

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Jiří Zahradník

**Purifikace a charakterizace vybraných enzymů z *Rhizobium radiobacter* R89
katalyzujících oxidačně-redukční reakce na uhlíku C-hydroxylovaných
morfinových skeletů**

Purification and characterization of selected enzymes from *Rhizobium radiobacter* R89 catalysing oxidation/reduction reactions of C-hydroxylated morphine skeletons

Diplomová práce

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

Školitel-specialista/Konzultant: RNDr. Pavel Kyslík, CSc

Praha, 2013

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Miroslava Šulce, Ph.D. a konzultanta RNDr. Pavla Kyslíka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 10. května 2013

.....

Jiří Zahradník

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi Ph.D. za jeho trpělivost a ochotu při vedení mé práce.

Za cenné rady a podněty děkuji RNDr. Pavlovi Kyslíkovi, CSc. a dalším členům Laboratoře enzymových technologií Ing. Evě Kyslíkové, CSc., RNDr. Václavu Štěpánkovi, CSc. a Mgr. Peteru Babiakovi, PhD. a také členům Laboratoře biomolekulárního rozpoznávání Mgr. Jaroslavu Nunvářovi a Mgr. Pavlovi Mikuleckému.

Za umožnění vykonávat tuto diplomovou práci v Laboratoři enzymových technologií a Laboratoři biomolekulárního rozpoznávání děkuji vedoucím laboratoří - RNDr. Pavlu Kyslíkovi, CSc. a Ing. Bohdanu Schneiderovi, CSc., DSc.

Za precizní jazykovou a stylovou korekturu děkuji PhDr. Jaromíru Nigrinovi, CSc.

Obsah

Seznam použitých zkratk	5
1a Abstract	7
1b Abstrakt	8
2 Studium biotransformačních reakcí	9
2.1 Isochinolinové alkaloidy	9
2.1.1 Chemické vlastnosti alkaloidů morfinové řady	10
2.1.2 Mechanismus účinku morfinových alkaloidů	12
2.1.3 Farmakologicky významné deriváty morfinových alkaloidů	13
2.1.4 Biosyntéza alkaloidů morfinové řady	14
2.2 Biotransformační a biodegradační dráhy alkaloidů morfinové řady v mikroorganismech	17
2.3 Studované proteiny	21
2.3.1 Morfin 6-dehydrogenáza	22
2.3.2 Morfinon reduktáza	24
3 Cíl práce	27
4 Metodická část	28
4.1 Materiál	28
4.1.1 Biologické materiály	28
4.1.1.1 Bakteriální kmeny	28
4.1.1.2 Plasmidy a primery	28
4.1.1.3 Enzymy	29
4.1.1.4 Standardy	29
4.1.2 Chemické materiály	30
4.1.2.1 Chemikálie	30
4.1.2.2 Komerční pufry	30
4.1.3 Ostatní materiály	30
4.1.4 Přístrojové vybavení	31
4.2 Metody	32
4.2.1 Chromatografické metody	32
4.2.1.1 Příprava vzorků pro HPLC a TLC	32
4.2.1.2 HPLC s reverzní fází	33
4.2.1.3 Chromatografie na tenké vrstvě	34
4.2.1.4 Cytosolární extrakt z buněk <i>Rhizobium radiobacter</i> R89 a <i>E.coli</i>	35
4.2.1.5 Niklová chelatační chromatografie (NiNTA)	36
4.2.1.6 Gelová permeační chromatografie	37
4.2.1.7 Afinity chromatografie NGTNR na determinování protein-proteinových interakcí	37
4.2.2 Elektroforetické metody	38

4.2.2.1	Agarosová elektroforéza	38
4.2.2.2	SDS-PAGE elektroforéza	38
4.2.2.3	Western blot	40
4.2.3	Molekulárně biologické metody	40
4.2.3.1	PCR metody	40
4.2.3.2	Restrikční štěpení a ligace	42
4.2.3.3	Příprava a transformace kompetentních buněk	42
4.2.3.4	Další standardní metody rekombinantní DNA	43
4.2.4	Spektrofotometrické metody	43
4.2.4.1	Stanovení proteinů	43
4.2.4.2	Stanovení kinetických parametrů	44
4.2.4.3	DLS stanovení termostability.....	44
4.2.4.4	Termofluorimetrie.....	45
4.2.5	Kultivační metody	45
4.2.5.1	Kultivace mikroorganismů	46
4.2.5.2	Expres studovaných proteinů	46
4.2.6	Biotransformace alkaloidů	47
4.2.7	Krystalizace	47
5	Výsledky	49
5.1	Biotransformační schopnosti <i>Rhizobium radiobacter</i> R89.....	49
5.2	Purifikace proteinů a hledání kódujících genů enzymů	53
5.3	Proteiny NGTNr a scMDH	56
5.3.1	Klonování a exprese strukturních genů	56
5.3.2	Charakterizace proteinu NGTNr	63
5.3.3	Expres a charakterizace proteinu scMDH	67
6	Diskuze	70
7	Závěr	77
8	Seznam použité literatury	78
9	Přílohy	83

Seznam použitých zkratek

AcN	Acetonitril
A₂₈₀	Absorbance při 280 nm
A₃₄₀	Absorbance při 340 nm
APS	Peroxosíran amonný
Bicine	N,N-Bis(2-hydroxyetyl)glycin
bp	Párů bází, z angl. "Base pair"
BSA	Hovězí sérový albumin, z angl. "Bovine serum albumin"
CBB-G	Brilliantní modř G250, z angl. "Coomassie Brilliant Blue G-250"
CBB-R	Brilliantní modř R250, z angl. "Coomassie Brilliant Blue R-250"
CV	Objem kolony, z angl. "Column volume"
Cys	Cystein; V práci jsou používány mezinárodně uznávané jednopísmenné a trojpísmenné zkratky aminokyselin, které zde nejsou z důvodu přehlednosti uvedeny.
dH₂O	Destilovaná voda
DLS	Dynamický rozptyl světla, z angl. "Dynamic light scattering" (také někdy nazýván fotonová korelační spektroskopie)
dNTP	Deoxyribonukleotid trifosfáty
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Kyselina etylendiamintetraoctová
EtOH	Etanol
FMN	Flavin mononukleotid
FPLC	Rychlá proteinová chromatografie či také rychlá účinná (z angl. „Fast protein liquid chromatography“ či "fast performance")
G-	Gram negativní bakterie
GTN	Glycerol trinitrát, z angl. "Glycerol trinitrate", také nitroglycerol
HEPES	2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (z angl. „High performance liquid chromatography“)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
LB	Luria-Beltani kultivační médium
MALDI-TOF MS	Metoda hmotnostní spektrometrie s matricí asistovanou desorpčí vzorku a analýzou pomocí doby letu, z angl. "Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight Mass spectrometry")
MDH	Morfin 6-dehydrogenáza, <i>Pseudomonas putida</i> M10
MES	Kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová
morR	Strukturní gen pro NGTNR, <i>Rhizobium radiobacter</i> R89
mQ H₂O	Ultračistá voda (s velmi nízkou konduktivitou-Q)
MWCO	Limit molekulové hmotnosti, z angl. "Molecular weight cut of"

NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid (redukováný)
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (redukováný)
NGTnr	Nová glycerol trinitrát reduktáza, z angl. "New Glycerol Trinitrate Reductase", <i>Rhizobium radiobacter</i> R89
NiNTA	Matrice pro afinitní chromatografii obsahující Ni ionty navázané na nitriloctovou kyselinu, z angl. "nickel-nitriloacetic acid"
OD₆₀₀	Optická densita při 600 nm
OYE	Starý žlutý enzym (případně rodina), z angl. "Old yellow enzyme"
PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PCR	Polymerázová řetězová reakce, z angl. "Polymerase chain reaction"
PDB	Protein Data Bank - bioinformační server
PEG	Polyetylenglykol
RE	Restrikční endonukleáza
scD	Strukturní gen pro morfin-6-dehydrogenázu s krátkým řetězcem, <i>Rhizobium radiobacter</i> R89
SCD	Obecná zkratka pro dehydrogenázy s krátkým řetězcem
scMDH	Morfin-6-dehydrogenáza s krátkým řetězcem, <i>Rhizobium radiobacter</i> R89
SDS	Dodecylsulfát sodný
TBME	Tercbutylmetylether
TEMED	N, N, N', N'- tetrametyletylendiamin
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě, z angl. "Thin layer chromatography"
Tm	Teplota tání (z angl. "Melting temperature")
Tris	Trishydroxymetylmethan, používána Trizma [®] base

1a Abstract

The Rhizobiaceae bacteria are known for its varied nitrogen metabolism: especially its nitrogen fixation, so called diazotrofia, its capability of symbiosis with plants, or on the contrary plant pathogenesis (genus *Agrobacterium*). *Rhizobium radiobacter* R89 (stored in Czech Collection of Microorganism, in Brno as R89-1) is bacteria strain capable of codeine and morphine biotransformation to whole spectrum of pharmacologically significant derivates.

This work is focused on purification and characterization of two selected enzymes that catalyze oxidation-reduction reactions, the crucial beginning of morphine skeletons biodegradation.

At the first, the biotransformational potential of the strain was evaluated and biochemical, molecular biological and bioinformatical approaches were employed to purify the responsible enzymes. Considering unsuccessful purification from *Rhizobium radiobacter* R89-1, the proteins structural genes were cloned and heterologously expressed in bacterial system and afterward characterized. Found protein sequence and enzyme characterization (basic kinetic measurements, substrate specificity and thermo-stability) have revealed different origin of the enzymes and clarify reasons why the original purification procedure was not successful.

1b Abstrakt

Bakterie z rodiny *Rhizobiaceae* jsou známé přítomností mnoha enzymů účastnících se metabolismu dusíku. A to nejen z pohledu fixace dusíku (tzv. diazotrofie) a schopnosti tvořit s rostlinami mutualistické vztahy, ale i z pohledu rostlinné patogeneze (genus *Agrobacterium*). *Rhizobium radiobacter* R89 (uložen v České sbírce mikroorganismů v Brně jako R89-1) je bakteriální kmen schopný biotransformace kodeinu a morfinu na celé spektrum farmakologicky významných derivátů.

Cílem této práce je purifikace a charakterizace dvou vybraných enzymů katalyzujících oxidačně-redukční reakce, které jsou klíčové pro začátek biodegradační dráhy morfinových skeletů.

Nejprve byl charakterizován biotransformační potenciál daného kmene a pro purifikaci enzymů zodpovědných za zvolené reakce byly použity biochemické, molekulárně biologické a bioinformační metody. Vzhledem k neúspěšné purifikaci enzymů z původního materiálu byly strukturální geny kódující proteiny klonovány a heterologně exprimovány v bakteriálním expresním systému a následně charakterizovány. Nalezená proteinová sekvence a enzymová charakterizace (základní kinetické parametry, substrátová specifita a teplotní stabilita) odhalily odlišný původ enzymů a tak i objasnily neúspěch původního purifikačního postupu z mikroorganismu *Rhizobium radiobacter* R89.

(In Czech)

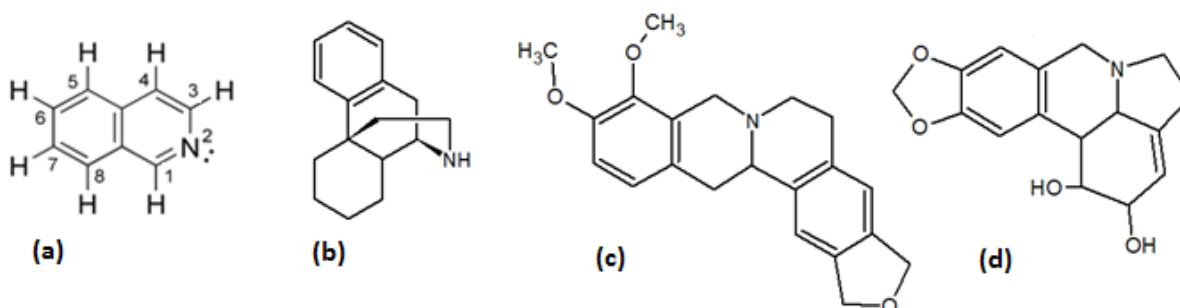
2 Studium biotransformačních reakcí

Biotransformací je obecně myšlena změna jedné látky v druhou, která probíhá v živém organismu. Většinou je biotransformací míněna přeměna látek organismu nevlastních - cizorodých (xenobiotik). Konečným cílem biotransformačních reakcí může být: detoxifikace, utilizace samotného xenobiotika či naopak jeho potenciace jako prostředek mezidruhového konkurenčního boje.

Mikrobiální biotransformace je v centru lidského zájmu s ohledem na potenciální biotechnologické využití, především, když chemická konverze daných sloučenin představuje technicky i ekonomicky obtížný krok a vyžaduje s tím spojené vysoké finanční náklady.

2.1 Isochinolinové alkaloidy

Alkaloidy jsou obrovská skupina více než 5000 známých látek ¹. Jejich farmakologické účinky z nich činí již téměř tři tisíce let nedílnou součást lidské medicíny. Název alkaloidy byl zaveden německým chemikem Carlem F.W. Meissnerem v roce 1819. Dělení alkaloidů je založeno na podobnosti uhlíkového skeletu ². Pravé alkaloidy obsahují dusík jako heterocyklický atom, u nepravých se vyskytuje v postranním řetězci. Isochinolinové alkaloidy mají, jak již název vypovídá, isochinolinový kruh ve své struktuře, případně je některým z meziproductů biosyntézy. Struktura kruhu je většinou základem pro číslování jednotlivých atomů ve složitějších strukturách a je zobrazena na obrázku č. 1 ad. (a). Isochinolinové alkaloidy jsou největší podskupinou alkaloidů a jejich struktury se mohou značně lišit, jak je ukázáno na obrázku č. 1 (b, c, d):



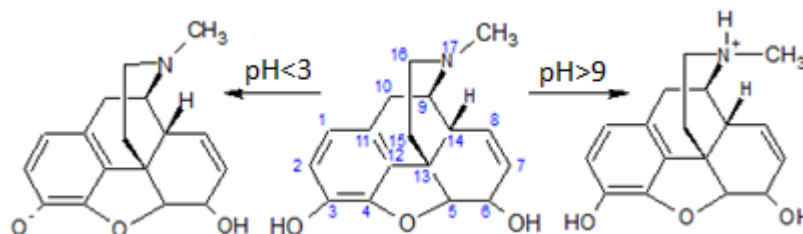
Obrázek č. 1 - Struktura a číslování isochinolinových alkaloidů. (a) isochinolinový kruh s číslováním, (b) morfinan, (c) canadine, (d) lycorin

Stejně jako tyto struktury se liší i organismy, které tyto sekundární metabolity syntetizují. Zároveň je nutné uvést, že biotické a abiotické faktory mají obecně zásadní vliv na produkci sekundárních metabolitů. V následujícím textu se již budeme zabývat výhradně isochinolinovými alkaloidy morfinové řady, jejichž struktury budou popsány společně s biosyntézou v následující kapitole 2.1.1, farmakologické účinky v kapitole 2.1.2 a mechanismus účinku v kapitole 2.1.3.

(Pozn.: Vzhledem ke své nejednoznačné struktuře jsou isochinolinové alkaloidy dále děleny na cca 26 různých skupin, ze kterých je odvozováno názvosloví. V literatuře je možné setkat se s jinými názvy pro alkaloidy morfinové řady, jako například morfinany, morfiny či fenanthrenové alkaloidy. V této práci budou látky strukturně odvozené od morfinanu nazývány alkaloidy morfinové řady. Opioidy oproti tomu budou nazývány lidské endogenní látky peptidické povahy.)

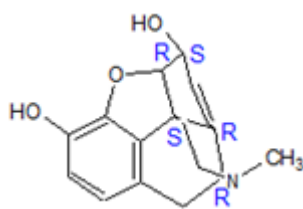
2.1.1. Chemické vlastnosti alkaloidů morfinové řady

Chemické vlastnosti morfinových alkaloidů vycházejí z rigidní pentacyklické kostry, která obsahuje jeden benzenový kruh, dva cyklohexenové kruhy, piperidinový kruh a kruh furanový. Benzenový kruh a cyklohexenové kruhy tvoří dohromady strukturu fenanthrenu a poskytují tedy omezenou konformační flexibilitu. Vzhledem ke komplikované struktuře není číslování odvozeno od izochinolinu. Číslování atomů morfinového skeletu je na obrázku č. 2.



Obrázek č. 2 - Číslování morfinového skeletu a acidobazické vlastnosti morfinu.

V molekule morfinu je přítomno 5 stereogenních center, která se celkově projevují existencí dvou optických izomerů. Zajímavé je, že pouze izomer (-): $[\alpha]_D^{23} = -130,9^\circ$ je biologicky aktivní a obsažen v opiu. Správná 3D konformace a absolutní konfigurace aktivního morfinu je na obrázku č. 3, str. 11.



Obrázek č. 3 - 3D konformace a absolutní konfigurace (-)morfinu.

Na základním uhlíkovém skeletu nalezneme tři typy funkčních skupin, od kterých se odvíjí chemické a acidobazické vlastnosti morfinu. Jedná se o hydroxyl na uhlíku C6, někdy také nazývaný podle přítomnosti dvojné vazby olefinový, dále fenolický hydroxyl na uhlíku C3 a terciární amin dusíku N17.

Acidobazické vlastnosti jsou dány vlastností terciárního aminu, jehož bazicita je výrazně vyšší než kyselost fenolického hydroxylu. Výsledné chování je tak, stejně jako u ostatních alkaloidů, bazické ³. Toto chování ještě umocňuje u blízkých alkaloidů kodeinu a thebainu metylace zmíněných hydroxylů.

Ze struktury tedy vyplývá výrazně nepolární charakter a s ním spojená nízká rozpustnost. Bezvodý morfin je ve vodě prakticky nerozpustný (1 : 10000, uváděno w/v). V běžných organických rozpouštědlech je také málo rozpustný: Ether 1 : 4350, benzen 1 : 5000, methanol 1 : 60, dobře se rozpouští v pyridinu 1 : 5,3 a piperidinu 1 : 1,5. Jak lze z acidobazických vlastností předpokládat, morfin se lehce rozpouští v roztocích hydroxidů alkalických kovů za vzniku fenolátů. Se silnými kyselinami vytváří také dobře rozpustné soli - například hydrochlorid nebo síran (1 : 15,5).

Oxidací v alkalickém prostředí přechází na pseudomorfin (2,2'-bimorfin). Zahřátím s kyselinou chlorovodíkovou na 140 °C přesmykuje za ztráty vody na apomorfin ⁴.

Vlastnosti ostatních látek morfinové řady jsou odvislé od povahy substituentů. Za zmínku stojí morfinon (resp. kodeinon), který díky svému systému konjugovaných vazeb mezi C6 keto skupinou a 7,8 nenasycenou dvojnou vazbou podléhá konjugované adici thiolů. Velmi dobře reaguje s β -merkptoethanolem, glutathionem a cysteinem za vzniku kovalentních a velmi stabilních aduktů. Tato reakce je důvodem značné toxicity pro živé organismy ^{5,6,7}.

2.1.2 Mechanismus účinku morfinových alkaloidů

Hlavním důvodem účinku alkaloidů morfinové řady je podobnost se strukturně analogickými endogenními opioidními peptidy (endorfiny, enkefaliny, dynorfiny a endomorfiny) a s nimi spojená aktivace receptorových drah. Celá problematika odpovědi na alkaloidy morfinové řady je nesmírně rozsáhlá a proto bude v následujícím textu uvedena pouze v základní formě týkající se tzv. opioidních receptorů.

Opioidní receptory byly objeveny v roce 1973 na synaptických membránách neuronů. Jsou široce rozšířené v centrální nervové soustavě, páteřní míše a zažívacím traktu a jedná se o tzv. receptory spřažené s G proteiny⁸. Na celkové odpovědi se podílí s dalšími receptory, například sigma receptory a nociceptinovými receptory (tzv. opioidním podobnými, z angl. "opioid like"), které jsou odpovědné například za antitusický efekt^{9, 10}. Výskyt, lokalizace, síla aktivace a účinek drah jednotlivých receptorů je shrnut v tabulce č. 1:

Tabulka č. 1 - Interakce alkaloidů morfinové řady s opioidními receptory a jejich účinek.

Typ receptoru	Lokalizace	Účinek aktivace	Aktivace alkaloidem	
			Morfin	Kodein
Delta (δ) (subtypy $\delta_{1, 2, 3}$)	Mozek (amygdala, pons Varoli), periferní sensorické neurony	Analgetické, antidepresivní účinky, fyzická závislost.	+	+
Kappa (κ) (subtypy $\kappa_{1, 2, 3}$)	Mozek (hypothalamus), spinální mícha, periferní sensorické neurony	Analgetické, sedativní účinky, konstrikce zornic, dysphorie (opak euforie). Ovlivnění ADH hormonu.	++	+
Mí (μ) (subtypy $\mu_{1, 2, 3}$)	Mozek (kůra, thalamus), spinální mícha (sub. gelatinosa), periferní sensorické neurony, gastrointestinální trakt	Analgetické, euforizující, vazodilatační účinky, zpomalení peristaltiky střev, fyzická závislost, respirační deprese.	+++	+

Míra agonistické interakce s jednotlivými receptory : + (slabá), ++ (střední), +++ (silná až velmi silná)^{11, 9, 10}.

2.1.3 Farmakologicky významné deriváty morfinových alkaloidů

Nežádoucí vlastnosti morfinu byly podnětem pro hledání derivátů vykazujících lepší farmakologické účinky. Původní snahou bylo především omezit vznik fyzické závislosti - tzv. morfinismu, kterému nakonec podlehl i sám objevitel morfinu.

Ze zásahů do molekuly morfinu byly zjištěny následující projevy v lidském organismu:

- i) Etherifikací nebo esterifikací uhlíku C-3 se snižuje analgetická účinnost. Naopak, tato modifikace na uhlíku C-6 účinnost zvyšuje (referenční škála analgetické účinnosti morfinu – 1; 6-etylehemorfinu 1,6; 6-acetylmorfin 4).
- ii) Redukcí dvojné vazby mezi C-7 a C-8 se účinnost zvyšuje. Také oxidace hydroxylové skupiny C6 na keto-skupinu či zavedení hydroxyly do polohy C-14 zvyšuje účinnost.
- iii) Zavedení metylové skupiny na C-5 či C-6, případně odstranění hydroxylové skupiny na C-6 rovněž vede ke zvýšení účinnosti.
- iv) Demetylace C-6, C-3 či N vede nejen ke snížení toxicity (zvláště thebainu), ale také analgetické účinnosti ⁴.

V současné době je využíváno obrovské množství látek morfinové řady. Krátký přehled s důrazem na deriváty morfinu je zanesen v tabulce č. 2 na straně 14 a demonstruje tak významné, a tedy žádané reakce (resp. jejich produkty). Pro srovnání jsou na začátku tabulky uvedena běžně dostupná analgetika.

Tabulka č.2 - Farmakologicky významné deriváty alkaloidů morfinové řady.

Účinná látka	Síla	Derivatizace	Krátký popis farmaceutika
Aspirin	0,0027	-	Kyselina acetylsalicylová. Analgetické a antipyretické účinky.
Paracetamol	0,04	-	<i>N</i> -(4-hydroxyphenyl)acetamid; Slabé analgetikum.
Morfin *	1	-	Prvně byl izolován 1806 Fridrichem Sertünere. Považován za standard analgetických účinků (Byla mu přiřazena hodnota 1).
Dihydromorfin *	1,2	7,8-dihydro	Využíván jako analgetikum s rychlejšími účinky než morfin.
Dihydromorfinon *	5	7,8-dihydro; 6-keto	Hydromorfon; Silné analgetikum analogické hydrokodonu.
Oxymorfon *	7	7,8-dihydro; 6-keto; 14-hydroxy	Používá se jako předoperační analgetikum.
Kodein *	0,1	3-methoxy	Slabé analgetikum, používán spíše jako antitusikum. Dále antidiarheální, antihypertenzivní, sedativní a hypnotické vlastnosti.
Hydrokodon *	1	3-methoxy; 7,8-dihydro; 6-keto	Synonymum dihydrokodein. Silné analgetikum používané ve spojení s dalšími látkami jako paracetamol či ibuprofen.
Oxycodon *	2	3-methoxy; 7,8-dihydro; 6-keto; 14-hydroxy	Analgetikum používané pro chronické bolesti. Používán také pro své diarhetické účinky při selhání ostatní léčby.
Naloxon, Naltrexon, Naloxol	A	N-alkylované deriváty oxycodonu	Deriváty oxycodonu. Silně antagonistické látky pro opioidní receptory. Využívány pro léčbu závislosti na látkách morfinové povahy a alkoholismu.
Thebain (Paramorfin)*	A	3,6-methoxy derivát	Účinky má analogické strychninu. LD ₅₀ se pohybuje kolem 20 mg. Smrt působí silnou depresí dýchacího centra, následovanou udušením. Otrava je provázána silnými křečemi.

Šedě jsou zvýrazněny výchozí alkaloidy. **A** značí antagonistické účinky. Derivatizace udává změny ve struktuře daného derivátu a je vztažena k morfinu. Tabulka byla zpracována z pramenů: ^{12, 13, 14}.

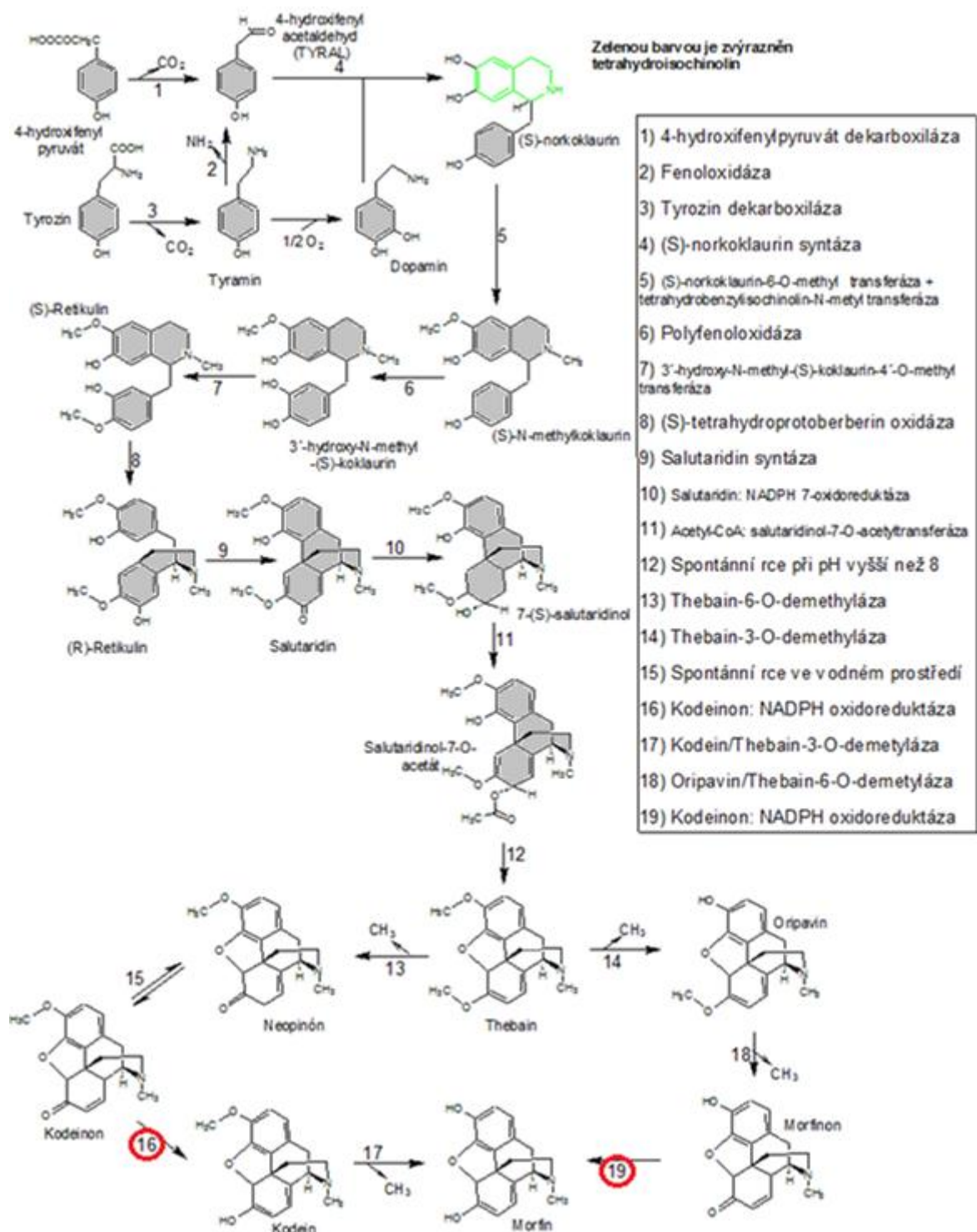
2.1.4 Biosyntéza alkaloidů morfinové řady

Rostlina máku setého (*Papaver somniferum* L.) je schopna syntetizovat celou řadu alkaloidů. Co do diverzity struktur tvoří zástupci morfinové řady početně malou skupinu, která ale tvoří okolo 60-ti % hmotnosti alkaloidů obsažených v opiu ¹⁵. Všech 42 dosud identifikovaných alkaloidů tvoří 25 % hmotnosti surového opia (z toho činí morfin 10 %, kodein 0,5 %, thebain 0,2 % w/w) ¹⁶.

Celá biosyntetická dráha je ve zjednodušené podobě přehledně zpracována v obrázku č. 4 na straně 16 včetně přítomných enzymů ^{rev. 17}. Celkově se na dráze podílí 17 enzymově katalyzovaných kroků ¹⁸. Základní biosyntéza skeletu (na schématu zvýrazněna šedě) probíhá tzv. pre-retikulinovou drahou za spotřeby dvou molekul tyrozinu složitým reakčním mechanismem až na molekulu thebainu, který je již považován za přímého zástupce alkaloidů morfinové řady [hlavní alkaloid máku listenatého *Papaver bracteatum* L.] ¹⁷. Vzhledem ke svým farmakologickým účinkům odlišným od morfinu je postupně zaváděn mák listenatý na doporučení WHO (1980) jako náhrada klasického máku setého, aby bylo zabráněno možnému zneužití ¹⁹.

Tvorba dalších alkaloidů morfinové řady z thebainu probíhá majoritní 6-O-demetylací (viz reakce 13, obr. č. 4, str. 16) a minoritní 3-O-demetylací (viz reakce 14, obr. č. 4, str. 16) za vzniku stabilních alkaloidů oripavinu a kodeinu až na výsledný morfin přes nestabilní meziprodukty kodeinon a neopinon, které jsou v neenzymové rovnováze (52 : 48 w/w)²⁰. Tyto meziprodukty jsou charakteristické i pro začátek mikrobiálních drah. Enzym katalyzující hydrogenaci keto skupiny na uhlíku C6 – Kodeinon: NADPH 6-oxidoreduktáza (EC 1.1.1.247) je zodpovědný za rychlou tvorbu kodeinu z kodeinonu tak, aby bylo zamezeno jeho toxickým účinkům, a je tedy pro buňky zásadní (viz reakce 16, 19 červeně). Mechanismus toxického účinku kodeinonu je objasněn v kapitole 2.1.1. (Chemické vlastnosti, str. 10). Konečným alkaloidem syntetické dráhy, po proběhnutí obou demetylací, je morfin.

Současným cílem studia je vytvořit biosyntetickou dráhu, která by mohla nahradit používané technologie. K tomuto cíli by mohly přispět detailní znalosti enzymů zúčastněných v biodegradaci.



Obrázek č. 4 - Biosyntéza isochinolinových alkaloidů morfinové řady. Schéma je zjednodušeno neuvádí některé intermediáty a obsahuje pouze stabilní reakční meziprodukty.

2.2 Biotransformační a biodegradační dráhy alkaloidů morfinové řady v mikroorganismech

Vzhledem k množství používaných semisyntetických analgetik odvozených od alkaloidů morfinové řady a alkaloidů samotných jsou i biotransformace těchto látek cílem mnoha výzkumů, jak například pro mikroorganismy ilustruje tabulka č. 3, str. 18.

Z informací o přítomných biotransformačních produktech lze usuzovat u jednotlivých mikroorganismů na odpovědné reakce – enzymové aktivity, které jsou rovněž zapracovány do tabulky č. 3. C14 hydroxylace je popsána jako neenzymatický krok a proto není v tabulce zohledněna²¹.

Ačkoli se většina prací zabývá pouze průmyslovým využitím (detekce biotransformačních produktů), skupina prof. Neila C. Bruce ("Institute of Biotechnology, University of Cambridge, UK") se zabývá problematikou podrobněji. Jimi nalezený organismus *P. putida* M10, který biotransformuje alkaloidy morfinové řady, je nejvíce prozkoumaný mikroorganismus v této problematice a dosud jeden z mála, u něhož byly izolovány a charakterizovány enzymy odpovědné za biotransformaci: morfin 6-dehydrogenáza (EC 1.1.1.218), morfinon reduktáza (EC 1.3.1.42) a heroin esteráza (EC 3.1.1.72)^{22, 23, 24}. Dále je známa dehydrogenázová aktivita na uhlíku C6 morfinu katalyzovaná enzymem β -hydroxysteroidní dehydrogenázou (z angl. " β -hydroxysteroid dehydrogenase") z mikroorganismu *Pseudomonas testosteronii* (dle současné nomenklatury *Comamonas*).

Tabulka č. 3 - Dosud známé mikroorganismy biotransformující alkaloidy morfinové řady a jejich deriváty.

Název organismu	Výchozí látka	Detekovaný produkt	Reakce *	Ref.
<i>Trametes sanguinea</i>	Morfin	14OH-morfin	Oxred.	25
<i>Arthrobacter</i> sp.	Morfin	14OH-morfin	Oxred.	26
<i>Pseudomonas testosteroni</i>	Morfin	14OH-morfin	Oxred.	27
<i>Pseudomonas putida</i> M10	Morfin, Kodein	Hydrokodon, 14OH- morfin	Oxred.	22
<i>Bacillus</i> sp.	Morfin, Kodein	Morfinon, kodeinon	Oxred.	28
<i>Mycobacterium neonarum</i> MT605	Kodein	14OH-kodein	Oxred.	21
<i>Rhizobium radiobacter</i> R89*	Kodein	14OH-kodein	Oxred.*	29
<i>Streptomyces griseus</i> NRRL B8090 + další kmeny <i>S. griseus</i> , <i>griseolus</i> , <i>punipalus</i> , <i>linconensis</i> ;	Kodein	14OH-kodein, norkodein	Oxred., dealk.	30 31
<i>Spirulina platensis</i>	Kodein	Morfin	Dealk.	32
<i>Cunninghamella echinulata</i> NRRL 1384	Buprenorfin	Morfin	Dealk.	33
<i>Mucus piriformis</i>	Thebain	Northebain	Dealk.	34
<i>Rhodococcus</i> sp. H1	Heroin	Morfin	Dealk.	24
<i>Cunninghamella bainieri</i>	Kodein	Norkodein	Dealk.	35
<i>Cunninghamella echinuata</i> , <i>Helicostylum piriforme</i> , <i>Trametes</i> <i>sanguinea</i> , <i>T. cinnabarina</i> , <i>Curvularia</i> <i>lunata</i>	Buprenorfin	Oripavin, Morfin	Dealk.	36
<i>Cylindrocarpon didymum</i>	Morfin	2,2'-bimorfin	Konjug.	37
<i>Nostoc muscorum</i>	Kodein	6-acetylkodein, oxycodon, norcodein	Oxred., konjug., dealk.	38

- Organismy jsou seřazeny podle biotransformační aktivity.

* Oxred. – oxidoredukční, dealk. – dealkylační, konjug. - konjuguační aktivita (nutná pro přeměnu výchozí l. na detekovaný produkt)

** Mikroorganismus *R. radiobacter* R89 a jeho biotransformační potenciál je částečně publikován v referenci²⁹ a je významně rozšířen o další látky v této práci, viz kapitola 5 Výsledky na straně 49.

Jak je z tabulky č. 3 patrné, společné pro většinu mikrobiálních drah jsou charakteristické oxidoredukční reakční stupně. Z údajů známých o *Pseudomonas putida* M10 je možné usuzovat na přítomnost dehydrogenace C-6 hydroxylu a nasycení dvojně vazby mezi uhlíky 7 a 8³⁹.

Biotransformace alkaloidů morfinové řady není samozřejmě doménou pouze mikroorganismů a zvláště jako detoxifikace nacházíme tyto reakce u vyšších organismů. Sekvenční podobnost eukaryotních enzymů s mikrobiálními orthology je však natolik nízká, že je nelze využít k bioinformačním studiím aplikovaným na mikrobiální genomy. Jako příklad detoxifikací lze uvést N-demetylací a konjugaci s kyselinou glukuronovou u myši, králíků, morčat, koček, opic a také u člověka⁴⁰. Hlavní detoxifikační metabolity,

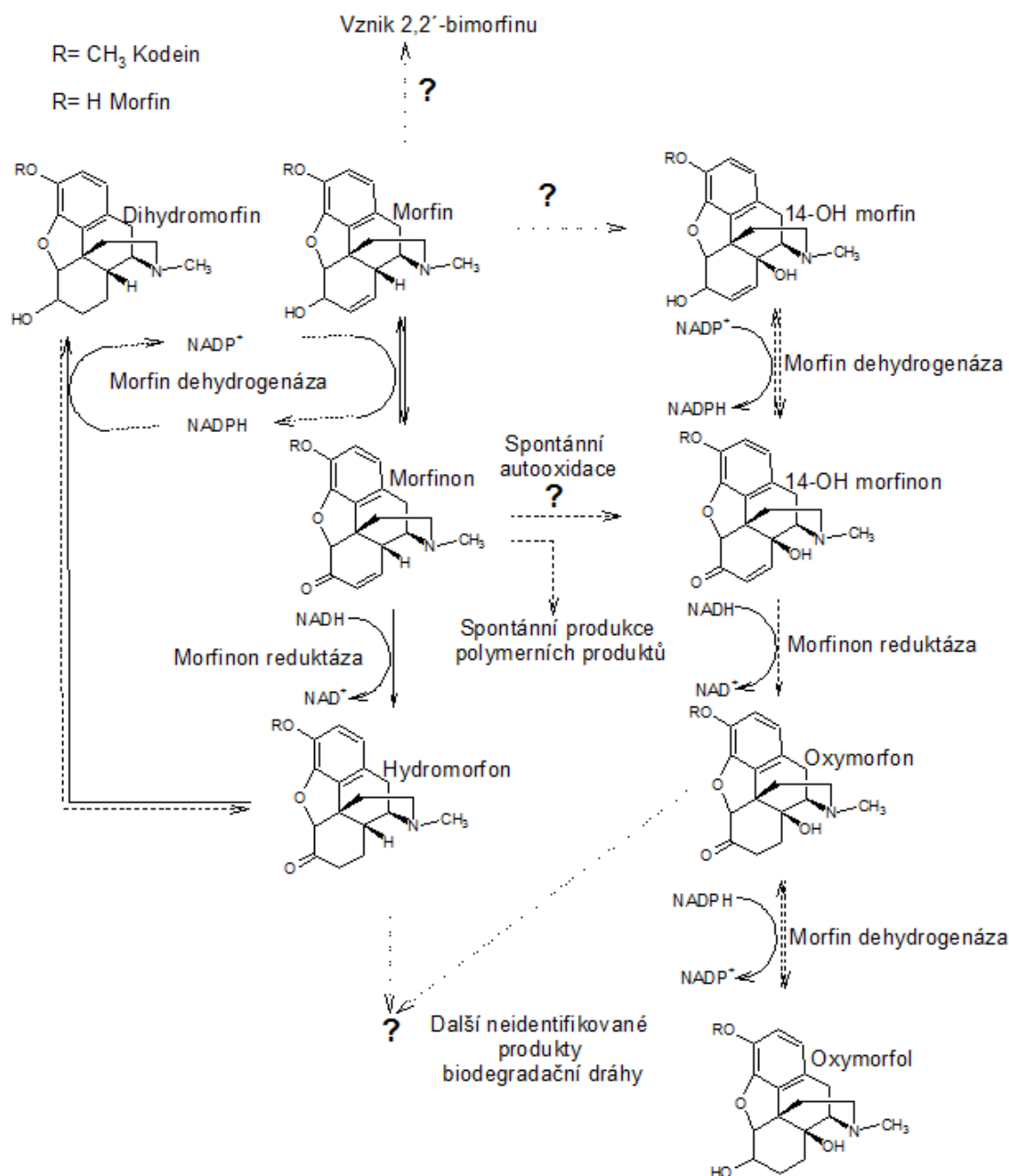
které vznikají u člověka, jsou 3-O-glukuronidy a 6-O-glukuronidy, dále pak minoritně kodein (3-O-metyl derivát) a normorfin (N-demetylovaný produkt).

Biotransformace alkaloidů morfinové řady – *Pseudomonas putida* M10

Pseudomonas putida je saprotrofní půdní G- bakterie vytvářející tyčinkám podobné buňky. Stejně jako ostatní zástupci řádu *Pseudomonales* se vyznačuje velmi rozsáhlým metabolismem nejrůznějších látek umožňujících bakterii přežít v rozličných podmínkách, například v půdách zamořených toluenem, oleji nebo naftalenem ⁴¹.

Mikroorganismus *P. putida* M10 byl izolován v roce 1990 z průmyslového odpadu v třepané kultuře s minerálním médiem obohaceným o morfin a byl charakterizován jako schopný růst na morfinu jako jediném zdroji uhlíku ^{42, 43}. Skupina profesora Neila C. Bruce kromě již výše zmíněných charakterizací enzymů popsala některé kroky a meziprodukty biotransformace zobrazené na obrázku č. 5, str. 20. Schéma bylo získáno sloučením publikovaných reakcí ^{44, 45}.

Jako hlavní produkty biotransformace morfinu byly identifikovány hydromorfon, dále pak dihydromorfin a také méně zastoupené 14 β -OH morfinon a 14 β -OH morfin (46). V dalších studiích byly pak nalezeny s jinými substráty i další produkty. Při inkubaci oxymorfonu s celými buňkami *P. putida* M10 vznikal oxymorfol jako výsledný a jediný produkt.



Obrázek č. 5 - Biotransformační potenciál mikroorganismu *P. putida* M10. Plné šipky znázorňují hlavní reakční dráhu pro morfin s maximálním zastoupením produktů (pro kodein analogické). Přerušované šipky značí vedlejší reakce poskytující minoritní produkty nebo reakční produkty získané z reakcí, jejichž výchozí látkou nebyl morfin (resp. kodein), ale přímo daný meziprodukt např. oxymorfon. Tečkované jsou zobrazeny reakce, jejichž průběh je předpokládán, ale nepodařilo se je doložit.

Biotransformace alkaloidů morfinové řady bakteriemi rodu *Rhizobiaceae* a jejich charakteristika

Zástupci rodiny *Rhizobiaceae* patří mezi alfa proteobakterie a jsou velkou, poměrně heterogenní skupinou, jejíž nomenklatura není dosud ustálena ani na základě molekulárně biologických technik. Buněčná stěna je G- typu s obrovským množstvím nejrůznějších

polysacharidů, mezi nimiž dominuje exopolysacharid curdlan (β -glukan) a sukcinoglukan⁴⁷. Zástupci jsou aerobní půdní bakterie morfologicky podobné tyčinkám.

Rhizobium radiobacter je reklasifikovaný název pro *Agrobacterium tumefaciens*⁴⁸. Tento mikroorganismus je známý především jako rostlinný patogen, který je využíván jako nástroj pro transformaci rostlin. Patogeneze je spojena s přítomností Ti-plasmidu, který umožňuje horizontální genový přenos nejen do rostlinných buněk, ale konjugací i mezidruhově do jiných *rhizobií*. Přesto mnoho kmenů *R. radiobacter* postrádá Ti-plasmid a nejsou tedy rostlinnými patogeny.

Metabolismus kodeinu a morfinu byl zatím identifikován pouze u kmenu *Rhizobium radiobacter* R89 a je popsán v předchozí práci²⁹. V této publikaci je kladen důraz na biotechnologické využití daného kmenu a nejsou popsány enzymy účastníci se biotransformace. Zásadní popsanou schopností daného kmenu je vysoká morfin 6-dehydrogenázová aktivita a C14-hydroxylace, vedoucí při zvolení vhodných podmínek ke 100% konverzi kodeinu (morfinu) na 14OH-kodein (14OH-morfin).

2.3 Studované proteiny

Z dostupných děl týkajících se biotransformace alkaloidů morfinové řady (tabulka č. 3, str. 18) je zřejmé, že po počátečních demetylacích metoxylů složitějších alkaloidů následuje vždy dehydrogenázová reakce na uhlíku C6 a nasycení dvojně vazby mezi uhlíky C7 a C8. První zmíněný krok a C14 hydroxylace jsou zajímavé vzhledem k obtížně dostupné alternativě chemickou syntézou (nezbytnosti minoritně zastoupeného alkaloidu – thebainu⁴⁶ jako výchozí látky).

Nalezením enzymů odpovědných za iniciační kroky biotransformace morfinových alkaloidů v *R. radiobacter* R89 se otevírá cesta jejich dalšímu možnému využití farmaceutickým průmyslem a pochopení jejich možné fyziologické role v mikroorganismu. Z tohoto důvodu jsou předmětem hlavního zájmu morfin-6-dehydrogenáza a morfinon reduktáza, jejichž popisem se zabývají následující kapitoly.

2.3.1 Morfin 6-dehydrogenáza

Tato enzymová aktivita již byla popsána u rostlin při syntéze morfinu v jednom z posledních kroků (viz obrázek č. 4 str. 16, reakce 16 a 19). Jednalo se o enzym: EC 1.1.1.247 kodeinon: NADPH 6-oxidoreduktáza katalyzující C6 redukci keto skupiny kodeinonu na příslušný alkohol, tedy kodein⁴⁹. U mikroorganismů je morfin 6-dehydrogenázou myšlen jiný enzym, a to EC 1.1.1.218 morfin: NAD(P)⁺ 6-oxidoreduktáza, který katalyzuje stejnou reakci, ale v opačném směru (z kodeinu na kodeinon). Enzymy s touto aktivitou se nacházejí také u vyšších živočichů včetně člověka^{22, 6}.

Jak již bylo zmíněno, na proteinové úrovni jsou známé dva mikrobiální enzymy zodpovědné za morfin 6-dehydrogenázovou aktivitu. Jedná se o morfin 6-dehydrogenázu z mikroorganismu *P. putida* M10 a β -hydroxysteroidní dehydrogenázu z *P. testosteronii*²⁷. V následujícím textu budou postupně popsány vlastnosti obou.

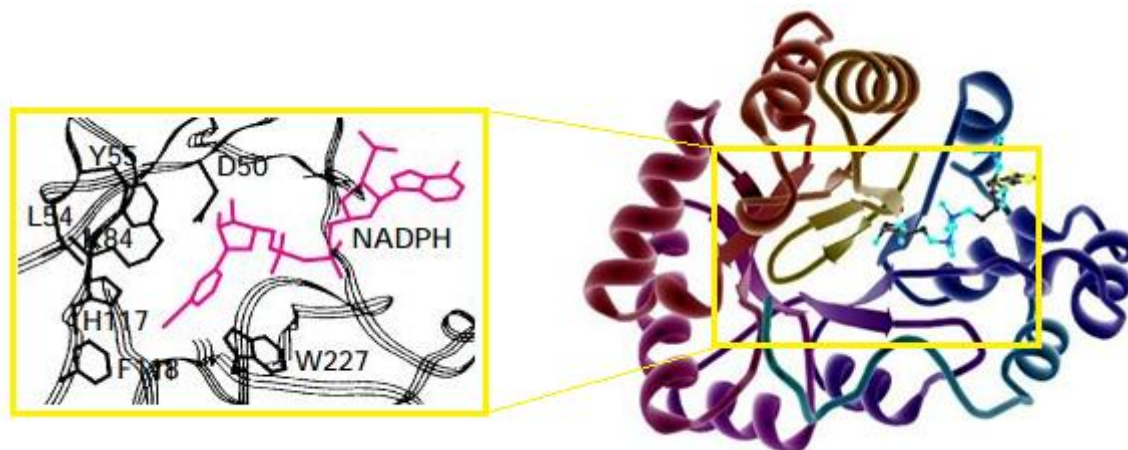
Morfin 6-dehydrogenáza *Pseudomonas putida* M10

Morfin dehydrogenáza z *P. putida* - MDH (z. angl. morphine dehydrogenase) je 296 aminokyselin velký protein o celkové hmotnosti 32 124 Da. Odpovídající gen byl nalezen na 165 kb velkém plasmidu pMOR.

Enzym byl kineticky charakterizován s morfinem a kodeinem. Žádný další substrát u něj popsán nebyl. Kinetika je dvousubstrátová s neuspořádaným (z angl. "random") nebo tzv. Theorell-Chance mechanismem. Ternární komplex nevzniká⁷. Bylo zjištěno, že MDH velmi rychle ztrácí aktivitu během vzniku morfinonu (resp. kodeinonu). Jak bylo popsáno v kapitole Chemické vlastnosti (2.1.1, str. 10), reaguje přímo Michaelovou adicí s thio-skupinou^{5, 39}. Po 80-ti minutách byl nalezen veškerý enzym inaktivovaný kovalentním aduktem morfinonu na Cys-80, který je zásadní pro katalýzu. Místně cílenou mutagenezí byl nahrazen Cys za Ser, čímž se podařilo vzniku aduktu zabránit za částečného snížení aktivity⁷.

Porovnání nukleotidové sekvence MDH (z angl. "alignment") s dalšími enzymy byl enzym zařazen do aldo-keto reduktázové rodiny, u které je známa velmi široká substrátová specifita⁵⁰. Dosud není známa krystalová struktura tohoto enzymu, ale přiřazení k homologním aldo-keto reduktázám umožnilo najít a postulovat 8 α a 8 β struktur⁵¹. Enzym je tedy charakteristický $\beta 8/\alpha 8$ barelovým motivem (z angl. " $\beta 8/\alpha 8$ barrel motif")⁵².

V současné době je k dispozici pouze jedna blízce homologní struktura aldo-keto reduktázy z *Mycobacterium stegmatis* MC 155 v databázi Protein Data Bank (PDB)^{53, 54}. 3D struktura zmíněného proteinu je ukázána na obrázku č. 6.



Obrázek č. 6 - 3D struktura MDH homologu z *Mycobacterium stegmatis* MC 155 - stužkový model. Struktura je zobrazena s ligandem NADPH (růžově). Levý obrázek ukazuje výřez z aktivního místa enzymu. Pravý obrázek zachycuje strukturu pohledem zvrchu tak, aby vynikla struktura beta skládaného listu uvnitř enzymu vytvářející hydrofobní jádro s aktivním místem enzymu. Aktivní místo bylo převzato a upraveno z Jez a kol., 1997⁵¹.

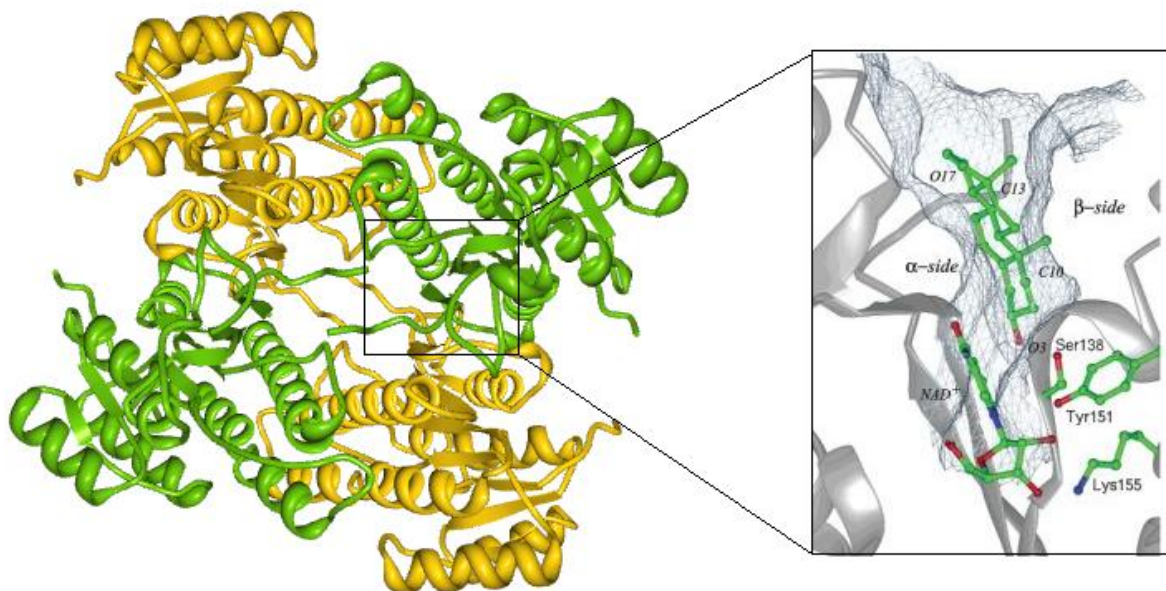
β -hydroxysteroidní dehydrogenáza *Pseudomonas testosteroni* (*Comamonas testosteroni*)

Jedná se o druhý enzym s morfin 6-dehydrogenázovou aktivitou, který byl popsán na proteinové úrovni, a to již v roce 1975²⁷. Protein obsahuje 254 aminokyselin a má celkovou hmotnost 26952 Da. Jedná se o tetramer, jak je u homologních proteinů obvyklé (PDB, 1HXH)⁵⁵.

Kineticky je protein dobře charakterizován. Ze získaných hodnot K_m je možné odhadnout, že katalýza dehydrogenace alkaloidů morfinové řady je dána podobností aktivních míst, a nejedná se tedy o primární substrát (kodein $K_m = 1,92$ mM; morfin $K_m = 5,7$ mM, testosteron $K_m = 55$ μ M).

Porovnáním primární sekvence s databází je možné zařadit β -hydroxysteroidní dehydrogenázu do skupiny tzv. dehydrogenáz s krátkým řetězcem (SCD, z angl. "short-chain dehydrogenase")^{56, 57}. Substrátové spektrum těchto dehydrogenáz je nesmírně široké: od cukerných alkoholů, látek steroidní povahy až po proteiny přizpůsobené signální funkci⁵⁸.

Struktura charakterizovaného enzymu bohužel není známa, ale je k dispozici blízký homolog 3 α ,20 β -hydroxysteroidní dehydrogenázy jiného kmene *Comamonas testosteroni*, jejíž struktura s detailem aktivního místa je ukázána na obrázku č. 7:



Obrázek č. 7 - 3D struktura 3 α ,20 β -hydroxysteroidní dehydrogenázy *Comamonas testosteroni* (1HXH). Struktura je příkladem charakteristické struktury dehydrogenáz s krátkým řetězcem. Data jsou ze serveru PDB ⁵⁹, zobrazena pomocí Protein Workshop softwaru ze stejné stránky. Struktura aktivního místa s NAD⁺ převzata z Benach a kol., 2002 ⁵⁵.

2.3.2 Morfinon reduktáza

Morfinon reduktáza (EC 1.3.1.42) je druhý enzym v biodegradční dráze kodeinu a morfinu.

Jako specifický enzym byla izolována pouze z *Pseudomonas putida* M10. Jedná se o homodimerický protein s $M_r=41120$ Da, u kterého každá z obou podjednotek váže flavin mononukleotid (FMN) ²³. Porovnáním odpovídající nukleotidové sekvence s geny kódující další proteiny byla morfinon reduktáza zařazena do široké rodiny tzv. starého žlutého proteinu (OYE, z angl. "old yellow enzyme family") ⁶⁰, které katalyzují saturaci dvojných vazeb nejrůznějších substrátů.

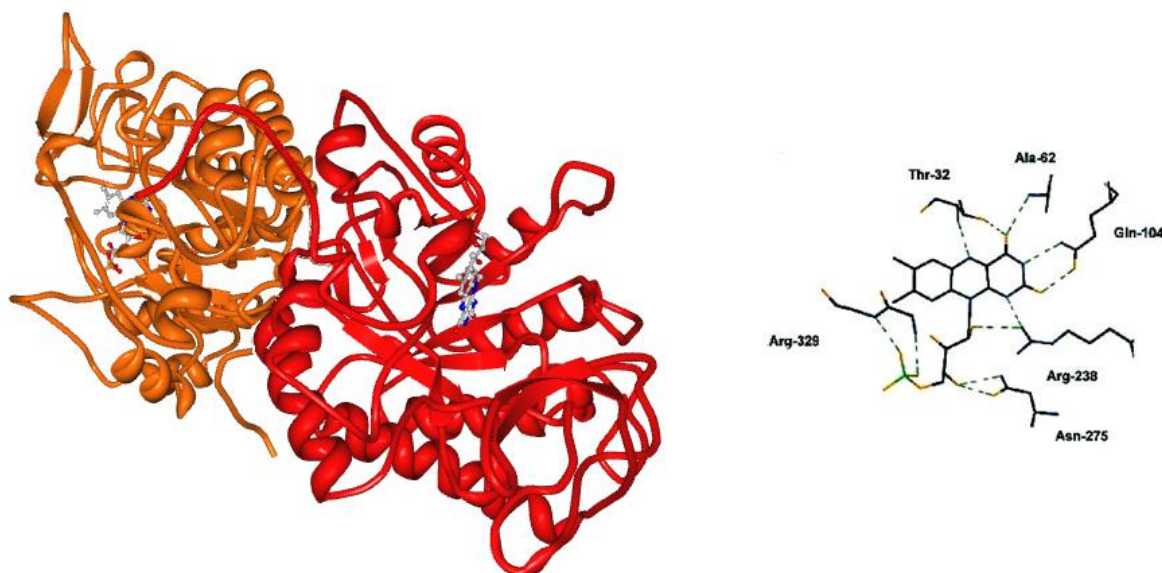
Starý žlutý protein, jak už téměř vyplývá z názvu, byl vůbec první izolovaný flavoprotein. Enzym izolovali Warburg a Christian již v roce 1933 ⁶¹. Od té doby bylo nalezeno množství homologů bakteriálních, ale i rostlinných isoformů, jak ukazuje tabulka č. 4 na straně 25.

Tabulka č. 4 - Diversita proteinů OYE rodiny.

Název organismu	Rok	Název enzymu (funkce)	Ref.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1969	Starý žlutý enzym ("Old yellow enzyme")	62
<i>Pseudomonas putida</i> M10	1994	Morfinon reduktáza	23
<i>Lactococcus lactis</i>	1997	Dihydroorotát dehydrogenáza (<i>de novo</i> biosyntéza pyrimidinových nukleotidů)	63
<i>Pseudomonas putida</i> II-B	1999	XenA, XenB (reduktázy xenobiotik)	64
<i>Lycopersicon esculentum</i>	2001	12-Oxofytodienoát reduktáza (z angl. 12-Oxophytodienoate reductase (α,β -nenasyčené karbonyl. slouč.-substráty)	65
<i>Tripanozoma cruzi</i>	2002	TcOYE (klíčový enzym v metabolismu xenobiotik, resistance)	66
<i>Bacillus subtilis</i>	2005	YqjM flavoprotein (funkce v odpovědi na oxidační stres)	67
<i>Thermus scotoductus</i> SA-01	2008	Chroman reduktáza (redukce Cr ^{VI} na méně toxické Cr ^{III} sloučeniny)	68

Tabulka přináší náhled do obrovské diversity OYE homologů mezi bakteriemi. Funkce enzymu je velmi zkráceně popsána v závorce za názvem enzymu. Ref. - reference vedoucí k popisu daného proteinu.

V PDB databázi je více než 30 záznamů odpovídajících různým strukturním zástupcům OYE. Struktura morfinon reduktázy je charakteristická dvěma podjednotkami a také $\beta 8/\alpha 8$ barelovým motivem⁶⁹ a je ukázána na obrázku č. 8 s detailem aktivního místa:



Obrázek č. 8 - Struktura morfinon reduktázy *P. putida* M10 s detailem aktivního místa. Struktura PDB: 1GWJ zobrazena Protein Workshop softwarem ze stejné stránky. Aktivní místo převzato a upraveno dle Barna T. a kol.⁶⁹.

Zajímavou skutečností je, že morfinon reduktáza je používána jako jeden z modelových proteinů ke studiu komplexity katalytického cyklu flavoproteinů^{70, 71, 72}.

Dosud popsané enzymové reakce mohou být v mikroorganismech katalyzovány i jinými zástupci daných rodin či dokonce jinými rodinami enzymů, u kterých došlo selekčním evolučním tlakem ke změně substrátové specifity. Takovým příkladem může být na základě získaných výsledků serin 3-dehydrogenáza z rodiny dehydrogenáz s krátkým řetězcem, která poskytuje morfin 6-dehydrogenázovou aktivitu a glycerol trinitrát reduktáza (GTN, z angl. "Glycerol Trinitrate Reductase") katalyzující redukci morfinonu.

Ze zástupců rodu *Rhizobium* (v⁷³ označ. jako *Agrobacterium*) byl izolován člen OYE rodiny a to 39 kDa velká monomerní glycerol trinitrát reduktáza GTN (z angl. "glycerol trinitrate"), která umožňuje danému mikroorganismu využít GTN a další nitroderiváty (většinou výbušniny) jako zdroj dusíku⁷³. Enzym bohužel nebyl biochemicky analyzován s kodeinonem jako substrátem a srovnávací studie není k dispozici vzhledem k faktu, že katalyzovaná reakce - reduktivní štěpení trinitroglycerolu – je značně odlišná.

3 Cíl práce

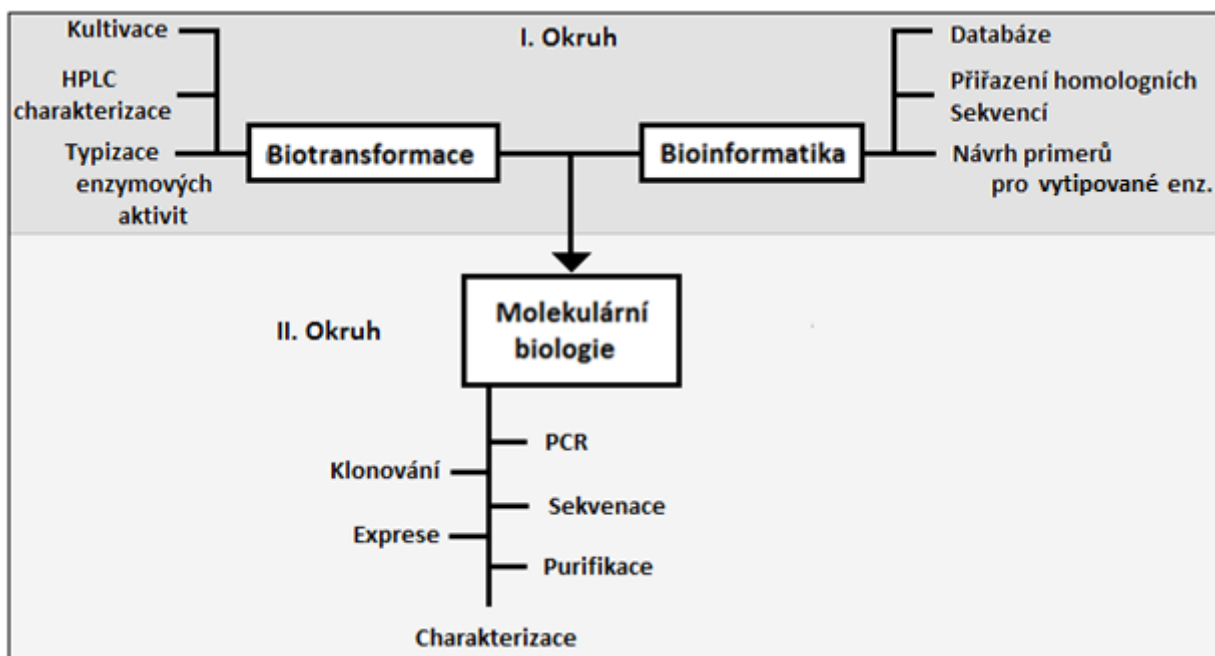
Tato práce se zaměřuje na purifikaci a charakterizaci dvou vybraných enzymů katalyzujících oxidačně-redukční reakce C14 hydroxylovaných morfinových skeletů z organismu *Rhizobium radiobacter* R89.

Cíl řešení práce lze tematicky rozčlenit na 2 okruhy, které odpovídají jednotlivým dílčím cílům:

První okruh se zabývá charakterizací biotransformačních schopností zvoleného mikroorganismu *Rhizobium radiobacter* R89 a bioinformatickou analýzou genomu pro selekci vybraných enzymových aktivit.

Náplní druhého okruhu byla rekombinantní heterologní exprese proteinů katalyzujících studované enzymové aktivity v buňkách *Escherichia coli* a jejich purifikace a následná charakterizace.

Jednotlivé úkony a části práce jsou pro přehlednost graficky zpracovány v následujícím schématu:



Obrázek č. 9 - Schéma práce

4 Metodická část

4.1 Materiál

4.1.1 Biologické materiály

4.1.1.1 Bakteriální kmeny

Rhizobium radiobacter R89

Escherichia coli ArcticExpress Agilent, USA

Escherichia coli BL21(DE3) Invitrogen, USA

Escherichia coli SHuffle® New England Biolabs, USA

Escherichia coli TOP10..... Invitrogen, USA

Escherichia coli XL-1 Agilent (Stratagene), USA

4.1.1.2 Plasmidy a primery

Plasmid pGEM®-T Easy Promega, USA

Plasmid pET 28b Novagen, UK

Takara Chaperone Plasmid Set Takara, Japonsko

Teplota tání (T_m) je generována pomocí webového nástroje OligoAnalyzer 3.1:

<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx> (27.4.2013)

Degenerované primery pro amplifikaci genu OYE (*R. radiobacter* R89), cca 720 bp:

- přímý primer (T_m 56°C, na AK sekvenci **QLWH(V/T)G**): 5'-ICARYTITGGCAYRYNGG-3'

- zpětný primer (T_m 50°C, na AK sekvenci **GY(T/I)DYP**): 5'-IGGRTARTCIRTRTANCC-3'

Primery pro inverzní PCR na sekvenci amplifikovanou předchozími primery:

(T_m 57°C) - 5'-CAACAACGGCTTCGTCGATG -3'

(T_m 58°C) - 5'-TCATTGCCAATCCGGACCTG -3'

Primery pro amplifikaci *morR* genu:

- přímý primer*: TTT**CATATGACTCAGATTC**CCCTTAGTCTTG (podtržená část je restriční místo *NdeI*, šedě specifická část primeru; T_m 62°C)

- zpětný primer*: TTT**GAATTC**CAATTGTCGGACGTTGTTT (podtržená část je restriční místo *EcoRI*, šedě specifická část primeru; T_m 64°C)

Primery pro zbývající oblast genu *scD* (zbytek operonu).

- přímý primer I (T_m 40°C): 5'-CATTTTCAAATTCTCC -3'
- přímý primer II (T_m 41°C): 5'-TTGACATTACATGATG -3'
- přímý primer III (T_m 41°C): 5'-AGAAAAGAGGAATCC -3'
- zpětný primer (T_m 46°C): : 5'-AAAGCCTGACGAGT -3'

Primery pro amplifikaci *scD* genu:

- přímý primer* (T_m 64°C): 5'-TTTCATATGACTCAGATTCCCTTAGTCTTG -3'
- zpětný primer* (amplifikace *morR+scD*; T_m 77°C):5'-
TTTGCGGCCGCTCAATTGTCGGACGTTGTT -3'
- zpětný primer* (amplifikace *scD*; T_m 86°C): 5'-TTTGCGGCCGCTCACGCCGGCGTC -3'

Výrobce primerů: Metabion, Německo nebo Generi Biotech, ČR (označeno *)

4.1.1.3 Enzymy

Restrikční enzymy

MseI, *Bfal*, *EcoRI*, *SphI*, *BstBI*..... New England BioLabs, USA
NdeI HF, *NotI* HF.....Fermentas, Lotyšsko

DNA dependentní DNA polymerázy

Taq polymeráza, 2 U/μlThermo Scientific, USA
Phusion polymeráza, 2 U/μlThermo Scientific, USA

Ligáza

T4 DNA ligáza, 5 U/μl.....Thermo Scientific, USA

Ostatní

Benzonase®Sigma Aldrich, USA
GlukózaoxidázaSigma Aldrich, USA
Lysozym: 50 mg/ml, v roztoku Glu-CDTA-Tris, 100 000 U/mg Serva, Německo

4.1.1.4 Standardy

Dual Color Precision Plus Protein Standards Bio-Rad, USA
Dual Xtra Standards Bio-Rad, USA
Gene Ruler DNA Ladder MixThermo Scientific, USA
NEB Protein Ladder New England BioLabs, USA

4.1.2 Chemické materiály

4.1.2.1 Chemikálie

Fluka (Německo): kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová (MES), polyetylglykol 8000 (PEG 8000),

Lach-Ner (ČR): NaCl, KCl, NaOH, KOH, ethanol, isopropanol, bezvodý glycerol, tetraboritan sodný, acetonitril, terbutylmetyléter (TBME)

New England BioLabs (USA): sada nukleotid trifosfátů (dNTPs)

Merck (Německo): β-merkптоethanol, bromfenolová modř, CaCl₂, glycin

Serva (Německo): sodium docecylsulfát (SDS), tetracyklin

Sigma Aldrich (USA): Luria-Bertani agar (LB agar), Luria-Bertani médium (LB médium), Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB-R), Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB-G), 1,4-dithiotrietol (DTT), hovězí sérový albumin (BSA), ethidium bromid, Na₂HPO₄ · 7H₂O; NaH₂PO₄ · 10H₂O, imidazol, N,N-Bis(2-hydroxyetyl)glycine (Bicine), 2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina (Hepes), kanamycin, sorbitol, N, N, N', N'-tetrametyletylendiamin (TEMED), Trizma® base, akrylamid, isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), Peroxosíran amonný (APS), kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA), NiSO₄ · 6H₂O, kyselina boritá, SYPRO® Orange, nitroglycerol (glycerol trinitrát, GTN)

Biotinum (Německo): Gel RED Nucleic Acid Stain

Zentiva (ČR): fosforečnan kodeinu, 14OH-kodein, kodeinon, 14OH-kodeinon, hydrokodon, oxykodon, oxykodol, 7,8-dihydrokodein; morfin, 14OH-morfin, 14OH-morfinon, hydromorfon, oxymorfon, oxymorfol, 7,8-dihydromorfin, thebain

4.1.2.2 Komerční puřry

6×DNA Loading DyeThermo Scientific, USA

4.1.3 Ostatní materiály

Centrifugovatelné plastové zkumavky z výčkem (50 a 15 ml) ...ROTH, Thermo Scientific, USA

Complete inhibitor proteasRoche, Švýcarsko

Filtr stříkačkový: Millex®-HV (PVDF 0,45 μm)Fisher Scientific, USA

Filtr stříkačkový: Rotilalo® Spritzenfilter (PES 0,22 μm)Carl ROTH, Německo

Filtry: Glass Microfibre Filter..... Hahnemühle, Německo

FPLC kolona: Mimetic Orange 3® F3GA, Piksi column 1ml Prometic biosciences, UK

HPLC kolona: Luna 5u Phenyl-Hexyl 250x4,60mmPhenomenex, USA

HPLC kolona: Phenomenex C18 250x 0,46 mm.....Phenomenex, USA

Kolony Econo-Pac Chromatography ColumnsBio Rad, USA

Krystalizační destičky: Inteli-PLATE®, ARI (96).....Art Robins Instruments, USA

Mikrostříkačka Hamilton SYR 50μl Hamilton, USA

Nanášecí kapilára Pyrex 1-5 Micro.....Corning Glass Works, USA

Ni-NTA Agarose Invitrogen, USA

Soustavy mikroskopů: Flat Cap Strips	Bio-Rad, USA
Suché dialyzační membrány: SnakeSkin®, MWCO 10 000.....	Thermo Scientific, USA
Špičky k automatickým pipetám - Thermo Scientific FinTips.....	Thermo Scientific, USA
TLC destička: Silica gel 60 F ₂₅₄	Merck, Německo
Vivaspin MWCO 10 000	Sartorius, Německo

Komerční soupravy

BCA Protein Assay Kit	Pierce, USA
BSA Protein Assay Standards	Pierce, USA
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche, Švýcarsko
JCSQ core I, II, III, IV Crystallization Kit	Qiagen, USA
Luminata Forte Western HRP Substrate	Merck, Německo
Mini PROTEAN Precast - Gels	Bio-Rad, USA
QIAprep® Spin Mini Prep Kit	Qiagen, USA
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, USA
Trans-Blot® Turbo TM Transfer Pack (Midi format)	Bio-Rad, USA

4.1.4 Přístrojové vybavení

Analytická HPLC sestava: Shimadzu UFLC, degasser DGU-20A ₅ , liquid chromatograph LC-20AD, auto sampler SIL-20A HT, Column oven CTO-10AS VP, UV/VIS detector SPD-20A	Shimadzu, Japonsko
Analytické váhy: CPA225D	Sartorius, Německo
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Avanti J-30I	Beckman Coulter, USA
Centrifuga: Microfuge® 18 Centrifuge	Beckman Coulter, USA
Centrifuga: Microfuge® 22R Centrifuge	Beckman Coulter, USA
Cycler: Gradient cycler, PTC-200	MJ Research, USA
DLS: Zetasizer Nano Series ZS 90	Malvern, UK
Flow Box: Clean-Air	Schoeler Instruments, Německo
FPLC sestava: Äkta Purifier; Box-900; UPC-900; P-900; Frac 920, Inv 907; PV-908.....	GE Healthcare, USA
Hlubokomrazicí mrazák: Sanyo VIP Series	Schoeler, Německo
Horizontální třepačka: IKA® Vortex Genius 3	IKA Laboratory Equipment, Německo
Horizontální třepačka: Lab Shaker	Adolf Kuhner AG, Švýcarsko
Horizontální třepačka: LT3	Kavalierglass, ČR
Horkovzdušná pistole: PNG 600-3	Bosch, Německo
Iluminátor (DNA): HF-ChemiBis 3.2	Bio-Imaging Systems, Israel
Iluminátor: Image Quant LAS 4000	GE Healthcare, USA
Iluminátor: ImageQuant LAS 4000	GE Healthcare, USA
Inkubátor (maxi): Max Q 5000, KRD.....	Thermo Scientific, USA
Inkubátor (mini): NB-205.....	Biotech, Švédsko

Inkubátor (misky): Wùve incubator EN120, KRD.....	Thermo Scientific, USA
Inkubátor: Max Q 4000, Barnstead Lab-Line.....	Thermo Scientific, USA
Magnetická míchačka: IKA® RCT basic	IKA Laboratory Equipment, Německo
Membránová vývěva: N810	Fisher Scientific, USA
Mikrocentrifuga: Eppendorf mini Spin	Eppendorf, Německo
Olejevá vývěva 3AAC83-4L.....	Mez Mohelnice, ČR
pH metr: HI2221.....	HANNA Instruments, USA
pH metr: inoLab	WTW, ČR
Předvážkové váhy: Mettler PJ 600	Mettler, Švýcarsko
Předvážky: Pioneer.....	OHAUS, Švýcarsko
Souprava automatických pipet: Finpipette®F2	Thermo Scientific, USA
Spektrofotometr: Biowave II	Biochrom, UK
Termostat: Biological Thermostat BT 120	Laboratorní přístroje Praha, ČR
Termostatovaný blok: 17600 Dri-Bath	Thermolyne, USA
Thermo cycler: C1000 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad, USA
Thermo cycler: XPCyclor	Bioer, Čína
Transiluminátor: Herolab UVT-20M	Herolab, Německo
Třepačka - kultivační: Orbital Incubator	Gallenkamp, UK
Ultrazvuková rozbíjecí souprava: Sonicator 3000	Misonix, USA
Vortex: PV1	Grant instruments, UK

4.2 Metody

4.2.1 Chromatografické metody

Chromatografické metody byly používány k charakterizaci a kvantifikaci produktů biotransformace (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, Chromatografie na tenké vrstvě) nebo k purifikaci proteinů (Gelová permeační chromatografie, Niklová chelatační chromatografie).

4.2.1.1 Příprava vzorků pro HPLC a TLC

Vzorky pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, HPLC (z angl. "High Performance Liquid Chromatography") a tenkovrstvou chromatografii, TLC (z angl. "Thin Layer Chromatography") analýzu byly extrahovány alkalickou éterovou extrakcí.

Vodné fáze vzorků byly převedeny do mikrozkušavek Eppendorf. Do zkumavek bylo následně pipetováno 100 µl NH₄OH a dále 300 µl terc-butylmetyléteru (TBME). Zkumavky byly třepány 15 minut na horizontální třepačce 200 ot./min. Centrifugací 10 min, 1000 g, 25 °C (Eppendorf Centrifuge 5403) byly odděleny obě fáze. Éterová fáze byla následně

pipetováním oddělena do čisté zkumavky Eppendorf. Odpovídající objem éterové fáze byl přímo nanášen kapilárou na destičku TLC. Pro HPLC analýzu byla éterová fáze odpařena v evakuovaném exsikátoru (olejová vývěva 3AAC83-4L) a odparek byl rozpuštěn v 500 μ l chromatografického pufru (viz kapitola 4.2.1.2). Koncentrace získaného extraktu byla stanovena při 281 nm (detekce aromatického kruhu v alkaloidech morfinové řady).

4.2.1.2 HPLC s reverzní fází

Analýzy změn látek morfinové řady byly prováděny porovnáním retenčních časů se standardy na Analytické HPLC sestavě: Shimadzu UFLC. Porovnání probíhalo metodou standardního přídatku daného standardu (s čistotou vyšší než 99 %). Ve všech metodách byly použity tyto konstantní podmínky: průtoková rychlost 1 ml/min, teplota kolony 40 °C a detekce spektrofotometrickým detektorem (SPD-20A) při vlnové délce 220 a 281 nm. Všechny potřebné látky není možné efektivně separovat jednou analytickou metodou a proto byly využívány tři izokratické metody shrnuté v tabulce č. 5, str. 34. V řádku použití je napsáno v jakém případě (analýze) byla metoda využívána.

Orientačním nástřikem bylo vždy standardizováno množství separované směsi tak, aby bylo dosaženo odpovídající odpovědi detektoru, maximalizace separační schopnosti a hlavně standardizace umožňující kvantifikaci vzorků. Odpovídající nástřik se pohyboval v rozmezí 0,3 μ l až 10 μ l vzorku získaného dle 4.2.1.1. Vzorek s výchozí látkou biotransformace extrahovaný dle stejného protokolu byl použit po provedení separace danou metodou jako základní linie z důvodu odstranění vlivu kontaminací přítomných v dané chemikálii (chromatografický vrchol dané látky byl proložen nulovou linií). Ze stejného důvodu byla k základní linii přidána hodnota získaná stejným postupem z buněk v pufru bez výchozí látky. Obě základní linie byly proměřeny třikrát, zprůměrovány a výsledná základní linie byla pomocí HPLC ovládacího programu LC Solutions (Shimadzu) odečítána od analyzovaných vzorků.

Tabulka č. 5 - Používané HPLC metody.

	Metoda A)	Metoda B)	Metoda C)
Analyzované látky	Kodein, Morfin, 14OH-morfinon, 14OH-kodeinon, 14OH-dihydrokodeinon	Kodein a kodeinon	Dihydromorfin , Morfin, 14OH-morfinon, 14OH-dihydrokodein, 14OH-kodein, Kodein, Dihydrokodein
Kolona	Phenyl-hexyl 0,46 x 25 cm	C 18	C 18
Eluce	13% AcN, 86,9% mQ H ₂ O, 0,1% TFA	40% AcN, 59,9% mQ H ₂ O, 0,1% TFA	22% AcN, 77,4% mQ H ₂ O, 0,2% TFA, 0,4 NH ₄ OH
Použití	Analytická metoda pro stanovení vzorků obsahujících silně nepolární látky morfinové řady	Rychlá metoda pro stanovení morfin 6-dehydrogenázové aktivity	Analytická metoda s nejvyšší separační schopností pro vzorky neobsahující silně nepolární látky morfinové řady

4.2.1.3 Chromatografie na tenké vrstvě TLC

Chromatografie na tenké vrstvě se specifickou detekcí byla použita k rychlému kvalitativnímu vyhodnocení analyzované směsi. U výsledků, kde v důsledku špatné separace HPLC panovala nejednoznačnost přiřazení vrcholu k danému standardu sloužilo TLC se specifickou detekcí ke kvalitativnímu stanovení sporných látek.

TLC destička (Merck) byla před použitím opláchnuta vyvíjením v methanolu. Po opětovném vysušení byly nanесeny na základní linii kapilárou (Pyrex 1-5 Micro) vzorky. Nanášený objem byl 5 µl pro koncentrace kolem 1 mM, 20 µl pro nižší koncentrace kolem 0,1 mM. Vzorky byly vyvíjeny ve skleněné vyvíjecí vaně se zábrusovým víkem tak, aby nedocházelo k nadměrnému odparu vyvíjecího rozpouštědla. Jakmile čelo vyvíjecího roztoku dorazilo cca 1 cm od konce destičky, bylo vyvíjení ukončeno. Po vysušení byla TLC destička vyvíjena pokrytím slabou vrstvou reagens pomocí skleněného rozprašovače. Vyvíjení bylo provedeno horkovzdušnou pistolí (PNG 600-3) při teplotě 120 – 140 °C.

Mobilní fáze: 90 : 10 : 1 (v/v) chloroform : methanol : NH₄OH

Vyvíjecí roztok - upravené Marquisovo reagens, někdy také jako Anisaldehydové barvení⁷⁴: 90 : 10 : 1 (v/v) metanol : H₂SO₄ konc. : anisaldehyd

Vzorky byly analyzovány podle svého retenčního faktoru R_f, vypočteného dle rovnice (1) na straně 35, kde I_s = vzdálenost skvrny od počátku migrace a I_r = vzdálenost čela mobilní

fáze od počátku. Specifická barva i pořadí analytů zůstávají zachovány i při odchylce R_f způsobené evaporací vysoce těkavé složky mobilní fáze (chloroform).

$$R_f = \frac{l_s}{l_r} \quad (1)$$

4.2.1.4 Cytosolární extrakt z buněk *Rhizobium radiobacter* R89 a *Escherichia coli*

Pro cílené sledování biotransformačních reakcí (*Rhizobium radiobacter* R89) a purifikace proteinů (*Escherichia coli*) bylo nutné nejprve získat kvalitní cytosolární preparát s minimem nečistot a s co nejvyšší zachovanou enzymovou aktivitou.

Zmražené buňky [-20 °C] bez kultivačního média oddělené centrifugací [10 min, 1000 g], kultivované v míchaném bioreaktoru dle ²⁹ byly zváženy na předvážkách a rozpuštěny v rozbíjecím pufru (50 mM Na₂HPO₄, 1 µg lysozym, 0,5 mM FMN; pH upraveno kys. fosforečnou na 8,0; do každých 10 ml pufru byla přidána 1 tableta Complete inhibitoru proteas (Roche) tak, aby výsledná koncentrace buněčné suspenze byla 10% w/v. Buněčná suspenze byla vortexována (3krát 20s) a následně inkubována v 28 °C po dobu 15 minut (horizontální třepačka Lab Shaker, 200 cm⁻¹).

Do 1,5 ml mikrozkušavek Eppendorf bylo odměřeno přibližně 300µl balotin (0,2 – 0,4 µm). Mikrozkušavka byla vychlazená na ledu a poté byl do každé pipetován 1 ml 10% buněčné suspenze. Samotné rozbíjení probíhalo mechanicky, třepáním dvakrát 30 minut při -20 °C (stolní třepačka IKA Voretex Genius 3, 2000 cm⁻¹). Mezi rozbíjecími intervaly byly mikrozkušavky inkubovány na 30 minut na ledu.

Po ukončení rozbíjení byly mikrozkušavky centrifugovány (Eppendorf Centrifuge 5403, 1000 g, 4 °C, 10 min). Pipetou byl opatrně odebrán supernatant do sterilní 50 ml plastové centrifugační zkumavky s víčkem. Celý výsledný objem byl následně opět centrifugován (1000 g, 4 °C, 10 min) pro odstranění hrubých nečistot. Výsledný supernatant byl převeden do centrifugačních kyvet, přesně vyvážen, a závěrečně centrifugován (J-30I, 80 000g, 60 min., 2 – 8 °C). Získaná cytosolární frakce byla na závěr štěpena 1 µl/ 50 ml **Benzonase®Nuclease** (250 U/µl, Sigma, inkubace 10 minut na ledu) s následnou dvojnásobnou filtrací 0,45 µm a 0,22 µm (Hahnemühle). V případě nutnosti byl získaný extrakt uchováván při -80 °C.

Sedimentovaný pelet – membránová frakce byl mechanicky resuspendován v pufru 50 mM Na₂PO₄, pH 8,0. Pro nanášení na SDS PAGE byla přidána močovina na konečnou koncentraci 8 M.

Cytosolární extrakt z *Escherichia coli*

U buněk *Escherichia coli* různých kmenů s exprimovaným proteinem (získány dle kapitoly 4.2.3.2 Expresse studovaných proteinů) byla cytosolární frakce získávána z 10% buněčné suspenze v pufru (50mM Na₂HPO₄, 0,5mM FMN; pH upraveno kys. fosforečnou na 8,0) pomocí ultrazvuku-sonikací (Sonicator 3000; amplituda 2,5; průměrný výkon 14 W na 5 ml vzorek; teplota 0 °C). Použit byl program střídající 20s sonikace a 40s pauzy v souhrnné době sonikace 5 minut (15 minut celkem). Následně byla rozbitá směs ošetřena přidavkem 1μl/5ml *Benzonase*[®]**Nuclease** (250 U/μl, Sigma, inkubace 10 minut na ledu) a centrifugována (J-30I, 30 000 g, 30 min., 2 – 8 °C). Vzorek již nebyl filtrován a nebyl uchováván (uchovávány byly vždy pouze celé buňky či přečištěné frakce). Sedimentovaný pelet po centrifugaci byl v některých případech frakcí obsahující inkluzní tělíška. Tato frakce byla smíchána s 5 ml 50 mM Na₂PO₄, 8M močovina, pH 8,0 a pro další aplikace mechanicky resuspendována (SDS PAGE).

4.2.1.5 Niklová chelatační chromatografie (NiNTA)

Tento typ afinitní purifikace byl použit pro protein heterologně exprimovaný v *E.coli* pomocí pET expresního systému opatřený N terminální hexahistidinovou sekvencí, tzv. His kotvou (z angl. "His Tag", celá sekvence GSSHHHHHSSGLVPRGSH).

Používané pufr:

Pufr A: 50 mM Na₂HPO₄; 100 mM NaCl; pH 8,0

Promývací pufr: 50 mM Na₂HPO₄; 100 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 8,0

Eluční pufr: 50 mM Na₂HPO₄; 100 mM NaCl; 150 mM Imidazol; pH 8,0

Jako matrice byla využita: "Ni-NTA Agarose" (Invitrogen) o celkovém objemu 5 ml. Chromatografie byla prováděna ručním nanášením roztoků pipetou a vzorku na kolonku v (Econo-Pac Chromatography Columns, Bio-Rad). Kolonka byla nejprve ekvilibrována pufr A odpovídající 10 objemům kolony. Poté byla kolonkou třikrát promyta cytosolární frakce získaná z produkčních buněk. Následně byla kolonka promyta 3 objemy kolony

pufrem A k odmytí nevázané frakce. Proteiny slabě interagující s matricí byly odstraněny elucí promývacím pufrem, 5 – 6 objemy kolony tak, aby již nedocházelo k eluci proteinů. Kontrola eluce proteinů byla prováděna orientačně v 96-jamkové destičce metodou dle Bradfordové (20 µl vzorku bylo smícháno s 100 µl činidla)⁷⁵. Zbytek proteinů byl uvolněn elučním pufrem v objemu 5 CV (objem kolony, angl. "Column volume").

4.2.1.6 Gelová permeační chromatografie

Druhým chromatografickým krokem používaným po niklové chelatační chromatografii, aby byla zajištěna dostatečná čistota získaného proteinu, byla gelová permeační chromatografie.

Nejprve byly připraveny používané roztoky filtrací a odvzdušněním (Membránová vývěva: N810; 0,45 µm Glass Microfibre Filter 0,45µm; Hahnemühle). Používán byl základní pufr: 50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl; pH upraveno kys. fosforečnou na 8,0.

Vlastní chromatografie byla prováděna na chlazené (7 °C) soustavě **ÄKTA Purifier** (GE Healthcare, USA) FPLC (z angl. "Fast protein liquid chromatography"). Před použitím byla celá soustava promyta do konstantní odpovědi spektrofotometrického a konduktivního detektoru (cca 30 – 60 minut). Dle objemu a velikosti proteinu ve vzorku byla vybrána kolona (Superdex 75 5/150; Superdex 75 16/60). První zmíněná kolona sloužila k analýze čistoty používaného materiálu, druhá zmíněná k purifikaci. Nanášený objem na analytickou kolonku: 20 µl a na purifikační: 5 ml. V případě většího objemu vzorku byl nejprve zakoncentrován: Vivaspin MWCO 10 000 (Sartorius, 8000 g, 15 min.) a následně nanášen.

Po ukončení chromatografie byla kolona převedena do 30% etanolu a tak uchovávána.

4.2.1.7 Afinitní chromatografie NGTNR interagujících proteinů

Pomocí afinitní kotvy pro niklovou chelatační chromatografii je možné navázat protein na kolonu tak pevně, že je možné studovat jeho interakce s dalšími proteiny. Tato chromatografie byla použita u proteinu NGTNR pro nalezení případného reakčního partnera.

Chromatografie proběhla dle protokolu Boechmera a Lehmana⁷⁶. Na malý objem nosiče - NiNTA agarosy (0,5 ml) bylo nanášeno takové množství NGTNR proteinu, že byl již přítomen v průchozí frakci (cca 20 mg; vazba 50 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaCl, 20 mM imidazol). S takto připravenou matricí byl inkubován cytosolární extrakt R89 po dobu 30

minut (4°C) a následně byla nevázaná frakce odmyta 5 ml vazebného pufru. Vázané proteiny byly z kolony eluovány v pufru: 50 mM Na₂HPO₄ s přidavkem 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 mM NaCl. V posledním kroku byla zmíněným pufrům s 1 M NaCl a 150 mM imidazolem eluována veškerá zbylá frakce včetně NGTNr.

4.2.2 Elektroforetické metody

Elektroforetické metody byly využívány pro rychlou separaci proteinů nebo fragmentů DNA a jejich snadnou vizualizaci.

4.2.2.1 Agarosová elektroforéza

Horizontální agarosová elektroforéza byla využita k separaci DNA fragmentů po restričních štěpení, či k zobrazení výsledků PCR reakcí. Používány byly dvě rozdílné metody.

První, určená pro velké fragmenty nad 2,5 kbp, byla založena na TAE pufru (40 mM Tris-acetát, 2 mM EDTA, pH 8,0). Separace probíhala v 0,7% agarose, při 80 V cca 30 – 45 minut.

Fragmenty s velikostí pod 2,5 kbp byly děleny metodou dle Jonathana R. Brodyho a kol.^{77,78}. Separace probíhala v 1,5% agarose v SB pufru (10mM boritan sodný, pH 8,0), při 200 – 250 V cca 5 – 10 minut.

Nejprve bylo odměřeno 50 ml použitého pufru a požadované množství agarosy. Získaná suspenze byla zahřáta v mikrovlnné troubě k varu (900 W, 2 – 3 min). Následně byla ponechána chladnout při pokojové teplotě na teplotu cca 50 °C, kdy bylo přidáno 5 µl ethidium bromidu (nebo Gel RED, Biotinum). Směs byla poté nalita do sestavené soupravy na nalévání gelů a po zatuhnutí byl odstraněn hřebínek a gel byl přenesen do elektroforetické vany (systém Bio-Rad DNA Horizontal Electrophoresis System).

Jednotlivé vzorky byly smíchány s 1/6 objemu 6×DNA Gel Loading Buffer (Thermo) a přímo nanášeny do vzorkových komůrek vytvořených vyndáním hřebínku. Jako standard velikostí byl používán Gene Ruler DNA Ladder Mix v objemu 5 µl.

4.2.2.2 SDS-PAGE elektroforéza

Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) byla používána pro separaci a vizualizaci proteinových směsí.

Elektroforéza byla prováděna ve standardním Tris-glycinovém uspořádání dle Laemmliho ⁷⁹. Používaly byly 10% a 12,5% polyakrylamidové gely. Elektroforéza byla prováděna na soupravě Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell (Bio-Rad) při 80 – 150 V, 60 – 120 min. Po doražení čela separace ke konci gelu byla elektroforéza ukončena a gely byly obarveny dle standardního protokolu pomocí Comassie Brilliant Blue R-250 ⁸⁰.

SDS-PAGE vzorky byly smíchány s redukujícím či neredukujícím nanášecím pufrem a po inkubaci (10 min, 95 °C, 17600 Dri-Bath) nanášeny na gel pomocí mikrostříkačky Hamilton. Jako standardy molekulové velikosti proteinů byly využívány komerčně dostupné směsi: NEB Protein Ladder (NEB), Dual Color Precision Plus Protein Standards a Dual Xtra Standards (Bio-Rad)

Neredukující vzorkový pufr: 30% (w/v) glycerol, 2% SDS, 62.5 mM Tris (pH 6.8), 5 mM EDTA, 0.01% bromfenolová modř (w/v);

Redukující vzorkový pufr: 30% (w/v) glycerol, 2% SDS, 62.5 mM Tris (pH 6.8), 10 mM DTT (nebo 20mM β-merkaptóetanol), 5 mM EDTA, 0.01% bromfenolová modř (w/v)

Acetonová precipitace proteinů

Proteinové vzorky, jejichž koncentrace byla příliš nízká, byly precipitovány přidavkem čtyřnásobného objemu acetonu a inkubovány 20 minut při –20 °C. Centrifugací (Microfuge[®] 18, 18000 g, 10 min) byl oddělen supernatant, který byl poté odsát pomocí pipety. Následně byly vzorky vysušeny v evakuovaném exsikátoru (olejová vývěva 3AAC83-4L). Opětovným resuspendováním precipitátu v požadovaném pufru byl připraven vzorek. Nejčastěji 10krát koncentrovaný.

Barvení stříbrem

Při nízké koncentraci proteinů bylo využíváno barvení stříbrem. Všechny používané roztoky byly připravovány z ultračisté vody (mQ H₂O). S gelem bylo manipulováno a nakládáno pouze ve skleněném nádobí. Nejprve bylo z gelu odstraněno zbytkové SDS trojnásobným promytím ve fixačním roztoku (30 % EtOH; 10 % kyselina octová; 30 minut). Gel byl dále promýván 20% ethanolem (10 min) a mQ H₂O (10 minut). Následně byla provedena senzitivizace proteinů opláchnutím roztokem thiosíranu sodného (0,2 g/l; 2 × 20 s). Takto upravený gel byl na 30 minut ponořen do roztoku dusičnanu stříbrného (2 g/l). Po uplynutí této doby byl gel rychle opláchnut (5 – 10 s; mQ H₂O) a vyvíjen roztokem (0,7 ml

formaldehydu 37%; 30 g K₂CO₃; 10 mg Na₂S₂O₃ na jeden litr roztoku) až do požadovaného zbarvení. Barvení bylo ukončeno přendáním gelu do fixačního roztoku.

4.2.2.3 Western blot

Pro identifikaci proteinového pruhu NGTNR na SDS-PAGE gelu (monomer/dimer) byla použita metoda přenosu proteinů z gelu na nitrocelulosovou membránu "Western blot" s imunodetekcí proti histidinové kotvě.

Standardní Tris-Glycinový 12% SDS PAGE gel byl po ukončení elektroforézy opláchnut destilovanou H₂O (2×10s) a společně s předem připravenou soupravou membrány a filtračního papíru přenesen podle protokolu "Trans-Blot Turbo Transfer System" do transferové komory zařízení Trans-Blot Turbo a přenášen na membránu 7 minut. Po ukončení přenosu proteinů byla membrána vyjmuta, opláchnuta destilovanou H₂O (2×10s) a blokována po dobu 1 h při laboratorní teplotě (roztok na blokaci – 10mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 5% odtučněné mléko). Po inkubaci byla membrána 5 krát opláchnuta fosfátovým pufrům a hodinu inkubována v roztoku na blokaci s protilátkou při laboratorní teplotě. Po vazbě protilátky byla membrána opět opláchnuta fosfátovým pufrům, vysušena pomocí filtračního papíru a vyvolána přidáním 1 ml chemiluminiscenčního substrátu (Lumia Forte Western HRP Substrate). Záznam chemiluminiscence byl pořízen pomocí iluminátoru ImageQuant LAS 4000.

4.2.3 Molekulárně biologické metody

Pro nalezení genů odpovědných za studované aktivity v *R. radiobacter* R89 a přípravu vektorů expresních systémů byly využívány metody molekulární biologie.

4.2.3.1 PCR metody

Standardní PCR reakce

PCR – polymerázová řetězová reakce (z angl. "polymerase chain reaction").

Standardní PCR reakční směs byla za sterilních podmínek inkubována v tenčených 0,5 ml mikrozkuvkách 10 minut na ledu a pak přenesena do PCR aparatury (cycleru). Složení používaných směsí je zobrazeno v tabulce č. 6, str. 41. Teplota nasedání primerů byla

určována pro každý pár zvlášť pomocí webového nástroje "Tm Calculator" na stránkách firmy New England Biolabs (<https://www.neb.com>).

Tabulka č. 6 - Standardní PCR protokoly

Složka	Protokol Taq 15µl	Průběh	Protokol Phusion 50 µl	Průběh
H ₂ O (pro PCR)	8,93 µl	1) 95°C; 3 min	13,5 µl	1) 98°C; 30 s
10×Thermo pufr	1,5 µl	2) 95°C; 10 s	5×Phusion pufr; 10 µl	2) 98°C; 10 s
2mM dNTPs	1,5 µl	3) x°C; 30 s	5 µl	3) x°C; 30 s
Primer FW	1,5 µl	4) 72°C; 90 s	2,5 µl	4) 72°C; 30 s
Primer BW	1,5 µl	5) 72°C; 10 min	2,5 µl	5) 72°C; 10 min
Polymeráza	0,08 µl	6) 4°C;	0,5 µl	6) 4°C;
Aditiva	-	Krok 2-4: 35×	10 µl 40% glycerol	Krok 2-4: 35×
Templát	1 µl		1 µl	

Protokol Taq 15µl - optimalizace a Colony PCR. Protokol Phusion - maximalizace množství PCR produktu.

PCR s degenerovanými primery

Polymerázová řetězová reakce s degenerovanými primery byla prováděna jako tzv. "špinavá PCR". Jednotlivé směsi nebyly připravovány na ledu. Výchozím templátem byl varný lyzát (10 min var 5% buněčné suspenze v destilované vodě [dH₂O]). Teplota nasedání primerů byla vždy volena nejnižší možná (dle protokolu výrobce). Pro PCR s degenerovanými primery byla využita vždy metoda využívající Taq polymerázu z důvodu získání 3'A přesahů. Používaná koncentrace primerů byla zvýšena na 4 µM. Pomocí agarosové elektroforézy byly hledány odpovídající fragmenty. Získané fragmenty byly přečištěny pomocí soupravy "Gel Extraction Kit" (Qiagen) a následně ligovány do vektoru pGEM®-T Easy (Promega). Vybrané kolonie byly předány servisnímu pracovišti k provedení sekvenace vloženého fragmentu.

Colony PCR

Pro verifikaci správné ligace byla prováděna tzv. PCR colony. Výchozím templátem pro tuto polymerázovou řetězovou reakci byly celé kolonie. Tyto kolonie byly sterilní špičkou odebrány z misky přímo do mikrozkušavky s namíchanou PCR směsí. Využíván byl protokol Taq 15 µl, uvedený v tabulce č. 6.

Inverzní PCR

Inverzní PCR byla prováděna s použitím standardního Phusion 50 µl protokolu (teplota nasedání primerů 70°C). Templát pro tuto PCR byl připraven restriční štěpením (viz 4.2.3.2) chromosomální DNA *Rhizobium radiobacter* R89 (získán pomocí High pure PCR Template Preparation Kit, Roche; dle protokolu výrobce) pomocí restričních endonukleáz

MseI, *Bfal*, *EcoRI*, *SphI*, *BstBI*. Ligace byla provedena odlišně od standardního protokolu s nízkou koncentrací štěpené DNA (1 ng/μl) a vysokou koncentrací ligázy (0,1 Weisovy jednotky / 1μl) pomocí PCR cycleru. Bylo použito celkem 6 teplotních cyklů: 50 minut 16 °C, 3 min 20 °C, 5 min 24 °C, 1 min 37 °C. Po konci ligačního protokolu byla ligáza teplotně inaktivována (10 minut při 65 °C) a DNA byla purifikována použitím kolonky ze soupravy Gel Extraction Kit (Qiagen) dle protokolu výrobce.

4.2.3.2 Restrikční štěpení a ligace

Restrikční štěpení

Všechna restrikční štěpení byla prováděna v celkovém objemu 50 μl v mikrozkušavce Eppendorf (1 či 1,5 ml). Složení štěpící směsi bylo: plasmid/PCR produkt 42,5 μl; adekvátní pufr k restrikční endonukleáze (RE) 5μl; BSA 0,5 μl (pouze při použití RE od NEB); 1 μl RE (většinou 2RE najednou tj. 1+1 μl). Délka restrikčního štěpení byla většinou 2 hodiny při 37 °C či přes noc při pokojové teplotě. Pro ověření absence tzv. hvězdičkové aktivity (z angl.: "star activity") byla využívána tabulka na webu Thermo Scientific:

(<http://www.thermoscientificbio.com/restriction-and-modifying-enzymes/restriction-enzymes/reaction-conditions-for-fastdigest-enzymes-chart/>).

Ligace

Ligace fragmentů byla prováděna vždy paralelně s negativní kontrolou (směs bez ligázy). Směs obsahovala vždy 16,5 μl sterilní dH₂O, T4 DNA pufr 3 μl, štěpený vektor 2 μl, štěpený inzert (PCR produkt) 8 μl, T4 DNA ligase 0,5 μl. Délka ligace byla nastavována dle požadované efektivity. Nejkratší ligace probíhala 2 h při pokojové teplotě, standardně bylo ligováno při pokojové teplotě přes noc.

4.2.3.3 Příprava a transformace kompetentních buněk

Příprava

Používány byly tyto publikované metody: pro přípravu kompetentních buněk ⁸¹ a transformaci ^{82, 83}. Příprava kompetentních buněk byla provedena v 50 ml media (LB + 10mM MgSO₄; 0,2% glukosa), které bylo inokulováno 1 ml noční kultury buněk v LB. Buňky byly pěstovány do OD₆₀₀ = 0,6 při 30 °C. Narostlé buňky byly zchlazeny na ledu po 10 minut a centrifugovány (Allegra X-22R, 8000g, 10 min, 4°C). Centrifugované buňky byly rozpuštěny v 0,5 ml původního média a bylo k nim přidáno 2,5 ml media LB

s 36% glycerolem, 12% PEG 8000, 12mM MgSO₄. Připravená buněčná suspenze byla rozdělena do mikrozkuvek a zamražena při -80 °C.

Transformace

Po vyjmutí buněk z mrazáku -80 °C k nim bylo pipetováno 10 µl ligační směsi (na 100 µl buněk) nebo 1 – 2 µl izolované plasmidové DNA a byly umístěny po dobu 30 minut na led. Po této době byly mikrozkuvky umístěny na 60 s do vyhřívaného bloku (42 °C, 17600 Dri-Bath, 17600 Dri-Bath). Po uplynutí 60 s byly mikrozkuvky s buňkami 5 minut inkubovány na ledu a následně k nim bylo pipetováno 1 ml LB media. Obsah mikrozkuvek byl promíchán obrácením a dále inkubován 60 minut při 37 °C. Po této době byly buňky centrifugovány (Microfuge, 18 000 g, 3 min), medium bylo opatrně odebráno a ve zbylých cca 200 µl byl resuspendován pelet. Získaná suspenze byla vyseta na misky (LB agar s příslušným antibiotikem).

4.2.3.4 Další standardní metody rekombinantní DNA

Izolace plasmidu byla provedena přesně podle protokolu výrobce k soupravě QIAprep® Spin Mini Prep Kit (Quiagen). Buňky Escherichia coli TOP10 (nebo XL-1) byly kultivovány 8 hodin při 37 °C nebo přes noc (12 – 16 h, 30 °C). Plasmidová DNA byla eluována 50 µl sterilní dH₂O.

Izolace z gelu byla provedena pomocí soupravy QIAquick® Gel Extraction Kit dle protokolu výrobce (Quiagen).

Sekvenování vybraných kolonií či plasmidů bylo provedeno komerčně v Centru sekvenování, MBÚ AV ČR. Procedura se uskutečňovala na přístroji BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) a byla vyhodnocena pomocí ABI PRISM 3130x1.

4.2.4 Spektrofotometrické metody

Spektrofotometrické metody byly využívány ke stanovení koncentrace proteinů ve vzorku a u purifikovaných proteinů ke stanovení enzymové aktivity.

4.2.4.1 Stanovení proteinů

Stanovení proteinů bylo prováděno kvůli standardizaci množství proteinů v cytosolárním extraktu a následné kvantifikaci biotransformace.

Ke stanovení byl použit BCA Protein Assay Kit (Pierce) dle protokolu výrobce s ředěním vzorků tak, aby poskytly hodnoty v koncentračním rozmezí kalibrační křivky. Jako standard koncentrace proteinů byl použit hovězí sérový albumin (BSA z angl."bovine serum albumin") v již předpřipravených koncentracích – BSA Protein Assay Standards (Pierce). Kalibrační závislost, která byla použita, měla hodnotu $c = 0,1573 A^2 + 0.5921A$.

Orientační stanovení proteinů bylo prováděno pomocí protokolu dle Bradfordové – viz kapitola 4.2.1.5, str. 36.

U purifikovaných proteinů byla koncentrace stanovována pomocí měření A_{280} při současném ředění tak, aby se A_{280} pohybovalo v rozmezí 0,2 až 1,0. K výpočtu koncentrace byl následně použit vypočtený extinkční koeficient: databáze ExpASY, nástroj: "Proteomics – ProtParam" (<http://web.expasy.org/protparam/>).

4.2.4.2 Stanovení kinetických parametrů

Stanovení kinetických parametrů bylo provedeno spektrofotometricky měřením absorbance při 340 nm (A_{340} odpovídající NADH či NADPH) v čase na spektrofotometru (UV 2401, Shimadzu) chlazeném vodou z termostatované vodní lázně (ThermoBath).

Stanovení kinetických konstant bylo provedeno měřením reakční rychlosti při rozdílných koncentracích NADH (0,3 – 0,015 mM) a kodeinonu (0,3 – 1 mM) při 20°C. pH závislost byla charakterizována s pomocí setu fosfáto/citrátového pufru (50 mM Na_2HPO_4 150 mM NaCl, pH upraveno citrátem) o těchto hodnotách pH 10,3; 9,5; 9,0; 8,5; 8,1; 7,6; 7,0; 6,5; 5,8; 4,8. Závislost aktivity na teplotě byla stanovena změnou teploty chlazené vody na danou hodnotu. Enzym byl při této teplotě inkubován cca 1-3 minuty a následně byla změřena odpovídající aktivita. Pro teploty 20 – 23 °C byla změřena aktivita také po 30 minutové inkubaci při dané teplotě.

Výpočet kinetických parametrů NGTNR se držel metody použité pro morfinon reduktázu *P. putida* M10. Pro výpočet byly hodnoty počítány při saturaci druhým substrátem (1,5 mM kodein či 0,3 mM NADH), pomocí Lineweaverovo-Burkova výnosu⁸⁴.

4.2.4.3 DLS stanovení termostability

Fotonová korelační spektroskopie (DLS, z angl."Dynamic Light Scattering") byla použita pro měření stability získaných proteinů.

Měření bylo provedeno na přístroji Zetasizer Nano Range ZS 90 (Malvern). Data byla získávána po dobu 24 h při 5 °C; 24 h při 25 °C. Teplota koagulace NGTnr proteinu byla měřena v rozsahu 5 – 40 °C s krokem o 1 °C a 10 min inkubací při dané teplotě. Měření bylo prováděno za asistence Tatsiany Charnavets, Ph.D. (Laboratoř Biomolekulárního rozpoznávání, BTÚ, lab. 57).

4.2.4.4 Termofluorimetrie

Termofluorimetrie byla využita pro optimalizaci pufrů, pH, iontové síly a podmínek pro uchovávání získaných preparátů NGTnr s důrazem na možné využití získaných poznatků při krystalizaci proteinu.

K měření byla využita metodika publikovaná Erickssonovou a kol.⁸⁵. K měření byl využit PCR cycler pro měření v reálném čase (CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad). Před vlastním měřením byla nejprve vytvořena koncentrační škála (kalibrace) proteinu ve standardním pufru k nalezení optimálního průběhu křivek při dané koncentraci barvy (SYPRO® Orange) tak, aby byly výsledky porovnatelné. Následně již byly do proužků s uzavíratelnými jamkami (z angl."strips", Flat Cap strips, Bio-Rad) pipetovány vždy dvě rozdílné koncentrace proteinu (6,25 µl NGTnr o koncentraci 1,2 µg/ml a 17,75 µl daného pufru či 3,13 µl proteinu a 20,87 µl pufru). Tyto dvě koncentrace proteinu byly shledány jako optimální. Do připraveného roztoku byl pipetován 1 µl zásobního roztoku SYPRO® Orange (Sigma) získaného 25× ředěním původní koncentrace.

Samotné měření probíhalo od teploty 4°C do 80°C po 0,5°C krocích. V dané teplotě byl vzorek inkubován 30 s a následně byla změřena jeho fluorescence v režimu FRET. Vyhodnocení získaných dat bylo provedeno na programu Bio-Rad CFX Manager 3.0 a následně v programu Microsoft Excel.

Pro některé vzorky byla použita metoda ThermoFAD⁸⁶. Jako fluorescenční sonda byl využit enzymem nekovalentně vázaný FMN. Příprava vzorku byla totožná, 1 µl roztoku fluoroforu byl nahrazen puftrem.

4.2.5 Kultivační metody

Použití a optimalizace kultivačních metod byly nutné k charakterizaci a zajištění stejné fyziologické kvality preparátů z *R. radiobacter* R89. Následně pak k dosažení co nejlepších výsledků s použitými expresními systémy *E.coli*.

4.2.5.1 Kultivace mikroorganismů

Kultivovány byly mikroorganismy *R. radiobacter* R89 a různé kmeny *Escherichia coli*. Vzhledem k rozdílné fyziologii těchto organismů se kultivační podmínky zvláště pro zmíněné *Rhizobium* lišily.

Jako optimální pro kultivaci *Rhizobium radiobacter* R89 bylo zvoleno Luria-Bertani (LB) medium obohacené o stopové prvky a glukosu²⁹. Medium obsahovalo: 1 % trypton, 0,5 % kvasinkový extrakt, 1 % NaCl, 200 mg/l MgSO₄, 50 mg/l CaCl₂, 10 mg/l FeSO₄, glukosa 0,5%; pH upraveno na 7,0²⁹. Buňky rostli ve 100 ml média (v 500ml Erlenmayerově baňce, třepání 200 ot./min, 28°C) a OD₆₀₀ dosáhla po 48 h růstu hodnoty 8 (změřeno při desetinásobném zředění buněčné suspenze).

Při experimentech s konverzí a hledáním produktů biotransformace bylo zmíněné médium ještě obohaceno o 0,2 g/l kodeinu. Kultivace *R. radiobacter* R89 byly prováděny ve 30 °C do pozdní stacionární fáze (48 h). Získaná buněčná kultura byla centrifugována (5000 g, 15 min, 4 °C) a získané buňky následně zamraženy při -20°C.

Všechny používané kmeny *Escherichia coli* byly kultivovány obdobně na samotném LB mediu (Sigma), které bylo obohaceno o kanamycin (60μg/l). Kultivační teplota se odvíjela od použitého expresního protokolu (viz níže). Třepané kultivace probíhaly kultivační lahve (DURAN Schott) s uzávěrem, v nichž médium tvořilo 1/5 objemu.

4.2.5.2 Expese studovaných proteinů

Pro získání rozpustné a aktivní formy studovaných proteinů byl proveden rozsáhlý test expresních protokolů. Jejich přehled shrnuje tabulka č. 7 na straně 47: Expese probíhala v třepaných baňkových kulturách (200 ot./min) o objemu 50, 200 nebo 1000 ml LB media (objem media byl vždy 1/5 objemu kultivační Erlenmayerovy baňky).

Tabulka č. 7 - Testované protokoly pro heterologní expresi

Hostitelský kmen (Protein NGTN)	Růst bez indukce	Koncentrace induktoru	Teplota po indukci	Kultivační doba po indukci
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	30°C; OD ₆₀₀ = 0,4-0,6	0,1 mM IPTG; 1 mM IPTG	30°C; 20°C; 16°C	30°C - 4h; 20°C a 16°C 20 h
<i>Escherichia coli</i> ArcticExpress	30°C; OD ₆₀₀ = 0,8-1,0	0,1 mM IPTG; 1 mM IPTG	10°C	24 h
<i>Escherichia coli</i> SHuffle®	30°C; OD ₆₀₀ = 0,4-0,6	1 mM IPTG	16°C	24 h
(Protein scMDH)				
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	30°C; OD ₆₀₀ = 0,4-0,6	1 mM IPTG	30°C; 16°C	30°C - 4 h; 16°C 20 h
<i>Escherichia coli</i> ArcticExpress	30°C; OD ₆₀₀ = 0,8-1,0	1 mM IPTG	10°C	24 h

Pro snížení požadavků na nízkou teplotu exprese proteinu NGTN byl testován vliv chaperonů pomocí soupravy TAKARA Chaperone Plasmid Set. Využity byly všechny dostupné plasmidy (pG-KJE8; pGro7; pKJE7; pG-Tf2; pTf16) v kombinaci s buňkami *Escherichia coli* BL21(DE3) při 28 °C a 26 °C.

4.2.6 Biotransformace alkaloidů

Studium biokonverze alkaloidů morfinové řady celými buňkami nebo cytosolárním extraktem *R. radiobacter* R89 sloužilo k charakterizaci příslušných reakčních kroků a definování s nimi souvisejících enzymů.

Konverze byla prováděna s 10% buněčnou suspenzí (vlhká hmotnost), získanou z rozmražené biomasy resuspendované ve fyziologickém roztoku. Reakční objem byl volen 50 ml (250 ml Erlenmayerova baňka) či 2ml v jedné jamce 12-ti jamkové sterilní destičky. Měření OD₆₀₀ bylo zjištěno, že koncentrace buněk v 10% suspenzi dále nevzrůstá.

Biotransformace probíhala standardně 24 h a poté byla směs extrahována způsobem popsáním v kap. 4.2.1.1. Při stanovování konverzí v cytosolárním extraktu byl využíván systém regenerace redukované formy kofaktoru NADH a NADPH, které se spontánně autooxiduje. Systém byl založen na aktivitě enzymu Glukosaoxidas (EC 1.1.3.4, Sigma) v koncentraci cca 10 U/ml a 5 mM glukosy v reakční směsi (cytosolární frakci).

4.2.7 Krystalizace proteinu NGTNr.

Pro přesné determinování struktury a porovnání aktivního místa s již známými strukturami OYE enzymů, které by potvrdilo rozdílnost struktury a vysvětlilo by odlišné

substrátové spektrum od dosud známých GTN reduktáz, bylo přistoupeno ke krystalizačním pokusům.

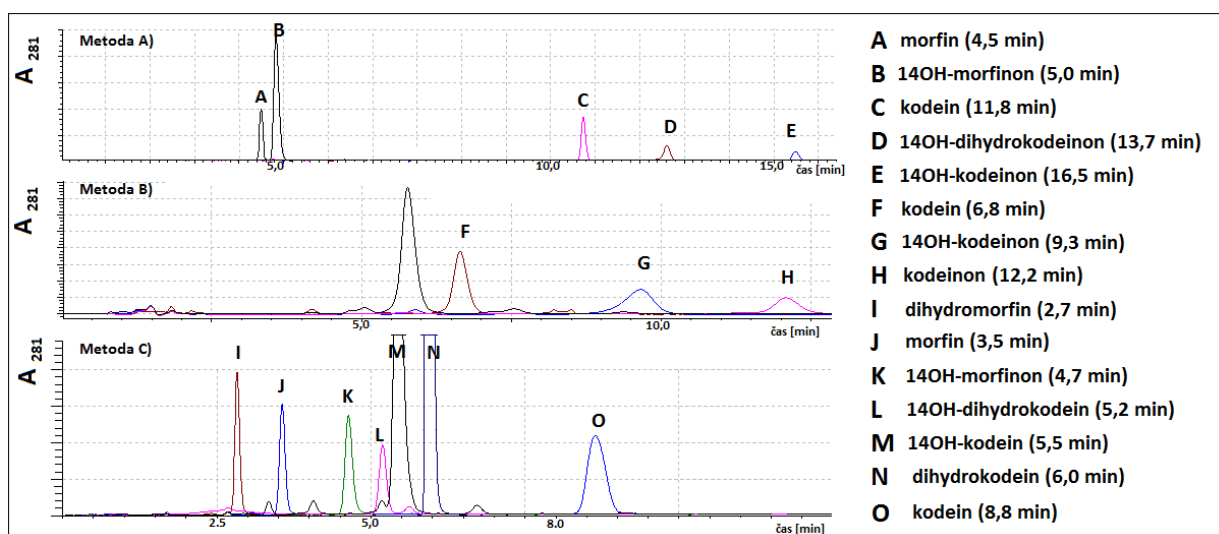
NGTNR. protein byl purifikován standardním protokolem NiNTA chromatografií a následně gelovou chromatografií. Takto získaný přečištěný protein byl koncentrován pomocí centrifugační kolonky (VivaSpin MWCO 10 000, 15 minut, 8000 g) až na koncentraci 16,6 mg/ml. Takto koncentrovaný protein byl s pomocí automatického pipetovacího robota (Art Robins Instruments) přenesen do jednotlivých pozic na 3×96 jamkové krystalizační destičce (Inteli-PLATE® 96) a to v množství vždy 0,2; 0,4; 0,6 µl proteinového roztoku + 0,6; 0,4; 0,2 µl krystalizačního roztoku od jedné krystalizační podmínky z soupravy JCSQ core I, II, III, IV (Qiagen). Připravená destička byla sterilně překryta izolační fólií a byla ponechána v klidu v krystalizační místnosti (15 °C). S denním odstupem byly jednotlivé podmínky sledovány a zaznamenávány změny.

5 Výsledky

5.1 Biotransformační schopnosti *Rhizobium radiobacter* R89

V předkládané práci byly studovány biotransformační schopnosti *R. radiobacter* R89 a získané výsledky byly využity k nalezení, expresi a charakterizaci potenciálně zajímavých enzymů.

Prvním krokem bylo přesné zmapování vzniku reakčních produktů pomocí HPLC a TLC (kap. 4.2.1.1). Z tohoto důvodu byly optimalizovány tři analytické metody na HPLC. Metoda A pro nepolární část látek, metoda B na rychlé stanovení a metoda C na stanovení polárnějších látek morfinové řady. Danými metodami byly stanoveny retenční časy standardů a také jejich základní linie ukazující na přítomné nečistoty. Tato základní linie byla odečítána od hodnot získaných měření vzorků, společně s základní linií získanou extrakcí 10% buněčné suspenze bez výchozí látky, jak bylo popsáno v kapitole 4.2.1.2. HPLC chromatogramy standardů a jejich příslušné retenční časy jsou ukázány na obrázku č. 10.

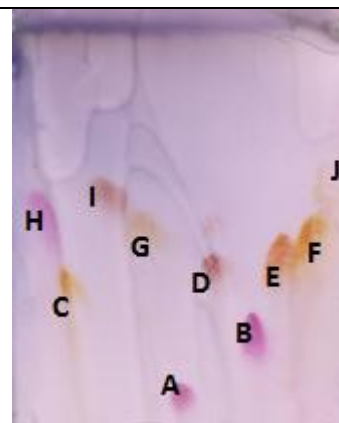


Obrázek č. 10 - Používané HPLC metody a retence standardů

Analogicky HPLC byly stanoveny retenční faktory migrace standardů na TLC destičce a barva po specifické detekci na alkaloidy morfinové řady (kap. 4.2.1.3). Získané výsledky jsou shrnuty do tabulky č. 8, str 50. společně s ukázkou vyvolané destičky standardů z které byly R_f odečítány.

Tabulka č. 8 - Retenční faktory alkaloidů morfinové řady používané TLC metody

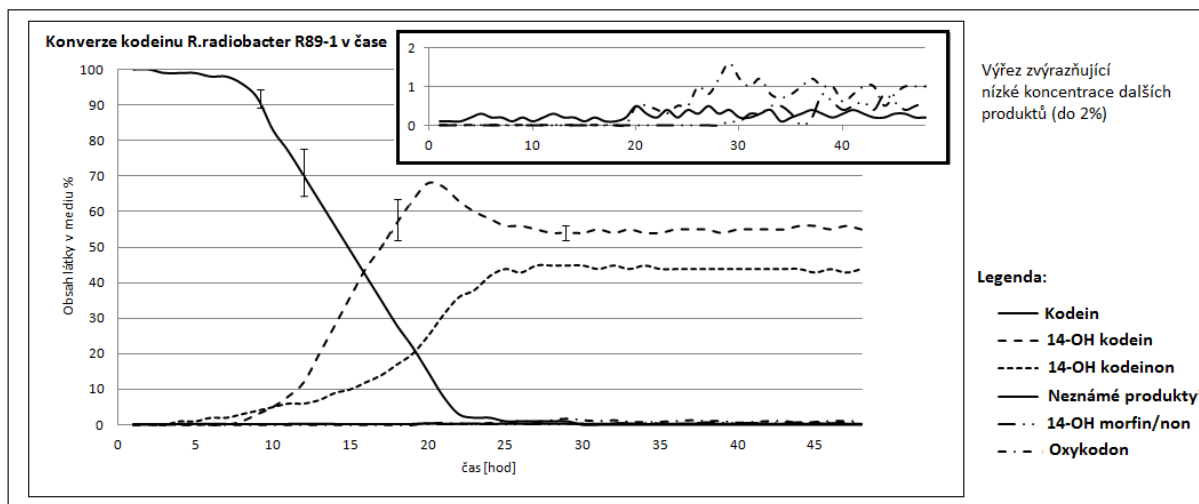
Látka	Retenční faktor	Barva specifické detekce
Morfin (A)	0,08	Temně fialová
Kodein (B)	0,23	Temně fialová
Kodeinon (C)	0,34	Cihlově červená
14OH-morfinon (D)	0,40	Tmavě červená
14OH-kodein (E)	0,43	Tmavě červená
Thebain (F)	0,46	Oranžová
14OH-dihydromorfin (G)	0,50	Žlutá
14OH-dihydrokodein (H)	0,54	Temně fialová
14OH-kodeinon (I)	0,60	Tmavě červená
14OH-dihydrokodeinon (J)	0,65	Žlutá



Vyvolaná TLC destička standardů, ukázka specifické detekce. Písmena odpovídají označení látek.

Základním biotransformačním pokusem bylo zmapování závislosti výskytu produktů na čase. Z důvodu zajištění stejného fyziologického stavu buněk byl využit již optimalizovaný postup kultivace buněk²⁹ s přidavkem 0,2 g kodeinu na litr media (kap. 4.2.3.1). Z 50 ml 10% buněčné suspenze byl odebírán 1 ml každou hodinu a pomocí HPLC (metody A) byl stanoven výskyt biotransformačních produktů. Od 20. hodiny byl obsah příslušných látek stanovován HPLC metodou A, C a za využití TLC se specifickým barvením. Celý pokus byl prováděn třikrát. Výsledek je shrnut do grafu na obrázku č. 11 na straně 51, v kterém je patrná počáteční lag fáze než začne docházet k biotransformaci. Následuje prudký úbytek kodeinu (maximální rychlost konverze kodeinu je přibližně $1,2 \pm 0,2$ % výchozí koncentrace 0,2 g/l za deset minut (tj. cca $0,0002 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$), nárůst koncentrace 14OH-kodeinu až na 70% a 14OH-kodeinonu na 30%. Ačkoli nebyl detekován kodeinon jako meziprodukt, lze předpokládat morfin 6-dehydrogenázovou reakci nutnou pro vznik kodeinonu.

Po této prudké změně následuje pokles koncentrace 14OH-kodeinu a nárůst koncentrace 14OH-kodeinonu na zastoupení cca 55:45. Od cca 25. hodiny byl pomocí TLC a HPLC metody c nalezen nárůst dalších reakčních produktů – viz výřez na obrázku č. 11, str. 51. Mezi těmito produkty byl nalezen oxykodon, jehož přítomnost ukazuje na reduktázový krok a 14OH-morfin/14OH-morfinon ukazující na 3-O-demetylační krok.



Obrázek č. 11 - Zastoupení produktů konverze *R. radiobacter* R89 v čase. Hlavní graf je vytvořen analýzou reakčních produktů pomocí HPLC metody A. Analýza dalších látek ve výřezu pomocí HPLC metody C a TLC. Chybové úsečky jsou na grafu zobrazeny pouze z ilustrativních důvodů. Výjimečně přesahuje rozptyl hodnot 10 % v oblasti nejvyšší změny hodnot.

Další pokus měl ukázat, zda se zastoupení produktů biotransformace nezmění změnou počátečního množství kodeinu na 0,4 a 1,0 g nebo předchozí kultivací buněk *R. radiobacter* R89 ve vyšších koncentracích kodeinu (0,4 a 1,0 g) před samotným biotransformačním pokusem. Cílem bylo zvýšení zastoupení minoritních meziproductů (oxycodonu a demetylačních produktů) což se bohužel nezdařilo. Jedinou změnou bylo zkrácení lag fáze trvající na obrázku č. 11 cca 6 hodin (0,2 g) na 3 – 4 h (0,4 a 1,0 g/l). Zastoupení minoritních meziproductů se pohybovalo po 20. h kolem konstantních 1,5 %. V dalších experimentech byla využívána pouze koncentrace 0,2 g kodeinu na litr.

Po sérii těchto biotransformačních pokusů bylo žádoucí prokázat přítomnost morfinon reduktázového kroku (analogického *P. putida* M10). Za tímto účelem byly prováděny pokusy v 12 jamkových destičkách (2 ml) s 10 % buněčnou suspenzí nebo s cytosolárním extraktem, 0,2 g substrátu a příslušnými kofaktory (viz 4.2.3.3). Výchozí látky, produkty a celkové zastoupení jsou shrnuty v tabulce č. 9 na straně 52. Pokusy probíhaly při 25 °C. Demetylační krok nebyl vzhledem k zaměření práce prokazován.

Tabulka č. 9 - Důkaz přítomnosti reduktázového kroku.

Buňky 10% susp. (24h)			
Substrát	Produkt	Konverze %	Reakce *
Kodeinon	14OH-kodein	98	Deh.
Hydrokodon	Dihydrokodein, kodein	70 : 30	Deh. i red.
14OH-kodeinon	14OH-kodein	100	Deh.
Oxycodon	Oxycodol, 14OH-kodein	5 : 95	Deh. i red
Thebain	-	-	-
Cytosolární extrakt			
Kodeinon, NADH	Hydrokodon, Kodein	2 : 5	Deh. i red
14OH-kodeinon, NADH	Oxycodon, 14OH-kodein	20 : 5	Deh. i red

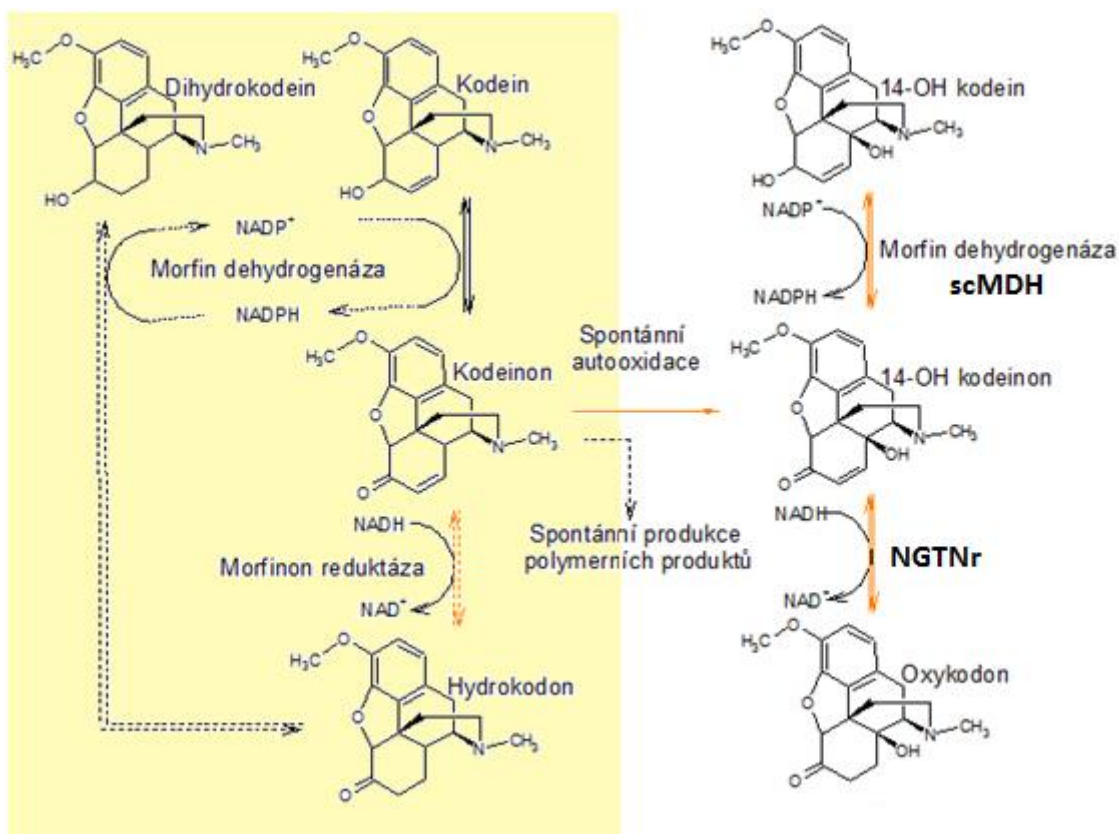
* deh. - dehydrogenace (na uhlíku 6), red. - redukce (dvojně vazby mezi uhlíky 7 a 8)

Hydroxylační krok na uhlíku 14 byl popsán v literatuře jako autooxidační krok ²¹.

Z tohoto důvodu nebyla tato aktivita studována. Rychlost vzniku 14OH produktů ukazuje obrázek č. 11 na straně 51.

Na obrázku č. 12, str. 53 jsou shrnuty prokázané biotransformační aktivity *R. radiobacter* R89 s důrazem na enzymy a reakce již dobře popsané v literatuře (žlutě) a reakce, jejichž úplný popis chybí a na jejichž charakterizaci se zaměřuje tato práce (bíle).

Ukázané schéma je velice blízké obrázku č. 5 na straně 20, zásadní je rozdíl v aktivitě jednotlivých reakčních kroků. Zatímco u *P. putida* je kodeinon z 60% transformován na hydrokodon, u *R. radiobacter* R89 tato reakce probíhá velmi neochotně a byla naopak nalezena aktivita opačná, která u *P. putida* M10 prokázána nebyla. Obdobná reakce s 14OH-kodeinonem není u *P. putida* prozkoumána a u *R. radiobacter* R89 byla prokázána s větší aktivitou než předchozí reakce.



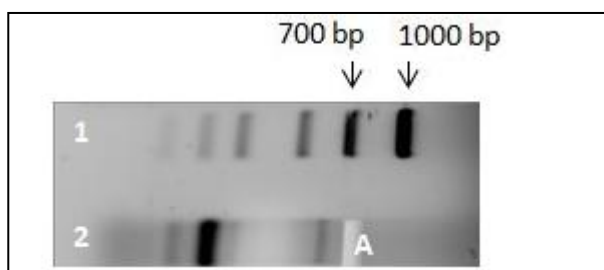
Obrázek č. 12 - Prokázané biotransformační aktivity *Rhizobium radiobacter* R89. Žlutá část schématu je dobře charakterizována v práci prof. Neila C. Bruce a kol.^{44, 45}. Bílá část obsahuje aktivity zjištěné u *Rhizobium radiobacter* R89 v této práci.

5.2 Purifikace proteinů a hledání kódujících genů enzymů

Původní ideou bylo provést izolaci enzymů odpovídajících za studované aktivity v nativním stavu z původního mikroorganismu *R. radiobacter* R89 s použitím kombinace ionexové (Q Sepharosa) a afinitní (Mimetic Orange 3) chromatografie podle obdobného protokolu publikovaného v literatuře^{22, 23}. Bohužel izolace enzymů nebyla ani v jednom případě úspěšná a proto byl zvolen postup heterologní exprese rekombinantních proteinů.

Nejprve bylo v databázi NCBI vyhledáno 50 homologních sekvencí k hledaným proteinům (homology proteinů *P. putida*). Z dostupných sekvencí byly vytvořeny souhrnné dendrogramy, hledány byly homologní sekvence tak, aby bylo možné navrhnout degenerované primery. Toto hledání bohužel vyloučilo možnost nalezení optimálních degenerovaných primerů a tedy vyloučilo možnost použití zvoleného experimentálního postupu pro morfin dehydrogenázu. Její sekvence není dostatečně unikátní a zvláště 2,5-diketoglukonát reduktáza je velmi podobná. Druhý protein, tedy morfin reduktáza (OYE

rodina) se naopak ukázala jako velmi vhodná. Na N konci byla nalezena konzervovaná sekvence: QLWHVG; na C konci pak sekvence: GYTDYP. Na tyto sekvence byly navrženy degenerované primery (amplifikace 260AK, 720bp): Na sekvenci **QLWH(V/T)G**: 5'-ICARYTITGGCAYRYNGG-3' (přímý primer, fwd z angl."forward") a na sekvenci **GY(T/I)DYP**: 5'-IGGRTARTCIRTRTANCC-3' (zpětný primer, rev z angl."reverse"). Polymerázová řetězová reakce s degenerovanými primery (kap. 4.2.3.1) poskytla produkt o velikosti 720 bp – obrázek č. 13, který byl ligován do vektoru pGEM-T easy a několik kolonií bylo předáno sekvenačnímu středisku ke zpracování.



Obrázek č. 13 - Agarosová 0,7 % elektroforéza PCR produktů po odstranění produktu předpokládané velikosti 720 bp. 1 standard velikostí; 2 výsledek PCR s degenerovanými primery; A PCR produkt předpokládané velikosti;

Sekvence specifického produktu byla identifikována jako část genu kódujícího enzym glycerol trinitrát reduktázu (GTN). Přiřazení (z angl. "alignment") je součástí práce jako příloha č. 1, str. 83. Dalším krokem bylo využití inverzní PCR pro získání celého genu. Nejprve bylo pomocí bioinformatické analýzy frekvence restrikčních míst v blízké příbuzném *Agrobacterium* sp. H13-3 (2 148 289 bp), jehož chromozom je plně sekvenován, navrženo vhodné restrikční štěpení tak, aby byl získán dostatečný počet restrikčních míst a zároveň velikost fragmentů nepřesáhla 3 kbp. Jejich přehled ukazuje tabulka č. 10.

Tabulka č. 10 - Četnost štěpení a průměrná velikost fragmentů v genomu *Agrobacterium* sp. H13-3

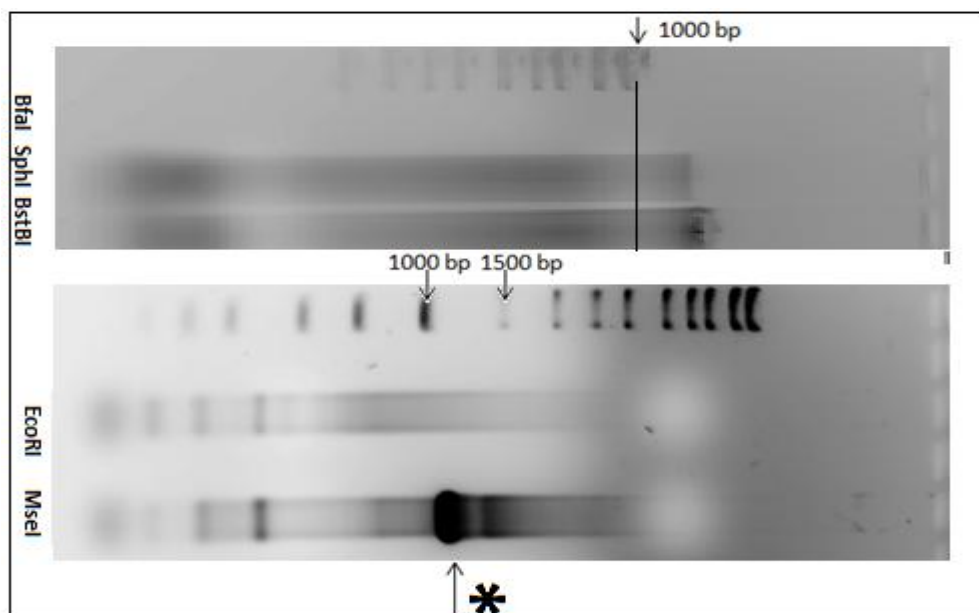
Restrikční endonukleáza	Rozeznávaná sekvence (5'–3')	Počet štěpících míst	průměrná velikost štěpných fragmentů bp
<i>MseI</i>	T/TAA	2904	740
<i>BfaI</i>	C/TAG	1460	1470
<i>EcoRI</i>	G/AATTC	845	2540
<i>SphI</i>	GCATG/C	797	2700
<i>BstBI</i>	TT/CGAA	791	2720

Všechny zmíněné restrikční endonukleázy byly použity pro přípravu templátu na inverzní PCR (kap. 4.2.3.1). K samotné reakci byly využity tyto primery:

(T_m 57°C) – 5'-CAACAACGGCTTCGTCGATG -3'

(T_m 58°C) – 5'-TCATTGCCAATCCGGACCTG -3'

Jediný úspěšný templát byla chromozomální DNA štěpená pomocí restrikční endonukleázy *Mse*I. Výsledek inverzní PCR je zobrazen na obrázku č. 14:



Obrázek č. 14 - Výsledek inverzní PCR. Hvězdičkou je označen specifický PCR produkt.

PCR produkt byl v tomto případě přímo izolován z agarosového gelu a předán servisnímu pracovišti na DNA sekvenaci. Výsledek sekvenace poskytl 12 kbp DNA sekvence, která byla doplněna o vnitřní sekvenci získanou PCR s degenerovanými primery (mezi primery pro inverzní PCR). Byla získána sekvence pro celý gen anotovaný (NCBI, Blast) jako GTN reduktáza. Aminokyselinová sekvence je ukázána na obrázku č. 15 společně s His kotvou (podtržena):

```
GSSHHHHHHSSGLVPRGSHMTKTTLFQPTSLGAIITLANRIVMAPLTRNRAGAGFVPGELTAGYYAQRASAGL
II SEATQISQQGQGYQDTPGIYTQAQIDGWKKVTA AVHKKGGRIVLQLWHVGRI SHVNLQPNGGAPVAPSAIRA
EVKTFVNNGFVDVSEPRALELELAGIVDDFRKAAANS IEAGFDGVEVHGANGYLLEQFAKDGANMRTDTYGGS
VENRARLMLEVTA AVAQEIGPERTGIRISPVSPANGISCSDPQTQYDYIVDKLDALGIAYIHVVEGATGGPRDV
APFDYGSLRRRFSRTYIANNGFDLELATSHLADGRADLIAFGRPFIANPDLVERLQSGAPLAEVNAAKIFGGSA
AGYTDYPRFSETTSDN
```

Obrázek č. 15 - Aminokyselinová sekvence NGTNR, "Nové glycerol trinitrát reduktázy" z *R. radiobacter* R89 + N koncová his kotva (pET28b) - podtržena

Inverzní PCR byl kromě zbývajících sekvencí GTN získán také fragment dehydrogenázy s krátkým řetězcem (SCD, z angl. "short chain dehydrogenase") ze stejného operonu. Bioinformační analýza operonu blízkých příbuzných mikroorganismů s osekvenovaným genomem přispěla k domněnce, že tato dehydrogenáza může být odpovědná za morfin 6-dehydrogenázovou aktivitu. Analýza je přiložena jako příloha č. 2, str. 84. Pro amplifikaci fragmentu *scD* byly tedy navrženy 3 degenerované primery na konzervovanou promotorovou sekvenci daného operonu spolu s primery navrženými na fragment získaného C-konce a byla provedena PCR. Získaný fragment byl opět sekvenován a byla získána kompletní sekvence genu *scD*. Aminokyselinová sekvence je zobrazena na obrázku č. 16 s His kotvou (podtržena):

```
GSSHHHHHSSGLVPRGSHMTQIPLVLITGASTGIGATYAERFARRGHDLVLVARDVVRMEALASRLRDETG  
VAIDILPADLTKSEDLAKVETRLRDDRIGILVNNAGTAIGGSFVDQSVDDMTKLVGLNATALVRLSSAIAPRL  
AKAGEGSIVNIGSVVGLAPEFGMTVYGATKAFVLFLSQGLAHELGSKGVYIQAVLPATTRTEIWDHVGADVSAM  
SNVMEVGDLDVAALVGFDRREPVTIPLHDGGQWDALDGARKAMLGNLVNAVPAERYRTPA
```

Obrázek č. 16 - Aminokyselinová sekvence *scMDH*, Dehydrogenázy s krátkým řetězcem z *R. radiobacter* R89 + N koncová his kotva (pET28b) - podtržena

Celková analýza získané sekvence genů v operonu je přiložena jako příloha č. 3, str. 85. Pomocí databáze ExPASy a jejího webového nástroje: "Proteomics - ProtParam" (<http://web.expasy.org/protparam/>) byly získány základní údaje o proteinových produktech získaných genů. Proteinové produkty byly nazvány NGTNR (z angl. "New Glycerol Trinitrate Reductase") a *scMDH* (z angl. "Short Chain Morphine-6-dehydrogenase").

NGTNR

365 aminokyselin; molekulová hmotnost 38 931,6 Da; pI (teoretické) = 5,60; extinkční koeficient $\epsilon=30370 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Abs._(při c 1mg/ml) = 0,780)

scMDH

262 aminokyselin; molekulová hmotnost 27 598,6 Da; pI (teoretické) = 5,27; extinkční koeficient $\epsilon=16960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Abs._(při c 1mg/ml) = 0,615)

5.3. Proteiny NGTNR a *scMDH*

5.3.1 Klonování a exprese strukturních genů

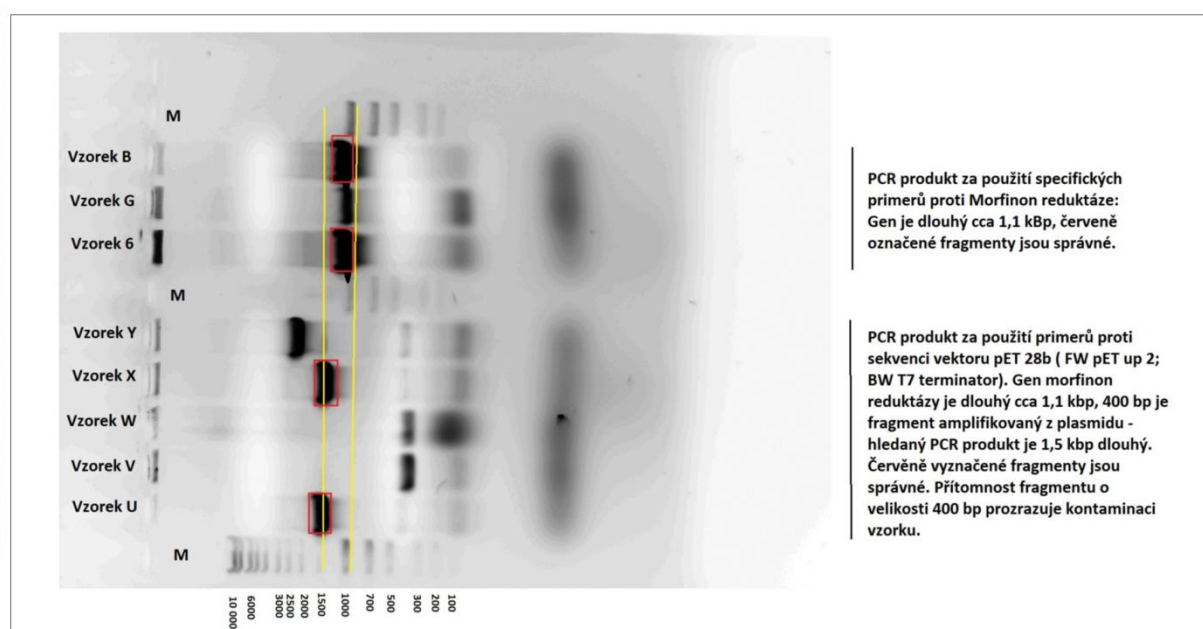
Pro zjištění, zdali může být studovaná aktivita přiřazena k proteinovým produktům získaných genů, byl využit expresní systém pET 28b a proteiny byly v tomto systému po optimalizaci heterologně exprimovány v dostatečném množství k charakterizaci.

Jako první gen byl klonován NGTNr. Byly navrženy specifické primery pro amplifikaci genu z chromosomální DNA *Rhizobium radiobacter* R89. Na 5'konce daných sekvencí bylo přidáno místo pro restriční štěpení a TTT sekvence pro usnadnění štěpení restričními enzymy:

fwd primer (*Nde*I)TTTCATATGACCAAGACCACACTCTTCC

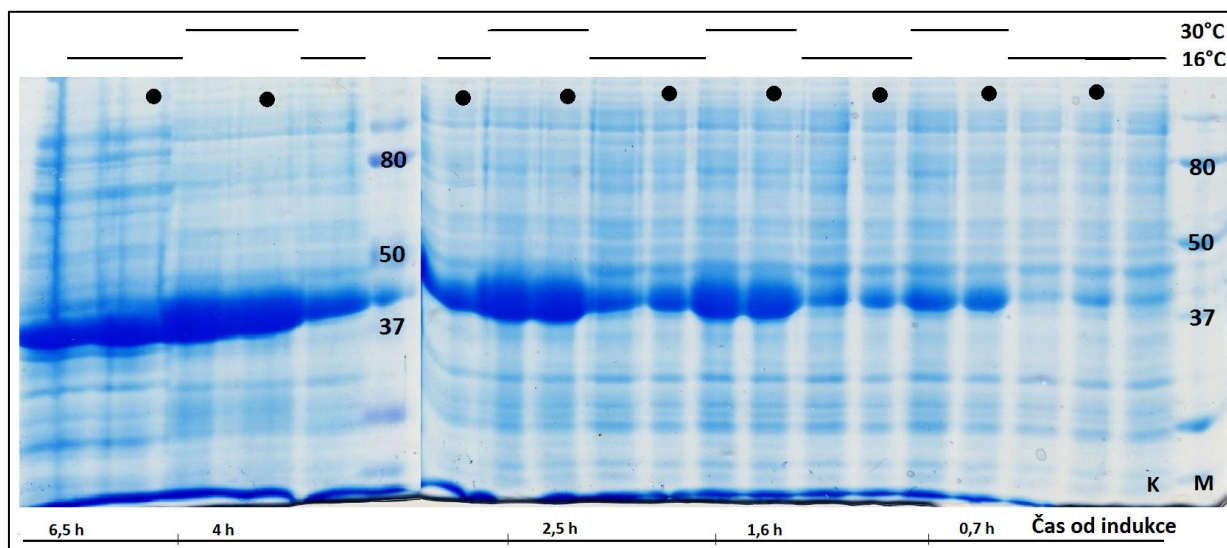
rew primer (*Eco*RI)TTTGAATTCTCAATTGTCGGACGTTGTTT

Výsledný PCR produkt a plasmid pET28b byl štěpen restričními endonukleázami (2 h, 30°C). Výsledek byl vizualizován agarosovou elektroforézou a DNA pruhy odpovídající štěpným produktům byly izolovány. Směs byla ligována přes noc při laboratorní teplotě. Transformace buněk *E. coli* TOP10 byla provedena 10 µl ligační směsí. Selektce proběhla vysetím na LB agar s kanamycinem (60µg/l). Přijetí správného plasmidu bylo ověřeno metodou Colony PCR a následně vizualizací pomocí horizontální agarosové elektroforézy. Výsledek je zobrazen na obrázku č. 17. Vybrané kolonie byly verifikovány sekvenací, která ověřila kompletnost genu a vyloučila mutace. Pro další použití byl zvolen a verifikován vzorek 6 (na obrázku č. 17). Z kolonie byl izolován plasmid (MiniPrep, Qiagen), kterým byly transformovány buňky expresního systému *Escherichia coli* BL21(DE3).



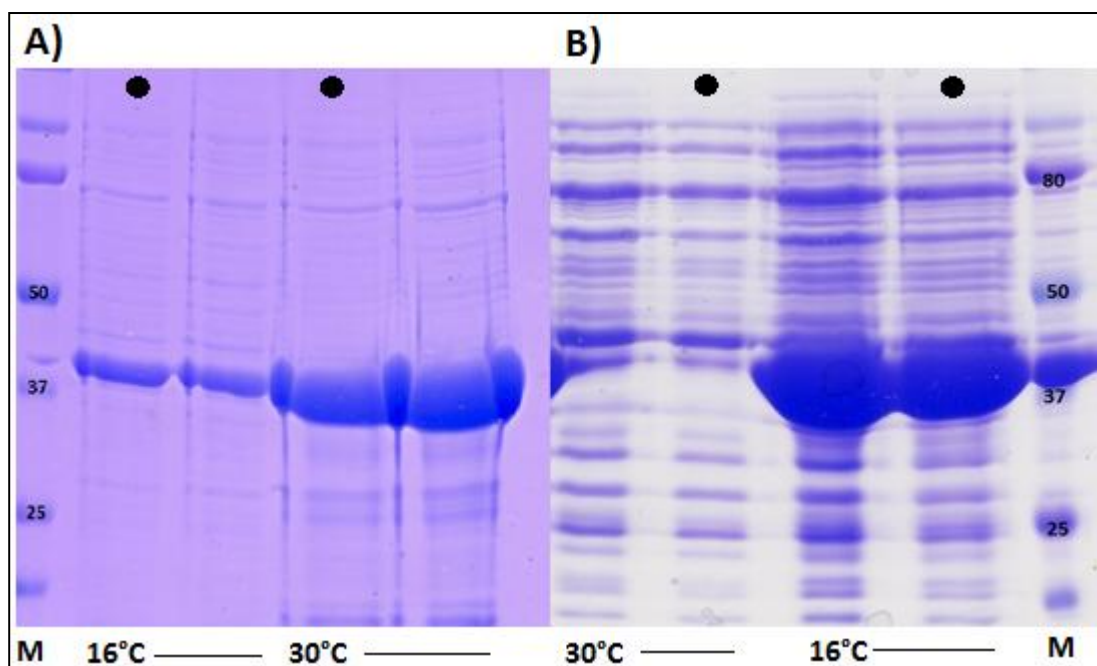
Obrázek č. 17 - Colony PCR, ověření přítomnosti správného plasmidu. M označuje standard velikostí - popsány číslem (bp). Červeně orámované pruhy jsou správné velikosti - viz text u obrázku.

Pro zjištění vlastností exprese NGTNr byl zvolen kultivační objem 20 ml a čtyři rozdílné podmínky exprese. Buňky byly pěstovány do $OD_{600}=0,6$ při 30°C a následně indukovány v 16°C a 30°C, 1mM IPTG a 0,1mM IPTG. V čase byl odebírán vzorek (1 ml) kultivačního média, centrifugován (14 000g, 3 min.) a inkubován v denaturačním pufru při 95 °C (50 mM Tris/HCl, 8M močovina, 5mM EDTA, 2% SDS, pH 8,0). Všechny získané vzorky byly nanесeny na SDS-PAGE a výsledný 12% gel barvený CBB-R250 je zobrazen na obrázku č. 18.



Obrázek č. 18 - Exprese NGTNr v různých podmínkách. 80, 50 a 37 jsou označeny velikosti daného standardu molekulových hmotností (kDa) - M; 12% akrylamidový gel; K - neindukovaná kontrola; ● indukce 1 mM IPTG; bez kolečka indukce 0,1 mM IPTG;

Nejlepší podmínky exprese poskytující nejvíce proteinu jsou při 30°C, 4h nebo 16°C, 24h s indukcí 1mM IPTG. Protože bylo nutné zjistit kvalitu exprimovaného proteinu, byl proveden následující pokus, který frakcionoval materiál na rozpustnou a nerozpustnou frakci (inkluzní tělíska) s použitím nejlepších podmínek z předchozího pokusu (4h 30°C a 24h 16°C). Všechny vzorky byly vizualizovány elektroforézou v 12% akrylamidovém gelu. Výsledek je ukázán na obrázku č. 19 na straně 59.



Obrázek č. 19 - rozpustnost exprimované NGTNR při odlišných podmínkách. A) Nerozpustná frakce, B) rozpustná frakce; M standard molekulových velikostí - označeny číslem v kDa; ● indukce 1mM IPTG, bez tečky indukce 0,1 mM IPTG

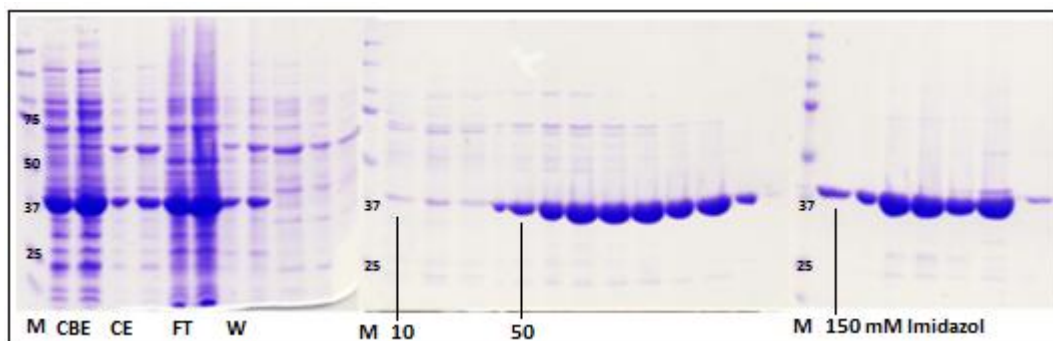
Při 20h expresi v 16°C převažuje rozpustná frakce (B) proteinu nad nerozpustnou (A), která tvoří kolem 10 % z celkového množství NGTNR, naproti tomu při expresi 4h 30°C výrazně převažuje (95 %) nerozpustná frakce. Z tohoto důvodu byla dále optimalizována exprese NGTNR proteinu s využitím dalších typů buněk (viz 4.2.3.2) a ověřením konverze kodeinonu (2mM, 24 h, pomocí HPLC, při standardním množství proteinu). Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 11. Jak je z tabulky patrné, nejlepší výsledky byly dosaženy s buňkami *Escherichia coli* ArcticExpress s expresí při 10°C po 24 h. Tento expresní protokol byl dále využíván pro purifikaci vlastního proteinu NGTNR.

Tabulka č. 11 - Přehled použitých expresních systémů NGTNR

Použitý expresní systém	Rozpustná/nerozpustná frakce *	Konverze kodeinonu 2mM (24h) **
<i>E. coli</i> BL21(DE3); 30°C; 1mM IPTG	≤ 5%/ 95%	1-5%
<i>E. coli</i> BL21(DE3); 16°C; 1mM IPTG	80-90%/ 10-20%	70%
<i>E. coli</i> ArcticExpress; 10°C; 1mM IPTG	100%/0%	100%
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pGro7; 26°C; 1mM IPTG	40%/60%	50%
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pTf16; 26°C; 1mM IPTG	40%/60%	50%
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pG-Tf2; 26°C; 1mM IPTG	40%/60%	60%
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pG-KJE8; pKJE7; 26°C; 1mM IPTG	20%/80%	20%

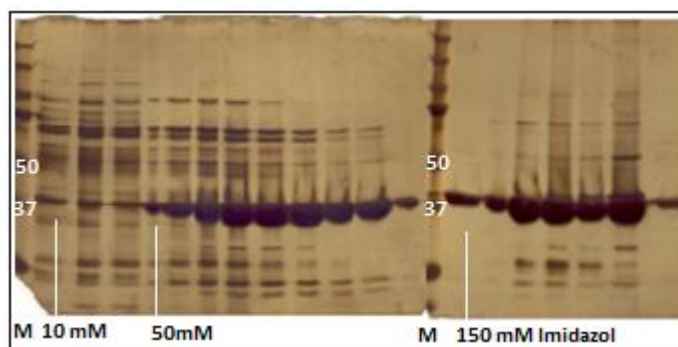
* Poměr mezi frakcemi je určován na základě iluminací analýzy gelu s danými frakcemi. ** Konverze kodeinonu proběhla v 12 jamkových destičkách s rozpustnou frakcí (2ml) ze stejné hmotnosti buněk (50mM Na₂HPO₄ pufr pH 8,0; 2mM kodeinon 5mM NADH; regenerace kofaktoru).

Prvním krokem purifikačního protokolu NGTNR byla niklová chelatační chromatografie následovaná gelovou chromatografií. Na obrázku č. 20 je ukázán průběh zmíněné chelatační chromatografie na 12% SDS-PAGE barvené CBB-R 250 (10 ml cytosolárního extraktu *E.coli* ArcticExpress, 2g vlhké hmotnosti buněk).

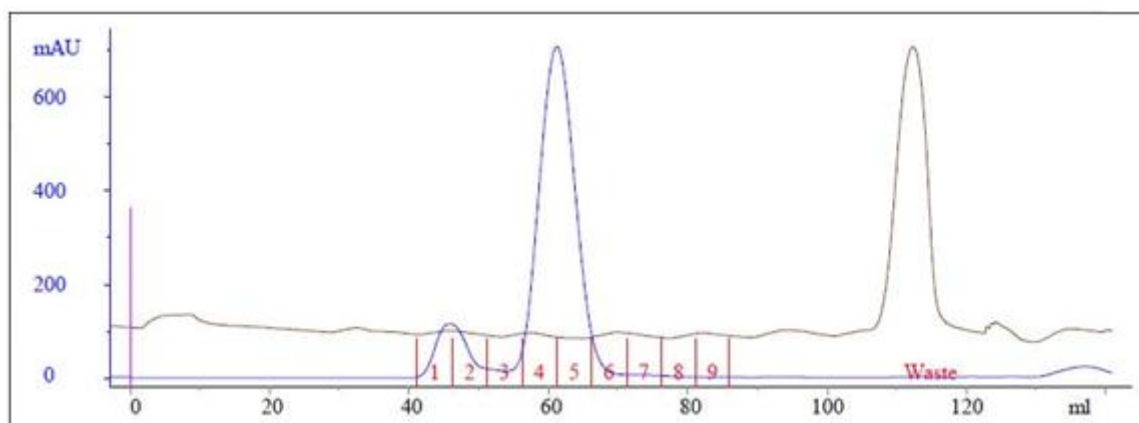


Obrázek č. 20 - NiNTA chromatografie NGTNR. Použitý objem kolonky Ni-NTA – 1 ml, eluce 10, 50, 150 mM imidazol v 50 mM Na_2HPO_4 100 mM NaCl 1 mM DTT, pH 8,0; laboratorní teplota. Cytosolární frakce z 50 ml kultivace *E.coli* ArcticExpress. M - standard molekulových velikostí (kDa), CBE - celobuněčný lyzát, CE - cytosolární extrakt, FT - frakce prošlá kolonou, W - odmytí nevázané frakce;

Pro zjištění nečistot byly frakce nanoseny na 12% SDS-PAGE gel a následně barveny stříbrem (obrázek č. 21). Frakce eluované při 50 mM Imidazolu mají vysoký obsah kontaminujících proteinů a proto bylo dále pracováno pouze s frakcí eluovanou při 150 mM imidazolu. Tato frakce také obsahuje nečistoty. Většinou jsou to proteiny o velmi vysoké nebo nízké molekulové hmotnosti. Z tohoto důvodu byla zvolena gelová chromatografie s kolonou Superdex 75 5/150 pro analýzu purifikace a následně Superdex 75 16/60 pro samotnou purifikaci. Chromatogram při použití kolony Superdex 75 16/60, demonstrující čistotu preparátu, je ukázán na obrázku č. 22, str. 61:

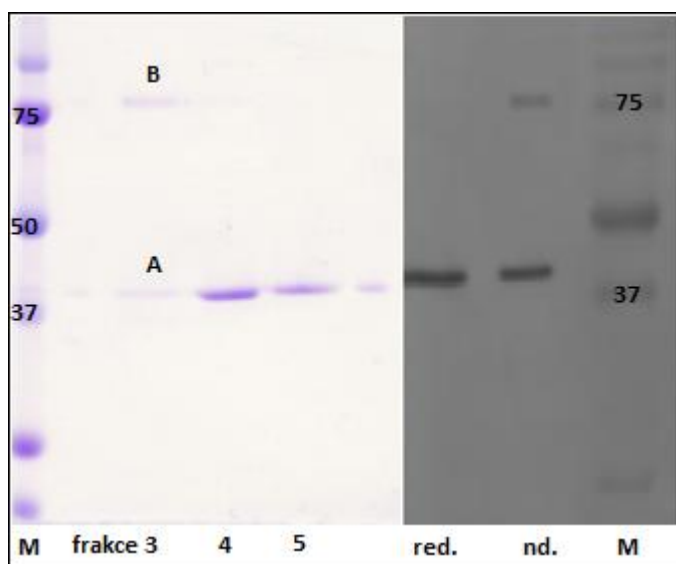


Obrázek č. 21 - Vybrané frakce z NiNTA chromatografie NGTNR barvené stříbrem. M - standard molekulových velikostí (kDa); 10, 50, 150 mM Imidazol - označuje eluované frakce



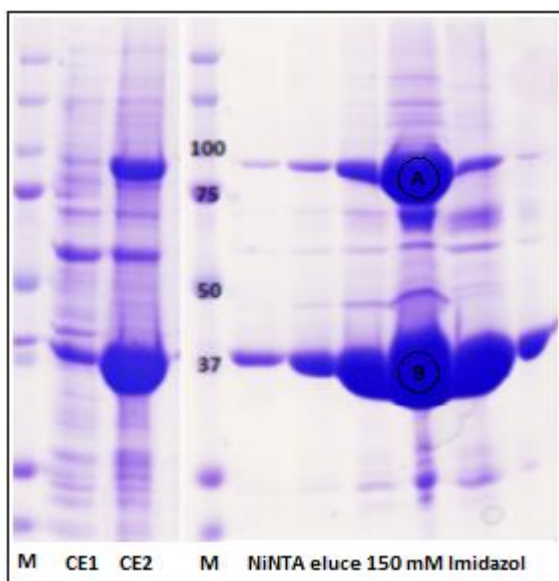
Obrázek č. 22 - Chromatogram NGTNR purifikace, Superdex 75 16/60. Kolona Superdex 75 16/60; Modrá křivka - A_{280} ; Hnědá křivka - konduktivita; Frakce označeny červenými čísly; Osa x - celkový eluční objem.

Výsledné chromatografické frakce 3,4,5 z analytické kolony Superdex 75 5/150 byly naneseny na 12% SDS PAGE gel za neredukujících podmínek a jsou ukázány na obrázku č. 23. Jak je patrné, ve frakci číslo tři je přítomný poměrně výrazný proteinový pruh o velikosti cca 80 kDa, který byl podezřelý, že se jedná o dimer proteinu NGTNR. Z tohoto důvodu byl proveden Western blot s protilátkou proti histidinové kotvě přítomné na exprimovaném proteinu. Výsledek je ukázán na obrázku č. 23, vpravo a potvrzuje přítomnost a vznik dimeru.



Obrázek č. 23 - Přítomnost dimeru, důkaz. M - standard molekulových velikostí (kDa), jednotlivé pruhy označeny číslem v kDa; A - monomer proteinu NGTNR.; B - předpokládaný dimer; red. - nanesena redukováná frakce 5mM DTT; nd. - neredukovaná frakce

V literatuře je uvedena GTN reduktáza jako monomerní protein ⁷³ a proto je předpokládána monomerní povaha také NGTN reduktázy, ačkoli obsahuje jeden cystein v aminokyselinové sekvenci. Naproti tomu obdobný enzym morfinon reduktáza (*P. putida* M10) je dimerní povahy. Z tohoto důvodu byl využit expresní systém *E.coli* SHuffle® umožňující tvorbu SS-můstků a tedy potenciálních dimerních NGTNr. Jeho použitím došlo k produkci velkého množství dimerní formy proteinu NGTNr. Purifikační protokol byl z časových důvodů omezen na NiNTA chromatografií, i když získané množství monomer vs. dimer bylo cca 60 : 40. Výsledek je ukázán na obrázku č. 24. Získaná čistota dostačovala pro stanovení kinetických vlastností dimeru vzhledem k známým vlastnostem purifikovaného monomeru a bylo dokázáno, že dimerní forma je aktivní z cca 1/10 a jedná se tedy s velkou pravděpodobností o nefunkční protein. Pro další experimenty byl použit expresní protokol, který umožňoval získání nativní a funkční monomerní formy.



Obrázek č. 24 - Produkce dimerní formy NGTNr expresním systémem *E.coli* SHuffle®. Monomer 39kDa označen B, Dimer 78 kDa označen A. Čísla označují standard o dané molekulové velikosti v kDa (pruh M). 12% SDS-PAGE. Příliš mnoho vzorku naneseného na gel způsobuje migraci odlišnou od předpokládané hodnoty. CE1 - cytosolární extrakt buněk *E.coli* ArcticExpress; CE2 - cytosolární extrakt buněk *E.coli* Shuffle;

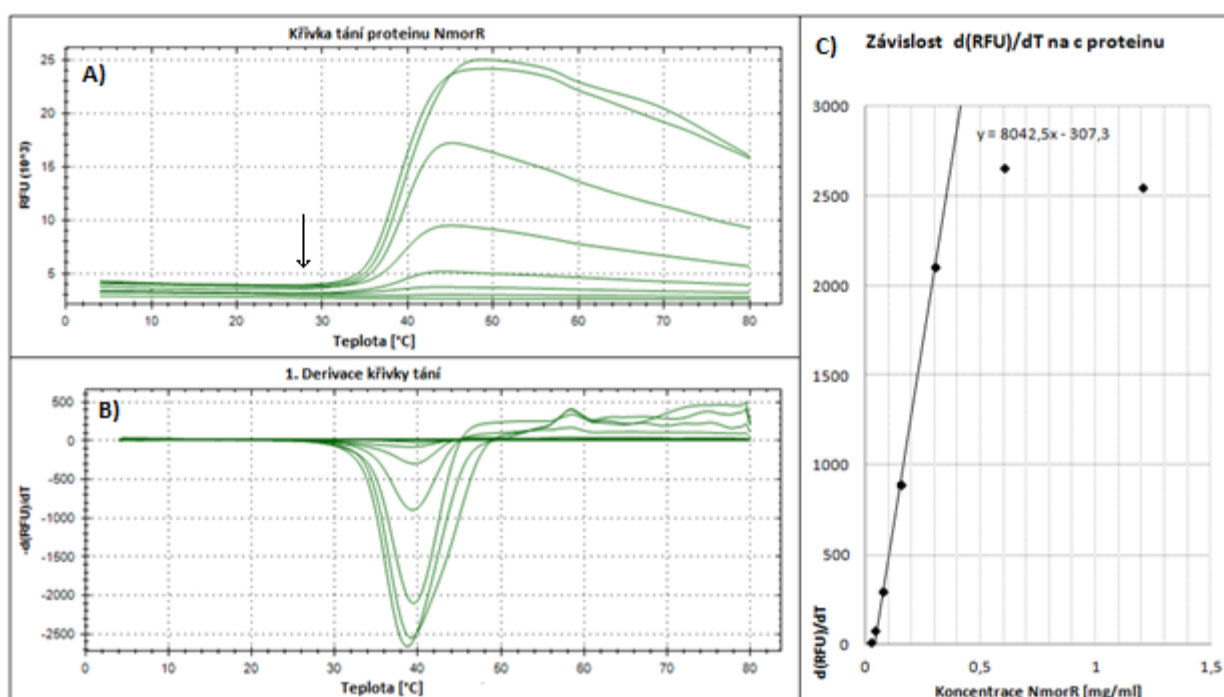
Pro ověření aminokyselinové sekvence purifikovaného rekombinantního proteinu NGTNr byla použita metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS (z angl. "Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight Mass spectrometry") po trypsinovém štěpení v gelu SDS-PAGE vybraného proteinového proužku [M.Šulc, MBÚ, 2.5.2013].

Získaná data odpovídají sekvenci ukázané na obrázku č. 15, str. 55 a jsou přiložena jako příloha č. 5 na straně 87.

5.3.2 Charakterizace proteinu NGTNR

Vzhledem k záměru pokusit se krystalizovat získané proteiny byla nejprve provedena charakterizace stability NGTNR proteinu technikou Thermofluor (a ThermoFAD) optimalizace pufru, pH a kryopreservačních aditiv.

Na obrázku č. 25 jsou ukázány hodnoty pro standardizaci měření a to počáteční teplota tání (teplotní denaturace, označena šipkou) 27,5°C v základním pufru 50mM Na₂HPO₄; 150mM NaCl, pH 8,0 (hodnota počátku nárůstu fluorescenčního signálu) a teplota denaturace 39°C (hodnota maximálního nárůstu signálu). Nejvhodnější koncentrace NGTNR pro tuto techniku byla stanovena na 0,3 mg/ml.

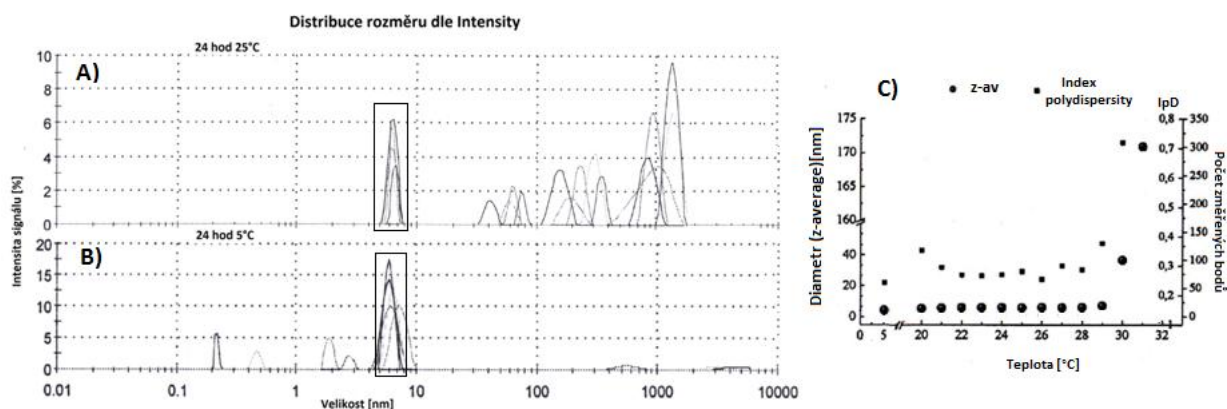


Obrázek č. 25 - Thermofluorimetrické vlastnosti proteinu NGTNR ve standardním pufru. (50 mM Na₂HPO₄; 150mM NaCl; pH 8,0); ad A) - získané křivky relativní fluorescence; ad B) první derivace křivek – d(RFU)/dT ukazující teplotu denaturace při 39 °C; ad C) kalibrační závislost pro standardisaci proteinové koncentrace při měření

Celkové výsledky jsou shrnuty do grafů a přiloženy jako příloha k této práci č. 4, str 86. Z výsledků vyplývá, že dosud používaný pufr 50mM Na₂HPO₄; 150mM NaCl, pH 8,0 je pro NGTNR optimální. Pufr fosfát/citrát vykazuje prakticky totožné charakteristiky a je také vhodný pro pozdější krystalizace. Vzhledem k širokému rozsahu pufráční kapacity je také

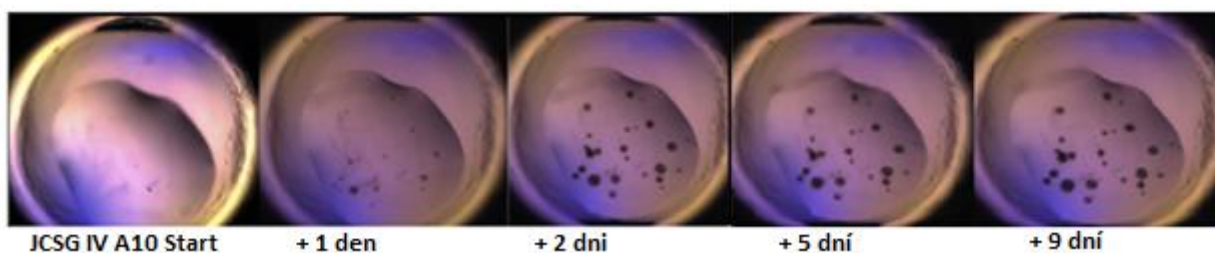
použitelný pro stanovení pH optima. Protein je stabilní při vyšších pH 8 – 9. Jako ideální kryopreservant se ukázal 20% glycerol.

Pro potvrzení kvality proteinového preparátu (monodispersity), stability a teploty agregace byla použita metoda fotonové korelační spektroskopie (DLS, kap. 4.2.4.3). Výsledky jsou ukázány na obrázku č. 26. Protein se ukázal jako relativně stabilní při 25°C a 5°C (v řádu dní), intenzita vrcholu odpovídající původnímu proteinu poklesla minimálně i přes značnou odpověď větších částic způsobujících silnou dispersi. Při 25 °C byla detekována nízká hladina agregace nedosahující 1 %. Při inkubaci v 5 °C byl detekován vznik štěpných produktů taktéž pod 1 % celkového množství proteinu. Teplota agregace byla stanovena na 29°C, což je ve shodě s hodnotou získanou metodou ThermoFluor.



Obrázek č. 26 - DLS analýza stability proteinového preparátu a teploty agregace. V černém rámečku je zvýrazněn původní rozměr proteinu NGTNR. Graf A) Vrcholy v pravo od původního naznačují agregované částice; B) Vrcholy vlevo od původního proteinu naznačují vznik štěpných produktů; C) Stanovení agregační teploty měřením velikosti částic. Index polydispersity (IpD).

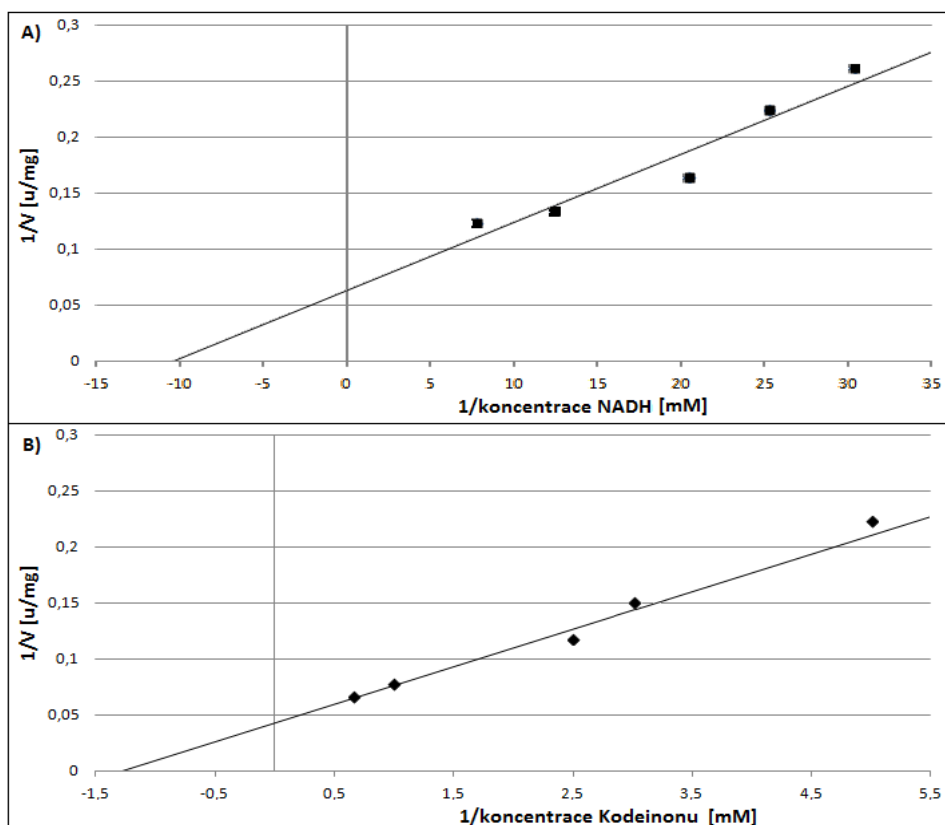
Krystalizace proteinu NGTNR. využívající JCSG core I-IV soupravy krystalizačních podmínek (celkem 384 různých podm., celkem 1152) poskytla 5 různých podmínek, v kterých se tvořily proteinové krystaly. Bohužel ani jedna ze zmíněných podmínek neposkytla krystaly schopné difrakce. Z tohoto důvodu byla vybrána nejlepší podmínka pro další optimalizaci podmínek, časový záznam krystalizačního procesu v podmínce JCSG IV A10 je uveden na obrázku č. 27, str. 65.



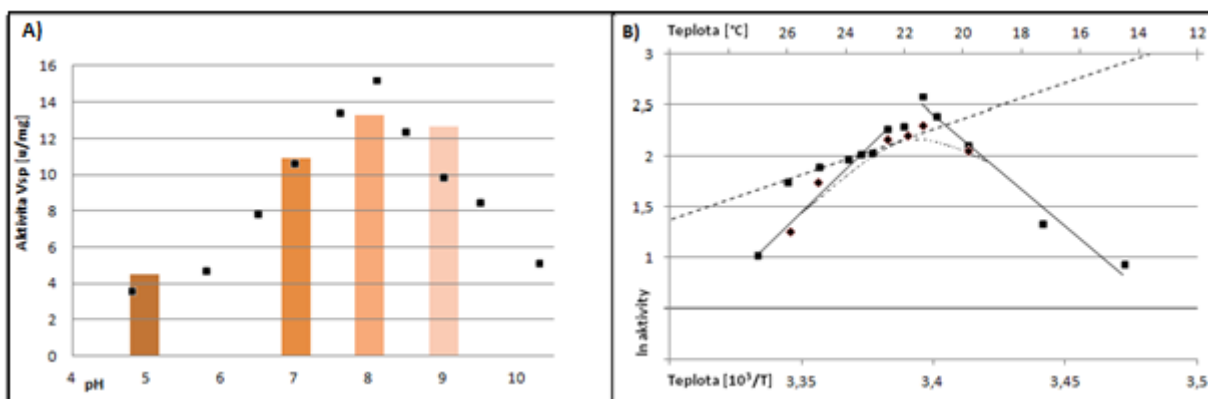
Obrázek č. 27 - Záznam krystalizačního procesu v podmínce JCSG IV A10.

Kineticky byl protein NGTNR charakterizován s kodeinonem jako výchozím substrátem, aby bylo co nejlépe možné porovnat jeho vlastnosti s morfinon reduktázou z *Pseudomonas putida* M10. Z průběhu dvojitě reciprokého výnosu variací koncentrace NADH a kodeinonu lze předpokládat Ping-Pong mechanismus dvousubstrátové reakce. Na obrázku č. 28, str. 66 jsou pomocí stejného výnosu ukázány přímky, z kterých jsou vypočteny referenční hodnoty pro K_m a V_{max} dané reakce. Získány byly tyto hodnoty pro kodeinon: $K_m = 0,77 \pm 0,24$ mM; $V_{max} = 22,99 \pm 1,6$ U.mg⁻¹; $K_{cat} = 14,91 \pm 1,2$ s⁻¹; $K_{cat}/K_m = 16,36$ s⁻¹.mM⁻¹; $K_{m(NADH)} = 0,096 \pm 0,008$. Jak je možné z obrázku č. 29, str. 66, část B) vidět, enzym reaguje prudkými změnami aktivity na změnu teploty, nicméně tyto změny nejsou stabilní a aktivita se postupně při prodloužené inkubaci při dané teplotě mění. Tuto skutečnost popisuje tzv. Arrheniův výnos, který bývá standardně používán pro výpočet aktivační energie reakce. Plná úsečka jdoucí zleva doprava ukazuje na vzrůstající hodnotu aktivity, naopak úsečka jdoucí zprava doleva charakterizuje denaturaci. Přerušovaná křivka je standardní hodnota, od které se odvíjí predikce průběhu - tečkovaně (software GraFit 7, nelineární regrese). Tyto predikce ukazují na předpokládané stabilní hodnoty aktivity enzymu v dané teplotě a hodnoty získané po 30 minutové inkubaci při dané teplotě (vyznačeny kosočtverci) se těmito hodnotám přibližují. Z tohoto důvodu byla teplota maximální aktivity, při které je enzym stabilní, stanovena na 20°C. V této teplotě bylo následně stanoveno pH optimum. Na obrázku č. 29 (A), str. 66 je nejen závislost na pH, ale i korespondující stabilita proteinu v daném pH stanovená termofluorimetrií.

Dále byla charakterizována substrátová specifita získaného preparátu. Z výsledků vyplývá, že nejvyšší specifickou aktivitu vykazuje enzym pro GTN (41,62 U/mg), dále následuje 14OH-kodeinon (24,45 U/mg), 14OH-morfinon (10,33 U/mg) a nejnižší aktivitu vykazuje s morfinonem (6,61 U/mg). Je tedy zřejmé, že enzymové charakteristiky bude třeba stanovit i pro ostatní substráty (především GTN a 14OH-kodeinon).

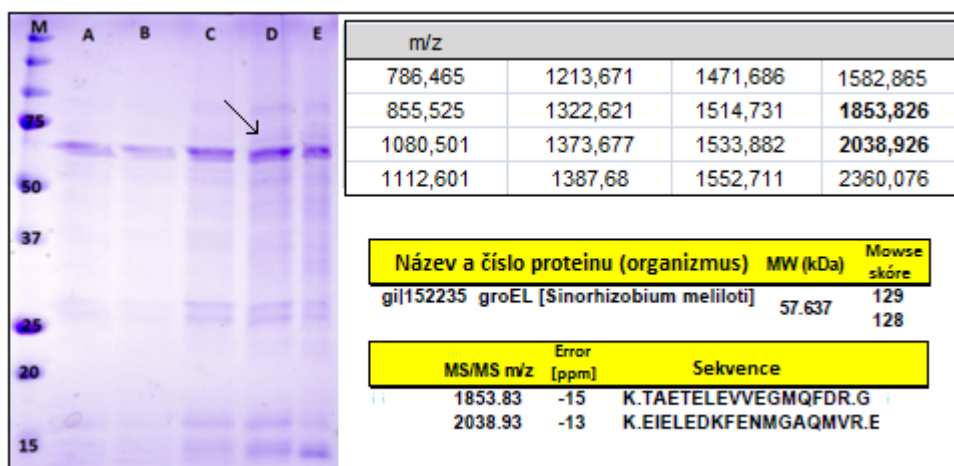


Obrázek č. 28 - Lineweaver-Burkův výnos, určení K_m a V_{max} analogicky dle (23) A) pro NADH; B) pro Kodeinon



Obrázek č. 29 - Kinetické vlastnosti proteinu NGTnr. A) Závislost aktivity na pH + sloupcově stabilita proteinu v daném pH (Thermofluorimetrie); B) Arrheniův výnos závislosti $\ln A$ na teplotě (hodnoty pro minutu (čtverce) nebo 30 min. inkubovaný vzorek při dané teplotě – kosočtverce);

Protein – proteinovou afinitní chromatografií NGTnr byly získány eluční frakce, které byly po acetonové precipitaci naneseny na SDS-PAGE gel. Získaný gel je ukázán na obrázku č. 30 na straně 67. Frakce D byla opětovně nanesena na SDS-PAGE gel a nejvýraznější proteinový proužek byl charakterizován pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF-MS [M. Šulc, MBÚ, 2. 5. 2013] po trypsinovém štěpení v gelu.



Obrázek č. 30 - Interagující proteiny NGTNr. Frakce odpovídají eluci A-200mM, B-300mM, C-400 mM, D-500mM, E-600mM NaCl v pufru 50mM Na₂HPO₄ 20mM Imidazol; Šipkou je naznačen pruh odpovídající charakterizovanému groEL v dané frakci (MALDI-TOF-MS); tučně zvýrazněné fragmenty m/z byly charakterizovány peptidovou fragmentací (MS/MS) a protein určen na základě signifikantní identifikace; M - standard molekulových velikostí MW (kDa);

5.3.3 Exprese a charakterizace proteinu scMDH

Jako druhý byl klonován gen *scD*, jímž kódovaný protein, jak bylo posléze zjištěno, byl odpovědný za morfin-dehydrogenázovou aktivitu na uhlíku C6. Pro PCR reakci byly použity tyto primery:

- přímý primer* (Tm 64°C): 5'-TTT**CATATGACTCAGATTCCCTTAGTCTTG** -3'

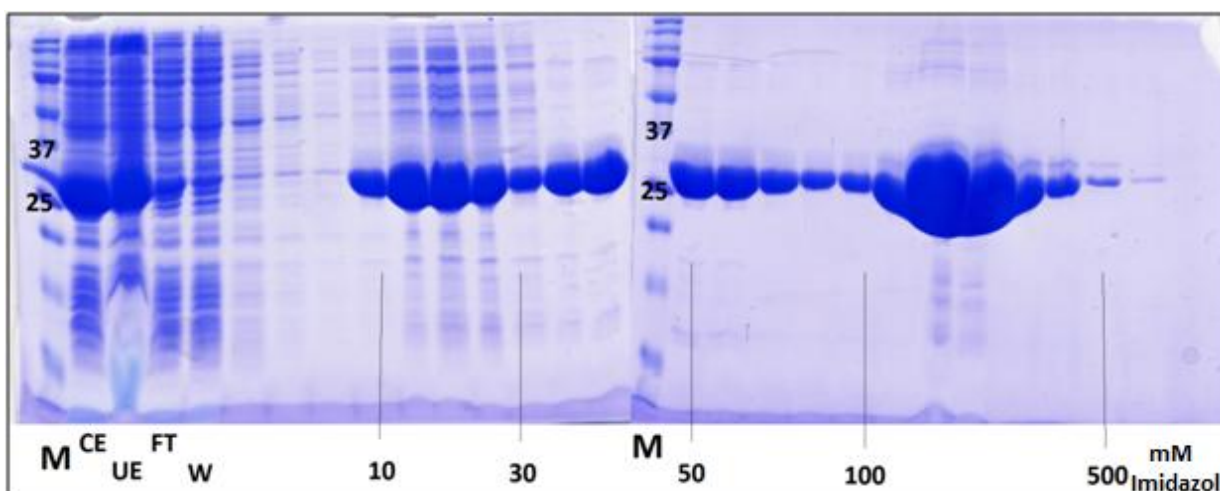
- zpětný primer* (Tm 86°C): 5'-TTT**GCGGCCGCTCACGCCGGCGTC** -3'

Výsledný PCR produkt byl vizualizován agarosovou elektroforézou, purifikován (QIAquick, Qiagen), štěpen restričními endonukleázami a následně ligován přes noc při laboratorní teplotě. Ligační směsí byly transformovány buňky *E.coli* TOP10 a vysety na LB agar s kanamycinem (60 mg/l). Ligace byla ověřena Colony PCR a následnou sekvenací. Z pozitivního klonu byla provedena mini-preparace plasmidu (QIAprep, Qiagen), který byl následně použit pro transformaci expresních buněk *Escherichia coli* BL21(DE3) a *E. coli* ArcticExpress.

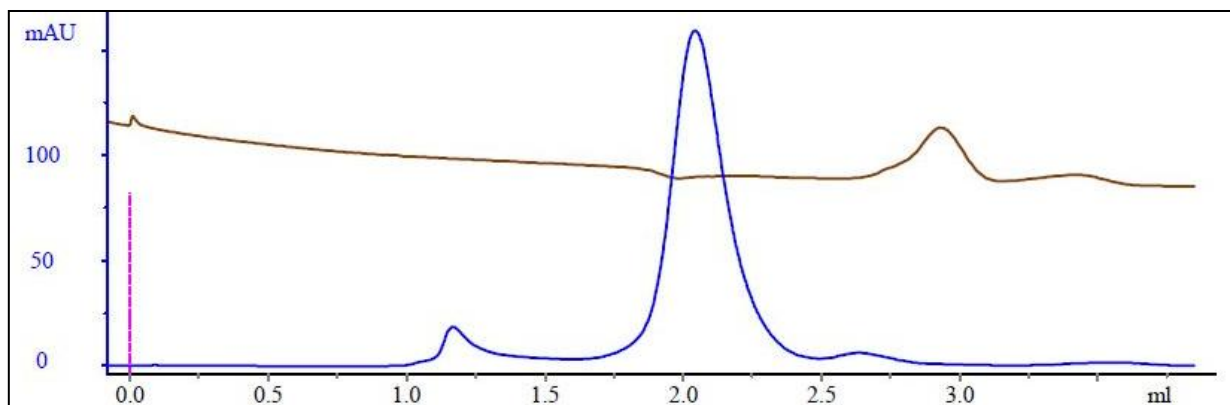
Pro optimalizaci exprese proteinu scMDH byly vyzkoušeny následující podmínky: 30 °C, 1 mM IPTG, 4 h; 20°C, 1 mM IPTG, 6h; 16°C, 1 mM IPTG, 20h; 10°C, 1 mM IPTG, 24 h. Indukce probíhala při OD₆₀₀ = 0,4 – 0,6 u BL21 a u ArcticExpress při 0,8 – 1,0. Ve všech

popsaných případech byl nalezen protein scMDH v rozpustné formě. Proto byl zvolen expresní protokol při 30 °C využívající *Escherichia coli* BL21(DE3).

Purifikační protokol scMDH, stejně jako u NGTNR, byl založen na niklové chelatační chromatografii následované gelovou chromatografií. Rozbíjení buněk a příprava cytosolární frakce proběhly analogicky NGTNR. Na obrázku č. 31 je ukázán elektroforetický gel s jednotlivými frakcemi z niklové chelatační chromatografie. Při gelové chromatografii - obrázek č. 32, str. 69 scMDH migruje na kolonce Superdex 75 5/150 s retenčním objemem odpovídajícím zhruba 45 kDa a je tedy pravděpodobně dimerní, což odpovídá velké většině dosud publikovaných dehydrogenáz s krátkým řetězcem⁵⁸. Protein scMDH při uchování v -80°C velmi rychle ztrácí aktivitu (za týden cca 50 %) nebo přímo precipituje a to i při přidávku stabilizujících aditiv. Proto bude detailní charakterizace enzymu předmětem další práce. Předběžné testy s purifikovaným preparátem potvrdily morfin 6-dehydrogenázovou aktivitu proteinu scMDH.



Obrázek č. 31 - Niklová chelatační chromatografie scMDH. Použitý objem kolonky Ni-NTA – 2 ml, eluce 10, 30, 50, 100, 150 a 500 mM imidazol v 50 mM Na₂HPO₄ 150 mM NaCl 1 mM DTT, pH 8,0; laboratorní teplota. Cytosolární frakce z 50 ml kultivace *E.coli* BL21 (DE3). M - standard molekulových velikostí (kDa), CE - cytosolární extrakt, UE - močovinný extrakt, W - odmytí nevázané frakce



Obrázek č. 32 - Gelová chromatografie scMDH na Superdex 75 5/150 Modrá křivka - A_{280} ; Hnědá křivka - konduktivita; Růžová - nástřik; Osa x celkový eluční objem

6 Diskuze

V literatuře je popsáno poměrně velké množství mikroorganismů schopných biotransformovat morfinové skelety. Skupina zabývající se mikroorganismem *Pseudomonas putida* M10 tuto problematiku sledovala podrobněji a odhalila první dva enzymové kroky u biodegradační dráhy alkaloidů morfinové řady (viz obr. 5, str. 20). Cílem této diplomové práce bylo detailně studovat stejnou problematiku s mikroorganismem *Rhizobium radiobacter* R89 biotransformující kodein s důrazem na reakce probíhající s C14 hydroxylovanými deriváty kodeinu a morfinu.

Pomocí biotransformačních experimentů byly nalezeny dvě enzymové aktivity: morfin-6-dehydrogenázová a morfinon reduktázová (viz obr. 11, str. 51). Oproti *P. putida* M10 byla nalezena také slabá 3-demetylační aktivita, jejíž účast v degradačním schématu je neznámá. Celková schopnost biotransformace se nicméně u obou organismů zásadně liší v efektivitě obou enzymových kroků. Morfinon reduktáza z *P. putida* M10 je dostatečně aktivní k tomu, aby se v biotransformační směsi hromadil převážně hydromorfon (cca 60 %). Analogický protein NGTNR z *R. radiobacter* R89 vykazuje velice nízkou aktivitu a zastoupení produktů s nasycenou vazbou 7-8 je minimální (< 1 %, 30 °C). Výsledky enzymové charakterizace proteinu NGTNR tento fakt objasňují. Za daných podmínek dochází k denaturaci proteinu a jeho aktivita *in vivo* je tedy zanedbatelná. S klesající teplotou je pravděpodobné, že dojde ke značným změnám v rozložení produktů biotransformace. Preference substrátu 14OH-kodeinonu zároveň poukazuje spíše na nárůst koncentrace oxykodonu při biotransformaci. Na rozdíl od publikovaných dat u *P. putida* M10⁴⁵ s velkou pravděpodobností nepokračuje biodegradační dráha přes hydrokodon, ale přes oxykodon či po 3-O-demetylačním kroku oxymorfonem.

Původním cílem této práce bylo pomocí proteinové chromatografie získat aktivní frakce a izolovat proteiny v dostatečných množstvích z původního mikroorganismu. Za tímto účelem byl využit částečně upravený purifikační postup a publikované vlastnosti morfin 6-dehydrogenázy a morfinon reduktázy u kmene *P. putida* M10. Pokusili jsme se tedy o izolaci pomocí afinitní chromatografie za použití Mimetic Orange[®] 3 (A6XL) a Mimetic Red[®] 2 (A6XL)^{22, 87} nebo v případě morfinon reduktázy použitím afinitní kolony Mimetic Yellow 2²³.

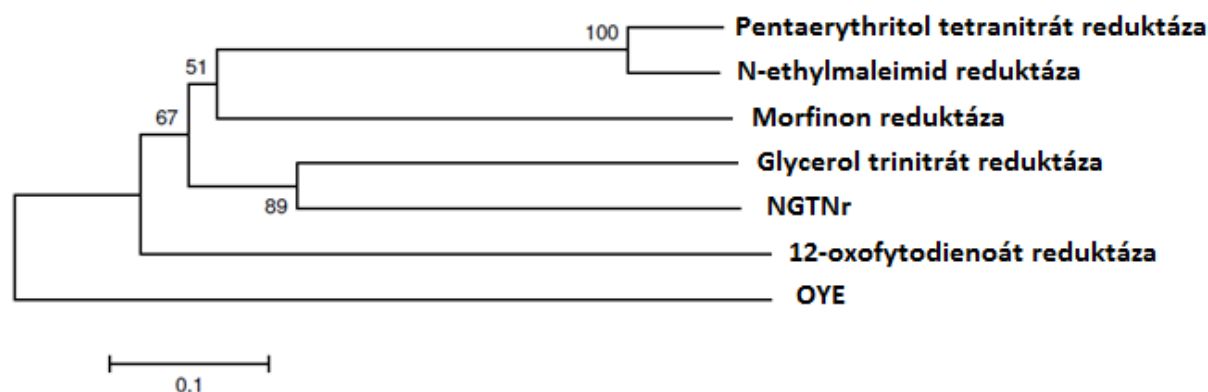
Při použití chromatografie s Mimetic Orange[®] 3 (A6XL) nebyl zaznamenán velký nárůst specifické aktivity v některé z chromatografických frakcí. Nárůst byl způsoben spíše nespecifickou vazbou na kolonu a daný protein se eluoval při velmi nízkých koncentracích NaCl (pod 100 mM). Toto zjištění naznačilo odlišné chování proteinů a proto byla zvolena metoda heterologní exprese. Až tento přístup spolu s enzymovou charakterizací objasnil příčinu neúspěchu zvoleného purifikačního postupu, protože se jedná o jiné proteiny schopné využít stejný substrát.

Prvním proteinem zapojeným do biotransformace, jehož kódující sekvence byla odhalena pomocí PCR metod, se stal 39kDa velký flavoprotein patřící do OYE rodiny. Tento enzym je psychrofilního charakteru s teplotou agregace 27,5°C a teplotním optimem 20°C. Tento fakt bohužel vede k nutnosti používat expresní protokol v buňkách *Escherichia coli* ArcticExpress při nízkých teplotách (10 °C). Proteinovou chromatografií následovanou SDS-PAGE a MS byl nalezen silný interakční partner studovaného NGTNR - protein chaperonin z rodiny GroEL, který je pravděpodobně nezbytný pro tvorbu správného prostorového uspořádání studovaného proteinu. Absence dostatečného množství tohoto proteinu či nevhodnost homologu přítomného v *E.coli* je možným důvodem, proč i při teplotách výrazně pod teplotou agregace byla nalezena určitá část proteinu v inkluzních tělískách.

Zajímavou vlastností proteinu je, že díky cysteinu obsaženému v primární aminokyselinové sekvenci je schopen tvořit během heterologní exprese dimerní formu. Tato dimerní forma však vykazuje přibližně 10 krát nižší aktivitu, než forma monomerní, a redukcí silným činidlem jako je například DTT, dojde k obnovení původní aktivity. V genomové sekvenci *Rhizobium* sp. PDO1-076 i v dalších zástupcích rodiny se nalézají anotované proteiny s disulfid izomerázovou aktivitou bez zjevného sekrečního signálu. Nelze tedy jednoduše vyloučit, že vznik dimerní formy je artefakt, ke kterému v buňce nedochází.

Naproti tomu morfinon reduktáza je popsána jako dimerní protein. Z *Rhizobium radiobacter* je popsán monomerní homolog OYE glycerol trinitrát reduktáza. Za účelem charakterizace příbuznosti získaného zástupce OYE a dalších členů byla vytvořena přiřazení a následně dendrogram, který je zobrazen na obrázku č. 33, str. 72. Jak je z umístění NGTNR patrné, má společného předchůdce s GTN reduktázou ze stejného organismu. Evoluční vzdálenost obou proteinů od ostatních zástupců je velká a při porovnání s ostatními je

zřejmé, že se jedná o nového člena OYE rodiny. Charakterizace příbuznosti GTN a NGTN je přidána jako příloha č. 6, str 88.



Obrázek č. 33 - Dendrogram OYE rodiny některých charakterizovaných členů, s důrazem na zapojení NGTNR proteinu. Pentaerythritol tetranitrát reduktáza *Eterobacter cloacae* PB2⁸⁸; N-ethylmaleimid r. *Escherichia coli* K12⁸⁹; Morfinon r. *Pseudomonas putida* M10²³; Glycerol trinitrát reduktáza (GTN) *Rhizobium radiobacter*⁷³, NGTNR *Rhizobium radiobacter* R89; 12-oxofytodienoát reduktáza⁶⁴; Old Yellow Enzyme *Saccharomyces carlbergensis*⁹⁰

K přiřazení proteinu přispěla charakterizace substrátové specifity a srovnávání s údaji dostupnými z literatury. Získané kinetické údaje jsou shrnuty v tabulce č. 12. V tabulce č. 13 jsou údaje získané pro morfinon reduktázu z *Pseudomonas putida* M10.

Tabulka č. 12 - Kinetické konstanty pro reakce katalyzované NGTNR.

Substrát - kat. NGTNR.	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m (s ⁻¹ .mM ⁻¹)	$V_{sp,20^\circ C}$ (U/mg)
Kodeinon	0,77±0,24	22,99±1,6	14,91±1,2	19,36	15,37
NADH	0,096±0,008	-	-	-	-
Nitroglycerin	-	-	-	-	41,62
14OH-kodeinon	-	-	-	-	24,45
Morfinon **	-	-	-	-	6,61
14OH-morfinon	-	-	-	-	10,33

** Morfinon byl získán jako biotransformační produkt. Je nestálý a není běžně dostupný jako standard. Získaná hodnota může být tedy zatížena značnou chybou stanovení v důsledku rozkladu a nečistot.

Tabulka č. 13 - Kinetické konstanty pro reakce katalyzované morfinon r. *P. putida* M10

Substrát - katal. MorR	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m (s ⁻¹ .mM ⁻¹)	V_{sp} (U/mg)
Kodeinon	0,26±0,02	35±1	24±1	93±9	-
NADH	0,050±0,003	-	-	-	-
cyklohex-2-en-1-on	5,5±1	0,98±0,09	0,67±0,06	0,12±0,03	-
Nitroglycerin	-	-	-	-	-0,3±0,1
1-nitrocyclohexen	-	-	-	-	0,5±0,1
2-nitrobenzaldehyd	-	-	-	-	0,5±0,1

Vzniklo sloučením dostupných dat z French a kol., 1994²³ a Williams a kol., 2004⁹¹. Specifická aktivita je měřena při 30°C.

Jak je z tabulky č. 13 na straně 72 zřejmé, morfinon reduktáza nevyužívá jako substrát GTN, na rozdíl od proteinu získaného z *Rhizobium radiobacter* R89-1. Z tohoto důvodu byl protein pojmenován NGTNR (z angl. "New Glycerol Trinitrate reductase). Zároveň byla schopností využívat GTN jako substrát potvrzena předpokládaná evoluční příbuznost proteinu. Je možné pouze spekulovat zda za změnu substrátové specifity daného enzymu je odpovědný selekční tlak způsobený vysokým obsahem alkaloidů morfinové řady v životní nise mikroorganismu.

Z kinetického hlediska je morfinon reduktáza z *P. putida* schopna efektivněji biotransformovat alkaloidy morfinové řady v optimálních podmínkách (30°C, pH 7). Data, která by umožnila oba proteiny porovnat při stejné teplotě a ukázat rozdíl v jejich optimech bohužel nejsou k dispozici. Zajímavou skutečností ukazující podobnost obou proteinů je také fakt, že morfinon reduktáza a glycerol trinitrát reduktáza (i NGTNR) využívají jako kofaktor NADH, zatímco ostatní členové OYE rodiny preferují NADPH a s NADH mají řádově nižší aktivitu.

Studium biotransformace GTN co do počtu prozkoumaných proteinů je mnohem obsáhlejší nežli studium analogických proteinů aktivních na alkaloidech morfinové řady. Následující tabulka č. 14 ukazuje zjištěnou specifickou aktivitu za daných podmínek pro některé charakterizované enzymy. Do tabulky je v této práci také zařazena heterologně exprimovaná a charakterizovaná NGTNR. Je zřejmé, že u žádného z dosud sledovaných proteinů nebylo popsáno tak nízké teplotní optimum. Ačkoli NGTNR má nízké teplotní optimum, přesto je nalezená aktivita srovnatelná s popsány proteiny. Nižší hodnotu lze vysvětlit Van't Hoffovým pravidlem. Protože hodnota teplotního optima NGTNR je položena přibližně o 10 stupňů Celsia níže než u dosud popsanych proteinů, reakční rychlost odpovídá polovině.

Tabulka č. 14 - Aktivita vybraných proteinů OYE s GTN.

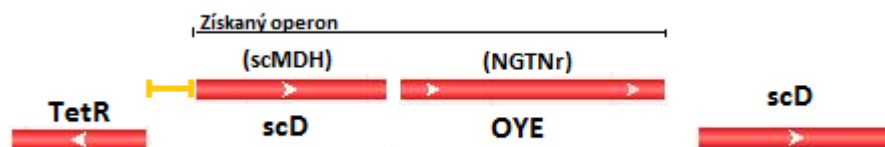
Mikroorganismus	Protein	Aktivita s GTN [U.mg ⁻¹]	°C	Ref.
<i>Pseudomonas putida</i> II-B	Nitroester reduktáza	124 ± 6	25	92
<i>P. fluorescens</i> I-C	Nitroester reduktáza	110 ± 11	25	92
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	GTN, gen NerA	3,1 ± 0,1	30	93
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	GTN	15,02*	Rt	73
<i>Enterobacter cloacae</i> PB2	PETN reduktáza	12,1 ± 0,5	Rt	88
<i>Enterobacter cloacae</i>	PETN reduktáza	35,5 ± 3,1	30	91
<i>Escherichia coli</i>	NEM reduktáza	37,9 ± 5,3	30	91
<i>Rhizobium radiobacter</i> R89	NGTNR	17,82 ± 1,3	18	

* Pouze v tomto případě byla aktivita měřena sledováním GTN. Získané hodnoty jsou za využití NADH. Ve sloupci teplota je Rt označena neznámá/nepublikovaná hodnota a je tedy předpokládána teplota laboratorní.

Druhý získaný protein byl scMDH (morfin dehydrogenáza s krátkým řetězcem). Oproti NGTNR je jeho teplotní optimum, teplota agregace a denaturace podstatně vyšší, v rozmezí 30 a 40°C a tedy srovnatelná s dosud charakterizovanými proteiny s morfin dehydrogenázovou aktivitou. Z porovnání sekvencí vyplynulo, že scMDH není příbuzná s MDH z *Pseudomonas putida* M10 (aldo-keto reduktázová rodina), ale s enzymem β -hydroxysteroidní dehydrogenázou z *Comamonas testosteroni* (*Pseudomonas testosteroni*). Přiřazení je přiloženo jako příloha č. 7, str. 88.

Získaný protein scMDH pravděpodobně vytváří dimerní formu na rozdíl od tetrameru dehydrogenázy s krátkým řetězcem z *C. testosteroni*. Dendrogram sekvenční homologie s příbuznými proteiny je zobrazen v příloze č. 6 na straně 87. Mezi fylogeneticky příbuznými proteiny byl nalezen nejbližší anotovaný protein serin 3-dehydrogenáza, u kterého dosud morfin dehydrogenázová aktivita nebyla popsána. Bohužel z časových důvodů a nestability námi purifikovaného proteinu nebyla u scMDH stanovena substrátová specifita, která by pomohla naznačit fyziologickou funkci daného proteinu. Vzhledem k faktu, že NGTNR a scMDH jsou obsaženy v jednom operonu a tedy se stejnou regulací, nabízí se možnost funkce v jedné biochemické dráze v případě morfinu respektive kodeinu.

Význam získaného operonu a popsaných reakcí je dosud neobjasněný stejně jako obecná role biotransformace alkaloidů morfinové řady. Při hledání nejbližších homologů *Rhizobium radiobacter* R89 podle příbuznosti genů v objeveném operonu byla nalezeno striktní uspořádání: Transkripční regulátor TetR + operon obsahující OYE a SCD (někdy inverzně) spolu s dalším SCD mimo operon (u 80% případů). Toto uspořádání bylo nalezeno i u nepříbuzných organismů jako *Rahnella aquatis* CIP 78.65, *Enterobacter* sp. 638, *Pseudomonas fluorescens* SBW25, *Dickeya zea* Ech1591, *Shewanella baltica* OS223, *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3 a u mnoha dalších. Charakteristické uspořádání je schématicky zobrazeno na obrázku č. 34 na straně 75. Lze tedy usuzovat, že fyziologicky (metabolicky) mají všechny tyto geny souvislost a tvoří genový shluk (z angl. "cluster").



Obrázek č. 34 - Charakteristické uspořádání genů obsahující nalezený operon. Krátký konzervativní úsek vyznačen žlutě.

Přiřazením genů *scD* mimo operon a *TetR* transkripčního regulátoru nebyly získány výsledky, které by mohly napovědět o původu či účelu tohoto uspořádání. Zajímavé údaje ovšem přineslo až přiřazení krátkého úseku mezi geny *TetR* a *scD* (na obr. č. 34 vyznačeno krátkou úsečkou), které je vysoce konzervativní a v genomech *Rhizobií* unikátní. Vyskytuje se pouze jednou, většinou v asociaci s přenašečovými proteiny – MFS transporter (*R. tropici* CIAT 899), monokarboxylátový transporter (*R. etli* CIAT 652) a další. Výjimkou je právě výskyt námi popisovaného operonu zobrazeného na obrázku č. 34. Dále je překvapivě sekvence součástí genu transkripčního regulátoru *TetR* (s 242 aminokyselinami místo klasických 182) v identické formaci u Ti plasmidu pTiBo542 *Agrobacterium tumefaciens* (GenBank: DQ058764.1). Ti plasmid je odpovědný za rostlinnou patogenezí. Jediná dosud známá funkce *TetR* regulátoru u aromatických sloučenin (alkaloidy morfinové řady) je represe genů pro degradaci – cymenu a kumátu u *P. putida* F1⁹⁴. Strukturálně velmi blízká látka je acetosyringon (α -keton) dobře známý svou úlohou v patogenicitě *Agrobacteria*⁹⁵, ale také obecném rozpoznávání rostliny při nodulaci, kde by *TetR* mohl hrát určitou roli. Popisované unikátní uspořádání s transkripčním regulátorem *TetR* má pravděpodobně fyziologickou funkci v rozpoznání aromatických sekundárních metabolitů a může vést k začátku jejich utilizace. Podporujícím argumentem je fakt, že transkripční regulátor *TetR* je asociován i s jinými členy *OYE* v podobném uspořádání například u *Polaromonas naphthalnivorans* CJ2, kde bylo nalezeno uspořádání *TetR*+*OYE*+aldehyd dehydrogenáza a u *Ralsonia pickettlii* 12J *TetR*+*OYE*+Zn vázající alkohol dehydrogenáza. Nalezený genový shluk bude podroben dalšímu studiu exprese jednotlivých genů i výskytu a evoluce mezi jednotlivými mikroorganismy s cílem odhalení možného horizontálního genového přenosu.

Požadavek rozpoznávání aromatického kruhu alkaloidů morfinové řady pravděpodobně mohl vést k následnému pozměnění substrátové specifity. Jedná se však pouze o spekulaci na základě výskytu unikátního genového uskupení. Jisté je, že původní fyziologická funkce

uspořádání není utilizace alkaloidů morfinové řady, protože se vyskytuje i u organismů, které s nimi nikdy nemohly přijít přirozeně do styku, jako je vodní mikroorganismus *Rahnella aquatis*.

Předpokládaný selekční tlak může mít tedy zásadní vliv na evoluci schopnosti biotransformovat/utilizovat alkaloidy morfinové řady. Jeho skutečný mechanismus je ovšem dosud nezodpovězen.

V posledních několika letech byla objevena účast OYE proteinů v reakci na oxidační stres a také modulaci programované buněčné smrti^{96, 97}. Je možné, že protein NGTNR by mohl jako zástupce OYE rodiny v *Rhizobium radiobacter* R89 mít podobnou funkci.

Při pohledu na reakční schéma obr. č. 12, str. 53 je zřejmá zásadní role kodeinonu (resp. morfinonu) jako reaktivního toxického meziproductu, jehož existence je co nejméně omezoována. V tomto ohledu C14 hydroxylace stabilizuje molekulu, brání adici molekuly na SH-skupiny přes svoji dvojnou vazbu mezi uhlíky 7 a 8. Tím pravděpodobně výrazně snižuje toxicitu. Naproti tomu je popsáno, že při 14-hydroxylační reakci vzniká vysoce reaktivní peroxid jako meziproduct²¹, který může být příčinou oxidačního stresu. Ke konečnému vyloučení toxicity způsobené adičními reakcemi dojde po nasycení vazby mezi uhlíky 7 a 8 za účasti morfinon reductázy (kodeinon) či enzymu NGTNR (14OH-kodeinon). Počáteční reakce schématu (obr. č. 12, str. 53) lze tedy chápat jako jakési rychlé vytvoření netoxického produktu, který pak může být dále postupně využíván. Je tedy možné navrhnout hypotézu, že v případě biotransformace morfinu se jedná o určitou adaptaci na stres vyvolaný toxicitou morfinonu vůči mikroorganismům.

Popsaná toxicita je bohužel komplikujícím faktorem pro biotechnologické využití. Pouze některé kmeny mikroorganismů jsou schopné přežít a prosperovat v prostředí s vysokou koncentrací alkaloidů morfinové řady. Z biotechnologického pohledu bude muset být mikroorganismus, v kterém bude heterologně exprimován NGTNR nebo scMDH schopen tolerovat vysoké koncentrace toxického morfinu zajišťující dostatečnou efektivitu bioproduktu. Nezbytnost NADH (NGTNR) či NADP⁺ (scMDH) neumožňuje provádění biotransformace s imobilizovaným enzymem v průmyslovém měřítku, a proto je možné pouze využití celobuněčných transformací.

7 Závěr

Byly klonovány a exprimovány strukturní geny kódující první dva enzymové kroky degradační/biotransformační dráhy alkaloidů morfinové řady mikroorganismu *Rhizobium radiobacter* R89 v *Escherichia coli*.

- Byl charakterizován biotransformační potenciál kmene *Rhizobium radiobacter* R89 při 30 °C, včetně minoritně zastoupených produktů.
- Metodami molekulární biologie byl identifikován a charakterizován degradační operon odpovědný za morfin dehydrogenázovou a morfinon reduktázovou aktivitu.
- Získané geny byly klonovány do expresního vektoru pET28b. Tyto geny byly exprimovány v různých hostitelských kmenech *Escherichia coli*. Byla optimalizována exprese a následně purifikace enzymů, za účelem vysokých výtěžků jejich rozpustných forem.
- Oba proteiny byly částečně biochemicky charakterizovány. Byly nalezeny základní kinetické parametry, teplotní a pH optima, agregační teplota a celková stabilita u NGTN reduktázy. U tohoto proteinu také bylo rozšířeno dosud známé substrátové spektrum o další látky s důrazem na 14OH deriváty alkaloidů morfinové řady.
- U proteinu NGTN reduktázy byly nalezeny základní krystalizační podmínky vhodné pro optimalizaci produkce difraktujících krystalů.

8 Seznam použité literatury

1. Pelletier, S. W.: *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. John Wiley and Sons, New York (1983)
2. Aniszewski, T.: *Alcaloids - secrets of life*. Elsevier, Amsterdam (2007)
3. Schnell, B.R.: *Compendium of Pharmaceuticals and Specialties*. Canadian Pharmacists Association, British Columbia (1999)
4. Buděšinský, Z., Protiva, M.: *Synthetická léčiva*. Nakladatelství československé akademie věd, Praha, str. 165-199 (1954)
5. Kumagai, K., Todaka, T., Toki, S.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255, 504-510 (1990)
6. Todaka, T., Ishida, T., Kita, H., Narimatsu, S., Yamano, S.: *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1275-1280 (2005)
7. Walker, E.H., French, C.E., Rathbone, D.A., Bruce, N.C.: *Biochem.* 345, 687-692 (2000)
8. Janecka, A., Fichna, J., Janecki, T.: *Curr. Top. Med. Chem.* 4, 1-17 (2004)
9. Stein, C., Schäfer, M., Machelska, H.: *Nature Med.* 9, 1003-1008 (2003)
10. Perry, G.F., Portenoy, R.K.: *A Clinical Guide to Opioid Analgesia*. Minneapolis, McGraw Hill (2004)
11. Trescot, A.M., Datta, S., Lee, M., Hansen, H.: *Pain Phys.* 11, 133-153 (2008)
12. Pereira, J., Lawlor, P., Vigano, A.: *J. Pain Symptom. Manage.* 22, 672-687 (2001)
13. Shaheen, E.P., Walsh, D., Lasheen, W.: *J. Pain Symptom. Manage.* 38, 409-417 (2009)
14. Cherny, N.I.: *Drugs.* 51, 713-737 (1996)
15. Melichar, B., Čeladník, M., Palát, K., Kňazko, L., Nováček, L., Sova, J.: *Chemická léčiva*. Avicenum, Praha (1972)
16. Kapoor, L.D.: *Opium Poppy: Botany, Chemistry and Pharmacology*. The Haworth Press, Binhamton, New York (1995)
17. Balažová, A., Pšenák, M.: *Chem.Listy.* 92, 1006-1015 (1998)
18. Torsten, G., Lenz, R., Kutchan, T.M.: *J. Biol. Chem.* 276, 30717-30723 (2001)
19. Advisory Group, WHO. *Bull. Narcot.* 32, 45-54 (1980)
20. Gollwitzer, J., Lenz, R., Hampp, N., Zenk, M.H.: *Tetrahedron Lett.* 34, 5073 (1993)
21. Zhang, Q., Rich, J.O., Cotterill, I.C., Pantaleone, D.P., Michels, P.C.: *J. Am. Chem. Soc.* 127, 7286-7287 (2005)
22. Bruce, N.C., Wilmont, C.J., Jordan, N.K., Stephens, D.G., Lowe C.R.: *Biochem. J.* 274, 875-880 (1991)
23. French C.E., Bruce, N.C.: *Biochem. J.* 301, 97-103 (1994)
24. Cameron, G.W., Jordan, K.N., Holt, P.J., Baker, P.B., Lowe, C.R., Bruce, N.C.: *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3881-3883 (1994)

25. Iizuka, K., Okuda, S., Aida, K., Asai, T., Tsuda, K., Yamada, M., Seki, I.: *Chem. Pharm. Bull.* 8, 1056–1057 (1960)
26. Liras, P., Umbreit, W.W.: *Appl. Microbiol.* 30, 262-266 (1975)
27. Liras, P., Kasparlian, S.S., Umbreit, W.W.: *Appl. Microbiol.* 30, 650-656 (1975)
28. Madyastha, K.M., Reddy, G.V.B., Sridhar, G.R.: *Indian J. Chem. Sec. B.* 37, 749-753 (1998)
29. Kyslíková, E., Babiak, P., Šepánek, V., Zahradník, J., Palyzová, A., Marešová, H., Valešová, R., Hájíček, J., Kyslík, P.: *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 87, 1-5 (2013)
30. Kunz, D.A., Reddy, G.S., Vatvars, A.: *Appl. Env. Microbiol.* 50, 831-836 (1985)
31. Harder, P.A., Kunz, D.A.: Bacterial hydroxylation of codeine, United States Patent No. 4 798 792 (1989)
32. Rao, S.R., Tripathi, U., Ravishankar, G.A.: *J. Microbiol. Biotechnol.* 15, 465-469 (1999)
33. Abel, A.M., Carnell, A.J., Davis, J.A., Paylor, M.: *Enz. Microbiol. Technol.* 33, 743-748 (2003)
34. Madyastha, K.M.: *Proc. Indian Acad. Sci.* 106, 1203-1212 (1994)
35. Gibson, M., Sopher, C.J., Parfitt, R.T., Sewell, G.J.: *Enz. Microbiol. Technol.* 6, 471-475 (1984)
36. Chaudhary, V., Leisch, H., Moudra, A., Allen, B., De Luca, V., Cox, D.P., Hudlický, T.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 1179-1193 (2009)
37. Stabler, P.J., Bruce, N.C.: *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4106-4108 (1998)
38. Niknam, S., Faramarzi, M.A., Abdi, K., Yazdi, M.T., Amini, M., Rastegar, H.: *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 119-123 (2010)
39. Yamano, S., Kageura, E., Ishida, T., Toki, S.: *J. Biol. Chem.* 260, 5259-5264 (1985)
40. Boerner, U., Abott, S., Roe, R.L.: *Drug Metab.Rev.* 4, 39-73 (1975)
41. Gomes, N.C.M., Kosheleva, I.A., Abraham, W.R., Smalla, K.: *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 21-33 (2005)
42. Bruce, N.C., Wilmot, C.J., Jordan, N.K., Trebilcock, E.A., Stephens, G.L.D., Lowe C.R.: *Arch. Microbiol.* 154: 465-470 (1990)
43. Hailes A.M., Bruce N.C.: *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2166-2170 (1993)
44. Bruce, N.C., French, C.E., Hailes, A.M., Long, M.T., Rathbone, D.A.: *Trends Biotech.* 13: 200-205 (1995)
45. Boonstra, B., Rathbone, D.A., Bruce, N.C.: *Biomol. Engineering.* 18: 41-47 (2001)
46. Long, M.T., Hailes, A.M., Kirby, G.W., Bruce, N.C.: *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3645-3649 (1995)
47. McKellar, R.C., van Geest, J., Cui, W.: *Food Hydrocolloids.* 17: 429-437 (2003)
48. Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martínez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H.: *Internat.l J. System. Evolut. Microbiol.* 51, 89-103 (2001)
49. Lenz, R., Zenk, M.H.: *Eur. J. Biochem.* 233, 132-139 (1995)

50. Bruce, N.C., Willey, D.L., Coulson F.A., Jeffery, J.: *Biochem. J.* 299, 805-811 (1994)
51. Jez, J.M., Bennett, M.J., Schlegel, B.P., Lewis, M., Penning T.M.: *Biochem. J.* 326, 625-636 (1997)
52. Wilson, D.K., Bohren, K.M., Gabbay, K.H., Quicho, F.A.: *Science*. 257, 81-84 (1992)
53. [http://www.pdb.org/pdb/results/results.do?qrid=82F1EBB8&tabtoshow=Current](http://www.pdb.org/pdb/results/results.do?qrid=82F1EBB8&tabtoshow=Current;); 10.3. 2013.
54. Scoble, J., Mcalister, A.D., Fulton, Z., Troy, S., Byres, E., Vivian, J.P., Brammananth, R., Wilce, M.C., Le Nours, J., Zaker-Tabrizi, L., Coppel, R.L., Crellin, P.K., Rossjohn, J., Beddoe, T.: *J.Mol.Biol.* 398, 26-39 (2010)
55. Benach, J., Filling, C., Oppermann, U.C.T., Roversi, P., Bricogne, G., Berndt, K.D., Jornvall, H., Ladenstein, R.: *Biochemistry*. 41, 14659-14668 (2002)
56. Ghosh, D., Weeks, C.M., Grochulski, P., Duax, W.L., Erman, M., Rimsay, R.L., Orr, J.C.: *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*. 88, 10064-10068 (1991)
57. Oppermann, U., Filling, Ch., Hult, M., Shafqat, N., Wua, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordlinga, E., Kallberga, Y., Persson, B., Jowall, H.: *Chem. Biol. Interact.* 143, 247-253 (2003)
58. Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S, González-Duarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D.: *Biochemistry*. 34, 6003-6013 (1995)
59. <http://pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureid=1HXH>. PDB; 29.4.2013.
60. French, C.E., Bruce, N.C.: *Biochem. J.* 312, 671-678 (1995)
61. Warbur, O., Christian, W. *Biochem. Z.* 266,377-411 (1933)
62. Matthews, R.G., Massey V.: *J. Biol.Chem.* 244, 1779-1786 (1969)
63. Rowland, P., Nielsen, F.S., Jensen, K.F., Larsen, S.: *Structure*. 5, 239-252 (1997)
64. Blehert, D.S., Fox, B.G., Chambliss, G.H.: *J. Bacteriol.* 181, 6254-6263 (1999)
65. Breithaupt, C., Strassner, J., Breitinge, U., Huber, R., Macheroux, P., Schaller, A., Clausen, T.: *Structure*. 9, 419-429 (2001)
66. Kubata, B.K., Kabututu, Z., Nozaki, T., Munday, C.J., Fukuzumi, S., Ohkubo, K., Lazarus, M., Maruyama, T., Martin, K.S., Duszenko, M., Urade, Y.: *J. Exp. Med.* 196, 1241-1252 (2002)
67. Kitzing, K., Fitzpatrick, T.B, Wilken, C., Sawa, J., Bourenkov, G.P., Macheroux, P., Clausen, T.: *J. Biol. Chem.* 280, 27904-27913 (2005)
68. Opperman, D.J., Piater, L.A., van Heerden E.: *J. Bacteriol.* 190, 3076-3082 (2008)
69. Barna, T., Messiha, H.L., Petosa C., Bruce, N.C., Scrutton, N.S.: *J. Biol. Chem.* 277, 30976-30983 (2002)
70. Khan, H., Harris, R.J., Barna, T., Craig, D.H., Bruce, N.C., Munro, A.W., Moody, P.C., Scrutton, N.S.: *J. Biol. Chem.* 277, 21906-21912 (2002)
71. Pudney, C.R., McGrory, T., Lafite, P., Pang, J., Hay, S., Leys, D., Sutcliffe, M.J., Scrutton, N.S.: *Eur. J. Chem. Biol.* 10, 1379-1384 (2009)
72. Pudney, C.R., Hay, S., Pang, J., Costello, C., Leys, D., Sutcliffe, M.J., Scrutton, N.S.: *J. Am. Chem. Soc.* 129, 13949-13956 (2007)

73. Snape, J.R., Walkley, N.A., Morby, A.P., Nicklin, S., White, G.F.: *J. Biotechnol.* 179, 7796-7802 (1997)
74. Masoud, N.A.: *J. Pharm. Sci.* 64, 841-844 (1975)
75. Bradford, M.M.: *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)
76. Boehmer, P.E., Lehman, I.R.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 8444-8448 (1993)
77. Brody, R.J., Kern, E.S.: *Bio. Techniques.* 36, 214-215 (2004)
78. Brody, R.J., Kern, E.S.: *Anal. Biochem.* 333, 1-13 (2004)
79. Laemmli, U.K.: *Nature.* 227, 680-685 (1970)
80. Schagger, H.: *Nature Protocols.* 1, 16-23 (2006)
81. Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y., Suirgo, Y.: *Nucleic Acids Res.* 18, 6169 (1990)
82. Hanahan, D., Jessee, J., Bloom, F.R.: *Methods Enzymol.* 204, 63-113 (1991)
83. Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. *Gene.* 96, 23-28 (1990)
84. Frey, P.A., Ables, R.H., Hegeman, A.D.: *Enzymatic Reaction Mechanism.* Oxford Univ. Press, Wisconsin (2006)
85. Ericsson, U.B., Hallberg, B.M., DeTitta, G.T., Dekker, N., Nordlund, P.: *Anal. Biochem.* 357, 289-298 (2006)
86. Forneris, F., Orru, R., Bonivento, D., Chiarelli, L.R., Mattevi, A.: *FEBS J.* 276, 2833-2840 (2009)
87. Willey, D.L., Caswell, D.A., Lowe, C.R., Bruce, N.C.: *Biochem. J.* 290, 539-544 (1993)
88. French, C.E., Nicklin, S., Bruce, N.C.: *J. Bacteriol.* 178, 6623-6627 (1996)
89. Miura, K., Tomioka, Y., Suzuki, H., Yonezawa, M., Hishinuma, T., Mizugaki, M.: *Biol. Pharm. Bull.* 20, 110-112 (1997)
90. Saito, K., Thiele, D.J., Davio, M., Lockridge, O., Massey, V.: *J. Biol. Chem.* 266, 20720-20724 (1991)
91. Williams, R.A., Rathbone, D.A., Scrutton, N.S., Bruce, N.C.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3566-3574 (2004)
92. Blehert, D.S., Knoke, K.L., Fox, B.G., Chambliss, G.H.: *J. Bacteriol.* 179, 6912-6920 (1997)
93. Marshall, S.J., Krause, D., Blencowe, D.K., White, G.F.: *J. Bacteriol.* 186, 1802-1810 (2003)
94. Tropel D., Meer J.R.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 474-500 (2004)
95. Baker, C.J., Mock, N.M., Whitaker, B.D., Roberts, D.P., Rice, C.P., Deahl, K.L. Yanov, A.A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 130-136 (2005)
96. Odat, O., Matta, S., Khalil, H., Kampranis, S.C., Pfau, R., Tschlis, P.N.: *J. Biol. Chem.* 282, 36010-36023 (2007)
97. Fitzpatrick, T.B., Amrhein, N., Macheroux, P.: *J. Biol. Chem.* 278, 19891-19897 (2003)
98. Brown, S.D., Klingeman, D.M., Lu T.Y., Johnson, C.M., Utturkar, S.M., Land, M.L., Schadt, C.W., Doktycz, M.J., Pelletier, D.A.: *J. Bacteriol.* 194, 2383-2384 (2012)

99. Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Quorollo, B., Goldman, B.S., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lappas, C.: *Science*. 294, 2323-2328 (2001)
100. Hao, X., Lin, Y., Johnstone, L., Liu, G., Wang, G., Wei, G., McDermott, T. J.: *Bacteriol.* 194, 903-904 (2012)
101. Hao, X., Xie, P., Johnstone, L., Miller, S.J., Rensing, C., Wei G.: *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5384-5394 (2012)
102. Trimble, W.L., Phung le, T., Meyer, F., Gilbert, J.A., Silver, S.: *J. Bacteriol.* 194, 6986-6987 (2012)
103. Ormeno-Orrillo, E., Menna, P., Almeida, L.G., Ollero, F.J., Nicolas, M.F., Pains, R.E., Shigueyoshi, N.A., Silva B.J.S., Oliveira, C.L.M., Souza R.C., Vasconcelos, R.A.T., Megias, M., Hungria, M., Martinez-Romero, E.: *BMC Genomics*. 13, 735 (2012)
104. Schuldes, J., Rodriguez, O.M., Schmeisser, C., Krishnan, H.B., Daniel, R., Streit, W.R.: *J. Bacteriol.* 194, 4483 (2012)
105. Gong, W., Kisiela, M., Schilhabel, M.B., Xiong, G., Maser, E.: *J. Bacteriol.* 194, 1633-1634 (2012)

9 Přílohy

Příloha č. 1 - Přiřazení získaného genu a identifikace jako glycerol trinitrát reduktáza

```
GTN_reductase      RISHTSLQPHGGQPVAPSAITAKSKTYIINDDGTGAFSAETSEPRALTIDD
PCR-amplified_sequence RISHVNLQPNGGAPVAPSAIRAEVKT FVNN----GFVDVSEPRALELEE
****.***:** ***** *: **: *      .*.***** **:

GTN_reductase      IGLILEDYRSGARAAL EAGFDGVEIHAANGYLIEQFLKSSSTNQRTDDYGG
PCR-amplified_sequence LAGIVDDFRKAAANSIEAGFDGVEVHGANGYLLEQFAKDGANMRTDTYGG
:. **:***:..*  :*****:*.*****:*** *..:* *** **

GTN_reductase      SIENRARFLEVVDAVAEEIGAGRTGIRLSPVTPANDIFEADPQPLYNYV
PCR-amplified_sequence SVENRARLMLEVTAAVAQEIGPERTGIRISPVSPANGISCSDPQTQYDYI
*:*****:***. **:***. *****:***:***.*  :***. **:

GTN_reductase      VEQLGKRNLAFIHVVEGATGGPRDFKQGDKPFDYASFKAAYRNAGGKGLW
PCR-amplified_sequence VDKLDALGIAYIHVVEGATGGPRDVA----PFDYGSLRRRFSRT-----Y
*:.*.  .*:*****.      ****.*: : .:  :

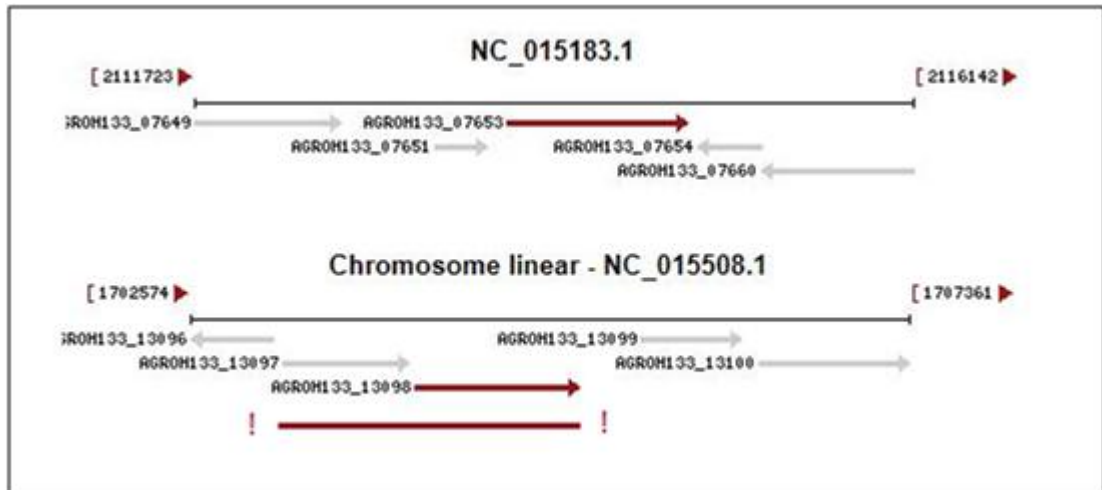
GTN_reductase      IANNGYDRQSAIEAVESGKVDAVAFGKAFIANPDLVRLKNDAPLNAPNQ
PCR-amplified_sequence IANNGFDLELATSHLADGRADLIAFGRPFIANPDLVERLQSGAPLAEVNA
*****:* : * . : .*:.* :***:*****.***:..*** *

GTN_reductase      PTFYGGGAE
PCR-amplified_sequence AKIFGGSAA
...:***.*
```

Přiřazení je zpracováno pomocí webového nástroje ClustalW 2.0.12 (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::clustalw-multialign>)

Příloha č. 2 - Porovnání lokalizace GTN reduktáz

Porovnáním lokalizace GTN reduktáz s lokalizací získané *morR* sekvence bylo zjištěno, že operon obsahující gen *morR* a gen *scD* je obsažen pouze v nejbližších homolozích *Rhizobium radiobacter* R89. Ostatní GTN reduktázy jsou lokalizované jinde. Jak bylo později zjištěno, operon je součástí většího celku genů - shluku, který se v mutované podobě nachází u mnoha mikroorganismů.



Hledaný gen GTN reduktázy je zobrazen červenou šipkou. Ostatní geny jsou šedě. Hledaný operon je na chromosomu *Rhizobium* sp. H13-3 (blízký homolog *R. radiobacter* R89) a na plasmidu NC_015183.1 je jiný gen pro GTN *Agrobacteria* sp (ilustruje jinou lokalizaci). Lokalizace GTN v operonu společně s short-chain dehydrogenázou je vyznačeno červenou čarou s vykřičníky. Data jsou získána z NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>; megablast, základní nastavení - threshold 10, word size 28), 16.2.2013.

Příloha č.3 - celková analýza získané nukleotidové sekvence operonu

GCCGTCATATTTAAACACAATCATGATGATCGTCATGAATATAGGGTCAACCGTAGAA
AAGAGCAATCCAAAATGACTCAGATTCCCTTAGTCTTGATCACCGGCGCCTCCACAGG
GATTGGCGCGACCTATGCCGAACGGTTCGCACGCCGCGGACATGATCTCGTGCTCGTC
GCCCGAGACGTTGTGCGCATGGAGGCGCTTGCAAGCCGTCTGCGCGACGAAACCGGCG
TCGCAATCGACATCCTTCTGCCGATCTCACCAAGTCTGAGGACTTGGCCAAGGTCTGA
GACCAGGCTGCGCGACGACGCCCGGATCGGCATACTTGTCAACAATGCCGGAACGGCG
ATAGGTGGAAGCTTCGTGACAGAGCGTTCGATGACATGACCAAGCTCGTTGGGCTTA
ACGCAACCGCACTCGTCAGGCTTTCAGCGCGATTGCTCCCCGTCTTGCCAAGGCAGG
GGAAGGCTCGATCGTGAATATCGGTTCCGGTCGTCGGCCTCGCCCCGAATTCGGCATG
ACCGTTTATGGCGCGACCAAGGCCTTTGTCTGTTTCTGTCCCAGGGACTTGCCCATG
AGCTCGGATCCAAGGGTGTCTACATCCAGGCCGTTCTTCCC GCGACGACCCGCACCGA
GATCTGGGATCACGTCGGCGCCGACGTGAGCGCAATGAGCAATGTCATGGAAGTGGGC
GATCTGGTTGATGCCGCTCTCGTCGGCTTCGACCGTCGCGAACC GG TGACCATCCCTC
CGCTGCACGACGGCGGCCAGTGGGACGCGCTTGATGGCGCGCGCAAAGCCATGCTCGG
CAATCTCGTCAATGCAGTTC GCGCTGAACGCTATCGGACGCGCGCTGA GCTTTCCGA
CGTCGATGAATCCACACCGATCCAGAGAAACATCACAGTGATATCATGACCAAGACCA
CACTCTTCCAACCCACCAGCTTAGGCGCAATCACGCTTGCAAACCGCATCGTCATGGC
GCCGCTCACCCGCAATCGCGCCGGCGCTGGCTTCGTGCCCGGCGAGCTGACCGCCGGG
TATTACGCCAGCGGGCTTCGGCCGACTGATCATCTCCGAAGCCACTCAAATTTCCG
AGCAGGGACAAGGCTACCAGGACACGCCCGGTATCTATACCCAGGCGCAGATCGATGG
CTGGAAAAGGTCACCGCCGCGTGCACAAGAAGGGCGGGCGGATCGTCCTGCAGCTC
TGGCATGTGGGCGGATCAGCCATGTCAACCTTCAGCCCAATGGTGCGCACCAGTCG
CGCCATCTGCAATCCGGGCGGAAGTCAAACATTCGTCAACAACGGCTTCGTTCGATGT
TTCGGAGCCTCGCGCGCTTGAGCTGGAAGAACTCGCTGGAATCGTCGATGATTTCCGC
AAGGCCGCCGCAATTCATCGAGGCGGGTTTTGATGGGGTCAAGTTCACGGGGCCA
ACGGTTATTTGCTCGAGCAGTTCGCCAAGGACGGTGCCAATATGCGTACAGATACCTA
TGCGGGCTCCGTGGAAAACCGCGCGCCTGATGCTTGAGGTGACCGCTGCGGTGGCG
CAGGAGATCGGACCCGAACGCACCGGGATCCGGATTTCCCGGTCTCGCCCGCCAACG
GTATTTCTGCAGTGATCCCCAGACGCAGTACGATTACATTTGTCGATAAACTCGATGC
TCTCGGTATCGCCTACATTCATGTCGTGCAAGGTGCTACCGGCGGACCCCGCGACGTC
GCACCCTTTGATTATGGTTGCTGCGCCGCGCTTCAGCAGAACCTACATCGCCAACA
ATGGCTTTGATCTCGAGCTTGCAGCGTCGCATCTGGCCGATGGCAGGGCGGATCTCAT
CGCTTTCCGGGCGTCCGTTCATTGCCAATCCGGACCTGGTGAACGGCTACAGAGCGGT
GCGCCATTGGCGGAAGTGAACGCGGCTAAAATCTTCGGTGGCAGCGCTGCGGGTTATA
CCGACTATCCCCGCTTTTCCGAAACAACGTCCGACAATTGAGCCATCACTGGCGCCGT
ACCTCGGTGCGGGCCCTATCATGCAGATCACCAATAA

Legenda: *Gen short-chain dehydrogenázy (scD)*

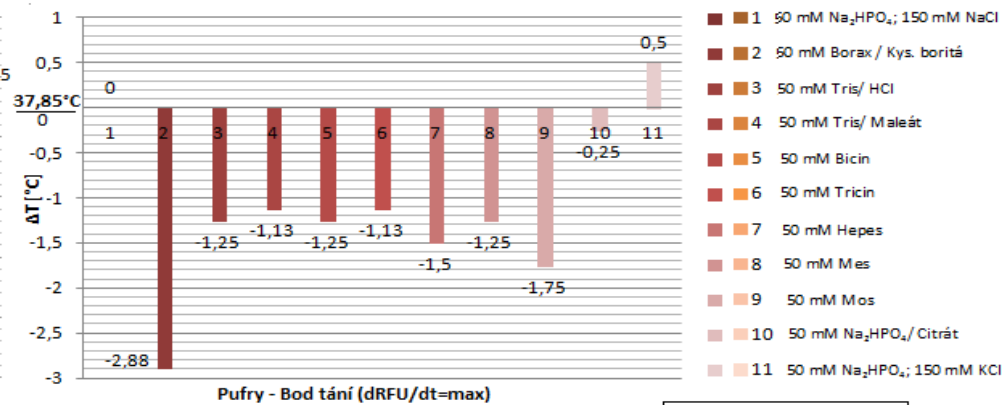
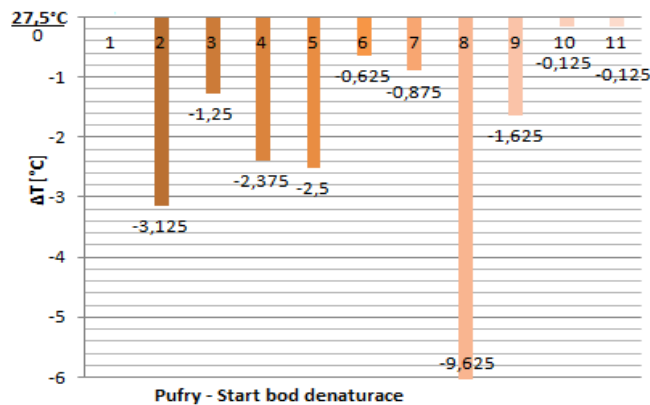
Gen NGTN reduktázy (*morR*)

fragment genu reduktázy amplifikovaný degenerovanými primery

PCR primery

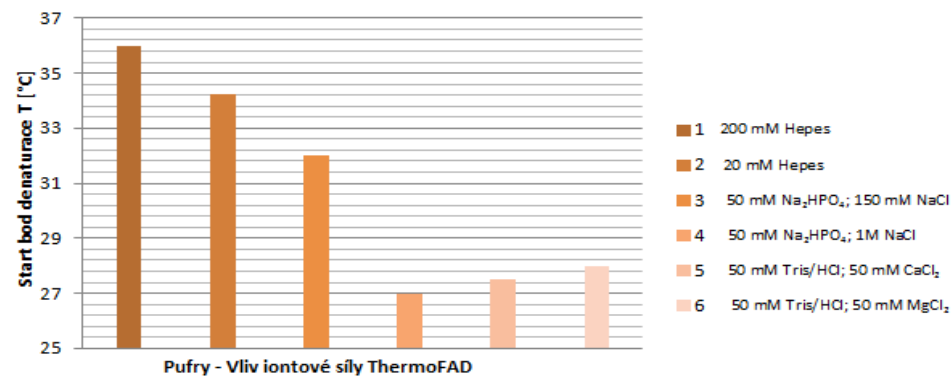
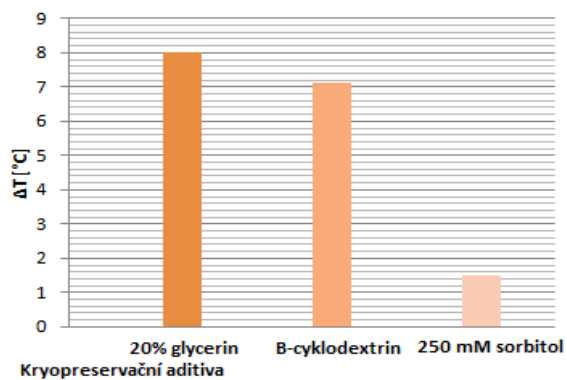
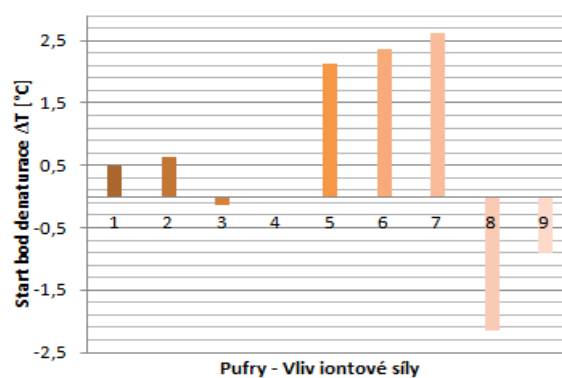
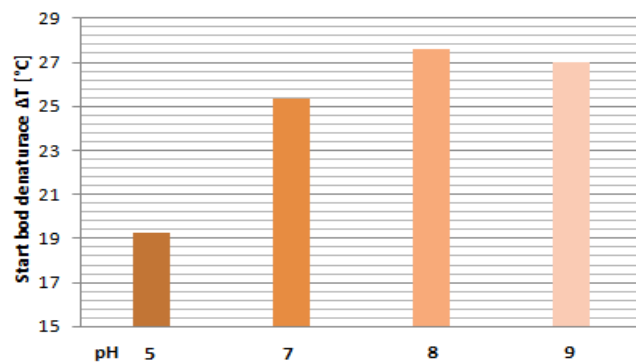
Msel restrikční místa

**Příloha č. 4 -
Výsledky
Thermofluorimetrie
+ ThermoFAD**



Všechny používané pufry mají pH = 8 pokud není napsáno jinak

- 1 20 mM Na₂HPO₄
- 2 20 mM HEPES
- 3 50 mM Na₂HPO₄/ Citrát
- 4 50 mM Na₂HPO₄; 150 mM NaCl
- 5 200 mM Na₂HPO₄
- 6 200 mM HEPES
- 7 50 mM Na₂HPO₄; 1M NaCl
- 8 50 mM Tris/HCl; 50 mM CaCl₂
- 9 50 mM Tris/HCl; 50 mM MgCl₂



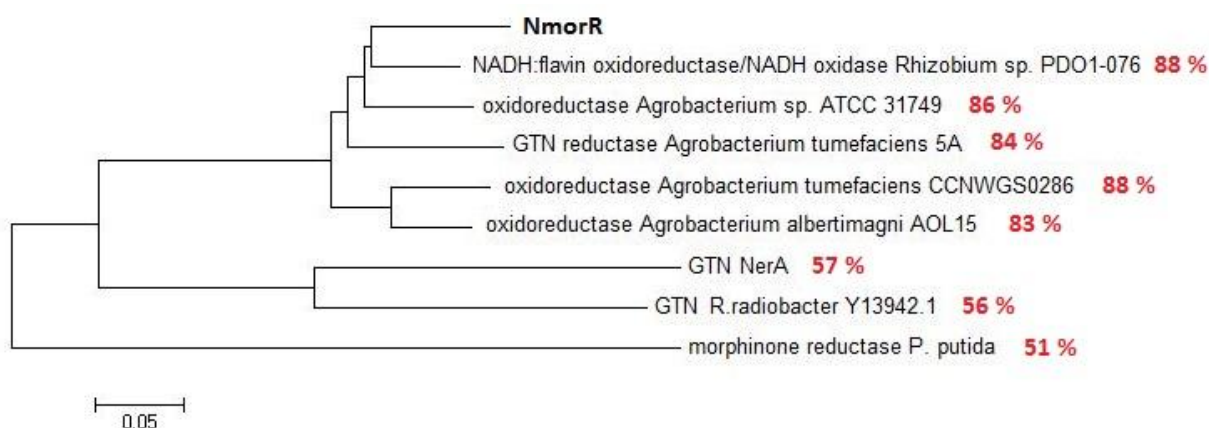
Příloha č. 5 - Hmotnostní spektrometrie NGTnr a scMDH

scMDH m/z	CCA seq	NGTnr m/z	CCA seq	Výsledná sekvence scMDH
745,343	95-100	660,252	17-22	GS3HHHHHSSGLVPRGSHMTQIPLVLI
777,321	60-66	663,234	208-213	GASTGIGATYAERFARRGHDLVLVARDVVRMEALASH
814,427	138-145	725,358	105-111	LRDETGVAIDILPADLTKSEDLAKVETRLRDDARIGI
979,481	47-55	900,443	40-47	LVNNAGTAIGGSFVDQSVDDMTKLVGLNATALVRLS
1126,626	127-137	1198,446	214-224	AIAPRLAKAGEGSIVNIGSVVGLAPEFGMTVYGATKA
1135,602	46-55	1220,639	116-125	FVLFLSQGLAHELGSRGVYIQAVLPATTRTEIWDHVQ
1388,699	194-206	1239,51	293-303	ADV3AMS3N3VMEVGD3LVD3AAL3VGFDRRE3V3T3I3P3L3H3D3
1454,681	263-276	1395,606	293-304	GQWDALD3GARK3MLGN3LVNA3VPAERYR3T3FA
1582,766	262-276	1474,593	363-376	NGTnr
1768,744	1-16	1580,664	150-163	GS3HHHHHSSGLVPRGSHMTKITLFPQPTSLGAI
1939,948	67-84	1689,749	164-178	LANRIVMAPLTRNRAGAGFVPGELTAGYVAQRASAGI
2243,979	241-261	1768,756	1-16	IISEATQISQQGQGYQDTPGIYTQAQIDGWKKVTAAN
2400,124	240-261	1804,89	23-39	HKRGGRIVLQLWHVGRISHVNLQPNGGAPVAPSAIRI
2644,234	17-42	1817,859	164-179	EVRTFVNNGFVDVSEPRALEELLAGIVDDFRKAAN
2724,417	149-176	1827,822	50-67	SIEAGFDGVEVHGANGYLLEQFARDGANMRTDTYGGI
3518,644	207-239	1998,986	126-145	VENRARI3MLEV3IAVA3QEIGPERTGIRISPV3PANGI
3674,837	207-240	2008,966	273-292	SCSDPQITQYDYIVDKLDALGIAYIHVVEGATGGPRDI
		2114,047	330-348	APFDYGS3LRRR3F3RT3YIAN3NG3FD3LE3LAT3SH3LAD3GRAI
		2277,987	309-329	LI3AF3GR3PF3IAN3PDL3VER3LQ3GAP3LAE3VNA3AKI3FG3S3
		2685,367	23-47	AGYTDYPRFSETTSDN
		2878,207	180-207	
		3823,834	349-376	
		3951,914	68-104	
		4744,265	248-292	

Získané peptidové fragmenty jsou v tabulce charakterizovány m/z a přiřazeny pozicí v sekvenci CCA. Celé získané sekvence odpovídající předpokladu jsou umístěny vpravo. Tučně zvýrazněné peptidové fragmenty byly ověřeny fragmentací.

Příloha 6 - Dendrogram nejbližších homologů NGTNR

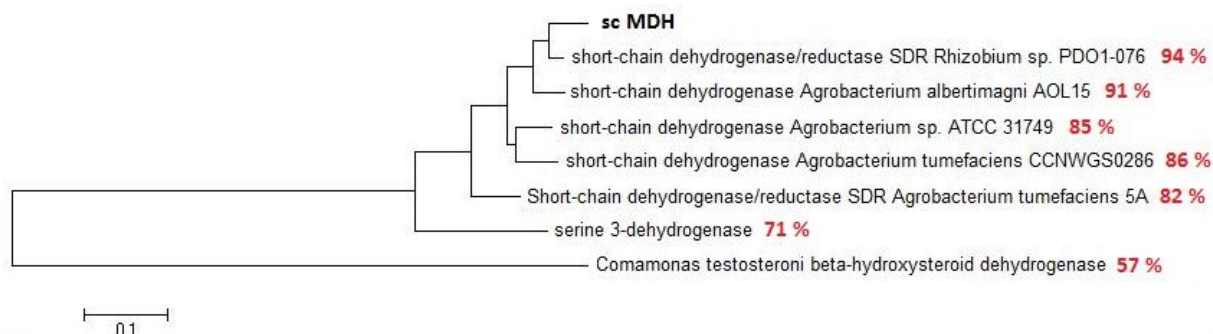
Přesnější charakterizace příbuznosti proteinu NGTNR s nejbližšími anotovanými členy OYE enzymové rodiny. Z databáze (NCBI) byly staženy nejbližší homology a dva geny pro již kineticky charakterizované GTN reduktázy. Jako referenční gen byla využita morfinon reduktáza (*P. putida* M10). Jak je ze získaných závislostí patrné, protein NGTNR není blízce podobný s žádnou dosud intenzivněji studovanou GTN reduktázou a jejich evoluční příbuznost od referenčního proteinu morfinon reduktázy je téměř identická.



Procenta za názvem (červeně) udávají maximální identitu daného proteinu vzhledem k NGTNR. Použité reference: *Rhizobium* sp. PDO1-076, NCBI referenční sekvence ZP_13489179.1⁹⁸; *Agrobacterium* sp. ATCC 31749, NP_396379.1⁹⁹; *Agrobacterium tumefaciens* 5A, ZP_12984259.1¹⁰⁰; *A. tumefaciens* CCNWGS0286, ZP_12909179.1¹⁰¹; *A. albertimagni* AOL15, ZP_11174874.1¹⁰², *Rhizobium* sp. PRF 81, ENN87886.1¹⁰³; *R. radiobacter* Y13942.1, CAA74280.1⁷³; morphinone reductase *P. putida* M10²³. Data jsou získána z NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>; megablast, základní nastavení - threshold 10, word size 28).

Příloha č. 7 - Dendrogram nejbližších homologů scMDH

Přiřazením sekvencí byly nalezeny nejbližší homology scMDH a jako referenční protein byla zvolena β -hydroxysteroidní dehydrogenáza se známou aktivitou na morfinu (*C. testosteroni*), která byla rovněž zařazena mezi sekvence. Z evoluční příbuznosti je patrné, že scMDH je příbuzný enzym serin 3-dehydrogenázy.



Procenta za názvem (červeně) udávají maximální identitu daného proteinu vzhledem k scMDH. Použité reference: *Rhizobium* sp. PDO1-076, ZP_13489180.1⁹⁵; *A. albertimagni* AOL 15, ZP_11174875.1⁹⁹; *Agrobacterium* sp. ATCC 31749, ZP_08530855.1⁹⁶; *A. tumefaciens* CCNWGS0286, ZP_12909177.1⁹⁸; *A. tumefaciens* 5A, ZP_12984260.1⁹⁷; serin 3-dehydrogenáza, *Sinorhizobium fredii* USDA 257, YP_006397355.1¹⁰⁴, β -hydroxysteroidní dehydrogenáza *Comamonas testosteroni* ATCC 11996, ZP_13098384.1¹⁰⁵; Data jsou získána z NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>; megablast, základní nastavení - threshold 10, word size 28).

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