

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra biochemie



**Optimalizace exprese fotoafinitních proteinových  
nanosond lidských strukturních proteinů zubní  
skloviny**

Bakalářská práce

Jana Štrohalmová

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.

Konzultant:

RNDr. Tomáš Ječmen

Praha 2014

## **PROHLÁŠENÍ**

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

V Praze dne .....

.....

Jana Štrohalmová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Mé poděkování patří školiteli doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce, za cenné rady a informace, darované chemikálie a zapůjčené přístroje. Dále velmi děkuji Mgr. Renatě Ptáčkové za pomoc a spolupráci při práci. V neposlední řadě děkuji RNDr. Tomáši Ječmenovi za podporu a poskytnutí odborné literatury pro teoretickou část této práce.

## ABSTRAKT

Zubní sklovina (enamel) je nejtvrďší tkáň těla obratlovců. Je tvořena evolučně vysoce konzervovaným biomineralizačním procesem, který je řízen proteiny mezibuněčné hmoty (extracelulární matrix). Amelogenin (AMEL) a ameloblastin (AMBN) jsou hlavními proteiny a zároveň klíčovými prvky pro správnou tvorbu zubní skloviny. Současně slouží jako molekuly buněčné adheze, které regulují proliferaci a diferenciaci ameloblastů (buněk podílejících se na tvorbě zubní skloviny). Protože AMBN i AMEL patří do rodiny vnitřně neuspořádaných proteinů (IDP, z angl. intrinsically disordered protein), je velice složité najít metodiku umožňující studovat jejich strukturu a molekulární mechanismus působení.

Tato bakalářská práce se zabývá optimalizací přípravy fotoaktivovatelných proteinových "nanosond" studovaného ameloblastinu a amelogeninu pomocí rekombinantní exprese v *E. coli* s inkorporovaným fotoaktivovatelným analogem aminokyseliny (methionin, leucin). Takto připravené proteinové "nanosondy" budou sloužit ke studiu protein-proteinových interakcí v roztoku a k objasnění strukturně funkčních vztahů lidských proteinů zubního enamelu (ameloblastin a amelogenin).

**Klíčová slova:** Zubní sklovina  
Ameloblastin  
Amelogenin  
Fotoaktivovatelné proteinové "nanosondy"  
Hmotnostní spektrometrie

## ABSTRACT

Dental enamel is the hardest tissue of the body. It is formed by an evolutionarily highly conserved biomineralization process that is controlled by proteins of extracellular matrix. Amelogenin (AMEL) and ameloblastin (AMBN) are key element of the correct enamel formation. Simultaneously the proteins serve as a cell adhesion molecule that regulates proliferation and differentiation of ameloblasts (the cells involved in dental enamel formation). AMEL and AMBN belong to the family of intrinsically disordered proteins (IDPs) therefore it is very difficult to find a methodology for studying the structure and action of molecular mechanism.

This bachelor's thesis is aimed at optimization of preparation process of photolabile protein "nanoprobes" of ameloblastin and amelogenin using recombinant expression in *E. coli* by incorporation of the photolabile analogs of amino acids (methionine, leucine). The prepared protein "nanoprobes" will be used to study protein-protein interactions in solution and to elucidate the structure-function relationships of human dental enamel proteins (ameloblastin, amelogenin). (In Czech)

**Keywords:** Dental enamel  
Ameloblastin  
Amelogenin  
Photolabile protein "nanoprobes"  
Mass Spectrometry

# OBSAH

<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>3</b>
Klíčová slova.....	3
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
Keywords.....	4
<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>7</b>
<b>1. TEORETICKÝ ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
1.1 Zub .....	9
1.1.1 Zubní sklovina.....	9
1.1.1.1 Vznik zubní skloviny .....	10
1.1.1.2 Ameloblasty .....	11
1.1.1.3 Proteiny extracelulární matrix zubního enamelu.....	11
1.2 Studované proteiny - ameloblastin a amelogenin.....	12
1.2.1 Amelogenin .....	12
1.2.2 Ameloblastin .....	13
1.3 Fotoafinitní značení pomocí fotoaktivovatelných "nanosond" .....	13
1.3.1 Diazo sloučeniny.....	15
1.3.2 Nitreny.....	15
1.3.3 Benzofenony .....	16
1.4 Hmotnostní spektrometrie .....	17
1.4.1 Měkké ionizační techniky.....	18
1.4.2 Hmotnostní analyzátor TOF.....	19
<b>2. CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIÁL.....</b>	<b>21</b>
3.1 Chemikálie.....	21
3.2 Použité pufrы a roztoky .....	22

3.3 Přístroje .....	23
<b>4. METODY.....</b>	<b>24</b>
4.1 Transformace kompetentních buněk.....	24
4.2 Inokulace .....	25
4.3 Optimalizace produkce AMBN.....	26
4.4 Optimalizace produkce AMEL.....	26
4.5 Produkce AMBN v limitním mediu.....	26
4.5.1 Produkce AMBN v limitním mediu s pMet .....	27
4.5.2 Produkce AMBN v limitním mediu s pLeu.....	27
4.5.3 Izolace plasmidové DNA.....	28
4.6 Produkce AMEL v limitním mediu.....	29
4.6.1 Produkce AMEL v limitním mediu s pMet a v limitním mediu s Met .....	29
4.6.2 Produkce AMEL v limitním mediu s různými poměry koncentrací Met a pMet..	29
4.7 Diskontinuální elektroforesa SDS-PAGE.....	30
4.8 Modifikace proteinů, štěpení proteasou a měření MALDI-TOF MS .....	31
4.9 Grafické znázornění provedených experimentů.....	32
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>33</b>
5.1 Transformace plasmidu do bakteriálních buněk, noční kultura.....	33
5.2 Produkce proteinu v LB mediu .....	33
5.3 Produkce AMBN v limitním mediu s pMet.....	34
5.4 Produkce AMBN v limitním mediu s pLeu.....	36
5.5 Produkce AMEL v limitním mediu s pMet .....	37
<b>6. DISKUSE .....</b>	<b>42</b>
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>44</b>
<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>45</b>

## SEZNAM ZKRATEK

ACN	acetonitril
AMBN	ameloblastin
AMEL	amelogenin
AMK	aminokyselina
APS	persíran amonný (z angl. amonium persulfate)
c	molární koncentrace [mol/dm <sup>3</sup> ]
CBB	Coomassie brilliantová modř (z angl. Coomassie brilliant blue, R-250)
CCA	α-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (z angl. α-cyano-4-hydroxycinnamic acid)
cDNA	komplementární DNA (z angl. complementary DNA)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
DTT	dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtMf	ethylmorfolin
IAA	jodacetamid
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
Leu / pLeu	leucin / foto-leucin
LB medium	Luria–Bertani / lysogeny broth medium
MALDI-TOF	desorpce a ionizace laserem za asistence matrice – měření doby letu (z angl. matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight)
Met/pMet	methionin / foto-methionin
M	jednotka molární koncentrace [mol/dm <sup>3</sup> ]
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
MWm	standard molekulových hmotností (z angl. Molecular Weight marker)
m/z	poměr hmotnost/náboj
OD <sub>550</sub>	optická densita při vlnové délce 550 nm
PB pufr	fosfátový pufr (z angl. Phosphate Buffer)
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationtů
pI	izoelektrický bod
rpm	otáčky za minutu (z angl. rotates per minute)

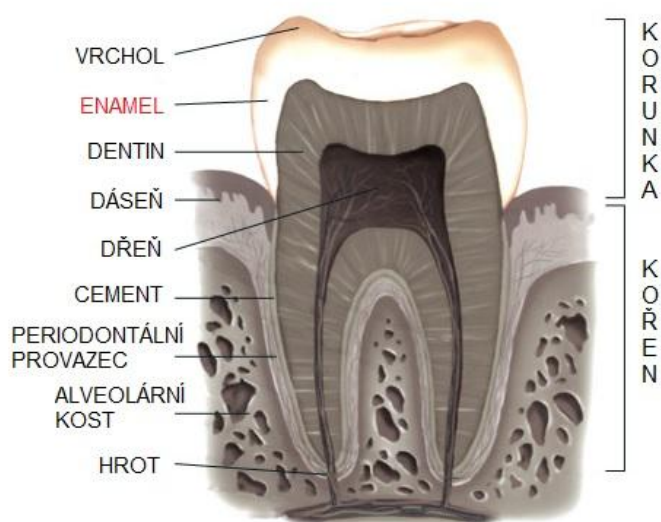


SDS	dodecylsulfát sodný (z angl. sodium dodecylsulfate)
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (z angl. sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electroforesis)
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfan
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TFA	trifluoroctová kyselina
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transferová RNA (z angl. transfer RNA)
Uniprot	databáze Universal Protein Resource
UV	ultrafialové záření (z angl. ultraviolet)
v/v	objemová procenta (poměr objem/objem)
w/v	procenta (poměr hmotnost/objem)
w/w	hmotnostní procenta (poměr hmotnost/hmotnost)

# 1. TEORETICKÝ ÚVOD

## 1.1 Zub

Zuby jsou vývojově specializovanými deriváty ústní sliznice, které slouží k mechanickému rozmělnění potravy. Důležité jsou však i při tvorbě řeči. Každý zub je tvořen dvěma hlavními částmi - korunkou a kořenem (obr. 1).<sup>1,2</sup>



Korunka je nejobemnější část zubu, jenž vyčnívá z dásně a je tedy dobře viditelná. Je tvořena zubovinou (dentinem) a sklovinou (enamelem). Dentin vytváří nejsilnější vrstvu zubních tkání a tvoří tedy základní tvar samotného zubu. Enamel pokrývá dentin po celém povrchu zubní korunky a je nejtvrdší tkání těla obratlovců. Je to obal celého zubu.<sup>2</sup>

**Obr. 1 Průřez zubem.** Složení zubu: vrchol, enamel, dentin, dásněň, dřeň, cement, periodontální provazec, alveolární kost, hrot.<sup>3</sup>

Kořen je pevně zasazen do zubního lůžka. Je pokryt zubním cementem, jenž se skladbou i tvrdostí podobá kostní tkáni.<sup>2</sup>

Pomyslnou hranici mezi korunkou a kořenem tvoří zubní krček. Tato zúžená prostřední část zubu je také pokryta zubním cementem, jenž v malém rozsahu kryje i zubní sklovinu.<sup>2</sup>

### 1.1.1 Zubní sklovina

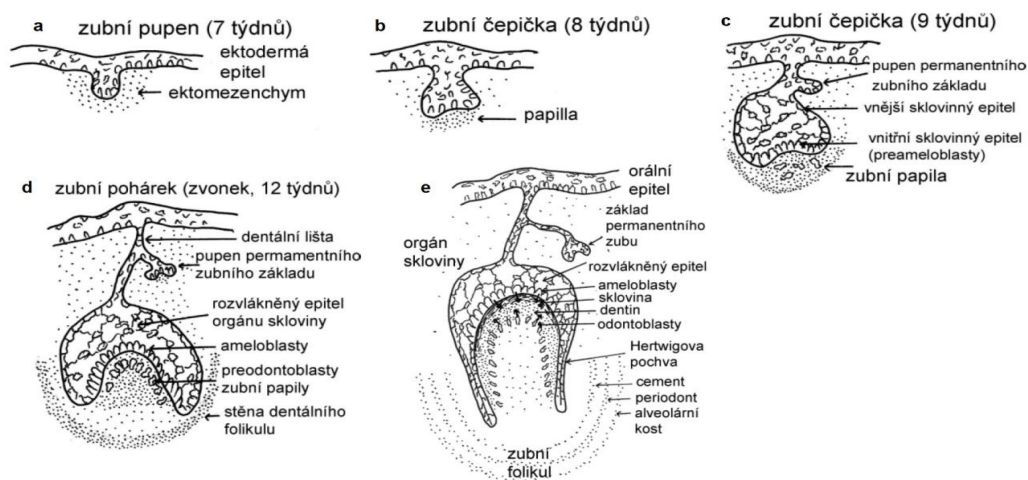
Zubní sklovina (enamel) je nejtvrdší a nejvíce mineralizovaná tkáně těla obratlovců. Jako vnější vrstva zubní korunky kryje vnitřní části zubu (obr. 1). Až 90% zubní skloviny tvoří krystalická sloučenina hydroxyapatit  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Hydroxylové skupiny v krystalové struktuře hydroxyapatitu mohou být nahrazeny jinými anionty, například fluoridovými (vzniká fluorapatit), fosforečnanový anion může být nahrazen uhličitanovým

a vápenaté kationty mohou být zaměněny například za hořečnaté či olovnaté kationty.<sup>1,4</sup> Zbylých 10% zubní skloviny tvoří organické látky (proteiny a lipidy) a voda.<sup>1,4</sup>

### 1.1.1.1 Vznik zubní skloviny

Poměrně složitý proces tvorby zubní skloviny začíná již okolo 5. - 6. týdne embryonálního vývoje. Buňky neurální lišty migrují do oblasti vyvíjejících se dásní a diferencují se v mezenchymové buňky, které ovlivňují diferenciaci dásňového epitelu ektodermálního původu. Bujením pak vzniká horní a dolní obloukovitá zubní lišta. Na každé liště se poté tvoří 10 zubních pupenů (obr. 2a), obklopených zhuštěným mezenchymem, které jsou základem pro tzv. "dočasné" zuby. Zubní pupeny se mění v zubní čepičky (obr. 2b,c), proti nimž je vtlačován zhuštěný mezenchym, který se proměňuje v dentální papilu. Okolo 12. týdne embryonálního vývoje se zubní čepičky přemění v zubní pohárky (obr. 2d), které se dále mění v orgán zvonovitého tvaru, tzv. sklovinný orgán (obr. 2e), jenž je složen ze tří částí: a) z vrstvy vnějších ameloblastů, b) ze sklovinné pulpy, c) z vrstvy vnitřních ameloblastů, přiléhajících k dentální papile. Během transformace zubních pupenů se mění také buňky na povrchu dentální papily, ze kterých se stávají odontoblasty. Odontoblasty začínají sekretovat predentit, který se po mineralizaci přemění na dentin. Právě v tuto chvíli se diferencují vnitřní ameloblasty v cylindrické buňky, které zahájí sekreci proteinů zubní skloviny.<sup>5</sup>

Ameloblasty sekretují proteiny zubní skloviny pod sebe, což je u epitelových buněk neobvyklé. Vznikající zubní sklovina pak vtlačuje vnitřní ameloblasty směrem ke sklovinné pulpě a vnějším ameloblastům.<sup>5</sup>



**Obr. 2 Vývoj zuby.** a) zubní pupen, b), c) zubní čepička, d) zubní pohárek, e) sklovinný orgán.<sup>6</sup>

### 1.1.1.2 Ameloblasty

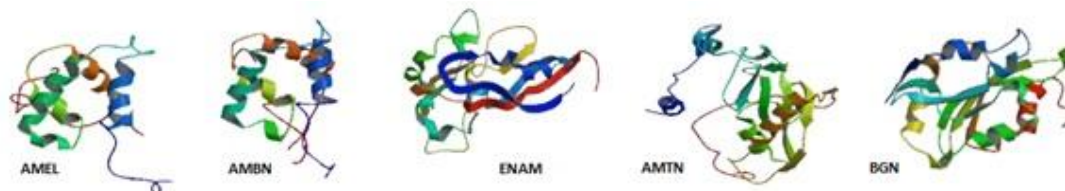
Ameloblasty jsou vysoké cylindrické buňky ektodermálního původu. Objevují se a fungují pouze při vývoji zubů obratlovců, kde slouží jako ložisko zubní skloviny. Ameloblasty vznikají při procesu zvaném amelogenese.

Při amelogenesi se z vnitřní sklovinné hmoty diferencují preameloblasty. Tento děj vyvolá diferenciaci odontoblastů, jenž začnou produkovat predentin. Mineralizací predentinu vzniká dentin a zároveň se indukuje přeměna preameloblastů na ameloblasty. Zralé ameloblasty vytvářejí apikální Tomesův výběžek, který obsahuje sekreční granula s proteiny, které se následně podílejí na mineralizaci zubní skloviny. Tyto ameloblasty sekterují sklovinnou hmotu, která je již částečně mineralizována. Poté, co je vyprodukována celá tloušťka zubní skloviny, Tomesův výběžek vymizí a vznikají zredukované ameloblasty. Ty zajišťují maximální mineralizaci skloviny tím, že odnímají z již vyprodukované sklovinné hmoty vodu a organické látky a nahrazují je hydroxyapatitem. Po dokončení mineralizace se začínají ameloblasty zkracovat a při prořezávání zubů úplně vymizí.<sup>7</sup>

### 1.1.1.3 Proteiny extracelulární matrix zubního enamelu

Výstavba zubní skloviny je velice složitý a dosud plně neobjasněný proces. Účastní se jí mnoho složek a faktorů, které přispívají ke správné tvorbě enamelu. Velkou roli zde hrají právě proteiny, které koordinují mineralizaci zubní skloviny (obr. 3).<sup>8</sup>

Amelogenin (AMEL), ameloblastin (AMBN) a enamelin (ENAM) jsou klíčové proteiny při budování zubní skloviny, stejně jako nedávno objevený amelotin (AMTN) a malý proteoglykan biglycan (BGN).<sup>8</sup>



**Obr. 3 Ilustrace trojrozměrných struktur proteinů extracelulární matrix zubního enamelu.**  
a) amelogenin, Uniprot Q99217, b) ameloblastin, UniProt Q9NP70, c) enamelin, UniProt Q9NRM1, d) amelotin, UniProt Q6UX39, e) biglycan, UniProt P21810.<sup>9</sup>

## 1.2 Studované proteiny - ameloblastin a amelogenin

Ameloblastin (AMBN) a amelogenin (AMEL) jsou nejhojnější proteiny extracelulární matrix, kde hrají klíčovou roli v biomineralizaci zubní skloviny.<sup>6</sup> Oba proteiny patří do rodiny tzv. "vnitřně neuspořádaných proteinů" (z angl. intrinsically disordered proteins, IDP), která obsahuje molekuly, jež nemají stabilní terciální nebo sekundární strukturu a velmi rychle mění svou konformaci. To je také důvod, proč zatím stále nemáme dostatek informací o jejich struktuře, interakcích a hlavně funkční roli v biomineralizaci enamelu.<sup>8,10</sup>

### 1.2.1 Amelogenin

Amelogenin je nepostradatelný pro správný vývoj zubní skloviny. Lidský gen pro AMEL je exprimován jediným genem na chromozomu X. Kopie tohoto genu však byla objevena také na chromozomu Y a má spojitost s defektním onemocněním zubní skloviny zvaným *amelogenesis imperfecta* (AI). Tato dědičná porucha ještě více potvrzuje tvrzení, že AMEL je jedním z majoritních proteinů v procesu biomineralizace zubního enamelu.<sup>8,10</sup>

Aminokyselinová sekvence AMEL byla původně určena pomocí Edmanova N-terminálního odbourávání purifikovaných proteinů. Později byla odvozena od DNA sekvence amelogeninových cDNA. První sekvence AMEL byla izolována z prasat a skotu. Následně byl izolován AMEL lidský, králičí, a z křečka. Nedávno byly také popsány sekvence AMEL z ptakopyska, ježury, kajmana a ropuchy. Tyto údaje odhalily nápadnou homologii na N- a C- terminálních částech mezidruhových sekvencí AMEL.<sup>10</sup>

Jak již bylo řečeno, AMEL je specifický enamelový protein, jenž je produkován ameloblasty od začátku mineralizace dentinu až po zrání zubní skloviny. Exprese AMEL v buňkách byla popsána pomocí *in situ* hybridizace a také imunohistochemicky. Pozdější studie ukázaly, že AMEL signály jsou velmi slabé a nachází se v blízkosti sekretujících buněk, tedy ameloblastů, zatímco AMBN signály (více viz kapitola 1.2.2) jsou velice silné, což může ukazovat, že vznikající AMEL je nějakým způsobem zastíněn a "imun sondy" tak dostávají jen nepatrný signál.<sup>10</sup> Tato informace by mohla naznačovat existenci protein-proteinových interakcí.

Vývoj expresních systémů pro rekombinantní AMEL přinesl nejen možnost studovat některé strukturální vlastnosti, ale také možnost zkoumat fyzikálně-chemické vlastnosti AMEL. Byla provedena studie ukazující závislost rozpustnosti AMEL na změně pH roztoku. Bylo zjištěno, že rozpustnost AMEL úzce souvisí s primární strukturou proteinu,

pH roztoku, s iontovou silou roztoku i na samotném složení pufru. Ukázalo se, že rekombinantní i modifikovaný AMEL (který postrádá 13 aminokyselin na C-konci), jsou velmi dobře rozpustné v kyselém prostředí. V bazickém prostředí se však modifikovaný AMEL rozpouští o poznání méně. Toto chování koresponduje s absencí hydrofilní C-terminální sekvence modifikovaného AMEL.<sup>10</sup>

### 1.2.2 Ameloblastin

Ameloblastin je druhým nejrozšířenějším proteinem extracelulární matrix. Lidský gen pro AMBN je lokalizován na chromozomu 4, u myši je to chromozom 5.<sup>11</sup> AMBN je tvořen ameloblasty od rané sekreční fáze až do fáze zrání v procesu tvorby zubního enamelu. Zaujímá 5-10 % (*w/w*) všech proteinů zubní skloviny.<sup>4</sup> Bioinformativní analýza potvrdila, že AMBN také patří do rodiny IDP a skládá se z N-koncové domény, která má tendenci přijmout helikální konformaci, a z kyselého C-konce, který je zodpovědný za strukturální poruchy celé molekuly.<sup>12</sup>

N- a C- konce AMBN byly objeveny při hledání proteinů zubní skloviny prasete.<sup>10</sup> Ukázalo se, že při formování zubní skloviny působí na AMBN proteasy extracelulární matrix. Bylo dokázáno, že produkty štěpení N- a C- konce mají v této mezibuněčné hmotě odlišné pozice. Z částí N- terminální sekvence jsou tvořeny nízkomolekulární peptidy o molekulové hmotnosti 13 - 17 kDa<sup>10</sup> a jsou lokalizovány po celé tloušťce matrix<sup>12</sup>, zatímco produkty štěpení kyselého C-konce jsou tvořeny dvěma polypeptidovými řetězci o přibližné hmotnosti 27 a 29 kDa.<sup>12</sup> Tyto konce jsou pozorovány hlavně v nezralých částech matrix, v blízkosti vylučování ameloblastů.<sup>12</sup>

Zajímavou fyzikálně-chemickou vlastností AMBN je jeho bipolarita. Na základě studia prasečí cDNA sekvence AMBN bylo zjištěno, že prvních 129 zbytků proteinu, které odpovídají produktu štěpení o molekulové hmotnosti 15 kDa (tedy N-konci), mají izoelektrický bod (pI) rovný 10,6, zatímco 66 zbytků odpovídajících C-konci má pI rovno 4,5. Tato skutečnost může vysvětlit odlišnou lokalizaci proteolytických štěpů C- a N- konce v průběhu tvorby zubního enamelu.<sup>10</sup>

### 1.3 Fotoafinitní značení pomocí fotoaktivovatelných "nanosond"

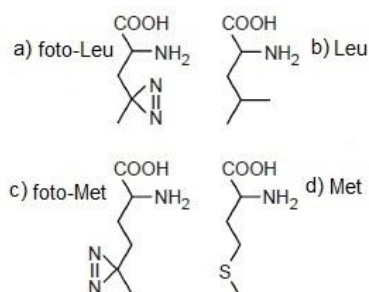
Protein-proteinové interakce hrají klíčovou roli při organizaci či regulaci buněčných procesů. Mnohé studie ukazují, že většina proteinů častěji vytváří supermolekulární komplexy, než by fungovaly jako izolovaný subjekt. Jednou z metod studie vzájemných

interakcí proteinů je koimunoprecipitace. Tato metoda využívá jako výchozí materiál buněčné lyzáty, což však činí velký problém právě při detekci proteinových interakcí, jelikož může docházet ke ztrátě prostorové organizace během lyzačních procesů. Druhým problémem této metody se stávají slabě interagující partneři, kteří mohou být během promývacích fází ztraceni.<sup>13</sup>

Z těchto důvodů je stále používanější metoda chemického nebo fotochemického zesíťování (z angl. cross-link), které vytváří vazbu jednoho polymerního řetězce s druhým, a tak kovalentně fixuje protein-proteinové interakce v živých buňkách. Chemické zesíťování používá mírně reaktivní chemická činidla, která reagují např. s volnými amino skupinami za vzniku kovalentní vazby mezi proteiny. Foto-zesíťení naopak generuje vysoce reaktivní meziproducty *in situ* ozářením inertního prekursoru a jeho hlavní výhodou je nízká specifita a extrémně krátký poločas života excitovaného intermediátu.<sup>13</sup>

Jednou z možností, jak inkorporovat fotolabilní analog aminokyseliny do sekvence proteinu je rekombinantní exprese v *E. coli*. Díky nižší specifitě aminoacyl-tRNA synthasy a strukturální podobnosti analogu s aminokyselinou je na molekulu tRNA přenesen tento analog aminokyseliny a tak může vstupovat do procesu proteosyntesy. Pro zvýšení míry

inkorporace analogu do sekvence proteinu a snížení kompetice vlastní aminokyseliny probíhá rekombinantní exprese v minerálním mediu s obsahem jednotlivých aminokyselin a inkorporovaného foto-analogu. V této bakalářské práci byly použity fotoaktivovatelné analogy aminokyseliny foto-Leu (obr. 4a) a foto-Met (obr. 4c), které při expresi proteinu v mediu nahrazovaly aminokyseliny leucin (obr. 4b) a methionin (obr. 4d).

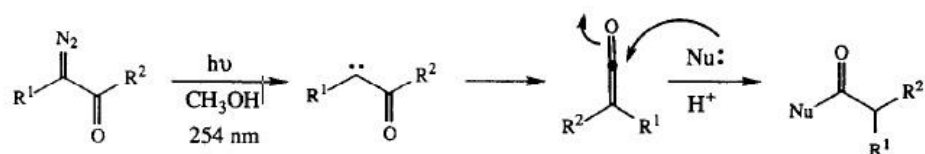


**Obr. 4 Fotoaktivovatelné aminokyseliny, foto-Leu (a) a foto-Met (c) odvozené od aminokyselin Leu (b) a Met (d).**<sup>13</sup>

Uvedené fotolabilní analogy aminokyselin patří do skupiny diazirinů, které po ozáření tvoří reaktivní karbeny. Kromě nich lze k tvorbě reaktivních intermediátů použít také fotolabilní nitreny či benzofenony.

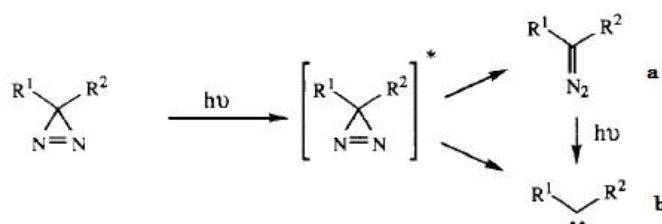
### 1.3.1 Diazo sloučeniny

**Diazo skupiny** byly použity jako první příklad fotoafinitní analýzy. Fotochemické chování diazo ketonů je velmi dobře prostudováno a jeho reakční mechanismus je ukázán na obrázku 5. Z diazo ketonu vzniká fotoaktivací ketenový intermediát, který je poměrně stabilní a dokáže selektivně reagovat s nukleofilními činidly. Tato skutečnost však přináší nebezpečí právě pro fotoznačení. Například přítomnost vody může experiment zkomplikovat, protože jako nukleofilní činidlo reaguje s ketenem za vzniku karboxylové kyseliny.<sup>14</sup>



Obr. 5 Reakční schéma diazo ketonu.<sup>14</sup>

V roce 1975 Smith a Knowles navrhli jako potenciálně možné činidlo pro fotoafinitní značení **diaziriny**. Jsou to malé, lipofilní molekuly, které obsahují chromofor schopný absorpce UV světla o vlnových délkách až 300 nm. Díky tomu bylo objeveno velmi mnoho aplikací fotochemického zesíťování právě pro skupiny diazirinů. Ozáření substituovaného diazirinu (obr. 6) vede ke vzniku odpovídající diazo sloučeniny (a) a karbenu (b).<sup>14</sup>



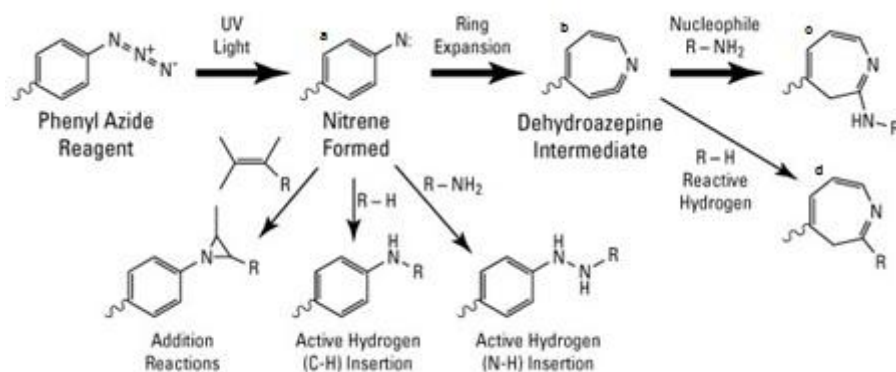
Obr. 6 Reakční schéma diazirinu.<sup>14</sup>

### 1.3.2 Nitreny

Fotoafinitní značení s nitreniovým meziproduktem pocházejícím z aryl azidu je nejpoužívanější technika značení. Relativní fotoreaktivita aryl azidu se liší v závislosti na použité aminokyselině. Například cystein vykazuje nejvyšší reaktivitu, kdežto glycin je s nitreniovými meziprodukty téměř nereaktivní. Na obrázku 7 (str. 16) je zobrazen fenyl azid, který se po ozáření UV zářením přemění na nitreniový meziprodukt (a). Jeho hlavní



reakční dráha (tučné šipky) poté pokračuje přeměnou na dehydroazepinový meziprodukt (b), který dále reaguje s molekulou obsahující nukleofilní (c) (častěji) nebo aktivní vodíkové skupiny (d).<sup>14</sup>



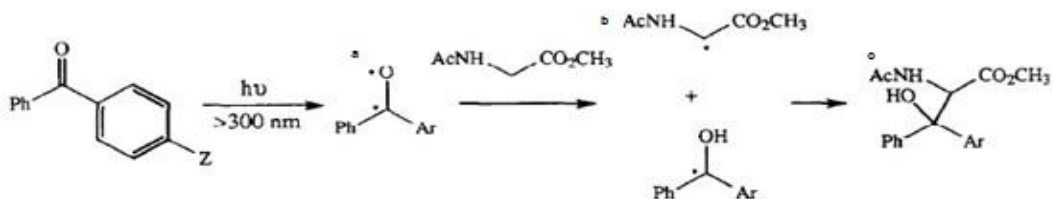
**Obr. 7** Reakční schéma aryl azidu při fotochemickém zesíťování. Vlnitá čára reprezentuje označovací činidlo nebo zesíťovač s fenyl azidovou reaktivní skupinou, (R) představuje protein nebo jeden konec molekuly obsahující nukleofilní nebo aktivní hydrogenovou skupinu.<sup>15</sup>

Další třídu nitrenioivých prekurzorů tvoří **purinové a pyrimidinové azidy**. Fotoaktivita 8-N<sub>3</sub> a 2-N<sub>3</sub> adenosinů byla použita pro kovalentní vazbu v mnoha studiích. Fotochemická cesta však stále není dostatečně objasněna a otevírá tak možnost dalšího a podrobnějšího studia.<sup>14</sup>

Zajímavou skupinu nitrenioivých prekurzorů pak tvoří **alkyl azidy**. Jejich použití je však velmi omezeno díky relativní nestabilitě.<sup>14</sup>

### 1.3.3 Benzofenony

Benzofenony jsou pro fotoafinní značení běžně užívané. Předpokládaný mechanismus fotoafinitního značení je zobrazen na obr. 8. Ozáření benzofenonové skupiny vzniká diradikál, který reaguje s  $\alpha$ -vodíkem z N-acetylglycin methyl esteru a vzniká výsledný  $\alpha$ -benzhydryl derivát.<sup>14</sup>



**Obr. 8** Reakční schéma benzofenonu.<sup>14</sup>

Obecně platí, že radikálové meziprodukty jsou velmi vhodné pro fotoafinitní značení. S C-H vazbami reagují více než nitreny a oproti karbenům mají menší sklon k intramolekulárním přesmykům.<sup>14</sup>

## 1.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS, z angl. mass spectrometry) je analytická metoda určování hmotnosti atomů, molekul a jejich částí. Díky objevu měkkých ionizačních technik nalézá MS uplatnění také v biochemii, kde, mimo jiné, slouží k zjišťování posttranslačních modifikací proteinů, k určování disulfidických vazeb a k identifikaci mutací v AMK sekvenci.

Hmotnostní spektrometr dokáže analyzovat částice nesoucí náboj. Nabité molekuly prochází elektrickým nebo magnetickým polem, které je rozdělí na základě poměru hmotnost/náboj ( $m/z$ ). Z těchto údajů lze pak velmi přesně určit molekulovou hmotnost daných částic.<sup>16</sup>

Hmotnostní spektrometr tvoří tři hlavní části - ionizační zdroj, analyzátor a detektor. Ionizační zdroj přivádí na částice analytu náboj a převádí je do plynného stavu. Použitý způsob ionizace značně ovlivňuje aplikační zaměření metody.<sup>17</sup> Podle množství dodané energie rozdělujeme ionizační techniky na tzv. měkké, kdy energetický přebytek dodaný ionizované molekule je malý a pravděpodobnost fragmentace nízká, a tvrdé ionizační techniky, kdy dodaná energie postačuje k fragmentaci primárního iontu.<sup>16</sup>

Po ionizaci přicházejí nabité částice do analyzátoru, kde dochází k jejich dělení a rozlišení podle poměru  $m/z$  na základě rozdílného chování v magnetickém nebo elektrickém poli. Výběrem analyzátoru, stejně jako ionizačního zdroje, ovlivňujeme vlastnosti celého spektrometru (např.: přesnost, citlivost, rozlišení).<sup>16</sup>

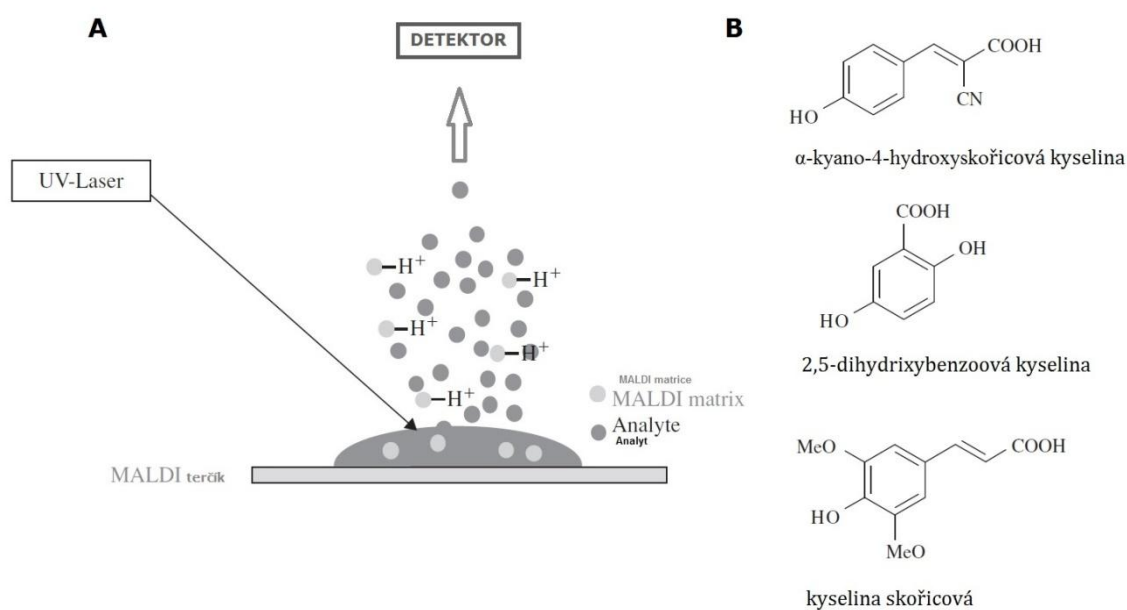
Roztříděné ionty následně dopadají na detektor. V současné době dělíme detektory do dvou kategorií: (1) detektory pro přímá měření, na které dopadají ionty a tím generují elektrický proud a (2) násobičové detektory, které násobí množství elektronů vznikajících při dopadu iontů na detektor a tím umožňují měřit signály s vyšší citlivostí (i jednotlivých iontů).<sup>16</sup>

S ohledem na MS techniky je nedílnou součástí spektrometru i výkonný vakuový systém, který zajišťuje udržení dostatečně nízkých tlaků po celou dobu měření tak, aby nedocházelo k ovlivnění trajektorie průletu nabitého analytu v přístroji.<sup>16</sup>

### 1.4.1 Měkké ionizační techniky

Jednou z poměrně nových měkkých ionizačních technik je ionizace MALDI (z angl. matrix-assisted laser desorption/ionization), která vznikla zdokonalením dříve hojně využívané ionizace laserem (tvrdé ionizační techniky). MALDI ionizační zdroj (obr. 9A) využívá tzv. matrix, neboli matrici, která se smíchá s analytem. Tato směs se poté nanese na MALDI terčik a vytvoří směsný krystal. Matrice musí splňovat několik podmínek - musí absorbovat v blízkosti vlnových délek používaného laseru, musí být stabilní ve vakuu a dobře mísitelná s analytem. Nejčastěji používané matrice pro UV-lasery jsou zobrazeny na obr. 9B. Jsou to slabé kyseliny, které obsahují systém konjugovaných dvojných vazeb absorbující energii UV záření, které mají schopnost protonizovat analyt.

Poté, co se MALDI terčik s krystalem vloží do evakuovaného systému, dochází pomocí pulsu UV laseru k šetrné ionizaci a převodu vzorku do plynného stavu.<sup>17</sup> Ionizovaný analyt dále pokračuje k detektoru, kde dochází k selekci a filtraci iontů. Nejpoužívanějším detektorem pro MALDI je analyzátor z doby letu (TOF, z angl. time of flight).



**Obr. 9A Schéma MALDI ionizace.** UV-laser ozáří směsný krystal na MALDI terčíku. Následně dochází k protonizaci analytu MALDI matricí. **9B Nejpoužívanější matrice pro MALDI ionizaci.**<sup>17</sup>

### 1.4.2 Hmotnostní analyzátor TOF

Pokud bychom hledali nejjednodušší a současně jeden z nejrychlejších MS detektorů, jednalo by se o TOF analyzátor. Jeho princip měření je založen na poznatku, že ionty se stejnou kinetickou energií, ale rozdílnou hmotností, se pohybují různými rychlostmi ( $E_k = 1/2 mv^2$ ). Když pulz UV laseru ionizuje směsný krystal matrice a analytu, dostávají všechny ionty ve stejnou chvíli stejný impulz kinetické energie při zachování jejich momentu hybnosti. Ionty poté prolétají po trajektorii a je zřejmé, že ionty s menší hmotností dopadají na detektor dříve než ionty s větší hmotností. Čím delší je dráha letu dvou ionizovaných částic, tím lépe dochází k jejich rozdělení. Z toho důvodu může být na konci trubice umístěno iontové zrcadlo (reflektron), které nejen prodlouží dráhu letu ale současně fokusuje populaci částic o stejném  $m/z$ .<sup>17</sup>

Spojení metody MALDI s TOF analyzátozem je pro své vlastnosti velmi často využíváno, zvláště pro studium makromolekul v proteomice.<sup>18</sup>

## 2. CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je optimalizace a realizace přípravy fotoaktivovatelných ameloblastinových a amelogeninových "nanosond" rekombinantní expresí v *E. coli* a následná analýza výsledného produktu pomocí hmotnostní spektrometrie.

Takto připravené fotoaktivovatelné "nanosondy" budou sloužit ke studiu protein-proteinových interakcí a strukturně funkčního mechanismu tvorby zubní skloviny (enamelu).

## 3. MATERIÁL

### 3.1 Chemikálie

**Applied Biosystem, USA:** oligo R3

**Bruker Daltonics, SRN:**  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina

**Fluka, Švýcarsko:** dihydrogenfosforečnan draselný, dodecylsulfát sodný, ethylmorfolin, glycin, hydrogenfosforečnan disodný, chlorid amonný, chlorid sodný, kyselina octová, jodacetamid, N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin, persíran amonný, trifluoroctová kyselina, tris(hydroxymethyl)aminomethan

**Lachema, ČR:** ethanol, glycerol

**Merck, SRN:** acetonitril, destilovaná voda

**Oxoid, ČR:** trypton, yeast extrakt

**Pierce-Thermo, USA:** p-Leu, p-Met

**Promega, SRN:** trypsin

**Riedel-De-Haen, SRN:** bromfenolová modř

**Roche Diagnostics, SRN:** chymotrypsin

**Roth, SRN:** agar, dithiotreitol,

**Serva, SRN:** Coomassie brilliantová modř

**Sigma, USA:** akrylamid, ampicilin, fenylalanin, glukosa, isoleucin, kanamycin, leucin, lysin, methionin, síran hořečnatý, threonin, valin, vitamin thiamin,

**Stratagene, USA:** *E. coli* BL21-Gold

**Darované chemikálie** (Dr. Radim Osíčka + Ing. Tomáš Vald, MBÚ): cDNA lidského AMBN proteinu v plasmidu pET28b-TEV, cDNA lidského AMEL proteinu v plasmidu pET11c

## 3.2 Použité pufry a roztoky

**AMK mix pro přípravu M9 s pLeu:** 0,1% (w/v) L-lysin, 0,1% (w/v) L-fenylalanin, 0,1% (w/v) L-threonin, 0,05% (w/v) L-isoleucin, 0,05% (w/v) L-methionin, 0,05% (w/v) L-valin

**AMK mix pro přípravu M9 s pMet:** 0,1% (w/v) L-lysin, 0,1% (w/v) L-fenylalanin, 0,1% (w/v) L-threonin, 0,05% (w/v) L-isoleucin, 0,05% (w/v) L-leucin, 0,05% (w/v) L-valin

**Barvicí lázeň Coomassie BB R-250:** 0,25% (w/v) Coomassie BBR-250, 45% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová

**Elektrodový pufr (pětkrát koncentrovaný, pH 8,5):** 0,1M Tris/HCl, 1M glycin, 0,5% (w/v) SDS

**LB agar:** 1,5% (w/v) agar v LB mediu

**LB medium (pH 7,25):** 1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) NaCl, sterilizace autoklávem

**Loading pufr (pětkrát koncentrovaný):** 250mM Tris/HCl, 500mM dithiotreitol, 10% (w/v) dodecylsulfát sodný, 0,5% (w/v) bromfenolová modř, 50% (v/v) glycerol

**M9 medium (400 ml):** 350 ml M9 základ, 200 µl kanamycin (výsledná c = 50 µg/ml), 0,4 ml 1M MgSO<sub>4</sub>, 4 ml 4% (w/v) glukosa, 40 µl 0,5% (w/v) vit. thiamin, 40 ml mix AMK, 10 ml 0,55mM pMet/pLeu

**M9 základ (pH 7,2):** 0,6% (w/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,3% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% (w/v) NH<sub>4</sub>Cl, 0,05% (w/v) NaCl, sterilizace autoklávem

**Odbarvovací roztok:** 25% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová

**Separační gel 10% (5 ml/sklo):** 1,9 ml vody, 1,3 ml 1,5M Tris/HCl (pH = 8,8), 1,7 ml 29,5 % (w/v) akrylamidu s 0,8 % (w/v) BIS, 50 µl 10% (w/v) SDS, 2 µl TEMED, 50 µl 10% (w/v) APS

**Separační gel 12% (5 ml/sklo):** 1,7 ml vody, 1,3 ml 1,5M Tris/HCl (pH = 8,8), 2,0 ml 29,5% (w/v) akrylamidu s 0,8 % (w/v) BIS, 50 µl 10 % (w/v) SDS, 2 µl TEMED, 50 µl 10 % (w/v) APS

**Štěpící ethylmorfolinový pufr (pH 8,1):** 50mM ethylmorfolin, 10% (v/v) acetonitril

**Zaostřovací gel 3% (2 ml/sklo):** 1,4 ml vody, 0,25 ml 1,5M Tris/HCl (pH = 6,8), 0,33 ml 29,5 % (w/v) akrylamidu s 0,8 % (w/v) BIS, 20 µl 10% (w/v) SDS, 2 µl TEMED, 20 µl 10% (w/v) APS

**50mM PB (pH 7,7):** 50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, sterilizace autoklávem

### 3.3 Přístroje

**Centrifugy:** centrifuga eppendorf minispin (Eppendorf), centrifuga Universal 320R (Hettich)

**Spektrometry:** spektrofotometr DU72 (Beckman), hmotnostní spektrometr MALDI-TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics)

**Ostatní:** analytické váhy GR-200 (A&D INSTRUMENTS), aparatura na SDS elektroforesu SE 200 (Hoeffler), Cano Scan Lide 700F (Canon), kývačka BFR-25 (Grant Boekel), pH metr PHM-210 (Radiometer Copenhagen), QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), sonifikační lázeň (ELMA), thermomixer Comfort (Eppendorf), třepačka, vakuový rotační koncentrátor (Speed-Vac DNA 110, Savant), Vortexový mixer (Velp Scientifica), zdroj elektroforesy EPS-3501 (Amersham Pharmacia Biotech)



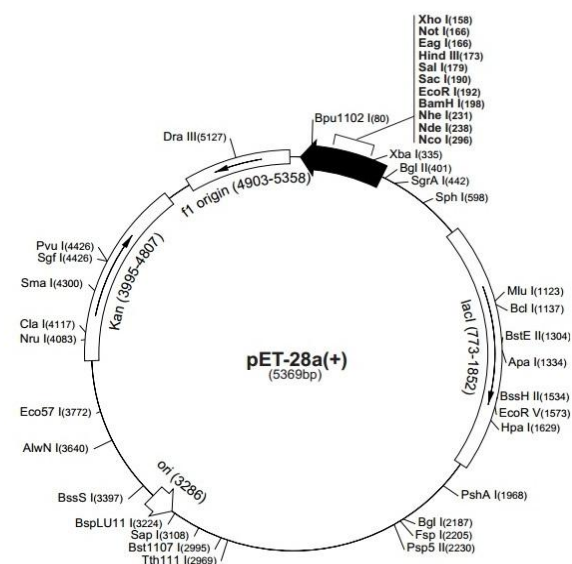
## 4. METODY

### 4.1 Transformace kompetentních buněk

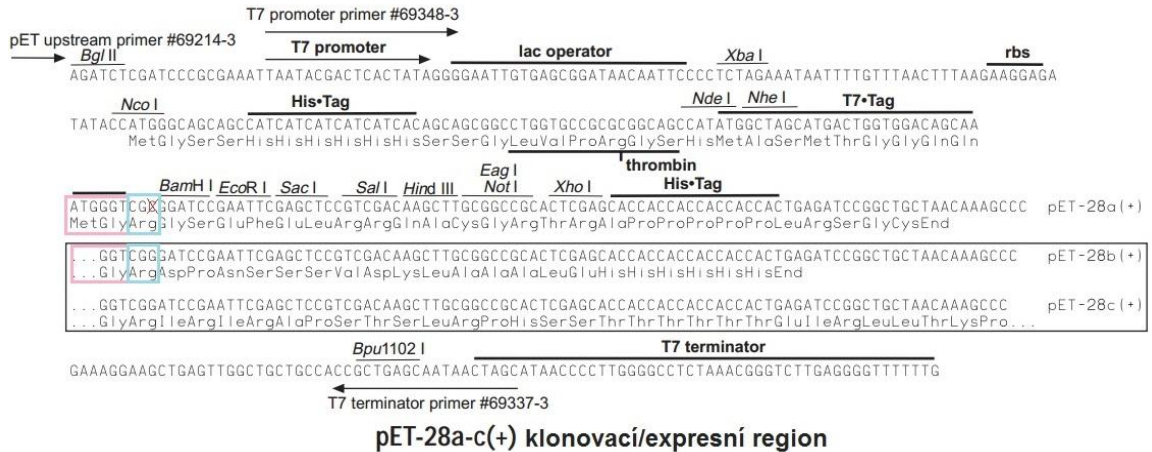
Kompetentní buňky *E. coli* BL21-Gold byly transformovány plasmidem pET28b-TEV (obr. 10 a na str. 26 obr. 11) metodou teplotního šoku.

100 µl bakteriálních kompetentních buněk, které byly uchovávány při teplotě -80 °C, bylo vloženo na led na dobu nezbytně nutnou pro jejich rozmražení. Poté byly buňky rozděleny do dvou sterilních mikrozkušavek tak, aby v každé zkumavce bylo 50 µl buněčné suspenze. Jedna ze zkumavek byla označena písmenem "P" a bylo do ní přidáno 0,5 µl plasmidu. Druhá zkumavka s přidavkem 0,5 µl sterilní vody byla označena písmenem "K" a sloužila jako kontrola. Obě zkumavky byly na 20 min vloženy na led a poté byly vystaveny na 90 s teplotě 42 °C. Následně byly zkumavky inkubovány 10 min na ledu a po přidání 500 µl sterilního LB media (1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) NaCl, pH 7,25) byly zkumavky inkubovány 60 min (37 °C, 300 rpm). Po inkubaci byly buňky 1 min odstředovány na centrifuze eppendorf minispin (úhlový rotor, poloměr 4,5 cm, 2000 rpm). Posléze bylo možné odebrat přibližně 450 µl supernatantu a peletu resuspendovat ve zbytku LB media. Celý objem zkumavky byl poté asepticky nanesen a rozetřen na agarovou plotnu obsahující kanamycin o výsledné koncentraci 50 µg/ml. Obě misky byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C.

pET-28a(+) sekvenční oblasti	
T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (BamH I - Xho I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
lacI coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358



**Obr. 10** Mapa plasmidu pET28a (+)-TEV. Mapa plasmidu pET-28b-TEV je shodná s mapou plasmidu pET-28a-TEV. Plasmid pET-28b-TEV má v BamH I o jednu bázi méně (5368bp) než pET-28a-TEV (5369bp).<sup>19</sup>



**Obr. 11** Vektorová mapa expresního vektoru *pET-28a (+)-TEV*. Mapa ukazuje sekvenci plasmidu *pET-28a-TEV* a rozdíly v sekvencích plasmidů *pET-28b-TEV* a *pET-28c-TEV*. Růžová barva značí shodné sekvence, modrá rozdíly v sekvencích.<sup>19</sup>

\*IPTG aktivuje expresi T7-RNA polymerázy, která nasedá na T7-promotor a ten spouští expresi AMBN.

Stejným způsobem byla provedena transformace buněk *E. coli* BL21-Gold plasmidem *pET11c*, který má (na rozdíl od plasmidu *pET28b-TEV*) resistenci na ampicilin. Agarové plotny tedy obsahovaly ampicilin o výsledné koncentraci 100 µg/ml.

## 4.2 Inokulace

Pro selekci klonů byly z agarové plotny vybrány 4 transformované bakteriální kolonie, které byly zaočkovány do 5 ml LB media s kanamycinem (50 µg/ml). Tyto vzorky byly následně inkubovány přes noc (37 °C, 250 rpm).

Z inkubované buněčné kultury byly připraveny glycerinové konzervy a současně byla provedena optimalizace produkce AMBN.

V případě přípravy glycerinových konzerv bylo do sterilních mikrozkmavek odebráno 200 µl buněčné suspenze a přidáno 50 µl 50% (v/v) sterilního glycerinu. Zkumavky byly uskladněny v mrazicím boxu při teplotě -80 °C. Tyto konzervy mohou následně sloužit jako zdroj bakteriálních buněk s již transformovaným plasmidem.

Stejným způsobem byly inokulovány a zakonzervovány plasmidem *pET11c* transformované buňky *E. coli* BL21-Gold pro následnou optimalizaci a produkci AMEL.

### 4.3 Optimalizace produkce AMBN

Pro optimalizaci maximální produkce proteinu byla provedena produkce proteinů v LB mediu.

Z noční kultury bylo do sterilních zkumavek odebráno 10  $\mu$ l suspenze a inokulováno do 5 ml LB media s kanamycinem (50  $\mu$ g/ml). Vzorky byly přibližně 5 hodin inkubovány (37 °C, 250 rpm) dokud optická densita OD<sub>550</sub> nedosáhla hodnoty 0,6-0,7.

#### ***Příprava vzorků na SDS-PAGE gel:***

Bylo odebráno 1300  $\mu$ l inkubované kultury. 300  $\mu$ l bylo použito pro stanovení OD<sub>550</sub>. 1000  $\mu$ l bylo centrifugováno 2 min na centrifuze eppendorf minispin (úhlový rotor, poloměr 4,5 cm, 2000 rpm). Po odebrání téměř celého množství supernatantu byla peleta resuspendována v 30  $\mu$ l sterilní vody a 10  $\mu$ l 5x koncentrovaného SDS loading pufru (250mM Tris/HCl, 500mM dithiotreitol, 10% (w/v) dodecylsulfát sodný, 0,5% (w/v) bromfenolová modř, 50% (v/v) glycerol). Tyto zkumavky pro nás znamenaly produkci AMBN v čase T<sub>0</sub>.

Do zbylé kultury (cca 3,7 ml) bylo přidáno 20  $\mu$ l isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosidu (IPTG) o koncentraci 80 mM (výsledná koncentrace 0,4mM). Vzorky byly inkubovány 2 hodiny (37 °C, 250 rpm). Poté bylo do sterilních mikrozkušavek odebráno 1000  $\mu$ l buněčné suspenze s IPTG a centrifugováno 2 min na centrifuze eppendorf minispin (úhlový rotor, poloměr 4,5 cm, 2000 rpm). Následně byl odebrán supernatant a peleta byla resuspendována v 30  $\mu$ l sterilní vody a 10  $\mu$ l 5x koncentrovaného SDS loading pufru. Tyto zkumavky pro nás znamenaly produkci AMBN v čase T<sub>2</sub> (IPTG).

### 4.4 Optimalizace produkce AMEL

Optimalizace produkce AMEL v LB mediu s ampicilinem (100  $\mu$ g/ml) byla provedena s pomocí Mgr. Renaty Ptáčkové dle postupu v kapitole 4.3.

### 4.5 Produkce AMBN v limitním mediu

Z připravených glycerinových konzerv s buňkami *E.coli* BL21-Gold s transformovaným plasmidem pET28b-TEV bylo po rozmražení odebráno 10  $\mu$ l suspenze a přeneseno do 5 ml LB media s kanamycinem (50  $\mu$ g/ml). Vzorky byly přibližně 5 hodin inkubovány (37 °C,

250 rpm) dokud optická densita nedosáhla hodnoty  $OD_{550}$  0,6-0,7. Poté bylo z každého vzorku odebráno 2,5 ml a použito na produkci AMBN v minerálním mediu s pMet.

#### 4.5.1 Produkce AMBN v limitním mediu s pMet

Buněčná suspenze o celkovém objemu 2,5 ml byla 10 min centrifugována na centrifuze Hettich Univerzal 320R (úhlový rotor, poloměr 7,5 cm, 2000 rpm, 4 °C). Poté byl odebrán supernatant a peleta resuspendována v 2,5 ml sterilního PB pufru (50mM  $KH_2PO_4$ , pH 7,7). Takto byla buněčná suspenze promyta ještě jednou a na závěr byla peleta resuspendována v 2,4 ml sterilního minerálního media s přísadkou 0,55mM pMet (0,6% (w/v)  $Na_2HPO_4$ , 0,3% (w/v)  $KH_2PO_4$ , 0,1% (w/v)  $NH_4Cl$ , 0,05% NaCl, 0,012% (w/v)  $MgSO_4$ , 0,04% (w/v) glukosa,  $5 \cdot 10^{-5}$ % (w/v) vitamin thiamin, 0,01% (w/v) L-lysin, 0,01% (w/v) L-fenylalanin, 0,01% (w/v) L-threonin, 0,005% (w/v) L-isoleucin, 0,005% (w/v) L-leucin, 0,005% (w/v) L-valin) a kanamycinem (50 µg/ml). Vzorky byly 40 min inkubovány (37 °C, 250 rpm). Po inkubaci bylo z každého vzorku odebráno 1 ml suspenze, ze které byly připraveny vzorky v čase  $T_{0-pMet}$  na SDS gel.

Do zbylého objemu buněčné suspenze bylo přidáno 12 µl 80mM (výsledná koncentrace 0,4mM) IPTG. Vzorky byly 2 hodiny inkubovány (37 °C, 250 rpm). Po inkubaci byl odebrán 1 ml suspenze, ze které byly připraveny vzorky v čase  $T_{2-pMet}$  (IPTG).

#### 4.5.2 Produkce AMBN v limitním mediu s pLeu

Z glycerinových konzerv s buňkami *E.coli* BL21-Gold s transformovaným plasmidem bylo odebráno 10 µl suspenze a přeneseno do 5 ml LB media s kanamycinem (50 µg/ml). Vzorky byly přibližně 5 hodin inkubovány (37 °C, 250 rpm) do  $OD_{550}$  0,6-0,7. Poté bylo z každého vzorku odebráno 2,5 ml a použito na produkci AMBN v minerálním mediu s pLeu. Zbytek kultury byl použit na izolaci plasmidové DNA.

2,5 ml inkubované buněčné suspenze bylo 10 min centrifugováno na centrifuze Hettich Univerzal 320R (úhlový rotor, poloměr 7,5 cm, 2000 rpm, 4 °C). Poté byl odebrán supernatant a peleta resuspendována v 2,5 ml PB pufru. Takto byla buněčná suspenze promyta ještě jednou a na závěr byla peleta resuspendována v 2,4 ml sterilního minerálního media s přísadkou 0,55mM pLeu a kanamycinem (50 µg/ml). Vzorky byly 40 min inkubovány (37 °C, 250 rpm). Po inkubaci bylo z každého vzorku odebráno 1 ml suspenze, ze které byly připraveny vzorky v čase  $T_{0-pLeu}$  na SDS gel (viz kapitola 4.3).

Do zbylého objemu bylo přidáno 12  $\mu$ l 80mM IPTG (výsledná koncentrace 0,4mM). Vzorky byly 2 hodiny inkubovány (37 °C, 250 rpm). Po inkubaci byl odebrán 1 ml suspenze, ze které byly připraveny vzorky v čase  $T_{2-pLeu}$  (IPTG) (postup viz kapitola 4.3).

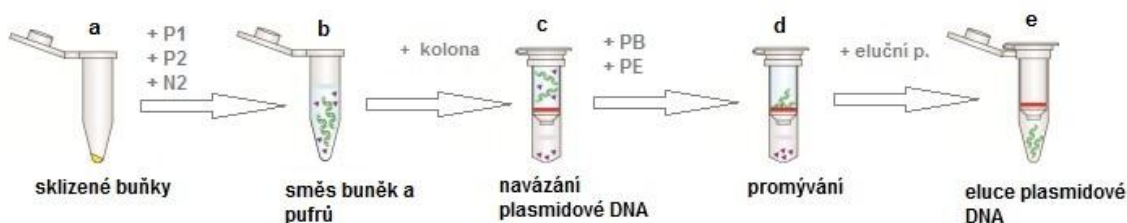
### 4.5.3 Izolace plasmidové DNA

Z 2,4 ml buněčné suspenze připravené dle kapitoly 4.5.2 byla provedena izolace plasmidové DNA podle protokolu QIAprep Spin Miniprep Kit od firmy *Qiagen* (obr. 12)

Peleta po centrifugaci 2,4 ml buněčné kultury ( $OD_{550} \sim 0,6$ ) (obr. 12a) byla resuspendována v 250  $\mu$ l P1 pufru s přidáním RNAsou. Po přidání 250  $\mu$ l P2 pufru a jemným promícháním došlo k lýzi buněk. Přidáním 350  $\mu$ l N2 pufru a šetrným promícháním se směsí došlo k neutralizaci a precipitaci proteinů (obr. 12b). Následně byla směs 10 min centrifugována na centrifuze eppendorf minispin (úhlový rotor, poloměr 4,5 cm, 13000 rpm).

Do 2ml mikrozkušavek byly umístěny kolony a na ně aplikovány supernatanty buněčné suspenze z neutralizačního kroku (obr. 12c). Zkušavky s kolonami byly centrifugovány 45 s na centrifuze eppendorf minispin (úhlový rotor, poloměr 4,5 cm, 13000 rpm). DNA se takto navázalo na nosič kolony. Kolona byla promyta 500  $\mu$ l PB pufru a vysušena 750  $\mu$ l PE pufru s ethanolem (obr. 12d).

Vysušené kolony byly vloženy do nových mikrozkušavek. Na střed kolony bylo aplikováno 50  $\mu$ l sterilní vody. Po absorpci celého objemu elučního pufru byla 1min centrifugací na centrifuze eppendorf minispin (úhlový rotor, poloměr 4,5 cm, 13000 rpm) eluována plasmidová DNA (obr. 12e).



**Obr. 12 Schéma izolace plasmidové DNA.<sup>20</sup>**

## 4.6 Produkce AMEL v limitním mediu

### 4.6.1 Produkce AMEL v limitním mediu s pMet a v limitním mediu s Met

Z glycerinových konzerv s buňkami *E.coli* BL21-Gold s transformovaným plasmidem pET11c bylo odebráno 5  $\mu$ l suspenze a přeneseno do 5 ml LB media s ampicilinem (100  $\mu$ g/ml). Vzorky byly přes noc inkubovány (37 °C, 250 rpm). Z inkubované kultury bylo odebráno 100  $\mu$ l buněčné suspenze a zaočkováno do 10 ml LB media. Buňky byly inkubovány (37 °C, 250 rpm) do  $OD_{550} \sim 0,6$ . Poté byly buňky 10 min centrifugovány na centrifuze Hettich Univerzal 320R (úhlový rotor, poloměr 7,5 cm, 2000 rpm, 4 °C). Následně byl odebrán supernatant a peleta resuspendována v 10 ml PB pufru. Takto byla buněčná suspenze promyta ještě jednou a na závěr byla peleta resuspendována v 10 ml sterilního minerálního media s ampicilinem (100  $\mu$ g/ml) obsahujícím pouze Met. Druhá peleta byla resuspendována v 10 ml sterilního minerálního media s ampicilinem (100  $\mu$ g/ml) obsahujícím pouze pMet.

Vzorky byly 20 min inkubovány (37 °C, 250 rpm). Po inkubaci bylo z každého vzorku odebráno 1 ml suspenze, ze které byly připraveny vzorky v čase  $T_0$  ( $T_{0-Met}$ ,  $T_{0-pMet}$ ) na SDS gel (viz kapitola 4.3).

Do zbylého objemu bylo přidáno IPTG (výsledná koncentrace 0,5mM). Vzorky byly 3 hodiny inkubovány (37 °C, 250 rpm). V hodinových intervalech byl odebírán vždy 1 ml suspenze (+ 400  $\mu$ l pro změření  $OD_{550}$ ), ze které byly připraveny vzorky v čase  $T_{1-3Met}$  (IPTG) a  $T_{1-3pMet}$  (postup viz kapitola 4.3).

### 4.6.2 Produkce AMEL v limitním mediu s různými poměry koncentrací Met a pMet

Postupem uvedeným v kapitole 4.6.1 byly připraveny inkubované buněčné suspenze ( $OD_{550} \sim 0,6$ ). Po centrifugaci byly pelety promyty PB pufrem a resuspendovány v 10 ml sterilního minerálního media s ampicilinem (100  $\mu$ g/ml) s různými koncentracemi Met (viz tab. 1, str. 30).

**Tab. 1** Složení minerálního media

Označení	Minerální medium [ml]	⊙ Met (5 mg/ml) [μl]	p-Met [mg]
Met	10	100	0
pMet	10	0	0,5
Met <sup>1</sup> / <sub>10</sub>	10	10*	0,5
Met <sup>1</sup> / <sub>100</sub>	10	1**	0,5

\* do 10 ml minerálního media bylo přidáno 100 μl 10x naředěného zásobního roztoku Met (5 mg/ml), poměr koncentrací Met a pMet v mediu je tedy 1:10

\*\* do 10 ml minerálního media bylo přidáno 100 μl 100x naředěného zásobního roztoku Met (5 mg/ml), poměr koncentrací Met a pMet v mediu je tedy 1:100

Vzorky byly 20 min inkubovány (37 °C, 250 rpm). Po inkubaci bylo z každého vzorku odebráno 1 ml suspenze, ze které byly připraveny vzorky v čase T<sub>0</sub> (T<sub>0-Met</sub>, T<sub>0-pMet</sub>, T<sub>0-Met1/10</sub>, T<sub>0-Met1/100</sub>) na SDS gel (viz kapitola 4.3).

Do zbylého objemu bylo přidáno IPTG (výsledná koncentrace 0,5mM). Vzorky byly 3 hodiny inkubovány (37 °C, 250 rpm). V hodinových intervalech byl odebírán vždy 1 ml suspenze (+ 400 μl pro změření OD<sub>550</sub>), ze které byly připraveny vzorky v čase T<sub>1-3Met</sub> (IPTG), T<sub>1-3pMet</sub> (IPTG), T<sub>1-3Met1/10</sub>(IPTG), T<sub>1-3Met1/100</sub> (IPTG), (postup viz kapitola 4.3).

## 4.7 Diskontinuální elektroforesa SDS-PAGE

Elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) je metoda sloužící k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti.<sup>18</sup>

Nejrozšířenější diskontinuální elektroforesa SDS-PAGE je založena na Laemmliho systému pufrů, při které jsou použity dva pufrы o různém pH (pH 6,8 a pH 8,8) pro přípravu zaostřovacího a rozdělovacího gelu, a jeden pufr (pH 8,8) tvořící elektrolyt.

Pro dělení proteinů AMBN byl použit 3% (w/v) zaostřovací gel (0,125M Tris/HCl (pH = 6,8), 3% (w/v) akrylamid s 0,1% (w/v) BIS, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (v/v) TEMED, 0,1% (w/v) APS) a 10% (w/v) rozdělovací gel (0,4M Tris/HCl (pH = 8,8), 10% (w/v) akrylamid s 0,3% (w/v) BIS, 0,1% (w/v) SDS, 0,04% (v/v) TEMED, 0,1% (w/v) APS).

Pro dělení proteinů AMEL byl použit 3% (w/v) zaostřovací gel a 12% (w/v) rozdělovací gel (0,4M Tris/HCl (pH = 8,8), 12% (w/v) akrylamid s 0,4% (w/v) BIS, 0,1% (w/v) SDS, 0,04% (v/v) TEMED, 0,1% (w/v) APS).

Připravené vzorky pro SDS-PAGE elektroforesu byly 5 min povařeny a po centrifugaci naneseny do jamek zaostřovacího gelu. Připraven byl také hmotnostní standard

z 4  $\mu$ l Sigma wide range protein marker (MWm., z angl. Molecurat Wide marker), 30  $\mu$ l sterilní vody a 10  $\mu$ l 5x koncentrovaného SDS loading pufru. Elektroforesa probíhala za konstantního proudu 20 mA/gel s limitní hodnotou napětí 140 V.

Po ukončení elektroforesy byly gely vloženy na přibližně 1 hodinu do barvicí lázně Coomassie BBR-250 (0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová) a poté do odbarvovací lázně (35% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová). Po odbarvení byly gely skladovány při 6 °C v 1% (v/v) roztoku kyseliny octové.

#### 4.8 Modifikace proteinů, štěpení proteasou a měření MALDI-TOF MS

Z polyakrylamidových gelů byly skalpelem vyříznuty proteinové proužky, které byly nakrájeny na velmi malé kostičky (max. 1 mm<sup>3</sup>) a vloženy do mikrozkušavek. Následně bylo nutné zajistit úplné odbarvení gelu, a to přidáním 100  $\mu$ l ACN a 100  $\mu$ l 100mM ethylmorfolinu (EtMf), 15 min sonifikací a odstraněním supernatantu. Tento postup byl opakován do úplného odbarvení kostiček gelu.

K rozrušení případných disulfidových vazeb a rozvolnění struktury proteinu byla provedena redukce s následnou modifikací cysteinových aminokyselinových zbytků přidáním 50  $\mu$ l 30mM tris(2-karboxyethyl)fosfanu (TCEP), ve 100mM EtMf. Vzorky byly 20 min inkubovány (70 °C, 700 rpm). Po inkubaci byly vzorky promyty 100  $\mu$ l ACN a 1 min sonifikovány. Po odebrání supernatantu byly vzorky převrstveny 30mM roztokem iodacetamidu (IAA) ve 100mM EtMf a 60 min inkubovány při laboratorní teplotě v temnu.

Po inkubaci byly vzorky třikrát promyty střídavě ve 100  $\mu$ l ACN a 100  $\mu$ l vody. Po promytí ve 100  $\mu$ l ACN byly vzorky 5 min sonifikovány v 200  $\mu$ l 50% vodného roztoku ACN. Po odstranění supernatantu byly vzorky 10 min sušeny na vakuovém rotačním koncentrátoru (SpeedVac DNA 110, Savant).

##### **! Vzorky AMEL nebyly pomocí TCEP a IAA modifikovány !**

Po vysušení bylo ke vzorkům přidáno 20 - 25  $\mu$ l (aby byly kousky gelu zcela ponořeny) 50mM EtMf s 10% ACN (v/v) a přídatkem endoproteasy (v případě AMBN byl použit trypsin o koncentraci 0,1  $\mu$ g/vzorek, v případě AMEL byl použit chymotrypsin o koncentraci 0,2  $\mu$ l/vzorek) . Takto připravené vzorky byly 16 hodin inkubovány (37 °C, 650 rpm). Ke vzorkům byl přidán ACN a kyselina trifluoroctová (TFA) do finální koncentrace v roztoku 30% (v/v) ACN a 0,1% TFA (v/v). Po 20 min sonifikace bylo odebráno 0,5  $\mu$ l extraktu a nanášeno na MALDI terč. Po odpaření rozpouštědla byly vzorky



převrstveny 0,5  $\mu$ l kyseliny  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicové (CCA matrice, 5 mg/ml v 40% (v/v) ACN a 0,1% (v/v) TFA) a analyzovány na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF/TOF (provedeno školitelem).

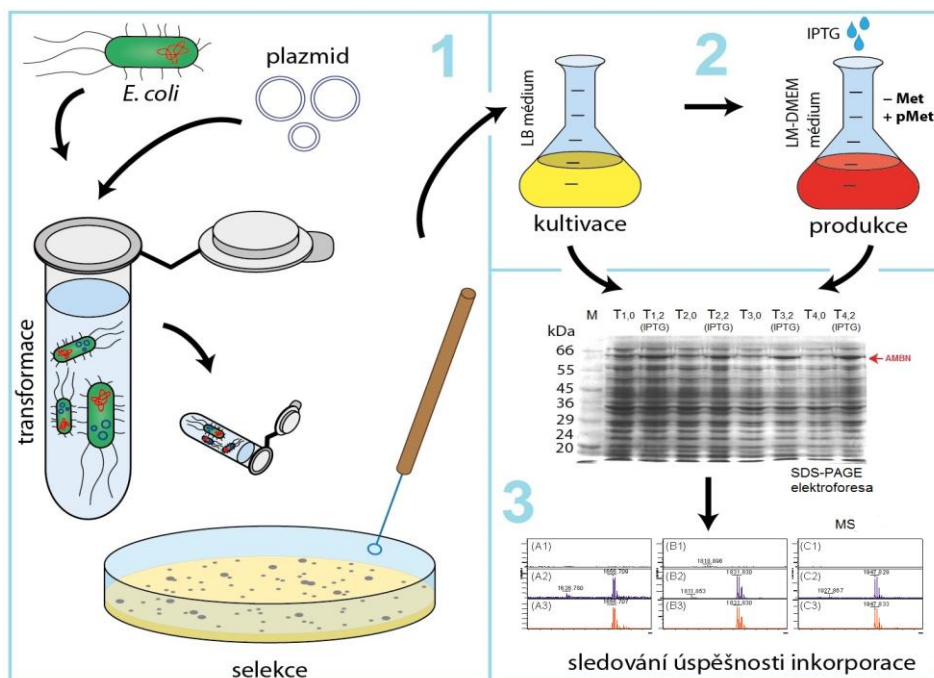
#### 4.9 Grafické znázornění provedených experimentů

Grafické znázornění optimalizace a realizace přípravy fotoaktivovatelných "nanosond" amelogeninu a ameloblastinu s inkorporovaným fotoaktivovatelným analogenem methioninu a leucinu je uvedeno na obr. 13.

V první části obrázku je znázorněna transformace kompetentních buněk *E. coli* plasmidem a následná selekce bakteriálních kolonií z agarové plotny.

Druhá část obrázku ukazuje kultivaci vybraných bakteriálních klonů v LB mediu. Po optimalizaci maximální produkce proteinu (zjištěno pomocí SDS-PAGE elektroforesy) znázorňuje obrázek také produkci proteinu v limitním mediu s fotoaktivovatelným analogem AMK a přidaným IPTG.

Třetí část obrázku ukazuje výsledky SDS-PAGE elektroforesy a jejich následnou analýzu pomocí MALDI-TOF a interpretaci získaných výsledků.



**Obr. 13 Grafické znázornění optimalizace a produkce fotoaktivovatelných proteinových "nanosond" a následná analýza pomocí hmotnostní spektrometrie. (autor: RNDr. Tomáš Ječmen) upraveno 24.4.2014**

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Transformace plasmidu do bakteriálních buněk, noční kultura

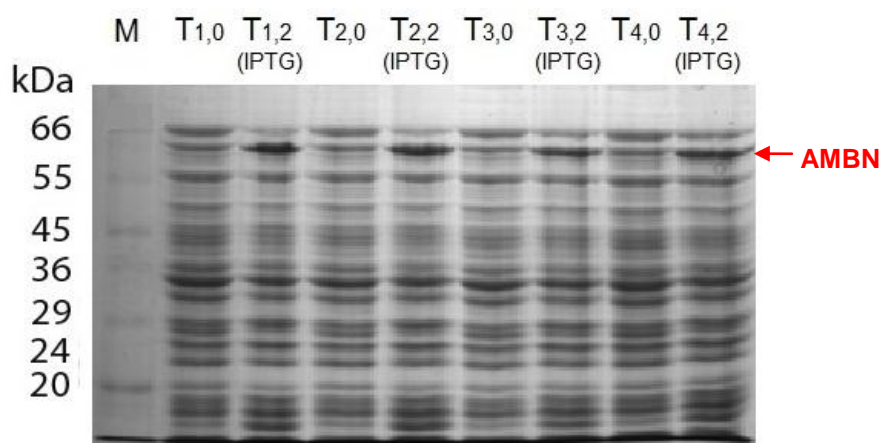
Protože cílem této práce byla optimalizace přípravy fotoafinitních proteinových nanosond v expresním systému *E. coli*, byla provedena transformace kompetentních buněk expresními plasmidy.

Po teplotním šoku bylo do 50  $\mu$ l buněk *E. coli* BL21-Gold transformováno 0,5  $\mu$ l plasmidu pET-28b-TEV (v případě amelogeninu byl použit plasmid pET11c). Po následné inkubaci v LB mediu a vyšetí kultury na agarovou plotnu s antibiotikem byly po noční inkubaci náhodně vybrány 4 zdařile transformované bakteriální kolonie. Kontrolní plotna byla čistá.

### 5.2 Produkce proteinu v LB mediu

Jako první byla testována produkce náhodně vybraných klonů v nutričně bohatém LB mediu, abychom vyloučili klony s nízkou produkcí proteinu.

Po inkubaci buněk inokulovaných z noční kultury byly připraveny vzorky na SDS-PAGE gel (obr. 14). Do jamek zaostřovacího gelu bylo nanášeno 20  $\mu$ l každého vzorku.



**Obr. 14** Fotografie gelu z SDS elektroforesy použitého pro test exprese AMBN v LB mediu s pMet. Šipkou je vyznačena pozice exprimovaného proteinu. Pořadí vzorků zleva: 1. dráha-hmotnostní standard (M), 2. dráha-klon č. 1 v čase  $t = 0$  h před přidáním IPTG (T<sub>1,0</sub>), 3. dráha-klon č. 1 v čase  $t = 2$  h po přidání IPTG (T<sub>1,2</sub>(IPTG)), 4. dráha-T<sub>2,0</sub>, 5. dráha-T<sub>2,2</sub>(IPTG), 6. dráha-T<sub>3,0</sub>, 7. dráha-T<sub>3,2</sub>(IPTG), 8. dráha-T<sub>4,0</sub>, 9. dráha-T<sub>4,2</sub>(IPTG).

Z uvedené vizualizace je patrné, že plasmidem pET-28b-TEV transformované kompetentní buňky *E.coli* BL21-Gold exprimovaly po přidání IPTG námi požadovaný protein AMBN.

Podobně byla provedena transformace buněk plasmidem pET11c a testována exprese v LB mediu po přidání IPTG protein AMEL. Úspěšná produkce byla potvrzena pomocí SDS-PAGE elektroforesy stejně jako v případě AMBN (obr. neuveden).

Produkce proteinů AMEL a AMBN byla také potvrzena MALDI-TOF hmotnostní analýzou po štěpení proteinů proteasou v gelu (data nejsou presentována).

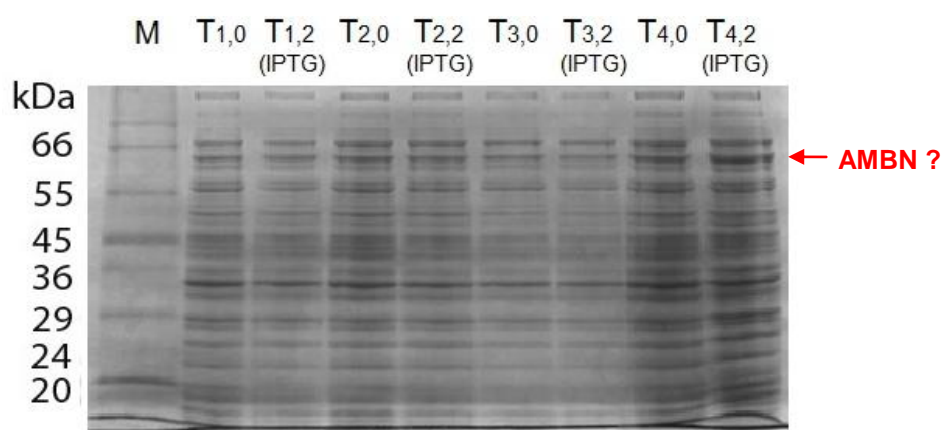
### 5.3 Produkce AMBN v limitním mediu s pMet

Expese AMBN byla u vybraných klonů dále testována v limitním mediu s přídavkem fotoaktivovatelného analogu aminokyseliny Met.

Po inkubaci buněk v limitním mediu s pMet byla změřena optická densita  $OD_{550}$  (tab. 2) a byly připraveny vzorky na SDS-PAGE gel (obr. 15).

**Tab. 2** Hodnoty  $OD_{550}$  pro klony 1-4 naměřené v čase  $t = 0$  h (před přidáním IPTG) a v čase  $t = 2$  h (po přidání IPTG).

	$OD_{550}$ $T_{0-pMet}$	$OD_{550}$ $T_{2-pMet(IPTG)}$
<b>klon 1</b>	0.26	0.2
<b>klon 2</b>	0.39	0.3
<b>klon 3</b>	0.24	0.2
<b>klon 4</b>	0,54	0,5



**Obr. 15** Fotografie gelu z SDS elektroforesy použitého pro test exprese AMBN v limitním mediu s pMet. Pořadí nanesených vzorků zleva: 1. dráha-hmotnostní standard (M), 2. dráha-klon č. 1 v čase  $t = 0$  h před přidáním IPTG ( $T_{1,0}$ ), 3. dráha-klon č. 1 v čase  $t = 2$  h po přidání IPTG ( $T_{1,2(IPTG)}$ ), 4. dráha- $T_{2,0}$ , 5. dráha- $T_{2,2(IPTG)}$ , 6. dráha- $T_{3,0}$ , 7. dráha- $T_{3,2(IPTG)}$ , 8. dráha- $T_{4,0}$ , 9. dráha- $T_{4,2(IPTG)}$ .

Hodnoty OD<sub>550</sub> změřené před a po přidání IPTG a uvedené v tabulce 2 jsou velmi nízké. Optimální OD<sub>550</sub> pro indukci IPTG by měla být okolo 0,6-0,7. Z toho důvodu nedošlo k produkci AMBN nebo jeho produkce byla pod mezí detekce, což dokazuje obrázek gelu z SDS elektroforezy (obr. 15), na kterém není pozorován žádný rozdíl v intenzitě proužků v čase T<sub>0-pMet</sub> a T<sub>2-pMet(IPTG)</sub>.

Produkce AMBN v limitním mediu s pMet byla zopakována, přičemž doba inkubace v mediu před přidáním IPTG byla podstatně delší a koncentrace buněk v mediu vyšší. Po přidání IPTG byly vzorky inkubovány (na rozdíl od předešlého pokusu) pouze hodinu.

**Tab. 3** Hodnoty OD<sub>550</sub> pro klony 2-4 naměřené po inkubaci v limitním mediu, v čase  $t = 0$  h (před přidáním IPTG) a v čase  $t = 1$  h (po přidání IPTG).

	OD <sub>550</sub> kultivace v LB	OD <sub>550</sub> T* <sub>0-pMet</sub>	OD <sub>550</sub> T* <sub>1-pMet(IPTG)</sub>
<b>klon 2</b>		0,72	0,81
<b>klon 3</b>	0,9	0,65	0,73
<b>klon 4</b>		0,72	0,80

\* značí druhý experiment se stejným proteinem při jiných podmínkách produkce.

Při vyšší OD<sub>550</sub> (~0,7) než v předchozím pokusu (~0,3) byla z SDS gelu patrná produkce AMBN po přidání IPTG (výsledek není uveden).

Ačkoli MALDI-TOF hmotnostní analýza potvrdila produkci AMBN, nebyla bohužel potvrzena inkorporace pMet do sekvence proteinu.

Na závěr byla provedena produkce AMBN v limitním mediu s 2mM pMet, tedy čtyřikrát koncentrovanějším fotoanalogem AMK. Pro tento optimalizační experiment byl vybrán pouze jeden klon buněčné kultury s transformovaný plasmidem, ze kterého byly po inkubaci připraveny vzorky na SDS-PAGE gel.

**Tab. 4** Hodnoty OD<sub>550</sub> pro klon 4 naměřené v čase  $t = 0$  h (před přidáním IPTG) a v čase  $t = 2$  h (po přidání IPTG).

	OD <sub>550</sub> T** <sub>0-pMet</sub>	OD <sub>550</sub> T** <sub>2-pMet s IPTG</sub>
<b>klon 4</b>	0,68	0,76

\*\* značí třetí experiment se stejným proteinem při jiných podmínkách produkce.

Ačkoli při vyšší koncentraci pMet v minerálním mediu byla z SDS gelu (není uveden) patrná produkce AMBN po přidání IPTG a hmotnostní spektrometrie prokázala produkci AMBN, nedošlo ani při čtyřikrát vyšší koncentraci pMet v mediu k inkorporaci pMet do sekvence proteinu.

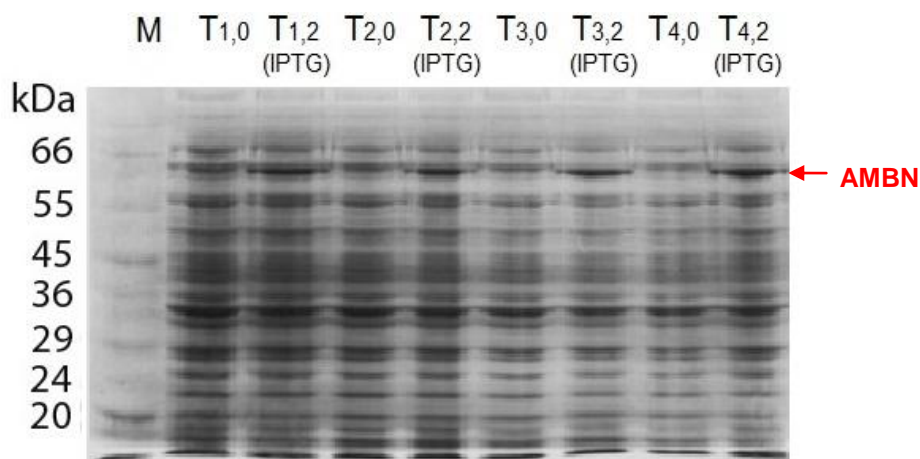
## 5.4 Produkce AMBN v limitním mediu s pLeu

Podobným způsobem byla testována exprese AMBN v minerálním mediu s pLeu. Tímto pokusem jsme chtěli ověřit, zda se analog jiné AMK nebude inkorporovat do sekvence AMBN lépe než pMet.

Po inkubaci buněk v limitním mediu s pLeu byla zaznamenána optická densita  $OD_{550}$  (tab. 4) a byly připraveny vzorky na SDS-PAGE gel (obr. 16).

**Tab. 4** Hodnoty  $OD_{550}$  pro klony 1-4 naměřené po inkubaci v limitním mediu v čase  $t = 0$  h (před přidáním IPTG) a v čase  $t = 2$  h (po přidání IPTG).

	$OD_{550}$ kultivace v LB	$OD_{550}$ $T_{0-pLeu}$	$OD_{550}$ $T_{2-pLeu(IPTG)}$
<b>klon 1</b>	0,76	0,65	0,73
<b>klon 2</b>	0,78	0,61	0,67
<b>klon 3</b>	0,76	0,54	0,62
<b>klon 4</b>	0,74	0,50	0,58



**Obr. 16** Fotografie gelu z SDS elektroforezy použitého pro test exprese AMBN v limitním mediu s pLeu. Šipkou je vyznačena pozice exprimovaného proteinu. Do jamek zaostřovacího gelu byly nanášeny vzorky a hmotnostní standard v pořadí: 1. dráha-hmotnostní standard (M), 2. dráha-klon č. 1 v čase  $t = 0$  h před přidáním IPTG ( $T_{1,0}$ ), 3. dráha-klon č. 1 v čase  $t = 2$  h po přidání IPTG ( $T_{1,2(IPTG)}$ ), 4. dráha- $T_{2,0}$ , 5. dráha- $T_{2,2(IPTG)}$ , 6. dráha- $T_{3,0}$ , 7. dráha- $T_{3,2(IPTG)}$ , 8. dráha- $T_{4,0}$ , 9. dráha- $T_{4,2(IPTG)}$ .

Z výše uvedené vizualizace je patrné, že plasmidem pET-28b-TEV transformované kompetentní buňky *E.coli* BL21-Gold exprimovaly po přidání IPTG do limitního media s pLeu námi požadovaný protein AMBN. Z MALDI-TOF hmotnostní analýzy však nebyla patrná žádná inkorporace pLeu do sekvence produkovaného AMBN.

## 5.5 Produkce AMEL v limitním mediu s pMet

Protože inkorporace pMet a pLeu do sekvence AMBN nebyla úspěšná, pokusili jsme se provést inkorporaci fotoanalogu AMK do sekvence druhého proteinu zubního enamelu, tedy do AMEL. Jedním z důvodů, proč jsme zvolili protein AMEL byl nižší výskyt Met v sekvenci proteinu oproti AMBN, což může mít vliv na inkorporaci analogu této AMK.

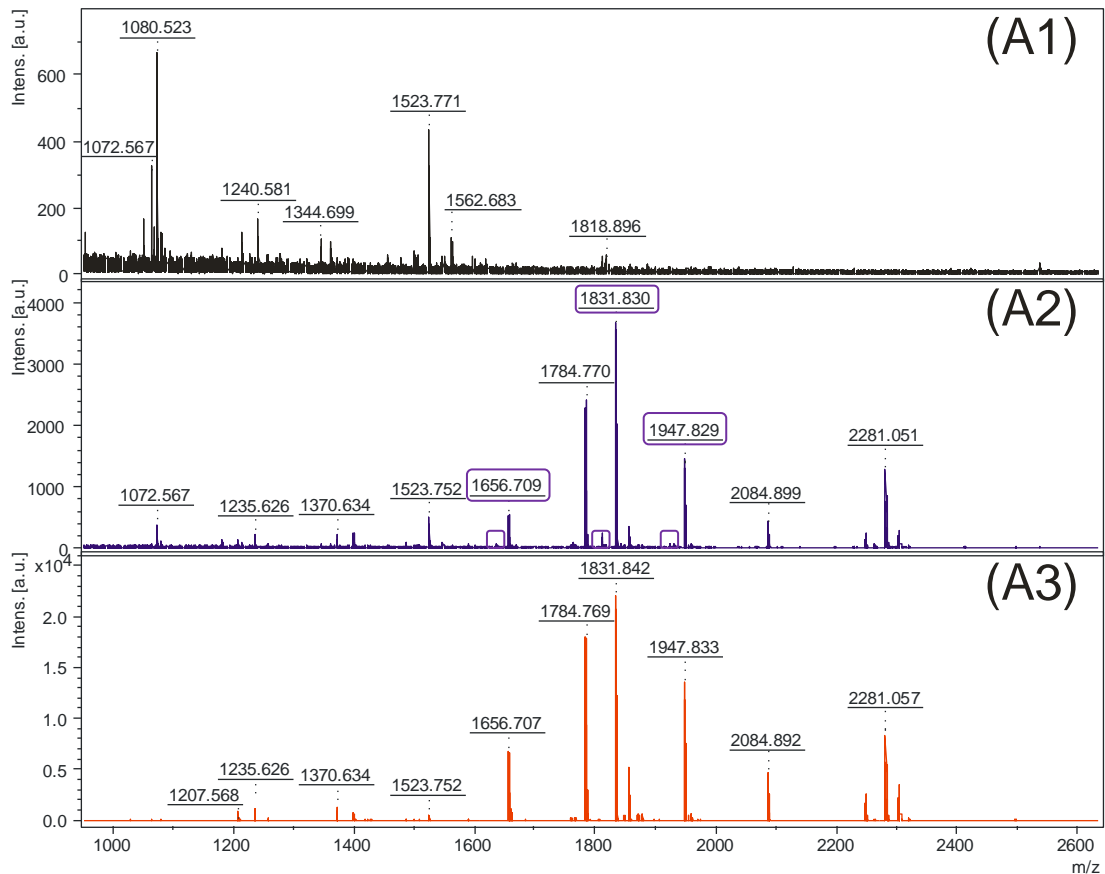
Po inkubaci kompetentních buněk transformovaných plasmidem pET11c v limitním mediu s pMet a také v limitním mediu s Met byly připraveny vzorky na SDS-PAGE gel (není uveden). Po vyhodnocení SDS-PAGE elektroforesy a MALDI-TOF analýze (tab. 5, obr. 17, 18 str. 38) byla potvrzena produkce AMEL v buňkách inkubovaných v limitním mediu s Met nebo s pMet a nízká inkorporace pMet do sekvence proteinu.

**Tab. 5** Míra pokrytí sekvence exprimovaného proteinu AMEL

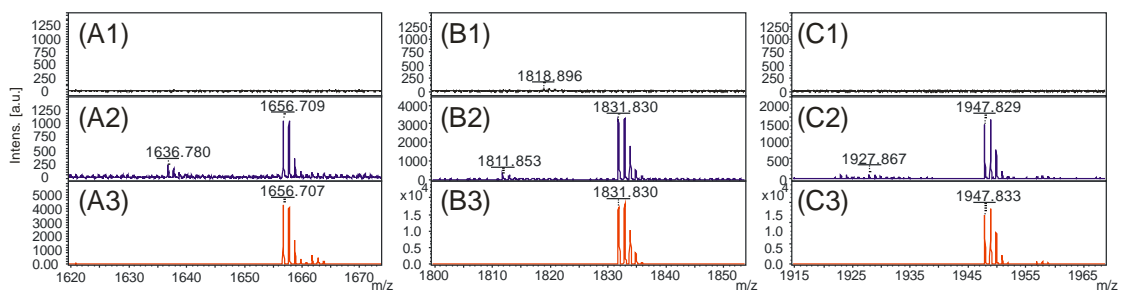
AMEL pMet 3 h		AMEL pMet 0 h		AMEL Met 3h	
m/z[M+H] <sup>+</sup>	sekvence	m/z[M+H] <sup>+</sup>	sekvence	m/z [M+H] <sup>+</sup>	sekvence
1072.567		1072.567		1028.502	156-164
1080.514		1080.523		1079.509	31-39
1181.599		1214.625		1207.568	30-39
1207.563	30-39	1240.581		1235.615	19-29
1214.634		1344.699		1257.599	[M+Na] <sup>+</sup>
1235.626	19-29	1361.683		1370.619	29-39
1257.61	[M+Na] <sup>+</sup>	1499.771		1398.671	19-29
1344.677		1523.771		1420.652	58-69
1361.676		1547.786		1427.633	30-41
1370.634	29-39	1562.683		1486.694	102-114
1398.68	19-29	1818.896		1523.758	
1486.71	102-114	2536.153		1590.694	29-41
1523.752				1656.707	31-44
1547.759				1760.793	3-18
1590.706	29-41			1784.769	30-44
<b>1636.78</b>	<b>31-44 (pM)</b>			1831.842	2-18
1656.709	31-44			1853.81	[M+Na] <sup>+</sup>
1784.77	30-44			1947.833	29-44
<b>1811.853</b>	<b>2-18 (pM)</b>			2084.892	30-47
1831.83	2-18			2247.949	29-47
<b>1927.867</b>	<b>29-44 (pM)</b>			2281.057	95-114
1947.829	29-44			2303.035	[M+Na] <sup>+</sup>
2084.899	30-47			2496.253	45-66
2247.95	29-47			2734.274	2-26
2281.051	95-114				

Tabulka 5 obsahuje data získaná při hmotnostní analýze MALDI-TOF . První dva sloupce ukazují data amelogeninu po tří hodinové inkubaci v limitním mediu s pMet. Tučně jsou označena místa inkorporace pMet. Druhé dva sloupce znázorňují data amelogeninu inkubovaného v limitním mediu s pMet před přidáním IPTG. Poslední dva sloupce obsahují data amelogeninu inkubovaného v limitním mediu bez pMet, tedy pouze s Met.

V tabulce 5 jsou zvýrazněny 3 hodnoty  $m/z[M+H]^+$ . Tato data dokazují inkorporaci pMet do sekvence AMEL. Tučně vyznačená hodnota  $m/z[M+H]^+ = 1636,78$  je o 20 hmotnostních jednotek nižší než hodnota  $m/z[M+H]^+ = 1656,709$  (stejně jako  $m/z[M+H]^+ = 1811,853$  a  $1831,83$  a hodnota  $m/z[M+H]^+ = 1927,867$  a  $1947,829$ ). Tyto hodnoty jsou také vyznačeny na MS spektru (obr. 17)



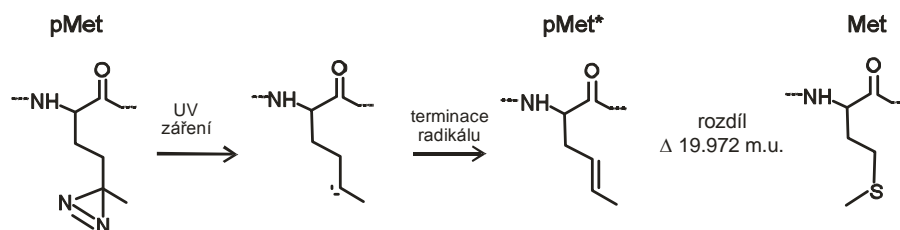
**Obr. 17 Hmotnostní spektrum MALDI-TOF MS AMEL. A1:** spektrum AMEL před přidáním IPTG, **A2:** spektrum AMEL s pMet po tří hodinové inkubaci v limitním mediu, **A3:** spektrum AMEL s Met po tří hodinové inkubaci v limitním mediu.



**Obr. 18 Detail hmotnostního spektra MALDI-TOF AMEL pro signály (A) 1656, (B) 1831 a (C) 1947. A1, B1, C1:** spektrum před přidáním IPTG, **A2, B2, C2:** spektrum s pMet po tří hodinové inkubaci v limitním mediu, **A3, B3, C3:** spektrum AMEL s Met po tří hodinové inkubaci v limitním mediu.

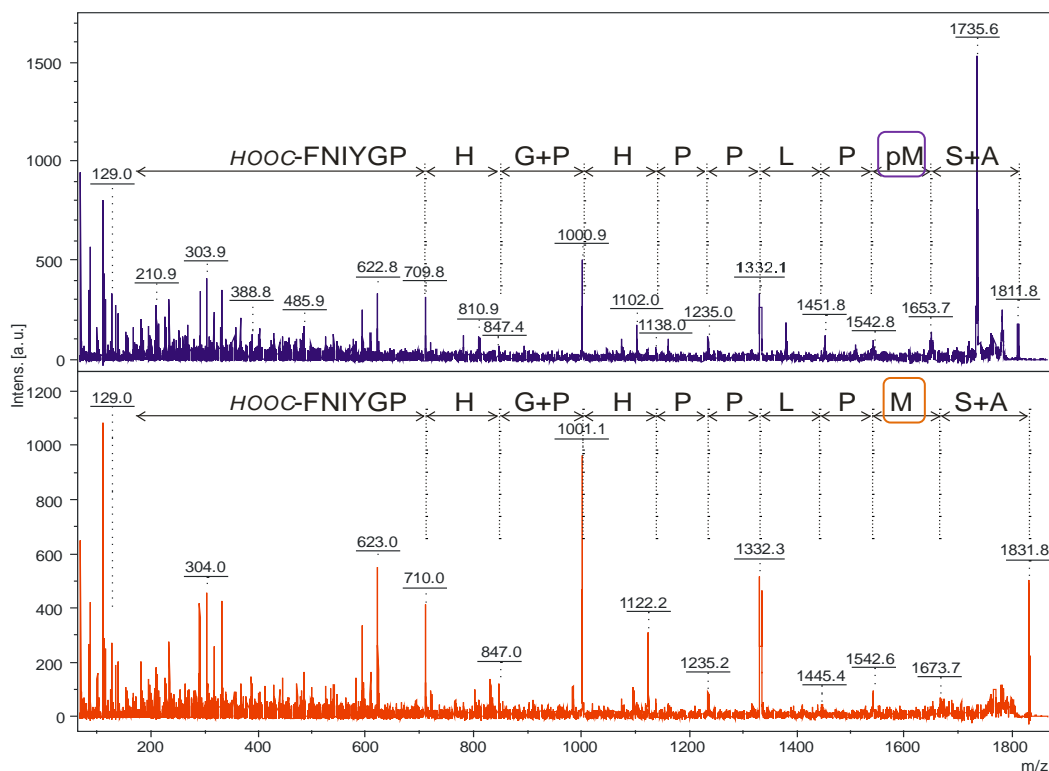
Z detailu hmotnostního spektra MALDI-TOF je patrná inkorporace pMet do sekvence proteinu. Na obrázku 18 (A2, B2, C2) jsou jasné signály Met a o 20 hmotnostních jednotek nižší signály pMet.

Rozdíl právě 20 (přesněji 19,972) hmotnostních jednotek je vysvětlen na obrázku 19.



**Obr. 19 Schéma fotoaktivace pMet.** Po UV ozáření vniká z pMet nestabilní radikál, který se dále terminuje za vzniku dvojné vazby mezi uhlíky. Molekulová hmotnost pMet\* je o 19,972 m.u. (z angl. molecular unit, hmotnostní jednotka) menší než molekulová hmotnost původního Met.

Po prokázání inkorporace pMet do sekvence AMEL byla provedena tandemová hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS/MS (obr. 20) signálu  $m/z$  1831,8 (peptid s Met) a signálu  $m/z$  1811,8 (peptid s inkorporovaným pMet).



**Obr. 20 Tandemová hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS/MS.** Fialové spektrum značí přítomnost pMet v sekvenci proteinu.

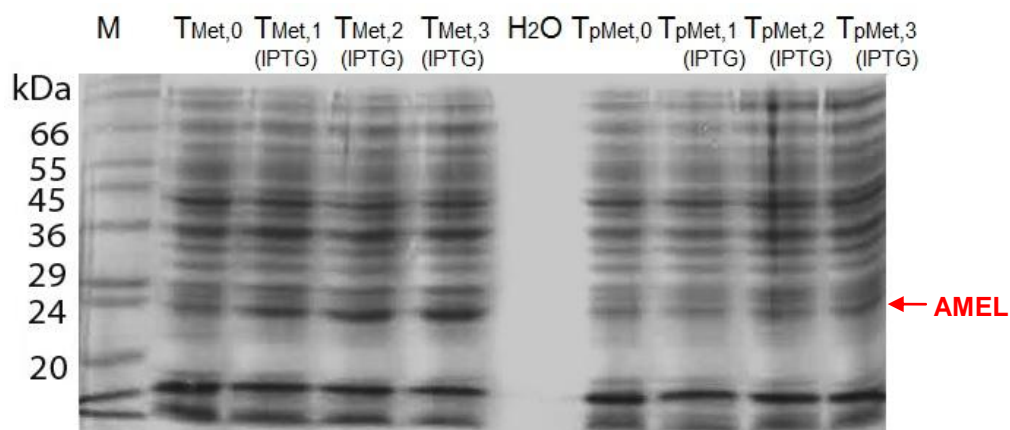


Hmotnostní analýza potvrdila nízkou míru inkorporace pMet, což ale, s ohledem na dosavadní výsledky s nulovou inkorporací fotoanalogu AMK do sekvence proteinu, byl první pozitivní výsledek.

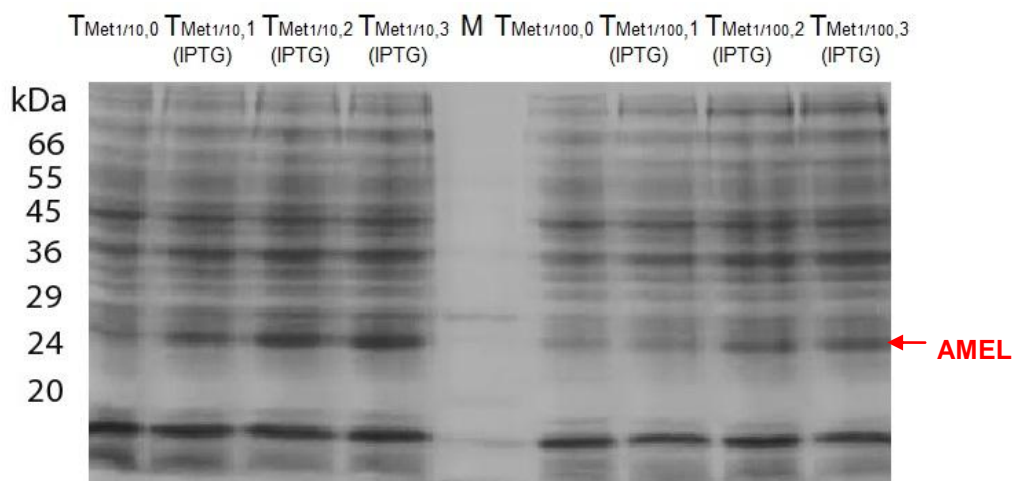
Z toho důvodu byla provedena inkubace buněk v limitním mediu s různými poměry koncentrací Met a pMet. Z inkubovaných kultur byla změřena optická densita  $OD_{550}$  (tab. 6) a připraveny vzorky na SDS-PAGE gel (obr. 21, 22 na str. 41).

**Tab. 6** Hodnoty  $OD_{550}$  pro buněčné kultury inkubované v limitním mediu s různými koncentracemi Met v čase  $t = 0$  h (před přidáním IPTG) a v časech  $t = 1, 2, 3$  h (po přidání IPTG).

	$OD_{550}$ $t = 0$ h	$OD_{550}$ $t = 1$ h (s IPTG)	$OD_{550}$ $t = 2$ h (s IPTG)	$OD_{550}$ $t = 3$ h (s IPTG)
<b>Met</b>	0,59	0,75	0,84	0,88
<b>pMet</b>	0,56	0,60	0,73	0,75
<b>Met <math>1/10</math></b>	0,61	0,79	0,88	0,90
<b>Met <math>1/100</math></b>	0,57	0,69	0,81	0,81

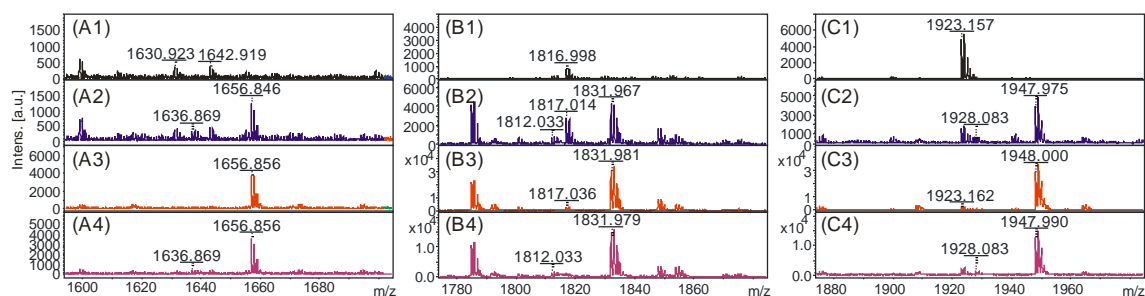


**Obr. 21** Fotografie gelu z SDS elektroforesy použitého pro test exprese AMEL v limitním mediu s Met a v limitním mediu s pMet. Šipkou je vyznačena pozice exprimovaného proteinu. Pořadí vzorků zleva: 1. dráha-hmotnostní standard (M), 2. dráha-klon inkubovaný v limitním mediu pouze s Met v čase  $t = 0$  h před přidáním IPTG ( $T_{Met,0}$ ), 3. dráha-klon inkubovaný v limitním mediu pouze s Met v čase  $t = 1$  h po přidání IPTG ( $T_{Met,1(IPTG)}$ ), 4. dráha- $T_{Met,2(IPTG)}$ , 5. dráha- $T_{Met,3(IPTG)}$  6. dráha-sterilní voda, 7. dráha-klon inkubovaný v limitním mediu s pMet v čase  $t = 0$  h před přidáním IPTG ( $T_{pMet,0}$ ), 8. dráha-klon inkubovaný v limitním mediu s pMet v čase  $t = 1$  h po přidání IPTG ( $T_{pMet,1(IPTG)}$ ), 9. dráha- $T_{pMet,2(IPTG)}$ , 10. dráha- $T_{pMet,3(IPTG)}$ .



**Obr. 22** Fotografie gelu z SDS elektroforesy použitého pro test exprese AMEL v limitním mediu s pMet a Met<sub>1/10</sub> a v limitním mediu s pMet a Met<sub>1/100</sub>. Šipkou je vyznačena pozice exprimovaného proteinu. Pořadí vzorků zleva: 1. dráha-klon inkubovaný v limitním mediu s pMet a Met<sub>1/10</sub> v čase t = 0 h před přidáním IPTG (T<sub>Met1/10,0</sub>), 2. dráha-klon inkubovaný v limitním mediu s pMet a Met<sub>1/10</sub> v čase t = 1 h po přidání IPTG (T<sub>Met1/10,1(IPTG)</sub>), 3. dráha-T<sub>Met1/10,2(IPTG)</sub>), 4. dráha - T<sub>Met1/10,3(IPTG)</sub>, 5. dráha-hmotnostní standard (M), 6. dráha-klon inkubovaný v limitním mediu s pMet a Met<sub>1/100</sub> v čase t = 0 h před přidáním IPTG (T<sub>Met1/100,0</sub>), 7. dráha-klon inkubovaný v limitním mediu s pMet a Met<sub>1/100</sub> v čase t = 1 h po přidání IPTG (T<sub>Met1/100,1(IPTG)</sub>), 8. dráha-T<sub>Met1/100,2(IPTG)</sub>, 9. dráha-T<sub>Met1/100,3(IPTG)</sub>.

Z výše uvedených obrázků je patrná úspěšná produkce amelogeninu v limitním mediu s Met, Met<sub>1/10</sub> a Met<sub>1/100</sub>. Nejméně se pak protein produkoval v limitním mediu s pMet. Následná hmotnostní analýza potvrdila inkorporaci pMet do sekvence produkovaného AMEL (obr. 23).



**Obr. 23** Detail hmotnostního spektra MALDI-TOF MS AMEL pro signály (A) 1656, (B) 1831 a (C) 1947. A1, B1, C1: spektrum před přidáním IPTG, A2, B2, C2: spektrum s pMet po tří hodinové inkubaci v limitním mediu, A3, B3, C3: spektrum s Met<sub>1/10</sub> po tří hodinové inkubaci v limitním mediu, A4, B4, C4: spektrum s Met<sub>1/100</sub> po tří hodinové inkubaci v limitním mediu.

Hmotnostní analýza MALDI-TOF MS na obrázku 23 (A2, A3, A4, B2, B3, B4, C2, C3, C4) potvrzuje inkorporaci pMet do sekvence AMEL. Intenzita signálů pro pMet je největší u AMEL inkubovaného v limitním mediu s Met<sub>1/100</sub> a klesá Met<sub>1/10</sub> > pMet.

## 6. DISKUSE

Jelikož fotoaktivovatelné značení pomocí fotoaktivovatelných "nanosond" a samotná exprese těchto analogů je poměrně nová a neprobádaná vědecká disciplína, nelze v literatuře nalézt dostatečné množství informací pro porovnání výsledků získaných v této práci.

Pro základní srovnání však můžeme použít výsledky z naší laboratoře, kde kolegové pracovali na fotoaktivovatelném značení elektrotransportního hemoproteinu cytochromu  $b_5^{21}$  a regulačního proteinu 14-3-3<sup>22</sup>. U obou proteinů byla po inkubaci v limitním mediu s pMet pozitivní inkorporace fotoanalogu AMK.

Zdá se, že amelogenin i ameloblastin mají určitou odlišnost od cytochromu  $b_5$  a proteinu 14-3-3, která může být dána:

1. AMEL i AMBN patří do rodiny proteinů IDP
2. Velikostí AMBN, AMEL
3. Vysokým obsahem aminokyselin Met a Leu v sekvenci

Amelogenin a ameloblastin patří do rodiny IPD, tedy do skupiny proteinů, které postrádají terciální a mnohdy i sekundární strukturu. Tato skutečnost však nemůže být jediným důvodem, proč byla inkorporace fotoanalogu aminokyseliny do proteinu tak složitá, jelikož v posledním pokusu došlo k úspěšné, ačkoli nízké inkorporaci pMet do struktury AMEL.

Velikost AMBN (65 kDa) je oproti cytochromu  $b_5$  (16 kDa) a proteinu 14-3-3 (28 kDa) podstatně vyšší. Je tedy pravděpodobné, že velikost proteinu může hrát v inkorporaci fotoanalogů poměrně důležitou roli. To naznačuje i pozitivní inkorporace pMet v AMEL (27 kDa), jehož velikost je srovnatelná s proteinem 14-3-3. Doposud nemáme tolik informací, abychom mohli s jistotou říci, že čím větší je daný protein, tím obtížnější bude inkorporace fotoanalogu AMK. Nicméně podle ústního sdělení školitele se v laboratoři podařilo úspěšně inkorporovat pMet do sekvence *B. pertussis Cya C*, přestože tento toxin obsahuje 1706 AMK, což je téměř čtyřikrát více AMK než obsahuje sekvence AMBN. Proto pravděpodobně nebude záležet pouze na velikosti exprimovaného proteinu.

Sekvence cytochromu b<sub>5</sub> obsahuje 4 methioniny a 11 leucinů. Sekvence proteinu 14-3-3 obsahuje 7 methioninů a 24 leucinů. Inkorporace pMet do cytochromu b<sub>5</sub> i do proteinu 14-3-3 proběhla s pozitivním výsledkem - vysokým množstvím produkovaného proteinu s inkorporovaným pMet.

Mgr. Renata Ptáčková společně s Martinou Mazurovou pracovaly na optimalizaci produkce proteinu 14-3-3 s inkorporovaným analogem pLeu. Expresse však nevykazovala žádnou inkorporaci pLeu (zatím není publikováno, pouze ústní sdělení). Tato informace podporuje náš třetí bod navrhované hypotese, kdy pro syntesu 7 methioninů v sekvenci proteinu 14-3-3 stačilo buňce pouze množství pMet, které obsahovalo limitní medium, zatímco pro syntesu 24 leucinů bylo pLeu málo a biosyntesa proteinu se zastavila.

Tuto hypotese můžeme aplikovat na námi syntetizovaný AMBN s (ne)inkorporovaným pMet a pLeu a AMEL s nízkou inkorporací pMet poté, co bylo k pMet do limitního media přidáno Met v poměru s pMet (1:10 nebo 1:100). Sekvence AMBN totiž obsahuje 18 methioninů a 40 leucinů. Množství pMet a pLeu v limitním mediu tedy nestačilo pro biosyntesu proteinu. Dokonce ani čtyřikrát vyšší koncentrace pMet v limitním mediu nestačila pro biosyntesu proteinu. Sekvence AMEL obsahuje 11 methioninů a 16 leucinů. Při prvním pokusu o produkci AMEL v limitním mediu s pMet byla inkorporace pMet nízká. Proto jsme se ve druhém pokusu, kdy limitní mediu obsahovalo kromě pMet také malé množství Met, snažili ověřit, zda přídavek Met minimálně umožní syntesu proteinu s inkorporovaným pMet. Biosyntesa proteinu se tehdy díky přidanému Met nezastavila a produkce proteinu proběhla i s inkorporovaným pMet. Podařilo se nám tedy nalézt postup, kterým jsme alespoň částečně naplnili původní cíl práce.

Míra inkorporace pMet v AMEL však stále není uspokojivá. Specifita Met-tRNA synthasy je sice nízká, ale dovolí inkorporaci analogů Met do sekvence AMEL. Nicméně disociační konstanta ( $K_D$ ) těchto analogů je 40-5000 krát větší než  $K_D$  Met-tRNA synthasy.<sup>23</sup> Z toho důvodu bude nutné vyzkoušet poměry Met a pMet 1:1000 a 1:5000. To naznačuje i výsledek, kdy inkorporace pMet byla relativně vyšší v případě poměru Met:pMet 1:100 než v experimentu, kdy tento poměr byl 1:10.

Lze předpokládat, že při optimálním složení minerálního media s vhodným poměrem Met a pMet je možné připravit AMEL s dostatečně inkorporovaným fotoanalogem aminokyseliny.

## 7. ZÁVĚR

Byla provedena úspěšná transformace plasmidu do bakterie a optimalizace produkce amelogeninu a ameloblastinu v LB mediu.

V limitním mediu s fotoanalogem aminokyseliny byl produkován ameloblastin i amelogenin. Produkce byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforesy a následné MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

Optimalizace produkce vedla k úspěšné přípravě fotoaktivovatelné "nanosondy" lidského amelogeninu rekombinantní expresí v *E. coli*.

### *Shrnutí výsledků:*

#### **\* AMBN:**

- ✓ Transformace buněk plasmidem
- ✓ Produkce proteinu v LB mediu
- ✓ Produkce proteinu v limitním mediu s pMet

#### **\* Inkorporace pMet do sekvence proteinu**

- ✓ Produkce proteinu v limitním mediu s pLeu

#### **\* Inkorporace pLeu do sekvence proteinu**

#### **✓ AMEL:**

- ✓ Transformace buněk plasmidem
- ✓ Produkce proteinu v LB mediu
- ✓ Produkce proteinu v limitním mediu s pMet
- ✓ **Inkorporace pMet do sekvence proteinu**

## POUŽITÁ LITERATURA

1. Lukáčová, I.: Nutriční aspekty zubního zdraví: Bakalářská práce LF Masarykova Univerzita v Brně, str. 10 - 11 (2007)
2. Dokládál, M.: Anatomie zubů a chrupu, skriptum LF Masarykova Univerzita v Brně, str. 7 - 11 (1994)
3. [www.studiodentaire.com/en/glossary/enamel.php](http://www.studiodentaire.com/en/glossary/enamel.php) <sup>27.12.2013</sup>
4. Anzenbacherová, E.: Struktura a chemické složení zubu, Studijní materiál LF UP Olomouc (dostupné z: <http://liborlouda.ic.cz/P%20f8edn%20e1%209aky/Chemick%20e9%20slozeni%20zubu%20I.pdf>)
5. Jelínek R. a kolektiv: Histologie embryologie, skriptum 3. LF UK Praha (dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf>)
6. Nedorost, L. a kolektiv: Atlas histologie tvrdých tkání, skriptum LF UK v Plzni, str. 26 - 27 (2009)<sup>upraveno</sup>
7. Mazurová, Y.: Vývoj oblasti orofaciální a krční - vývoj zubu (online, dostupné z: [http://web.lfhk.cuni.cz/histologie/Histols\\_web/vyuka/vseobecne/doc/prednasky/letni\\_semestr/V\\_II\\_predn\\_10\\_4\\_E\\_zuby.pdf](http://web.lfhk.cuni.cz/histologie/Histols_web/vyuka/vseobecne/doc/prednasky/letni_semestr/V_II_predn_10_4_E_zuby.pdf))
8. Bartlett, J., Ganss, B., Goldberg, M., Moradian, J., Paine, M., Snead, M., Wen, X., White, S., Zhou, Y. : *Developmental Biology* 74, 57 - 115 (2006)
9. <http://www.uscnk.com> <sup>27.12.2013</sup>
10. Fincham, A., Moradian-Oldak, J., Simmer, J.: *Journal of Structural Biology* 126, 270-299 (1999)
11. Smith, C.E.: *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 128, 128 - 161 (1998)
12. Wald, T. a kolektiv: *The journal of biological chemistry* 288, 2 - 23 (2013)
13. Suchanek, M., Radzikowska, A., Thiele, CH.: *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2, 261 - 268 (2005)
14. Fleming, S. A: *Tetrahedron* 51, 12479 - 12520 (1995)
15. <http://www.piercenet.com/method/photoreactive-crosslinker-chemistry> <sup>3.1.2014</sup>
16. Němcová, I., Engst, P., Jelínek, I., Sejbal, J., Rychlovský, P.: Spektrometrické analytické metody II, skriptum PŘF UK Praha, str. 38 - 42 (1998)
17. Lee, M. S., Zhu, M.: *Theory and instrumentation of Mass v knize Mass spectrometry in drug metabolism and disposition*, Wiley, New Jersey, str. 270 - 283 (2011)

18. Ječmen, T.: Mapování protein-proteinových interakcí cytochromu P450 2B4 a cytochrom b5 metodami chemické modifikace a hmotnostní spektrometrie: Bakalářská práce PŘF UK Praha, str. 11 - 13, 20 (2007)
19. <http://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/pET.pdf> upraveno 5.2.2014
20. <http://www.geneaid.com/products/plasmid-dna-purification/plasmid-kit-miniprep> upraveno 21.2.2014
21. Koberová, M., Stiborová M., Ječmen, T., Hodek, P., Šulc, M., Černá, V., Hudeček, J.: International Journal of electrochemical science 8, 125 - 134 (2013)
22. Ptáčková, R., Ječmen, T., Novák, P., Hudeček, J., Stiborová, M., Šulc M.: International Journal of Molecular Sciences : akceptovaný článek (2014)
23. Kiick, K. L., Tirrell, D. A.: Tetrahedron 56, 9487-9493 (2000)

