

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Dorota Zawadová

Rekombinantní exprese a purifikace nitrilasy z *Neurospora crassa*

**Recombinant expresion and purification of nitrilase from
*Neurospora crassa***

Diplomová práce

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

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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 8.5. 2014

.....
Podpis

Abstrakt

Nitrilasy jsou enzymy schopné transformovat toxické nitrilové sloučeniny na příslušné karboxylové kyseliny nebo amidy. Jsou proto jsou potencionálně využitelné při detoxikaci barviv, herbicidů nebo látek používaných při přípravě léčiv. Jejich dalším uplatněním může být enzymatická výroba karboxylových kyselin, u kterých je postup přípravy neenzymatickou cestou drahý nebo příliš náročný.

Náplní této diplomové práce je rekombinantní exprese a optimalizace purifikace nitrilas pocházejících z vláknité houby *Neurospora crassa*. Jako expresní systém, do kterého byla vnesena sekvence genu kódující tento enzym, byly použity buňky *E. coli* BL 21 Gold. Purifikace byla provedena v redukujícím prostředí za pomoci chromatografie na iontoměniči, chelatační chromatografie a gelové filtrace. Připravené enzymy byly charakterizovány pomocí sedimentační analýzy v analytické ultracentrifuze, dále pak byly použity pro hledání podmínek krystalizace.

Klíčová slova: nitrilasa, *Neurospora crassa*, rekombinantní exprese

Abstract

Nitrilases are enzymes able to convert toxic nitriles to corresponding carboxylic acids or amides. Thus they might be used in the detoxification of dyes, herbicides and pharmaceutical intermediates and byproducts. They can be used also for enzymatic syntheses of carboxylic acids not available by standard procedures.

The aim of this diploma thesis is a recombinant expression of nitrilases from *Neurospora crassa* and the optimization of their purification. Cells of *E. coli* (BL 21 Gold) were utilized as an expression system. The purification was performed by ion-exchange chromatography, chelation chromatography and gel filtration – all under reducing conditions. Purified enzymes were studied by sedimentation analysis in an analytical ultracentrifuge. They were also used for searching of optimal conditions for their crystallization.

Keywords: nitrilase, *Neurospora crassa*, recombinant expression

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za vedení při vypracovávání této práce a změření vzorků na AUC. Za cenné rady a nekonečnou trpělivost bych chtěla poděkovat Mgr. Janu Bláhovi. Za nasazení krystalizačních kapek bych chtěla poděkovat Mgr. Janu Bláhovi, RNDr. Jiřímu Pavlíčkovi, Ph.D. a Mgr. Jakubu Ptáčkovi. Za změření enzymové aktivity bych ráda poděkovala Ing. Anně Rinágelové. Za motivaci a podporu bych chtěla poděkovat Mgr. Zbigniewu Zawadovi. Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům za výchovu a bezmeznou podporu při studiu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým přátelům za psychickou podporu při psaní této práce.

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením grantového projektu GA ČR P504-11-0394.

Seznam zkratek

AA	akrylamid
APS	peroxodisíran amonný (z ang. <i>ammonium persulfate</i>)
BSA	hovězí sérový albumín (z ang. <i>bovine serum albumin</i>)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
DTT	dithiothreitol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z ang. <i>high performance liquid chromatography</i>)
IAA	kyselina indol-3-octová
IAN	indolacetonitril
IPTG	isopropylthiogalaktopyranosid
β-ME	beta-merkptoethanol
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
SDS	dodecylsulfát sodný (z ang. <i>sodium dodecylsulphate</i>)
TEMED	tetramethylethylendiamin
TES	N-2-aminoethansulfonová kyselina
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

Obsah

Seznam zkratk	6
1. Teoretický úvod	9
1.1. Nitrilasy	9
1.1.1. Výskyt	9
1.1.2. Superrodina nitrilas	10
1.1.3. Struktura	11
1.1.4. Reakční mechanismus	12
1.1.5. Substrátová specifita	14
1.1.6. Využití	16
1.2. <i>Neurospora crassa</i>	17
1.2.1. Charakterizace	17
1.2.2. Životní cyklus	18
2. Cíl práce	19
3. Materiál a pomůcky	20
3.1. Přístroje	20
3.2. Chemikálie	21
3.3. Markery	22
3.4. Plazmidy a buňky	22
4. Metody	23
4.1. Transformace	23
4.2. Produkce rekombinantní nitrilasy	23
4.3. SDS elektroforéza	24
4.4. Chromatografie na iontoměniči	24
4.5. Chelatační chromatografie s následným odsolením	25

4.6. Gelová filtrace	25
4.7. Stanovení koncentrace proteinů	26
4.8. Sedimentační analýza	26
4.9. Krystalizace	26
4.10. Enzymová aktivita	27
5. Výsledky	28
5.1. Rekombinantní exprese nitrilasy z <i>Neurospora crassa</i> s histidinovou kotvou na C a N konci v bakteriálním expresním systému	28
5.2. Izolace enzymů a optimalizace jejich purifikace v redukujícím prostředí	29
5.3. Srovnání purifikace nitrilas v redukujícím a neredukujícím prostředí	33
5.4. Sedimentační analýza	35
5.5. Krystalizace	37
6. Diskuse	39
7. Závěr	43
8. Použitá literatura	44

1. Teoretický úvod

1.1. Nitrilasy

1.1.1. Výskyt

Nitrilasy jsou enzymy, které katalyzují přeměnu nitrilové skupiny na příslušnou karboxylovou kyselinu za vzniku amoniaku jako vedlejšího produktu. Poprvé byly popsány na počátku 60. let, jako enzymy zodpovědné za hydrolýzu indolacetonitrilu (IAN) na indolactovou kyselinu (IAA) v ječmenových listech ¹.

Tyto enzymy se vykytují v prokaryotech i eukaryotech. Mezi prokaryota obsahující nitrilasy patří např. bakterie z rodu *Rhodococcus* nebo *Pseudomonas*, u kterých jsou zodpovědné za hydrolýzu ricininové nitrilové skupiny ².

U eukaryot byly tyto enzymy objeveny ve vláknitých houbách, kvasinkách, ale i rostlinách. Jako bohatý zdroj nitrilas se ukázaly vláknité houby z rodů: *Aspergillus*, *Fusarium* nebo *Neurospora*. Kromě přeměny IAN na IAA, byla u těchto enzymů prokázána schopnost hydrolyzovat například fenylacetonitril (látka používaná při syntéze fenobarbitalu) nebo degradovat herbicidy, což je řadí mezi enzymy se slibným průmyslovým využitím ³.

Za nitrilasy izolované z půdy nebo fermentovaného jídla jsou zodpovědní zástupci kvasinek jako například *Candida*, *Pichia* nebo *Saccharomyces* ⁴.

U rostlin mají nitrilasy důležitou funkci při promoci elongace růstu rostlin, přeměnou IAN na IAA ⁵. Další klíčovou rolí nitrilas u rostlin je jejich schopnost detoxikovat kyanid, který je meziproduktem při biosyntéze ethylenu u všech rostlin. U některých rostlin jsou navíc kyanidy součástí obranných látek, kyanogenických glykosidů, které mohou být díky β -glukosidasám a α -hydroxynitrilasám degradovány na aldehydy nebo ketony ^{5, 6}.

Nitrilasové homology můžeme najít i u zvířat, např. *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans* obsahují tumor supresorový gen, Fhit, který je připojen k doméně vykazující homologii k bakteriálním a rostlinným nitrilasám ⁷.

1.1.2. Superrodina nitrilas

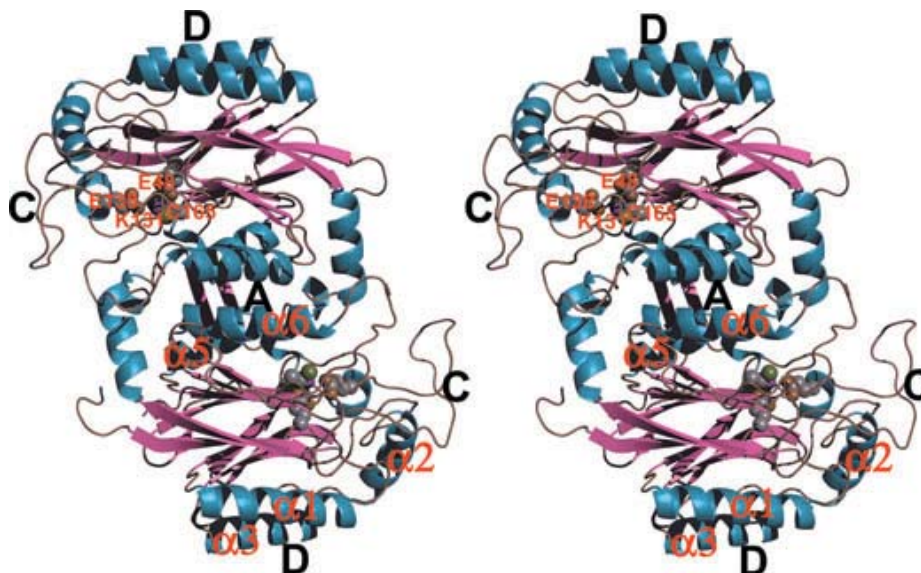
U zvířat, rostlin a hub jsou pomocí enzymů superrodiny nitrilas produkovány látky jako auxin, biotin nebo β -alanin. Tyto enzymy jsou na základě sekvenční analýzy rozděleny do třinácti skupin. Navzdory tomuto rozdělení, byla nitrilasová aktivita prokázána pouze u enzymů první skupiny⁸.

Enzymy první skupiny (EC 3.5.5.1) do které patří auxin produkující nitrilasy, alifatické nitrilasy, β -kyano-L-alanin hydratasy, kyanidhydratasy a kyanidhydratasy se nachází kromě eukaryotických buněk i v mnoha typech bakterií^{9,10,11}.

Častěji než nitrilasovou aktivitu můžeme u enzymů superrodiny nitrilas vidět aktivitu amidasovou, patrnou u druhé až čtvrté skupiny. Malé molekuly jako např. asparagin jsou substráty alifatických amidas patřících do druhé skupiny. N-terminální amidasy třetí skupiny jsou specifické pro hydrolýzu asparaginu nebo glutaminu pokud jsou na N – konci polypeptidu¹². Sekundární amidasy čtvrté skupiny, biotinidasy a panteinasy se účastní recyklace vitamínů^{13,14}. Do páté skupiny řadíme β -ureidopriponasy, účastníci se katabolizmu pyrimidinu¹⁵. Enzymy šesté skupiny, karbamylasy jsou zodpovědné za dekarbamylicí D-aminokyselin¹⁶. Glutamin-dependentní NAD syntetasy, patřící do sedmé a osmé skupiny, jsou u bakterií zodpovědné za schopnost NAD syntetasy využít glutaminu jako zdroje amoniaku⁷. V deváté skupině jsou apolipoprotein N-acetyltransferasy, účastníci se modifikace lipoproteinu, hlavní složky vnější membrány *E. coli*¹⁷. Do desáté skupiny patří Nit proteiny, které jsou připojeny k homologům tumor supresorového genu Fhit⁷. Produkci putrescinu a podobných aminů katalyzují enzymy jedenácté skupiny. Do dvanácté skupiny patří enzymy spojené s RimI N-terminálními acetyltransferasami, které se pravděpodobně podílí na post-translačních modifikacích. Ve třinácté skupině jsou pak zařazeny zbylé proteiny spojené s nitrilasami, nehodící se do předešlých tříd¹⁸.

1.1.3. Struktura

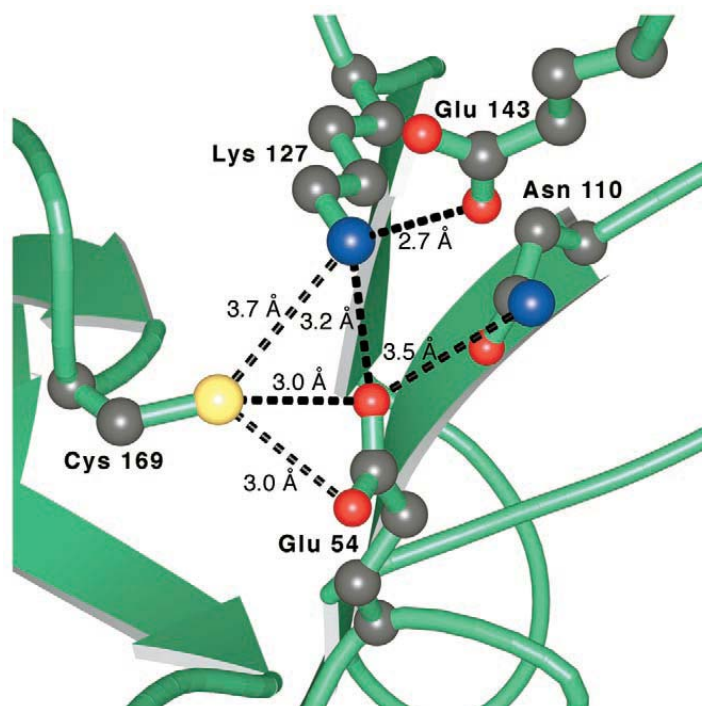
Monomery enzymů superrodiny nitrilas tvoří $\alpha\beta\beta\alpha$ sandwich, který se shlukuje a tvoří 8 vrstvý $\alpha\beta\beta\alpha - \alpha\beta\beta\alpha$ dimer (obr.1) ¹⁹. Zatímco krystalové struktury tvoří dimery, tetramery, hexamery nebo oktamery, mikrobiální nitrilasy tvoří větší homo oligomerní spirály s různým počtem podjednotek. Primární stavební jednotkou oligomerizace je dimer, jehož vzájemné asociace jsou v různých podobách viditelné napříč celou superrodinou nitrilas, např. kyanidhydratasa z *N. crassa* a nitrilasa z *Aspergillus niger* tvoří dlouhý pravidelný helix ²⁰, oproti tomu kyanid dihydratasa z *B. pumilus* tvoří jak krátké tak i dlouhé helixy v závislosti na pH ²¹. Výhody oligomerizace můžeme vidět např. u *Rhodococcal*, kde byl zaznamenán nárůst aktivity se zvětšujícím se komplexem (na rozdíl od vyšších oligomerů byl dimer neaktivní) ^{22,23}. Nejlepším příkladem funkčního významu asociace podjednotek jsou rostlinné nitrilasy, které mají dvě nebo tři isoformy tohoto enzymu, jenž mohou mít dvojí biologickou funkci nebo rozšířit substrátové spektrum. Příkladem jsou kukuřičné nitrilasy ZmNit1 a ZmNit2 syntetizující auxin nebo se podílející na kyanidové detoxikaci, hydrolyzou β -kyanoalaninu ⁵.



Obr. 1: Model dimeru z *Rhodococcus rhodochrous* J1

Interagující povrchy jsou vyznačeny černě. Jako koule jsou zobrazeny katalytické zbytky. Červeně jsou vyznačeny alfa helixy ($\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ and $\alpha 6$) účastnící se interakcí ²⁷.

Dalším společným rysem nitrilas je přítomnost katalytické triady Glu-Lys-Cys v aktivním centru (obr. 2). Cystein a lysin zde plní roli nukleofilu a bazického katalyzátoru, zatímco glutamát je zodpovědný za stabilizaci tetrahedralního intermediátu ¹⁸.



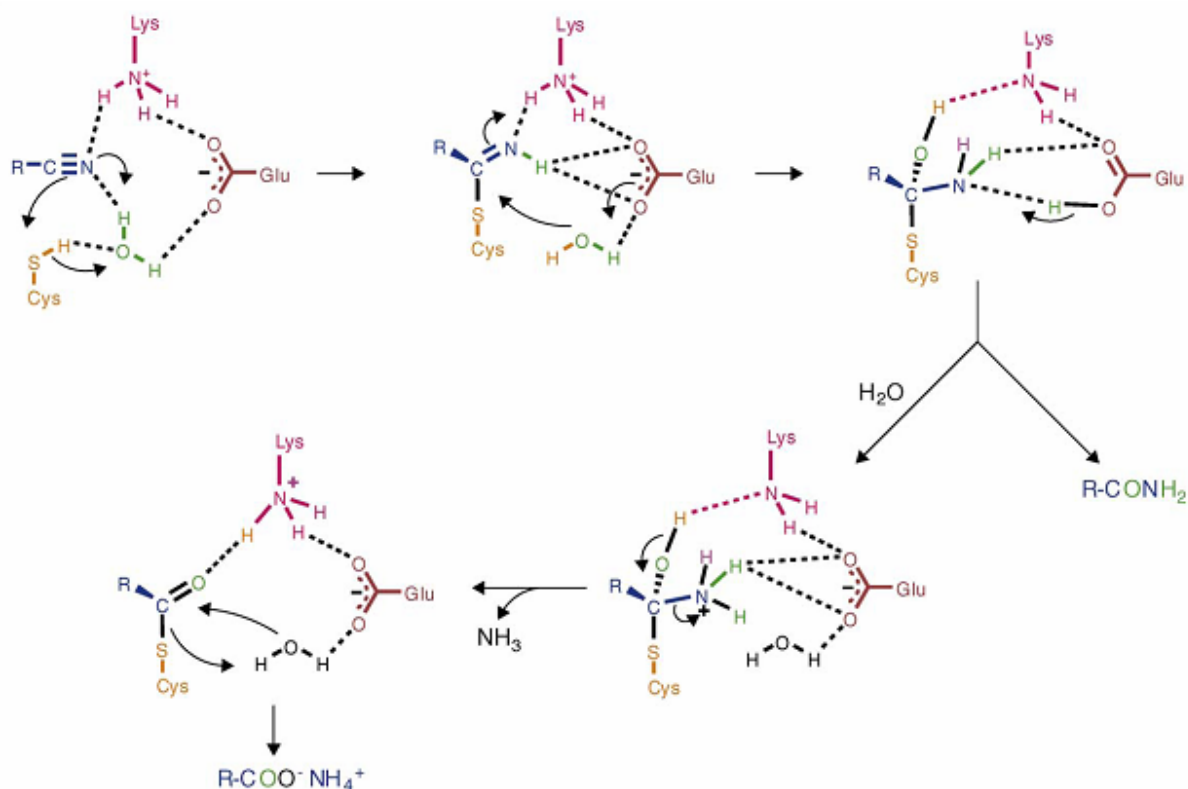
Obr. 2: Aktivní centrum nitrilas.

Aktivní centrum enzymů superrodiny nitrilas se skládá z: Glu, Lys a Cys, kteří tvoří katalytickou triadu zodpovědnou za přeměnu substrátu. Jako příklad je uvedeno aktivní centrum nit z *C. elagans* tvořené: Glu54, Lys127 a Cys169 ²⁴.

1.1.4. Reakční mechanismus

Reakční mechanismus nitrilas (obr. 3, str. 13) byl navržen již v době jejich objevu v šedesátých letech (a později potvrzen Hookem a Robinsonem, kteří prokázali, že tímto způsobem probíhá hydrolysa ricinu) ². Podle tohoto mechanismu nese nitrilový uhlík dílčí pozitivní náboj, díky kterému podléhá nukleofilnímu ataku SH skupin nitrilasy. Vzniklý imin je dále hydrolyzován na odpovídající keton při vzniku NH₃ jako vedlejšího produktu. V posledním kroku se připojením vody k acyl-enzymu vytvoří příslušná karboxylová kyselina a dojde k uvolnění zregenerovaného enzymu ²⁶.

Hydrolyzou nitrilů může kromě karboxylové kyseliny vznikat i amid. Působením nitrilasy z *Arabidopsis thaliana* na β -kyano-L-alanin vznikne kromě kyseliny asparagové i asparagin a to ve více jak 60 % výtěžku. Vznik amidu je vysvětlován pozdním uvolněním enzymově vázaného substrátu po adici první molekuly vody a následném opožděném příjmu druhé molekuly vody¹¹. Vznik amidů při nitrilasami katalyzovaných reakcích je silně ovlivňován sterickými vlivy a elektronovou hustotou reaktantu. Dalšími faktory podporující vznik amidu jsou nízká teplota a zvýšené pH^{25,26}.



Obr. 3: Reakční mechanismus nitrilasy.

Sulfanylová skupina Cys nitrilasy nukleofilně atakuje nitrilový uhlík, za vzniku kovalentního enzym – thioimidového komplexu, který je dále hydrolyzován na tetrahedrální intermediát. Vznik karboxylové kyseliny, za současného uvolnění NH₃, je umožněn díky stabilizaci pozitivního náboje dusíkového atomu reaktantu, kys. glutamovou. Při sterické nebo elektronové zábraně substituentu R je tato stabilizace znemožněna, což vede ke vzniku amidu²⁵.

1.1.5. Substrátová specifita

Jak bylo zmíněno v kapitole 1.1.2., jsou nitrilasy rozděleny do 13 skupin na základě jejich sekvenční analýzy. Původní členění těchto enzymů bylo sestaveno podle jejich preferencí k substrátu. Mezi nejčastěji štěpené látky patří aromatické nitrily, arylacetonitrily, alifatické nitrily, bromoxynil nebo kyanidy (tab. 1, str. 15)^{27,28}.

Enzymy patřící do skupiny aromatických nitrilas preferují aromatické a heterocyklické nitrily. Jejím nejlépe charakterizovaným zástupcem je nitrilasa z *Rhodococcus rhodochrous* J1. Tento enzym hydrolyzuje kromě benzonitrilu i substráty jako jsou akrylonitril a propionitril, můžeme ho tedy zařadit i do skupiny alifatických nitrilas²².

Pro alifatické nitrilasy, je typická katalýza přeměny alifatických nitrilů ačkoliv jsou schopné využívat jako substrát i benzonitril. Tento trend byl pozorován např. u rekombinantní NIT1 nitrilasy z *Arabidopsis thaliana*, která vykazovala 270 × větší aktivitu k 3-fenylpropionitrilu než k benzonitrilu²⁹.

Představitelem nitrilas využívajících jako substrát bromoxynil (3,5-dibromo-4-hydroxybenzonitril) je nitrilasa z *Klebsiella pneumoniae*. Tento enzym využívá jako jediný zdroj dusíku amoniak uvolněný při kompletní přeměně bromoxynilu na příslušnou kyselinu³⁰.

Arylacetonitrilasy jsou většinou enantioselektivní enzymy, vykazují aktivitu k benzonitrilu popřípadě k alifatickým nitrilům. Jedním ze substrátů této skupiny enzymů je (R, S)-mandelonitril, který je přeměňován nitrilasou z *Pseudomonas fluorescens* EBC191 preferenčně na (R)-(-) mandlovou kyselinu³¹. Dalším zástupcem této skupiny je nitrilasa z *Labrenzia aggregata*, která katalyzuje přeměnu (R, S)-*o*-chloromandelonitrilu na (R) -*o*-chloromandlovou kyselinu (základní látka pro výrobu Klopidoogrelu, látky používané k inhibici tvorby krevních sraženin)³².

Kyanidhydratasy a kyanidhydratasy hydrolyzují přeměnu kyanidu na kyselinu mravenčí a amoniak resp. formamid²⁷. Dalším možným substrátem těchto enzymů jsou kovové komplexy kyanidu, jako např. hexakynoželeznan draselný ($K_4[Fe(CN)_6]$) a tetrakyanonikelnatan draselný ($K_2[Ni(CN)_4]$), které jsou degradovány kyanidhydratasou pocházející z vláknité houby *Fusarium solani*³³.

Tab. 1: Substrátová specifita vybraných nitrilas (převzato a upraveno podle ²²).

Substrátová specifita	Organismus	Substrát	Molekulární hmotnost (kDa)	Optimum pH	Teplotní optimum °C
Aromatické nitrilasy	<i>Aspergillus niger</i> K10	Benzonitril	> 650	8	45
		4-kyanopyridin			
	<i>Fusarium solani</i> O1	Benzonitril	580	8	40 – 45
		4-kyanopyridin			
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	Benzonitril	78	76	45
		Akrylonitril			
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> PA-34	Benzonitril	45	7,5	35
		Akrylonitril			
Alifatické nitrilasy	<i>Arabidopsis thaliana</i> AtNIT1	3-fenylpropionitril	450	9	35
		Benzonitril			
	<i>Pseudomonas</i> sp. S1	Akrylonitril	41	-	-
		Benzonitril			
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> K22	Akrylonitril	650	5,5	50
		Benzonitril			
Bromoxynil specifické nitrilasy	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>ozaenae</i>	Bromoxynil	74	9,2	35
		4-Hydroxybenzonitril			
Arylacetonitrilasy	<i>Pseudomonas fluorescens</i> EBC191	2-fenylvaleronitril		6,5	50
		Benzonitril			
	<i>Pseudomonas putida</i>	4-Aminofenylacetonitril	412	7	40
		Benzonitril			
	<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	p-Aminobenzylkvanid	460	7,5	45
		Benzonitril			
Kyanidhydratasy	<i>Alcaligenes xylooxidans</i> ssp. <i>denitrificans</i> DF3	NaCN	>300	7,6 - 8	26
		<i>Pseudomonas stutzeri</i> AK61	KCN	532	7,5
Kyanidhydratasy	<i>Fusarium solani</i>	KCN	>300	7,5	25
		K ₂ [Ni(CN) ₄], K ₄ [Fe(CN) ₆]			
	<i>Fusarium oxysporum</i> N-10	KCN	160	7,5	30
		Benzonitril			

1.1.6. Využití

K nejcennějším schopnostem nitrilas patří jejich schopnost degradace vysoce toxických, mutagenních a karcinogenních sloučenin nitrilů. Mezi tyto látky, které jsou široce využívány v průmyslu, agrikultuře, přípravě léčiv, plastů, herbicidů a pesticidů, patří např. acetonitril, akrylonitril, benzonitril, bromoxynil a další^{28,34}.

Nitrilasy z *R. rhodochrous* PA-34, *Rhodococcus* sp. NDB 1165 a *N. globerula* NHB-2 vykazují vysokou specifickou aktivitu k benzonitrilu³⁵. Tyto enzymy dokáží zcela hydrolyzovat deriváty benzonitrilu, herbicidy chloroxynil a bromoxynil³⁶. Dalším enzymem schopným degradovat bromoxynil je již dříve zmíněná nitrilasa z *K. pneumoniae* (kapitola 1.1.5. Substrátová specifita), jejíž gen zodpovědný za specifitu k tomuto herbicidu byl implantován do bavlny a dal tak vzniknout bromoxynil rezistentní bavlně^{31,30}.

Nitrilasám je v posledních letech věnována velká pozornost také kvůli jejich schopnostem biotransformace nitrilů za vzniku příslušných karboxylových kyselin a jejich derivátů. Této schopnosti je využíváno při biosyntéze potravních doplňků nebo látek využitelných v chemickém a farmaceutickém průmyslu²⁶.

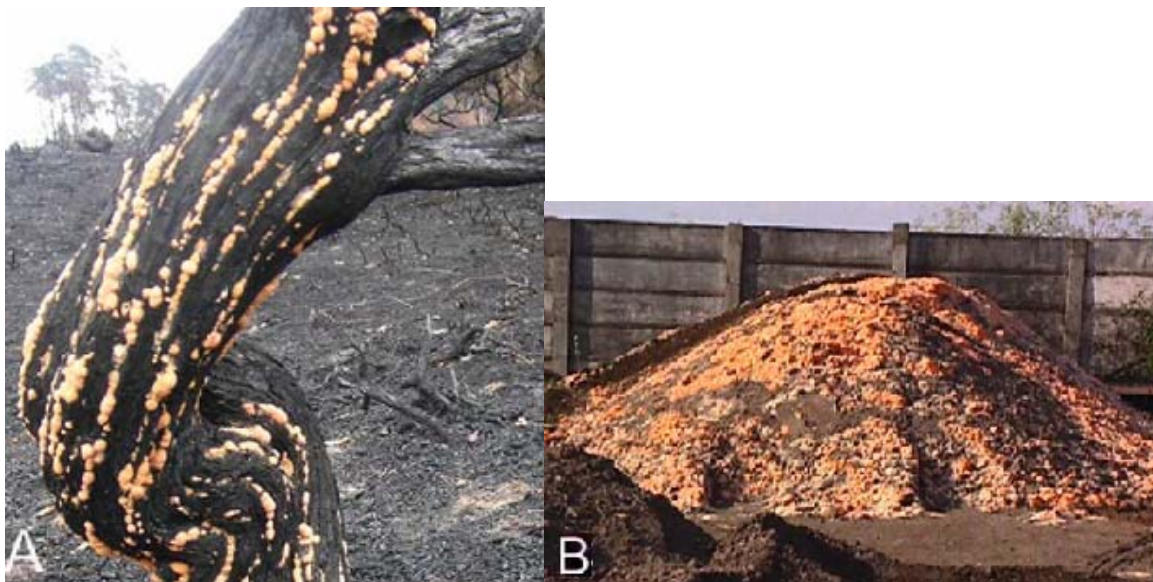
Příkladem průmyslově významné látky je kyselina akrylová, která má široké uplatnění při výrobě lepidel, disperzantů a povrchových nátěrů³⁷. Průmyslová výroba kyseliny akrylové se skládá z dvoukrokové oxidace propylenu, při které dochází ke vzniku mnoha vedlejších produktů a anorganického odpadu³⁸. Tyto negativní efekty doprovázející průmyslovou výrobu můžeme eliminovat, použitím enzymatické hydrolysy akrylonitrilu. Velký potenciál pro produkci akrylové kyseliny vykazují nitrilasy z *Arthrobacter nitroguajacolicus* nebo *R. rhodochrous*. Přičemž největšího výtěžku, 414,5 g/l (při 10h nepřetržité katalytické reakci) bylo dosaženo použitím nitrilasy z *R. rhodochrous*^{38,39}.

1.2. *Neurospora crassa*

1.2.1. Charakterizace

Vláknité houby jsou bohatým zdrojem nitrilas. Jedním z jejich zástupců je *Neurospora*, která poskytuje dobré výtěžky těchto enzymů. Tato houba, která se řadí do třídy askomycet (vřeckovýtrusné houby) je široce rozšířená na ohořelých rostlinách po přírodních požárech nebo zemědělském vypalování (obr. 4A). Dalším jejím častým místem výskytu jsou cukrovarské filtrační kaly bohaté na sacharidy (obr. 4B)⁴⁰.

Neurospora má široké uplatnění v různých odvětvích výzkumu. Díky jejím vhodným biologickým vlastnostem jako např. nenáročnosti na živiny (sole, cukry a biotin), rychlému vegetativnímu růstu a dvou až tři týdennímu životnímu cyklu nebo rozlišné pigmentaci askospor (tmavá u normálních, životaschopných askospor; bez pigmentu – neživotaschopné askospory) umožňující snadnou detekci přeuspořádání chromosomů, je tato houba často používána jako modelový organismus např. při genetických, cytogenetických nebo cytologických studiích⁴¹. Další cennou vlastností této houby je schopnost recyklovat různé organické látky, zvláště pak odbourávat toxické a odpadní látky⁴².

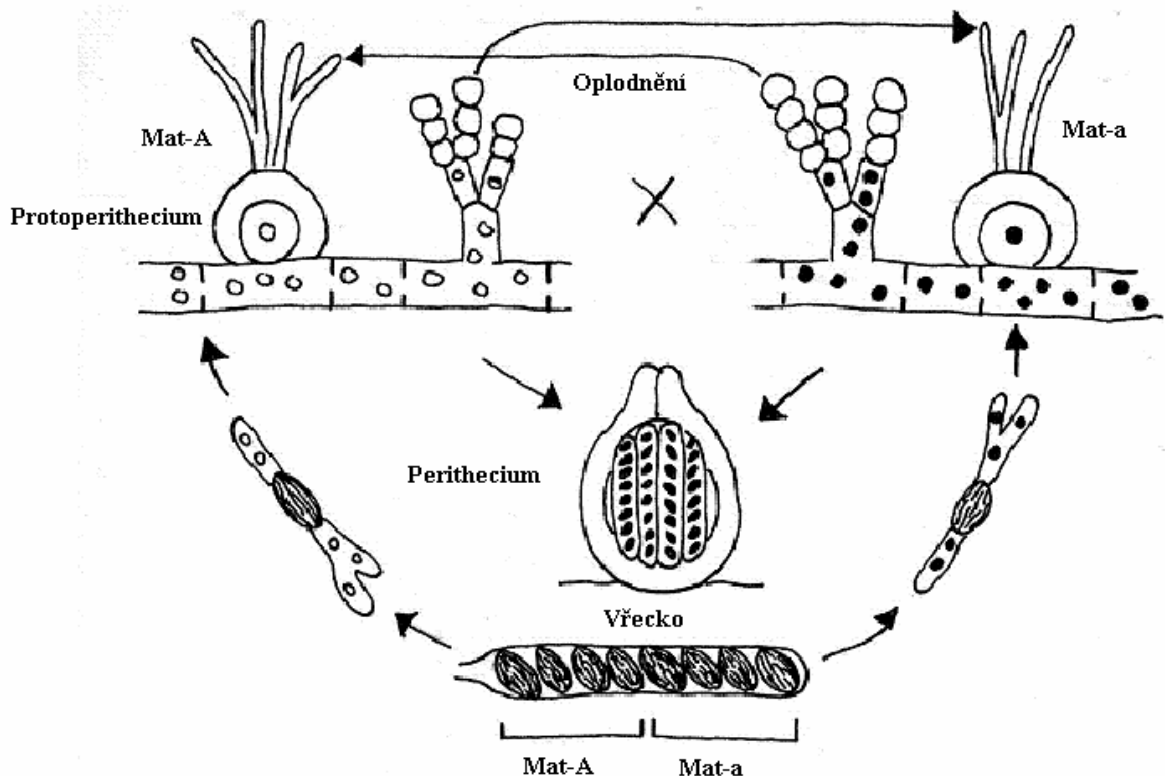


Obr. 4: A) *Neurospora* rostoucí na ohořelém kmeni po lesním požáru v Surrey (Anglie).

B) Povlak *Neurospory* na filtračním kalu v cukrovaru v jižní Indii⁴².

1.2.2. Životní cyklus

Nejznámějším druhem *Neurospory* je houba s dvěma kopulačními typy (*mat A* a *mat a*), *Neurospora crassa*. Haploidní kmeny jsou hermafroditi (mající samčí i samičí znaky), u nichž ale nemůže dojít k sebeoplození a reprodukční cyklus je inicializován oplodněním protoperithecia jednoho kopulačního typu, buňkami druhého kopulačního typu (obr. 5)⁴³. Tyto oplodněné protoperithecia se dále rozvíjí v perithecia, uvnitř kterých vznikají vřecka. V mladých vřeckách následně dochází k fúzi dvou haploidních jader za vzniku diploidního jádra zygoty, které okamžitě vstupuje do meiózy a postmeiotické mitosy. Z každého perithecia vznikne 200 až 400 vřecek, z čehož každé vřecko vyprodukuje 8 lineárně uspořádaných haploidních askospor⁴⁴.



Obr. 5. Schéma reprodukčního cyklu *N. crassa*

Reprodukční cyklus začíná oplodněním protoperithecia. Z něhož se formuje perithecium, uvnitř kterého vznikají vřecka. Převzato a upraveno z⁴⁸.

2. Cíl práce

- Rekombinantní exprese nitrilasy z *Neurospora crassa* s histidinovou kotvou na C a N konci v bakteriálním expresním systému.
- Izolace enzymů a optimalizace jejich purifikace v redukujícím prostředí.
- Porovnání kvartérní struktury obou enzymů připravených v neredukujícím a redukujícím prostředí.
 - Sedimentační analýza
 - Krystalizace
 - Měření enzymové aktivity

3. Materiál a pomůcky

3.1. Přístroje

Analytické váhy HA-180 M	Schoeller Pharma Prague, ČR
Aparatura pro filtraci	Sigma, USA
Autokláv Varioklav 300/400/500 EP-Z	H+P Labortechnik GmbH, Německo
Automatické pipety	HTL, Polsko
Automatické pipety Pipetman	Gilson, USA
Centrifuga Allegra X-22R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga EBA 12 R	Hettick Zentrifugen, Německo
Filtr Millipore Express PLUS 0,20 µm	Millipore, USA
FPLC AKTA prime plus	GE Healthcare USA
HPLC systém AKTA basic	GE Healthcare USA
Inkubátor IR 1500	LABsystem Praha, ČR
Kolona HiTrap desalting	GE Healthcare, USA
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, USA
Kolona Q-Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, USA
Kolona Protino® Ni – NTA	Macherey – Nagel, Německo
Koncentrátory Amicon Ultra	Millipore, USA
Lednice 225-R	Calex, ČR
Mrazičí box (-80 °C)	Sanyo, Japonsko
pH metr 3310	Jenway, UK
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo
Sady krystalizačních podmínek	QIAGEN, Nizozemsko
JCSG Core Suite I-IV	
Souprava pro SDS elektroforézu	Bio-Rad, USA
Třepačka orbi safe TS NetWise	Gallenkamp, Německo
UV/VIS spektrometr UV2 Series	Unicam, UK
Ultrazvukový homogenizátor Sonoplus	Bandelin, Německo
Vařič	ETA, ČR

Vodní lázeň TW 2
Vortexový mixér
Zdroj deionizované vody Milli Q

Julabo, Německo
VELP Scientifica, Itálie
Millipore, USA

3.2. Chemikálie

Agar	Oxoid, UK
Akrylamid	Sigma, USA
APS	Serva, USA
Azid sodný	Serva, USA
β -merkaptoethanol	Sigma, USA
BSA	Sigma, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka Chemika, Švýcarsko
Činidlo dle Bradfordové	Bio-Rad, Německo
Dithiothreitol	Serva, USA
EDTA	Lachner, ČR
Imidazol	Serva, USA
IPTG	Serva, USA
Kanamycin	Merck, Německo
Kvasničný lyzát	Imuna Pharm, ČR
Leupeptin	Serva, USA
Lysozym	Sigma, USA
PMSF	Serva, USA
SDS	Jersey Lab Supply, USA
TEMED	Serva, USA
Tris	Roth, Německo
Trypton	Oxoid, UK
Ostatní běžné chemikálie	Lach-Ner, ČR

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

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

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

HEPES pufr. 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM β-ME, pH = 7,0

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: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, 5 mM β-ME, pH = 8,0

Pufr A_{Tris}: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, 10 mM β-ME, pH = 8,0

Pufr B_{imidazol}: 20mM Tris, 150 mM NaCl, 250 mM imidazol, 10mM NaN₃, 5 mM β-ME, pH = 8,0

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

Pufr C: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH = 8,0

TES pufr: 10 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH = 8,0

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

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

3.3. Markery

Protein Mixture

Amersham Bioscience, UK

3.4. Plazmidy a buňky

E. coli BL21-Gold (DE3)

Stratagene, USA

pET-28a_{nitNC}

Mgr. Alicja B. Veselá,

Laboratoř biotransformací MBÚ AV ČR.

4. Metody

4.1. Transformace

Pro přípravu nitrilasy bylo použito 90 μ l buňek *E. coli* BL 21 Gold, ke kterým byl přidán 1 μ l plazmidu *Neurospora crassa* pET 28a s genem pro nitrilasu z *Neurospora crassa* vloženým mezi restrikční místa NdeI a HindIII (pro nitrilasu s His-kotvou na N-konci) a restrikčními místy NcoI a XhoI (u nitrilasy s his kotvou na C-konci). Směs byla nejprve inkubována 30 min na ledu, poté ponořena do 42 °C lázně přesně na 1 min a následně vrácena na led. Po přidání 1 ml LB média (předem vyhřátého na 37 °C) byla směs inkubována 1 h při 37 °C a dále centrifugována 1 min při 4500 \times g. Vzniklá peleta byla resuspendována přibližně ve 100 μ l supernatantu, nanesena na misku s LB agarem a kanamycinem (ve výsledné koncentraci 50 μ g/ml) a 16 h inkubována při 37 °C.

4.2. Produkce rekombinantní nitrilasy

Bakteriálními koloniemi (rozmíchanými v 2 ml LB média) bylo zaočkováno 2 \times 0,5 l LB média s kanamycinem o koncentraci 50 μ g/ml. Směs byla kultivována při 200 ot/min a 37 °C. Po dosažení optické denzity 0,823 (měřeno při $\lambda = 550$ nm) byla směs zchlazena na 22 °C a produkce proteinu zaindukována přidávkem 0,5 mM IPTG. Buňky byly ponechány na třepačce dalších 16h při 200 ot/min a 22 °C.

Následující den bylo médium rozděleno do dvou kyvet a centrifugováno 15 min při 4000 \times g. Poté byl supernatant odstraněn a peleta resuspendována v TES pufru a znovu odstředěna. Vzniklá peleta byla uchována v mrazáku při - 20 °C.

4.3. SDS elektroforéza

Pro potvrzení přítomnosti nitrilasy v peletách byla provedena SDS elektroforéza. Pro přípravu 15 % separačního gelu bylo napipetováno: 0,9 ml deionizované H₂O, 2 ml 30 % AA, 1 ml Tris pufru o pH = 8,8, 40 µl 10 % SDS, 2 µl TEMED a 40 µl 10 % APS. Tato směs byla nalita do výšky zhruba 1 cm pod okraj hřebenu do předem sestavených skel a převrstvena deionizovanou H₂O, která byla po ztuhnutí gelu odstraněna. Na tento gel byl nalit gel zaostřovací, který byl připraven pipetováním: 0,7 ml deionizované H₂O, 0,25 ml 30 % AA, 0,125 ml Tris pufru o pH = 6,8, 10 µl 10 % SDS, 1,5 µl TEMED a 10 µl 10 % APS. Do tohoto gelu byl okamžitě zasunut vkládací hřeben.

Po zatuhnutí gelu byl tento hřeben vyjmut a gel byl vložen do aparatury na elektroforézu naplněné elektrodovým pufrem, který byl poté nalit i do prostoru mezi skla. Do první jamky v gelu bylo napipetováno 3 µl standartu, do zbylých pak 10 µl vzorků, které byly předem smíchány s 2 × koncentrovaným redukujícím vzorkovým pufrem, následně povařeny přibližně 5 min a odstředěny 5 min při 4000 × g. Elektroforéza probíhala 55 min při 200 V. Po doběhnutí elektroforézy byly gely vyjmuty a na 20 min ponořeny do barvicího roztoku. Následně byly gely 3 × vloženy do odbarvovacího roztoku, kde byly za stálého míchání ponechány vždy po dobu 30 min.

Při použití 12,5 % gelu (použitý k posouzení čistoty vzorků z IC, AC a GC) bylo na přípravu separačního gelu pipetováno: 1,265 ml destilované H₂O a 1,675 ml 30 % AA (ostatní objemy zůstaly nezměněny).

4.4. Chromatografie na iontoměni

Zmražená peleta byla ponechána roztát při pokojové teplotě. Po rozmražení byla resuspendována v 40 ml pufru A_{TRIS}, ke kterému bylo následně přidáno 4 mg lysozymu, 1 µM leupeptin, 1 mM PMSF a 20 mM EDTA. Tato směs byla ponechána 30 min na ledu, po inkubaci byl ke směsi přidán 1 ml 2 M DTT. Buňky byly následně za stálého chlazení na ledu 4 × lyzovány pomocí ultrazvukového homogenizátoru Sonoplus s amplitudou 40 % a pulzací 0,5 s po dobu 1 min. Následně byl buněčný lyzát centrifugován při 20000 × g po dobu 10 min.

Vzniklý supernatant byl přelit do čistých kyvet, znovu odstředěn za výše uvedených podmínek a poté přefiltrován pomocí filtru Millipore Express PLUS 0,22 μm .

Filtrát byl následně zředěn pufr A_{Tris} , do kterého byl předem přidán 1 μM leupeptin, 1 mM PMSF a 20 mM EDTA v poměru 1:1.

Takto připravený vzorek byl za průtoku 3 ml/min nanesen na kolonu Q-Sepharose Fast Flow 16/10. Jako mobilní fáze byl použit pufr A_{Tris} (bez inhibitorů proteas). Po promytí kolony byla nitrilasa eluována gradientem pufru B, z 0 bylo dosaženo 100 % pufru B_{Tris} za 1h. Z jednotlivých frakcí píku (které byly jímány přibližně po 14 ml) byly odebrány vzorky na SDS elektroforézu a poté spolu s frakcemi uskladněny do lednice.

4.5. Chelatační chromatografie s následným odsolením

Vybrané frakce z chromatografie na iontoměničích byly smíchány s pufr A v poměru 1:1. Takto naředěné frakce byly nanesený na kolonu Protino Ni-NTA při průtoku 5 ml/min. Po nanesení vzorku byla tato kolona promyta pufr A (který byl použit jako mobilní fáze) a odpojena. Poté byla provedena ekvilibrace 2 odsolovacích kolonek HiTrap s náplní Sephadex G25 superfine, nejprve pufr A, poté pufr $\text{B}_{\text{imidazol}}$, který sloužil jako eluční pufr a znovu pufr A. Na takto připravené odsolovací kolonky byla připojena kolona Protino Ni-NTA (s dříve naneseným vzorkem) a znovu promytá pufr A. Vzorek byl eluován 2×2 ml pufru $\text{B}_{\text{imidazol}}$.

4.6. Gelová filtrace

Po provedení SDS elektroforézy byly vybrány jednotlivé odsolené frakce, které byly dále zakoncentrovány pomocí centrifugace na koncentrátorech Amicon Ultra-4 (MWCO 10000) při $4000 \times g$.

Tyto koncentráty byly při průtoku 0,5 ml/min postupně nanesený na kolonu Superdex 200 10/300 GL. Jako mobilní fáze byl použit pufr A_{Tris} . Jednotlivé frakce byly jímány do mikrozkuumavek po 1 ml a poté uloženy do lednice.

4.7. Stanovení koncentrace

Na mikrotitrační destičce bylo k 5 μ l vzorku frakcí přidáno 200 μ l činidla Bradfordové. Stejným způsobem (5 μ l BSA a 200 μ l činidla) byla připravena kalibrační řada BSA. Absorbance kalibrační řady BSA a vzorku frakcí byla změřena pomocí čtečky mikrotitračních destiček Sunrise.

4.8. Sedimentační analýza

Po purifikaci byly oba enzymy analyzovány RNDr. Ondřejem Vaňkem, Ph.D. na analytické ultracentrifuze ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter) metodou sedimentační rychlosti ⁴⁵. Analýza proteinu probíhala při 30000 ot./min a 20°C. Bylo sbíráno 200 snímků po 5 min při vlnové délce 280 nm. Jako reference byl použit příslušný pufr použitý při gelové filtraci, pufr A pro neredukované a HEPES pufr pro redukované formy. Hustota a viskozita použitého pufru, stejně jako parciální specifické objemy analyzovaných vzorků byly predikovány za pomoci programu SEDNTERP ⁴⁶ a získaná data byla následně vyhodnocena s využitím programu SEDFIT ⁴⁷.

4.9. Krystalizace

S oběma vypurifikovanými proteiny byly nasazeny krystalizační kapky Mgr. Janem Bláhou, RNDr. Jiřím Pavlíčkem, Ph.D. a Mgr. Jakubem Ptáčkem na BTÚ AV ČR. Pro krystalizaci byla použita metoda sedící kapky v difúzi par a sady krystalizačních podmínek: JCSG Core Suite I, II, III a IV, které byly nasazeny na 96 jamkové destičky. Nitrilasa z NCC byla nasazena v koncentraci 17 mg/ml. Pro každou podmínku byly nasazeny 3 kapky, každá v jiném objemovém poměru protein vs. srážedlo: nahoře - 200 nl protein + 100 nl rezervoár, uprostřed 150 nl protein + 150 nl rezervoár, dole 100 nl protein + 200 nl rezervoár. Nitrilasa z NCN byla nasazena v koncentraci 12 mg/ml, kdy pro každou podmínku byly opět nasazeny 3 kapky v následujícím poměru: nahoře - 150 nl protein + 300 nl rezervoár, uprostřed 150 nl protein + 150 nl rezervoár, dole 200 nl protein + 100 nl rezervoár.

4.10. Enzymová aktivita

Enzymová aktivita byla změřena v Laboratoři biotransformací MBÚ AV ČR. Ke 40 μ l vzorku bylo přidáno 150 μ l pufru C. Poté byly vzorky 5 min preinkubovány za mírného třepání, při 30°C. Reakce byla inicializována přidáním 10 μ l 500 μ M fenylacetonitrilu. Po 2 min inkubaci za stejných podmínek byla reakce ukončena přidáním 20 μ l 2 M HCl. Po krátkém protřepání vzorků byly vzorky centrifugovány. Takto připravené vzorky byly předány Ing. Anně Rinágelové k analýze na HPLC.

5. Výsledky

5.1. Rekombinantní exprese nitrilasy z *Neurospora crassa* s histidinovou kotvou na C a N konci v bakteriálním expresním systému.

Mým cílem bylo připravit 2 různé formy téhož enzymu s pomocí plazmidů, které byly získány od Mgr. Alicje B. Veselé z Laboratoře biotransformací MBÚ AV ČR, obsahujících expresní konstrukty, jejichž sekvence jsou uvedeny níže.

nitNCC = *Neurospora crassa* s His-kotvou na C-konci

MATTIKVAVTQAEPDWLDLQASIQKAVSLVHEAASNGAKIVAFSETWAPGYPGWCWARP
VPDPALNTKYAYNSLTANSPEMEQLQQAAKEDSIAVVIGFSERSSSGSLYIGQAIISPQG
EVALQRRKLPKPTMERTIFGDGSGPDLNCVAELDFGSELGSIKVGTLNCWEHAQPLPKF
HEIQQGVVIHIAMWPPIDPYPGVEFPGLWSMTADGCQNLSQTFAVESGAFVLHCTAVC
NESGIEAMDTRNGMVFREPGGGHSCVIGPDGRRLTQPLADKPSAEGIVYADLDLTRVV
TNKSFQDIVGHYSRPDLLWLSYDKEKKDAAVHRN **LEHHHHHH**

Počet AMK: 335 **Molekulová hmotnost:** 36641,53 **Teoretické pI:** 5,64

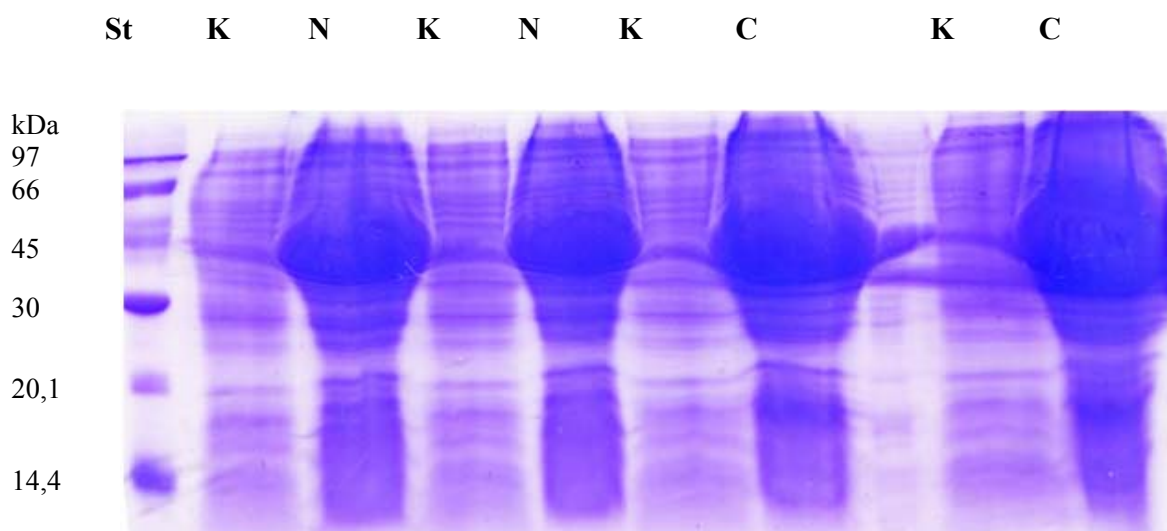
nitNCN = *Neurospora crassa* s His-kotvou na C-konci

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMATTIKVAVTQAEPDWLDLQASIQKAVSLVHEAASNGA
KIVAFSETWAPGYPGWCWARPVPDPALNTKYAYNSLTANSPEMEQLQQAAKEDSIAVVI
GFSERSSSGSLYIGQAIISPQGEVALQRRKLPKPTMERTIFGDGSGPDLNCVAELDFGSEL
GSIKVGTLNCWEHAQPLPKFHEIQQGVVIHIAMWPPIDPYPGVEFPGLWSMTADGCQN
LSQTFAVESGAFVLHCTAVCNESGIEAMDTRNGMVFREPGGGHSCVIGPDGRRLTQPL
ADKPSAEGIVYADLDLTRVV TNKSFQDIVGHYSRPDLLWLSYDKEKKDAAVHRN

Počet AMK: 347 **Molekulová hmotnost:** 37739,73 **Teoretické pI:** 5,86

Ze sekvencí vidíme, že u nitNCC je kotvou na C-konci proteinu přidáno pouze 8 nepůvodních AMK, zatímco u nitNCN je to 20 AMK, což způsobilo nárůst její molekulové hmotnosti. Kotvy jsou vyznačeny žlutou barvou.

Nitrilasy byly produkovány v *E. coli* BL 21 Gold podle postupu uvedeného v kap. 4.1. a 4.2. Přítomnost proteinu v buňkách po produkci byla ověřena pomocí SDS elektroforézy (obr. 6).



Obr. 6: SDS elektroforéza po produkci v *E. coli* BL 21 Gold

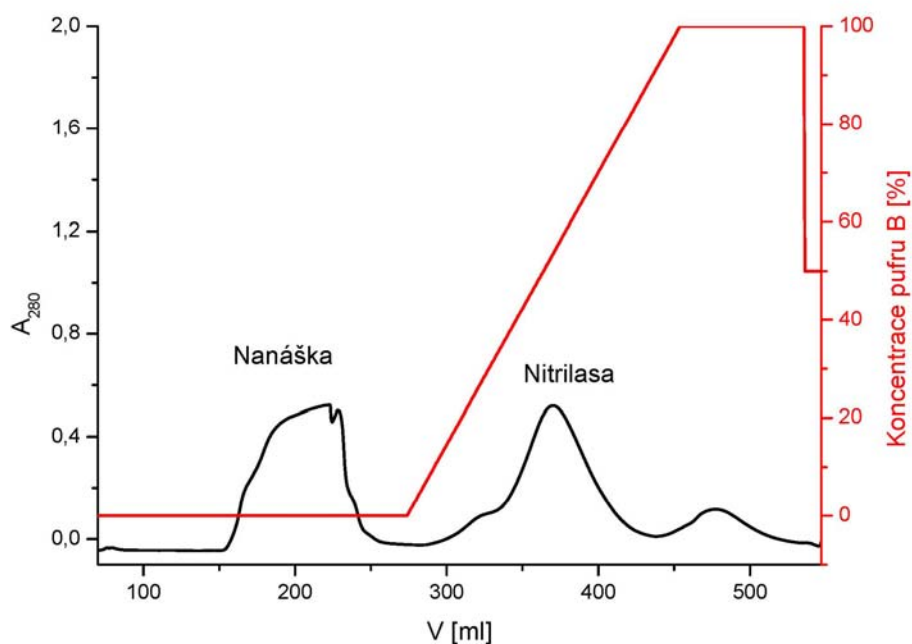
Označení St je použito pro standard, N pak pro nitrilasu z *Neurospora crassa* s histidinovou kotvou na N-konci; C pro nitrilasu s histidinovou kotvou na C-konci.

Jako kontroly (dráha 2, 4, 6, 9) byly použity vzorky z kultivace před indukcí IPTG.

Při porovnání drah kontrol s příslušnými drahami se vzorkem nitrilasy je patrné, že po indukcí IPTG se produkují proteiny s molekulovou hmotností odpovídající daným expresním konstruktům.

5.2. Izolace enzymů a optimalizace jejich purifikace v redukujícím prostředí.

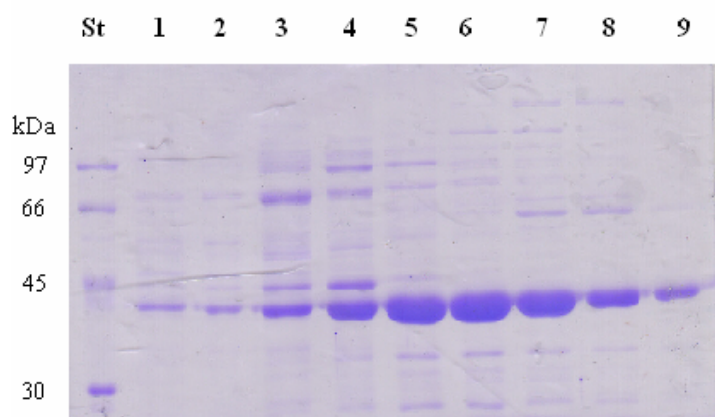
Buňky byly izolovány v redukujícím prostředí a redukující činidlo bylo přítomno také ve všech použitých pufrech. U obou nitrilas (NCC i NCN) byly použity stejné purifikační kroky (výsledky jsou uvedeny pouze pro NCC, pro NCN byl postup purifikace velmi obdobný). Purifikace obou proteinu začala chromatografií na iontoměničích na koloně Q-Sepharose Fast Flow 16/10 (obr. 7, str. 30).



Obr. 7: Chromatogram NCC z chromatografie na iontoměniči

Chromatografie byla provedena na koloně Q-Sepharose Fast Flow 16/10, při průtoku 3 ml/min. Nitrilasa byla eluována gradientem pufru B (z 0 na 100 %, za 1h).

Ke kontrole obsahu nitrilasy v jednotlivých frakcích po iontové výměnné chromatografii a zjištění jejich čistoty byla použita SDS elektroforéza (obr. 8).

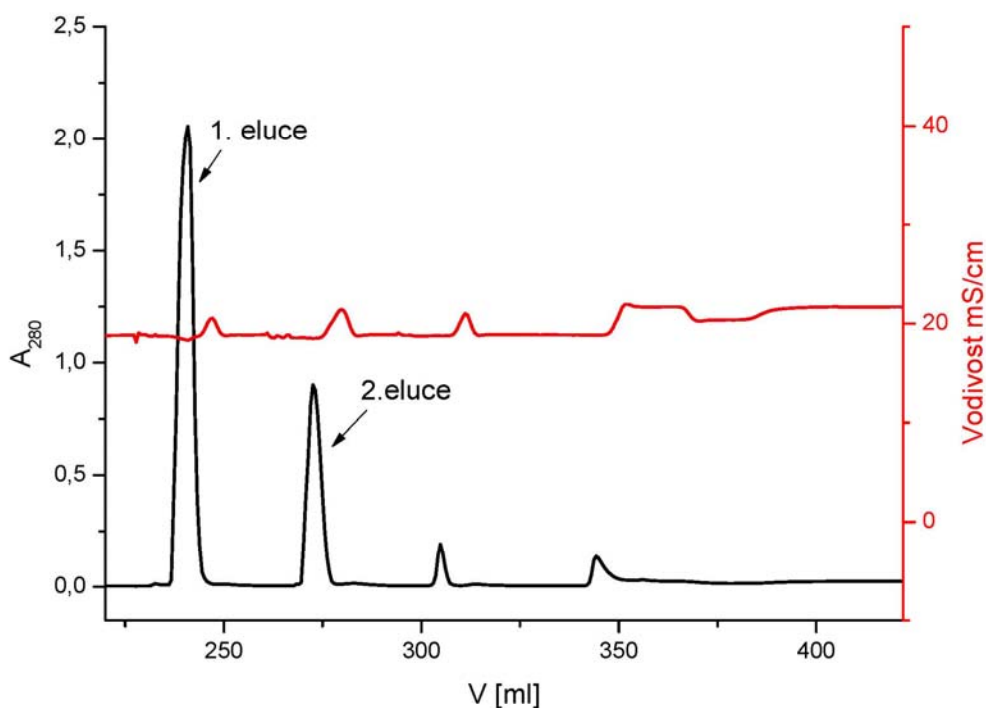


Obr. 8: SDS elektroforéza frakcí z chromatografie NCC na iontoměniči.

Frakce 1 – 9 nit NCC po chromatografii na iontoměniči.

Největší množství nitrilasy je ve frakcích 4 až 6, nicméně pro další postup byly použity všechny frakce (1 až 9).

Tyto frakce byly spojeny a naředěny v poměru 1:1 s pufrům A_{Tris} . S takto naředěnými frakcemi byla provedena chelatační chromatografie na koloně Protino Ni-NTA s následným odsolením na 2 odsolovacích kolonkách HiTrap (obr. 9).

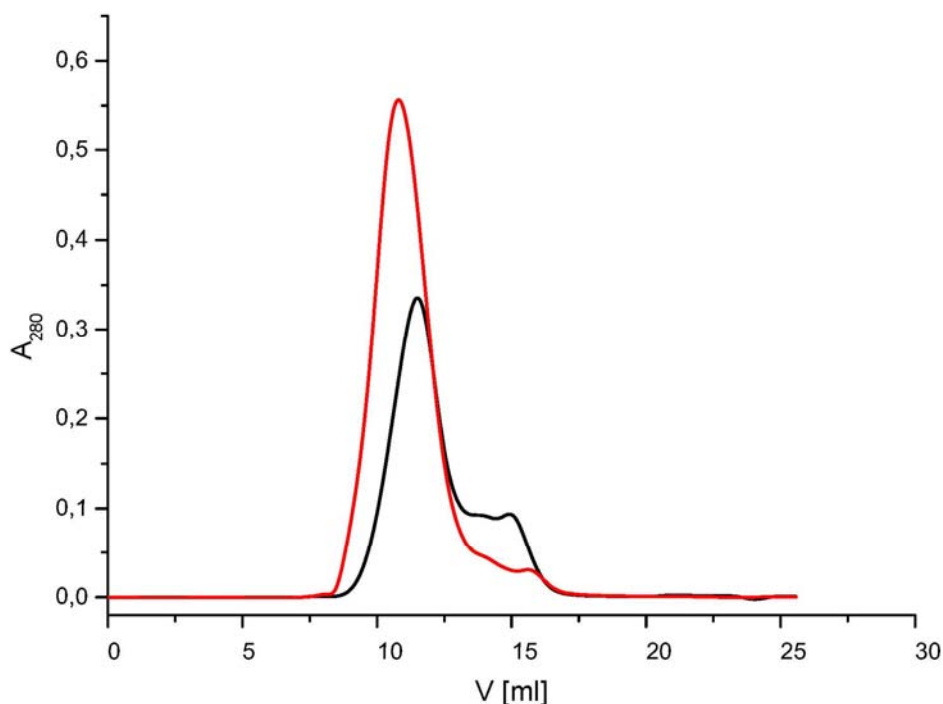


Obr. 9: Chromatogram NCC z chelatační chromatografie a následného odsolení

Vzorek nitrilasy z *Neurospora crassa* s His-kotvou na C-konci byl nanesen na kolonu Protino Ni-NTA při průtoku 5 ml/min a následně eluován a ihned odsolen na odsolovacích kolonkách HiTrap při stejném průtoku.

Eluce nitrilasy byla provedena 2×2 ml pufru C. Jak je vidět z obr. 7, většina proteinu je z kolony uvolňována už při první eluci, jejíž frakce byla použita k další separaci.

Finálním krokem purifikace byla gelová filtrace na koloně Superdex 200 10/300 GL (obr. 10, str. 32).



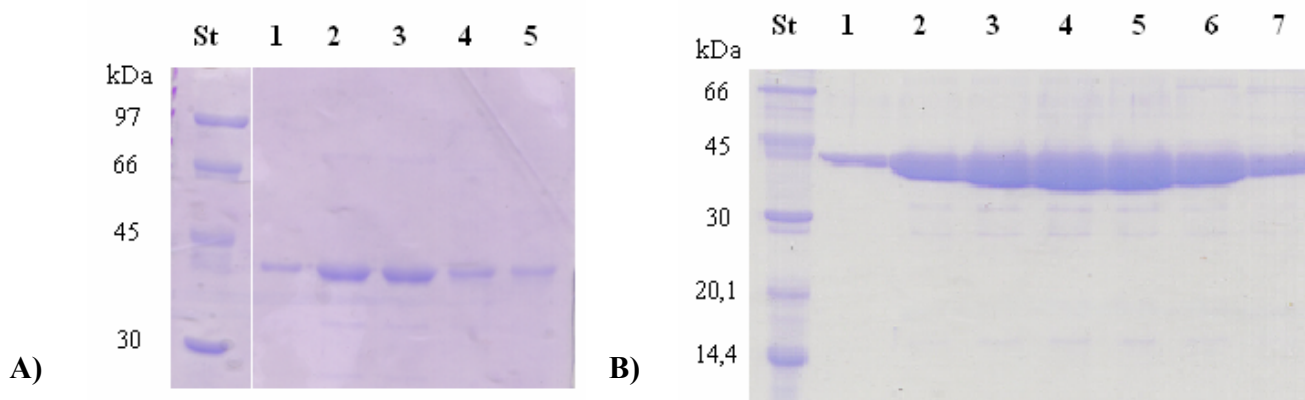
Obr. 10: Chromatogram NCC a NCN z gelové filtrace

Porovnání chromatogramů nitrilasy z *Neurospora crassa* s His-kotvou na C-konci: černá křivka a nitrilasy z *Neurospora crassa* s His-kotvou na N-konci: červená křivka.

Na gelovou filtraci byla použita první frakce po chelatační chromatografii (a následném odsolení). Použitá kolona: Superdex 200 10/300 GL, průtok 0,5 ml/min.

Z chromatogramů na obr. 8 je patrné, že nitNCN je eluována z kolony o něco dříve než nitNCC. Dalším zřetelným rozdílem je výška elučního vrcholu a tvar křivky v konečné části, naznačující odlišné zastoupení oligomerů u NCC oproti NCN.

Finální čistota preparátu byla zkontrolována pomocí SDS elektroforézy (obr. 11).



Obr. 11: SDS elektroforéza frakcí po gelové filtraci NCC a NCN

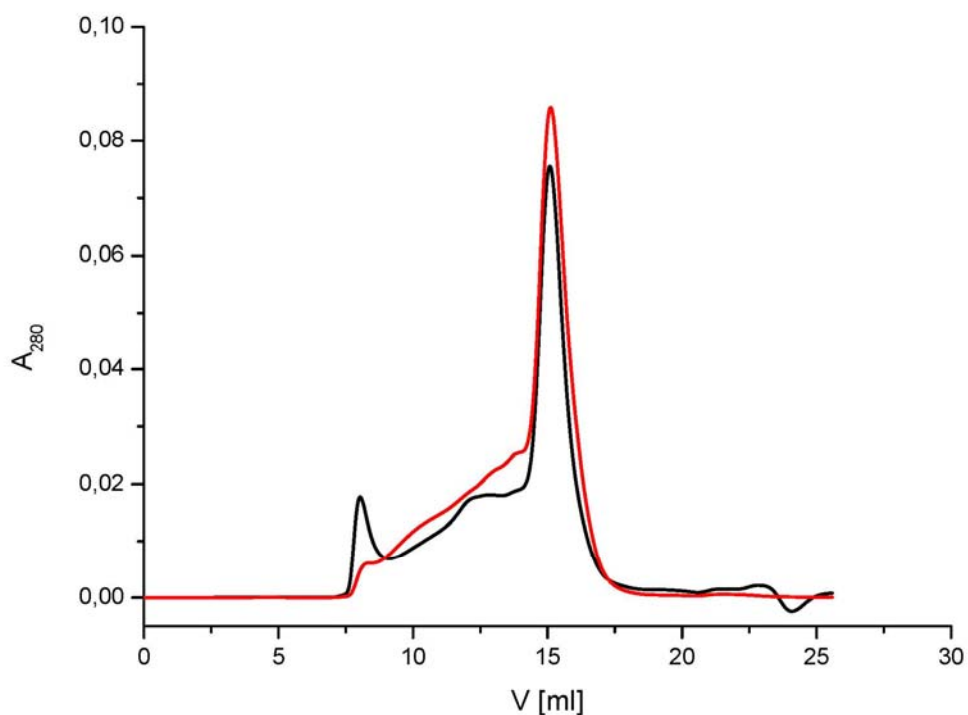
A) 1 - 5 frakce po gelové filtraci nitrilasy z *Neurospora crassa* s His-kotvou na C-konci

B) 1 - 7 frakce po gelové filtraci nitrilasy z *Neurospora crassa* s His-kotvou na N-konci.

Z obrázku 9 A je vidět, že nejvíce proteinu u NCC je obsaženo ve 2. a 3. frakci, která odpovídá středu elučního vrcholu. U čtvrté a páté frakce, odpovídající konečné části křivky je zastoupení proteinu zřetelně nižší. Na obr. 9 B je vidět, že u NCN je protein přítomný ve velkém množství ve většině frakcí. Nejvíce pak ve frakcích 3 až 5 odpovídajících středu elučního vrcholu.

5.3. Srovnání purifikace nitrilas v redukujícím a neredukujícím prostředí

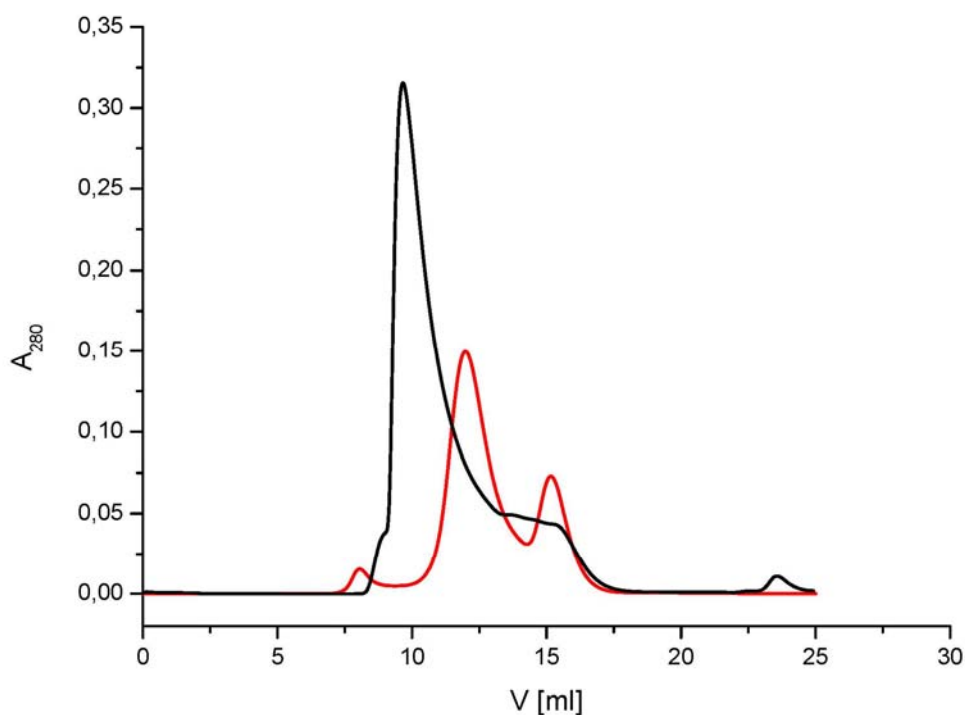
Dalším cílem bylo srovnání vlivu redukujícího a neredukujícího prostředí na kvartérní strukturu proteinu. Jednotlivé purifikační kroky zůstaly v obou případech totožné s izolací a purifikací nitrilas v redukujícím prostředí. Jediným rozdílem byla absence všech redukujících činidel při purifikaci v neredukujícím prostředí (DTT při izolaci buněk a β -ME ve všech pufrech). Finální krokem separace byla gelová filtrace na koloně Superdex 200 10/300 GL (obr. 12, str. 34). U redukujícího prostředí byl ke vzorku nitrilasy před nástřikem na gelovou filtraci přidán 10 mM β -ME. Po přibližné 30 min inkubaci byl vzorek nastříknut na kolonu Superdex 200 10/300 GL (obr. 13, str. 35). Jako mobilní fáze byl v tomto případě použit HEPES puf.



Obr. 12: Chromatogram NCC z gelové filtrace v redukujícím a neredukujícím prostředí

Porovnání chromatogramů nitrilas z *Neurospora crassa* s His-kotvou na C-konci v neredukujícím (červená) a redukujícím (černá) prostředí. Použitá kolona: Superdex 200 10/300 GL, průtok 0,5 ml/min.

Rozdíl u nitNCC mezi redukovanou a neredukovanou formou není příliš velký. Nicméně z obr. 12 můžeme vidět, že v neredukujícím prostředí dochází k eliminaci prvního elučního vrcholu a mírnému nárůstu hlavního elučního vrcholu.



Obr. 13: Chromatogram NCN z gelové filtrace v redukujícím a neredukujícím prostředí

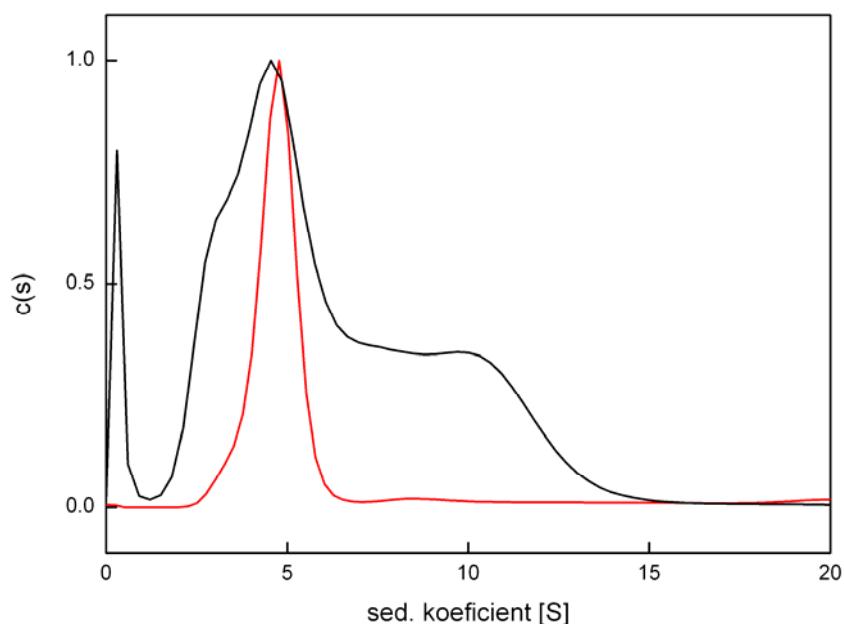
Porovnání chromatogramů nitrilasy z *Neurospora crassa* s His-kotvou na N-konci v neredukujícím (červená) křivka a redukujícím (černá) prostředí. Použitá kolona: Superdex 200 10/300 GL, průtok 0,5 ml/min.

U nitrilasy z NCN je zřetelný rozdíl mezi redukovanou a neredukovanou formou. U redukované formy je vidět jeden eluční vrchol odpovídající oligomerům. Oproti tomu u neredukované formy je rovnováha posunuta spíše k dimerní formě.

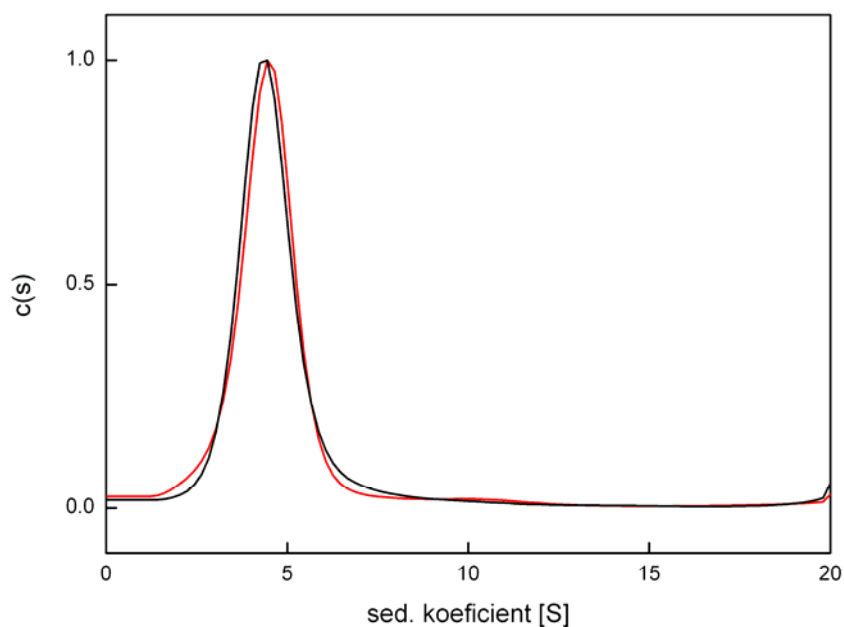
5.4. Sedimentační analýza

Nitrilasy NCN i NCC byly analyzovány pomocí analytické ultracentrifugace metodou sedimentační rychlosti, a to jak v neredukované, tak v redukované formě. Zatímco neredukovaná nitrilasa NCN vytváří v roztoku směs oligomerů (monomer-dimer-hexamer), po redukci se v roztoku nachází již výlučně ve formě dimeru (obr. 14, str. 36) o velikosti

sedimentačního koeficientu $s_{20,w} = 4,93$ S. U nitrilasy NCC pak byl v neredukujícím i v redukujícím prostředí pozorován pouze dimer o velikosti sedimentačního koeficientu $s_{20,w} = 4,6$ S, resp. $s_{20,w} = 4,7$ S (obr. 15).



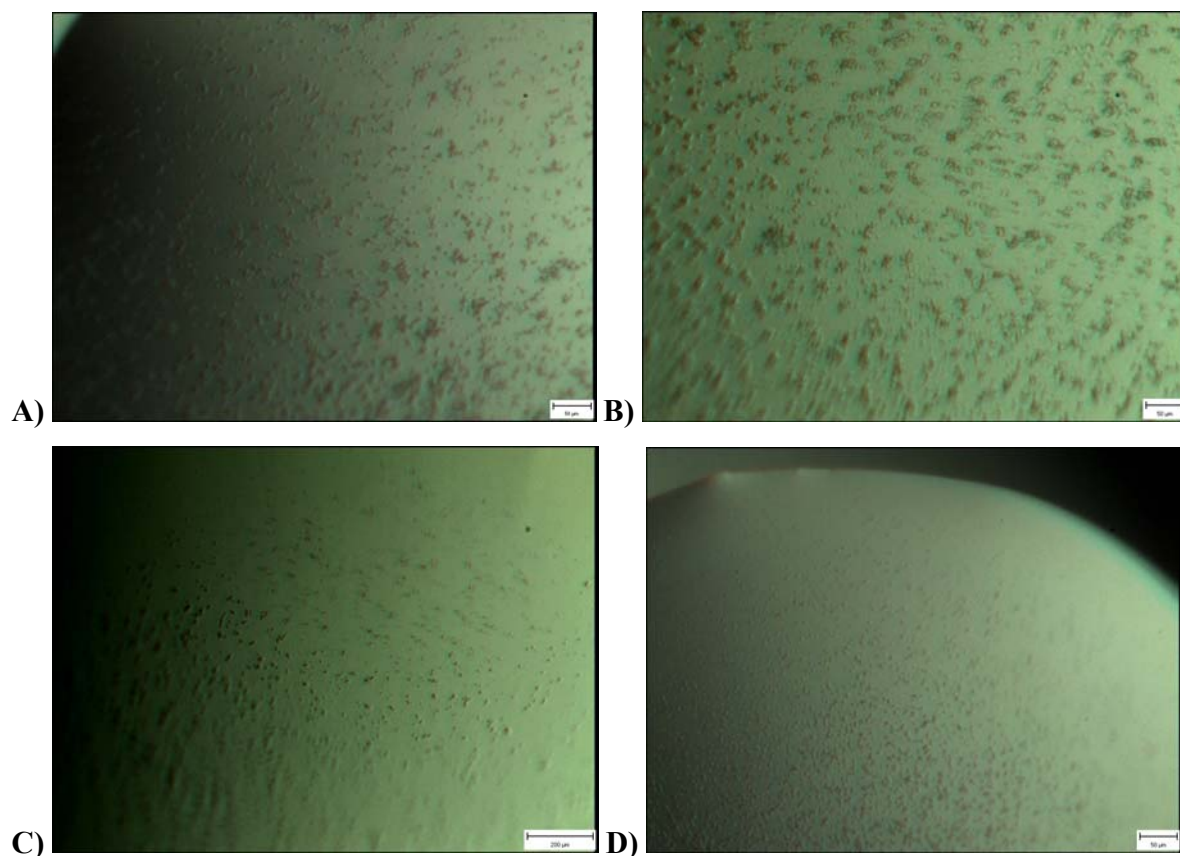
Obr. 14: Sedimentační analýza NCN. Normalizovaná distribuce sedimentačních koeficientů pro neredukovanou a redukovanou nitrilasu z *Neurospora crassa* s His-kotvou na N-konci.



Obr. 15: Sedimentační analýza NCC. Normalizovaná distribuce sedimentačních koeficientů pro neredukovanou a redukovanou nitrilasu z *Neurospora crassa* s His-kotvou na C-konci.

5.5. Krystalizace

S vypurifikovanými proteiny nitNCN o koncentraci 17 mg/ml a nit NCC o koncentraci 12 mg/ml byly nasazeny krystalizační experimenty s komerčními sadami krystalizačních vzorků srážedel na BTÚ AV ČR.



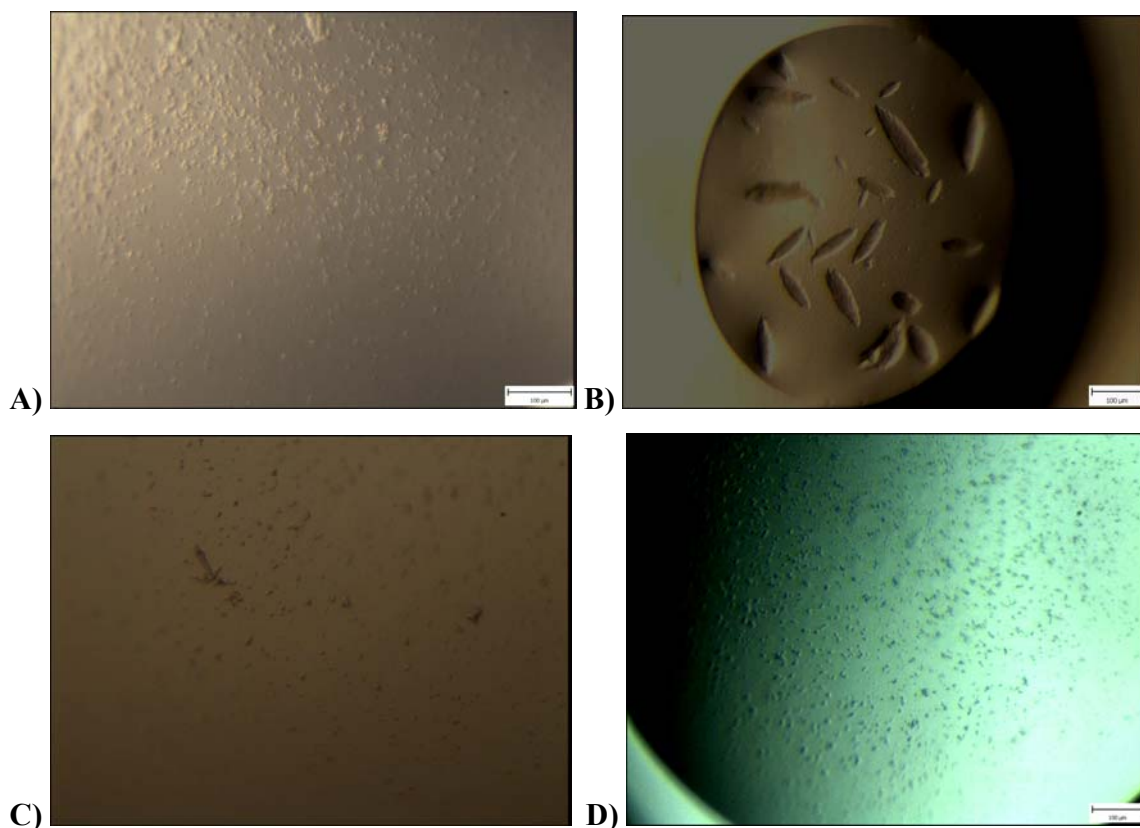
Obr. 16: Snímky krystalizačních kapek NCN po 2 měsících od nasazení.

A) 0,1 M Tris pH 8,5, 2,0 M dihydrogenfosforečnan amonný; 150 nl protein + 300 nl rezervoár

B) 0,1 M Tris pH 8,5, 8% PEG 8000; 200 nl protein + 100 nl rezervoár

C) 0,5 M síran amonný, 0,1M Tris pH 7,0, 30% (v/v) PEG 600, 10% (v/v) glycerol; 200 nl protein + 100 nl rezervoár

D) 2,0 M síran amonný; 150 nl protein + 150 nl rezervoár.



Obr. 17: Snímky krystalizačních kapek NCC po 6 týdnech od nasazení.

A) 0,8 M dihydrogenfosforečnan sodný /0,8 M dihydrogenfosforečnan draselný, 0,1 M HEPES pH 7,5; 200 nl protein + 100 nl rezervoár

B) 0,1 M citrát pH 5,6, 20% *iso*-propanol/20% PEG 4000; 200 nl protein + 100 nl rezervoár.

C) 0,26 M dihydrogenfosforečnan amonný, 35% glycerol; 100 nl protein + 200 nl rezervoár.

D) 1,6 M dihydrogenfosforečnan amonný, 0,08 M Tris pH 8,5, 20% glycerol;
150 nl protein + 150 nl rezervoár.

Z obrázků obou proteinů je patrné, že se dosud nepodařilo najít ideální krystalizační podmínku. Na všech obrázcích je zřetelný granulární precipitát, na obr. 17 B můžeme pozorovat vysychající separaci fázi.

6. Diskuse

- **Rekombinantní exprese nitrilasy z *Neurospora crassa* s histidinovou kotvou na C- a N-konci v bakteriálním expresním systému.**

Jako expresní systém byly použity buňky *E. coli* BL 21 Gold. Tyto buňky vykazovaly poměrně snadnou a rychlou produkci navíc s dobrým výtěžkem. Jelikož u těchto buněk často dochází k produkci proteinu s nesprávně spojenými disulfidickými můstky, byly jako další expresní systém vyzkoušeny buňky *E. coli* Shuffle T7 Express, u kterých je tvorba disulfidických můstků podpořena delecí genů reduktas *trxB* a *gor* a zavedením genu pro disulfid-isomerasu DsbC. Kromě nižšího výtěžku a podstatně delší doby produkce nebyl při použití buněk kmene Shuffle pozorován žádný rozdíl v produkci proteinů. Proto byly pro purifikaci použity pouze proteiny produkované v *E. coli* BL 21 Gold.

- **Izolace enzymů a optimalizace jejich purifikace v redukujícím prostředí.**

U obou nitrilas byl zvolen stejný postup purifikace, který původně začínal chelatační chromatografií na nosiči Talon s následným zakoncentrováním a převedením do pufru A (používaného jako mobilní fáze při gelové filtraci) pomocí centrifugace. Poté následovala gelová filtrace. Po provedení kontrolních SDS elektroforéz po chelatační chromatografii a gelové filtraci bylo zjištěno, že přečištění proteinů je nedostatečné a byl přidán další separační krok, a to chromatografie na iontoměniči. Porovnáním chromatogramů z chromatografie na iontoměniči a gelové filtrace se ukázalo, že v průběhu purifikace dochází k mnohonásobnému snížení výtěžku proteinu, a při posouzení SDS elektroforéz po jednotlivých separačních krocích bylo patrné, že ke ztrátám dochází během chelatační chromatografie a následného zakoncentrovávání před nástřikem na gelovou filtraci. Ztráty způsobené precipitací proteinu, byly pravděpodobně způsobeny dlouhým působením imidazolu, kterému byl protein vystaven během těchto dvou kroků, což mohlo být i negativně podpořeno zvyšováním koncentrace proteinu během zakoncentrovávání před nástřikem na gelovou filtraci.

Negativní vliv imidazolu na protein, podporující jeho precipitaci byl eliminován změnou

provedení chelatační chromatografie. Použitím kolony Protino Ni–NTA se dvěma bezprostředně připojenými odsolovacími kolonkami HiTrap došlo ke snížení doby kontaktu imidazolu s proteinem na nezbytné minimum, což ve výsledku vedlo k jeho větší stabilitě a lepšímu výtěžku. Další modifikací postupu bylo přidání inhibitorů cysteinových, threoninových a serinových proteas ke vzorku během izolace nitrilasy z buněk. U tohoto kroku však nebyl zaznamenán žádný výraznější (ať už pozitivní nebo negativní) efekt na protein.

- **Porovnání kvartérní struktury obou enzymů připravených v neredukujícím a redukujícím prostředí.**

Kromě eliminace veškerých redukujících činidel (použití DTT při izolaci proteinů z buněk a přítomnost β -ME ve všech pufrech) zůstal postup purifikace v neredukujícím prostředí nezměněn. Při purifikaci v redukujícím prostředí byl před provedením gelové filtrace k proteinu přidán 10 mM β -ME, s kterým byl vzorek ponechán 30 min inkubovat. Jako mobilní fáze při gelové filtraci nesloužil pufr A, ale HEPES pufr s 5 mM β -ME. Při porovnání chromatogramů z gelové filtrace je větší rozdíl mezi redukovanou a neredukovanou formou patrný u nitNCN. U redukované formy je zřetelný jeden hlavní eluční vrchol, který svým retenčním objemem odpovídá oligomerní formě enzymu. Oproti tomu u neredukované formy vidíme i menší eluční vrchol, naznačující přítomnost dimeru.

U nitNCC je rozdíl mezi oběma formami poměrně malý a v obou případech se nitrilasa nachází především ve formě dimeru. Oproti tomu je velice výrazný rozdíl mezi tímto chromatogramem a chromatogramem z izolace a purifikace nitNCC v redukujícím prostředí (srovnej obr. 10, str. 32 a obr. 13, str. 35). Tento rozdíl mohl být způsoben rozdílnou dobou působení redukujících činidel na protein. Při izolaci a purifikaci v redukujícím prostředí (chromatogram na obr. 10, str. 32) byla doba kontaktu redukujících činidel s enzymem během celého postupu (3 dny). Naopak při druhém postupu, byl protein během celé doby izolace a purifikace udržován v neredukujícím prostředí a k přidání redukčního činidla došlo až bezprostředně před nástřikem na gelovou filtraci. Dalším faktorem, který mohl mít vliv rozdílný tvar elučních profilů je menší koncentrace nitNCC připravené v neredukujícím prostředí během nástřiku na gelovou filtraci. Při větší koncentraci NCC (připravené

v redukujícím prostředí) pravděpodobně dochází k zvýšené tvorbě oligomerů a agregátů patrných na chromatogramu na obr. 10, str. 32.

- **Sedimentační analýza**

Výsledky sedimentační analýzy nitNCC jsou v souladu s předešlým pozorováním během gelové filtrace. Jak zredukovaný, tak nativní enzym se v roztoku nachází výhradně ve formě dimeru (pro sedimentační analýzu byla použita frakce odpovídající maximu elučního vrcholu a tím k odstranění menšího množství oligomerních či zagregovaných forem proteinu - viz obr. 15, str. 36). Na to, že se protein nachází v roztoku ve formě dimeru lze usuzovat na základě porovnání jeho změřené hodnoty sedimentačního koeficientu a teoretické hodnoty sedimentačního koeficientu odpovídajícího částici tvaru koule o hmotnosti buď monomeru, nebo dimeru nitNCC. Pokud je experimentálně určená hodnota sed. koeficientu vyšší než maximální teoreticky možná hodnota pro částici o hmotnosti monomeru (pro nitNCC je to přibližně 3,5 S), znamená to, že protein asociuje a tvoří např. dimer (teoretická max. hodnota pro nitNCC je přibližně 5,3 S). Podíl experimentální a teoretické hodnoty S pro částici dané hmotnosti pak odpovídá její asymetrii - jak moc je její tvar odlišný od koule. V našem případě lze říci, že nitNCC se v roztoku nachází jako dimer mírně protáhlého tvaru (rotační elipsoid o rozměrech cca 5×10 nm).

Sedimentační analýza nitNCN naznačuje, že zatímco v redukujícím prostředí se nitrilasa opět nachází ve formě dimeru, v nativních podmínkách tvoří také vyšší oligomery. Toto pozorování je však v kontrastu s výsledky z gelové filtrace, které jsou prakticky přesně opačné. Příčina odlišného chování enzymu během těchto dvou stanovení není známa.

- **Enzymová aktivita**

U obou enzymů byla měřena enzymová aktivita k fenylacetonitrilu na MBÚ AV ČR. Bohužel ani u jednoho proteinu nebyla naměřena žádná enzymová aktivita. Tento výsledek byl velmi pravděpodobně způsoben příliš nízkou koncentrací enzymu ve vzorku, což mohlo být způsobeno precipitací, která byla během optimalizace purifikace nitNCN i nitNCC často

pozorována a obecně lze na základě těchto zkušeností říci, že připravované nitrilasy se jeví jako proteiny poměrně nestálé a náchylné k agregaci ať už při zakoncentrovávání, nebo při delším skladování v chladu, rovněž zmrazení roztoku enzymu vede k jeho kompletnímu vysrážení.

- **Hmotnostní a Ramanova spektroskopie**

Obě nitrilasy byly dále analyzovány pomocí hmotnostní a Ramanovy spektroskopie. Z důvodu rychlé tvorby agregátů, kterou vykazovaly oba enzymy během jakéhokoliv delšího skladování a v důsledku příliš nízké koncentrace nebylo možné data z těchto měření uspokojivě vyhodnotit ani u jednoho z proteinů.

- **Krystalizace**

S oběma nitrilasami byly ihned po purifikaci nasazeny krystalizační kapky v rozdílných koncentracích, pro nitNCN 17 mg/ml a u nitNCC 12 mg/ml. Po 2 měsících krystalizace u nitNCN (6 týdnů u nitNCC) se zatím nepovedlo najít krystalizační podmínku, která by vedla ke vzniku krystalů. Jako podmínky, které by v budoucnu mohly vést k úspěšné krystalizaci proteinu se jeví různé kombinace dihydrogenfosforečnanu amonného nebo síranu amonného s Tris pufrem.

7. Závěr

- Byly připraveny rekombinantní nitrilasy nitNCC a nitNCN v *E. coli* BL 21 Gold.
- Byla optimalizována izolace a purifikace obou proteinů v redukujícím i neredukujícím prostředí
- Byla provedena sedimentační analýza připravených enzymů
- Byly nasazeny krystalizační kapky s nitNCC i nitNCN

8. Použitá literatura

- 1 K. V. Thimann a S. Mahadevan, *Arch. Biochem. Biophys.* **105** (1), 133 (1964).
- 2 W. G. Robinson a R. H. Hook, *J. Biol. Chem.* **239** (12), 4257 (1964).
- 3 J. C. Hsu a N. D. Camper, *Soil Biol. Biochem.* **11** (1), 19 (1979).
- 4 E. Walters a D. A. Thimann, *Emerg. Med. J.* **30** (4), 343.
- 5 M. Piotrowski, *Phytochemistry* **69** (15), 2655 (2008).
- 6 R. Jenrich, I. Trompetter, S. Bak a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** (47), 18848 (2007).
- 7 Y. Pekarsky, M. Campiglio, Z. Siprashvili a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95** (15), 8744 (1998).
- 8 H. C. Pace a C. Brenner, *Genome Biology* **2** (1) (2001).
- 9 M. Kobayashi, H. Komeda, N. Yanaka a kol., *J. Biol. Chem.* **267** (29), 20746 (1992).
- 10 S. Vorwerk, S. Biernacki, H. Hillebra a kol., *Planta* **212** (4), 508 (2001).
- 11 M. Piotrowski, S. Schonfelder, a E. W. Weiler, *J. Biol. Chem.* **276** (4), 2616 (2001).
- 12 R. T. Baker a A. Varshavsky, *J. Biol. Chem.* **270** (20), 12065 (1995).
- 13 J. Hymes a B. Wolf, *Clin. Chim. Acta* **255** (1), 1 (1996).
- 14 G. Pitari, F. Malergue, F. Martin a kol., *FEBS Lett.* **483** (2-3), 149 (2000).
- 15 K. L. Kvalneskrick a T. W. Traut, *J. Biol. Chem.* **268** (8), 5686 (1993).
- 16 T. Nakai, T. Hasegawa, E. Yamashita a kol., *Struct. Fold. Des.* **8** (7), 729 (2000).
- 17 H. C. Pace a C. Brenner, *Genome Biology* **2** (1), 9 (2001).
- 18 C. Brenner, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12** (6), 775 (2002).
- 19 B. T. Sewell, M. N. Berman, P. R. Meyers a kol., *Structure* **11** (11), 1413 (2003).
- 20 K. C. Dent, B. W. Weber, M. J. Benedik a kol., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82** (2), 271 (2009)
- 21 D. M. Jandhyala, R. C. Willson, B. T. Sewell a kol., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68** (3), 327 (2005).
- 22 T. Nagasawa, M. Wieser, T. Nakamura a kol., *Eur. J. Biochem.* **267** (1), 138 (2000).
- 23 D. B. Harper, *Biochemical Journal* **165** (2), 309 (1977).

- 24 H. C. Pace, S. C. Hodawadekar, A. Draganescu a kol., *Current Biology* **10** (15), 907
(2000).
- 25 B. C. M. Fernandes, C. Mateo, C. Kiziak a kol., *Adv. Synth. Catal.* **348** (18), 2597
(2006).
- 26 J. S. Gong, Z. M. Lu, H. Li a kol., *Microbial Cell Factories* **11**.
- 27 R. N. Thuku, D. Brady, M. J. Benedik a kol., *Journal of Applied Microbiology* **106** (3),
703 (2009).
- 28 A. Banerjee, R. Sharma, a U. C. Banerjee, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60** (1-2), 33
(2002).
- 29 S. Osswald, H. Wajant, a F. Effenberger, *Eur. J. Biochem.* **269** (2), 680 (2002).
- 30 D. S. Williamson, K. C. Dent, B. W. Weber a kol., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88** (1),
143.
- 31 C. Kiziak, D. Conradt, A. Stolz a kol., *Microbiology-(UK)* **151**, 3639 (2005).
- 32 C. S. Zhang, Z. J. Zhang, C. X. Li a kol., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95** (1), 91.
- 33 M. Barclay, V. A. Tett, a C. J. Knowles, *Enzyme Microb. Technol.* **23** (5), 321 (1998).
- 34 J. Chen, R. C. Zheng, Y. G. Zheng a kol., v *Biotechnology in China I: from Bioreaction
to Bioseparation a Bioremediation* (Springer-Verlag Berlin, Berlin, 2009), Vol. 113, pp.
33.
- 35 A. B. Veselá, M. Franc, H. Pelantová a kol., *Biodegradation* **21** (5), 761.
- 36 L. Martinková, B. Uhnaková, M. Pátek a kol., *Environ. Int.* **35** (1), 162 (2009).
- 37 X. B. Xu, J. P. Lin, a P. L. Cen, *Chin. J. Chem. Eng.* **14** (4), 419 (2006).
- 38 M. Shen, Y. G. Zheng, a Y. C. Shen, *Process Biochemistry* **44** (7), 781 (2009).
- 39 T. Nagasawa, T. Nakamura, a H. Yamada, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34** (3), 322
(1990).
- 40 K. Rashmi, J. N. L. Latha, T. N. Sowjanya a kol., *Curr. Sci.* **85** (12), 1670 (2003).
- 41 D. D. Perkins, *Genetics* **130** (4), 687 (1992); D. K. Asch, G. Frederick, J. A. Kinsey a
kol., *Genetics* **130** (4), 737 (1992); D. F. Eberl, L. A. Perkins, M. Engelstein a kol.,
Genetics **130** (3), 569 (1992).
- 42 N. B. Raju, *J. Biosci.* **34** (1), 139 (2009).
- 43 G. N. Bistis, *Mycologia* **73** (5), 959 (1981).
- 44 N. B. Raju, *Eur. J. Cell Biol.* **23** (1), 208 (1980).

- 45 O. Vaněk a K. Bezouška, *Chem. Listy* **104** (12), 1155.
- 46 Program SENDTERP, dostupné z: <http://www.jphilo.mailway.com/default.htm>
(4.3.2014)
- 47 P. Schuck, *Biophys. J.* **78** (3), 1606 (2000)., program dostupný z:
<http://www.analyticalultracentrifugation.com/default.htm> (4.3.2014)
- 48 Fungal Genetics Stock Center <http://www.fgsc.net/Neurospora/sectionB2.htm>
(1.5. 2014)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka