

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Přírodovědecká fakulta
UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE



David Illéš

Optimalizace purifikace rekombinantní nitrilasy

z Arthroderma benhamiae

Optimalization of purification of recombinant nitrilase from

Arthroderma benhamiae

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Praha 2013

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

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

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 5. září 2013

Obsah

1	Teoretický úvod	- 8 -
1.1.	Expresse rekombinantních proteinů	- 8 -
1.1.1.	Expresní systémy	- 8 -
1.1.2.	Inserty	- 9 -
1.1.3.	Expresní vektory	- 9 -
1.1.4.	Regulace exprese v buňkách <i>E. coli</i> BL21	- 10 -
1.2.	<i>Arthroderma benhamiae</i>	- 11 -
1.3.	Superrodina nitrilas	- 12 -
1.3.1.	Nitrilasy	- 14 -
1.3.2.	Zdroje nitrilas	- 16 -
1.3.3.	Nitrilhydratasy	- 17 -
1.3.4.	Amidasy	- 19 -
2	Cíle práce	- 21 -
3	Materiál	- 22 -
4	Metody	- 24 -
4.1.	Gelová permeační chromatografie	- 24 -
4.2.	Příprava nového preparátu nitrilasy	- 24 -
4.2.1.	Kultivace <i>E. coli</i> a produkce rekombinantní nitrilasy	- 24 -
4.3.	Iontově výměnná chromatografie buněčného lyzátu	- 25 -
4.4.	Iontově výměnná chromatografie vybraných proteinových frakcí	- 25 -
4.5.	SDS elektroforéza	- 25 -
4.6.	Gelová permeační chromatografie proteinových frakcí	- 26 -
4.7.	Stanovení koncentrace proteinu metodou dle Bradfordové	- 27 -
4.8.	Stanovení enzymové aktivity	- 27 -
5	Výsledky práce	- 28 -
5.1.	Studium oligomerního stavu nitrilasy z <i>A. benhamiae</i>	- 28 -
5.1.1.	Gelová permeační chromatografie neredukované nitrilasy	- 28 -
5.1.2.	Gelová permeační chromatografie redukované nitrilasy	- 29 -
5.1.3.	Závislost míry redukce nitrilasy na koncentraci β -merkptoethanolu	- 30 -
5.2.	Rekombinantní exprese a purifikace nitrilasy	- 32 -
5.2.1.	Iontově výměnná chromatografie buněčného lyzátu	- 32 -

5.2.2.	Iontová výměnná chromatografie proteinových frakcí	- 33 -
5.2.3.	Gelová permeační chromatografie kontaminované frakce nitAB.....	- 35 -
5.2.4.	Gelová permeační chromatografie čisté frakce nitrilasy	- 36 -
5.2.5.	SDS elektroforéza frakcí nitAB po gelové permeační chromatografii	- 37 -
5.2.6.	SDS elektroforéza závislosti míry redukce na době uplynulé od přípravy vzorku	- 39 -
5.2.7.	Stanovení enzymové aktivity	- 41 -
6	Diskuze	- 42 -
7	Závěr	- 45 -
8	Seznam citované literatury	- 46 -

Seznam zkratek

AA	<u>a</u> krylamid
APS	peroxosíran amonný („ <u>a</u> mmonium <u>p</u> ersulphate“)
β-ME	beta-merkapt ethanol, 2-merkapt ethanol
BisTris	<u>B</u> is(2-hydroxyethyl)amino- <u>t</u> ris(hydroxymethyl)methan
CoA	koenzym A („ <u>c</u> oenzyme <u>A</u> “)
DNA	deoxyribonukleová kyselina („ <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid“)
DTT	<u>d</u> ithio <u>t</u> hreitol
EC	systémové číslo enzymu („ <u>e</u> nzyme <u>c</u> omission number“)
Fhit	fragilní fragment histidinové triády „ <u>f</u> ragile <u>h</u> istidine <u>t</u> riade fragment“
HEPES	4-(2- <u>h</u> ydroxyethyl)-1- <u>p</u> iperazinethansulfonová kyselina
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie („ <u>h</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography“)
IPTG	<u>i</u> sopropyl <u>t</u> hiogalaktopyranosid
MWCO	limit propustnosti membrány („ <u>m</u> olecular <u>w</u> eight <u>c</u> ut <u>o</u> ff“)
NHase	nitrilhydratasa
nitAB	<u>n</u> itrilasa z <u>A</u> rthroderma <u>b</u> enhamiae
NAD	nikotinamidinukleotid („ <u>n</u> icotin <u>a</u> mid <u>i</u> nucleotide“)
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok („ <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline“)
SDS	dodecylsulfonát sodný („ <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulphonate“)
TEMED	tetramethylethylenediamin („ <u>t</u> etramethylethylene <u>d</u> iamine“)
Tris	<u>t</u> ris(hydroxymethyl)aminomethan

Seznam symbolů

°C	stupeň Celsia
AU	absorpční jednotky („ <i>absorption units</i> “)
Da	Dalton (1 Da = 1 g mol ⁻¹)
g	gram
λ	vlnová délka
min	minuta
ot	otáčky
s	sekunda
U	units (1 U = 1 μmol ml ⁻¹ min ⁻¹)

Úvod

Nitrilasy se v minulých letech staly terčem zájmu díky jejich potenciálnímu uplatnění v průmyslu, jakožto prostředku k degradaci nitrilů a produkci karboxylových kyselin v různých průmyslových odvětvích. Tato práce se zabývá optimalizací purifikace nitrilasy z vláknité houby rodu *Arthroderma benhamiae*, jejíž sekvence genu, kódující produkci nitrilasy, byl rekombinantně vnesen do genomu bakterie druhu *Escherichia coli* BL21-Gold (DE3). Sérií ionexových a gelových permeačních chromatografií byl připraven čistý preparát rekombinantní nitrilasy s enzymatickou aktivitou k fenylacetonitrilu o hodnotě 15,5 U/mg.

Klíčová slova

nitrilasa, HPLC chromatografie, oligomerizace, proteinová krystalografie

Keywords

nitrilase, HPLC chromatography, oligomerization, protein crystallography

1 Teoretický úvod

1.1. Expresse rekombinantních proteinů

Vložením konkrétního genu či jeho části do hostitelského organismu, v němž lze vytvořit protein, jenž je danou genovou sekvencí kódován. Tento proces je nazýván expresse rekombinantních proteinů. Vytvořený protein lze od nežádoucích látek a nečistot oddělit purifikačními kroky. Takto připravený čistý produkt lze dále využít, např. pro proteinovou krystalografii a následné řešení jeho terciární struktury.

1.1.1. Expresní systémy

Expresním systémem rozumíme živý systém, který využívá rekombinantních DNA technologií za účelem produkce bioorganických látek, a to především proteinů. Expresní systémy jsou děleny na prokaryotické a eukaryotické.

Prokaryotní bakteriální expresní systémy jsou pro rekombinantní expresi v praxi nejužívanější. Výhodou je jednoduchost, vysoký výtěžek produktu a nízká finanční i časová náročnost. Bakteriální systémy ale neumožňují posttranslační modifikace, což může ovlivnit terciární strukturu exprimovaných proteinů. V této oblasti byl ale učiněn objev, kdy byl do *E. coli* vnesen gen pro glykosylační systém *C. jejuni* a jeho funkce zůstala zachována [1]. Molekulová hmotnost exprimovaného proteinu by rovněž neměla překročit 150 kDa. Protein je exprimován buď do cytosolu nebo do inkluzních tělísek, v nichž se hromadí v agregované formě. Kam bude protein exprimován závisí převážně na jeho struktuře. Protože typ exprese nelze cíleně ovlivnit, je následně potřeba zvolit vhodný purifikační postup. Mezi nejužívanější prokaryotické expresní systémy patří *Escherichia coli* [2], *B. subtilis* či *Pseudomonas fluorescens*. Bakterie rodu *P. fluorescens* jsou využívány hlavně při velkoprodukcích vakcín a bioterapeutik [3].

Eukaryotní expresní systém kvasinkový je po bakteriálních systémech druhý nejpoužívanější. Na rozdíl od systémů bakteriálních lze v tomto systému připravit proteiny s molekulovou hmotností převyšující 150 kDa. Protože v kvasinkách probíhají posttranslační modifikace, jsou proteiny exprimované touto cestou ve své nativní formě. Protein kvasinky produkují do cytosolu nebo jej sekretují

do živného média a typ exprese je ovlivnitelný použitím vhodného expresního vektoru. Dalším z eukaryotních systémů, využívaných pro expresi, je systém savců. Ke kultivaci savčích buněk je potřeba zajistit specifické koncentrace oxidu uhličitého, proto je tento systém využíván pouze ve speciálně vybavených laboratořích. Příkladem savčího expresního systému jsou buňky linie HEK293 (human embryonic kidney 293).

1.1.2. Inserty

Lineární molekula DNA, jež kóduje požadovaný protein, se nazývá insert. Na obou koncích insertu jsou sekvence, tzv. restrikční místa, která jsou shodná s restrikčními místy v sekvenci expresního vektoru. Použitím restrikčních endonukleas lze insert pomocí procesu ligace vložit do expresního vektoru. Součástí insertu musí být sekvence pro počátek transkripce (Met) a konec transkripce (stop kodon). Do insertu může být přidána specifická sekvence, jehož přítomností lze exprimovaný protein snáze identifikovat a purifikovat. Za tímto účelem bývají používány N a C-terminální značky, mezi něž patří např. Histidinová kotva, FLAG epitop, vápník vázající doména CBP („*calcium-binding protein*“) či celulosu vázající doména CBD („*cellulose-binding domain*“).

1.1.3. Expresní vektory

Expresní vektor, je většinou plazmid či virus určený k proteinové expresi v buňce. Vektory jsou využívány pro vložení specifického genu do cílové buňky. Komponenty potřebné pro správnou funkci bakteriálního expresního plazmidu jsou:

- T7 promotor – sekvence vektoru, na kterou nasedá enzym T7 RNA polymerasa. T7 RNA polymerasa pochází z bakteriofága λ , je tedy specifická jen pro úsek DNA v expresním vektoru.
- T7 počátek transkripce – místo počátku syntézy mRNA insertu.
- Klonovací místo – místo ve vektoru, kam lze zaklonovat insert. Obsahuje sekvence pro několik restrikčních endonukleáz, mezi které je insert vložen.
- T7 terminátor – místo ukončení transkripce insertu.
- LacI sekvence – gen kódující *lac* represor, který v nepřítomnosti laktosy blokuje aktivitu T7 RNA polymerasy svou vazbou na DNA v blízkosti T7 promotoru [3]
- Počátek replikace plazmidu.
- Sekvence kódující rezistenci vůči vybranému antibiotiku – umožňuje selekci bakterií, které expresní vektor obsahují a které ne.

Součástí expresního plazmidu bývá obvykle také sekvence kódující kotvu na N- nebo C- terminálním konci exprimovaného proteinu, kterou lze k proteinu připojit a tím umožnit jeho purifikaci metodou afinitní chromatografie.

Expresní vektor s vloženým genem pro rekombinantní protein je do buněk vnesen během procesu zvaného transformace. Buňky, které jsou schopny snadno přijmout plazmidovou DNA, označujeme jako kompetentní. Zvýšení permeability jejich buněčné membrány je dosahováno elektroporací nebo působením chemických činidel. Vlastní transformace je pak nejčastěji prováděna metodou tepelného šoku.

1.1.4. Regulace exprese v buňkách *E. coli* BL21

Expresí proteinu je proces, při kterém je gen využit k syntéze funkčního produktu – proteinu. Tento děj probíhá fyziologicky ve všech živých organismech. V buňkách typu BL21 lze využít umístění sekvence rekombinantního genu v expresním plazmidu přímo za specificky regulovaný promotor, označovaný jako *lac* operon.

Tři proteiny, které kóduje *lac* operon přirozeně se vyskytující v genomu bakterie, jsou zodpovědné za transport a metabolismus laktosy v buňce *E. coli* a některých dalších střevních bakteriích. Proteiny kódované v *lac* operonu jsou β -galaktosidasa, která štěpí laktosu na glukosu a galaktosu, β -galaktosidpermeasa, což je transmembránový protein zodpovědný za přenos laktosy z okolí buňky do intracelulárního prostoru a β -galaktosyltransacetylasy, která je schopna přenášet acetyl-CoA na β -galaktosidy.

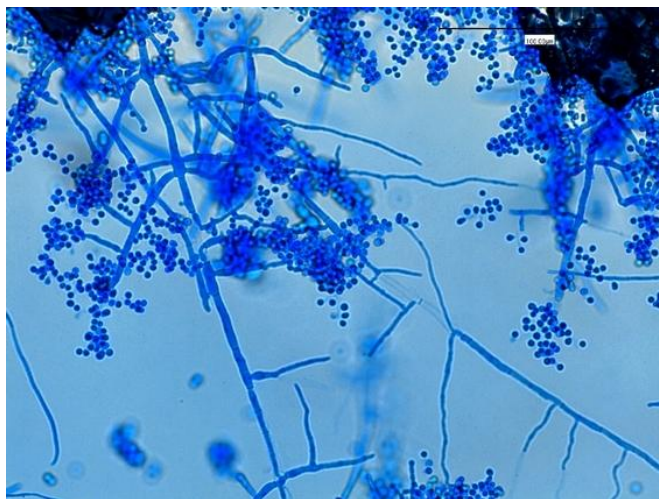
Expresí *lac* operonu je regulována *lac* represorem, který za nepřítomnosti induktoru, tedy laktosy, expresi na něm kódovaných proteinů blokuje. V přítomnosti laktosy se represor od operonu oddělí, na jeho místo přisedá RNA polymerasa a započne expresi enzymů. Po vyčerpání laktosy se represor vrací na své původní místo a proteiny *lac* operonu dále syntetizovány nejsou.

Protože je sekvence rekombinantního proteinu vložena přímo za *lac* operon v expresním plazmidu, je možné jeho expresi regulovat přidáním induktoru do živného média, ve kterém buňky nesoucí daný gen rostou. Laktosa by ale byla z média vlivem enzymů *lac* operonu bakterie rychle odbourána a represor by další

expresi zastavil, proto se pro tento účel užívá látek, které enzymatickému odbourání nepodléhají. Mezi tyto látky patří isopropyl- β -D-thiogalaktosid, fenyl- β -D-galaktosa a allolaktosa. [4]

1.2. *Arthroderma benhamiae*

Arthroderma benhamiae (obr. 1) je teleomorfa, tj. stádium v životním cyklu hub, ve kterém dochází k pohlavnímu rozmnožování. Stádium, kdy se houba rozmnožuje nepohlavně, např. pomocí astrospor, konidií a dalších rozmnožovacích orgánů, je nazýváno anamorfa. Teleomorfy a anamorfy jsou vzájemně morfologicky odlišné, proto často nesou různé názvy – anamorfa *A. benhamiae* nese název *Trichophyton mentagrophytes*. I přes morfologické rozdíly anamorf a teleomorf nesou obě formy stejnou genetickou informaci – jedná se tedy o stejný organismus. *A. benhamiae* patří mezi houby třídy *Ascomycetes*. Díky své keratinofilní povaze je *A. benhamiae* zařazena mezi zoofilní dermatofyta, což jsou kožní parazité. Keratin rozkládá chemickou i mechanickou cestou, pomocí kyselých proteas, elastas, keratinas a dalších enzymů, které jsou původci jejich virulence. Pro své potřeby asimiluje *A. benhamiae* fosfor, draslík, sodík a vápník. Je rovněž schopna zpracovávat methionin, jehoho utilizace je však inhibována přítomností kyseliny listové [5].

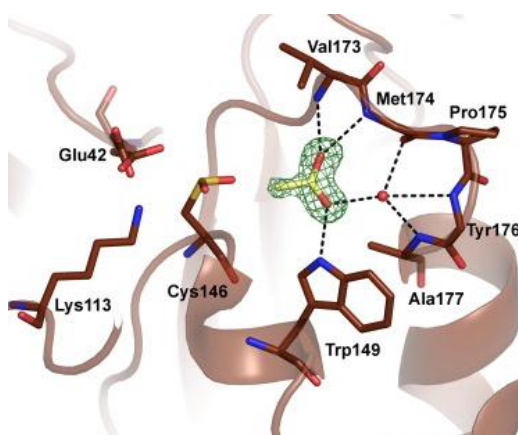


Obr. 1 - *Trichophyton mentagrophytes* – 400 \times zvětšeno, barveno laktofenolovou modří. [6]

T. mentagrophytes se vyskytuje ve dvou variantách, a to zoofilní a antropofilní. Infekce touto houbou jsou u člověka doprovázeny svěděním a vyrážkou, která se poměrně jednoduše šíří.

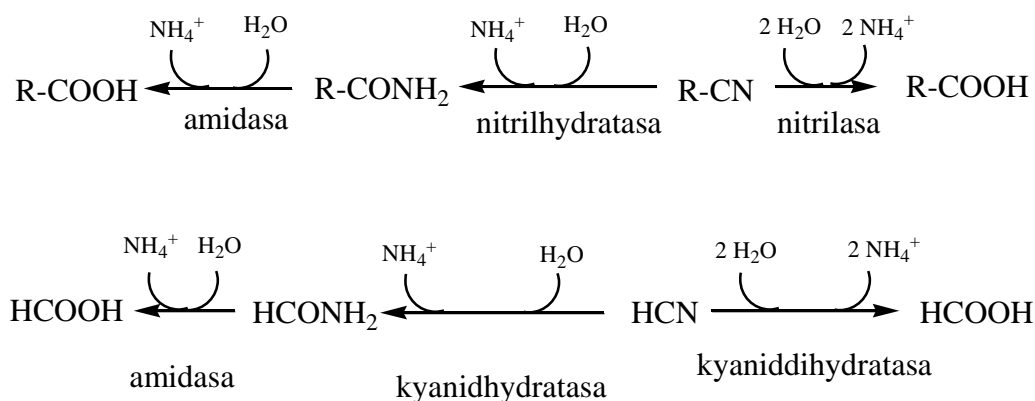
1.3. Superrodina nitrilas

Superrodina nitrilas je tvořena třinácti hlavními skupinami enzymů, jež byly rozlišeny na základě sekvenční analýzy. Do první skupiny patří nitrilasy mikrobiálního, rostlinného a živočišného původu (nitrilasy, kyanidhydratasy, kyanidhydratasy), podle níž byla celá superrodina pojmenována. Druhá až pátá skupina zahrnuje amidasy alifatické, amidasy amino-terminální, biotinidasy a β -ureidopropionasy. Karbamoylasy jsou šestou skupinou a jsou specifické schopnosti dekarbamoylovat D-aminokyseliny. Sedmá a osmá skupina sestává z NAD syntetas eukaryotního a prokaryotního původu. Ty jsou schopny zpracovat volný amoniak či glutamin a následně katalyzovat přesun amidového dusíku na široké spektrum substrátů. Apolipoprotein N-acyltransferasy byly začleněny do skupiny číslo devět a katalyzují přenos acylové skupiny na lipoproteiny v gramnegativních bakteriích. Skupina deset obsahuje enzymy, jež jsou spojeny s funkcí Fhit, na základě tzv. „rosetta stone“ vztahu mezi těmito dvěma enzymy. Jako „rosetta stone“ proteiny označujeme proteiny, které jsou složeny z několika vzájemně interagujících podjednotek, jež jsou při proteosyntéze vytvářeny v jednom uceleném řetězci. Příkladem „rosetta stone“ proteinu je např. acetát-CoA transferasa v *E. coli*, homologní protein je u člověka tvořen ze dvou podjednotek. Do skupin jedenáct až třináct patří enzymy spojené s posttranslačními modifikacemi proteinů, pro něž nebyla nalezena ani určena substrátová specifita [6]. Nitrilasová superrodina katalyzuje hydrolýzu nepeptidových vazeb mezi uhlíkem a dusíkem v proteinových i neproteinových substrátech. Proteinová rodina superrodina je charakteristická typickým $\alpha\beta\alpha$ - $\alpha\beta\alpha$ uspořádáním proteinových podjednotek [6,7,8]. Jako katalytické centrum byla identifikována trojice aminokyselin Cys, Glu a Lys v aktivním místě enzymu (obr. 2 na následující straně) [6, 7].



Obr. 2 – aktivní místo nitrilasy (Cys146 v oxidované formě, Lys113 a Glu42) termoaktivní nitrilasy *Pyrococcus abyssi*. V zelené elektronové mapě se nachází acetátový ion. V koordinované vazbě na Pro175, Tyr176, Ala177 a acetát je znázorněna molekula vody. [9]

Katalytické vlastnosti nitrilas, kyanidhydratas a kyanidhydratas jsou i přes svou podobnost v aminokyselinové sekvenci značně odlišné. Oproti nitrilasam, které přijímají za své substráty často široké spektrum látek, mají kyanidhydratas a kyanidhydratas vysokou specifitu pouze pro kyanovodík, aktivita těchto dvou skupin enzymů vůči nitrilům je v porovnání s aktivitou vůči kyanovodíku nižší. Reakce katalyzované jednotlivými členy superrodiny nitrilas jsou uvedeny v obr. 3.

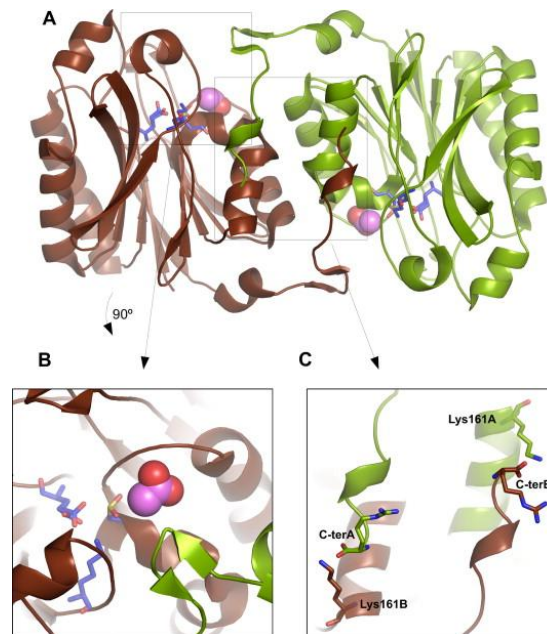


Obr. 3 – reakce organických nitrilů a kyanovodíku katalyzované enzymy, jež jsou členy nitrilasové superrodiny, včetně nitrilhydratasy, která do této superrodiny nepatří (lyasa).

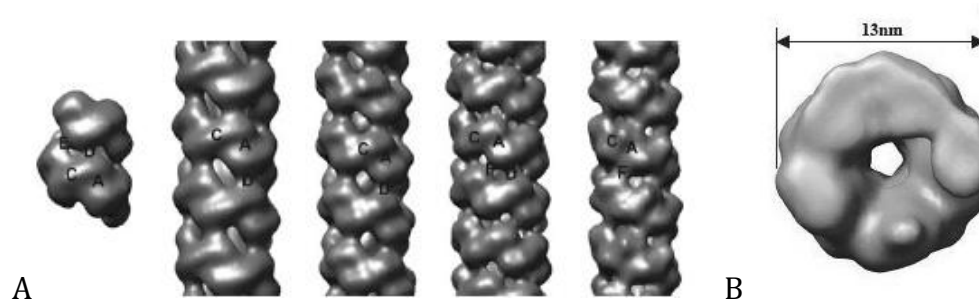
1.3.1. Nitrilasy

První nitrilasa (E.C. 3.5.5.1) byla izolována z listů chmele a byla schopná přeměňovat indolacetonitril na indol-3-octovou kyselinu, což je látka podporující prodlužování buněk (auxin) [10]. Původně byla pojmenována indolacetonitrilasa, ale analýzou substrátové specifity bylo zjištěno, že je tento enzym za svůj substrát schopen pojmout široké spektrum látek. Díky tomuto objevu byl enzym později přejmenován na nitrilasu.

Nitrilasy se skládají nejčastěji z jednoho, případně dvou typů podjednotek, které se skládají do spirálovitých terciárních struktur různých délek, např. nitrilasa z *P. stutzeri* AK61 vytváří spirály ze 14 podjednotek, kdežto homologní enzym z *B. pumilus* C1 a 8A3 vytváří helixy z 18 a 22 podjednotek [11]. Strukturální analýzou byla identifikována místa zodpovědná za interakci na úrovni podjednotek. Tato místa, respektive plochy, byly označeny písmeny A, B, C, D, E a F. Plochy A, C, D a F se v krystalové struktuře účastní spiralizace, zatímco plocha B ne. Plocha B byla objevena pouze v krystalových formách N-karbamyl-D-aminokyselina-amidohydrolasy [7] a NitFHit proteinu [8], ve kterých podjednotky vytvářejí tetramer [9, 11]. Nitrilasa z *R. rhodochrous* J1 vykazuje plochu D, kdežto kyanidhydratasy mají buďto samotnou plochu F nebo obě plochy D i F. Asymetričnost plochy E způsobuje ukončení spirály oligomeru. V mikrobiálních nitrilasach byly prozatím elektronovou mikroskopií vizualizovány pouze symetrické plochy C, D a F a asymetrická plocha E. Všechny mikrobiální nitrilasy, pro něž jsou dostupná data, vykazují prodloužený C-terminální řetězec. Ten je zodpovědný za podporu tvorby spirálové struktury a díky své flexibilitě může interagovat s jinou částí podjednotky, která je v blízkosti aktivního místa a tím ovlivňovat aktivitu a stabilitu šroubovice (obr. 4 a 5 na následující straně). [9, 11]



Obr. 4 – **A** – trojrozměrný model dvou podjednotek nitrilasy *Pyrococcus abyssi* spojených do dimeru. Kuličkovým modelem jsou znázorněny molekuly acetátu, aktivní místa nitrilasy jsou zobrazena tyčinkovým modelem. **B** – detail vazebného místa, otočeno o 90° směrem dolů v porovnání s obrázkem A. **C** – detail prodloužených C-terminálních řetězců s interagujícími aminokyselinovými zbytky zobrazenými jako tyčinkové modely [9].



Obr. 5 – **A** - rekonstrukce mikrobiálních nitrilas studovaných při nízkém rozlišení elektronovou mikroskopií. Zleva – kyanidhydratasa z *P. stutzeri* AK61, kyanidhydratasa z *B. pumilus* C1 při pH 5,4, nitrilasa zkrácená na C-konci z *R. rhodochrous* J1, kyanidhydratasy z *N. crassa* a *G. Sorghi*. **B** – pohled do nitra helixu nitrilasy z *R. rhodochrous* J1 odhaluje centrální dutinu [11].

1.3.2. Zdroje nitrilas

Nitrilasy byly v průběhu času objeveny, ať už prakticky či teoreticky sekvenční analýzou genomu, v četných organismech.

1.3.2.1. Nitrilasy říší *Procaryotae* a *Archeae*

Bakterie a organismy říše *Archeae* za účelem schopnosti přežít v daném prostředí. Jejich předpokládaným cílem jsou pravděpodobně nitrily produkované jinými mikroorganismy a rostlinami za účelem své ochrany, dále xenobiotika, jež mohou být v přítomnosti nitrilas degradována a v neposlední řadě se předpokládá podílení se nitrilas v biosyntéze sekundárních metabolitů. Nitrilasy nejsou v bakteriích nikterak rozšířeným enzymem – ze 150 druhů bakterií, jejichž genom byl sekvenován, pouze 10 obsahovalo geny kódující nitrilasy. Nitrilasy těchto zkoumaných bakterií byly charakterizovány. Bylo zjištěno, že vlastnosti těchto enzymů, jako substrátová specifita či enantiosektivita, v některých případech korelují s prostředím, ze kterého vzorky pocházely. [12]

1.3.2.2. Fungální nitrilasy

Některé patogenní houby využívají kyanidhydratasu k napadení rostlin, které na svou obranu před infekcí produkují velká množství alkenylglukosinátů. Ty se rozkládají na isothiokyanáty a nitrily. V porovnání s mikroby houby nevykazují vysokou nitrilasovou aktivitu. Fungální nitrilasy doprovázejí další enzymy účastnící se degradace aldoximu.

Nitrilasy z hub byly pro svou afinitu k aromatickým nitrilům považovány za aromatické, jsou však schopny za své substráty pojmout i nitrily alifatické a alicyklické, jako isovaleronitril, propionitril, acetonitril, ϵ -kaprolaktam a další [13].

1.3.2.3. Rostlinné nitrilasy

Nitrilasy rostlinného původu bývají označovány za klíčový enzym biosyntézy auxinu, tedy růstového hormonu. Tato reakce probíhá hydrolýzou indol-3-acetonitrilu na indol-3-oxalovou kyselinu (IAA, „*indole-3-acetic acid*“). Vzniklá IAA má schopnost iniciovat prodlužování rostlinných buněk [14]. Nitrilasy mají ale mnohem širší fyziologické využití, a to především v detoxifikaci kyanidu – ten je produktem syntézy ethylenu, po které je vzniklý kyanid detoxifikován

přeměnou na β -kyano-L-alanin a dále na asparagin, kyselinu asparagovou a amoniak. Nitrilasa je tedy i součástí rostlinného systému pro recyklaci dusíku. Kyanid může být dále uvolněn z kyanogenních glykosidů (amygdalin z mandlí, linamarin z manioku) a lipidů, které se běžně vyskytují v rostlinách. V rodu *Sorghum* (čirok) byla identifikována nitrilasová isoforma, která využívá intermediát katabolického meziprojektu - kyanogenního glukosidu dhurrinu. Tím umožňuje metabolizovat kyanoglukosid bez uvolnění toxického kyanidu. Reakce probíhá přeměnou (Z)-*p*-hydroxyfenylacetaldoximu na *p*-hydroxyfenylacetonitril [14, 15].

1.3.2.4. Živočišné nitrilasy

O živočišných nitrilasach se v současné době mnoho neví. Do této skupiny patří již dříve zmiňovaný člen nitrilasové rodiny *Nit1*, objeveném v *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabdits elegans* (str. 12, oddíl 3.2., [8]). Homolog tohoto proteinu byl objeven i u savců, v nichž ale není protein *Nit1* připojen k 5'-terminálnímu řetězci proteinu *Fhit* (Fragile histidine fragment, fragilní histidinový fragment) v tzv. „rosetta stone“ vztahu. Bylo postulováno, že *Nit1* je funkčně příbuzný k *Fhit*, který je tzv. tumorovým supresorem, a to díky schopnosti indukovat apoptosu. Myší T buňky bez *Nit1* spontánně vstupují do buněčného cyklu, procházejí cyklem rychleji a míra apoptosy u těchto *Nit1* deficitních buněk je zvýšená [16].

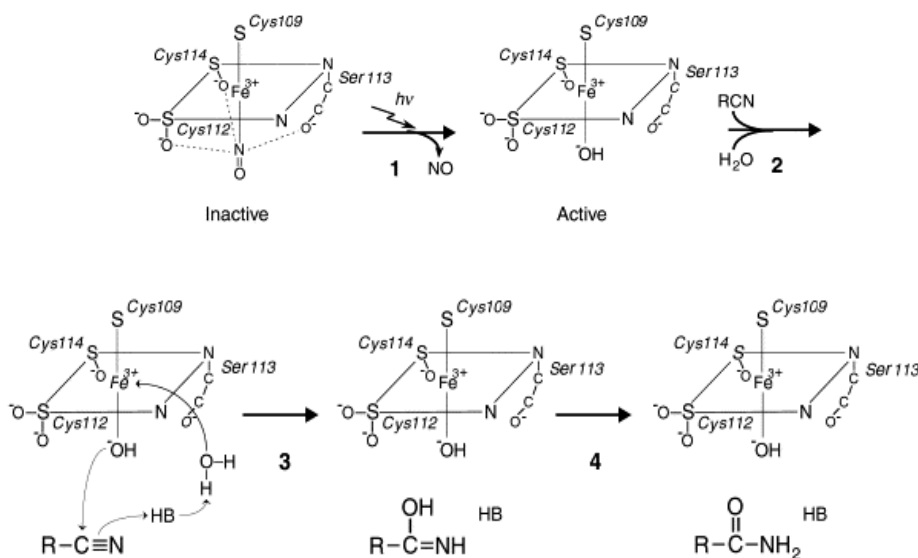
1.3.3. Nitrilhydratasy

Nitrilhydratasy (NHasy, E.C. 4.2.1.84) katalyzují přeměnu nitrilů na amidy. Jakožto lyasy nejsou zařazeny do nitrilasové rodiny. První dokumentovaný nález NHasové aktivity byl učiněn v kulturách *Arthrobacter* sp. J1. Tyto enzymy jsou v dnešní době úspěšně využívány pro syntézu akrylamidu, nikotinamidu a 5-kyanovaleramidu [17, 18].

Biotechnologická přeměna akrylonitrilu na akrylamid vlivem NHasové aktivity je využívána k pokrytí čtvrtiny celosvětové produkce. Tento způsob výroby akrylamidu je využíván od roku 1991 a využívá bakterii *R. rhodochrous* J1, ve které byla přítomností močoviny v živném médiu indukovaná exprese NHasy, která přeměňuje akrylonitril na akrylamid. [17]

NHasy sestávají ze dvou podjednotek, α a β , které si nejsou vzájemně podobné ve své aminokyselinové sekvenci. Existují buďto jako dimery $\alpha\beta$, tetramery $\alpha_2\beta_2$ či heterooligomery, které sestávají až z dvaceti těchto podjednotek. Na jednu podjednotku $\alpha\beta$ připadá jeden ion kovu (železitý nebo kobaltitý v bakteriálních NHasach, zinečnaté ionty byly objeveny v houbě *Myrothecium verrucaria* [19]).

Noguchi a kol. objevil NHasu v *Rhodococcus* sp. N771, která je fotosenzitivní [20]. Váže ve své struktuře molekulu oxidu dusnatého k nehemovému iontu železa v aktivním centru enzymu. Působením světelného záření dochází k disociaci oxidu dusnatého z aktivního místa enzymu, kde jej nahradí hydroxylový anion. V této formě je enzym aktivní a je umožněn přístup substrátu k aktivnímu místu. Vzniklý produkt není stabilní a dochází k jeho přesmyku na stabilnější produkt – amid (obr. 6) [21].



Obr. 6 – předpokládaný reakční mechanismus světlem aktivované NHasy z *Rhodococcus* sp. N-771. Zbytky Cys112 a Cys114 jsou kyseliny cystein-sulfenylová (Cys112-SO₂H) a cystein-sulfinylová (Cys114-SOH). B představuje bazickou skupinu enzymu. **1** – vlivem elektromagnetického záření ($h\nu$) je NO z katalytického centra NHasy disociován; **2, 3** – nitrilový substrát přistupuje k hydroxylovému iontu vázanému k iontu kovu; **4** – přesmyk produktu reakce poskytuje amid [21].

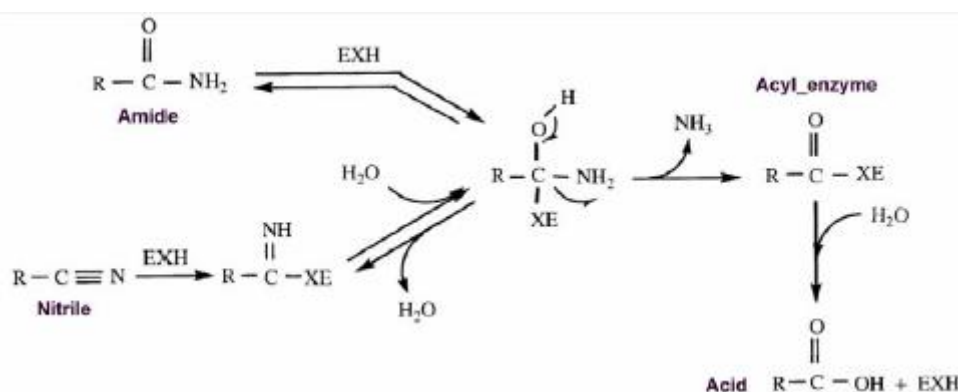
1.3.4. Amidasy

Amidasy katalyzují hydrolyzu amidu na příslušnou karboxylovou kyselinu a amoniak. Jsou řazeny do kategorií EC 3.5.1 a EC 3.5.2. Vyskytují se jak v eukaryotách, tak prokaryotách, kde jsou většinou spárovány s nitrilhydratasami (NHasy). Díky tomuto spojení probíhá hydrolyza nitrilů dvojenzymatickou cestou [22].

Mimo hydrolytickou aktivitu jsou amidasy schopny přenášet acylovou skupinu na hydroxylamin za vzniku hydroxamátů – dobře prozkoumaná je schopnost přenosu acylových skupin amidů, kyselin a esterů na hydroxylamin (NH_2OH) v rodu *Rhodococcus* R312. Tento enzym umožňuje přenos acylů z amidů s krátkým řetězcem i na hydrazin (NH_2NH_2), za vzniku oxanilhydrazidů (CONHNH_2). Tyto reakce ale probíhají mnohem pomaleji, než hydrolyza amidů [23].

Amidasy se dělí na alifatické a aromatické, zároveň byla objevena i schopnost hydrolyzy α a ω -aminokyselin. U některých amidas byla popsána stereoselektivita.

Kobayashi a kol. [24] navrhli reakční mechanismus amidasy. Karbonylová skupina amidu je nukleofilně atakována, což vede ke vzniku tetraedrického intermediátu. Uvolněním amoniaku je intermediát přeměněn na acyl-enzymový komplex, který je hydrolyzován na kyselinu adicí molekuly vody. Schématické znázornění reakčního mechanismu je uvedeno na obr. 7 níže.



Obr. 7 – reakční mechanismus amidasy navržený Kobayashim a kol. Nukleofilní atak amidu enzymem (EXH) vede k tvorbě tetraedrického intermediátu, ze kterého je přeskupením vazeb uvolněn amoniak. Následnou hydrolyzou je enzymový komplex přeměněn na příslušnou karboxylovou kyselinu. [24]

Ionty kovů byly u amidas doposud objeveny pouze v bakteriích *Klebsiella pneumoniae*, a to kobaltu a železa[25].

2 Cíle práce

Rekombinantní exprese nitrilasy z *Arthroderma benhamiae*: její produkce v *E. coli*, optimalizace její izolace a purifikace v redukujícím prostředí.

3 Materiál

3.1. Pomůcky a přístroje

Aparatura pro filtraci	<i>Sigma, USA</i>
Autokláv Varioklav 300/400/500 EP-Z	<i>H+P Labortechnik GmbH, Německo</i>
Automatické pipety Discovery	<i>HTL, Polsko</i>
Automatické pipety Pipetman	<i>Gilson, USA</i>
Centrifuga Allegra X-22R	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Filtr Millipore Express PLUS 0,20 µm	<i>Millipore, USA</i>
HPLC systém ÄKTA basic	<i>GE Healthcare USA</i>
Kahan	<i>závod Votice, ČR</i>
Kolona Superdex 200 10/300 GL	<i>Merck, Německo</i>
Kolona SOURCE 15Q	<i>GE Healthcare, USA</i>
Kolona Q-Sepharose Fast Flow	<i>GE Healthcare, USA</i>
Koncentrátory Amicon Ultra	<i>Millipore, USA</i>
Lednice 225-R	<i>Calex, ČR</i>
pH metr ino Lab	<i>Schoeller, Německo</i>
Pipetovací nástavec Midiphus	<i>Biohit, USA</i>
Předvážky KB1200-2	<i>Kern, Německo</i>
Souprava pro SDS elektroforézu	<i>Bio-Rad, USA</i>
UV/VIS spektrometr UV2 Series	<i>Unicam, UK</i>
Ultrazvukový homogenizátor Sonoplus	<i>Bandelin, Německo</i>
Vařič	<i>ETA, ČR</i>
Vortexový mixér	<i>VELP Scientifica, Itálie</i>
Zdroj deionizované vody Milli Q	<i>Millipore, USA</i>
Zdroj napětí EC 250-90	<i>Sigma, USA</i>

3.2. Chemikálie

Akrylamid	<i>Sigma, USA</i>
APS	<i>Serva, USA</i>
Azid sodný	<i>Serva, USA</i>
β-merkapt ethanol	<i>Sigma, USA</i>
BisTris	<i>Roth, Německo</i>
Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Fluka Chemika, Švýcarsko</i>
Dithiothreitol	<i>Serva, USA</i>
Fenylacetonitril	<i>Sigma, USA</i>
Kanamycin	<i>Merck, Německo</i>
Kvasničný lyzát	<i>Imuna Pharm, ČR</i>
PBS	<i>Roth, Německo</i>
SDS	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
TEMED	<i>Serva, USA</i>
Tris	<i>Roth, Německo</i>
Ostatní běžné chemikálie	<i>Lach-Ner, ČR</i>

3.2.1. Enzymy

Lysozym	<i>Sigma, USA</i>
---------	-------------------

3.2.2. Markery pro elektroforézu

PiNK Plus Prestained Protein Ladder

GeneDireX, Tchaj-wan

3.3. Bakteriální buňky, plazmidy

E. coli BL21-Gold (DE3)

Agilent Technologies, USA

pET-30 a (+)

Novagen, Německo

genová sekvence nitrilasy *A. benhamiae*

GeneArt, Německo

3.4. Roztoky a média

AA: 29% akrylamid, 1% N,N'-methylen-bis-akrylamid

Barvicí roztok: 45% methanol, 10% kyselina octová, 0,25% CBB R-250

Elektrodový pufr (10x koncentrovaný): 3% Tris, 14,4% glycin, 1% SDS, pH = 8,3

HEPES pufr: 10mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM NaN₃, pH = 7,5

LB médium: 1% trypton, 0,5% kvasničný lyzát, 1% NaCl, pH = 7,4

Odbarvovací roztok: 35% ethanol, 10% kyselina octová, 55% destilovaná voda

Pufr A_{BisTris}: 20mM BISTRIS, 10mM NaN₃, 10mM β-ME, pH = 7,0

Pufr B_{BisTris}: 20mM BISTRIS, 0,5M NaCl, 10mM NaN₃, 10mM β-ME, pH = 7,0

Pufr A_{Tris}: 20mM TRIS, 10mM NaN₃, 10mM β-ME, pH = 8,0

Pufr B_{Tris}: 20mM TRIS, 0,5M NaCl, 10mM NaN₃, 10mM β-ME, pH = 8,0

TRIS pufr: 50mM TRIS, 150mM NaCl, 10mM NaN₃, 10mM β-ME, pH = 8,0

Vzorkový pufr (redukující, 2x koncentrovaný): 100mM TRIS, 20% glycerol, 4% SDS, 0,2% bromfenolová modř, 100mM DTT, pH = 6,8

Vzorkový pufr (neredukující, 2x koncentrovaný): 100mM TRIS, 20% glycerol, 4% SDS, 0,2% bromfenolová modř, pH = 6,8

4 Metody

4.1. Gelová permeační chromatografie

Kapalinová vysokotlaká chromatografie (HPLC systém ÄKTA basic) s isokratickou elucí byla provedena v HEPES pufru na koloně Superdex 200 10/300 GL při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. Vzorek byl před analýzou uchován v mrazáku, byl tedy před samotným experimentem rozmražen a odstředěn. Nanáška na kolonu byla vždy 50 µl. Frakce v oblasti elučního vrcholu byly jímány a znovu za stejných podmínek nastříknuty na kolonu.

Za stejných podmínek bylo po promytí kolony dostatečným množstvím mobilní fáze analyzováno 50 µl preparátu AV ČR, ke kterému byl přidán roztok dithiothreitolu (DTT) do výsledné koncentrace 100 mM.

4.2. Příprava nového preparátu nitrilasy

Pro transformaci byl využit plazmid pET-30 a (+) s genem nitrilasy z *A. benhamiae* CBS 112371 zaligovaným mezi restriční místa NdeI a HindIII. Plazmid byl transformován do produkčního bakteriálního kmene *E. coli* BL21-Gold (DE3). Transformované bakterie natřené na agaru v Petriho misce byly získány od Mgr. Alicje B. Veselé z Laboratoře biotransformací MBÚ AV ČR.

4.2.1. Kultivace *E. coli* a produkce rekombinantní nitrilasy

Do každé z osmi dvoulitrových Erlenmayerových baněk bylo nalito přibližně 500 ml sterilního LB média s kanamycinem o koncentraci 50 mg/ml a každá baňka byla zaočkována stejným množstvím bakteriální suspenze rozmíchané na Petriho misce v malém množství média. Kultivace probíhala při 200 ot/min a 37 °C. Po dosažení $A = 0,854$ ($\lambda = 550$ nm; 2 hod 30 min) bylo médium ochlazeno na 25 °C a do každé baňky bylo přidáno 200 µl 1M IPTG. Třepání buněk probíhalo přes noc při 200 ot/min a 25 °C.

Následující den bylo médium rozděleno na 4 stejné díly do plastových kyvet a jejich obsah odstředěn 15 min při 4000 × g. Po odstředění byl supernatant odlit a peleta buněk resuspendována v TES pufru. Odstředování s následnou resuspendací bylo provedeno celkem třikrát.

Po centrifugaci byly buňky lyzovány ultrazvukovým homogenzátorem Sonoplus, s nastavenou amplitudou 40 % a pulsem 0,5 s po dobu 1 min. První

sonikace byla provedena bez chlazení, další tři sonikace za stejných podmínek byly provedeny při chlazení suspenze na ledové lázni. Buněčná suspenze byla rozdělena do dvou plastových kyvet, k oběma dílům byl přidán 1 ml 2M DTT a 4 mg lysozymu. Po půl hodině byl jejich obsah centrifugován 10 min při $20\,000 \times g$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl od pelety oddělen a převeden do čistých zkumavek za současné filtrace přes filtr Millipore Express PLUS $0,20\text{ }\mu\text{m}$.

4.3. Iontově výměnná chromatografie buněčného lyzátu

Přefiltrovaný lyzát byl v poměru 1:1 naředěn pufrém A_{Tris} , který sloužil i jako mobilní fáze. Za průtoku 5 ml/min byl naředěný lyzát nanesen na kolonu Q-Sepharose Fast Flow 16/10 a následně byl po promytí kolony eluován pufrém B_{Tris} . Gradient pro eluci nitrilasy byl nastaven z 0 na 30 % pufru B za 10 minut. Po eluci píku byl nastaven gradient z 30 na 100 % pufru B_{Tris} za 10 minut. Frakce v oblastech elučních vrcholů byly jímány v objemech 5 ml a uloženy v lednici.

4.4. Iontově výměnná chromatografie vybraných proteinových frakcí

Frakce 1, 2 a 3 (viz 5.2.2.) byly spojeny, odsoleny a převedeny do pufru A_{BisTris} pomocí koncentrátorů Amicon Ultra-4 (MWCO 10 000) a centrifugace při $4000 \times g$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 10min krocích.

Separace byla provedena při průtoku mobilní fáze $0,5\text{ ml/min}$ na koloně Source 15Q 4.6/100 PE, která byla přes víkend uložena v pufru B_{BisTris} a následně promyta 1M NaOH, 1M HCl, 30% acetonitrilem s přidavkem 0,1 % kyseliny trifluoroctové, 8M močovinou s 50mM Tris pufrém a 0,5M imidazolem. Mezi jednotlivými čistícími kroky byla na kolonu přiváděna filtrovaná destilovaná voda. Kolona byla následně ekvilibrována v pufru A_{BisTris} a byl na ni nanesen vzorek. Po nanesení vzorku a opětovném promytí kolony pufrém A_{BisTris} byl spuštěn gradient pufru B_{BisTris} z 0 na 20 % za 5 min. Následně byl spuštěn gradient z 20 na 50 % pufru B_{BisTris} za 1 hodinu. Zachyceno bylo celkem 20 frakcí. Po dokončení eluce nitrilasy byl gradient pufru B_{BisTris} zvýšen na 100 % za 1 min.

4.5. SDS elektroforéza

Pro přípravu 15% separačního gelu bylo smícháno 0,45 ml dH_2O , 1 ml 30% AA, 0,5 ml 1,5M Tris o $\text{pH} = 8,8$, 20 μl 10% SDS, 20 μl 10% APS a 1 μl TEMED. Separálního gelu bylo mezi skla nalito takové množství, aby mezi hladinou gelu

a koncem zubů hřebenu alespoň centimetr místa. Nalítý gel byl převrstven destilovanou vodou. Po zatuhnutí gelu byla voda odstraněna a na vrch separačního gelu byl nalit gel zaostřovací. Dva zaostřovací gely byly připravovány pipetováním 0,7 ml dH₂O, 0,25 ml 30% AA, 0,125 ml 1M roztoku Tris o pH = 6,8, 10 μl 10% SDS, 10 μl 10% APS, 1,5 μl TEMED a 60 μl 1× koncentrovaného neredukujícího vzorkového pufru. Do zaostřovacího gelu byly následně ihned zapíchnuty hřebeny, kde byly ponechány až do úplného zatuhnutí gelu.

Po ztuhnutí gelů byly hřebeny opatrně vytaženy, elektroforetická skla vložena do aparatury pro elektroforézu naplněné elektrodovým pufrem, který byl následně nalit i do prostoru mezi skly tak, aby pufr přetekl do zubů v zaostřovacích gelech.

Vzorky pro elektroforézu byly připravovány rozpouštěním ve 2 × koncentrovaném vzorkovém pufre. Po přidavku vzorkového pufru byly vzorky po dobu 5 minut vařeny na vodní lázni a poté centrifugovány při 4000 × g po dobu 5 minut. Dávky vzorků do jednotlivých drah činily 10 μl. Dávka markeru byla 5 μl.

Samotná elektroforéza probíhala vždy při napětí 200 V, po dobu přibližně 50 minut, a to do chvíle, kdy linie vzorkového pufru doputovala ke spodnímu okraji gelu.

Gely byly po provedení elektroforézy barveny v barvicím roztoku a po jejich obarvení byly vloženy do roztoku odbarvovacího, ve kterém byly za stálého míchání odbarvovány. Odbarvovací roztok byl v průběhu několikrát vyměňován za čistý.

12,5% separační gel byl připraven z 1,04 ml dH₂O, 0,41 ml 30% AA, 0,5 ml 1,5M Tris o pH = 8,8, 20 μl 10% SDS, 20 μl 10% APS a 1 μl TEMED. Složení zaostřovacího gelu zůstalo stejné.

4.6. Gelová permeační chromatografie proteinových frakcí

Podle výsledků elektroforézy byly frakce rozděleny na čisté (frakce 1-9, 19-20) a kontaminované (10-18) frakce, které byly spojeny a jejich objem snížen na koncentrátorech Amicon® Ultra-4 (MWCO 10 000) pomocí centrifugace při 4000 × g na 1 ml.

Zakoncepované čisté a kontaminované frakce byly po částech nastříknuty na kolonu Superdex 200 10/300 GL při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. Mobilní

fází byl 50mM TRIS pufr. Nástřiky čisté frakce byly provedeny celkem tři (200, 500 a 400 µl) a kontaminované dva (2 x 500 µl). Z každého nástřiku byly zachyceny čtyři frakce, z nichž byla provedena SDS elektroforéza.

4.7. Stanovení koncentrace proteinu metodou dle Bradfordové

Do mikrotitrační destičky bylo k 5 µl frakce číslo 9 z protokolu 5.3.4. bylo přidáno 200 µl činidla Bradfordové. Kalibrační řada roztoků BSA o různých koncentracích byla připravena z 5 µl příslušného roztoku BSA a 200 µl činidla Bradfordové. Koncentrace proteinů ve frakci byla určena pouze orientačně vizuálním porovnáním intenzity zabarvení vzorků a kalibrační řady.

4.8. Stanovení enzymové aktivity

Enzymová aktivita nitrilasy byla stanovena dle publikovaného protokolu [26] Mgr. Alicjou B. Veselou v Laboratoři biotransformací MBÚ AV ČR.

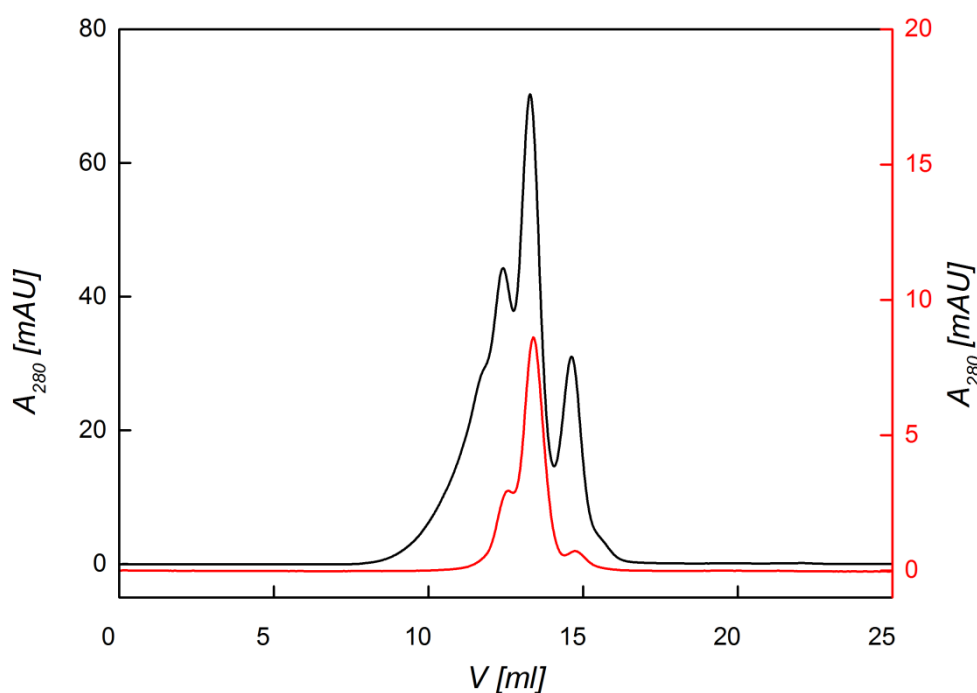
5 Výsledky práce

5.1. Studium oligomerního stavu nitrilasy z *A. benhamiae*

Preparát rekombinantní nitrilasy z *Arthroderma benhamiae* byl připraven Mgr. Alicjou B. Veselou v Laboratoři biotransformací MBÚ AV ČR. Celkový objem preparátu činil 0,5 ml. Nitrilasa byla rozpuštěna v pufru o složení 10mM Tris, 150mM NaCl, 10mM NaN₃, pH = 8,0. Koncentrace nitrilasy v preparátu byla 4 mg/ml a aktivita k fenylacetonitrilu 20,04 U mg⁻¹.

5.1.1. Gelová permeační chromatografie neredukované nitrilasy

Optimalizace purifikace rekombinantní nitrilasy z *A. benhamiae* započala provedením gelové permeační chromatografie s využitím vzorku nitrilasy připraveného Mgr. Alicjou B. Veselou v Laboratoři biotransformací MBÚ AV ČR dne 1. 10. 2012. Separace byla provedena na koloně Superdex 200 10/300 GL. V oblasti elučního vrcholu s maximální absorbancí byla jímána vytékající mobilní fáze, která byla za stejných podmínek znovu nanášena na kolonu (obr. 8).

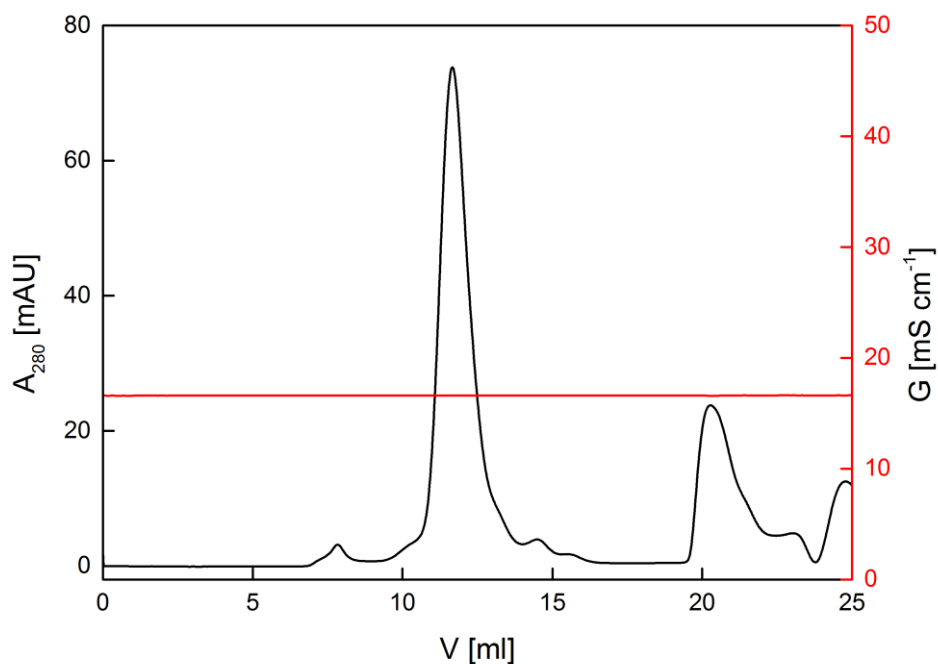


Obr. 8 - chromatogram neredukovaného vzorku nitrilasy. Separace byla provedena na koloně Superdex 200 10/300 při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. Opakovaný nástřik zachyceného eluovaného vzorku, který byl proveden za stejných podmínek, je znázorněn červeně.

Na chromatogramu je patrné, že nitrilasa v neredukovaném prostředí vytváří vyšší oligomery.

5.1.2. Gelová permeační chromatografie redukované nitrilasy

Vzorek nitrilasy obsahující 100 μM DTT byl nastříknut na kolonu Superdex 200 10/300 obdobně, jako v předchozím odstavci. Redukcí proteinu došlo k rozpojení disulfidických můstků a tím ke změně oligomerního stavu proteinu.



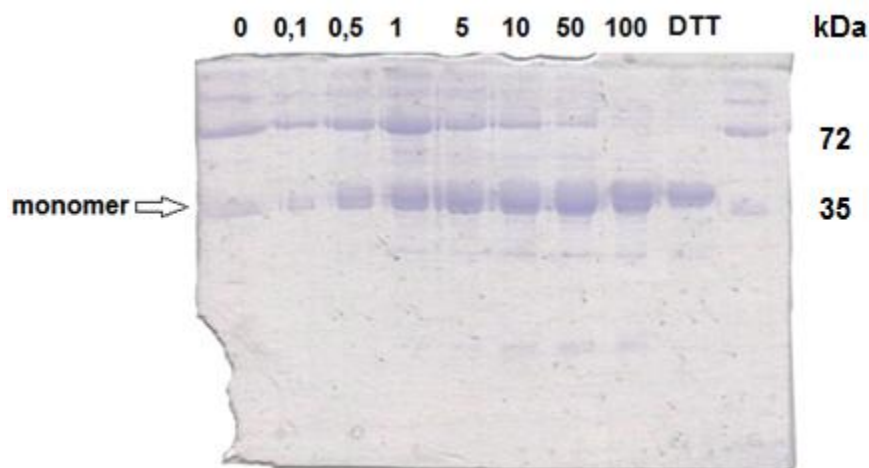
Obr. 9 - gelová permeační chromatografie redukováného vzorku nitrilasy na koloně Superdex 200 10/300 při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. Na chromatogramu lze pozorovat hlavní eluční vrchol nitrilasy v oblasti kolem 11 ml elučního objemu. Eluční vrchol při 20 ml je pravděpodobně DTT.

Redukcí nitrilasy byly zredukovány kovalentní vazby mezi cysteiny, které se pravděpodobně podílejí na vzniku oligomerních struktur nitrilasy, pozorovaných při nástřiku neredukovaného vzorku. Eluční vrchol s retenčním objemem 11 ml však přitom neodpovídá jednotlivým volným molekulám nitrilasy, které by se vzhledem ke své molekulové hmotnosti (37 kDa) měly nacházet přibližně v oblasti 15 – 16 ml elučního objemu. Je tedy zřejmé, že i redukováná nitrilasa tvoří

oligomer (byť již pouze nekovalentní), avšak redukce výrazně přispívá k homogenitě proteinového preparátu.

5.1.3. Závislost míry redukce nitrilasy na koncentraci β -merkaptoethanolu

Dalším krokem studie bylo nalezení koncentrace redukčního činidla, jež je dostačující pro redukci nitrilasy na své podjednotky. Toto bylo provedeno přípravou řady vzorků nitrilasy v neredukujícím SDS pufru se stoupající koncentrací β -merkaptoethanolu (β -ME) o celkovém objemu 10 μ l a koncentraci nitAB 5 μ g/ml. Výsledné koncentrace β -ME ve vzorcích byly 0, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM a 100 mM. Jako referentní vzorek, v němž dochází k úplné redukci enzymu, byl připraven roztok obsahující 5 μ g/ml nitAB a 100 mM DTT. Takto připravené vzorky byly nanášeny na 15% polyakrylamidový gel a byla provedena elektroforetická analýza dle 5.1.2. (Obr. 10).



Obr. 10 - vliv koncentrace redukčního činidla na stupeň redukce nitAB. Čísla uvedená nad jednotlivými dráhami odpovídají koncentraci β -ME v daném vzorku nitrilasy. Šipka ukazuje polohu monomeru nitAB. DTT dráha obsahuje plně redukovaný vzorek nitAB obsahující 100 μ M DTT. Poslední dráha obsahuje marker. Elektroforetická analýza na 15% gelu. Molekulové hmotnosti proteinů použitého markeru v krajní dráze jsou uvedeny vpravo.

Z elektroforézy je patrné, že koncentrace β -ME potřebná k plné redukci oligomeru nitAB je vysoká, teprve při nejvyšší 100 mM koncentraci β -ME je výsledek redukce srovnatelný se vzorkem redukovaným pomocí DTT. Tato

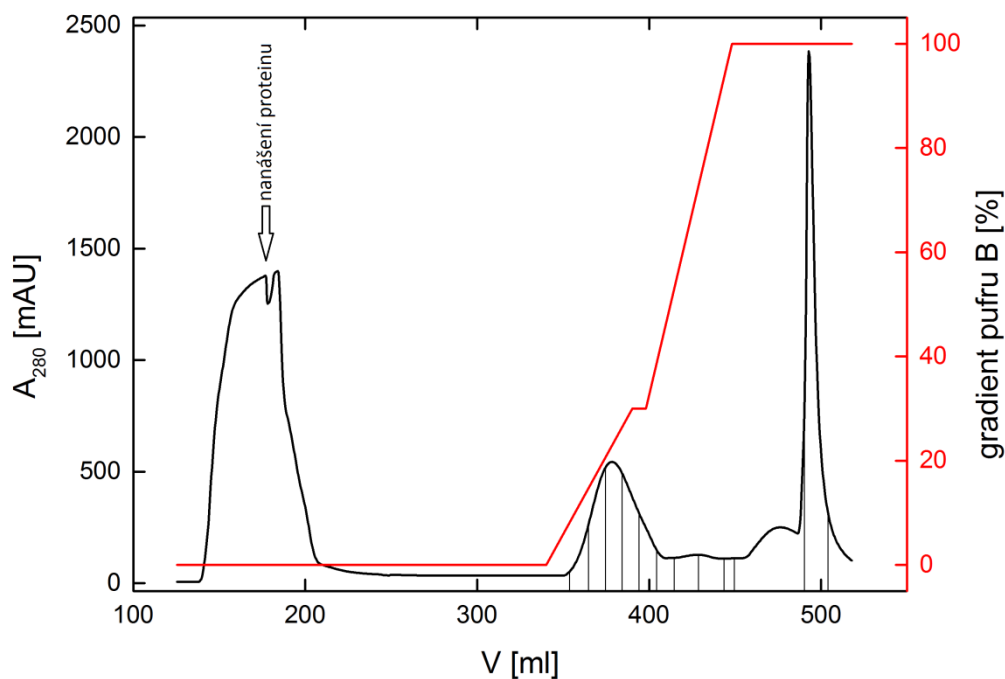
koncentrace byla využita pro přípravu nitrilasy v redukčním prostředí a další práci s ní. Na gelu je rovněž viditelná tendence nitrilasy spojovat se ve vyšší struktury a disulfidická povaha oligomerů. S rostoucí koncentrací redukčního činidla jsou proužky oligomerů vyšších molekulových hmotností méně intenzivní, na intenzitě naopak přibývá proužek odpovídající monomeru.

5.2. Rekombinantní exprese a purifikace nitrilasy

Aby bylo možné v experimentech s nitAB pokračovat, bylo nutné připravit novou šarži, což bylo provedeno dle 5.3. Lyzace kultivovaných buněk byla provedena v redukujícím prostředí, což sloužilo jako prevence kovalentního spojování monomerů nitAB ve vyšší oligomery, za účelem usnadnění následné purifikace nitAB.

5.2.1. Iontově výměnná chromatografie buněčného lyzátu

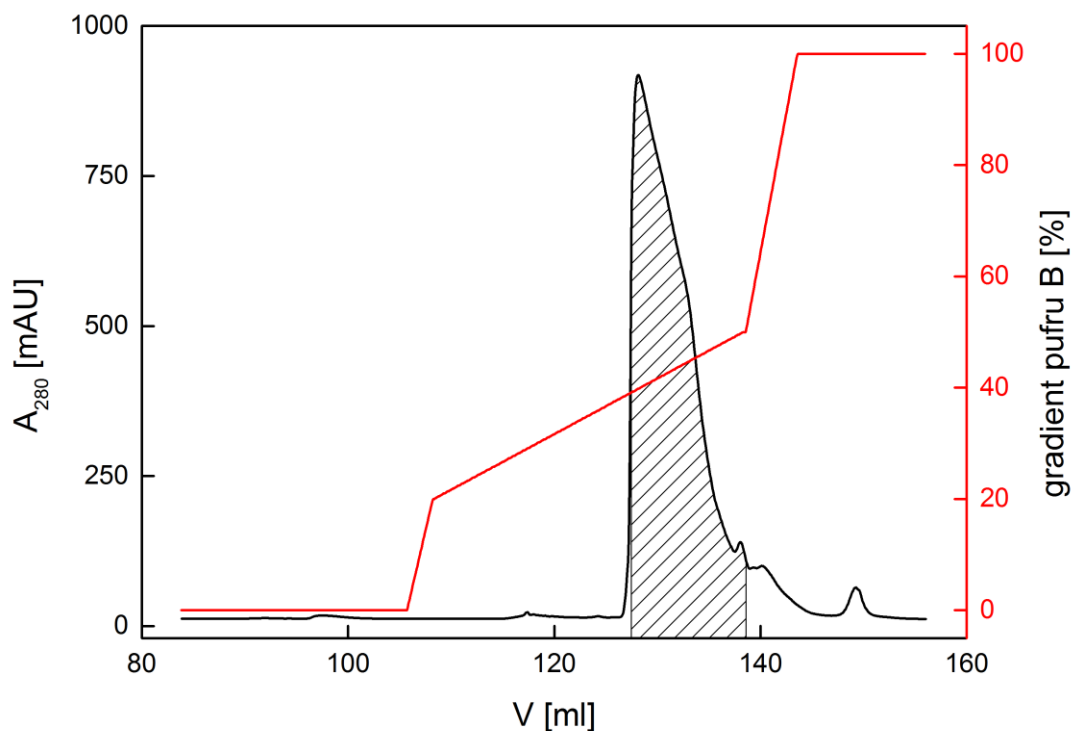
Přefiltrovaným buněčným lyzátem získaným v předchozím kroku byla po naředění pufrům A_{Tris} v poměru 1:1 provedena iontová výměnná chromatografie na koloně Q-Sepharose Fast Flow 16/10. Eluce byla provedena gradientem pufru B_{Tris} (obr. 11).



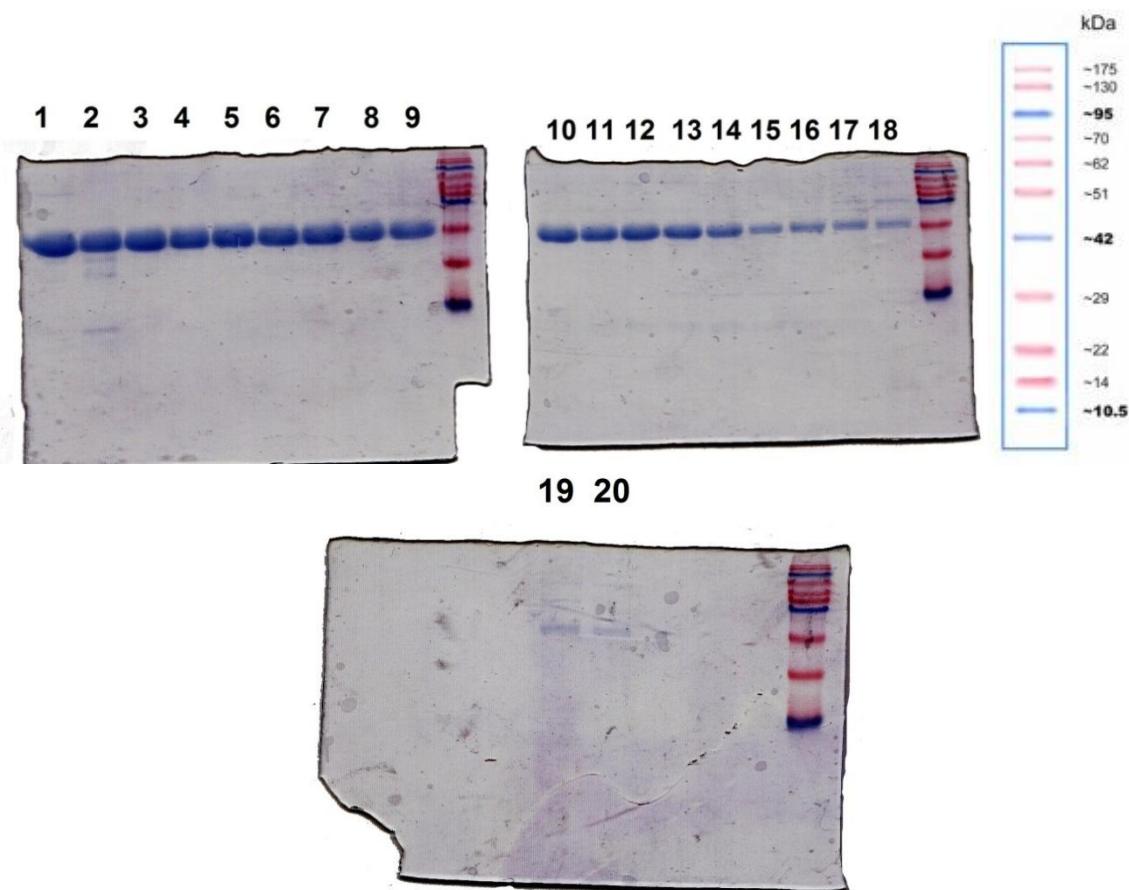
Obr. 11 – chromatogram iontově výměnné separace nitAB na koloně Q-Sepharose™ Fast Flow 16/10 za průtoku mobilní fáze 5 ml/min. Svislé čáry vyznačují zachycené frakce.

5.2.2. Iontová výměnná chromatografie proteinových frakcí

Odsolené a spojené frakce 1, 2 a 3 z předcházejícího experimentu byly afinitně separovány za průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min na koloně Source 15Q 4.6/100 PE, ze které byly později eluovány pufrům B s vyšší iontovou silou. V oblasti elučního vrcholu bylo jímáno 20 frakcí po zhruba 0,5 ml, z nichž byly připraveny vzorky pro elektroforézu (obr. 13 na následující straně).



Obr. 12 – chromatogram eluce nitAB z kolony Source 15Q 4.6/100 PE. Ve šrafované oblasti bylo jímáno 20 frakcí.



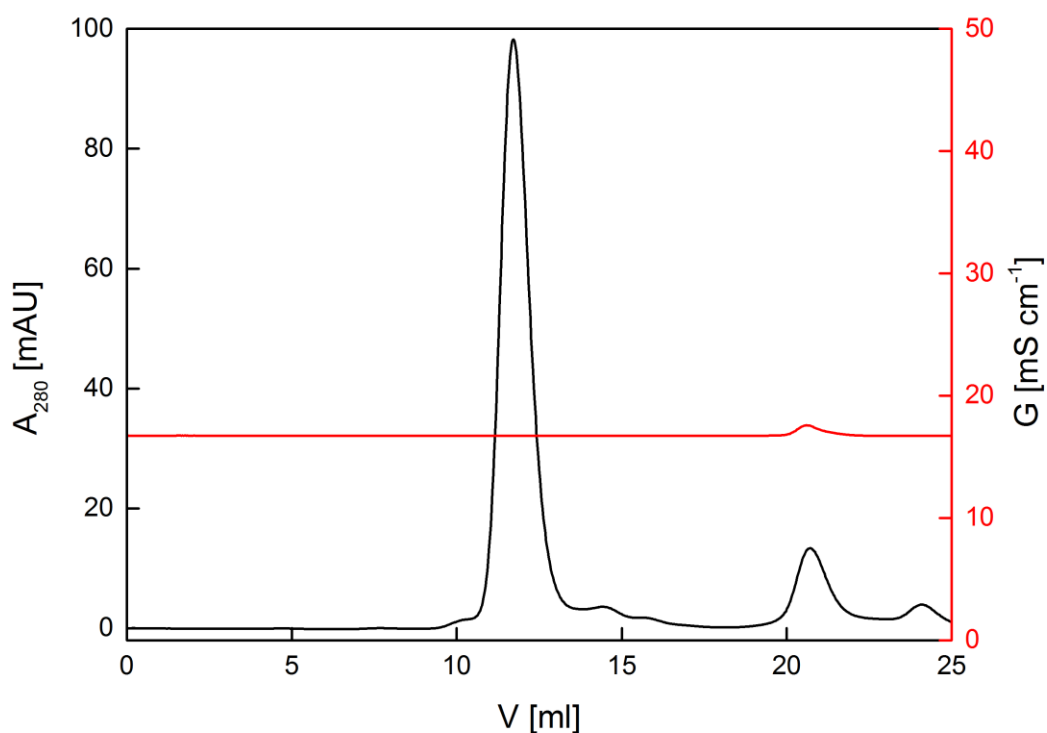
Obr. 13 – SDS elektroforéza frakcí eluovaných proteinů z kolony Source 15Q 4.6/100 PE. Čísla nad dráhami označují pořadí, ve kterém byly frakce jímány. Vpravo nahoře je uveden proteinový žebříček použitého markeru (PiNK Prestained Protein Ladder) s uvedenými molekulovými hmotnostmi proteinů v příslušném proužku.

Koncentrace proteinu ve frakci č. 9 čistého proteinu před rozdělením frakcí na čisté a kontaminované a jejich zakonzentrováním byla stanovena metodou dle Bradfordové porovnáním zbarvení s kalibrační řadou BSA jako 3,6 µg/µl.

Z elektroforézy je zřejmé, že většinu frakcí lze považovat za čisté. Některé však kromě nitAB stále obsahovaly kontaminující bakteriální proteiny. Frakce proto byly rozděleny na dvě části, označené jako čisté (10 – 18) a kontaminované (1 – 9, 19 – 20), které byly spojeny a dále odděleně purifikovány.

5.2.3. Gelová permeační chromatografie kontaminované frakce nitAB

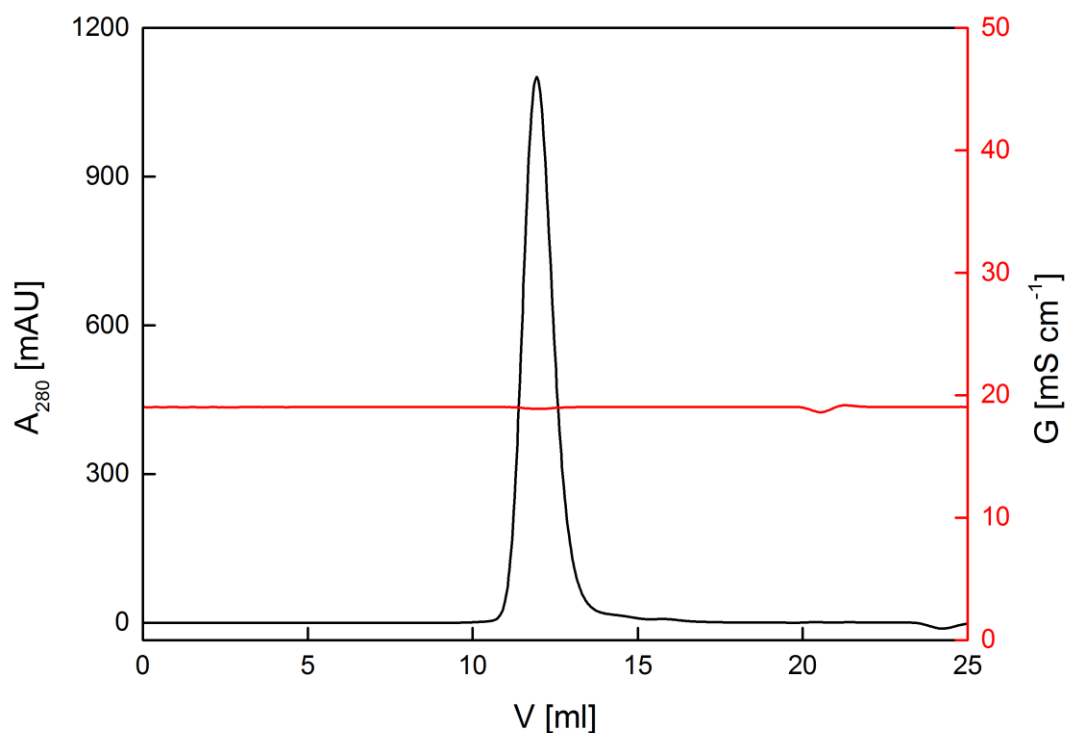
Roztok spojených kontaminovaných frakcí nitAB byl zakonzentrován a nastříknut na kolonu Superdex 200 10/300 GL. Gelová permeační chromatografie byla provedena postupně s celým preparátem za účelem dosažení co nejvyšší čistoty vzorku – byly provedeny celkem tři nástřiky, první činil 200 μl (obr. 13, str. 34), druhý 500 μl a třetí 400 μl . V průběhu chromatografií byly jímány frakce v oblasti elučního vrcholu.



Obr. 14 – chromatogram nástřiku 200 μl zakonzentrováných kontaminovaných frakcí nitAB na koloně Superdex 30/100 GL.

5.2.4. Gelová permeační chromatografie čisté frakce nitrilasy

Vzorek spojených čistých frakcí, který byl předtím zakoncentrován, byl nastříknut na kolonu Superdex 200 30/100 GL při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. Gelová filtrace byla provedena postupně s celým preparátem za účelem dosažení co nejvyšší čistoty vzorku. V průběhu chromatografií byly jímány frakce v oblasti elučního vrcholu.



Obr. 15 – chromatogram nástřiku 500 μ l čisté frakce nitrilasy na koloně Superdex 200 30/100 GL při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min.

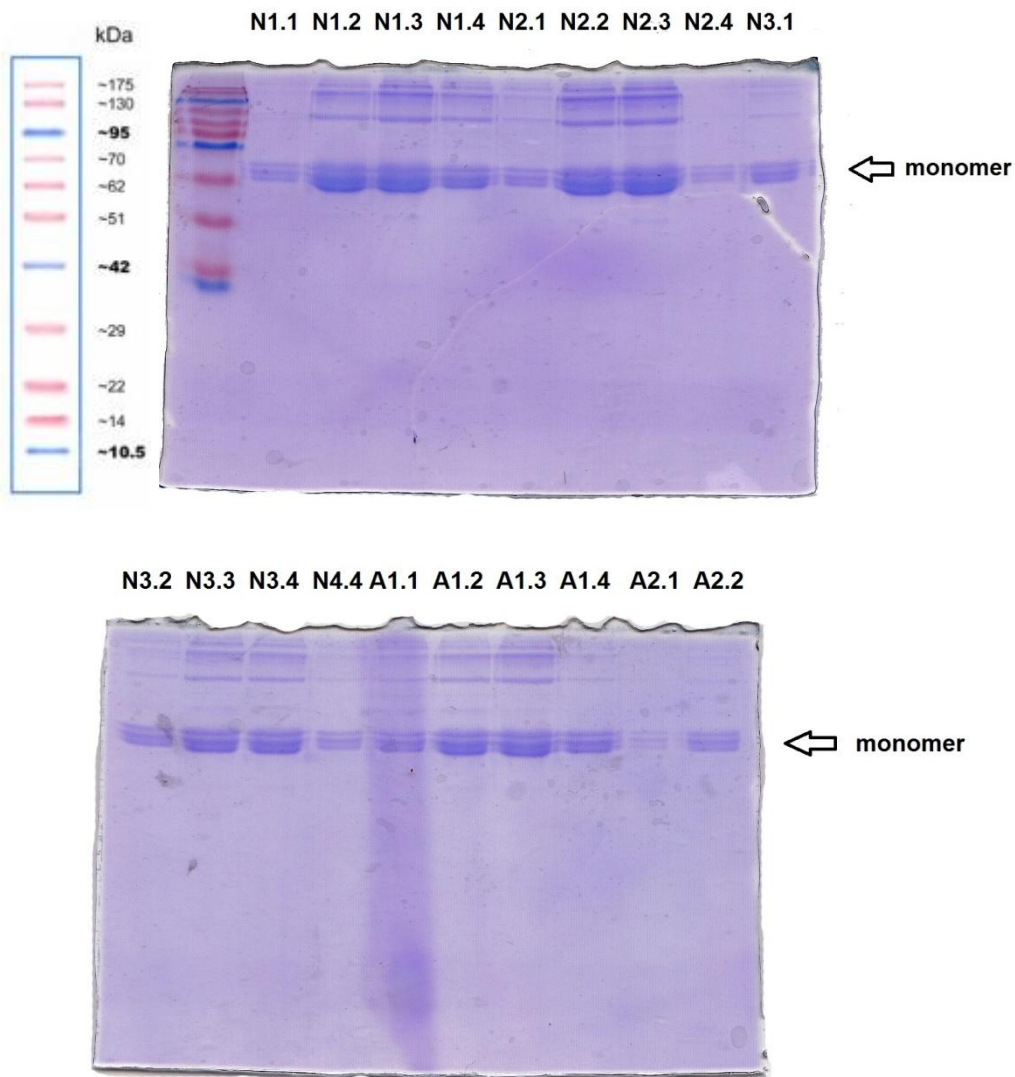
Gelové permeační chromatografie byly s čistým vzorkem provedeny celkem dvě, oba nástřiky činily 500 μ l vzorku.

5.2.5. SDS elektroforéza frakcí nitAB po gelové permeační chromatografii

Frakce zachycené z jednotlivých nástřiků byly elektroforeticky separovány na polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS (obr. 16, následující strana).

Pořadí nástřiku	Objem nástřiku (μ l)	frakce
1	200	Kontaminovaná
2	500	Kontaminovaná
3	400	Kontaminovaná
4	500	Čistá
5	500	Čistá

Tab. 1 – pořadí nástřiku kontaminovaného a čistého vzorku s nanášenými objemy na kolonu Superdex 200 10/300 GL. Z nanášek 1 až 4 byly zachyceny 4 frakce, z nanášky č. 5 byly zachyceny frakce dvě. Z frakcí byly připraveny vzorky pro elektroforézu a byla provedena jejich elektroforetická analýza (obr. 9 na následující straně).

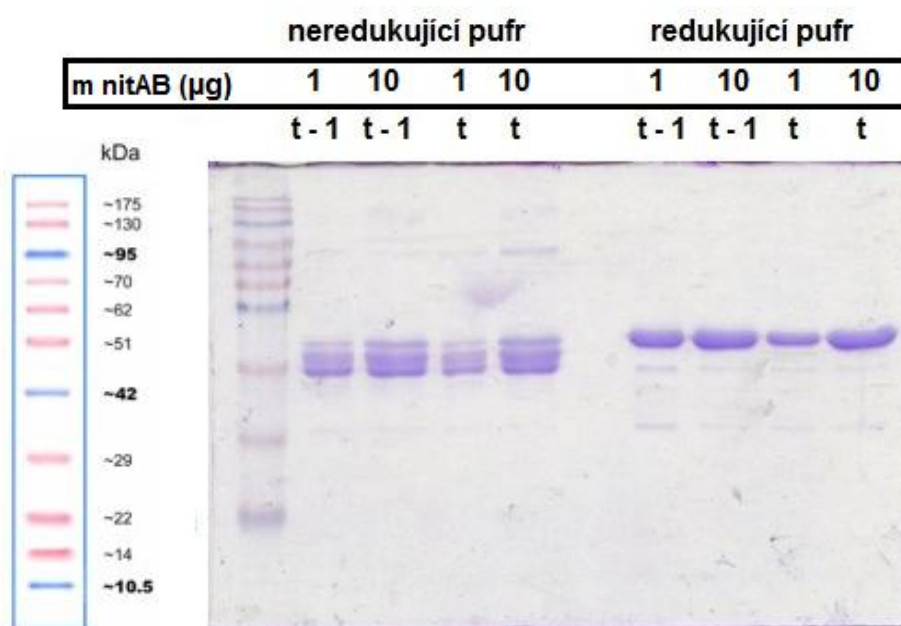


Obr. 16 – SDS elektroforéza frakcí z jednotlivých nástřiků čistého a jinými proteiny kontaminovaného vzorku nitrilasy na 15% gelu. N – nástřiky kontaminovaného vzorku, A – nástřiky čistého vzorku, číslo před tečkou - pořadí nástřiku, číslo za tečkou – pořadí, ve kterém byla jímána daná frakce z příslušného nástřiku. Vzorky frakcí byly připraveny v neredukujícím vzorkovém pufru den před provedením samotné elektroforézy, což vedlo k opětovnému spojování monomerů ve vyšší oligomery.

Vzorky pro elektroforézu byly připraveny den před provedením analýzy v neredukujícím prostředí a přes noc uchovány v lednici, což vedlo ke zpětné tvorbě dimerů, tetramerů a dalších oligomerů nitrilasy. Toto zjištění bylo ověřeno následujícím experimentem.

5.2.6. SDS elektroforéza závislosti míry redukce na době uplynulé od přípravy vzorku

Na 12,5% polyakrylamidový gel byly naneseny vzorky nitrilasy připravené den před provedením experimentu a v den provedení experimentu (obr. 10). Polovina obsahovala nitrilasy v redukujícím vzorkovém pufru a druhá v neredukujícím. Každý roztok byl zároveň připraven o dvou koncentracích nitrilasy, a to 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ nitAB. Nanášky vzorků činily 10 μl . Pořadí vzorků a výsledná hmotnost nanesené nitAB viz obr. 10. Jako marker byl vyžit PiNK Prestained Protein Ladder, jehož nanáška činila 5 μl . Do dráhy mezi vzorky obsahující redukující a neredukující pufr bylo nanášeno 10 μl neredukujícího vzorkového pufru.



Obr. 17 - SDS elektroforéza, 12,5% akrylamid, vzorky nitrilasy připravené v redukujícím a neredukujícím vzorkovém pufru. Hmotnost nanesené nitAB je uvedena nad příslušnými drahami. Označení t - 1 nesou vzorky připravené den před provedením experimentu, vzorky s označením t v den provedení. Nalevo je uveden proteinový žebříček použitého markeru.

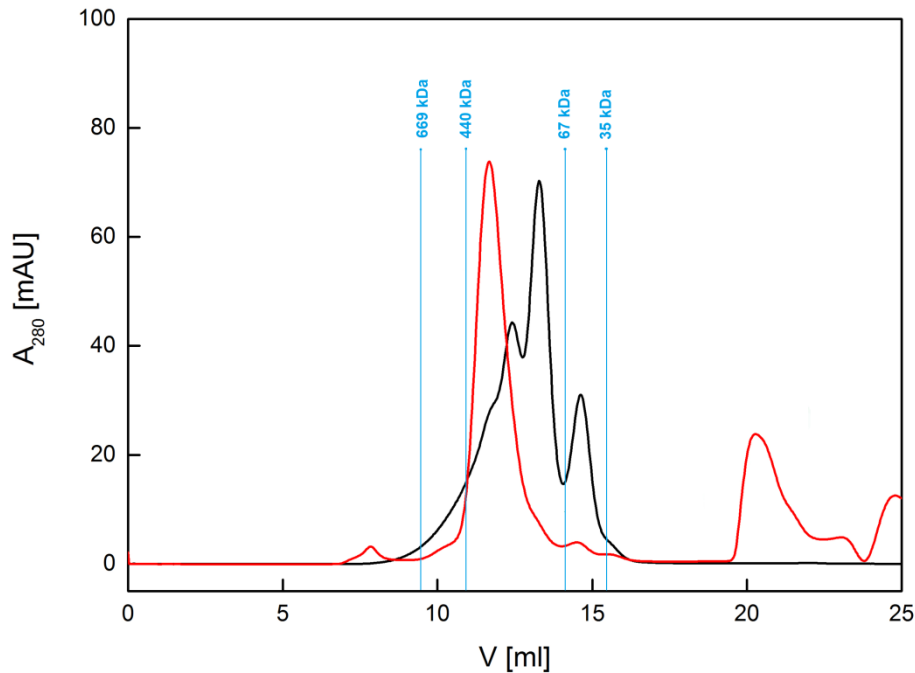
Lze pozorovat, že vzorky nitAB připravené v redukujícím vzorkovém pufru obsahují menší proteiny, které mohly být z nitrilasy odštěpeny vlivem redukčního prostředí DTT, příčinou může být i kontaminace použitého vzorkového pufru. Naproti tomu vzorky, jež byly připraveny v neredukujícím vzorkovém pufru, vykazují přítomnost vyšších proteinů, které mohly vzniknout spojením nitrilasových monomerů v oligomery. Jejich přítomnost ve všech čtyřech vzorcích napovídá, že se může rovněž jednat o kontaminaci vzorkového pufru. Protože byla nitAB připravena v bakteriálním kmenu, jež není schopen vytvářet disulfidické můstky mezi cysteiny, dochází v neredukujícím prostředí k jejich samovolnému vzniku.

5.2.7. Stanovení enzymové aktivity

Enzymová aktivita, stanovená dle publikovaného protokolu [24], čerstvě připravené a purifikované nitrilasy k fenylacetonitrilu, dosáhla hodnoty 15,5 U mg⁻¹. Aktivitu stanovila Mgr. Alicja B. Veselá v Laboratoři biotransformací MBÚ AV ČR.

6 Diskuze

Ze studia oligomerního stavu nitrilasy vyplývá, že nitrilasa z *A. benhamiae* vytváří v redukujícím prostředí nekovalentně vázané oligomery s molekulovou hmotností v blízkosti 390 kDa, což odpovídá 10 až 11 nitrilasovým monomerům (37 kDa). Četné eluční vrcholy neredukované formy nitAB odpovídají molekulovým hmotnostem okolo 50 kDa, 150 kDa a 220 kDa, jež pravděpodobně přísluší dimerní, pentamerní a heptamerní struktuře proteinu (Obr. 18).



Obr. 18 – srovnání chromatogramů z gelové permeační chromatografie neredukované (černě) a redukované (červeně) formy nitrilasy z *A. benhamiae* připravené v AV ČR. Chromatografie byly provedeny za stejných podmínek na koloně Superdex 200 10/300 GL. Eluční vrcholy neredukované nitrilasy náležejí různým stupňům oligomerizace, v nichž se nitrilasa v neredukujícím prostředí nachází. První eluční vrchol redukované nitrilasy vyznačuje mrtvý objem kolony, druhý pík je oligomerní redukovaná nitAB. Modrými čarami je vyznačena kalibrace použité kolony závislosti elučního objemu na molekulové hmotnosti, jež je dodávána výrobcem.

Monomer nitAB by měl mít dle své molekulové hmotnosti eluční vrchol v oblasti kolem 15,5 ml. Protože se v tomto oběmu mobilní fáze vrchol nenachází, je zřejmé,

že k disociaci podjednotek na jednotlivé monomery nedochází ani po redukci disulfidických můstků mezi nimi.

Nitrilasa relativně rychle podléhá zpětné oxidaci (obr. 1, str. 36). Vhodnější pro účely elektroforetické separace je tedy vhodnější využívat vzorkových pufrů s přídatkem redukčního činidla. Ačkoliv totiž již bylo redukční činidlo v nízké koncentraci (10mM β -ME) přítomno v roztoku vzorku, pravděpodobně vytékalo či bylo oxidováno při vaření vzorků. Nitrilasa v neredukujícím vzorkovém pufru vytváří tři proužky o přibližně stejné molekulové hmotnosti. Příčina tohoto jevu je pravděpodobně tvorba intramolekulárních disulfidických můstků spojená se změnou pohyblivosti proteinu během elektroforézy.

Ačkoliv nižší, aktivita námi připravené nitrilasy stanovená k fenylacetonitrilu (15,5 U mg^{-1}) je srovnatelná s aktivitou nitrilasy připravené v Laboratoři biotransformací MBÚ AV ČR (20,04 U mg^{-1}). Přítomnost redukčních činidel může ovlivňovat rychlost enzymatické reakce, proto stanovené hodnoty aktivit nelze zcela porovnat. Zároveň je zřejmé, že tvorba kovalentních oligomerů nitAB nemá na aktivitu enzymu negativní vliv, naopak nelze vyloučit mírně pozitivní alosterický efekt. Z hlediska strukturního výzkumu je však získání homogenního materiálu nutným předpokladem, proto lze považovat za úspěch, že redukovaný homogenní enzym si zachovává svou aktivitu a tedy i správnou prostorovou strukturu.

V průběhu vypracovávání bakalářské práce byla pozorována pozvolná precipitace proteinu vlivem opakovaného mražení a rozmrazování. Po tomto zjištění byly preparáty skladovány v lednici. Závislost precipitace nitrilasy na teplotě bude předmětem dalšího zkoumání, neboť pro účely navazující strukturní analýzy by bylo vhodné najít optimální podmínky ke skladování tohoto enzymu v redukované homogenní formě.

S nově připraveným purifikovaným redukovaným preparátem nitAB byla Mgr. Janem Bláhou započata optimalizace krystalizačních podmínek, přičemž se již podařilo získat první krystaly tohoto enzymu.

Rozdělení frakcí nitAB na čisté a kontaminované bylo provedeno jinak, než bylo původně plánováno (6.2.2., str. 33), a to z důvodu záměny elektroforetických gelů. Optimální by bylo vybrat skutečně frakce, které kontaminace obsahovaly

(frakce 1, 2, 17 a 18) a na ty, které byly kontaminujícími proteinů prosté (zbylé frakce). Přestože byly jednotlivé frakce spojeny jiným způsobem (1 – 9 a 19 – 20 jako čisté a 10 – 18 jako kontaminované), nebyl jejich vliv při čištění nitrilasy pozorován, jak dokládá záznam separace nitAB připravené v redukujícím a neredukujícím pufru (6.2.6., obr. 10).

7 Závěr

- Byl charakterizován oligomerní stav preparátu nitrilasy z *A. benhamiae*
- Byl připraven preparát rekombinantní nitrilasy z *A. benhamie* v redukčním prostředí

8 Seznam citované literatury

- [1] Wacker, M., Linton, D.: N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*: *Science* **298**:5599, 1790-1793 (2002)
- [2] Baneyx F.: Recombination protein expression in *Escherichia coli*; *Current Opinion on Biotechnology* **10**:5, 411-421 (1999)
- [3] Retallack, D. M., Jin, H., Chew, L.: Reliable protein production in *Pseudomonas fluorescens* expression system.: *Protein Expression and Purification* **81**:2, 157–165 (2012)
- [4] Yansura, D.G., Henner, D.J.: Use of the *E. coli* lac repressor and operator to control gene expression in *B. subtilis*.: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**, 439-443 (1984)
- [5] Kushawa R. K. S., Guarro, J., Oyeka, C. A.: Biology of Dermaophytes and other Keratinophilic Fungi; online verze na stránkách <http://dermatophytes.reviberoammicol.com/>; (staženo dne 30. 3. 2013); *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao 60 – 65 (2000)
- [6] Trichophyton mentagrophytes complex, online verze na stránkách <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.cz/2013/04/trichophyton-mentagrophytes-complex.html>; staženo dne 10. 6. 2013
- [6] Brenner, C.: Catalysis in the nitrilase superfamily; *Current Opinion on Structural Biology* **12**, 775–782 (2002)
- [7] Nakai, T., Hasegawa, T., Yamashita, E.: Crystal structure of N-carbamyl-D-amino acid aminohydrolase with a novel catalytic framework common to aminohydrolases; *Cell Press* **8**:7, 729-738 (2000)
- [8] Pace, H. C., Hodawadekar, S. C., Draganescu, A., Crystal structure of the worm NitFhit Rosetta Stone protein reveals a Nit tetramer binding two Fhit dimers; *Cell Press* **10**:15, 907–917 (2000)
- [9] Raczynska, J. E., Vorgias, C. E.: Crystallographic analysis of thermoactive nitrilase; *Journal of Structural Biology* **173**:2, 294-302 (2011)
- [10] Thimann, K. V., Mahadevan, S.: Nitrilase: I. Occurrence, preparation, and general properties of the enzyme; *Archives of Biochemistry and Biophysics* **105**:1, 133-141 (1964)
- [11] Thuku, R.N., Brady, D.: Microbial nitrilases: versatile, spiral forming, industry enzymes; *Journal of Applied Microbiology* **106**, 703-727 (2009)
- [12] Podar, M., Eads, J. R., Richardson, T. H.: Evolution of microbial nitrilase gene family: a comparative and environmental genomics study; *BMC Evolutionar Biology* **5**:42, (2005)

- [13] Martínková, L., Vejvoda, V.: Fungal nitrilases as biocatalysts: Recent developments; *Biotechnology advanced* **27**:6, 661-670 (2009)
- [14] Piotrowski, M.: Primary od secondary? Versatile nitrilases in plant metabolism; *Phytochemistry* **69**:15, 2655-67 (2008)
- [15] Jenrich, R., Trompetter, I.: Evolution of heteromeric nitrilase complexes in *Poaceae* with new functions in nitrile metabolism; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:47, 18848-18853 (2007)
- [16] Zhang, H., Hou, Y., Han, S.: Mammalian nitrilase 1 homologue Nit1 is a negative regulator in T cells; *Internal Immunology* **21**:6, 691-703 (2009)
- [17] Kobayashi, M., Nagasawa, T.: Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over; *Trends in Biotechnology* **10**, 402-408 (1992)
- [18] Yamada, H., Kobayashi, M.: Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide; *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **60**:9, 1391-1400 (1996)
- [19] Maier-Greiner, U. H., Obermaier-Skobranek, B. M. M.: Isolation and properties of a nitrile hydratase from the soil fungus *Myrothecium verrucaria* that is highly specific for the fertilizer cyanamide and cloning of its gene; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 4260-4264 (1991)
- [20] Noguchi, T., Honda, J.: Photosensitive nitril hydratase intrinsically possesses nitric oxide bound to the non-heme iron center: evidence by Fourier transform infrared spectroscopy; *FEBS Letters* **358**:1, 9-12 (1995)
- [21] Kobayashi, M., Shimizu, S.: Nitrile hydrolases; *Current Opinion in Chemical Biology* **4**:1, 95-102 (2000)
- [22] Doran, J. P., Duggan, P.: Expression and purification of a recombinant enantioselective amidase; *Protein Expression and Purification* **40**:1, 190-196 (2005)
- [23] Fournand, D., Bigey, F., Arnaud, A.: Acyl transfer activity of an amidase from *Rhodococcus* sp. strain R312: formation of a wide range of hydroxamic acids; *Applied and Environmental Microbiology* **64**:8, 2844-2852 (1998)
- [24] Kobayashi, M., Goda, M., Shimizu, S.: The catalytic mechanism of amidase also involves nitrile hydrolysis; *FEBS Letters* **20**:439, 325-328 (1998)
- [25] Fournand, D., Arnaud, A.: Aliphatic and enantioselective amidases: from hydrolysis to acyl transfer activity; *Journal of Applied Microbiology* **91**:3, 381-393 (2001)
- [26] Veselá, A. B., Petříčková, A., Weyrauch, P., Martínková, L.: Heterologous expression, purification and characterization of acylacetonitrilases from *Nectria haematococca* and *Arthroderma benhamiae*; *Biocatalysis and Biotransformation* **31**:1, 49-56 (2013)

