

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Příprava rozpustné formy myšního Nkr-p1a proteinu pro NMR analýzu

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Josef Chmelík, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Eliška Pospíšilová

Vypracoval: Kristián Skála

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele Mgr. Josefa Chmelíka, Ph.D. a konzultantky Mgr. Elišky Pospíšilové a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne

Kristián Skála

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat Mgr. Josefu Chmelíkovi, Ph.D. za možnost pracovat na této bakalářské práci. Dále bych chtěl poděkovat své konzultantce Mgr. Elišce Pospíšilové za trpělivost, ochotu a všechny praktické rady při řešení práce. V neposlední řadě děkuji také ostatním členům laboratoře za příjemné pracovní prostředí, a Mgr. Zdeňkovi Kukačkovi za provedení hmotnostní spektrometrie. Na závěr děkuji své rodině a přátelům za neustálou podporu v době mého studia.

Abstrakt

Přirození zabíječi (NK buňky) patří mezi lymfocyty a funkčně jsou definováni jako buňky schopné cytotoxicky usmrtit cílové buňky bez předchozí senzibilizace.

Jednou z rodin povrchových receptorů NK buněk je rodina NKR-P1. Členové této rodiny patří mezi receptory C-lektinového typu, přičemž některé plní funkci aktivační a jiné inhibiční. Rozpustná forma myšího proteinu Nkr-p1a je izoformou aktivačního receptoru Nkr-p1a. V jeho aminokyselinové sekvenci chybí významná část transmembránové domény, proto je vysoká pravděpodobnost jeho výskytu v cytoplazmě.

Tato práce se zaměřuje na optimalizaci podmínek produkce rozpustné formy myšího Nkr-p1a proteinu v bakteriálním kmeni *E. coli* BL21(DE3) Gold, jeho izolaci ve formě inkluzních tělísek a purifikaci pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Byla optimalizována koncentrace induktoru exprese, doba a teplota produkce. Cílem optimalizace pracovního postupu je jeho využití pro přípravu izotopově značeného proteinu pro strukturní studium metodou nukleární magnetické rezonance.

Abstract

Natural killer cells (NK cells) are a type of lymphocyte. According to their function they are defined as cytotoxic cells which cause cell death without prior sensitization.

NKR-P1 is one of the families of NK surface receptors. This family belong to C-type lectin like with inhibitory or activatory function. In this work we concern of soluble form of mouse protein Nkr-p1a, that is isoform of activatory receptor Nkr-p1a. This receptor is expected to be intracellular due to lack of major part of its transmembrane domain.

We focus on the optimization of Nkr-p1a production parameters. As production system we used bacterial strain *E. coli* BL21(DE3) Gold, in which the target protein is produced and subsequently isolated in the form of inclusion bodies. Obtained recombinant protein was refolded and purified. As purification step we used high-performance liquid chromatography. We optimized concentration of inductor of expression, production time and temperature. The objective is to set up protocol for preparation of isotopically labeled protein for nuclear magnetic resonance structure characterization.

(in czech)

Obsah

Seznam zkratk.....	7
1. Úvod.....	8
1.1. Imunitní systém.....	8
1.2. Buňky imunitního systému.....	9
1.3. NK buňky a jejich funkce.....	10
1.3.a) Mechanismus cytotoxicity.....	11
1.4. Receptory NK buněk.....	11
1.4.a) Rozpoznávací mechanismy NK buněk.....	11
1.5. Rodina NKR-P1 receptorů.....	12
1.5.a) Receptor Nkr-p1a.....	13
1.6. Rozpustná forma myšního proteinu Nkr-p1a (Nkr-p1a izoforma 2).....	14
2. Cíle práce.....	15
3. Materiál.....	16
3.1. Přístroje a pomůcky.....	16
3.2. Chemikálie.....	17
3.3. Roztoky a pufry.....	18
3.3.a) Zásobní roztoky.....	19
3.4. Média.....	20
3.5. Bakteriální kmen.....	20
3.6. Vektor.....	20
4. Metody.....	21
4.1. Transformace kompetentních buněk.....	21
4.1.a) Příprava LB média.....	21
4.1.b) Příprava misky s LB agarem.....	21
4.1.c) Příprava M9 minimálního média (M9MM).....	21
4.2. Výběr vhodných produkčních klonů.....	22
4.2.a) Ověření aminokyselinové sekvence produkovaného proteinu.....	22
4.3. Optimalizace podmínek pro produkci proteinu.....	22
4.3.a) Optimalizace koncentrace induktoru exprese.....	23
4.3.b) Optimalizace doby produkce po indukci exprese.....	23
4.3.c) Optimalizace teploty při produkci po indukci exprese.....	23
4.3.d) Zpracování vzorků po produkcích.....	23
4.4. Produkce ve velkém objemu.....	23
4.4.a) Růstová křivka.....	24
4.5. Izolace inkluzních tělísek z buněčného lyzátu.....	24
4.6. Renaturace rekombinantního proteinu.....	25
4.6.a) Reálná hmotnost inkluzních tělísek.....	25
4.7. Gelová permeační chromatografie.....	25

4.8. Iontově výměnná chromatografie.....	26
4.9. Stanovení koncentrace proteinu.....	27
4.9.a) Metoda stanovení koncentrace proteinu dle Bradforda.....	28
4.9.b) Metoda stanovení koncentrace proteinu BCA.....	28
4.10. SDS elektroforéza.....	29
4.10.a) Příprava gelů.....	29
4.10.b) Příprava pevných vzorků.....	29
4.10.c) Příprava kapalných vzorků.....	30
4.10.d) Vizualizace gelů - CBB R-250.....	30
4.10.e) Vizualizace gelů - Barvení stříbrem.....	30
5. Výsledky.....	31
5.1. Transformace kompetentních buněk a výběr vhodných produkčních klonů.....	31
5.1.a) Ověření aminokyselinové sekvence produkovaného proteinu.....	31
5.2. Optimalizace podmínek pro produkci proteinu.....	32
5.3. Produkce ve velkém objemu, izolace inkluzních tělísek.....	33
5.3.a) Růstová křivka.....	33
5.3.b) Vliv koncentrace glukosy na rychlost růstu kultury v M9MM.....	34
5.4. Renaturace proteinu.....	35
5.5. Purifikace rekombinantního proteinu.....	37
6. Diskuze.....	42
7. Závěr.....	44
8. Použitá literatura.....	45

Seznam zkratek

APS	peroxodisíran amonný (Amonium Persulfate)
Clr	proteiny asociované s C-lektinovými receptory (C-Lektin Related Protein)
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CD16	receptor vázající těžké řetězce protilátek (Cluster of Differentiation 16)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
IFN	interferon
Ig	protilátka (Immunoglobulin)
IL	interleukin
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Kan	kanamycin
KIR	receptor imunoglobulinového typu (Killer cell Immunoglobulin-like Receptors)
LLT1	lidský lektinový protein (Lectin-Like Transcript 1)
Ly-49	rodina C-lektinových receptorů
M9MM	M9 minimální médium
MHC gp	glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu (Major Histocompatibility Complex)
NK	přirozený zabíječ (Natural Killer)
NKR-P1	rodina C-lektinových receptorů (Natural Killer Receptor-Protein 1)
NMWL	limitní molekulová hmotnost (Nominal Molecular Weight Limit)
OD	optická denzita
SDS	dodecylsírán sodný (Sodium Dodecyl Sulfate)
Tet	tetracyklin

1. Úvod

1.1. Imunitní systém

Imunitní systém obratlovců je velmi složitý. Chrání organismus před škodlivými látkami a podílí se na udržování stálého vnitřního prostředí. Základní funkce imunitního systému jsou obranyschopnost, autotolerance a imunitní dohled. Obranyschopnost organismu je umožněna mimo jiné jeho schopností rozpoznat širokou škálu vnějších škodlivin včetně patogenních mikroorganismů. Mikroorganismy jsou rozpoznávány podle charakteristické stavby buněčné stěny (obsahující lipopolysacharidy a peptidoglykany) nebo typických produktů jejich metabolismu. Další velice důležitou funkcí imunitního systému je takzvaná autotolerance. Ta spočívá ve schopnosti organismu rozpoznat tkáň tělu vlastní, čímž brání vzniku autoimunitní reakce. Třetí neméně důležitou funkcí je imunitní dohled, jenž zajišťuje rozpoznání vnitřních škodlivin (např. starých, poškozených nebo zmutovaných buněk), které jsou buňkami imunitního systému průběžně odstraňovány. [1]

Imunitní mechanismy jsou obvykle děleny dle jejich specifity na mechanismy nespecifické (přirozená / vrozená imunita) a mechanismy specifické (získaná / adaptivní imunita). Obě tyto složky vzájemně spolupracují a jsou nezbytné pro přežití živočicha. [1]

Vrozená imunita je založena na přítomnosti molekul a buněk, které jsou schopné reagovat na široké spektrum patogenních látek na základě jejich určitých společných rysů, mohou to být například molekulové vzory asociované s patogeny, případně molekulové vzory asociované s poškozením [2]. Jelikož jsou složky zajišťující nespecifickou obranu trvale přítomné v tkáních, je jejich efekt velmi rychlý (odpověď v řádu minut).

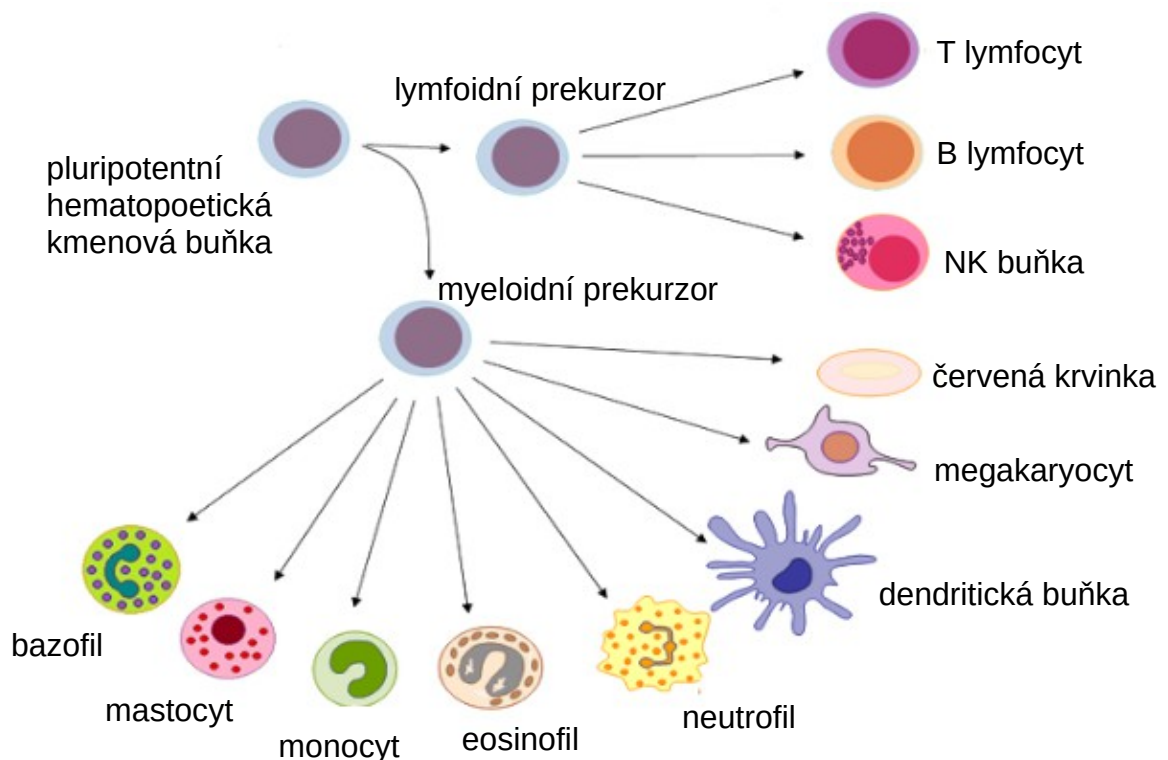
Buněčné systémy vrozené imunity jsou reprezentovány převážně fagocytujícími buňkami myeloidní linie a přirozenými zabíječi (NK buňkami z angl. Natural Killer; Kap. 1.3) lymfoidní linie. Humorální složky jsou tvořeny systémem sérových proteinů (interferony, lektiny, komplementový systém a jiné). [1]

Získaná imunita je evolučně mladší mechanismus přítomný pouze u obratlovců a je založena na interakci jejích receptorů se specifickými antigeny. Odpověď získané imunity je pomalejší (v řádech dnů) kvůli její klonální specifitě. Po aktivaci příslušné buňky specifické imunity dochází nejdříve k jejímu dělení a teprve dceřiné klony se stávají

buňkami efektorovými. Menší část dceřiných buněk nedozrává v buňky efektorové, ale stávají se z nich buňky paměťové. Ty jsou při opětovném výskytu daného antigenu schopny snazší a rychlejší přeměny v buňky efektorové, což zajišťuje rychlejší a razantnější odpověď organismu. Tento mechanismus se nazývá imunologická paměť a poskytuje organismu strategickou výhodu při opakovaném střetu s tímtež patogenem. Získaná imunita je reprezentována T lymfocyty, B lymfocyty, jejich antigenně specifickými receptory a protilátkami. [1, 3]

1.2. Buňky imunitního systému

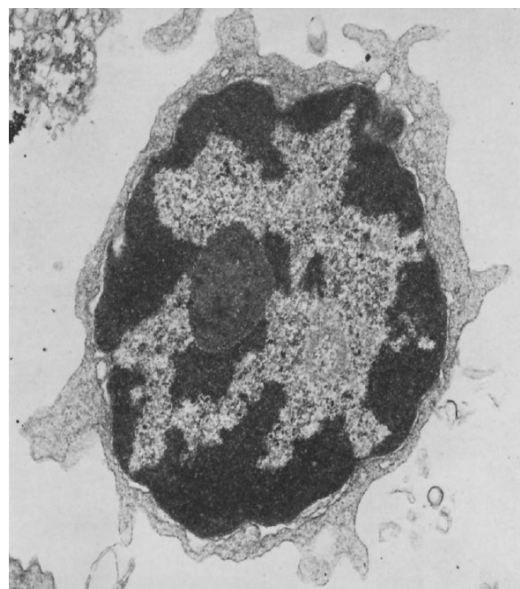
Buňky přirozené i adaptivní imunity vznikají z pluripotentních hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni. Diferencují se do dvou linií: myeloidní a lymfoidní (Obr. 1)



Obr 1. Diferenciace buněk z pluripotentních hematopoetických kmenových buněk [4]. Buňky myeloidní linie zprostředkovávají antigenně nespecifickou imunitní odpověď, zatímco buňky lymfoidní linie zajišťují antigenně specifickou odpověď. Výjimkou jsou NK buňky, které spadají do linie lymfoidní, ale zprostředkovávají antigenně nespecifickou imunitní odpověď.

1.3. NK buňky a jejich funkce

V roce 1973 byly definovány buňky ze skupiny lymfocytů postrádající typické receptory T a B buněk (Obr. 2) [5]. Skupina kolem R. Kiesslinga pak v roce 1975 poprvé pozorovala jejich cytolytickou aktivitu in vivo [6]. NK buňky jsou charakterizované jako lymfocyty podílející se na nespecifické obraně. Jejich významnou funkcí je cytolytická aktivita obdobná jako u cytotoxických T lymfocytů, ovšem s tou výhodou, že po aktivaci neprochází fází dělení a diferenciací. NK buňky patří do první obranné linie našeho imunitního systému a spolu s ostatními buňkami vrozené imunity zasahují přímo v místě infekce. [1]



Obr. 2: NK buňka pozorovaná elektronovým mikroskopem [5].

Funkce NK buněk není primárně řízena prostřednictvím antigenně specifických receptorů. NK buňky rozpoznávají řadu buněk (virem infikovaných, nádorových nebo jinak poškozených), vůči kterým vykazují cytolytickou aktivitu, která je regulována aktivačními a inhibičními receptory na jejich povrchu. Tyto receptory jsou podrobněji popsány v následující kapitole (Kap. 1.4). NK buňky zastávají důležité regulační mechanismy ovlivňující nespecifickou i specifickou imunitu a krvetvorbu. Jsou významnými producenty řady cytokinů (interferon gamma (IFN- γ), faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů, interleukin 3 (IL-3) a jiné), které přispívají k antigenně nespecifické aktivaci makrofágů a plní mnoho dalších regulačních funkcí [7]. Nejvíce prozkoumaný je IFN- γ , který organizuje mnoho buněčných programů obrany proti patogenům posílením imunitního dohledu a obranyschopnosti napadeného organismu. Také hraje důležitou roli při maturaci T lymfocytů [8]. Aktivita NK buněk je stimulována specifickými cytokiny (IL-2, IFN- α , IFN- β , IL-12, IL-18 a jiné) produkovanými ostatními buňkami imunitního systému, případně buňkami infikovanými patogenem [9]. Významnou úlohu v imunitní odpovědi hraje spolupráce NK buněk s buňkami dendritickými [10]. [1, 11]

1.3.a) Mechanismus cytotoxicity

NK buňky ničí cílové buňky pomocí cytotoxických granulí obsahujících proteiny perforiny a proteasy, zvané granzymy, které vyšle přímo do místa kontaktu s cílovou buňkou. Perforiny vytváří póry v buněčné membráně cílové buňky, skrz které procházejí granzymy. Uvnitř buňky indukují granzymy (serinové proteasy) apoptózu štěpením prekurzorů kaspasových proteas [12]. Případně může dojít působením perforinů k porušení integrity buněčné stěny a následné osmotické lýze buňky, a tím uvolnění patogenu do mezibuněčného prostoru. [1]

1.4. Receptory NK buněk

Receptory NK buněk lze na základě jejich struktury rozdělit do dvou skupin: imunoglobulinové receptory a C-lektinové receptory. V obou těchto skupinách jsou zastoupeny receptory inhibiční, konjugované s imunoreceptorovým tyrosinovým inhibičním motivem, a receptory aktivační, konjugované s imunoreceptorovým tyrosinovým aktivačním motivem. Cytotoxická aktivita NK buněk je regulována rovnováhou mezi inhibičními a aktivačními signály. [13, 14]

Imunoglobulinové receptory jsou transmembránové proteiny I typu (N-konec lokalizován vně buňky) a patří k nim například rodina KIR (z angl. Killer cell Immunoglobulin-like Receptors) nebo receptor CD16 (z angl. Cluster of Differentiation 16) (ve své extracelulární části mohou mít i více domén vázajících protilátky). C-lektinové receptory jsou transmembránové proteiny II typu (N-konec lokalizován v cytoplazmě). Tyto receptory ve většině případů tvoří homodimery spojené disulfidickými můstky. Jejich extracelulární část nese C-lektinovou doménu typickou pro celou skupinu těchto receptorů. Mezi C-lektinové receptory NK buněk patří například rodina lymfocytových antigenů 49 (Ly-49), vyskytující se u hlodavců, a rodina NKR-P1 (z angl. Natural killer receptor-protein 1), čítající několik forem u hlodavců a doposud pouze jednu známou u člověka. [15, 16]

1.4.a) Rozpoznávací mechanismy NK buněk

Aktivita NK buněk je řízena receptory rozeznávajícími specifické ligandy. K významnějším ligandům patří glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC gp) I třídy, které na svém povrchu exprimují všechny jaderné buňky organismu.

Prostřednictvím MHC gp I třídy vystavují buňky na svém povrchu peptidové fragmenty vlastního proteomu. Při některých virových infekcích, nebo nádorových bujeních dochází ke snížení exprese těchto glykoproteinových komplexů. NK buňky jsou schopné kontrolovat hustotu MHC gp na povrchu okolních buněk, je-li jejich zastoupení na povrchu cílové buňky příliš nízké nebo pokud tyto komplexy zcela chybí, NK buňka vyvolá programovanou buněčnou smrt takové buňky. Mechanismus této aktivace je označován jako rozpoznání na základě úbytku struktur pro tělo vlastních (z angl. missing-self recognition) [17, 18]. K aktivaci NK buněk může dojít i v případě, že se na povrchu cílové buňky vyskytuje vyšší hustota MHC gp I třídy, než je obvyklé na zdravých buňkách. Tento mechanismus bývá nazýván rozpoznání podle přebytku struktur pro tělo vlastních (z angl. induced-self recognition). [9, 19]

Funkce NK buněk jsou řízeny i mechanismy nezávislými na signalizaci prostřednictvím MHC gp (anglicky označovanými jako "MHC-independent recognition"). Řízení aktivity NK buněk pomocí těchto signálů je regulováno obdobnými mechanismy jako v případě MHC gp. [20]

Speciální funkci zastává imunoglobulinový receptor CD16, který rozpoznává těžké řetězce protilátek IgG. Díky tomu jsou NK buňky schopné usmrtit buňky opsonizované IgG a částečně se tak podílet na funkci specifické imunity. Tento mechanismus aktivace je označován jako buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách. [21, 22]

1.5. Rodina NKR-P1 receptorů

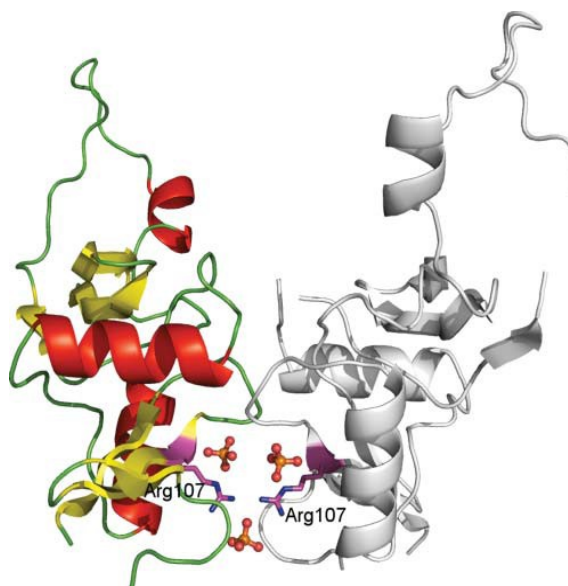
Jedná se o jednu z prvních objevených rodin receptorů NK buněk. Nejvíce forem receptorů této rodiny bylo doposud identifikováno u myši. Dnes je známo 6 jejích členů: Nkr-p1a, b, c, d, f a g [23, 24, 25]. Prvním identifikovaným členem této rodiny u myši byl receptor Nkr-p1c, který je používán jako povrchový znak k odlišení NK buněk od T a B lymfocytů [26]. Cytoplazmatická doména proteinů Nkr-p1b a d obsahuje imunoreceptorový tyrosinový inhibiční motiv [20]. Nkr-p1a, c a f tento inhibiční motiv neobsahují a jsou řazeny mezi receptory aktivační [27]. Funkce receptoru Nkr-p1g nebyla zatím zcela objasněna. V NK genovém komplexu (část genomu nesoucí informaci o receptorech NK buněk) je mimo jiné přítomen gen kódující Nkr-p1e, ten ale není překládán do proteinové sekvence - je to takzvaný pseudogen. [24]

Ligandy vázající se na NKR-P1 receptory jsou ze skupiny proteinů asociovaných s C-lektinovými receptory (Clr). Jejich biologická funkce zatím není zcela objasněna, ale v zásadě zprostředkovávají rozpoznání abnormálních buněk nezávisle na MHC gp. Proteiny NKR-P1 jsou s Clr proteiny úzce spjaty. Jejich genetický kód se nachází ve stejné části NK genového komplexu [19]. Vzhledem k různému zastoupení jednotlivých forem Clr proteinů v těle se interakce NKR-P1/Clr zdá být tkáňově specifická, na rozdíl od interakce receptorů s MHC gp I třídy. [28, 29]

U člověka byla identifikována jen jedna forma NKR-P1 proteinu a to NKR-P1A. Jeho ligandem s inhibiční funkcí je LLT1 (z angl. Lectin-Like Transcript 1) (lidský homolog myšního Clr) [14, 30].

1.5.a) Receptor Nkr-p1a

Nkr-p1a je transmembránový receptor II typu (C-konec - extracelulární) a patří mezi receptory C-lektinového typu [31]. Je exprimován na všech NK buňkách a na některých podskupinách T lymfocytů. Ve své transmembránové doméně má pozitivně nabitý postranní řetězec argininu, který zprostředkovává přenos signálu na tyrosinové kinasy. V nedávné době byla vyřešena trojrozměrná struktura části proteinu na základě rentgenové krystalografie (Obr. 3). V C-lektinových



Obr. 3: Model krystalograficky stanovené struktury Nkr-p1a [32]

doménách téměř všech C-lektinových receptorů byla objevena prodloužená smyčka, která je u jednotlivých receptorů variabilní [23]. Tato smyčka je považována za důležitý prvek rozhodující o vazbě specifických ligandů mezi jednotlivými formami poměrně konzervované skupiny receptorů [23]. [27, 32]

Pokusy s geneticky modifikovanými hlodavci byla prokázána aktivační funkce Nkr-p1a receptoru. [33]

1.6. Rozpustná forma myšního proteinu Nkr-p1a (Nkr-p1a izoforma 2)

Rozpustná forma myšního proteinu Nkr-p1a je zvláštním členem NKR-P1 rodiny receptorů. Oproti izoformě 1 má zkrácenou cytoplasmatickou a transmembránovou doménu. Nabízí se, že se nejedná o transmembránový receptor, ale že by se tento protein mohl nacházet volně v cytoplazmě NK buněk. Prozatím ale není známo, jaká by mohla být jeho funkce. Rozpustná forma myšního proteinu Nkr-p1a byla objevena v NK genomovém komplexu myši při sekvenačním projektu celého myšního genomu. Na následujícím obrázku jsou graficky porovnány aminokyselinové sekvence myšního receptoru Nkr-p1a a jeho rozpustné formy (Obr. 4).

```

      10          20          30          40          50          60
izo1  MDTARVYFGL KPPRTPGAWH ESPPSLPPDA CRCPRSHRLA LKLSCAGLIL LVVTLIGMSV
izo2  MDTARVYFGL KPPRTPGAWH ESPPSLPP
      70          80          90          100         110         120
LVRVLIQKPS IEKCYVLIQE NLNKTTDSA KLECPODWLS HRDKCFHVSH VSNTWEEGLV
VRVLIQKPS IEKCYVLIQE NLNKTTDSA KLECPODWLS HRDKCFHVSH VSNTWEEGLV
      130         140         150         160         170         180
DCDGKGATLM LIQDQEELRF LLDSIKEKYN SFWIGLRYTL PDMNWKWING STLNSDVLKI
DCDGKGATLM LIQDQEELRF LLDSIKEKYN SFWIGLRYTL PDMNWKWING STLNSDVLKI
      190         200         210         220         227
TDDTENDSCA AISGDKVTFE SCNSDNRWIC QKELYHETLS NYVGYGH
TDDTENDSCA AISGDKVTFE SCNSDNRWIC QKELYHETLS NYVGYGH

```

Obr. 4: Srovnání aminokyselinové sekvence receptoru Nkr-p1a a jeho rozpustné formy. Sekvence izoformy 1 a doplňující informace [34].

Nkr-p1a izo1: 227 aminokyselin, molekulová hmotnost $M_w=25765,74$ Da, teoretický monoizotopický izoelektrický bod pI 5,80

cytoplasmatická doména M 1 - C 45

transmembránová doména A 46 - I 66

extracelulární doména Q 67 - H 227

C-lektinová doména E 93 - K 212

cysteiny, pravděpodobné zapojení disulfidických můstků: 94 - 105; 122 - 210; 189 - 202

motiv který váže LCK (z angl. lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) 31 - 34

Nkr-p1a izo2: 194 aminokyselin, molekulová hmotnost $M_w=22195,79$ Da, teoretický monoizotopický izoelektrický bod pI 5,23

cytoplasmatická doména M 1 - P 28

transmembránová doména V 62 - I 66 (V 29 - I 33)

extracelulární doména Q 67 - H 227 (Q 34 - H 194)

C-lektinová doména E 73 - K 212 (E 60 - K 179)

cysteiny

2. Cíle práce

Cílem předkládané bakalářské práce je optimalizace produkce rozpustné formy myšního Nkr-p1a proteinu, jeho následná izolace a purifikace. Účelem těchto pokusů je optimalizovat protokol pro velkoobjemovou produkci izotopově značeného proteinu v M9 minimálním médiu pro jeho strukturní analýzu nukleární magnetickou rezonancí.

- Optimalizace produkce rozpustné formy myšního Nkr-p1a proteinu v M9MM.
- Produkce rozpustné formy myšního Nkr-p1a proteinu ve velkém objemu, jeho izolace, renaturace a purifikace.

3. Materiál

3.1. Přístroje a pomůcky

96 jamková destička	Nunc, <i>Dánsko</i>
Analytické váhy AL54	Mettler Toledo, <i>ČR</i>
Automatické pipety	Gilson, <i>USA</i>
Centrifuga Avanti J-26 XP	Beckman Coulter, <i>USA</i>
Centrifuga Z 233 MK-2	Hermle, <i>Německo</i>
Centrifuga Spektrafuge 16M Edison	Labnet, <i>USA</i>
Centrifugační koncentrátor Amicon Ultra NMWL 10 kDa	Millipore, <i>USA</i>
Dialyzační trubice	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Hamiltonka	GE healthcare, <i>UK</i>
HPLC systém BioSys 500	Beckman, <i>USA</i>
Injekční filtr 0,22 µm	TPP, <i>Švýcarsko</i>
Kolona ENrich SEC 70 (10×300)	Bio-Rad, <i>Německo</i>
Kolona ENrich Q (5×50)	Bio-Rad, <i>Německo</i>
Magnetická míchačka CB-161	Stuart, <i>UK</i>
Mikrozkumavky	Trefflab, <i>Švýcarsko</i>
Monochromátorová čtečka destiček Safire 2	Tecan, <i>Švýcarsko</i>
Mrazicí box (-80 °C)	Forma Scientific, <i>USA</i>
pH metr Φ200	Beckman Coulter, <i>USA</i>
Předvážky HF-1200G	A & D Company, <i>Japonsko</i>
Souprava pro SDS elektroforézu	Bio-Rad, <i>Německo</i>
Souprava pro ultrafiltraci	Millipore, <i>USA</i>
Spektrofotometr DU-70	Beckman, <i>USA</i>
Třepačka	Gallenkamp Ltd., <i>UK</i>
Ultrafiltrační membrána Ultracel NMWL 10 kDa	Millipore, <i>USA</i>
Ultrazvuková lázeň	KRAINTEK, <i>Slovensko</i>
Ultrazvuková sonda 4710	Cole-Parmer, <i>USA</i>
Vakuová odparka RC 10.10	Jouan, <i>Francie</i>
Vortexový míchač VELP	Scientifica, <i>Itálie</i>
Zdroj deionizované vody MilliQ	Millipore, <i>USA</i>
Zdroj napětí MP 250 V	Major Science, <i>USA</i>

3.2. Chemikálie

2-merkaptoethanol	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Agarosa	Serva, <i>Německo</i>
Akrylamid	Serva, <i>Německo</i>
Azid sodný	Serva, <i>Německo</i>
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250)	Serva, <i>Německo</i>
Cystamin dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Cysteamin hydrochlorid	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Činidlo pro stanovení koncentrace proteinu dle Bradforda	Bio-Rad, <i>Německo</i>
Činidlo pro BCA stanovení koncentrace proteinu	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
D-Glukosa	Lachema, <i>ČR</i>
DNasa I	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	Lachema, <i>ČR</i>
Dodecylsírán sodný (SDS)	Serva, <i>Německo</i>
Dusičnan stříbrný (AgNO ₃)	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Formaldehyd (H ₂ CO)	Lachema, <i>ČR</i>
Glycin	Serva, <i>Německo</i>
Guanidin hydrochlorid	Serva, <i>Německo</i>
HEPES	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Hydrogenfosforečnan sodný (Na ₂ HPO ₄)	Lachema, <i>ČR</i>
Hydroxid sodný (NaOH)	Lachema, <i>ČR</i>
Chlorid amonný (NH ₄ Cl)	Lachema, <i>ČR</i>
Chlorid hořečnatý (MgCl ₂)	Lachema, <i>ČR</i>
Chlorid sodný (NaCl)	Lachema, <i>ČR</i>
Chlorid vápenatý (CaCl ₂)	Lachema, <i>ČR</i>
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Kanamycin	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>
Kvasničný extrakt	Biolife, <i>Itálie</i>
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma-Aldrich, <i>USA</i>

Kyselina octová (CH ₃ COOH)	Lachema, ČR
L-Arginin hydrochlorid	Serva, Německo
Leupeptin	Sigma-Aldrich, USA
Lysozym	Sigma-Aldrich, USA
N,N-methylen-bis-akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Německo
Peroxodisíran amonný (APS)	Sigma-Aldrich, USA
Proteinový marker Broad Range (7 - 175 kDa)	New England Biolabs, UK
Proteinový marker SeeBlue (4 - 250 kDa)	Invitrogen, USA
RNasa I	Sigma-Aldrich, USA
Sacharosa	Lachema, ČR
Síran hořečnatý (MgSO ₄)	Lachema, ČR
Tetracyklin	Sigma-Aldrich, USA
Thiamin hydrochlorid	Sigma-Aldrich, USA
Thiosíran sodný (Na ₂ S ₂ O ₃)	Sigma-Aldrich, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Serva, Německo
Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA
Trypton	Oxoid, USA
Uhličitan draselný (K ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich, USA

3.3. Roztoky a pufry

- 30% (w/w) zásobní roztok akrylamidu: 29% (w/w) Akrylamid, 1% (w/w) N,N'-methylen-bis-akrylamid
- Barvicí roztok na polyakrylamidový gel: 0,25% (w/w) Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) kys. Octová
- Dialyzační pufr: 15mM HEPES, 150mM NaCl, 1mM NaN₃, pH 8,0
- Elektrodový pufr pro SDS elektroforézu: 25mM Tris, 250mM Glycin, 0,1% (w/w) SDS, 0,2mM NaN₃, pH 8,3
- Guanidinový pufr: 6M Guanidin, 100mM Hepes, 10mM dithiothreitol, pH 8,0
- Nanášecí pufr pro iontově výměnnou chromatografii: 15mM Tris, 50mM NaCl, 1mM NaN₃, pH 6,8
- Neredukující vzorkový pufr (2×): 100mM Tris; 4% (w/w) SDS; 0,2% (w/w) Bromfenolová modř, 20% (v/v) Glycerol, pH 6,8

- Odbarvovací roztok na polyakrylamidový gel: 35% (v/v) EtOH, 10% (v/v) HAc
- Promývací pufr pro izolaci inkluzních tělísek: 50mM Tris, 100mM NaCl, 1mM 2-merkptoethanol, 1mM NaN₃, pH 7,4
- Pufr A pro iontově výměnnou chromatografii: 15mM Tris, 20mM NaCl, pH 6,8
- Pufr B pro iontově výměnnou chromatografii: 15mM Tris, 1M NaCl, pH 6,8
- Pufr pro gelovou filtraci: 15mM HEPES, 150mM NaCl, 1mM NaN₃, pH 6,8
- Pufr s detergentem pro izolaci inkluzních tělísek: 0,5% (w/w) Triton X-100, 50mM Tris, 100mM NaCl, 1mM NaN₃, 1mM 2-merkptoethanol, pH 7,4
- Redukující vzorkový pufr pro SDS elektroforézu (2×): 100mM Tris, 4% (w/w) SDS, 0,2% (w/w) Bromfenolová modř, 20% (v/v) Glycerol a 200mM Dithiotreitol; pH 6,8
- Renaturační pufr: 0,4M Arginin, 50mM HEPES, 100mM CaCl₂, 1mM NaN₃, 9mM Cystamin, 3mM Cystamin, pH 6,8
- Rozdělovací polyakrylamidový gel pro SDS elektroforézu (15% (w/w)), V = 20 ml: 4,6 ml ddH₂O; 10 ml 30% (w/w) akrylamid; 5 ml 1,5M Tris pufr pH 8,8; 200 μl 10% (w/w) SDS; 8 μl N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin a 200 μl 10% (w/w) APS
- Sacharosový lyzační pufr: 25% (w/w) Sacharosa; 50mM Tris; 1mM kys. Ethyldiamintetraoctová; 1mM NaN₃; pH 7,4
- Vyvolávací roztok (barvení stříbrem): 0,07% (v/v) Formaldehyd, 3% (w/w) K₂CO₃, 0,001% (w/w) Na₂S₂O₃
- Zaostřovací polyakrylamidový gel pro SDS elektroforézu (5% (w/w)), V = 6 ml: 4,1 ml ddH₂O; 1 ml 30% (w/w) akrylamid; 0,75 ml 1M Tris pufr pH 6,8; 60 μl 10% (w/w) SDS; 6 μl N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin a 60 μl 10% (w/w) APS
- Zastavovací roztok (barvení stříbrem): 50% (w/w) Tris, 25% (v/v) HAc

3.3.a) Zásobní roztoky

- DNasa I: zásobní roztok 100 U/μl, pracovní koncentrace 10 U/ml
- Fenylmethylsulfonylfluorid: zásobní roztok 100mM (v EtOH), pracovní koncentrace 1mM
- Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG): zásobní roztok 1M, optimalizovaná pracovní koncentrace 0,3mM
- Kanamycin: zásobní roztok 50 mg/ml, pracovní koncentrace 50 μg/ml
- Leupeptin: zásobní roztok 100mM, pracovní koncentrace 10μM
- Lysozym: zásobní roztok 10 mg/ml, pracovní koncentrace 2 μg/ml
- RNasa I: zásobní roztok 10 mg/ml, pracovní koncentrace 0,25 μg/ml
- Tetracyklin: zásobní roztok 5 mg/ml v EtOH, pracovní koncentrace 12,5 μg/ml

3.4. Média

- Solný roztok M9 minimálního média: 36mM Na₂HPO₄ • 12 H₂O, 22mM KH₂PO₄, 9mM NaCl, 19mM NH₄Cl, pH 7,4
- M9 minimální médium (M9MM): 100μM CaCl₂, 1mM MgSO₄, 1mM thiamin hydrochlorid, 3 g/l glukosa
- LB medium podle Luria-Bertani: 10% Trypton, 5% Kvasničný extrakt, 10% NaCl, pH 7,4
- LB agar: LB médium, 2% Agar

3.5. Bakteriální kmen

- *Escherichia coli* BL21(DE3) Gold Stratagene, USA

3.6. Vektor

- pET-30a(+) Novagen, USA
koncentrace zásobního roztoku 0,5 μg/μl

4. Metody

4.1. Transformace kompetentních buněk

Alikvot kompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3) Gold o objemu 200 μ l (uskladněný při -80 °C) byl ponechán rozmraznout na ledu. Po rozmrznutí bylo k buňkám sterilně pipetováno 0,5 μ g plazmidové deoxyribonukleové kyseliny nesoucí úsek kódující rozpustnou formu myšního Nkr-p1a proteinu. Plazmid v rámci své bakalářské práce připravila Bc. Pavlína Vaňková. Po 30 min na ledu byly buňky vystaveny teplotnímu šoku (42 °C po dobu 45 s). K buňkám byl sterilně odměřen 1 ml sterilního LB média (temperovaného na 37 °C) a buňky byly ponechány inkubovat jednu hodinu při 37 °C. Buněčná suspenze byla odstředěna (5 000 rpm, 2 min, Spectrafuge 16M), většina supernatantu odlita a ve zbylých přibližně 50 μ l byla rozptýlena peleta. Suspenze byla nanášena na Petriho misku s LB agarem s antibiotiky (50 μ g/ml kanamycin (Kan), 12,5 μ g/ml tetracyklin (Tet)). Petriho miska s LB agarem byla ponechána přes noc při 37 °C a poté byla umístěna do lednice (4 °C).

4.1.a) Příprava LB média

Rozpuštěním jednotlivých složek (Kap. 3.4) bylo připraveno LB médium, které bylo sterilizováno. Antibiotika (Kan, Tet) byla přidávána až po zchladnutí na 50 °C, jelikož jsou termolabilní.

4.1.b) Příprava misky s LB agarem

Pro přípravu Petriho misky s LB agarem byla do LB média před sterilizací přidána agarosa (Kap. 3.4). Antibiotika byla přidávána opět až po zchladnutí na 50 °C. Po přidání antibiotik byl LB agar nalit za sterilních podmínek na Petriho misku a ponechán ztuhnout. Miska s LB agarem byla následně ponechána schnout přes noc při 37 °C dnem vzhůru.

4.1.c) Příprava M9 minimálního média (M9MM)

Byl připraven solný roztok M9MM, který byl následně sterilizován. Do solného roztoku byly za stálého míchání přidány sterilní roztoky CaCl₂ a MgSO₄. Dále byly odměřeny roztoky thiamin hydrochloridu a glukosy, které byly sterilizovány přes mikrofiltr (0,22 μ m). Nakonec byla do média pipetována antibiotika Kan, Tet. (Kap. 3.4)

4.2. Výběr vhodných produkčních klonů

Po inkubaci bylo z Petriho misky s LB agarem s narostlými koloniemi vybráno 8 jednotlivých klonů, kterými byly jednotlivě zaočkovány vždy 4 ml sterilního LB média s antibiotiky (Kan, Tet). Kultury byly ponechány třepat přes noc (220 rpm, 37 °C). Takto připravenými stacionárními kulturami byly v poměru 1:100 zaočkovány vždy 2 zkumavky s čistým LB médiem (Kan, Tet), které byly jednu hodinu ponechány inkubovat na třepačce (220 rpm, 37 °C). Vždy k jedné z identických kultur byl pipetován isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) induktor exprese rekombinantního proteinu o výsledné koncentraci 1mM. Druhá z páru byla ponechána bez přídavku IPTG (negativní kontrola). Všechny kultury byly ponechány tři hodiny inkubovat na třepačce (220 rpm 37 °C). Poté byly vzorky převedeny do mikrozkušavek a odstředěny (5 000 rpm, 10 min, Spectrafuge 16M), supernatant byl odsán pod vakuem a pelety zmrazeny na -80 °C. Při této teplotě byly uloženy až do vyhodnocení na elektroforéze v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS elektroforéza).

Induktor exprese IPTG je analogem laktosy, který ale není metabolizován. Jeho funkce spočívá v deaktivaci *lac* represoru, což vede k indukci exprese genů *lac* operonu. Použitý bakteriální kmen *E. coli* BL21(DE3) Gold obsahuje v *lac* operonu vloženou informaci pro T7 RNA polymerasu, která rozpoznává T7 promotor přítomný v produkčním plazmidu pET-30a(+). T7 RNA polymerasa pochází z T7 bakteriofága a zajišťuje velmi efektivní expresi rekombinantního proteinu. [35, 36]

4.2.a) Ověření aminokyselinové sekvence produkovaného proteinu

Gel z výběru produkčních klonů byl předán Mgr. Zdeňkovi Kukačkovi, pro ověření aminokyselinové sekvence produkovaného proteinu pomocí hmotnostní spektrometrie.

4.3. Optimalizace podmínek pro produkci proteinu

Do sterilních zkumavek bylo asepticky odměřeno po 1 ml M9MM (Kan, Tet), které bylo v poměru 1:100 zaočkováno vybranou stacionární kulturou. Stejným způsobem byly pro měření optické denzity zaočkovány kontrolní vzorky o objemu 2 ml. Zkumavky byly umístěny na třepačku (220 rpm, 37 °C). Průběžně byla spektrofotometricky měřena optická denzita kontrol do doby, než dosáhla hodnoty 0,6 - 0,8. Měření probíhalo při vlnové délce 550 nm a jako slepý vzorek byla použita destilovaná voda.

4.3.a) Optimalizace koncentrace induktoru exprese

Po dosažení požadované optické denzity byl ke vzorkům odměřen IPTG o různých finálních koncentracích (0,01; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 1; 5; a 10mM). Indukované vzorky a kontroly (w/o IPTG) byly ponechány tři hodiny třepat (220 rpm, 37 °C).

4.3.b) Optimalizace doby produkce po indukci exprese

Po dosažení požadované optické denzity byl ke vzorkům odměřen 0,3mM IPTG (na základě předchozího stanovení). Vzorky byly ponechány třepat (220 rpm, 37 °C) po různou dobu (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 a 10 hod).

4.3.c) Optimalizace teploty při produkci po indukci exprese

Po dosažení požadované optické denzity byl ke vzorkům odměřen 0,3mM IPTG. Následně byly zkumavky rozmístěny na třepačky (220 rpm) a ponechány třepat pět hodin při teplotách 24, 30, 35, 37 a 40 °C.

4.3.d) Zpracování vzorků po produkcích

Vzorky byly převedeny do mikrozkuvek a odstředěny (5 000 rpm, 10 min, Spectrafuge 16M), supernatant byl odsán pod vakuem a pelety zmrazeny na -80 °C, dokud nebyly vyhodnoceny na SDS elektroforéze.

4.4. Produkce ve velkém objemu

Ve 2l Erlenmayerově baňce bylo zaočkováno 0,5 l M9MM (Kan, Tet) v poměru 1:100 vybranou stacionární kulturou. Baňka byla umístěna na třepačku (220 rpm, 37 °C). V průběhu inkubace byla spektrofotometricky měřena optická denzita buněčné suspenze při vlnové délce 550 nm proti destilované vodě, dokud nedosáhla hodnoty 0,6. Následně byl přidán IPTG (c = 0,3mM) a kultura byla pět hodin inkubována na třepačce (220 rpm 37 °C). Poté byla buněčná suspenze odstředěna (8 000× g, 12 min, 4 °C) a peleta rozpuštěna ve 20 ml sacharosového lyzačního pufru, do kterého byl přidán lysozym (c = 2 µg/ml) a inhibitory proteas leupeptin (c = 10µM) a fenylmethylsulfonylfluorid (c = 1mM). Buněčný lyzát byl homogenizován ultrazvukovou sondou (3×20 s) a zmrazen na -80 °C.

4.4.a) Růstová křivka

Pět set mililitrů sterilního LB média (Kan, Tet) ve 2l Erlenmayerově baňce bylo zaočkováno 1:100 stacionární kulturou vybraného produkčního klonu. V době indukce byl odebrán první vzorek ($t = 0$) pro spektrofotometrické stanovení optické denzity a poté byly baňky umístěny na třepačku (220 rpm, 37 °C). Každou půl hodinu byly odebírány vzorky pro spektrofotometrické stanovení. Optická denzita byla měřena při vlnové délce 550 nm proti destilované vodě jako slepému vzorku. V případě, že hodnota optické denzity překročila hodnotu 0,8, byla buněčná suspenze pro spektrofotometrické stanovení vhodně ředěna. Experimentální body byly na závěr vyneseny do grafu.

Analogicky byla stanovena růstová křivka pro bakteriální kultury v M9MM (Kan, Tet).

V obdobném experimentu byla sledována počáteční fáze růstu bakteriální kultury (startovací kultura byla zaočkována 1:1000) v M9MM s různou koncentrací glukosy (2, 3 a 4 g/l).

4.5. Izolace inkluzních tělísek z buněčného lyzátu

Buněčný lyzát byl rozmrazen ve vodní lázni, homogenizován ultrazvukovou sondou (20 s) a zmrazen. Proces rozmrazení, homogenizace a zmrazení byl čtyřikrát opakován. Následně byla suspenze rozmrazena a k ní pipetovány roztoky $MgCl_2$ ($c = 20$ mM), DNasa I ($c = 10$ U/ml) a RNasa I ($c = 0,25$ μ g/ml). Směs byla ponechána 20 min při laboratorní teplotě a v průběhu byla dvakrát homogenizována (2×20 s). Následně byl buněčný lyzát odstředěn ($17\,500 \times g$, 15 min, 4 °C) a peleta rozptýlena ve 20 ml pufri s detergentem a inhibitory proteas. Suspenze byla homogenizována (3×20 s) a odstředěna ($17\,500 \times g$, 15 min, 4 °C). Peleta byla rozptýlena ve 20 ml promývacího pufri bez detergentu s inhibitory proteas, suspenze byla homogenizována (3×20 s) a odstředěna ($17\,500 \times g$, 15 min, 4 °C). Promytí pufrem bez detergentu bylo zopakováno ještě jednou. Peleta obsahující promytá inkluzní tělíška byla zmrazena na -80 °C. V průběhu izolace byly odebírány vzorky supernatantů z jednotlivých izolačních kroků, které byly vyhodnoceny SDS elektroforézou.

4.6. Renaturace rekombinantního proteinu

Sto miligramů mokré pelety obsahující izolovaná inkluzní tělíska bylo solubilizováno v 1 ml guanidinového pufru s detergentem dithiothreitem. Peleta byla pipetou rozptýlena a jednu hodinu inkubována při 40 °C. Poté byly vzorky odstředěny (30 000× g, 30 min, 15 °C).

Do temperovaného renaturačního pufru byl metodou rychlého naředění převeden supernatant a roztok byl míchán jednu hodinu (4 °C). Posléze byly odstředěny vzniklé sraženiny (30 000× g, 30 min, 4 °C).

Supernatant byl převeden do dialyzačních trubic a dialyzován 2 + 4 hod při 4 °C za stálého míchání proti 2×4 litrům dialyzačního pufru. V průběhu dialýzy došlo k vysrážení proteinu - ten byl odstředěn (30 000× g, 30 min, 4 °C).

Odstředěný dialyzát byl zakonzentrován pod tlakem inertního plynu (N₂), přes celulosovou membránu (NMWL 10 kDa) v ultrafiltrační cele. Po zakonzentrování na přibližně 50 ml byl koncentrován v centrifugačním koncentrátoru (NMWL 10 kDa) (3 500× g, 20 °C) na objem přibližně 1 ml. V průběhu práce byly odebírány vzorky pelet a supernatantů pro vyhodnocení na SDS elektroforéze a pro stanovení koncentrací proteinu v jednotlivých krocích renaturace.

4.6.a) Reálná hmotnost inkluzních tělísek

Peleta inkluzních tělísek obsahovala určité množství pufru, proto byl proveden experiment pro zjištění čisté váhy inkluzních tělísek. Na analytických vahách byly přesně zváženy malé objemy pročištěných inkluzních tělísek. Tyto vzorky byly umístěny do rotační odparky a byl pozorován úbytek jejich hmotnosti.

4.7. Gelová permeační chromatografie

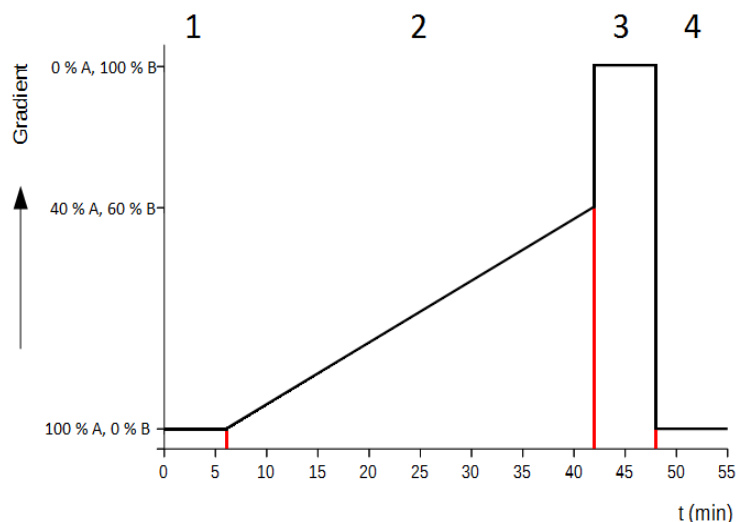
Stacionární fáze kolony ENrich SEC 70 (10×300) je tvořena hydrofilním polymethakrylátem s póry o průměru 10 μm. Při gelové filtraci dochází k rozdělení látek na základě jejich velikosti. Nejrychleji kolonou procházejí velké molekuly, které nepronikají do pórů stacionární fáze. Malé částice naopak do pórů pronikají, tím konají delší dráhu, čímž dochází k jejich zdržení v chromatografické koloně. [37, 38]

Kolona ENrich byla ekvilibrována pufrům pro gelovou chromatografii (2× objem kolony). Koncentrovaný vzorek obsahující rekombinantní protein byl odstředěn (17 000 rpm, 10 min, Spectrafuge 16M), přefiltrován přes sterilní filtr (0,22 μm), odstředěn (17 000 rpm, 10 min, Spectrafuge 16M) a nanesen na kolonu. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,5 ml/min. Detekce proteinu v eluátu byla prováděna spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm. Přítomnost a čistota proteinu jímaného v jednotlivých frakcích byla ověřena SDS elektroforézou. Po ukončení chromatografie byla kolona promyta a uchována ve 20% (v/v) roztoku ethanolu.

4.8. Iontově výměnná chromatografie

Stacionární fáze kolony ENrich Q (5×50) je tvořena hydrofilním polymethakrylátem, na kterém jsou jako funkční skupiny navázány kvarterní aminy. Ty jsou na sebe schopné elektrostatickými interakcemi vázat protein, který na svých karboxylových skupinách nese záporný náboj. Protein lze uvolnit elučním pufrům o vysoké iontové síle, kdy dojde k vytěsnění proteinu z kolony anionty z elučního pufru. [37, 38]

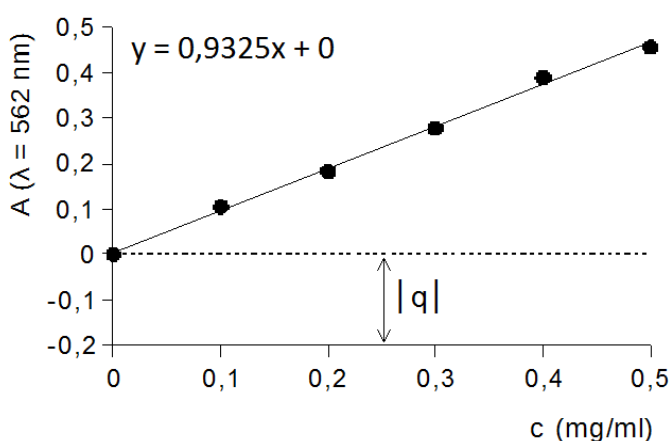
Kolona ENrich Q byla ekvilibrována pufrům B (5× objem kolony) a následně pufrům A (5× objem kolony). Vzorek byl před nanesením převeden do nanášecího pufru pro iontově výměnnou chromatografii. Výměna pufru byla provedena zředěním 1 ml koncentrovaného vzorku proteinu přibližně 15 ml nanášecího pufru a zakoncentrováním v centrifugačním koncentrátoru (3 500× g, 20 °C). Ředění a zakoncentrování bylo provedeno celkem třikrát. Při posledním opakování byl vzorek zakoncentrován na 1 ml, odstředěn (17 000 rpm, 10 min, Spectrafuge 16M), přefiltrován přes sterilní injekční filtr (0,22 μm), odstředěn (17 000 rpm, 10 min, Spectrafuge 16M) a nanesen na kolonu (metoda viz Obr. 5). Detekce proteinu v eluátu byla prováděna spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm. Přítomnost a čistota proteinu v jímaných frakcích byla ověřena na SDS elektroforéze. Po skončení chromatografie byla kolona promyta 20% (v/v) ethanolem, ve kterém je i uchována.



Obr. 5: Průběh metody iontově výměnné chromatografie.
 Průtok mobilní fáze 0,5 ml/min.
 1: 6 min pufr A, 2: 36 min gradient (100 % pufr A → 40 % pufr A + 60 % pufr B),
 3: 6 min pufr B, 4: 6 min pufr A.

4.9. Stanovení koncentrace proteinu

Dle standardních roztoků bovinního sérového albuminu o koncentracích: (0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 mg/ml) byla sestrojena kalibrační přímka. Nejprve byla odečtena absorbance slepého vzorku od absorbancí standardů. Takto získané body byly proloženy regresní přímkou s počátkem v bodě [0,0] (Obr. 6). S pomocí směrnice kalibrační přímky lze vypočítat koncentrace proteinu ve vzorku. Vzorky bylo nutné vhodně ředit, aby jejich koncentrace byla v rozmezí koncentrací standardů. Stanovení byla vždy prováděna v triplikátech.



Výpočet koncentrace:
 $y = k \cdot x + q$ (rovnice přímky)
 $x = (y - q) / k$
 $c = x \cdot d$

y absorbance vzorku,
x koncentrace vzorku,
q absorbance slepého vzorku,
k směrnice přímky, **d** ředění,
c koncentrace vzorku před ředěním

Obr. 6: Ilustrační kalibrační přímka.
 A absorbance, c koncentrace, $|q|$ absorbance slepého vzorku.

4.9.a) Metoda stanovení koncentrace proteinu dle Bradforda

Využití Comassie brilliant blue (CBB) G-250 ke stanovení koncentrace proteinů bylo popsáno Marion Bradfordem v roce 1976. Výhodou této metody je vysoká rychlost stanovení. Ke vzniku barevného komplexu CBB G-250 s proteinem v kyselém prostředí dochází během dvou minut. Koncentrace je stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm. Nevýhodou této metody je nepřesnost způsobená rozdílným aminokyselinovým složením stanovovaných proteinů. Nejvýznamněji přispívá k absorbanci arginin, méně pak histidin a lysin. Dalším nedostatkem je citlivost na přítomnost detergentů (např. SDS, Triton X-100), které ovlivňují výsledek stanovení. [39, 40]

Do jamky na 96 jamkové destičce bylo odměřeno 5 μ l vzorku proteinu a 200 μ l činidla dle Bradforda. Čím vyšší koncentrace bílkoviny ve vzorku, tím výraznější modré zabarvení pozorujeme. Analýza vzorků proběhla na spektrofotometru Sapphire 2 při vlnové délce 595 nm (absorpční maximum vznikajícího barevného komplexu).

4.9.b) Metoda stanovení koncentrace proteinu BCA

Do jamky bylo odměřeno 10 μ l vzorku a 200 μ l činidla, připraveného dle pokynů výrobce. Reakce vzorku s činidlem byly ponechány vyvíjet 30 min při 37 °C. Následovala jejich analýza při vlnové délce 562 nm na spektrofotometru Sapphire 2.

Při stanovení koncentrace proteinu bicinchoninovou kyselinou se jeho přítomnost projevuje přechodem barvy vzorku od zelené k fialové. Toto je důsledkem vzniku barevných komplexů měďných iontů s kyselinou bicinchoninovou. Měďné ionty vznikají redukcí iontů měďnatých přítomných v roztoku činidla. K redukcí iontů mědi přispívají peptidové vazby, cysteiny, tryptofany a tyrosiny. Stanovení koncentrace probíhá spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm (absorpční maximum vznikajícího barevného komplexu). Nevýhodou BCA stanovení je citlivost na redukční činidla, která ovlivňují výsledek. [41, 42]

4.10. SDS elektroforéza

Jedná se o jednu z nejpoužívanějších elektromigračních metod v biochemické laboratoři. K rozdělení proteinů dochází na základě jejich různé elektroforetické pohyblivosti. V přítomnosti SDS je pohyblivost proteinů dána především jejich velikostí. SDS se váže na proteiny a tím narušuje jejich terciární i sekundární strukturu a uděluje jim záporný náboj. Větší proteiny procházejí gelem pomaleji než menší proteiny, protože jsou více brzděny prostředím. Rozhodujícím faktorem ovlivňujícím prostupnost gelu je jeho porozita, která je dána koncentrací akrylamidu a poměrem akrylamidu a bis-akrylamidu. Kromě rozdělovacího gelu se využívá gel zaostřovací (startovní), který má nižší koncentraci akrylamidu a nižší pH. Díky němu dochází k zaostření vzorku na rozhraní rozdělovacího a startovního gelu, a tím ke sladění jednotlivých drah. [38, 43]

4.10.a) Příprava gelů

Při přípravě gelů byl jako poslední složka přidán peroxodisíran amonný (APS) (iniciátor polymerace). Roztok rozdělovacího gelu byl pipetou nanesen mezi důkladně očištěná elektroforetická skla, převrstven destilovanou vodou a ponechán přibližně hodinu tuhnout. Voda byla důkladně slita a separační gel převrstven gelem zaostřovacím, do kterého byl umístěn hřeben, který vytvoří v gelu jamky pro nanášení vzorků. Po ztuhnutí gelů a vyjmutí hřebenu byla skla s polyakrylamidovými gely umístěna do elektroforetické aparatury a převrstvena elektrodovým pufrem. Do jedné z jamek bylo vždy pipetováno 5 μ l proteinového markeru, do ostatních byly naneseny vzorky. Zaostření vzorků probíhalo při konstantním proudu 15 mA/gel, po průchodu vzorků do rozdělovacího gelu byl proud zvýšen na 25 mA/gel. Limitní hodnota napětí byla nastavena na 200/250 V. SDS elektroforéza byla ukončena přibližně pět minut poté, co bromfenolové čelo prošlo z gelu do elektrodového pufru.

4.10.b) Příprava pevných vzorků

Do mikrozkuřavky s peletou (z 1 ml buněčné suspenze) bylo odměřeno 100 μ l redukujícího vzorkového pufru. Vzorky byly vařeny pět minut ve vodní lázni, následně odstředěny (10 000 rpm, 5 min, Spectrafuge 16M). Na gel bylo nanášeno 15 μ l vzorku na jamku.

4.10.c) Příprava kapalných vzorků

Do mikrozkušavky bylo odměřeno 10 μl kapalného vzorku + 10 μl 2 \times koncentrovaného vzorkového pufru. Vzorky v redukujícím pufru byly vařeny pět minut ve vodní lázni, vzorky v neredukujícím pufru vařeny nebyly. Poté byly vzorky odstředěny (10 000 rpm, 5 min, Spectrafuge 16M). Do jedné jamky bylo nanášeno 15-20 μl vzorku (v závislosti na stanovení).

4.10.d) Vizualizace gelů - CBB R-250

Jak již bylo řečeno v kapitole 4.9.a CBB v kyselém prostředí vytváří komplex s proteiny. Toho se využívá při stanovení koncentrace proteinů a také pro vizualizaci proteinů v polyakrylamidovém gelu. K pozorování přítomnosti proteinu je zapotřebí alespoň 0,5 μg proteinu/ cm^2 . [44]

Po ukončení SDS elektroforézy byly polyakrylamidové gely vyjmuty z elektroforetických skel a 15 min barveny v roztoku CBB R-250, poté byly převedeny do roztoku odbarvovacího. Gely byly odbarvovány, dokud na nich nebyly jasně patrné proužky značící přítomnost proteinu. Gely byly vyfoceny a uchovány v 1mM NaN_3 .

4.10.e) Vizualizace gelů - Barvení stříbrem

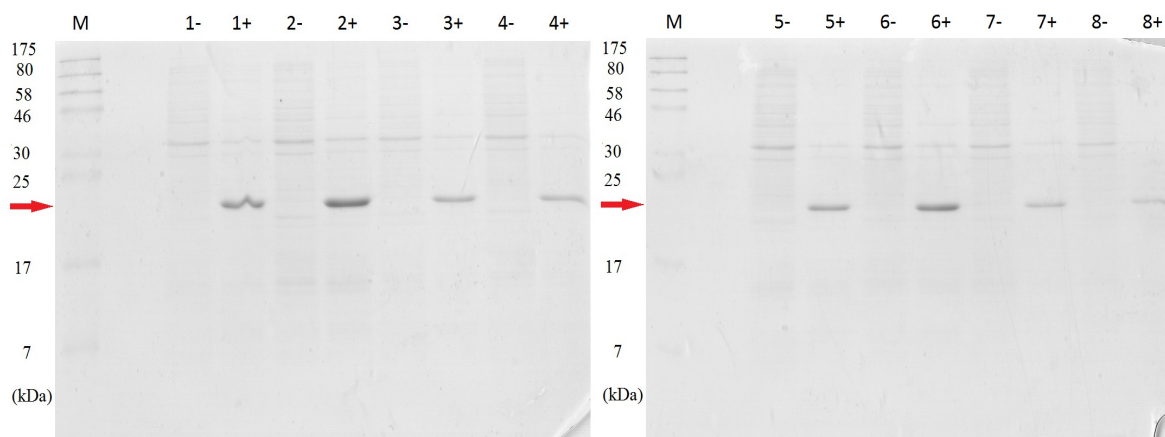
Tato metoda vizualizace proteinů je citlivější než metoda využívající CBB a poprvé byla popsána v roce 1979. Využívá stříbrných iontů, které tvoří komplexy s proteiny, ty jsou následně redukovány za vzniku kovového stříbra. Touto metodou lze pozorovat přítomnost proteinu již při 0,038 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. V této práci bylo využito pozitivního barvení. [45, 46]

Pro barvení stříbrem byl polyakrylamidový gel přes noc aktivován v odbarvovacím roztoku. Následně byl deset minut fixován ve 20% (v/v) roztoku ethanolu a promyt deset minut destilovanou vodou. Dalším krokem byla inkubace gelu v roztoku thiosíranu sodného ($c = 0,2 \text{ g/l}$) po dobu jedné minuty a promytí 2 \times 20 s destilovanou vodou. Poté byl gel impregnován 30 min roztokem dusičnanu stříbrného ($c = 2 \text{ g/l}$) a promyt 15 s destilovanou vodou. Gel byl přibližně tři minuty inkubován ve vyvolávacím roztoku (do vzniku červenohnědých pruhů značících přítomnost proteinu) a poté byl proces ukončen okyselením reakční směsi zastavovacím roztokem. Gel byl vyfocen a uchován v 1% roztoku kyseliny octové.

5. Výsledky

5.1. Transformace kompetentních buněk a výběr vhodných produkčních klonů

Metodou tepelného šoku byla provedena transformace kompetentních buněk (Kap. 4.1). Vhodné produkční klony byly vybrány z osmi připravených stacionárních kultur testem produkce rekombinantního proteinu (Kap. 4.2). Výsledky SDS elektroforézy jsou na obrázku 7. Produkovaný protein, jehož molekulová hmotnost činí 22,2 kDa a jeho monoizotopická hodnota izoelektrického bodu činí 5,23, je v obrázku označen červenou šipkou [47]. Pro další experimenty byly vybrány kultury 1, 3 a 6, protože u nich byla pozorována vysoká produkce rekombinantního proteinu v porovnání s množstvím ostatních proteinů přítomných ve vzorku.



Obr. 7: Výběr vhodných produkčních klonů - SDS elektroforéza.
Legenda: M marker, čísla značí jednotlivé kultury, ke vzorkům označeným + byl přidán induktor exprese IPTG, vzorky označené - jsou negativní kontroly.
Pro další pokusy byly vybrány kultury 1, 3 a 6.

5.1.a) Ověření aminokyselinové sekvence produkovaného proteinu

Na základě hmotnostní spektrometrie (hmotnostní spektra změřena a vyhodnocena Mgr. Zdeňkem Kukačkou) byla potvrzena shoda aminokyselinové sekvence připraveného proteinu se sekvencí kódovanou v použitém konstruktu.

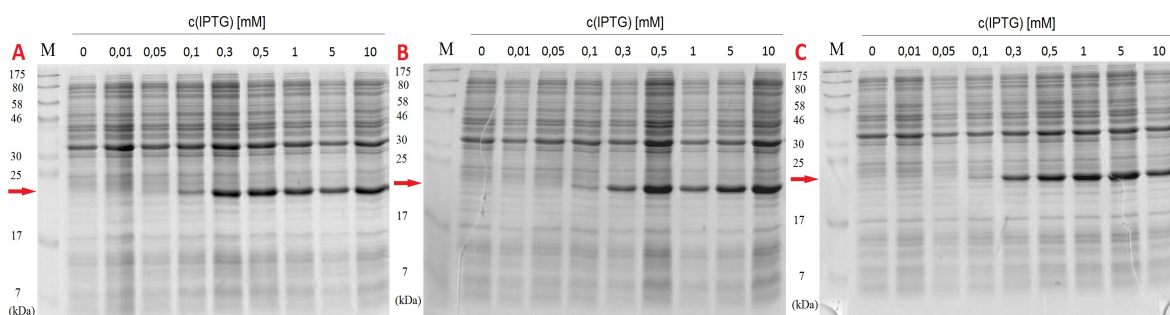
5.2. Optimalizace podmínek pro produkci proteinu

S ohledem na efektivitu, rychlost a co nejnižší finanční náklady byly provedeny experimenty, ve kterých byly sledovány optimální podmínky (koncentrace induktoru exprese, doba a teplota při produkci) pro produkci rekombinantního proteinu ve velkém objemu (Kap. 4.3).

Jako optimální byla vybrána 0,3mM koncentrace induktoru exprese IPTG, protože při této koncentraci již byla pozorovatelná dostatečná exprese rekombinantního proteinu. K produkci proteinu docházelo v menší míře již při 0,1mM koncentraci (Obr. 8).

Při optimalizaci doby produkce byla pozorována exprese proteinu již po jedné hodině inkubace. Po šesté hodině inkubace již množství proteinu v kultuře klesalo. Jako optimální byla zvolena doba pět hodin, kdy byl poměrně nejvyšší výtěžek produkovaného proteinu (Obr. 9, Str. 33).

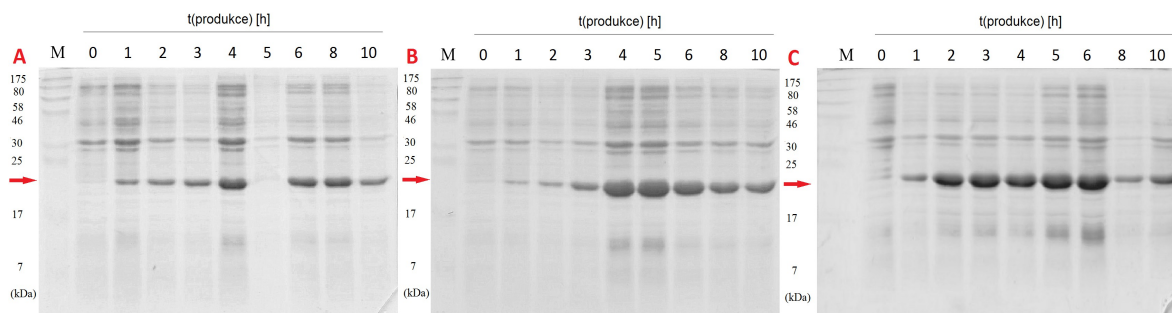
Při teplotách 24 °C a 30 °C byl protein exprimován v malém množství. Teploty od 35 °C do 40 °C se jeví jako optimální, a tak byla pro další pokusy zvolena teplota 37 °C, nacházející se ve středu optimálního rozmezí teplot (Obr. 10, Str. 33).



Obr. 8: Optimalizace koncentrace induktoru exprese.

Čísla u drah značí koncentrace induktoru exprese IPTG (jednotky mM), **A:** kultura 1, **B:** kultura 3, **C:** kultura 6.

Jako optimální byla zvolena 0,3mM koncentrace.

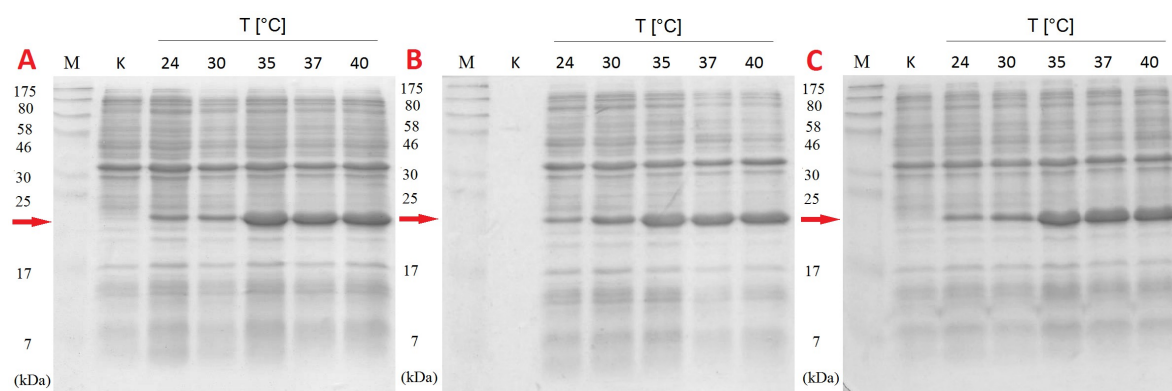


Obr. 9: Optimalizace doby produkce.

Čísla u drah odpovídají době inkubace po indukci v hodinách, **A:** kultura 1, (z důvodu neúspěšného zaočkování, kultura určená pro pět hodin inkubace téměř nerostla),

B: kultura 3, **C:** kultura 6.

Jako optimální byla zvolena doba pět hodin



Obr. 10: Optimalizace teploty.

Čísla u drah značí teplotu ve stupních celsia při inkubaci po indukci, **A:** kultura 1, **B:** kultura 3, (kontrola u této kultury chybí, jelikož byla chybně zaočkována jedna ze zkumavek, ve které pak nevyrostla bakteriální kultura), **C:** kultura 6.

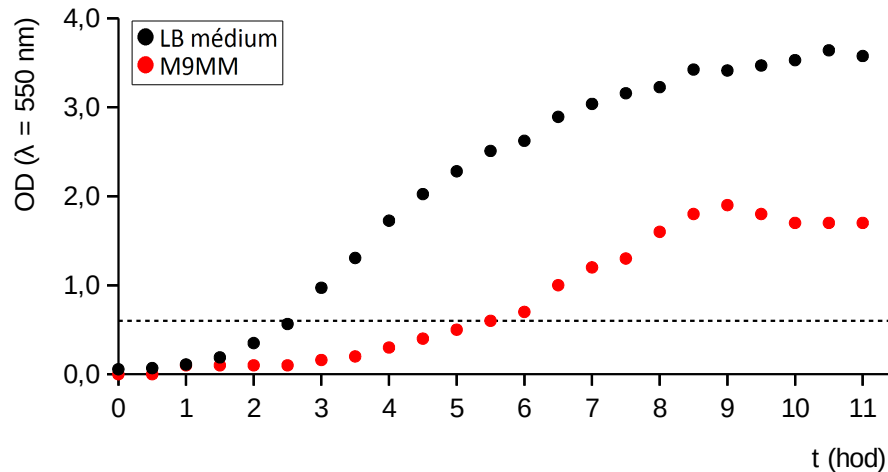
Pro další pokusy byla zvolena teplota 37 °C.

5.3. Produkce ve velkém objemu, izolace inkluzních tělísek

Protein byl produkován za vybraných optimálních podmínek (0,3mM IPTG, pět hodin inkubace po indukci a 37 °C) v objemu 0,5 l média, kdy byla měřena růstová křivka bakteriálních kultur (Kap. 4.4).

5.3.a) Růstová křivka

Byly připraveny kultury o objemu 0,5 l ze kterých byl v čase zaočkování odebrán první vzorek pro spektrofotometrické stanovení, další vzorky byly odebírány vždy v intervalu 30 min. Z naměřených hodnot optických denzit byly sestrojeny růstové křivky (Obr. 11, Str. 34). Startovní kultury byly zaočkovány 1:100 (Kap. 4.4.a)

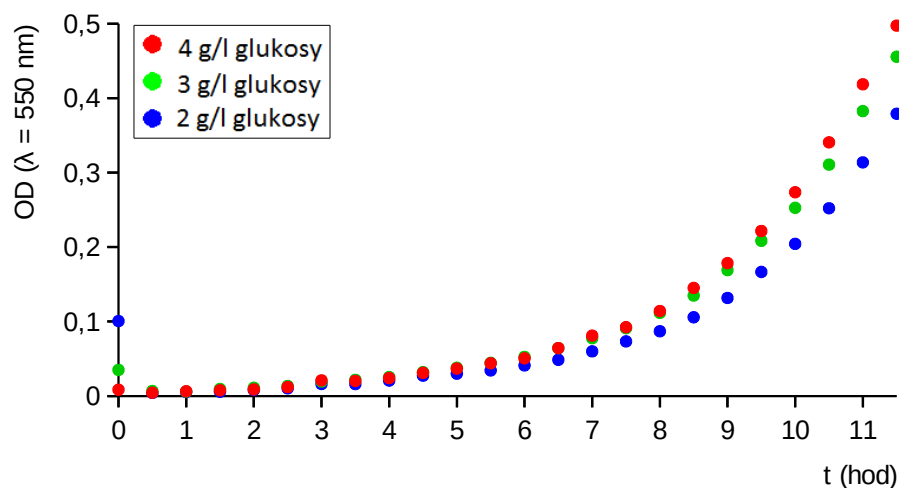


Obr. 11: Růstová křivka v LB médiu (černě), růstová křivka v M9MM (červeně).
 Přerušovanou čarou je označena hodnota optické denzity, při které byl obvykle přidáván induktor exprese.
 OD - optická denzita

Kultura v M9MM dosáhla stacionárního stavu po devíti hodinách a kultura v LB médiu dosáhla stacionárního stavu až po přibližně deseti hodinách inkubace. Odchytky od ideálního tvaru křivky jsou pravděpodobně způsobeny ředěním vzorků pro spektrofotometrické stanovení.

5.3.b) Vliv koncentrace glukosy na rychlost růstu kultury v M9MM

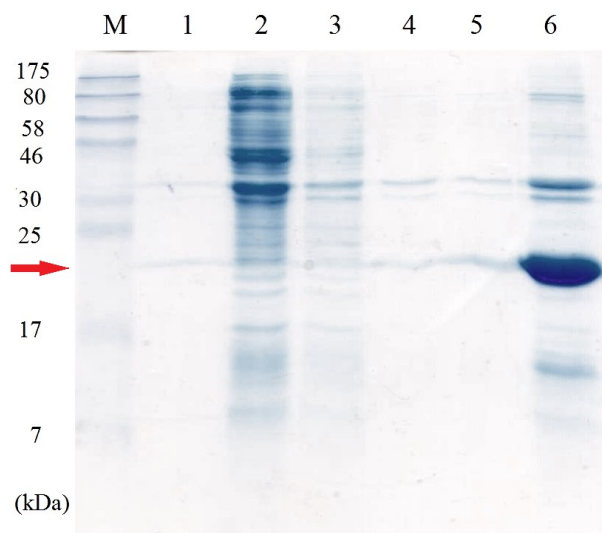
Sledované koncentrace glukosy: 4, 3 a 2 g/l. Startovací kultury byly zaočkovány 1:1000, a proto je velmi dlouhá takzvaná "lag" fáze růstu buněčné kultury. Výsledek je na následujícím grafu (Obr. 12).



Obr. 12: Růstové křivky v M9MM s různou koncentrací glukosy.
 Červeně 4 g/l glukosy, zeleně 3 g/l glukosy, modře 2 g/l glukosy.

Z grafu je patrné, že čím vyšší byla koncentrace glukosy v médiu, tím rychleji kultura rostla. Chyba v čase nula hodin byla způsobena příliš malým objemem vzorků ve spektrofotometrické kyvetě.

Po ukončení inkubace byla kultura odstředěna a za použití sacharosového lyzačního pufru a ultrazvukové sondy byly rozrušeny buněčné stěny. Buněčný lyzát byl zmrazen na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po osmotické lýze bakteriální kultury sacharosovým lyzačním pufrem následovala izolace inkluzních tělísek (Kap. 4.5), jejíž průběh je zachycen na obrázku 13.



Obr. 13: Supernatanty z izolace inkluzních tělísek a inkluzní tělíška.
M marker, 1 produkční médium, 2 sacharosový lyzační pufr, 3 pufr s detergentem,
4 promývací pufr, 5 druhý promývací pufr, 6 inkluzní tělíška.

Z výsledku elektroforézy je patrné, že většina proteinu je ukládána ve formě inkluzních tělísek. Jsou to agregáty rekombinantního proteinu vznikající v cytoplazmě. Proto je třeba inkluzní tělíška rozpustit a protein renaturovat, aby byl získán protein ve své nativní formě.

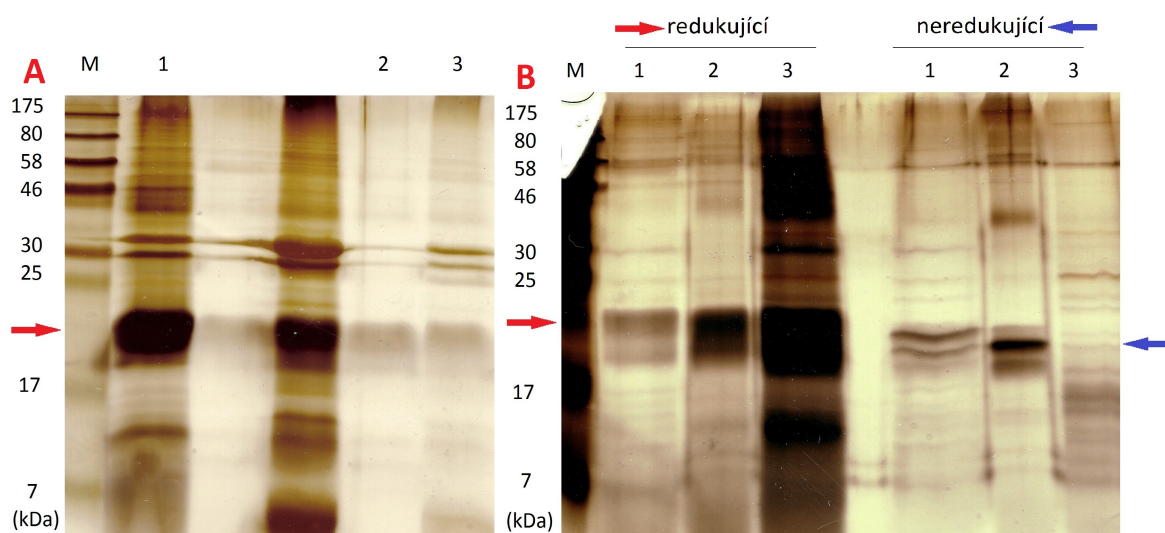
5.4. Renaturace proteinu

Izolovaná inkluzní tělíška byla solubilizována, rekombinantní protein byl renaturován, dialýzou převeden do fyziologických podmínek a koncentrován (Kap. 4.6). Průběh těchto metod je zachycen na obrázku 14 A (Str. 36) (solubilizace) a obrázku 14 B (Str. 36) (renaturace a dialýza). Pro jednotlivé kroky byla provedena látková bilance rozpustné formy myšího Nkr-p1a (Tab. 1, Str. 36)

Z obrázku 14 A (Str. 36) je patrné, že velká část inkluzních tělísek nebyla solubilizována. Po odstředění zůstala v peletě a z hlediska výtěžnosti je tento krok vysoce ztrátový.

Na obrázku 14 B (Str. 36) je patrný posun proužku odpovídajícímu rekombinantní rozpustné formě proteinu Nkr-p1a v neredukujícím oproti redukujícímu prostředí u vzorku renaturovaného i vzorku ve fyziologických podmínkách. Tento posun svědčí o zapojení intramolekulárních disulfidových můstků.

Při renaturaci i dialýze došlo k vysrážení proteinu, přičemž při dialýze byla precipitace silnější. Z tabulky 1 je zřejmé, že k nejvýznamnějším ztrátám však dochází při solubilizaci inkluzních tělísek.



Obr. 14:A: SDS elektroforéza solubilizace inkluzních tělísek.

M marker, 1 izolovaná inkluzní tělíška, 2 solubilizovaná inkluzní tělíška, 3 část pelety po odstředění solubilizovaných inkluzních tělísek, neoznačené dráhy s touto prací nesouvisí.

B: SDS elektroforéza z renaturace a dialýzy.

M marker, 1 renaturát, 2 dialyzát, 3 část pelety po odstředění dialyzátu.

Tab. 1: Látková bilance průběhu renaturace rekombinantního proteinu.

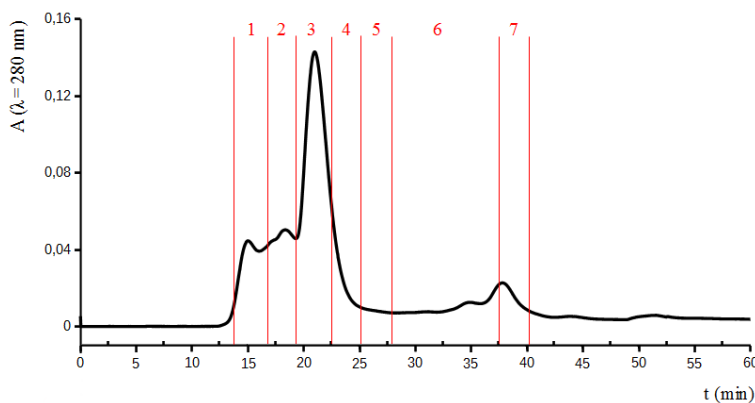
	koncentrace (mg/ml)	objem (ml)	hmotnost (mg)
mokrý peleta/ vysušená peleta	--	--	120/22*
solubilizovaná inkluzní tělíška	5,13	1	5,13
renaturát	0,03	100	3
dialyzát	0,32	cca 150	48
zakoncentrovaný vzorek	1,38	2	2,76

Poznámka: Stanovení probíhala metodou BCA, pouze renaturát byl stanoven metodou dle Bradforda, *předpokládaná hmotnost pelety obsahující inkluzní tělíška po vysušení (Kap. 4.6.a).

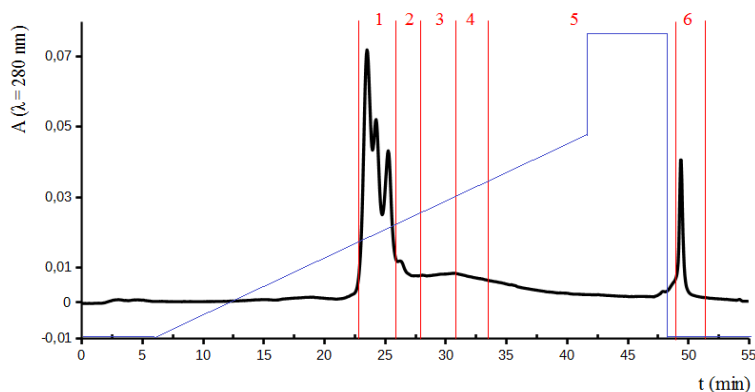
Koncentrace proteinu v renaturátu byla stanovena metodou dle Bradforda kvůli vysoké koncentraci cysteaminu. Ten přispívá k redukci měďnatých iontů a tím znemožňuje využití BCA metody pro stanovení koncentrace proteinu. Množství renaturovaného proteinu po dialýze je chybně stanovené, jelikož se v roztoku stále nacházela nízká koncentrace cysteaminu, který ovlivnil BCA metodu.

5.5. Purifikace rekombinantního proteinu

Koncentrovaný vzorek rekombinantního proteinu byl v objemu 1 ml nanesen na kolonu určenou pro gelovou permeační chromatografii (chromatogram s vyznačenými frakcemi viz. Obr. 15) a iontově výměnnou chromatografií (chromatogram s vyznačenými frakcemi viz. Obr. 16)

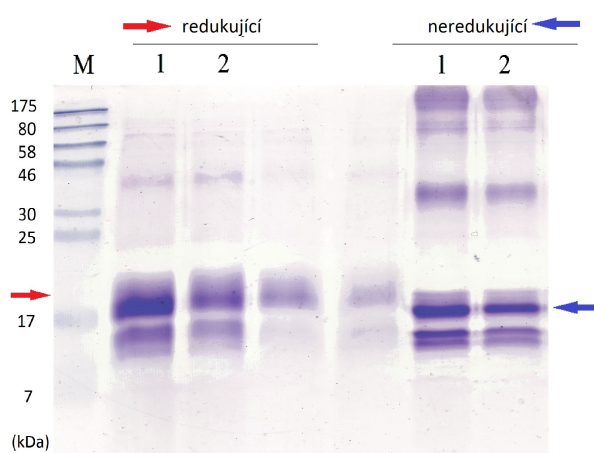


Obr. 15: Chromatogram gelové permeační chromatografie.
 Rychlost průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min.
 Frakce: 1 14,0 - 17,0 min; 2 17,0 - 19,6 min; 3 19,6 - 22,4 min; 4 22,4 - 25,1 min;
 5 25,1 - 28,0 min; 6 28,0 - 37,8 min; 7 37,8 - 40,2 min.



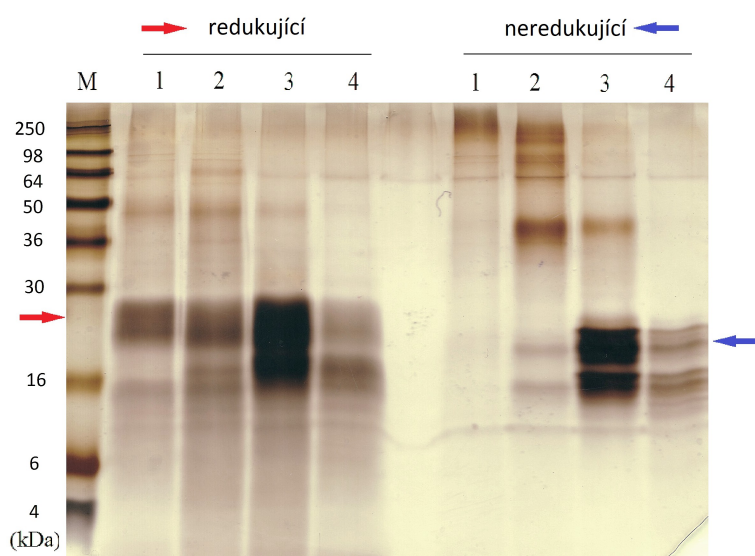
Obr. 16: Chromatogram iontové výměnné chromatografie.
 Rychlost průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min.
 Frakce: 1 22,7 - 25,7 min; 2 25,7 - 27,8 min; 3 27,8 - 30,6 min; 4 30,6 - 33,3 min;
 5 33,3 - 49,0 min; 6 49,0 - 51,5 min.
 Gradient: 6 min pufr A, 36 min gradient (100 % pufr A → 40 % pufr A + 60 % pufr B), 6 min pufr B, 6 min pufr A.

Na základě chromatogramů byla provedena SDS elektroforéza vybraných frakcí (Obr. 18, Str. 39; Obr. 19, Str. 40), včetně obou nanášek (Obr. 17). Ve frakcích 1, 2, 3, 4 a 7 z gelové permeační chromatografie (Tab. 2, Str. 39) a frakcích 1, 2, 3 a 6 z iontové výměnné chromatografie (Tab. 3, Str. 40) byly stanoveny koncentrace rozpustné formy myšního proteinu Nkr-p1a (Kap. 4.9). Každá z frakcí byla stanovována neředěná, 2× ředěná a 4× ředěná. Jako referenční vzorek byla použita destilovaná voda. S pomocí směrnice kalibrační přímky byly dopočítány odpovídající koncentrace vzorků.



Obr. 17: SDS elektroforéza nanášek na gelovou permeační chromatografii a iontově výměnnou chromatografii v redukcujících a neredukujících podmínkách. M marker, 1 nanáška na gelovou permeační chromatografii, 2 nanáška na iontově výměnnou chromatografii, neoznačené dráhy s touto prací nesouvisí.

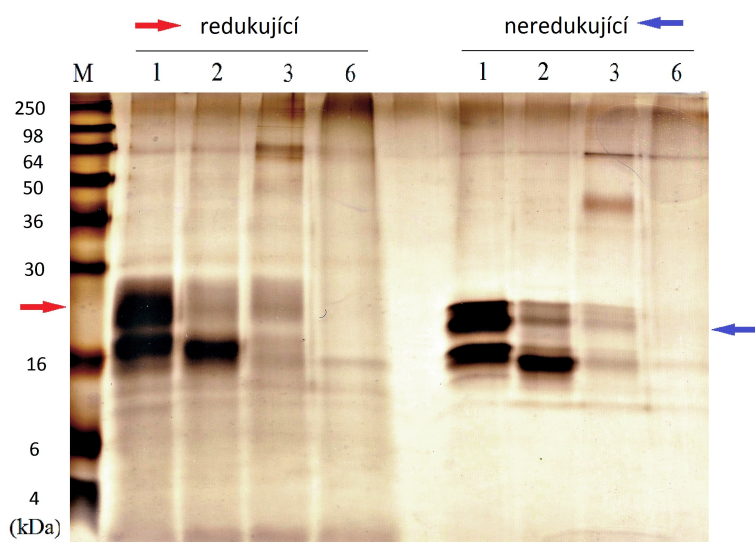
Po renaturaci a zakoncentrování je ve vzorcích vyhodnocených na SDS elektroforéze pozorovatelná přítomnost proteinu. Viditelné rozdělení proužků v místě odpovídajícím produkovanému proteinu je důkazem jeho degradace během renaturace.



Obr. 18: SDS elektroforéza frakcí gelové permeační chromatografie v redukujících a neredukujících podmínkách.
M marker, čísla u drah odpovídají číslům frakcí (Obr. 15, Str. 37) (frakce 7 byla vyhodnocena na jiném gelu, ale z důvodu negativního výsledku není součástí této práce).

Tab. 2: Výsledné koncentrace frakcí gelové permeační chromatografie.
 Objem každé frakce byl přibližně 1,5 ml.

frakce	koncentrace (mg/ml)	hmotnost (mg)
1	0,08	0,12
2	0,12	0,18
3	0,35	0,53
4	0,06	0,09
7	0,08	0,12
		součet: 1,04 mg



Obr. 19: SDS elektroforéza frakcí iontové výměnné chromatografie v redukujících a neredukujících podmínkách.
M marker, čísla u drah odpovídají číslům frakcí (Obr. 16, Str. 37).

Tab. 3: Výsledné koncentrace frakcí iontové výměnné chromatografie.
 Objem každé frakce byl přibližně 1,5 ml.

frakce	koncentrace (mg/ml)	hmotnost (mg)
1	0,12	0,18
2	0,08	0,12
3	0,07	0,11
6	0,02	0,03
		součet: 0,44 mg

Z výsledků SDS elektroforézy je zřetelné, že protein je možné úspěšně purifikovat. Z hlediska ztrát je lepší gelová permeační chromatografie. Získaný protein není za těchto podmínek renaturace a purifikace dostatečně stabilní. Dochází k jeho rozpadu na menší podjednotky. Z toho důvodu nebude použitý postup renaturace a purifikace vhodný pro přípravu vzorků na NMR stanovení.

Tab. 4: Celková bilance renaturace a purifikace rekombinantní rozpustné formy myšního proteinu Nkr-p1a.

	hmotnost (mg)	ztráta
izolovaná inkluzní tělíska	22	
solubilizovaná inkluzní tělíska	5,13	77 %
renaturát	3	42 %
<i>dialyzát</i>	48	- %
zakoncentrovaný vzorek	2,76	- %
frakce z gelové permeační chromatografie (nanáška 1,38 mg)	1,04	25 %
frakce z iontové výměnné chromatografie (nanáška 1,38 mg)	0,44	68 %
	1,48	47 %

6. Diskuze

Hlavním cílem práce bylo optimalizovat postup produkce rekombinantní rozpustné formy myšního proteinu Nkr-p1a v *E. coli* BL21(DE3) Gold. Ve vybraném produkčním systému je protein produkován ve formě inkluzních tělísek, pro získání jeho nativní formy je tedy třeba protein renaturovat.

K transformaci kompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3) Gold byl použit plazmid pET-30a(+) s vloženou sekvencí kódující rozpustnou formu myšního proteinu Nkr-p1a. Z kolonií transformovaných buněk byly na základě SDS elektroforézy vybrány vhodné produkční klony. U vybraných monoklonálních kultur byla provedena optimalizace podmínek pro produkci rekombinantního proteinu ve velkém objemu. Jako optimální koncentrace induktoru exprese IPTG byla zvolena 0,3mM koncentrace. Optimální doba produkce byla stanovena na dobu pěti hodin a optimální produkční teplotou bylo zvoleno 37 °C. Stanovením růstové křivky bylo zjištěno, že k získání kultury o hodnotě optické denzity 0,6, je v M9 minimálním médiu zapotřebí přibližně dvojnásobné doby inkubace než v LB médiu.

V půl litru M9 minimálního média byl s využitím optimálních podmínek produkován rekombinantní protein, ukládající se ve formě inkluzních tělísek. Izolovaná inkluzní tělíska byla solubilizována v guanidinovém pufru, který má chaotropní vlastnosti. Protein byl renaturován metodou rychlého zředění, převedením do renaturačního pufru obsahujícího arginin, který potlačuje srážení proteinu a funguje jako jednoduchý chaperon. Renaturační pufr dále obsahoval cysteamin a cystamin napomáhající správnému zapojení disulfidových můstků. Následně byl protein pomocí dialýzy převeden do fyziologických podmínek. K nejvýraznější ztrátě proteinu došlo při solubilizaci inkluzních tělísek, proto bude tento krok předmětem dalších pokusů. Renaturovaný protein byl dále purifikován pomocí gelové permeační chromatografie na koloně ENrich SEC 70 (10×300) a paralelně pomocí iontově výměnné chromatografie na koloně ENrich Q (5×50). Nižší ztráty při purifikaci byly pozorovány u gelové permeační chromatografie, méně efektivní se pak jeví iontově výměnná chromatografie. Při iontově výměnné chromatografii ale dochází k lepšímu oddělení dimeru proteinu od vzorku s nejvyšším obsahem monomeru.

Z výsledků SDS elektroforézy nanášek na kolony a získaných frakcí z obou chromatografických metod je ale bohužel patrné, že použitý renaturační a purifikační postup není vhodný pro přípravu izotopově značeného proteinu. Produkovaný protein není dostatečně stabilní a podléhá poměrně rychlému rozpadu, což by znemožnilo naměření NMR dat pro výpočet trojrozměrné struktury proteinu. K získání těchto dat je zapotřebí, aby protein vydržel stabilní minimálně po dobu několika týdnů.

7. Závěr

- byly vybrány optimální podmínky pro produkci rekombinantní rozpustné formy myšího proteinu Nkr-p1a ve velkém objemu
- produkovaný protein byl renaturován z inkluzních tělísek
- renaturovaný protein byl purifikován pomocí HPLC
- použitý postup renaturace a purifikace negativně ovlivňuje stabilitu proteinu, a proto ho bude třeba optimalizovat

8. Použitá literatura

1. Hořejší, V., Bartůňková, J.: *Základy imunologie*, 4.vydání; Praha; Triton; (2009)
2. Bianchi, M.E.: *J Leukoc Biol.* 81(1):1-5 (2007)
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: *Molecular biology of the cell*, 4.edition, New York (USA), Garland Science; (2002)
4. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/MEIS1ID41331ch2p14.html>; (10.5.2014)
5. Stobo, J.D., Rosenthal, A.S., Paul, W.E.: *J Exp Med.* 138(1):71-88 (1973)
6. Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H.: *Eur. J. Immunol.* 5, 112-7 (1975)
7. Cuturi, M.C., Anegón, I., Sherman, F., Loudon, R., Clark, S.C., Perussia, B., Trinchieri, G.: *J Exp Med.* 1;169(2):569-83 (1989)
8. Morandi, B., Bougras, G., Muller, W.A., Ferlazzo, G., Münz, C.: *Eur J Immunol.* 36(9):2394-400 (2006)
9. Murphy, K., Travers, P., Walport, M.: *Janeway's immunobiology*, seventh edition, Garland Science, New York, (2008)
10. Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., Trinchieri, G.: *J Exp Med.* 195(3):327-33 (2002)
11. Trinchieri, G.: *Semin Immunol.* 7(2):83-8 (1995)
12. Zapata, J.M., Takahashi, R., Salvesen, G.S., Reed, J.C.: *J. Biol. Chem.* 273(12):6916-20 (1998)
13. Yokoyama, W.M., Plougastel, B.F.: *Nat Rev Immunol.* 3(4):304-16 (2003)
14. Lanier, L.L.: *Annu. Rev. Immunol.* 23, 225-74 (2005)
15. Ryan, J.C., Seaman, W.E.: *Immunol Rev.* 155:79-89 (1997)
16. Natarajan, K., Dimasi, N., Wang, J., Mariuzza, R.A., Margulies, D.H.: *Annu Rev Immunol.* 20:853-85 (2002)
17. Kärre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., Kiessling, R.: *Nature.* 20-26;319(6055):675-8 (1986)
18. Zhang, C., Zhang, J., Tian, Z.: *Cell Mol Immunol.* 3(4):241-54 (2006)

19. Iannello, A., Debbeche, O., Samarani, S., Ahmad, A.: *J Leukoc Biol.* 84(1):1-26 (2008)
20. Iizuka, K., Naidenko, O.V., Plougastel, B.F., Fremont, D.H., Yokoyama, W.M.: *Nat Immunol.* 4(8):801-7 (2003)
21. Terunuma, H., Deng, X., Dewan, Z., Fujimoto, S., Yamamoto, N.: *Int Rev Immunol.* 27 (3): 93–110 (2008)
22. Anikeeva, N., Steblyanko, M., Fayngerts, S., Kopylova, N., Marshall, D.J., Powers, G.D., Sato, T., Campbell, K.S., Sykulev, Y.: *Eur J Immunol.* doi: 10.1002/eji.201344179 (2014)
23. Sovová, Z., Kopecký, V. Jr., Pazderka, T., Hofbauerová, K., Rozbeský, D., Vaněk, O., Bezouška, K., Ettrich, R.: *J Mol Model.* 17(6):1353-70 (2011)
24. Plougastel, B.F., Matsumoto, K., Dubbelde, C., Yokoyama, W.M.: *Immunogenetics.* 53(7):592-8 (2001)
25. Kveberg, L., Dai, K.Z., Inngjerdigen, M., Brooks, C.G., Fossum, S., Vaage, J.T.: *Immunogenetics.* 63(7):429-36 (2011)
26. Glimcher, L., Shen, F.W., Cantor, H.: *J Exp Med.* 145(1):1-9 (1977)
27. Aust, J.G., Gays, F., Mickiewicz, K.M., Buchanan, E., Brooks, C.G.: *J Immunol.* 183(1):106-16 (2009)
28. Zhang, Q., Rahim, M.M.A., Allan, D.S.J., Tu, M.M., Belanger, S., et al.: *PLoS One.* 7(12):e50561 (2012)
29. Inngjerdigen, M., Kveberg, L., Naper, C., Vaage, J.T.: *Tissue Antigens.* 78(2):81-8 (2011)
30. Rosen, D.B., Bettadapura, J., Alsharifi, M., Mathew, P.A., Warren, H.S., Lanier, L.L.: *J Immunol.* 175(12):7796-9 (2005)
31. Kogelberg, H., Lawson, A.M., Muskett, F.W., Carruthers, R.A., Feizi, T.: *Protein Expr Purif.* 20(1):10-20 (2000)
32. Kolenko, P., Rozbeský, D., Vaněk, O., Bezouška, K., Hašek, J., Dohnálek, J.: *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 67(Pt 12):1519-23 (2011)
33. Ryan, J.C., Niemi, E.C., Nakamura, M.C., Seaman, W.E.: *J Exp Med.* 181(5):1911-5 (1995)
34. <http://www.uniprot.org/uniprot/P27811> (12.8.2014)

35. pET system manual, Novagen, <http://richsingiser.com/4402/Novagen%20pET%20system%20manual.pdf> (5.8.2014)
36. Studier, F.W., Moffatt, B.A.: J Mol Biol. 189(1):113-30 (1986)
37. ENrich™ High-Resolution Protein Purification Columns, user manual http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6395.pdf (10.7.2014)
38. Anzenbacher, P., Kovář, J.: Metody chemického výzkumu pro biochemiky, první vydání, Praha, Ministerstvo školství ČSR, (1986)
39. Bradford, M.M.: Anal Biochem. 72:248-54 (1976)
40. <http://www.piercenet.com/method/chemistry-protein-assays#dyeassays> (10.7.2014)
41. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T.: Anal Biochem. 150(1):76-85 (1985)
42. bicinchonic acid protein assay kit, Sigma- Aldrich, product information
43. Reynolds, J.A., Tanford, Ch.: J. Biol. Chem. 245(19):5161-5 (1970)
44. <http://www.piercenet.com/product/coomassie-brilliant-blue-r-250-g-250> (12.7.2014)
45. Switzer, R.C., Merril, C.R., Shifrin, S.: Anal Biochem. 98(1):231-7 (1979)
46. Rabilloud, T.: Electrophoresis. 11(10):785-94 (1990)
47. http://web.expasy.org/compute_pi/ (10.8.2014)

