

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



**STUDIUM STABILITY KATALYTICKÉ DOMÉNY NEUTRÁLNÍ
TREHALASY POMOCÍ DIFERENČNÍ SKENOVACÍ FLUORIMETRIE**

Bakalářská práce

studijního oboru Chemie životního prostředí

Školitelka: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

Praha 2014

Aneta Šmídová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Veroniky Obšilové, Ph.D. a že jsem všechny použité materiály a zdroje řádně citovala.

Jsem si vědoma 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

Podpis

Poděkování

Děkuji RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady, které mi během tvorby mé bakalářské práce poskytla.

Dále děkuji Mgr. Miroslavě Kopecké za pomoc a praktické rady týkající se práce v laboratoři.

Děkuji svým rodičům a prarodičům za podporu při mém studiu.

Tato bakalářská práce byla finančně podporována grantem P207/11/0455 Grantové agentury České republiky.

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	6
Seznam zkratk	7
1 Úvod	8
2 Přehled literatury	9
2. 1 Charakterizace kvasničných trehalas	9
2. 2 Lokalizace trehalas	10
2. 3 Kyselá trehalasa.....	10
2. 4 Neutrální trehalasa.....	10
2. 5 Proteiny 14-3-3.....	11
2. 5. 1 Funkce proteinů 14-3-3	12
2. 5. 2 Struktura proteinů 14-3-3	12
2. 5. 3 Proteiny Bmh.....	13
2. 6 Způsob aktivace Nth1.....	14
2. 7 Sekundární sekvence Nth1 a výběr konstruktů pro krystalografii	15
3 Cíle práce	17
4 Materiál a metody	18
4. 1 Použitý materiál	18
4. 1. 1 Chemikálie	18
4. 1. 2 Přístroje	19
4. 1. 3 Ostatní materiál	19
4. 2 Expres konstruktů Nth1 100 – 751 a Nth1 153 – 751.....	20
4. 3 Centrifugace a lyze buněk	20
4. 4 Sonikace	21
4. 5 Purifikace Nth1 100 – 751 a Nth1 153 – 751	21
4. 5. 1 Niklová chelatační chromatografie	22
4. 5. 2 Dialýza	23
4. 5. 3 SDS – PAGE	24
4. 5. 4 Štěpení TEV proteasou	26
4. 5. 5 Zakoncentrování proteinu a filtrace.....	27

4. 5. 6	Gelová permeační chromatografie	27
4. 5. 7	UV – VIS spektrofotometrické stanovení koncentrace	28
4. 6	Expres a purifikace TEV proteasy	28
4. 6. 1	Expres, lyze, sonikace	28
4. 6. 2	Purifikace TEV proteasy.....	28
4. 7	Stabilita proteinu v roztoku.....	29
4. 8	Diferenční skenovací fluorimetrie.....	30
4. 8. 1	Příprava vzorků na DSF.....	31
4. 8. 2	Průběh DSF	31
5	Výsledky	32
5. 1	Purifikace proteinu Nth1 100 – 751	32
5. 1. 1	Výsledky niklové chelatační chromatografie a štípání TEV	32
5. 1. 2	Výsledky gelové permeační chromatografie.....	32
5. 2	Purifikace proteinu Nth1 153 – 751	34
5. 2. 1	Výsledky niklové chelatační chromatografie a štípání TEV	34
5. 2. 1	Výsledky gelové permeační chromatografie.....	34
5. 3	Výsledky purifikace TEV proteasy	36
5. 4	Příprava pufrů pro DSF	36
5. 5	Měření DSF Nth1 100 – 751 a Nth1 153 – 751.....	38
5. 6	Gelová permeační chromatografie pro ověření výsledků DSF.....	41
5. 6. 1	Výsledky gelové permeační chromatografie – 1 mM octan amonný	41
5. 6. 2	Výsledky gelové permeační chromatografie – 20 mM octan amonný	43
6	Diskuze	45
7	Závěr	47
8	Seznam použité literatury.....	48

Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce je součástí projektu, jehož záměrem je krystalizace trehalasové domény neutrální trehalasy Nth1 ze *Saccharomyces cerevisiae*. Hlavním cílem této bakalářské práce je optimalizace purifikačního protokolu dvou různých konstruktů kvasničné Nth1 a určení optimálního pufru pro krystalografii těchto konstruktů pomocí metody diferenční skenovací fluorimetrie DSF.

Trehalasy jsou důležité, vysoce konzervované enzymy, které se nacházejí v řadě organismů. Tyto enzymy patří do třídy hydrolas, podskupiny glykosidas a jejich společnou vlastností je to, že hydrolyticky štěpí molekulu trehalosy na dvě jednotky glukosy. Trehalosa je přirozeně se vyskytující neredukující disacharid, který slouží v buňkách kvasinek jako zásobárna uhlíku a energie a dále jako universální ochrana proti stresovým podmínkám. Trehalosa a její hydrolýza je důležitá v životním cyklu hmyzu, neboť je přítomná jako hlavní cukerná složka hemolymfy hmyzu, takže některé trehalasové inhibitory by mohly být využity jako insekticidy. Do této doby však byla vyřešena pouze jediná struktura trehalasy z prokaryotního organismu *Escherichia coli*. Z tohoto důvodu je velmi důležité vyřešit strukturu trehalasy z eukaryotního organismu.

Klíčová slova

Nth1, exprese, purifikace, DSF

Klíčové předměty

Proteinová biochemie, biofyzikální chemie

Abstract

This bachelor thesis is part of a project aiming for the crystallization of trehalase domain of neutral trehalase Nth1 from *Saccharomyces cerevisiae*. The main goal of this thesis is to optimize the purification protocol of two different constructs of yeast Nth1 and determine the optimal buffer for crystallography of these constructs using the differential scanning fluorimetry DSF.

Trehalases are important, highly conserved enzymes found in many organisms. These enzymes belong to the class of hydrolases, subgroup of glycosidases and their common feature is hydrolytic cleavage of trehalose molecule into two glucose subunits. Trehalose is a naturally occurring non-reducing disaccharide which serve in yeast cells as storage carbohydrate and energy and stress metabolite. Trehalose and its hydrolysis is very important in the life cycle of the insect, as it is present as the main sugar component of insect hemolymph, so some trehalase inhibitors could be used as insecticides. By this time, however, only one structure of trehalase from a prokaryotic organism *Escherichia coli* was solved. For this reason it is very important to solve the structure of trehalase from a eukaryotic organism.

Keywords:

Nth1, expresion, purification, DSF

Key subjects:

Protein biochemistry, biophysical chemistry

Seznam zkratek

Ath1	kyselá neutrální trehalasa (z angl. acid trehalase)
BAP-1	jiný název pro proteiny 14-3-3
Bicin	2 - (bis (2 - hydroxyethyl) amino) octová kyselina
Bmh1, 2	kvasničné izoformy 14-3-3 proteinů
CBB R250	Coomasie Brilliant Blue R250, modré barvivo
C-konec	konec peptidu končící – COOH skupinou
Da	Dalton (atomová hmotnostní jednotka)
DEAE	diethylaminoethyl
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
DSF	diferenční skenovací fluorimetrie
DTT	1, 4 - dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylendiamintetraacetic acid)
EXO1	jiný název pro proteiny 14-3-3
HEPES	2 - [4 - (2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethansulfonová kyselina
His-tag	motiv šesti histidinů za sebou (histidinová kotva)
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
LB	živné médium (médium dle Luria-Bertaniho)
MES	2 - (N-morfolino) ethansulfonová kyselina
Nth1	neutrální trehalasa 1 (z angl. neutral trehalase 1)
Nth2	neutrální trehalasa 2 (z angl. neutral trehalase 2)
OD	optická densita (z angl. optical density)
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PKA	proteinkinasa A (z angl. proteinkinase A)
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
rpm	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
SDS	dodecylsírán sodný, denaturační činidlo (z angl. sodium dodecylsulphate)
Ser	serin
TEMED	N, N, N', N'-tetraethylendiamin
TEV proteasa	z angl. Tobacco Etch Virus protease
T _m	teplota tání (z angl. temperature melting)
TRE37A	neutrální trehalasa z <i>Escherichia coli</i>
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	objem/objem (z angl. volume/volume)
w/v	hmotnost/objem (z angl. weight/volume)
β – ME	beta merkaptoethanol

1 Úvod

Tato bakalářská práce je součástí výzkumného projektu, který se zabývá studiem mechanismu regulace aktivity kvasničné neutrální trehalasy. Výzkum probíhá v laboratořích Fyziologického ústavu Akademie věd na oddělení Proteinových struktur pod vedením RNDr. Veroniky Obšilové, Ph.D.

Neutrální trehalasa je vysoce konzervovaný enzym štěpící trehalosu, který byl nalezen v mnoha organismech. Trehalosa je triviální název pro α -D-glukopyranosyl-(1,1)- α -D-glukopyranosid, což je neredukující disacharid, který se řadí mezi O-glykosidasové hydrolytické rodiny enzymů. Výsledkem hydrolytického štěpení jsou dvě molekuly glukosy. Neutrální trehalasa se vyskytuje v bakteriích, kvasinkách, vyšších rostlinách i u bezobratlých, kde zajišťuje zdroj uhlíku ve stresových situacích jako je dehydratace, teplotní extrémy nebo oxidativní stres. Při dehydrataci navíc chrání proteiny a membrány buněk.

Předkládaná práce se zabývá expresí a purifikací dvou konstruktů katalytické domény neutrální trehalasy (Nth1). Na základě výsledků získaných z diferenční skenovací fluorimetrie, byl určen jako nejvhodnější pufr ten, ve kterém měly dané konstrukty nejvyšší teplotu tání.

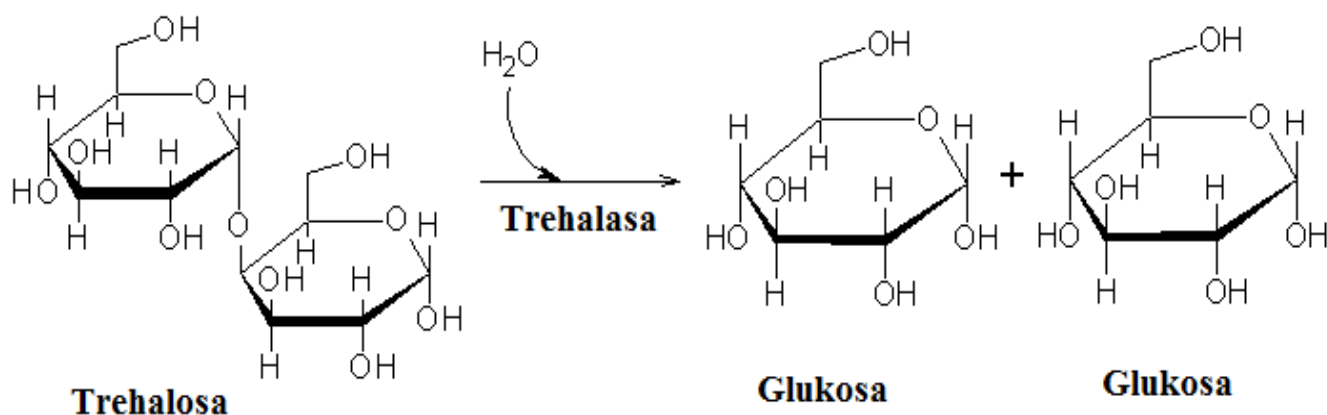
2 Přehled literatury

2. 1 Charakterizace kvasničných trehalas

Trehalosa se řadí mezi neredukující sacharidy, které v organismu slouží jako zdroj uhlíku a ochrana před denaturací proteinů při stresových situacích [1], [2], jako je dehydratace, osmotický a oxidativní stres a teplotní šok. Trehalosa může být buňkou využita jako zdroj uhlíku a energie [3]. Bylo také navrženo, že molekula trehalosy substituuje molekulu vody lipidové dvojvrstvy a tím je lipidová dvojvrstva při dehydrataci stabilizována [4]. Trehalosa byla nalezena v mnoha organismech - v bakteriích, kvasinkách, rostlinách a bezobratlých, ale nebyla nalezena v buňkách savců. V rostlinách a v kvasinkách možná zajišťuje určité metabolické dráhy nebo má vliv na růst. Navíc může být i signální a regulační molekulou v rámci transportu glukózy a glykolýzy. Trehalosa je důležitá zejména pro hmyz, pro který je glukosa vzniklá štěpením trehalosy zásadní pro let [3].

Trehalasy jsou vysoce konzervované enzymy, které byly nalezeny v široké škále organismů jako houby, bakterie, kvasinky, bezobratlí a cévnaté rostliny [5]. Trehalasy patří do glykosidové hydrolytické rodiny 37 (EC. 3.2.1.27) štěpící O-glykosidovou vazbu a jsou zodpovědné za hydrolytické štěpení molekuly trehalosy (α -D-glykopyranosyl – (1,1) - α -D-glykopyranosid) na α -D-glukosu a β -D-glukosu [2] (obrázek 2. 1, str. 10). První trehalasa byla popsána v *Aspergillus niger*, poté v *Saccharomyces cerevisiae* a v dalších organismech [6].

Hydrolyza trehalosy může být provedena dvěma enzymatickými cestami. V kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* byly nalezeny dvě trehalasy označené zkratkami: Nth1, Nth2 a Ath1. Formy Nth1 a Nth2 jsou neutrální trehalasy, jejichž aktivita je největší při neutrálním pH. Ath1 je kyselá forma trehalasy, která je nejvíce aktivní při nízkém pH [7]. Avšak tato obecná představa má výjimky. Některé termofilní houby obsahují trehalasy, které mají smíšené vlastnosti neutrální trehalasy i kyselé trehalasy, které pravděpodobně patří do jiné glykosidické rodiny [8], [9].



Obrázek 2. 1: Schéma hydrolytického štěpení trehalosy na dvě jednotky glukosy (vyrobeno v programu ChemSketch).

2. 2 Lokalizace trehalas

Po jejich lokalizaci v cytosolu a ve vakuolách byly určeny jejich aktivity a pH optimum. Trehalasa nalezená ve vakuolách má pH optimum při 4,5 a díky tomu nese označení kyselá trehalasa a je permanentně aktivní. Trehalasy lokalizované v cytosolu mají oproti kyselé trehalase pH optimum 7,0 a tudíž nesou označení neutrální trehalasa [7].

2. 3 Kyselá trehalasa

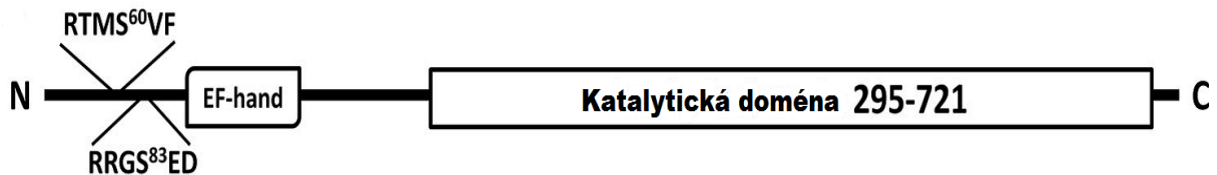
V kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* se nachází kyselá trehalasa, která je zodpovědná za degradaci extracelulární trehalosy. Tento méně zkoumaný enzym byl lokalizován ve vakuolách [8]. Kyselá trehalasa v kvasinkách je velmi specifický enzym a vykazuje vysoké teplotní optimum a vysokou stabilitu. Její pH optimum se pohybuje mezi 4,5 a 5,0 [10]. Sekvence kyselé trehalasy nevykazuje žádnou homologii s neutrální trehalasou a je důležitá pro růst média obsahující trehalosu jako zdroj uhlíku pro organismy jako je *Saccharomyces cerevisiae* [7].

2. 4 Neutrální trehalasa

O neutrální trehalase, její struktuře a mechanismu působení je známo více. Nth1 má ze 77 % stejnou sekvenci jako Nth2. Sekvence kódující Nth1 z organismů *Saccharomyces cerevisiae* a *Kluyveromyces lactis* a sekvence kódující Nth2 z *Saccharomyces cerevisiae* mají N - konec prokazatelně delší než u jiných organismů [11]. Dále porovnání sekvencí pro neutrální trehalasu z *Saccharomyces cerevisiae* a *Kluyveromyces lactis* ukázala na N-konci několik fosforylačních míst a také EF-hand motiv vázající iont vápníku, který reguluje enzymatickou aktivitu trehalasy tím, že ovlivní strukturu celé trehalasy [12]–[14]. EF-hand motiv má strukturu šroubovice-ohyb-šroubovice a je to univerzální, velmi

rozšířený motiv, který byl nalezen v mnoha rodinách proteinů [15], [16]. EF-hand motiv byl popsán v *Schizosaccharomyces pombe*, kde se trehalosa aktivuje právě vápenatým iontem, tento motiv byl také objeven v *Saccharomyces cerevisiae* [12]. Oblast obsahující EF-hand motiv (aminokyselinová sekvence 114 - 125) předchází oblast s katalytickou doménou (aminokyselinová sekvence 295 - 721). Schéma neutrální trehalasy je na obrázku 2. 2.

Aktivita neutrální trehalasy je nízká v oslabených buňkách, ale po přidání glukosy se aktivita znatelně zvýší již během několika minut [7], [17]. Fosforylace neutrální trehalasy je cAMP-dependntní a odpovídá za aktivaci endogenní trehalosy při různých podnětech. Katalytická aktivita je největší při neutrálním pH (6,5 – 7,0) [17]. Role cAMP-dependntní protein kinasy jsou tři: i) aktivovaná trehalasa může být deaktivována inkubací se zásaditou fosfatasou [18], [19], ii) neaktivní trehalasa může být znovu aktivována přítomností katalytické domény cAMP-depedentní proteinkinasy, tím se naváže fosfát na molekulu Nth1, iii) mutace nebo inhibice cAMP-depedentní proteinkinasy zabrání aktivaci Nth1 glukosou a mutace vedoucí ke zvýšené aktivitě proteinkinasy mají za následek zvýšení aktivity trehalasy [14], [20].



Obrázek 2. 2: Schéma struktury neutrální trehalasy s vyznačenými dvěma doménami EF-hand (sekvence 114 – 125) a katalytická doména (sekvence 295 – 721) a fosforylačními místy Ser60, Ser83 na N-koncové části (převzato a upraveno z [21]).

2. 5 Proteiny 14-3-3

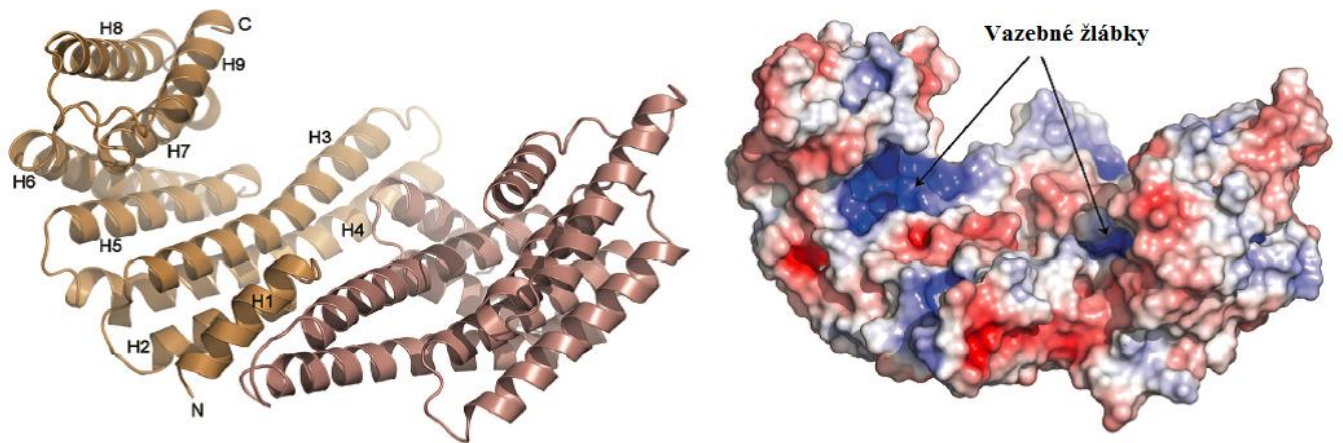
14-3-3 proteiny jsou kyselé regulační proteiny, jejichž různé izoformy byly nalezeny v široké škále organismů, od kvasinek (prokaryota) po savce (eukaryota) [22]. Velikost 14-3-3 proteinů je v rozmezí mezi 28 a 33 kDa. Nesou označení po číslu frakce z dvourozměrné DEAE-celulózové chromatografie, kde byly poprvé detekovány. Od objevení 14-3-3 proteinů dostávali členové této proteinové rodiny různá jména BAP-1, Bilardo, Exo1, Leonardo, Stratifin atd. [23].

2. 5. 1 Funkce proteinů 14-3-3

Proteiny 14-3-3 mají hodně vazebných partnerů, účastí se mnoha biochemických dějů: regulace buněčného cyklu, regulace transkripčních faktorů a apoptózy [23]–[25]. Díky konformačním změnám nebo stérickému působení vazebných partnerů mohou 14-3-3 proteiny aktivovat nebo potlačit enzymatickou aktivitu, předejít jejich degradaci, ovlivňovat jejich lokalizaci a usnadnit nebo zabránit modifikaci a interakce [24], [26]. Proteiny 14-3-3 rozpoznávají ve většině případů fosforylované ligandy (obvykle je fosforylovaný zbytek serinu anebo threoninu) a velmi často se tyto fosforylované zbytky účastní interakce [27]–[29]. Vazební partneři 14-3-3 proteinů byly nalezeny ve všech subcelulárních částech a zahrnují transkripční faktory, enzymy, proteiny cytoskeletu, signální molekuly či nádorové supresory. Je evidentní, že tyto proteiny hrají velmi významné role v klíčových procesech regulace buněčných mechanismů (apoptóza, karcinogeneze u některých typů rakovin u člověka) [26].

2. 5. 2 Struktura proteinů 14-3-3

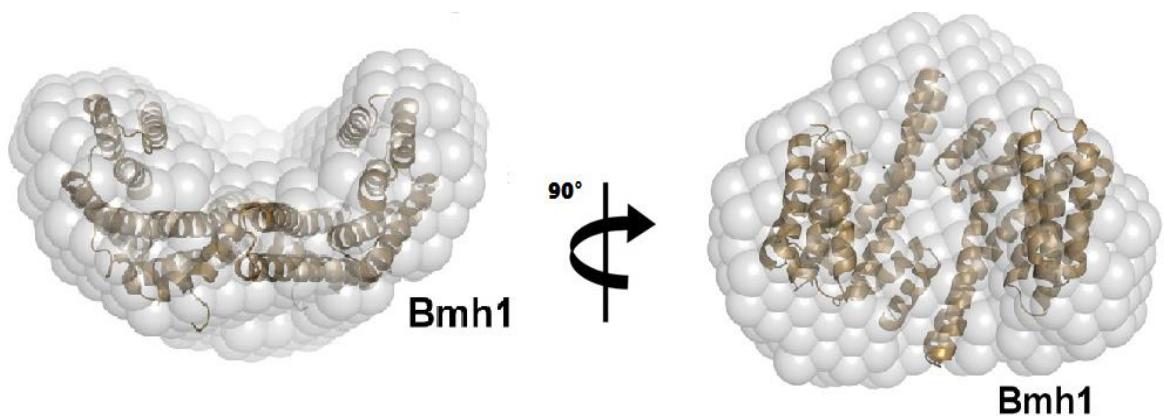
Tyto proteiny tvoří dimery, každý dimer je tvořen devíti antiparalelními alfa helixy, které strukturu stabilizují (obrázek 2. 3, str. 13) [30]. Tvorba dimerní struktury se ukázala jako důležitá pro správnou funkci proteinů 14-3-3, protože 14-3-3 proteiny, u kterých byly provedeny cílené mutace vedoucí k nevytvoření dimeru, ztrácí svou funkci [31]. Savčí sigma izoforma proteinu 14-3-3 jako jediná tvoří pouze homodimery, ostatní izolované izoformy tvoří homodimery i heretodimery [32]. Eukaryotické 14-3-3 proteiny se vyskytují v různých izoformách a jsou vysoce konzervovány. Kvasinky obsahují pouze dva geny pro 14-3-3 proteiny, vyšší eukaryota mají 14-3-3 genů až patnáct. V buňkách savců bylo identifikováno sedm izoform označenými řeckými písmeny (β , ε , η , γ , τ , ζ a σ), které jsou kódovány sedmi různými geny [33]. V centru dimeru se nachází prostorný kanál o velikosti $40 \cdot 10^{-10}$ m, ve kterém jsou dva amfipatické žlábký [28], [34]. Nejvíce flexibilní oblastí proteinu 14-3-3 je C-konec, je také nejvíce variabilní oblastí ve vzniklém dimeru [33].



Obrázek 2. 3: Struktura proteinu 14-3-3. Vlevo je stužková reprezentace krystalové struktury dimeru proteinu 14-3-3 zeta. Každý monomer je znázorněn jinou barvou a jednotlivé helixy jsou očíslovány H1-H9. Vpravo je znázorněna povrchová reprezentace 14-3-3 zeta, kde povrch je vybarven dle elektrostatického potenciálu (převzato a upraveno z [21]).

2. 5. 3 Proteiny Bmh

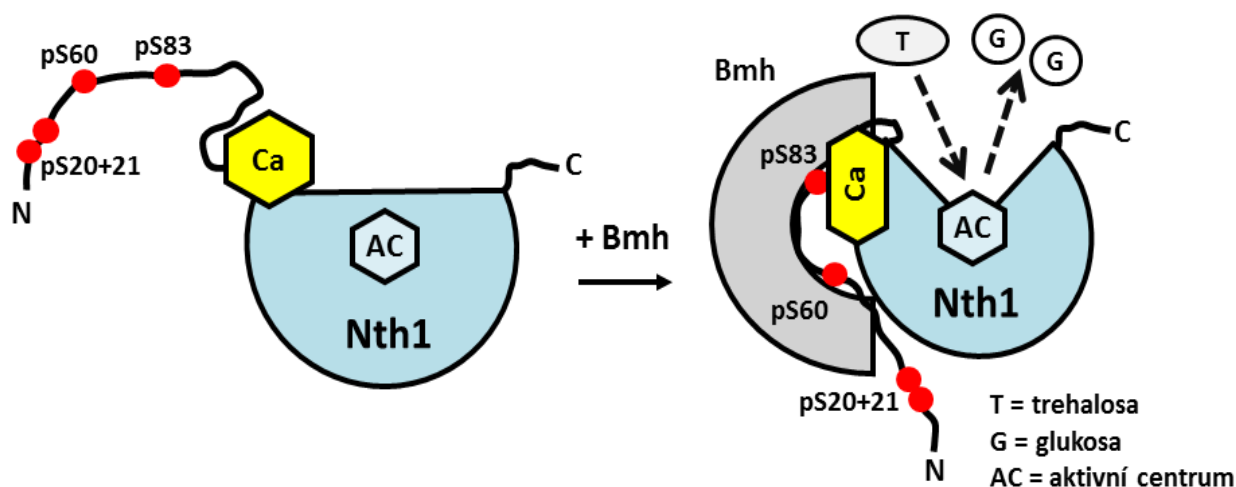
V *Saccharomyces cerevisiae* byly nalezeny dvě isoformy 14-3-3 proteinů Bmh1 a Bmh2, které mají z 93 % stejnou aminokyselinovou sekvenci [35] (obrázek 2. 4). Oproti isoformám u vyšších eukaryot se zjistilo, že kvasničné isoformy proteinů 14-3-3 Bmh1 a Bmh2 mají C-konec podstatně delší obsahující polyglutaminovou sekvenci dosud neznámé funkce. Stejně jako 14-3-3 proteiny tyto izoformy existují ve stabilní formě dimeru [2] a účastní se mnoha buněčných mechanismů jako regulace buněčného cyklu, regulace metabolismu glukosy, rozpad DNA, syntéza trehalosy a vesikulární transport [35], [36].



Obrázek 2. 4: Teoretický model struktury Bmh1 navržený z nízkoúhlového rozptylu rentgenového záření (sekvence 4-236). Převzato a upraveno z [21].

2. 6 Způsob aktivace Nth1

Neutrální trehalasa je neaktivní bez přítomnosti proteinů Bmh, aktivní centrum je totiž nepřístupné. Pro zpřístupnění aktivního centra je nezbytná fosforylace několika aminokyselinových zbytků na N-konci enzymu, díky které je dále Nth1 schopna interagovat s izoformami proteinů 14-3-3. Byla nalezena 4 možná fosforylační místa Ser20, Ser21, Ser60 a Ser83 [2], [7], přičemž pouze seriny na pozicích 60 a 83 jsou důležité pro vazbu proteinů Bmh a tím i aktivaci trehalosy [2]. Tato místa jsou fosforylována cyklickou AMP-dependentní kinasou (PKA), která je přítomná v cytoplasmě [17], jejíž regulace byla vysvětlena v kapitole 2. 4 str. 10. Až teprve fosforylovaná trehalasa je rozpoznána proteinem Bmh a tím dochází k aktivaci enzymu (obrázek 2. 5). Obě izoformy (Bmh1 i Bmh2) vytváří s fosforylovanou trehalasou stabilní komplex, při čemž jejich molární poměr je 2:1 (dimer proteinu Bmh se váže na monomer proteinu Nth1). Nezbytnou roli v aktivaci neutrální trehalasy hrají nejenom proteiny Bmh, ale i vápenaté kationty. Aktivace Nth1 pomocí proteinů Bmh je však mnohem účinnější, nežli aktivace jenom prostřednictvím Ca^{2+} iontů [21].



Obrázek 2. 5: Mechanismus aktivace neutrální trehalasy. Neutrální trehalasa je bez přítomnosti Bmh proteinu neaktivní kvůli nepřístupnému aktivnímu centru. Díky fosforylovaným serinům se dimer proteinu Bmh je schopen se navázat na neutrální trehalasu a způsobit tím konformační změnu, která odhalí aktivní centrum. Tím se neutrální trehalasa aktivuje. Červené body představují očíslované fosforylované seriny, žlutý hexagon iont vápníku, který váže EF-hand motiv (převzato a upraveno z [37]).

2. 7 Sekundární sekvence Nth1 a výběr konstruktů pro krystalografii

Pro výběr konstruktů pro výzkum je nutné znát sekundární strukturu zkoumaného proteinu. Již od devadesátých let, kdy byly shromážděny informace o sekundárních strukturách proteinů, podpořily tyto informace výzkum a vývoj a databází a s rostoucím množstvím dat se dalo odhadnout sekundární strukturu proteinu. Spolehlivost metod se zprvu pohybovala nad 4 %, dnešní metody mají spolehlivost kolem 76 % a jsou schopny správně odhadnout přítomnost alfa-šroubovice, skládaného listu a neuspořádané struktury. Různé principy metod a množství informací umožňují správnější predikci sekundární struktury, ale i správně předpoví dlouhé úseky pozorované v alternativních sekundárních strukturách v závislosti na podmínkách [38].

Dnes jsou k dispozici efektivní automatické metody pro zjištění sekundární struktury a stávají se nezbytnými pro studium struktury a tím i funkce proteinu. Existují již metody pro globulární tak i membránové proteiny. Výsledky jsou k dispozici v krátkém časovém rozmezí.

Pro zjištění sekundární struktury Nth1 byla použita metoda PSIPRED (Predict Secondary Structure) na serveru <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/>. Tato metoda umožňuje rychlé získání výsledků sekundární struktury v textovém souboru nebo prostřednictvím PRISPREDview, který interpretuje sekundární strukturu pomocí přehledného obrázku [39], [40]. Odhad sekundární struktury Nth1 je uveden v Příloze A, str. 51 - 53. Na základě predikce sekundární struktury byly navrženy následující dva konstrukty Nth1 100 – 751 a Nth1 153 – 751 (tabulky 2. 1 a 2. 2, str. 16).

Aminokyselinová sekvence Nth1, uložená v databázi UniProt pod kódem P32356, byla čerpána 12. 2. 2013 z <http://www.uniprot.org/uniprot/P32356>.

Tabulka 2. 1 Sekvence Nth1 (aminokyseliny 153 – 751), v plasmidu pHGT2, červeně znázorněna odštěpitelná sekvence TEV proteasou.

MNSSHHHHHHM QYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVKQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTENNN
NNNNNNNENLYFQ GAMGSNLLQELTIAKSFGRHQIFLDEARINENPNRSLRLINTQFWNSLTRRVDLNNV
GEIAKDTKIDTPGAKNPRIYVPYDCPEQYEFYVQASQMHP SLKLEVEYLPKKITAEYVKS VNDTPGLLALA
MEEHFN PSTGEKTLIGYPYAVPGGRFNELYGWDSYMMALGLLEANKTDVARGMVEHFIFEINHYGKILNA
NRSYYLCRSQPPFLTEMALVVFKKLGGRSNPDAVDLLKRAFQASIKEYKTVWTASPRLDPETGLSRYHPNG
LGIPPETESDHFDTVLLPYASKHGVTLDEFKQLYNDGKIKEPKLDEFFLHDRGVRESGHDTTYRFEGVCAYL
ATIDLNSLLYKYEIDIADFIKEFCDDKYEDPLDHSITTSAMWKEMAKIRQEKITKYMWDDESGFFFDYNTKI
KHRTSYESATTFWALWAGLATKEQAQKMVEKALPKLEMLGGLAACTERSRGPISISRPIRQWDYPFGWAP
HQILAWEGLRSYG YLTVTNRLAYRWLFMMTKAFVDYNGIVVEKYDVTRGTDPHRVEAEYGNQGADFKG
AATEGFGWVNASYILGLKYMNSHARRALGACIPPISFFSSLRPQERNLYGL

Tabulka 2. 2 Sekvence Nth1 (aminokyseliny 100 – 751) v plasmidu pHGT2, červeně znázorněna odštěpitelná sekvence TEV proteasou.

MNSSHHHHHHM QYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVKQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTENNN
NNNNNNNENLYFQ GAMGEDVDKTLNELLAEDTDKNYQITIEDTGPKVLKVG TANSYGYKHINIRGTYM
LSNLLQELTIAKSFGRHQIFLDEARINENPNRSLRLINTQFWNSLTRRVDLNNVGEIAKDTKIDTPGAKNPR
IYVPYDCPEQYEFYVQASQMHP SLKLEVEYLPKKITAEYVKS VNDTPGLLALAMEEHFN PSTGEKTLIGYP
YAVPGGRFNELYGWDSYMMALGLLEANKTDVARGMVEHFIFEINHYGKILNANRSYYLCRSQPPFLTEMA
LVVFKKLGGRSNPDAVDLLKRAFQASIKEYKTVWTASPRLDPETGLSRYHPNGLGIPPETESDHFDTVLLPY
ASKHGVTLDEFKQLYNDGKIKEPKLDEFFLHDRGVRESGHDTTYRFEGVCAYLATIDLNSLLYKYEIDIADF
IKEFCDDKYEDPLDHSITTSAMWKEMAKIRQEKITKYMWDDESGFFFDYNTKIKHRTSYESATTFWALWA
GLATKEQAQKMVEKALPKLEMLGGLAACTERSRGPISISRPIRQWDYPFGWAPHQILAWEGLRSYG YLTV
TNRLAYRWLFMMTKAFVDYNGIVVEKYDVTRGTDPHRVEAEYGNQGADFKGAATEGFGWVNASYILGL
KYMNSHARRALGACIPPISFFSSLRPQERNLYGL

3 Cíle práce

- Exprese a purifikace dvou různých konstruktů katalytické domény neutrální trehalasy Nth1 (sekvence 100 – 751; sekvence 153 – 751).
- Exprese a purifikace TEV proteasy.
- Příprava série pufrů o různém pH a iontové síle a určení teploty denaturace obou konstruktů v těchto pufrách pomocí metody diferenční skenovací fluorimetrie DSF.
- Určení ideálního pufru z hlediska stability a homogenity proteinu a optimalizace purifikace konstruktu Nth1 (sekvence 153 – 751) v tomto pufru.

4 Materiál a metody

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Chemikálie

Následující seznam chemikálií je seřazen abecedně, dále je uvedeno jméno výrobce.

1,4 - dithiothreitol, DTT	Carl Roth
ampicilin	Biotika
azid sodný	Sigma-Aldrich
Bicin	MERCK kGaA
bromfenolová modř	Sigma-Aldrich
citrát sodný	PENTA
Coomassie Brilliant Blue R 250, CBB R250	SIGMA
dihydrát citrátu sodného	LACH:NER
dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného	PENTA
dihydrogenfosforečnan draselný	PENTA
dodecylsulfát sodný, SDS	Sigma-Aldrich
ethanol pro UV- spektroskopii	PENTA
ethylendiamintetraoctová kyselina, EDTA	Carl Roth
fenylmethylsulfonylfluorid ,PMSF	Carl Roth
glycerol	LACH:NER
HEPES	Carl Roth
hydroxid draselný	LACH:NER
hydroxid sodný	LACH:NER
chloramfenikol	Carl Roth
imidazol	Carl Roth
isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid, IPTG	Sigma-Aldrich
kanamycin	Duchefa Biochemie
kyselina chlorovodíková	LACH:NER
kyselina octová	LACH:NER
lysozym	Carl Roth
médium Luria-Bertani, LB	Carl Roth
MES	Carl Roth
methanol	PENTA
N, N, N', N'-tetraethylendiamin, TEMED	Carl Roth
Octan amonný	LACHEMA
persulfát amonný	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-Free	SIGMA
síran nikelnatý	PENTA

thiamin-hydrochlorid	Carl Roth
trihydrát octanu amonného	PENTA
Tris	Carl Roth
β-merkptoethanol	Carl Roth

4. 1. 2 Přístroje

analytické váhy EG420-3NM	KERN
centrifuga 5804R	Eppendorf
centrifuga Sigma 8K	SIGMA
centrifuga Z 300	HERMLE labortech.
centrifuga Z323K	HERMLE labortech.
FPLC –AKTA	Amersham Bioscien.
Light cycler 480 II	Roche
magnetické míchačky VARIOMAG MAXI	Thermo Scientific
peristaltická pumpa Ecoline	Ismatec
pH metr JENWAY 3505	P-LAB
sada na elektroforézu	BioRad
Sonicator3000	Misonix
spektrofotometr Agilent 8453	Agilent Technologies
vortex Vortex-GENIE2	Scientific Industries
vortex Zx3	Velp Scientifica

4. 1. 3 Ostatní materiál

automatické pipety	Eppendorf
centrifugační kyvety	Carl Roth
Color Burst standard na SDS-PAGE	BioRad
destička na LigthCycler Multiwell plate 96	Roche
dialyzační membrána	Carl Roth
filtry SPARTAN13/0,45 RC	Whatman
fólie na destičku na LigthCycler 480 Sealing Foil	Roche
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare
kolona Superdex 200	Amersham Bioscien.
kolonka pro niklovou chelatační chromatografii	Bio-Rad Laboratories
koncentrátory Amicon Ultra	Millipore
křemenné kyvety	Agilent Technologies
laboratorní sklo	Simax
mikrostříkačka HAMILTON	Hamilton
mikrozkumavky	P-LAB
nylonové filtry	Whatman
pipeta multikanálová	Eppendorf
program Unicorn 4.11	GE Healthcare
set pro SDS-PAGE	Bio-Rad Laboratories
SP sepharose	Amersham Bioscien.

stříkačky.....	B. Braun
špičky.....	Axygen
Tib Tub zásobník 60 ml s víčkem.....	Eppendorf
víčko na zásobní destičku na pufry.....	RITTER
zásobní destička na pufry.....	RITTER

4. 2 Exprese konstruktů Nth1 100 – 751 a Nth1 153 – 751

Z glycerolové konzervy bakterií *E. coli* BL21(DE3), obsahující gen pro Nth1 v plasmidu pHGT2 (modifikovaný pRSFDuet) bylo odebráno po 5 µl do zkumavek s 5 ml tekutého LB média (tabulka 4. 1) obsahujících kanamycin o koncentraci 30 µg/ml. Bakterie byly kultivovány v tekutém LB médiu v termostatu v třepačce při 37 °C přes noc.

Následující den byly kultury s bakteriemi přeneseny do 2 l Erlenmayerových bání s 1000 ml sterilního LB média a 1 ml kanamycinu o koncentraci 30 mg/ml (výsledná koncentrace 30 µg/ml). Při měření optické density byl použit roztok čistého sterilního LB média s kanamycinem o koncentraci 30 µg/ml jako referenční vzorek. Při optické densitě měřené při 600 nm o hodnotě 0,8 byla teplota v inkubátoru zchlazena na 25 °C a exprese Nth1 byla indukována přidáním 1 ml 0,5 M IPTG (výsledná koncentrace 0,5 mM). Bakterie byly inkubovány při 25 °C a konstantním třepání 200 rpm přes noc.

Tabulka 4. 1

LB médium:	1000 ml
trypton	10 g
NaCl	10 g
kvasinkový extrakt	5 g
H ₂ O	doplnit do 1l

4. 3 Centrifugace a lyze buněk

K oddělení napěstovaných buněk od LB média byla použita centrifugace. Napěstované bakteriální kultury byly přelity do 1 l kyvet a centrifugovány po dobu 20 min. při 4 °C a rychlosti 2600 rpm. Vzniklá peleta byla resuspendována na vortexu lyzačním pufrem a homogenizována pro rovnoměrnou lyzi buněk. Na pelety z 3 l LB média přibližně 100 ml lyzačního pufru (tabulky 4. 2 a 4. 3, str. 21). Dále byly resuspendované pelety uloženy do – 80 °C.

Tabulka 4. 2

Lyzační pufr	100ml
10×PBS; výsledná koncentrace 1×PBS (tabulka 4. 3)	10 ml
NaCl, výsledná koncentrace 1 M	5,84 g
imidazol, výsledná koncentrace 2 mM	0,0136 g
β – ME, výsledná koncentrace 4 μM	28 μl
doplněno destilovanou vodou na 100 ml	

Tabulka 4. 3

PBS 10×koncentrovaný	1000 ml
NaCl	80 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	14,4 g
NaN ₃	0,4 g
doplněno destilovanou vodou na 1 l a pH upraveno na 7,4 pomocí 1M NaOH	

Lyze neboli rozbití buněk byla provedena inkubací pelety z předešlé centrifugace s 0,01 g lysozymu (pro peletu z 3 l LB média, výsledná koncentrace 100 μg/ml) po 30 min. Již před samotnou inkubací byla přidána jedna tableta komerčně dostupné tablety inhibitoru proteas rozpuštěná v 1 ml destilované vody. Nakonec se po inkubaci přidal do směsi 1 ml zásobního roztoku 0,1 M PMSF v ethanolu pro UV spektroskopii (výsledná koncentrace byla 0,5 mM).

4. 4 Sonikace

Pomocí sonikátoru byla směs vystavena ultrazvuku po dobu 15 minut při výkonu 57 wattů, vždy 3 s zapnuto a 17 s vypnuto. Tímto se exprimovaný protein dostal do roztoku. V průběhu sonikace byla směs chlazená v ledu, aby se zamezilo degradaci proteinu. Sonikovaná směs byla pak centrifugována 45 min, při 13 500 rpm a teplotě 4 °C. Supernatant (cytosolární frakce) obsahující exprimovaný konstrukt byl zamražen do - 80,0 °C.

4. 5 Purifikace Nth1 100 – 751 a Nth1 153 – 751

Purifikace konstruktů Nth1 100 – 751 a Nth1 153 – 751 probíhala ve dvou krocích – niklovou chelatační chromatografií a gelovou permeační chromatografií. Množství a

čistota Nth1 100 – 751 a Nth1 153 – 751 byla monitorována pomocí SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS – PAGE).

4. 5. 1 Niklová chelatační chromatografie

Oba konstrukty katalytické domény neutrální trehalasy jsou opatřeny histidinovou kotvou (6 histidinů za sebou – His – tag), která umožňuje první krok purifikace. Histidin obsahuje slabě bazický imidazolový zbytek, který je schopen chelatace s nikelnatými ionty zachycenými ve stacionární fázi (Chelating SepharoseTM fast flow) kolony pro chromatografii. Tímto dochází k jeho zadržení na stacionární fázi, která je promývána pufrům 10% F (40 ml pufru F a 360 ml pufru E), který nespecificky vázané proteiny odstraní. Poté se kolona promyje pufrům s velkým množstvím imidazolu (pufrům F), který také chelatuje s Ni²⁺ a protein uvolní.

Kolona určená pro niklovou chelatační chromatografii byla připojena k peristaltické pumpě, byl nastaven průtok 30 ml/ min a 5 ml sloupec sepharosy v koloně byl promyt následujícími roztoky (složení pufrů je uvedeno v tabulkách 4. 4 – 4. 5, str. 23):

- 1) 15 ml H₂O
- 2) 15 ml Stripp roztoku (tabulka 4. 6, str. 23)
- 3) 20 ml H₂O
- 4) 50 ml 0,1 M NiSO₄
- 5) 15 ml H₂O
- 6) 20 ml pufru E

Při promývání kolony síranem nikelnatým byl průtok snížen na 25 ml/ min kvůli kvantitativnímu navázání Ni²⁺ na sepharosu. Peristaltická kolona byla zastavena těsně nad sloupcem náplně – stacionární fáze byla připravena pro zachycení proteinu. Dále byla plastovým kapátkem na kolonu nanášena rozmrazená sonikovaná peleta v lyzačním pufru, smíchána se sepharosou a přemístěna zpět do kádinky. Směs v kádince byla za stálého míchání při 4 °C inkubována 30 minut (pro kvantitativní navázání proteinu na sepharosu).

Následně byla směs přemístěna do 45 ml zkumavek a centrifugována při 4 °C, 1600 rpm, 2 min. Peleta (sepharosa s navázaným proteinem) byla postupně promývána 400 ml 10 % pufru F (obsahující 60 mM imidazol), kdy se odstranily nespecificky vázané makromolekulární příměsi a směs byla opět centrifugována (4 °C, 1600 rpm, 2 min). Tento

způsob provedení niklové chelatační chromatografie se nazývá vsádkový. Následně se sepharosa vrátila zpět do kolony a konstrukt se eluoval gravitačně ze stacionární fáze pomocí 20 ml pufru F (obsahující 600 mM imidazol, tabulka 4. 5), přičemž pufr obsahující protein byl jímán do mikrozkuvek.

Použitá kolona byla po eluci proteinu regenerována promytím kolony přibližně 50 ml destilované vody, 50 ml STRIPP solution (tabulka 4. 6), 50 ml destilované vody a nakonec 25 ml 20 % (v/v) ethanolu. Kolona byla uskladněna pro opětovné použití pod 5 cm sloupcem 20 % (v/v) ethanolu v lednici.

Tabulka 4. 4

Pufr E pro chelatační chromatografii	1000 ml
10×PBS; výsledná koncentrace 1×PBS (tabulka 4. 3, str. 21)	100 ml 10×PBS
NaCl; výsledná koncentrace 0,5 M	29,2 g
imidazol; výsledná koncentrace 1 mM	0,07 g
β – ME; výsledná koncentrace 2 μM	139 μl

Tabulka 4. 5

Pufr F pro chelatační chromatografii, pH 8	500 ml
10×PBS; výsledná koncentrace 1×PBS (tabulka 4. 3, str. 21)	50 ml 10×PBS
NaCl; výsledná koncentrace 0,5 M	14,6 g
imidazol; výsledná koncentrace 0,6 M	20,4 g
β – ME; výsledná koncentrace 2 μM	69,5 μl

Tabulka 4. 6

STRIPP solution	450 ml
EDTA; výsledná koncentrace 0,33 M	300 ml 0,5M EDTA
NaCl; výsledná koncentrace 1,66 M	150 ml 5M NaCl

4. 5. 2 Dialýza

Dialýza je metoda pro oddělení velikostně rozdílných molekul, v tomto případě byla použita pro odstranění nízkomolekulárních látek od roztoku proteinu. Používají se komerčně dostupné membrány s různými velikostmi pórů. Proto je nutné zvolit membránu tak, aby velikost proteinu byla větší než póry a nedošlo k úniku proteinu do dialyzačního pufru. Menší molekuly difundují po koncentračním gradientu z vnitřku dialyzační membrány do dialyzačního pufru.

Nejprve byl připraven 1 l dialyzačního pufru, složení je uvedeno v tabulce 4. 7. Před vlastní dialýzou se do vychlazeného pufru na 4 °C přidalo DTT, pufr byl pečlivě promíchán na magnetické míchačce a byl zchlazen na 4 °C, aby nedocházelo k degradaci proteinu. Frakce obsahující protein byly pipetou přemístěny do dialyzační membrány, která byla na obou koncích sepnuta svorkami a membrána se ponořila do nádoby s dialyzačním pufrem. Dialýza probíhala přes noc při teplotě 4 °C za stálého míchání dialyzačního pufru.

Tabulka 4. 7

Pufr pro dialýzu	1000 ml
10% (w/v) glycerol	100 g
Tris – HCl, 20 mM, pH 7,5	20 ml 1M Tris – HCl pH 7,5
EDTA pH 8, výsledná koncentrace 1 mM	2 ml 0,5 M EDTA pH 8
NaCl, výsledná koncentrace 150 mM	8,76 g
β – ME, výsledná koncentrace 2 mM	139 μl

4. 5. 3 SDS – PAGE

SDS-PAGE elektroforéza (v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného) je elektromigrační metoda, které se používá k separaci proteinů na základě jejich rozdílné elektroforetické mobility a velikosti. Dodecylsírany sodný je povrchově aktivní látka, která se váže na proteiny, denaturuje je a dodává jim záporný náboj, který je nepřímo závislý na velikosti proteinu. Takto nabité proteiny putují vláknitou strukturou gelu od katody k anodě, největší molekuly zaznamenají největší odpor v gelu a proto jejich mobilita je nejmenší. Nejmenší molekuly mají naopak největší mobilitu.

K analýze byly použity 12 % separační gely a 5 % zaváděcí gely.

4. 5. 3. 1 Příprava vzorků

K 15 μl roztoku proteinu v mikrozkuhavce se přidalo 5 μl vzorkového pufru (tabulka 4. 13, str. 26). Celkový objem byl 20 μl. Mikrozkuhavky byly po 1 min inkubovány při 100 °C, tímto krokem byla zajištěna denaturace proteinu. Dále byly vzorky naneseny do jamek zaváděcího gelu pomocí mikrostříkačky HAMILTON. Do první jamky bylo zavedeno 10 μl roztoku molekulových standardů. Elektroforéza probíhala při 200 V, dokud obarvený vzorek nedoputoval ke konci gelu.

4. 5. 3. 2 Vizualizace gelů

Pro vizualizace gelů bylo použito barvivo CBB R250. Gely byly nejprve inkubovány po dobu 15 minut v barvicím roztoku při teplotě 100 °C, čímž došlo k navázání barviva na proteiny v gelu. Dalším krokem bylo odbarvení gelů pomocí odbarvovacího roztoku, který se zahřál k varu. Složení roztoků je uvedeno v tabulkách 4. 8 - 4. 16, str. 25 – 26.

Tabulka 4. 8

Zaváděcí gel

H ₂ O	2,25ml
Pufr pro zaváděcí gel	1,87ml
akrylamid/bis-akrylamid 30%/0,8% (w/v)	0,5 ml
10% (w/v) persulfát amonný	75 µl
TEMED	8 µl

Tabulka 4. 9

12% separační gel	celkový objem 7,7 ml
H ₂ O	2,6 ml
Pufr pro separační gel	1,87ml
akrylamid/bis-akrylamid 30%/0,8% (w/v)	3 ml
10% (w/v) persulfát amonný	75 µl
TEMED	8 µl

Tabulka 4. 10

Pufr pro separační gel

Tris – HCl (pH 8,8; 1,5 M)	75 ml
SDS (10%)	4 ml
H ₂ O	21 ml

Tabulka 4. 11

Pufr pro zaváděcí gel

Tris – HCl (pH 8,8; 1,5 M)	50 ml
SDS (10%)	4 ml
H ₂ O	46 ml

Tabulka 4. 12

Akrylamid/bis-akrylamid	100 ml
akrylamid	29,2 g
bis – akrylamid	0,8 g
doplněno destilovanou vodou do 100 ml	

Tabulka 4. 13

5x koncentrovaný pufr pro přípravu vzorků

Tris – HCl (pH 6,8, 1 mol dm ⁻³)	0,6 ml
glycerol	1,87ml
SDS (10 % w/v)	2 ml
β – ME	0,5 ml
10% bromfenolová modř	1 ml
H ₂ O	0,9 ml

Tabulka 4. 14

Pufr pro elektroforézu	výsledná koncentrace
Tris/HCl pH 8,3	50 mM
glycin	385 mM
SDS	0,1 % w/v

Tabulka 4. 15

Barvicí roztok

Coomassie Brilliant Blue R 250	1 g
methanol	450 ml
kyselina octová	100 ml
H ₂ O	450 ml

Tabulka 4. 16

Odbarvovací roztok

methanol	100 ml
kyselina octová	100 ml
H ₂ O	800 ml

4. 5. 4 Štěpení TEV proteasou

TEV proteasa je specifická endopeptidáza, která exprimovaný a purifikovaný konstrukt zbavuje histidinové kotvy (His – tag), která slouží k prvnímu kroku purifikace

(kapitola 4. 5. 1) Před dialýzou sloučených frakcí se do dialyzačního střeva přidalo 400 μ l TEV proteasy (v případě purifikace z 3 l LB média).

4. 5. 5 Zakoncentrování proteinu a filtrace

Zakoncentrování bylo nutné provést pro snížení objemu pufru s proteinem pro použití gelové permeační chromatografie. Ke koncentrování byl použit koncentrátor, který propouští molekuly do velikosti 10 kDa. Protein s koncentrátorem byl centrifugován při 4 °C, 1 600 rpm, 2 min. Objem byl snížen na 1 ml pro jednu gelovou permeační chromatografii.

4. 5. 6 Gelová permeační chromatografie

Gelová chromatografie je separační metoda, která se používá k dělení látek na základě jejich rozdílné molekulové hmotnosti. Použitá kolona obsahovala pórovitý zrnitý materiál a pufr. V průběhu chromatografie docházelo k dělení molekul mezi rozpouštědlo vně částic náplně kolony a mezi rozpouštědlo uvnitř těchto částic. Nejdéle jsou na koloně zadrženy molekuly, pro které jsou přístupné všechny póry zrn gelu a nejprve kolonou projdou ty molekuly, které se do póru nemohou dostat. Největší molekuly mají nejmenší retenční čas, naopak nejmenší látky největší retenční čas. Na tomto základě došlo k oddělení proteinu od agregovaných makromolekul a krátkých štěpů.

Pro gelovou permeační chromatografii byla použita kolona Superdex™ 200 10/300 (průměr/délka kolony v mm). Nejdříve byla kolona promyta vodou a následně přefiltrovaným pufrem (tabulka 4. 17). Protein byl filtrován přes 0,45 μ M filtr a poté nanesen na kolonu. Rychlost průtoku kolony byla nastavena 0,5 ml za minutu (dle parametrů příslušné kolony). Jednotlivé proteinové frakce byly jímány do mikrozkušavek a následně byla ověřena jejich čistota pomocí SDS – PAGE.

Tabulka 4. 17

Pufr pro gelovou permeační chromatografii	1000 ml
glycerol; 10% (w/v) glycerol	100 g
Tris; výsledná koncentrace 50 mM	50ml 1M Tris pH 7,5
NaCl; výsledná koncentrace 150 mM	8,76 g
DTT; výsledná koncentrace 5 mM	0,771g

4. 5. 7 UV – VIS spektrofotometrické stanovení koncentrace

Ke stanovení koncentrace vypořizifikovaného proteinu byl použit spektrofotometr s deuteriovou lampou. Byla použita skleněná kyveta, která se uchovává v roztoku kyseliny chromsírové zaručující čistotu kyvety pro přesné měření. Jako referenční vzorek byl použit pufr pro gelovou permeační chromatografii, stejným pufrém byl roztok s proteinem vhodně naředěn kvůli menším ztrátám proteinu a přesnosti měření. Absorbance vzorku byla měřena při 280 nm (pro kontrolu i při 260 nm). Molární koncentrace proteinu byla poté určena pomocí Lambert-Beerova zákona ($A = \epsilon \times c \times l$). Protein byl nakonec zmražen do -80°C.

4. 6 Expres a purifikace TEV proteasy

4. 6. 1 Expres, lyze, sonikace

Pro expresi TEV proteasy bylo odebráno 10 μ l glycerolové zásoby buněk B121(DE3)RIL do zkumavek s 5 ml tekutého LB média (složení v tabulce 4. 1, str. 21), do kterého bylo přidáno 5 μ l ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml (výsledná koncentrace byla 100 μ g/ml) a 5 μ l chloramfenikolu o koncentraci 34 mg/ml (výsledná koncentrace byla 34 μ g/ml). Bakterie byly kultivovány v LB médiu přes noc při 37 °C. Druhý den byl obsah zkumavky přelit do bání s 1000 ml LB média s 1 ml ampicilinu a 1 ml chloramfenikolu, koncentrace použitých roztoků i výsledné koncentrace antibiotik v bání jsou stejné jako při přípravě miniprepu. Popis způsobu kultivace bakterií je popsán v kapitole 4. 2, str. 20. Expres byla indukována přidáním 2,5 ml 0,1 M IPTG při $OD^{600\text{ nm}} = 0,9$. Druhý den bylo LB médium s bakteriemi stočeno a resuspendováno 40 ml lisačního pufru (tabulka 4. 2, str. 21) a na 30 min uloženo do -80 °C. Poté byla resuspendovaná směs inkubovaná s 4 mg lysosymu po dobu 30 min při 4 °C a následně vystavena ultrazvuku (kapitola 4. 4, str. 21) 15 s ON, 45 s OFF při celkovém čase ON 8 min. Poté byla směs stáčena 1 h při 13500 rpm a 4 °C.

4. 6. 2 Purifikace TEV proteasy

K purifikaci TEV proteasy byla použita niklová chelatační chromatografie (kapitola 4. 5. 1, str. 22 - 23), dialýza a pro ověření čistoty získaných frakcí SDS PAGE (kapitola 4. 5. 2 a kapitola 4. 5. 3, str. 23 - 26). Pro dialýzu byl použit pufr o složení uvedeném v tabulce 4. 18, str. 27.

Tabulka 4. 18

Pufř pro dialýzu	1000 ml
glycerol; 10% (w/v) glycerol	100 g
Tris pH 7,5; výsl. koncentrace 50 mM	50ml 1M Tris pH 7,5
EDTA; výsledná koncentrace 1 mM	2 ml 0,5 M EDTA
DTT; výsledná koncentrace 5 mM	0,7 g

Po dialýze byly frakce 2 – 10 sloučeny a změřena absorbance. Dále se roztok s TEV proteasou ředil pufřem pro dialýzu tak, aby se absorbance při 280 nm pohybovala kolem 1,04. Tato hodnota absorbance odpovídá koncentraci 0,838 mg/ml. Roztok s proteinem byl rozdělen do mikrozkuvek po 1 ml a zamražen do - 80 °C.

4. 7 Stabilita proteinu v roztoku

Pro krystalografii proteinu a další metody zkoumání jeho struktury je zcela zásadní jeho stabilita, vysoká koncentrace proteinu a homogenita roztoku. Protein setrvává v nativní formě díky hydrofobním interakcím s okolím, vodíkovými můstky a elektrostatickými interakcemi mezi opačně nabitými částmi proteinu a disulfidickými můstky mezi atomy síry obsažené v aminokyselinách methioninu a cysteinu. Stabilitu proteinu zajišťuje vhodná teplota při samotné purifikaci a další manipulaci, a látky rozpuštěné v roztoku o vhodné iontové síle, přítomnost precipitantů a v neposlední řadě také koncentrace proteinu a jeho velikost. Tyto ligandy se nespecificky váží na povrchovou část proteinu a tím jej stabilizují v nativní struktuře a nedochází k degradaci a agregaci proteinu [41].

Stabilita proteinu je dána rozdílem volné Gibbsovy energie neuspořádaného stavu (G_N) a volné Gibbsovy energie uspořádaného stavu (G_U).

$$(1)\Delta G_{N-U} = G_N - G_U$$

Pro uzavřený systém lze napsat rovnici (2), která ukazuje, že hodnota změny volné Gibbsovy energie závisí na teplotě [42].

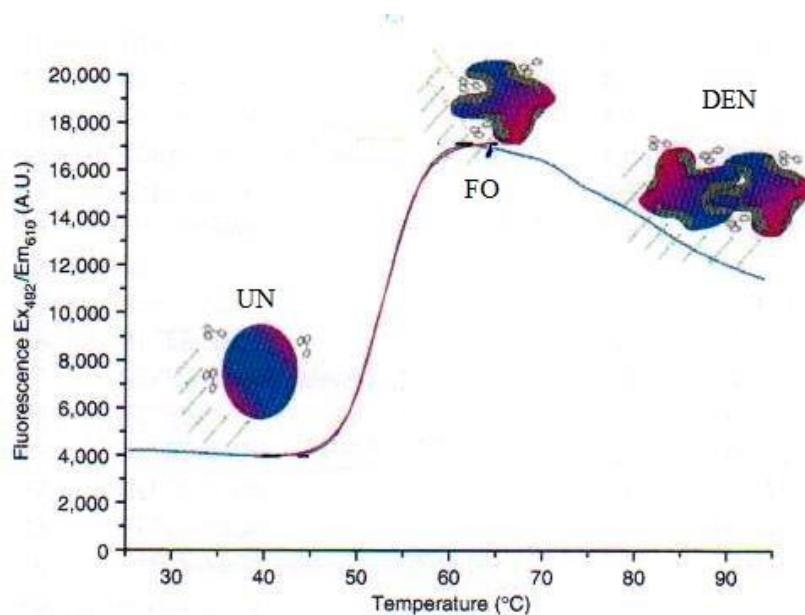
$$(2)\Delta G_{N-U} = \Delta H_{N-U} - T\Delta S_{N-U}$$

4. 8 Diferenční skenovací fluorimetrie

Metoda diferenční skenovací fluorimetrie (též Thermofluor) je poměrně efektivní metoda, která určí optimální složení roztoku pro krystalizaci proteinu. Tato metoda byla patentována v roce 2000 M. W. Pantolianem (United States Patent 6 020 141). DSF není náročná na instrumentaci, při experimentu se spotřebuje relativně málo proteinu (desítky μl) a výsledky jsou k dispozici velmi rychle. Výsledkem metody je hodnota teploty tání, která charakterizuje stabilitu proteinu v závislosti na složení zkoumaného roztoku.

Pro zjištění optimálních podmínek podporujících stabilitu nativní formy získaného proteinu ovlivňují roztoky, ve kterých jsou proteiny skladovány. Pomocí diferenční skenovací fluorimetrie se zjistila vhodná koncentrace solí a hodnota pH, která brání denaturaci proteinů a tvorbě agregátů, které jsou krajně nevhodné pro krystalizaci. Roztok proteinu v dostatečné kvalitě a čistotě byl použit při testování v různých variantách pufrů a roztoků solí. Pufr nebo roztok soli vykazující nejvyšší teplotu poskytuje nejlepší podmínky pro stabilitu proteinu a tudíž je vhodný pro použití v krystalografii [41].

Během diferenční skenovací fluorimetrie se sleduje růst fluorescence během postupného zvyšování teploty v intervalu 20°C až 95°C , tímto se získá křivka s charakteristickým průběhem. Nejdříve se protein pomalu rozbaluje, barvivo zatím neinteraguje s hydrofobními částmi proteinu. Se vzrůstající teplotou protein odhalí své hydrofóbní jádro, barvivo se na něj naváže a v důsledku tohoto se znatelně zvýší fluorescence. Dále se zvyšující se teplotou se fluorescence dostává na konstantní hladinu a mírně klesá díky precipitaci barviva a denaturaci proteinu [43] (obrázek 4. 1, str. 31).



Obrázek 4. 1: Typický průběh intenzity fluorescence pro citrát-synthasu v závislosti na teplotě v přítomnosti SYPRO orange; UN – protein v nativním stavu, SYPRO orange neinteraguje, FO – protein se rozbaluje, SYPRO interaguje s hydrofobním jádrem proteinu, DEN – protein v denaturovaném stavu, převzato a upraveno z [44].

V této metodě bylo použito komerčně dostupné fluorescenční barvivo SYPRO orange dye.

4. 8. 1 Příprava vzorků na DSF

Zkoumaný protein musel být nejprve zakonzentrován na vyšší koncentraci, pro Nth1 100 – 751 na 5 mg/ml a pro Nth1 153 – 751 na 5,58 mg/ml. Zásobní roztok fluorescenčního barviva SYPRO orange (1000x ředěné H₂O) byl dle návodu výrobce ředěn v poměru 1:24 pufrům na gelovou permeační chromatografii (tabulka 4. 17, str. 27). Do každé jamky bylo přidáno 10,5 μ l destilované vody, 12,5 μ l zkoumaného pufru/ roztoku soli, 1 μ l zředěného SYPRO orange a 1 μ l proteinu. Celkový objem byl 25 μ l. Finální koncentrace proteinů v reakci byla následující: 0, 2 mg/ml (konstrukt Nth1 100 – 751); 0, 22 mg/ml (konstrukt Nth1 153 – 751).

4. 8. 2 Průběh DSF

Destička s mikrojankami byla přelepena fólií pro zachování čistoty vzorků a centrifugována po 2 min při 1250 rpm. Dále byla destička umístěna do Light cycleru 480 II a pro experiment byl použit program Light cycler 480 II software release 1.5.0. Vzorky byly podrobeny teplotnímu gradientu 20 °C až 95 °C a v průběhu zvyšování teploty byla měřena fluorescence.

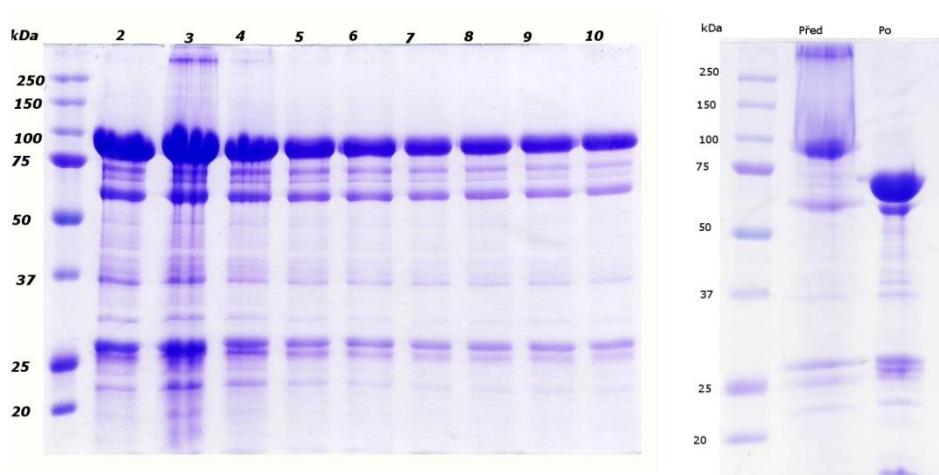
5 Výsledky

5. 1 Purifikace proteinu Nth1 100 – 751

Exprese Nth1 100 – 751 pomocí IPTG byla provedena z 6 l LB média. K purifikaci byly použity niklová chelatační chromatografie, dialýza a gelová permeační chromatografie. Pro diferenční skenovací fluorimetrii bylo zapotřebí získat protein v dostatečném množství a čistotě, proto po každém purifikačním kroku byla provedena SDS – PAGE s použitím 12 % gelu. Jako standard molekulových vah bylo vždy použito 10 μ l Precision Plus Protein Standards (BioRad), obsahující proteiny o molekulové hmotnosti 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 a 10 kDa.

5. 1. 1 Výsledky niklové chelatační chromatografie a štípání TEV

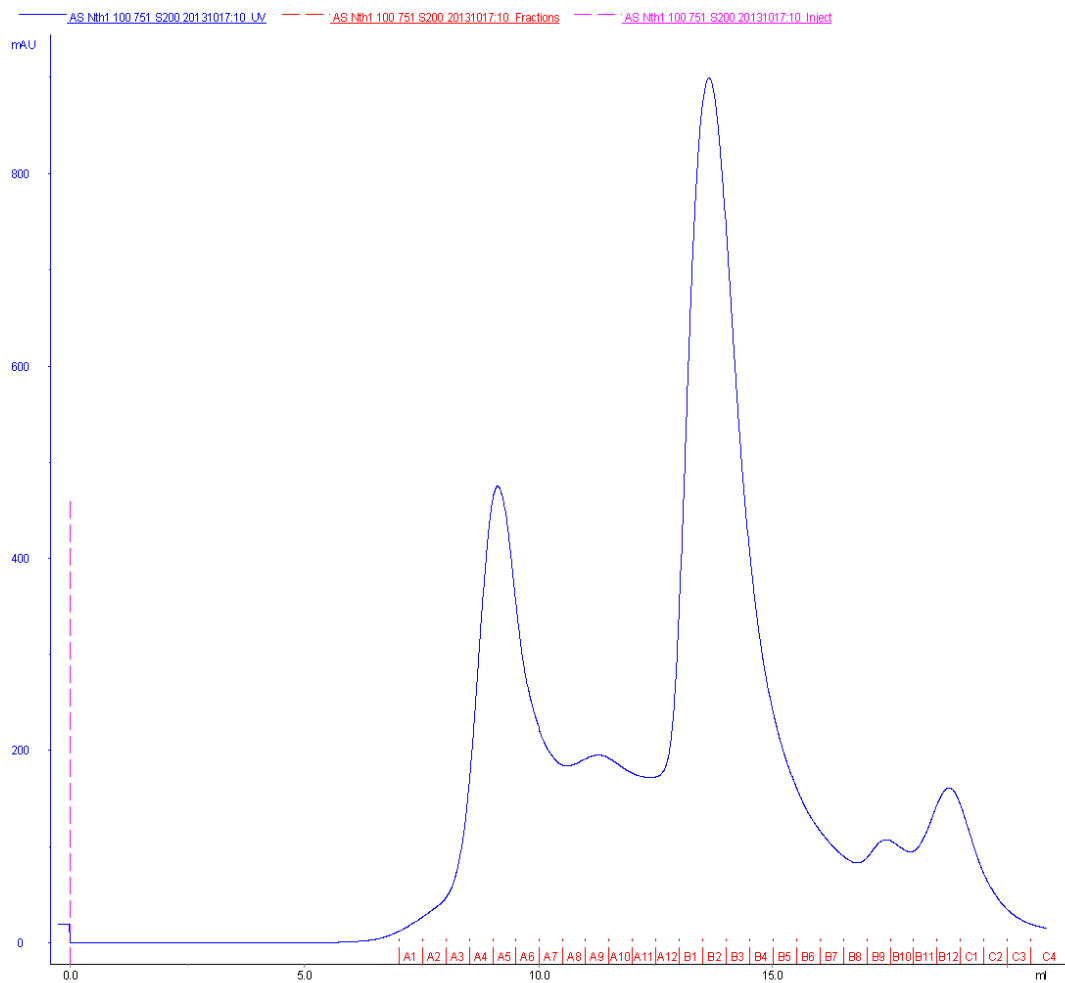
Díky histidinové kotvě, jejíž účel v purifikaci byl popsán výše, se podařilo proteiny Nth1 100 – 751 oddělit od ostatních součástí roztoku po sonikaci (obrázek 5. 1).



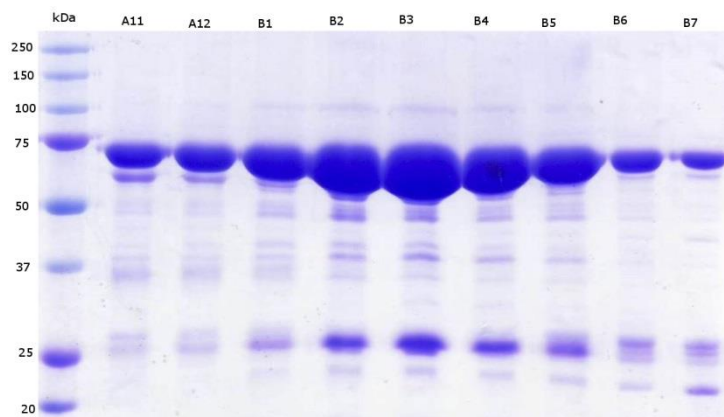
Obrázek 5. 1: Vlevo: 12 % (v/v) polyakrylamidové gely z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (první sloupec), dále frakce 2 – 10 z niklové chelatační chromatografie, které obsahovaly Nth1 100 – 751. Vpravo: 12 % (v/v) polyakrylamidové gely z SDS-PAGE obsahující standard molekulových vah (první sloupec), dále protein Nth1 100 – 751 před štípáním TEV proteasou a po štípání TEV proteasou.

5. 1. 2 Výsledky gelové permeační chromatografie

Během eluce při gelové permeační chromatografii (obrázek 5. 2, str. 33) byly jímány frakce po 0,5 ml do mikrozkuavek. Z frakcí A11 až B7 byly odebrány vzorky pro SDS – PAGE. Po vizualizaci gelu (obrázek 5. 3, str. 33) byly sloučeny již zmíněné frakce, které obsahovaly čistý protein ($M_r = 75$ kDa).



Obrázek 5. 2: Gelová permeační chromatografie, modrá křivka znázorňuje absorbanci. Na ose x je vyneseno eluční objem, na ose y absorbance při naměřené vlnové délce 280 nm. Mobilní fázi tvořil přefiltrovaný Pufr pro gelovou permeační chromatografii (tabulka 4. 17, str. 27). Rychlost průtoku byla 0,5 ml/min. Frakce A11 až B7 obsahují Nth1 100 – 751.



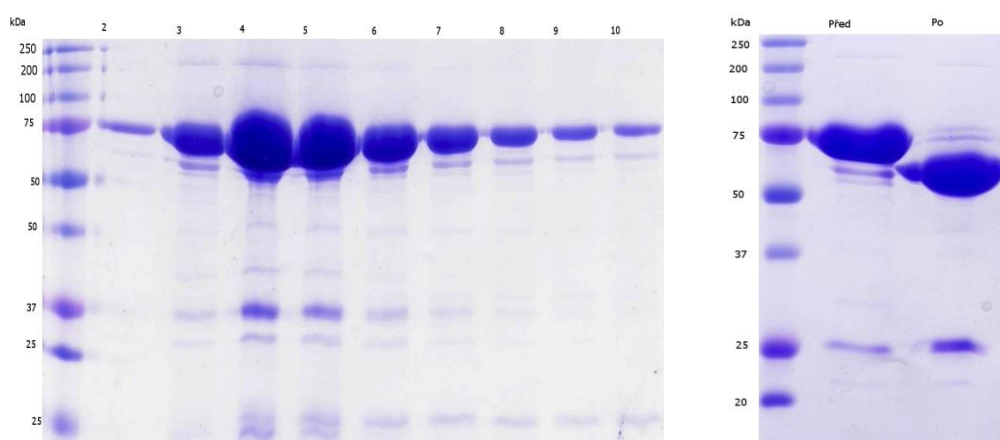
Obrázek 5. 3: 12 % (v/v) polyakrylamidový gel zobrazuje standard molekulových vah a frakce A12 – B7 obsahující Nth1 100 – 751.

Po gelové permeační chromatografii byla změřena optická densita při 10 násobném zředění. Molární absorpční koeficient Nth1 100 – 751 je $124110 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, koncentrace byla $7,2 \text{ } \mu\text{M}$. Celkový výtěžek proteinu z 6 l LB média 5,184 mg Nth1 100 - 751.

5. 2 Purifikace proteinu Nth1 153 – 751

5. 2. 1 Výsledky niklové chelatační chromatografie a štípání TEV

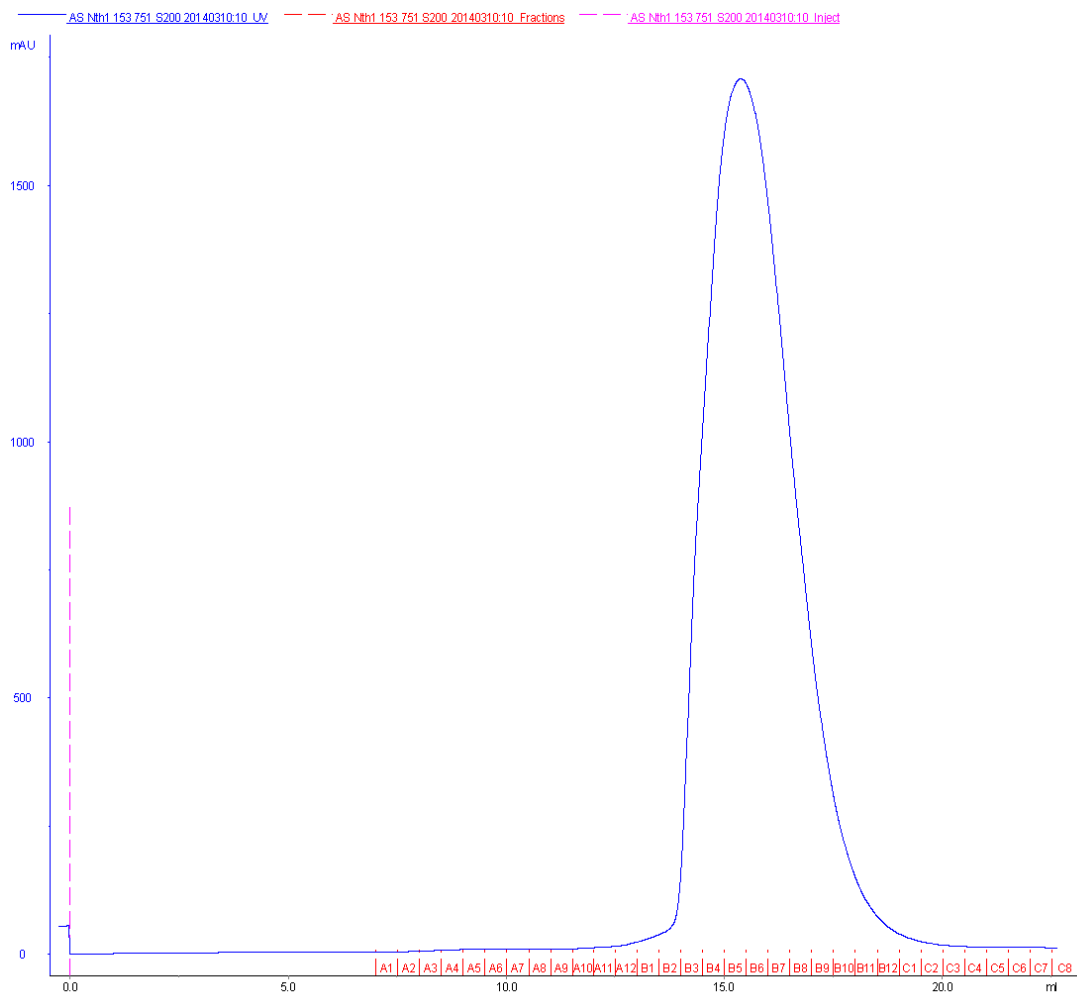
Expres Nth1 153 – 751 pomocí IPTG byla provedena z 6 l LB média. Postup purifikace a ověření čistoty proteinů po jednotlivých purifikačních krocích byly stejné jako v případě Nth1 153 – 751 (obrázek 5. 4).



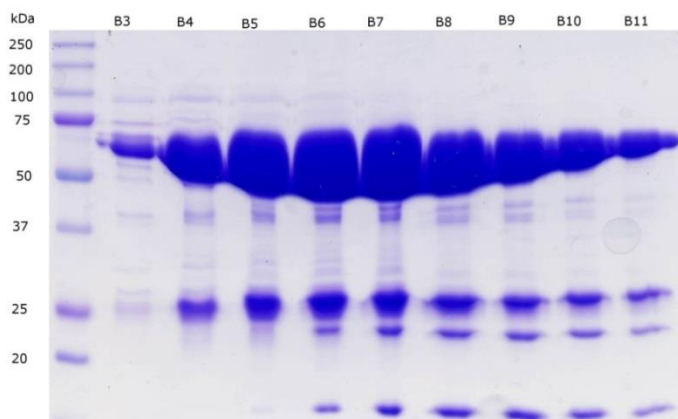
Obrázek 5. 4: Vlevo: 12 % (v/v) polyakrylamidové gely z SDS - PAGE obsahující standard molekulových vah (první sloupec), dále frakce číslo 2 – 10 z niklové chelatační chromatografie, které obsahovaly protein Nth1 153 – 751. Vpravo: 12 % (v/v) polyakrylamidové gely z SDS – PAGE obsahující standard molekulových vah (první sloupec), dále protein Nth1 153 – 751 před štípáním TEV proteasou a po štípání TEV proteasou.

5. 2. 1 Výsledky gelové permeační chromatografie

Během eluce při gelové permeační chromatografii (obrázek 5. 5, str. 35) byly jímány frakce po 0,5 ml do mikrozkušavek. Z frakcí A11 až B7 byly odebrány vzorky pro SDS – PAGE. Po vizualizaci gelu (obrázek 5. 6, str. 35) byly sloučeny již zmíněné frakce, které obsahovaly čistý protein ($M_r = 69 \text{ kDa}$).



Obrázek 5. 5: Gelová permeační chromatografie, modrá křivka znázorňuje absorbanci. Na ose x je vynesena eluční objem, na ose y absorbance při naměřené vlnové délce 280 nm. Mobilní fázi tvořil přefiltrovaný Pufr pro gelovou permeační chromatografii (tabulka 4. 17, str. 27), rychlost průtoku byla 0,5 ml/min. Frakce A11 až B7 obsahují Nth1 153 – 751.

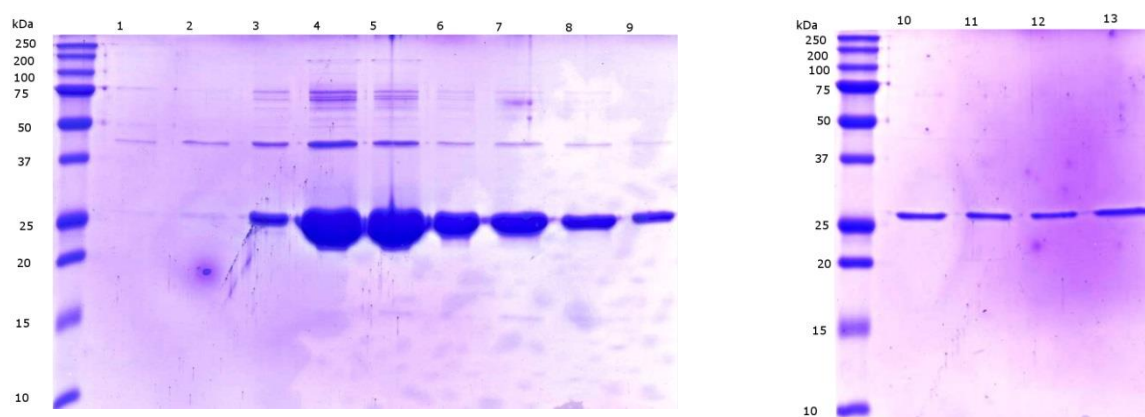


Obr. 5. 6: 12 % (v/v) polyakrylamidový gel zobrazuje standard molekulových vah a frakce B3 – B11 obsahující Nth1 153 – 751.

Po gelové permeační chromatografii byla změřena optická densita při 10 násobném zředění. Molární absorpční koeficient Nth1 153 – 751 je $118150 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, koncentrace byla $45,2 \text{ } \mu\text{M}$. Celkový výtěžek proteinu z 3 l LB média 3,17 mg Nth1 153 – 751.

5.3 Výsledky purifikace TEV proteasy

TEV proteasa byla exprimována pomocí IPTG v 1 l LB média, k purifikaci byla použita niklová chelatační chromatografie. Po inkubaci s lysozymem se sonikát přenesl na kolonu, která byla promyta 250 ml 10 % pufru F. Pro kontrolu čistoty TEV proteasy byla provedena SDS – PAGE (obrázek 5. 7).



Obr. 5. 7: 12 % (v/v) polyakrylamidový gel zobrazuje standard molekulových vah a frakce 1-10 obsahující TEV proteasu.

Na základě výsledků SDS - PAGE byly sloučeny frakce 3 – 13, obsahující TEV proteasu ($M_r = 27 \text{ kDa}$) a dialyzovány přes noc v dialyzačním pufru. Po dialýze byla změřena optická densita roztoku a vhodným ředěním pufrům na dialýzu (4. 18, str. 29) upravena přibližně na hodnotu 1,04, která odpovídá koncentraci $0,838 \text{ mg/ml}$.

5.4 Příprava pufrů pro DSF

Pro diferenční skenovací fluorimetrii bylo potřeba připravit dvě série zásobních 200 mM pufrů či roztoků solí o různém složení a pH. Složení první série pufrů je uvedeno v tabulce 5. 1, str. 37, druhá série pufrů obsahuje navíc 400 mM NaCl . Dále byly měřeny tyto varianty: destilovaná voda s přidavkem a bez přidavku 400 mM NaCl a pufr pro gelovou permeační chromatografii (tabulka 4. 17, str. 27).

Spočtené navážky a detaily přípravy pufrů jsou uvedeny v Příloze B, str. 54.

Tabulka 5. 3

Pufr	pH		
	octan sodný	4,5	5,0
dihydrát citrátu trisodného	4,7		
dihydrogenfosforečnan draselný	5,0	6,0	7,0
dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného	5,5	6,5	7,5
MES	5,8	6,2	6,5
HEPES	7,0	8,0	
octan amonný	7,3		
Tris	7,5	8,0	8,5
Imidazol	8,0		
Bicin	8,0	9,0	
původní pufr	7,5		

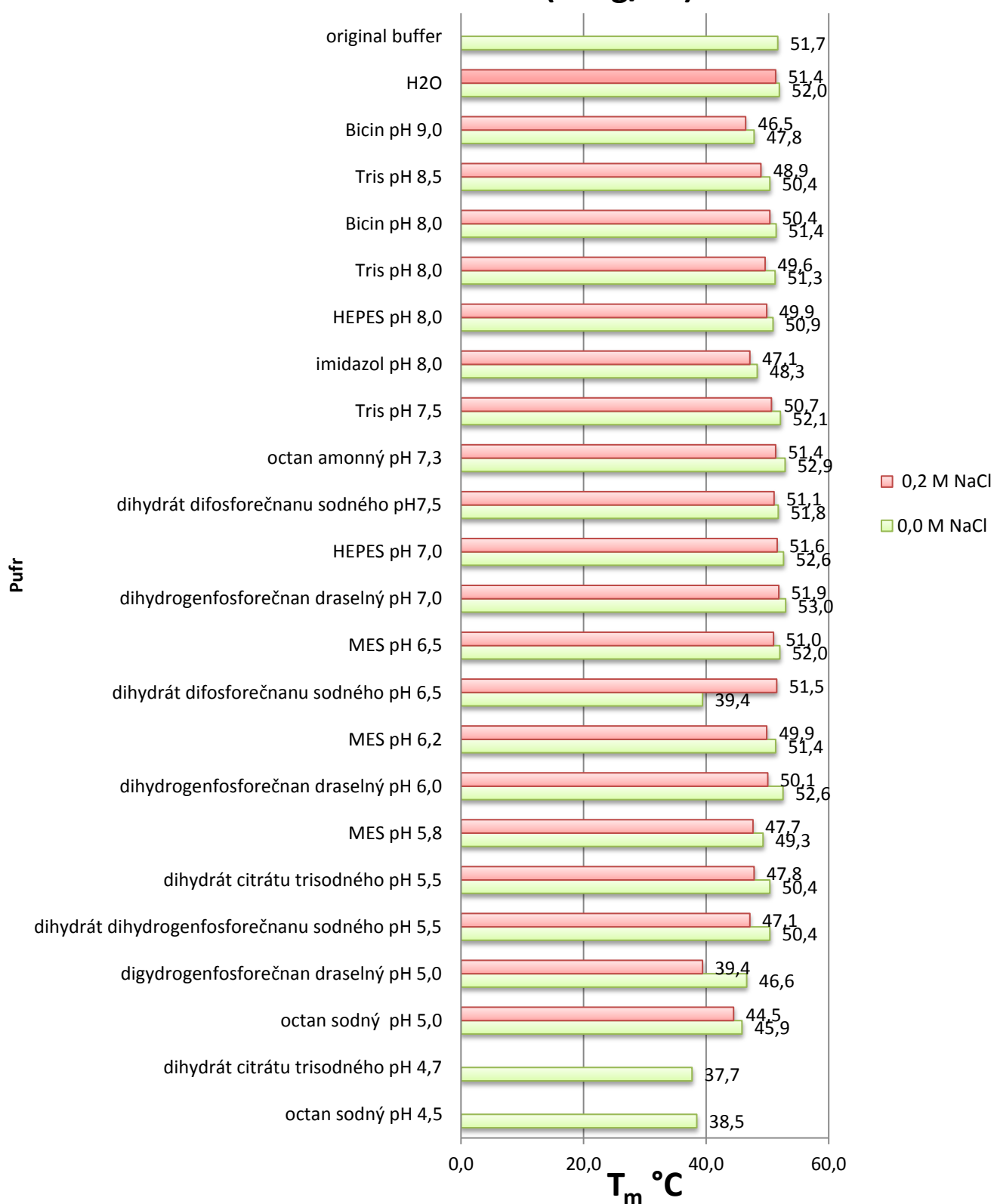
Původní pufr má stejné složení jako pufr pro gelovou permeační chromatografii (tabulka 4. 17, str. 27)

5. 5 Měření DSF Nth1 100 – 751 a Nth1 153 – 751

Stabilita proteinu byla testována ve škále pufrů a roztoku solí s rozsahem hodnot pH 4,5 až 9,0. Současně byl testován vliv chloridu sodného na stabilitu proteinu. Po změření závislosti fluorescence na teplotě byly získané křivky derivovány v inflexních bodech a hodnoty byly odečítány ve vzniklých minimech.

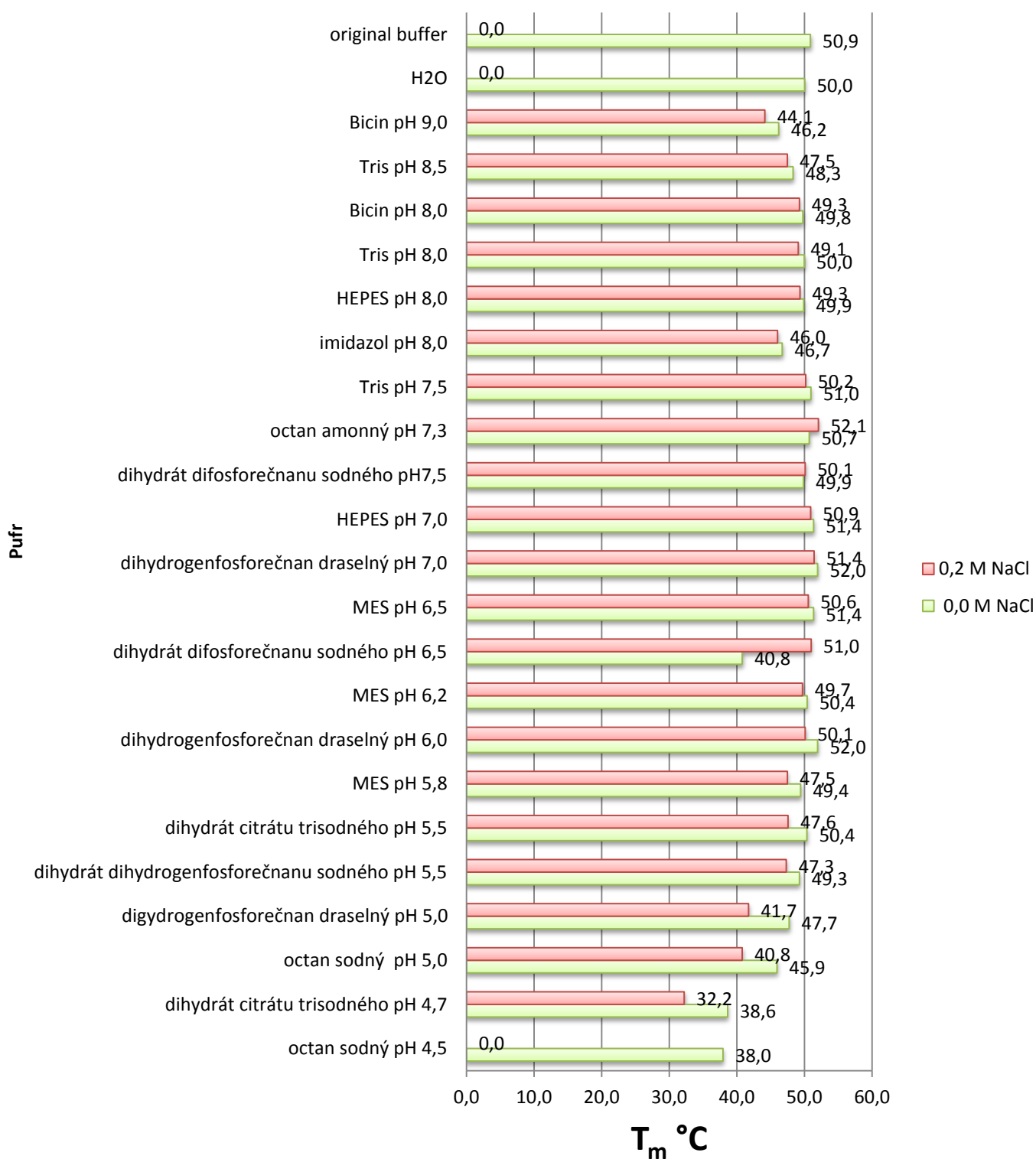
Výsledky diferenční skenovací fluorimetrie pro Nth1 100 – 751 jsou shrnuty na obrázku 5. 8, str. 39. Výsledky diferenční skenovací fluorimetrie pro Nth1 153 – 751 jsou shrnuty na obrázku 5. 9, str. 40.

Nth1 100 - 751 (5 mg/ml)



Obrázek 5. 8.: Výsledky diferenční skenovací fluorimetrie pro Nth1 100 – 751, T_m značí teplotu denaturace. Finální koncentrace pufrů byla 100 mM, finální koncentrace proteinu 0, 2 mg/ml.

Nth1 153 - 751 (5,58 mg/ml)



Obrázek 5. 9: Výsledky diferenční skenovací fluorimetrie pro Nth1 153 – 751, T_m značí teplotu denaturace. Finální koncentrace pufrů byla 100 mM, finální koncentrace proteinu 0, 22 mg/ml.

Nejvyšší T_m (53,0 °C) pro Nth1 100 – 751 byl dihydrogenfosforečnan draselný, nejvyšší T_m (52,1 °C) pro Nth1 100 – 751 byl octan amonný s chloridem sodným.

5. 6 Gelová permeační chromatografie pro ověření výsledků DSF

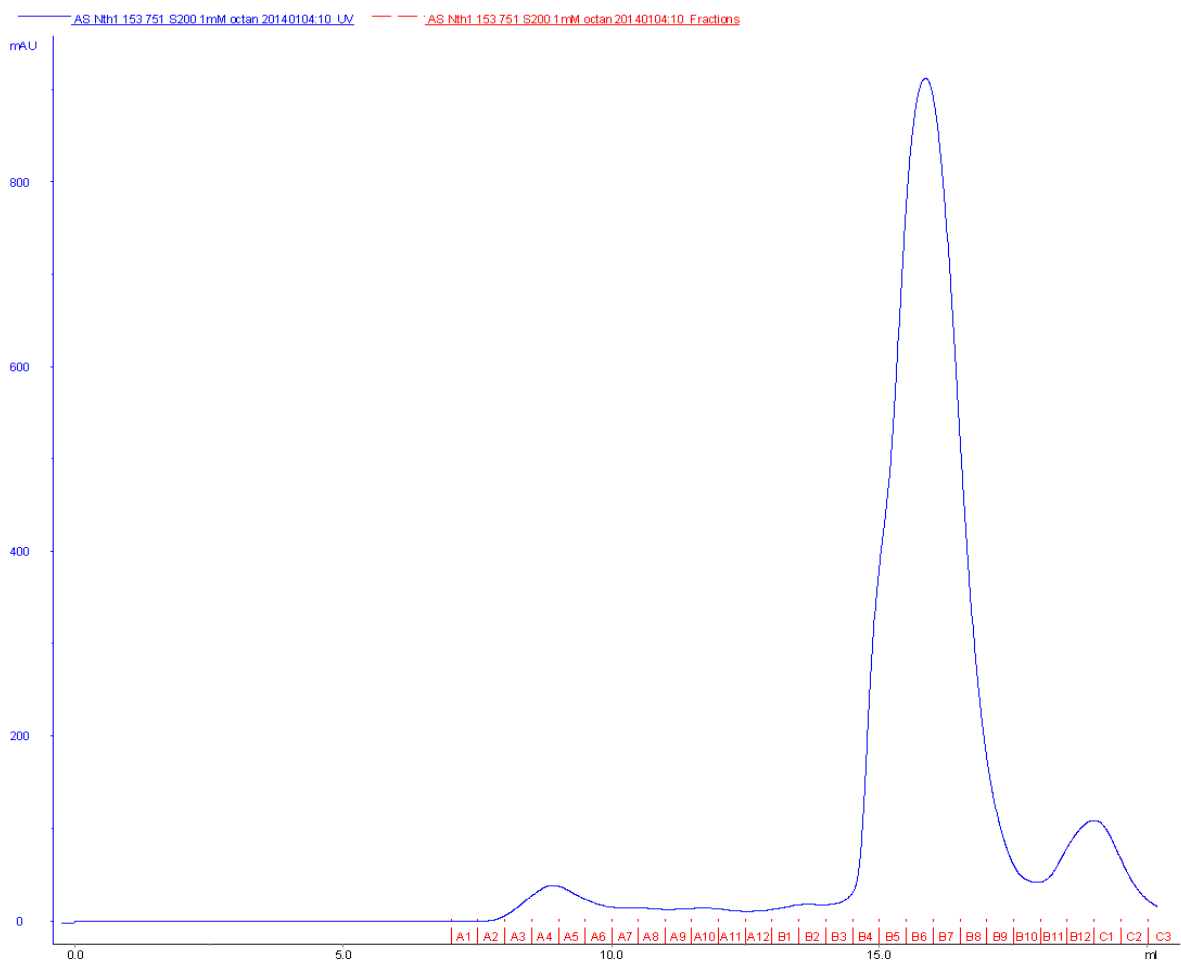
Pro ověření získaných experimentálních dat z diferenční skenovací fluorimetrie Nth1 153 – 751 byl znovu proveden finální purifikační krok – gelová permeační chromatografie s použitím roztoku solí, který při diferenční skenovací fluorimetrii vykazoval nejvyšší teplotu tání – octan amonný v kombinaci s chloridem sodným. Do roztoku těchto solí bylo přidáno navíc DTT, které brání oxidaci proteinu a tím zvyšuje jeho stabilitu. Do roztoku se nepřidával glycerol.

5. 6. 1 Výsledky gelové permeační chromatografie – 1 mM octan amonný

Složení roztoku solí, který byl použit jako mobilní fáze v gelové permeační chromatografii, je uvedeno v tabulce 5. 2. Separace byla provedena na koloně Superdex™ 200, frakce byly jímány do mikrozkuvek. Chromatogram získaný z této purifikační metody je na obrázku 5. 10, str. 42. Eluční frakce B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10 a B11 obsahují Nth1 153 – 751.

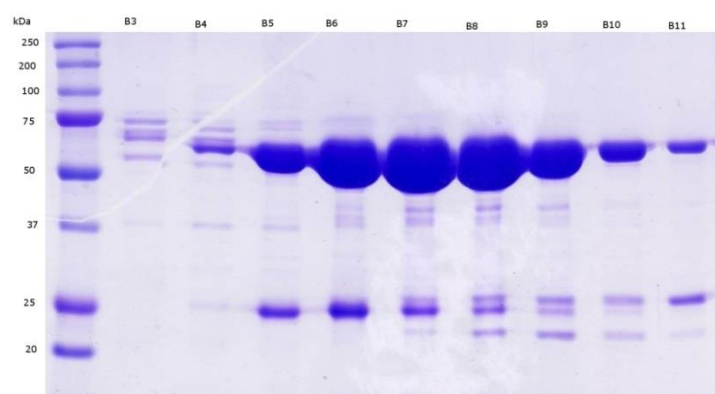
Tabulka 5. 2

Pufr gelovou permeační chromatografií 1	1000 ml
octan amonný; výsledná koncentrace 1 mM	0,077g
NaCl; výsledná koncentrace 150 mM	8,76 g
DTT; výsledná koncentrace 5 mM	0,771 g
pH upraveno na 7,3 pomocí 1 M NaOH	



Obrázek 5. 10: Gelová permeační chromatografie, modrá křivka znázorňuje absorbanci. Na ose x je vyneseno eluční objem, na ose y absorbance při naměřené vlnové délce 280 nm. Mobilní fázi tvořil přefiltrovaný pufr pro gelovou permeační chromatografii (tabulka 5. 2, strana 41), rychlost průtoku byla 0,5 ml/min. Frakce B3 – B9 obsahují Nth1 153 – 751.

Čistota získaných frakcí z gelové permeační chromatografie byla ověřena pomocí SDS – PAGE:



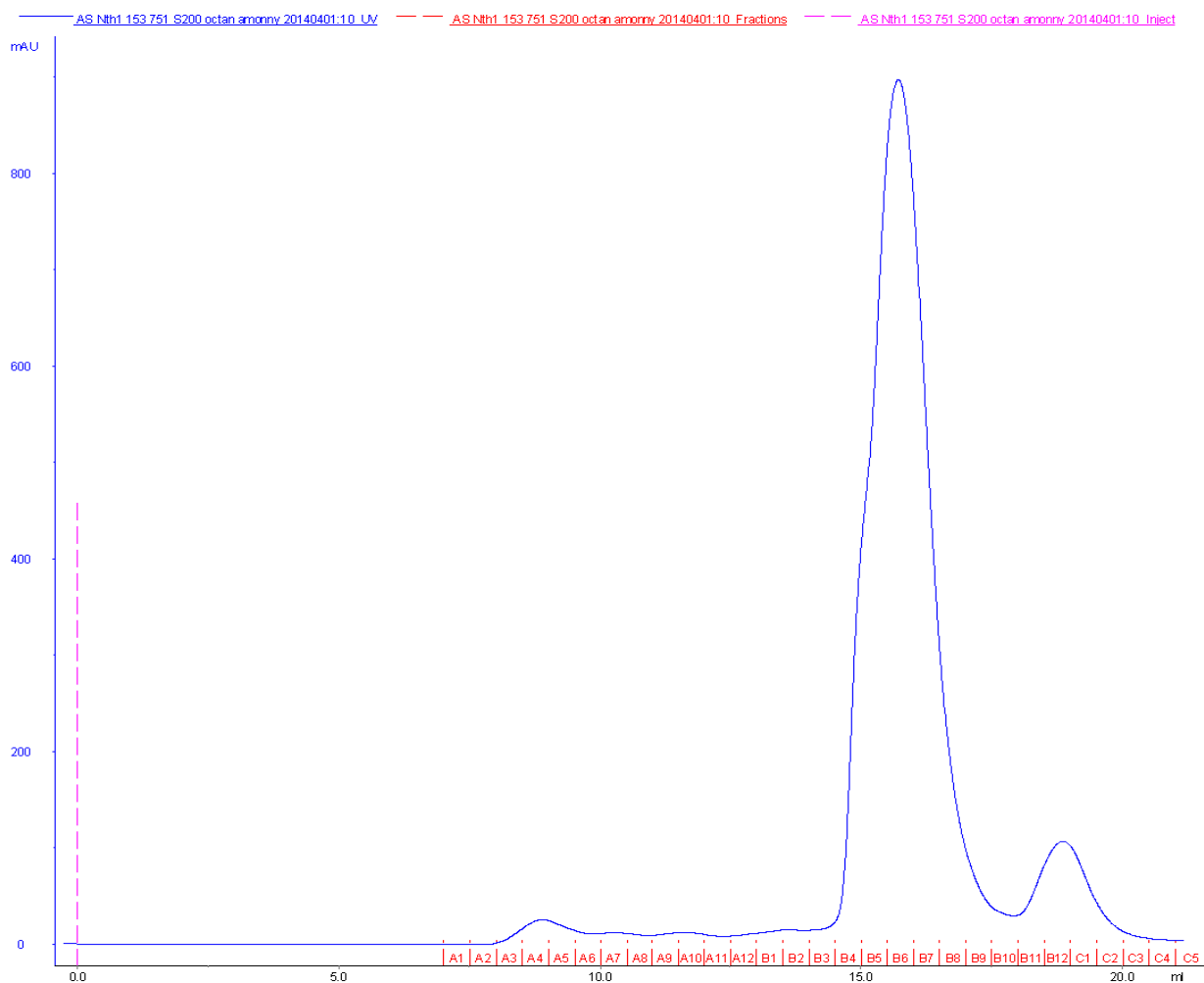
Obrázek 5. 11: 12 % (v/v) polyakrylamidový gel zobrazuje standard molekulových vah a frakce B3 – B11 obsahující protein Nth1 153 – 751.

5. 6. 2 Výsledky gelové permeační chromatografie – 20 mM octan amonný

Složení roztoku solí, který byl použit jako mobilní fáze v gelové permeační chromatografii, je uvedeno v tabulce 5. 4. Separace byla provedena na koloně Superdex™ 200, frakce byly jímány do mikroskopických vial. Chromatogram získaný z této purifikační metody je na obrázku 5. 12, str. 44. Eluční frakce B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10 a B11 obsahují Nth1 153 – 751 (obrázek 5. 13, str. 44).

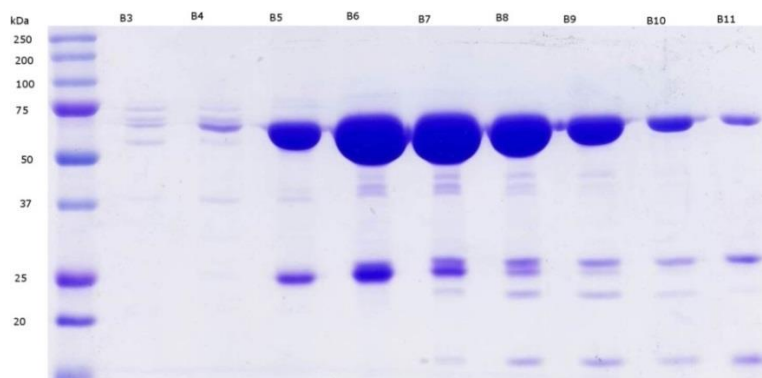
Tabulka 5. 4

Pufr gelovou permeační chromatografií 2	1000ml
Octan amonný; výsledná koncentrace 20 mM	1,54 g
NaCl; výsledná koncentrace 150 mM	8,76 g
DTT; výsledná koncentrace 5 mM	0,771 g
pH upraveno na 7,3 pomocí 1 M NaOH	



Obrázek 5. 12: Gelová permeační chromatografie, modrá křivka znázorňuje absorbanci. Na ose x je vynesena eluční objem a pojmenované frakce, na ose y absorbance při naměřené vlnové délce 280 nm. Mobilní fázi tvořil přefiltrovaný pufr pro gelovou permeační chromatografii (tabulka 5. 3, strana 43), rychlost průtoku byla 0,5 ml/min.

Čistota získaných frakcí z gelové permeační chromatografie byla ověřena pomocí SDS – PAGE:



Obr. 5. 13: 12 % (v/v) polyakrylamidový gel zobrazuje standard molekulových vah a frakce B3 – B11 obsahující protein Nth1 153 – 751.

6 Diskuze

Trehalasy jsou vysoce konzervované enzymy, které štěpí neredukující disacharid trehalosu na dvě glukosy, v mnoha organismech se tato hydrolyza ukázala jako životně důležitá [3]. Neutrální trehalasa Nth1 je plně aktivovaná pomocí fosforylace proteinkinasou cAMP, vápníkovými kationty a kvasničnými proteiny 14-3-3 (nazývanými Bmh) [21]. Pro získání představy o struktuře Nth1 by bylo žádoucí získat krystal proteinu k další analýze. Tato bakalářská práce je součástí projektu, který se zaměřuje na krystalizaci enzymu. Příprava krystalu proteinu obecně vyžaduje protein v co nejčistší formě a pufr (případný roztok soli) s co nejmenším množstvím příměsí, které mají negativní vliv na čistotu a kvalitu krystalu. Výběr vhodného pufru je tedy klíčovým faktorem pro krystalizaci daného proteinu.

Tato bakalářská práce se zabývá expresí a purifikací dvou různých konstruktů kvasničné neutrální trehalasy. Oba konstrukty Nth1 obsahovaly trehalosovou doménu klíčovou pro funkci tohoto enzymu a delší z konstruktů (sekvence 100 – 751) obsahoval navíc i vápníkovou doménu. Jedním z cílů této práce byla tedy purifikace obou konstruktů katalytické domény Nth1 podle již zavedeného purifikačního protokolu, který zahrnoval dva purifikační stupně: niklovou chelatační chromatografii s odštěpením histidinové kotvy TEV proteasou a gelovou chelatační chromatografií. Tímto způsobem byly získány oba konstrukty v dostatečné kvalitě i množství pro DSF, jak bylo potvrzeno použitím SDS - PAGE. Byla provedena též exprese a jednostupňová purifikace TEV proteasy, která byla následně použita k odštěpení histidinové kotvy fúzního proteinu po prvním purifikačním kroku (niklové chelatační chromatografii).

Následně byla provedena diferenční skenovací fluorimetrie, která určila optimální složení pufru (případně roztoku soli) pro krystalizaci konstruktů. Teplota tání Nth1 153 – 751 byla nejvyšší v roztoku octanu amonného a chloridu sodného, byly tedy připraveny dvě varianty roztoků soli. Výsledky DSF byly ověřeny změnou konečného purifikačního kroku, gelové permeační chromatografie, u kratšího z konstruktů (Nth1 153 – 751). Finální purifikace byla tudíž provedena ve dvou různých roztocích soli. Jedna kontrolní purifikace proběhla v 20 mM octanu amonném pH 7,3 s přidavkem 150 mM NaCl a druhá kontrolní purifikace proběhla v 1 mM octanu amonném pH 7,3 a 150 mM NaCl. Z obou chromatogramů a gelů je patrné, že ve zvoleném roztoku soli je protein Nth1 153 – 751

stabilní a netvoří se agregáty. Pro krystalografii bude tudíž vhodná varianta s nižší koncentrací octanu amonného (1 mM).

7 Závěr

- Dva různé konstrukty katalytické domény neutrální trehalasy Nth1 (sekvence 100 – 751; sekvence 153 – 751) byly úspěšně exprimovány a purifikovány s dostatečným výtěžkem.
- Byla provedena exprese a purifikace TEV proteasy, celkem bylo získáno 18,4 mg z 1 l LB média.
- Byla připravena série pufrů či roztoků solí o různém pH a iontové síle a následně byla provedena diferenční skenovací fluorimetrie. Tím byla určena teplota denaturace T_m obou konstruktů v připravené sérii pufrů. Pro Nth1 153 – 751 je nejvhodnější ze zkoumaných roztoků octan amonný pH 7,3 s 200 mM chloridem sodným, pro Nth1 100 – 751 je nejvhodnější dihydrogenfosforečnan draselný pH 7,0.
- Byl ověřen výsledek diferenční skenovací fluorimetrie pro Nth1 153 – 751 změnou složení pufru pro gelovou permeační chromatografií. Původní pufr TRIS HCl pH 7,5 vyměněn za octan amonný pH 7,3 o dvou různých koncentracích (20 mM a 1 mM) s přidavkem 150 mM NaCl. Protein Nth1 153 – 751 se ukázal být v obou těchto roztocích stabilní a tudíž jsou oba dva roztoky solí octanu amonného a chloridu sodného vhodné pro finální purifikaci před krystalografií.

8 Seznam použité literatury

- [1] J. H. Crowe, L. M. Crowe, and D. Chapman, "Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose," *Science*, vol. 223, no. 4637, pp. 701–703, Feb. 1984.
- [2] D. Veisova, E. Macakova, L. Rezabkova, M. Sulc, P. Vacha, H. Sychrova, T. Obsil, and V. Obsilova, "Role of individual phosphorylation sites for the 14-3-3-protein-dependent activation of yeast neutral trehalase Nth1," *Biochem. J.*, vol. 443, no. 3, pp. 663–670, May 2012.
- [3] A. D. Elbein, "New insights on trehalose: a multifunctional molecule," *Glycobiology*, vol. 13, no. 4, p. 17R–27, Apr. 2003.
- [4] J. V. Ricker, N. M. Tsvetkova, W. F. Wolkers, C. Leidy, F. Tablin, M. Longo, and J. H. Crowe, "Trehalose Maintains Phase Separation in an Air-Dried Binary Lipid Mixture," *Biophys. J.*, vol. 84, no. 5, pp. 3045–3051, May 2003.
- [5] A. D. Elbein, "The metabolism of alpha,alpha-trehalose," *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, vol. 30, pp. 227–256, 1974.
- [6] M. Kopp, H. Müller, and H. Holzer, "Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 7, pp. 4766–4774, Mar. 1993.
- [7] S. Wera, E. De Schrijver, I. Geyskens, S. Nwaka, and J. M. Thevelein, "Opposite roles of trehalase activity in heat-shock recovery and heat-shock survival in *Saccharomyces cerevisiae*," *Biochem. J.*, vol. 343 Pt 3, pp. 621–626, Nov. 1999.
- [8] M. K. Kadowaki, M. de Lourdes, T. M. Polizeli, H. F. Terenzi, and J. A. Jorge, "Characterization of trehalase activities from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1291, no. 3, pp. 199–205, Dec. 1996.
- [9] A. K. B. Lúcio-Eterovic, J. A. Jorge, M. de L. T. M. Polizeli, and H. F. Terenzi, "Biochemical characterisation of the trehalase of thermophilic fungi: An enzyme with mixed properties of neutral and acid trehalase," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1723, no. 1–3, pp. 201–207, May 2005.
- [10] J. A. Jorge, M. de L. T. . Polizeli, J. M. Thevelein, and H. F. Terenzi, "Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 154, no. 2, pp. 165–171, Jan. 2006.
- [11] S. Nwaka and H. Holzer, "Molecular Biology of Trehalose and the Trehalases in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*," in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, vol. 58, Elsevier, 1997, pp. 197–237.
- [12] A. Franco, T. Soto, J. Vicente-Soler, V. Paredes, M. Madrid, M. Gacto, and J. Cansado, "A role for calcium in the regulation of neutral trehalase activity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*," *Biochem. J.*, vol. 376, no. Pt 1, pp. 209–217, Nov. 2003.
- [13] C. H. Ortiz, J. C. Maia, M. N. Tenan, G. R. Braz-Prado, J. R. Mattoon, and A. D. Panek, "Regulation of yeast trehalase by a monocyclic, cyclic AMP-dependent phosphorylation-dephosphorylation cascade system," *J. Bacteriol.*, vol. 153, no. 2, pp. 644–651, Feb. 1983.
- [14] I. Uno, K. Matsumoto, K. Adachi, and T. Ishikawa, "Genetic and biochemical evidence that trehalase is a substrate of cAMP-dependent protein kinase in yeast," *J. Biol. Chem.*, vol. 258, no. 18, pp. 10867–10872, Sep. 1983.

- [15] H. H. Rashidi, M. Bauer, J. Patterson, and D. W. Smith, "Sequence motifs determine structure and Ca⁺⁺-binding by EF-hand proteins," *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 1, no. 1, pp. 175–182, Aug. 1999.
- [16] A. Lewit-Bentley and S. Réty, "EF-hand calcium-binding proteins," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 10, no. 6, pp. 637–643, Dec. 2000.
- [17] JOHAN M. THEVELEIN, "Regulation of Trehalose Mobilization in Fungi," in *MICROBIOLOGICAL REWIEWS*, vol. 84, pp. 42–59.
- [18] S. Nwaka and H. Holzer, "Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, vol. 58, pp. 197–237, 1998.
- [19] H. App and H. Holzer, "Purification and characterization of neutral trehalase from the yeast ABYS1 mutant," *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 29, pp. 17583–17588, Oct. 1989.
- [20] T. Toda, I. Uno, T. Ishikawa, S. Powers, T. Kataoka, D. Broek, S. Cameron, J. Broach, K. Matsumoto, and M. Wigler, "In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase," *Cell*, vol. 40, no. 1, pp. 27–36, Jan. 1985.
- [21] M. Kopecka, D. Kosek, Z. Kukacka, L. Rezabkova, P. Man, P. Novak, T. Obsil, and V. Obsilova, "Role of the EF-hand-like Motif in the 14-3-3 Protein-mediated Activation of Yeast Neutral Trehalase Nth1," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 20, pp. 13948–13961, May 2014.
- [22] M. B. Perez VJ, "Specific acid proteins in the nervous system," in *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*, vol. 1967, Prentice Hall, New Jersey, Englewood Cliffs, pp. 343–359.
- [23] A. Aitken, "14-3-3 proteins: a historic overview," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 16, no. 3, pp. 162–172, Jun. 2006.
- [24] H. Hermeking and A. Benzinger, "14-3-3 proteins in cell cycle regulation," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 16, no. 3, pp. 183–192, Jun. 2006.
- [25] H. Fu, R. R. Subramanian, and S. C. Masters, "14-3-3 proteins: structure, function, and regulation," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 40, pp. 617–647, 2000.
- [26] M. K. Dougherty, "Unlocking the code of 14-3-3," *J. Cell Sci.*, vol. 117, no. 10, pp. 1875–1884, Mar. 2004.
- [27] D. H. Jones, S. Ley, and A. Aitken, "Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins," *FEBS Lett.*, vol. 368, no. 1, pp. 55–58, Jul. 1995.
- [28] M. B. Yaffe, K. Rittinger, S. Volinia, P. R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S. J. Gamblin, S. J. Smerdon, and L. C. Cantley, "The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity," *Cell*, vol. 91, no. 7, pp. 961–971, Dec. 1997.
- [29] M. Chaudhri, M. Scarabel, and A. Aitken, "Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 300, no. 3, pp. 679–685, Jan. 2003.
- [30] B. Xiao, S. J. Smerdon, D. H. Jones, G. G. Dodson, Y. Soneji, A. Aitken, and S. J. Gamblin, "Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways," *Nature*, vol. 376, no. 6536, pp. 188–191, Jul. 1995.
- [31] G. Tzivion, Z. Luo, and J. Avruch, "A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity," *Nature*, vol. 394, no. 6688, pp. 88–92, Jul. 1998.
- [32] E. W. Wilker, R. A. Grant, S. C. Artim, and M. B. Yaffe, "A Structural Basis for 14-3-3 Functional Specificity," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 19, pp. 18891–18898, May 2005.

- [33] V. Obsilová, J. Silhan, E. Boura, J. Teisinger, and T. Obsil, “14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators,” *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.*, vol. 57 Suppl 3, pp. S11–21, 2008.
- [34] A. J. Muslin, J. W. Tanner, P. M. Allen, and A. S. Shaw, “Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine,” *Cell*, vol. 84, no. 6, pp. 889–897, Mar. 1996.
- [35] G. P. van Heusden, T. J. Wenzel, E. L. Lagendijk, H. Y. de Steensma, and J. A. van den Berg, “Characterization of the yeast BMH1 gene encoding a putative protein homologous to mammalian protein kinase II activators and protein kinase C inhibitors,” *FEBS Lett.*, vol. 302, no. 2, pp. 145–150, May 1992.
- [36] S. Panni, C. Landgraf, R. Volkmer-Engert, G. Cesareni, and L. Castagnoli, “Role of 14-3-3 proteins in the regulation of neutral trehalase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” *FEMS Yeast Res.*, vol. 8, no. 1, pp. 53–63, Feb. 2008.
- [37] V. Obsilova, M. Kopecka, D. Kosek, M. Kacirova, S. Kylarova, L. Rezaczkova, and T. Obsil, “Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through conformational modulation,” *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.*, vol. 63 Suppl 1, pp. S155–164, 2014.
- [38] B. Rost, “Review: protein secondary structure prediction continues to rise,” *J. Struct. Biol.*, vol. 134, no. 2–3, pp. 204–218, Jun. 2001.
- [39] L. J. McGuffin, K. Bryson, and D. T. Jones, “The PSIPRED protein structure prediction server,” *Bioinforma. Oxf. Engl.*, vol. 16, no. 4, pp. 404–405, Apr. 2000.
- [40] C. A. Orengo, J. E. Bray, T. Hubbard, L. LoConte, and I. Sillitoe, “Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction,” *Proteins*, vol. Suppl 3, pp. 149–170, 1999.
- [41] B. W. Segelke, “Efficiency analysis of sampling protocols used in protein crystallization screening,” *J. Cryst. Growth*, vol. 232, no. 1–4, pp. 553–562, Nov. 2001.
- [42] G. Feller, “Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures,” *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 22, no. 32, p. 323101, Aug. 2010.
- [43] U. B. Ericsson, B. M. Hallberg, G. T. DeTitta, N. Dekker, and P. Nordlund, “Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies,” *Anal. Biochem.*, vol. 357, no. 2, pp. 289–298, Oct. 2006.
- [44] F. H. Niesen, H. Berglund, and M. Vedadi, “The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability,” *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 9, pp. 2212–2221, Sep. 2007.