. Exprese azurinu s methioninem ve velkém objemu média a jeho izolace a purifikace jako kontrolní roztok k budoucím experimentům s azurinem obsahujícím azidohomoalanin
4. Charakterizace konečného preparátu koncentrátu azurinu

5. Materiál a metody

5.1 Chemikálie

Acetonitril (Merck)

Akrylamid (BioScience)

Ampicilin (Sigma. Roth)

L-azidohomoalanin hydrochlorid (Sigma-Aldrich)

Bis-akrylamid (BioScience)

Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva)

D₃-methionin (Sigma)

Deionizovaná voda

Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachner)

Ethylendiamíntetraacetát (Lachner)

4-ethylmorfolin (Sigma)

D-glukosa (Sigma)

L-fenylalanin (Sigma)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Penta)

Hydroxid draselný (Penta)

Chlorid draselný (Lachema)

Chlorid sodný (Fluka)

Chlorid amonný (Lachema)

Chlorid hořečnatý hexahydrát (Sigma)

Chlorid vápenatý dihydrát (Penta)

isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (Roth)

2-jodacetamid (Sigma)

L-isoleucin (Sigma)

Kit pro stanovení proteinů metodou BCA Pierce™ (ThermoFisher scientific)

Kyselina chlorovodíková 35 % (Penta)

Kyselina trifluorooctová (Fluka)
Kyselina octová (Penta)
L-leucin (Sigma)
L-lysin (Sigma)
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (Fluka)
Octan amonný (Lachema)
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BioRad)
Sacharosa (Penta)
Síran hořečnatý (Sigma)
Síran měďnatý pentahydrát (Lachema)
SP sepharosa (Sigma)
Tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid (Aldrich)
Thiamin hydrochlorid (Roth)
L-threonin (Sigma)
Trizma base (Sigma)
Trypsin (Promega)
Trypton (BioTech)
L-valin (Sigma)
Yeast extract (Biotech)

5.2 Biologický materiál

Bakterie *E. coli* B834

Plasmid kódující azurin a gen pro resistenci vůči ampicilinu
(dar od prof. RNDr. A. Vlček, Ph.D.)

5.3 Přístroje

Souprava na elektroforézu Bio Rad mini Protean II

Pipety a špičky Gilson, Eppendorf

Laboratorní předvážky Ohaus Scout™ Pro

Laboratorní váhy Ohaus Discovery

Spektrofotometr DeNovix DS-11+

Prosvětlovací pult Hama® LP 555

Centrifuga Hettich Zentrifugen Universal 320 R (úhlový motor 1620A)

Minicentrifuga Eppendorf minispin plus

Sušička Labconco CentriVap® micro IR

Čtečka destiček Multiskan bio (Thermo Scientific)

Inkubátor Ultimate Dry bath incubator (Clever Scientific)

Inkubátor IKA® KS4000 iControl

Sonikátor Bandelin Sonopuls, sonda KE-76

Sonikátor Hielscher UP100H

Peristaltická pumpa Gilson Minipuls Evolution

Vortexový mixér IKA MS1 Minisheker

Inkubátor Lovibond Liebherr FKS 1802

pH metr pH 7110 inoLab

5.4 Metody

5.4.1. Transformace kompetentních bakterií

Alikvot 100 μl kompetentních buněk *E. coli* B834 byl rozmražen na ledu. Objem byl rozdělen na dvě frakce o objemu 50 μl , z kterých jedna sloužila jako vzorek a druhá jako kontrolní suspenze. Do vzorku byl přidán 1 μl plasmidu (gen pro azurin, *P. aeruginosa*, s genem na rezistenci vůči ampicilinu) o koncentraci 73,60 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Do kontrolní suspenze byl přidán 1 μl deionizované vody.

Transformace byla provedena metodou teplotního šoku⁸³. Bakterie byly 20 minut ponechány na ledu a následně vystaveny teplotě 42 °C po dobu 90 sekund. Po vyjmutí byly na 3 minuty opět ponechány na ledu.

Do obou bakteriálních suspenzí bylo přidáno 0,5 ml SOC média (2% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 10 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ chlorid sodný; 2,5 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ chlorid draselný; 10 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ chlorid hořečnatý; 10 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ síran hořečnatý; 20 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ glukosa). Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C a 200 RPM.

Odebraný objem 0,5ml bakteriální suspenze byl centrifugován (4000 RPM, 4 min, mikrocentrifuga, rotor F-45-12-11, poloměr rotoru 6 cm). Peleta byla resuspendována v 100 μl PBS média. Z obou suspenzí bylo vyseto 50 μl na samostatné plotny s LB médiem (1% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 0,17 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ chlorid sodný, pH=7,7) obsahujícím 100 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ampicilinu.

Plotny byly inkubovány v závěsné poloze přes noc při teplotě 37 °C. Úspěšně transformované bakterie na vzorkové plotně byly uchovávány při teplotě 4 °C.

5.4.2. Expres rekombinantního proteinu se syntetickou aminokyselinou

Náhodně vybraná kolonie z plotny byla zaočkována do 40 ml LB média s 0,29 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ampicilinem a nechána v inkubátoru (37 °C, 200 RPM) přes noc. Na druhý den byla změřena optická hustota (OD_{600}).

Objem 25 ml čerstvého LB média s 0,29 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ampicilinem byl zaočkován z kultury inkubované přes noc na optickou hustotu 0,05. Kultura byla kultivována v inkubátoru (37 °C, 200 RPM) až do dosažení optické hustoty 0,6.

Vzorek byl následně centrifugován (H320R, úhlový rotor 1620A 8981 $\times$ g, 10 min 5000 RPM, 4 °C). Bakteriální peleta byla resuspendována v 10 ml vychlazeného

PBS média ($137\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ chlorid sodný, $2,7\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ chlorid draselný, $10\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ hydrogenfosforečnan disodný, $1,8\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ dihydrogenfosforečnan draselný, $\text{pH} = 7,4$) a centrifugována (H320R, úhlový rotor 1620A, $8981\times g$, 10 min, 5000 RPM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Resuspendace v PBS médiu a centrifugace byly opakovány 3x, přičemž supernatant byl po každém promytí odstraněn.

Následně byla peleta resuspendována v 25 ml MM-M9 média (kapitola 5.3.7) obsahujícího $0,29\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ampicilin. Do MM-M9 média byl přidán roztok d_3 -methioninu do finální koncentrace $10\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, respektive roztok azidohomoalaninu do koncentrace $8\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Expres proteinu byla indukována roztokem isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG) do koncentrace $0,5\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Po přidání všech reaktantů byla kultura umístěna do inkubátoru ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 180 RPM) a průběžně byly odebírány vzorky na elektroforézu a zpracovávány podle kapitol 5.4.5.2 a 5.4.6.

5.4.3. Expres a purifikace azurinu s methioninem

Do 25 ml LB média s $0,29\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ampicilem byla naočkována náhodně vybraná kolonie bakterií *E. coli* B834 transformovaných plasmidem obsahujícím gen pro azurin a gen pro ampicilinovou rezistenci.

Tato kultura byla přes noc inkubována za aerobních podmínek při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 RPM. Následně bylo do optické hustoty 0,05 zaočkováno 900 ml LB média s $0,29\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ampicilem. Protein byl po dosažení optické hustoty 0,6 indukován pomocí IPTG přidaného do koncentrace $0,5\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a následně exprimován po dobu 19 hodin v inkubátoru (30°C a 180 RPM).

Bakteriální suspenze byla centrifugována (H320R, úhlový rotor 1620A, $8981\times g$, 10 min, 5000 RPM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), bakterie byly resuspendovány do $0,58\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztoku sacharosy a po půlhodinové inkubaci na ledu byly centrifugovány (H320R, úhlový rotor 1620A, $8981\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5000 RPM 25 min). Bakteriální peleta byla následně resuspendována v $500\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztoku chloridu hořečnatého a homogenizována pomocí sonikační sondy (Sonikátor Bandelin Sonopuls, sonda KE-76, $3\times 20\text{s}$, 1 min pauza na ledu).

Homogenizát byl centrifugován (H320R, úhlový rotor 1620A, $8981\times g$, 10 min, 5000 RPM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) a resuspendován ve 40 ml $500\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztoku chloridu

hořečnatého. Jako pufr byl přidán roztok tris o $\text{pH} = 8,0$ do koncentrace 25 mmol.dm^{-3} . Roztok byl po kapkách titrován $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ roztokem síranu měďnatého do koncentrace $0,4 \text{ mmol.dm}^{-3}$.

Většina kontaminujících proteinů byla vysrážena snížením pH přidáním $0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$ roztoku octanu amonného po kapkách do koncentrace 30 mmol.dm^{-3} .

Roztok po srážení byl centrifugován (H320R, úhlový rotor 1620A, $8981 \times \text{g}$, 10 min, 5000 RPM, 4°C), peleta byla odstraněna a supernatant byl dialyzován proti 2 litrům 20 mmol.dm^{-3} octanu amonného při teplotě 32°C .

Dialyzovaný supernatant byl znovu centrifugován (H320R, úhlový rotor 1620A, $8981 \times \text{g}$, 10 min, 5000 RPM, 4°C), peleta byla odstraněna a supernatant byl nanášen na kolonu ($7 \times 0,8 \text{ cm}$, SP Sepharosa, objem nosiče 4 ml) pro FPLC chromatografii. Před nanášením vzorku byla kolona ekvilibrována deionizovanou vodou (60 ml , 1 ml.min^{-1}) a 10 mmol.dm^{-3} octanem amonným (60 ml , 1 ml.min^{-1}). Byl nanášen vzorek (40 ml , $0,7 \text{ ml.min}^{-1}$). Navázané proteiny byly z nosiče postupně uvolňovány krokovým gradientem octanu amonného. Nejdřív 10 mmol.dm^{-3} octanem amonným (40 ml , $0,7 \text{ ml.min}^{-1}$), pak 20 mmol.dm^{-3} octanem amonným (40 ml , $0,7 \text{ ml.min}^{-1}$). Azurin byl eluován 40 mmol.dm^{-3} . Sbírány byly frakce o objemu $1,5 \text{ ml}$.

Jednotlivé vzorky byly analyzovány pomocí elektroforézy na přítomnost kontaminujících proteinů podle postupu v kapitolách 5.4.5.2 a 5.4.6. Frakce obsahující nejvíce azurinu byly spojeny a zkoncentrovány přibližně 25x. Tento koncentrát byl dialyzován 2x24 hodin proti 2 litrům 20 mmol.dm^{-3} Tris, $\text{pH} = 7,4$.

Roztok byl pak znovu zkoncentrován ještě 5x. Finální preparát byl charakterizován podle kapitol 5.4.8 a 5.4.9. Byl rozdělen na alikvoty, zmražen v tekutém dusíku a uschován při teplotě -80°C .

5.4.4. Příprava minerálního média M9

Minerální médium M9 (MM-M9) se používá při inkorporaci nepřírodních aminokyselin do proteinů. Pro jeho přípravu bylo připraveno následujících devět roztoků:

5x koncentrovaný roztok **A**: 210mmol.dm⁻³ hydrogenfosforečnan disodný
110mmol.dm⁻³ dihydrogenfosforečnan draselný
90mmol.dm⁻³ chlorid amonný
43mmol.dm⁻³ chlorid sodný

200x koncentrovaný roztok **B**: 1mol.dm⁻³ síran hořečnatý

1000x koncentrovaný roztok **C**: 0,1mol.dm⁻³ chlorid vápenatý

1000x koncentrovaný roztok **D**: 80,6mmol.dm⁻³ EDTA
2,15mmol.dm⁻³ chlorid kobaltnatý
92,5mmol.dm⁻³ síran železnatý
1,56mmol.dm⁻³ síran zinečnatý
13,5mmol.dm⁻³ síran měďnatý
10,6mmol.dm⁻³ chlorid manganatý
1,62mmol.dm⁻³ kyselina boritá
pH=7,5

50x koncentrovaný roztok **E**: 1mol.dm⁻³ glukosa

100x koncentrovaný roztok **F**: 30mmol.dm⁻³ thiamin

10x koncentrovaný roztok **G**: 3,8mmol.dm⁻³ L-Ile
4,3mmol.dm⁻³ L-Val
3,8mmol.dm⁻³ L-Leu
6,8mmol.dm⁻³ L-Lys
6,1mmol.dm⁻³ L-Phe
8,4mmol.dm⁻³ L-Thr.

50x koncentrovaný roztok **H**: 10mmol.dm⁻³ d₃-methionin, nebo
8mmol.dm⁻³ azidohomoalanin.

1000x koncentrovaný roztok **I**: 0,29mmol.dm⁻³ ampicilin

Roztoky **A**, **B**, **C** byly sterilizovány autoklávováním

Roztoky **D**, **E**, **F**, **G**, **H**, **I** byly sterilizovány filtrací přes 0,22μm filtr.

5.4.5. Zpracování vzorku na elektroforézu

5.4.5.1. Vzorek z bakteriální kultury

Z růstového média bylo odebráno 0,5 ml bakteriální suspenze. Vzorek byl centrifugován (2 min, 14500 RPM, mikrocentrifuga, rotor F-45-12-11, poloměr rotoru 6 cm) a resuspendován v 40 μ l deionizované vody a 10 μ l 5 $\times$ koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru (10% (w/v) SDS, 20% (w/v) glycerol, 0,25% (w/v) bromfenolová modř, 10% (w/v) 2-merkaptoethanol, 30mmol.dm⁻³ Tris-Cl, pH = 6,8). Vzorky byly po centrifugaci a přidání pufru zamrazeny. Po rozmražení v sonikační lázni byly homogenizovány sonikační sondou (Hielscher UP100H, 30 W, 10 s). Vzorky byly inkubovány při 95 °C po dobu 5 minut v suché lázni s následnou krátkou centrifugací (14500 RPM, 10 s, mikrocentrifuga, rotor F-45-12-11, poloměr rotoru 6 cm)

5.4.5.2. Vzorek z purifikace proteinu / chromatografické frakce

Ze suspenze byly odebrány vzorky po 10 μ l. Ke vzorkům bylo přidáno 10 μ l deionizované vody a 5 μ l stejného koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru. Vzorky byly následně inkubovány při teplotě 95 °C po dobu 5 minut s následnou krátkou centrifugací (14500 RPM, 10 s, mikrocentrifuga, rotor F-45-12-11, poloměr rotoru 6 cm).

5.4.6. Elektroforéza

Gely pro diskontinuální SDS-PAGE (5% zaostřovací gel 15% a dělicí gel), byly připraveny podle tab. 5.1. Dělicí gel byl připraven a vpraven do aparatury jako první. Po ztuhnutí byl nalitý zaostřovací gel, do kterého byl vložen „hřeben“ pro vytvoření jamek pro vzorky. Oba gely byly nality okamžitě po přidání roztoku peroxodisíranu amonného.

Tabulka 5.1 Objemy složek pro přípravu gelů na SDS-PAGE elektroforézu

Složka	15% dělicí gel	5% zaostřovací gel
	Pipetovaný objem (ml)	
dH ₂ O	1,1	1,4
28% (w/v) Akrylamid + 2% bis-akrylamid	2,5	0,33
1,5mol.dm ⁻³ Tris (pH 8,8)	1,3	-
1,0mol.dm ⁻³ Tris (pH 6,8)	-	0,25
10% (w/v) SDS	0,05	0,02
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin	0,004	0,004
10% (w/v) peroxodisíran amonný	0,05	0,02

Z každého vzorku bylo do jamek pipetováno 20 μ l. Do prázdných jamek bylo pipetováno 5 μ l koncentrovaného vzorkového redukujícího pufru (10% (w/v) SDS, 20% (w/v) glycerol, 30mmol.dm⁻³ 0,25% (w/v) bromfenolová modř, 10% (w/v) 2-merkptoethanol, 30mmol.dm⁻³ Tris-Cl, pH = 6,8). Do jamek pro standard molekulových hmotností byly pipetovány dva mikrolitry standardu. Zdroj byl nastaven na limitní proud 200 V a limitní napětí 20 mA na gel.

Gel byl obarven v barvicí lázni (50% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová, 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250) a následně odbarvován do odbarvení pozadí (35% (v/v) methanol, 10 % (v/v) kyselina octová). Po odbarvení pozadí byl gel ponechán na delší uskladnění v roztoku 1% kyseliny octové v temnu při 4 °C.

5.4.7. Příprava vzorků na hmotnostní spektrometrii

Elektroforetický gel byl máčen 10 minut v deionizované vodě. Proteinové zóny obsahující analyzovaný protein byly opatrně vyřezány skalpelem, rozřezány na kostičky o hraně přibližně 0,5 mm a umístěny do samostatných mikrozkušavek.

Každý vzorek byl opakovaně sonikován ve vodní lázni ve směsi 100 μl ethylmorfolinového pufru (100mmol.dm⁻³ ethylmorfolin, pH = 8,1) a 100 μl 100% acetonitrilu (ACN) do odbarvení.

Po odbarvení byly vzorky promyty 100 μl ACN. Ve vzorcích byly disulfidové můstky redukovány po dobu 20 minut při teplotě 70 °C v 100 μl roztoku 30mmol.dm⁻³ tris(2-karboxyethyl)fosfinu TCEP v 90mmol.dm⁻³ ethylmorfolinového pufru o pH = 8,1. Každý vzorek byl následně propláchnut 100 μl 100% ACN, a 100 μl 50% ACN.

Vzorky byly alkylovány v 60 μl 30mmol.dm⁻³ 2-jodacetamidu (IAA) v 90mmol.dm⁻³ ethylmorfolinového pufru o pH = 8,1. Alkylace probíhala ve tmě po dobu 1 hodiny. Zbytky TCEP a IAA byly odstraněny propláchnutím střídavě 100 μl ACN, vodou, ACN, vodou a 50% ACN. Následně byly vzorky vysušeny v sušičce Labconco CentriVap[®] micro IR.

Vzorky byly štěpeny roztokem trypsinu při teplotě 37 °C po dobu 16 hodin ve štěpícím pufru (50mmol.dm⁻³ ethylmorfolin, 10% ACN, pH = 8,1, 19 μl) s přídavkem 1 μl 5ng/ μl roztoku trypsinu. Štěpení bylo zastaveno přidáním 5 μl roztoku kyseliny trifluorooctové (0,5% TFA, 90% ACN). Vzorky byly analyzovány doc. RNDr. Miroslavem Šulcem Ph.D. pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

5.4.8. Spektrofotometrie

Všechna spektrofotometrická měření byla prováděna na spektrofotometru DeNovix DS-11+. Absorbance byla měřena v mikroobjemu o optické dráze 1 mm, kterou spektrofotometr automaticky přepočítává na ekvivalent optické dráhy o délce 1 cm. Výsledky pak byly vyhodnoceny pomocí Lambert-Beerova zákona:

$$A = l\epsilon c \quad (5.1)$$

kde A značí naměřenou absorbanci, l optickou dráhu, c koncentraci látky absorbující světlo a ϵ molární extinkční koeficient.

Azurin má na vlnové délce 625 nm extinkční koeficient $3500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (cit.⁸⁴). Čistotu extraktu azurinu možno zjistit z poměru A_{625}/A_{280} .⁸⁴ Tato hodnota se pro čistý roztok azurinu pohybuje kolem 0,50-0,60^{84,85}.

5.4.9. Stanovení proteinů pomocí metody bicinchoninové kyseliny

Stanovení proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny (BCA) je jednoduchá metoda na kvantifikaci proteinů v roztoku. Peptidové vazby redukují měďnaté ionty na měďné ionty, které v zásaditém prostředí tvoří s bicinchoninovou kyselinou barevný komplex s absorpčním maximem při 562nm.

Ve vzorcích s neznámou koncentrací proteinů se koncentrace kvantifikuje porovnáním se standardem – roztoky proteinu o známých koncentracích. Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno v duplikátech po 25 μl vhodně naředěného vzorku, standardu a vody (kontrola). Jako standard byl použitý roztok BSA o koncentraci 1; 0,75; 0,5 a 0,25 $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Ke 25 μl vzorku/standardu/vody bylo pipetováno 200 μl činidla. To bylo připraveno smícháním roztoku BCA 1 (roztok síranu měďnatého) s roztokem BCA 2 (roztok bicinchoninové kyseliny) v poměru 50:1. Destička byla pak inkubována při 37°C po dobu 30 minut. Po inkubaci byla změřena absorbance při 562 nm na čtečce Multiskan Bio (Thermo Scientific). Pomocí získaných dat byla z roztoků standardu BSA sestavená kalibrační přímka. Z ní byla stanovena koncentrace proteinů ve vzorcích.

6. Výsledky

Celkem byly provedeny 3 exprese azurinu. Ve dvou byl azurin exprimován pro zjištění míry inkorporace syntetických aminokyselin (d_3 -methionin a azidohomoalanin). Protein byl taky exprimován s methioninem a následně z bakteriální suspenze izolován.

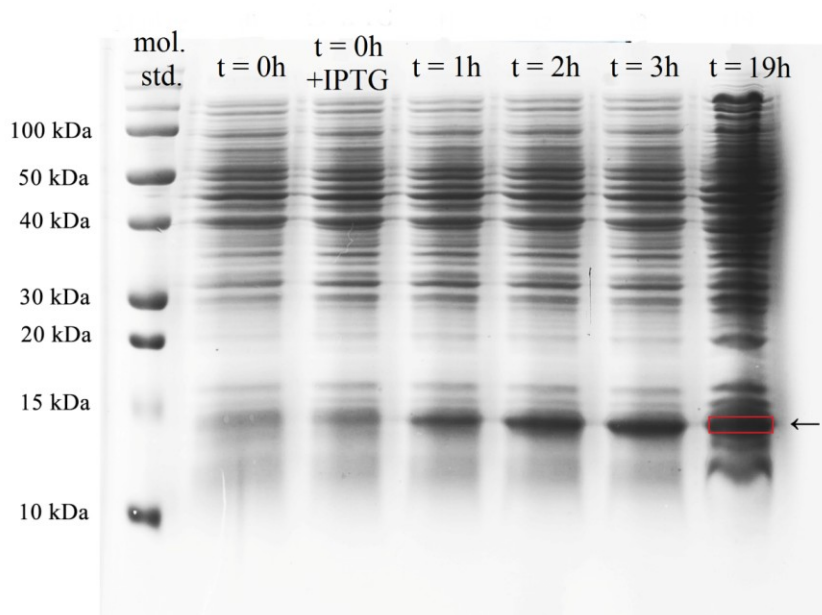
6.1 Transformace kompetentních buněk

Buňky *E. coli* B834 byly úspěšně transformovány plasmidem nesoucí gen pro azurin a gen na resistenci vůči ampicilinu. Na plotně s LB médiem obsahujícím ampicilin s koncentrací $0,29\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ byl po 24 hodinách inkubace při 37°C pozorován nárůst cca. 100 bakteriálních kolonií. Na plotně bez přidaného plasmidu nebyla přítomna žádná kolonie.

6.2 Exprese azurinu s d_3 -methioninem

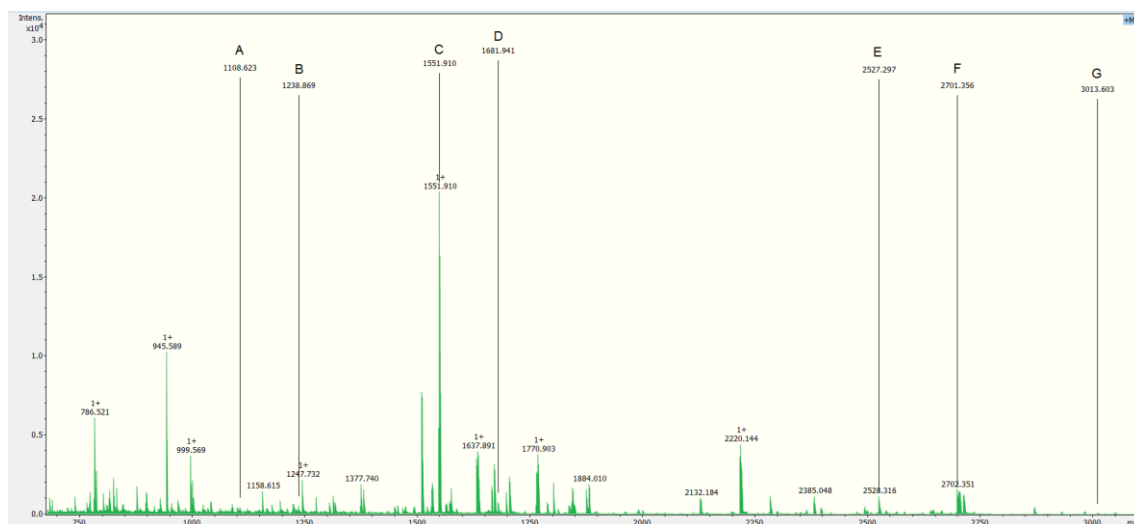
Náhodně vybraná kolonie z plotny transformovaných bakterií byla kultivována v kapalném LB médiu obsahujícím ampicilin s koncentrací $0,29\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ do optické hustoty 0,8. Sedimentované bakterie byly 3x promyty PBS médiem a přeneseny do MM-M9 obsahujícího ampicilin s koncentrací $0,29\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a d_3 -methionin o koncentraci $10\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Byla indukována exprese azurinu podle postupu popsáno v kapitole 5.3.2. Průběžně byly odebírány vzorky bakteriální suspenze, které byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Exprese byla ukončena po 19 hodinách. Bakterie byly sedimentovány a uchovány v 4°C .

Vzorky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE podle kapitol 5.4.5.1 a 5.4.6. Na elektroforeogramu (Obr. 6.1, str. 42) je možné pozorovat s časem narůstající intenzitu pásu relativní pohyblivosti odpovídající azurinu (šipka doleva).



Obr. 6.1 Elektroforeogram exprese azurinu s d_3 -methioninem, SDS-PAGE, 15% polyakrylamidový gel barvený CBBR-250, mol std. – standard molekulových hmotností, $t = 0$ h – IPTG vzorek před indukcí, $t = 0 - 19$ h – vzorky odebírány během exprese, šipka značí zónu elektroforetické pohyblivosti odpovídající azurinu, červený obdélník značí přibližnou oblast vyřezanou z gelu na zpracování pro hmotnostní spektrometrii

Elektroforetická zóna obsahující azurin byla zpracována podle postupu v kapitole 5.4.7. MALDI-TOF analýzu vzniklých tryptických štepů provedl doc. RNDr. Miroslav Šulc Ph.D.



Obr. 6.2 MALDI-TOF hmotnostní spektrum zóny obsahující azurin po 19 hodinách exprese.

Tabulka 6.1 Peptidy azurinu přítomné v hmotnostním spektru a sekvence aminokyselin azurinu, z kterých pozůstávají

Peptid	A	B	C	D	E	F	G
Sekvence azurinu	71 – 79	93 – 103	28 – 41	86 – 101	102 – 122	1 – 24	42 – 70

Obr. 6.2 (str. 42) obsahuje spektrum získané z MALDI-ToF analýzy. Jak je patrné už z elektroforeogramu, jedná se o směsné spektrum. Podařilo se najít několik signálů odpovídajícím azurinu (tab. 6.1), čím jsme potvrdili identitu proteinu ve vyřezané zóně. Ostatní signály pochází pravděpodobně od kontaminace keratinem během přípravy vzorku a od neznámého proteinu, který měl podobnou mobilitu na elektroforetickém gelu. Některé signály mohou taky reprezentovat produkty samoštěpení trypsinu.

¹AECSVDIQGND**Q**MQFNTNAITVDK**S**CKQFTVNL**S**HPGNLPKNV**M**GHNWVLSTAAD
MQGVVTDG**M**ASGLDKDYLPDDSRVIAHTKLIGSGEKDSVTFDVSKLKEGEQY**M**FFCTF
 PGHSAL**M**KGTLTLK¹²⁸

V předchozím odstavci je sekvence aminokyselin azurinu. Modře jsou vyznačeny úseky odpovídající peptidům nalezeným ve hmotnostním spektru. Pozice pro methionin jsou označeny tučným písmem.

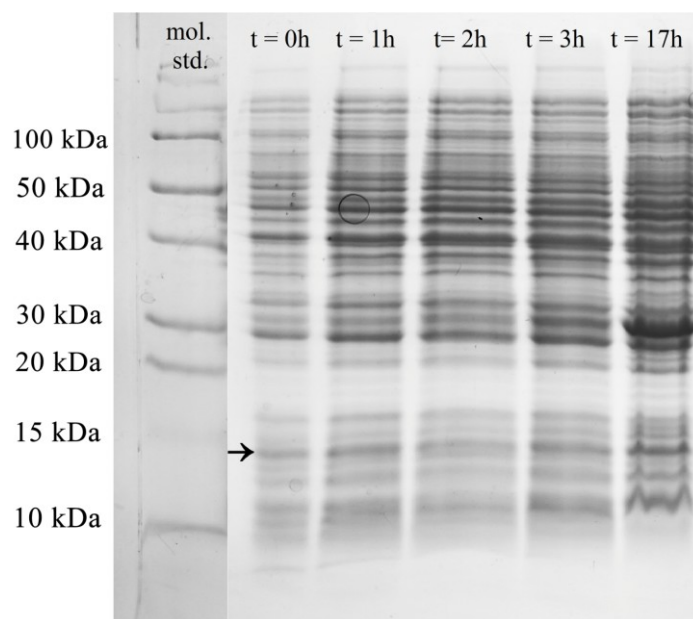
Málo intenzivní signály nalezených peptidů ukazují všechny pozice pro methionin zaplněny d₃-methioninem. Svědčí o tom nárůst hmotnosti peptidu přibližně o tři atomové hmotnostní jednotky za každý d₃-methionin, který peptid obsahuje (tab. 6.2, str. 44). Signály odpovídající peptidům obsahujícím methionin nebyly nalezeny. Nalezené peptidy obsahovali 88 % aminokyselin ze sekvence proteinu (113 ze 128), přičemž pokrývají všechny pozice pro methionin v azurinu. Z toho vyplývá, že míra inkorporace d₃-methioninu do azurinu byla 100 %.

Tabulka 6.2 porovnání poměru hmotnosti a náboje některých peptidů obsahujících d3-methionin nalezených ve spektru z hmotnostní spektrometrie s peptidy obsahujícími methionin.

Peptid	m/z peptidu obsahujícího methionin	m/z peptidu ze spektra	Rozdíl m/z	Počet pozicí pro methionin
E	2521,171	2527,297	6,126	2
F	2698,208	2701,356	3,148	1
G	3004,396	3013,603	9,207	3

6.3 Exprese azurinu s azidohomoalaninem

Analogicky jako v kapitole 6.2 byla sledována exprese azurinu s azidohomoalaninem. pomocí hmotnostní spektrofotometrie byla zjišťována úspěšnost inkorporace. Sesbírané vzorky byly zpracovány elektroforeticky (Obr. 6.3) podle postupu v kapitolách 5.4.5.2 a 5.4.6.



Obr. 6.3 Elektroforeogram exprese azurinu s azidohomoalaninem, SDS-PAGE, 15% polyakrylamidový gel barvený CBBR-250, mol. std. – standard molekulových hmotností, t = 0 – 19 h – vzorky odebrány během exprese, šipka značí zónu elektroforetické pohyblivosti odpovídající azurinu, červený obdélník značí přibližnou oblast vyřezanou z gelu na zpracování pro hmotnostní spektrometrii

Na elektroforeogramu (obr. 6.3, str. 44) je patrný menší nárůst biomasy v prostředí s azidohomoalaninem v porovnání s prostředím obsahujícím d3-methionin (obr. 6.1, str. 42). Toto zjištění je nejvíc patrné na dráhách z ukončení exprese (porovnání obr. 6.3, str. 44, $t = 17$ h a obr. 6.1, str. 42, $t = 19$ h). Elektroforetické zóny odpovídající azurinu jsou velmi slabé. Na vybrané zóně z dráhy vzorku odebraném po 17 hodinách byla provedena MALDI-TOF analýza doc. RNDr. Miroslavem Šulcem Ph.D. Z ní se ale nepodařilo určit míru inkorporace azidohomoalaninu.

6.4 Exprese, izolace a purifikace azurinu s methioninem

Azurin byl exprimován, izolován a zkoncentrován podle postupu v kapitole 5.4.3. v 900 ml LB média s ampicilinem o koncentraci $0,29\text{mmol.dm}^{-3}$ v šesti erlenmayerových bankách. Na rozdíl od dvou předchozích expresí neproběhla výměna média. Protein byl exprimován s methioninem. Po indukci pomocí IPTG byly bakteriální kultury ponechány v inkubátoru ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 180 RPM). Po 18 hodinách byla exprese ukončena.

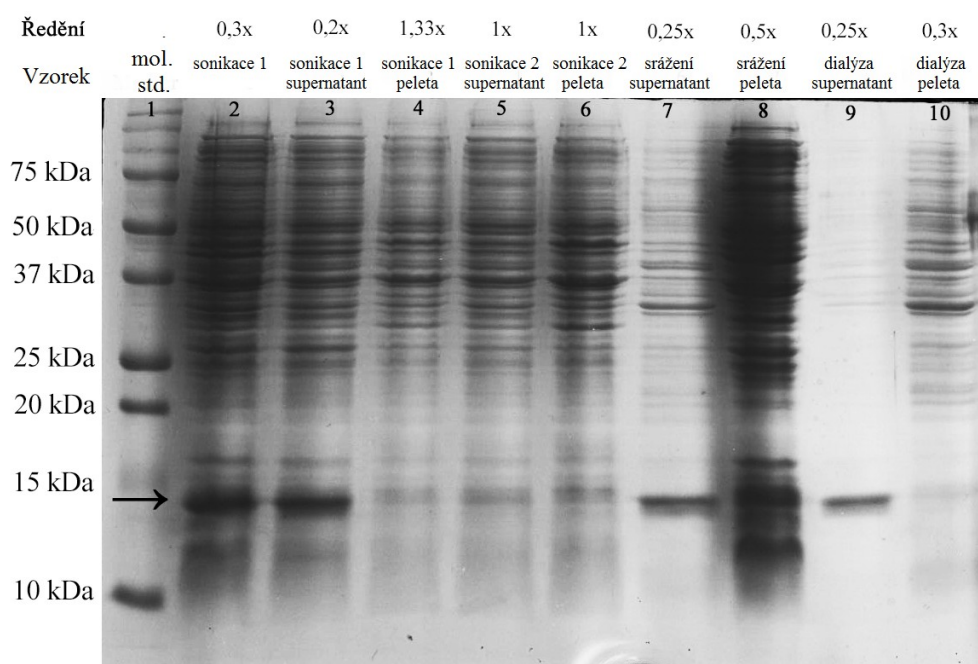
Bakteriální kolonie byly centrifugovány (H320R, úhlový rotor 1620A, $8981\times g$, 25 min, 5000 RPM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) a namodralá peleta byla resuspendována v $0,58\text{mol.dm}^{-3}$ roztoku sacharosy. Resuspendace v hypertonickém prostředí sloužila k rozrušení bakteriálních membrán. Společně s následným zmražením na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, rozmražením a resuspendací v hypotonickém roztoku ($20\text{ ml } 500\mu\text{mol.dm}^{-3}$ chloridu hořečnatého) napomohla uvolnění bakteriálních proteinů, včetně azurinu, do roztoku.

Homogenizace buněk byla následně vykonána pomocí sondační sondy (Sonikátor Bandelin Sonopuls, sonda KE-76, $3\times 30\text{ s}$, pauza 1 min na ledu). Suspenze byla centrifugována (H320R, úhlový rotor 1620A, $8981\times g$, 10 min, 5000 RPM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Po centrifugaci vykazovala peleta jemně modré zbarvení. To naznačovalo, že ne všechny azurin byl z bakterií odstraněn, proto byla peleta resuspendována v $10\text{ ml } 500\mu\text{M}$ chloridu hořečnatého. Vzniklá suspenze byla znovu homogenizována (Sonikátor Bandelin Sonopuls, sonda KE-76, $6\times 10\text{ s}$, pauza 1 min na ledu). Druhý homogenizát byl centrifugován stejně jako první, peleta byla odstraněna a supernatanty z obou sonikací byly spojeny.

Roztok byl titrován $0,1\text{mol.dm}^{-3}$ síranu měďnatého do koncentrace 4 mmol.dm^{-3} a srážen roztokem $0,5\text{mol.dm}^{-3}$ octanu amonného o $\text{pH} = 4,5$ do koncentrace 30 mmol.dm^{-3} . Oba roztoky byly přidávány po kapkách kvůli omezení lokálních podmínek s příliš nízkým pH a vysokou iontovou silou. Zakalený roztok byl centrifugován (H320R, úhlový rotor 1620A, $8981\times\text{ g}$, 10 min, 5000 RPM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Supernatant byl použit na dialýzu, peleta byla odstraněna. Po 24-hodinové dialýze byla suspenze opět centrifugována (H320R, úhlový rotor 1620A, $8981\times\text{ g}$, 10 min, 5000 RPM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Peleta byla odstraněna, supernatant byl nanášen na chromatografickou kolonu.

Během izolace byly odebírány vzorky na elektroforetickou analýzu. Ty byly zpracovány podle kapitol 5.4.5.2 a 5.4.6. Průběh izolace shrnuje elektroforeogram na obrázku 6.4.



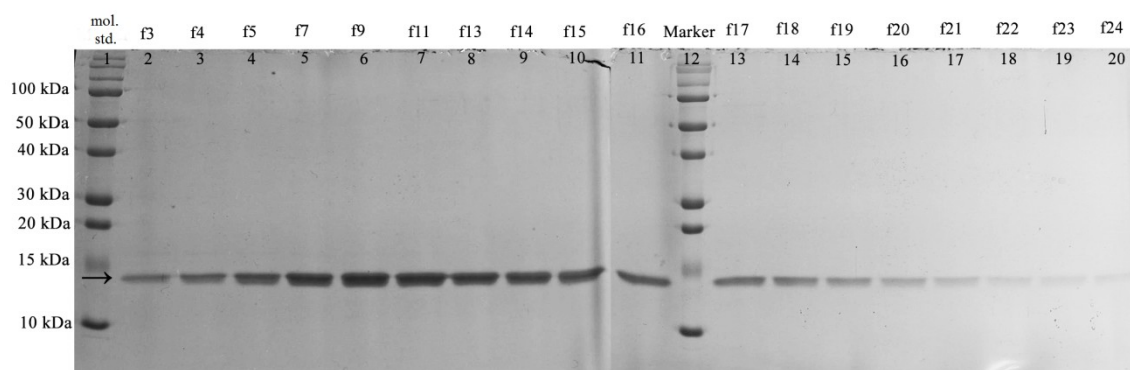
Obr. 6.4 Elektroforeogram postupu purifikace azurinu s methioninem, SDS-PAGE, 15% polyakrylamidový gel barvený CBBR-250, mol std. – standard molekulových hmotností, sonikace 1 – roztok bezprostředně po první sonikaci, další vzorky popsány buď jako resuspendovaná peleta nebo jako supernatant, obojí po psaném kroku purifikace, šipka značí zónu elektroforetické pohyblivosti odpovídající azurinu, ředění vzorek relativně ke vzorci „sonikace 2 supernatant“, odebráno 0,1% vzorku (10 μl) a zpracováno podle kapitol 5.4.5.2 a 5.4.6.

Intenzita zabarvení elektroforetických zón odpovídající azurinu (Obr. 6.4), odpovídá jeho množství v jednotlivých krocích izolace. Porovnáním vzorků z roztoku po první sonikaci (dráha č. 1) a supernatantu z první sonikace (dráha č. 2) je možno pozorovat téměř kvantitativní uvolnění azurinu do roztoku. V dráhách č. 4, 5 a 6 azurin přítomen

není a druhá sonikace byla patrně zbytečná. V dráhách č. 4 a 6 jsou první odstraněné proteinové kontaminanty.

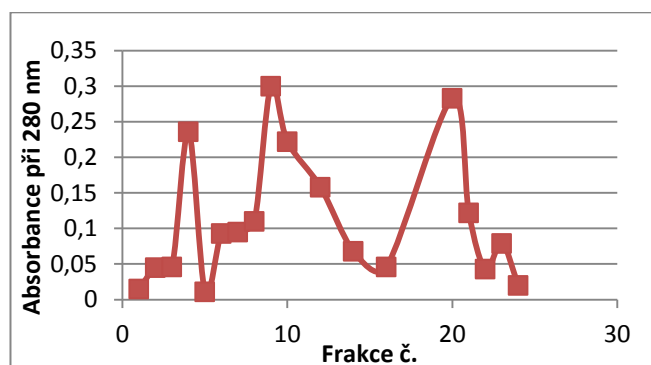
Po srážení proteinu je možno pozorovat výrazné vyčištění supernatantu od kontaminujících proteinů. Tímto krokem jsme přišli o nemalé množství azurinu (dráha č. 8), ale získali jsme tím poměrně čistou frakci (dráha č. 7), která byla následně ještě dočištěna dialýzou. Valná většina kontaminujících proteinů se při tomto kroku vysrážela (dráha č. 10). Supernatant obsahující už téměř čistý azurin (dráha č.9) byl pak nanášen na chromatografickou kolonu.

FPLC chromatografie proběhla podle popisu v kapitole 5.4.3. Kolona (7×0,8 cm, SP Sepharosa, objem nosiče 4 ml) byla nejdříve ekvilibrována deionizovanou vodou (60 ml, 1 ml.min⁻¹) a 10mmol.dm⁻³ octanem amonným (60 ml, 1 ml.min⁻¹). Následně byl nanášen vzorek (40 ml, 0,7 ml.min⁻¹). Azurin byl na koloně viditelný jako intenzivně modrý pás. Proteiny byly z kolony eluovány krokovým gradientem octanu amonného. Nejdříve 10mmol.dm⁻³ octanem amonným (40 ml, 0,7 ml.min⁻¹), pak 20mmol.dm⁻³ octanem amonným (40 ml, 0,7 ml.min⁻¹). Azurin byl eluován 40mmol.dm⁻³ octanem amonným (40 ml, 0,7 ml.min⁻¹). Bylo sesbíráno 24 modře zabarvených frakcí po 1,5 ml. Z hraničních frakcí a z každé druhé střední frakce byly odebrány vzorky. Ty byly elektroforeticky zpracovány podle kapitol 5.4.5.2 a 5.3.6. Elektroforeogram z jejich zpracování je na obrázku 6.5.



Obr. 6.5 Elektroforeogram eluovaných chromatografických frakcí během izolace azurinu s methioninem, SDS-PAGE, 15% polyakrylamidový gel barvený CBBR-250, mol. std. – standard molekulových hmotností, fn značí číslo frakce, z které byl vzorek odebrán, šipka značí zónu elektroforetické pohyblivosti odpovídající azurinu, zpracováno podle kapitol 5.4.5.2 a 5.4.6.

Obarvené gely (Obr. 6.5, str. 47) byly vizuálně vyhodnoceny na přítomnost kontaminujících proteinů. Nebyl nalezen žádný proteinový kontaminant. Frakce byly taky analyzovány spektrofotometricky (Obr. 6.6).



Obr. 6.6 Chromatogram eluovaných frakcí azurinu.

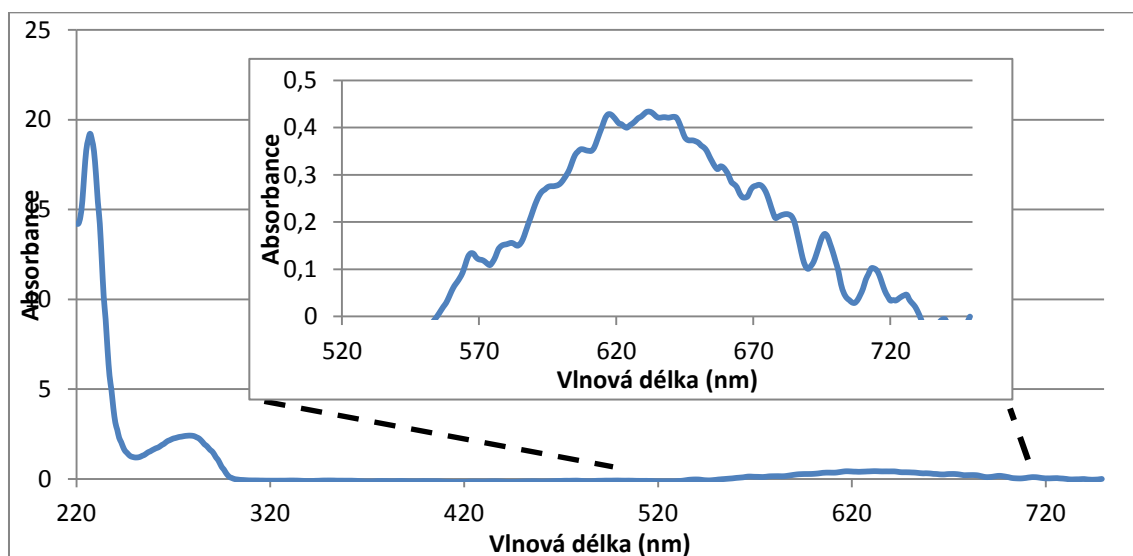
Signál kolem desáté frakce patří azurinu. Abnormálně vysoký signál frakce 4 byl důvodem jejího odstranění. Důvod signálu kolem frakce 20 není znám. Je možné, že šlo o protein eluovaný po azurinu. Na elektroforeogramu frakcí (obr. 6.5, str. 47) ale není možné pozorovat žádný kontaminant. Ten by musel mít stejnou mobilitu na elektroforetickém gelu (obr. 6.5, str. 47), což je velice nepravděpodobné. Myslíme si, že šlo o kontaminaci přístroje.

Kvůli měření v mikroobjemu a nízké koncentraci proteinu byla měření použita jen pro odstranění frakce f4. Frakce f5 až f21 byly na základě těchto analýz spojeny. Eluáty z nanášení azurinu a z promývání kolony nebyly analyzovány kvůli absenci modrého zabarvení roztoku, indikujícího žádné nebo minimální množství azurinu.

Výrazně obohacený preparát byl zakoncentrován pomocí molekulárních filtrů Amicon Ultra 4 asi 25x, na objem přibližně 1 ml. Po dvojnásobné dialýze proti roztoku Tris byl roztok ještě 5x zakoncentrován. Konečný objem intenzívně modrého roztoku azurinu byl přibližně 200 µl.

6.4.1. Charakterizace konečného preparátu

Konečný koncentrát azurinu byl měřen spektrofotometricky (kapitola 5.4.8) v několika ředěních. Data jsou zobrazeny v obr. 6.7.



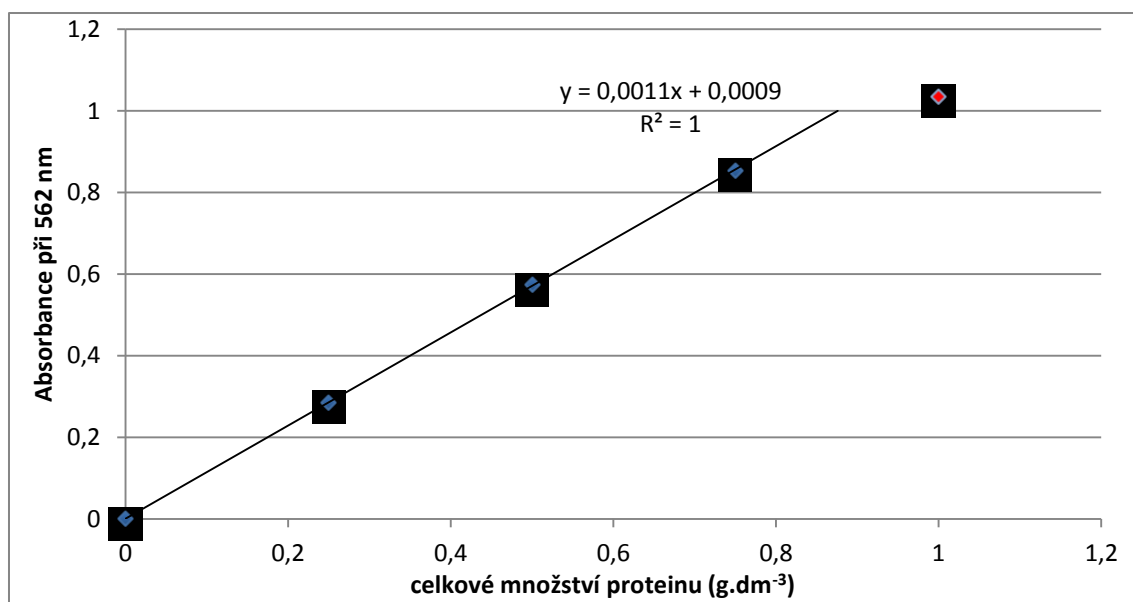
Obr 6.7 UV-Vis spektrum 10x ředkoncentrátu azurinu, ve grafu je detailněji ukázána část spektra kolem absorpčního maxima charakteristického pro azurin (625 nm),

Roztoky byly měřeny v mikroobjemu. Pro klasické měření v kyvetě by se musel roztok obsahující azurin více naředit, spotřebovalo by se tak velké množství vzorku. Viditelný šum v spektru preparátu proteinu je způsoben právě měřením v mikroobjemu. Absorbance kolem vlnové délky 625 nm (Obr 6.7) je charakteristická pro azurin.

Koncentrace azurinu v konečném preparátu na základě absorbance při 625 nm byla **16,07 g.dm⁻³**. Celkové množství azurinu v získaném preparátu (objem 200 μ l) bylo **3,2 g (231,4nmol)**, což odpovídá výtěžku 3,5 g na liter použitého média.

Bylo možné odhadnout i čistotu preparátu, a to poměrem hodnot absorbancí při 625 nm a 280 nm. Tenhle poměr byl určen na hodnotu **0,17**. Ta se poměrně hodně liší od teoretických 0,5-0,6 (cit.^{84,85}). Myslíme si, že rozdíl může být způsoben nedostatečným nasycením mědi, nebo nízkomolekulárními kontaminanty.

Pro charakterizaci průběhů izolace není spektrofotometrie vhodnou metodou. Proto byly konečný koncentrát azurinu i vzorky z čištění proteinu charakterizovány pomocí metody bicinchoninové kyseliny (BCA). Po sestrojení kalibrační přímky (obr. 6.8, str. 50) byly určeny koncentrace proteinů v některých bodech izolace (kapitola 6.4) a taky koncentrace azurinu v konečném preparátu (tab. 6.3, str. 50).



Obr. 6.8 Kalibrační závislost BSA na absorbanci při 562 nm. Nejvyšší bod (červený) byl mimo lineární závislost Lambert-Beerova zákona, proto byl maskován.

Tab. 6.3 naměřené absorbance, ředění a celkové množství proteinů v různých krocích izolace určeno metodou BCA

Vzorek (Ředění)	Roztok po po 1. sonikaci (5x)	Supernatant po 1. sonikaci (5x)	Peleta po 1. sonikaci (10x)	Peleta po srážení proteinů (25x)	Peleta po dialýze (5x)	Konečný preparát azurinu (100x)
Objem frakce (ml)	30	30	10	15	15	0,2
Absorbance při 562 nm	0,766 ±0,051	0,679 ±0,018	0,873 ±0,097	0,357 ±0,011	0,394 ±0,039	0,051 ±0,031
Celkové množství proteinu (mg)	173,9±3,2	92,40±0,69	79,28±2,48	96,98±0,21	26,80±0,74	0,91 ±0,55

Tabulka 6.3 ukazuje získané údaje z určení proteinů pomocí BCA. Celkové množství proteinu po první sonikaci bylo 173,9±3,2 mg. Toto množství bylo centrifugací rozděleno na peletu, obsahující 79,28±2,48 mg a na supernatant, obsahující 92,40±0,69 mg proteinů. Po spojení se supernatantem z druhé sonikace byl roztok srážen, přičemž sraženo bylo 96,98±0,21 mg proteinů. Dále bylo sraženo 26,80±0,74 mg proteinů během dialýzy. Tyto hodnoty zhruba korespondují s elektroforeogramem (obr. 6.4, str. 46). Supernatant ani peleta z druhé sonikace nebyly analyzovány. Celkové množství proteinu v preparátu azurinu bylo **0,91±0,55 mg**. Naměřená hodnota se od hodnoty získané spektrofotometrií liší, což může být

způsobeno špatným ředěním nebo podstatné nedokonalosti metody BCA – kvantifikací proteinu použitím jiného proteinu, v našem případě BSA.

7. Diskuze

Nepřirozené kyseliny d₃-methionin a azidohomoalanin jsou isosterické s methioninem⁶⁰. Při nepřítomnosti methioninu je methionyl-tRNA synthetasa dokáže vázat na tRNA a jsou inkorporovány do proteinů místo methioninu.

Auxotrofní bakterie *E. coli* B834 byly kultivovány v limitním médiu neobsahujícím methionin (MM-M9) s d₃-methioninem pro otestování míry inkorporace do bakteriálního proteinu azurinu. d₃-methionin se od methioninu liší jen třemi atomy deuteria na methylové skupině. Díky těmto vlastnostem je ideální značkou pro analýzu inkorporace do proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie⁴³.

Paralelně byl za stejných podmínek exprimován azurin v médiu obsahující azidohomoalanin místo d₃-methioninu. Exprese byla provedena pro otestování metodiky inkorporace azidohomoalaninu do bakteriálního proteinu azurinu. Azidohomoalanin obsahuje místo thioetheru methioninu azidovou skupinu, která po inkorporaci aminokyseliny do proteinů poskytuje možnosti unikátních biokonjugačních reakcí⁵². V případě azurinu taky nahradí methionin jako koordinační ligand mědi v aktivním centru, čím by mohl změnit redoxní potenciál proteinu⁴ a potenciálně trasu pohybu elektronu přes protein a rychlostní konstantu jeho přenosu.

Bakteriální suspenze s methioninem nahrazeným d₃-methioninem vykazovala nárůst biomasy s časem (obr. 6.1, str. 42). Nárůst biomasy byl podobný jako při expresi s methioninem (nepublikována data). Zvyšování intenzity elektroforetické zóny je vidět hlavně v zóně azurinu, který buňka po indukci exprese pomocí IPTG začala ve velké míře produkovat. Bakteriální methionyl-tRNA synthetasa ligovala d₃-methionin s příslušnou tRNA. Nárůst biomasy s časem v elektroforeogramu exprese s azidohomoalaninem je ale mnohem méně výrazný. Exprese azurinu neprobíhala v takové míře jako s d₃-methioninem. Na elektroforeogramu (obr. 6.3, str. 44) je patrná elektroforetická zóna, která by mohla odpovídat azurinu. Mohlo se ale jednat o jiný protein produkovaný bakterií *E. coli* s mobilitou podobnou azurinu. Míra inkorporace obou syntetických aminokyselin v azurinu ve vzorku bakteriální suspenze byla

analyzována elektroforeticky a pomocí hmotnostní spektrometrie (analyzoval doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.).

Z MALDI-TOF analýzy elektroforetických zón azurinu bylo získáno hmotnostní spektrum (obr. 6.2, str. 42). Porovnání naměřených signálů s teoretickými hodnotami m/z peptidů ukázalo v případě exprese s d3-methioninem míru inkorporace 100 %. Proteinová sekvence azurinu byla pokryta z 88 %, přičemž pokrytá část obsahovala všech 6 pozicí pro methionin v azurinu. Spektrum ale obsahovalo mimo slabých signálů tryptických štěpů azurinu také autoštěpy trypsinu, štěpy keratinu a neznámých proteinů s podobnou elektroforetickou mobilitou jako azurin. Míra inkorporace koresponduje s literaturou^{87,89} a byla očekávána.

V případě exprese s azidohomoalaninem se hmotnostní spektrum z MALDI-TOF analýzy nepodařilo interpretovat a míra inkorporace do azurinu nebyla určena. Je možné, že azidová skupina azidohomoalaninu se po osvětlení MALDI-TOF laserem rozpadá, čímž se změní hodnoty m/z analyzovaných peptidů na neznámou hodnotu. Azurin se produkoval ve velmi malé míře. To odpovídá i elektroforeogramu (obr. 6.3, str. 44).

Pro odstranění kontaminujících proteinů v hmotnostním spektru zkusíme implementovat srážení proteinů snížením pH vzorky s následnou centrifugací a elektroforézou supernatantu. Supernatant se elektroforeticky zpracuje a zóna odpovídající azurinu se analyzuje na hmotnostním spektrometru. Na elektroforeogramu z čištění azurinu (obr. 6.4, str. 46) je patrné výrazné vyčištění zóny od kontaminujících proteinů po tomto kroku.

Během expresí azurinu nebo cytochromu b5 s foto-methioninem byly výtěžky proteinů vyšší^{7,8}. Metodika inkorporace azidohomoalaninu se proto musí otestovat znovu na azurinu, případně i na jiném proteinu. V případě opětovné nízké míry produkce se proces exprese bude muset optimalizovat. Po optimalizaci bude metoda použita na expresi a izolaci azurinu s azidohomoalaninem ve velkém množství média, který bude použit na studium rozdílů trasy přenosu elektronu a rychlostní konstanty jeho přenosu vůči azurinu obsahujícího methionin.

Azurin s metioninem byl ve velkém množství média exprimován podle mírně pozměněného postupu uvedeného v práci R. Tuzhilkina⁸⁸. Homogenizace bakterií

neproběhla metodou pulzů, nýbrž kontinuálním sonikováním po dobu 3x20 s. První dialýza neproběhla proti 10mmol.dm⁻³ octanu amonnému ale proti 20mmol.dm⁻³ octanu amonnému. Azurin se začal eluovat už při promývání chromatografické kolony 40mmol.dm⁻³ octanem amonným, na rozdíl od eluce 80 mmol.dm⁻³ octanem amonným uvedenou v práci. Tomohlo být způsobeno chybami v ředění pufru, nebo starým nosičem.

Průběh izolace byl sledován elektroforeticky (obr. 6.4, str. 46). Vzorky sesbírané z některých kroků izolace byly analyzovány metodou bicinchoninové kyseliny (tab. 6.3, str. 50). Intenzity obarvení pasů na elektroforeogramu v jednotlivých vzorcích si odpovídají se zjištěným množstvím proteinu pomocí metody BCA.

Izolací bylo získáno přibližně 200 µl intenzivně modrého roztoku proteinu. Množství získaného azurinu bylo určeno spektrofotometricky ($c = 16,07 \text{ mg.cm}^{-3}$, $m_{\text{az}} = 3,2 \text{ mg}$). Hodnota koresponduje s hodnotou $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ mg.cm}^{-1}$ média. Ta hodnota je oproti publikované hodnotě $12 \cdot 10^{-3} \text{ mg.cm}^{-1}$ v Karlsson et. al.⁹⁰ nižší. Celkové množství proteinu v preparátu bylo určeno metodou bicinchoninové kyseliny ($c_{\text{prot}} = 4,55 \pm 2,75 \text{ mg.cm}^{-3}$, $m_{\text{prot}} = 0,91 \pm 0,55 \text{ mg}$).

Výsledky z obou metod se řádově shodují. Spektrofotometrické měření je jednodušší a přesnější pro kvantitativní stanovení specifického proteinu. Při metodě BCA se protein kvantifikuje relativně k jinému proteinu, co může ovlivnit výsledky (možno ovlivnit vhodným vybráním standardu) a je velmi závislé na přesnosti pipetování. Proto předpokládám, že hodnota získaná pomocí spektrofotometrie lépe vypovídá o skutečném množství proteinu.

Spektrální čistota azurinu byla určena poměrem hodnot absorpance při 625nm a 280nm určena na hodnotu **0,17**. Od ideální hodnoty 0,5-0,6(cit.^{84,85}) se liší. Tuzhilkin⁸⁸ určil čistotu svého preparátu azurinu v LB médiu na hodnotu 0,36. Je možné, že naše nízká hodnota čistoty je způsobena neúplným nasycením azurinu mědi vedoucím k nižším hodnotám A_{625} . Během titrace proteinu před srážením bylo postupováno podle práce R. Tuzhilkina⁸⁸. V té byla uvedena titrace do nárůstu A_{241} proti A_{625} . V spektru našeho proteinu jsme ale při 625 nm zaznamenali jen zvyšování hodnoty pozadí, nebyl pozorován nárůst spektrálního vrcholu. Absorbance při 241 nm lineárně stoupala se zvyšující se koncentrací měďnatých iontů. Usoudili jsme proto, že protein je už nasycený a většího přídatku měďnatých iontů nebylo třeba.

Odchylka od spektrální čistoty může být taky způsobena přítomností látek zvyšujících absorpci při 280 nm. Elektroforeogram frakcí azurinu po eluci z chromatografické kolony (obr. 6.5, str. 47) neukázal přítomnost žádného kontaminujícího proteinu. Chromatogram frakcí ukazuje neobvykle vysoký signál kolem 20. frakce, ten je ale způsoben kontaminací přístroje (obr. 6.6, str. 48). Hodnota celkového množství proteinů v konečném preparátu byla metodou BCA určena na hodnotu nižší než množství azurinu určeno spektrofotometricky. Je proto jediné možná neproteinová kontaminace, kterou by metoda BCA nekvantifikovala a která absorbuje při 280 nm.

V literatuře je popsána oxidace Cys-112 v azurinu. Je to jeden z ligandů pro vazbu mědi. Oxidovaný azurin by ztratil možnost vázat měď v aktivním centru a tím by ztratil své absorpční maximum na vlnové délce 625 nm. Tato forma azurinu je označována azurin*. Poměr hodnot absorbancí při 625nm a 280nm je pro tento protein menší než 0,01(cit.⁸⁶). Časové okno, ve kterém mohl protein zoxidovat bylo ale velmi krátké. Zahrnovalo část postupu mezi sonikací a titrací suspenze, které trvalo asi hodinu. Do suspenze nebyly přidávány žádné oxidanty a nemyslíme si, že by množství rozpuštěný kyslíku v suspenzi stačilo pro oxidaci v takovém rozsahu. Jestli je ale tato hypotéza pravdivá, konečný preparát obsahuje směs azurinu a azurinu*.

Byla prozkoumána metodika inkorporace syntetických aminokyselin d₃-methioninu a azidohomoalaninu do bakteriálního proteinu azurinu vycházející z metodiky inkorporace foto-methioninu. Metodiku je nutno hlouběji otestovat a závést zásadnější změny. Pak bude možná produkce azurinu obsahující azidohomoalanin ve větším objemu média. Azurin byl taky exprimován s methioninem. Pak byl izolován a purifikován. Tento vzorek bude sloužit jako kontrola v experimentech s elektronovým přenosem azurinu s azidohomoalaninem.

8. Závěr

V rámci práce byla testována exprese azurinu v malém objemu média se dvěma nepřírodními aminokyselinami, d₃-methioninem a azidohomoalaninem postupem globálního nahrazení aminokyseliny. Výsledky z hmotnostní spektrometrie exprese azurinu s d₃-methioninem ukazují míru inkorporace 100 % na všechny pozice methioninu. Při expresi s azidohomoalaninem azurin nebyl produkován v dostatečném množství, aby bylo možné určit míru inkorporace pomocí hmotnostní spektrometrie. Metodika pro jeho inkorporaci musí být otestována.

Dále byl exprimován a purifikován azurin obsahující methionin ve velkém objemu média jako kontrolní preparát k budoucím experimentům s azurinem obsahujícím azidohomoalanin. Pomocí spektrofotometrie byla určena spektrální čistota (A_{625}/A_{280}) na hodnotu 0,17 a množství azurinu na hodnotu 3,5mg azurinu na litr použitého média. Pomocí metody BCA byla získána hodnota $1,01 \pm 0,61$ mg na litr použitého média.

9. Seznam literatury:

1. Farver, O. & Pecht, I. Electron transfer in blue copper proteins. *Coordination Chemistry Reviews* (2011) doi:10.1016/j.ccr.2010.08.005.
2. Fowler, N. J., Blanford, C. F., Warwicker, J. & de Visser, S. P. Prediction of Reduction Potentials of Copper Proteins with Continuum Electrostatics and Density Functional Theory. *Chem. - A Eur. J.* (2017) doi:10.1002/chem.201702901.
3. De Rienzo, F., Gabdouliline, R. R., Menziani, M. C. & Wade, R. C. Blue copper proteins: A comparative analysis of their molecular interaction properties. *Protein Sci.* (2000) doi:10.1110/ps.9.8.1439.
4. Wilson, T. D., Yu, Y. & Lu, Y. Understanding copper-thiolate containing electron transfer centers by incorporation of unnatural amino acids and the Cu A center into the type 1 copper protein azurin. *Coordination Chemistry Reviews* (2013) doi:10.1016/j.ccr.2012.06.015.
5. Slack, J. M. W. Molecular Biology of the Cell. in *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition* (2013). doi:10.1016/B978-0-12-398358-9.00007-0.
6. Wang, A., Winblade, N., Marelli, M. & Grabstei, K. Protein Engineering with Non-Natural Amino Acids. *Protein Eng.* (2012) doi:10.5772/28719.
7. Renata, P. *et al.* The application of an emerging technique for protein-protein interaction interface mapping: The combination of photo-initiated cross-linking protein nanoprobe with mass spectrometry. *Int. J. Mol. Sci.* (2014) doi:10.3390/ijms15069224.
8. Ječmen, T. *et al.* Photo-initiated crosslinking extends mapping of the protein-protein interface to membrane-embedded portions of cytochromes P450 2B4 and b5. *Methods* (2015) doi:10.1016/j.ymeth.2015.07.015.
9. Arcangeli, C., Bizzarri, A. R. & Cannistraro, S. Long-term molecular dynamics simulation of copper azurin: Structure, dynamics and functionality. *Biophys. Chem.* (1999) doi:10.1016/S0301-4622(99)00029-0.
10. Dommerholt, J., Rutjes, F. P. J. T. & van Delft, F. L. Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides. *Topics in Current Chemistry* (2016) doi:10.1007/s41061-016-0016-4.
11. Deniziak, M. A. & Barciszewski, J. Methionyl-tRNA synthetase. *Acta Biochimica Polonica* (2001) doi:10.18388/abp.2001_3919.
12. Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. & Moras, D. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* (1990) doi:10.1038/347203a0.
13. Yadavalli, S. S. & Ibba, M. Selection of tRNA charging quality control mechanisms that increase mistranslation of the genetic code. *Nucleic Acids Res.* (2013) doi:10.1093/nar/gks1240.

14. Saleh, A. M., Wilding, K. M., Calve, S., Bundy, B. C. & Kinzer-Ursem, T. L. Non-canonical amino acid labeling in proteomics and biotechnology. *Journal of Biological Engineering* (2019) doi:10.1186/s13036-019-0166-3.
15. Datta, D., Vaidehi, N., Zhang, D. & Goddard, W. A. Selectivity and specificity of substrate binding in methionyl-tRNA synthetase. *Protein Sci.* (2009) doi:10.1110/ps.04792204.
16. Jakubowski, H. Homocysteine editing, thioester chemistry, coenzyme a, and the origin of coded peptide synthesis. *Life* (2017) doi:10.3390/life7010006.
17. Serre, L. *et al.* How methionyl-tRNA synthetase creates its amino acid recognition pocket upon L-methionine binding. *J. Mol. Biol.* (2001) doi:10.1006/jmbi.2001.4408.
18. Kim, H. Y., Ghosh, G., Schulman, L. H., Brunie, S. & Jakubowski, H. The relationship between synthetic and editing functions of the active site of an aminoacyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1993) doi:10.1073/pnas.90.24.11553.
19. Tanrikulu, I. C., Schmitt, E., Mechulam, Y., Goddard, W. A. & Tirrell, D. A. Discovery of Escherichia coli methionyl-tRNA synthetase mutants for efficient labeling of proteins with azidonorleucine in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2009) doi:10.1073/pnas.0905735106.
20. Van Hest, J. C. M., Kiick, K. L. & Tirrell, D. A. Efficient incorporation of unsaturated methionine analogues into proteins in vivo. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 1282–1288 (2000).
21. Liu, J. L. *et al.* Use of LC/MS peptide mapping for characterization of isoforms in 15N-Labeled recombinant human leptin. *Tech. Protein Chem.* (1997) doi:10.1016/S1080-8914(97)80018-X.
22. Jakubowski, H. Translational incorporation of S-Nitrosohomocysteine into protein. *J. Biol. Chem.* (2000) doi:10.1074/jbc.C000280200.
23. Fersht, A. R. & Dingwall, C. An editing mechanism for the methionyl-tRNA synthetase in the selection of amino acids in protein synthesis. *Biochemistry* **18**, 1250–1256 (1979).
24. Noren, C. J., Anthony-Cahill, S. J., Griffith, M. C. & Schultz, P. G. A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science* (80-.). (1989) doi:10.1126/science.2649980.
25. Wang, L. & Schultz, P. G. A general approach for the generation of orthogonal tRNAs.pdf. *Chem. Biol.* **8**, 883–890 (2001).
26. Blattner, F. R. *et al.* The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science* (1997) doi:10.1126/science.277.5331.1453.
27. Smolskaya, S. & Andreev, Y. A. Site-specific incorporation of unnatural amino acids into escherichia coli recombinant protein: Methodology development and recent achievement. *Biomolecules* (2019) doi:10.3390/biom9070255.

28. Anderson, J. C. *et al.* An expanded genetic code with a functional quadruplet codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2004) doi:10.1073/pnas.0401517101.
29. Rackham, O. & Chin, J. W. A network of orthogonal ribosome-mrna pairs. *Nat. Chem. Biol.* (2005) doi:10.1038/nchembio719.
30. Piccirilli, J. A., Benner, S. A., Krauch, T., Moroney, S. E. & Benner, S. A. Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA extends the genetic alphabet. *Nature* (1990) doi:10.1038/343033a0.
31. Schweitzer, B. A. & Kool, E. T. Hydrophobic, Non-Hydrogen-Bonding Bases and Base Pairs in DNA. *J. Am. Chem. Soc.* (1995) doi:10.1021/ja00112a001.
32. Hilaire, M. R. *et al.* Blue fluorescent amino acid for biological spectroscopy and microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2017) doi:10.1073/pnas.1705586114.
33. Bacher, J. M. & Ellington, A. D. Selection and characterization of escherichia coli variants capable of growth on an otherwise toxic tryptophan analogue. *J. Bacteriol.* (2001) doi:10.1128/JB.183.18.5414-5425.2001.
34. Cellitti, S. E. *et al.* In vivo incorporation of unnatural amino acids to probe structure, dynamics, and ligand binding in a large protein by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* (2008) doi:10.1021/ja801602q.
35. Wang, L., Xie, J., Deniz, A. A. & Schultz, P. G. Unnatural amino acid mutagenesis of green fluorescent protein. *J. Org. Chem.* (2003) doi:10.1021/jo026570u.
36. Rodriguez, E. A., Lester, H. A. & Dougherty, D. A. In vivo incorporation of multiple unnatural amino acids through nonsense and frameshift suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 8650–8655 (2006).
37. Chin, J. W. *et al.* Addition of p-azido-L-phenylalanine to the genetic code of Escherichia coli. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9026–9027 (2002).
38. Ugwumba, I. N. *et al.* Improving a natural enzyme activity through incorporation of unnatural amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* (2011) doi:10.1021/ja106416g.
39. Rogerson, D. T. *et al.* Efficient genetic encoding of phosphoserine and its nonhydrolyzable analog. *Nat. Chem. Biol.* (2015) doi:10.1038/nchembio.1823.
40. Cui, Z. *et al.* Combining Sense and Nonsense Codon Reassignment for Site-Selective Protein Modification with Unnatural Amino Acids. *ACS Synth. Biol.* (2017) doi:10.1021/acssynbio.6b00245.
41. Roy, R., Hohng, S. & Ha, T. A practical guide to single-molecule FRET. *Nature Methods* (2008) doi:10.1038/nmeth.1208.
42. Summerer, D. *et al.* A genetically encoded fluorescent amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2006) doi:10.1073/pnas.0603965103.
43. Weaving, G., Rocks, B. F., Iversen, S. A. & Titheradge, M. A. Simultaneous quantitation of homocysteine, cysteine and methionine in plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann. Clin. Biochem.* (2006)

doi:10.1258/000456306778904605.

44. Zhang, J. *et al.* Small Unnatural Amino Acid Carried Raman Tag for Molecular Imaging of Genetically Targeted Proteins. *J. Phys. Chem. Lett.* (2018) doi:10.1021/acs.jpcclett.8b01991.
45. Reece, S. Y. & Seyedsayamdost, M. R. Long-range proton-coupled electron transfer in the Escherichia coli class Ia ribonucleotide reductase. *Essays in Biochemistry* (2017) doi:10.1042/EBC20160072.
46. Wright, T. H. *et al.* Posttranslational mutagenesis: A chemical strategy for exploring protein side-chain diversity. *Science* (80-.). **354**, (2016).
47. Yoder, N. C. & Kumar, K. Fluorinated amino acids in protein design and engineering. *Chem. Soc. Rev.* (2002) doi:10.1039/b201097f.
48. Hendrickson, W. A., Horton, J. R. & LeMaster, D. M. Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *EMBO J.* (1990) doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb08287.x.
49. Hinz, F. I., Dieterich, D. C., Tirrell, D. A. & Schuman, E. M. Noncanonical amino acid labeling in vivo to visualize and affinity purify newly synthesized proteins in larval zebrafish. *ACS Chem. Neurosci.* (2012) doi:10.1021/cn2000876.
50. Landgraf, P., Antileo, E. R., Schuman, E. M. & Dieterich, D. C. BONCAT: Metabolic labeling, click chemistry, and affinity purification of newly synthesized proteomes. *Methods Mol. Biol.* (2015) doi:10.1007/978-1-4939-2272-7_14.
51. Liu, Y. *et al.* Application of bio-orthogonal proteome labeling to cell transplantation and heterochronic parabiosis. *Nat. Commun.* (2017) doi:10.1038/s41467-017-00698-y.
52. Hein, J. E. & Fokin, V. V. Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: New reactivity of copper(i) acetylides. *Chemical Society Reviews* (2010) doi:10.1039/b904091a.
53. Takayama, Y., Kusamori, K. & Nishikawa, M. Click chemistry as a tool for cell engineering and drug delivery. *Molecules* (2019) doi:10.3390/molecules24010172.
54. El-Zaatari, B. M., Shete, A. U., Adzima, B. J. & Kloxin, C. J. Towards understanding the kinetic behaviour and limitations in photo-induced copper(i) catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reactions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2016) doi:10.1039/c6cp04950h.
55. Dieterich, D. C., Link, A. J., Graumann, J., Tirrell, D. A. & Schuman, E. M. Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2006) doi:10.1073/pnas.0601637103.
56. Michael Green, N. Avidin and Streptavidin. *Methods Enzymol.* (1990)

doi:10.1016/0076-6879(90)84259-J.

57. Ouyang, T., Liu, X., Ouyang, H. & Ren, L. Recent trends in click chemistry as a promising technology for virus-related research. *Virus Research* (2018) doi:10.1016/j.virusres.2018.08.003.
58. Best, M. D. Click chemistry and bioorthogonal reactions: Unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules. *Biochemistry* **48**, 6571–6584 (2009).
59. Peran, I. *et al.* General strategy for the bioorthogonal incorporation of strongly absorbing, solvation-sensitive infrared probes into proteins. *J. Phys. Chem. B* (2014) doi:10.1021/jp5008279.
60. Taskent-Sezgin, H. *et al.* Azidohomoalanine: A conformationally sensitive IR probe of protein folding protein structure and electrostatics. *Angew. Chemie - Int. Ed.* (2010) doi:10.1002/anie.201003325.
61. Wolfshorndl, M. P., Baskin, R., Dhawan, I. & Londergan, C. H. Covalently bound azido groups are very specific water sensors, even in hydrogen-bonding environments. *J. Phys. Chem. B* (2012) doi:10.1021/jp209899m.
62. Shen, W. *et al.* Acute Synthesis of CPEB Is Required for Plasticity of Visual Avoidance Behavior in *Xenopus*. *Cell Rep.* (2014) doi:10.1016/j.celrep.2014.01.024.
63. Calve, S., Witten, A. J., Ocken, A. R. & Kinzer-Ursem, T. L. Incorporation of non-canonical amino acids into the developing murine proteome. *Sci. Rep.* (2016) doi:10.1038/srep32377.
64. Mato, J. M. & Lu, S. C. S-adenosylmethionine. in *Encyclopedia of Dietary Supplements* (2004). doi:10.1081/E-EDS-120022079.
65. Zhang, N. Role of methionine on epigenetic modification of DNA methylation and gene expression in animals. *Animal Nutrition* (2018) doi:10.1016/j.aninu.2017.08.009.
66. Ishikawa, K. & Mino, K. Biosynthesis of cysteine. in *Cysteine: Biosynthesis, Chemical Structure and Toxicity* (2012). doi:10.1128/ecosalplus.3.6.1.11.
67. Ferla, M. P. & Patrick, W. M. Bacterial methionine biosynthesis. *Microbiology (United Kingdom)* (2014) doi:10.1099/mic.0.077826-0.
68. Valley, C. C. *et al.* The methionine-aromatic motif plays a unique role in stabilizing protein structure. *J. Biol. Chem.* (2012) doi:10.1074/jbc.M112.374504.
69. Marcus Theory. in *Encyclopedia of Biophysics* (2013). doi:10.1007/978-3-642-16712-6_100567.
70. Gray, H. B. & Winkler, J. R. Electron tunneling through proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* (2003) doi:10.1017/S0033583503003913.
71. Warren, J. J., Ener, M. E., Vlček, A., Winkler, J. R. & Gray, H. B. Electron

- hopping through proteins. *Coordination Chemistry Reviews* (2012)
doi:10.1016/j.ccr.2012.03.032.
72. Zhuravleva, A. V. *et al.* Gated electron transfers and electron pathways in azurin: A NMR dynamic study at multiple fields and temperatures. *J. Mol. Biol.* (2004)
doi:10.1016/j.jmb.2004.08.001.
 73. Kustin, K. *Bioinorganic Chemistry (Bertini, Ivano; Gray, Harry B.; Lippard, Stephen J.; Valentine, Joan Selverstone).* *Journal of Chemical Education* (1995).
doi:10.1021/ed072pa125.1.
 74. Bizzarri, A. R., Brunori, E., Bonanni, B. & Cannistraro, S. Docking and molecular dynamics simulation of the Azurin-Cytochrome c551 electron transfer complex. *J. Mol. Recognit.* (2007) doi:10.1002/jmr.820.
 75. Winkler, J. Electron transfer in proteins. in *Conference on Quantum Electronics and Laser Science (QEELS) - Technical Digest Series* (1997).
doi:10.1146/annurev.biochem.65.1.537.
 76. Gray, H. B. & Winkler, J. R. Long-range electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2005)
doi:10.1073/pnas.0408029102.
 77. Mai, S. *et al.* Competing ultrafast photoinduced electron transfer and intersystem crossing of [Re(CO)₃(Dmp)(His124)(Trp122)]⁺ in *Pseudomonas aeruginosa* azurin: a nonadiabatic dynamics study. *Theor. Chem. Acc.* (2020)
doi:10.1007/s00214-020-2555-6.
 78. Takematsu, K. *et al.* Two Tryptophans Are Better Than One in Accelerating Electron Flow through a Protein. *ACS Cent. Sci.* (2019)
doi:10.1021/acscentsci.8b00882.
 79. Bashir, Q., Scanu, S. & Ubbink, M. Dynamics in electron transfer protein complexes. *FEBS Journal* (2011) doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08062.x.
 80. Choi, M. & Davidson, V. L. Cupredoxins - A study of how proteins may evolve to use metals for bioenergetic processes. *Metallomics* (2011)
doi:10.1039/c0mt00061b.
 81. Van Den Bosch, M. *et al.* Calculation of the redox potential of the protein azurin and some mutants. *ChemBioChem* (2005) doi:10.1002/cbic.200400244.
 82. Bollinger, J. M. Biochemistry: Electron relay in proteins. *Science* (2008)
doi:10.1126/science.1160001.
 83. Froger, A. & Hall, J. E. Transformation of Plasmid DNA into E. Coli using the heat shock method. *J. Vis. Exp.* (2007) doi:10.3791/253.
 84. Brill, A. S., Bryce, G. F. & Maria, H. J. Optical and magnetic properties of pseudomonas azurins. *BBA - Protein Struct.* (1968) doi:10.1016/0005-2795(68)90048-2.
 85. A Ali, M., S Mohamed, M. & G Sedek, R. Can metal replacement increase the antitumor activity of azurin? (in vitro study). *Gen. Med. Open* (2017)

doi:10.15761/gmo.1000111.

86. van de Kamp, M., Hali, F. C., Rosato, N., Agro, A. F. & Canters, G. W. Purification and characterization of a non-reconstitutable azurin, obtained by heterologous expression of the *Pseudomonas aeruginosa* *azu* gene in *Escherichia coli*. *BBA - Bioenerg.* (1990) doi:10.1016/0005-2728(90)90206-J.
87. Koberová, M. Studium inkorporace modifikovaných aminokyselin do cytochromu b5. PřF UK, bakalářská práce 2010, školitel: Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.
88. Tuzhilkin, R. Studium strukturně funkčních vztahů elektrotransportních proteinových systémů. PřF UK, bakalářská práce, 2018, školitel: doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.
89. Dědič, J. Studium molekulární interakce systému cytochromu P450 pomocí fotoaktivovatelných proteinů. PřF UK, diplomová práce, 2015, školitel: Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.
90. Karlsson, B., Pascher, T., Nordling, M., Arvidsson, Rolf H.A., Lundberg, Lennart G. Expression of the blue copper protein from *P. Aeruginosa* in *E. coli*. *FEBS Letters* (1989) doi: 10.1016/0014-5793(89)80285-6