Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Roman Tuzhilkin

Studium strukturně funkčních vztahů elektrotransportních proteinových systémů

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Miroslava Šulce Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 25. 05. 2018 Roman Tuzhilkin

Poděkování:

Děkuji svému školiteli doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi Ph.D. za jeho vedení a za to, že byl ochoten trpělivě snášet mé neustálé dotazy a opravovat mé chyby (včetně gramatických) a omyly při práci. Rovněž děkuji RNDr. Tomáši Ječmenovi, Ph.D. a Mgr. Renatě Ptáčkové, Ph.D. za jejich užitečné rady a včas zastavené elektroforézy.

Abstract

Electron transport processes are an extremely important field of study in modern biochemistry and structural/functional proteomics. Azurin is one of the most utilised model systems for study of redox and electron transport processes in proteins. We have utilised photo-induced crosslinking (PIXL) to study oligomerization of azurin in solution and the effect of L-2-amino-5,5-azi-hexanoic acid (photo-Met) – a structural photoinducible analogue of canonical amino acid Met – on electron transport processes in azurin.

The optimisation of expression conditions of recombinant azurin in auxotrophic *E. coli* B834 cells was done to maximise photo-Met incorporation percentage in azurin sequence (70% incorporation was measured *via* MALDI-TOF mass spectrometry). Through the optimisation of purification protocol (example: cell disintegration, acid precipitation of proteins, adding metallic ligand during cell sonication) we have increased the purity and yield of final product and reduced the purification time.

Final preparations (wild-type azurin (WT) with Met, WT with photo-Met and "All-Phe" mutant (all Trp/Tyr replaced by Phe) with photo-Met) were exposed to intense UV-light (PIXL) and evaluated *via* UV-VIS spectroscopy and SDS-PAGE. During PIXL experiment some photo-Mets incorporated into azurin were able to: (i) form covalent dimers, (ii) link azurin intramolecularly, (iii) alter redox state of copper ion at the active site (decreased value of absorbance maximum at 635 nm on UV-VIS spectrum after irradiation). Those effects were dependent on the ionic strength. We have excluded the effect of Trp/Tyr ("All-Phe" mutant with photo-Met) or the effect of photo-Met (WT with Met) on UV-light generated species. Therefore, we can claim that UV-light generates intermediates of photo-Met which are able to reduce copper ion at azurin's active site.

Key words: azurin, photo-Met, photo-induced crosslinking, electron transport

In Czech

Abstrakt

Studium procesů spojených s přenosem elektronu v proteinech je velice důležitou oblastí moderní biochemie a strukturní/funkční proteomiky. Azurin je jedním z nejpoužívanějších modelových systémů pro studium oxidačně-redukčních a elektron transportních procesů v proteinech. V této práci jsme použili metodiku kovalentního fotochemického zesítění (PIXL) pro studium oligomerizace azurinu v roztoku. Zároveň jsme studovali vliv L-2-amino-5,5-azi-hexanové kyseliny (foto-Met), strukturního světlem indukovatelného analogu přirozené aminokyseliny Met, na elektron transportní procesy v azurinu.

Byla provedena optimalizace podmínek exprese rekombinantního azurinu v auxotrofních buňkách *E. coli* B834 za účelem získání azurinu s maximální mírou inkorporace foto-Met (70% inkorporace určená MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií). Současně modifikací purifikačního protokolu (např. rozbití buněk, kyselá precipitace proteinů, zavedení kovového ligandu při sonikaci buněk) jsme zvýšili čistotu a výtěžek preparátu a zkrátili dobu purifikace.

Získané preparáty azurinu (přirozený protein (WT) s Met, WT s foto-Met a „All-Phe“ mutant (všechny Trp/Tyr zaměněny za Phe) s foto-Met) byly po ozáření UV světlem (metodika PIXL) charakterizovány pomocí UV-VIS spektroskopie a SDS-PAGE. Při experimentu PIXL některý z foto-Met zavedených do azurinu se v závislosti na iontové síle podílel na: (i) tvorbě kovalentního dimeru, (ii) intramolekulárního spojení, (iii) měnil oxidoredukční stav iontu mědi v aktivním centru (pokles hodnoty maxima absorbance při 635 nm v UV-VIS spektrech po ozáření). Po vyloučení příspěvku Trp/Tyr („All-Phe“ mutant s foto-Met) nebo příspěvku foto-Met (WT s Met) na tvorbu (generování) UV-světlem aktivovaných stavů můžeme konstatovat, že strukturní fotoaktivovatelný analog foto-Met může při ozáření intenzivním UV-světlem generovat intermediáty, které jsou následně schopné redukovat atom mědi v aktivním centru azurinu.

Klíčova slova: azurin, foto-Met, technika fotochemického zesítění, elektronový transport

Obsah

1 Seznam zkratek 8

2 Úvod 10

2.1 Elektron-transportní/dýchací řetězec 10

2.2 Cupredoxiny 13

2.3 Azurin 14

2.4 Hmotnostní spektrometrie 16

2.5 Světlem iniciované chemické zesítění (angl. Photo-Induced CrossLinking, PIXL) 18

2.5.1 Aminoacyl-tRNA-synthethasy 18

2.5.2 Foto-Met a foto-Leu 19

3 Cíle 21

4 Materiál 22

4.1 Chemikálie 22

4.2 Přístroje 24

5 Metody 25

5.1 Příprava LB média a LB agaru 25

5.2 Příprava kompetentních buněk *E. coli* B834 25

5.3 Transformace buněk plasmidem 25

5.4 Příprava MM-M9 média 26

5.5 Růst buněk a exprese proteinu v LB mediu a MM-M9 26

5.6 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného . 27

5.6.1 Příprava vzorku pro elektroforézu 27

5.6.2 Příprava polyakrylamidového gelu a průběh elektroforézy 28

5.6.3 Vizualizace proteinů analyzovaných SDS-PAGE 28

5.7 Štěpení proteinu v gelu a analýza míry inkorporace foto-Met pomocí MS 29

5.8 Izolace exprimovaného rekombinantního proteinu 31

5.9 Stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny 32

5.10 Experimenty PIXL 32
6 Výsledky 34
6.1 Transformace buněk plasmidem 34
6.2 Exprese azurinu v LB a MM-M9 s methioninem 34
6.3 Exprese azurinu v MM-M9 + foto-Met 35
6.4 Štěpení proteinu v gelu a analýza míry inkorporace foto-Met pomocí MALDI-TOF MS 37
6.5 Optimalizace exprese 39
6.6 Izolace „wild-type“ azurinu exprimovaného v MM-M9 + foto-Met 39
6.7 Exprese v LB mediu a izolace 44
6.8 Optimalizace postupu izolace 44
6.9 Charakterizace finálního preparátu. Stanovení koncentrace proteinu ve finálních preparátech pomocí bicinchoninové kyseliny a inkorporaci foto-Met pomocí MS 45
6.10 Experimenty PIXL 46
7 Diskuze 53
8 Závěr 57
9 Seznam literatury 58

1 Seznam zkratek

A_x	absorbance při vlnové délce x nm
aaRSs	aminoacyl-tRNA-synthethasy
ACN	acetonitril
AK	aminokyselina
Az	azurin
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
c	koncentrace ($mol.dm^{-3}$, není-li uvedeno jinak)
CBB R-250	briliantová modř (z angl. Coomassie Brilliant Blue) R-250
Da	Dalton, jednotka hmotnosti
dH_2O	deionizovaná voda
ESI	ionizace elektrosprejem (z angl. electrospray ionization),
ET	přenos elektronu (z angl. electron transfer)
FAD	flavinadenindinukleotid
foto-Met	„foto-methionin“, kyselina L-2-amino-5,5-azi-hexanová
FPLC	chromatografická metoda (z angl. Fast Protein Liquid Chromatography)
l	optická dráha kyvety (cm, není-li uvedeno jinak)
λ	vlnová délka (nm, není-li uvedeno jinak)
MALDI	desorpce a ionizace laserem za asistence matrice (z angl. matrix assisted laser desorption/ionization)
MM-M9	minerální médium M9
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
n	látkové množství (mol, není-li uvedeno jinak)

NADH	nikotinamidadenindinukleotid
OD600	optická denzita při vlnové délce 600 nm
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů
PIXL	světlem iniciované chemické zesítění (z angl. photo-induced crosslinking)
q	kvadrupólový analyzátor při hmotnostní spektrometrii (z angl. quadrupole).
RPM	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (z angl. sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)
TOF	analyzátor při hmotnostní spektrometrii měřící dobu letu částice (z angl. time of flight)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminoethan
UV	ultrafialová část spektra elektromagnetického záření (z angl. ultra-violet)
v/v	objemová procenta
w/v	poměr hmotnost/objem
VIS	viditelná část spektra elektromagnetického záření (z angl. visible)
WT	přirozená forma (z angl. wild-type)

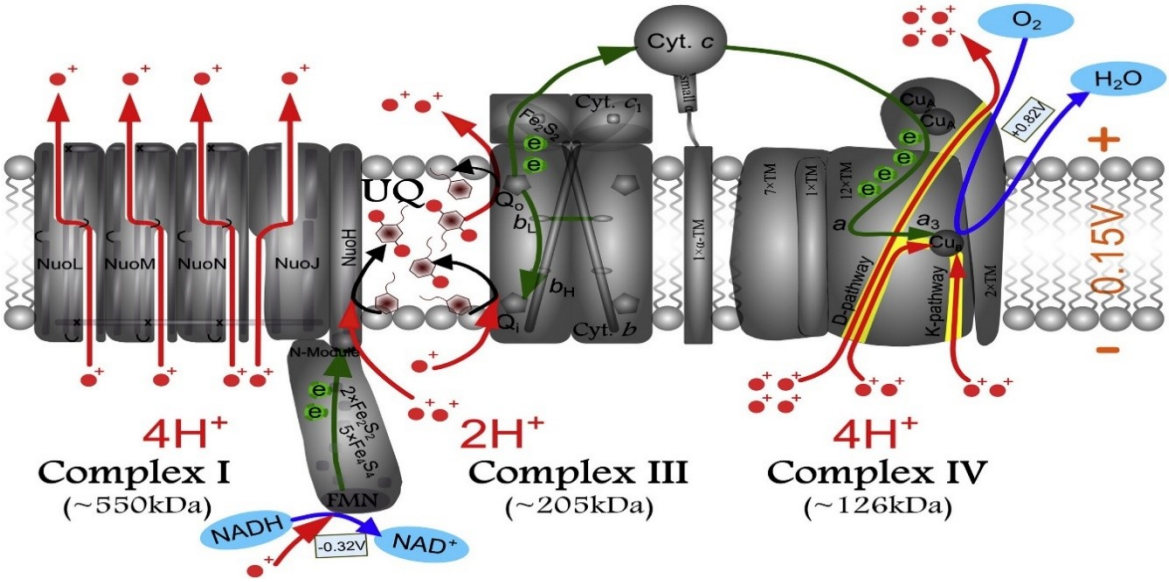
2 Úvod

Přenos elektronu (z angl. electron transfer, ET) mezi proteiny je jednou z nejběžnějších základních biochemických reakcí. Uplatňuje se například při fotosyntetických procesech v rostlinách, přenosech v dýchacím řetězci při aerobní či anaerobní (např. bakterie) respiraci [1] nebo procesech sekundárního metabolismu (např. odbourávaní xenobiotik v 1. fázi biotransformace).

Každá redox reakce, která vede k přenosu elektronu, vyžaduje nejméně dva partnery – oxidovaný akceptor elektronu a redukovaný donor elektronu. Výsledkem přenosu je redukovaný akceptor a oxidovaný donor [2]. V 90. letech minulého století byla vyslovena řada různých hypotéz o mechanismech tohoto přenosu. Některé z nich předpokládaly, že transport elektronu od donoru k akceptoru nezávisí na detailní struktuře proteinu a protein se chová jako homogenní medium (podobný „organickému sklu“). V dalším předpokládaném mechanismu se protein chová jako heterogenní medium a transport probíhá přes definovanou cestu, která zahrnuje určité kovalentní a vodíkové vazby [3].
V současnosti se přikláníme k mechanismu ET, který úzce souvisí se strukturou proteinu (intraproteinový ET) nebo celého intermediárního redox komplexu (interproteinový ET). Kromě těchto čistě korpuskulárních modelů je třeba zmínit také kvantový pohled, který se uplatňuje při interpretaci řady ET jevů. Vzhledem k důležité funkci ET procesu v organismech je studium těchto mechanismů velice rozsáhlou oblastí biochemického výzkumu. Pro studium ET jsou využívané modelové proteiny (plastocyanin, azurin a další), které pomáhají vytvářet a upřesňovat naše představy a hypotézy.

2.1 Elektron-transportní/dýchací řetězec

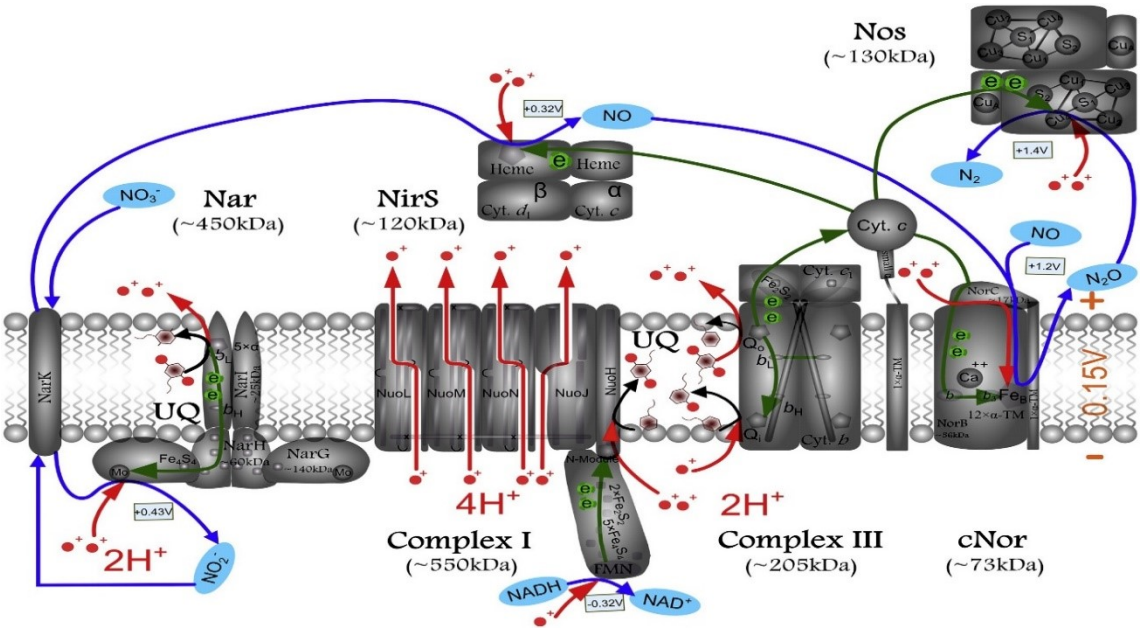
Dýchací řetězec je velmi důležitou součásti energetického metabolismu. U eukaryotních organismů je lokalizován na vnitřní membráně mitochondrie. Jeho primární funkcí je katalýza elektrontransportního přenosu elektronu na akceptor z redukovaných ekvivalentů ($NADH+H^+$, $FADH_2$), získaných glykolýzou a Krebsovým cyklem. Vytvořený H^+ gradient na membráně může být využit k synthese ATP na proteinovém komplexu ATP-synthasy.



Obr. 1: Dýchací řetězec aerobního organismu (respirace). Elektrony jsou transportované z NADH na komplex IV přes komplex I, ubichinon/ubichinol, komplex III a cytochrom c. Protony jsou pumpovány přes membránu komplexem I, komplexem III a komplexem IV. Celková bilance je 10 protonů na jeden elektronový pár. Převzato a upraveno z [4].

V případě aerobní respirace (viz obr. 1) je dýchací řetězec složen ze čtyř komplexů. Komplex I je NADH:Q oxidoreduktasou, která přenáší elektronový pár z NADH na ubichinon („koenzym Q“). Komplex II (není zobrazen na obrázku) je sukcinát dehydrogenasou. Ta pomocí $FADH_2$ katalyzuje přeměnu sukcinátu na fumarát a přenáší uvolněné elektrony na ubichinon. Komplex III je cytochrom c reduktasou, přenáší elektrony z ubichinonu na cytochrom c, který následně putuje ke komplexu IV. Na tomto komplexu dojde k přenosu elektronu z cytochromu c na molekulu O_2. ATP-synthasa se občas uvádí jako komplex V v dýchacím řetězci, i když na ní již žádný ET děj neprobíhá.

Aerobní respirace není jediným možným uspořádáním elektron-transportního řetězce. Řada bakteriálních druhů využívá anaerobní respiraci, kde finálním akceptorem elektronu není molekula O_2, ale jiná látka. Na obr. 2, str. 12 je uveden příklad základního denitrifikačního řetězce, kde akceptorem elektronu jsou molekuly, které obsahují atom dusíku v různém oxidačním stavu (ve sloučeninách NO_x)



Obr. 2: Dýchací řetězec anaerobního organismu (denitrifikace). Elektrony jsou transportované z NADH na NO_x reduktasy (např. nitrát nebo nitrit reduktasy) přes komplex I, ubichinon/ubichinol, komplex III a cytochrom c. Protony jsou pumpované přes membránu komplexem I, komplexem III a cytoplasmatickou nitrát reduktasou. Celková bilance je 6 protonů na jeden elektronový pár. Převzato a upraveno z [4].

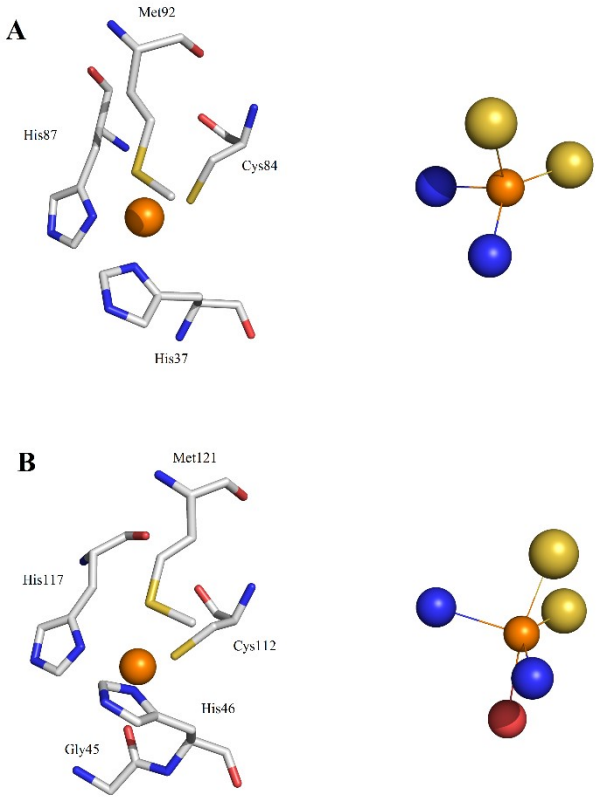
Principem všech elektron-transportních řetězců je přenos elektronu z donoru s vysokým potenciálem (NADH /NAD^+ $E^{0'}$ = +0,32 V) na akceptor s nízkým potenciálem (aerobně: O_2 $E^{0'}$= -0,82 V, nebo anaerobně: např. NO_3 $E^{0'}$ = -0,4 až -0,7 V) za tvorby H^+ gradientu na membráně. K tomuto procesu nedochází jedním krokem, ale je rozdělen do několika ET procesů s využitím intermediárních přenašečů. Roli intermediárních přenašečů v dýchacím řetězci plní především molekuly na bázi nikotinových, flavinových a chinonových kofaktorů nebo metaloproteiny či hemoproteiny s rozdílnou hodnotou $E^{0'}$.

Je pozoruhodné, že celou škálu v přírodě používaného rozsahu potenciálů (-0,7 až 0,8 V) lze pokrýt kombinací pouze tří typů metaloproteinů: Fe-S proteinů ($E^{0'}$ v rozsahu -0,7 až 0,5 V), cytochromů ($E^{0'}$ v rozsahu -0,5 až 0,35 V) a cupredoxinů ($E^{0'}$ v rozsahu 0,1 až 0,8 V).

2.2 Cupredoxiny

Iont mědi je jedním ze dvou v přírodě nejčastěji využívaných iontů kovů pro přenos elektronu při ET procesech. Je součástí řady metaloproteinů s různou funkcí v organismu. Cu-komplexy lze rozdělit na několik strukturních typů [5]: typ 1, typ 2, typ 3, CuA, CuB, CuZ. Typ 1 nebo-li „blue copper“ obsahuje mononukleární kovové centrum a v přírodě se účastní jednoelektronových přenosů. Tyto komplexy se vyskytují v řadě oxidoreduktas a jsou součásti cupredoxinů.

Cupredoxiny (v angl. literatuře označované Blue Copper Proteins) jsou malé (90 – 160 aminokyselin) rozpustné, nekatalytické proteiny, které působí především jako přenašeče v ET řetězcích. Ve všech případech jsou přítomny tři ekvatoriální atomy (NNS) pěvně koordinující atom mědi [5]. Dva atomy dusíku imidazolového postranního řetězce dvou histidinů a jeden atom síry cysteinu. U některých proteinů prvního typu je měď navíc koordinovaná čtvrtým axiálním ligandem, kterým je většinou atom síry methioninu. Ovšem vzhledem k větší vzdálenosti mezi Cu a tímto axiálně postaveným atomem síry (2,8 – 3,1 Å) je tato vazba slabší. Takovou koordinaci lze najít například v plastocyaninu (viz obr. 3, A, str. 14), rustycyaninu a u některých forem enzymu nitritreduktasy nebo askorbátoxidasy. Rozdílná je struktura Cu-komplexu azurinu (viz obr. 3, B, str. 14). Atom Cu je v něm slabě koordinován pátým ligandem, kyslíkem karbonylu z páteře proteinu, který se nachází v trans-poloze vůči methioninu.



Obr. 3: Zástupci aktivních center cupredoxinů. A) Plastocyanin, nejběžnější uspořádání – dva ekvatoriální histidiny, jeden ekvatoriální cystein a jeden axiální methionin jako ligandy. B) Azurin, s axiálním kyslíkem karbonylu glycinu v trans poloze vůči axiálnímu methioninu. Vpravo je zobrazena geometrie atomů mědi (oranžová) a jednotlivých donorových atomů (modře, dusík; žlutě, síra; červeně, kyslík).

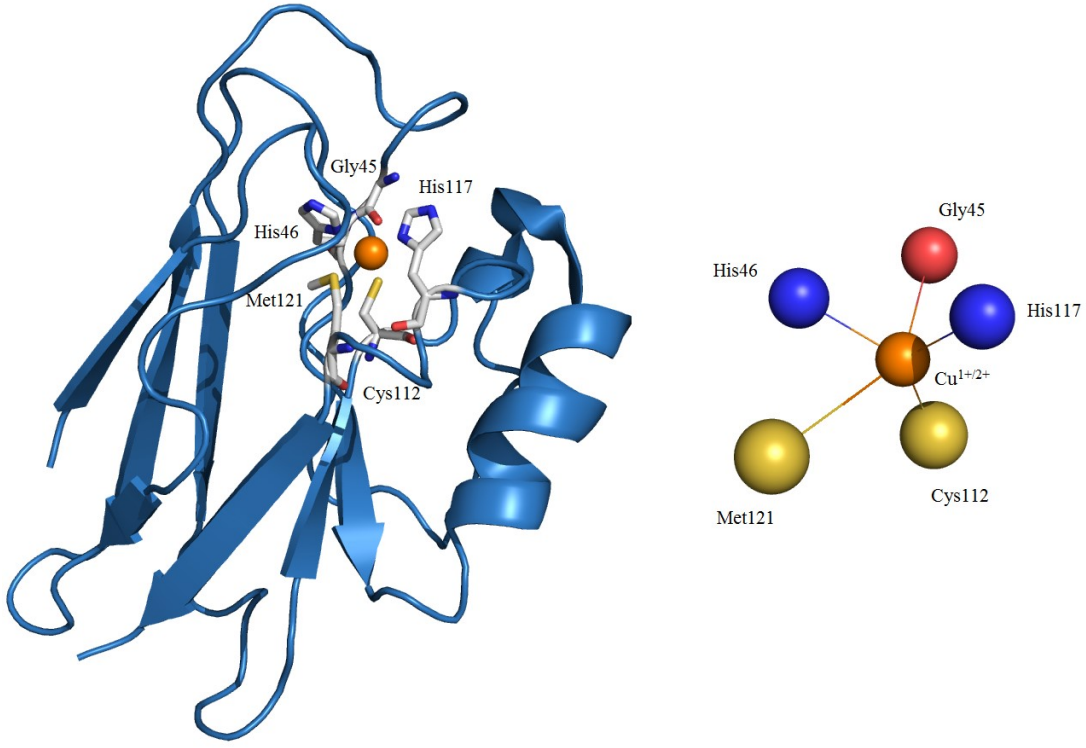
2.3 Azurin

Azurin (Az) je malý cupredoxin, který se nachází v řadě bakterií. Jeho funkce je úzce spojena s přenosem elektronu při procesech denitrifikace a anaerobní respirace [6].

Azurin patří mezi nejvíce prostudované proteiny participující na redox procesech. Používá se jako model pro studium ET procesu v biologických systémech. Například práce ze 70. a 80. let minulého století jsou zaměřeny na popis modifikovaných azurinů s napojenými donor/akceptorovými komplexy, které lze použít k ověření hypotéz ET [7–9]. Azurin zůstává jedním z nejpoužívanějších malých proteinů, které slouží jako model pro studium cupredoxinů a dalších elektron-transportních proteinů. Mutované formy azurinů obsahující iont kovu jsou stále používány pro studium rolí jednotlivých aminokyselin a modelovaní a

testování sil stabilizujících aktivní centrum [10] nebo relativní stability redoxních stavů iontu Cu (redoxních potenciálů) [11]. Navíc vlastnosti Az byly modulovány vložením arteficiálního aktivního centra jiného cupredoxinu do struktury WT azurinu [12]. Azurin byl použit také jako model pro studium role iontu kovu při tvorbě 3D struktury metaloproteinu a zároveň stabilizaci celého proteinu [10,13]. V neposlední řadě je třeba zmínit využití peptidů odvozených od primární struktury azurinu, které vykazují protinádorovou, antiparasitální a antivirotickou aktivitu [14].

Struktura azurinu je konzervovaná v řadě bakteriálních druhů. Oproti plastocyaninu azuriny jsou o něco větší (128-130 AK) a obsahují ve své struktuře jeden α-helix navíc. Sekundární a terciární strukturu u Az tvoří jeden α-helix a osm β-skládaných listů uspořádaných do struktury β-soudku (angl. β-barrel), v topologii Řeckého klíče [6,15] (viz obr. 4).



Obr. 4: strukturní model azurinu s vyznačeným iontem Cu (oranžová) koordinovaným do struktury postranními řetězci aminokyselin (His, His, Cys, Met) a karbonylem Gly. Vpravo je zobrazena geometrie atomů mědi a jednotlivých donorových atomů (modře, dusík; žlutě, síra; červeně, kyslík).

U azurinu mikroorganismu *Pseudomonas aeruginosa* je redoxně aktivní měď (Cu^{1+}/Cu^{2+}) koordinovaná v geometrii trigonální bipyramidy. Ta tvoří dva histidinové imidazoly (His46 a His117), jeden cysteinový thiolát (Cys112), a dva slabší axiální ligandy – síra methioninu (Met121) a karbonyl glycinu (Gly45). Ačkoli axiální ligandy jsou poměrně slabé, jejich mutace vede k výraznému ovlivnění vlastností celého proteinu. Je známo, že mutace Met121 za Leu nebo Gln výrazně ovlivňuje potenciál výsledného proteinu. Podobné mutace byly využity k přípravě různých azurinů s $E^{0'}$ od -1 V do +1 V [11,16]. Získané experimentální hodnoty pro modifikované azuriny naznačují překvapivou schopnost azurinů pokrýt širokou škálu hodnot potenciálu, které se vyskytují v přírodě.

Uspořádaná struktura určuje poměrně rigidní a přesnou geometrii vazebného místa pro kov, což vede k neobvyklé koordinaci Cu^{2+} v azurinu a dalších cupredoxinech. Azurin, *P. aeruginosa* muže vázat do svého aktivního místa v *in vitro* experimentu různé ionty kovů (např. zinku). Je překvapujícím zjištěním že krystalové struktury jsou téměř identické v případě vazby jiného kovového kofaktoru (Cu nebo Zn) či jeho absence (apo-forma).

Některé studované mutanty Az v roztoku vytváří slabé transientní oligomery. Při vysokých koncentracích dosahujících velikosti až 11-ti-meru. V roztoku s nízkou koncentrací (70 μM) je přítomné jen velké množství dimeru Az. Nativní Az je v roztoku o nízké (<70 μM) koncentraci přítomen pouze ve formě monomeru [17]. Zároveň existence oligomeru Az byla pozorovaná v X-ray krystalu azurinu (4AZU), který je v publikované podobě tvořen čtyřmi molekulami [15,18].

2.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (angl. Mass Spectrometry, MS) je analytická metoda využívající k analýze ionizovaného vzorku rozdílného pohybu nabitých částic v elektromagnetickém poli a určení detekovaných signálů poměru hmotnosti/náboje (*m/z*). Tato analýza a detekce iontů a molekul analytu probíhá ve vysokém vakuu, aby nedocházelo k ovlivnění trajektorie analyzovaných částic.

Pro analýzu vzorku je klíčovým krokem jeho ionizace a převedení do plynné fáze. V současnosti se k biochemickým účelům nejčastěji používají dvě metody ionizace. První je ionizace elektrosprejem (ESI, z angl. Electrospray Ionization), kde je kapalný vzorek ionizován napětím přiváděným na konec kapiláry. Rozpouštědlo je z uvolňovaných

nabitých kapek následně odpařeno působením proudu plynů, vyhřívané kapiláry a parciálním snižováním tlaku. Výhodou této metody je možnost snadného přímého napojení na chromatografickou separaci a zachovaní nekovalentních interakcí v ionizovaném vzorku. Druhou metodu ionizace biomolekul, která nachází velké uplatnění v biochemii, je laserová ionizace/desorpce za přítomnosti matrice (MALDI, z angl. Matrix Assissted Laser Desorption Ionisation). Při tomto způsobu ionizace je vzorek ve směsi s matricí, která je schopná absorbce energie fotonů laseru. Po ozáření laserem, se odpaří spolu s analytem a předá/odebere mu proton. Tato metoda je vhodná především k analýze složitých směsí. Interpretace MS spekter je u MALDI jednodušší než při použití ESI, protože poskytuje většinou signály jednou nabitých $[M-H]^-$/$[M+H]^+$ iontů analytů. Jako matrice pro UV-lasery (např. N_2-laser s vlnovou délkou 337 nm) se používají slabé aromatické kyseliny, např. kys. 2,5-dihydroxybenzoová, kys. α-kyano-4-hydroxyskořicová nebo kys. 3,5-bis(methoxy)-4-hydroxyskořicová.

Nejčastějšími druhy MS analyzátoru jsou analyzátor z doby letu (TOF, z angl. Time Of Flight) a kvadrupólový analyzátor (q, z angl. Quadrupole). Analyzátor TOF je konstrukčně poměrně jednoduché zařízení. Měří dobu letu iontů na definované dráze, kterým byl dodán stejný moment hybnosti na jednotku náboje. Iont s nižší hodnotou *m/z* se v tomto případě pohybuje rychleji a dopadne na detektor dříve než iont vyšší hodnotou *m/z*. Kvadrupólový analyzátor je založen na ladění radiofrekvenčního napětí mezi čtyřmi kvadrupólovými tyčemi (angl. Quadrupole rods), čímž je ovlivněna dráha procházejících iontů a pouze iont se stabilní dráhou při dané hodnotě radiofrekvenčního napětí projde analyzátorem a dopadne na detektor.

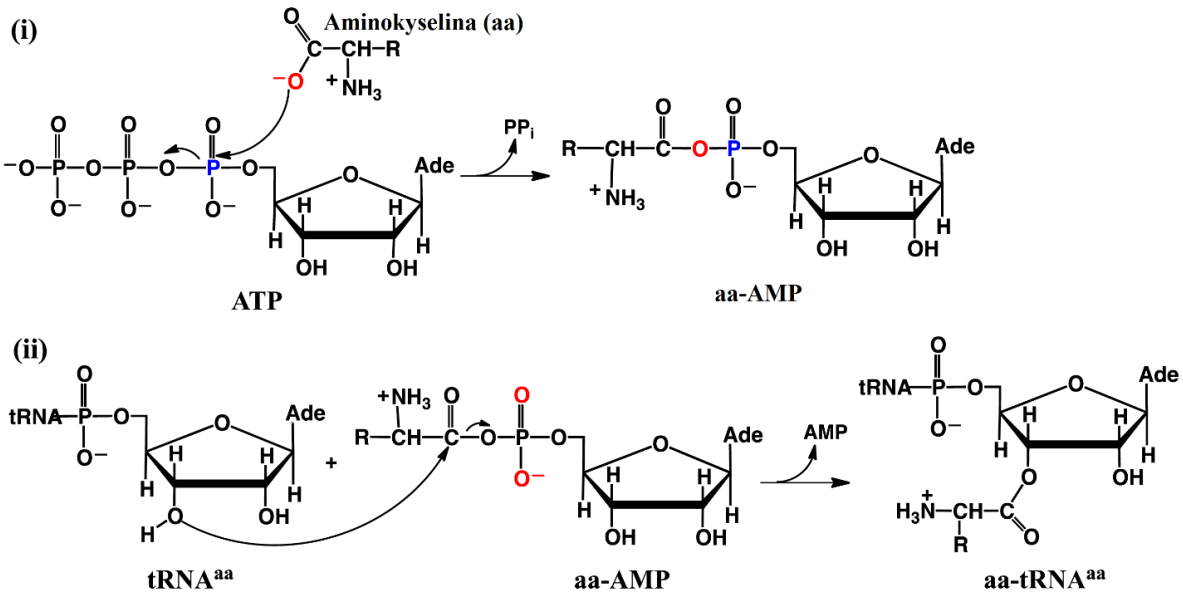
Výsledkem MS experimentu je MS spektrum s hodnotou *m/z* na ose x a intenzitou signálu na ose y (absolutní/relativní intenzita). MS je tedy kvalitativní a semi-kvantitativní analytickou metodou.

2.5 Světlem iniciované chemické zesítění (angl. Photo-Induced CrossLinking, PIXL)

2.5.1 Aminoacyl-tRNA-synthethasy

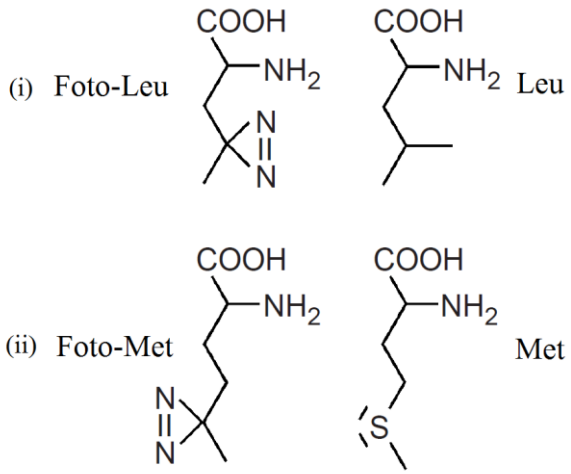
Aminoacyl-tRNA-synthethasy (aaRSs) je skupina enzymů, které hrají nezastupitelnou roli při proteosyntese. Katalyzují přiřazení, aktivaci a vazbu aminokyseliny s odpovídající molekulou tRNA. Jedná se o skupinu vysoce specifických a selektivních forem enzymů, u kterých každá dvojice proteinogenní aminokyseliny a příslušné tRNA má vlastní aminoacyl-tRNA-synthethasu.

Obecný mechanismus aaRSs obsahuje nejprve aktivaci aminokyseliny za spotřeby ATP s výslednou tvorbou aminoacyladenylátu a následným přenosem aminokyseliny z AMP na 3‘ nebo 2‘-hydroxyskupinu na 3’-konci tRNA [19]. Průběh reakce je zobrazen na obr. 5.



Obr. 5: Obecný mechanismus (i) aktivace aminokyseliny a následující (ii) aminoacylaci tRNA katalyzovaný aminoacyl-tRNA-synthethasou. Převzato a upraveno z [19].

Za určitých podmínek lze ovlivnit specifitu aminoacyl-tRNA-synthethas a zavést do sekvence proteinu modifikované nebo nepřirozené strukturní analogy aminokyselin (např. fotoaktivovatelné cyklické diaziriny foto-Met, foto-Leu, viz obr. 6, str. 19)



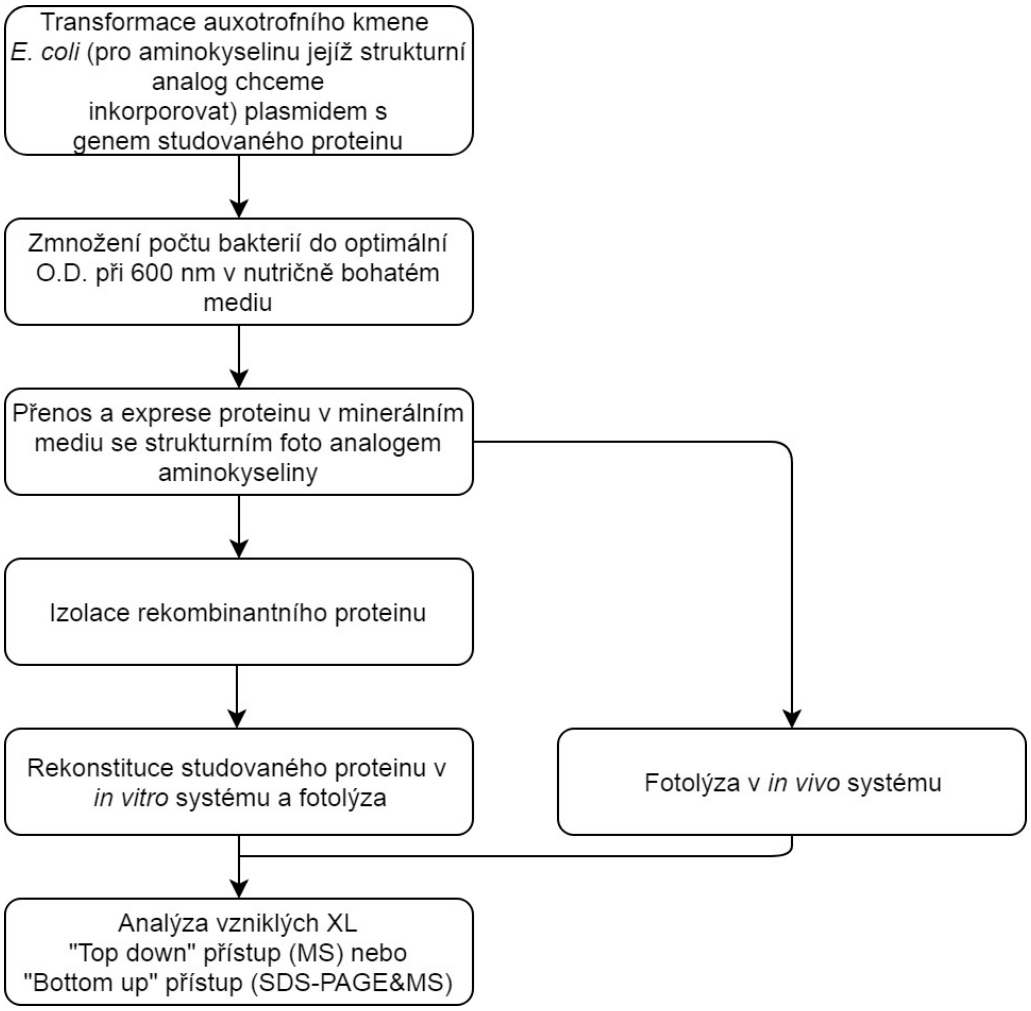
Obr. 6: Strukturní vzorce aminokyselin a jejich strukturních analogů: vlevo jsou zobrazeny (i) foto-Leu a (ii) foto-Met, vpravo přirozené Leu a Met. Převzato a upraveno z [20].

2.5.2 Foto-Met a foto-Leu

V roce 2005 byly syntetizovány fotoaktivovatelné aminokyseliny se strukturní analogií přirozeným kanonickým aminokyselinám Met a Leu. Kvůli této podobnosti dostaly název foto-Met a foto-Leu. Obě tyto kyseliny obsahují diazirinový kruh, ze kterého po fotoaktivaci UV zářením o vlnové délce 350-370 nm vzniká vysoce nestabilní karbén schopný tvorby nové kovalentní vazby (XL, z angl. CrossLink) ve svém nejbližším okolí (do 5 Å) [21] nebo terminuje za tvorby dvojné vazby [22].

Velkou výhodou těchto aminokyselin je již zmíněná podobnost přirozeným aminokyselinám, která umožňuje interakci s přirozenými aaRSs a následnou vazbu na tRNA a inkorporaci do sekvence proteinu. Tyto strukturní analogy nejsou toxické pro buňku a ovlivňují funkce exprimovaného proteinu velmi málo. Růst buněk v minerálním médiu (např. MM-M9, viz kapitolu 5.4, str. 26), který obsahuje pouze foto-analogy těchto dvou aminokyselin je sice zpomalen oproti růstu v bohatších médiích, ale není ovlivněna celková životaschopnost a proteosyntéza buněk [20].

Obecné experimentální využití metodik PIXL lze shrnout v následujícím schématu na obr. 7, str. 20.



Obr. 7: Obecné schéma PIXL experimentu s využitím strukturních fotoaktivovavtelných analogů aminokyselin.

Foto-Met a foto-Leu nachází široké uplatnění ve strukturní proteomice. Jsou používány k studiu intermolekulárních interakcí mezi proteiny v proteinových komplexech. Dovolují zachytit i velmi krátkodobé transientní interakce. Jsou nástrojem pro intramolekulární studium 3D struktury proteinu a dovolují studovat i oblasti špatně přístupné pro jiné síťovací metodiky (např. v prostředí lipidové membrány [23]). Strukturní fotoaktivovatelné analogy aminokyselin lze také využít při monitorování průběhu uspořádání nově synthetizovaných proteinů v rostoucí buňce [24]. S proteinem vytváří během PIXL experimentu novou kovalentní vazbu a dovolují snadnou analýzu pomoci MS technik.
V této práci ověřujeme další možné využití vlastností foto-Met a foto-Leu pro studium a iniciaci ET procesu vzhledem k přítomnosti diazirinového kruhu a mechanismu jeho fotoaktivace [20,25–28].

3 Cíle

Primárními cíle práce jsou:

1. Ověřit schopnost foto-Met generovat a poskytovat elektron nebo nějakým jiným způsobem se podílet na elektrotransportním ději v modelovém proteinu azurin *P. aeruginosa*.
2. Začlenit foto-Met do sekvence azurinu s použitím rekombinantní exprese a stanovit míru inkorporace pomocí hmotnostní spektrometrie. Na základě získaných výsledků stanovení míry inkorporace foto-Met do sekvence proteinu proces exprese optimalizovat.
3. Studovat změny oxidoredukčních stavů aktivního centra a tvorbu oligomerů azurinu pomocí metodiky PIXL.

4 Materiál

4.1 Chemikálie

Trypton (Bio Basic Canada)

NaCl (Fluka)

Kvasinkovy extrakt (Bio Basic Canada)

HCl (Fluka)

$CaCl_2$ (Fluka)

KCl (Lachema)

$MgCl_2$ (Lachema)

Ampicilin (Roth)

Na_2HPO_4 (Lach-Ner)

NH_4Cl (Lachema)

Glukosa (Sigma)

$MgSO_4$ (Sigma)

Thiamin (Sigma)

L-Ile (United States Biochemical Corporation)

L-Val (United States Biochemical Corporation)

L-Leu (United States Biochemical Corporation)

L-Lys (Sigma)

L-Phe (United States Biochemical Corporation)

L-Thr (United States Biochemical Corporation)

EDTA (Fluka)

$CoCl_2 . 6H_2O$ (Lachema)

$FeSO_4 . 7H_2O$ (Sigma)

$ZnSO_4 . 7H_2O$ (Sigma)

$CuSO_4 . 5H_2O$ (Lachema)

$MnCl_2 . 4H_2O$ (Sigma)

H_3BO_3 (Lachema)

KH_2PO_4 (Lachema)

L-Met (Sigma)

foto-Met (Thermo Scientific)

isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) (Roth)

sacharosa (Penta)

Tris-Cl (Sigma)

2-merkaptoethanol (Sigma)

glycerol (Lachema)

bromfenolová modř (Roth)

akrylamid (Bio Rad)

dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma)

peroxodisíran amonný (Sigma)

tetramethylethylendiamin (TEMED) (Fluka)

PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific)

Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma)

ethanol HPLC-grade (Merck)

kys. octová (Sigma)

methanol (Lachema)

formaldehyd (Sigma)

$Na_2S_2O_3$. 5 H_2O (Sigma)

$AgNO_3$ (Sigma)

Na_2CO_3 (Sigma)

ethylmorfolin (Sigma)

acetonitril HPLC-grade (Merck)

tris(2-karboxyethyl)fosfinhydrochlorid (TCEP) (Sigma)

jodacetamid (Sigma)

endoproteasa LysC (roztok 0,1 g/l, Roche)

kys. trifluoroctová (Fluka)

matrice (3 mg/ml α-kyano-4-hydroxy skořicové kyseliny v 50% (v/v) ACN a 0,1% (v/v) TFA) (Bruker Daltonics)

Octan amonný (Lachema)

bicinchoninová kyselina (BCA A) (Sigma)

4% roztok $CuSO_4$. $5H_2O$ (BCA B) (Sigma)

4.2 Přistroje

Souprava na elektroforézu Bio Rad mini Protean II

Souprava na elektroforézu Hoefer Mighty Small S260

Pipety a špičky Gilson

Laboratorní váhy Ohaus Discovery

Předvážky Ohaus ScoutTM Pro

Spektrofotometr DeNovix DS-11+

Fotolyzér Oriel 60100 (100 W)

Prosvětlovací pult Hama® LP 555

Sonikátor Hielscher UP100H

Sonikátor Bandelin Sonopuls se sondou KS-73 a KE-76

Inkubátor IKA® KS4000 iControl

Inkubátor Ultimate Dry bath Incubator (Cleaver Scientific)

Centrifuga Hettich Zentrifugen Universal 320 R

Minicentrifuga Eppendorf miniSpin Plus

Vakuový koncentrátor Labconco CentriVap®micro IR

Čtečka destiček Multiskan bio (Thermo Scientific)

Hmotnostní Spektrometr MALDI-TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics)

5 Metody

5.1 Příprava LB média a LB agaru

LB (angl. Lysogeny broth) je nutričně bohaté médium, které se využívá při kultivaci řady bakteriálních kultur, např. *E. coli.*

Pro přípravu 500 ml média bylo naváženo 5,00 g Tryptonu, 5,00 g NaCl a 2,50 g kvasinkového extraktu a následným rozpouštěním v přibližně 450 ml deionizované vody. Hodnota pH byla upravena na 7,7 pomocí 5 M HCl. Následně byl roztok doplněn deionizovanou vodou do finálního objemu 500 ml a medium bylo autoklávováno.

5.2 Příprava kompetentních buněk *E. coli* B834

Nejprve byly připraveny kompetentní buňky.

Jedna kolonie z agarové plotny byla inokulována do 10 ml LB media. Následovala inkubace přes noc při 37°C. Množství 250 µl takto připravené noční kultury bylo inokulováno do 25 ml LB média. Buňky byly kultivovány při 37°C a 190 RPM v inkubátoru IKA® KS 4000 do optické denzity 0,6 při vlnové délce 600 nm (měření v 10 mm kyvetě), (OD600). Poté byly buňky inkubovány na ledu po dobu 10 minut. Následně byly centrifugovány 5 min. při 5000 RPM a 4°C, centrifuga Hettich Universal 320R, úhlový rotor 1620A. Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována v 10 ml sterilního 100 mM $CaCl_2$ a inkubována na ledu 10 min. Po centrifugaci 10 min. při 2000 RPM a 4°C, centrifuga Hettich Universal 320R, úhlový rotor 1620A byl supernatant odstraněn a peleta byla resuspendována v 1 ml sterilního 50 mM $CaCl_2$. Kompetentní buňky byly skladovány při teplotě 4°C po dobu jednoho týdne

5.3 Transformace buněk plasmidem

K 50 µl kompetentních buněk byl přidán 1 µl plasmidu (S genem kódujícím azurin *P. aeruginosa*, Az3WT) o koncentraci 61,64 $ng.\mu l^{-1}$. Současně byl připraven vzorek negativní kontroly, do kterého nebyl přidán plasmid ale sterilní H_2O použitá k eluci plasmidu. Vzorky byly ponechány 20 min. na ledu a následně byl proveden teplotní šok – buňky byly vystaveny teplotě 42°C po dobu 90 sekund (Cleaver Scientific Ultimate Dry Bath Incubator) s následnou inkubací na ledu po dobu 3 minut. Po přidaní 0,5 ml SOC

média (2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) kvasinkový extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$ a 20 mM glukosa) byly buňky inkubovány 1 hod. při 37°C a 200 RPM v inkubátoru IKA® KS 4000. Z této buněčné kultury bylo vyseto 100 µl na LB agarové plotny s finální koncentrací ampicilinu 100 µg/ml (Amp100). Agarové plotny byly inkubovány přes noc při teplotě 37°C v převrácené poloze. Po vyhodnocení byly plotny s pozitivní přítomností kolonií buněk uchovány při 4°C za tmy.

5.4 Příprava MM-M9 média

Minerální médium M9 se používá k inkorporace strukturních analogů některých aminokyselin (např. methioninu) do proteinu během rekombinantní exprese. Samotné médium neobsahuje methionin.

Médium o objemu 50 ml bylo připraveno smísením 10 ml roztoku M9A (42 mM Na_2HPO_4, 22 mM KH_2PO_4, 18 mM NH_4Cl, 8,6 mM NaCl, autoklávováno), 1 ml 20% (w/v) glukosy (připraveno ve sterilní vodě a filtrováno přes 0,22 µm filtr), 250 µl 1 M $MgSO_4$ (autoklávováno), 500 µl 1% (w/v) thiaminu (vit. B_1, připraveno ve sterilní vodě a filtrováno přes 0,22 µm filtr), 50 µl 0,1 M $CaCl_2$ (autoklávováno), 5 ml směsí aminokyselin (0,5 mg/ml L-Ile, L-Val, L-Leu, 1 mg/ml L-Lys, L-Phe, L-Thr, připraveno ve sterilní vodě a filtrováno přes 0,22 µm filtr), 50 µl roztoku kovů (80,6 mM EDTA, 2,15 mM $CoCl_2 . 6H_2O$, 92,5 mM $FeSO_4 . 7H_2O$, 1,56 mM $ZnSO_4 . 7H_2O$, 13,5 mM $CuSO_4 . 5H_2O$, 10,6 mM $MnCl_2 . 4H_2O$, 1,62 mM H_3BO_3, pH 7,5, autoklávováno), 50 µl ampicilinu o zásobní koncentraci 100 mg/ml (připraveno ve sterilní vodě a filtrováno přes 0,22 µm filtr) a celý roztok byl doplněn sterilní deionizovanou vodou na objem 50 ml.

5.5 Růst buněk a exprese proteinu v LB mediu a MM-M9

Jedna kolonie z agarové plotny byla inokulována do 10 ml LB media s Amp100. Následovala inkubace přes noc při 37°C. Potom 200 µl noční kultury bylo přeneseno do 50 ml LB media (Amp100) v 250 ml erlenmeyerových baňkách a buňky byly inkubovány při 37°C a 200 RPM v inkubátoru IKA® KS 4000. Průběh růstu byl spektrofotometricky sledován stanovením optické denzity roztoku buněk při vlnové délce 600 nm (měření v 10 mm kyvetě). Pro expresi v MM-M9 po dosažení hodnoty OD600 ~0,6 byly buňky sklizeny centrifugací 10 min. při 5000 RPM a 4°C, centrifuga Hettich Universal 320R,

úhlový rotor 1620A. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v PBS (z angl. Phosphate Buffered Saline, 10 mM Na_2HPO_4, 1,8 mM KH_2PO_4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4). Promytí bylo zopakováno třikrát a potom buňky byly resuspendovány v 50 ml MM-M9. Po 20 minutové inkubaci byl do media přidán roztok Met/foto-Met (finální koncentrace 30/50 mg/l). Při expresi v LB byl tento krok vynechán a exprese probíhala ve stejném mediu jako růst buněk. Byl odebrán vzorek v čase 0 pro elektroforézu a do buněčné kultury byl přidán isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG, finální koncentrace 0,5 mM), který působí jako induktor exprese rekombinantního proteinu. Následovala inkubace buněk při 30°C a 180 RPM v inkubátoru IKA® KS 4000. Po 1, 2 a 20 hodinách byly odebírány vzorky pro elektroforézu. Po 20 hodinách byla produkce ukončena sklizením buněk centrifugací 10 min. při 5000 RPM a 4°C, úhlový rotor 1620A. Po odebrání supernatantu byla peleta resuspendována v 20 ml 20% (w/v) roztoku sacharosy (20 mM Tris-Cl a 1 mM EDTA, pH 8,1). Po 30 minutové inkubaci za pokojové teploty byl roztok sacharosy odstraněn centrifugací 10 min. při 9000 RPM a 4°C, úhlový rotor 1620A a buněčné pelety byly skladovány při -20°C.

V případě některých experimentů byly použity jiné, méně optimální podmínky. Informace o těchto změnách je uvedena v kapitolách 6.2, 6.3 a 6.5, str. 34, 35 a 39 vedle jednotlivých experimentů.

5.6 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného

Z angl. Sodium DodecylSulfate – PolyacrylAmid Gel Electrophoresis, SDS-PAGE.

5.6.1 Příprava vzorku pro elektroforézu

Během produkce rekombinantního proteinu v expresním systému *E. coli* byly z buněčné suspenze odebírány 0,5 ml vzorky buněčné kultury do mikrozkumavek. Vzorky byly následně centrifugované na stolní minicentrifuze Eppendorf miniSpin Plus po dobu 2 min při 14500 RPM. Supernatant byl opatrně odebrán pipetou a peleta byla resuspendována v 40 µl deionizované H_2O a 10 µl 5x koncentrovaného redukujícího pufru (10% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 30 mM Tris-Cl, pH 6,8, 0,25% (w/v) bromfenolová modř, 10% (w/v) 2-merkaptoethanol). Potom byly vzorky zamraženy při -20°C, rozmraženy, sonikovány (sonikátor Hielscher UP100H, 1 s puls, amp. 40%) po dobu 30 s a následně přibližně 5 minut zahřáty na 99°C (inkubátor Cleaver Scientific Ultimate Dry Bath

Incubator). Po krátké centrifugaci na minicentrifuze (14500 RPM, 10 sec), bylo do každé jamky nanášeno 18 µl vzorku v případě SDS-PAGE o šířce gelu 0,75 mm.

5.6.2 Příprava polyakrylamidového gelu a průběh elektroforézy

Separace byla prováděna na polyakrylamidovém gelu. Gel se skládal z 5 ml 15% dělícího gelu a 2 ml 5% zaostřovacího gelu, jejichž složení je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1: složení polyakrylamidových gelu.

Složka	15% dělicí gel	5% zaostřovací gel
	objem složky (ml)	
	1,1	1,4
30% (w/v) směs akrylamidu	2,5	0,33
1,5 M Tris-Cl (pH 8,8)	1,3	-
1,0 M Tris-Cl (pH 6,8)	-	0,25
10% (w/v) SDS	0,05	0,02
10% (w/v) peroxodisíran amonný	0,05	0,02
Tetramethylethylendiamin	0,004	0,004

Jako standard byl použit PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific) podle návodu přiloženého výrobcem. Elektroforéza probíhala s konstantním limitním proudem 20 mA na jeden gel. Byla použita aparatura Bio Rad mini Protean II nebo Hoefer Mighty Small S260.

5.6.3 Vizualizace proteinů analyzovaných SDS-PAGE

Po dokončení elektroforézy byly proteiny vizualizovány pomocí barvení Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25% (w/v) CBB, 50% (v/v) ethanol a 10% (v/v) kys. octová) a následným odbarvením v odbarvovacím roztoku (35% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kys. octová). Druhým používaným způsobem vizualizace bylo barvení stříbrem dle následujícího postupu. Gel byl nejprve fixován po dobu jedné hodiny v roztoku 50% (v/v) methanolu, 12% (v/v) kyseliny octové a 5 mM formaldehydem. Následně byl gel proplachován 3x 5 min. roztokem 50% (v/v) ethanolu. Další jednu minutu byl gel

senzitivizován pomocí preparačního roztoku $Na_2S_2O_3$. 5 H_2O o koncentraci 2 mg/l. Gel byl inkubován 20 min. v roztoku 0,1% (w/v) $AgNO_3$. Následovalo proplachování vodou trvající 2x 20 s. Vyvíjení probíhalo v roztoku Na_2CO_3 o koncentraci 60 g/l s přídavkem 5 mM formaldehydu a $Na_2S_2O_3$. 5 H_2O o koncentraci 40 mg/l. Vyvíjení probíhalo přibližně 10 minut a bylo zastaveno propláchnutím gelu deionizovanou vodou 2x 2 s a ponořením na 10 min. do 1,5% (w/v) roztoku EDTA.

Pro delší uchovávání byl gel přenesen do 1% (v/v) roztoku kyseliny octové a uchováván v temnu při 4°C.

5.7 Štěpení proteinu v gelu a analýza míry inkorporace foto-Met pomocí MS

MS lze použít ke stanovení relativní míry inkorporace analogu přirozených aminokyselin do struktury proteinu. Vzhledem k rozdílu hmotnosti mezi samotnou aminokyselinou a jejím strukturním analogem lze určit v MS spektru signály peptidu s přirozenou aminokyselinou a peptidu se strukturním analogem. Porovnáním ploch pod jednotlivými signály *m/z* v MS spektru pak lze určit relativní míru inkorporace analogu.

Pro provedení MS bylo třeba nejprve připravit vzorky proteinu. Proužky na gelu byly vyříznuty skalpelem a nakrájeny na malé kostičky. K odbarvení CBB-R250 bylo ke kostičkám gelu přidáno 160 µl 50 mM ethylmorfolinu (EtMf) v 50% (v/v) acetonitrilu (ACN) a vzorek byl inkubován v sonikační lázni až do odbarvení. Po odbarvení byly kousky gelu propláchnuty 80 µl ACN. Pro redukci cysteinových můstku byl k vzorků přidán 30 mM roztok tris(2-karboxyethyl)fosfinhydrochloridu (TCEP) ve 100 mM EtMf, pH 8,1 a po dobu 15 min. inkubován při teplotě 70°C. Po inkubaci byl vzorek znovu propláchnut 80 µl ACN a pak převeden do roztoku 30 mM jodacetamidu v 100 mM EtMf, pH 8,1 a ponechán 1 hodinu ve tmě při laboratorní teplotě. Po modifikace cysteinů byly kousky gelu propláchnuty ACN a vodou a po zopakování oplachu ACN a vodou byl vzorek převeden do 50% (v/v) roztoku ACN ve vodě. Vzorek byl vysušen na rotačním vakuovém koncentrátoru Labconco CentriVap® micro IR a bylo k němu přidáno 14 µl štěpícího pufru (50 mM EtMf, pH 8,1, 10% (v/v) ACN) a 1 µl endoproteasy LysC (roztok s koncentraci 0,1 g/l, Roche) a vzorek byl inkubován přes noc při 37°C.

Vzniklé peptidy z proteinu byly ze vzorku extrahovány přídavkem acetonitrilu (finální koncentrace 40% (v/v)) a kys. trifluoroctové (TFA, finální koncentrace 0,1% (v/v)). Po

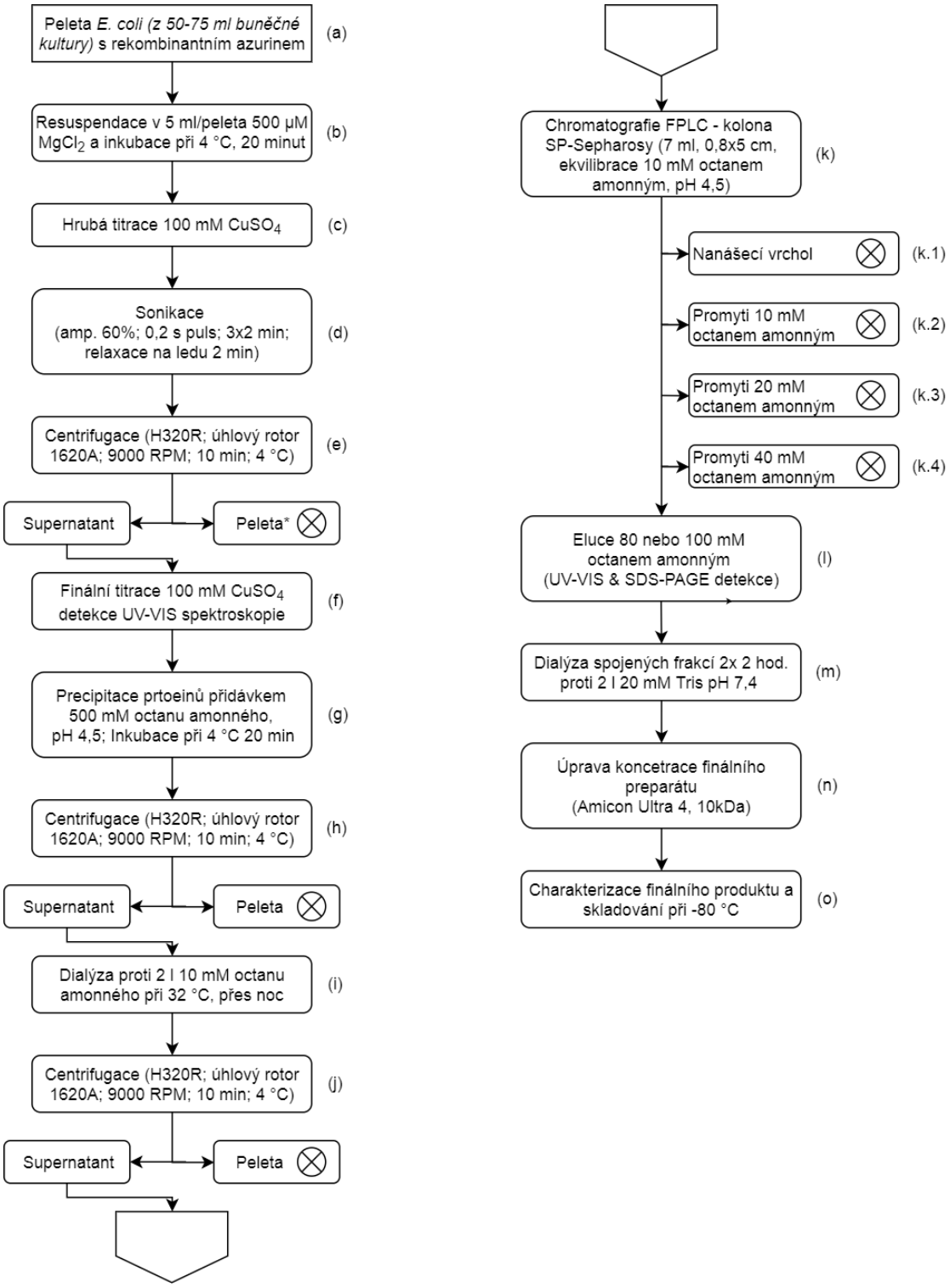
15 minutové sonikaci bylo naneseno na MALDI terčík 0,4 µl vzorku pro měření MALDI-TOF MS a po zaschnutí byly pozice převrstveny 0,4 µl roztoku matrice (3 mg/ml α-kyano-4-hydroxy skořicové kyseliny v 50% (v/v) ACN a 0,1% (v/v) TFA). Spektra byla měřena na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Bruker Daltonics Ultraflex III s pomocí školitele. MS spektra byla vyhodnocena manuálně s využitím známé sekvence konstruktů, viz obr. 8.

```
01    MLRKLAAVSL LSLLSAPLLA AECSVDIQGN DQMQFNTNAI TVDKSCKQFT
51    VNLSHPGNLP KNVMGHNWVL STAADMQGVV TDGMASGLDK DYLKPDDSRV
101   IAHTKLIGSG EKDSVTFDVS KLKEGEQYMF FDTFPGHSAL FKGTLTLK
```

Obr. 8: sekvence konstruktu přirozeného proteinu azurinu. Červeně je vyznačena odštěpovaná N-terminální vedoucí sekvence.

5.8 Izolace exprimovaného rekombinantního proteinu

Na schématu (viz obr. 9) je zobrazen optimalizovaný postup purifikace. Při některých izolacích nebyly začleněny do postupu některé kroky. Tyto odchylky jsou popsány v kapitolách 6.6, 6.7 a 6.8, str. 39 a 44 vedle jednotlivých experimentů.



Obr. 9: Podrobné schéma izolaci azurinu.

Legenda (viz schéma na obr. 9, str. 31):

- * - v případě, že tato peleta je větší lze jí znovu resuspendovat v 5 ml 500 μM $MgCl_2$ a zopakovat postup od hrubé titrace $CuSO_4$ (bod c).
- Jsou uvedeny objemy na 1 buněčnou peletu z 50 ml media.
- Při centrifugaci (body e, h, j) byla použita centrifuga Hettich Universal 320 R, úhlový rotor 1620A.
- Byl použit sonikator Bandelin Sonopuls, sonda KE-76 (bod d).
- Při promytí kolony (bod k) byly vždy použité dva objemy kolony.
- Symbolem ⊗ jsou označeny dále nepoužité frakce.

5.9 Stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny

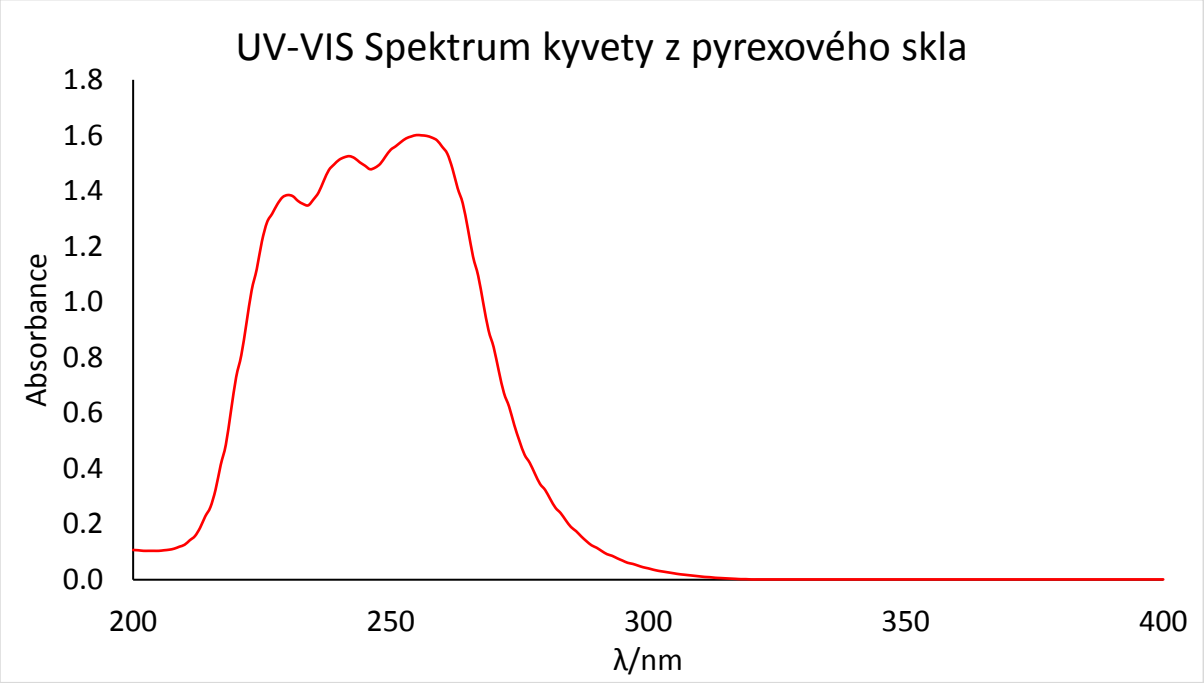
Celková koncentrace proteinu ve finálním preparátu byla stanovena pomocí bicinchoninové kyseliny (angl. bicinchoninic acid, BCA). Nejprve byl v objemovém poměru 49:1 smíchán zásobní roztok bicinchoninové kyseliny (BCA A) a roztok $CuSO_4$. $5H_2O$ (BCA B). Na mikrotitrační destičku bylo vždy nanášeno v duplikátech 5 μl vody (kontrola), standardu a vzorku. Do každé jamky pak bylo přidáno 95 μl výše připraveného BCA činidla. Před analýzou byly některé vzorky ředěny, aby získané hodnoty absorbance při 562 nm byly v rozsahu 0,1 – 1,0. Jako standard byly využity roztoky hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci proteinu (c_p) 1; 0,5; 0,2 a 0,1 mg/ml. Destička byla potom inkubována při 37°C 1 hod. Absorbance při 562 nm byla měřena pomocí spektrofotometru DeNovix (v mikroobjemu) nebo na čtečce destiček Multiskan bio (Thermo Scientific). Pomocí získané kalibrační přímky BSA (uvedena vedle jednotlivých experimentů v kapitole výsledky) byla stanovena koncentrace proteinu ve vzorcích.

5.10 Experimenty PIXL

Získané Az preparáty byly studovány pomocí metodiky PIXL.

Informace o složení jednotlivých vzorků je uvedena v kapitole 6.10, str. 46. V experimentu byl použit fotolyzér Oriel (PhotoMax Lamp Housing (60100-M), Arc Lamp Power Supply (68806-M), Electronic Safety Shutter (71445-M), Mercury Arc Lamp, 100 W (6281)). Vzorky byly fotolyzovány v křemenné kapiláře, která byla umístěna do kyvety

z pyrexového skla s vodou jejímž účelem bylo odstranění vysoce destruktivního záření o vlnové délce <280 nm jak ilustruje absorpční UV-VIS spektrum kyvety na obr. 10. Současně voda v kyvetě zajišťovala přenos tepla (chlazení vzorku) z chlazeného kyvetového prostoru, v kterém byla kyveta uchycena. Po ozáření v délce 0-2 min byly změřeny UV-VIS spektra vzorku (DeNovix DS-11+, mikroobjem) a provedena elektroforéza.



Obr. 10: Spektrum pyrexové kyvety, do které byla umístěna kapilára se vzorkem. Kyveta pohlcuje destruktivní záření o vlnové délce <280 nm.

6 Výsledky

6.1 Transformace buněk plasmidem

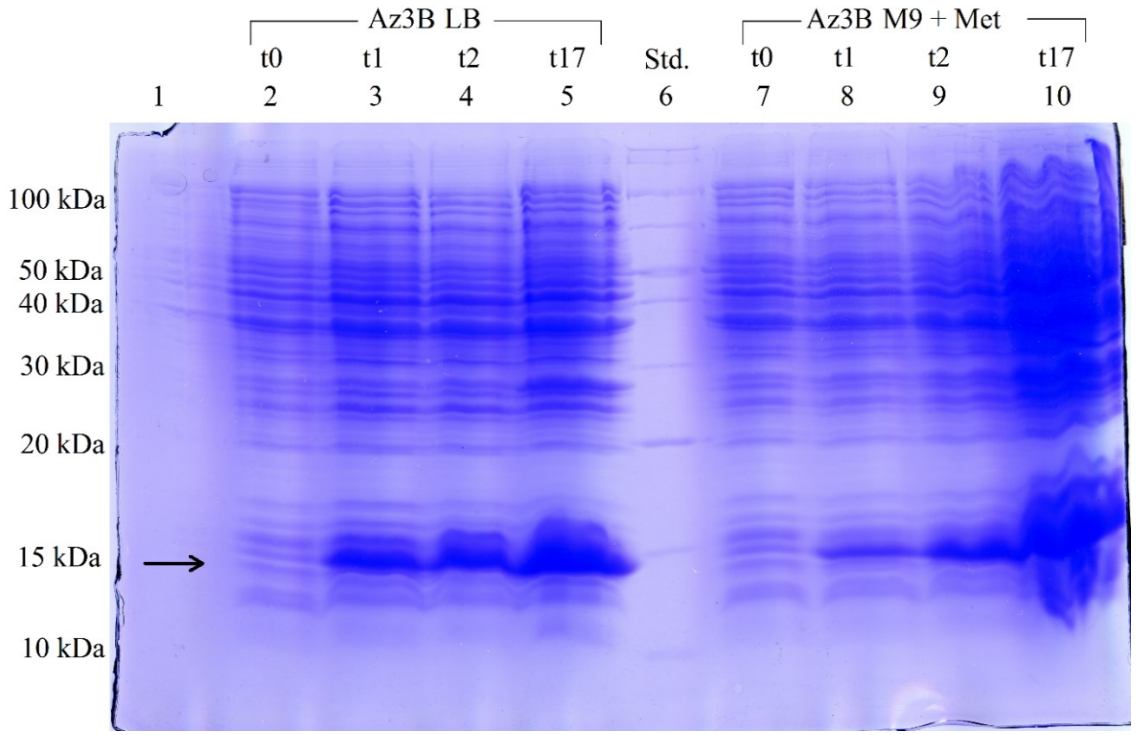
Buňky *E. coli* B834 byly úspěšně transformovány plazmidem Az3 nesoucím gen kódující přirozený (angl. „wild-type“) protein *P. aeruginosa* azurin (viz obr. 4, str. 15). Plazmid nesl ampicilinovou resistenci. Na agarové plotně s koncentrací antibiotika 100 μg/ml (Amp100) byl získán po transformaci buněk pozitivní nárůst 50-100 kolonií, z nichž byly náhodně vybrány pro další experimenty dva klony. Na kontrolních plotnách, do kterých byla přidaná voda místo plazmidu, nedošlo k nárůstu žádné kolonie.

Abychom zjistili, zda je plazmid funkční a buňky jsou schopné produkovat Az v LB mediu a v minerálním mediu M9 s methioninem (50 mg/l) byla nejprve provedena exprese proteinu u těchto dvou náhodně zvolených kolonií (Az3A a Az3B)

6.2 Exprese azurinu v LB a MM-M9 s methioninem

Množství 250 μl noční kultury klonů Az3A a Az3B bylo inokulováno do 30 ml LB media (Amp100). Za 6 hodin inkubace při 37°C a 190 RPM byla dosažena hodnota OD600 0,606 (vzorek Az3A) a 0,585 (vzorek Az3B). Bylo odebráno 5 ml z každého klonu pro expresi v LB mediu a ostatní buňky byly sklizeny centrifugací (H320R, úhlový rotor 1620A, 9000 RPM, 10 min, 4°C) a LB medium bylo odstraněno dvojnásobným promytím PBS. Tyto buňky byly použity pro expresi v MM-M9. Byly odebrány vzorky v čase 0 pro elektroforézu a do buněčné kultury byl přidán IPTG (finální koncentrace 0,5 mM). Exprese proteinu probíhala při 37°C a 190 RPM. Po 1, 2 a 17 hodinách byly odebírány vzorky pro elektroforézu. Po 17 hodinách byla exprese ukončena.

Odebrané vzorky byly analyzovány pomoci SDS-PAGE. V případě obou zvolených klonů došlo ke srovnatelné expresi proteinu (proteinový proužek o MW ~15 kDa na SDS-PAGE, viz polohu šipky) s výrazným nárůstem exprese ve vzorku po 17 hodinách, jak ilustruje obr. 11, str. 35. V LB mediu došlo k nárůstu exprese již po 2 hodinách oproti synthése proteinu v MM-M9 mediu, kde množství proteinu výrazně stouplo pouze po uplynutí 17 hodin.



Obr. 11: 15% polyakrylamidový elektroforetický gel barvený CBB-R250 ukazuje expresi klonů Az3B v LB a M9 + Met mediích. V dráze 6 je standard molekulové hmotnosti. V drahách 2, 3, 4 a 5 je ukázán růst v LB, v drahách 7, 8, 9 a 10 růst v M9 + Met. Jednotlivé frakce byly odebírány v časech 0, 1, 2 a 17 hod. po přidání IPTG. Šipka označuje relativní mobilitu odpovídající molekulové hmotnosti azurinu.

Oba klony vykázaly produkci azurinu jak v LB, tak i v M9 + Met. Jak klon A tak i klon B prokázaly velmi blízké hodnoty optické denzity a vizuálně podobně silné proužky azurinu na gelu. Pro další experimenty byl zvolen klon A.

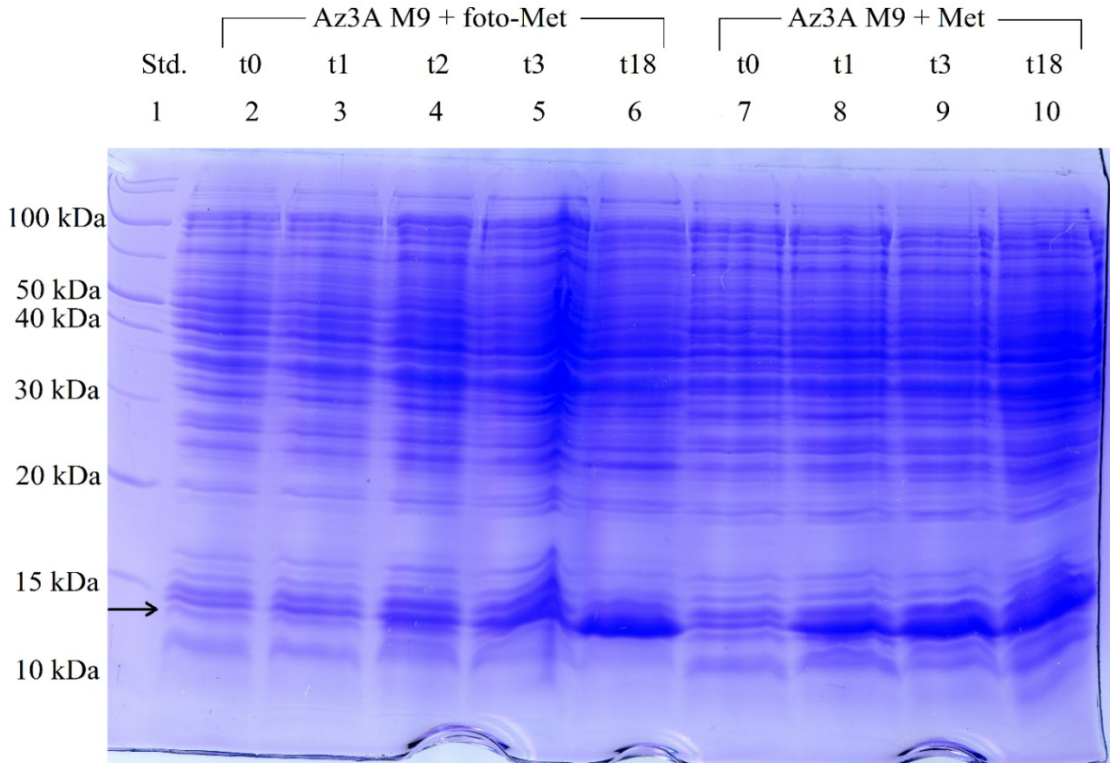
6.3 Exprese azurinu v MM-M9 + foto-Met

Po úspěšné expresi v MM-M9 mediu s methioninem byla provedena další exprese s použitím strukturního analogu foto-Met.

Byl použit analogický postup jako v předchozím experimentu. Množství 250 µl noční kultury klonu Az3A bylo inokulováno do 25 ml LB v 50 ml sterilní PE zkumavce a inkubováno při 37°C. Za 5 hodin, po dosažení OD600 0,650 byl ukončen růst a LB medium bylo nahrazeno MM-M9 pomocí 2x promytí PBS. Během promytí 1,5 ml kultury bylo odebráno pro Met-kontrolu a peleta z těchto buněk byla resuspendována v 3 ml

M9 + Met (50 mg/l). Zbytek kultury byl po promytí resuspendován v 25 ml MM-M9 a po 15-minutové inkubaci byl přidán roztok foto-Met (finální koncentrace 30 mg/l). Byly odebrány vzorky v čase 0 pro elektroforézu a do buněčné kultury byl přidán IPTG (finální koncentrace 0,05 mM). Poté byl protein exprimován při 30°C a 190 RPM snížením teploty při expresi proteinu jsme chtěli omezit pozorovanou degradaci azurinu. Po 1, 2, 3 a 18 hodinách inkubaci byly odebírány vzorky pro elektroforézu.

Odebrané vzorky byly analyzovány pomoci SDS-PAGE. V obou mediích došlo k srovnatelné expresi proteinu (proteinový proužek o molekulové hmotnosti ~15 kDa na SDS-PAGE, viz poloha šipky na obr. 12) po 18 hodinách. Azurin se úspěšně produkoval jak v mediu s přirozeným Met, tak i s foto-Met. Narůst exprese v MM-M9 mediu s foto-Met byl pomalejší než v mediu s Met (V mediu s foto-Met – vzorek t1 v dráze 3 – není pozorován žádný proteinový proužek Az, v mediu s Met – vzorek t1 v dráze 8 – je nárůst pozorovatelný po 1 hodině exprese).



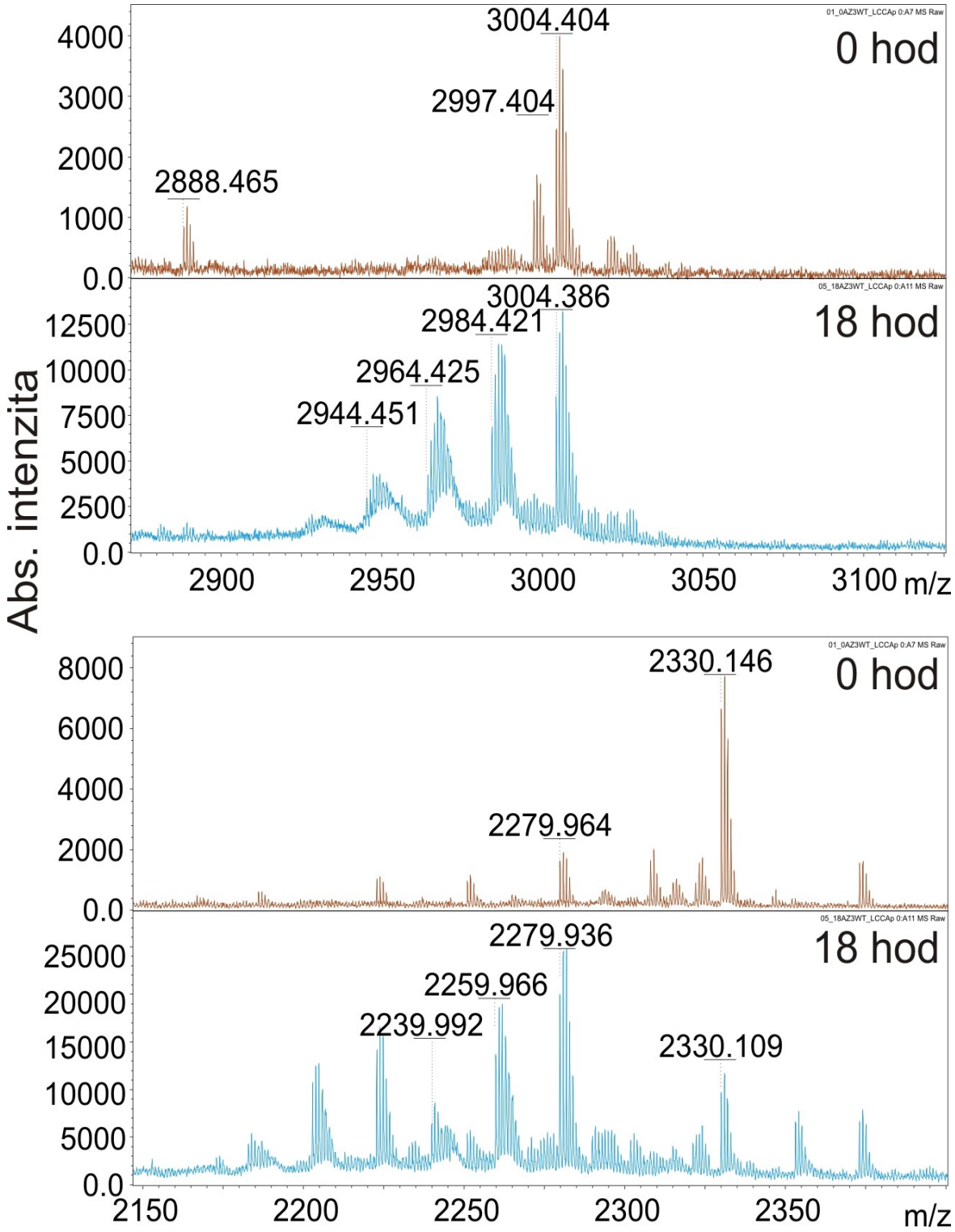
Obr. 12: 15% polyakrylamidový elektroforetický gel barvený CBB-R250 ukazuje expresi Azurinu v klonu Az3A v MM-M9 s Met a foto-Met. V dráze 1 je standard molekulové hmotnosti. V drahách 2-6 je ukázán růst v M9 + foto-Met, v drahách 7-10 růst v M9 + Met. Jednotlivé frakce byly odebírány v časech 0, 1, 2, 3 a 18 hod. po přidání IPTG. Šipka označuje relativní mobilitu odpovídající molekulové hmotnosti azurinu.

Při této expresi byla chybně použita nižší koncentrace IPTG (0,05 mM místo 0,5 mM), což vedlo k výraznému snížení výtěžku produkci rekombinantního proteinu oproti předchozí expresi.

Těmito experimenty byla ověřena funkčnost metody exprese rekombinantních proteinů Azurinu se zavedeným strukturním foto analogem aminokyseliny v buňkách *E. coli* B834. Dále byla stanovena míra inkorporace foto-Met pomoci MS, aby na základě získaných výsledků, byl postup exprese optimalizován k získání proteinu s maximální inkorporací foto-Met.

6.4 Štěpení proteinu v gelu a analýza míry inkorporace foto-Met pomocí MALDI-TOF MS

Z gelu byly vyříznuté proužky odpovídající vzorkům odebraným při expresi v MM-M9 + foto-Met v časech 0 a 18 hod. Štěpení proteinu v gelu bylo provedeno dle postupu, který je popsán v kapitole 5.7, str. 29. Po odbarvení gelu byly cysteinové postranní řetězce analyzovaných proteinových proužků redukovány a následně modifikovány. Po štěpení endoproteasou LysC při 37°C přes noc proběhla analýza vzorku metodou MALDI-TOF MS školitelem.



Obr. 13: Výsledky analýzy míry inkorporace MALDI-TOF MS. Nahoře: peptid s *m/z* 3004,404 (42-70 aminokyselina), dole: peptid s *m/z* 2279,936 (104-122 aminokyselina). Stanovení bylo provedeno ve vzorku buněčného lyzátu (po 18 hod exprese s IPTG) po separaci Az pomoci SDS-PAGE. Proteiny byly štěpeny endopeptidasou LysC z *S. aureus*.

MS spektra dvou peptidů s Met v sekvenci jsou uvedena na obr. 13, str. 38. Již v čase 0 hod byl naměřen signál odpovídající peptidům z Az. Po přidání IPTG a uplynutí 18 hod pozorujeme výrazný nárůst intenzity signálu. Kromě původního signálu dochází k detekci signálů s hodnotou *m/z* nižší o 20 hmotnostních jednotek, které odpovídá náhradě Met za jeden foto-Met v sekvenci peptidu [22]. Peptid 42-70 (*m/z* 3004,404; obr. 13, str. 38, záznam nahoře) má tři Met a můžeme u něho pozorovat čtyři vrcholy, které odpovídají postupné náhradě jednoho Met za foto-Met. Obdobně u peptidu 104-122 (*m/z* 2279,936; obr. 13, str. 38, záznam dole), který obsahuje dva Met, pozorujeme tři signály s odpovídající hodnotou *m/z*. Výsledky analýzy míry inkorporaci jsou uvedeny v tabulce 2. V buněčném lyzátu lze pozorovat míru inkorporace foto-Met až ~70%.

Tabulka 2: Výsledky stanovení míry inkorporace foto-Met v buněčném lyzátu.

Vzorek	Procento relativní inkorporace foto-Met (%)		
Stanoveny *m/z* signál [$M+H^+$]	2279,9928	2698,2089	3004,3967
Sekvence peptidu	104-122	1-24	42-70
Buněčný lyzát (18 hod IPTG)	62	34	72

6.5 Optimalizace exprese

Na základě výsledku MS analýzy školitelem byla provedena optimalizace podmínek a postupu při expresi rekombinantního Az v minerálním mediu M9 s foto-Met. Nejvyšší inkorporace foto-Met do struktury Az byla dosažena při použiti 3x promytí PBS a expresi proteinu při 30°C, 18-20 hod.

Za použíti optimalizovaných podmínek byla provedena exprese azurinu v 6x 50 ml MM-M9 media s přídavkem foto-Met a indukcí exprese proteinu 0,5 mM IPTG. Postup je popsán v kapitole 5.5, str. 26. Oproti tomuto postupu po expresi proteinu nebyla provedena inkubace buněk v roztoku sacharosy. Proto při izolaci nebyla provedena lýze buněk osmotickým šokem, ale pouze sonikací.

6.6 Izolace „wild-type“ azurinu exprimovaného v MM-M9 + foto-Met

Pelety buněk *E. coli* B834 s exprimovaným azurinem byly použity pro purifikaci podle postupu, jehož schéma je uvedeno na obr. 9, str. 31. Vzhledem k tomu, že na obrázku je

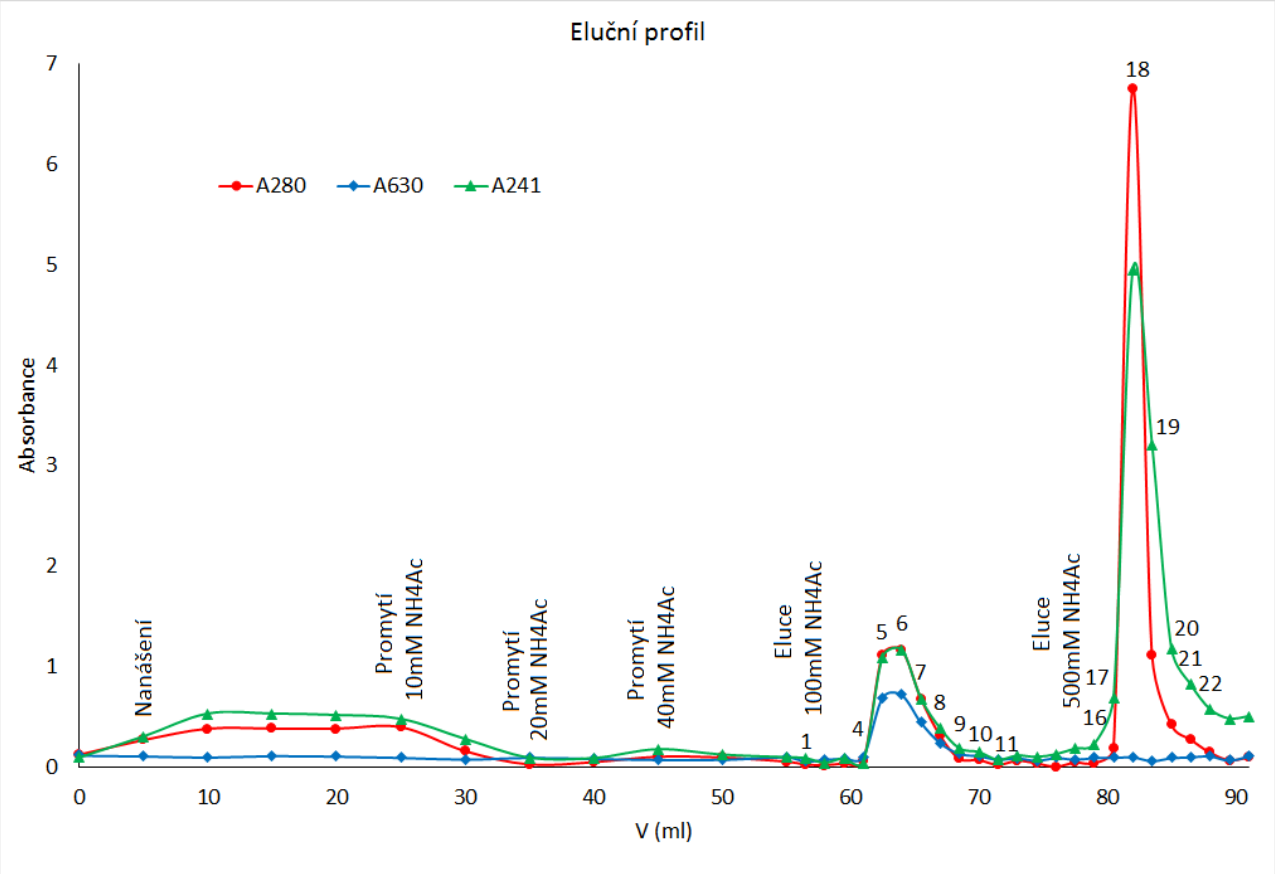
schéma finálního optimalizovaného postupu, při prvních izolacích došlo k několika odchylkám, než byl nalezen nejvýhodnější postup.

Buněčné pelety byly zvolna rozmraženy na ledu a resuspendovány v studeném roztoku 500 μM $MgCl_2$ (v poměru 5 ml/peleta). Buňky pak byly inkubovány 20 min. na ledu. Po předpokládané lýzi následovala centrifugace 20 min. při 9000 RPM a 4°C, centrifuga Hettich Universal 320R, uhlový rotor 1620A. Po centrifugaci ve zkumavce zůstala velká peleta, která naznačovala neúspěšnost lýze buněk. Proto byla peleta znovu resuspendována a buněčná suspenze byla sonikována na ledu sonikátorem Bandelin Sonopuls se sondou KS-73 4x 20 s. a 1 min. relaxace mezi jednotlivými pulsy na ledu. Sonda byla nastavena na výkon 55 W; amp. 60%; puls 0,2s. Buňky byly znovu centrifugovány za stejných podmínek. Supernatant byl odebrán, peleta byla znovu resuspendována v 4 ml 500 μM $MgCl_2$ a rozbití buněk sonikací bylo zopakováno ještě dvakrát.

Exprimovaný Az ještě nemusel obsahovat kovový ligand v dostatečné míře. Proto byla provedena titrace Cu^{2+} za účelem dostatečné inkorporaci iontu kovu do struktury aktivního centra proteinu. Získané supernatanty byly spojené do jedné zkumavky a titrovány 100 mM $CuSO_4$ dle UV-VIS detekce. Titrace byla ukončena v okamžiku, kdy hodnota absorpčního maxima při 240 nm (absorpční maximum roztoku $CuSO_4$) byla vyšší než hodnota absorpčního maxima proteinu při vlnové délce 280 nm. Potom k roztoku bylo po kapkách v průběhu 5 minut přidáno 2,5 ml 500 mM octanu amonného, s následnou úpravou hodnoty pH na 4,5 pomocí 50 μl kys. octové a roztok byl inkubován 20 min. na ledu. Precipitát byl odstraněn centrifugaci 20 min. při 9000 RPM a 4°C, centrifuga Hettich Universal 320R, uhlový rotor 1620A. Supernatant byl odebrán pro další zpracovaní a peleta byla resuspendována v 5 ml vody a 80 μl bylo odebráno jako vzorek na elektroforézu. K supernatantu bylo přidáno ještě 200 μl 100 mM $CuSO_4$ a následovala inkubace přes noc při 32°C.

Po inkubaci bylo třeba oddělit získaný azurin od precipitátu a nadbytečného $CuSO_4$. Nejprve byl vzorek centrifugován 20 min. při 9000 RPM a 4°C, centrifuga Hettich Universal 320R, uhlový rotor 1620A. Supernatant byl následně dialyzován 4x proti 800 ml 10 mM octanu amonného, pH 4,5. Peleta byla resuspendována ve vodě a využita jako vzorek na elektroforézu. Po dialýze byl vzorek ještě jednou centrifugován a supernatant byl separován rychlou proteinovou kapalinovou chromatografii (FPLC, z angl. Fast Protein Liquid Chromatography) na koloně SP-sepharosy (7 ml nosiče, kolona 0,8x5 cm,

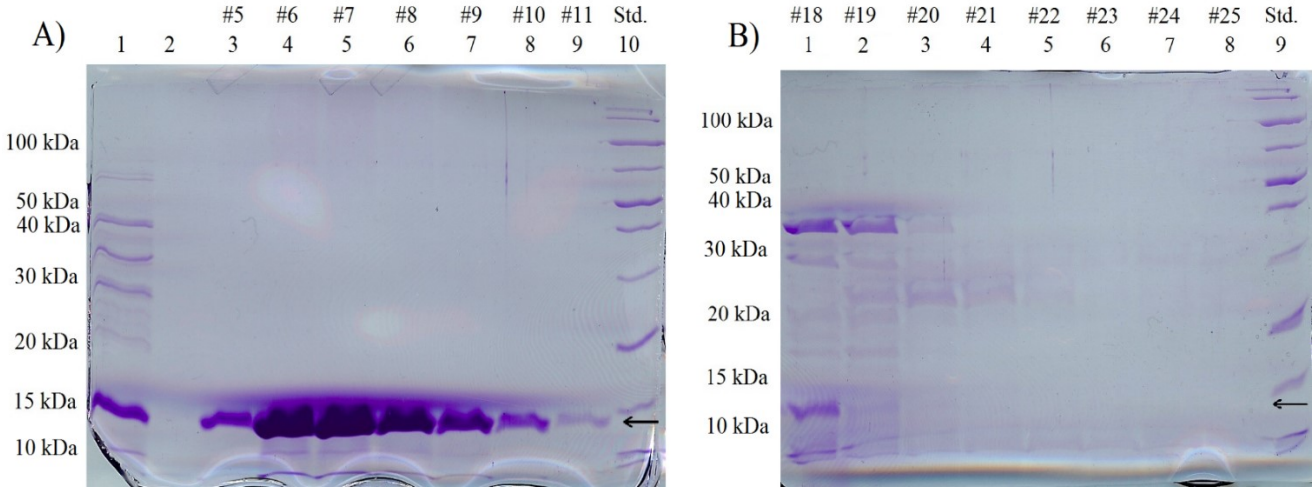
ekvilibrace 10 mM octanem amonným, pH 4,5). V průběhu nanesení a vymytí byly jímány frakce po 5 ml. Kolona byla postupně promyta 10 ml dávkami 10, 20 a 40 mM octanu amonného. U každé frakce bylo změřeno spektrum (DeNovix, v mikroobjemu). Azurin byl následně eluován 100 mM octanem amonným (14 frakcí po 1,5 ml) a poté 500 mM octanem amonným (11 frakcí po 1,5 ml). UV-VIS spektra získaných frakcí byla také proměřena na spektrofotometru DeNovix (mikroobjem). Na základě získaných spekter byl vytvořen eluční profil, který je uveden na obr. 14.



Obr. 14: Eluční profil FPLC chromatografie na koloně SP-Sepharosy (7 ml nosiče, kolona 0,8x5 cm, ekvilibrace 10 mM octanem amonným, pH 4,5). Na grafu jsou označeny vybrané frakce.

Na profilu jsou vidět tři vrcholy. První z nich je pozorován ještě při nanášení vzorku a promytí kolony 10 mM octanem amonným. U tohoto vrcholu nepozorujeme narůst absorbance při 630 nm. Lze předpokládat, že tento pík odpovídá kontaminujícím proteinům, které se nezachytily na koloně nebo se zachytily jen slabě a byly vymyty. Druhý vrchol je pozorován při eluci proteinů 100 mM octanem amonným. Pozorujeme ho mezi frakcemi 5-10 (elační objem 60-70 ml). Tento pík vykazuje absorbanci při všech

třech vlnových délkách a odpovídá eluci azurinu. Poslední vrchol je pozorován na konci eluce (frakce 17-22, elační objem 80-90 ml). Vykazuje vysoké hodnoty absorbance při 280 a 241 nm a není zde pozorováno maximum absorbance při 630 nm. Tento elační vrchol odpovídá dalším balastním proteinům a volným iontům Cu^{2+}. Frakce, které vykazovaly absorbanci při 280 a 630 nm (charakteristické vlnové délky pro proteiny a azurin), byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (viz obr. 15)

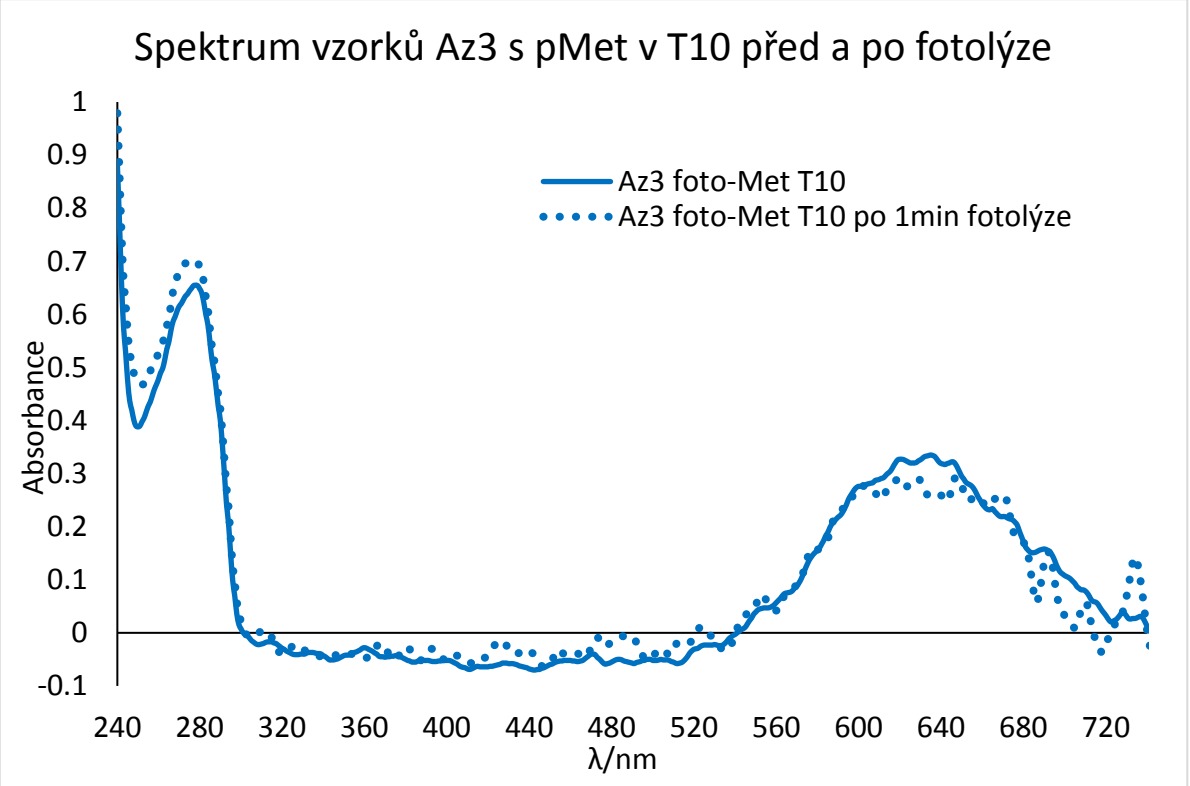


Obr. 15: 15% polyakrylamidové elektroforetický gel barvený CBB-R250 zobrazující výsledky chromatografie na koloně SP-Sepharosy. A) V dráze 1 je vzorek, který byl nanesen na kolonu; v dráze 2 je vzorek ze spojeného nanášecího vrcholu (15-30 ml); v drahách 3-9 jsou frakce 5-11; v dráze 10 je standard molekulové hmotnosti. B) V drahách 1-8 jsou frakce 18-25; v dráze 9 je standard molekulové hmotnosti. Na obou gelech šipka označuje relativní mobilitu odpovídající molekulové hmotnosti azurinu.

Na obr. 15, A je elektroforeogram frakcí, které představují druhý vrchol na elučním profilu. Šipka označuje relativní mobilitu odpovídající molekulové hmotnosti azurinu. Je vidět, že ve frakcích 5-11 je čistý azurin. Ve vzorku, který byl nanesen na kolonu (dráha 1), lze pozorovat řadu dalších proteinových proužků o vyšší hodnotě molekulové hmotnosti. Tyto proužky odpovídají kontaminujícím proteinům, které se podařilo oddělit na koloně SP-Sepharosy od eluovaných frakcích azurinu. Na obr. 15, B jsou frakce z třetího vrcholu na elučním profilu. Lze zde pozorovat, že frakce 18 ještě obsahovala menší množství azurinu. Ovšem navíc obsahovala i řadu dalších kontaminujících proteinů, které se nacházejí i ve vzorku nanášeném na kolonu SP-Sepharosy (vzorek v dráze 1, obr. 15, A).

Na základě získaných elektroforeogramů SDS-PAGE, byly spojeny frakce 5-11 do jednoho vzorku. V následujícím kroku bylo třeba převést azurin do vhodného pufru. Vzorek byl dvakrát dialýzován proti 2 litrům 50 mM Tris-Cl (pH 7,4) pufru po dobu 2 hodin. Koncentrace finálního preparátu byla upravena pomocí koncentrátoru Amicon Ultra 4 (cut off 10 kDa).

Čistota finálního preparátu byla stanovena spektroskopicky. Z literatury je známo, že poměr absorbanci A_{630}/A_{280} u čistého Az je ~0,6 [29,30]. Získaný finální preparát dosáhl poměru hodnot A_{630}/A_{280} hodnoty 0,58. Spektrum finálního preparátu je uveden na obr. 16. Plnou čarou je zobrazeno spektrum preparátu převedeného do 10 mM Tris-Cl. Tečkovaná čára ukazuje spektrum téhož vzorku po PIXL experimentu s délkou fotolýzy 1 min (viz kapitolu 6.10, str. 46).



Obr. 16: spektrům finálního preparátu Az s foto-Met. Plná čára zobrazuje spektrum vzorku Az v 10 mM Tris-Cl. Tečkována čára je spektrum stejného vzorku po 1 min fotolýze. Poměr A_{630}/A_{280} u finálního preparátu činí 0,58. Po fotolýze je pozorován pokles A_{630} spojený se změnou redoxního stavu iontu mědi v aktivním centru.

6.7 Exprese v LB mediu a izolace

Pro srovnání při experimentech byl azurin exprimován i v LB mediu. Při expresi byl použit stejný postup jako v předchozím experimentu (viz kapitola 5.5, str. 26). Exprese byla provedena v 3x 50 ml LB media (Amp100) v 250 ml Erlenmayerových baňkách. Při této produkci bezprostředně po expresi byla do postupu zavedena inkubace buněk v 20% (m/v) roztoku sacharosy (50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4). Tento krok měl zvýšit účinnost osmotického šoku.

Izolace byla provedena dle identického postupu jako předchozí izolace azurinu s foto-Met. I přes účinnější osmotický šok byl v postupu ponechán krok rozbití buněk ultrazvukem. Čas sonikace byl navýšen na 4x 30 s. Ovšem při této izolaci sonikace byla provedena pouze jednou. Azurin byl titrován 100 mM $CuSO_4$, část proteinu byla vysrážená snížením pH na hodnotu pH 4,5 500 mM roztokem octanu amonného (pro zmírněni podmínek srážení v postupu nebyla použita titrace kys. octovou). Po převedení vzorku do 10 mM octanu amonného, pH 4,5 pomocí dialýzy byl azurin oddělen chromatografii FPLC dle stejného postupu. Eluční profil při separaci vypadal velmi podobně obr. 14, str. 41 a proto není zde uveden. Frakce azurinu byly spojeny, dvakrát dialyzovány proti 1 litru 50 mM Tris-Cl pufru, pH 7,4 po dobu 2 hodin a koncentrace finálního preparátu byla upravena pomocí koncentrátoru Amicon Ultra 4 (cut off 10 kDa).

Získaný azurin měl poměr absorbancí A_{630}/A_{280} 0,36. Pro vyhodnocení množství získaného Az bylo provedeno stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny.

6.8 Optimalizace postupu izolace

Pro získání většího množství azurinu pro další experimenty jsme provedli optimalizaci izolačního postupu. Optimalizace byla provedena na vzorku azurinu exprimovaného v LB mediu dle postupu popsanému v kapitole 5.5, str. 26. Experiment byl reprodukován od začátku a k expresi byly použité čerstvě transformované buňky. Exprese byla provedena v 3x 50 ml media (Amp100) v 250 ml Erlenmayerových baňkách.

Vzhledem k její účinnosti v postupu byla zachována inkubace buněk v 20% (m/v) roztoku sacharosy (50 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7,4). Po provedení osmotického šoku (krok (b) ve schématu na obr. 9, str. 31) k buněčné suspenzi byla přidána 1/50 celkového objemu 100 mM $CuSO_4$ (krok (c)). Tato hrubá titrace měla umožnit inkorporaci Cu^{2+} již při

sonikaci v následujícím kroku (d) a snížit precipitaci azurinu při přídavku 500 mM NH_4Ac v kroku (g). Vzhledem k tomu, že azurin nepodléhal denaturaci a nadbytečné precipitaci při sonikaci v předchozích experimentech, čas sonikaci byl navýšen na 3x 2 min s 2 min relaxací na ledu. Po sonikaci byl azurin titrován 100 mM $CuSO_4$ dle UV-VIS detekce.

Pro úsporu času kroky (i) a (g) byly spojeny do jednoho kroku (krok (h) byl následně vynechán). Ke vzorku byl přidán 500 mM octan amonný, pH 4,5 pro úpravu pH na 4,5. Následně byl vzorek dialyzován proti 2 litrům 10 mM octanu amonného přes noc při 32°C. Během této dialýzy došlo současně k precipitaci proteinu a inkorporaci Cu^{2+} do aktivního centra Az.

Izolace dále pokračovala dle kroků popsaných ve schématu. Sražené proteiny byly odděleny centrifugací a azurin byl purifikován pomocí FPLC chromatografie na koloně SP-sepharosy. V kroku (m) izolovaný protein byl převeden do 20 mM Tris-Cl, pH 7,4. Rozhodnuti použít pufr s menší koncentrací soli bylo založeno na experimentálních datech z nichž plyne, že vysoká koncentrace soli ovlivňuje tvorbu oligomeru azurinu.

6.9 Charakterizace finálního preparátu. Stanovení koncentrace proteinu ve finálních preparátech pomocí bicinchoninové kyseliny a inkorporaci foto-Met pomocí MS

Stanovení bylo provedeno dle postupu popsaného v kapitole 5.9, str. 32. Vzorky finálních preparátů (Az3 s Met a Az3 s foto-Met, kapitoly 6.6 a 6.7, str. 39 a 44) byly ředěny dvakrát a byly naneseny na destičku v duplikátech. Absorbance při 562 nm byla změřena na spektrofotometru DeNovix (v mikroobjemu). Výsledky stanovení jsou znázorněny v tabulce 3.

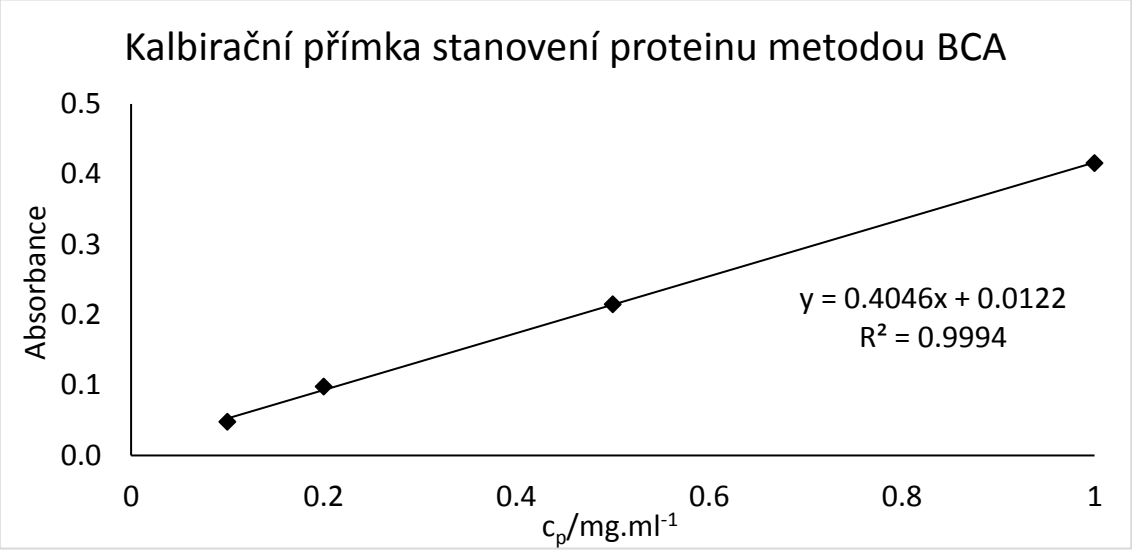
Tabulka 3: výsledky stanovení koncentraci proteinu ve finálních preparátech pomocí BCA s kalibrační přímkou s rovnicí $y = 1{,}2828x + 0{,}0826$ ($R^2 = 0{,}999$) stanovenou použitím BSA

Vzorek	A_{562} (1)	A_{562} (2)	$\bar{A}_{562}$	c_m (mg/ml)	Ředěni	$c_{m,finální}$ (mg/ml)
Az (foto-Met)	0,724	0,632	0,678	0,465	2x	0,929
Az (Met)	0,483	0,479	0,481	0,310	2x	0,621

Koncentrace proteinu ve finálním preparátu (kapitola 6.8, str. 44) byla stanovená pomocí BCA. Vzorek finálního preparátu byl ředěn dvakrát a nanesen na destičku v duplikátu. Absorbance při 562 nm byla změřena na čtečce destiček Multiskan bio (Thermo Scientific). Pro vyhodnocení byla použita kalibrační závislost uvedena na obr. 17. Výsledek stanovení je znázorněn v tabulce 4.

Tabulka 4: výsledky stanovení koncentraci proteinu ve finálním preparátu pomocí BCA

A_{562} (1)	A_{562} (2)	$\bar{A}_{562}$	c_m (mg/ml)	Ředění	$c_{m,finální}$ (mg/ml)
0,127	0,127	0,127	0,301	2x	0,602



Obr. 17: Kalibrační přímka stanovení koncentrace proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny – závislost absorbance na koncentraci hovězího sérového albuminu.

Míra inkorporace foto-Met ve finálním preparátu byla stanovena pomocí MALDI-TOF MS. Princip stanovení je popsán v kapitole 5.7, str. 29. Dle vypočtu ze všech tři analyzovaných peptidů míra inkorporace foto-Met činila 17%.

6.10 Experimenty PIXL

Z literatury jsme zjistili, že míra oligomerizace Az závisí na koncentraci Az a iontové síle prostředí [17]. Proto jsme tyto vlivy podmínek studovali pomocí metodiky PIXL.

PIXL experimenty byly provedeny s finálním preparátem Az3 s foto-Met. (viz kapitola 6.6, str. 39).

Při prvním experimentu byl studován vliv množství proteinu na tvorbu oligomeru při fotolýze. Vzhledem k tomu, že finální preparát byl uchováván v 50 mM Tris-Cl, některé vzorky byly naředěny příslušným způsobem tak aby proteiny byly v protstředi 20 mM Tris-Cl. Vzorky byly připraveny dle následujícího seznamu:

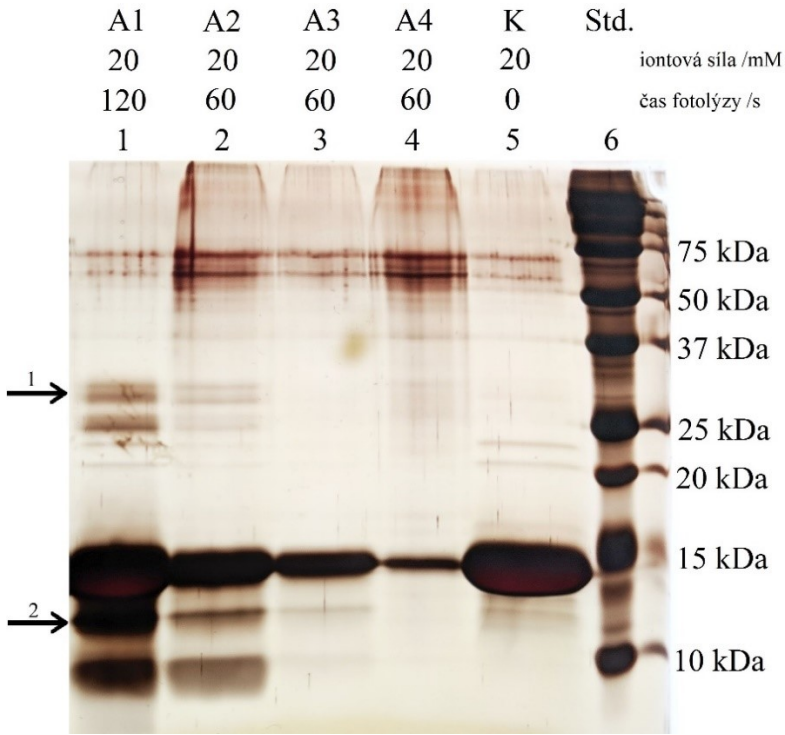
A) Změna množství proteinu (v 20 mM Tris-Cl)

- A1 – 5 µl Az3: 5 µl proteinového preparátu; 7,5 µl dH_2O; 7,5 µl 20 mM Tris-Cl
- A2 – 1 µl Az3: 1 µl proteinového preparátu; 19 µl 20 mM Tris-Cl
- A3 – 0,2 µl Az3: 1 µl 5x ředěného proteinového preparátu; 19 µl 20 mM Tris-Cl
- A4 – 0,04 µl Az3: 1 µl 25x ředěného proteinového preparátu; 19 µl 20 mM Tris-Cl

K) Kontrola (5 µl Az3 preparátu v 20 mM Tris-Cl)

- K – kontrola: 5 µl proteinového preparátu; 7,5 µl dH_2O; 7,5 µl 20 mM Tris-Cl

Vzorky A2 – A4 byly fotolyzovány 1 min, vzorek A1 byl fotolyzován 2 min, kontrolní vzorek K nebyl fotolyzován. Výsledky fotolýzy byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.



Obr. 18: 15% polyakrylamidový elektroforetický gel barvený stříbrem zobrazující výsledky fotolýzy. V drahách 1-4 jsou vzorky A1 – A4. V dráze 5 je kontrolní vzorek K, který nebyl fotolyzován. V dráze 6 je standard molekulové hmotnosti. Šipka 1 označuje relativní mobilitu odpovídající dimeru Az. Šipka 2 označuje relativní mobilitu odpovídající intramolekulárně zesíťovanému Az.

Jak ilustruje obr. 18, str. 47 (vzorky A1 – A4, dráhy 1-4) oligomery Az (viz relativní mobilitu odpovídající šipce 1) jsou pozorované pouze ve vzorcích B1 a B2. Při nižších koncentracích Az oligomery buď nevznikají nebo nejsou detekovatelné použitým barvením stříbrem gelu SDS-PAGE. Proto u dalších experimentů jsme využili podmínky A1. Toto množství přibližně odpovídá 4,5 μg proteinu a molární koncentraci 16 μM.

Při druhém experimentu PIXL byl studován vliv iontové síly na Az3 s foto-Met (sada vzorku B). Jako kontrolu jsme využili další dva proteiny: Az3 exprimovány v LB mediu (vzorky E) a Az4 „All-Phe“ (W48F, Y72F, Y108F) s foto-Met (vzorky D). U tohoto mutantu azurinu jsou všechny Trp a Tyr nahrazeny za Phe. Az4 byl exprimován a izolován školitelem a poskytnout pro tuto práci. Preparáty Az3 z LB a Az4 s foto-Met byly převedeny do 10 mM Tris-Cl dialýzou proti 1 litru 10 mM octanu amonného. Dále jsme studovali vliv doby vystavení záření indukující PIXL na Az3 s foto-Met (vzorky C).
V druhém experimentu byly použity následující vzorky:

B) Změna iontové síly (Az3 s foto-Met)

- B1 – 10 mM Tris-Cl: 5 μl proteinového preparátu; 15 μl dH_2O
- B2 – 20 mM Tris-Cl: 5 μl proteinového preparátu; 7,5 μl dH_2O; 7,5 μl 20 mM Tris-Cl
- B3 – 50 mM Tris-Cl: 5 μl proteinového preparátu; 15 μl 50 mM Tris-Cl
- B4 – 100 mM Tris-Cl: 5 μl proteinového preparátu; 15 μl 100 mM Tris-Cl

C) Změna času fotolýzy (Az3 s foto-Met)

- C1 – 20 mM Tris-Cl: 5 μl proteinového preparátu; 7,5 μl dH_2O; 7,5 μl 20 mM Tris-Cl
- C2 – 20 mM Tris-Cl: 5 μl proteinového preparátu; 7,5 μl dH_2O; 7,5 μl 20 mM Tris-Cl
- C3 – 50 mM Tris-Cl: 5 μl proteinového preparátu; 15 μl 50 mM Tris-Cl
- C4 – 50 mM Tris-Cl: 5 μl proteinového preparátu; 15 μl 50 mM Tris-Cl

K) Kontroly

- K1 – kontrola Az3 s foto-Met v 20 mM Tris-Cl: 5 μl proteinového preparátu; 7,5 μl dH_2O; 7,5 μl 20 mM Tris-Cl
- K2 – kontrola Az4 s foto-Met v 10 mM Tris-Cl: 14 μl proteinového preparátu; 6 μl dH_2O

D) Az4 s foto-Met

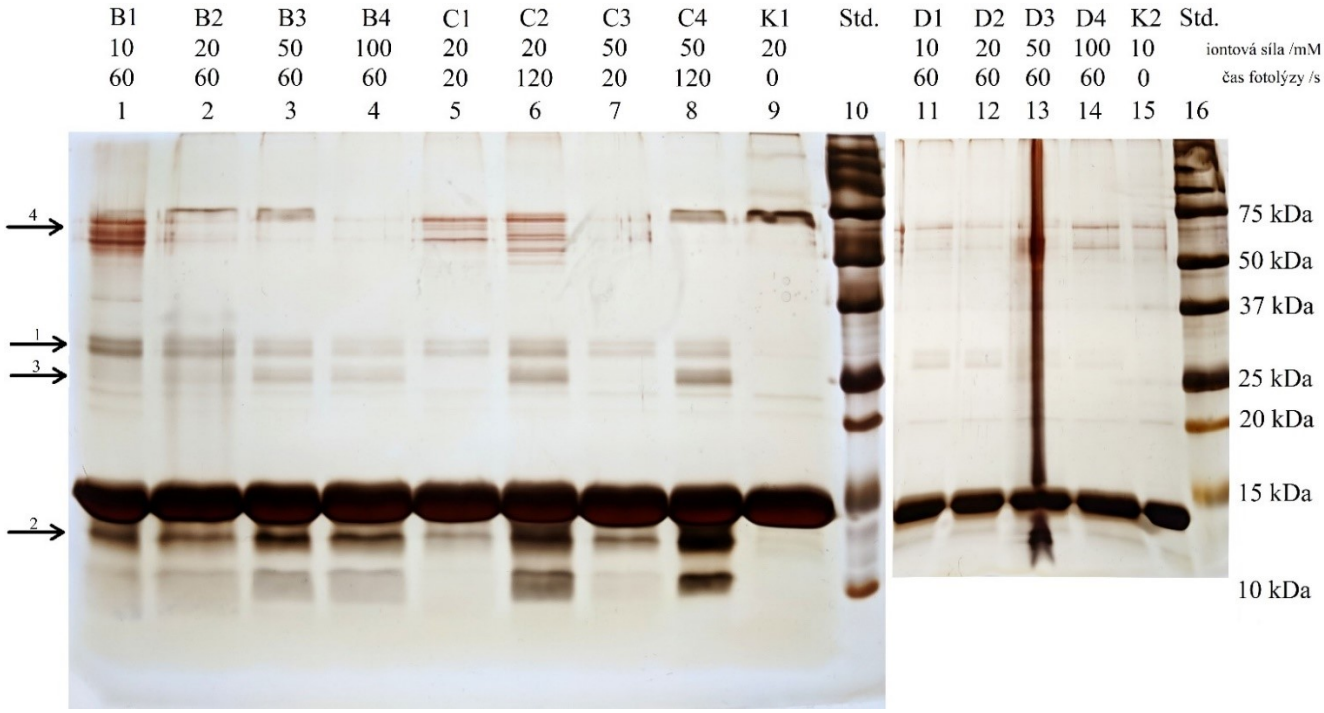
- D1 – 10 mM Tris-Cl: 14 μl proteinového preparátu; 6 μl dH_2O
- D2 – 20 mM Tris-Cl: 14 μl proteinového preparátu; 3 μl dH_2O; 3 μl 100 mM Tris-Cl
- D3 – 50 mM Tris-Cl: 14 μl proteinového preparátu; 5 μl dH_2O; 1 μl 1 M Tris-Cl

- D4 – 100 mM Tris-Cl: 14 µl proteinového preparátu; 5 µl dH_2O; 2 µl 1 M Tris-Cl

E) Az3 z LB

- E1 – 10 mM Tris-Cl: 14 µl proteinového preparátu; 6 µl dH_2O
- E2 – 20 mM Tris-Cl: 14 µl proteinového preparátu; 3 µl dH_2O; 3 µl 100 mM Tris-Cl
- E3 – 50 mM Tris-Cl: 14 µl proteinového preparátu; 5 µl dH_2O; 1 µl 1 M Tris-Cl
- E4 – 100 mM Tris-Cl: 14 µl proteinového preparátu; 5 µl dH_2O; 2 µl 1 M Tris-Cl

Vzorky B1 – B4, D1 – D4 a E1 – E4 byly fotolyzovány 1 min, vzorky C1 a C3 byly fotolyzovány 20 sec a vzorky C2 a C4 byly fotolyzovány 2 min. Kontrolní vzorky K1 a K2 nebyly fotolyzovány. Výsledky fotolýzy byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a UV-VIS spektroskopie.



Obr. 19: 15% polyakrylamidový elektroforetický gel barvený stříbrem zobrazující výsledky fotolýzy. V dráhách 1-4 jsou vzorky Az3 s foto-Met B1 – B4, ve kterých se mění iontová síla pufru. V drahách 5-8 jsou vzorky Az3 s foto-Met C1 – C4, které se liší časem fotolýzy. V dráhách 11-14 jsou vzorky Az4 s foto-Met D1 – D4. V dráhách 9 a 15 jsou kontrolní vzorky K1 a K2, které nebyly fotolyzovány. V dráhách 10 a 16 je standard molekulové hmotnosti. Šipka 1 označuje relativní mobilitu odpovídající dimeru Az. Šipka 2 označuje relativní mobilitu odpovídající kovalentně intramolekulárně propojenému Az. Šipka 3 – keratin degradovány fotolýzou, šipka 4 – nativní keratin.

Gel uvedený na obr. 19, str. 49 ilustruje výsledek druhého experimentu PIXL. Můžeme zde pozorovat vliv iontové sily na stabilitu oligomeru Az. Šipka 1 označuje relativní pohyblivost odpovídací dimeru Az. Maximální intenzitu proužku pozorujeme ve vzorcích B1 (dráha 1) a B2 (dráha 2). Dále dochází k poklesu stability dimeru při zvýšení koncentrace pufru (vzorky B1 – B4, dráhy 1-4). Stejný trend pozorujeme u intramolekulárně propojeného Az (relativní pohyblivost, které odpovídá šipka 2). Trend je pozorován i ve vzorcích Az4 s foto-Met (D1 – D4, dráhy 11-14). Proužky dimeru mají vysokou intenzitu ve vzorcích D1 a D2 a téměř nejsou vidět ve vzorcích D3 a D4.

Hned pod proužkem dimeru (relativní pohyblivost, které odpovídá šipka 3) se nachází další proteinový proužek, který vykazuje opačný trend. Tento proužek odpovídá keratinu, který je pravděpodobně degradován fotolýzou při vysokých koncentracích soli. Odpovídá tomu pokles intenzity proužku (viz poloha šipky 4) keratinu od vzorku B1 ke vzorku B4. Identita proužku keratinu byla stanovena pomocí MS školitelem.

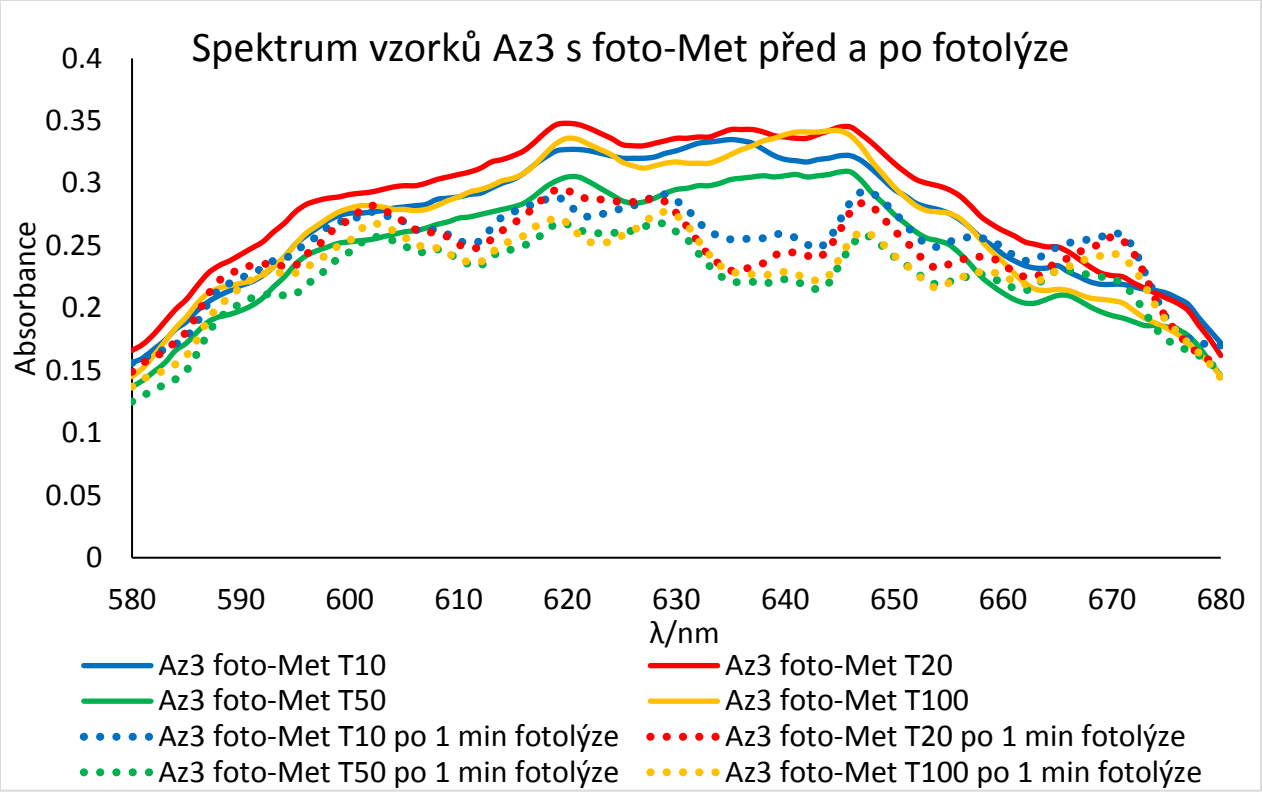
Dle našich očekávání v kontrolních vzorcích K1 a K2 (dráhy 9 a 15) není pozorován dimer ani intramolekulárně propojený Az.

Vliv doby fotolýzy na tvorbu oligomerů Az je úměrný délce ozáření. Při prodloužení doby fotolýzy pozorujeme větší intenzitu proužků dimeru.

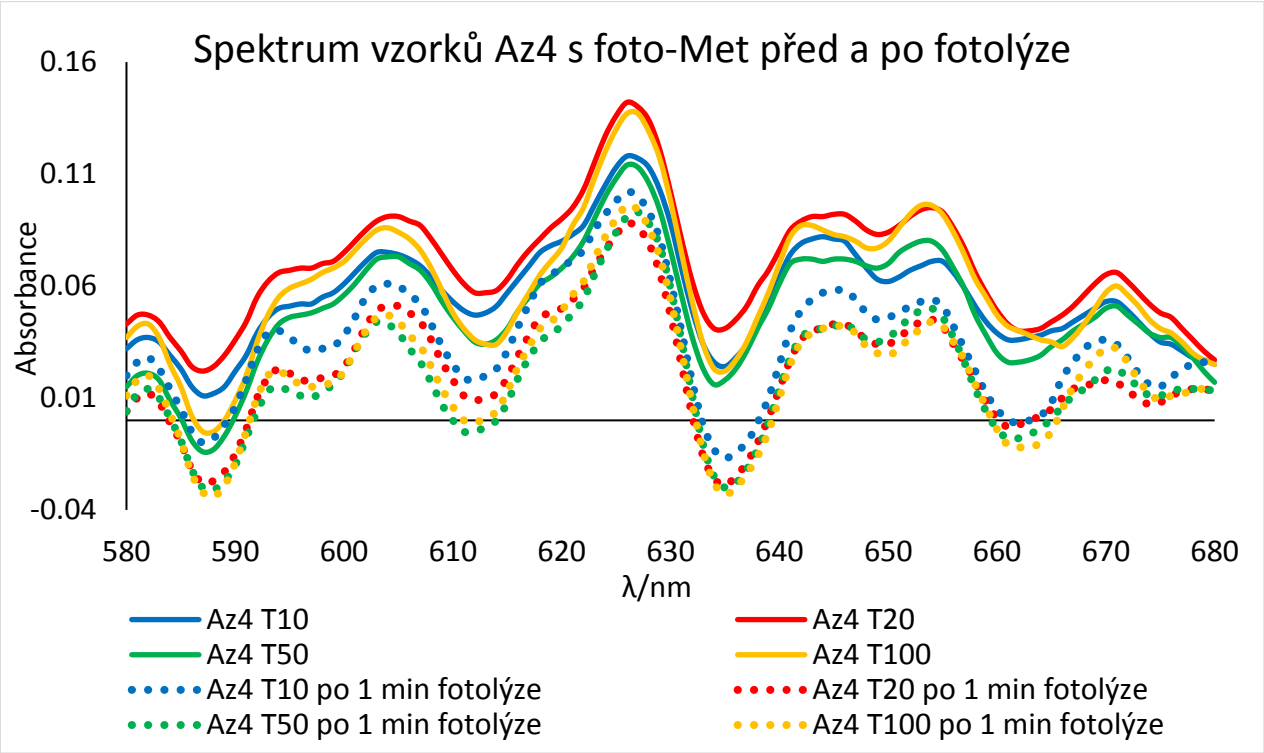
Před a po fotolýze byla změřena spektra vzorku (DeNovix, mikroobjem). U vzorku Az3 s foto-Met byl pozorován pokles hodnoty A_{635} viz obr. 16, str. 43 v kapitole 6.6, str. 39. Proto bylo přistoupeno k detailní analýze UV-VIS spekter v případě experimentů PIXL. Ukázalo se, že velikost změn hodnot A_{635} v průběhu PIXL experimentu je závislá na iontové síle. V 20 mM Tris-Cl rozdíl absorbance před a po fotolýze je maximální a dosahuje 0,05. Při snížení koncentrace Tris-Cl na 10 mM dochází k poklesu rozdílu na 0,02. Při zvýšení iontové síly rozdíl poklesl na hodnotu 0,045 v 50 mM Tris-Cl a 0,04 v 100 mM Tris-Cl. Spektra vzorku B1 – B4 jsou uvedeny na obr. 20, str. 51. Zobrazen je pouze interval vlnových délek v rozsahu 580-680 nm.

Spektra vzorků Az4 s foto-Met (D1 – D4) jsou ukázána na obr. 21, str. 52. I zde je zobrazen pouze interval vlnových délek v rozsahu 580-680 nm. Pozorujeme zde pokles A_{635} stejně jako u Az3 s foto-Met. Vykazuje stejný trend a velikost poklesu je srovnatelná s poklesem ve vzorcích A1 – A4.

U Az3 z LB změna A_{635} vykazuje stejnou závislost na iontové síle jako u Az3 s foto-Met. Hodnota poklesu A_{635} je menší než u Az3 a Az4 s foto-Met.



Obr. 20: Spektrum vzorků B1 – B4. Plné čáry zobrazují spektrum vzorků před fotolýzou, tečkované po fotolýze po dobu 1 min. Největší pokles A_{635} je pozorován ve vzorku A2 (T20). Při snížení či zvýšení iontové síly dochází ke snížení hodnoty změny A_{635}.



Obr. 21: Spektrum vzorků D1 – D4. Plné čáry zobrazují spektrum vzorků před fotolýzou, tečkované po fotolýze po dobu 1 min. Největší pokles A_{635} je pozorován ve vzorku D2 (T20). Při snižení či zvýšení iontové síly dochází ke snížení hodnoty změny A_{635} stejně jako u vzorku Az3 s foto-Met.

7 Diskuze

Azurin se úspěšně exprimuje v *E. coli* B834 jak v bohatém LB mediu, tak i v minerálním mediu M9 s Met či foto-Met, viz obr. 11, str. 35 a obr. 12, str. 36. Exprese v M9 mediu je oproti LB mediu zpomalena ale neovlivňuje celkovou životaschopnost a funkčnost buněk podobně jako u eukaryotních buněk [20]. Substituce Met za jeho strukturní foto analog foto-Met v M9 mediu nemá zásadní vliv na výtěžek exprese po 17-20 hodinách. Výtěžky exprese dobře korespondovaly s výsledky literatury [7,11,30]. Snížená teplota ovlivňuje buňky *E. coli* jen málo, ale zpomaluje degradaci dostupného foto-Met nebo exprimovaného Az. Kratší exprese (do 4 hodin) neposkytuje dostatečné množství proteinu a tedy významně komplikuje následující izolaci Az.

V minulosti používaný postup purifikace byl v této práci optimalizován.

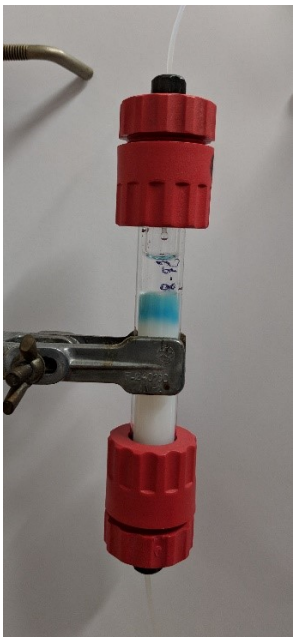
Původní postup zahrnoval provedení lýze buněk pouze pomocí osmotického šoku. V prvním postupu izolace (viz kapitola 6.6, str. 39) jsme tento krok nahradili využitím sonikační proby. Dostatečnou účinnost rozbití buněk jsme zajistili až při trojitém použití sonikačního cyklu. Proto jsme v následující purifikaci (kapitola 6.7, str. 44) použili kombinaci osmotického šoku (inkubace buněk v 20% (m/v) roztoku sacharosy po expresi, zmražení buněk při -20°C a následná inkubace v 500 μM $MgCl_2$, 20 min. na ledu) a následnou sonikaci (4x 30 s s 1 min relaxaci na ledu). Tímto postupem jsme zajistili dostatečnou lýzi buněk bez nutnosti vícenásobné sonikace.

Dalším krokem, který bylo nutné optimalizovat, bylo srážení/precipitace 500 mM octanem amonným, pH 4,5 s následnou úpravou pH pomocí kyseliny octové. Stávalo se, že docházelo k velkým ztrátám azurinu, který měl při kyselé precipitaci balastních proteinů zůstat v roztoku. Příčinou mohlo být špatné prostorové uspořádání proteinu a tedy i snížení jeho rozpustnosti za podmínek precipitace (pH 4,5). Proto jsme využili poznatek z literatury [10,13], že iont mědi pomáhá zaujímání správného prostorového uspořádání azurinu a před krokem sonikace buněk vložili hrubou titraci $CuSO_4$. Tímto krokem došlo ke zvýšení inkorporace centrálního iontu kovu do proteinu a současně se zvýšila jeho stabilita při precipitaci 500 mM octanem amonným, pH 4,5 a úpravou pH přídavkem kys. octové. Současně jsme změnili podmínky kyselé precipitace, a pro úpravu pH jsme použili pouze titraci 500 mM octanem amonným, pH 4,5. Od této úpravy protokolu již nedošlo

k nežádoucí precipitaci Az s balastními proteiny ani při jedné purifikaci různých verzí či přirozeného proteinu azurinu.

Další optimalizací postupu bylo sloučení kroku kyselé precipitace balastních proteinu při pH 4,5 při 32°C s dialýzou proti 10 mM octanu amonnému, pH 4,5. Supernatant, získány po centrifugaci takto připraveného preparátu, lze hned nanášet na kolonu SP-Sepharosy a dojde tak k výraznému zkrácení postupu. (viz kapitolu 6.8, str. 44).

Az byl purifikován chromatografii FPLC na koloně SP-Sepharosy. Dle našich pozorování, které se shodují s literaturou [29,30], "wild-type" Az se dobře eluuje 100 mM octanem amonným, pH 4,5. Po chromatografii jsme získali téměř čistý Az. Použité kroky a objem postupného (skokového) gradientu rostoucí iontové síly použitého pufru (10 mM, 20 mM a 40 mM octan amonného, pH 4,5) je vhodné zachovat, protože při použití 40 mM octanu amonného již dochází k postupnému pohybu proteinu na koloně (využito bylo azurové zbarvení Az dobře viditelné po vazbě na nosič kolony SP-Sepharosy, viz obr. 22)



Obr. 22.: Kolona SP-Sepharosy. Azurově zbarvený proužek je Az navázaný na nosič.

Všechny takto připravené preparáty Az jsme charakterizovali a následně použili v PIXL experimentech.

Diskutabilní je srovnání výsledků inkorporace foto-Met stanovené v buněčném lyzátu a následně ve finálním preparátu. Diskrepanci získané hodnoty 17% inkorporace foto-Met ve finálním preparátu od určené hodnoty v buněčných preparátech (60 až 70% pro peptidy

42-70 a 104-122, nebo 35% pro peptid 1-24, viz kapitolu 6.4, str. 37) nelze pravděpodobně vyloučit průběhem purifikace (např. selektivní nabohacování proteinu s Met či selektivní precipitace a ztráty proteinu s foto-Met). Takového chování azurinu nebylo pozorováno při žádné jiné purifikaci formy azurinu s foto-Met a proto se po diskusi se školitelem přikláníme k vysvětlení, že došlo k lidskému selhání a do purifikace byla přidána peleta buněk s exprimovaným azurinem v LB mediu (tedy s Met v sekvenci proteinu).

Při PIXL experimentech jsme pozorovali vznik dimeru Az při vyšších koncentracích proteinu. Kvůli nízké míře inkorporace foto-Met ve finálním preparátu by šlo předpokládat, že absence proužku oligomeru ve vzorcích s nižší koncentraci (viz obr. 18, str. 47) je dána nedostatečnou citlivostí detekce. Ovšem v literatuře [31] se setkáváme s experimenty, při kterých oligomery Az také nejsou pozorovány při nízkých koncentracích proteinu (pod 70 μM), můžeme tedy předpokládat, že Az opravdu při nízké koncentraci v roztoku (16 μM) netvoří oligomery a velice slabě dimer.

Při fotolýze Az s foto-Met dochází k poklesu A_{635}, který naznačuje změnu redoxního stavu iontu mědi v aktivním centru proteinu. Pokles absorbance závisí na iontové síle prostředí. Je nejvyšší v 20 mM Tris-Cl a klesá při snížení či zvýšení koncentrace pufru (viz obr. 20, str. 51). Přítomnost foto-Met zjevně má vliv na tuto změnu. Ačkoli v blízkosti iontu mědi se nachází Trp, který je schopný tvorby radikálů po vystavění UV záření [32,33], které bylo použito při experimentu PIXL, a následného přenosu elektronu na iont mědi v aktivním centru [17,34]. Tento vliv chování Trp byl eliminován záměnou této aminokyseliny za Phe v proteinu označeném „All-Phe“, ve kterém jsou aminokyselinou Phe kromě Trp48 nahrazeny i Tyr v poloze 72 a 108. U tohoto proteinu jsme pozorovali při experimentu PIXL srovnatelnou velikost poklesu A_{635} jako u „wild-type“ Az. Současně byla pozorována podobná závislost změny A_{635} na iontové síle s maximální hodnotou při iontové síle 20 mM Tris-Cl pufru. U vzorku Az3 z LB, kde není přítomen foto-Met, jsme pozorovali jen malou změnu absorbanci při 630 a 635 nm. Pravděpodobně postranní řetězce aminokyseliny Trp anebo Tyr participují jen málo na tvorbě radikálových forem, které jsou schopné změnit redoxní stav centrálního atomu mědi. Oba kontrolní experimenty však potvrzují pravděpodobnou možnost tvorby reaktivních forem foto-Met v experimentu PIXL schopných změny redoxního stavu centrálního atomu mědi ve struktuře Az.

Pro zlepšení dosaženého porovnání by bylo dobré exprimovat a izolovat Az s větší inkorporací foto-Met, a porovnat experimenty PIXL s tímto preparátem s výsledky prací věnovaných Az s Met [11,16,17].

8 Závěr

Pomocí rekombinantní exprese v auxotrofních buňkách *E. coli* B834 jsme zavedli strukturní analog přirozené aminokyseliny Met do sekvence proteinu azurin *Pseudomonas aeruginosa*. Pro získání Az maximální míry inkorporace foto-Met s mírou přibližně 70% jsme použili následující podmínky: 3x promytí PBS, exprese při 30°C, minimální dobu 18 hod.

Foto-Met zavedený do struktury proteinu azurin *P. aeruginosa* ovlivňuje při experimentu PIXL oxidoredukční stav iontu mědi v aktivním centru azurinu. Pokles A_{635} po fotolýze naznačuje změnu oxidačního stavu iontu mědi. Tato změna závisí na iontově síle prostředí a je maximální při použití 20 mM Tris-Cl pufru. Míra vlivu světlem indukovaného foto-Met na vlastnosti aktivního centra Az není zcela jasná, protože blízko aktivního centra se nachází Trp, který je také potenciálním zdrojem elektronu při fotolýze. Provedená záměna této aminokyseliny za fenylalanin pomocí cílené mutageneze („All-Phe“ mutant) jen částečně ovlivnila redoxní změny iontu mědi při experimentu PIXL. Přirozený protein s Met v sekvenci poskytuje ještě menší ovlivnění.

Azurin tvoří oligomery v roztocích při vyšších koncentracích proteinu. Byl pozorován vznik kovalentního dimeru metodou PIXL ve dvou pravděpodobných orientacích. Tedy alespoň jeden Met (v pozici 13, 44, 56, 64, 109 a 121) se nachází v blízkosti interakčního rozhrání Az. Současně byl pozorován vznik intramolekulárně propojeného Az. Síla transientní interakci tvořící dimer závisí na iontové síle prostředí a proto lze předpokládat tvorbu iontových párů.

Na základě všech výsledků lze konstatovat, že metoda PIXL je využitelná nejen pro studium protein-proteinových interakcí, ale i ET.

9 Seznam literatury

1. Warren, J. J., Ener, M. E., Vlček Jr., A., Winkler, J. R. & Gray, H. B. *Coord. Chem. Rev.* **256,** 2478–2487 (2012).
2. Kleanthous, C. *Protein-protein Recognition*. (Oxford University Press, 2000).
3. Sigfridsson, K. *Plastocyanin, an electron-transfer protein*. 1–28 (Springer Science & Business Media, 1998).
4. Chen, J. & Strous, M. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1827,** 136–144 (2013).
5. Nersissian, A. M. & Shipp, E. L. *Adv. Protein Chem.* **60,** 271–340 (2002).
6. Adman, E. T. Copper Protein Structures. in *Advances in Protein Chemistry* (ed. C.B. Anfinsen, J. T. E., Frederic M.Richards and David S.Eisenberg) **42,** 145–197 (Academic Press, 1991).
7. Faraggi, M. & Pecht, I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45,** 842–848 (1971).
8. Wherland, S., Holwerda, R. A., Rosenberg, R. C. & Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **97,** 5260–5262 (1975).
9. Margalit, R. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **81,** 6554–6558 (1984).
10. Yanagisawa, S. & Dennison, C. *J. Am. Chem. Soc.* **125,** 4974–4975 (2003).
11. Hosseinzadeh, P. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **113,** 262–267 (2016).
12. Romero, A. *et al. J. Mol. Biol.* **229,** 1007–1021 (1993).
13. Alcaraz, L. A. & Donaire, A. *FEBS Lett.* **579,** 5223–5226 (2005).
14. Pérez-Henarejos, S. A., Alcaraz, L. A. & Donaire, A. *Arch. Biochem. Biophys.* **584,** 134–148 (2015).
15. Nar, H., Messerschmidt, A., Huber, R., van de Kamp, M. & Canters, G. W. *FEBS Lett.* **306,** 119–124 (1992).
16. Marshall, N. M. *et al. Nature* **462,** 113–116 (2009).
17. Takematsu, K. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **135,** 15515–15525 (2013).

18. Nar, H., Messerschmidt, A., Huber, R., van de Kamp, M. & Canters, G. W. *J. Mol. Biol.* **221,** 765–772 (1991).
19. Gherib, R., Dokainish, H. M. & Gauld, J. W. *Int. J. Mol. Sci.* **15,** 401–422 (2013).
20. Suchanek, M., Radzikowska, A. & Thiele, C. *Nat. Methods* **2,** 261–267 (2005).
21. Kalkhof, S., Ihling, C., Mechtler, K. & Sinz, A. *Anal. Chem.* **77,** 495–503 (2005).
22. Šulc, M. & Ptáčková, R. *Bioprospect Bull. Biotechnol. Spol. V Čes. Republice Slov. Republice* **26,** 79–83 (2016).
23. Ječmen, T. *et al. Methods* **89,** 128–137 (2015).
24. Miyazaki, R., Myougo, N., Mori, H. & Akiyama, Y. *J. Biol. Chem.* **293,** 677–686 (2018).
25. Henderson, T. A. & Nilles, M. L. *Methods Mol. Biol.* **1531,** 47–60 (2017).
26. Lössl, P. & Sinz, A. *Methods Mol. Biol.* **1394,** 109–127 (2016).
27. Häupl, B., Ihling, C. H. & Sinz, A. *Proteomics* **17,** (2017).
28. Shaffer, C. J., Marek, A., Nguyen, H. T. H. & Tureček, F. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **26,** 1367–1381 (2015).
29. Parr, S. R., Barber, D. & Greenwood, C. *Biochem. J.* **157,** 423–430 (1976).
30. Karlsson, B. G., Pascher, T., Nordling, M., Arvidsson, R. H. A. & Lundberg, L. G. *FEBS Lett.* **246,** 211–217 (1989).
31. Sokolová, L. *et al. J. Phys. Chem. B* **115,** 4790–4800 (2011).
32. Larson, B. C. *et al. J. Phys. Chem. B* **119,** 9438–9449 (2015).
33. Westerlund, K., Berry, B. W., Privett, H. K. & Tommos, C. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1707,** 103–116 (2005).
34. Shih, C. *et al. Science* **320,** 1760–1762 (2008).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka