

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Gabriela Petrovová

Vliv kovalentně vázané fluorescenční značky na
strukturu a funkci proteinů

Effect of binding of a fluorescent label on the
protein structure and function

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Daniel Kavan, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Daniel Rozbeský

Praha 2013

PROHLÁŠENÍ:

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

V Praze dne

Gabriela Petrovová.....

PODĚKOVÁNÍ:

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli RNDr. Danielu Kavanovi, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Danielu Rozbeskému za jejich odborné vedení, cenné rady a trpělivost, kterou mi poskytovali v průběhu celé práce. Velmi děkuji Mgr. Josefu Chmelíkovi, Ph.D. za změření TROSY spekter a ochotu. Dále bych ráda poděkovala vedoucímu laboratoře RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. za umožnění vypracování diplomové práce a měření hmotnostních spekter a také všem ostatním členům Laboratoře přirozené imunity za jejich ochotu vždy pomoci a za vytvoření přátelského prostředí.

V neposlední řadě patří poděkování mým nejbližším za jejich trpělivost a obětavost, kterou mi dávají.

ABSTRACT

Fluorescent labeling is a method used for visualization of various types of biomolecules including proteins and protein complexes. However, the effect of protein labeling on protein structure and functions has not been investigated so far.

The goal of the diploma thesis was to examine an influence of NHS-fluorescein binding on structure and function of human carbonic anhydrase I (hCA-I). The particular aims of this work were to prepare recombinant ^{15}N -hCA-I which was used for NMR structure analysis of carbonic anhydrase upon fluorescent labeling. Furthermore, enzyme activity was measured in order to find out a correlation between the concentration of NHS-fluorescein and protein function. In addition, the reaction mixtures were systematically analyzed by ESI FT-ICR mass spectrometry. The analysis revealed experimental conditions for fluorescent labeling of human carbonic anhydrase I with minimal effect on protein structure and function.

The results of this study show that the calculation of molar excess of NHS-fluorescein cannot rely on a simple procedure provided by manufacturer. However, due to decrease of enzyme activity upon fluorescent labeling, it is better to take into count the influence of NHS-fluorescein concentration on the relative enzymatic activity. Moreover, the calculation of molar excess of fluorescent reagent is not in accordance with the degree of labeling at all. In order to establish the general conditions for fluorescent labeling, it is necessary to perform further analysis of other proteins using other fluorescent labels in future research.

Keywords: carbonate dehydratase (carbonic anhydrase), NHS-fluorescein, NMR, ESI FT-ICR MS, the relative enzyme activity, fluorescent labeling

ABSTRAKT

Fluorescenční značení je velmi často používanou metodou určenou k vizualizaci všech typů biomolekul včetně proteinů a proteinových komplexů. Dosud však nebylo zkoumáno, jakým způsobem a v jakém rozsahu toto značení ovlivňuje jejich strukturu a funkci. Tato diplomová práce se tedy zabývá vlivem vazby NHS-fluoresceinu na modelový protein lidské karbonát dehydratasy (hCA-I).

Cílem této práce byla příprava rekombinantní ^{15}N -hCA-I, studium její struktury pomocí NMR spektroskopie po značení fluoresceinem, studium ovlivnění relativní enzymové aktivity hCA-I v závislosti na míře fluorescenčního značení a v neposlední řadě také analýza produktů pomocí ESI FT-ICR MS vzniklých po vazbě karbonát dehydratasy NHS-fluoresceinem. Využitím těchto metod byly stanoveny obecné experimentální podmínky pro použití fluorescenčního značení s minimálním efektem na strukturu proteinu a jeho funkci.

Z výsledků této práce vyplývá, že při výpočtech molárních nadbytků přidávaného NHS-fluoresceinu k proteinům nelze použít dosavadního jednoduchého postupu, ale je více než nutné zohlednit vliv relativní enzymové aktivity proteinu, která klesá se zvyšujícím se molárním nadbytkem fluorescenční značky, a že výpočet molárních nadbytků neodpovídá skutečnému stupni značení.

V budoucím výzkumu bude nutné provést optimalizaci pro další proteiny za použití jiných fluorescenčních značek.

Klíčová slova: karbonát dehydratasa (karboanhydratasa), NHS-fluorescein, NMR, ESI FT-ICR MS, relativní enzymová aktivita, fluorescenční značení

OBSAH

PROHLÁŠENÍ:	2
PODĚKOVÁNÍ:	3
ABSTRACT	4
ABSTRAKT	5
SEZNAM ZKRATEK	9
1. Teoretický úvod	11
1.1. Fluorescence.....	11
1.1.1. Charakteristiky a fyzikální principy fluorescence.....	12
1.1.2. Fluorofory.....	14
1.2. Fluorescenční značení.....	15
1.2.1. Vývoj a klasifikace fluoroforů.....	15
1.2.2. Fluorescenční značky a sondy.....	16
1.2.2.1. Fluorescein.....	16
1.2.2.2. Rhodamin.....	17
1.2.2.3. Cyaniny a ftalocyaniny.....	17
1.2.2.4. Polycyklické aromatické uhlovodíky.....	18
1.2.2.5. Kumariny.....	19
1.2.2.6. NBD.....	19
1.2.2.7. BODIPY.....	19
1.2.2.8. Indoly a imidazoly.....	20
1.2.2.9. Ostatní fluorofory.....	20
1.2.3. Principy fluorescenčního značení proteinů.....	21
1.2.3.1. Reaktivní skupiny proteinů.....	21
1.2.3.1.1. Aminy.....	22
1.2.3.1.2. Thioly.....	22
1.2.3.1.3. Fenoly.....	23
1.2.3.1.4. Karboxylové kyseliny.....	23
1.2.3.1.5. Ostatní aminokyseliny a jejich postranní řetězce.....	23
1.2.3.2. Hlavní činidla určená pro proteinovou modifikaci.....	23
1.2.3.2.1. Činidla reagující s aminy.....	23
1.2.3.2.2. Činidla reagující s thioly.....	25
1.2.4. Použití fluorescenčního značení proteinů.....	25
1.3. Karboanhydratasy.....	26
1.3.1. Klasifikace a výskyt proteinů.....	27
1.3.2. Katalytické mechanismy karboanhydratas.....	27
1.3.3. Fyziologická funkce proteinu.....	29
2. Cíle práce	30

3. Materiál	31
3.1. Laboratorní materiál a přístroje.....	31
3.2. Chemikálie.....	32
3.3. Soupravy a vektory.....	34
3.4. Enzymy a inhibitor proteas	34
3.5. Kompetentní buňky	34
3.6. Média	35
3.7. Roztoky a pufry.....	35
4. Metody	37
4.1. Amplifikace syntetického genu phCA-I kódující hCA-I.....	37
4.1.1. Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> kmene NovaBlue.....	37
4.1.2. Příprava plasmidové DNA metodou Maxiprep	37
4.1.3. Restrikční analýza syntetického genu phCA-I	38
4.2. Rekombinantní exprese ¹⁵ N-značené hCA-I	38
4.2.1. Transformace kompetentních buněk <i>E.coli</i> kmene BL21(DE3) Gold.....	38
4.2.2. Selektce produkčního klonu.....	39
4.2.3. Velkoobjemová produkce.....	39
4.3. Příprava bakteriálního lyzátu určeného k separaci chromatografickými metodami..	40
4.4. Chromatografické metody.....	40
4.4.1. Afinitní chromatografie – IMAC.....	40
4.4.2. Gelová chromatografie.....	41
4.5. Elektroforetické metody	41
4.5.1. Diskontinuální elektroforéza v 15 % polyakrylamidovém gelu- SDS-PAGE.....	41
4.5.2. Gradientová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu-NuPAGE	42
4.6. Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové	43
4.7. Příprava ¹⁵ N-hCA-I pro NMR měření.....	43
4.7.1. Fluorescenční značení proteinu vazbou NHS-fluoresceinu	43
4.7.2. Zahušťování proteinu.....	44
4.8. Dialýza.....	44
4.9. Měření relativní aktivity hCA-I.....	44
4.9.1. Vazba NHS-fluoresceinu na hCA-I	44
4.9.2. Měření enzymové aktivity hCA-I.....	45
4.10. Hmotnostní spektrometrie	46
4.10.1. Rozsah modifikace hCA-I a potvrzení její přesné monoisotopové hmotnosti	46
4.10.2. Lokalizace vazby fluoresceinu na hCA-I	47
5. Výsledky	49
5.1. Restrikční analýza syntetického genu phCA-I	49
5.2. Rekombinantní exprese ¹⁵ N-značené hCA-I	50
5.2.1. Transformace kompetentních buněk a selektce produkčního klonu	50
5.2.2. Velkoobjemová produkce a příprava bakteriálního lyzátu určeného k separaci chromatografickými metodami	51
5.3. Chromatografické metody.....	52
5.3.1. Afinitní chromatografie	52

5.3.2. Gelová chromatografie.....	53
5.4. Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové	55
5.5. Měření relativní enzymové aktivity hCA-I.....	55
5.6. Gradientová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu - NuPAGE.....	56
5.7. Hmotnostní spektrometrie	57
5.7.1. Potvrzení přesné monoisotopové hmotnosti hCA-I po vazbě s fluoresceinem a kontrola rozsahu modifikace	57
5.7.2. Studium lokalizace vazby fluoresceinu na jednotlivé aminokyseliny hCA-I.....	59
5.8. NMR měření	61
6. Diskuse	64
7. Závěr.....	69
8. Literatura.....	70

SEZNAM ZKRATEK

AcN	acetonitril
AMC	7-amino-4-methylkumarin
ANS	8-anilino-1-naftalensulfonát
ANDS	3-azidonaftalen-2,7-disulfonová kyselina
APS	peroxodisíran amonný
bp	pár bazí (base pair)
CCA	α -kyano-4-hydroxy skořicová kyselina
CBB R-250	barvivo na obarvení gelů SDS elektroforézy (Coomassie Brilliant Blue R-250)
DMSO	dimethylsulfoxid
DPH	1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI	ionizace elektrosprejem (ElectroSpray Ionization)
FAM	karboxyfluorescein
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
FRET	Försterův (fluorescenční) rezonanční přenos energie (Förster's resonance energy transfer)
FT-ICR	iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance)
HAc	kyselina octová
hCA-I	lidská karboanhydratasa I (human carbonic anhydrase I)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
HSA	lidský sérový albumin (human serum albumin)
IMAC	afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech (Immobilized Metal Affinity Chromatography)
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
IR	infračervené elektromagnetické záření
ITC	isothiokyanát

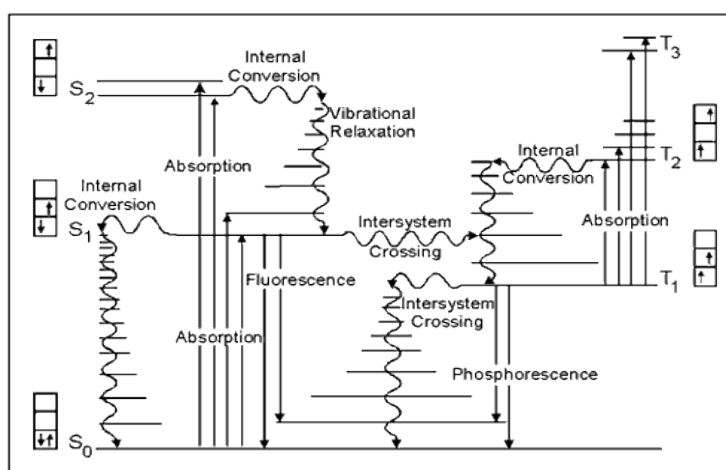
MALDI	desorpce/ionizace laserem za přítomnosti matrice
MES	2-(N-morpholino) ethansulfonová kyselina
NHS	N-hydroxysukcinimid
NTA	nitriltriocetová kyselina
OD	optická densita
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid - inhibitor serinových proteas
PNPA	paranitrofenylacetát
RPM	otáčky za minutu (revolutions per minute)
SDS	dodecylsulfát sodný (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)
TAMRA	tetramethylrhodamin
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEtraMethylEthyleneDiamine)
TFA	kyselina trifluoroctová (TriFluoroacetic Acid)
TMR	tetramethylrhodamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát
TROSY	NMR aplikace - Transverse relaxation optimized spectroscopy

1. Teoretický úvod

1.1. Fluorescence

Fluorescence je forma luminiscence, jež je samovolný fyzikálně chemický excitační děj spojený se zbytkovým vyzářením energie při určité teplotě a v určité spektrální oblasti. Tento typ tzv. studené excitace vzniklý nad úrovní jeho tepelného záření je pozorován u pevných nebo kapalných látek. Tyto látky jsou označovány jako luminofory. Luminiscence byla systematicky pozorována již v 17. století v Boloni a pojmenována v roce 1888 dle Eilharda Wiedemanna [1], [2]. Dalšími typy luminiscence závislé na způsobu excitace jsou například, bioluminiscence u zvířat, triboluminiscence, elektroluminiscence, thermoluminiscence, radioluminiscence, kathodoluminiscence, fotoluminiscence, chemiluminiscence, při které dochází k excitaci molekuly v důsledku chemické reakce, a další [2].

Fluorescence spolu s fosforescencí patří mezi tzv. fotoluminiscenci, při které je emise důsledkem absorpce fotonů elektromagnetického záření o vlnové délce 200-800 nm. Rozsahy vlnových délek, při kterých dochází k absorpci a emisi, se nazývají absorpční, respektive emisní spektra sloučeniny. Závislosti absorpčních a emisních spekter a jejich vlnové délky lze vyčíst z tzv. Jablonski diagramu [3] (Obr. 1).



Obr. 1: Jablonski diagram znázorňující absorpci, fluorescenci a fosforescenci

S₀, S₁, S₂ = singletový stav se spinovou multiplicitou M= 1

T₁, T₂, T₃ = tripletový stav, při kterém je spinová multiplicita M=3

V případě, že je látka ozářena externím zdrojem záření, dojde k excitaci atomu na tzv. vyšší energetickou hladinu S_1 a následně k návratu do stabilního základního stavu S_0 a současně dochází k vyzáření kvanta zářivé energie - fotonu. Část absorbované energie se ztrácí kolizemi s jinými molekulami.

Z kvantové teorie, kdy je světlo absorbováno kvantem energie E o vibrační frekvenci ν ($E = h\nu$ kde h je Planckova konstanta) vyplývá, že frekvence souvisí s vlnovou délkou λ ($\nu = c/\lambda$ kde c je rychlost světla). Energie se proto mění nepřímo s vlnovou délkou λ . Z Jablonskiho diagramu vyplývá, že absorpce záření o vyšší frekvenci (kratší vlnové délce) vyvolává fluorescenční záření o nižší frekvenci (delší vlnové délce). Tento jev byl poprvé pozorován G. G. Stokesem na universitě v Cambridge v roce 1852 [2], [4], [5].

Rozdíl mezi maximální absorpční a emisní vlnovou délkou se tedy nazývá Stokesův posun. Fluorescence se od fosforescence liší tzv. dobou života excitovaného stavu τ , která v případě fluorescence je kolem 10^{-9} - 10^{-6} s a v případě fosforescence bývá i několik hodin. Příčinou takto krátké doby života excitovaného stavu fluorescence je přechod elektronů mezi tzv. povolenými stavy oproti fosforescenci, při kterých dochází k jejich přechodu z excitovaného tripletového stavu.

Při excitaci atomu na vyšší energetickou hladinu S_1 mohou totiž elektrony zůstat buď v tzv. singletovém stavu (ve kterém mají antiparalelní spin) a vrátit se emisí do základního stavu S_0 nebo se mezisystémovým „zakázaným“ přechodem dostat do tzv. tripletového stavu (spin je zde paralelní) [5].

1.1.1. Charakteristiky a fyzikální principy fluorescence

Jak již bylo zmíněno výše, molekula může dohasínat různými konkurenčními cestami. Ať již vibrační relaxací, při které je energie rozptýlena ve formě tepla, nebo konverzí do tripletového stavu následně relaxovaného přes fosforescenci, nebo nějakým dalším nezářivým přechodem, např. vnitřní konverzí.

Jednou z charakteristik fluorescence je doba života excitovaného stavu (lifetime), při které fluorescence dohasíná exponenciálně dle rychlostní rovnice 1. řádu (1).

$$I = I_0 \cdot e^{-kt} \quad (1)$$

kde k je monomolekulární rychlostní konstanta dohasínání fluorescence. Doba života excitovaného stavu je τ (2) a je důležitým parametrem pro metodu FRET.

$$\tau = 1/k \quad (2)$$

Relaxace S_1 stavu může nastat díky tzv. zhášení fluorescence interakcí s další molekulou. Dynamické (kolizní) zhášení nastává absorpcí světla, jiným procesem (např. jako produkt reakce), anebo pokud je excitovaná molekula deaktivována srážkou s molekulou zhášedla (quencheru). Tento proces zhášení závisí na difuzi a nedochází k chemické změně molekul. Na rozdíl od statického zhášení, při kterém se po kontaktu obou molekul vytváří nefluorescenční komplex a reakce tak není závislá na difuzi [6].

Technika FRET je vhodná pro studium struktury makromolekul včetně studia protein-proteinových interakcí, sbalování proteinu, konformačních změn a molekulární dynamiky. Metoda zahrnuje přenos excitace z fluorescenčního donoru (např. FAM) na fluorescenční akceptor (např. TAMRA). Důležitým parametrem je Försterův poloměr R_0 , jenž bývá typicky mezi 20-90 Å a je vzdáleností mezi donorem a akceptorem, při které je 50 % pravděpodobnost přenosu energie. Dalším parametrem je nutnost překrývání absorpčního spektra akceptoru s emisním spektrem donoru [6], [7].

Další charakteristikou související s Jablonski diagramem je kvantový výtěžek excitace Q , který poukazuje na efektivitu fluorescence (3). V závislosti na Stokesově zákoně je kvantový výtěžek vždy menší než 1. Proto látky s Q blízcím se hodnotě 1 tedy bývají nejlepšími emitery [6], [8].

$$Q = \frac{\text{počet emitovaných fotonů}}{\text{počet absorbovaných fotonů}} \quad (3)$$

Měření intenzity fluorescence probíhá dvěma metodami: Stacionární (steady-state) a časově rozlišená. Intenzita je dána počtem fotonů prošlých jednotkovou plochou za jednotku času v daném směru.

Stacionární fluorescence je měřena kontinuálně, kdy je vzorek excitován zdrojem záření a kolmo k ose zdroje záření je měřena intenzita fluorescence. Při časově rozlišeném měření je zaznamenáváno množství zachycených fotonů v časovém úseku.

Dalším měřeným parametrem je anisotropie fluorescence. Při jejím měření je vzorek ozářen lineárně polarizovaným světlem a intenzita fluorescence je měřena emisním polarizátorem, jenž je orientován buď rovnoběžně, nebo kolmo k rovině polarizovaného světla.

Fluorescence se používá jako nedestruktivní způsob sledování biologických molekul. Protein nebo jiná sloučenina mohou být značeny exogenním fluoroforem nebo fluorescenčním barvivem. Kvantifikace barviva je měřena spektrofluorimetri. Fluorescence nachází široké uplatnění v různých aplikacích [6].

1.1.2. Fluorofory

Z anorganických sloučenin byla fluorescence popsána u fluoritu (CaF_2), ze kterého byl pojem odvozen [9], a také u dvojmocného europia a u některých dalších prvků vzácných zemin. V experimentu G. G. Stokesa bylo pozorováno modré světlo emitované ethanolovým roztokem chininu [4]. Fluorescence je ale hlavně pozorována u organických sloučenin. Tyto sloučeniny většinou obsahují aromatické cykly s vazbami π .

Fluorofory (fluorochromy neboli fluorescenční barviva) obsahují ve své molekule reaktivní skupinu reagující s nukleofilními skupinami jako např. NH_2 , OH, SH. Fluorofory se dělí na vnitřní (intrinsic) vyskytující se v organismech přirozeně a vnější (extrinsic), jež jsou přidávány ke vzorku.

Vnitřními fluorofory jsou např. chinin a aromatické aminokyseliny tryptofan (Trp;W), fenylalanin (Phe;F) a tyrosin (Tyr;Y), jejichž fluorescence byla popsána Weberem [10]. Indolová skupina Trp s absorpčním a emisním maximem (A_{280}/E_{348}) vykazuje největší fluorescenci. Trp je citlivý na okolní prostředí a může být používán jako index při sbalování proteinů, vazbě ligandů, protein-proteinových interakcích [6], [11] nebo při metodě FRET [12]. Dalšími přirozeně se vyskytujícími fluorofory jsou redukované formy NADH a NADPH, flaviny, deriváty pyridoxalu a sloučeniny obsahující porfyriny jako např. hemoglobin, myoglobin, chlorofyl, bakteriochlorofyl, kobalamin. Dále také peroxidasa nebo vitamin A [6], [13].

Vnější fluorofory se dle typu vazby dělí na fluorescenční značky a fluorescenční sondy. Dále se vnější fluorofory dělí dle kvantového výtěžku fluorescence Q , který se buď nemění v závislosti na přidaném barvivu (např. fluorescein, akridinová oranž), nebo Q závisí na bezprostředním okolí fluoroforu (např. DPH) [6].

1.2. Fluorescenční značení

1.2.1. Vývoj a klasifikace fluoroforů

Od doby, kdy byl jako první dobře definovanou molekulou fluoroforu popsán chinin (Obr. 2 str. 21), vedla jeho vlastní fluorescence během 2. světové války k rozvoji fluorimetru, nutného pro vyhodnocení antimalarik [6]. Komercializací těchto přístrojů v 50. letech minulého století bylo umožněno větší využití bioanalytických technik na bázi fluorescence [14] a v 60. letech 20. století s příchodem laseru začal narůstat zájem o syntézu nových nebo vylepšených molekul s žádoucími fotofyzikálními vlastnostmi. Nedávno se k organickým fluoroforům připojily také anorganické nanokrystaly „quantum dots“ a fluorescenční proteiny [15], [16].

Fluorescenční proteiny, z nichž je nejznámější GFP (green fluorescent protein) a jeho varianty, jsou v podstatě geneticky kódovaná imidazolinová barviva, zakotvená do proteinu s terciální strukturou β -barelu [17]. Toto barvivo je produkováno autokatalyticky, vyžaduje molekulární kyslík, produkuje H_2O_2 a ROS (reaktivní formy kyslíku) [18]. Mutageneze zapříčinila vznik fluorescenčních proteinů s různými chemickými a spektrálními vlastnostmi [19], [20], které umožňují například zobrazování experimentů *in vivo* [21].

Fluorescence je tedy používána v biochemickém a biologickém výzkumu přes 100 let [4]. Tento rozvoj fluorescenční chemie spolu s technickými objevy podnítily vývoj mnoha různých typů fluoroforů. Tyto fluorofory v dnešní době poskytují větší flexibilitu, účinnost a možnosti než kdykoli předtím. Syntetická chemie je také používána pro jejich aktivaci, jelikož nové fluorogenní enzymové substráty a fotoaktivovatelné sloučeniny byly připraveny pro usnadnění pokročilých zobrazovacích experimentů s nízkým pozadím fluorescence [22]. Jejich odlišné vlastnosti by měly být brány na zřetel při rozhodování o dané aplikaci nebo experimentálním systému. Malá velikost organických syntetických fluoroforů bývá

přínosem oproti biologickým fluoroforům (např. GFP), jelikož organické fluorofory mohou vázat makromolekuly, aniž by tolik zasahovaly do biologické funkce.

Molekuly jsou k dispozici buď komerčně [23] nebo *de novo*. Dle jejich podobných vlastností se organické fluorofory dělí do několika základních tříd, jenž jsou zde dále podrobněji popsány [24].

1.2.2. Fluorescenční značky a sondy

K fluorescenčnímu značení proteinů se používají fluorescenční značky, které se k proteinům vážou kovalentní vazbou. Oproti tomu se fluorescenční sondy váží ke strukturám nekovalentní vazbou a nezděrně mění své fluorescenční vlastnosti [6].

1.2.2.1. Fluorescein

Nejnámějším, nejdéle používaným a nejuniverzálnějším syntetickým organickým barvivem je fluorescein (resorcinolftalein) a jeho deriváty (Obr. 2 str. 21). Jeho absorpční a emisní maximum je A_{494}/E_{521} , $M_r \sim 389$, $pK_a \sim 6,4$ a kvantový výtěžek 0,95 [6], [23]. Syntéza fluoresceinu byla poprvé provedena v roce 1871 Adolfem von Baeyerem z resorcinolu a anhydridu kyseliny ftalové za přítomnosti $ZnCl_2$ [25]. Další možností přípravy je použití methansulfonové kyseliny [26].

Nejnámějšími deriváty fluoresceinu jsou FITC (fluorescein-5-isothiokyanát) a 6-karboxyfluorescein (FAM). FITC je derivát fluoresceinu s isothiokyanátovou (-N=C=S) funkční skupinou nahrazující vodíkový atom v dolním kruhu [27].

Dalším derivátem je NHS-fluorescein, u kterého se na fluoresceinové jádro váže NHS-sukcinimidová skupina a tvoří sukcinimid ester. Výhodou NHS-fluoresceinu je lepší specifita k primárním aminům v přítomnosti ostatních nukleofilů. Fluorescein lze použít na přípravu různých značených proteinových konjugátů [28].

Oproti tomu TET (2',4,7,7'-tetrachlorfluorescein) a FAM jsou využívány při přípravě fluorescenčně značených oligonukleotidů [23]. Nevýhodou všech fluoresceinových derivátů je snadná fotodestrukce. Pro aplikace vyžadující větší stabilitu, vyšší intenzitu fluorescence nebo jiné vazebné skupiny, byly vyvinuty fluorové deriváty a modifikací struktury fluoresceinu další fluorescenční značky, jako např. Oregon Green (2',7'-difluorfluorescein) a Tokyo Green [29], [30]. Mezi nejnovější značky patří Alexa 488, DyLight 488 a FluoProbes 488 [31].

Fluorescein vykazuje ve vodném roztoku několik zajímavých vlastností. Existuje v 7 tautomerních formách, přičemž nejvíce biologicky aktivní je monoanion a dianion, který je nejvíce fluorescentní [24].

1.2.2.2. Rhodamin

Stejně jako fluoresceiny jsou i rhodaminy a jejich deriváty velmi často používanými značkami. Oproti fluoresceinům patří mezi hlavní přednosti rhodaminů nízká citlivost vůči pH a uzpůsobitelné spektrální vlastnosti díky možnosti připojení různých N-alkyl substitučních skupin.

Nejjednodušším rhodaminem je Rh110 (Obr. 2 str. 21), který vykazuje podobné spektrální vlastnosti jako fluorescein [32]. Nejznámější deriváty rhodaminu jsou TRITC, TAMRA a TMR, jenž vykazuje podobné vlastnosti jako fluorescein. Hlavními rozdíly mezi TMR a fluoresceinem jsou delší excitační a emisní vlnová délka a nižší kvantový výtěžek [6]. Sulforhodamin 101 (SRh 101) na Obr. 2 str. 21 je běžně používané barvivo na bázi heterocyklické sloučeniny julolidinu známé jako Texaská červeň [23], [33]. Novějšími deriváty s vylepšenými vlastnostmi, jinými spektrálními charakteristikami, vyšší fotostabilitou a vyšší fluorescencí, jsou například Alexa 546, Alexa 633, Alexa 555, Dy Light 633 a Dy Light 550 [31].

Rhodaminové značky jsou často používány spolu s fluoresceinovými deriváty při metodě FRET [23], jelikož přenos energie mezi těmito sloučeninami dosahuje vyšší efektivity. Kombinace fluoresceinu a rhodaminu je vhodná pro sekvenování DNA [34].

Dle Mangela mohou být rhodaminy (stejně jako fluoresceiny a jiné fluorofory) používány jako enzymové substráty pro proteasy [35]. Tyto substráty byly také vyvinuty pro fosfatasy, esterasy a katalýzu založenou na interakci iont-kov [32], [36]. Existují i hybridní struktury xantinových barviv s jedním kyslíkovým a jedním dusíkovým substituentem zvané rhodoly, neboť jsou na pomezí rhodaminů a fluoresceinů [37].

1.2.2.3. Cyaniny a ftalocyaniny

Cyaninová barviva jsou systémy s polymethinovým řetězcem mezi dvěma atomy dusíku $R_2N-(CH=CH)_n-CH=N^+R_2$. Pokrývají spektrum od UV do IR a rozdělují se na 3

typy: streptocyaniny s otevřeným řetězcem, hemicyaniny a cyaniny se zavřenými řetězci, jenž disponují arylovými skupinami na každém konci řetězce [38].

Četné cyaniny jsou asociované polymethinové struktury používané jako značky a též jako senzory membránového potenciálu [39], [40]. Cyaninová barviva jsou známa jako CyDye fluorofory založené na sulfoindocyaninové struktuře [41]. Názvy těchto sloučenin jsou odvozeny v závislosti na počtu uhlíkových atomů mezi jednotlivými dihydroindoly. Cy3 má srovnatelné spektrální charakteristiky jako TMR. Delší cyaninová barviva jako Cy5 a Cy7 vykazují posun k vyšším vlnovým délkám (Obr. 2 str. 21) [42]. Zavedení benzenu do dihydroindolové struktury vyvolává bathochromní posun o cca 30 nm. Sloučeniny s takovou změnou struktury mají poté suffix 0,5 (např. Cy5,5) [43].

CyDye dvojice jsou též používány pro FRET a mohou být využity jako přepínatelné fotosondy pro vysoce rozlišené zobrazování [44]. Významnou nevýhodou těchto barviv je závislost fluorescence na počtu fluoroforů v konjugované molekule. Novější sulfonovaná cyaninová barviva tento problém překonávají [45]. Ftalocyaniny, jako aromatické makrocyclické sloučeniny (např. IRDye 700DX na Obr. 2 str. 21) jsou velmi fotostabilní a vykazují fluorescenci v blízké oblasti IR spektra [46].

1.2.2.4. Polycyklické aromatické uhlovodíky

Do této kategorie se řadí hlavně naftalenové deriváty, mezi které patří především značky: amin-reaktivní 5-(dimethylamino)naftalen-1-sufonyl(dansyl)chlorid(DNS-Cl) popsáný Weberem [6], [47] a také 5-((2-aminoethyl)amino)naftalen-1-sulfonová kyselina (EDANS) (Obr. 2 str. 21). Naftalen může být dále zpracován na 4-amino-3,6-disulfonylnaftalimid.

Tyto fluorofory jsou známy jako Luciferová žluť (Obr. 2 str. 21) a používají se také jako polární indikátory [24], [23]. Weber také objevil dodnes používané sloučeniny jako ANS (8-anilinonaftalen-1-sulfonát) a TNS (2-p-toluidinonaftalen-6-sulfonát), jenž se používají jako fluorescenční sondy pro dynamickou polaritu prostředí [6]. Jako sondy lze také použít pyrenové deriváty (Obr. 2 str. 21). Sulfonace pyrenu vyvolává bathochromní posun, poskytující užitečné sloučeniny, které jsou excitovány při $\lambda > 390$ nm. Tyto sloučeniny zahrnují pH sondy 8-hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonát

(HPTS nebo pyranin) a cenné sulfonované pyrenové značky s vysokou rozpustností ve vodě [24], [48].

1.2.2.5. Kumariny

Kumariny představují širokou třídu přírodních produktů, léčiv a fluoroforů. Substituce heteroatomu na pozici 7 poskytuje fluorescenční molekuly s excitačními vlnovými délkami v oblasti UV záření. Běžný příklad je 7-hydroxy-4-methylkumarin (4-methylumbelliferon, 4-MU) a s ním související 7-amino-4-methylkumarin (AMC) (Obr. 2 str. 21), jenž má podobné spektrální vlastnosti, které jsou stálé při pH>5 [23], [49]. Velký Stokesův posun nastává zčásti díky významné změně v dipólu při excitaci a z části díky následné ztrátě energie reorganizací molekul rozpouštědla [8].

Různé reaktivní skupiny jsou kompatibilní s těmito fluorofory a vážou se obvykle do polohy 3 nebo 4 daného kumarinu [23]. Spektrální charakteristiky AMC mohou být upraveny díky různým dusíkovým substituentům [50] a další substituce jako např. fluorace nebo sulfonace může vytvořit kumarinová barviva s žádanými chemickými vlastnostmi (např. vyšší rozpustnost ve vodě a nižší citlivost k pH).

1.2.2.6. NBD

4-chloro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) (Obr. 2 str. 21) vykazuje fluorescenci po vazbě s primárními aminy [6]. Tyto deriváty emitují v zelené části spektra [23].

1.2.2.7. BODIPY

Novější fluorescenční značky obsahují atomy bóru, konkrétněji bór-dipyromethen. Nejjednodušší BODIPY-FL (Obr. 2 str. 21) vykazuje podobné vlastnosti jako fluorescein. Jejich výhodami je vysoký Q, široké emisní spektrum, malý Stokesův posun a nezávislost na polaritě a pH. Barvivo je navíc celkově lipofilní [51]. Další důležitá vlastnost je změna vlnové délky díky vhodné substituci [52]. Všemi těmito univerzálními vlastnostmi mohou BODIPY nahradit tradiční barviva jako fluorescein, TMR a mnoho dalších. Např. fluorescenční značka BODIPY-TR vykazuje podobné spektrální vlastnosti jako Texaská červeň (Obr. 2 str. 21) [23].

1.2.2.8. Indoly a imidazoly

Známou indolovou sondou je DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) vázající se do menšího žlábků DNA (Obr. 2 str. 21). Většinou se proto používá pro vizualizaci veškeré jaderné DNA z důvodu velkého nárůstu fluorescence [53].

Dibenzimidazolová barviva, konkrétně Hoechst 33342 (Obr. 2 str. 21), se vážou také do menšího žlábků DNA, ale jsou propustná pro buňku [54]. Tyto barviva jsou zhášeny vazbou na DNA s obsahem 5-bromo-2-deoxyuridinu a umožňují proto analýzu buněčného cyklu [55].

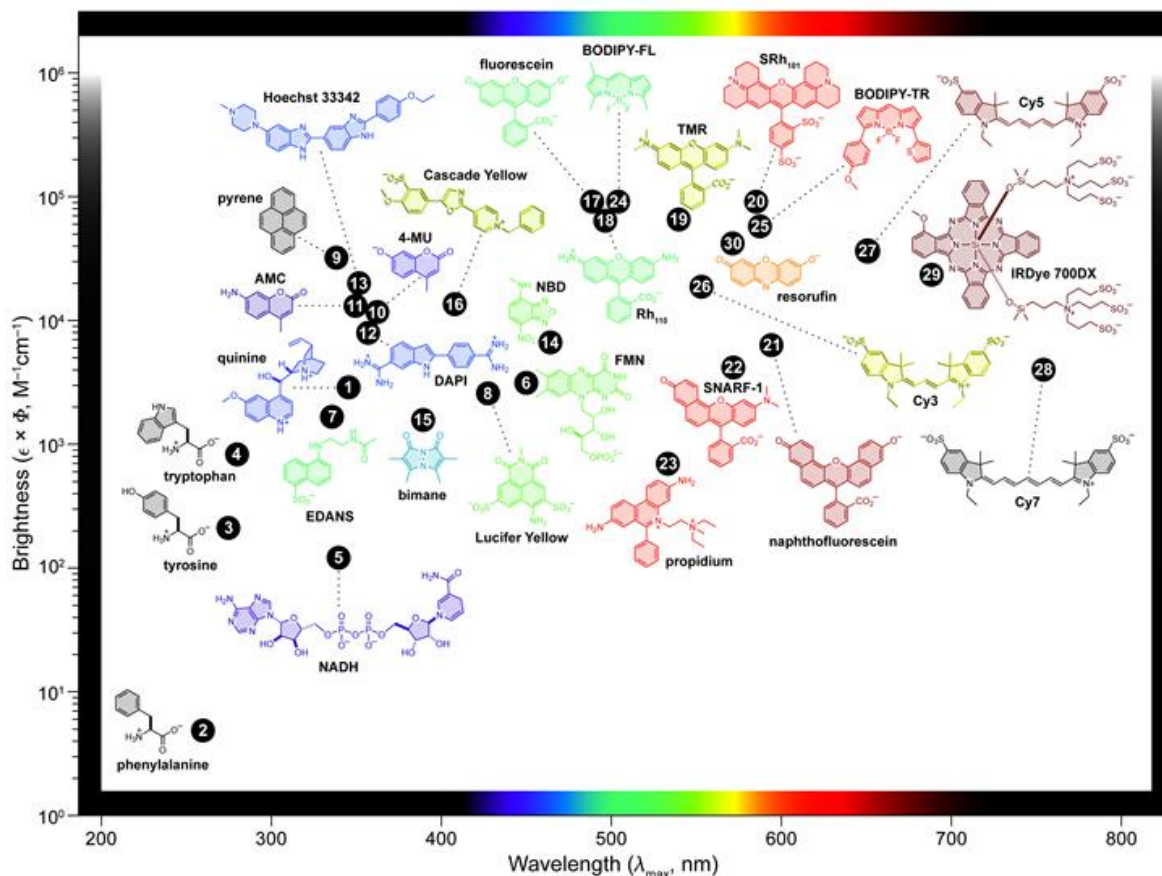
1.2.2.9. Ostatní fluorofory

K dalším fluoroforům patří například ethidium a propidium (Obr. 2 str. 21), které jsou používány jako interkalátory do DNA a vykazují větší intenzitu fluorescence [56].

Oxasinové sloučeniny jako resorufin (Obr. 2 str. 21) vykazují zajímavé redoxní vlastnosti. Při oxidaci na resazurin je jeho snadné redukce zpět na resorufin využíváno při testech na životaschopnost buněk [57].

Dále při zavedení benzenu do struktury fluoresceinu nebo rhodaminu nastává stejný bathochromní posun jako u naftofluoresceinu (Obr. 2 str. 21). Toto xanthenové barvivo má sice nízký Q, ale asymetrie způsobená zavedením jen jednoho benzenového kruhu je využívána u fluorescenčních indikátorů, kdy sondy jako seminaftofluorescein (SNAFL) a seminaftorhodafluor (SNARF-1) jsou používány jako pH senzory [58].

Jak zde bylo uvedeno jsou komerčně k dispozici široké škály barev s charakteristickými kvantovými výnosy, extinčními koeficienty a spektry pro téměř jakékoliv fluorescenční aplikace.



Obř. 2: Nejčastěji používané fluorofory: Číselné značky fluoroforů jsou v průsečíku intenzity jejich fluorescence a emitované λ při maximální absorpci.

1.2.3. Principy fluorescenčního značení proteinů

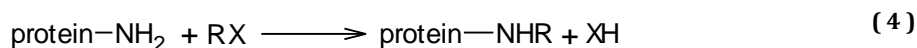
Pro přípravu proteinových konjugátů kovalentními značkami je třeba vždy zvážit, jaké modifikovatelné aminokyseliny v daném proteinu jsou k dispozici pro kovalentní vazbu a jaká činidla mohou být na tyto skupiny vázána.

1.2.3.1. Reaktivní skupiny proteinů

Proteiny a peptidy jsou polymery aminokyselin obsahující mnoho postranních řetězců. Tyto řetězce, které mohou i nemusí být přirozenou částí proteinů, jsou poté využívány k napojování různých molekul a proteinů [28]. Postranní řetězce aminokyselin disponují různými fyzikálně chemickými vlastnostmi a na základě reaktivity je lze rozdělit do několika tříd:

1.2.3.1.1. Aminy

Patří mezi nejčastější reaktivní skupiny proteinů, zejména alifatická ϵ -aminoskupina lysinu. V některých proteinech se vyskytuje buď jen jednou (např. insulin), nebo mnohem běžněji v hojném počtu (např. 36× v avidinu) [59]. Lysin vytváří stabilní vazby s širokým spektrem reagensů ($pK_a = 9,18$) (4) [60].

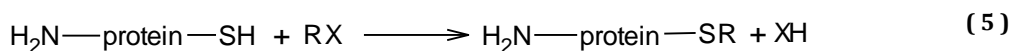


Ostatní aminy, jež jsou v proteinech reaktivní, mohou být α -aminoskupiny N-terminálních aminokyselin. Na rozdíl od ϵ -aminoskupiny lysinu jsou α -aminoskupiny méně bazické a reaktivní okolo pH 7,0. Jsou ale také proteiny, jež nemají žádnou volnou α -aminoskupinu (např. cytochrom C nebo ovalbumin), jelikož N-terminální aminoskupina není reaktivní z důvodu její N-acylace [28].

1.2.3.1.2. Thioly

Thioly se vyznačují přítomností síry v reaktivních skupinách aminokyselin cysteinu, cystinu a methioninu. Cystein obsahuje volnou thiolovou skupinu, jež je více nukleofilní než aminy a je nejreaktivnější skupinou v proteinu vůbec (5). Proto jsou schopny reakce i u skupin, které jsou vůči jinak dobře reagujícím aminům nereaktivní (např. při neutrálním pH) [61].

Většina proteinů je ale vázána disulfidovými můstky, a proto je vhodné je rozvolnit dithiothreitem (DTT) a tím pádem tyto aktivní sulfhydrylové skupiny zpřístupnit [62]. V případě absence cysteinu, může i methionin mimo jiné reagovat s thiol-reaktivními sloučeninami jako je například iodacetamid.



1.2.3.1.3. Fenoly

Hydroxylová skupina tyrosinů může vytvářet estery nebo etherové vazby a jejich aromatický kruh může podléhat reakcím, při kterých dochází ke spojení reaktantů, např. diazoniových solí, jež se nacházejí v blízkosti hydroxylové skupiny [63]. Modifikace tyrosinů je spíše používána při strukturních studiích než při specifickém značení, jelikož jeho acetylace přináší užitečné informace o účasti tyrosinu při vazebných vlastnostech proteinů [28].

1.2.3.1.4. Karboxylové kyseliny

Proteiny obsahují karboxylové skupiny na C-terminálním konci a na postranních řetězcích aminokyselin aspartátu a glutamátu. Nízká reaktivita těchto skupin ve vodě většinou zapříčiňuje obtížné využití k selektivní modifikaci proteinů a ostatních biopolymerů. V těchto případech je možné karboxylovou kyselinu převést na reaktivní ester za použití ve vodě rozpustného karbodimidu, jenž poté reaguje s nukleofilním reaktantem, jako např. aminem nebo hydrazinem [64].

1.2.3.1.5. Ostatní aminokyseliny a jejich postranní řetězce

Chemické modifikace na jiných aminokyselinových skupinách nejsou často využívány. Guanidinová skupina argininu vyžaduje kvůli svému pKa 12-13 tak drastické podmínky, že by téměř všechny proteiny byly denaturovány. Histidiny pak reagují s iodoacetáty [28], [65].

1.2.3.2. Hlavní činidla určená pro proteinovou modifikaci

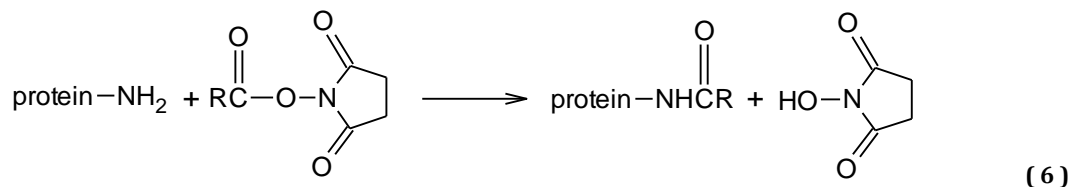
Existuje široký výběr činidel, jež jsou k dispozici k modifikaci proteinů. Jsou to často deriváty fluoroforů (fluorescein, rhodamin, kumarin). Pro modifikaci je nutná znalost typu reakcí jednotlivých reaktivních amino skupin a povaha chemické vazby [6].

1.2.3.2.1. Činidla reagující s aminy

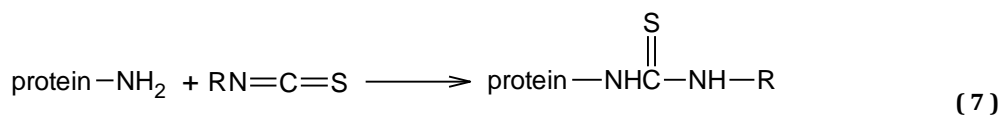
Tyto činidla reagují s ϵ -aminoskupiny lysinu a α -aminoskupinou ve vodných i nevodných podmínkách.

- a) Reaktivní estery tvořící amidovou vazbu jsou především NHS-estery [66]. Jak už bylo diskutováno výše (1.2.2), jsou vysoce selektivní k alifatickým aminům.

Optimální pH pro reakci ve vodném prostředí je 8,0-9,0 a produkty těchto reakcí jsou velmi stabilní. Prakticky každá molekula obsahující karboxylovou kyselinu může být přeměněna na NHS-ester (6). Estery s lepší rozpustností ve vodě reagují i se sulfonovými skupinami [28], [67].

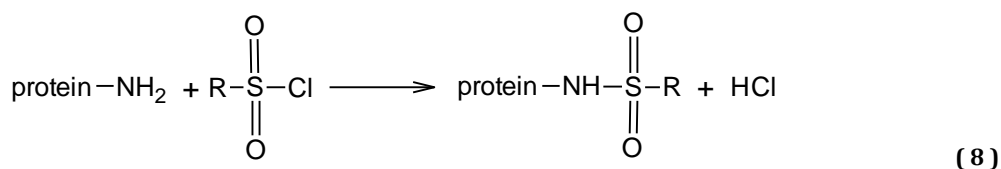


b) Isothiokyanáty jako např. nejvíce používaný FITC (1.2.2) vytváří s aminy thiomocovinovou vazbu (7).



Isothiokyanáty jsou ve vodě více rozpustné než NHS-estery, jsou ale také citlivé na alkalické prostředí a jejich optimální pH pro reakci je 9,0-9,5. Velký počet fluorescenčních barviv, jako např. kumariny, rhodaminy, se na proteiny vážou právě přes jejich reaktivní isothiokyanáty [68].

c) Sulfonylhalidy se používají pro N-terminální Dansyl-Edmanovo odbourávání, protože jsou sice nestabilní ve vodě, ale tvoří pevnou sulfonamidovou vazbu (8) [69]. Často používaná značka „Texaská červeň“ je sulfonyl chlorid a vykazuje spektrální vlastnosti s nejdelší vlnovou délkou mezi amin reaktivními činidly [33].



1.2.3.2.2. Činidla reagující s thioley

Tato činidla reagují ve fyziologických podmínkách rychle a tvoří thioetherové produkty:

- a) Haloacetylové deriváty (jako fluoresceinové a rhodaminové iodacetamidy) jsou nejčastěji používanými sulfhydrylovými činidly. Reakční rychlost iodoacetátu je v průměru dvojnásobná oproti reakci s bromoacetátem a 20-100 násobná oproti chloroacetátu [70]. Thioethery vzniklé při reakci s haloacetamidy jsou velmi stabilní. Problém vzniká pouze při použití iodoacetamidu, jenž je především v roztoku fotosenzitivní [28].
- b) Maleimidy jsou použitelné podobně jako iodoacetamidy a sice jako reaktanty pro modifikaci thiolů s tím rozdílem, že jsou více selektivní a nereagují s histidiny a methioniny [71], [72].
- c) Ostatními činidly reagujícími s thioley s podobnou reaktivitou jako iodoacetamidy jsou např. bromomethylové deriváty. Monobromobiman a monochlorobiman reagují s glutationy a dalšími thioley v buňkách za vzniku fluorescenčních aduktů, jež slouží ke kvantifikaci thiolů [73] (Obr. 2 str. 21).

1.2.4. Použití fluorescenčního značení proteinů

Fluorescenční značení proteinů našlo široké uplatnění v biologických a biochemických aplikacích. Následující příklady použití fluorescenčního značení jsou jen malým výčtem pro velkou škálu možností použití. Toto značení nachází použití zejména ve fluorescenční mikroskopii, protein- proteinových interakcích, lokalizacích proteinů v buňce, imunspecifických detekcích, ligand-receptorových interakcích, fytochemii, atd. [6].

Deriváty fluoresceinu- maleimidy a iodacetamidy se používají ke značení sulfhydrylových skupin aminokyselin, zatímco FITC, NHS a sulfonylchloridy se používají ke značení aminů [42]. FITC je také hojně používán v průtokové cytometrii [74]. Sensitivita fluoresceinu k pH byla mj. využita jako indikátoru při měření vnitrobuněčného pH [75].

Vazba různých typů chelátů na fluorescein poskytuje senzory pro biologicky významné ionty jako například Zn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ . Tyto fluorescenční indikátory tedy mohou být použity k měření toku různých iontů a kvantifikovat jejich koncentrace

v živých buňkách [24], [76]. Rhodaminy byly také použity k vytvoření indikátorů iontů jako Na^+ , Ca^{2+} a ROS v buňkách [77], [78].

Kumariny jsou také užitečné pro tvorbu enzymových substrátů. Různé deriváty 7-hydroxykumarinu mohou být využity k testování hydroláz a dealkyláz [79]. Peptidové deriváty AMC jsou často používány k měření proteasové aktivity. AMC bylo také zpracováno na přípravu substrátů jiných enzymů včetně deacetyláz a esteráz [24]. BODIPY jsou většinou využívány jako značky a nepolární charakter těchto sloučenin umožňuje začlenění do lipofilních sond [51].

Někdy je též využívána vazba biotin-avidin, jehož $K_D \sim 10^{-12}$. Biotin je vázán na studovanou molekulu a detekce je poté provedena fluorescenčně značeným avidinem [80].

V roce 1989 byly syntetizovány isothiokyanátové deriváty cyaninových barviv. Barviva (konkrétně Cy5,8-ITC) měla maximální absorpční vlnu v IR a blízké IR oblasti spektra a také vysoký extinkční koeficient. Inkorporací dvou alkyl sulfonátových skupin do jejich struktury vzrostla jejich rozpustnost ve vodě. Isothiokyanátové deriváty cyaninových barviv vykazovaly daleko lepší reaktivitu a vlastnosti v porovnání s předchozími fluoresceinovými a rhodaminovými činidly [81].

Při porovnání kovalentního a nekovalentního značení za účelem použití v analýze HSA pomocí HPLC bylo pozoruhodné, že zatímco nekovalentní značení bylo rychlejší než kovalentní a bylo v rozmezích fyziologického pH, kovalentní značení bylo více stabilní v podmínkách vyskytujících se při měření HPLC [82].

V poslední době z důvodu univerzálnosti, citlivosti a vysoce výkonné detekce vzrostl počet používaných nekovalentních fluorescenčních barviv jako například ANS, Bis-ANS, Nil-red, Thioflavin T [83].

1.3. Karboanhydratasy

Karbonické anhydratasy (CA) jsou všudypřítomné metaloenzymy katalyzující reakci mezi CO_2 a H_2O za vzniku hydrogenuhličitanu a protonu. Všechny tyto jednoduché, ale nepostradatelné chemické látky jsou zapojeny do mnoha fyziologických procesů, jež probíhají v organismech téměř celého fylogenetického stromu (*Bacteria*, *Archaea* i *Eukarya*). Z tohoto důvodu je velké množství těchto enzymů přítomno v mnoha

tkáních nebo buněčných kompartmentech [84]. Dnes je známo již 5 geneticky odlišných rodin α -, β -, γ -, δ - a ζ -CA.

Karboanhydratasa byla objevena u savců již před 80 lety, a sice její α -isoforma. Uvedené enzymy byly intenzivně zkoumány, jelikož jejich unikátní vlastnosti měly velký potenciál při léčbě onemocnění, jak bude diskutováno v kapitole 1.3.2. Proto jsou již skoro 60 let používány sulfonamidy ovlivňující aktivitu karboanhydratas [84].

V letech 1972 a 1975 byla postupně rozřešena krystalová struktura lidské karboanhydratasy I [85], [86]. Bylo zjištěno, že protein má jednu globulární doménu a na jeho povrchu je lokalizováno malé množství relativně krátkých α -helixů [87]. Sekundární struktura dominuje deset β -listů, které jsou mírně pootočený v antiparalelní konformaci (Obr. 3 str. 28). Architektura aktivního místa je dále diskutována v kapitole 1.3.2.

1.3.1. Klasifikace a výskyt proteinů

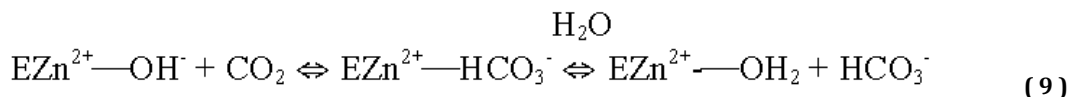
U obratlovců, ale také u bakterií, řas a v cytoplasmě zelených rostlin je zastoupena hlavně α -isoforma. Isoforma β se nachází hlavně v eubakteriích, v doméně Archea, řasách a v chloroplastech jednoděložných i dvouděložných rostlin. γ -isoforma je zastoupena v doméně Archea a u některých bakterií, isoforma δ se nachází v mořských rozsivkách, doméně Archea, rostlinách a eubakteriích.

U savců bylo izolováno nejméně 16 různých α -isoforem nebo proteinů souvisejících s CA. Tyto proteiny jsou distribuovány v rozdílných tkáních, jako jsou erytrocyty, ledviny, plíce, gastrointestinální trakt, játra, centrální nervový systém a mnoho dalších, a patří mezi ně: 4 membránově vázané (CA-IV, CA-IX, CA-XII, CA-XIV), mitochondriální forma (CA-V), sekretovaný isoenzym (CA-VI) a CA I-III, CA-VII, jež jsou cytoplasmatickými formami [88].

1.3.2. Katalytické mechanismy karboanhydratas

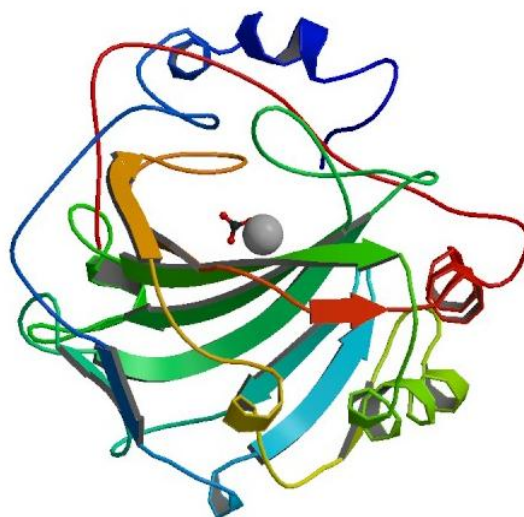
CA jsou známy jako účinné katalyzátory reverzibilní hydratace CO_2 za vzniku hydrogenuhličitanu (Obr. 3 str. 28) [88]. Tyto reakce se týkají dýchání a transportu CO_2 a hydrogenuhličitanu v metabolismu tkání a plic, pH a CO_2 homeostázy, sekretu elektrolytů v těchto tkáních a biosyntetických reakcí (např. glukoneogeneze, lipogeneze a tvorba močoviny), kalcifikace (u živočichů), CO_2 fixace (u rostlin a řas) a

mnoho dalších fyziologických nebo patologických procesů. U živočichů je CA hlavní složkou hydrogenuhličitanového pufru krve a lze vyjádřit rovnicemi (9), (10).



Vysoce univerzální α -isoformy jsou schopny katalyzovat další hydrolytické procesy. Katalytický mechanismus α -CA je všeobecně znám. Aktivní centrum obsahuje Zn^{2+} ionty, které jsou přítomny ve všech α -CA a jsou esenciální pro katalýzu. Ion Zn^{2+} , jenž se nachází v 15 Å hlubokém aktivním centru, je koordinován třemi histidinovými zbytky (His94, His96 a His119) a molekulou H_2O nebo OH^- iontem. Zn^{2+} vázaná voda tvoří vodíkové vazby s hydroxylovou skupinou threoninu (Thr199), který je vázán na karboxylovou skupinu glutamátu (Glu106). Tyto interakce zvyšují nukleofilní charakter molekuly a správně orientují substrát (CO_2). Aktivní formou enzymu je Zn^{2+} s navázaným OH^- . Tento silný nukleofil poté atakuje CO_2 , jenž se dostává do hydrofobní kapsy. V případě isoenzymu CA-II je hydrofobní kapsa tvořena aminokyselinovými zbytky valinů a leucinu (Val121, Val143, Leu198) a umožňuje tvorbu hydrogenuhličitanu koordinovaného k iontu Zn^{2+} .

Hydrogenuhličitan je poté nahrazen molekulou H_2O a uvolňuje se do roztoku, což vede ke tvorbě kyselé formy enzymu s koordinovanou molekulou vody na Zn^{2+} . Pro regeneraci základní formy enzymu dochází k přenosu H^+ buď za pomoci zbytku histidinu (např. His64) umístěného na vstupu do aktivního



Obr. 3: Struktura lidské karboanhydratasy I (hCA-I) v komplexu se substrátem - hydrogenuhličitanem [89]

místa nebo přítomností pufru v médiu. Pro β a γ -CA je tento mechanismus podobný, ačkoliv některé β -isoformy nemají H_2O koordinovanou s iontem kovu [88]. Velmi dobrými inhibitory CA jsou sulfonamidy s obecným vzorcem $RXSO_2NH_2$, kde $X = O, NH$ nebo není přítomen a R je většinou aryllová skupina.

Na inhibici těchto enzymů jsou založeny jednotlivé farmaceutické přípravky. Účinkují takto hlavně diuretika, antikonvulsiva, léky proti glaukomu, obezitě nebo protinádorové látky [84].

1.3.3. Fyziologická funkce proteinu

V současné době je za jedinou fyziologickou reakci katalyzovanou karboanhydrasami považována CO_2 hydratace/ HCO_3^- dehydratace. U obratlovců se izoenzymy I, II a IV účastní respirace a regulace acidobasické homeostasy. Tyto procesy zahrnují jak transport CO_2/HCO_3^- mezi tkáněmi, tak exkreční procesy v plicích a ledvinách, zprostředkované eliminací CO_2 v kapilárách a plicních sklípcích, eliminaci H^+ iontů v renálních tubulech a sběrných kanálcích jakož i reabsorbci HCO_3^- . Karboanhydratasa II se rovněž podílí na vývoji kostí a funkcích jako je diferenciace osteoklastů. Karboanhydratasy se podílejí na sekreci elektrolytů v mnoha jiných tkáních a orgánech jako např. produkce slin, žaludečních kyselin, žluči, pankreatických šťáv a transportu iontů ve střevech. Nachází se tedy především v erytrocytech a gastrointestinálním traktu. Isoenzymy II a V jsou zapojeny do důležitých metabolických procesů, jelikož poskytují hydrogenuhličitan pro glukoneogenezi, *de novo* biosyntézu mastných kyselin nebo syntézu pyrimidinových basí [88].

2. Cíle práce

- Příprava rekombinantní karboanhydratasy (hCA-I)
- Studium ovlivnění enzymové aktivity hCA-I v závislosti na míře fluorescenčního značení
- Studium struktury hCA-I po vazbě fluoresceinu pomocí NMR spektroskopie
- Analýza produktů vzniklých po vazbě fluoresceinu na hCA-I pomocí ESI FT-ICR MS
- Studium lokalizace jednotlivých fluorescenčních značek kovalentně vázaných na ϵ -aminoskupiny lysinů

3. Materiál

3.1. Laboratorní materiál a přístroje

Analytické váhy AL54-IC	<i>Mettler Toledo, ČR</i>
Analytické váhy ALJ 220-4	<i>Kern, Německo</i>
Automatické pipety	<i>Gilson, USA</i>
Automatické pipety	<i>Eppendorf, Německo</i>
Centrifuga Avanti J-26 XP	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga Induction Drive Centrifuge, J-6 M	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga Spectrafuge 16M	<i>Labnet, USA</i>
Centrifuga MiniSpin	<i>Eppendorf, Německo</i>
Čtečka destiček Safire ²	<i>Tecan, Švýcarsko</i>
Dialyzační kolonky 3 500 MWCO	<i>Thermo Scientific, USA</i>
Plastové zkuševky	<i>Biologix Plastics Co., Čína</i>
Gely NuPAGE 4 – 12 % Bis-Tris	<i>Invitrogen, USA</i>
Hmotnostní spektrometr ULTRAFLEX III	<i>Bruker Daltonics, USA</i>
Hmotnostní spektrometr APEX-Qe Ultra	<i>Bruker Daltonics, USA</i>
HPLC systém Agilent 1 200	<i>Agilent, USA</i>
HPLC systém BioSys 510	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Iluminátor BTS-20.LS	<i>UVItec, UK</i>
Kolona MAGIC C18-AQ (0,02 × 1,5 cm)	<i>MichromBioresources, USA</i>
Kolona Ni – Sepharose 6 FF10/100	<i>GE Healthcare, UK</i>
Kolona Superdex 200 10/300 GL	<i>GE Healthcare, UK</i>
Centrikon Amicon® Ultra-15	<i>Millipore, USA</i>
Magnetické míchačky MM 2A	<i>Laboratorní přístroje Praha, ČR</i>
Kolonka Peptide Microtrap (0,1×0,8 cm)	<i>Michrom Bioresources, USA</i>
Kolonka Peptide Macrotrap (0,3 × 0,8 cm)	<i>Michrom Bioresources, USA</i>
Mikrostríkačka, 500 µl	<i>Hamilton, Švýcarsko</i>
Mikrotitrační destičky	<i>Nunc, Dánsko</i>
Mikrozkuševky (V = 1,5 ml; 0,5 ml)	<i>Trefflab, Švýcarsko</i>
Mini-centrifuga Rotilabo®	<i>Carl Roth®, Německo</i>
Mrazicí box (-80 °C) Ultra Low	<i>Revco, USA</i>

Mrazící box (-20 °C)	<i>Zannusi, Itálie</i>
Napájecí zdroj MP-250V	<i>Major Science, USA</i>
Napájecí zdroj ECPS 3 000/150	<i>Pharmacia, Švédsko</i>
pH metr Φ200	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Předvážky HF-1 200G	<i>AND, USA</i>
Souprava pro elektroforézu	<i>Bio-Rad, USA</i>
Souprava pro elektroforézu X-Cell Sure Lock	<i>Invitrogen, USA</i>
Spektrofotometr DU-70	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Sterilní filtr, 0,2 μm	<i>Whatman, USA</i>
Termoblok	<i>Grant, UK</i>
Termostat BT 120M	<i>Laboratorní přístroje Praha, ČR</i>
Třepačka	<i>Sanyo Gallenkamp Ltd., UK</i>
Třepačka na zkumavky BigGer Bill	<i>Thermolyne, USA</i>
Ultrazvuková lázeň Sonorex	<i>Bandelin, Německo</i>
Ultrasonic Homogenizer 4 710	<i>Cole-Parmer Instrum. Co., USA</i>
Vakuová odparka Speedvac RC1010	<i>Jouan, Francie</i>
Vakuová odparka Savant SPD 121P Speedvac	<i>Thermo Fisher, USA</i>
Vodní lázeň	<i>Memmert, Německo</i>
Vortexový mixér	<i>VELP Scientifica, Itálie</i>
Zdroj deionizované vody MilliQ Académic	<i>Millipore, USA</i>

3.2. Chemikálie

Acetonitril (LC-MS grade)	<i>Merck, Německo</i>
Agar	<i>Oxoid, USA</i>
Agarosa	<i>Serva, Německo</i>
Akrylamid	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
Ampicilin	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
Azid sodný	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
BSA	<i>New England Biolabs, USA</i>
CCA (α-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina)	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Serva, Německo</i>
Síran měďnatý pentahydrát	<i>Lach-Ner, ČR</i>

DMSO	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
DNA marker 1 kb	<i>New England Biolabs, USA</i>
DTT	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
Ethanol	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Ethidium bromid	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
4-Ethylmorfolin	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
Glukosa	<i>Lach-Ner, ČR</i>
HEPES	<i>Serva, Německo</i>
Chlorid hořečnatý	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Chlorid sodný	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Imidazol	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
Dihydrogenfosforečnan draselný	<i>Lach-Ner, ČR</i>
IPTG	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
Isopropanol	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Jodacetamid	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
Kvasničný extrakt (autolyzát)	<i>Oxoid, USA</i>
Kyselina octová	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Kyselina octová (LC-MS grade)	<i>Merck, Německo</i>
2-merkaptoethanol	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
Síran hořečnatý	<i>Lach-Ner, ČR</i>
$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$	<i>Cambridge Isotope Laboratories, VB</i>
Dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát	<i>Lach-Ner, ČR</i>
NHS-fluorescein	<i>Thermo Scientific, USA</i>
N,N'-methylen-bis-akrylamid	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
PNPA	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
SDS	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Standard pro gradientovou elektroforézu	<i>Invitrogen, USA</i>
Standardy pro SDS-PAGE	<i>Serva, Německo</i>
TCEP	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
TEMED	<i>Serva, Německo</i>
TFA (LC-MS grade)	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>

Thiamin hydrochlorid	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
Tris	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Trypton, pepton	<i>Oxoid, USA</i>
Ultračistá voda (LC-MS grade)	<i>J.T.Baker, USA</i>
Síran zinečnatý	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Ostatní chemikálie	<i>Lach-Ner, ČR</i>

3.3. Soupravy a vektory

JETSTAR 2.0 Plasmid Maxiprep Kit	<i>Genomed, Německo</i>
pET-21a(+)	<i>Novagen, USA</i>

3.4. Enzymy a inhibitor proteas

DNAsa I (2 000 U.mg ⁻¹)	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
hCA-I (100-500 U.mg ⁻¹)	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
<i>HindIII</i> (20 000 U.ml ⁻¹)	<i>New England Biolabs, USA</i>
lysozym (250 µg.ml ⁻¹)	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
<i>NdeI</i> (20 000 U.ml ⁻¹)	<i>New England Biolabs, USA</i>
PMSF (inhibitor proteas)	<i>Sigma-Aldrich, ČR</i>
Trypsin (150 U.mg ⁻¹)	<i>Roche, Švýcarsko</i>

3.5. Kompetentní buňky

kmen BL21(DE3) Gold genotyp: <i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tetr <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> Hte	<i>Stratagene, USA</i>
kmen NovaBlue genotyp: <i>E. coli</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK12- mK12+) <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> F' <i>[proA+B+ lacIqZDM15::Tn10]</i> (TetR)	<i>Novagen, USA</i>

3.6. Média

LB agar: 1,25 % agar v LB médiu

LB médium: 1 % bacto-trypton; 0,5 % kvasničný extrakt; 1 % NaCl, pH 7,4

M9 minimální médium (pro přípravu 1 000 ml média): 15,1 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 3,0 g KH₂PO₄; 0,5 g NaCl; 1,0 g ¹⁵NH₄Cl; 2 ml 1 M MgSO₄; 0,1 ml 1 M CaCl₂; 4 g glukosa; 1 ml 1 M thiamin hydrochlorid

3.7. Roztoky a pufry

10× NEB 2 pufr - komerčně dostupný od firmy *New England Biolabs*

Činidlo dle Bradfordové: 0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250; 95 % (w/v) ethanol; 85 % (w/v) kyselina fosforečná

Barvicí roztok pro SDS elektroforézu: 45 % methanol; 10 % kys. octová; 0,25 % CBB R-250

Elektrodový pufr pro gradientovou elektroforézu: NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20×)

Elektrodový pufr pro SDS elektroforézu: 10 mM Tris-HCl; 20 mM glycin; 3,5 mM SDS; pH 8,3

HEPES pufr: 10 mM HEPES; 150 mM NaCl; pH 7,5

Odbarvovací roztok pro SDS elektroforézu: 10 % kyselina octová; 35 % ethanol

Pufr A pro afinitní chromatografii pro protein ¹⁵N-hCA-I: 50 mM NaCl; 1 mM NaN₃; 50 mM Na₂HPO₄; 1 mM imidazol; pH 7,5

Pufr B pro afinitní chromatografii pro protein ¹⁵N-hCA-I: 50 mM NaCl; 1 mM NaN₃; 50 mM Na₂HPO₄; 200 mM imidazol ; pH 7,5

Promývací pufr (lyzační pufr) pro afinitní chromatografii pro protein ¹⁵N-hCA-I: 50 mM NaCl; 1 mM NaN₃; 50 mM Na₂HPO₄; pH 7,5

Pufr pro gelovou chromatografii ¹⁵N-hCA-I: 40 mM fosfátový pufr; 50 mM NaCl; pH 6,2

Roztok 30 % akrylamidu: 29 g akrylamidu; 1 g N,N'-metylen-bis-akrylamid ve 100 ml H₂O

Roztok pro přípravu 1,25 % agarosového gelu: 0,75 g agarosy; 60 ml TAE pufru; 0,5 µg.ml⁻¹ ethidiumbromidu

TAE pufr (Tris-acetátový pufr s EDTA): 40 mM Tris; 20 mM kyselina octová; 1 mM EDTA; pH 8,0

2× vzorkový pufr pro SDS elektroforézu redukující: 100 mM Tris-HCl; 200 mM DTT; 14 mM SDS; 3 mM bromfenolová modř; 2 M glycerol; pH 6,8

Vzorkový pufr pro gradientovou elektroforézu: NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)

4. Metody

4.1. Amplifikace syntetického genu phCA-I kódující hCA-I

Expresní plasmid (phCA-I) pro přípravu hCA-I byl na zakázku vyroben firmou Shanghai Generay Biotech Co. Konstrukt byl navržen tak, aby kompletní sekvence genu pro hCA-I (lidská karboanhydratasa I) mohla být klonována pomocí restričních endonukleas *NdeI* a *HindIII* do expresního vektoru pET-21a (+).

Plasmid phCA-I o koncentraci $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ byl poté transformován do buněk *E. coli* kmene NovaBlue i BL21(DE3) Gold.

4.1.1. Transformace kompetentních buněk *E. coli* kmene

NovaBlue

Expresní plasmid phCA-I o koncentraci $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ byl rozpuštěn v $10 \mu\text{l}$ H₂O. Bylo rozmraženo $2 \times 100 \mu\text{l}$ buněk *E. coli* kmene NovaBlue a $1 \mu\text{l}$ směsi phCA-I byl pipetován do jednoho z alikvotů. Druhý alikvot byl použit jako negativní kontrola. Buňky byly ponechány 30 min na ledu, poté byl proveden tepelný šok při $42 \text{ }^\circ\text{C}$, 50 s ve vodní lázni pro přijmutí phCA-I a buňky byly opět 2 min ponechány na ledu. Následně bylo k buňkám přidáno $800 \mu\text{l}$ LB média bez antibiotik a buňky byly inkubovány 1 hod při $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Po inkubaci byly buňky 5 min centrifugovány při $3\,000 \times g$, $700 \mu\text{l}$ supernatantu bylo odebráno, buňky byly resuspendovány ve zbylých $100 \mu\text{l}$ a vysety na agarové misky s ampicilinem ($150 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Buňky byly dále inkubovány do druhého dne při $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Veškerá manipulace s buňkami byla provedena asepticky nad kahanem.

4.1.2. Příprava plasmidové DNA metodou Maxiprep

Vybrané kolonie byly očkovány do LB média s obsahem ampicilinu ($150 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Po kultivaci do stacionární fáze byly tyto kultury centrifugovány 15 min při $6\,000 \times g$. Izolace DNA byla provedena metodou MAXIPREP a k ní určenému kitu *JETSTAR 2.0 Plasmid Maxiprep Spin Kit*. Sediment byl rozpuštěn ve $100 \mu\text{l}$ dH₂O a ve vzniklém roztoku byla spektrofotometricky stanovena koncentrace a čistota izolované DNA měřením absorpance při 260 a 280 nm. Koncentrace byla určena z empirického vztahu, kdy koncentrace $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ DNA odpovídá jednotkové absorbanci při 260 nm.

4.1.3. Restrikční analýza syntetického genu phCA-I

Přípravená plasmidová DNA byla kontrolována restrikční analýzou. Reakční směs (Tab. 1) byla inkubována 2 hodiny při 37 °C a následně analyzována pomocí agarosové elektroforézy. Agarosový 1,25 % gel byl připraven rozpuštěním 0,75 g agarosy v 60 ml TAE (1×) pufru a následným přidáním ethidium bromidu (0,5 mg . ml⁻¹) použitého jako vizualizační činidlo. Po restrikční analýze byla DNA uchována v -20 °C.

Tab. 1: Složení reakční směsi určené k restrikční analýze DNA získané metodou Maxiprep

Složka	Objem (μl)
phCA-I (1,2 μg. μl ⁻¹)	1
dd H ₂ O	8
10× NEB 2 pufr	1
<i>NdeI</i>	0,3
<i>HindIII</i>	0,3

4.2. Rekombinantní exprese ¹⁵N-značené hCA-I

Před přípravou rekombinantní ¹⁵N-značené hCA-I byla nejdříve provedena rekombinantní exprese neznačené hCA-I v LB médiu.

4.2.1. Transformace kompetentních buněk *E.coli* kmene BL21(DE3) Gold

Expres proteinu byla provedena v bakteriích *E.coli* kmene BL21(DE3) Gold s použitím plasmidu phCA-I, jehož součástí je i kontrolovaný T7 promotor. Analog laktosy IPTG indukuje expresi T7 RNA polymerasy, která poté nasedá na T7 promotor a zajišťuje transkripci DNA příslušného rekombinantního proteinu.

Transformace byla provedena stejným způsobem jako v případě transformace kmene NovaBlue (4.1.1). Kmen BL21(DE3) Gold je určen pro vysokou produkci proteinů. Jako antibiotikum byl použit ampicilin (150 μg.ml⁻¹).

4.2.2. Selekcce produkčního klonu

Kolonie kmene BL21(DE3) Gold byly jednotlivě očkované do 4×2 ml M9 minimálního média (Tab. 2) s obsahem ampicilinu ($150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Kultury byly inkubovány v třepačce přes noc do stacionární fáze při 37°C , 220 RPM.

Druhý den byly kultury použity k selekci produkčního klonu za účelem potvrzení úspěšnosti transformace a nalezení klonu produkující protein v největším množství. Do sterilních zkumavek s 8×2 ml čerstvého M9 minimálního média s ampicilinem bylo pipetováno 50 μl této kultury. Dvojice zkumavek byly vždy označeny „+“ a „-“. Po inokulaci byly kultury 1,5 hod kultivovány do exponenciální fáze v třepačce při 37°C do $\text{OD}=0,8$ při 600 nm. Poté byla teplota snížena na 30°C a kultury označené „+“ byly indukovány 1 mM IPTG a 0,5 mM ZnSO_4 . Kultury byly dále kultivovány při 30°C , 220 RPM další 3 hodiny a po uplynutí této doby byl odebrán 1 ml z každé zkumavky. Kultury byly sklizeny 10 min centrifugací při $15\,000\times\text{g}$ a proteiny analyzovány pomocí SDS elektroforézy (4.5.1).

Tab. 2 Složení M9 minimálního média (dle originálního návodu firmy Promega)

Složka	Množství
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	15,1 g
KH_2PO_4	3,0 g
NaCl	0,5 g
$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$	1,0 g
Po klávkování přidáno:	
Ampicilin ($150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	1 000 μl
1 M MgSO_4	2 ml
1 M CaCl_2	0,1 ml
40 % glukosa	10 ml
1 M thiamin hydrochlorid	1 ml

4.2.3. Velkoobjemová produkce

Kultury s největším množstvím exprimované hCA-I byly použity k velkoobjemové produkci. Kultury nacházející se ve stacionární fázi růstu byly pipetovány v množství $2\times 500 \mu\text{l}$ do $2\times 500 \text{ml}$ sterilního M9 minimálního média s ampicilinem a obsahem $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ jako jediným zdrojem dusíku (Tab. 2). Dále byly kultury kultivovány

do $OD_{600} = 0,8$ při 37 °C, 220 RPM. Po dosažení exponenciální fáze růstu byla snížena teplota na 30 °C, buňky byly indukovány 1 mM IPTG a 0,5 mM $ZnSO_4$ a ponechány růst přes noc při 30 °C. Po produkci byly kultury 10 min centrifugovány při 6 000×g a sedimenty s produkovaným proteinem použity pro přípravu bakteriálního lyzátu určeného na purifikaci pomocí chromatografických metod.

4.3. Příprava bakteriálního lyzátu určeného k separaci chromatografickými metodami

Sedimenty obsahující ^{15}N -hCA-I byly resuspendovány v 15 ml lyzačního (promývacího) pufru s obsahem 50 mM Na_2HPO_4 (pH 7,5); 1 mM NaN_3 a 50 mM NaCl. Do suspenze byl přidán 1 mM PMSF a lysosym ($250 \mu g \cdot ml^{-1}$) a směs byla 15 min inkubována při 25 °C. Buněčná suspenze byla krátkými pulsy sonikována 5 min na ledu a následně k ní bylo přidáno 5 μl DNaseI a 400 μl 1 M $MgCl_2$ a směs byla inkubována 20 min při laboratorní teplotě. Po 15 min centrifugaci při 45 000×g byl vzniklý supernatant s obsahem ^{15}N -hCA-I přefiltrován přes bakteriologický filtr a použit na purifikaci pomocí technologie IMAC.

4.4. Chromatografické metody

Separace byly provedeny na přístroji HPLC BioSys 510 za použití afinitní a gelové chromatografie. Detektor zaznamenával hodnoty absorbance při $\lambda = 280$ nm. Afinitní chromatografie dělí proteiny na základě jejich ligandů vázajících se na nosič. Gelová chromatografie dělí proteiny na základě jejich velikosti. Jednotlivé frakce byly jímány do plastových zkumavek, analyzovány SDS-PAGE (4.5.1) a uchovány při 5 °C. Kolony byly vždy po ukončení metody promyty 20 % ethanolem.

4.4.1. Afinitní chromatografie – IMAC

Pro purifikaci pomocí IMAC byla použita kolona Ni Sepharose 6FF 10/100 (Kolona Ni-NTA, ve které je sorbentem nitriltriocetová kyselina tvořící chelát s ionty Ni^{2+}). Ionty Ni^{2+} byly vyměněny za ionty Cu^{2+} použitím roztoku EDTA a následně $CuSO_4$. Výměna iontů byla provedena Mgr. Danielem Rozbeským.

Supernatant s obsahem exprimované ^{15}N -hCA-I byl filtrován přes bakteriologický filtr a nanesen na kolonu. Po ekvilibraci pufrém A s obsahem 50 mM Na_2HPO_4 , 50 mM NaCl, 1 mM NaN_3 a 1 mM imidazolem (pH 7,5) byla F_0 frakce jímána do plastové zkumavky.

Navázaný enzym byl eluován lineárním gradientem imidazolu v rozmezí od 1 mM do 200 mM po dobu 45 min a při průtokové rychlosti $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Eluce proteinu byla monitorována na průtokovém fotometrickém detektoru při vlnové délce 280 nm. Frakce obsahující ^{15}N -hCA-I byly dále purifikovány gelovou chromatografií.

4.4.2. Gelová chromatografie

Pro purifikaci pomocí gelové chromatografie byla použita kolona Superdex 200 10/300 GL. Mobilní fází byl v tomto případě 40 mM fosfátový pufr; 50 mM NaCl (pH 6,2). Jednotlivé frakce z kolony Ni Sepharose 6FF 10/100 (Ni-NTA) byly nanášeny Hamiltonovou stříkačkou o objemu 500 μl a eluce proteinu probíhala 60 min při průtokové rychlosti $0,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

4.5. Elektroforetické metody

Elektroforetické metody byly použity za účelem kontroly odpovídající velikosti proteinů a pro kontrolu jejich čistoty. Z gelu gradientové elektroforézy byly izolovány proteinové zóny, jelikož jsme chtěli ověřit lokalizaci modifikovaných lysinů fluoresceinem a také za účelem potvrzení, zda při této modifikaci nevznikají dimery nebo další supramolekulární struktury. SDS-PAGE diskontinuální elektroforéza byla provedena na soupravě od firmy Bio-Rad, gradientová elektroforéza na soupravě X-Cell Sure Lock od firmy Invitrogen.

4.5.1. Diskontinuální elektroforéza v 15 % polyakrylamidovém gelu- SDS-PAGE

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu byla provedena s přidavkem SDS (dodecylsulfátu sodného), jenž byl použit jako denaturační činidlo a zároveň proteinům udával i záporný náboj. Nejdříve byl zvlášť připraven 15 % separační a 5 % zaostřovací gel (Tab. 3 str. 42). Separační gel byl nanesen mezi 2 utěsněná skla a

převrstven vodou. Po zpolymerování byl převrstven 5 % zaostřovacím gelem. Byly vytvořeny jamky pro aplikaci vzorků, skla byla umístěna do aparatury a převrstvena elektrodoým pufrem.

Vzorky pro elektroforézu byly smíseny se vzorkovým pufrem (2×) s přidáním DTT (dithiothreitolu), denaturovány 5 min při 100 °C a dalších 5 min centrifugovány při 13 000×g. Po nanesení vzorků a standardu molekulových hmotností do jamek byla aparatura připojena ke zdroji stejnosměrného napětí 200 V. Pro vizualizaci a vyhodnocení jednotlivých proteinových frakcí byly gely 10 min barveny barvicím roztokem obsahujícím CBB R-250 a dále odbarvovány několik hodin, než byly zřetelně vidět jednotlivé zóny proteinu.

Tab. 3: Složení 15 % separačního a 5 % zaostřovacího gelu na 2 gely (2× 5 ml)

15 % separační gel	V[ml]	5 % zaostřovací gel	V[ml]
dH ₂ O	2,3	dH ₂ O	1,4
30 % acrylamid mix	5,0	30 % acrylamid mix	0,33
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5	1,0 M Tris (pH 6,8)	0,25
10 % SDS	0,1	10 % SDS	0,02
TEMED	0,004	TEMED	0,004
10 % APS	0,1	10 % APS	0,02

4.5.2. Gradientová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu-NuPAGE

Gradientová elektroforéza byla provedena s již připravenými 10 jamkovými gely NuPAGE 4-12 % Bis-Tris, které byly vloženy do aparatury a převrstveny elektrodoým pufrem. Pro každou jamku bylo smíseno 15 µl vzorku proteinu s 5 µl vzorkového pufru bez přísavku DTT.

Vzorky byly 5 min denaturovány při 90 °C a centrifugovány 5 min při 13 000×g. Takto připravené vzorky byly dále pipetovány do jamek a elektroforéza probíhala při 200 V. Po 30 min, kdy zóny s bromfenolovou modří doputovaly na spodní okraje gelů, byly gely 10 min barveny barvicím roztokem s obsahem CBB R-250 a dále několik hodin odbarvovány odbarvovacím roztokem.

4.6. Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové

Pro stanovení koncentrace proteinu ^{15}N -hCA-I z jednotlivých frakcí získaných gelovou chromatografií byla použita metoda dle Bradfordové.

Na mikrotitrační destičku bylo nejdříve v dubletech pipetováno 5 μl standardu s komerčně dostupnou hCA-I ředěnou HEPES puforem ve zvyšujících se koncentracích: 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Do dalších jamek byly z jednotlivých frakcí po 5 μl pipetovány dublety jednotlivých ředěných (10 \times) vzorků proteinů ^{15}N -hCA-I. Následně bylo ke standardům i vzorkům pipetováno 200 μl činidla Bradfordové a směsi byly inkubovány 5 min při 25 $^{\circ}\text{C}$.

Na čtečce destiček Safire² byla měřena absorbance při vlnové délce $\lambda = 595 \text{ nm}$. Tato absorbance byla vynesena do grafu jako závislost na koncentraci jednotlivých standardů hCA-I. Z jejich kalibrační křivky byla určena koncentrace jednotlivých vzorků ^{15}N -hCA-I. Činidlo Bradfordové obsahuje CBB G-250, jenž se v kyselých podmínkách váže na bazické aminokyseliny, především arginin, přičemž se díky posunu jeho absorpčního maxima změnila barva činidla z hnědé na modrou.

4.7. Příprava ^{15}N -hCA-I pro NMR měření

Jednotlivé frakce proteinů ^{15}N -hCA-I se stanovenými koncentracemi dle Bradfordové (4.6) byly smíseny a ředěny pomocí fosfátového pufru (3.7) na výslednou koncentraci 0,2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, která odpovídala počátečním podmínkám pro měření kinetických experimentů (4.9).

4.7.1. Fluorescenční značení proteinu vazbou NHS-fluoresceinu

Pro vazbu NHS-fluoresceinu bylo vyprodukováno 107 ml ^{15}N -hCA-I o koncentraci 0,2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Toto množství bylo rozděleno do 5 kádinek. Ke vzorkům ve čtyřech kádinkách byl pipetován roztok NHS-fluoresceinu ve zvyšujícím se molárním nadbytku (Tab. 4 str. 44). Podobně jako při měření relativní enzymové aktivity (Tab. 5 str. 45), byl zbylý vzorek bez přídavku nemodifikovaného NHS-fluoresceinu (wild type) rovnou připraven pro zahuštění a následné měření TROSY spekter 2D NMR. Po 2 hod, kdy proběhla reakce, byly roztoky s vázaným fluoresceinem

zahuštěny na koncentraci 10 mg.ml⁻¹ a následně při 25 °C měřeny ¹H-¹⁵N TROSY NMR spektra na spektrometru Bruker Avance III 600 MHz, disponujícím TCI kryosondou. Získaná NMR data byla zpracována a analyzována za použití NMRPipe softwaru.

Tab. 4: Objem roztoku NHS-fluoresceinu potřebný ke značení rekombinantně připravené ¹⁵N-hCA-I
F = NHS-fluorescein wt = wild type (bez přídavku NHS-fluoresceinu)

Molární nadbytek F	wt	5×	10×	50×	100×
Celková koncentrace činidla [mg.ml ⁻¹]	0,2	1,0	1,0	10,0	10,0
Objem F [μl]	0,0	346,5	693	346,5	693

4.7.2. Zahušťování proteinu

Zahušťování proteinu bylo provedeno centrikonem Amicon Ultra. Centrikony byly uchovány ve 4 °C v 1 mM NaN₃. Proteiny byly centrifugovány 20 min při 2 000×g, 25 °C na centrifuze J-6 M. Opakovanou centrifugací byly frakce s obsahem ¹⁵N-hCA-I zahuštěny na konečný objem 450-500 μl o výsledné koncentraci 8-10 mg.ml⁻¹.

4.8. Dialýza

Pro odstranění nenavázaného fluoresceinu byla provedena dialýza rekombinantně připraveného ¹⁵N-hCA-I v chladové místnosti při 4 °C. Protein nanesený na mikrokolonku byl dialyzován za stálého míchání 2×3 hodiny proti 2×2 litrům 40 mM fosfátového pufru; 50 mM NaCl (pH 6,2), ve kterém byl protein původně ředěn.

4.9. Měření relativní aktivity hCA-I

Tyto kinetické experimenty byly ze statistických důvodů provedeny pětkrát a měření bylo realizováno vždy v tripletech.

4.9.1. Vazba NHS-fluoresceinu na hCA-I

Komerčně dostupná hCA-I o zásobní koncentraci 4 mg.ml⁻¹ byla ředěna na finální koncentraci 0,2 mg.ml⁻¹. Ředění pro zvyšující se molární nadbytky NHS-fluoresceinu

bylo provedeno do jednotlivých mikrozkušavek pomocí HEPES pufru (Tab. 5). Konečný objem hCA-I v jedné mikrozkušavce byl 100 μl .

Navážených ≈ 10 mg NHS-fluoresceinu bylo rozpuštěno v potřebném množství DMSO tak, aby finální koncentrace byla přesně $70 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po vytvoření ředící řady 70, 40, 10 a $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo toto vypočítané množství NHS-fluoresceinu pipetováno k hCA-I. Z důvodu závislosti absorbance na objemu bylo nutné tento objem korigovat na stejnou hodnotu přidáním HEPES pufru (Tab. 5). NHS-fluorescein poté reagoval 2 hod s hCA-I při 25°C .

Tab. 5: Objemy a koncentrace výchozích roztoků pro fluorescenční značení hCA-I

F = NHS-fluorescein, wt = wild type (nemodifikovaná hCA-I bez přídavku NHS-fluoresceinu)

Označení vzorku	1	2	3	4	5	6	7	8
Molární nadbytek F	wt	5 \times	10 \times	50 \times	100 \times	300 \times	500 \times	1000 \times
Celková koncentrace činidla [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]	0,2	1,0	1,0	10,0	10,0	40,0	40,0	70,0
Objem F [μl]	0,0	1,65	3,30	1,65	3,30	2,47	4,12	4,71
Korekce na objem [μl]	4,71	3,06	1,41	3,06	1,41	2,24	0,59	0,0

4.9.2. Měření enzymové aktivity hCA-I

Z jednotlivých zreagovaných směsí NHS-fluoresceinu s hCA-I bylo pipetováno $3 \times 20 \mu\text{l}$ do 96 jamkové destičky (Tab. 6 str. 46). Dalších $15 \mu\text{l}$ bylo použito na detekci pomocí gradientové SDS elektroforézy (4.5.2) a zbývající množství bylo použito na měření molekulových hmotností pomocí ESI FT-ICR MS (4.10.1).

Navážených ≈ 20 mg substrátu PNPA bylo rozpuštěno v 1 ml AcN. Po rozpuštění byla směs přilita k 9 ml HEPES pufru a ihned pipetována k roztokům v 96 jamkové destičce za pomoci multikanálové pipety do jamek. Rychlým pipetováním roztoku substrátu o objemu $80 \mu\text{l}$ bylo umožněno včasné měření, dříve než začalo docházet k nežádoucímu rozpadání substrátu.

Pomocí čtečky destiček Safire² a programu XFluor Safire II byla při 384 nm po dobu 30 min měřena absorbance isosbestického bodu dvou produktů při rozkladu substrátu. Data byla vyhodnocena v programu Origin a Excel a z nich bylo poté možné určit relativní enzymovou aktivitu k aktivitě nemodifikovaného proteinu v závislosti na molárním nadbytku NHS-fluoresceinu.

Tab. 6: Rozvržení činidla na 96 jamkové destičce:

S = substrát PNPA

	1	2	3	4	5	6	7
A		0×	5×	10×	50×	100×	300×
B		0×	5×	10×	50×	100×	300×
C		0×	5×	10×	50×	100×	300×
D							
E		0×	5×	10×	50×	100×	300×
F		0×	5×	10×	50×	100×	300×
G		0×	5×	10×	50×	100×	300×
H		80 μ l S	80 μ l S	80 μ l S	80 μ l S	80 μ l S	80 μ l S

4.10. Hmotnostní spektrometrie

Kontrola rozsahu modifikace hCA-I fluoresceinem byla provedena na hmotnostním spektrometru FT-ICR APEX-Qe Ultra. Ionizační technikou byl v tomto případě elektrosprej (ESI) a data byla analyzována iontovou cyklotronovou rezonancí s využitím Fourierovy transformace (FT-ICR).

Kontrola vzorků před LC-MS analýzou byla provedena na hmotnostním spektrometru s průletovým analyzátozem ULTRAFLEX III. V tomto případě byla použita ionizační technika MALDI.

Hmotnostní spektrometrie byla použita pro lokalizaci vazby fluoresceinu na jednotlivé aminokyseliny, kontrolu kvality proteinu a ověření jeho monoisotopových hmotností.

4.10.1. Rozsah modifikace hCA-I a potvrzení její přesné monoisotopové hmotnosti

Směs proteinu s navázaným fluoresceinem (20 μ l) bylo nutné odsolit před ESI FT-ICR MS analýzou.

Do soupravy na odsolení vzorků byla vložena proteinová kolonka MicroTrap uchovávaná v 50 % AcN. Tato kolonka funguje jako HPLC na reverzní fázi. Roztoky byly nanášeny pomocí Hamiltonovy stříkačky. Kolonka byla promyta 3 \times 500 μ l roztokem 80 % AcN a 5 % HAc, dále byla ekvilibrována 2 \times 500 μ l roztokem 5 % HAc.

Směs proteinu s fluoresceinem byla nanášena na kolonku spolu se 100 μl roztoku 5 % HAc. Takto navázaný protein byl odsolen použitím 1 \times 500 μl 5 % HAc a 2 \times 500 μl 5 % HAc a 10 % AcN. Tato směs (10 % AcN a 5 % HAc) byla použita z důvodu odstranění nevázaného fluoresceinu. Protein byl uvolněn do čisté mikrozkušavky elucí o objemu 50 μl 80 % AcN + 5 % HAc.

Po analýze na hmotnostním spektrometru byla měřená data dekonvoluována metodou SNAP [90] a zpracována v programu DataAnalysis 4.0.

4.10.2. Lokalizace vazby fluoresceinu na hCA-I

Pro studium vazby byl vybrán 10 \times molární nadbytek fluoresceinu. Při tomto nadbytku byl výtěžek reakce největší (Obr. 12 str. 58) a současně docházelo k nejmenšímu ovlivnění relativní aktivity enzymu (Obr. 10 str. 56). K počáteční koncentraci 0,2 mg. ml⁻¹ a množství 100 μg proteinu bylo pipetováno 1,65 μl roztoku NHS-fluoresceinu (10 mg.ml⁻¹). Reakce byla provedena v tripletu. Současně jako kontrola byl pipetován další triplet roztoků s nemodifikovaným enzymem. Po proběhnutí reakce byla provedena SDS-PAGE gradientová elektroforéza (4.5.2). Proteinové zóny byly skalpelem vyříznuty z gelu a nakrájeny na kostičky o velikosti cca 0,2 mm. Po vložení do mikrozkušavek k nim bylo pipetováno 100 μl AcN a 100 μl N-ethylmorfolinoacetátového pufru (100 mM, pH 8,5). Po odbarvení gelu a odebrání směsi AcN a N-ethylmorfolinoacetátového pufru bylo ke kostičkám pipetováno 200 μl AcN pro dehydrataci. Po 5 min sonikaci byl AcN odebrán a ke gelu bylo pipetováno 50 μl 50 mM roztoku TCEP. Následovala 10 min inkubace při 90 °C. Po odebrání TCEPu byly kostičky opět vysušeny 200 μl AcN, vortexovány a po odebrání AcN byl přidán iodacetamid (50 μl 50 mM), jako alkylační činidlo případných rozrušených S-S můstků. Inkubace proběhla 30 min ve tmě a iodacetamid byl odebrán. Dále probíhalo promývání pufrů, solí a SDS, při kterém bylo vždy přidáno 100 μl AcN. Směs byla 5 min sonikována, odstraněna kapalná část a přidáno 100 μl H₂O. Znovu proběhla 5 min sonikace a odebrání H₂O. Uvedené promývání bylo provedeno celkem 3 \times po sobě. Na závěr bylo ke gelu pipetováno 50 μl 50 % AcN. V zápětí byl roztok AcN odebrán a gely byly vysušeny na vakuové odparce (speedvac). Po přidání 50 μl 50 mM N-ethylmorfolinoacetátového pufru a 10 % AcN, bylo přidáno

0,5 μl trypsinu ($500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Štěpení proběhlo přes noc při 37°C . Poté byla potvrzena přítomnost peptidových štěpů hmotnostní spektrometrií MALDI TOF.

Vzorky byly nanášeny na MALDI terčík v množství $0,5 \mu\text{l}$, stejně jako Peptidový MixII, který byl použit jako standard. Ke vzorkům byl pipetován $1 \mu\text{l}$ matrice složené z roztoků $4 \mu\text{l}$ $0,1\%$ TFA dále $4 \mu\text{l}$ 80% AcN a $0,1\%$ TFA a nakonec $4 \mu\text{l}$ CCA (α -kyano-4-hydroxy skořicová) v nasyceném methanolovém roztoku. Poměr těchto roztoků byl 1:1:1. Pokud se jednotlivé štěpy shodovaly s jejich očekávanou molekulovou hmotností, byla provedena extrakce peptidů.

Směsi určené k extrakci peptidů byly centrifugovány 5 min při $12\,000\times g$ a supernatant přenesen do čistých mikrozkušavek. Ke zbytkům gelu bylo přidáno $50 \mu\text{l}$ roztoku 80% AcN a $0,1\%$ TFA. Po 1 min sonikaci byl extrakt přidán k odebranému supernatantu, ke kouskům gelu dále přidáno $0,1\%$ TFA, po 1 min sonikaci byl extrakt opět přidán k supernatantu a gel převrstven 50% AcN, opět 1 min sonikován a výsledný extrakt přidán k odebranému supernatantu. Supernatant byl poté vysušen na vakuové odparce a sediment byl resuspendován v $5 \mu\text{l}$ roztoku 80% AcN a 1% TFA, ke kterým bylo přidáno $200 \mu\text{l}$ $0,1\%$ TFA. Před kontrolou pomocí MALDI MS byly vzorky odsoleny podobně jako v kapitole 4.10.1. Tentokrát byla ale použita peptidová kolonka MacroTrap. Ekvilibrace a odsolení bylo provedeno roztokem $0,1\%$ TFA, eluce probíhala v objemu $150 \mu\text{l}$ roztokem 1% TFA a 80% AcN.

Po kontrole vzorků pomocí MS MALDI-TOF byla provedena analýza LC-MS na přístroji Agilent Technologies 1200 Series. Na koloně Magic C18-AQ probíhala 30 min eluce při průtokové rychlosti $5 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, teplotě 30°C a gradientu 10 - 45% AcN. Dále byly vzorky analyzovány hmotnostní spektrometrií ESI FT-ICR.

Data z MALDI-TOF byla vyhodnocena v programu FlexControl 3.3 a data z ESI FT-ICR MS vyhodnoceny v programu DataAnalysis 4.0 a dále pomocí programu *Links* [91].

5. Výsledky

Vliv kovalentně vázané fluorescenční značky, konkrétně fluoresceinu, byl zkoumán na struktuře a funkci lidské karboanhydratasy I (hCA-I). Kompletní aminokyselinová sekvence je vyznačena na Obr. 4. Monoisotopová hmotnost hCA-I je 28 763,36 Da a její průměrná molekulová hmotnost 28 781,07 Da. Tato aminokyselinová sekvence byla získána z databáze UniProt [92] a vypočítané hodnoty molekulových hmotností byly získány z programu GPMW 8.0 od *Lighthouse Data*.

ASPDWGYDDKNGPEQWSKLYPIANGNNQSPVDIKTSETKHDTSLKPI SVSYN
PATAKEI INVGHSFHVNFEDNDNRSVLKGGPFSDSYRLFQFHFHWGSTNEHG
SEHTVDGVKYS AELHVAHWNSAKYSSLAEAASKADGLAVIGVLMKVGEANPK
LQKVL DALQAIKTKGKRAPFTNFDPSTLLPSSLDFTYPGSLTHPPLYESVT
WIICKESISVSSEQLAQFRSLLSNVEGDNAVPMQHNNRPTQPLKGR TVRAS F

Obr. 4: Aminokyselinová sekvence proteinu karboanhydratasy I (hCA-I).

Modře jsou znázorněny lysiny (K), které se mohou podílet na kovalentní amidové vazbě vzniklé při vazbě s NHS-fluoresceinem. Celkový počet lysinů v molekule hCA-I je 18. **Červeně** je dále vyznačen alanin (A) jenž byl acetylován.

5.1. Restrikční analýza syntetického genu phCA-I

Námi požadovaný expresní vektor pET-21a(+) s klonovanou kompletní sekvencí genu pro hCA-I (dále jen phCA-I) byl připraven na zakázku firmou Shanghai Generay Biotech Co. Expresní plasmid phCA-I byl transformován do kompetentních buněk *E.coli* kmene NovaBlue. Transformace byla provedena metodou tepelného šoku za účelem amplifikace syntetického expresního plasmidu. K následné kultivaci bylo použito antibiotikum ampicilin o koncentraci 150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Vybrané kolonie, jež narostly přes noc na agarových plotnách, byly inokulovány do 2×100 ml LB média s antibiotikem (vzorky A, B). Izolace DNA z této kultury byla provedena pomocí metody Maxiprep a k ní určené soupravě *JETSTAR 2.0 Plasmid Maxiprep Spin Kit*.

Vzorky plasmidové DNA získané metodou Maxiprep byly dále kontrolovány restrikční analýzou za použití endonukleas *NdeI* a *HindIII* a vizualizovány pomocí agarosové elektroforézy.

Dále byla měřena absorbance při 260 a 280 nm za účelem stanovení čistoty phCA-I a za účelem výpočtu koncentrace izolované DNA.

Výsledné koncentrace a výtěžky vzorků DNA byly vypočítány:

A: $c = 1,2 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ $m = 0,12 \text{ mg}$

B: $c = 0,6 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ $m = 0,06 \text{ mg}$

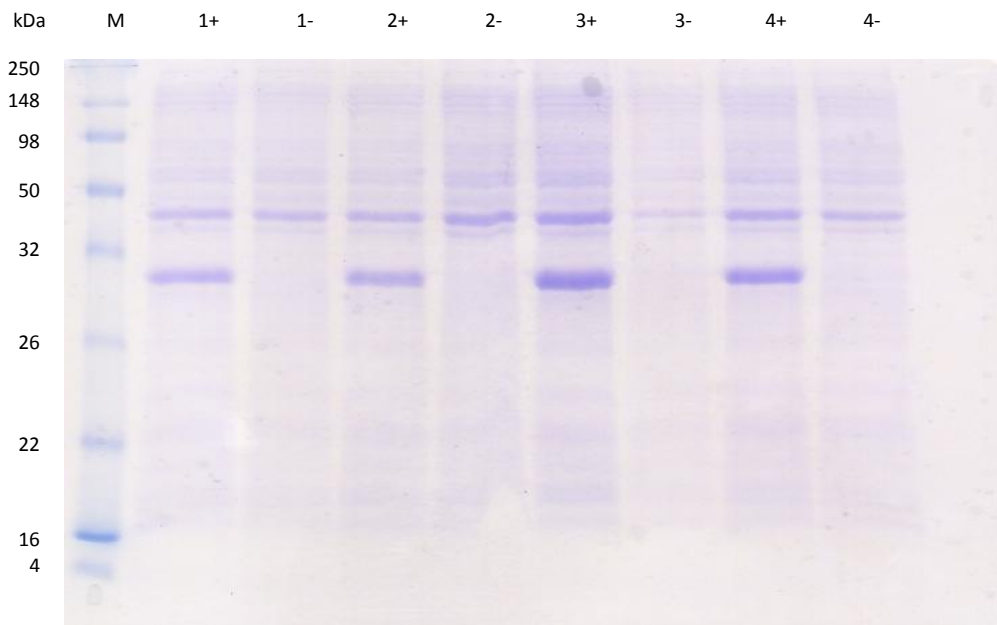
5.2. Rekombinantní exprese ¹⁵N-značené hCA-I

5.2.1. Transformace kompetentních buněk a selekce produkčního klonu

Transformace kompetentních buněk byla provedena metodou tepelného šoku. Kompetentní buňky *E.coli* kmene BL21(DE3) Gold byly transformovány expresním plasmidem phCA-I. Kultura nacházející se ve stacionární fázi byla další den použita k selekci produkčního klonu za účelem potvrzení úspěšnosti transformace a nalezení klonu produkujícího požadovaný protein v největším množství.

Byly připraveny dvojice identických kultur, přičemž vždy jedna z této dvojice byla při $\text{OD}_{600} = 0,8$ po dosažení exponenciální fáze růstu indukována 1 mM IPTG a 0,5 mM ZnSO_4 . Po produkci byly jednotlivé kultury sklizeny centrifugací ($15\ 000\times g$, 10 min) a analyzovány pomocí SDS elektroforézy. Výsledek selekce produkčního klonu je znázorněn na elektroforeogramu (Obr. 5 str. 51). Dvojice indukovaných kultur (dráhy označeny „+“) a kultur, kde indukce exprese nebyla provedena (dráhy označeny „-“), vykazují zřetelné rozdíly v proteinových profilech.

Z elektroforeogramu je patrné, že všechny testované kultury produkovaly protein, přičemž kultura s největším množstvím exprimované hCA-I, označena č. 3, byla dále použita k velkoobjemové produkci a následné purifikaci pomocí chromatografických metod. Produkované hCA-I odpovídaly proteinové zóně s molekulovou hmotností 29 kDa.



Obr. 5: Výsledek selekce produkčního klonu:

V dráze M je zobrazen standart molekulových hmotností.

Dráhy označené „+“ znázorňují proteinový profil po indukci pomocí IPTG a $ZnSO_4$.

Dráhy označené „-“ označují kultury, kde indukce exprese nebyla provedena.

5.2.2. Velkoobjemová produkce a příprava bakteriálního lyzátu určeného k separaci chromatografickými metodami

Klon č. 3 s největším množstvím exprimované hCA-I (Obr. 5), byl pipetován do 2×500 ml M9 minimálního média s obsahem ampicilinu a $^{15}NH_4Cl$ jako jediným zdrojem dusíku (Tab. 2 str. 39). Po dosažení exponenciální fáze růstu ($OD_{600}=0,8$) byly buňky indukovány 1 mM IPTG a 0,5 mM $ZnSO_4$ a dále inkubovány při 30 °C, 12 h. Touto velkoobjemovou produkcí bylo získáno dostatečné množství proteinu ^{15}N -hCA-I. Buňky byly sklizeny centrifugací 10 min při 6 000×g.

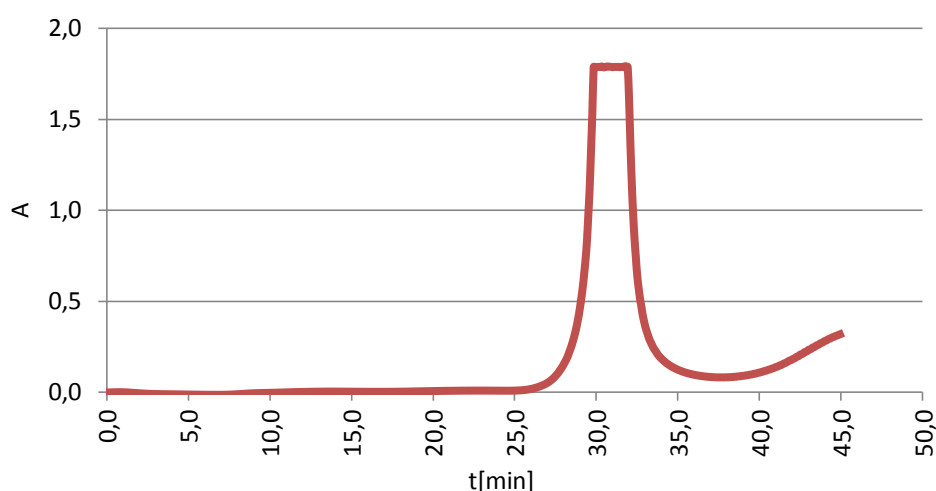
Produkovaný protein vykazoval enzymovou aktivitu, což naznačovalo, že se nacházel v nativní konformaci. Poté bylo přistoupeno k přípravě lyzátu určeného na purifikaci pomocí chromatografie.

Jednotlivé sedimenty byly resuspendovány v lyzačním pufru s obsahem 50 mM Na_2HPO_4 (pH 7,5), 50 mM NaCl a 1 mM NaN_3 . Do suspenze byl přidán 1 mM PMSF a lysozym ($250 \mu g \cdot ml^{-1}$) a směs byla inkubována 15 min při 25 °C. Vzniklý buněčný lyzát byl sonikován a zbaven DNA použitím DNasy I. Po jeho centrifugaci při 45 000×g 15 min, byl vzniklý supernatant dále použit na purifikaci technologií IMAC.

5.3. Chromatografické metody

5.3.1. Afinitní chromatografie

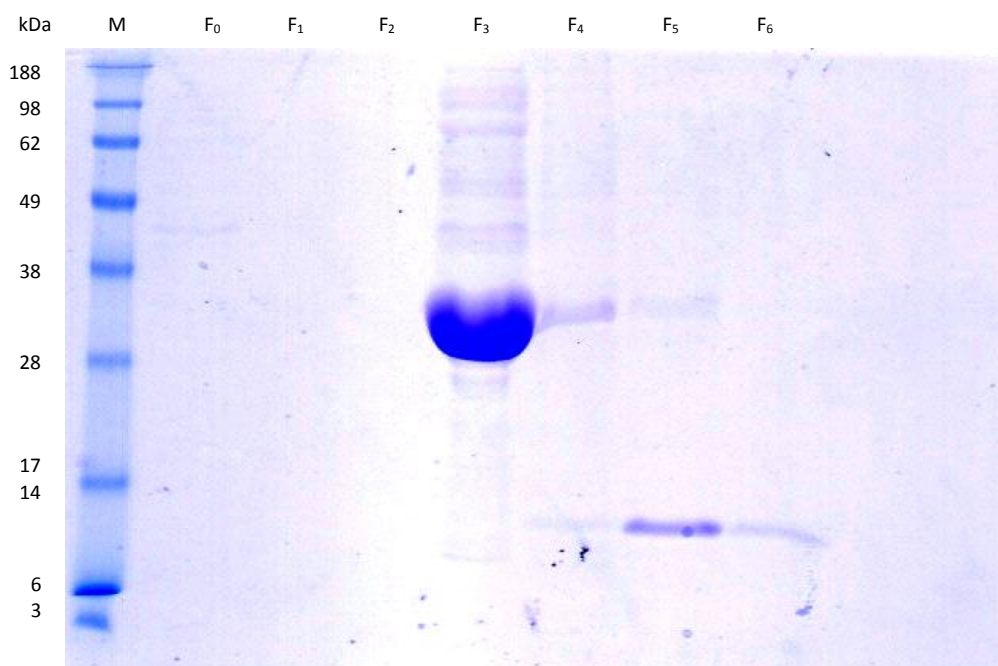
Pro purifikaci pomocí IMAC chromatografie byla použita kolona Ni Sepharose 6FF 10/100. Ionty Ni^{2+} byly odebrány pomocí EDTA a nosič byl znovu nabit ionty Cu^{2+} . Tato výměna iontů byla provedena Mgr. Danielem Rozbeským. Supernatant s obsahem exprimovaného ^{15}N -hCA-I byl filtrován a získaný filtrát byl nanesen na kolonu. Pro ekvilibraci byla kolona promyta pufrům s obsahem 50 mM Na_2HPO_4 , 50 mM NaCl, 1 mM NaN_3 a 1 mM imidazolu. Protein ^{15}N -hCA-I byl eluován lineárním gradientem imidazolu v rozmezí od 1 mM do 200 mM po dobu 45 min.



Obr. 6: Eluční profil ^{15}N -hCA-I na koloně Cu Sepharose FF - afinitní chromatografie

Detekce proteinu byla provedena měřením absorbance při 280 nm pomocí průtokového fotometrického detektoru při průtokové rychlosti $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Na Obr. 6 je zobrazen eluční profil ^{15}N -hCA-I a jeho proteinová frakce s elučním vrcholem ve 31 minutě.

Jednotlivé frakce hCA-I získané afinitní chromatografií byly za redukujících podmínek vizualizovány pomocí SDS-PAGE na Obr. 7 str. 53. Kontrola těchto frakcí proběhla z důvodu určení čistoty a homogenity exprimovaného proteinu. Čistota proteinových preparátů dosahovala 90 % a proteinové zóny odpovídaly očekávaným molekulovým hmotnostem při 29 kDa.



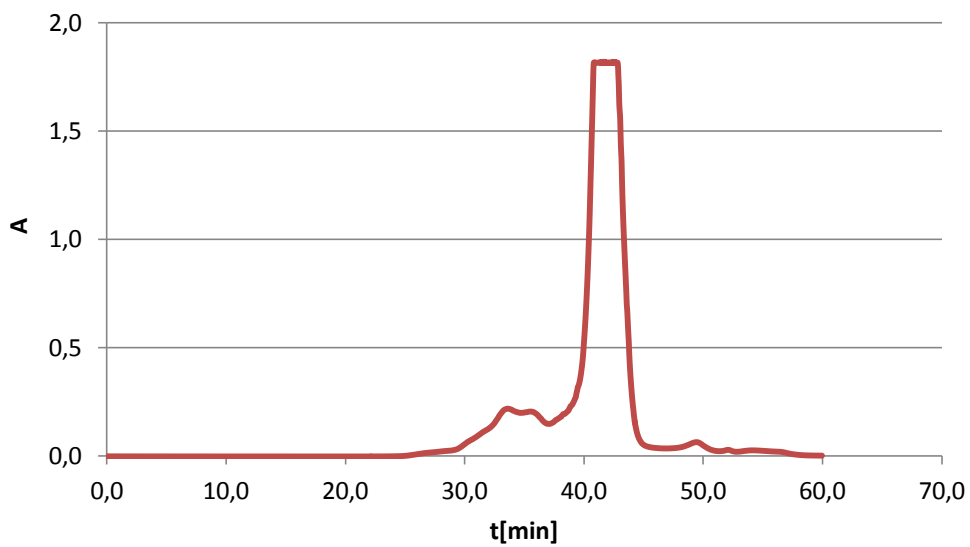
Obr. 7.: Frakce z afinitní chromatografie obsahující ^{15}N -hCA-I :

V dráze **M** je zobrazen standart molekulových hmotností, **dráha 2-4:** prošlá frakce F_0 , F_1 , F_2 bez obsahu proteinu, **dráha 5,6:** frakce F_3 , F_4 obsahující ^{15}N -hCA-I, **dráha 7,8:** frakce F_5 , F_6 bez obsahu proteinu. Časy jímání frakcí: F_0 : 0-8,1 min; F_1 : 8,1-21,1 min; F_2 : 21,1-25,5 min; F_3 : 25,5-32,0 min; F_4 : 32,0-38,2 min; F_5 : 38,2-42,0 min; F_6 : 42,0-45,0 min

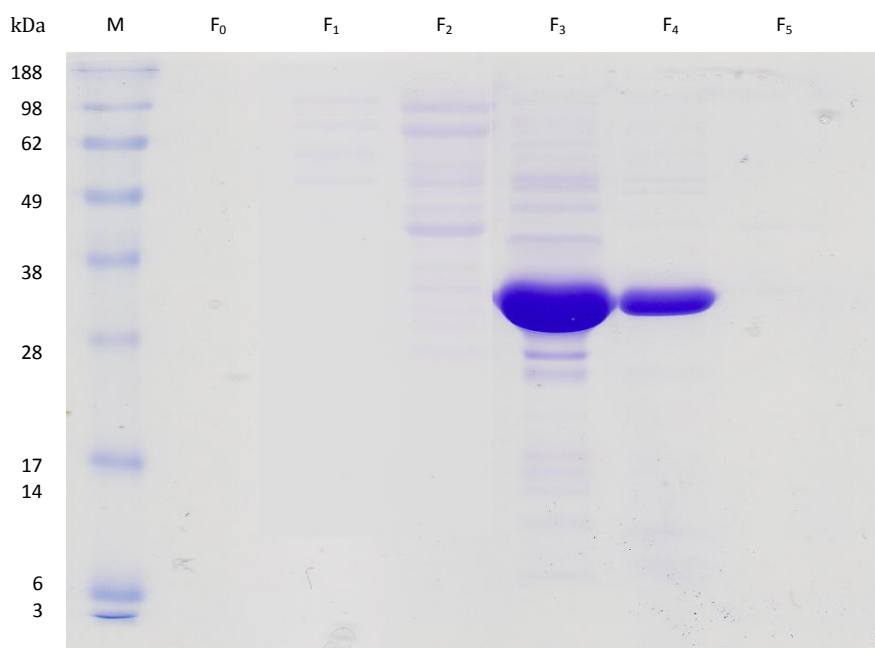
5.3.2. Gelová chromatografie

Vybrané frakce obsahující ^{15}N -hCA-I byly přečištěny gelovou filtrací za použití kolony Superdex 200 10/300 GL. Jako mobilní fáze byl použit 40 mM fosfátový pufr, 50 mM NaCl o pH 6,2. Průtoková rychlost byla nastavena na $0,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a protein byl opět detekován spektrofotometricky při 280 nm. Eluční profil ^{15}N -hCA-I je zobrazen na Obr. 8 str. 54, na kterém je vidět proteinová frakce s ostrým elučním vrcholem ve 41 minutě. Eluce proteinu probíhala 60 min.

Čistota a homogenita rekombinantně připravené ^{15}N -hCA-I byla kontrolována SDS-PAGE elektroforézou za redukujících podmínek. Výsledek elektroforetické analýzy jednotlivých jímaných frakcí po gelové chromatografii je zobrazen na Obr. 9 str. 54. Je vidět, že preparát odpovídá očekávané molekulové hmotnosti 29 kDa a je již čistý.



Obr. 8: Eluční profil ^{15}N -hCA-I - gelová chromatografie



Obr. 9: Frakce ^{15}N -hCA-I po gelové chromatografii:

V dráze M je zobrazen standart molekulových hmotností, **dráha 2,3,4:** prošlé frakce F_0 , F_1 , F_2 bez obsahu proteinu, **dráha 5,6:** frakce F_3 , F_4 obsahující ^{15}N -hCA-I, **dráha 7:** prošlá frakce F_5 bez obsahu proteinu. **Časy jímání frakcí:** F_0 : 0-27,9 min; F_1 : 27,9-33,9 min; F_2 : 33,9-35,1 min; F_3 : 35,1-42,4 min; F_4 : 42,4-46,7 min; F_5 : 46,7-60,0 min.

5.4. Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové

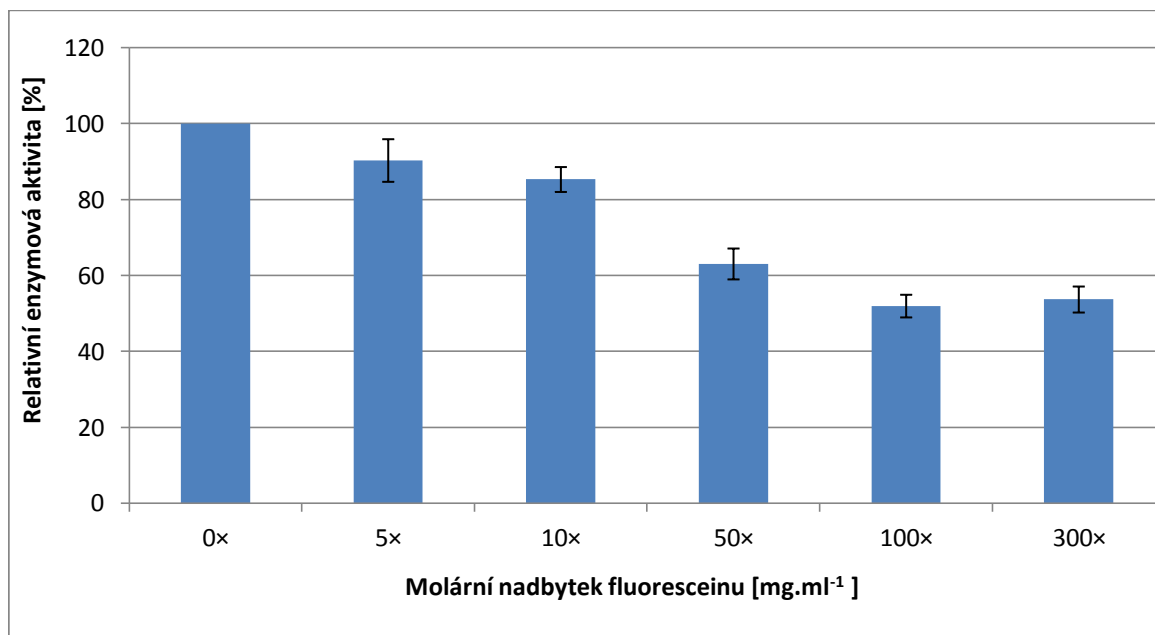
Koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích isotopově značeného proteinu ^{15}N -hCA-I z gelové chromatografie byly stanoveny metodou dle Bradfordové. Jako standard byla použita komerčně dostupná hCA-I v koncentracích 0-0,5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Z kalibrační křivky závislosti absorbance na koncentraci těchto standardů byla stanovena průměrná koncentrace exprimovaného proteinu. Celkový výtěžek byl 21,4 mg ^{15}N značeného proteinu hCA-I z 1 000 ml M9 minimálního média.

5.5. Měření relativní enzymové aktivity hCA-I

Měření relativní enzymové aktivity s komerčně dostupnou lidskou hCA-I bylo provedeno při její konstantní koncentraci 0,2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Karboanhydratasa I byla modifikována různými zvyšujícími se koncentracemi NHS-fluoresceinu v 5-300 \times molárním nadbytku a po následné reakci byla její relativní enzymová aktivita 30 min měřena pro jednotlivé molární nadbytky spektrofotometricky při 384 nm. Následně byla tato relativní enzymová aktivita porovnána s aktivitou nemodifikovaného enzymu. Jako substrát byl zvolen PNPA.

Veškeré kinetické experimenty s modifikovanou i nemodifikovanou hCA-I byly provedeny ze statistických důvodů 5 \times a vždy v tripletech. Ze zpracování bylo jedno z těchto měření vyjmuto pro odlehlost jeho výsledků. Průměrné hodnoty měření jsou znázorněny na Obr. 10 str. 56, kdy každý sloupec znázorňuje průměrné hodnoty ze 4 jednotlivých tripletů. Hodnoty 5-300 \times odpovídají zvyšujícím se molárním nadbytkům vázaného fluoresceinu. Hodnota relativní aktivity ve sloupci označeném 0 \times odpovídá nemodifikované hCA-I.

Zajímavé bylo, že se zvyšující se koncentrací NHS-fluoresceinu byla tato relativní enzymová aktivita výrazně menší a v případě 100 \times molárního nadbytku klesla téměř k 50%.

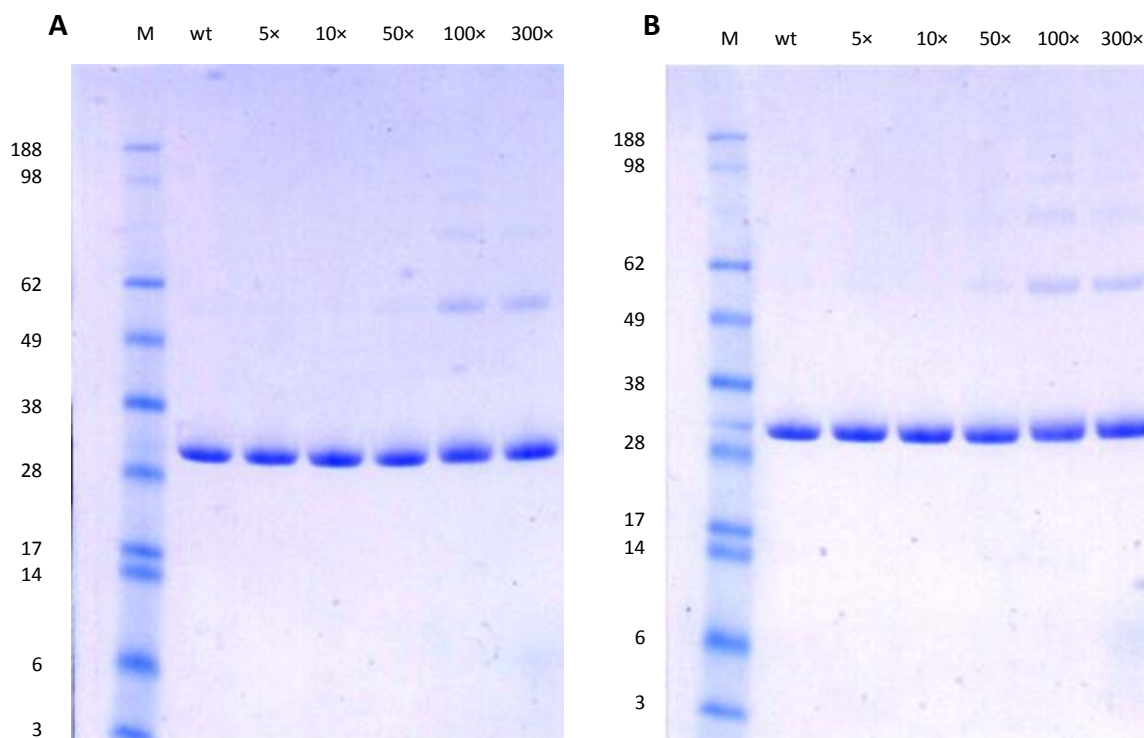


Obr. 10: Relativní enzymová aktivita hCA-I (měřená spektrofotometricky) v závislosti na zvyšujícím se molárním nadbytku NHS-fluoresceinu.

Sloupec 0x: relativní enzymová aktivita bez přidavku NHS-fluoresceinu, **sloupce 5-300x:** relativní enzymová aktivita hCA-I po vazbě NHS-fluoresceinu ve zvyšujících se molárních nadbytcích

5.6. Gradientová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu - NuPAGE

Karbonát dehydratasa I s navázaným fluoresceinem byla analyzována a vizualizována gradientovou elektroforézou pro ujištění, zda nevznikají agregáty nebo vyšší multienzymové komplexy. Agregace hCA-I byla pozorována, zvláště pro hodnoty 100x a 300x na Obr. 11 str. 57. Proteinové zóny s molekulovou hmotností 55 kDa odpovídají tvorbě dimerů a byly detekovány právě při těchto vyšších hodnotách.



Obr. 11: Gradientová elektroforéza (dublet A,B)

M značí proteinový marker se standardy molekulových hmotností, **dráha 2:** wild type hCA-I bez přídavku NHS-fluoresceinu, **dráha 3-7:** modifikovaná hCA-I se zvyšujícími se (5-300×) molárními nadbytky fluoresceinu

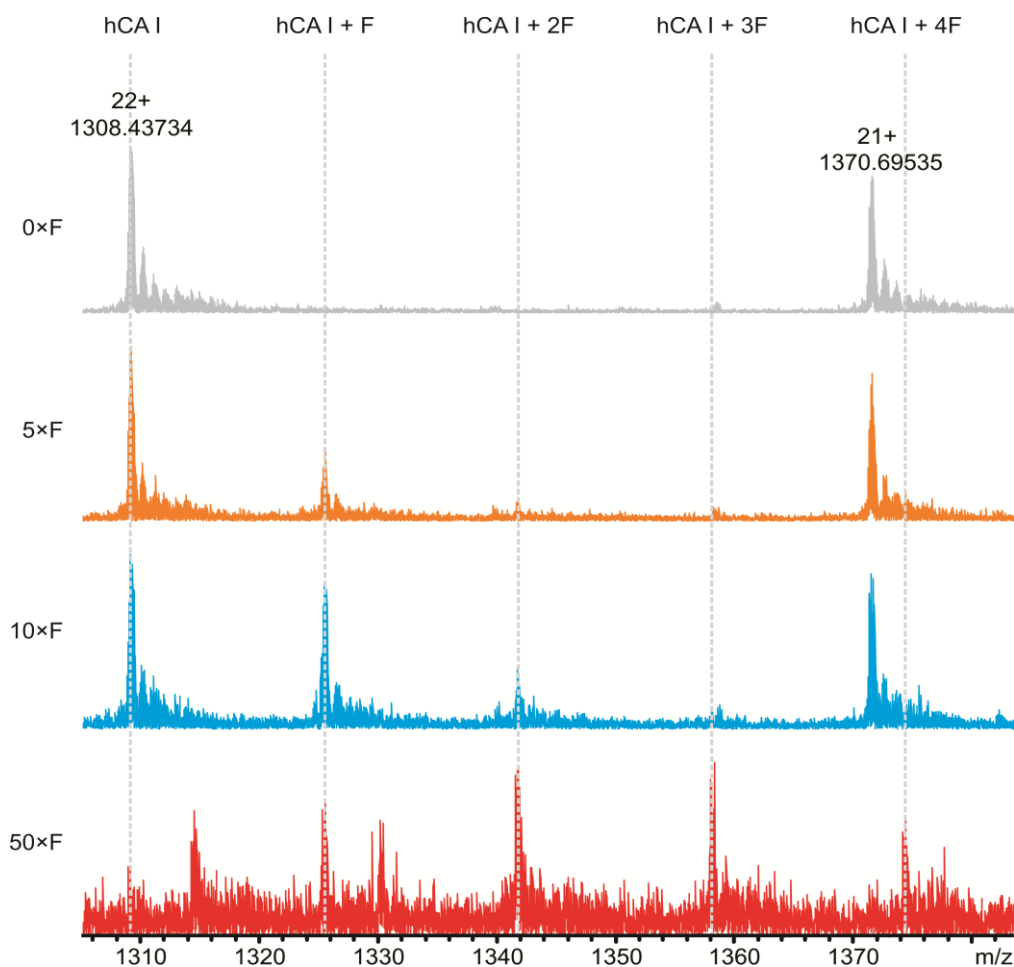
5.7. Hmotnostní spektrometrie

5.7.1. Potvrzení přesné monoisotopové hmotnosti hCA-I po vazbě s fluoresceinem a kontrola rozsahu modifikace

Rozsah modifikace hCA-I byl analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie při ionizaci elektrosprejem (ESI) FT-ICR. Na Obr. 12 str. 58 je znázorněn přehled jednotlivých měřených spekter. Přesná naměřená monoisotopová hmotnost hCA-I byla 28 763,45 Da. Tato hodnota se od teoretické monoisotopové hmotnosti 28 763,36 Da odchyluje o 0,09 hmotnostních jednotek.

Nejdříve bylo měřeno spektrum nemodifikované hCA-I (označeno jako 0×). V tomto spektru je vidět vrchol s vysokou intenzitou odpovídající nemodifikovanému proteinu. V dalším spektru je znázorněn protein modifikovaný 5× molárním nadbytkem NHS-fluoresceinu. Je zajímavé, že je ve spektru vidět vysoká intenzita nemodifikované hCA-I a zároveň se zde začíná objevovat další, menší vrchol, odpovídající jedné molekule fluoresceinu vázané na protein (hCA I + F).

Při modifikaci 10× molárním nadbytkem fluoresceinu je stále pozorována značná intenzita nemodifikované hCA-I. Intenzita proteinu s jednou molekulou fluoresceinu je vyšší oproti předchozímu spektru (5×). Současně je pozorován vrchol s nízkou intenzitou výskytu proteinu odpovídající dvěma respektive třem molekulám vázané značky (hCA I + 2F, hCA I + 3F).



Obr. 12: Přehled naměřených hmotnostních spekter hCA-I pomocí ESI FT-ICR.

Šedou barvou označeno spektrum nemodifikované hCA-I (0×F), oranžově spektrum hCA-I modifikované 5× molárním nadbytkem NHS-fluoresceinu, modře spektrum hCA-I modifikované 10× molárním nadbytkem fluoresceinu a červeně znázorněno komplexní spektrum hCA-I modifikované 50× molárním nadbytkem fluoresceinu. Produkty modifikací hCA-I s vazbou jedné (F), dvou (2F) nebo tří (3F) molekul fluoresceinu jsou vyznačeny nad spektry.

Poslední spektrum zobrazující hCA-I modifikovanou 50× molárním nadbytkem fluoresceinu je velice komplexní. Nemodifikovaná karboanhydratasa již není rozlišitelná od šumu, zatímco je pozorován vrchol s vysokými intenzitami proteinu odpovídajícími modifikaci dvěma nebo třemi molekulami (hCA I + 2F, hCA I + 3F), současně s přítomností jiných nábojových stavů (23⁺), které se ve spektru vyskytly z důvodu velkého molárního nadbytku NHS-fluoresceinu.

5.7.2. Studium lokalizace vazby fluoresceinu na jednotlivé aminokyseliny hCA-I

Pro studium lokalizace jednotlivých kovalentně vázaných molekul fluoresceinu na ϵ -aminoskupiny lysinu byl fluorescein vázán na hCA-I v 10× molárním nadbytku. Takto modifikovaný protein byl štěpen trypsinem (500 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Za použití peptidové kolonky MacroTrap s reverzní fází byla vzniklá směs peptidů odsolena a potvrzena hmotnostní spektrometrií MALDI TOF.

Pro určení lokalizace fluoresceinu na hCA-I byla použita kapalinová chromatografie (LC) ve spojení s ESI FT-ICR MS. Měření bylo ze statistických důvodů provedeno 3×. Z dat získaných hmotnostní spektrometrií pomocí LC-MS byly programem *Links* identifikovány jednotlivé kovalentně modifikované lysiny [91].

Z dat získaných hmotnostní spektrometrií bylo z celkového počtu 18 možných identifikováno 8 lysinů, jejichž ϵ -aminoskupiny prokazatelně tvořily amidovou vazbu s fluoresceinem. Identifikované lysiny jsou značeny na Obr. 13 a vypsány v Tab. 7 str. 60.

Tab. 7: Přehled identifikovaných lysinů (K) po vazbě fluoresceinu na hCA-I s 10× molárním nadbytkem NHS-fluoresceinu.

Zvýrazněný sloupec zobrazuje lysiny, jež byly modifikovány fluoresceinem, dále je znázorněna experimentální a teoretická hmotnost, odchylka, sekvence a intenzita příslušného peptidu pocházejícího z trypsinového štěpení.

č.lysinu	experimentální hmotnost	teoretická hmotnost	odchylka (ppm)	peptidy	sekvence	intenzita
K170 K172	947,4254	947,4262	0,8	169-173+1FITC	TKGKR	1,64E+06
K168	1557,7809	1557,7839	2	160-170+1FITC	VLDALQAIKTK	1,07E+08
K159	1697,8756	1697,8789	1,9	157-168+1FITC	LQKVLDAIQAIK	1,74E+07
K168 K170	1742,9034	1742,9004	1,8	160-172+1FITC	VLDALQAIKTKGK	1,54E+08
K80	1770,7616	1770,765	1,9	77-89+1FITC	SVLKGGPFSDSYR	4,88E+07
K168 K170 K172	1899,0044	1899,0015	1,5	160-173+1FITC	VLDALQAIKTKGKR	4,04E+06
K45	2287,051	2287,0557	2	40-57+1FITC	HDTSLKPISVSYNPATAK	3,82E+07
K39 K45	2833,3167	2833,3208	1,5	35-57+1FITC	TSETKHDTSLKPISVSYNPATAK	8,38E+07
K252	3330,5522	3330,5601	2,3	228-254+1FITC	SLLSNVEGDNAVPMQHNNRPTQLKGR	1,37E+07

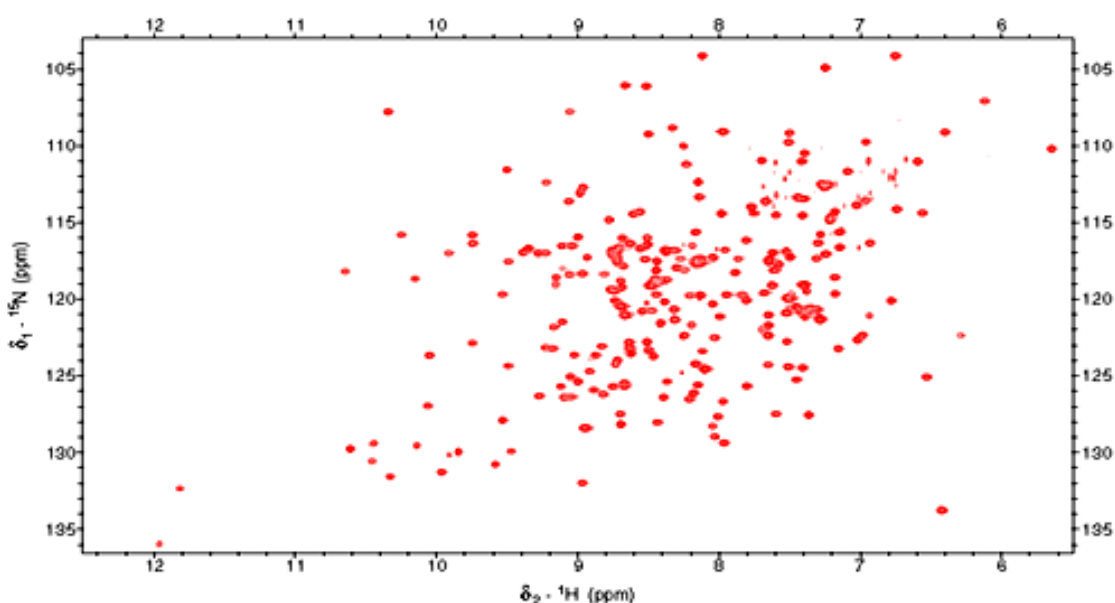


Obr. 13: Struktura lidské karboanhydratasy I

Červenou barvou jsou značeny identifikované lysiny modifikovány fluoresceinem, šedivou barvou je značen Zn^{2+} v aktivním centru vázaný na modře značené 3 histidinové zbytky.

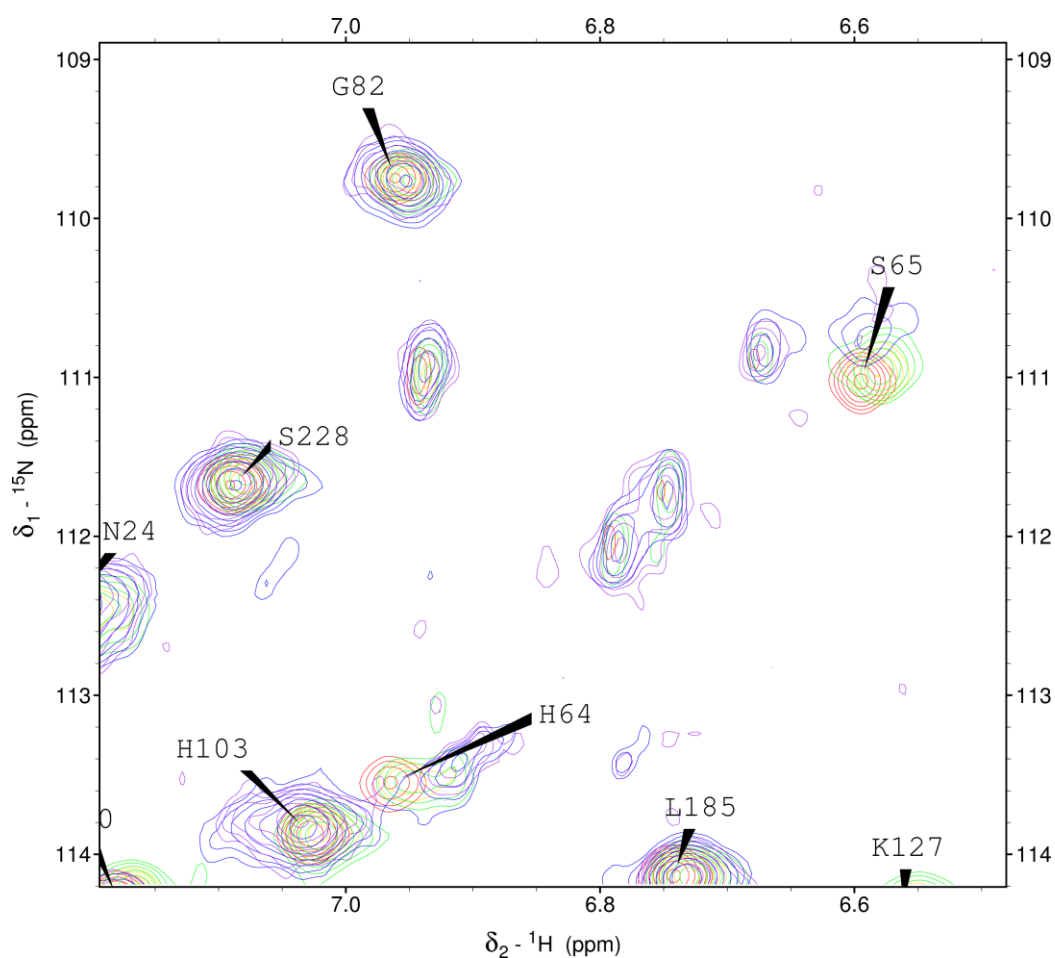
5.8. NMR měření

Metoda NMR spektroskopie byla použita k prozkoumání konformačních změn způsobených fluorescenčním značením. Změny chemických posunů amidového skeletu byly monitorovány měřením ^1H - ^{15}N TROSY spekter. Tyto TROSY spektra byly naměřeny Mgr. Josefem Chmelíkem, Ph.D. Rekombinantně připravená ^{15}N -hCA-I byla zahuštěna na výslednou koncentraci $10\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Její ^1H - ^{15}N TROSY spektrum je zobrazeno na Obr. 14. Z disperze signálu a značného chemického posunu o velikosti větší než 6 ppm je vidět, že protein disponuje kompaktním foldem.



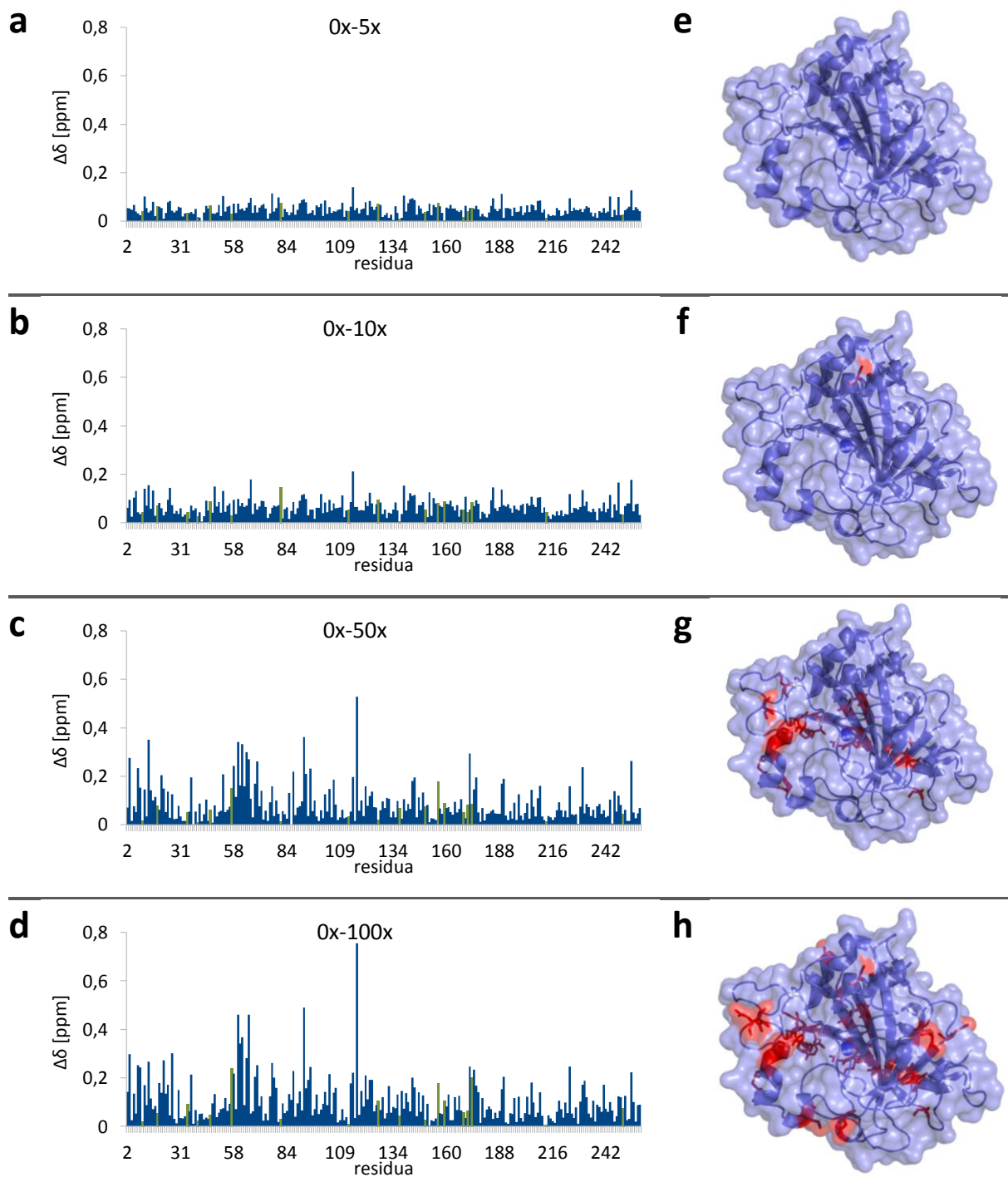
Obr. 14: Měřené spektrum ^1H - ^{15}N TROSY NMR nemodifikované hCA-I

Následně byla ^{15}N -hCA-I ředěna na koncentraci $0,2\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a modifikována $5\times$, $10\times$, $50\times$ a $100\times$ molárním nadbytkem NHS-fluoresceinu. Po proběhnutí reakce byl protein zahuštěn na koncentraci $10\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a měřená NMR spektra modifikované hCA-I byla porovnána se spektrem nemodifikovaného proteinu. Superpozice ^1H - ^{15}N TROSY spekter nemodifikovaného a modifikovaného proteinu odhalila, že ačkoliv většina signálů byla ovlivněna málo, relativní intensity a pozice některých signálů byly výrazně odlišné (Obr. 15).



Obr. 15: Superpozice ^1H - ^{15}N TROSY NMR měřených spekter nemoifikované hCA-I (červeně), hCA-I modifikované 5× molárním nadbytkem NHS-fluoresceinu (žlutě), 10× molárním nadbytkem (zeleně), 50× molárním nadbytkem (modře), 100× molárním nadbytkem (růžově). Pro zjednodušení je znázorněn jen výřez ^1H - ^{15}N TROSY NMR spektra.

Jelikož páteřní ^1H - ^{15}N rezonance hCA-I byly přiřazeny již dříve [93], mohly být spočítány odchylky chemických posunů ($\Delta\delta$) pro jednotlivé signály jako vážený průměr chemických posunů ^1H a ^{15}N (Obr. 16 str. 63). Pro kvantifikaci strukturních změn hCA-I po vazbě fluoresceinu byla zvolena hodnota $\Delta\delta > 0,2$ ppm. Po vazbě 5× molárního nadbytku fluoresceinu nebyly nalezeny žádné aminokyselinové zbytky s odchylkou $\Delta\delta > 0,2$ ppm. Při modifikaci 10× molárním nadbytkem byla tato odchylka pozorována pouze u jednoho aminokyselinového zbytku, zatímco při modifikaci 50× molárním nadbytkem již bylo těchto aminokyselin pozorováno 19. Po modifikaci 100× molárním nadbytkem bylo pozorováno dokonce 32 aminokyselinových zbytků, u kterých byla vypočítána $\Delta\delta > 0,2$ ppm (Obr. 16 str. 63).



Obr. 16: Závislost relativní odchylky chemického posunu $\Delta\delta$ na čísla aminokyselinového zbytku (**a-d**), **zeleně** jsou zvýrazněny lysinové zbytky (K). V krystalové struktuře hCA-I (**e-h**) jsou dále **červeně** zvýrazněny aminokyselinové zbytky ($\Delta\delta$ větší 0,2 ppm), jejichž stuktura byla nejvíce pozměněna při fluorescenčním značení.

6. Diskuse

Fluorescenčně značené proteiny jsou nepostradatelnou součástí mnohých biochemických a molekulárně biologických technik. Velké uplatnění našly ve studiu protein-proteinových interakcí, ve strukturním výzkumu proteinů a proteinových komplexů, dále ve vizualizaci různých buněčných struktur a kompartmentů a v celém spektru imunochemických metod. Na přípravu fluorescenčně značených proteinů se často používají komerčně dostupné fluorescenční značky, které se kovalentně vážou na protein prostřednictvím různých reaktivních skupin jako například isothiokyanátové nebo N-hydroxysukcinimidové skupiny. Kovalentní vazba této značky může v principu indukovat lokální změny ve struktuře studovaného proteinu, například narušením elektrostatických interakcí, což se může projevit ve funkci studovaného proteinu a ve finále může vést k falešně pozitivním nebo negativním výsledkům následné studie.

Doposud nebyla publikována žádná práce, která by se detailně zabývala touto problematikou, a proto cílem této diplomové práce bylo prozkoumat vliv vazby fluorescenční značky na strukturu a funkci proteinu. V práci byl studován vliv jedné z nejznámějších a nejpoužívanějších fluorescenčních značek, NHS-fluoresceinu, který pomocí reaktivní N-hydroxysukcinimidové skupiny reaguje s primární aminoskupinou lysinu nebo primární aminoskupinou N-terminální aminokyseliny za vzniku amidové vazby. Jako modelový protein byla vybrána lidská karboanhydratasa I (hCA-I), protože její strukturní a molekulově dynamické aspekty byly detailně prozkoumány ať už rentgenově strukturní analýzou nebo NMR spektroskopickými technikami [85], [86], [93]. Kromě toho je tento enzym komerčně dostupný a jeho enzymová aktivita může být jednoduše studována spektrofotometricky s použitím p-nitrofenylacetátu, jako substrátu [94].

Prvním krokem bylo studium vlivu vazby fluoresceinu na enzymovou aktivitu hCA-I. V tomto experimentu byla koncentrace proteinu konstantní, zatímco NHS-fluorescein byl přidáván v různých molárních nadbytcích. Po reakci byla měřena relativní enzymová aktivita a poté byla porovnána s aktivitou nemodifikovaného enzymu. Zajímavé bylo, že už při použití 10× molárního nadbytku NHS-fluoresceinu, relativní enzymová aktivita klesla o 10 %. Dále, se zvyšující se koncentrací

fluorescenčního činidla, se relativní enzymová aktivita postupně snižovala a při 100× molárním nadbytku činidla dosáhla pouhých 50 %. Pozorovaný jev je jasným důkazem toho, že vazba fluorescenční značky může markantně ovlivnit funkci proteinu. Příčinou tohoto jevu mohou být lokální strukturní změny v určité části proteinu, které mohou indukovat narušení topologie a celkové architektury aktivního místa enzymu. Lokální změny struktury proteinu mohou být vyvolány, jak již bylo zmíněno, například narušením elektrostatických interakcí, protože cílem ataku NHS-fluoresceinu jsou právě kladně nabitě lysiny. Vazbou jednoho záporně nabitého fluoresceinu na kladně nabitý lysin dochází ke změně až o 2 náboje na molekulu proteinu.

Připravené fluorescenční proteiny byly dále analyzovány pomocí gradientové SDS-PAGE elektroforézy, protože nás zajímalo, jestli vazbou fluoresceinu na hCA-I nedochází k proteinové agregaci nebo jiným strukturním změnám, které by se projevíly ve změně elektroforetické mobility. Překvapivá byla přítomnost proteinových agregátů, které odpovídaly dimerům, trimerům a tetramerům, pozorovaných při 100× a 300× molárním nadbytku NHS-fluoresceinu, i když byly detekovány jen v malém množství.

Z předchozích experimentů a pozorovaného trendu vyplývá, že se zvyšující se koncentrací fluorescenční značky se funkce proteinu může markantně měnit, z čehož vyplývá další velice důležitý obecný fakt a to, že při fluorescenčním značení proteinu by mělo být používáno minimální množství fluorescenční značky. Na druhé straně platí, že čím nižší koncentrace fluorescenční značky, tím nižší výtěžek reakce. Proto volba koncentrace fluorescenční značky při značení proteinu by měla být jakýmsi racionálním kompromisem mezi výtěžkem reakce a vlivem na funkci proteinu. Zajímavé je, že výrobci uvedených fluorescenčních značek tyto skutečnosti vůbec neuvádějí a v případě NHS-fluoresceinu výrobce bez jakýchkoliv dalších omezení či podmínek doporučuje použití 15× molárního nadbytku činidla ke koncentraci proteinu [95]. Toto pravděpodobně empirické doporučení bohužel vůbec nebere v úvahu velikost proteinu a počet lysinů, které jsou z hlediska výtěžku naprosto zásadní.

Dále nás zajímal vztah mezi koncentrací NHS-fluoresceinu při fluorescenčním značení, výtěžkem reakce a stupněm značení. V tomto případě byly reakční směsi

z předchozích experimentů analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie ESI FT-ICR. Z měřených spekter vyplývá, že při 5× molárním nadbytku NHS-fluoresceinu byl ve spektru pozorován majoritní vrchol odpovídající nemodifikovanému proteinu. Dále byl pozorován vrchol odpovídající molekulové hmotnosti hCA-I s jedním vázaným fluoresceinem. Se zvyšující se koncentrací fluoresceinu, intenzita vrcholu nemodifikovaného proteinu klesala a na druhé straně se zvyšovala intenzita produktu. Nebyl pozorován jenom vrchol odpovídající molekulové hmotnosti hCA-I s jedním vázaným fluoresceinem, ale také vrcholy odpovídající molekulové hmotnosti hCA-I se dvěma či třemi vázanými fluoresceiny. Se zvyšující se koncentrací NHS-fluoresceinu komplexnost reakční směsi narůstala a při 50× molárním nadbytku fluorescenčního činidla obsahovala velké množství produktů lišících se v počtu vázaných fluoresceinů a v jejich vzájemném zastoupení. Uvedený výsledek experimentu naráží na pojem stupeň značení, který je používán mnohými světovými laboratoři [96], [97], [98] na vyjádření kvality připraveného fluorescenčního proteinu a zároveň jeho stanovení doporučuje i samotný výrobce NHS-fluoresceinu [95]. Stupeň značení má být údajně číslo, které má obecně vyjadřovat počet kovalentně vázaných molekul fluorescenční značky na jednu molekulu proteinu [95]. Náš experiment dokazuje, že použití stupně značení se jeví jako neopodstatněné, protože při reakci nevzniká jeden homogenní a uniformní produkt s konstantním počtem vázaných fluorescenčních značek, ale naopak vzniká komplexní směs produktů s různým počtem vázaných fluorescenčních značek, jejichž množství a vzájemné zastoupení je zřejmě dáno určitou distribuční funkcí.

Dále nás zajímal vliv vazby fluoresceinu na samotnou strukturu proteinu, kterou jsme se rozhodli studovat pomocí NMR spektroskopie. Prvním krokem byla příprava ^{15}N značeného proteinu hCA-I (^{15}N -hCA-I) v bakteriálním expresním systému. Protein byl produkován v M9 minimálním médiu, kde jediným zdrojem dusíku byl $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. Po indukci proteinové exprese pomocí IPTG a ZnSO_4 se protein produkoval do cytoplasmy bakterií v aktivní formě, což bylo potvrzeno interakcí bakteriálního lyzátu se substrátem PNPA. Rekombinantní protein hCA-I byl dále purifikován gradientovou afinitní chromatografií IMAC. Purifikace nebyla založena na interakci Ni^{2+} nosiče a konvenční, běžně používané, hexahistidinové kotvě, ale na výskytu Zn^{2+} iontu v aktivním místě hCA-I. Netradiční princip purifikace byl v tomto případě založen na

neustálé výměně Zn^{2+} iontu mezi aktivním místem hCA-I a ionty Ni^{2+} respektive Cu^{2+} vázanými v nosiči Ni Sepharosy. Po IMAC chromatografii byl protein na závěr dočištěn pomocí gelové filtrace na koloně Superdex 200. Homogenita a vysoká čistota proteinového preparátu, která dosahovala víc, než 90 % byla potvrzena elektroforeticky a pomocí hmotnostní spektrometrie ESI FT-ICR. Hmotnostní spektrometrie dále potvrdila odštěpení iniciačního formyl-methioninu a acetylaci N-terminálního alaninu, což bylo v souladu s předchozími publikacemi [99]. Měřená isotopová hmotnost velmi dobře korelovala s teoretickou hmotností hCA-I. Kvalita proteinového preparátu byla dále kontrolována pomocí NMR spektroskopie. Disperze (rozptyl) signálu v 1H - ^{15}N TROSY spektru dokumentovala, že protein hCA-I disponuje kompaktním foldem a navíc měřené 1H - ^{15}N TROSY spektrum bylo identické se spektrem, publikovaném v časopise Journal of Biomolecular NMR [93]. Celkový výtěžek byl 21,4 mg ^{15}N značeného proteinu hCA-I z 1000 ml M9 minimálního média, což je 17 % v porovnání s publikací [100].

Při studiu vlivu vazby fluoresceinu na samotnou strukturu proteinu, byl protein ^{15}N -hCA-I značen při různých koncentracích NHS-fluoresceinu. Po reakci bylo měřeno 1H - ^{15}N TROSY spektrum, které bylo porovnáno se spektrem nemodifikovaného proteinu. Protože každý signál v 1H - ^{15}N TROSY spektru reprezentuje N-H skupinu peptidových vazeb nebo postranních řetězců některých aminokyselin, měla by se změna struktury proteinu projevit ve změně chemického posunu nebo intenzity daného signálu. Superpozice 1H - ^{15}N TROSY spekter proteinu s vázaným fluoresceinem a nemodifikovaným proteinem překvapivě odhalila, že po vazbě fluoresceinu na hCA-I nedochází k markantním strukturním změnám. Většina signálů nevykazovala signifikantní změnu chemického posunu ani frekvence, ale na druhé straně některé signály byly pozměněny. Pro kvantifikaci strukturních změn byla pro každý signál spočítána odchylka chemických posunů ($\Delta\delta$) v ppm jako vážený průměr rozdílů chemických posunů páteřních 1H - ^{15}N rezonancí ^{15}N -hCA-I. Se zvyšující se koncentrací NHS-fluoresceinu při značení se rozsah a kvantita změn postupně zvyšovala, což koreluje s měřením enzymové aktivity. Konkrétně při 5× molárním nadbytku NHS-fluoresceinu nebyl nalezen žádný signál s $\Delta\delta > 0,2$ ppm, při 10× molárním nadbytku byl nalezen pouze jeden, při 50× molárním nadbytku 19 a při 100× molárním nadbytku až 32 signálů. Zajímavé je, že markantní změna signálu

$\Delta\delta > 0,2$ ppm se nevztahuje jenom k lysinům, ale i k ostatním aminokyselinám proteinu hCA-I. Protože přiřazení signálu v ^1H - ^{15}N TROSY spektru k jednotlivým aminokyselinám hCA-I již bylo publikováno [93], byly jednotlivé změny s $\Delta\delta > 0,2$ ppm vyznačeny v krystalové struktuře proteinu. Tato vizualizace pozměněných aminokyselin v krystalové struktuře proteinu odhalila, že právě při 100× molárním nadbytku činidla dochází k rozsáhlým změnám v oblasti kavity aktivního centra enzymu, což koresponduje s pozorovaným jevem, že aktivita takto značeného enzymu vykazovala jenom 50 % aktivity nemodifikovaného proteinu.

Závěrem je možno shrnout, že vazba fluoresceinu na hCA-I má vliv na její enzymovou aktivitu a strukturu. Pokles enzymové aktivity a rozsah strukturních změn závisí na koncentraci NHS-fluoresceinu použitého v reakci. Z diplomové práce vyplývá, že volba koncentrace fluorescenční značky při fluorescenčním značení je zásadní parametr, který může ovlivnit výsledky následného experimentu. Každopádně před formulováním obecných závěrů týkajících se vztahu mezi výtěžkem reakce, velikostí proteinu a vlivu na jeho strukturu a funkci, je potřebné realizovat další podobné studie na proteinech s různou velikostí a s různými strukturně- dynamickými aspekty.

7. Závěr

- Byla připravena rekombinantní ^{15}N -hCA-I.
- Bylo pozorováno, že se zvyšující se koncentrací NHS-fluoresceinu relativní enzymová aktivita hCA-I klesala.
- Fluoresceinem modifikovaná hCA-I byla analyzována hmotnostní spektrometrií ESI FT-ICR. Analýza odhalila, že reakční směs obsahuje produkty o různé intenzitě s různým počtem fluoresceinů vázaných na molekulu hCA-I.
- Kovalentně modifikované lysiny fluoresceinem byly identifikovány za použití HPLC spojené s ESI FT-ICR MS.
- Struktura rekombinantně připravené ^{15}N -hCA-I byla po značení fluoresceinem studována měřením ^1H - ^{15}N TROSY NMR spekter. Bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací NHS-fluoresceinu se zvyšoval rozsah strukturních změn hCA-I.

8. Literatura

- [1] Queisser, H.: *Journal of Luminescence*. **24**, 3–10. (1981)
- [2] Valeur, B. and M. Berberan-Santos: *Journal of Chemical Education*. **88**, 731–738. (2011)
- [3] Smith, K.C.: *BASIC PHOTOCHEMISTRY*. (2013)
<http://www.photobiology.info/Photochem.html> [citace 20.4.2013]
- [4] Royal Society (Great Britain): *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. (1894)
- [5] Williams, R. and J. Bridges: *Journal of clinical pathology*. 371–94. (1964)
- [6] Lakowicz, J.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer London, Limited, (2009) . ISBN 9780387463124.
- [7] Zadran, S., S. Standley, K. Wong, E. Otiniano, A. Amighi and M. Baudry: *Applied microbiology and biotechnology*. **4**, 895–902. (2012)
- [8] Valeur, B. and M.N. Berberan-Santos: *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley, (2012) . ISBN 9783527328376.
- [9] Thomson, T., R. Phillips and E.W. Brayley: *The Annals of Philosophy*. Baldwin, Cradock, and Joy., (1819)
- [10] Teale, F. and G. Weber: *Biochemical Journal*. **3**, 476–82. (1957)
- [11] Beechem, J. and L. Brand: *Annual review of biochemistry*. 43–71. (1985)
- [12] Sapsford, K.E., L. Berti and I.L. Medintz: *Angewandte Chemie International Edition*. **28**, 4562–4589. (2006)
- [13] Schulman, S.: *Molecular luminescence spectroscopy: methods and applications*. Wiley, (1985) . ISBN 9780471868484.
- [14] Udenfriend, S.: *Protein science : a publication of the Protein Society*. **3**, 542–51. (1995)
- [15] Giepmans, B.N.G., S.R. Adams, M.H. Ellisman and R.Y. Tsien: *Science (New York, N.Y.)*. **5771**, 217–24. (2006)
- [16] Waggoner, A.: *Current opinion in chemical biology*. **1**, 62–6. (2006)
- [17] Yang, F., L.G. Moss and G.N. Phillips: *Nature Biotechnology*. **10**, 1246–1251. (1996)
- [18] Niwa, H., S. Inouye, T. Hirano, T. Matsuno, S. Kojima, M. Kubota, M. Ohashi and F.I. Tsuji: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **24**, 13617–22. (1996)
- [19] Remington, S.J.: *Current opinion in structural biology*. **6**, 714–21. (2006)
- [20] Shaner, N.C., G.H. Patterson and M.W. Davidson: *Journal of cell science*. **Pt 24**, 4247–60. (2007)
- [21] Livet, J., T. Weissman, H. Kang and J. Lu: *Nature*. **7166**, 56–62. (2007)
- [22] Wysocki, L.M. and L.D. Lavis: *Current opinion in chemical biology*. **6**, 752–9. (2011)
- [23] Haugland, R.P., M.T.Z. Spence and I.D. Johnson: *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. Molecular Probes, (2005) . ISBN 9780971063648.
- [24] Lavis, L.D. and R.T. Raines: *ACS chemical biology*. **3**, 142–55. (2008)
- [25] Baeyer, A.: *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. **2**, 555–558. (1871)
- [26] Ueno, Y., G.-S. Jiao and K. Burgess: *Synthesis*. 13.08.2004. *EFirst*, 2591–2593. (2004)
- [27] Riggs, J., R. Seiwald, J.H. Burckhalter, C.M. Downs and T.G. Metcalf: *The American journal of pathology*. **6**, 1081–1097. (1958)
- [28] Brinkley, M.: *Bioconjugate chemistry*. **11**, 2–13. (1992)
- [29] Sun, W. and K. Gee: *The Journal of Organic Chemistry*. **10**, 6469–6475. (1997)
- [30] Crovetto, L., R. Rios, J.M. Alvarez-Pez, J.M. Paredes, P. Lozano-Velez, C. Del Valle and E.M. Talavera: *The journal of physical chemistry*. B. **33**, 10082–5. (2008)
- [31] Panchuk-Voloshina, N., R.P. Haugland, J. Bishop-Stewart, M.K. Bhalgat, P.J. Millard, F. Mao and W.-Y. Leung: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. **9**, 1179–1188. (1999)

-
- [32] Lavis, L., T. Chao and R. Raines: ACS chemical biology. 4, 252–260. (2006)
- [33] Titus, J.A., R. Haugland, S.O. Sharrow and D.M. Segal: Journal of Immunological Methods. 2, 193–204. (1982)
- [34] Lee, L.G., S.L. Spurgeon, C.R. Heiner, S.C. Benson, B.B. Rosenblum, S.M. Menchen, R.J. Graham, a Constantinescu, K.G. Upadhy and J.M. Cassel: Nucleic acids research. 14, 2816–22. (1997)
- [35] Leytus, S., W. Patterson and W. Mangel: Biochemical Journal. 253–260. (1983)
- [36] Goddard, J.-P. and J.-L. Reymond: Trends in biotechnology. 2, 363–70. (2004)
- [37] Whitaker, J.E., R.P. Haugland, D. Ryan, P.C. Hewitt, R.P. Haugland and F.G. Prendergast: Analytical Biochemistry. 2, 267–279. (1992)
- [38] Ernst, L. a, R.K. Gupta, R.B. Mujumdar and a S. Waggoner: Cytometry. 1, 3–10. (1989)
- [39] Plášek, J. and K. Sigler: Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 33, 101–124. (1996)
- [40] Buschmann, V., K.D. Weston and M. Sauer: Bioconjugate chemistry. 1, 195–204. (2003)
- [41] Mujumdar, R.B., L. a Ernst, S.R. Mujumdar, C.J. Lewis and a S. Waggoner: Bioconjugate chemistry. 2, 105–11. (1993)
- [42] Waggoner, A.: Biochemical Spectroscopy. Academic Press, (1995) s. 362–373. ISBN 0076-6879.
- [43] Mujumdar, S.R., R.B. Mujumdar, C.M. Grant and a S. Waggoner: Bioconjugate chemistry. 3, 356–62. (1996)
- [44] Schobel, U., H.J. Egelhaaf, a Brecht, D. Oelkrug and G. Gauglitz: Bioconjugate chemistry. 6, 1107–14. (1999)
- [45] Berlier, J.E., A. Rothe, G. Buller, J. Bradford, D.R. Gray, B.J. Filanoski, W.G. Telford, S. Yue, J. Liu, C.-Y. Cheung, et al.: Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 12, 1699–1712. (2003)
- [46] Peng, X., D.R. Draney, W.M. Volcheck, G.R. Bashford, D.T. Lamb, D.L. Grone, Y. Zhang and C.M. Johnson: Optical Molecular Probes for Biomedical Applications. 60970E–60970E. (2006)
- [47] Weber, G.: Biochemical Journal. 156–167. (1952)
- [48] Kano, K. and J.H. Fendler: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2, 289–299. (1978)
- [49] Sun, W.C., K.R. Gee and R.P. Haugland: Bioorganic & medicinal chemistry letters. 22, 3107–10. (1998)
- [50] Grandberg, I.I., L.K. Denisov and O.A. Popova: Chemistry of Heterocyclic Compounds. 2, 117–142. (1987)
- [51] Karolin Jan, L.B.-A. Johansson, L. Strandberg and T. Ny: Journal of the American Chemical Society. 3, 7801–7806. (1994)
- [52] Ulrich, G., R. Ziesel and A. Harriman: Angewandte Chemie (International ed. in English). 7, 1184–201. (2008)
- [53] G.Manzini, L.Xodo, M.L.Barcellonal and F.Quadrifoglio: Nucleic Acids Research. 24, 8955–8967. (1985)
- [54] Crissman, H.A. and G.T. Hirons: Flow Cytometry Second Edition, Part A. Academic Press, (1994) s. 195–209. ISBN 0091-679X.
- [55] Mozdziak, P.E., P.M. Pulvermacher, E. Schultz and K. Schell: Cytometry. 2, 89–95. (2000)
- [56] Cosa, A.G., K. Focsaneanu, J.R.N. Mclean, J.P. Mcnamee, J.C. Scaiano, G. Cosa and K. Focsaneanu: Photochemistry and Photobiology. 6, 585–599. (2001)
- [57] O’Brien, J., I. Wilson, T. Orton and F. Pognan: European journal of biochemistry / FEBS. 17, 5421–6. (2000)
- [58] Whitaker, J.E., R.P. Haugland and F.G. Prendergast: Analytical Biochemistry. 2, 330–344. (1991)
- [59] DeLange, R. and T. Huang: Journal of Biological Chemistry. 3, 698–709. (1971)

-
- [60] Fasman, G.: Practical Handbook of: Biochemistry and Molecular Biology. CRC Press INC, (1989) . ISBN 9780849337055.
- [61] Korn, A.H., S.H. Fearheller and E.M. Filachoine: Journal of Molecular Biology. 3, 525–529. (1972)
- [62] Cleland, W.: Biochemistry. 1960, 480–482. (1964)
- [63] Riordan, J.F. and B.L. Vallee: Part B: Enzyme Structure. Academic Press, (1972) s. 521–531. ISBN 0076-6879.
- [64] Hoare, D.G. and D.E. Koshland: The Journal of biological chemistry. 10, 2447–53. (1967)
- [65] Stark, G., W. Stein and S. Moore: Journal of Biological Chemistry. 2. (1961)
- [66] Bragg, P.D. and C. Hou: Archives of Biochemistry and Biophysics. 1, 311–321. (1975)
- [67] James V. Staros: Biochemistry. 1981, 3950–3955. (1982)
- [68] Brandtzaeg, P.: Annals of the New York Academy of Sciences. 35–53. (1975)
- [69] Gray, W.R.: Enzyme Structure. Academic Press, (1967) s. 469–475. ISBN 0076-6879.
- [70] Lundblad, R.L.: Chemical Reagents for Protein Modification, Third Edition. Taylor & Francis, (2010) . ISBN 9780849319839.
- [71] Tyagarajan, K., E. Pretzer and J.E. Wiktorowicz: Electrophoresis. 14, 2348–58. (2003)
- [72] Smyth, D., O. Blumenfeld and W. Konigsberg: Biochemical Journal. 91, 589–595. (1964)
- [73] Kosower, N.S., E.M. Kosower, G.L. Newton and H.M. Ranney: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 7, 3382–6. (1979)
- [74] Valet, G., S. Bamberger, H. Hofmann, R. Schindler and G. Ruhstroth-Bauer: Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 1, 342–349. (1979)
- [75] Graber, M.L., D.C. DiLillo, B.L. Friedman and E. Pastoriza-Munoz: Analytical Biochemistry. 1, 202–212. (1986)
- [76] Gee, K.R., K. a Brown, W.N. Chen, J. Bishop-Stewart, D. Gray and I. Johnson: Cell calcium. 2, 97–106. (2000)
- [77] Minta, A., J. Kao and R. Tsien: Journal of Biological Chemistry. 14, 8171–8178. (1989)
- [78] Martin, V. V, A. Rothe, Z. Diwu and K.R. Gee: Bioorganic & medicinal chemistry letters. 21, 5313–6. (2004)
- [79] Gee, K.R., W.C. Sun, M.K. Bhalgat, R.H. Upson, D.H. Klaubert, K. a Latham and R.P. Haugland: Analytical biochemistry. 1, 41–8. (1999)
- [80] MICHAEL H. HEGGENESS and J.F. ASH: The journal of cell biology. 12, 783–788. (1977)
- [81] Mujumdar, R.B., L. a Ernst, S.R. Mujumdar and a S. Waggoner: Cytometry. 1, 11–9. (1989)
- [82] Williams, R.J., M. Lipowska, G. Patonay and L. Strekowski: Analytical chemistry. 5, 601–5. (1993)
- [83] Hawe, A., M. Sutter and W. Jiskoot: Pharmaceutical research. 7, 1487–99. (2008)
- [84] Supuran, C.T.: Bioorganic & medicinal chemistry. 6, 1377–8. (2013)
- [85] Liljas, A., K. Kannan, P. Bergsten and I. Waara: Nature. 57, 131. (1972)
- [86] Kannan, K.K., B. Notstrand, K. Fridborg, S. Lovgren, A. Ohlsson and M. Petef: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1, 51–55. (1975)
- [87] Lindskog, S.: Pharmacology & therapeutics. 1, 1–20. (1997)
- [88] Supuran, C.T.: Current pharmaceutical design. 7, 603–14. (2008)
- [89] RCSB Protein Data Bank. (2013) <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1HCB> [citace 10.4.2013]
- [90] Horn, D.M., R.A. Zubarev and F.W. McLafferty: American Society for Mass Spectrometry. 99, 320–331. (2000)
- [91] SW links.
- [92] UniProt Consortium.
- [93] Sethson, I., U. Edlund, T.A. Holak, A. Ross and B.-H. Jonsson: Journal of biomolecular NMR. 4, 417–428. (1996)

-
- [94] Khalameyzer, V., I. Fischer, U.T. Bornscheuer and J. Altenbuchner: *Appl. Envir. Microbiol.* 2, 477–482. (1999)
- [95] Pierce Biotechnology: piercenet.com.
<http://www.piercenet.com/instructions/2162082.pdf> [citace 3.2.2013]
- [96] Sednev, M. V, C. a Wurm, V.N. Belov and S.W. Hell: *Bioconjugate chemistry.* 4, 690–700. (2013)
- [97] Yu, Y., J. Liu, Z. Zhao, K.M. Ng, K.Q. Luo and B.Z. Tang: *Chemical communications* (Cambridge, England). 6360–6362. (2012)
- [98] Bhattacharyya, S., S. Wang, R. Daniel, K.W. Jr., R.A. Kruger and T.R. DeGrado: *Bioconjugate chemistry.* 6, 1186–1193. (2008)
- [99] Helbig, A.O., S. Gauci, R. Raijmakers, B. Van Breukelen, M. Slijper, S. Mohammed and A.J.R. Heck: *Molecular & cellular proteomics : MCP.* 5, 928–39. (2010)
- [100] Banerjee, A.L., M. Swanson, S. Mallik and D.K. Srivastava: *Protein expression and purification.* 2, 450–4. (2004)

