

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Exprese rekombinantní formy
nepenthesinu I z *Nepenthes gracilis***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Petr Man Ph.D.

Konzultant: RNDr. Hynek Mrázek Ph.D.

Autor: Vyacheslav Tretyachenko

Praha 2013

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Petra Mana Ph.D. a RNDr. Hynka Mrázka Ph.D a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze,
dne 25.5.2013

podpis:.....

Poděkování

Rád bych poděkoval školiteli RNDr. Petru Manovi Ph.D. za možnost vypracování projektu na Mikrobiologickém ústavu AV ČR a za ochotu kdykoliv poskytnout pomoc. Také chci poděkovat svému konzultantu RNDr. Hynku Mrázkovi Ph.D. za poskytnutí mnoha cenných rad a za projevenou trpělivost a snahu pomoci v mých počínáních. Dále děkuji Mgr. Ljubině Ivanové za asistenci při provádění pokusů. Chci poděkovat všem členům laboratoře za přátelský přístup a vytvoření příjemné atmosféry na pracovišti. Na závěr děkuji své rodině za značnou morální a finanční podporu.

Abstrakt

Nepenthesin je nesespecifickou aspartátovou proteasou láčkovek *Nepenthes* a *Drosera*. Přírodní forma se vyznačuje vysokou termostabilitou a odolností v širokém rozmezí pH, vlastnostmi, které dovolují použití enzymu pro účely experimentu vodík/deuteriové výměny ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Navzdory těmto charakteristikám se ukázalo, že proteasa má relativně nízkou stabilitu vůči denaturačním činidlům (močovina, guanidinium chlorid). Pro vysvětlení tohoto fenoménu je třeba strukturně–funkční analýzy, která dosud nebyla možná z důvodu nízkého množství izolovaného enzymu z láček a jeho dodatečné glykosylace. Cílem této práce bylo připravit aktivní rekombinantní formu nepenthesinu v dostatečném množství pro možnost jeho rutinního využívání v experimentech vodík/deuteriové výměny a pro jeho charakterizaci prostřednictvím rentgenstrukturní analýzy.

Klíčová slova: nepenthesin, aspartátová proteasa, H/D, rekombinantní, produkce, exprese

Abstract

Nepenthesin is an aspartic proteinase from pitchers of genus *Nepenthes* and *Drosera*. Native form is characterised by high thermostability and endurance in wide pH range, properties required for digestive enzymes in preparational stage of hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry experiment. Despite of this characteristics, it was shown, that the enzyme has relatively low stability in presence of chaotropic agents (urea, guanidinium chloride). The functional analysis based on revealed structure is necessary to find the reason for this inconsistency. X–ray studies of protein were not possible, mainly in cause of protein glycosylation and low extraction yields of enzyme in pitcher plants. The aims of this project is production of an active recombinant form of nepenthesin for its common utilization in H/D based mass spectrometry analysis and for Xray crystallography based structure solution. (In Czech)

Keywords: nepenthesin, aspartic, proteinase, protease, H/D, recombinant, production, expression

Seznam zkratek a symbolů

AP	aspartátová proteasa
BCA	kyselina bicinchoninová (bicinchoninic acid)
TEMED	N,N,N' N'-tetramethylethyldiamin
SB	vzorkový pufr (sample buffer)
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
TAE	pufr Tris-octan-EDTA
TE	pufr Tris-EDTA
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
H/D	vodík/deuteriová (hydrogen/deuterium)
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice (matrix-assisted laser desorption ionisation)
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonová kyselina
CBB	briliantní modř (Coomassie Brilliant Blue)
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	endoplasmatické retikulum
ESI	ionizace elektrospřejem
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
LB	Luria-Bertani médium
CAPS	kyselina N-cyklohexyl-3-aminopropansulfonová
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid (phenylmethylsulphonyl fluoride)
PBS	solný roztok pufovaný fosforečnany (phosphate buffered saline)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NAP	insert nepenthesinového typu (Nepenthes-like aspartic protease)
OD	optická densita
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforesa (polyacrylamide gel electrophoresis)
PSI	specifická rostlinná sekvence (plant specific insert)
SDS	dodecylsulfát sodný (sodium dodecylsulphate)
TOF	analyzátor doby letu (time of flight)

Obsah

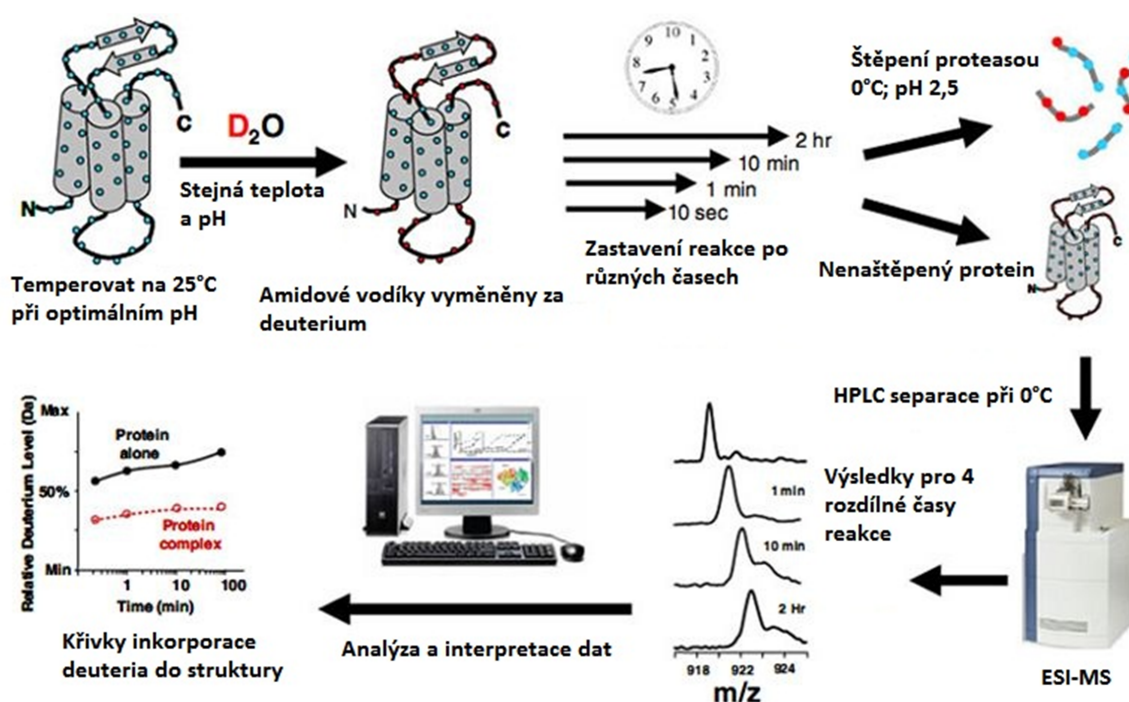
1	Úvod.....	8
1.1	Význam použití kyselých proteas pro účely strukturních studií proteinů prostřednictvím vodík/deuteriové výměny.....	8
1.2	Aspartátové proteasy	9
1.2.1	Obecné charakteristiky	9
1.2.2	Rostlinné aspartátové proteasy	10
1.3	Nepenthesin	11
1.3.1	Láčkovky.....	11
1.3.2	Obsah trávicích šťáv.....	12
1.3.3	Charakteristiky proteas z láčkovek	13
1.3.4	Stabilita nepenthesinu vůči pH, teplotě a denaturačním činidlům	15
2	Cíl práce.....	18
3	Materiál	19
3.1	Přístroje.....	19
3.2	Chemikálie	19
3.2.1	Enzymy	21
3.2.2	Roztoky.....	21
3.2.3	Média.....	22
3.2.4	Vektory	23
3.2.5	Bakteriální kmeny	23
4	Metody	23
4.1	Transformace kompetentních buněk.....	23
4.2	Minipreparativní izolace plasmidové DNA	24
4.3	Maxipreparativní izolace plasmidové DNA.....	25
4.4	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA.....	25
4.5	Elektroforesa DNA v agarosovém gelu	25
4.6	Restrikční štěpení a analýza	26
4.7	Produkce proteinu a +/- pokus v kompetentních buňkách.....	26
4.8	Velkoobjemová produkce	27
4.9	Diskontinuální zónová elektroforesa proteinů v polyakrylamidovém gelu	27
4.10	Vizualizace proteinů v polyakrylamidovém gelu dusičnanem stříbrným.....	28
4.11	Izolace inkluzních tělísek	29

4.12	Renaturace proteinu do aktivní konformace.....	29
4.13	Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu pomocí reakce s kyselinou bicinchoninovou.	30
4.14	Měření enzymové aktivity.....	30
5	Výsledky.....	31
5.1	Amplifikace a izolace plasmidu pET21a.....	31
5.2	Produkce proteinu	32
5.2.1	Produkce proteinu v bakteriálních buňkách	32
5.2.2	Analýza optimální koncentrace induktoru pro produkci.....	33
5.2.3	Renaturace vyprodukovaného proteinu	34
5.3	Charakterizace proteinu	35
5.3.1	Stanovení koncentrace v izolovaném vzorku.....	35
5.3.2	Stanovení enzymové aktivity	35
5.3.3	Sledování průběhu aktivace a aktivity proenzymu v kyselém prostředí	36
6	Diskuze	38
7	Závěr.....	40
8	Reference.....	41

1 Úvod

1.1 Význam použití kyselých proteas pro účely strukturních studií proteinů prostřednictvím vodík/deuteriové výměny

Vodík/deuteriová (H/D) výměna umožňuje sledování konformačních změn proteinů vyvolaných změnou prostředí nebo interakcí s ligandem. Podstatou techniky je vystavení proteinu deuterovanému solventu a následné sledování výměny amidových vodíků za deuterium z rozpouštědla. Analýza deuterace se pak provádí technikou nukleární magnetické rezonance nebo vyhodnocením změny hmotnosti proteinu/peptidu pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Výhodou analýzy hmotnostní spektrometrií je malá spotřeba analytu, schopnost práce s nízkými koncentracemi vzorku a také možnost studia větších proteinových struktur. Nevýhodou je naopak nízká rozlišovací schopnost, daná schopností fragmentovat protein proteasou. Typický H/D experiment se provádí vnesením vzorku proteinu do deuterovaného rozpouštědla, následně se protein ponechá v pufru po určitou



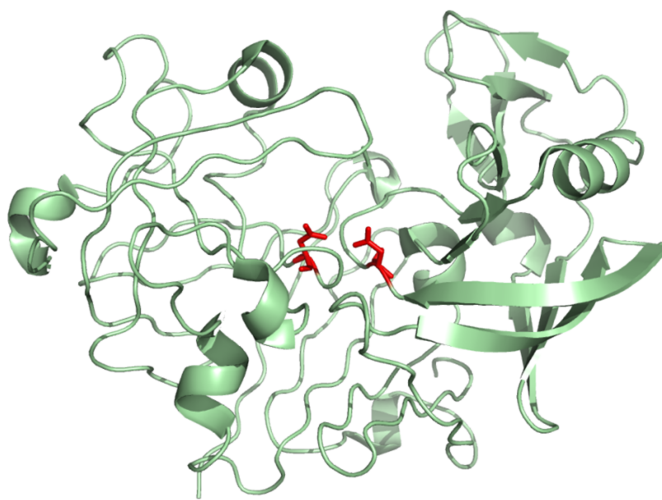
Obrázek 1: Klíčové kroky při provádění H/D pokusu¹

dobu inkubovat (obvykle v několika časových intervalech) a potom se výměna zastaví snížením teploty na 0°C a pH na 2,5¹. Za těchto podmínek pak proběhne štěpení vzorku proteasou, vzniklé peptidy se separují kapalinovou chromatografií na obrácené fázi a přímo analyzují pomocí hmotnostní spektrometrie. Porovnáním hmotností nedeuterovaných a částečně deuterovaných peptidů se získá hodnota stupně deuterace jednotlivých úseků daného proteinu. Postup experimentu je znázorněn na Obr. 1 (str. 8). Nejčastěji používanou proteasou v H/D experimentech je pepsin. Schopnost zmapování celé sekvence proteinu je ovšem díky experimentálním podmínkám a určité tendenci enzymu ke štěpení specifických sekvencí ztížena. Pro zvýšení rozlišovací schopnosti experimentu se proto používá kombinace několika proteas, schopných štěpit protein v daných experimentálních podmínkách. Dosud byly prováděny pokusy s aspergillopepsinem, rhizopuspepsinem a dalšími enzymy (plasmepsin, pepsin ze žaludku úhoře nebo pepsin ze žaludku antarktických ryb)^{2,3}.

1.2 Aspartátové proteasy

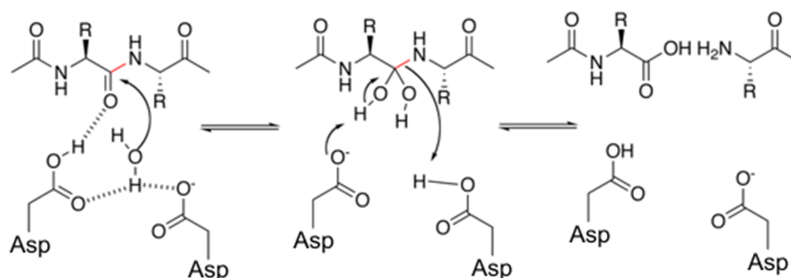
1.2.1 Obecné charakteristiky

Aspartátové proteasy (EC 3.4.23) jsou třídou enzymů, které pro svoji hydrolytickou aktivitu využívají dva zbytky kyseliny asparagové. Tyto enzymy byly prostudovány u obratlovců, rostlin, parazitů, virů a bakterií⁴⁻⁸. Nejčastěji se aspartátové proteasy podílejí na trávení živin (pepsin, trypsin) nebo na regulaci buněčných a humorálních dějů (katepsiny, renin). Všechny aspartátové proteasy (dále AP) jsou syntetizovány jako neaktivní preproenzymy, které jsou posléze přeměněny na jedno nebo dvou řetězcové aktivní formy. Prekurzory mají N-terminální signální sekvenci pro transport do ER, následuje prosekvenec o délce přibližně 40 aminokyselin a následně N- a



Obrázek 2: Terciární struktura pepsinu, červeně jsou označeny zbytky kyseliny asparagové v aktivním centru. Generováno v programu PyMOL ze struktury 5PEP

C- terminální doména. Prosekvence slouží všem AP k inaktivaci proteinu (inaktivace je uskutečněna vazbou propeptidové (tzv. "flap") části

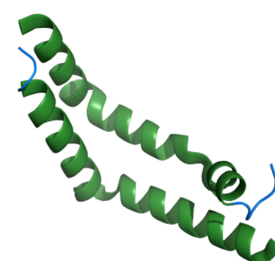


Obrázek 3: Reakční mechanismus hydrolytické aktivity aspartátových proteas

k aspartátům aktivního místa ⁹) a správnému sbalení ¹⁰. Na Obr. 2 (str. 9) je struktura pepsinu, typického zástupce této třídy. První polovina proteinu (tzv. N-terminální doména) je nezávislou podjednotkou složenou hlavně z β listů, s malým podílem α -helixů. Druhá polovina (C-terminální doména) je taktéž nezávislou částí se stejnými strukturálními motivy ¹¹. Aktivní místo enzymů je orientováno v dutině mezi těmito podjednotkami, každá z nich poskytuje jeden zbytek kyseliny asparagové, který je obvykle součástí specifické *Asp-Thr-Gly* sekvence ¹² a je umístěn vespod dutiny. Mechanismus reakce zahrnuje koordinaci molekuly vody v aktivním místě a vznik tetrahedrálního intermediátu na karbonylovém uhlíku peptidové vazby (Obr. 3).

1.2.2 Rostlinné aspartátové proteasy

U rostlin se aspartátové proteasy uplatňují při štěpení zásobních proteinů, při klíčení semen ¹³, trávení polapené kořisti u karnivorních druhů a recyklaci dusíku při senescenci rostlinných orgánů. Analýzy aminokyselinových sekvencí různých aspartátových proteas odvozených z cDNA ukázaly, že prekurzory pro tyto enzymy jsou si sekvenčně velmi podobné. Katalytické domény rostlinných AP mají, na rozdíl od zbytku AP, sekvenční motivy aktivního místa – *Asp-Thr-Gly* (DTG) a *Asp-Ser-Gly* (DSG) ¹⁴. Enzymy obsahují hydrofobní N-terminální část, zodpovědnou za transport prekurzoru do ER, po níž následuje úsek 40 aminokyselinových zbytků a sekvence pro N- a C- terminální domény rozdělené zhruba 100 aminokyselinovými zbytky (tzv. plant specific insert, dále PSI) (Obr.4) ¹⁵. PSI sekvenci představuje pět amfipatických α -helixů, sbalených do kompaktní globulární domény a

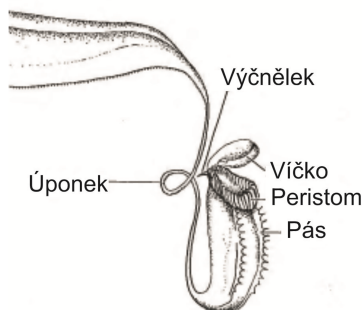


Obrázek 4: Struktura PSI aspartátové proteasy ze *Solanum tuberosum*. Generováno v programu PyMOL ze struktury 3RF1

propojených mezi sebou navzájem třemi disulfidickými můstky¹⁶. Role PSI není definitivně odhalena, předpokládá se, že hraje důležitou úlohu při transportu proenzymu do vakuoly¹⁷ a díky schopnosti interakce s fosfolipidovou dvojrůstvou také při obraně proti patogenům¹⁸. Aktivace rostlinných AP zahrnuje odštěpení propeptidové sekvence a částečné nebo úplné odštěpení PSI sekvence¹⁶.

1.3 Nepenthesin

1.3.1 Láčkovky



Obrázek 5: Schématický nákres láčkovky²²

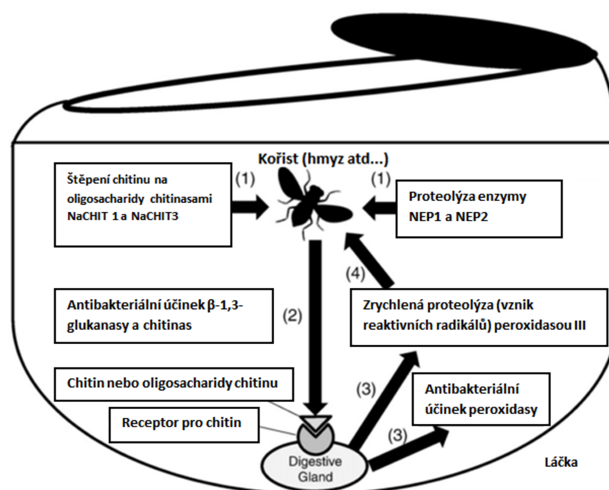
Láčkovky pocházejí z jihovýchodní Asie, určité populace jsou také v Indii, na Madagaskaru a severní Austrálii. Rostliny se nalézají v různých lokalitách a nadmořských výškách. Rozdělujeme je na horské (přibližně dvě třetiny známých druhů), jež se vyskytují ve výškách nad 1000 m nad mořem a při teplotách 10–37 °C a na nížinné, které najdeme ve výškách pod 1000 m nad mořem a při teplotách 21–29 °C. Prostřednictvím karnivorní výživy získávají rostliny, nezávisle na kořenové výživě, esenciální dusík a fosfor, což jim umožňuje osidlovat i lokace s chudší půdou. Nejčastější kořisti jsou mravenci, létající hmyz či dokonce drobní obratlovci^{19,20}. Uvádí se, že rod *Nepenthes* získává až 60 % celkového dusíku trávením kořisti v láčkách²¹. Láčky (nazývané také pasti) se vytvářejí z úponků na konci listů. Láčky mohou být umístěny v horní části rostliny, v tomto případě jsou nálevkovité, zúžené směrem k úponku. Pasti umístěné v dolní části rostliny jsou soudkovité, se dvěma rovnoběžnými pásy na přední straně láčky (Obr. 5)²². Vstup do láčky je lemován zvrásněným prstencem – peristomem. Ten je nápadně zbarven a vyznačuje se zvláštní topologií – anizotropní povrch je uspořádán tak, že pohyb kořisti je ztížen při pokusu o únik z pasti

²³. V horní části láčky jsou umístěny krystalky vosků, skládajících se převážně

z dlouhých (C_{30} a C_{32}) řetězců aldehydů a primárních alkoholů²⁴. Krystaly jsou křehké, snadno se ulamují a ulpívají kořisti na končetinách, čímž jí znesnadňují pohyb²³. Ve spodní části láčky se nacházejí bifunkční sekreční žlázy, jejichž úlohou je jak sekrece trávicí tekutiny, tak i příjem natrávených živin²⁵. Poněkud bizarní způsob získávání dusíku u *N. lowii*, *N. macrophyla* a *N. rajah* je sběr výkalů živočichů, které se mezitím živí nektarem z peristomu^{26,27}. Rostlina však dokáže strávit i rostlinný materiál. Uvádí se, že až 35 % fixovaného dusíku pochází u *N. ampullaria* právě z rostlinného materiálu²⁸. Tekutina z neotevřených láček byla využívána jako lék proti popáleninám, kašli, poškozením kůže a jako laxativum.

1.3.2 Obsah trávicích šťáv

Kapalný obsah láček je směsí mnoha sloučenin s odlišnými vlastnostmi a funkcemi (Obr. 6). Všechny tyto látky jsou sekretovány zvláštními žlázami na spodní straně láčky a v menší míře také epidermálními buňkami. Tekutina především slouží k usmrcení a stravení kořisti. Současně je minimalizována možnost úniku hmyzu z láčky díky specifickým fyzikálním vlastnostem tekutiny – vysoké viskozitě a nízkému povrchovému napětí. Viskozita šťáv je způsobena zvýšenou koncentrací



Obrázek 6: Složení obsahu láčky a funkce nejdůležitějších enzymů⁴⁷

lineárních poly-sacharidů zatímco snížené povrchové napětí zapřičiňuje přítomnost surfaktantů v roztoku. Díky kombinaci těchto dvou faktorů je zamezen pohyb kořisti v láčce a smrt nastává nejčastěji utonutím nebo udušením. Zabití kořisti napomáhá i nízké pH trávicí tekutiny. Acidita roztoku je zajištěna pumpováním H^+ iontů z epidermálních buněk a sekrečních žláz ve spodní části láčky. Změny pH jsou spojeny s dozráváním a otevřením pasti (pH tekutiny z *N. alata* snížilo hodnotu ze 4,3 na 2,8 za pět dnů po otevření láčky¹⁵) nebo lapaním kořisti. Přítomnost hmyzu je detekována receptory pro chitin na povrchu sekrečních buněk láčky. Vazbou chitinu na receptor je spuštěna signalizační

kaskáda, která způsobí sekreci proteinů a dalších látek do roztoku v láčce (většinou se jedná o sloučeniny inhibující růst a množení bakterií a germinaci spor^{29,30}). Mezi identifikovanými enzymy jsou chitinasy^{31,32}, proteasy, lipasa, peroxidasa a ribonukleasa³³. Trávení je zahájeno štěpením hmyzího polysacharidového exoskeletu chitinasami a oxidací proteinů peroxidasami. Peroxidasy hrají v celém procesu dvojí úlohu – jednak svým účinkem paralyzují kořist a zároveň napomáhají štěpení proteinů a peptidů proteasami³⁴, jelikož je známo, že oxidované proteiny jsou degradovány (např. chymotrypsinem nebo trypsinem) rychleji, než jejich neoxidované formy³⁵. S chycením kořisti (a tedy i snížením pH roztoku) dochází k aktivaci vlastních proteas láčkovky – nepenthesinu I a II. V roztoku byla nalezena také nespecifikovaná cysteinová proteasa, která se nemůže účastnit samotného trávení díky nízkému pH roztoku. Mezi další enzymy patří lipasa, která zprostředkovává štěpení zejména buněčných membrán³⁶, ribonukleasa, fosfatasa a fosfoamidasa³⁷, které se účastní štěpení nukleových kyselin lapené kořisti.

1.3.3 Charakteristiky proteas z láčkovek

V tekutině z láček byla nalezena vlastní rostlinná proteasa, pojmenovaná nepenthesin (EC 3.4.23.12)³⁸. Purifikace enzymu byla provedena Athaudou et al.³⁹ a byly stanoveny jeho dvě formy, nepenthesin I (Obr. 7) a nepenthesin II. Tyto formy se navzájem liší molekulovou hmotností, hodnotou izoelektrického bodu (3,94 a 3,09) a předpokládanou mírou N-glykosylace. Obě formy jsou tvořeny 437 aminokyselinovými zbytky, z nichž prvních 24 aminokyselin tvoří signální sekvenci pro extracelulární transport a dalších 55 tvoří úsek, jehož odštěpením se enzym aktivuje. Sekvenční identita pro obě formy je 66,5 %. Jak nepenthesin I tak i nepenthesin II postrádají PSI sekvenci, obvyklou pro rostlinné

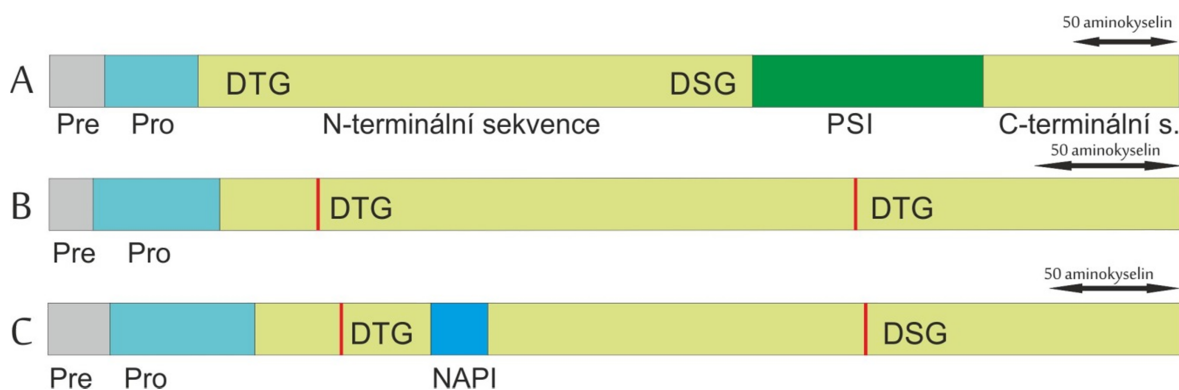
```

MASSLYSFLLALSIVYIFVAPTHSTSRTALNHRHEAKVTGFQIMLEHVDSGKNLTKFQLI 60
ERAIERGSRRRLQRLEAMLNGPSGVETSVYAGDGEYLMNLSIGTPAQPFSAIMDTGSDLIW 120
TQCQPCTQCFNQSTPIFNPDGSSSFSTLPCSSQLCQALSSPTCSNNFCQYTYGYGDGSET 180
QGSMTETLTFGSVSIPNITFGCGENNQGFQNGAGLVGMGRGPLSLPSQLDVTKFSYC 240
MTPIGSSTPSNLLLGLSLANSVTAGSPNTTTLIQSSQIPTFYIITLNGLSVGSTRLPIDPSA 300
FALNSNNGTGGIIIDSGTTLTYFVNNAYQSVRQEFISQINLPVVNGSSSGFDLCFQTPSD 360
PSNLQIPTFVMHFDGGDLELPSENYFISPSNGLICLAMGSSSQGMSIFGNIQQQNMLVVY 420
DTGNSVVSFASAQCGAS 437

```

Obrázek 7: Aminokyselinová sekvence nepenthesinu I. Šedou barvou je vyznačena signální sekvence, modře je propeptidová část, aspartáty aktivního místa jsou označeny červeně a fialové jsou potenciální místa glykosylace. Sekvence převzata ze SwissProt databáze, kód NEP1_NEPR

AP. Důvodem může být extracelulární lokace enzymu. Athauda³⁹ dále rozlišuje formu nepenthesin Ia a nepenthesin Ib navzájem se odlišující sekvencemi Asp²²³–Asn²⁵¹–Gly³⁹² a Val²³³–Thr²⁵¹–Glu³⁹². Naopak Kubotovi et al.⁴⁰, se podařilo separovat dvě, dále nespecifikované, frakce nepenthesinu II – nepenthesin IIa a nepenthesin IIb, které se navzájem odlišují stabilitou vůči denaturačním činidlům. Teoretická hmotnost nepenthesinu I byla odhadnuta na 37 kDa, analýza přirozeně se vyskytující formy proteinu prostřednictvím SDS-PAGE však ukázala pruh v poloze 45 kDa. Hodnota molekulové hmotnosti pro nepenthesin II naopak odpovídala teoretické hodnotě. Na základě tohoto experimentu a výskytu potenciálních N-glykosylačních míst byla navržena možnost glykosylace nepenthesinu I a absence této posttranslační modifikace u nepenthesinu II (kde se také nevyskytují N-glykosylační konsenzus sekvence). Glykosylace byla u nepenthesinu I experimentálně potvrzena na Asp⁹⁸ a Asp¹³¹³⁹. Obě formy enzymu obsahují po 12 cysteinech, které pravděpodobně tvoří 6 disulfidických vazeb. Také se v primární struktuře nepenthesinu vyskytuje unikátní sekvence o přibližně 25 aminokyselinách, která se vyznačuje velkou variabilitou mezi jednotlivými druhy rostlin⁴¹. Tato sekvence, nazývaná NAP insert (nepenthesin–like AP), je specifická přítomností čtyř cysteinů, pravděpodobně tvořících disulfidické můstky a přispívajících k mimořádné stabilitě nepenthesinů (Obr. 8).



Obrázek 8: Srovnání sekvencí schémat obecné rostlinné aspartátové proteasy (A, převzato z¹⁴) prasečích pepsinu A (B) a nepenthesinu I (C) z *N. gracilis*. Pre – signální sekvence, Pro – propeptidový úsek, DTG/DSG – aminokyselinové triády aktivního místa (katalytické aspartáty vyznačeny červeně), NAPI – nepenthesin–like aspartic protease insert

Při testování enzymové specifity bylo odhaleno, že nepenthesin má poněkud širší sekvencí specifitu, než ostatní známé aspartátové proteasy. Jak se ukázalo, enzym štěpí nejlépe na N a C konci kyseliny asparagové. Ke štěpení peptidu nedocházelo u terminálního zbytku kyseliny asparagové, což podmiňuje zařazení

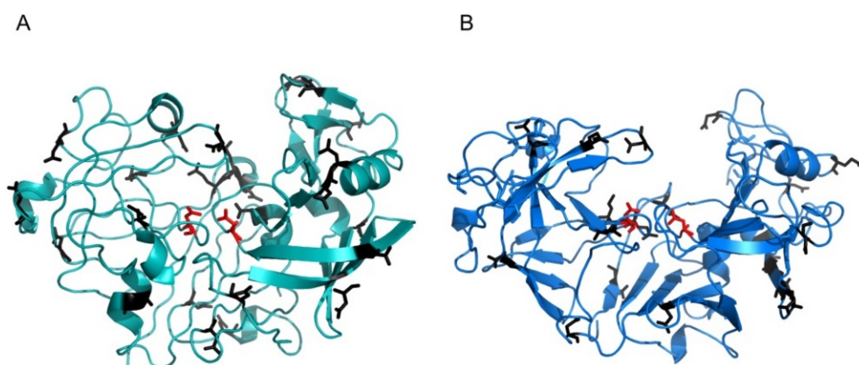
proteasy mezi endopeptidasy. Specifita se projevila také v případě tyrosinu, ovšem hydrolyza nastávala v těchto místech méně často. Dále bylo zjištěno, že aminokyseliny Trp, Gln a Glu kolem Asp na štěpeném peptidu upravují afinitu enzymu k substrátu, a tím i četnost štěpení ³⁸. V pozdější studii Athauda et al., poukazuje na velkou afinitu enzymu k sekvencím Phe–Phe, Glu–Ala, Leu–Cya (Cya pro kyselinu cysteovou) ³⁹ a Rey et al. vyzdvihuje schopnost štěpení za bazickými aminokyselinami Arg, Lys a His a také, velmi neobvyklé, za prolinem ⁴².

1.3.4 Stabilita nepenthesinu vůči pH, teplotě a denaturačním činidlům

Velmi zajímavým zjištěním byla také pozoruhodná odlišnost ve stabilitě v širokém rozmezí teplot a pH. Na druhou stranu se ukázalo, že stabilita vůči denaturačním činidlům je oproti pepsinu nižší. Stabilita při vyšších hodnotách pH je vysvětlována menším výskytem kyselých zbytků v primární struktuře (Obr. 9). Tyto se při překročení pH, rovné jejich hodnotě pKa disociují a repulze záporně nabitých zbytků přispívá celkovému rozvolnění struktury. Stejnou úvahu lze použít pro vysvětlení

nižší stability nepenthesinu II (33 kyselých a 1 zásaditý zbytek) oproti nepenthesinu I (20 kyselých a 5 zásaditých zbytků) ³⁹.

Denaturace aspartátových



Obrázek 9: (A) Struktura prasečího pepsinu (PDB 5PEP) a (B) homologní model nepenthesinu I z *N.gracilis* vytvořený Ing. Janem Dohnálkem z ÚMCH AV ČR. Červeně jsou označeny katalytické aspartáty a černě kyselý zbytek (generováno v programu PyMOL)

proteas začíná rozbalením N-terminální domény, po kterém následuje rychlé rozvolnění zbytku proteinu. Nepenthesin má ve své N-terminální části zvýšený počet disulfidických vazeb, které mu zajišťují mimořádnou stabilitu ve srovnání s ostatními AP. Původ senzitivity nepenthesinu vůči denaturačním činidlům zatím není jasný ⁴⁰. Nepenthesin, stejně jako pepsin A, je silně inhibován pepstatinem v ekvimolárním poměru.

Měření vlivu hodnoty pH na aktivitu obou forem nepenthesinu (Obr. 10) ukázalo, že optimem je při teplotě 37 °C hodnota pH 2,6. Rozmezí hodnot je ale poměrně široké, ukázalo se, že

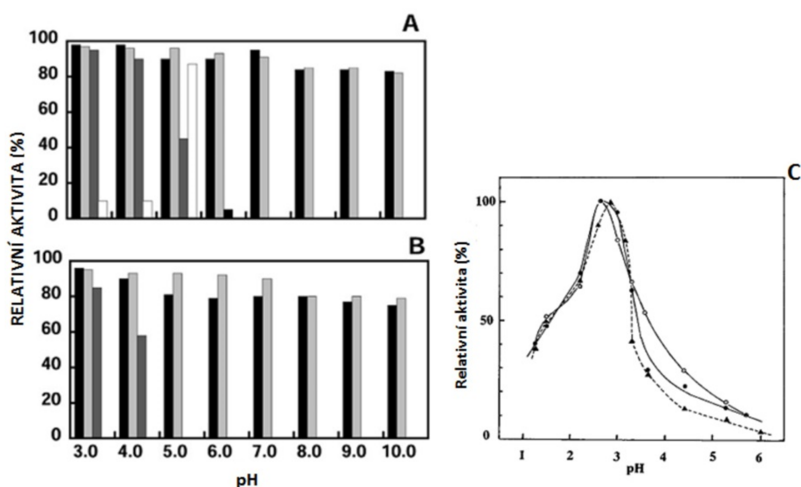
aktivita nepenthesinu byla zachována až do pH 6,0. Pozoruhodné je, že i vysoké hodnoty pH neměly velký vliv na stabilitu enzymů, při 30 denní inkubaci při pH 10 bylo zachováno skoro 80 % aktivity nepenthesinu. U

pepsinu bylo podobného výsledku dosaženo pouze díky snížení pH na 5 a zkrácením doby inkubace na 7 dnů.

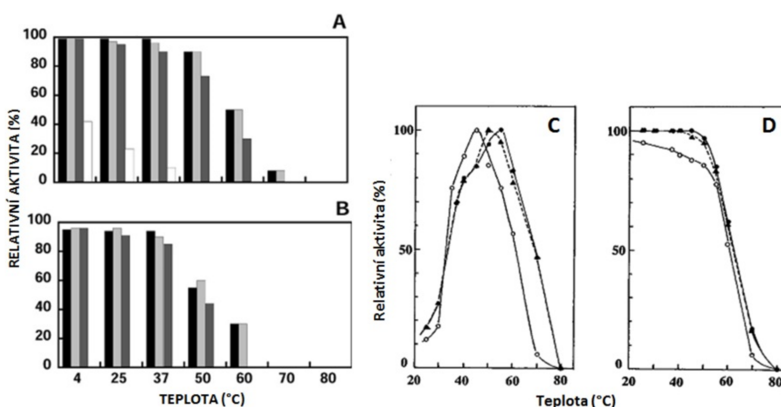
Obdobným způsobem se zkoumal vliv teploty na aktivitu a stabilitu enzymů (Obr. 11). Bylo zjištěno, že

teplotní optimum pro obě formy nepenthesinů je 55 °C (45 °C pro nepenthesin II) a v případě

nepenthesinu I byla aktivita pořád ještě registrována až do 80 °C (70 °C pro nepenthesin II). Po dlouhodobém pozorování lze pro srovnání uvést stability enzymů po sedmidenní inkubaci při 37 °C – pepsin si zachoval 10 % původní aktivity, zatímco nepenthesiny měly v průměru 90% aktivity. Při působení vyšších

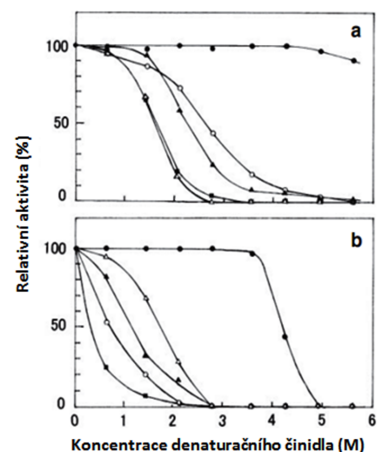


Obrázek 10: Inkubace enzymů při pH 3 po dobu (A) 7 dnů a (B) 30 dnů. Černá: tekutina z láčky, světle šedá: nepenthesin I, tmavě šedá: nepenthesin II, transparentní: pepsin A. (C) Aktivita byla měřena při pH 3,0. (D) Aktivita byla měřena při teplotě 37 °C po 1h inkubaci vzorků při různých teplotách a pH 3,0. -●- nepenthesin I; -○- nepenthesin II; -▲- tekutina z láčky³⁹



Obrázek 11: Aktivita měřena při 37 °C po dobu (A) 7 dnů a (B) 30 dnů při různých hodnotách pH. Černá: tekutina z láčky, světle šedá: nepenthesin I, tmavě šedá: nepenthesin II, transparentní: pepsin A. (C) Aktivita byla měřena na kyselinou denaturovaném hemoglobinu při různých hodnotách pH a při teplotě 37 °C. -○- nepenthesin I; -□- nepenthesin II; -▲- tekutina z láčky³⁹

teplot a při delší inkubaci byla aktivita pepsinu zcela ztracena³⁹. Zcela odlišné charakteristiky byly zjištěny při zkoumání nepenthesinu v přítomnosti denaturujících agens (Obr. 12). Zatímco pepsin si zachovával značný podíl aktivity i při 5,6M koncentraci močoviny, nepenthesin přišel o veškerou aktivitu již při 5M koncentraci. Podobných výsledků bylo dosaženo i s guanidinium chloridem, kdy pepsin měl 90% aktivitu při 3,59M koncentraci zatímco u nepenthesinu I bylo 90 % aktivity zachováno pouze při 0,67M (1,46M pro nepenthesin IIa a 0,67M pro nepenthesin IIb) koncentraci. Z průběhu křivek (přesněji z odlišných koncentrací poloviční denaturace nepenthesinu) pro odlišná denaturační činidla lze soudit o různém mechanismu deaktivace. Výrazné zrychlení denaturace enzymu způsobilo přidání redukčního činidla v koncentracích 40-70mM, tento fakt potvrzuje přítomnost disulfidických vazeb a jejich roli na stabilitě proteinu⁴⁰.



Obrázek 12 Vliv močoviny (a) a guanidinium chloridu (b) na aktivitu nepenthesinů a pepsinu A. -■- nepenthesin I; -▲- nepenthesin IIa; -Δ- nepenthesin IIb; -○- kapalina z láčky; -●- pepsin A [18]

2 Cíl práce

- namnožit plasmid nesoucí gen kódující Nepenthesin I
- nalézt optimální podmínky produkce Nepenthesinu I v bakteriálním expresním systému
- nalézt podmínky pro renaturaci proteinu *in vitro*
- připravit rekombinantní formu nepenthesinu I z *N. gracilis*

3 Materiál

3.1 Přístroje

Analytické váhy AL54-1C	<i>Mettler Toledo, ČR</i>
Automatické pipety P2-P1000	<i>Gilson, USA</i>
Centrifuga Coulter Avanti J26XP	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga J-6M	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga Spectrafuge 16M	<i>Labnet, USA</i>
Centrifuga Z233	<i>Hermle, Německo</i>
Dialyzační trubice Spektra/Por	<i>Spektrum Lab., USA</i>
EPS500/400	<i>Pharmacia, USA</i>
Magnetická míchačka MM2A	<i>Laboratorní přístroje Praha, ČR</i>
Mrazicí box Bio-Freezer	<i>Forma Scientific, USA</i>
pH metr Φ200	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Předvážky HF-1200G	<i>AND, USA</i>
Souprava pro ultrafiltraci	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Spektrofotometr DU-70	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Spektrofotometr NanoDrop 2000c	<i>NanoDrop Products, USA</i>
Termostat Thermomixer comfort	<i>Eppendorf, Německo</i>
Třepačka na Erlenmeyerovy baňky	<i>Gallenkampf, UK</i>
Ultrafiltrační membrána 30 kDa	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Ultrazvuková sonda Ultrasonic Hogenizer 4710	<i>Cole Parmer, USA</i>
UV lampa UVGL-58	<i>Science Company, USA</i>
Vortexový mixer ZX-3	<i>Forma Scientific, USA</i>
Zdroj deionizované vody MilliQ Academic	<i>Millipore, USA</i>
Zdroj napětí BM554	<i>Tesla, ČR</i>

3.2 Chemikálie

2-merkaptóethanol 99%	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Agarosa	<i>Serva, Německo</i>
Akrylamid	<i>Serva, Německo</i>
Ampicilin	<i>Biotika, SR</i>
Azid sodný	<i>Serva, Německo</i>

Bacteriological peptone	<i>Oxoid, UK</i>
Kyselina bicinchoninová	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Bromfenolová modř	<i>Lachema, ČR</i>
Coomassie Brilliant Blue R250	<i>Serva, Německo</i>
Dithiotreitol	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
dNTP	<i>Fermentas, Kanada</i>
Dodecylsulfát sodný	<i>Serva, Německo</i>
Ethanol	<i>Serva, Německo</i>
Ethidium bromid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Fenylmethylsulfonylfluorid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Glycin	<i>Serva, Německo</i>
Hydroxid sodný	<i>Lach-ner, ČR</i>
Chlorid sodný	<i>Lach-ner s.r.o., ČR</i>
Isopropanol	<i>Serva, Německo</i>
Isopropyl- β -D-galaktopyranosid	<i>Serva, Německo</i>
Kvasničný autolyzát	<i>Serva, Německo</i>
Kyselina ethylendiamintetraoctová	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Leupeptin hemisulfat	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Močovina	<i>Serva, Německo</i>
Myoglobin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
N,N'-bismethylenakrylamid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
N-cyclohexyl-3-aminopropansulfonová kys.	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
NEB DNA buffer, 1kb	<i>New England Biolabs, USA</i>
Peroxodisíran amonný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Sacharosa	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
SeeBlue Pre-Stained Standard	<i>Serva, Německo</i>
Standard pro agarosovou elektroforesu	<i>New England Biolabs, USA</i>
Standardy pro SDS-PAGE	<i>Invitrogen, USA</i>
Tetracyklin	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Tetramethylethyldiamin	<i>Serva, Německo</i>
Triton X-100	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
<i>Ostatní chemikálie byly minimálně čistoty p.a. a byly od firmy Lachema nebo Sigma-Aldrich.</i>	

3.2.1 Enzymy

<i>HindIII</i>	<i>New England Biolabs, USA</i>
<i>NdeI</i>	<i>New England Biolabs, USA</i>
Pepsin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
RNAsa I (10 mg/ml)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
DNAsa I (10 U/ml)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>

3.2.2 Roztoky

- **1. Renaturační pufr:** 8M močovina, 50mM CAPS, 1mM EDTA, 1 mMglycin, 500mM NaCl, 300mM 2-merkapt ethanol, pH 10,5
- **1000× roztok Metal mix** (100 ml): 50 ml 0,1M FeCl₃•6H₂O , 2 ml 1M CaCl₂, 1 ml 1M MnCl₂•4H₂O, 1 ml 1M ZnSO₄•7H₂O, 1 ml 0,2M CoCl₂•6H₂O, 2 ml 0,1M CuCl₂•2H₂O, 1 ml 0,2M NiCl₂•6H₂O, 2 ml 0,1M Na₂MoO₂•2H₂O, 2 ml 0,1M Na₂SeO₂•5H₂O, 2 ml 0,1M H₂BO₂
- **2. Renaturační pufr:** 50 mM Tris-HCl, pH 11
- **20× roztok NPS:** 6,6 g (NH₄)₂SO₄; 13,6 g KH₂PO₄; 14,2 g Na₂HPO₄, 90 ml voda
- **3. Renaturační pufr:** 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
- **4. Renaturační pufr:** 50 mM MOPS, 300 mM NaCl, pH 7,5 nebo 50 mM fosfátový pufr, 300 mM NaCl, pH 7,5
- **50× roztok 5052:** 25 g glycerol; 2,5 g glukosa; 10 g α-laktosa; 73 ml voda
- **Agarosový gel:** 0,5 g agarosa, 50 ml TAE pufr, 5 µl ethidium bromid
- **Akrylamidový mix:** 29% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) N,N'-bismethylenakrylamid
- **Genaid Maxi Plasmid Kit:** PM1, PM2, PM3 Buffer, PEQ Buffer, PW Buffer, PEL Buffer, RNase A
- **Geneaid Mini Plasmid Kit:** PD1, PD2, PD3 buffer, W1 pufr, Wash pufr, Elution pufr
- **LB agar:** 1,5% agar v LB mediu
- **NEB4 pufr:** 10mM Bis-Tris-propan-HCl, 10 mM MgCl₂, 1mM DTT, pH 7,9
- **Promývací pufr pro izolaci inkluzních tělísek (500ml):** 3,03 g Tris-HCl; 2,92 g NaCl; 0,5 ml 1M 2-merkapt ethanol; 0,5 ml 1M NaN₃; pH 7,4

- **Pufr pro SDS-PAGE – elektrodový:** 10mM Tris-HCl, 250 mM glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3
- **Roztok M6 (1l):** 85,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 15 g KH_2PO_4 ; 2,5 g NaCl; 5 g NH_4Cl , doplnit vodou na 1000 ml
- **Roztok pro SDS-PAGE – barvicí:** 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová, 0,25% (w/v) CBB R-250
- **Roztok pro SDS-PAGE – fixační a odbarvovací:** 35% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová
- **Roztok ZY (925 ml):** 10 g trypton; 5 g kvasničný autolyzát; ~925 ml voda
- **Sacharózový pufr pro izolaci inkluzních tělísek (500 ml):** 125 g 25% sacharóza; 3,03 g Tris-HCl; 1 ml 0,5 M EDTA; 0,5 ml 1 M NaN_3 ; pH 7,4
- **STOP pufr:** 30% (w/v) glycerol, bromfenolová modř, TE pufr
- **TAE pufr pro agarosovou elektroforesu:** 40mM Tris, 20mM CH_3COOH , 1mM EDTA.
- **Tritonový pufr pro izolaci inkluzních tělísek (500 ml):** 3,03 g Tris-HCl; 2,92 g NaCl; 2,5 ml Triton X-100; 0,5 ml 1M 2-merkaptoetanol; 0,5 ml 1M NaN_3 ; pH 7,4
- **Vzorkový pufr pro agarosovou elektroforézu (STOP pufr):** 6× Loading Dye: 50% glycerol, bromfenolová modř, TE pufr
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující:** 50mM Tris-HCl, 12% (v/v) glycerol, 4% SDS (w/v), 0,1 % (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující:** 50mM Tris-HCl, 12% (v/v) glycerol, 4% SDS (w/v), 0,1 % (w/v) bromfenolová modř, 100 mM DTT, pH 6,8

3.2.3 Média

- **2YT médium (1000 ml):** 16 g bakto-trypton; 10 g kvasničný autolyzát; 5 g NaCl; doplnit vodou na 1000 ml
- **Autoindukční medium ZYP-5052 (200 ml):** 186 ml ZY; 0,2 ml 1000× metal mix; 0,2 ml 1M MgSO_4 ; 4 ml 50× 5052; 10 ml 20× NPS; 0,2 ml ampicilin (50mg/ml)
- **LB medium (1l, pH 7):** 10 g bakto-trypton; 5 g kvasničný autolyzát; 5 g NaCl; doplnit vodou na 1000 ml

- **M6 minimální médium** (1000 ml): ~778 ml voda; 200 ml M6; 2 ml 1M MgSO₄; 20 ml 20% glukosy; 100 µl 1M CaCl₂
- **Růstové médium P-0,5G** (50 ml): 46,8 ml voda; 50 µl 1M MgSO₄; 5 µl 1000× metal mix; 0,625 ml 40% (w/v) glukosy; 2,5 ml 20× NPS; 50 µl ampicilin (50 mg/ml)
- **Růstové médium ZYP-0,8G** (50 ml): 46,5 ml ZY; 50 µl 1M MgSO₄; 1 ml 40% glukosy; 2,5 ml 20× NPS; 50 µl Ampicilin (50 mg/ml)

Použité koncentrace antibiotik v médiích:

- Ampicilin 150 µg/ml
- Tetracyklin 12,5 µg/ml

3.2.4 Vektory

- pET21a

3.2.5 Bakteriální kmeny

- *E.coli* NovaBlue *endA1 hsdR17*(r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15::Tn10]* (Tet^R) Novagen, USA
- *E.coli* BL21-Gold (DE3) B F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm⁺ Tet^r gal λ*(DE3) *endA Hte* Stratagene, USA
- *E.coli* C41(DE3) F⁻ *ompT gal dcm hsdS_B*(r_B⁻ m_B⁻)(DE3) Lucigen, USA
- *E.coli* C43(DE3) F⁻ *ompT gal dcm hsdS_B*(r_B⁻ m_B⁻)(DE3) Lucigen, USA

4 Metody

4.1 Transformace kompetentních buněk

Pro produkci proteinu je nutné zanést do buněk DNA ve formě plasmidu obsahujícího gen pro požadovanou bílkovinu. Plasmid je vnášen do kompetentních buněk v procesu zvaném transformace. Všechny buňky *Escherchia coli* byly transformovány metodou tepelného šoku. Touto metodou je cytoplasmatická membrána destabilizována působením vyšší teploty a vápenatých iontů, destabilizace membrány je provázena vytvořením pórů. Těmito otvory plasmid může vniknout do cytosolu.

Kompetentní buňky ve dvou mikrozkušavkách byly vyjmuty z mrazicího boxu a vloženy na led, pak bylo do jedné vneseno 0,5 µl vektoru pET21a (1 µg/µl)

a obě zkumavky byly ponechány stát 30 minut na ledu. Poté byly buňky vloženy do vodní lázně o teplotě 42 °C a byly v ní ponechány 45 sekund. Následně bylo k oběma zkumavkám přidáno po 1 ml LB média bez antibiotik, buňky byly inkubovány 1 hodinu při teplotě 37 °C. Po inkubaci byly buňky vloženy do centrifugy a odstředovány 1 minutu při 4000×g. Byl odebrán 1 ml supernatantu a sediment byl resuspendován. Poté bylo 20 µl buněčné suspenze rozetřeno na Petriho misce s agarem s odpovídajícími antibiotiky (pro C41 a C41 pouze ampicilin, pro NovaBlue a Gold ampicilin a tetracyklin, koncentrace viz kap. 3.2.3, s. 23) jako selekčními markery. Nakonec byla miska inkubována přes noc při teplotě 37 °C.

4.2 Minipreparativní izolace plasmidové DNA

Minipreparativní izolace slouží k extrakci plasmidové DNA z malého množství transformovaných buněk. Čerstvě transformované buňky se v objemu 20 µl nanese na agarovou plotnu a jsou rozetřeny po celém povrchu plotny. Potom jsou buňky na agarech inkubovány 12 hodin při 37 °C. Následně je z agaru vybrána buněčná kolonie, která se z plotny setře a vnese do média. Buněčný klon je pak kultivován 12 hodin při 37 °C. Potom je suspenze odebrána, centrifugována při 4000×g a získaný pelet je zpracováván podle návodu.

K buněčnému sedimentu bylo přidáno 200 µl PD1 pufru, v němž byl pelet resuspendován. Pak bylo do zkumavky přidáno 200 µl PD2 pufru, směs byla promíchána otáčením zkumavky a byla inkubována při laboratorní teplotě. Ke směsi bylo přidáno 300 µl PD3 pufru a roztok byl promíchán otáčením zkumavky (10×). Obsah mikrozukavky byl následně odstředěn při 14000×g po dobu 30 minut. Poté byla extrakční kolonka vložena do 2 ml sběrací zkumavky a na kolonku byl nanesen supernatant z předchozího kroku. Kolonka v mikrozukavce byla centrifugována při 14000×g po dobu 1 minuty. Na kolonku bylo pak nanese 400 µl W1 pufru, zkumavka byla odstředěna při 14000×g po dobu 1 minuty. Následně bylo na kolonku nanese 600 µl Wash pufru, zkumavka byla znovu odstředěna při 14000×g po dobu 1 minuty. Eluát byl odlit a kolonka v mikrozukavce byla centrifugována dalších 5 minut za stejných podmínek. Kolonka byla následně přesunuta do nové mikrozukavky, bylo na ni nanese 50 µl Elution pufru a kolonka byla ponechána stát 2 minuty, následovala centrifugace při 14000×g po dobu 5 minut.

4.3 Maxipreparativní izolace plasmidové DNA

Namnožený plasmid s požadovanou DNA je třeba izolovat ve větším množství pro další manipulaci. Buňky *E.coli* NovaBlue, transformované plasmidem pET21a byly přeočkovány do 400 ml LB média a byly kultivovány 12 h při 37 °C. Poté byly přesunuty do čtyř 50 ml zkumavek a centrifugovány při 6000×g. Izolace byla provedena pomocí sady Maxi Plasmid Kit (Geneaid) dle návodu.

Extrakční kolona byla ekvilibrována 10 ml PEQ pufru. K buněčné suspenzi bylo mezitím přidáno 10 ml PM1 pufru a směs byla resuspendována. K roztoku bylo pak přidáno 10 ml PM2 pufru, směs byla promíchána otáčením zkumavky a byla ponechána stát 2 minuty při laboratorní teplotě. Pak bylo do roztoku přidáno 10 ml PM3 pufru, směs byla promíchána a centrifugována 20 minut při 37 °C a 6000×g. Supernatant byl posléze přes papírový filtr nalit na kolonu. Po protečení kolonou byl obsah sběrné zkumavky odstraněn a kolonou bylo prolito 30 ml PW pufru. Na kolonu bylo nanášeno 12 ml elučního PEL pufru, který se nechal protéct kolonou. K eluátu bylo pak přidáno 9 ml (0,75 objemu roztoku) isopropanolu, roztok byl promíchán a centrifugován při 15000×g 30 minut při 4 °C. Supernatant byl následně opatrně odebrán a zkumavka byla naplněna 5 ml 75% ethanolu. Roztok byl opět centrifugován při 15000×g při 4 °C 10 minut. Supernatant byl odebrán a zkumavka byla 10 min sušena na vzduchu při laboratorní teplotě. Precipitovaná DNA byla nakonec rozpuštěna ve 2 ml TE pufru.

4.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Po izolaci plasmidové DNA byla stanovena její přibližná koncentrace a čistota pomocí měření absorpce při vlnových délkách 260 a 280 nm. Dusíkaté báze nukleových kyselin silně absorbují při vlnové délce 260 nm. V proteinech nejvíce absorbují aminokyseliny tyrosin, tryptofan a fenylalanin specificky při vlnové délce 280 nm. Z poměru $R_{280/260}$ lze přibližně zjistit čistotu izolované DNA a z hodnoty absorpce při 260 nm lze přibližně určit koncentraci DNA (absorbance při 260 nm je rovna jedné, je-li koncentrace 50 µg / ml)

4.5 Elektroforesa DNA v agarosovém gelu

Elektroforesa v agarosovém gelu se používá k separaci různě dlouhých úseků DNA, lišících se elektroforetickou pohyblivostí. Gel se připravuje povařením agarosy v příslušném objemu elektroforetického pufru. Ke gelu je také přidáván

ethidium bromid. Toto činidlo se interkaluje do struktury DNA a po ozáření UV světlem emituje přibližně 20× intenzivněji⁴³.

K přípravě jednoho gelu bylo vždy odváženo 0,5 g agarosy, která byla povařením rozpuštěna v 50 ml TAE pufru. Po mírném ochlazení byl roztok nalit do formy pro gel, byl vložen hřeben vytvářející jamky pro nanesení vzorků a gel byl ponechán ztuhnout. Po ztuhnutí gelu, byl vyndán hřeben a do jamek byly vždy nanášeny vzorky smíchané s odpovídajícím objemem 6× koncentrovaného STOP pufru. Elektroforesa probíhala při konstantním počátečním napětí 65 V, po zaputování vzorků do gelu bylo napětí zvýšeno na 90 V.

4.6 Restrikční štěpení a analýza

Pro potvrzení úspěšné amplifikace plasmidu v bakteriální kultuře byl izolovaný plasmid rozštěpen příslušnými restriktasami a vzniklé fragmenty byly analyzovány agarosovou elektroforesou.

Precipitovaná plasmidová DNA byla rozpuštěna v 200 µl destilované vody a odstředěna při 15000×g, následně byl z roztoku odebrán vzorek o objemu 20 µl za účelem spektrofotometrického stanovení koncentrace a čistoty DNA dle 4.3. Po určení koncentrace bylo ze vzorku odebráno po 3 µg DNA (10 µl izolovaného pET21a) a roztok byl doplněn destilovanou vodou na celkový objem 10 µl. Ke vzorkům byl přidán NEB4 pufr a 0,5 µl *HindIII* a 0,5 µl *NdeI* restriktas. Plasmidy byly inkubovány 2 h při 37 °C. Po této době bylo přidáno 2 µl vzorkového STOP pufru, vzorky byly pak nanесeny na agarosový gel.

4.7 Produkce proteinu a +/- pokus v kompetentních buňkách

Připravený plasmid byl transformací vnášen do bakteriálních kmenů určených pro produkci proteinu. Transformované buňky se před produkcí kultivují do dostatečné hustoty (optické density měřené při vlnové délce 550 nm; OD₅₅₀ = 0,6). Poté lze začít produkci požadovaného proteinu přidáním induktoru do média s buňkami. Jako induktor exprese proteinu byl použit isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) – analog allolaktosy, metabolitu laktosy. IPTG se váže na lac represor, čímž sníží afinitu represoru na DNA a umožní se navázat RNA polymerase.

Noční kultury ze zkumavek s odpovídajícími růstovými médii byly v objemu 20 µl přeočkovány do zkumavek se 3 ml připravených médií (vždy po dvou – indukovaný a neindukovaný vzorek). Přeočkované kultury byly vloženy do

termostatu a byly inkubovány 2 hodiny při teplotě 37 °C nebo 28 °C. Z kultur v neautoindukčních médiích bylo každou hodinu odebíráno po 200 µl buněčné směsi, ta byla naředěna vodou na 400 µl a byla proměřena její optická densita při 550 nm. Po dosažení $OD_{550} = 0,6$ byly buňky indukovány pomocí IPTG v takovém objemu, aby koncentrace induktoru ve zkumavkách činila 0,5 mmol/l. Buňky produkovaly protein po dobu 4 hodin, pak byly odstředěny při 4000×g a uloženy v mrazicím boxu.

4.8 Velkoobjemová produkce

Po zkušebních produkcích a optimalizaci produkčních podmínek v malém objemu byla nasazena velkokapacitní produkce v 1 l média. Z dříve připravených misek s buňkami *E. coli* C41 byly kolonie vypíchnuty a přeočkovány do 3 ml LB média. Buňky byly kultivovány 12 hodin při 37 °C. Noční kultury byly posléze inokulovány v objemu 1,5 ml do dvou Erlenmeyerových baněk o objemu 2 l s 0,5 l LB média. Baňky byly protřepávány při 220 otáčkách, dokud optická densita buněk v médiu nedosáhla hodnoty $OD_{550} = 0,6$. Pak byly kultury indukovány pomocí přidání IPTG, na konečnou koncentraci 0,1 mM. Po čtyřhodinové produkci bylo médium přesunuto do centrifugačních kyvet a směs byla centrifugována při 4000×g. Supernatant byl odlit a pelet byl uchován v mrazicím boxu při –80 °C.

4.9 Diskontinuální zónová elektroforesa proteinů v polyakrylamidovém gelu

K vizualizaci a separaci proteinového obsahu roztoku nebo buněčné směsi se používá elektroforesa v polyakrylamidovém gelu (PAGE) v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS). Účelem metody je rozdělení složek směsi na základě jejich celkového náboje a velikosti. Elektroforesa využívá pohybu nabitých částic v stejnosměrném elektrickém poli. Gelového nosiče se přitom užívá k omezení difuzního pohybu částic analyzované směsi. Vzorek se nanáší na vrstvu řídkého (velkopórového) gelu, kde se bílkoviny koncentrují do úzkého proužku před vlastním dělením ve spodním, koncentrovanějším gelu. K dělení je nutné dodat proteinům záporný náboj a tím umožnit separaci pouze podle velikosti molekuly. Tomu se napomáhá přidáním tenzidu SDS – vlastní náboj molekuly je překryt nábojem komplexu s SDS a při dělení se uplatňuje pouze velikost a tvar molekuly⁴⁴.

K elektroforese vzorků byl vždy používán 12% polyakrylamidový gel, vzorky byly naneseny na 5% zaostřovací gel společně se vzorkovým pufr (SB). K buněčným suspenzím bylo předtím vždy přidáno 130 μ l vzorkového pufru pro SDS-PAGE, ke vzorkům kapalným vždy objem 2 \times koncentrovaného SB pufru v poměru 1:1 vzhledem k roztoku. Takto připravené vzorky byly 5 minut povařeny ve vodní lázni a 5 minut centrifugovány při 14000 \times g.

Složení separačního a dělicího gelu:

- **12% polyakrylamidový gel (1 gel):** 1,6 ml dH₂O, 2 ml 30% akrylamid mix, 1,3 ml 1,5M Tris pufr (pH 8,8), 50 μ l 10% SDS, 50 μ l 10% APS, 2 μ l TEMED
- **5% velkopórový polyakrylamidový gel (1 gel):** 3,4 ml dH₂O, 0,83 ml 30% akrylamid mix, 0,63 ml 1M Tris pufr (pH 6,8), 50 μ l 10% SDS, 50 μ l 10% APS, 5 μ l TEMED

4.10 Vizualizace proteinů v polyakrylamidovém gelu dusičnanem stříbrným

Aktivovaný nepenthesin není účinně vizualizován pomocí briliantní modři (CBB-R250), proto bylo využíváno barvení proteinů v gelu dusičnanem stříbrným. Polyakrylamidový gel byl postupně promýván v roztocích uvedených v Tab. 1.

Tabulka 1: Postup při vizualizaci proteinů dusičnanem stříbrným

	Roztok	Objem a množství složek roztoku	Čas (min)	Poznámka
1	30% ethanol 10% CH ₃ COOH	15 ml ethanol + 5 ml CH ₃ COOH + 30 ml H ₂ O	3 \times 30	fixace
2	20% ethanol	10 ml ethanolu + 40 ml H ₂ O	10	fixace
3	H ₂ O	50 ml H ₂ O	10	promývání
4	0,2 g/l Na ₂ S ₂ O ₃	20 μ l 0,5 g/ml Na ₂ S ₂ O ₃ , 50 ml H ₂ O	1	sensibilizace
5	H ₂ O	50 ml H ₂ O	2 \times 0,3	promývání
6	2 g/l AgNO ₃	0,1 g AgNO ₃	30	impregnace
7	H ₂ O	50 ml H ₂ O	0,2	promývání
8	0,7 ml/l HCHO 30 g/l K ₂ CO ₃ 10 mg/l Na ₂ S ₂ O ₃	35 μ l 37% HCHO, 1,5 g K ₂ CO ₃ , 1 μ l 0,5 g/ml Na ₂ S ₂ O ₃ , 50 ml H ₂ O	2–4	vyvolání
9	50 g/l Tris–HCl, 25% CH ₃ COOH	2,5 g Tris–HCl, 13 ml CH ₃ COOH, 37 ml H ₂ O	1	zastavení

4.11 Izolace inkluzních tělísek

Vyprodukovaný protein se v buňkách ukládal ve formě nerozpustných inkluzních tělísek, která byla od suspenze oddělena promýváním ve třech pufrch.

Nejdříve bylo médium s buňkami přesunuto do centrifugačních kyvet, směs byla centrifugována 15 minut při 4000×g, Supernatant byl odlit a sediment byl rozpuštěn ve 20 ml sacharóзовého pufru. Následně byly přidány inhibitory proteas Leupeptin (výsledná koncentrace v pufru 1 μM), PMSF (výsledná koncentrace v pufru 1mM), buňky byly homogenizovány čtyřnásobným zmražením na –80 °C a ohřátím na ~50 °C. K výsledné suspenzi bylo přidáno 400 μl 1M MgCl₂, 3 μl DNAsy I (10mg/ml) a 5 μl RNAsy I (10 U/ml). Směs byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě a centrifugována 15 minut při 10000×g. Supernatant byl odebrán a sediment byl následně resuspendován sonikací v tritonovém pufru. K suspenzi byly opět přidány inhibitory proteas ve stejném množství jako předtím, a byla provedena centrifugace při stejných podmínkách. Posledním krokem je resuspendování sedimentu v promývacím pufru s inhibitory proteas. Po centrifugaci byl supernatant opět odstraněn a izolovaná inkluzní tělíska byla uchována v mrazicím boxu při teplotě –80 °C. Ve všech krocích byly odebírány vzorky pro analýzu průběhu izolace pomocí SDS-PAGE

4.12 Renaturace proteinu do aktivní konformace.

Pro renaturaci proteinu byla použita metoda dialýzy, dříve úspěšně v laboratoři využita pro při renaturaci rhizopuspepsinu ⁴⁵.

Isolovaná inkluzní tělíska o přibližné hmotnosti 1 g (namokro) byla rozpuštěna v **1. renaturačním** pufru, následně bylo pH roztoku upraveno 10M NaOH na hodnotu 10,5 a objem byl doplněn destilovanou vodou na 1 l. V tomto roztoku byla inkluzní tělíska míchána za teploty 37 °C po dobu 1 h. Pak byl roztok přesunut do dialyzačních trubic a byl ponechán dialyzovat proti 5 l **2. renaturačního** pufru pufru o hodnotě pH 11. Po hodině byl dialyzační pufr vyměněn za čerstvý **2. renaturační** pufr – 50mM Tris-HCl, pH 11. Po další hodině dialýzy byl pufr vyměněn za **3. renaturační** pufr a proces byl ponechán na 12 h při teplotě 4 °C. Posledním, **4. renaturačním** pufr byl 50mM MOPS nebo při dalších produkcích PBS pufr o pH 7 a dialýza byla prováděna 24 h při teplotě 4 °C.

4.13 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu pomocí reakce s kyselinou bicinchoninovou.

Kyselina bicinchoninová (dále BCA) reaguje s měďnými kationty v alkalickém prostředí za vzniku fialového komplexu. Této reakce lze využít pro stanovení koncentrace proteinu ve vzorku. Kationty Cu^+ jsou produkovány biuretovou reakcí, dále jsou využity při tvorbě planárního komplexu s kyselinou bicinchoninovou. Komplex absorbuje při vlnové délce 562 nm a po sestrojení kalibrační přímky se známými standardy lze určit koncentraci proteinu ve vzorku ⁴⁶.

Při pokusu bylo připraveno 6 roztoků myoglobinu o koncentracích 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5 a 0,25 a 0 mg/ml, které posloužily jako standardy. Pak byly připraveny 15×, 10× a 5× zředěné vzorky, obsahující vyprodukovaný rekombinantní nepenthesin I. Do zkumavek bylo přidáno po 2 μl připravených roztoků myoglobinu nebo nepenthesinu, ty byly vzápětí převrstveny 40 μl roztoku modré skalice v BCA (v poměru 1:50). Ve slepém pokusu, připraveném dle stejného postupu jako vzorek, byl místo roztoku proteinu přidán pouze pufr. Každý vzorek byl ihned po přidání BCA vložen do vodní lázně, temperované na 37 °C a byl inkubován po dobu 30 minut. Po inkubaci byly absorbance vzorků proměřeny na spektrofotometru NanoDrop při 562 nm.

4.14 Měření enzymové aktivity

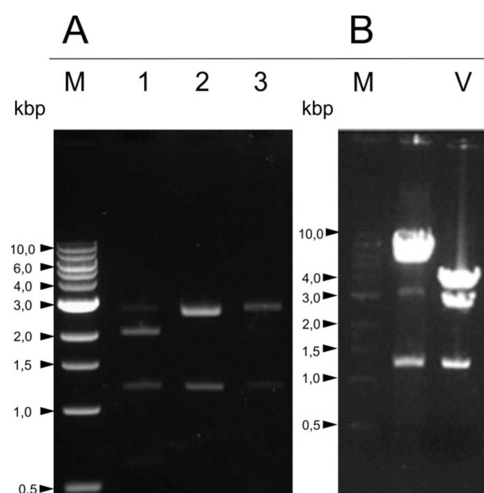
Ze zásobního roztoku pepsinu o koncentraci 5 mg/ml bylo ředěním s 50 mM glycinovým pufrém pH 2,5 připraveno 6 roztoků o koncentracích 0,05; 0,2; 0,4; 0,8; 1 a 1,2 mg/ml. Roztok nepenthesinu o neznámé koncentraci byl naředěn 10×, 5× a 1×. Následně bylo do 16 zkumavek pipetováno po 10 μl myoglobinu o koncentraci 20 mg/ml. Do osmi z těchto zkumavek bylo přidáváno po 2 μl připravených enzymů v minutových intervalech, ve zbylých 8 byl ponechán samotný myoglobin. Všechny zkumavky byly vkládány do vodní lázně a byly inkubovány 30 minut při teplotě 37 °C. Po inkubaci bylo k roztokům enzymu se substrátem i k příslušným slepým vzorkům přidáváno po 20 μl trichloroctové kyseliny v jednominutových intervalech, ke slepým pokusům bylo navíc přidáváno po 2 μl enzymu o příslušné koncentraci. Vzorky byly sráženy na vodní lázni vždy 5 minut a pak byly centrifugovány 10 minut při 20 °C a 16100×g. Z každé

zkumavky bylo následně odebráno po 20 μ l supernatantu. Absorbance vzorků byla pak proměřena na spektrofotometru NanoDrop při 280 nm.

5 Výsledky

5.1 Amplifikace a izolace plasmidu pET21a

Pro expresi proteinu v bakteriálních buňkách bylo potřeba amplifikovat malé množství plasmidové DNA kódující nepenthesin I z *N. gracilis*. Proto byly plasmidem transformovány buňky *E.coli* NovaBlue, ve kterých došlo k namnožení vložené DNA. Po transformaci buněk dle 4.1 byly z agarů, na kterém narostly úspěšně transformované kolonie s rezistencí na ampicilin, vybrány 3 kolonie, ty byly nechány narůst přes noc a následně byly analyzovány na přítomnost vloženého plasmidu. Izolace DNA byla provedena dle 4.2 a restrikční analýza dle 4.5. Na Obr. 13 jsou rozštěpené vzorky vektoru pET21a a genu pro nepenthesin ze tří kolonií z agarů. Po štěpení byla na gelu očekávána sekvence vektoru o délce 5443 párů bazí a vloženého genu pro nepenthesin I o délce 1242 párů bazí. Nejlepšího výtěžku bylo dosaženo u kolonie č. 2, kolonie č. 3 poskytovala plasmidovou DNA s menším výtěžkem a u kolonie č. 1 se pravděpodobně projevila mutace vektoru. Buňky z kolonie č. 2 byly přeočkovány do 100 ml LB média s antibiotiky a inkubovány 12h. Narostlá buněčná kultura byla následně zpracována za účelem izolace plasmidové DNA dle 4.3. Pak byla provedena restrikční analýza dle 4.5. Výsledky izolace jsou uvedeny na Obr. 13. Nakonec byla dle kapitoly 4.4 stanovena koncentrace plasmidové DNA v izolovaném vzorku na 303,6 μ g/ml a celkový výtěžek byl 115 μ g.

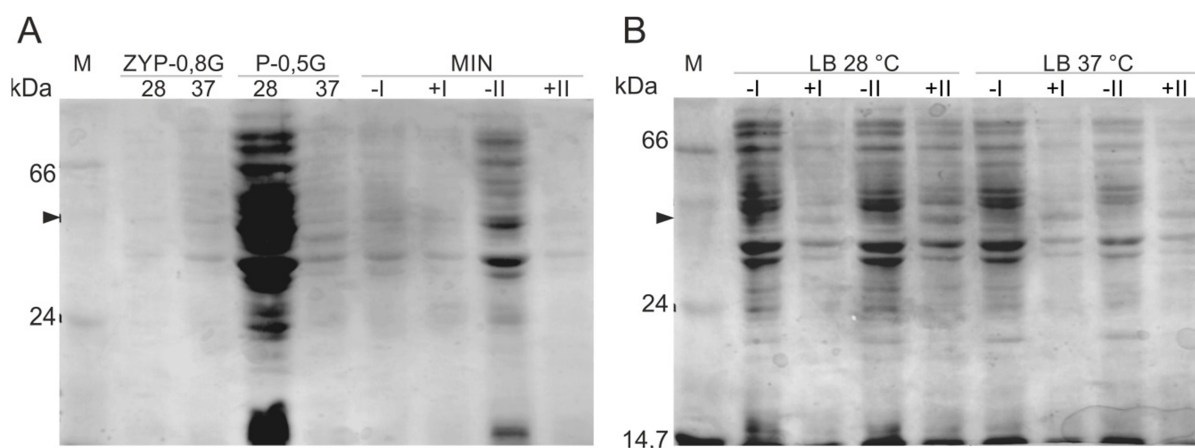


Obrázek 13: Restrikční analýza amplifikovaného plasmidu pET21a ze tří kolonií (A) a restrikční analýza vzorku plasmidu (B) produkovaného kolonií č. 2 (vzorek označen V), izolovaného maxipreparativní technikou. Štěpení bylo prováděno restrikťasami HindIII a NdeI

5.2 Produkce proteinu

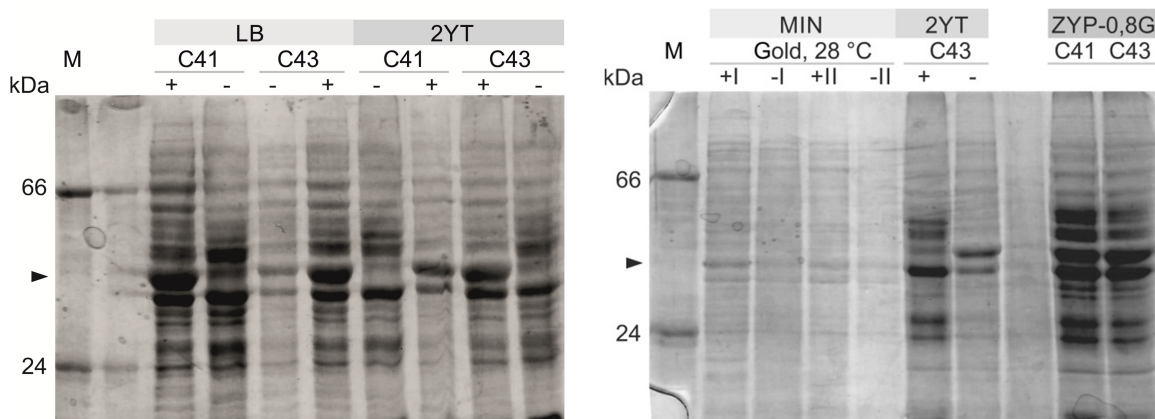
5.2.1 Produkce proteinu v bakteriálních buňkách

Po úspěšném zmnožení a izolaci plasmidové DNA bylo možné transformovat produkční kmeny *E.coli*. Byly transformovány 3 produkční bakteriální kmeny - *E.coli* Gold, *E.coli* C41 a *E.coli* C43, které se kultivovaly v minimálním, LB, 2YT a a dvou autoindukčních médiích (ZYP-0,8G a P-0,5G). Všechny bakteriální buňky byly transformovány vektorem pET21a s genem pro nepenthesin I dle 4.1.



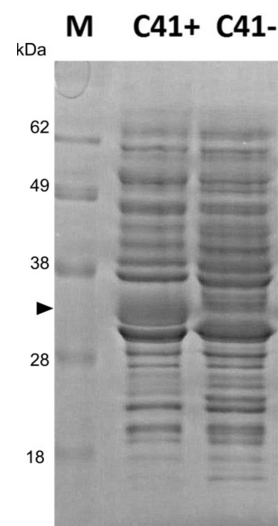
Obrázek 14 Produkce v autoindukčních médiích (A) (ZYP-0,8G a P-0,5G) za různých teplot (28 a 37 °C) a koncentraci IPTG (I – 0,5 mM; II – 1 mM). (B) je produkce v LB médiu za různých teplot a koncentraci induktoru, značení je stejné jako na vedlejším obrázku.

Po transformaci byly buňky natřeny na agar s odpovídajícími antibiotiky a kultura se nechala narůst přes noc v termostatu při 37 °C. Po inkubaci byly kolonie z agaru inokulovány do LB média, kde byly kultivovány 12 h při 37 °C. Následně byly buňky naočkovány do příslušných médií a byla provedena produkce proteinu dle 4.6. Analýza proteinového profilu bakteriálních kultur po produkci byla provedena metodou SDS-PAGE dle 4.7, výsledek lze vidět na Obr. 14. Přítomnost nepenthesinu pozorujeme u indukovaných kultur označených +, v poloze, zhruba odpovídající molekulové hmotnosti 43 kDa.



Obrázek 15 +/- pokus produkce v buňkách C41, C43 a Gold v LB, 2YT, minimálním a autoindukčním ZYP-0,8G médiu. Kromě produkce v minimálním médiu, všechno inkubováno při 37 °C. I a II značí 0,5 a 1 mM koncentraci IPTG mol/l.

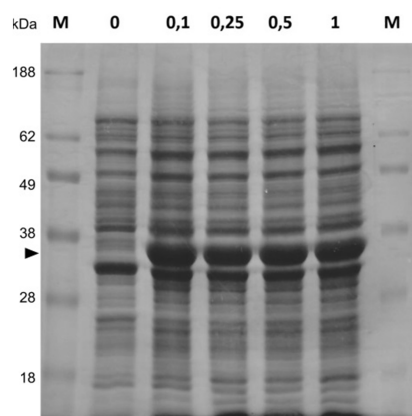
V buňkách *E. Coli* C41 a *E. Coli* C43 se produkovalo ve stejných médiích, rozdílem oproti produkci v *E. Coli* Gold byla stálá koncentrace induktoru – 0,5 mM. Stanovení přítomnosti proteinu bylo opět provedeno metodou SDS-PAGE. Výsledky jsou na Obr. 15. Pro velkoobjemovou produkci byly zvoleny buňky *E. Coli* C41, jejichž schopnost produkce byla dodatečně ověřena v LB médiu při 37 °C s přidáním induktoru ke koncentraci v médiu 1 mM. Výsledky kontrolní produkce jsou uvedeny na Obrázek 16.



Obrázek 16: Kontrolní produkce nepenthesinu I v buňkách C41 s (+) a bez (-) induktoru

5.2.2 Analýza optimální koncentrace induktoru pro produkci

Vliv koncentrace induktoru na produkci proteinu byl sledován v buňkách *E. Coli*. Produkční buňky připravené dle 4.1, byly nanášeny na agar a kultivovány 12 hodin při 37 °C. Z narostlých kolonií byl vypíchnut jeden klon, který byl dalších 12 hodin kultivován při 37 °C v LB médiu. Do šesti zkumavek s 2 ml LB média bylo poté vneseno po 20 µl noční kultury. Po dosažení $OD_{550} = 0,6$ byl do zkumavek přidán IPTG tak, aby výsledná

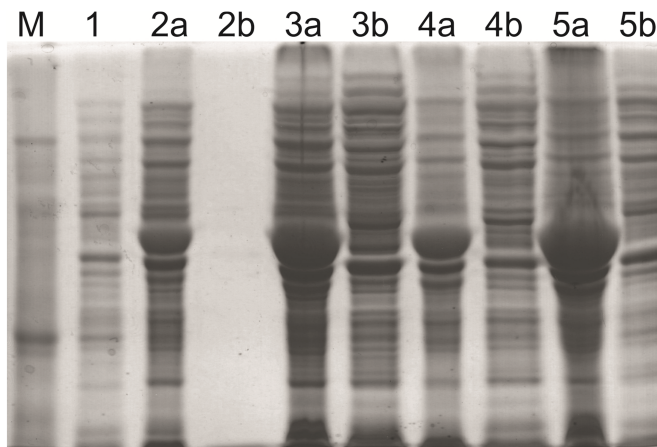


Obrázek 17 Výsledek čtyř produkci nepenthesinu I s různými koncentracemi IPTG v médiu (v mM)

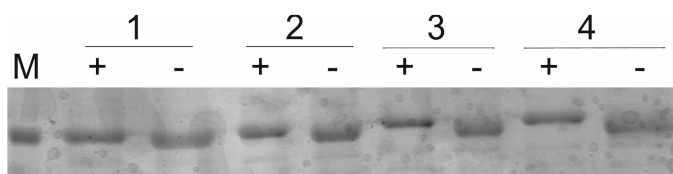
koncentrace ve zkumavkách byla – 1; 0,5; 0,25; 0,1 a 0 mM. Po produkci byly jednotlivé kultury analyzovány metodou SDS-PAGE dle 4.7. Výsledky jsou vidět na Obr. 17 (str. 33).

5.2.3 Renaturace vyprodukovaného proteinu

Vybraný produkční klon byl použit pro inokulaci 1 litru LB média. Buňky byly kultivovány při 37 °C v třepačce po dobu 4 hodin. Z buněk byla izolována inkluzní tělíska dle 4.11 a protein byl renaturován dle 4.12 – v každém kroku celého procesu byly odebírány vzorky pro následnou SDS-PAGE analýzu. Při izolaci inkluzních tělísek byl vždy odebírán jak pelet, tak i supernatant z jednotlivých kroků izolace a v případě konečné renaturace byly odebírány vzorky roztoku z dialyzačních trubic. Výsledná SDS-PAGE analýza izolace inkluzních tělísek je na Obr. 18. a průběh renaturace je znázorněn na Obr. 19.



Obrázek 18. Postup izolace inkluzních tělísek z buněk *E.coli* C41. 1 – buňky před indukcí, 2 – po produkci, 3 – v sacharózovém pufru, 4 – tritónovém pufru, 5 – promývacím pufru. (a) – pelet, (b) – supernatant

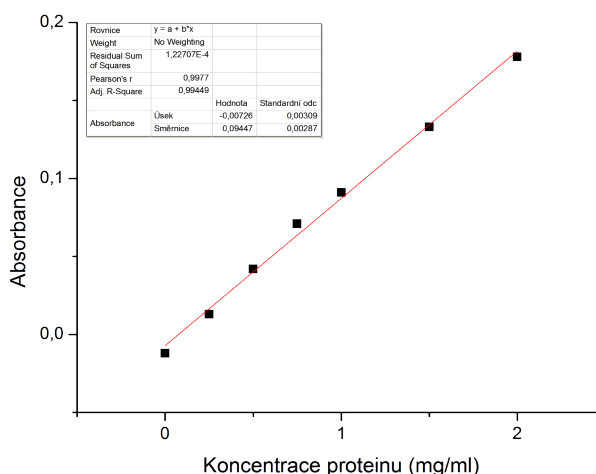


Obrázek 19. Postup při renaturaci proteinu z inkluzních tělísek. Vzorky z dialyzačních trubic byly nanášeny na gel v redukujícím (100 mM DTT) a neredukujícím vzorkovém pufru. 1 – 8M močovina, 300 mM BME, 2 – 50 mM Tris-HCl pH 10, 3 – 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 4 – 50 mM fosfátový pufr pH 7,5

5.3 Charakterizace proteinu

5.3.1 Stanovení koncentrace v izolovaném vzorku

Přípravou vzorků myoglobinu o definovaných koncentracích dle 4.13 a proměřením jejich absorbance byla sestavena kalibrační křivka pro stanovení koncentrace připraveného proteinu (Obr. 20). Absorbance 5× zředěného retenátu z ultrafiltrační cely byla 0,04. Konečná

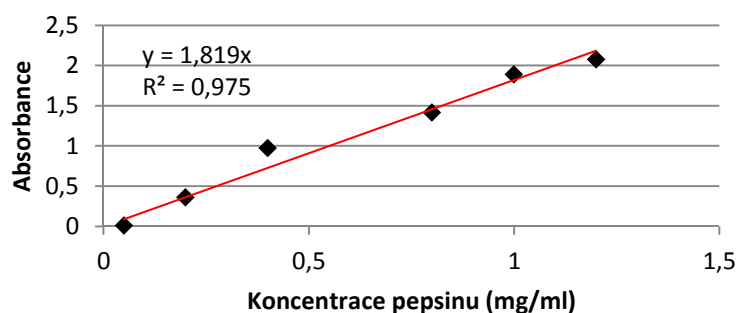


Obrázek 20. Graf závislosti absorbance na koncentraci myoglobinu ve vzorku. Rovnice pro kalibrační křivku posloužila pro výpočet koncentrace nepenthesinu v roztoku

koncentrace izolovaného proteinu v 50 ml retenátu byla spočtena na 2,5 mg/ml a celkové množství připraveného proenzymu činilo 125 mg.

5.3.2 Stanovení enzymové aktivity

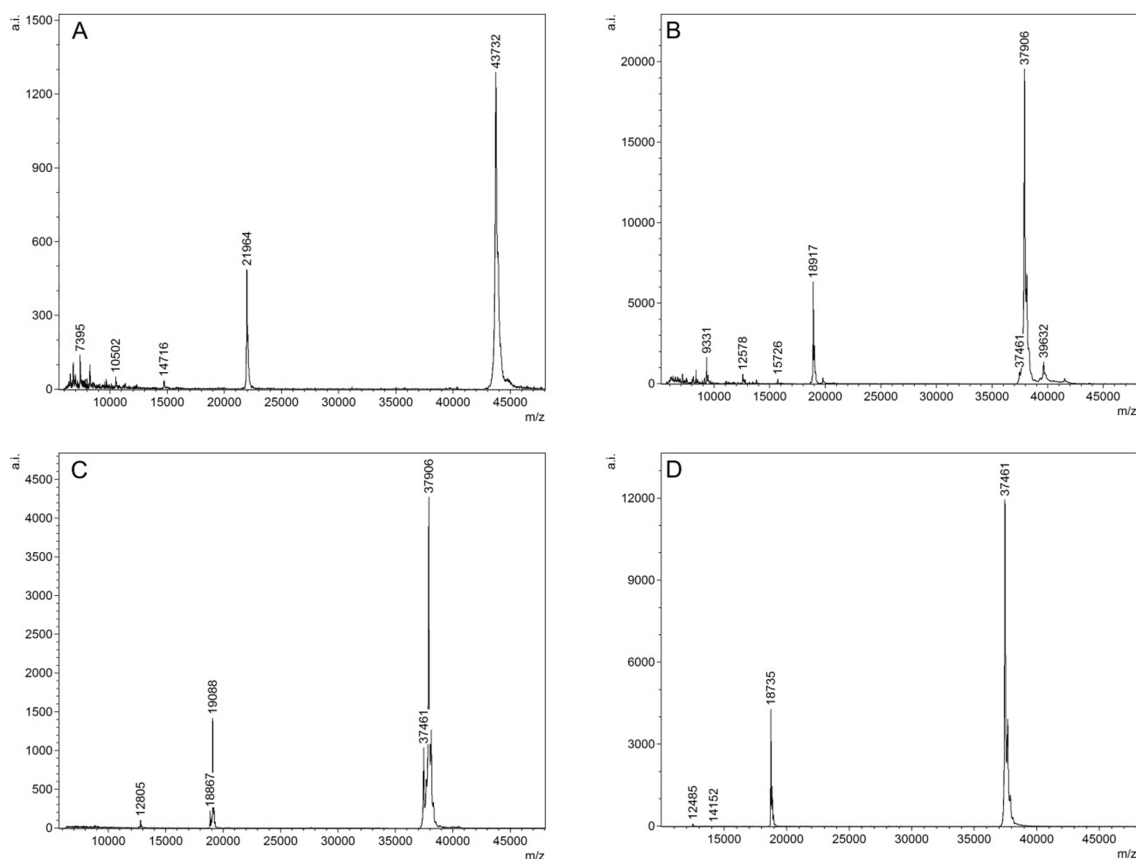
Stanovení aktivity bylo provedeno dle 4.14. Kalibrační křivka s absorbancemi peptidů, generovaných pepsinem z myoglobinu o definované koncentraci je uvedena na Obr. 21. Vzorek myoglobinu o



Obrázek 21. Graf závislosti absorbance na koncentraci pepsinu ve vzorku. Rovnice kalibrační křivky byla využita pro určení množství pepsinu odpovídajícího aktivitě izolovaného nepenthesinu I

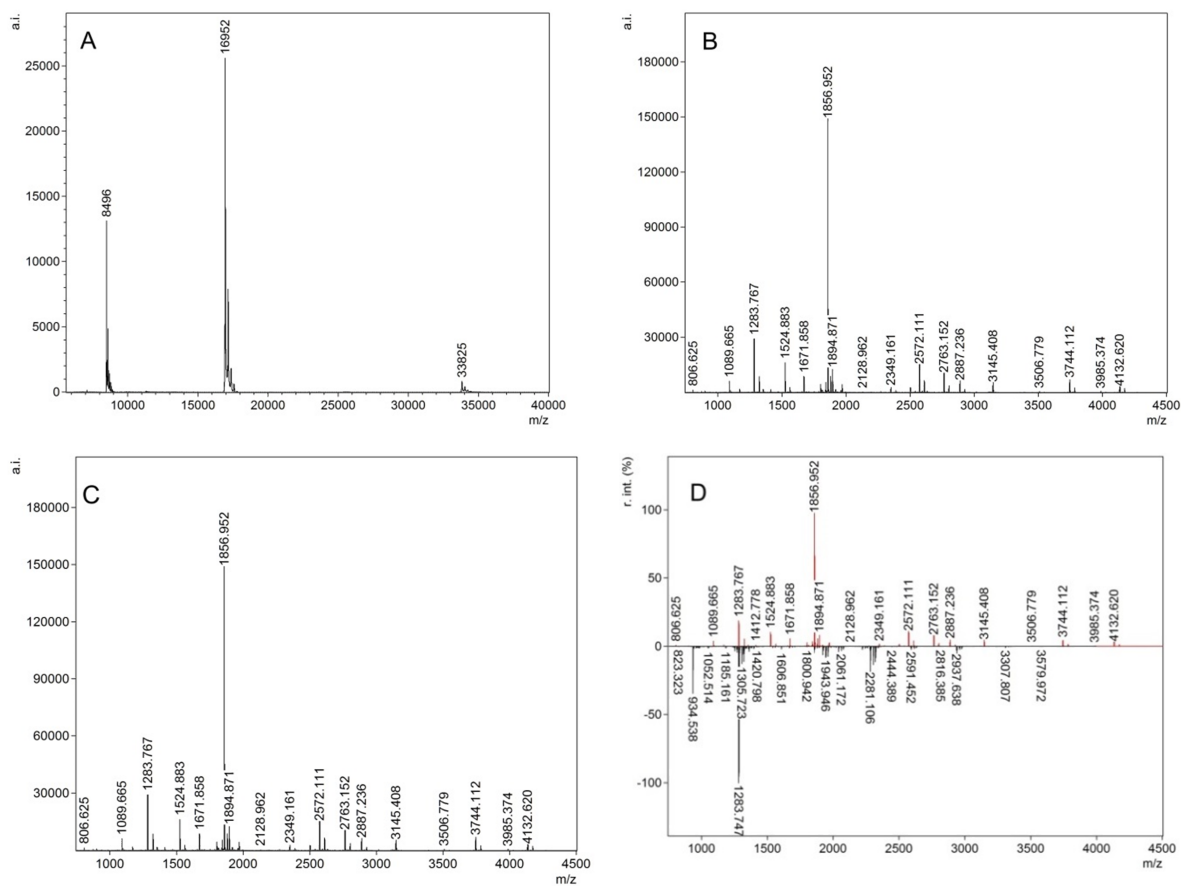
koncentraci 20 mg/ml štěpený 10× zředěným roztokem aktivovaného nepenthesinu měl absorbanci 0,267. Tato hodnota odpovídá aktivitě pepsinu o koncentraci 1,47 mg/ml.

5.3.3 Sledování průběhu aktivace a aktivity proenzymu v kyselém prostředí



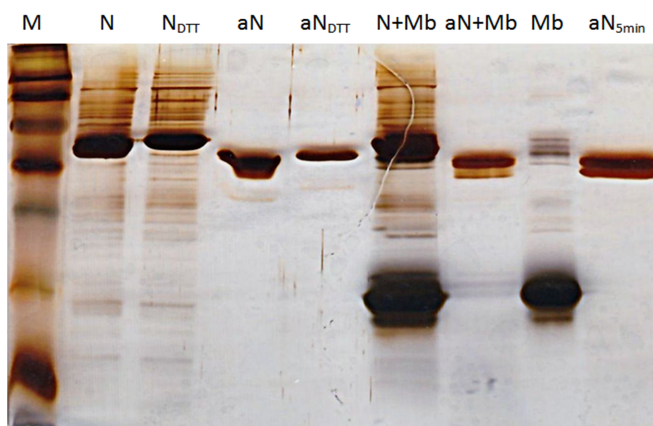
Obrázek 22. MALDI-MS spektra znázorňující průběh aktivace rekombinantního nepenthesinu I z *N. gracilis*. Neaktivovaný proenzym (A) s molekulovou hmotností 43,7 kDa odpovídající sekvenci 25–437. Ve spektru je patrný dvojnásobně (21,9 kDa) a trojnásobně (14,7 kDa) nabitý iont a kontaminace v oblasti 6–12 kDa. Nepenthesin po aktivaci okyselením na pH 2,5 po 5 min (B), 1 hod (C) a 24 hod (D). Ze spekter lze odvodit postupné odštěpování propeptidu na formu 75–437 (37,9 kDa) a následně až na finální produkt (37,4 kDa; 79–437). Také je viditelné vyčištění preparátu vlastní proteolytickou aktivitou enzymu od kontaminace.

Vyprodukovaný rekombinantní protein byl analyzován pomocí metody MALDI-TOF, kde byla změřena jeho molekulová hmotnost a sledován proces aktivace (Obr. 22) Enzym byl dále charakterizován porovnáním proteolytické specifity s pepsinem. Aktivita enzymu byla ověřena na myoglobinu a vzniklé fragmenty byly vyhodnoceny metodou MALDI-TOF a porovnány se vzorkem myoglobinu vystavenému štěpení pepsinem (Obr. 23, str. 37).



Obrázek 23. MALDI-MS analýza neštěpeného (A) vzorku myoglobinu a vzniklé peptidy (B) po 10 minutovém štěpení nepenthesinem I z *N. gracilis* a (C) prasečím pepsinem. Dále je srovnávací spektrum (D) peptidových fragmentů produkovaných pepsinem (nahore) a nepenthesinem (dole)

Charakterizace byla také provedena pomocí SDS-PAGE. Bylo sledováno zapojení disulfidových můstků, aktivace proteasy a její aktivita pomocí štěpení myoglobinu. Výsledky jsou na Obr. 24.



Obrázek 24. Chování enzymu v redukujícím prostředí, aktivace a proteolytická aktivita. N - proenzym, DTT - redukující pufr, aN - aktivovaná forma, Mb - myoglobin.

6 Diskuze

Tato práce vznikla na základě spolupráce dr. Petra Mana a dr. Martiala Reye (University of Calgary) při hledání nových proteas využitelných v experimentech H/D výměny ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Mým úkolem bylo připravit aktivní rekombinantní formu nepenthesinu, proteasy, která na základě experimentů prováděných na extraktech z pastí láčkovek, vykazovala velmi zajímavé štěpné preference (štěpení za Lys, Arg, His a Pro ⁴²)

Plasmid se sekvencí kódující nepenthesin I z *N. gracilis* byl obdržen od dr. Reye. V naší laboratoři byla dr. Hynkem Mrázkem vyklonována sekvence bez signálního peptidu (25–437) a vnesena do vektoru pET21a. Plasmid, dodaný dr. Hynkem Mrázkem, byl úspěšně amplifikován v buňkách *E. Coli* NovaBlue. Pro zmnožení DNA byla, vzhledem k nejlepším výtěžkům, vybrána kolonie č. 2 (Obr. 13, str. 31). Po amplifikaci byl potřebný plasmid izolován ze 100 ml média, celkově bylo získáno 380 µl plasmidové DNA o koncentraci 0,303 µg/ml. Na Obr. 13B (str. 31) lze vidět, vedle správně rozštěpeného plasmidu, těžší řetězec DNA v neštěpitelné superhelikální konformaci. Plasmidem byly následně transformovány 3 produkční bakteriální kmeny – *E. Coli* Gold, *E. Coli* C41 a *E. Coli* C43, které se kultivovaly v minimálním, LB, 2YT a a dvou autoindukčních médiích (ZYP-0,8G a P-0,5G) ve kterých byla zkoušena exprese proteinu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u kmene *E. Coli* C41 v LB médiu. Dle výrobce se jedná o kmen rezistentní vůči toxickým produktům proteosyntézy. Při zkoumání optimální koncentrace induktoru pro expresi bylo zjištěno, že vysokých výtěžků proteinu bylo dosaženo již při 0,1 mM koncentraci IPTG. Z ekonomických důvodů bylo toto množství používáno i v dalších produkcích prováděných v objemech 500 či 1000 ml. Protein byl produkován ve formě inkluzních tělísek, která byla z buněk izolována a během tohoto procesu docházelo i k odmyvání řady kontaminujících proteinů (Obrázek 18, str. 34). Pro renaturaci nepenthesinu byla připravena strategie různých metodik, jako první však byla zkoušena metoda založená na dialýze, již dříve v laboratoři úspěšně používaná pro renaturaci jiné proteasy. V průběhu dialýzy byla postupně snižována koncentrace denaturujících a redukčních činidel a bylo snižováno pH až na hodnotu 7,5. Cílovým dialyzačním roztokem byl při první produkci MOPS pufr. Z ekonomického hlediska (3094 Kč/100 g MOPS) byl pro

finální dialyzační krok v dalších produkcích úspěšně použit 50 mM fosfátový pufr. Následná analýza retenátu hmotnostní spektrometrií ukázala přítomnost relativně čistého proteinu. Jeho finálního dočištění bylo docíleno pouhým snížením pH roztoku s izolátem. V důsledku této manipulace se část kontaminujících proteinů a jejich fragmentů vysrážela a další část byla pravděpodobně rozštěpena samotným aktivovaným nepenthesinem. Disulfidické vazby vznikají v produktu již v prvním dialyzačním pufru, jak lze vidět z Obr. 19 (str. 34). Ze zvětšující se vzdálenosti pruhů v redukujícím a neredučujícím vzorkovém pufru v renaturačních pufrech lze usoudit o postupném zapojování S-S můstků v průběhu renaturace. Přesné pořadí a přiřazení jednotlivých cysteinů však ukáže až analýza pomocí hmotnostní spektrometrie. Aktivace proteinu byla pozorována metodou MALDI-MS a bylo zjištěno, že proces odštěpení propeptidové sekvence se uskutečňuje v několika krocích. Velmi rychle je odštěpen peptidový úsek k Asn³¹ a poté se zpomalující se tendencí pokračuje ke Glu⁶¹, v řádu několika minut je doštěpen ke Glu⁷⁵ a po 24 hodinovém štěpení je protein plně doštěpen na formu začínající Asn⁷⁹. Z experimentů bylo vidět, že klíčovými kroky při aktivaci proteinu je zkrácení proteinu ke Glu⁷⁵ a následné doštěpení k Asn⁷⁹ (Obr. 22, str. 36). Specifická aktivita izolovaného enzymu měla při teplotě 37 °C a pH 2,5 vyšší hodnotu než u pepsinu, také je z Obr. 23D (str. 37) vidět, že má nepenthesin jinou substrátovou specifitu než pepsin. Vysoké výtěžky aktivního produktu lze vysvětlit hladkou hyperplochou potenciálních konformačních energií s výrazným minimem odpovídajícím aktivní konformaci. Z tohoto faktu také vyplývá nadprůměrná stabilita enzymu vůči teplotě a širokému rozsahu pH. Enzym je dále v laboratoři studován, používán v experimentech H/D výměny, byla provedena jeho imobilizace a byla nasazena krystalizace ve spolupráci s Ing. J. Dohnálkem z Ústavu makromolekulární chemie, Akademie věd České republiky.

7 Závěr

Výsledky této práce jsou následující:

- byla amplifikována DNA kódující nepenthesin I z *N.gracilis* v bakteriálních buňkách s výtěžkem 115 µg.
- byly zjištěny optimální podmínky pro produkci proteinu v bakteriálním expresním systému
- bylo vyprodukováno 125 mg proteinu z 1 l LB média
- byla provedena předběžná charakterizace proteinu

Všechny zadané cíle byly splněny.

8 Reference

- (1) Engen, J.R. *Anal. Chem.* **2009**, **81**, 7870–7875.
- (2) Cravello, L.; Lascoux, D.; Forest, E. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2003**, **17**, 2387–2393.
- (3) Ahn, J.; Cao, M.; Yu, Y.; Engen, J.R. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**.
- (4) Rawlings, N.; Barrett, A. *Method. Enzymol.* 105–120.
- (5) Barrett, A.; Rawlings, N.; J, W. *Academic Press, San Diego, CA* **1998**, 799–986.
- (6) Davies, D. *Annu. Rev. Biophys. Bio.* **1990**, **19**, 189–215.
- (7) Dunn, B. M. *Chem. Rev.* **2002**, **102**, 4431–4458.
- (8) Hill, J.; Phylip, L. H. *FEBS Lett.* **1997**, **409**, 357–360.
- (9) A.D, R.; A.J, B. *Method. Enzymol.* **1995**, **248**, 105–120.
- (10) Koelsch, G.; Mares, M.; Metcalf, P.; Fusek, M. *FEBS Lett.* **1994**, **343**, 6–10.
- (11) Dunn, B. M. In *Encyclopedia of Biological Chemistry*; Lennarz, W.; Lane, D., Eds.; 2004; p. 3087.
- (12) Castro, H. C.; Abreu, P. a; Geraldo, R. B.; Martins, R. C. a; Dos Santos, R.; Loureiro, N. I. V; Cabral, L. M.; Rodrigues, C. R. *J. Mol. Recognit.* **2011**, **24**, 165–181.
- (13) Higgins, T. *Annu. Rev. Plant. Physio.* **1984**, **35**, 191–221.
- (14) Mutlu, A.; Gal, S. *Physiol. Plantarum* **1999**, **105**, 569–576.
- (15) An, C.; Fukusaki, E.; Kobayashi, A. *Planta* **2002**, **214**, 661–667.
- (16) Simoes, I.; Faro, C. *Eur.J. Biochem.* **2004**, **271**, 2067–2075.
- (17) Runeberg-Roos, P.; Tomakangas, K.; Ostman, A. *Eur. J. Biochem.* **1991**, **202**, 1021–1027.
- (18) Egas, C.; Lavoura, N.; Resende, R.; Brito, R. .; Pires, E. *J. Biol. Chem.* **2000**, **275**, 38190–38196.
- (19) Stehli, G. *Kosmos* **1934**.
- (20) Brodie, J.; Lee, C. *Carniv. Pl. Newslett.* **2000**, **54**.

- (21) Schulze, W.; Schulze, E. D.; Pate, J. S.; Gillison, A. N. *Oecologia* **1997**, **112**, 464–471.
- (22) Pietroipalo, J.; Pietropaolo, P. *Carnivorous plants of the World*; Timber Press Inc., **1997**; p. 206.
- (23) Moran, J. a; Clarke, C. M. *Plant Signal. Behav.* **2010**, **5**, 644–648.
- (24) Riedel, M.; Eichner, A.; Jetter, R. *Planta* **2003**, **218**, 87–97.
- (25) Mithöfer, A. *Phytochemistry* **2011**, **72**, 1678–1682.
- (26) Clarke, C. M.; Bauer, U.; Lee, C. C.; Tuen, A. A.; Rembold, K.; Moran, J. A. *Biol. Letters* **2009**, **5**, 632–635.
- (27) Chin, L.; Moran, J. A.; Clarke, C. *New Phytol.* **2010**, **186**, 461–470.
- (28) Moran, J. A.; Clarke, C. M.; Hawkins, B. *Int. J. Plant Sci.* **2003**, **164**, 635–639.
- (29) Eilenberg, H.; Pnini-Cohen, S.; Rahamim, Y.; Sionov, E.; Segal, E.; Carmeli, S.; Zilberstein, A. *J. Exp. Bot.* **2010**, **61**, 911–922.
- (30) Hatano, N.; Hamada, T. *J. Proteome Res.* **2008**, **7**, 809–816.
- (31) Passardi, F.; Cosio, C.; Penel, C.; Dunand, C. *Plant Cell Rep.* **2005**, **24**, 255–265.
- (32) Liskay, A.; Kenk, B.; Schopfer, P. *Planta* **2003**, **217**, 658–667.
- (33) Matthews, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, **38**, 552–553.
- (34) Davies, K.; Lin, S. *Free Radic. Biol. Med.* **1988**, **5**, 215–223.
- (35) Davies, K. *J. Biol. Chem.* **1987**, **262**, 9895–9901.
- (36) Tökés, Z.; Woon, W.; Chambers, S. *Planta* **1974**, **119**, 39–46.
- (37) Higashi, S.; Nakashima, A.; Ozaki, H. *J. Plant Res.* **1993**, 47–54.
- (38) Nakayama, S.; Amagase, S. *P. Jpn. Acad.* **1968**, **44**, 358–362.
- (39) Athauda, S.; Matsumoto, K. *Biochem. J.* **2004**, **381**, 295–306.
- (40) Kubota, K.; Metoki, Y.; Athauda, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, **74**, 2323–2326.
- (41) Takahashi, K.; Niwa, H.; Yokota, N. *Plant Physiol. Bioch.* **2008**, **46**, 724–729.

- (42) Rey, M.; Yang, M.; Burns, K.; Yu, Y.; Lees-Miller, S.P.; Schriemer, D.H.; *Mol. Cell. Proteomics*. **2013**, **12**, 464–472.
- (43) Kalous, V. *Metody chemického vyzkumu*; SNTL/Alfa, **1987**; p. 430.
- (44) Prosser, V. *Experimentální metody biofyziky*; Academia, 1989; p. 712.
- (45) Flentke, G. R.; Glinski, J.; Satyshur, K.; Rich, D. H. *Protein Expres. Purif.* **1999**, **16**, 213–220.
- (46) Smith, P. *US Patent 4,839,295* **1989**, **85**, 76–85.
- (47) Hatano, N.; Hamada, T. *J. Proteomics* **2012**, **75**, 4844–4852.

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