

3034

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

katedra biochemie



**Termostabilita elongačních faktorů Tu z *E. coli* a  
*B. stearothermophilus* studovaná cílenou bodovou mutagenezí**

Hana Tišerová

**Diplomová práce**

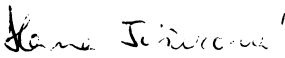
Vedoucí diplomové práce: Doc. MUDr. Jiří Jonák, DrSc.

Prof. RNDr. Marie Tichá, CSc.

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením školitele Doc. MUDr. Jiřího Jonáka, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 2. 5. 2006

  
Hana Tišerová

Tato práce vznikla na oddělení Genové exprese Ústavu molekulární genetiky AV ČR v Praze.

Za uvedení do problematiky a cenné rady děkuji Mgr. Haně Šanderové a svému školiteli Doc. MUDr. Jiřímu Jonákovi, DrSc. za odborné vedení této práce. Dále děkuji Mgr. Liboru Krásnému, PhD. za psychickou podporu a cenné rady a ostatním členům kolektivu za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Prof. RNDr. Marii Tiché, CSc. děkuji za podnětné připomínky k formálnímu zpracování diplomové práce.

Za klidné zázemí a trpělivost děkuji i své rodině a všem svým blízkým.

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>7</b>
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>2 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Elongační faktor Tu.....</b>	<b>9</b>
2.1.1 Obecná charakteristika.....	9
2.1.2 Regulace exprese elongačního faktoru Tu u prokaryot .....	10
2.1.2.1 Gen pro elongační faktor Tu .....	10
2.1.2.2 Regulace exprese genu <i>tuf</i> .....	10
2.1.3 Struktura EF-Tu .....	11
2.1.3.1 Terciární struktura EF-Tu .....	11
2.1.3.2 Struktura a funkce G-domény EF-Tu.....	13
2.1.4 Mechanismus přepínání mezi GTP a GDP konformací proteinu EF-Tu.....	14
2.1.5 Struktura ternárního komplexu EF-Tu·GTP·aa-tRNA.....	16
2.1.6 Mechanismus reaktivace EF-Tu .....	17
2.1.7 Úloha EF-Tu v proteosyntéze.....	18
<b>2.2 Termostabilita proteinů – obecné charakteristiky .....</b>	<b>19</b>
2.2.1 Stabilizující mechanismy.....	21
2.2.2 Zkoumání termostability.....	22
<b>2.3 Termostabilita EF-Tu.....</b>	<b>23</b>
2.3.1 Funkce a stabilita zkrácených forem EF-Tu .....	23
2.3.2 Chimerní proteiny EF-Tu.....	25
2.3.3 Mutagenese u EF-Tu .....	26
<b>3 CÍLE .....</b>	<b>28</b>
<b>4 PŘÍSTROJE, MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Přístroje .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Materiál.....</b>	<b>30</b>
4.2.1 Používané chemikálie, enzymy a další preparáty .....	30
4.2.2 Používané roztoky a pufrы .....	31
4.2.3 Používané bakteriální kmeny .....	31
4.2.4 Používané vektory.....	32
<b>4.3 Metody .....</b>	<b>33</b>
4.3.1 Kultivace bakteriálních buněk .....	33
4.3.1.1 Kultivace buněk v tekutém médiu.....	33
4.3.1.2 Kultivace buněk na pevné půdě .....	33
4.3.1.3 Příprava kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> .....	33
4.3.1.4 Příprava glycerolových konzerv .....	34
4.3.2 Metody práce s DNA .....	34
4.3.2.1 Izolace plazmidové DNA z G- bakterie <i>Escherichia coli</i> .....	34
4.3.2.2 Přečištění plazmidové DNA fenolem, chloroformem a izoamylalkoholem	38

4.3.2.3	Precipitace plazmidové DNA ethanolem v prostředí octanu sodného .....	39
4.3.2.4	Izolace DNA z gelu .....	39
4.3.2.5	Analýza plazmidové DNA restrikčním štěpením .....	40
4.3.2.6	Elektroforetická analýza DNA .....	41
4.3.2.7	Polymerázová řetězcová reakce (PCR) .....	42
4.3.2.8	Mutagenní polymerázová řetězcová reakce .....	43
4.3.2.9	Klonování DNA .....	43
4.3.2.10	Sekvenační reakce – kapilární sekvenátor .....	45
4.3.2.11	„Cracking gel“ .....	46
4.3.3	Metody práce s proteiny .....	47
4.3.3.1	Expres a izolace proteinů pomocí GST purifikačního systému .....	47
4.3.3.2	Měření koncentrace bílkovin – BRADFORD .....	49
4.3.3.3	Polyakrylamidová elektroforéza proteinů (SDS-PAGE) .....	50
4.3.3.4	Barvení polyakrylamidových gelů .....	51
4.3.3.5	Testování schopnosti proteinů EF-Tu vázat a vyměnit GDP .....	52
4.3.3.6	Testování schopnosti proteinů EF-Tu vázat a vyměnit GTP .....	53
4.3.3.7	Měření vnitřní GTPázové aktivity EF-Tu .....	54
4.3.3.8	Měření rychlostní konstanty disociace komplexu EF-Tu·GDP .....	56
4.3.3.9	Měření rychlostní konstanty disociace komplexu EF-Tu·GTP .....	57
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>59</b>
<b>5.1</b>	<b>Příprava mutovaných genů a konstrukce expresních vektorů .....</b>	<b>59</b>
5.1.1	Mutagenní PCR .....	59
5.1.2	Štěpení endonukleázou <i>Dpn I</i> a transformace do <i>DH5α</i> .....	61
5.1.3	Analýza klonů .....	61
5.1.4	Konstrukce expresních vektorů .....	61
<b>5.2</b>	<b>Expres a izolace proteinů .....</b>	<b>62</b>
5.2.1	Transformace plazmidů do buněk <i>E. coli</i> BL21 .....	62
5.2.2	Izolace proteinů .....	62
<b>5.3</b>	<b>Testování aktivity a termostability rekombinantních proteinů .....</b>	<b>65</b>
5.3.1	Vliv mutace v poloze 46 na termostabilitu a aktivitu EF-Tu a G-domény z <i>B. stearothermophilus</i> .....	66
5.3.2	Vliv mutace v poloze 46 na termostabilitu a aktivitu EF-Tu a G-domény z <i>E. coli</i> .....	69
5.3.3	Vliv mutace v poloze 14 a 65 na termostabilitu a aktivitu G-domény z <i>B. stearothermophilus</i> .....	72
5.3.4	Vliv mutace v poloze 14 a 65 na termostabilitu a aktivitu G-domény z <i>E. coli</i> .....	74
<b>6</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>77</b>
<b>6.1</b>	<b>EF-Tu z <i>B. stearothermophilus</i> a <i>E. coli</i> .....</b>	<b>77</b>
<b>6.2</b>	<b>Výběr aminokyselin vhodných k záměně .....</b>	<b>77</b>
<b>6.3</b>	<b>Konstrukce proteinů .....</b>	<b>78</b>
<b>6.4</b>	<b>Mutace v poloze 46 .....</b>	<b>79</b>

<b>6.5</b>	<b>Mutace v poloze 14 a 65.....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>83</b>

# Seznam použitých zkratek

AA	akrylamid
ak zbytky	Aminokyselinové zbytky
aa-tRNA	aminoacyl-tRNA
A, P, E místo	aminoacylové, peptidylové a výstupní místo na ribozomu
Amp <sup>r</sup>	rezistence k ampicilinu
APS	Amoniumpersulfát
bis AA	N, N'- methylenbisakrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
cpm	count per minute – jednotka měření radioaktivity
dNTP	deoxyribonukleosid-5'-trifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GDPNP (GppNHp)	guanosin-5'-( $\beta,\gamma$ -imido)-trifosfát
GS4B	glutathion Sepharosa 4B
GST	glutathion S-transferáza
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
2-ME	2-mercaptoethanol
PBS	phosphate buffer saline
PEP	fosfoenolpyruvát
PEPK	fosfoenolpyruvát kináza
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
RE	restrikční endonukleáza
SAP	krevetí alkalická fosfatáza
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
<i>str</i>	<i>streptomycinový</i>
TAE	trisacetátový pufr pro elektroforézu DNA
TEMED	N, N, N', N' - Bis(dimethylamino)ethan

# 1 Úvod

Termostabilita je v popředí zájmu vědy a proteinového inženýrství již řadu let. Modelovým proteinem pro studium termostability na Oddělení genové exprese Ústavu molekulární genetiky AV ČR byl zvolen bakteriální protein elongační faktor Tu (EF-Tu). EF-Tu patří mezi tzv. GTP-proteiny, které mají schopnost vázat guaninové nukleotidy a v závislosti na typu vázaného nukleotidu mění konformaci molekuly. EF-Tu je vhodným modelem pro studium adaptačních mechanismů bílkovin na různé teploty, neboť je přítomen ve všech mikroorganismech rostoucích jak při nízkých tak i extrémních teplotách a mezi jednotlivými bakteriálními druhy vykazuje vysokou homologii. Je to bílkovina složená vždy ze tří domén, a tak umožňuje získat pohled na to, jak se vlastnosti a funkce budují z příspěvků jednotlivých domén.

Pro studium termostability je využíváno několik experimentálních přístupů. V této práci byla použita metoda vnášení cílených bodových mutací. Studovány byly proteiny z mezofilní bakterie *Escherichia coli* a termofilní bakterie *Bacillus stearothermophilus* lišící se teplotním optimem růstu.

Organizmy dělíme podle teplotního optima růstu na **psychrofilní** (teplotní optimum 5-25°C); **mezofilní** (25-45°C), mezi které patří např. *E. coli* (37°C); **termofilní** (45-80°C), mezi které patří např. představitelé rodů *Bacillus* (s optimem růstu mezi 50-60°C) a *Thermus*; a **hypertermofilní** ( $\geq 80^\circ\text{C}$ ), mezi které patří např. *Thermotoga maritima* a mnoho zástupců skupiny archaea [1; 2].

Znalost funkce a struktury je nezbytná pro navržení vhodných bodových mutací, z tohoto důvodu se jimi budu zabývat ve svém literárním přehledu. Dále se zmíním o obecných prvcích termostability a dosavadních výsledcích zkoumání termostability EF-Tu.



## 2 Literární přehled

### 2.1 Elongační faktor Tu

#### 2.1.1 Obecná charakteristika

Elongační faktor Tu (EF-Tu) je protein, který se zásadním způsobem podílí na elongační fázi bakteriální proteosyntézy. Je nejvíce zastoupeným proteinem v prokaryotické buňce, představuje 5 – 10% ze všech proteinů, což odpovídá 7 – 10 kopiím na ribozóm [3]. EF-Tu je GTP-protein (GTP-vazebný protein s vnitřní GTPázovou aktivitou) o molekulové hmotnosti okolo 43 000 Da a je tvořen přibližně 400 aminokyselinovými zbytky (ak zbytky). Tento monomerní protein je tvořen třemi doménami a jeho aktivita je závislá na typu vázaného guaninového nukleotidu. V GDP formě je protein neaktivní a jeho konformace se výrazně liší od aktivní GTP formy [4; 5].

Jeho hlavní (ne však jedinou) funkcí je vazba aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) v cytosolu buňky a její přenos do A místa translatujícího ribozómu. V aktivní formě má protein vysokou afinitu k aa-tRNA a ribozómu. Významnou úlohu také hraje při zajištění přesnosti translace (korekční, „proofreading“ aktivita) [6; 7]. Představuje esenciální podjednotku RNA-polymerázy fágů Q $\beta$  a SP1, která syntetizuje fágovou RNA [8; 9]. Podílí se na exkluzi T fágů z některých kmenů bakterie *Escherichia coli* [10; 11]. Částečně asociuje s plazmatickou membránou buňky a je methylován při nedostatku živin [12; 13]. Obecným jevem je přechodná fosforylace EF-Tu v průběhu translace. Fosforylovaný EF-Tu není schopen vázat aa-tRNA a naopak ternární komplex není pro kinázu přístupný [14]. V roce 1998 byla v systému *in vitro* objevena schopnost EF-Tu působit jako „molekulární chaperon“ [15]. EF-Tu také zvyšuje rezistenci translačního aparátu k antibiotikům tetracyklinu, streptomycinu, spektinomycinu, erythromycinu a chloramfenikolu [16].

Funkce EF-Tu je zajištěna interakcí s různorodými molekulami. Pro vazbu guaninových nukleotidů je esenciální přítomnost iontů Mg<sup>2+</sup>. Vzhledem k vyšší afinitě EF-Tu ke GDP než GTP (~ o 2 řády) je nezbytnou součástí elongačního cyklu elongační faktor Ts (EF-Ts), jenž katalyzuje výměnu GDP za GTP a reaktivuje tedy EF-Tu.

Jsou známá čtyři antibiotika, která ovlivňují různým způsobem EF-Tu: kirromycin [17; 18], pulvomycin [19], GE2270 A [19; 20], enacyloxin IIa [21]. Elongační faktory Tu z některých bakteriálních kmenů vykazují rezistenci vůči těmto antibiotikům [22; 23]. Takovým příkladem je i EF-Tu z *Bacillus stearothermophilus*, který je rezistentní vůči kirromycinu a pulvomycinu [24]. Jako první specifický irreverzibilní inhibitor EF-Tu byl

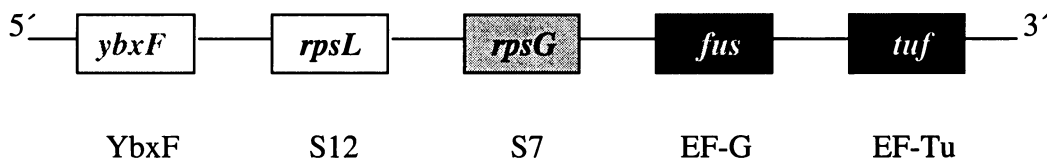
popsán N-tosyl-L-phenylalanylchloromethylketon. Modifikuje první cysteinový zbytek (Cys 81 u *E. coli*), tím faktor ztrácí schopnost vázat aa-tRNA a účastnit se proteosyntézy [25-29].

## 2.1.2 Regulace exprese elongačního faktoru Tu u prokaryot

### 2.1.2.1 Gen pro elongační faktor Tu

EF-Tu je kódován genem *tuf*, který je součástí *streptomycinového* operonu (operon *str*). Dalšími geny tohoto operonu jsou *fus* (kóduje protein EF-G), *rpsL* a *rpsG* (kódují ribozomální proteiny S12 a S7). U G+ bakterií je dále přítomen gen *ybxF* (kóduje protein YbxF) s doposud neobjasněnou funkcí [30]. U mnoha bakterií je gen *tuf* posledním genem tohoto operonu (obr. 2.1) [31; 32].

Většina G+ bakterií má pouze 1 gen *tuf* v chromozómu, zatímco G- bakterie obsahují obvykle 2 téměř identické geny pro EF-Tu, které jsou lokalizované v různých operonech [33; 34].



Obr. 2.1 *Streptomycinový* operon G+ bakterií (obecný model, který pouze naznačuje pořadí genů v operonu, ale neukazuje poměr velikostí jednotlivých genů).

### 2.1.2.2 Regulace exprese genu *tuf*

EF-Tu je nejhojnější bílkovinou v bakteriální buňce a je také přibližně 4-10x hojnější než ostatní bílkoviny operonu *str*, proto byla důkladně studována regulace jeho exprese [3].

U *Escherichia coli* je operon *str* přepisován jako 1 polycistronní mRNA [35]. Gen *tuf* však může být přepisován také ze specifického promotoru umístěného před genem, ten však vykazuje nižší aktivitu než hlavní promotor celého operonu. Transkript z tohoto promotoru představuje pouze 30% celkového transkriptu genu *tuf* [3].

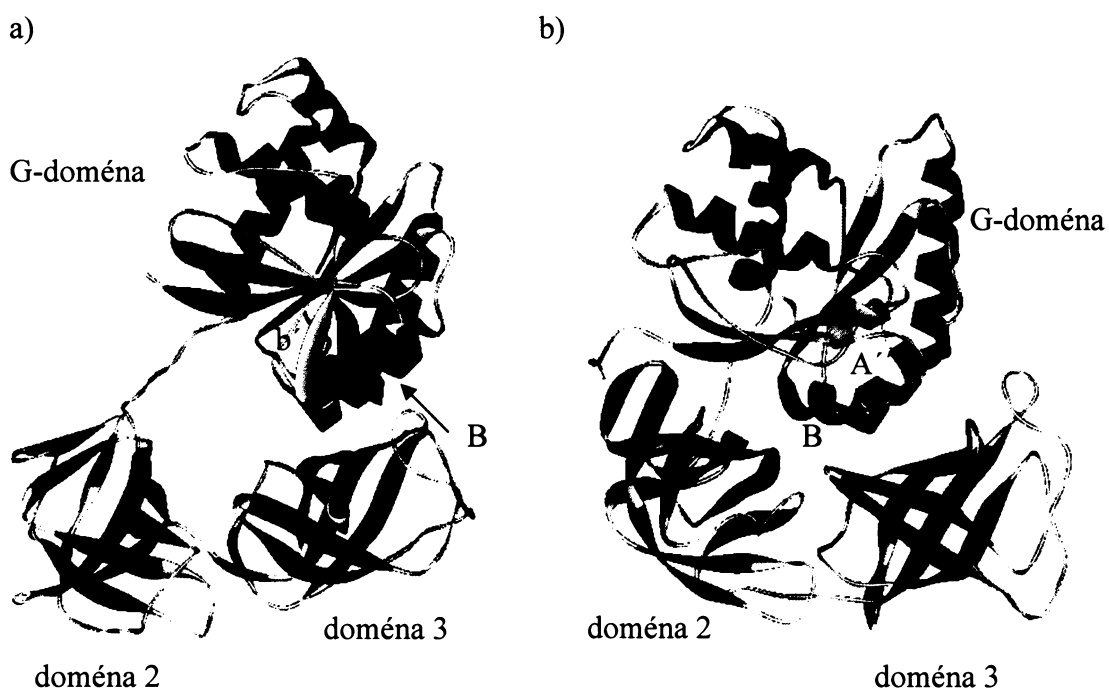
Zcela odlišná situace byla popsána u *Bacillus stearothermophilus*, kde se také nachází specifický promotor pro gen *tuf*, jeho aktivita je však 10x vyšší než aktivita hlavního promotoru operonu *str* [24].

## 2.1.3 Struktura EF-Tu

### 2.1.3.1 Terciární struktura EF-Tu

EF-Tu je monomerní GTP-protein s vnitřní GTPázovou aktivitou. Byl prvním GTP-proteinem, u kterého byla popsána schopnost měnit konformaci vlivem guaninových nukleotidů [36; 37]. GTP-proteiny se účastní různých biologických pochodů souvisejících s buněčným růstem, proliferací, signální transdukcí, membránovým přenosem a sekrecí, organizací buněčné kostry a pohybu, translací atd.

GTP-proteiny rozdělujeme do tří skupin – translační faktory, proteiny rodiny Ras a heterotrimerní G-proteiny. Tyto proteiny jsou si strukturně velmi blízké. Někdy jsou mezi GTP-proteiny řazeny i tubuliny, které také váží guaninové nukleotidy, ale neobsahují strukturní motivy společné ostatním GTP-proteinům [38].



Obr. 2.2 Terciární struktura EF-Tu z *Thermus aquaticus* v neaktivní GDP konformaci (a) a aktivní GTP konformaci (b). Modře je znázorněn  $\alpha$ -helix B, který výrazně mění polohu při změně konformace molekuly. Žlutě je vybarven řetězec b', který se při změně konformace svine do  $\alpha$ -helixu A''.

Trojrozměrná struktura EF-Tu byla určena pomocí rentgenové difrakce krystalu proteinu. Byla publikována struktura aktivního EF-Tu v GDPNP formě (nehydrolyzovatelný analog GTP) z bakterií *Thermus aquaticus* [5] a *Thermus thermophilus* [4]. V neaktivní GDP formě byla struktura určena pro EF-Tu z bakterií *Thermus thermophilus* [39] a *Escherichia coli* [39-41].

EF-Tu se skládá ze tří domén (obr. 2.2, str. 11). N-terminální doména 1 (G-doména) je zodpovědná za vazbu guaninových nukleotidů a hydrolýzu GTP, tvoří ji přibližně 200 aminokyselin a strukturou i funkcí představuje typickou G-doménu GTP-proteinů. Jádro domény je tvořeno šesti  $\beta$ -skládanými listy (pět paralelních a jeden antiparalelní), které jsou označovány písmeny a-f. Jádro  $\beta$ -listů je obklopeno šesti hlavními  $\alpha$ -helixy (A-F) a deseti smyčce podobnými útvary, které spojují tyto sekundární struktury [4].

Při porovnání struktur proteinu z *E. coli* a *T. aquaticus* nelze přehlédnout inserci 10 ak zbytků v sekvenci G-domény EF-Tu z *T. aquaticus*. Jedná se o ak zbytky Met 182 – Asn 193 vložené mezi helixy E a F. Tato inserce byla pojmenována jako termofilní smyčka, neboť byla poprvé identifikována u EF-Tu z termofilního organismu s optimem růstu okolo 70°C [5]. Pravděpodobně však tato inserce s termostabilitou nijak nesouvisí, neboť byla objevena i ve struktuře EF-Tu z mezofilního organismu *Anacystis nidulans* [42] a naopak nenachází se ve struktuře EF-Tu z termofilní bakterie *Bacillus stearothermophilus* [24].

Domény 2 a 3 jsou tvořeny vždy asi 100 aminokyselinami upořádanými do sedmi a šesti antiparalelních  $\beta$ -listů. Celá doména tvoří v obou případech  $\beta$ -barel. Struktura domény 3 je stabilizována hydrofobním jádrem tvořeným aromatickými postranními řetězci ak zbytků. Domény 2 a 3 jsou v úzkém kontaktu pomocí vodíkových můstků. Kompaktnost celého proteinu je zajištěna vodíkovými můstky a iontovými interakcemi mezi doménami 1 a 3 [5].

V neaktivní GDP formě má EF-Tu volnější uspořádání (obr. 2.2a, str. 11). Domény 1 a 2 nejsou v kontaktu prostřednictvím nekovalentních interakcí, a tím se utváří poměrně veliký „otvor“ uprostřed molekuly [39]. Peptid spojující doménu 1 a 2 je dlouhý 16 Å, uprostřed se nachází jednoduchá helikální otočka. Tento spojovací element vykazuje vysoký stupeň termálního pohybu stejně jako celá doména 2 [5].

V aktivní GTP formě jsou domény uspořádány do kompaktního globulárního tvaru (obr. 2.2b, str. 11). Peptid spojující doménu 1 a 2 vykazuje stejný termální pohyb jako zbytek molekuly [5]. Doména 1 je pootočena o 90° vzhledem k doméně 2 a 3 (podrobněji

viz 2.1.4), tím se dostává do těsnějšího kontaktu s doménou 2, kde vzniká několik polárních interakcí a vodíkových můstků [4].

### 2.1.3.2 Struktura a funkce G-domény EF-Tu

#### Vazba guaninových nukleotidů

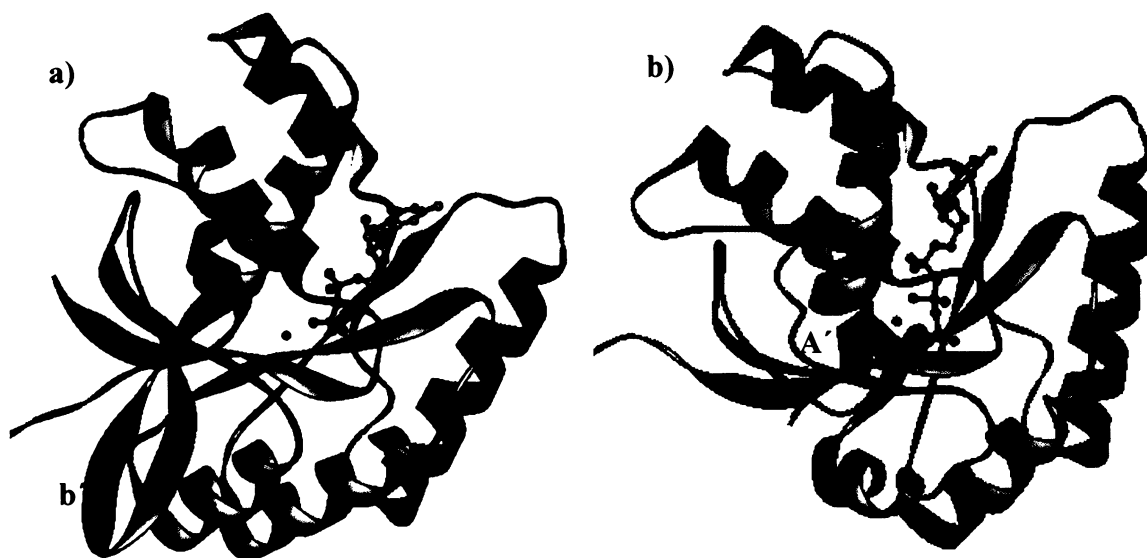
Struktura vazebného místa guaninových nukleotidů je velmi podobná pro EF-Tu a protein Ras-p21 [38]. V této oblasti byly definované tři konzervované motivy, u EF-Tu byla popsána ještě čtvrtá konzervovaná sekvence [38] (obr. 2.3, str. 14). Prvním motivem je aminokyselinová sekvence GxxxxGK(S/T) (označovaná jako smyčka vázající fosfát nebo smyčka bohatá na glycin), kterou u EF-Tu z *E. coli* představují ak zbytky 18-25. Tato část polypeptidového řetězce se obtáčí kolem  $\beta$ -fosfátu guaninového nukleotidu, který interaguje s konzervovanou sekvencí několika vodíkovými můstky. Šestým zbytkem motivu je vždy Gly, neboť nepřítomnost postranního řetězce zabraňuje vzniku stérické interference s guaninovou částí nukleotidu. Druhým sekvenčním motivem je DxxG. U EF-Tu z *E. coli* jde o ak zbytky 80-83, z nichž Asp se podílí na vazbě iontu  $Mg^{2+}$ . Tento úsek je zahrnut v konformačních změnách mezi GDP a GTP formou (podrobněji viz 2.1.4). Třetí konzervovanou oblast tvoří aminokyseliny NKxD (u *E. coli* ak zbytky 135-138), která je nazývána jako oblast rozpoznávající guanin, neboť touto sekvencí je vázána guaninová báze, konkrétně se této interakce účastní Asp. V molekule EF-Tu se nachází ještě jeden konzervovaný motiv, který není obsažen v molekule Ras-p21, tento motiv je tvořen ak zbytky SALx (173-176 u *E. coli*) a rovněž se podílí na vazbě guaninového nukleotidu [5; 38].

#### Vazba $Mg^{2+}$

Ion  $Mg^{2+}$  představuje esenciální kofaktor pro vazbu guaninových nukleotidů a hydrolyzu GTP u všech GTP-proteinů [41; 43].

Ion  $Mg^{2+}$  je uložen v hluboké štěrbině, která odděluje kapsu vázající nukleotidy a oblast přepínačů I a II (podrobněji viz 2.1.4). Ion váže šest ligandů v oktahedrál ní koordinační geometrii. Koordinuje kyslík ze skupiny  $\beta$ -fosfátu a boční řetězec Ser/Thr z prvního konzervovaného motivu. Axiálními ligandy jsou molekuly vody, ve většině struktur je jedna molekula ukotvena na místě vodíkovým můstkem s  $\alpha$ -fosfátem a druhá molekula vodíkovým můstkem s konzervovaným Asp z druhého sekvenčního motivu. Ostatní ligandy závisí na konformačním stavu. V GTP formě je dalším ligandem kyslík  $\gamma$ -fosfátu a postranní řetězec Thr 61 (u *E. coli*) z tzv. efektorové oblasti [5; 38]. V GDP

formě jsou tyto dva ligandy nahrazeny molekulami vody [39]. Ion  $Mg^{2+}$  spojuje několik různých částí jádra G-domény – vazebné místo pro nukleotidy, samotný nukleotid, oblast přepínače II a efektorovou oblast [5; 38].



Obr. 2.3 Terciární struktura G-domény EF-Tu z *Thermus aquaticus*. (a) GDP forma G-domény. (b) GTP forma G-domény (GTP je zde nahrazeno GDPNP). Vyznačeny jsou konzervované oblasti vazebného místa pro nukleotidy a  $Mg^{2+}$  (tmavě modrá – GxxxxGK(S/T); červená – DxxG; černá – NKxD a žlutá – SALx). Zároveň je znázorněna změna sekundární struktury, kdy při vazbě GTP je  $\beta$ -list b' svinut do  $\alpha$ -helixu A' (tmavě růžová). Ion  $Mg^{2+}$  je znázorněn zeleně a nukleotidy kuličkovým modelem.

## 2.1.4 Mechanismus přepínání mezi GTP a GDP konformací proteinu EF-Tu

Ve struktuře G-domény jsou definovány dvě oblasti, které jsou důležité pro přepínání mezi aktivním (GTP) a neaktivním (GDP) stavem.

První oblastí je přepínač I (ak zbytky 40-62 u *E. coli*, 41-63 u *T. thermophilus* – u označení ak zbytků je uvedeno pořadí platné v molekule EF-Tu z *E. coli*, v závorce z *T. thermophilus*, resp. *T. aquaticus*), který je označován jako efektorová oblast, protože interaguje s efektorovými molekulami (např. aa-tRNA) [5]. Tvoří okolí iontu  $Mg^{2+}$  a prostřednictvím molekuly vody s ním interaguje. Vodíkovým můstkem je spojen s  $\alpha$ -fosfátem nukleotidu [4; 5; 38; 39]. Tuto oblast lze rozdělit na dva úseky – sekvence ak zbytků 40-48 (41-49), která má největší variabilitu v rámci celé molekuly, a sekvenci ak zbytků 53-59 (54-60), která obsahuje sekvenční motiv PEEKARG konzervovaný u prokaryotických organismů. Vlivem přítomnosti  $\gamma$ -fosfátu dochází v této oblasti k dramatické změně konformace sekundární struktury [4; 40]. V GTP konformaci tvoří

efektorovou oblast  $\beta$ -list a', krátký helix A'a helix A'' (ak zbytky 51-57). V GDP konformaci je helix A'' rozvinut a vzniká krátký  $\beta$ -list b'. Řetězce b'a b vytvářejí v této formě sekundární strukturu označovanou jako  $\beta$ -vlásenka, která je v kontaktu s doménou 3 (obr. 2.3, str. 14) [39; 41].

Druhou oblastí je přepínač II, který ve struktuře představuje  $\alpha$ -helix B a smyčky před a za tímto helixem. Součástí této sekvence je druhý konzervovaný motiv DxxG. Oblast přepínače II vykazuje menší strukturní variabilitu [38].

Hydrolýzou  $\gamma$ -fosfátu dochází nejprve k lokální změně v oblasti přepínače II. Obrtlíkem jsou 2 konzervované ak zbytky Gly 83 (84) a Gly 94 (95). Spouštěcím mechanismem je odstranění záporného náboje  $\gamma$ -fosfátu, který je nahrazen molekulou vody. Potenciální repulze mezi touto molekulou vody a amidem Gly 83 (84) je vyřešena překlopením („flipem“) peptidové vazby mezi Pro 82 (83) a Gly 83 (84) přibližně o  $150^\circ$ . Překlopením vazby je výrazně ovlivněna pozice ak zbytků v helixu B. Při přechodu do neaktivní konformace dochází ke vzniku nového závitů na N-konci tohoto helixu a rozvinutí jeho poslední C-koncové otočky. Její součástí je Gly 94 (95), který umožňuje tento posun sekundární struktury podél sekvence. V aktivní GTP formě stabilizuje tento ak zbytek poslední otočku helixu vazbou k Arg 384 (385) v doméně 3. Při přechodu do GDP konformace je tato vazba rozrušena [5; 38; 39].

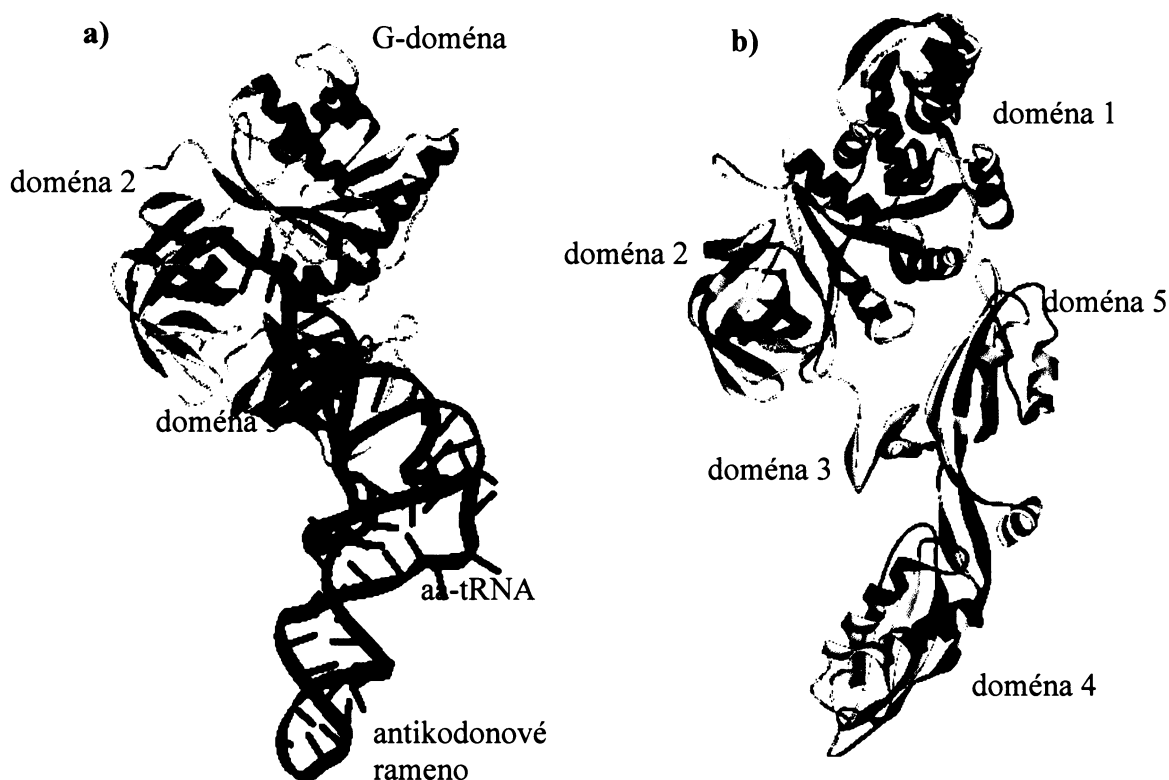
Reorientace Pro 82 (83) způsobí další lokální změny v efektorové oblasti (přepínač I). Dochází k překlopení vazby mezi Ile 62 a Asn 63, což způsobí reorientaci předchozích 12 ak zbytků a následnou výraznou změnu sekundární struktury [40]. Jak již bylo uvedeno, v GTP konformaci tvoří efektorovou oblast krátký  $\beta$ -list a', krátký helix A'a helix A'' (ak zbytky 51-57). Zmíněnými změnami dochází po hydrolýze GTP k rozvinutí helixu A'' a vzniká krátký  $\beta$ -list b' (ak zbytky 53-58) [39].

Lokální změny v oblastech přepínačů mají za následek rozsáhlé konformační změny celé molekuly. Osa helixu B změní úhel o  $42^\circ$  a jeho pozice je posunuta o 4 ak zbytky, což způsobí uvolnění vazeb mezi doménami a dochází k rotaci G-domény o  $90^\circ$  vzhledem k doménám 2 a 3. V některých smyčkách tak dochází k posunu ekvivalentních pozic až o  $40 \text{ \AA}$  [5]. Mezi doménami vzniká „otvor“ a je rozrušeno vazebné místo pro aa-tRNA.

## 2.1.5 Struktura ternárního komplexu EF-Tu·GTP·aa-tRNA

Hlavní úlohou EF-Tu je transport aa-tRNA do A místa na ribozómu ve formě ternárního komplexu – EF-Tu·GTP·aa-tRNA. Krystalová struktura ternárního komplexu byla určena u dvou komplexů. Prvním byl komplex kvasinkové Phe-tRNA<sup>Phe</sup> a EF-Tu·GDPNP z *T. aquaticus* [44] a druhým komplex Cys-tRNA<sup>Cys</sup> z *E. coli* a EF-Tu·GDPNP z *T. aquaticus* [45].

Ternární komplex má protáhlý tvar, antikodonové rameno směřuje od molekuly EF-Tu (obr. 2.4a). Na vazbě aa-tRNA se podílejí všechny tři domény EF-Tu, jedno z vazebných míst leží na styčné ploše všech tří domén, což je možné pouze v aktivní GTP formě. Aminoacyl-tRNA interaguje s EF-Tu třemi oblastmi, jsou jimi aminoacylovaný CCA konec, akceptorové rameno a smyčka na pseudouridinovém rameni [46]. Zatímco akceptorové rameno a CCA konec jsou rozpoznávány specificky konzervovanými oblastmi, pseudouridinové rameno je vázáno nekonzervovanými ak zbytky na povrchu domény 3 [44].



Obr. 2.4 Makromolekulární mimikry mezi ternárním komplexem (a) a EF-G·GDP (b). Aa-tRNA v ternárním komplexu je znázorněna tmavě modrou barvou.



Překvapivým zjištěním, jež vzešlo z porovnání struktur ternárního komplexu a elongačního faktoru G (EF-G) v neaktivní GDP formě (obr. 2.4b, str. 16), byla podobnost tvarů těchto dvou komplexů [44]. Domény 1 a 2 EF-G-GDP jsou velmi podobné EF-Tu-GTP, domény 3 a 5 napodobují akceptorové rameno aa-tRNA, zatímco doména 4 má podobný tvar jako antikodonové rameno aa-tRNA. Tento jev byl nazván makromolekulární mimikry [46; 47].

EF-G je GTP vazebný protein, jehož funkcí je translokace peptidyl-tRNA z A do P místa na ribozómu a současně posun mRNA o jeden kodon. Po dokončení translokace molekulou EF-G-GTP je GTP hydrolyzováno a komplex EF-G-GDP ztrácí afinitu k ribozómu. Před uvolněním tohoto komplexu z ribozómu zanechá ve struktuře ribozómu svůj otisk. Do tohoto místa se následně váže ternární komplex [46; 47].

### 2.1.6 Mechanismus reaktivace EF-Tu

EF-Tu má mnohonásobně (přibližně 100x) vyšší afinitu ke GDP než GTP, proto je v buňce nezbytně nutná přítomnost proteinu, který je schopen katalyzovat výměnu GDP za GTP (GEF – guanine-nucleotide exchange factor). Takovým proteinem, schopným reaktivovat EF-Tu, je EF-Ts (pro přehled [48]).

Byla určena 3D struktura dvou komplexů EF-Tu·EF-Ts, vždy bez přítomnosti nukleotidu. Prvním je komplex izolovaný z *E. coli* [48] a druhým je komplex z *T. thermophilus* [49]. V obou případech tvořily komplex dvě molekuly EF-Tu a dvě molekuly EF-Ts, ale proteiny EF-Ts z obou organizmů se značně liší.

Změny konformace v molekule EF-Tu po interakci s EF-Ts mají za následek narušení vazebného místa pro  $Mg^{2+}$ , což usnadňuje uvolnění GDP z molekuly. Na uvolněné místo se váže GTP, neboť jeho koncentrace v buňce je 100-1000x vyšší než GDP. Vazebné místo pro  $Mg^{2+}$  je narušeno inzercí ak zbytku Phe 81 (82) molekuly EF-Ts do hydrofobní oblasti mezi helixy B a C v G-doméně EF-Tu. Z tohoto důvodu dochází k reorganizaci helixu B a tím i ak zbytků podílejících se na vazbě molekul vody, které stabilizují  $Mg^{2+}$  v G-doméně [48]. Důležitou aminokyselinou pro vytvoření komplexu je v molekule EF-Tu His 118. Experimentálně bylo však zjištěno, že není esenciální pro přenos signálů vedoucích k uvolnění nukleotidu [50].

Dalším možným příspěvkem k uvolnění GDP může být separace domén 1 a 3 v molekule EF-Tu molekulou EF-Ts umožňující reorientaci helixu B [47].

## 2.1.7 Úloha EF-Tu v proteosyntéze

Při translaci dochází na ribozómu k překlada genetické informace, původně uložené v DNA, do struktury proteinů. V průběhu každého elongačního cyklu dochází k prodloužení vznikajícího polypeptidového řetězce o jednu aminokyselinu. Byly navrženy tři různé modely pro elongační cyklus – alosterický trojmístný model, model hybridních míst a  $\alpha - \epsilon$  model (pro přehled [6]). V poslední době je nejvíce upřednostňován model alosterický.

Elongačního cyklu se účastní dva GTP-proteiny, EF-Tu a EF-G. V podmínkách *in vitro* bylo však zjištěno, že tento cyklus může probíhat i bez účasti těchto elongačních faktorů. Interakce s tRNA a translokace jsou tedy základními vlastnostmi ribozómu, elongační faktory jen výrazně tyto procesy urychlují, zvyšují přesnost celé translace a rezistenci vůči inhibitorům (např. antibiotikům) (pro přehled [16; 51]).

U prokaryot je ribozóm složen z velké (50S) a malé (30S) podjednotky. Malá podjednotka je zodpovědná za vazbu mRNA a monitorování kodon-antikodon interakcí s tRNA. Velká podjednotka je zodpovědná za vznik peptidové vazby a interaguje s akceptorovým koncem tRNA, ke kterému je připojena aktivovaná aminokyselina [52; 53]. Tyto dvě podjednotky tudíž interagují s opačnými konci tRNA. Celý ribozóm obsahuje 3 vazebná místa pro tRNA – A, P a E místo [54].

Elongační cyklus proteosyntézy začíná vazbou ternárního komplexu do A místa na ribozómu. Proces vazby aa-tRNA do A místa lze rozdělit do několika kroků. Nejprve ternární komplex vytvoří labilní vazbu s ribozómem, následně dochází k rozpoznání kodonu a spouští se hydrolyza GTP, jejímž výsledkem je konformační změna EF-Tu. Neaktivní GDP forma EF-Tu ztrácí afinitu k aa-tRNA a k ribozómu, aa-tRNA je uvolněna z EF-Tu a vstupuje do A místa na velké podjednotce, aby se mohla podílet na vzniku peptidové vazby (pro přehled [7]).

Výběr správné aa-tRNA je uskutečněn translačním aparátem s vysokou přesností a rychlostí pomocí dvou mechanismů - korekční aktivitou („proofreading“ aktivitou) EF-Tu a substrátem indukovanou konformační změnou. Kinetický „proofreading“ ternárního komplexu efektivně odděluje výběr do dvou částí – počáteční selekce a vlastní „proofreading“. Tím je umožněno více příležitostí, aby nesprávná aa-tRNA opustila ribozóm. Substrátem indukovaná konformační změna dále zvyšuje věrnost selektivním zrychlením některých kroků [55]. Ribozóm aktivuje GTP hydrolyzu v EF-Tu pravděpodobně indukovaním konformačních změn ve faktoru, vedoucích k přesné orientaci katalytických skupin v EF-Tu [56]. K maximální aktivaci však dochází pouze

v případě interakce správného (plně komplementárního) antikodonu aa-tRNA s kodonem mRNA, nikoli v případě příbuzných aa-tRNA (lišících se jednou bází od správné) nebo nepříbuzných aa-tRNA.

K určitým interakcím dochází i v případě příbuzné aa-tRNA, GTP hydrolyza je však aktivována slaběji než při vazbě správné aa-tRNA. Dokud je EF-Tu přítomné na ribozómu není aminoacylovaný zbytek v kontaktu s peptidyltransferázou na velké podjednotce [6; 7]. Tím je připravena další možnost odmítnutí nesprávné (příbuzné) aa-tRNA s nekomplementárním antikodonem. Mezi kodon-antikodonovým párováním a tvorbou peptidové vazby je krátká prodleva, během níž může nesprávně navázaná aa-tRNA opustit ribozóm.

Po vazbě aa-tRNA do A místa a uvolnění EF-Tu·GDP z ribozómu nastupuje druhá fáze elongačního cyklu, tvorba nové peptidové vazby. Jako peptidyltransferázové místo byla identifikována velká ribozomální podjednotka [57; 58]. Při této reakci jsou 3' konce obou peptidyl-tRNA a aa-tRNA vázány v peptidyltransferázovém centru (pro přehled [6]).

Posledním krokem elongačního cyklu je translokace, tedy posun mRNA o jeden kodon a zároveň posun peptidyl-tRNA z A do P místa na ribozómu. Tento posun musí být velmi přesný, aby nedošlo ke změně čtecího rámce a aby poslední ak zbytek peptidového řetězce zůstal v peptidyltransferázovém centru. Tento proces je katalyzován proteinem EF-G. EF-G·GTP redukuje aktivační energii tohoto procesu, po translokaci dochází k hydrolyze GTP a EF-G·GDP ztrácí afinitu k ribozómu [6]. Poté začíná další elongační cyklus.

## **2.2 Termostabilita proteinů – obecné charakteristiky**

Již mnoho let jsou termostabilní enzymy (termozymy) v popředí zájmů vědců a proteinových inženýrů. Jedná se o enzymy s teplotním optimem v rozmezí 60 – 125°C, které mají široké praktické využití. Nezastupitelnou úlohu hrají v molekulární biologii (př. termostabilní DNA polymerázy, DNA ligázy), v technologiích při zpracování škrobu (př.  $\alpha$ -amylázy, izomerázy glukózy), organické syntéze, výrobě a zpracování papíru, produkci ethanolu, diagnostice a živočišné výrobě [1].

Již v úvodu byly organismy rozděleny dle teplotních optim růstu na psychofilní, mezofilní, termofilní a hypertermofilní. Stejným způsobem jsou označovány proteiny izolované z těchto organismů.

Pro studium termofilních proteinů, bylo důležité zjištění, že až na několik výjimek mohou být tyto proteiny rekombinantně připravovány v mezofilních organizmech. Takové rekombinantní proteiny si zachovávají všechny své přirozené vlastnosti včetně stability a optimální aktivity ve vysokých teplotách. Z toho je patrné, že teplotní vlastnosti jsou vlastnostmi molekuly [59; 60].

Termofilní proteiny skýtají několik biotechnologických výhod: (i) při izolaci těchto proteinů z mezofilního organismu můžeme použít purifikaci teplem; (ii) termostabilita je obvykle spojena s vyšší odolností k chemické denaturaci; (iii) průběh enzymatické reakce za vyšší teploty dovoluje vyšší koncentraci substrátu, nižší viskozitu, menší riziko mikrobiální kontaminace a často vyšší rychlost reakce [1].

Přes rozdílnost v přizpůsobivosti k nepříznivým podmínkám jsou termofilní proteiny velmi podobné odpovídajícím proteinům mezofilním: (i) mají vysokou sekvenční podobnost (40 – 85%) [59; 61]; (ii) mají velmi podobné trojrozměrné struktury (pro přehled [1]); (iii) používají stejné katalytické mechanismy [59].

Některé proteiny jsou stabilizovány externími faktory (např. přítomností solí nebo polyaminů v prostředí, glykosylací), ale u většiny termostabilních proteinů je stabilita dána primární sekvencí aminokyselin [62].

Z fyzikálně chemického hlediska charakterizuje termostabilitu volná energie stabilizace ( $\Delta G_{\text{stab}}$ ). Porovnáním hodnot pro termofilní proteiny a jejich mezofilní partnery bylo zjištěno, že rozdíly nejsou velké, pohybují se v rozmezí 5–20 kcal·mol<sup>-1</sup> při 25°C. Nárůst  $\Delta G_{\text{stab}}$  o 3,0 - 6,5 kcal·mol<sup>-1</sup> může znamenat zvýšení termostability o 12°C [63] a přítomnost několika málo hydrofobních interakcí navíc zvýší  $\Delta G_{\text{stab}}$  o 5-7 kcal·mol<sup>-1</sup>, velmi malé změny interakcí tedy vedou k velkým změnám v termostabilitě [1].

Zdá se, že termostabilita je zajištěna kombinací více malých strukturních modifikací: výměnou některých aminokyselin za jiné a modulací interakcí (vodíkové můstky, iontové páry, hydrofobní interakce) [64]. Především studium pomocí cílené bodové mutagenese a porovnávání struktur a stability termofilních a mezofilních enzymů ukázalo některé důležité faktory přispívající k stabilitě termozymů [65], neexistuje však univerzální model zvýšení stability. Molekulární mechanismy jsou různé a každý termostabilní enzym je stabilizován unikátní kombinací rozdílných mechanismů [62].

## 2.2.1 Stabilizující mechanizmy

Faktory přispívající ke stabilitě zahrnují intramolekulární interakce (vodíkové můstky, elektrostatické interakce, hydrofobní interakce, disulfidové můstky, vazbu kovů) a celkové správné sbalení (př. větší rigiditu, kompaktnost sbalení, uvolnění konformačního napětí, stabilitu  $\alpha$ -helixů, snížení entropie rozbalení).

Nejprve se zaměříme na intermolekulární interakce.

- Příspěvek **vodíkových můstků** ke stabilizaci proteinů je znám již delší dobu. Vodíkové můstky jsou vytvářeny nejen uvnitř a mezi polypeptidovými řetězci, ale také s obklopujícím médiem. Termostabilita koreluje s počtem vytvořených vodíkových můstků [66] a jejich příspěvek ke stabilizaci je dokonce vyšší než příspěvek iontových interakcí [67].
- **Elektrostatické síly** můžeme rozdělit do tří skupin na nabitě-nabitě, nabitě-dipol, dipol-dipol. Z hlediska termostability je nejdůležitější první skupina interakcí mezi opačně nabitými ak zbytky (solné můstky). Množství Glu, Lys a Arg je vyšší v termofilních proteinech, větší počet nabitých ak zbytků ukazuje, že u termofilních proteinů je více solných můstků než u ekvivalentních mezofilních proteinů [2]. Dále bylo zjištěno, že termozymy mají vyšší poměr Arg:Lys než mezofilní enzymy [68]. Delší postranní řetězec Arg nabízí větší možnosti tvorby iontových interakcí než Lys [69].
- **Hydrofobní interakce** jsou velmi důležitým stabilizujícím prvkem [70]. Existuje přímý vztah mezi celkovou hydrofobicitou proteinu a jeho termostabilitou. Průměrný nárůst stability o  $1,3 \pm 0,5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  získá protein s každou methylovou skupinou, která je ukryta uvnitř molekuly v průběhu sbalování [71].
- Příspěvek **disulfidových můstků** se projevuje snížením entropie rozbaleného stavu [72].
- Další možností stabilizace proteinů je **vazba kovů**, které jsou již dlouho známými stabilizátory a aktivátory řady proteinů [73].

Neméně důležitým prvkem stabilizace proteinů je dobrá konformační struktura.

- Termozymy jsou obecně více **rigidní** při mezofilních teplotách, což je esenciální pro zajištění katalytické aktivity v požadované teplotě. Vyšší rigidita má za následek nižší citlivost k proteolytické degradaci a chemické a tepelné denaturaci [74; 75]. Celková rigidita je zvýšená stabilizací  $\alpha$ -helixů, optimalizací elektrostatických

interakcí, redukcí konformačního napětí atd. [2]. Adaptace proteinu na vysoké teploty je výsledkem kompromisu mezi zvýšenou rigiditou a flexibilitou molekuly, která je nutná pro plnění fyziologických funkcí enzymu [64; 76].

- Základním znakem termozymů je **vyšší účinnost uspořádání molekuly**. Kompaktnost může být zajištěna zmenšením smyček, zvýšením počtu hydrofobních atomů zanořených v molekule, optimalizací sbalení postranních řetězců zanořených aminokyselin, eliminací fyziologicky nedůležitých dutin [77]. Hypertermofilní enzymy vykazují výrazně nižší hydrofobní povrch přístupný rozpouštědлу než ekvivalentní mezofilní protějšky [78].
- **Redukce entropie rozbalení** proteinů může být dosažena zkrácením smyček, ukotvením volných konců, vložením disulfidových můstků, ukotvením N- a C-konců molekuly [1].
- **Stabilizace  $\alpha$ -helixů** je zajišťována přítomností zbytků s vysokou schopností tvořit  $\alpha$ -helixy (např. Ala) a případnou substitucí ak zbytků, které  $\alpha$ -helixy destabilizují, mezi něž patří  $\beta$ -větvené zbytky (Val, Ile, Thr) [79].

Dalším stabilizujícím prvkem je vyšší rezistence termofilních proteinů ke kovalentní modifikaci a následné denaturaci [80], která je obecně způsobena tepelně indukovanými kovalentními modifikacemi některých ak zbytků (např. destrukcí Cys, deaminací Asn a Gln, oxidací Cys a hydrolýzou peptidových vazeb). U termozymů je počet takto citlivých ak zbytků nižší [62].

Stabilizace molekuly zahrnuje všechny úrovně hierarchie proteinové struktury od lokálního uspořádání polypeptidového řetězce, sekundárních a supersekundárních strukturních elementů až po domény a podjednotky [76].

### 2.2.2 Zkoumání termostability

Cílem většiny studií je zvýšení termostability při zachování funkce proteinu [76], proto je stabilita měřena jako aktivita proteinů za různých teplot.

Existuje několik experimentálních přístupů ke zkoumání principů termostability jednotlivých proteinů.

Jedním z nich je bodová mutagenese a testování vlivu substitucí jednotlivých aminokyselin. Zde existují dva odlišné postupy. Prvním je cílená mutagenese, kdy je na

základě porovnání trojrozměrných struktur a aminokyselinových sekvencí určena aminokyselina, která by případně mohla přispívat k termostabilitě.

Druhou možností je umělá evoluce termostabilních proteinů, kdy pomocí určitých technik (např. error-prone PCR, DNA shuffling [81]) vznikají proteiny s více náhodnými mutacemi (pro přehled [1])

Dalším přístupem je vytváření chimerních proteinů, které obsahují určité úseky z mezofilního partnera zkoumaného proteinu. Modifikací je konstrukce zkrácených forem proteinu, které si zachovávají některé funkční aktivity proteinu.

Velmi významné je porovnání 3D struktur mezofilních a termofilních proteinů, které umožňují navrhnout vhodné experimentální přístupy.

## **2.3 Termostabilita EF-Tu**

Termostabilita EF-Tu je předmětem zkoumání už několik let. V této kapitole se budeme věnovat genetickým manipulacím tohoto proteinu, se zaměřením na jeho termostabilitu. Pokud v textu není uvedeno jinak, byla termostabilita zkoumána schopností proteinu vázat GDP nebo GTP za stoupající teploty a teplota charakterizující jeho stabilitu označuje teplotu, kdy měl protein 50% aktivitu ( $\theta_{1/2}$ ).

EF-Tu byl analyzován u několika bakteriálních druhů. Především u *E. coli* [82; 83], tato bakterie je zástupcem mezofilních organizmů. U *E. coli* byly také velice podrobně určeny vlastnosti samotné G-domény EF-Tu. Dále byl analyzován EF-Tu z termofilních bakterií *T. thermophilus* [84; 85] a *B. stearothermophilus* [86; 87] a hypertermofilní bakterie *Thermotoga maritima* [88]. Také byl analyzován EF-1 $\alpha$  z hypertermofilního organismu *Sulfolobus solfataricus*, který patří mezi archea [89; 90].

### **2.3.1 Funkce a stabilita zkrácených forem EF-Tu**

Podíl domén na jednotlivých funkcích byl zkoumán vytvořením zkrácených forem EF-Tu [83; 84; 89].

U *E. coli* byly vytvořeny tyto konstrukty – samotná G-doména, EF-Tu bez domény 3 (EF-Tu $\Delta$ 3) a EF-Tu bez domény 2 (EF-Tu $\Delta$ 2) [83; 91].

G-doména je zodpovědná za vazbu guaninových nukleotidů a vlastní GTPázovou aktivitu. Bylo ověřeno, že samotná G-doména z *E. coli* je schopna slabě vázat GDP i GTP a zachovává si GTPázovou aktivitu [86; 87; 91; 92]. Disociační konstanty pro komplexy

G-domény s GDP i GTP jsou si velmi podobné [91], což je výrazně odlišný výsledek od situace u celého EF-Tu, kde se tyto hodnoty liší asi o 2 řády (při 30°C). Afinita G-domény k GDP je asi 100x nižší než celého EF-Tu, zatímco afinita ke GTP je snížena jen asi 4-6x [93].

Studium GTPázové aktivity prokázalo, že i u G-domény je tato stimulována přítomností monovalentních kationtů, především K<sup>+</sup> [93].

Samotná G-doména z *E. coli* je v GDP vazbě výrazně méně termostabilní než celé EF-Tu. G-doména ztrácí 50% své aktivity při teplotě 25,8°C, zatímco EF-Tu při 49,1°C [86].

Také další, již zmíněné, zkrácené formy byly schopné vázat GDP i GTP s podobnou afinitou jako G-doména. Zachovávají si i GTPázovou aktivitu srovnatelnou s EF-Tu, jen u EF-Tu $\Delta$ 3 mírně poklesla. Termostabilita těchto forem, testovaná vazbou GDP při vzrůstající teplotě, je však odlišná. EF-Tu $\Delta$ 2 má srovnatelnou stabilitu jako EF-Tu, zatímco EF-Tu $\Delta$ 3 má termostabilitu podobnou G-doméně. Doména 3 z *E. coli* má tedy výrazně stabilizující efekt na rozdíl od domény 2 [83].

Také u *T. thermophilus* byla zkoumána termostabilita zkrácených forem. Vytvořeny byly následující konstrukty: G-doména, EF-Tu $\Delta$ 3 a EF-Tu $\Delta$ <sup>10</sup> (EF-Tu, ze kterého bylo odstraněno 10 ak zbytků představujících tzv. termofilní klíčku). Termostabilita byla zkoumána vazbou GDP při vzrůstající teplotě. V porovnání s EF-Tu z *E. coli*, který má  $\theta_{1/2}$  ve 49°C, EF-Tu z *T. thermophilus* má  $\theta_{1/2}$  okolo 80°C. Odstranění tzv. termofilní klíčky způsobilo pokles termostability o 20°C, nikoliv však až na úroveň EF-Tu *E. coli* [84]. Termofilní klíčka má tedy určitý stabilizující efekt v rámci celé molekuly.

Stabilita G-domény *T. thermophilus* je výrazně nižší,  $\theta_{1/2}$  se pohybuje okolo 40°C [84]. Konstrukt EF-Tu $\Delta$ 3 je výrazně méně stabilní než EF-Tu *T. thermophilus*, ale o něco stabilnější než G-doména *T. thermophilus*. Doména 2 tedy přispívá určitým způsobem ke stabilitě, přestože se jedná o GDP formu proteinu, kdy podle krystalického modelu nejsou mezi G-doménou a doménou 2 nekovalentní interakce. V případě, že je odstraněna doména 3, doména 2 interaguje s G-doménou [84], na rozdíl od pozorování u *E. coli*.

Metodou teplotně závislé precipitace byla zkoumána termostabilita konstruktů, který obsahoval pouze domény 2 a 3 z EF-Tu z *T. thermophilus*. Tento protein má překvapivě srovnatelnou stabilitu s celým EF-Tu, což souhlasí s představou i předchozími nálezy (popsáno viz. 2.3.2) [86; 87], že domény 2 a 3 mají v proteinu EF-Tu stabilizující účinek [94].



Další pokusy byly provedeny na hypertermofilních proteinech z *T. maritima* a *S. solfataricus*. G-doména z *T. maritima* je podle  $\theta_{1/2}$  přibližně o 10°C méně stabilní než celý protein [88]. Tento pokles avšak není tak výrazný jako u *T. thermophilus* (platí i pro *S. solfataricus*). Zdá se, že G-doména těchto organismů obsahuje stabilizující prvky, které se nevyskytují u *T. thermophilus*.

### 2.3.2 Chimerní proteiny EF-Tu

Z výše uvedených hypertermofilních proteinů byly připraveny chimerní formy, které obsahovaly úseky EF-Tu z *E. coli*. Proteiny byly aktivní v GDP vazbě. Chimerní protein, který obsahoval G-doménu z EF-1 $\alpha$  *S. solfataricus* a domény 2 a 3 z *E. coli*, byl výrazně stabilnější než EF-Tu *E. coli* (o 30°C v  $\theta_{1/2}$ ), ale méně termostabilní než EF-1 $\alpha$  (o 13°C) a také než samotná G-doména z *S. solfataricus* (o 3°C). Došlo k záměně poloviny molekuly, mohli bychom tedy očekávat ještě větší pokles. Vysvětlením by mohl být fakt, že úsek proteinu z *E. coli* nezpůsobuje podstatné snížení průměrné hydrofobicity celé molekuly [90]. Nebyl však pozorován stabilizující efekt domén 2 a 3, protože chimerní protein je méně termostabilní než samotná G-doména.

Dále byly charakterizovány dva chimerní proteiny odvozené z EF-Tu a G-domény *T. maritima*, u kterých bylo vyměněno 90 N-koncových ak zbytků odpovídajícím úsekem z *E. coli*. Oba proteiny vykazovaly výrazně nižší termostabilitu a bylo navrženo, že termostabilita z *T. maritima* je závislá na unikátních interakcích N-koncového úseku s ostatními oblastmi v terciální struktuře proteinu [88].

Chimerní proteiny byly také vytvořeny pro EF-Tu z termofilního organismu *B. stearothermophilus*, kde bylo vytvořeno všech 6 možných variací domén z *B. stearothermophilus* a *E. coli*. Bylo zjištěno, že v GDP formě je samotná G-doména z *B. stearothermophilus* přibližně o 20°C stabilnější než G-doména z *E. coli* a o 18°C méně stabilní než celé EF-Tu z *B. stearothermophilus*. V případě, kdy byly ke G-doméně z *E. coli* přidány obě zbývající domény z *B. stearothermophilus*, byl pozorován mírný nárůst stability GDP (o 2°C) i GTP formy (o 10°C) vzhledem ke stabilitě EF-Tu z *E. coli*. Tento posun nebyl pozorován, pokud byla v proteinu EF-Tu z *E. coli* zaměněna jen jedna nekatalytická doména [86]. Domény 2+3 zvyšují termostabilitu obou G-domén přibližně o 20°C na úroveň teplotního růstového optima obou organismů. Doména 3 má větší stabilizující efekt než doména 2.

Hlavní rozdíl v termostabilitě celých EF-Tu z těchto organismů je tedy primárně určen rozdílem v termostabilitě G-domén. Čím je rozdílná termostabilita G-domén podmíněna? Rozhodující se zdají být především dva faktory. G-doména z *B. stearothermophilus* má přibližně o 4 % menší nepolární povrch přístupný rozpouštědlu a jádro G-domény je tudíž kompaktněji sbaleno. Dále se G-domény liší poměrem počtu nabitých a nenabitých polárních ak zbytků (CvP). Analýza hodnot CvP proteinů mnoha bakterií ukázala její spojitý nárůst od psychofilů po hypertermofily [95]. Ten je v případě G-domény z *B. stearothermophilus* výrazně vyšší (14/6) než v případě G-domény z *E. coli* (8/11). Ze srovnání těchto poměrů je zřejmé, že G-doména z *B. stearothermophilus* má více možností tvorby solných můstků, které tak mohou významně zvýšit stabilitu proteinu ve srovnání G-doménou z *E. coli* [86].

Výsledná termostabilita proteinu EF-Tu z *E. coli* a *B. stearothermophilus* je pak dána kooperativní interakcí všech tří domén. Molekulární mechanismus stabilizujícího účinku domén 2 + 3 na funkci G-domény je dán stabilizujícím účinkem nekatalytických domén na  $\alpha$ -helikální úseky G-domény. Jak vyplynulo z měření pomocí CD spektroskopie, v přítomnosti domén 2 + 3 dochází k denaturaci  $\alpha$ -helikálních úseků G-domény až při teplotě přibližně o 20°C vyšší než u samotné G-domény [86].

### 2.3.3 Mutageneze u EF-Tu

Bodové mutace byly vždy v popředí zájmu studia proteinů. EF-Tu není výjimkou. Většina prací je však zaměřena na funkční analýzu mutačních následků, nikoliv na teplotní stabilitu.

Z hlediska termostability byl např. charakterizován v EF-Tu z *E. coli*, u kterého byl Cys v poloze 81 nahrazen glycinem (C81G). Tento Cys je druhým ak zbytkem konzervované sekvence DxxG a i tento ak zbytek je obvykle konzervovaný v bakteriálních EF-Tu. Záměna C81G snížila termostabilitu proteinu rozdílně, a to v závislosti na jeho konformaci. Termostabilita GDP formy poklesla mutací více (asi o 10°C) než termostabilita GTP formy (asi 4°C), čímž se úplně ztratil rozdíl v termostabilitě mezi oběma formami EF-Tu, který je pro EF-Tu z *E. coli* typický [82]. To bylo zajímavé zjištění, které ukazuje, že Cys 81, vedle svých dalších úloh, specificky přispívá ke schopnosti EF-Tu z *E. coli* rozlišovat mezi GDP a GTP. Tato úvaha byla podpořena zjištěním, že mutace C81G vede rovněž ke snížení rozdílu v afinitách EF-Tu pro GDP a GTP, a skutečností, že EF-1 $\alpha$ , eukaryotický analog EF-Tu, který má na místě Cys 81

přirozeně Ala, má stejnou afinitu pro GDP i GTP a také tepelná stabilita jeho forem je stejná.

Jiná záměna H118G u EF-Tu u *E. coli* měla odlišné účinky. Zde došlo k stejnému poklesu termostability v obou formách faktoru o 6,5°C. Mutace byla zároveň spojena se ztrátou schopnosti EF-Tu tvořit pevný komplex s EF-Ts [50].

Zkoumání mutací Q114E a E117Q u samotné G-domény ukázalo, že GDP forma proteinu s mutací Q114E měla stejnou stabilitu jako nemutovaná G-doména, zatímco termostabilita G-domény s mutací v poloze 117 byla snížena přibližně o 5°C. Zdá se, že kyslík v karboxylové skupině  $\delta$  uhlíku v Glu 117 přispívá svými interakcemi ke stabilitě proteinu a je tedy důležitý pro kontrolu konformace [96].

Tyto výsledky naznačují, že i jediná mutace může velmi výrazně ovlivnit stabilitu proteinu. Všechny tyto pokusy však byly prováděny ve značně konzervovaných oblastech molekuly a destabilizace tudíž není ničím překvapivým. Naopak záměny H95L a H95G u EF-Tu z *T. thermophilus* nijak neovlivnily stabilitu proteinu [85].

### 3 Cíle

- Porovnat modely proteinů EF-Tu z *E. coli* a *B. stearothermophilus*, navrhnout aminokyseliny vhodné k záměně.
- Pomocí mutagenní PCR vnést do genů vložených do expresního plazmidu zvolené mutace a sekvenci těchto genů ověřit sekvenováním.
- Z připravených konstruktů exprimovat a poté izolovat proteiny pomocí afinitní chromatografie.
- Zjistit vliv bodových mutací v polohách 14, 46 a 65 na termostabilitu a aktivitu EF-Tu.

## 4 Přístroje, materiál a metody

### 4.1 Přístroje

#### Centrifugy

Beckman Model J2–21M – chlazená centrifuga s možností výměny úhlových rotorů

– rotor JA 14 – na 6 kyvet o objemu 250 ml s maximálním odstředivým zrychlením 30 100x g

– rotor JA 20 – na osm kyvet o objemu 50 ml s maximální odstředivým zrychlením 48 400x g

Heraeus Cryofuge 8000 – tato chlazená centrifuga má výkyvné rotory a maximální odstředivé zrychlení 8 000x g pro objem až 6 l

Heraeus Christ Biofuge A – mikrocentrifuga na 24 mikrozkušavek bez možnosti chlazení s maximálním odstředivým zrychlením 15 000x g

Universal 16 R – chlazená mikrocentrifuga s maximálním odstředivým zrychlením 20 000x g

Qualitron, INC. – stolní centrifuga na krátké stáčení roztoku v mikrozkušavce  
stolní centrifuga na skleněné zkumavky

#### Elektroforézy

OWL - pro horizontální agarózovou elektroforézu – velikost gelu – 13 x 11,5 cm  
7 x 8 cm

Agarózová elektroforéza – velikost gelu – 6,5 x 7,5 cm

Mini-Protean II a III (Bio-Rad) – pro vertikální elektroforézu proteinů – velikost gelů 9,5 – 7,5 cm

Elektroforetické zdroje – BIO-RAD Model 500/200

BIO-RAD PAC 3000

LKB BROMMA 2197

#### Inkubátory a třepačky

Eppendorf Termostat 5320 – používán pro inkubaci roztoků s restričními endonukleázami

Thermo 120 – termoblok s možností nastavení teploty

Biological Termostat BT 120 – používán pro inkubace buněk na pevné půdě

Incubator Shaker Model G 25, New Brunswick Scientific (USA) – používán pro inkubace kultur v tekutých médiích

Elpan Water Bath Shaker type 357

Rotační třepačka RT60

**Spektrofotometr - Shimadzu UV - 1601**

**Cyclery - PTC – 100, PTC – 200 MJ Research**

## **4.2 Materiál**

### **4.2.1 Používané chemikálie, enzymy a další preparáty**

Při práci byly používány chemikálie určené pro biochemii a molekulární biologii nejvyšší dostupné čistoty.

2-mercaptoethanol (Serva, USA)

Agar pro pevné půdy (Lachema, ČR)

Agaróza pro molekulární biologii (Amresco, USA; Lachema, ČR)

Aqua pro injectione biotika (Biotika, SR)

Akrylamid (Serva, USA)

Aktivní uhlí (Merck, SRN)

Amoniumpersulfat (Serva, USA)

Ampicilin (Biotika, SR)

Bromphenole blue (Serva, USA)

Coomassie brilliant blue G-250 (Serva, USA)

Coomassie brilliant blue R-250 (Serva, USA; LKB, Švédsko)

EDTA (chelaton III, Lachema, ČR)

Faktor Xa (Amersham Biosciences, Anglie)

Fosfoenolpyruvát (Sigma; SRN)

Fosfoenolpyruvát kináza (Calbiochem; USA)

GDP, sodná sůl (Serva, USA)

Glycin (Serva, USA)

GTP, sodná sůl (Serva, USA)

[<sup>3</sup>H] GDP, specifická aktivita 11,5 Ci/mmol (Amersham, Anglie)

[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] GTP, specifická aktivita 10 Ci/mmol (Izotop, Maďarsko)

Kapalný scintilátor – Rothiszint (Carl Roth, SRN)

Lysozym – (Serva, USA)

N, N, N', N' - Bis(dimethylamino)ethan (TEMED) (LKB, Švédsko)

N, N' - methylenbisakrylamid (Serva, USA)

Nitrocelulózové filtry Millipore, typ 0,45  $\mu$ m, White HAWP, 25 mm (Milipore, USA)

Restrikční endonukleázy – *BamH I*, *BsiW I*, *Dpn I*, *EcoR I*, *Hind III*, *Hpa II*, *Nde I* (od firem – Amersham, Anglie; New England Biolabs, USA; Promega, USA; TaKaRa, Japonsko; Roche, Německo)

RNAseA (Serva; USA)

SDS (Serva, USA)

Shrimp alkaline phosphatase (SAP) (Promega, USA)

T4 DNA ligáza (TaKaRa, Japonsko)

Tris (Serva, USA)

Tryptone (Oxoid, Velká Británie)

Xylene cyanol (LKB, Švédsko)

Yeast extract (Oxoid, Anglie)

#### 4.2.2 Používané roztoky a pufrы

V této kapitole jsou uvedeny roztoky a pufrы používané obecně u více metod. Ostatní jsou uvedeny u jednotlivých postupů.

*Ampicilin* – 50mg/ml

*TE, pH 8,0* – 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0

*Ethanol pro UV spektrofotometrii* – 96 %

*Ethanol pro UV spektrofotometrii* – 70 %

*dH<sub>2</sub>O* – deionizovaná voda

*iH<sub>2</sub>O* – injekční voda (Agua pro injectione Biotika – sterilní voda bez nukleáz používaná pro práci s DNA a proteiny)

*TK H<sub>2</sub>O* – voda pro tkáňové kultury

#### 4.2.3 Používané bakteriální kmeny

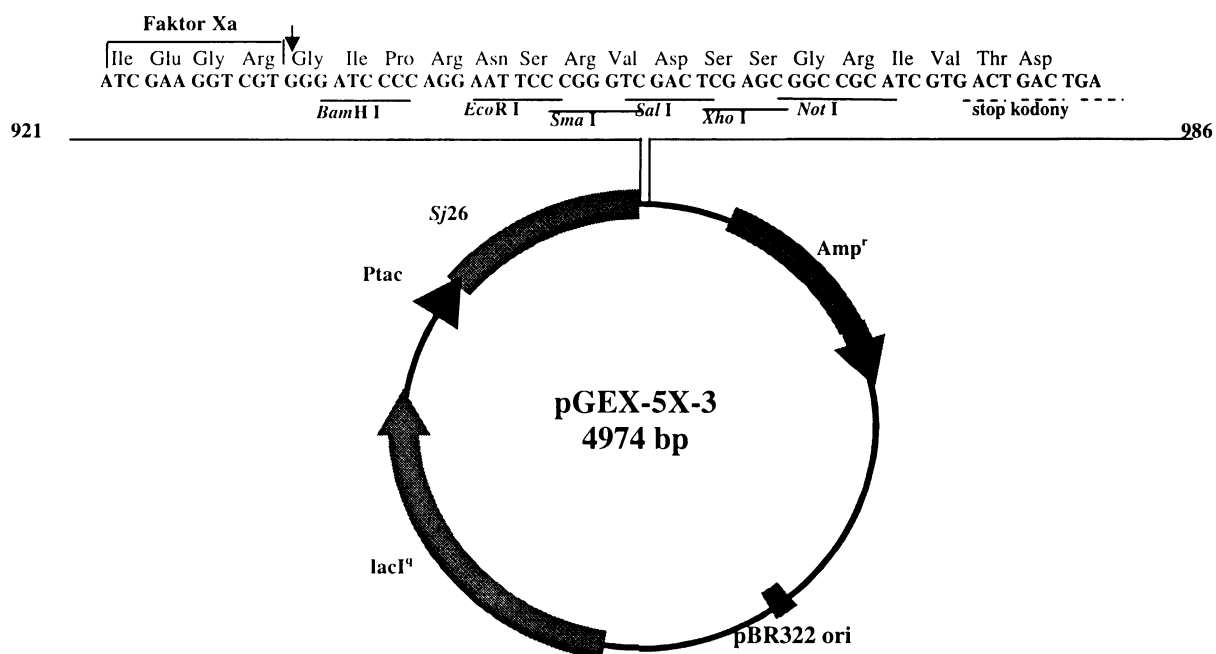
*Bacillus stearothermophilus* CCM 2184

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  – *supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\Phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1* – tento kmen byl používán pro transformace ligačních směsí a izolace plazmidových DNA

*Escherichia coli* BL21 – F- r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>- - tento kmen byl používán k izolaci proteinů exprimovaných z plazmidů

## 4.2.4 Používané vektory

Jako expresní vektor byl použit pGEX-5X-3 zakoupený od firmy Amersham Pharmacia Biotech (obr. 4.1). Vektor obsahuje bakteriální počátek replikace *ori* pro expresi vektoru v *E. coli*, markerový selekční gen pro rezistenci k ampicilinu, gen pro Glutathione S-transferázu (*Sj26*), před kterým je vložen tac promotor (*Ptac*), jehož aktivita je reprimovaná přítomností glukózy v prostředí a který je aktivován přítomností isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosidu (dále jen IPTG). Gen *Sj26* je zaklonován bez stop kodonu. Za tímto genem je proteázové místo pro štěpení faktorem Xa. Dále následuje „polylinker“ pro vložení určitého genu a za ním tři stop kodony, každý v jiném čtecím rámci.



Obr. 4.1 Expresní vektor – plazmid pGEX-5X-3; vektor obsahuje bakteriální počátek replikace *ori*, markerový selekční gen pro rezistenci k ampicilinu, gen pro Glutathione S-transferázu (*Sj26*), před kterým je vložen tac promotor (*Ptac*), v horní části obrázku je znázorněn „polylinker“ a proteázové místo pro štěpení faktorem Xa.



## 4.3 Metody

### 4.3.1 Kultivace bakteriálních buněk

#### 4.3.1.1 Kultivace buněk v tekutém médiu

Buňky *Escherichia coli* byly kultivovány ve dvou různých médiích:

1) **RMK médium**:

- 3 ml 1M KCl; 6 g Bacto Tryptone; 1,5 g Bacto Yeast Extract; 280 ml dH<sub>2</sub>O.

- pH bylo upraveno pomocí NaOH na 7,6; poté bylo médium sterilizováno.

2) **LB médium** (Luria – Bertani medium) [97]:

- 10 g Bacto Tryptone; 5 g Bacto Yeast Extract; 10 g NaCl; 980 ml dH<sub>2</sub>O

- pH bylo upraveno pomocí NaOH na 7,1 – 7,5; poté bylo médium sterilizováno.

Kultivace byla prováděna v Erlenmeyerových baňkách o vhodném objemu se zátkou z buničité vaty a gázy. Objem baňky byl zvolen tak, aby objem kultury představoval maximálně 1/3 objemu baňky. Kultury bakterií pro minipreparaci (2 ml) byly kultivovány v umělohmotných kónických zkumavkách o celkovém objemu 10 ml, které byly před dalším použitím důkladně umyty, opláchnuty kyselinou chlorovodíkovou (0,5%), usušeny a sterilovány UV zářením. Kultivace obvykle probíhala ve třepačce Brunswick.

#### 4.3.1.2 Kultivace buněk na pevné půdě

Pro růst buněk *Escherichia coli* na pevné půdě byla použita LB agarová půda složená z LB média, agaru (o výsledné koncentraci 1,5 %) a ampicilinu (100 µg/ml) (ampicilin byl přidáván do mírně ochlazeného média s teplotou nižší než 60°C). Agarová půda byla nalita do Petriho misek a nechána utuhnout. Misky byly uloženy ve 4°C maximálně 1 měsíc. Misky s vyšetými buňkami byly inkubovány v termostatu při 37°C, obvykle přes noc.

#### 4.3.1.3 Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli*

Kompetentní buňky byly ze všech používaných kmenů připravovány podle stejného protokolu [98].

### **Použité roztoky:**

*puf* **TFB I** – 100 mM RbCl; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 30 mM octan draselný; 9,3 mM CaCl<sub>2</sub>; 15 % glycerol; pH 5,8

*puf* **TFB II** – 10 mM MOPS, pH 7,0; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 15 % glycerol

*Oba pufry byly sterilovány filtrací přes filtry Millex od firmy Millipore s velikostí pórů 0,22 μm.*

### **Vlastní postup:**

- Z 300 ml RMK média bylo odebráno 20 ml do sterilní Erlenmeyerovy baňky o objemu 100 ml. Toto médium bylo inokulováno 10 μl noční kultury. Zbylých 280 ml RMK média bylo uloženo do 4°C.
- 20 ml kultura byla inkubována ve 37°C dokud nedosáhla  $A_{550} = 0,2 - 0,3$ .
- Předehřátých 280 ml média bylo inokulováno 12 ml narostlé kultury a dále inkubováno ve 37°C do  $A_{550} = 0,48 - 0,52$ .
- Kultura byla ochlazená na 4°C a centrifugována 10 minut při 4°C a 3 800x g. Supernatant byl odstraněn.
- Sediment byl resuspendován v 75 ml pufu TFB I (předchlazeném ve 4°C) a centrifugován jako v předchozím bodě. Supernatant byl odstraněn.
- Sediment byl resuspendován ve 20 ml předchlazeného pufu TFB II.
- Suspenze byla rozpipetována do předchlazených zkumavek (-20°C) (k tomu byly použity předchlazené špičky (-20°C)).
- zkumavky byly dány na 1 hodinu do -20°C a poté byly na suchém ledu přeneseny do -80°C.

#### **4.3.1.4 Příprava glycerolových konzerv [97]**

Jednou kolonií byly inokulovány 2 ml RMK/LB média a inkubovány přes noc ve 37°C. 850 μl noční kultury bylo přidáno k 150 μl sterilního glycerolu, dobře promícháno na vortexu a uloženo v -70 °C. Takto připravená kultura zůstává aktivní i několik let.

### **4.3.2 Metody práce s DNA**

#### **4.3.2.1 Izolace plazmidové DNA z G- bakterie *Escherichia coli***

Izolace plazmidové DNA byla prováděna třemi metodami. Byly to minipreparace (2 odlišné postupy) a midipreparace. Všechny jsou založeny na stejném principu, kterým je alkalická lyze bakterií pomocí SDS a NaOH a následná neutralizace roztokem octanu

draselného a kyseliny octové. Dochází k srážení proteinů a chromozomální DNA, zatímco plazmidová DNA zůstává po centrifugaci sraženiny v supernatantu.

### **MINIPREPARACE - *Escherichia coli* DH5a [97]**

#### **Použité roztoky:**

**Sol. I** - 50 mM glukosa; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0

**Sol. II** - 0,2 N NaOH; 1 % SDS

**Sol. III** - 60 ml 5M octanu draselného; 11,5 ml kys. octové; 28,5 ml dH<sub>2</sub>O

**RNasa A** - 10 mg/ml - RNasa byla rozpuštěna v pufru (10mM Tris, pH 7,5, 15 mM NaCl), 15 minut byla inkubována v 100 °C, pomalu ochlazená a uchovávána v malých alikvotech v -20 °C

**Vzorkový pufr pro DNA** - 2,5 mg/ml bromfenolová modř; 2,5 mg/ml xylen cyanol; 30 % glycerol; 6 mM EDTA

#### **Vlastní postup:**

- Jednou kolonií byly inokulovány 2 ml RMK média s příslušným antibiotikem a inkubovány přes noc při 37°C.
- Sterilně byl přepipetován 1 ml kultury do mikrozkuřavky a centrifugován v mikrocentrifuze při 12 500x g, 3 minuty a supernatant byl odstraněn.
- Sediment byl resuspendován ve 100 µl Sol. I.
- Bylo přidáno 200 µl Sol. II, směs byla promíchána převrácením mikrozkuřavky (5 – 6x) a inkubována 2 minuty na ledu.
- Lyze byla zastavena přidáním 150 µl Sol. III, směs byla opět několikrát rychle promíchána a inkubována 1 minutu na ledu. Sraženina byla centrifugována 5 minut při 12 500x g.
- Supernatant byl přepipetován do nových mikrozkuřavek a byly přidány 2 objemy 96 % ethanolu (nechlazeného). Mikrozkuřavky byly promíchány a inkubovány 2 minuty při pokojové teplotě.
- Následovala centrifugace při 12 500x g, 5 minut. Supernatant byl odstraněn a pelet byl opláchnut 100 µl 70 % ethanolu (chlazený v -20°C), usušen a rozpuštěn v 50 µl TE pufru, pH 8,0.
- Roztok obsahující plazmidovou DNA byl inkubován 10 minut v 65°C.
- Plazmidová DNA byla ověřena restriční štěpením.
- Před nanášením na elektroforézu byla ke každému vzorku přidána RNasaA na výslednou koncentraci 0,005 mg/ml a 1/20 objemu vzorkového pufru pro DNA.

Při minipreparaci plazmidové DNA z kmene BL21, který obsahuje endonukleázuA byl protokol modifikován. Objem odebrané noční kultury byl 1,5x zvětšen a tomu odpovídalo i zvýšení objemů Sol. (150 µl), Sol. II (300 µl) a Sol. II (225 µ). Supernatant odpipetovaný po neutralizaci byl purifikován fenolem, chloroformem s izoamylalkoholem (4.3.2.2). Po tomto kroku následovala precipitace ethanolem v prostředí octanu sodného (4.3.2.3). Dále bylo postupováno dle uvedeného protokolu.

### **MINIPREPARACE pomocí soupravy „Qia prep Spin Miniprep Kit“ - *Escherichia coli* DH5a**

Touto metodou lze získat plazmidovou DNA v dostatečné kvalitě a kvantitě pro další pokusy (např. sekvenování, transformace buněk atd.). Používána byla souprava od firmy Qiagen („QIA prep Spin Miniprep Kit“). Metoda je založena na alkalické lyzi bakteriálních buněk následované adsorpcí DNA na silikonovou membránu v prostředí chaotropních solí.

#### **Použité roztoky a materiál:**

***Roztoky dodávané v soupravě: pufr P1 (s RNAsou A), pufrP2, pufr N3, pufr PB, pufr PE  
Kolonky dodávané v soupravě obsahující silikonovou membránu***

#### **Vlastní postup:**

- Jednou kolonií bylo inokulováno 7,5 ml LB média s příslušným antibiotikem a inkubováno přes noc při 37°C.
- Noční kultura byla centrifugována 10 minut při 7 700x g a 4°C. Supernatant byl dokonale odstraněn.
- Sediment byl resuspendován v 250 µl pufru P1 (s RNAsou). Roztok byl přepipetován do mikrozkušavky.
- Poté bylo přidáno 250 µl pufru P2 a roztok byl jemně převrácením mikrozkušavky promíchán (4 – 6x). Docházelo k lyzi bakterií.
- Bylo přidáno 350 µl pufru N3 a opět jemně obrácením promícháno. Lyze byla zastavena neutralizací.
- Sraženina byla centrifugována v mikrocentrifuze při 12 500x g, 30 minut a 4°C.
- Supernatant byl přepipetován na kolonku a centrifugován 1 minutu při 12 500x g a 4°C. Supernatant byl opětovně napipetován na kolonku a stejným způsobem centrifugován. Všechny následné centrifugace probíhaly za stejných podmínek

- Supernatant byl odstraněn a na kolonku bylo naneseno 0,5 ml pufru PB, proběhla centrifugace a pufr byl odstraněn.
- Na kolonku bylo naneseno 0,75 ml pufru PE a opět byl centrifugován. Pufr byl odstraněn a kolonka byla ještě jednou centrifugována (odstranění zbylého pufru PE).
- Kolonka byla přenesena do sterilní mikroskopické kumavky. Na membránu kolonky bylo naneseno 50 µl pufru EB.
- Po 5 minutách inkubace v pokojové teplotě byla kolonka centrifugována. Poté byla kolonka odstraněna a plazmidová DNA nacházející se v mikroskopické kumavce byla analyzována restrikčním štěpením a elektroforeticky.

### **MIDIPREPARACE – *Escherichia coli***

Touto metodou byla kvantitativně získávána plazmidová DNA o dostatečné čistotě pro další pokusy. Midipreparace byla prováděna pomocí soupravy Wizard *Plus* Midipreps DNA purification system od firmy Promega. Principem izolace plazmidové DNA při použití souprav je afinitní chromatografie, kdy je plazmidová DNA adsorbována na "Wizard <sup>TM</sup> Midipreps Purification Resin" resp. na částice na kolonce v prostředí chaotropních solí. Odtud je po promytí plazmidová DNA eluována.

#### **Wizard *Plus* Midipreps DNA purification system (Promega)**

##### **Použité roztoky a materiál:**

***Cell Resusp. Solution*** – 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNAsaA

***Cell Lysis Solution*** – 0,2 M NaOH; 1 % SDS

***Neutralisation Solution*** – 1,32 M Kac, pH 4,8

***Wizard <sup>TM</sup> Midipreps Purification Resin***

***Column Wash Solution*** – 80 mM octan draselný; 8,3 mM Tris - HCl, pH 7,5; 40 µM EDTA – do tohoto roztoku je nutné přidat množství ethanolu podle návodu

##### ***Kolonky***

##### **Vlastní postup:**

- Z glycerolové konzervy nebo jednou kolonií bylo inokulováno 100 ml LB média s vhodným antibiotikem a kultura byla inkubována přes noc při 37°C.
- Kultura byla centrifugována při 10 000x g, 10 minut, při teplotě 4°C. Supernatant byl poté dokonale odstraněn.
- Sediment byl resuspendován ve 3 ml Cell Resuspension Solution.

- Byly přidány 3 ml Cell Lysis Solution a roztoky byly jemně promíchány otáčením kyvety.
- Byly přidány 3 ml Neutralisation Solution a vše bylo opět jemně promícháno.
- Následovala centrifugace při 14 000x g, 10 minut, při 4 °C.
- Supernatant byl přelit do sterilní falkonky a bylo přidáno 10 ml dokonale rozmíchaného Wizard <sup>TM</sup>Midipreps Purification Resin, zavřením promícháno a ihned přeneseno na kolonku. Pufr byl odsát pomocí vývěvy.
- Kolonka byla dále promyta 30 ml Column Wash Solution a byla 30 sekund sušena při zapnuté vývěvě.
- Rezervoár kolonky byl vložen do sterilní mikrozkušavky bez víčka. Skalpelem byla odříznuta nepotřebná část kolonky. Zbytek kolonky (s resinem a adsorbovanou plazmidovou DNA) v mikrozkušavce byl centrifugován v mikrocentrifuze při 12 500x g, 2 minuty.
- Kolonka byla přenesena do nové sterilní mikrozkušavky. Na kolonku bylo nanášeno 300 µl injekční vody a inkubováno 1 minutu v pokojové teplotě (plazmidy nad 10 kbp je nutné inkubovat v 65-70°C, nad 20 kbp v 80°C).
- Kolonka v mikrozkušavce byla centrifugována při 12 500x g, 20 sekund. Kolonka byla odstraněna, mikrozkušavka zavřena utřeným víčkem a opět centrifugována při 12 500x g, 5 minut.
- Plazmidová DNA v supernatantu byla precipitována roztokem ethanolu a octanu sodného (viz 4.3.2.3). Pelet byl rozpuštěn v 50 µl injekční vody (pokud se při srážení vytvořilo vřeteno DNA), nebo ve 30 µl (pokud se nevytvořilo).
- Koncentrace plazmidové DNA byla měřena spektrofotometricky a plazmidová DNA byla analyzována restričním štěpením a elektroforeticky.

#### **4.3.2.2 Přečištění plazmidové DNA fenolem, chloroformem a izoamylalkoholem [99]**

##### **Použité roztoky:**

**Fenol** - ekvilibrovaný s 0,1 M Tris, pH 8-9; 0,1 % 8-hydroxychinolinem; 0,2 % 2-mercaptoethanolem

**Chloroform s izoamylalkoholem** – v poměru 24 : 1

### **Vlastní postup:**

- K roztoku, který obsahoval plazmidovou DNA byl připipetován fenol v poměru 1 : 1, směs byla 20 sekund vortexována, 3 minuty míchána převrácením kyvety a centrifugována 5 minut při 12 500x g. Do nové mikrozkušavky byla přepipetována vodná fáze.
- K vodné fázi byl připipetován fenol (50 µl fenolu/ 100 µl vodné fáze), směs byla 20 sekund vortexována. Pak bylo připipetováno stejné množství chloroformu s izoamylalkoholem. Opět následovalo 20 sekund vortexování, poté 3 minuty míchání převrácením zkumavek a centrifugace 5 minut při 12 500x g.
- K vodné fázi byl připipetován stejný objem směsi chloroformu s izoamylalkoholem, 20 sekund vortexováno, 3 minuty míchání a centrifugace 5 minut při 12 500x g.
- Plazmidová DNA ve vodné fázi byla precipitována ethanolem v prostředí octanu sodného (viz. 4.3.2.3).

### **4.3.2.3 Precipitace plazmidové DNA ethanolem v prostředí octanu sodného [97]**

#### **Použité roztoky:**

*3 M octan sodný, pH 5,2*

#### **Vlastní postup:**

- Roztok s plazmidovou DNA byl smíchán s 1/10 objemu 3 M octanu sodného, pH 5,2 a k takto vzniklému celkovému objemu byly přidány 2,2 objemy 96 % ethanolu (–20 °C) a vše bylo důkladně promícháno.
- Směs byla inkubována 20 - 30 minut v –70 °C nebo přes noc v –20 °C.
- Plazmidová DNA byla centrifugována 30 minut při 14 000x g, při 4°C.
- Sediment byl opláchnut vychlazeným 70 % ethanolem, usušen a rozpuštěn v TE pufru nebo v injekční vodě.

### **4.3.2.4 Izolace DNA z gelu**

Izolace DNA z gelu byla prováděna pomocí soupravy QIAquick Gel Extraction Kit od firmy Qiagen. Preparace je založena na afinitní chromatografii, kdy se DNA váže na silikonovou membránu v prostředí chaotropních solí.

### **Použité roztoky a materiál:**

*Roztoky dodávané v soupravě: pufr QG, pufr PE, pufr EB*

*Kolonky dodávané v soupravě obsahující silikonovou membránu*

### **Vlastní postup:**

- Sterilním skalpelem byl vyříznut fragment DNA z agarózového gelu, vložen do sterilní mikroskopické pipety a zvážen. Do jedné mikroskopické pipety je možné dát nejvýše 400 mg gelu.
- Do mikroskopické pipety byl přidán pufr QC (300 µl pufru / 100 mg gelu).
- Směs byla inkubována 10 minut při 50°C. V průběhu inkubace byla směs několikrát promíchána (cca 5x).
- Po inkubaci byl přidán isopropanol (100 µl isopropanolu / 100 mg gelu). Směs byla promíchána a přenesena na kolonku (max. 750 µl). Následovala centrifugace 1 minutu při 12 500x g. Všechny následující centrifugace byly prováděny stejným způsobem.
- Směs byla opět přenesena z rezervoáru na kolonku a opět centrifugována.
- Rezervoár byl vyprázdněn a na kolonku byl nanesen případný zbytek směsi a opět 2x centrifugován.
- Na kolonku bylo nanесeno 500 µl pufru QC a centrifugováno. Poté byl pufr odstraněn.
- Dále bylo nanесeno 750 µl pufru PE a centrifugováno. Po odstranění pufru byla kolonka ještě jednou centrifugována (odstranění zbytku pufru PE).
- Kolonka byla přenesena do sterilní mikroskopické pipety. Na membránu kolonky bylo nanесeno 30 µl pufru EB.
- Po 5 minutách inkubace v pokojové teplotě byla kolonka centrifugována. Poté byla kolonka odstraněna a DNA nacházející se v mikroskopické pipetě byla analyzována elektroforeticky.

### **4.3.2.5 Analýza plazmidové DNA restrikčním štěpením**

Nejprve byla namíchána restrikční směs o objemu 10 – 50 µl, která obsahovala plazmidovou DNA (obvykle 10 µl izolátu z minipreparace nebo 500 ng plazmidu izolovaného při midiprepu), restrikční endonukleázu (RE) v koncentraci 1–2 U/500ng DNA, restrikční pufr (1/10 celkového objemu; 10x koncentrovaný dodávaný s enzymy). V případě, že bylo štípano dvěma RE současně, byl použit takový pufr, ve kterém oba enzymy vykazovaly vysokou aktivitu. Pokud takový pufr nebyl nalezen, bylo štípano nejprve jedním enzymem, poté byl enzym tepelně inaktivován (viz dále), objem vzorku byl



zvětšen a dodán druhý enzym a vhodný pufr. Pokud nebylo možné enzymy tepelně inaktivovat, byla plazmidová DNA po prvním štěpení precipitována ethanolem a octanem sodným (4.3.2.3), rozpuštěna v iH<sub>2</sub>O, nebo v TE pufru a štěpena druhým enzymem.

Restrikční směs byla inkubována 1 hodinu v 37°C resp. v 25°C v závislosti na enzymu.

Po inkubaci byla reakce ukončena jedním ze dvou možných způsobů, dle dalšího použití restrikční směsi. Prvním z nich byla tepelná inaktivace inkubací restrikční směsi obvykle 10 minut v 65°C (nebo dle podmínek pro tepelnou inaktivaci daného enzymu uvedených výrobcem, ale nelze použít u všech enzymů). Druhým způsobem bylo přidání roztoku EDTA (chelaton III, sloučenina vázající hořčnaté ionty nezbytné pro aktivitu enzymu) na výslednou koncentraci 10 mM.

#### 4.3.2.6 Elektroforetická analýza DNA [97]

K analýze DNA byla použita horizontální elektroforéza v agarózovém gelu. Princip této metody je založen na skutečnosti, že se DNA v roztoku chová jako polyanion a v elektrickém poli putuje k anodě. Koncentrace agarózy byla zvolena podle velikosti analyzovaných fragmentů v rozmezí 0,8 – 2%. Pro přípravu agarózy a jako elektroforetický pufr byl používán 1x TAE. Pro kontrolu velikosti a pro odhad koncentrace byly používány dva hmotnostní markery – DNA z bakteriofáfa  $\lambda$  štěpená enzymy *Hind* III a *Eco*R I (velikosti fragmentů v rozmezí 21 226 – 564) a pUC18 štěpený enzymem *Hpa* II (velikosti fragmentů 501 – 26). Oba markery byly připravovány v naší laboratoři. Vzorky byly nanášeny v roztoku vzorkového pufru (2,5 mg/ml bromfenolová modř; 2,5 mg/ml xylen cyanol; 30 % glycerol; 6 mM EDTA). Bromfenolová modř a xylen cyanol slouží ke sledování průběhu elektroforézy (bromfenolová modř putuje na úrovni 250 bp a xylen cyanol 2500 bp) a EDTA k inaktivaci štěpící reakce. K vizualizaci fragmentů byl použit ethidium bromid. Po ukončení elektroforézy byl gel ponořen do elektroforetického pufru (1x TAE) obsahujícím ethidium bromid o výsledné koncentraci 0,5  $\mu$ g/ml.

#### **Použité roztoky a materiál:**

##### ***Agaróza***

**50x TAE, pH 8,0** – 2 M Tris-acetát; 50 mM EDTA, pH 8,0

**ethidium bromid** – 10mg/ml

**vzorkový pufr pro DNA** - 2,5 mg/ml bromfenolová modř; 2,5 mg/ml xylen cyanol; 30 % glycerol; 6 mM EDTA

### **Příprava elektroforézy:**

- Nejprve byla sestavena elektroforéza.
- Dále bylo připraveno požadované množství pufru 1x TAE.
- Požadované množství agarózy (hmotnostní jednotky odpovídají objemovým) bylo v mikrovlnné troubě rozvařeno v 1x TAE.
- Agaróza byla poté ochlazená pod tekoucí vodou na teplotu asi 50°C, byla rychle nalita do elektroforézy a byl vsazen hřeben.
- Po utužení byla agaróza přelita pufrům 1x TAE a byl z ní vyjmut hřeben.
- Na připravený gel byly nanášeny vzorky a hmotnostní markery.
- Po nanesení vzorků byla DNA dělena za stálého napětí 5 V.cm<sup>-1</sup>.
- Gely byly prohlíženy na UV transiluminátoru při vlnové délce 320 nm a vybrané gely fotografovány přístrojem Polaroid.

### **4.3.2.7 Polymerázová řetězcová reakce (PCR)**

K amplifikaci byl použit systém Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System od firmy Boehringer Mannheim. Tento systém byl zvolen proto, že kromě *Taq* polymerázy obsahuje také polymerázu *Pvo*, která má navíc korekční aktivitu. Z tohoto důvodu je tento systém 3x přesnější než polymeráza *Taq*.

### **Vlastní postup reakce:**

- Nejprve byl namíchán PCR mix o finálním objemu 50 µl v jedné reakci, který obsahoval:
  - 5 µl 10x pufru s MgCl<sub>2</sub>, který byl dodáván s polymerázou
  - 1 µl 10 mM dNTP
  - 0,5 - 1 µl „forward“ primeru o zásobní koncentraci 100 pmol/µl
  - 0,5 - 1 µl „reverse“ primeru o zásobní koncentraci 100 pmol/µl
  - mix enzymů – 0,75 µl (2,6 U) Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System
  - templátovou DNA (1 µg chromozomální DNA nebo 1 ng plazmidové DNA)
  - iH<sub>2</sub>O na doplnění objemu
- Směs byla dobře promíchána, vložena do PCR cycleru PTC-200 a reakce probíhala v režimu, kdy k nasedání primerů docházelo postupně ve třech teplotách (60°C, 56°C a 52°C).

- Produkty byly testovány elektroforeticky.

#### 4.3.2.8 Mutagenní polymerázová řetězcová reakce

Při vnášení bodové mutace do genu proteinů byly použity produkty firmy Fermentas, vlastní postup byl proveden podle návodu firmy Stratagene (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit). Metoda je založena na vnesení mutace pomocí primerů, ve kterých je obsažena žádaná záměna. Dochází k amplifikaci celého plazmidu. Plazmid obsahující záměnu je oddělen od původního nemutovaného pomocí restriční endonukléazy *DpnI*, která štěpí methylované části DNA. Tato methylace je přítomna pouze na parentální templátové tj. nemutované DNA, která je izolovaná z *dam+* bakteriálního kmenu. Rozštěpením templátové DNA dojde k selektivnímu nabohacení mutovaného plazmidu.

##### Vlastní postup reakce:

- Nejprve byla namíchána PCR směs o finálním objemu 50  $\mu$ l v jedné reakci, která obsahovala:
  - 5  $\mu$ l 10x pufru s  $MgCl_2$ , který byl dodáván s polymerázou
  - 1  $\mu$ l 10 mM dNTP
  - 2,5  $\mu$ l „forward“ primeru o zásobní koncentraci 50 ng/ $\mu$ l
  - 2,5  $\mu$ l „reverse“ primeru o zásobní koncentraci 50 ng/ $\mu$ l
  - 1  $\mu$ l *Pfu* DNA polymerázy (2,5 U)
  - 2  $\mu$ l templátové DNA o koncentraci 50 ng/ $\mu$ l
  - $H_2O$  na doplnění objemu
- Směs byla dobře promíchána, vložena do PCR cycleru PTC-200. K nasedání primerů docházelo při teplotě 52°C, k syntéze plazmidu polymerázou docházelo při 68°C, čas syntézy je závislý na délce plazmidu (2 minuty / 1000bp).
- Po ukončení reakce byl přidán 1  $\mu$ l *Dpn I* a směs byla inkubována minimálně 1 hodinu při 37°C.
- Produkty byly testovány elektroforeticky.

#### 4.3.2.9 Klonování DNA

##### A) Příprava inzertů

Geny byly amplifikovány metodou PCR pomocí primerů, které nesly vždy na 5' konci oblast obsahující restriční místa enzymů pro vnášení inzertů do plazmidu. Tyto

PCR produkty byly nejprve izolovány z gelu (4.3.2.4). Dále byly jejich konce štěpeny restričními endonukleázami a ty byly poté tepelně inaktivovány (viz 4.3.2.5).

## **B) Příprava plazmidů**

Plazmidy byly nejprve štěpeny odpovídajícími restričními endonukleázami (viz 4.3.2.5), restriční směsi byly rozděleny agarózovou elektroforézou a štěpené plazmidy byly izolovány z gelu a defosforylovány.

Defosforylace byla prováděna pomocí krevetí alkalické fosfatázy (SAP  $\approx$  shrimp alkaline phosphatase) dodané firmou Promega.

### **Vlastní postup defosforylace:**

- Nejprve byla namíchána směs obvykle o finálním objemu 10  $\mu$ l, která obsahovala:
  - 1  $\mu$ l 10x SAP pufru
  - 0,3  $\mu$ l resp. 0,5  $\mu$ l SAP (1U/ $\mu$ l) pro defosforylaci 5' přesahujících resp. ustupujících konců
  - požadované množství štěpeného plazmidu
  - iH<sub>2</sub>O – doplnění na požadovaný objem
- Směs byla 1 hodinu inkubována v 37°C.
- Reakce byla ukončena inkubací při 65°C po dobu 15 minut.

## **C) Ligace inzertu do plazmidu**

K ligaci byla používána T4 DNA ligáza od firmy TaKaRa. V tomto procesu enzym DNA ligáza spojuje kohezní nebo tupé konce plazmidů a ligovaných inzertů za vzniku fosfodiesterových vazeb. Reakce je energeticky náročná a vyžaduje přítomnost ATP v prostředí.

### **Vlastní postup reakce:**

- Nejprve byly namíchány reakční směsi o objemu 10  $\mu$ l tak, aby obsahovaly plazmid a inzert v množstevním poměru 1 : 5 a zároveň 50 – 100 ng plazmidu, 1-5 U ligázy a ligační pufr o koncentraci 1x.
- Mikrozkušavky byly inkubovány buď jednu hodinu při 16°C, nebo přes noc ve 14°C.
- Ligace byla ukončena inkubací při 65°C po dobu 15 minut.

#### D) Transformace buněk *Escherichia coli*

Transformace všech kmenů byla prováděna metodou tepelného šoku [98].

- Zmražené kompetentní buňky, uchovávané při  $-80^{\circ}\text{C}$ , byly vloženy do ledové lázně a ponechány roztát.
- Ligační směs nebo plazmidy byly rozpipetovány do vychlazených ( $4^{\circ}\text{C}$ ) mikrozkušavek a bylo připipetováno po  $200\ \mu\text{l}$  kompetentních buněk. Směsi byly lehce protřepány a inkubovány 30 minut v ledové lázni.
- Mikrozkušavky byly inkubovány 90 sekund ve  $42^{\circ}\text{C}$ , poté 5 minut v ledové lázni.
- Do každé mikrozkušavky byl přidán 1 ml média RMK bez antibiotika. Mikrozkušavky byly v septovém stojánku třepány 1 hodinu v  $37^{\circ}\text{C}$  v horizontální poloze.
- Buňky byly krátce centrifugovány, supernatanty byly nedokonale slity a sedimenty byly resuspendovány ve zbytcích supernatantu.
- Buňky byly rozetřeny na misky se selekčním antibiotikem a inkubovány přes noc ve  $37^{\circ}\text{C}$  dnem vzhůru.

#### 4.3.2.10 Sekvenační reakce – kapilární sekvenátor

K sekvenování byla použita směs Big Dye Terminátor v3.1 Cycle Sequencing od firmy Applied Biosystems. Tato směs obsahuje deoxynukleosidtrifosfáty, dideoxynukleosidtrifosfáty a DNA polymerázu. Pokud polymeráza vloží do vznikajícího řetězce dideoxynukleosidtrifosfát, syntéza řetězce se zastaví. Různě dlouhé řetězce jsou separovány kapilární elektroforézou.

##### Vlastní postup reakce:

- V mikrozkušavkách o objemu  $200\ \mu\text{l}$  byl nejprve namíchán mix o finálním objemu  $10\ \mu\text{l}$  v jedné reakci, který obsahoval:
  - DNA templát – ssDNA (50ng)  
dsDNA (1  $\mu\text{g}$ )
  - primer (10 pmol)
  - PREMIX (BigDye Terminator) –  $2\ \mu\text{l}$
  - $\text{iH}_2\text{O}$  na doplnění objemu
- Směs byla dobře promíchána, vložena do PCR cycleru PTC-200. K nasedání primerů docházelo při teplotě  $58^{\circ}\text{C}$ , k syntéze DNA docházelo při  $60^{\circ}\text{C}$ , proběhlo 25 cyklů.

- Po ukončení reakce bylo ke vzorku přidáno 10  $\mu$ l 3M octanu sodného (pH 5,6) a 80  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$ , vzorky byly dobře promíchány a přepipetovány do mikrozkušavek o objemu 1,5 ml.
- Dále bylo přidáno 5  $\mu$ g glykogenu a opět důkladně promícháno.
- Bylo přidáno 300  $\mu$ l 96% chlazeného ethanolu a promícháno. Směs byla centrifugována 20 minut při 17 000x g a 4°C.
- Supernatant byl odstraněn a pelet byl opláchnut 250  $\mu$ l 70% ethanolu, 5 minut centrifugován jako v předchozím bodě.
- Supernatant byl odstraněn a pelet byl sušen v exsikátoru.
- Usušené pelety byly dopraveny na pracoviště Ing. Felsberga (MBÚ AV ČR), kde byly podrobeny kapilární elektroforéze a analýze.

#### 4.3.2.11 „Cracking gel“

Metoda se používá pro rychlé zjištění přítomnosti inzertu v plazmidu po ligaci.

##### Použité roztoky a materiál:

###### *Agaróza*

*10x TBE, pH 8,0* – 0,9 M Tris-HCl; 10 mM EDTA, pH 8; 0,9 M kys. boritá

*„protoplasting“ pufr* – 20 % sacharóza, 30 mM Tris-acetát (pH 8), 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, RNAsa A – 5  $\mu$ g/ml, lysozym – 0,1 mg/ml

*„lysis“ pufr* – 5 % sacharóza, 1x TBE, 2 % SDS, 0,025 % bromfenolová modř

##### Vlastní postup:

- Byl připraven 0,8 % agarózový gel v 1x TBE pufru (viz. 4.3.2.6), těsně před nalitím bylo přidáno SDS na výslednou koncentraci 0,0005 %. Gel byl ponechán bez pufru. Do označených mikrozkušavek bylo rozpipetováno 7  $\mu$ l „protoplasting“ pufru.
- Vždy novou sterilní špičkou byly nanесeny předem označené kolonie inkubované přes noc na agarové půdě do mikrozkušavek a špička byla ponechána uvnitř. Druhou část kolonie nanесeme na novou misku (s agarovou půdou a antibiotikem) s mřížkou (s označenými pozicemi).
- Špičkami byly promíchány obsahy mikrozkušavek.
- Do jamek agarového gelu bylo napipetováno 5  $\mu$ l „lysis“ pufru, do takto připravených jamek byly napipetovány obsahy mikrozkušavek.

- Do 1 l 1x TBE pufru bylo přidáno 5 ml 10 % SDS. Gel byl zalit puftrem. K dělení docházelo nejprve při nižším napětí (20 V) po dobu 20 minut, poté asi 60 minut při vyšším napětí (110 V).

### 4.3.3 METODY PRÁCE S PROTEINY

#### 4.3.3.1 Exprese a izolace proteinů pomocí GST purifikačního systému

[100; 101]

Tato metoda byla prováděna pomocí soupravy „GST purification system“ od firmy Amersham Biosciences. Principem této metody je afinitní chromatografie, kdy dochází k navázání proteinu GST (glutathion S-transferáza) nebo fúzního proteinu obsahujícího na N-konci protein GST na glutathion-Sepharosu 4B („glutathione sepharose 4B“ - GS4B). Afinitní chromatografie je prováděna vsádkovou metodou. Po promytí je fúzní protein eluován redukovaným glutathionem, resp. dochází ke štěpení navázaného fúzního proteinu specifickou proteázou. Požadovaný protein se po centrifugaci nachází v supernatantu.

#### Použité roztoky a materiál:

**10x PBS** – 1,4 M NaCl; 27 mM KCl; 101 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,3

**100mM IPTG** – uchováváno v -20°C v alikvotech o 1 ml.

**Faktor Xa** – 400 U faktoru Xa bylo rozpuštěno v předchlazené (4°C) injekční vodě na finální koncentraci 1 U/μl, rozaliquotováno a skladováno v -80°C.

**Glutathione Sepharose 4B** – požadované množství původního roztoku (75% suspenze - 50 % suspenze 133 μl na 150 ml narostlé kultury) bylo centrifugováno 5 minut při 500 x g. Supernatant byl odebrán a sedimentovaná GS4B byla promyta roztokem předchlazeného (4°C) 1x PBS (1 ml na každých 133 μl původního roztoku). Centrifugováno 5 minut při 500 x g, supernatant byl odpipetován a pelet resuspendován v 1x PBS (100 μl na každých 133 μl původního roztoku). *Glutathione Sepharose 4B bylo nutné připravit si vždy čerstvou.*

**Sonikační pufr** – 1x PBS; 10% glycerol; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 7 mM 2-ME; 15 μM GDP  
– roztok byl namíchán bez GDP a skladován ve 4°C  
– před použitím bylo vždy přidáno 0,1 M GDP na výslednou koncentraci 15μM

**Štěpící pufr** (pro faktor Xa) – 50 mM Tris; 105 glycerol; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 7 mM 2-ME; 15 μM GDP  
– roztok byl namíchán bez GDP a skladován ve 4°C  
– před použitím bylo vždy přidáno 1,5 μl 0,1 M GDP do 10 ml pufru

**20 % Triton X-100**

**0,1 M GDP (sodná sůl)**

**100 mM PMSF** – 1,7 mg na 100 μl 96 % ethanolu

### **Vlastní postup:**

#### **a) růst kultury, indukce exprese fúzního proteinu**

- Jednou kolonií s rekombinantním pGEX vektorem, nebo kličkou z glycerolové konzervy byly inokulovány 5 ml RMK média s antibiotikem a inkubovány přes noc ve 37°C.
- 3 ml noční kultury bylo inokulováno 300 ml RMK s antibiotikem a inkubovány při 37°C za stálého míchání, dokud kultura nenarostla na  $A_{600} = 0,6$ , poté byla kultura za stálého míchání ochlazená na pokojovou teplotu a dále inkubována při této teplotě do  $A_{600} = 0,8$ .
- Následovala indukce exprese fúzního proteinu přidáním 300  $\mu$ l 100 mM IPTG (finální koncentrace 0,1 mM) a inkubace pokračovala další 4 hodiny.
- Kultura (300 ml) byla centrifugována při 7 700x g, 10 minut při 4°C. Supernatant byl dokonale odstraněn a pelet byl resuspendován v 15 ml sonikačního pufru a stejným způsobem centrifugován. Supernatant byl dokonale slit a sediment byl uchován v -20°C.

#### **b) příprava lyzátu**

- Sediment byl resuspendován v 10 ml sonikačního pufru (4°C) a další práce probíhaly při 4°C.
- Kultura byla přepipetována do sonikační kyvety a buňky byly lyzovány sonikací 6 x 10 sekund s přestávkami na ledu (1 min.).
- Bylo přidáno 500  $\mu$ l 20 % Triton X-100 na výslednou koncentraci 1%, inkubováno 30 minut za stálého míchání (Triton X-100 je neiontový detergent, který napomáhá solubilizaci proteinu asociovaného s membránou).
- Mezitím byla připravena 50 % suspenze GS4B (viz použité roztoky a materiál).
- Lyzát byl centrifugován při 10 000x g, 20 minut při 4°C, supernatant byl přepipetován do nové kyvety a opět centrifugován při 15 000x g, 20 minut při 4°C.

#### **c) vazba fúzního proteinu**

- Supernatant byl rozdělen na dvě poloviny, ke každé byla přidána 50 % suspenze GS4B, za stálého míchání byl supernatant inkubován 30 minut při 4°C.
- Následovala centrifugace při 500x g, 4°C, 3 minuty a supernatant byl odpipetován.
- GS4B s navázaným fúzním proteinem v každé falkonce (uzavíratelná umělohmotná zkumavka kónického tvaru o objemu 50 ml) byla 4x promyta 5 ml sonikačního pufru a



poté jednou promyta 5 ml štěpícího pufru (sediment vždy resuspendován a centrifugován při 500x g, 1,5 minuty, při 4°C a supernatant byl odstraněn).

#### **d) štěpení fúzního proteinu obsahujícího EF-Tu (resp. G-doménu) z *E. coli***

- Sediment (GS4B s navázaným fúzním proteinem) byl resuspendován ve 300 µl štěpícího pufru a byly přidány 4 U faktoru Xa a směs byla inkubována přes noc (cca 16 hodin) při 4°C.
- Po štěpení byl faktor Xa inaktivován přidáním PMSF na finální koncentraci 1 mM a směs byla centrifugována při 500x g, 5 minut při 4°C a supernatant byl přepipetován do nové mikrokumavky.
- Sediment byl resuspendován v 100 µl štěpícího pufru (s GDP), centrifugován při 12 000x g, 10 minut, při 4°C a supernatant byl připipetován k předchozímu.
- Spojené supernatanty byly centrifugovány při 12 000x g, 10 minut, při 4°C k odstranění zbytků GS4B. Výsledný supernatant byl přepipetován do nové mikrokumavky a koncentrace proteinu byla změřena metodou podle Bradfordové (viz 4.3.3.2) a protein byl analyzován na SDS-PAGE (viz 4.3.3.3).
- Protein byl uskladněn ve štěpícím pufru při -20°C .

#### **e) štěpení fúzního proteinu obsahujícího EF-Tu (resp. G-doménu)**

##### ***z B. stearothermophilus***

- Sediment (GS4B s navázaným fúzním proteinem) byl resuspendován ve 300 µl štěpícího pufru a byly přidány 40 U faktoru Xa a směs byla inkubována 1 hodinu při 9°C.
- Další postup byl shodný jako pro proteiny z *E. coli*.

### **4.3.3.2 Měření koncentrace bílkovin – BRADFORD [102]**

#### **Použité roztoky:**

**Bradfordové činidlo** - 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (rozpustit v 50 ml ethanolu); 8,5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a doplnit dH<sub>2</sub>O na 1l

**BSA** – 0,5 µg/µl

#### **Vlastní postup:**

- Při měření 1 - 10 µg bílkoviny byl vzorek doplněn iH<sub>2</sub>O na objem 100 µl a zároveň byla podle tabulky namíchána kalibrační křivka. Jako standard bylo použito BSA.

<b>µg BSA</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>µl BSA (0,5 µg/µl)</b>	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	100	98	96	94	92	90	88	86	84	82	80

- Dále byl přidán 1 ml činidla, směs byla dobře promíchána a inkubována 5 minut v pokojové teplotě (stálost roztoku je po té 5 – 20 minut od zamíchání).
- Vzorek byl měřen při  $A_{595}$  a naměřené hodnoty byly vyhodnoceny pomocí programu Microsoft Excel.

### 4.3.3.3 Polyakrylamidová elektroforéza proteinů (SDS-PAGE) [103]

K elektroforetické analýze proteinů byla použita metoda vertikální polyakrylamidové elektroforézy v prostředí SDS („sodium dodecyl sulphate“), které působí jako denaturační činidlo a zároveň udílí proteinům uniformní záporný náboj. Proteiny se proto dělí jen podle své molekulové hmotnosti. Bylo používáno diskontinuální uspořádání, kdy elektroforéza probíhá ve dvou gelech. K vlastnímu dělení dochází v gelu separačním.

#### a) Příprava vzorků

##### Použité roztoky:

##### *Vzorkové pufr*

	Neredukující vzorkový pufr	Redukující vzorkový pufr
0,5 m Tris.HCl, pH 6,8	1,0	1,0
Glycerol	0,8	0,8
10% SDS	1,6	1,6
0,05% Bromfenol. modř	0,2	0,2
2-mercaptoethanol	-	1,2
dH <sub>2</sub> O	4,4	3,2
Σ	8,0 ml	8,0 ml

- Požadované množství vzorku bylo smícháno se vzorkovým pufrém a 5 minut vařeno.
- Analyzován byl obvykle 1 µg proteinu.

#### b) Příprava a provedení elektroforézy

##### Použité roztoky:

**30% AA, bis AA** – 29,2 g AA; 0,8 g bis AA; doplnit do 100 ml, ohřát, přefiltrovat, skladováno při 4°C

**1,5 M Tris.HCl, pH 8,8**

**0,5 M Tris.HCl, pH 6,8** .

**10% SDS**

**Elektrodový pufr (5x), pH 8.3** – na 600 ml pufru - 9 g Tris; 43,2 g glycin; 3 g SDS

**10% APS  
TEMED**

**Vlastní postup:**

- Nejprve byla připravena aparatura pro nalévání gelů. Skla byla nejprve důkladně umyta v 50 % roztoku detergentu, opláchnuta dH<sub>2</sub>O, umyta v 96 % ethanolu a dokonale usušena gázou. Skla byla umístěna do držáku a připevněna do nalévacího stojanu.
- Podle tabulky byl namíchán roztok pro separační gely o požadované hustotě (množství jsou uvedena vždy pro dva gely při použití aparatury Mini Protean II; Bio-Rad).

HUSTOTA GELŮ	7,5%	10%	12%	15%
30% AA, bis AA	2,5 ml	3,33 ml	4,0 ml	5,0 ml
1,5 M Tris.HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
dH <sub>2</sub> O	5,0 ml	4,16 ml	3,5 ml	2,5 ml
10% SDS	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl

- Bylo přidáno 35 μl 10 % APS a 4,5 μl TEMEDu, směs byla dobře promíchána a roztok byl okamžitě automatickou pipetou nalit (2 x), a to 1,5 cm pod hranici menšího skla. Nalité „gely” byly převrstveny dH<sub>2</sub>O a nechány polymerovat.
- Po utužení byla odstraněna vrstva vody, byl namíchán 4 % roztok pro dva zaostřovací gely - 1,52 ml dH<sub>2</sub>O; 625 μl 0,5 M Tris.HCl, pH 6,8; 325 μl 30% AA, bisAA; 25 μl 10% SDS – před naléváním bylo přidáno – 35 μl 10% APS a 3,8 μl TEMEDu. Roztoky byly pipetovány na povrch separačního gelu a do nich byly vsunuty hřebeny a zaostřovací gel se nechal polymerovat (přibližně 15 minut).
- Poté byla skla vložena do komory pro vlastní elektroforézu, gely byly zality 300 ml 1x elektrodového pufru, byly vyndány hřebeny, nanoseny vzorky a spuštěna elektroforéza, která obvykle probíhala při napětí 120 V. Průběh elektroforézy byl sledován podle pohybu bromfenolové modři.
- Při doputování bromfenolové modři ke spodnímu okraji gelů, byla elektroforéza ukončena a aparatura rozebrána. Na gelech byl vždy odříznut jeden roh pro identifikaci, gely byly opláchnuty v dH<sub>2</sub>O a barveny.

#### **4.3.3.4 Barvení polyakrylamidových gelů**

**Barvení gelů Coomassie Brilliant Blue [103]**

**Použité roztoky:**

*roztok Coomassie Blue R-250* – 0,2 g Coomassie Brilliant R-250; 2,5 g CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O; 135 ml ethanolu (ve kterém byla rozpuštěna Coomassie

Briliant Blue R-250); 315 ml H<sub>2</sub>O (v ní byl rozpuštěn CuSO<sub>4</sub>); 50 ml kys. octové  
*odbarvovací roztok* – 25 % methanol; 10 % kyselina octová  
*uchovávací roztok na gely* – 1 % glycerol; 4 % kyselina octová

#### **Vlastní postup:**

- Gely byly dány do roztoku Coomassie Brilliant Blue a za stálého míchání barveny alespoň 1 hodinu.
- Gely byly odbarvovány v odbarvovacím roztoku a poté uloženy ve 4°C v uchovávacím roztoku (alespoň přes noc) a sušeny na listu filtračního papíru překryty průhlednou folií na sušičce s vodní vývěvou.

### **4.3.3.5 Testování schopnosti proteinů EF-Tu vázat a vyměnit GDP [82]**

Schopnost vázat GDP je základní vlastností EF-Tu a je přímo úměrná jeho aktivitě. Proteiny jsou smíchány s GDP v molárním poměru alespoň 1:10 (protein:GDP). Směs je inkubována při teplotě, ve které chceme testovat aktivitu proteinu. Předpokládá se, že nefunkční nebo tepelně inaktivovaný protein není schopen vázat GDP. Nenavázané GDP je odstraněno při promývání nitrocelulózových filtrů.

#### **Použité roztoky a materiál:**

*10x standardní pufr pro vazbu GDP a GTP* – 500 mM Tris.HCl, pH 7,6; 600 mM NH<sub>4</sub>Cl;  
100 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 M 2- mercaptoethanol  
*[<sup>3</sup>H] GDP* – specifická aktivita 11,5 Ci/mmol  
*0,1 M; 1 mM roztok GDP*

#### **Vlastní postup:**

- Nejprve byla připravena aparatura pro promývání nitrocelulózových filtrů. Aparatura byla složena z kovového filtračního zařízení nasazeného na odsávací baňku napojenou na vodní vývěvu. Filtry byly lícovou stranou položeny na hladinu 1x standardního pufru, aby se navlhčily.
- Poté byly namíchány reakční mixy pro celý počet vzorků v pokusu najednou (zde budou uvedeny mixy pro jednu reakci/jeden vzorek):  
MIX I – obsahoval 1 µg proteinu (23 pmol EF-Tu, resp. 46 pmol G-domén) ve 20 µl štěpícího pufru (s 15 µM GDP) (pro G-domény z *E. coli* bylo použito 3 µg proteinu do 10 µl)  
MIX II – finální objem 60 µl – 8 µl 10x standardního pufru

- 410 pmol GDP o specifické aktivitě 500 cpm/pmol (do roztoku bylo podle deklarované aktivity přidáno určité množství radioaktivního [<sup>3</sup>H] GDP a množství bylo doplněno neradioaktivním GDP)  
(pro G-domény z *E. coli* bylo použito 1600 pmol GDP o specifické aktivitě 700 cpm/pmol v objemu 30 µl)
- iH<sub>2</sub>O na doplnění objemu
- Mixy byly napipetovány do mikrozkušavky při 4°C.
- Vzorky byly inkubovány 8 minut při určité teplotě a po inkubaci byly vzorky nechány 30 minut na ledu.
- Na promývací zařízení byl položen filtr lícovou stranou nahoru, na filtr byl položen kovový komín. Ke vzorku byl přidán 1 ml předchlazeného 1x standardního pufru, vzorek byl okamžitě promíchán a nanesen na filtr. Filtr byl promyt 3 x 3 ml 1x standardního pufru. Po promytí byl filtr vložen do scintilační lahvičky a sušen pod infralampou. Po usušení byl přelit 2 ml scintilačního roztoku. Aktivita vzorku byla měřena 1 minutu na přístroji Beckman LS 6500.
- Dále byly změřeny radioaktivita zachycená na filtru bez přítomnosti EF-Tu (blank) a množství radioaktivity vložené do reakce.

#### 4.3.3.6 Testování schopnosti proteinů EF-Tu vázat a vyměnit GTP [82]

Schopnost vázat GTP je základní vlastností EF-Tu a je přímo úměrná jeho aktivitě. Proteiny jsou smíchány s GTP v molárním poměru alespoň 1:10 (protein:GTP). Do reakce je dále přidán fosfoenolpyruvát (PEP) a fosfoenolpyruvát kináza (PEPK) k fosforylaci veškerého přítomného GDP na GTP a směs je preinkubována ve 30°C (vzniká ale neradioaktivní komplex). Poté je směs inkubována v teplotě, ve které chceme testovat aktivitu proteinu.

##### **Použité roztoky a materiál:**

**10x standardní pufr pro vazbu GDP a GTP** – 500 mM Tris.HCl, pH 7,6; 600 mM NH<sub>4</sub>Cl;  
100 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 M 2- mercaptoethanol

**[ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-GTP** – specifická aktivita > 5000 Ci/mmol

**0,1 M; 100 mM roztok GTP**

**0,5 M PEP**

**Phosphoenolpyruvát kináza** – 30,79 mg/ml

### Vlastní postup:

- Nejprve byly namíchaný reakční mixy pro celý počet vzorků v pokusu najednou (zde budou uvedeny mixy pro jednu reakci):
  - MIX I – obsahoval 1 µg proteinu (23 pmol, resp. 46 pmol) v 10 cl štěpícího pufru (s 15 cm GDP) (pro G-domény z *E. coli* bylo použito 3 µg proteinu)
  - MIX II – finální objem 30 cl – 4 cl 10x standardního pufru
    - 240 pmol GTP o specifické aktivitě 2000 cpm/pmol (do roztoku bylo podle deklarované aktivity přidáno určité množství radioaktivního [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] GTP a množství bylo doplněno neradioaktivním GTP) (pro G-domény z *E. coli* bylo použito 1200 pmol GTP o specifické aktivitě 2000 cpm/pmol)
    - 0,08 cl 0,5 M PEP (výsledná koncentrace v reakci Emm)
    - 0,035 l PEPK o koncentraci 30,79 mg/ml (finální koncentrace v reakci 27 mg/l)
    - $\text{iH}_2\text{O}$  na doplnění objemu
- Oba mixy byly pipetovány do mikrozkuřavky (40 cl).
- Vzorek byl preinkubována 20 minut ve 30°C (pro proteiny s nižší termostabilitu byla použita k preinkubaci teplota o 10°C nižší, než je optimum proteinu pro GTP vazbu). Poté byl vzorek inkubován 8 minut při testované teplotě (obvykle v teplotách v rozmezí 30 – 70°C). Ke vzorku byl přidán 0,5 ml předchlazeného 1x standardního pufru, vzorek byl okamžitě promíchán a nanesen na filtr. Filtr byl promyt 3 x 3 ml 1x standardního pufru na stejné aparatuře jako v 4.3.3.5. Dále se postupovalo jako v 4.3.3.5.

### **4.3.3.7 Měření vnitřní GTPázové aktivity EF-Tu [104]**

Tato aktivita je u proteinů EF-Tu nízká, a proto je v systému *in vitro* testována v prostředí 1 M KCl, které ji výrazně zvyšuje. Protein je smíchán s GTP o specifické aktivitě v poměru 1:25. Ke vzorku je přidán regenerační systém PEP a PEPK. Vzorky jsou preinkubovány ve 30°C, poté je přidáno KCl, vzorky jsou inkubovány v testované teplotě a v časových intervalech jsou odebírány alikvoty.

### **Použité roztoky a materiál:**

*10x standardní pufr pro GTPázu* – 500 mM imidazol acetát, pH 7,6; 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
*2 M KCl*

*[ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-GTP* – specifická aktivita > 5000 Ci/mmol

*0,1 M; 100 mM roztok GTP*

*0,5 M PEP*

*Phosphoenolpyruvát kináza* – 30,79 mg/ml

*Stop solution* – 1 M HClO<sub>4</sub>; 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

*Roztok 6 % aktivního uhlí v 1 M HCl*

### **Vlastní postup:**

- Nejprve byly namíchaný mixy (zde jsou uvedeny hodnoty pro jednu reakci = jeden odběr):
  - MIX I – 1 µg proteinu v 2,25 µl uchovávacího roztoku
  - MIX II – finální objem 8,32 µl – 0,58 µl 2 M KCl (finální koncentrace 109 mM)
    - 575 pmol GTP o specifické aktivitě 1800 cpm/pmol (do roztoku bylo podle deklarované aktivity přidáno určité množství radioaktivního [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]GTP a množství bylo doplněno neradioaktivním GTP)
    - 0,1 µl 0,5 M PEP (finální koncentrace 4,5 mM v preinkubaci ve 30°C; 2,5 mM při testování aktivity)
    - 0,026 µl PEPK (finální koncentrace 0,076 µg/µl resp. 0,04 µg/µl)
    - 2 µl 10x standardního pufru pro GTPázu
    - iH<sub>2</sub>O na doplnění objemu
- Mixy byly spipetovány dohromady do mikrozkušavky a vzorky byly inkubovány 20 minut ve 30°C (jako v 4.3.3.6).
- Ke vzorkům bylo připipetováno 9,43 µl 2 M KCl (finální koncentrace 1M).
- Vzorky byly inkubovány při teplotě, ve které byla testována aktivita proteinů.
- V časových intervalech bylo odebíráno 20 µl vzorku. Alikvot byl dán na led, okamžitě k němu bylo připipetováno 20 µl stop solution a vzorek byl zamíchán.
- Po ukončení inkubace bylo ke všem vzorkům připipetováno 360 µl roztoku aktivního uhlí v 1 M HCl, vzorky byly důkladně promíchány a centrifugovány 20 minut při 4 000x g.
- 200 µl supernatantu bylo přepipetováno do nové mikrozkušavky a opět centrifugováno. 180 µl supernatantu bylo přepipetováno do nové mikrozkušavky a

k němu byly připipetovány 1,3 ml Brayova roztoku. Aktivita vzorku byla měřena 1 minutu na přístroji Beckman LS 6500.

#### 4.3.3.8 Měření rychlostní konstanty disociace komplexu EF-Tu·GDP

[105]

Rychlost disociace binárního komplexu EF-Tu·GDP je spolu s rychlostí asociace mírou afinity proteinu k jeho ligandu. Protein inkubujeme s radioaktivně značeným ligandem v testované teplotě, dokud se neustaví rovnováha systému. Poté je vzorek naředěn neznačeným ligandem a v časových intervalech jsou odebírány alikvoty.

##### Použité roztoky a materiál:

*10x standardní pufr pro vazbu GDP a GTP* – 500 mM Tris.HCl, pH 7,6; 600 mM NH<sub>4</sub>Cl;  
100 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 M 2- mercaptoethanol  
*[<sup>3</sup>H] GDP* – specifická aktivita 11,5 Ci/mmol  
*0,1 M; 1 mM roztok GDP*

##### Vlastní postup:

- Nejprve byla namíchána směs obsahující radioaktivně značené GDP:
  - Směs – finální objem 50 µl – 500 pmol GDP o specifické aktivitě 800 cpm/pmol (do roztoku bylo podle deklarované aktivity přidáno určité množství radioaktivního [<sup>3</sup>H] GDP a množství bylo doplněno neradioaktivním GDP)
  - iH<sub>2</sub>O na doplnění objemu
- Dále byla namíchána reakční směs – finální objem 500 µl – 50 pmol proteinu
  - 50 µl MIX
  - 50 µl 10x standardní pufr
  - iH<sub>2</sub>O na doplnění objemu
- Reakční směs byla inkubována alespoň 1 hodinu v testované teplotě.
- Poté bylo odebráno 2 x 50 µl reakční směsi, odpovídající času 0 minut (resp. s). Ke vzorku byl přidán 0,5 ml předchlazeného 1x standardního pufru, vzorek byl okamžitě promíchán a nanesen na filtr. Filtr byl promyt 3 ml 1x standardního pufru na stejné aparatuře jako v 4.3.3.5. Dále se postupovalo jako v 4.3.3.5.



- K reakční směsi bylo přidáno 400  $\mu\text{l}$  1 mM neznačeného GDP v 1 x standardním pufru a v časových intervalech bylo odebíráno 100  $\mu\text{l}$ . Dále se postupovalo jako v předchozím bodě.

#### 4.3.3.9 Měření rychlostní konstanty disociace komplexu EF-Tu·GTP

[105]

Rychlost disociace binárního komplexu EF-Tu·GTP je spolu s rychlostí asociace mírou afinity proteinu k jeho ligandu. Připravíme směs obsahující protein, radioaktivně značený ligand v molárním poměru alespoň 1:10 (protein:GTP), fosfoenolpyruvát (PEP) a fosfoenolpyruvát kinázu (PEPK) k fosforylaci veškerého přítomného GDP na GTP a směs je preinkubována ve 30°C (vzniká ale neradioaktivní komplex). Poté je vzorek inkubován v testované teplotě, dokud se neustaví rovnováha systému. Následně je vzorek naředěn neznačeným ligandem a v časových intervalech jsou odebírány alikvoty.

##### Použité roztoky a materiál:

*10x standardní pufr pro vazbu GDP a GTP* – 500 mM Tris.HCl, pH 7,6; 600 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ;  
100 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,1 M 2- mercaptoethanol

*$[\gamma^{32}\text{P}]$ -GTP* – specifická aktivita > 5000 Ci/mmol

*0,1 M; 100 mM roztok GTP*

*0,5 M PEP*

*Phosphoenolpyruvát kináza* – 30,79 mg/ml

##### Vlastní postup:

- Nejprve byl namíchán mix obsahující radioaktivně značené GDP:
  - MIX – finální objem 50  $\mu\text{l}$  – 5000 pmol GTP o specifické aktivitě 4800 cpm/pmol  
(bylo použito pouze značené  $[\gamma^{32}\text{P}]$  GTP)
  - $\text{iH}_2\text{O}$  na doplnění objemu
- Dále byla namíchána reakční směs – finální objem 500  $\mu\text{l}$ 
  - 50 pmol proteinu
  - 50  $\mu\text{l}$  MIX
  - 50  $\mu\text{l}$  10x standardní pufr
  - 1,5  $\mu\text{l}$  0,5 M PEP (výsledná koncentrace v reakci 1,5 mM před přidáním neznačeného GTP)
  - 0,65  $\mu\text{l}$  PEPK (výsledná koncentrace v reakci 0,04  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  před přidáním neznačeného GTP)

– iH<sub>2</sub>O na doplnění objemu

- Reakční směs byla inkubována 20 minut ve 30°C (jako v 4.3.3.6).
- Dále byla reakční směs inkubována alespoň 1 hodinu v testované teplotě.
- Poté bylo odebráno 2 x 50 µl reakční směsi, odpovídající času 0 min (resp. 0 s). Ke vzorku byl přidán 0,5 ml předchlazeného 1x standardního pufru, vzorek byl okamžitě promíchán a nanesen na filtr. Filtr byl promyt 3 ml 1x standardního pufru na stejné aparatuře jako v 4.3.3.5. Dále se postupovalo jako v 4.3.3.5.
- K reakční směsi bylo přidáno 400 µl 1 mM neznačeného GTP v 1x standardním pufru a v časových intervalech bylo odebíráno 100 µl. Dále se postupovalo jako v předchozím bodě.

## 5 Výsledky

Pro jednodušší orientaci ve výsledcích jsme zvolili zkratkovité značení proteinů, proteiny z *B. stearothermophilus* jsou značeny zkratkou *Bst* a proteiny z *E. coli* zkratkou *Ec*. Pro G-doménu bylo použito pouze písmeno G. Pro jednotlivé aminokyseliny jsme použili jednopísmenné zkratky, jako první je vždy uveden ak zbytek, který je obsažen v nemutovaném proteinu, např. G-doména z *B. stearothermophilus* obsahující záměnu Tyr za Phe v poloze 46 bude označena *BstGY46F*.

### 5.1 Příprava mutovaných genů a konstrukce expresních vektorů

Pro vytvoření konstruktů na přípravu rekombinantních proteinů byl použit expresní vektor pGEX-5X-3 od firmy Amersham Pharmacia. Zároveň s vektorem jsme obdrželi buňky *E. coli* kmen BL21, který je vhodný pro expresi fúzních proteinů. Bylo ověřeno, že ani jeden z genů *tuf* neobsahuje restrikční místa pro restrikční endonukleázy (RE) *BamH* I a *EcoR* I, které byly později použity pro vkládání genů do vektoru. Zároveň bylo ověřeno, že vložením mutace restrikční místa pro tyto dvě endonukleázy nevzniknou. Dále bylo zkontrolováno, že v sekvencích genů *tuf* není obsaženo specifické místo pro štěpení proteázou faktorem Xa. Sekvence rozpoznávaná touto proteázou je Ile-Glu-Gly-Arg [106].

#### 5.1.1 Mutagenní PCR

Pro mutagenní PCR byl použit vektor pGEX-5X-3 obsahující vždy jeden z genů *tuf* (resp. gen pro G-doménu). Byla zvolena metoda QuikChange Site-Directed Mutagenesis s postupem podle návodu firmy Stratagene a enzymy a pufrý od firmy Fermentas (4.3.2.8). Bylo vytvořeno šest konstruktů obsahujících záměny v polohách 14, 46 a 65 (obr. 5.1, str. 60):

pGEX-5x-3/*Ec*GV14I+S65A

pGEX-5x-3/*Bst*GI14V+A65S

pGEX-5x-3/*Ec*GF46Y

pGEX-5x-3/*Ec*EF-TuF46Y

pGEX-5x-3/*Bst*GY46F

pGEX-5x-3/*Bst*EF-TuY46F

Použity byly primery uvedené v tabulce č. 5.1 (str. 60).

	14	46	
Bst	1 AKAKFERTKPHVNI <b>IG</b> TIGHVDHGKTTLTAAITTVLAKQGKAEAKAY <b>YD</b> QIDAAPeerERG 59		
	+K KfERTKPHVN+GTIGHVDHGKTTLTAAITTVLAK	A+A+DQID APEE+ RG	
Ec	1 SKEKFERTKPHVNV <b>GT</b> TIGHVDHGKTTLTAAITTVLAKTYGGAARA <b>F</b> DQIDNAPEEKARG 59		
	<b>65</b>		
Bst	60 ITIST <b>A</b> HVEYETEArHYAHVDCPGHADVKNMITGAAQMDGAILVVSAA <b>D</b> GMPQ <b>T</b> REHI 119		
	ITII+T+HVEY+T RHYAHVDCPGHADVKNMITGAAQMDGAILVV+A DGPMPQ <b>T</b> REHI		
Ec	60 ITINT <b>S</b> HVEYDTP <b>R</b> HYAHVDCPGHADVKNMITGAAQMDGAILVVAAT <b>D</b> GMPQ <b>T</b> REHI 119		
Bst	120 LLSRQVGVPYI <b>V</b> FLNKCDMVDDEELLELVEMEV <b>R</b> DLLSEYDFPGDEVP <b>V</b> IKGSALKALE 179		
	LL RQVGVPYI+VFLNKCDMVDDEELLELVEMEV <b>R</b> +LLS+YDFPGD+ P+++GSALKALE		
Ec	120 LLGRQVGVPYII <b>V</b> FLNKCDMVDDEELLELVEMEV <b>R</b> ELLSQYDFPGDD <b>T</b> P <b>V</b> IRGSALKALE 179		
		doména 2	
Bst	180 GDPK <b>W</b> EEEKI <b>I</b> ELMNAVDEYI <b>P</b> T <b>P</b> QREVD <b>K</b> P <b>F</b> MMP <b>I</b> EDVFSITGRGT <b>V</b> ATGR <b>V</b> ER <b>G</b> TL <b>K</b> VG 239		
	GD +WE KI+EL +D YIP P+R +DK <b>P</b> F++ <b>P</b> IEDVFSI+GRGT <b>V</b> TGR <b>V</b> ER <b>G</b> + <b>K</b> VG		
Ec	180 GDAEW <b>E</b> AKI <b>L</b> E <b>L</b> AGFLDSYI <b>P</b> E <b>P</b> ER <b>A</b> ID <b>K</b> P <b>F</b> LL <b>P</b> IEDVFSISGRGT <b>V</b> TGR <b>V</b> ER <b>G</b> I <b>I</b> KVG 239		
Bst	240 DPVEI <b>I</b> GLSDEPKAT 254		
	+ VEI+G+ + K+T		
Ec	240 EEVEI <b>V</b> GIKETQKST 254		
		doména 3	
Bst	250 EPKAT <b>T</b> VTGVEMFRKLLDQAEAGDNIGALLRGVSRDEVER <b>G</b> QVLAKPG <b>S</b> I <b>T</b> PHT <b>K</b> FKAQ <b>V</b> 309		
	E + +T TGVEMFRKLLD+ AG+N+G LLRG+ R+E+ERGQVLAKPG+ <b>I</b> PHT <b>K</b> F+++ <b>V</b>		
Ec	249 ETQK <b>S</b> TCTGVEMFRKLLDEGRAGENVGVLLRGI <b>K</b> REEIER <b>G</b> QVLAKPG <b>T</b> I <b>K</b> PHT <b>K</b> F <b>E</b> SE <b>V</b> 308		
Bst	310 YVL <b>T</b> KEEGRRHT <b>P</b> FFSNYR <b>P</b> QFYFR <b>T</b> TDV <b>T</b> GI <b>I</b> IL <b>P</b> EGVEMVMPGD <b>N</b> EM <b>T</b> VELI <b>A</b> PI <b>A</b> I 369		
	Y+L+K+EGRRHT <b>P</b> FF YRPQFYFR <b>T</b> TDV <b>T</b> G I L <b>P</b> EGVEMVMPGD <b>N</b> + <b>M</b> V LI PIA+		
Ec	309 YIL <b>S</b> KDEGGRRHT <b>P</b> FFKGYR <b>P</b> QFYFR <b>T</b> TDV <b>T</b> GT <b>I</b> EL <b>P</b> EGVEMVMPGD <b>N</b> IK <b>M</b> V <b>V</b> TL <b>I</b> HPI <b>A</b> M 368		
Bst	370 EEG <b>T</b> K <b>F</b> SIREGGRT <b>V</b> GAGSVSE <b>I</b> I 394		
	++G +F+IREGGRT <b>V</b> GAG V++++		
Ec	369 DDGLR <b>F</b> AIREGGRT <b>V</b> GAG <b>V</b> VAK <b>V</b> LS 393		

Obr. 5.1 Porovnání aminokyselinových sekvencí mezi *Bst*EF-Tu a *Ec*EF-TuA. Místa záměn jsou označena barevně. Prostřední řádek podává přehled shodných aminokyselinových zbytků mezi oběma proteiny.

	„forward“ primer	„reverse“ primer	RE (+/-)
<i>Ec</i> - V14I	cgcacg <b>tt</b> aac <b>att</b> ggtactatcgg	ccgatag <b>tt</b> acca <b>at</b> g <b>tt</b> aacgtg <b>cg</b>	
<i>Bst</i> - I14V	cgcacg <b>tc</b> aac <b>gtt</b> ggcagcatcgg	ccgatc <b>gt</b> cca <b>ac</b> g <b>tt</b> gacgtg <b>cg</b>	
<i>Ec</i> - F46Y	gtgctgctc <b>gt</b> catatgaccagatc <b>g</b> ataac	g <b>tt</b> atc <b>gt</b> atc <b>gt</b> catatg <b>c</b> acgagcag <b>c</b>	<i>Nde</i> I (+)
<i>Bst</i> - Y46F	cgaagcaaaagc <b>gtt</b> cac <b>aa</b> atc <b>g</b> acg	c <b>gt</b> c <b>g</b> at <b>tt</b> g <b>gt</b> c <b>ga</b> ac <b>g</b> ct <b>tt</b> g <b>ct</b> tcg	<i>Bsi</i> W I (-)
<i>Ec</i> - S65A	ccatcaacactg <b>ccc</b> acg <b>tt</b> gaatac	gtattcaacg <b>ttg</b> g <b>gc</b> ag <b>tt</b> gatg <b>g</b>	
<i>Bst</i> - A65S	cgatttcagc <b>gtc</b> tcacg <b>tc</b> gagta	tactcagc <b>gtg</b> ag <b>ac</b> g <b>tc</b> gaaatc <b>g</b>	

Tab. 5.1 Sekvence primerů použitých při vkládání bodových mutací. Pokud bylo vloženo restriční místo spolu s mutací je v posledním sloupečku uveden název enzymu (+), pokud bylo místo zrušeno je uveden název enzymu (-).

Pokud to bylo možné, byl zvolen takový kodon, který dal vzniknout novému restrikčnímu místu, anebo vedl k zániku původní restrikčního místa. Byla vybrána taková RE, která neštěpí jinde v genu nebo plazmidu. Vložení mutace lze po transformaci ověřit v daném bakteriálním klonu pomocí restrikční analýzy. Správná sekvence takto potvrzené mutace byla dále ověřena sekvenační reakcí (4.3.2.11). Pokud nebylo možné ověřit vložení mutace restrikční analýzou, bylo sekvenováno několik náhodně vybraných klonů.

### 5.1.2 Štěpení endonukleázou *Dpn I* a transformace do DH5 $\alpha$

Po ukončení mutagenní PCR byly nemutované plazmidy (templátová DNA) štěpeny endonukleázou *Dpn I*. Endonukleáza *Dpn I* rozpoznává metylované sekvence DNA (4.3.2.8). Metylovaná je pouze templátová (nemutovaná) DNA. Proto je nutné izolovat templátový plazmid z *dam+* bakteriálního kmenu (např. *E. coli* DH5 $\alpha$ ).

Plazmidy byly po restrikci transformovány do buněk *E. coli* kmenu DH5 $\alpha$  metodou tepelného šoku (4.3.2.9).

### 5.1.3 Analýza klonů

Bylo nutné zjistit, zda je v genu obsažena žádaná mutace a zda je zbytek genu bez chyby. Byly použity dva přístupy. V případě konstruktů obsahujících záměnu v poloze 46 bylo náhodně vybráno větší množství klonů k izolaci plazmidů (Minipreparace - 4.3.2.1). Tyto plazmidy byly podrobeny restrikční analýze, na jejím základě byly určeny klony obsahující plazmid s požadovanou záměnou. Z jednoho pozitivního klonu byl izolován plazmid minipreparací pomocí soupravy od firmy Qiagen (4.3.2.1). Sekvence byla ověřena sekvenční reakcí (4.3.2.11).

Pro konstrukty obsahující dvojzáměnu byly náhodně vybrány 4 klony, ze kterých byly izolovány plazmidy soupravou od firmy Qiagen a tyto plazmidy byly podrobeny sekvenční reakci.

### 5.1.4 Konstrukce expresních vektorů

Při mutagenní PCR dochází k syntéze celého plazmidu. Z důvodu vyloučení nechtěné záměny v sekvenci plazmidu byl mutovaný gen vložen do „čistého“ plazmidu.

Izolovaný plazmid pGEX-5X-3 (Midi prep – 4.3.2.1) byl linearizován *Bam*H I v pufru Multicore od firmy Promega, ve kterém štěpí *Bam*H I i *Eco*R I. Linearizace byla ověřena elektroforeticky, a poté byl plazmid štěpen *Eco*R I (4.3.2.5). Nakonec byl defosforylován alkalickou fosfatázou (4.3.2.9). Takto linearizovaný plazmid byl uchováván v  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Mutovaný gen byl pomocí restričních endonukleáz *Bam*H I a *Eco*R I vyštěpen z původního plazmidu. Vyštěpený gen byl izolován z gelu (4.3.2.4) a ligován do linearizovaného „čistého“ plazmidu (4.3.2.9) a transformován do buněk *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Pozitivní klony byly detekovány metodou „Cracking gel“ (4.3.2.10), při které je možné ověřit velké množství klonů během krátké doby. Z vybraných klonů byl opět izolován plazmid, který byl podroben sekvenační reakci.

Expresní vektory byly uchovávány v  $-20^{\circ}\text{C}$  a z ověřených buněčných klonů, které je obsahovaly, byly připraveny glycerinové konzervy (4.3.1.4).

## **5.2 Exprese a izolace proteinů**

### **5.2.1 Transformace plazmidů do buněk *E. coli* BL21**

Expresní vektory byly vneseny do kompetentních buněk *E. coli* kmenu BL21 ( které jsou doporučeny pro expresi a izolaci proteinů) transformačním postupem. Tyto buňky nejsou vhodné pro práci s DNA. Protože obsahují endonukleázu A, je nutné modifikovat postupy preparací (4.3.2.1), jinak dochází k degradaci plazmidové DNA. Dalším problémem je nízká účinnost transformace těchto buněk, na kterou upozorňuje výrobce (experimentálně potvrzeno).

### **5.2.2 Izolace proteinů**

Elongační faktory a G-domény z *B. stearothermophilus* byly izolovány ze 300 ml kultury buněk. Preparace trvala 2 dny (4.3.3.1). Vlastní vazba fúzního proteinu probíhala ve dvou falkonkách. Důvodem byla lepší možnost promytí fúzního proteinu. Po promytí fúzního proteinu byla GS4B v každé falkonce resuspendována ve 150  $\mu\text{l}$  štěpícího pufru a obsahy obou falkonek byly přepipetovány do jedné mikrozkuřavky o objemu 1,9 ml. Nebylo možné štěpit faktorem Xa přes noc (cca 16 hodin), neboť docházelo k nespecifickému štěpení proteinů v přirozeně citlivé oblasti za Arg 59. Z tohoto důvodu

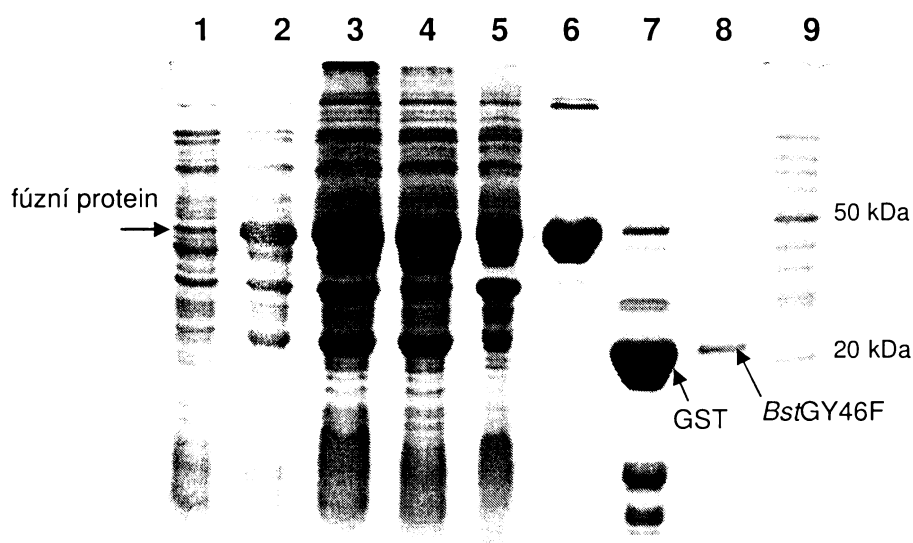
byly tyto proteiny štěpeny pouze 1 hodinu větším množstvím faktoru Xa (40 U). Tyto podmínky byly určeny již při předchozí optimalizaci metody [106]. Bylo také zjištěno, že je velmi důležité, jaký faktor Xa použijeme. Vyzkoušeny byly 3 faktory Xa od firem Amersham Biosciences, Qiagen, Novagen. V případě proteinů z *B. stearotherophilus* bylo možné použít pouze faktor Xa od firmy Amersham, při použití enzymů od zbylých dvou firem docházelo k rozpadu proteinů i během jednohodinového štěpení. Pro naše potřeby byl izolovaný protein štěpen z fúzního proteinu navázaného na GS4B a štěpení bylo ukončeno přidáním PMSF na výslednou koncentraci 1 mM.

V EF-Tu z *E. coli* není oblast Arg 59 citlivá na faktor Xa a je tedy možné štěpit faktorem Xa přes noc. Volba faktoru neměla vliv na kvalitu proteinu a byl tedy používán faktor Xa od firmy Qiagen, který je levnější. Ostatní postup byl zcela shodný (4.3.3.1).

V případě izolace G-domény z *E. coli* jsme vycházeli z 1 l kultury buněk, neboť exprimovaná G-doména tvoří z velké části nerozpustná inkluzní tělíska (špatně sbalená forma proteinu). Sediment buněk byl před přípravou lyzátu resuspendován ve 20 ml sonikačního pufru. Další postup byl již zcela shodný, bylo použito stejné množství GS4B jako pro ostatní izolace, přestože vycházíme z většího množství kultury (4.3.3.1).

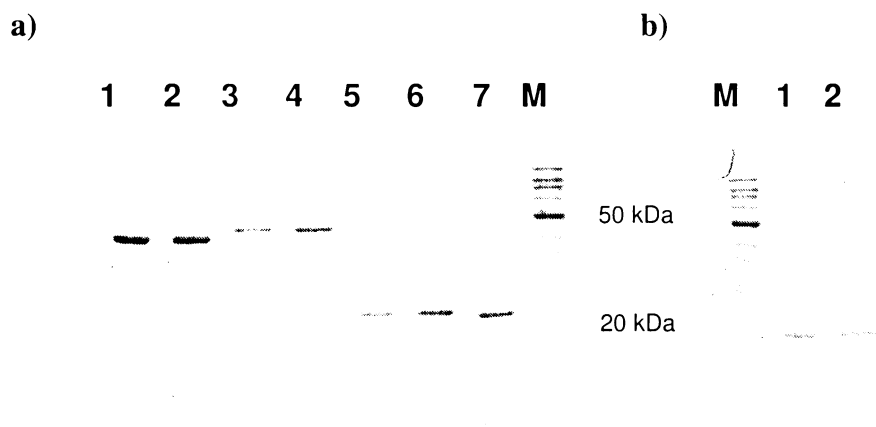
Koncentrace proteinů byla určena metodou podle Bradfordové za použití hovězího sérového albuminu jako standardu (4.3.3.2). Výsledná koncentrace proteinů se pohybovala kolem 1 µg/µl, výtěžek z jedné preparace byl přibližně 500 µg proteinu. V případě G-domény z *E. coli* bylo dosahováno výtěžků kolem 300 µg.

Čistota proteinu byla ověřena pomocí SDS-PAGE (4.3.3.3) (obr. 5.2, str. 62). Stejným způsobem byla monitorována i exprese a přítomnost fúzního proteinu v různých krocích postupu. Nejprve bylo odebráno 150 µl kultury buněk těsně před indukcí exprese proteinu IPTG. Po ukončení indukce bylo odebráno stejné množství kultury. Dále byly odebrány vzorky z lyzátu, supernatantu a sedimentu po centrifugaci lyzátu, navázaného fúzního proteinu na GS4B a GS4B po štěpení faktorem Xa (obr. 5.3, str. 62). Vzorky buněčných kultur byly centrifugovány 3 minuty při 10 500x g a supernatant odsát vývěvou. Sediment byl resuspendován ve 35 µl tzv. cracking pufru (50 mM Tris·HCl, pH 6,8; 1 % SDS; 2 mM EDTA; 1 % 2-mercaptoethanol; 10% glycerol; 0,02 % bromfenolová modř;), promíchán na vortexu a 5 minut vařen. K ostatním odběrům byl přidán redukující vzorkový pufr a byly 5 minut vařeny.



Obr. 5.2 Produkce a izolace proteinu EF-Tu pomocí GST purifikačního systému. Ukázka izolace *BstGY46F*. Barveno pomocí Coomassie Brilliant Blue.

- Dráha -
- 1 – buňky před indukcí
  - 2 – buňky po indukci exprese fúzního proteinu
  - 3 – lyzát po sonikaci buněk
  - 4 – supernatant po centrifugaci lyzátu
  - 5 – sediment po centrifugaci lyzátu
  - 6 – fúzní protein navázaný na GS4B
  - 7 – GS4B po štěpení faktorem Xa
  - 8 – *BstGY46F*
  - 9 – standardy molekulových hmotností (ProteoLadder 100, firma NORGEN – Kanada)



Obr. 5.3 SDS-PAGE izolovaných proteinů. Barveno pomocí Coomassie Brilliant Blue.

- a) dráha
- 1 – *EcEF-Tu*
  - 2 – *EcEF-TuF46Y*
  - 3 – *BstEF-Tu*
  - 4 – *BstEF-TuY46F*
  - 5 – *BstG*
  - 6 – *BstG114V+A65S*
  - 7 – *BstGY46F*
- b) dráha
- 1 – *EcG*
  - 2 – *EcGF46Y*

M – proteinový hmotnostní marker (ProteoLadder 100)



## **5.3 Testování aktivity a termostability rekombinantních proteinů**

### **Testování schopnosti vázat guaninové nukleotidy**

Termostabilita proteinů byla testována schopností vázat guaninové nukleotidy po inkubaci (8 minut) v různých teplotních rozmezích (volených podle optima proteinu). Množství navázaného GDP nebo GTP bylo stanoveno filtrační technikou za použití nitrocelulózových filtrů (Millipore) (4.3.3.5-6). Výsledná koncentrace glycerolu v reakci nepřesáhla 5 %.

Od naměřených hodnot byla nejprve odečtena hodnota pozadí. Z naměřených hodnot byla určena teplota, při které byla opakovaně naměřena nejvyšší hodnota navázaného nukleotidu. Pro tuto teplotu bylo stanoveno 100 % aktivity proteinu. Ke grafickému zpracování výsledků byl použit program Microsoft Excel. Do grafů byla vynášena teplotní závislost aktivit na teplotě. K porovnávání termostabilit proteinů byla z grafů odečtena teplota, při které má protein aktivitu 50 % ( $\theta_{1/2}$ ).

Všechny zobrazené křivky závislosti vazebných aktivit jednotlivých EF-Tu a G-domén jsou průměrem několika měření, ve všech grafech jsou také znázorněny chybové úsečky (standardní odchylka).

### **GTPázová aktivita**

Další možností studia termostability je testování závislosti GTPázové aktivity na teplotě. Vnitřní GTPázová aktivita byla testována v prostředí 1 M KCl (4.3.3.7). Pro každý protein byla určena teplota, při které byla aktivita maximální. Pro 6 teplot (volených podle vazebné křivky pro GTP) byly udělány 2 odběry po 20 a 30 minutách průběhu reakce. V takto určeném optimu byl experiment zopakován, alikvoty byly odebírány po dobu 40 minut v 10 minutových intervalech.

Po odečtení hodnoty pozadí byly výsledky zpracovány pomocí programu Microsoft Excel. Byl určen poměr: pmol hydrolyzovaného GTP/pmol aktivního proteinu. Množství hydrolyzovaného GTP bylo určeno z poměru naměřené hodnoty v daném čase (po odečtení pozadí) a vkládaného množství radioaktivity na pmol GTP (určeno změřením aktivity směsi). Aktivní frakci proteinu byla určena z GTP vazby (resp. z GDP vazby, pokud nebyl rozdíl mezi GDP a GTP vazbou).

### **Rychlost disociace**

Rychlostní konstanta disociace byla dalším parametrem měřeným u proteinů obsahujících záměnu v poloze 46 (4.3.3.8-9). Všechny proteiny byly testovány při teplotě 0°C (měření při vyšší teplotě je často technicky nemožné), pouze EF-Tu a EF-TuF46Y z *E. coli* byly testovány při 37°C (pro určení disociace GDP z komplexu). Po odečtení pozadí byly hodnoty zpracovány pomocí programu Microsoft Excel. Byl určen poměr koncentrace GDP v komplexu s proteinem v určitém čase  $t$  a koncentrace v čase 0 minut (resp. 0 sekund) ( $c_t/c_0$ ), který je roven poměru naměřených hodnot v daných časech (cpm). V grafu byla vynesena závislost  $\ln(c_t/c_0)$  na čase.

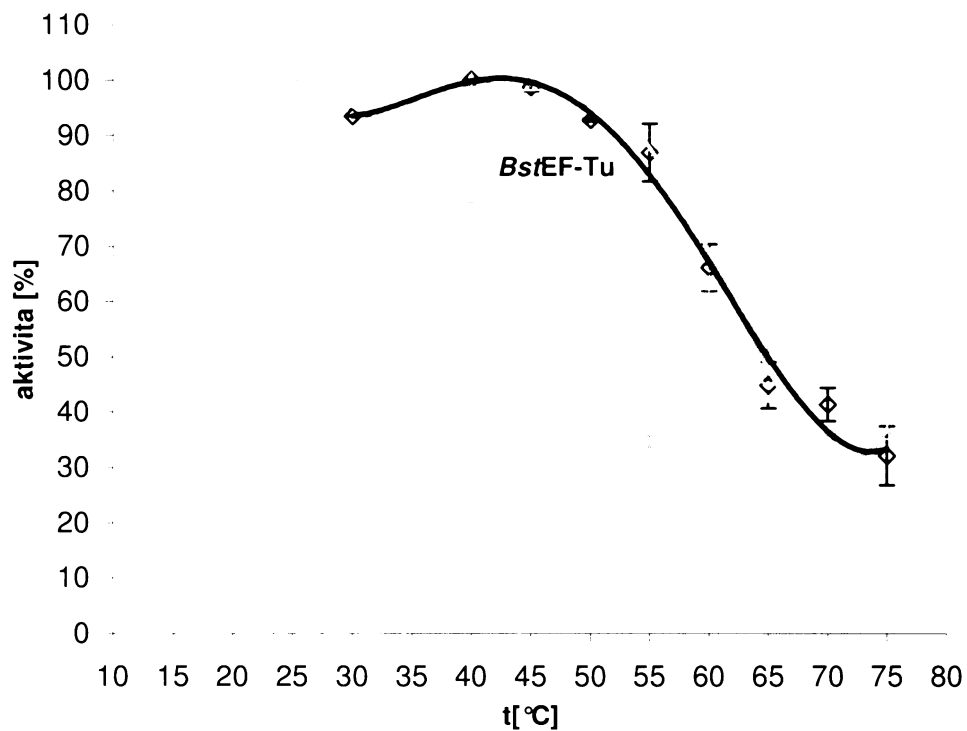
### **5.3.1 Vliv mutace v poloze 46 na termostabilitu a aktivitu EF-Tu a G-domény z *B. stearothermophilus***

Termostabilita obou proteinů není záměnou Tyr za Phe v poloze 46 výrazně ovlivněna ani v GDP formě (obr. 5.4a, str. 67) ani v GTP formě (obr. 5.4b, str. 67). V tabulce 5.2 (str. 68) jsou uvedeny jednotlivé hodnoty  $\theta_{1/2}$ . K velmi malému poklesu (o 2°C) došlo pouze u G-domény v GDP formě.

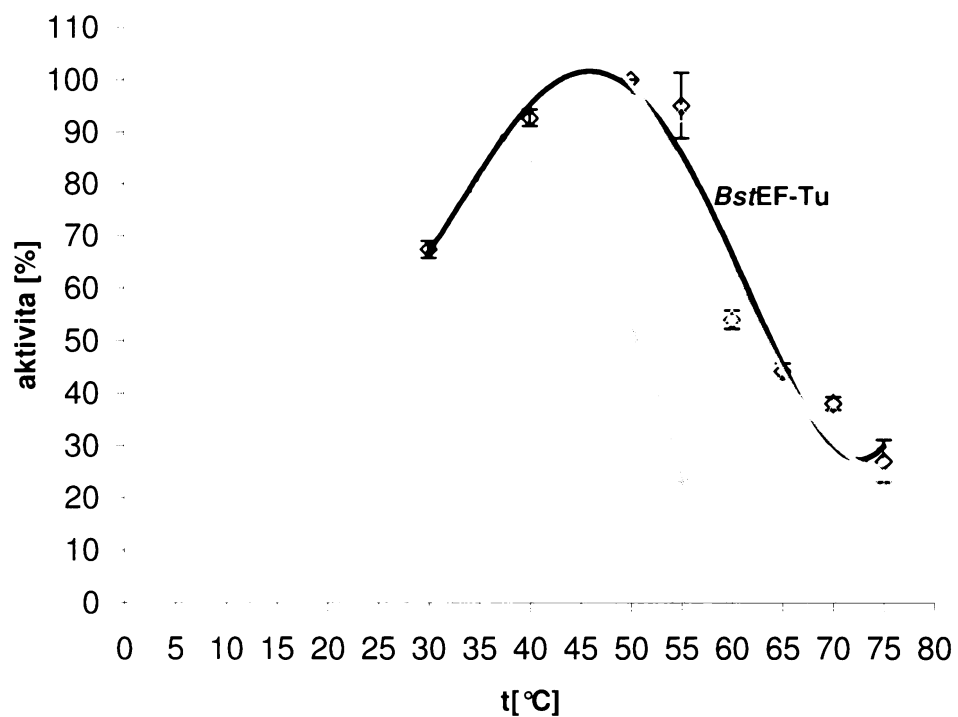
Změřena byla také GTPázová aktivita G-domén (obr. 5.5, str. 68). Optimum GTPázové aktivity bylo jak pro nemutovaný tak pro mutovaný protein shodné, maximální aktivitu měly při 55°C. Aktivita mutované G-domény však byla přibližně o 30 % nižší (tab. 5.3, str. 68).

V rychlostech disociace nebyl naměřen žádný rozdíl mezi proteiny přirozenými a mutovanými, to platí pro celé elongační faktory i pro samotné G-domény z *B. stearothermophilus*. Jednotlivé hodnoty  $\theta_{1/2}$  jsou uvedeny v tabulce 5.3 (str. 68), graf je zde uveden jen jeden pro názornost (obr. 5.6, str. 69), všechny ostatní závislosti měly podobný průběh.

a) GDP forma



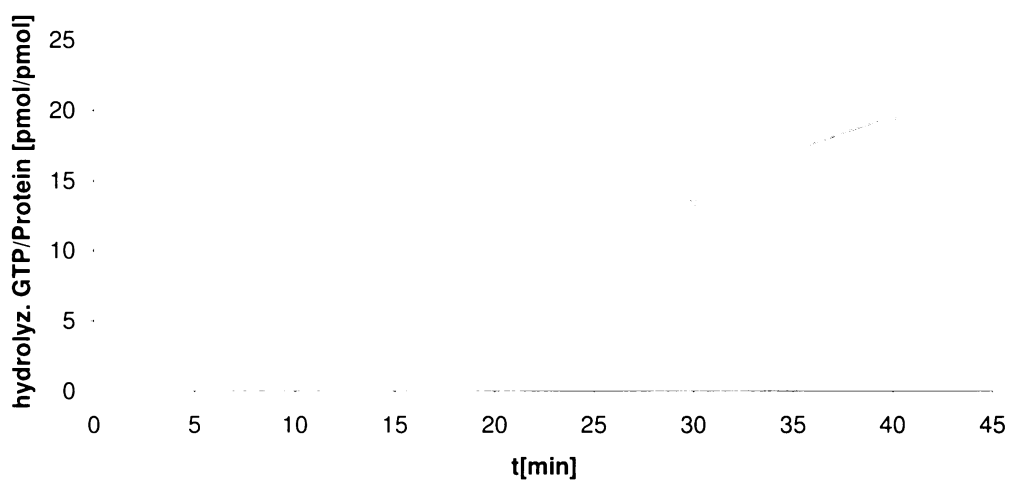
b) GTP forma



Obr. 5.4 Teplotní závislost schopnosti proteinů vázat a) GDP, b) GTP; *BstEF-Tu* (◇), *BstEF-TuY46F* (Δ), *BstG* (◆), *BstGY46F* (▲).

Protein	$\theta_{1/2}$ [°C]	
	GDP	GTP
<i>Bst</i> G	50	50,5
<i>Bst</i> GY46F	48	50
<i>Bst</i> EF-Tu	65	64
<i>Bst</i> EF-TuY46F	64,5	64

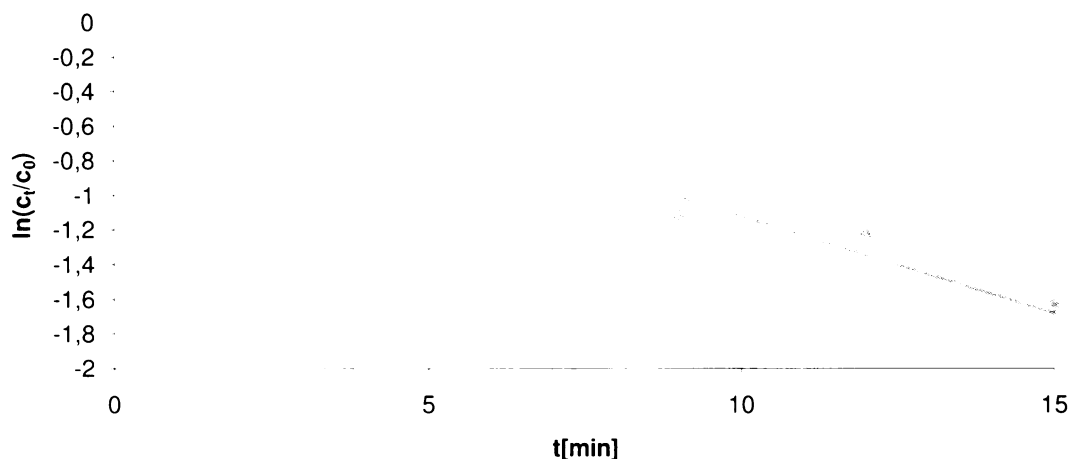
Tab. 5.2 Teploty, kdy je 50% proteinů aktivních ( $\theta_{1/2}$ ) ve vazbě GDP nebo GTP.



Obr. 5.5 GTPázová aktivita – časová závislost hydrolyzy GTP účinkem *Bst*G (◆) a *Bst*GY46F (▲)

Protein	$k_{-1}$ (GDP) [s <sup>-1</sup> ]	$k_{-1}$ (GTP) [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]
<i>Bst</i> G	$(18,7 \pm 0,0) \times 10^{-4}$	$(10,7 \pm 0,7) \times 10^{-3}$	$(8,17 \pm 0,46) \times 10^{-3}$
<i>Bst</i> GY46F	$(18,6 \pm 1,2) \times 10^{-4}$	$(10,6 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(5,42 \pm 0,04) \times 10^{-3}$
<i>Bst</i> EF-Tu	$(1,88 \pm 0,16) \times 10^{-4}$	$(8,32 \pm 0,20) \times 10^{-3}$	
<i>Bst</i> EF-TuY46F	$(1,69 \pm 0,11) \times 10^{-4}$	$(8,93 \pm 0,27) \times 10^{-3}$	

Tab. 5.3 Hodnoty rychlostních konstant ( $k_{-1}$ ) pro disociaci GDP/GTP z komplexů proteinů a hodnoty rychlostních konstant katalýzy ( $k_{cat}$ ) G-domén.



Obr. 5.6 Rychlost disociace komplexu proteinu v GDP formě; *BstG* (◆), *BstGY46F* (▲)

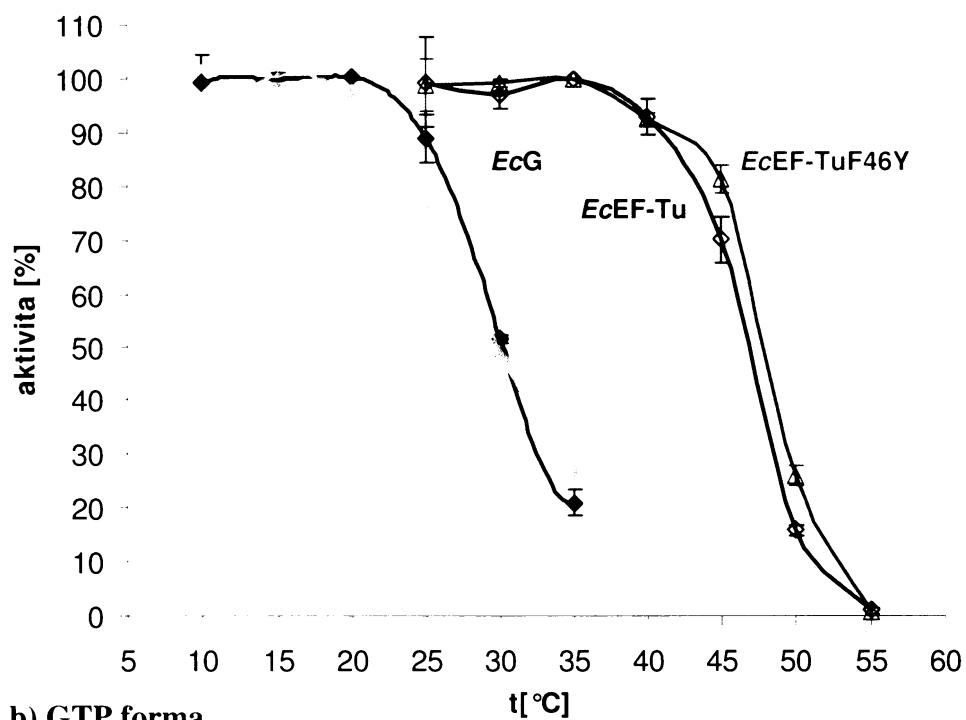
### 5.3.2 Vliv mutace v poloze 46 na termostabilitu a aktivitu EF-Tu a G-domény z *E. coli*

K výrazné změně termostability proteinů záměnou Phe za Tyr v poloze 46 nedošlo ani v GDP ani v GTP formě (obr. 5.7, str. 70). V tabulce 5.4 (str. 71) jsou uvedeny jednotlivé hodnoty  $\theta_{1/2}$ .

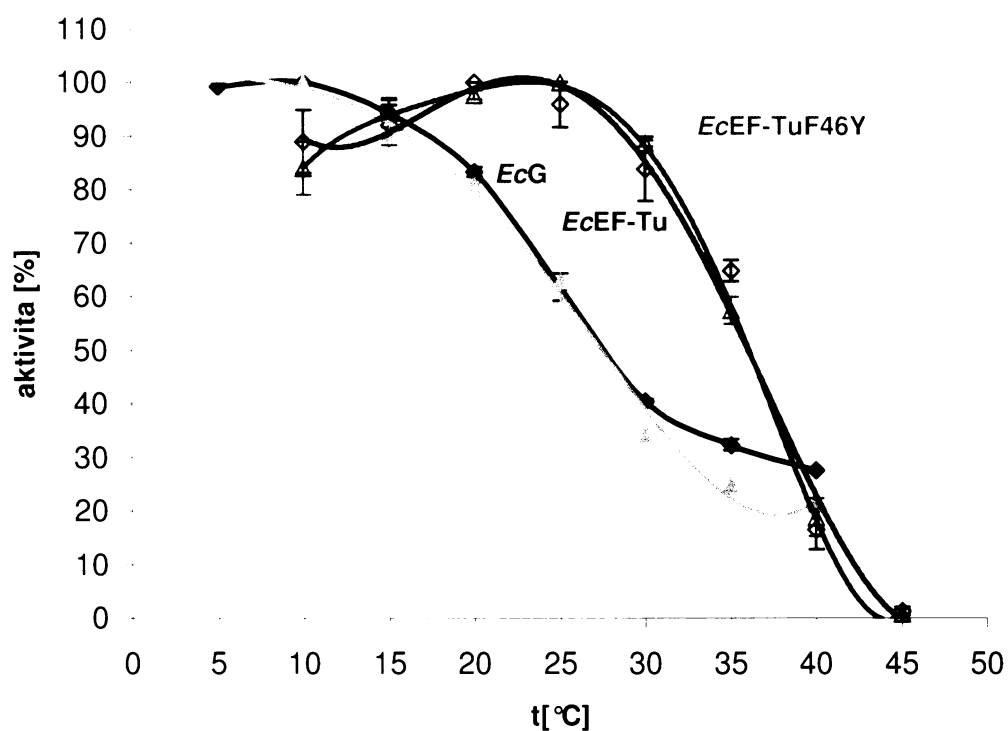
Rychlostní konstanty disociace byly změřeny pouze pro celé elongační faktory, hodnoty jsou zaznamenány v tabulce 5.5 (str. 72). Rychlost disociace EF-TuF46Y-GDP byla přibližně o 14 % nižší (při teplotě 0°C) než rychlost disociace přirozeného komplexu. Při teplotě 37°C byl zaznamenán stejný trend, ale naměřený rozdíl byl asi 30 % (obr. 5.8 a, str. 71). U GTP komplexů byla zjištěna zcela opačná situace, GTP komplex mutovaného EF-Tu disocioval asi o 50 % rychleji než komplex přirozeného EF-Tu (obr. 5.8 b, str. 71).

Byla také porovnána GTPázová aktivita elongačních faktorů. GTPázová aktivita *EcEF-TuF46Y* byla o 45 % vyšší než GTPázová aktivita *EcEF-Tu* při stejném teplotním optimu (40°C) (obr. 5.9, tab. 5.6, str. 72).

a) GDP forma



b) GTP forma

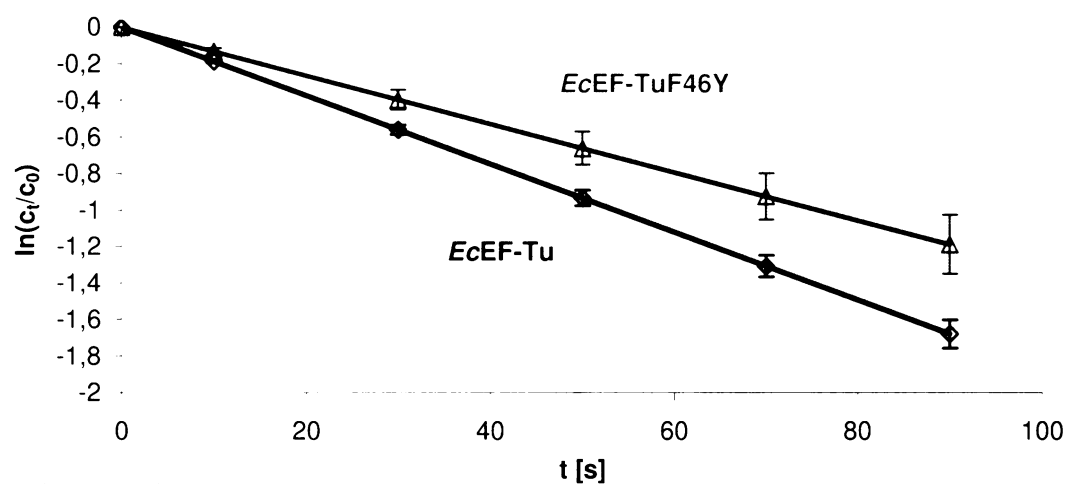


Obr. 5.7 Tepelná závislost schopnosti vázat a) GDP, b) GTP; *EcEF-Tu* (◇), *EcEF-TuF46Y* (Δ), *EcG* (◆), *EcGF46Y* (▲).

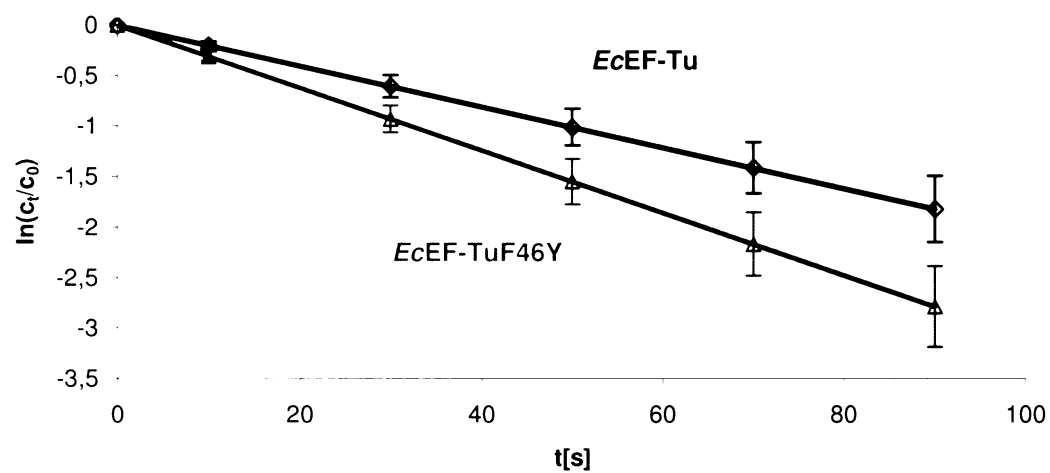
Protein	$\theta_{1/2} [^{\circ}\text{C}]$	
	GDP	GTP
<i>EcG</i>	30	27,5
<i>EcGF46Y</i>	30	27,5
<i>EcEF-Tu</i>	47	36
<i>EcEF-TuF46Y</i>	48	36

Tab. 5.4 Teploty, kdy je 50% proteinů aktivních ( $\theta_{1/2}$ ) ve vazbě GDP nebo GTP.

a) GDP (37°C)



b) GTP (0°C)



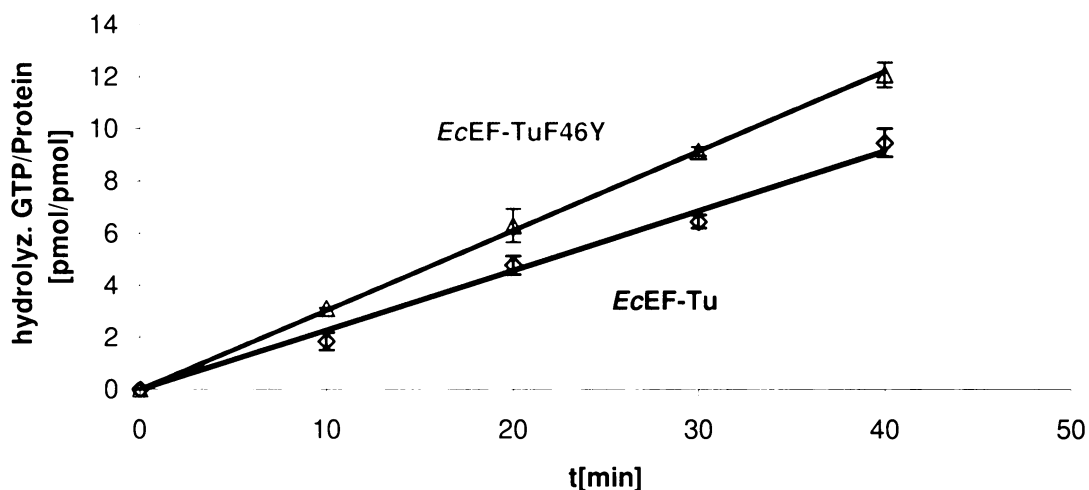
Obr. 5.8 Rychlost disociace komplexu proteinu v a) GDP formě při teplotě 37°C, b) GTP formě při 0°C; *EcEF-Tu* ( $\diamond$ ), *EcEF-TuF46Y* ( $\Delta$ )

Protein	$k_{-1}$ (GDP) - 0°C[s <sup>-1</sup> ]	$k_{-1}$ (GDP) - 37°C[s <sup>-1</sup> ]	$k_{-1}$ (GTP) [s <sup>-1</sup> ]
<i>EcEF-Tu</i>	$(5,78 \pm 0,50) \times 10^{-4}$	$(1,87 \pm 0,09) \times 10^{-2}$	$(2,02 \pm 0,36) \times 10^{-2}$
<i>EcEF-TuF46Y</i>	$(4,98 \pm 0,37) \times 10^{-4}$	$(1,32 \pm 0,18) \times 10^{-2}$	$(3,10 \pm 0,45) \times 10^{-2}$

Tab. 5.5 Hodnoty rychlostních konstant disociace ( $k_{-1}$ ) pro GDP/GTP komplexy elongačních faktorů.

Protein	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]
<i>EcEF-Tu</i>	$(3,51 \pm 0,11) \times 10^{-3}$
<i>EcEF-TuF46Y</i>	$(5,09 \pm 0,15) \times 10^{-3}$

Tab. 5.6 Hodnoty rychlostních konstant katalýzy ( $k_{cat}$ ) elongačních faktorů.



Obr. 5.9 GTPázová aktivita – časová závislost hydrolyzy GTP účinkem *EcEF-Tu* (◇), *EcEF-TuF46Y* (Δ)

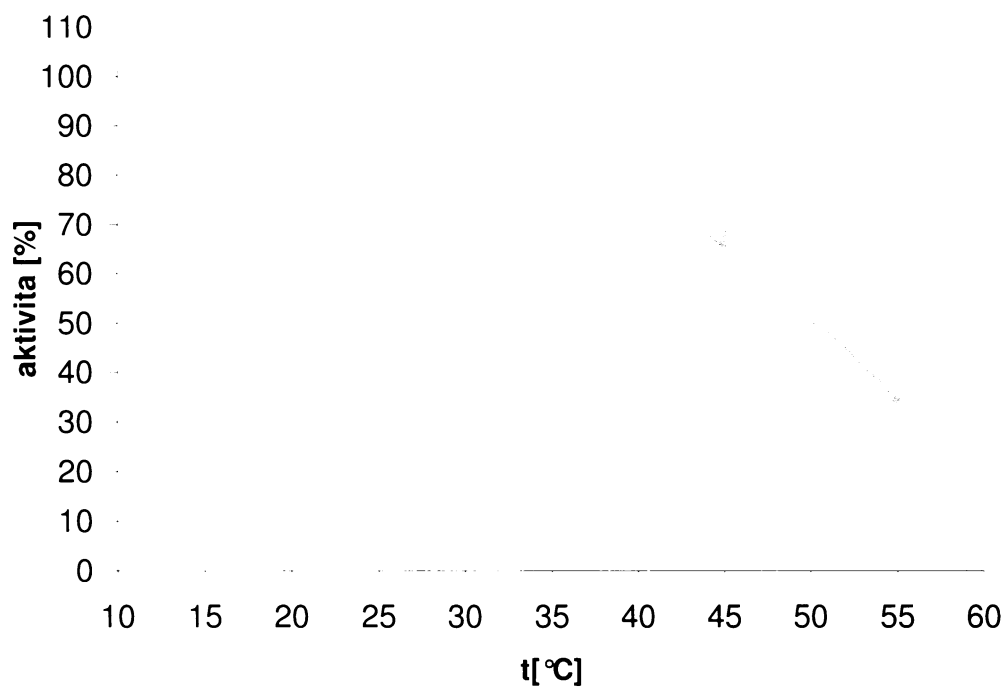
### 5.3.3 Vliv mutace v poloze 14 a 65 na termostabilitu a aktivitu G-domény z *B. stearothermophilus*

Záměny I14V a A65S vedou k výraznému snížení termostability (o 6°C) G-domény z *B. stearothermophilus* v obou jejích formách (tab. 5.7, str. 74), tj. jak v GDP formě (obr. 5.10 a, str. 73) tak i v GTP formě (obr. 5.10 b, str. 73).

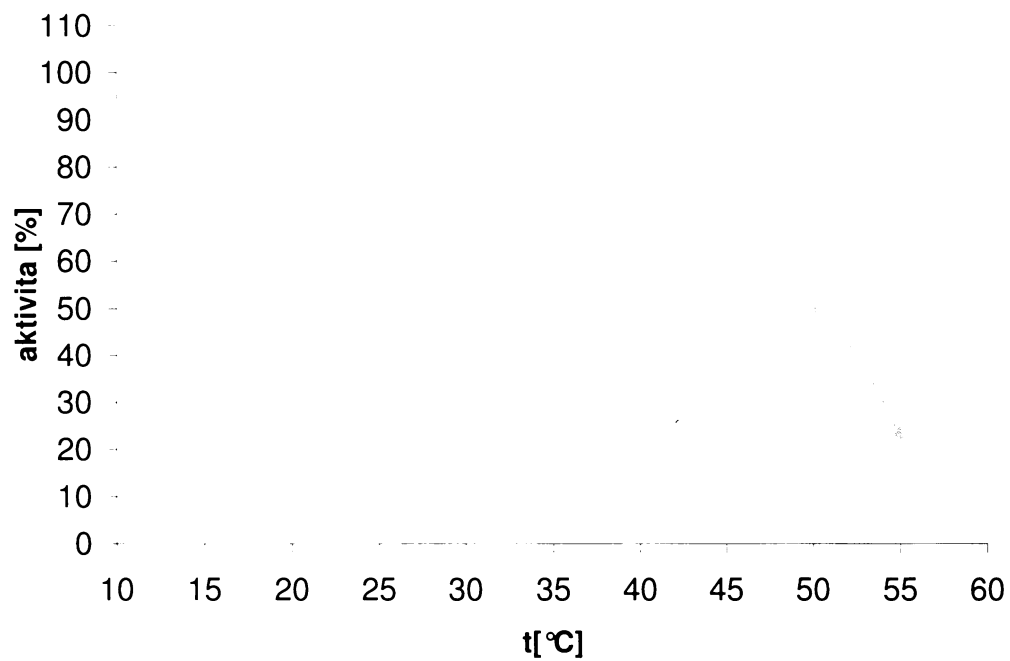
Optimum GTPázové aktivity mutované G-domény bylo posunuto o 5°C níže (z 55°C na 50°C), maximální aktivita však snížena nebyla, byl zaznamenán dokonce mírný nárůst (necelých 10 %) (obr. 5.11, tab. 5.8, str. 74).



**a) GDP forma**



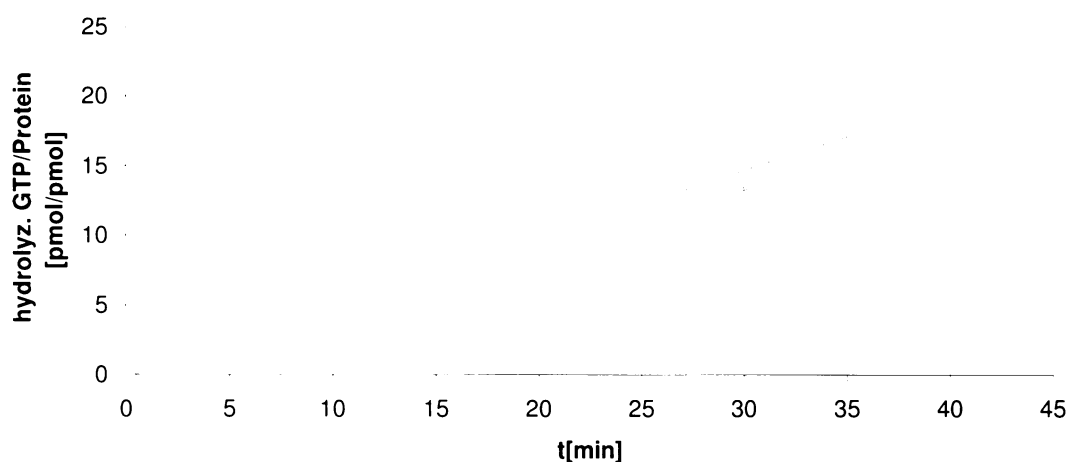
**b) GTP forma**



Obr. 5.10 Teplotní závislost schopnosti G-domén vázat a) GDP, b) GTP; *BstG* (◆), *BstGI14V+A65S* (▲).

Protein	$\theta_{1/2}$ [°C]	
	GDP	GTP
<i>BstG</i>	50	50,5
<i>BstG</i> I14V+A65S	44,5	44,5

Tab. 5.7 Teploty, kdy je 50% proteinů aktivních ( $\theta_{1/2}$ ) ve vazbě GDP nebo GTP.



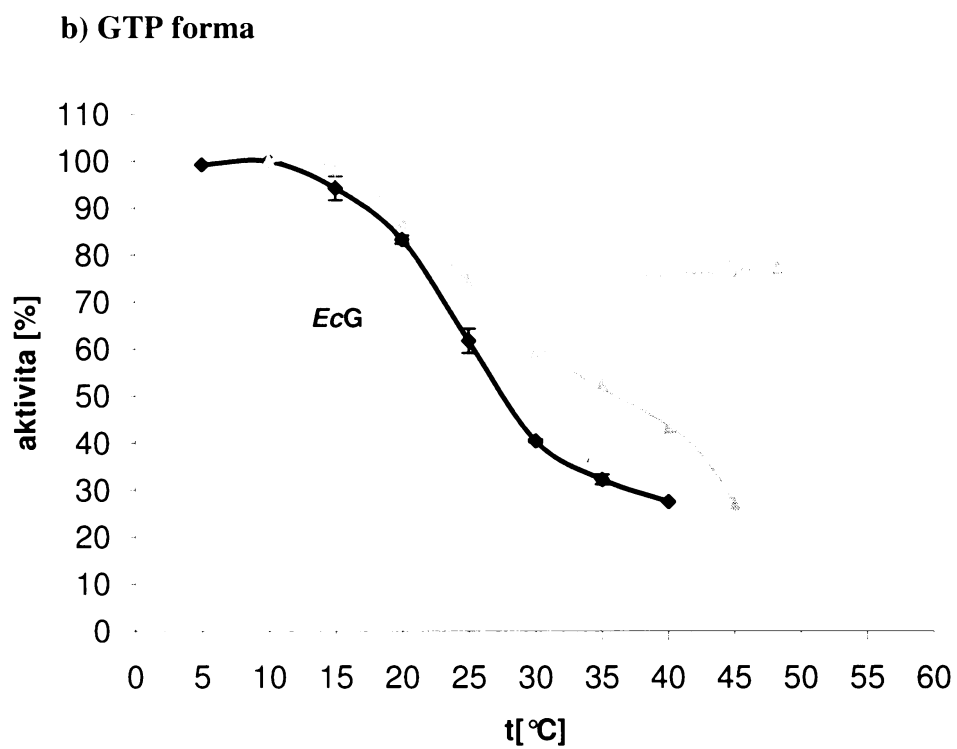
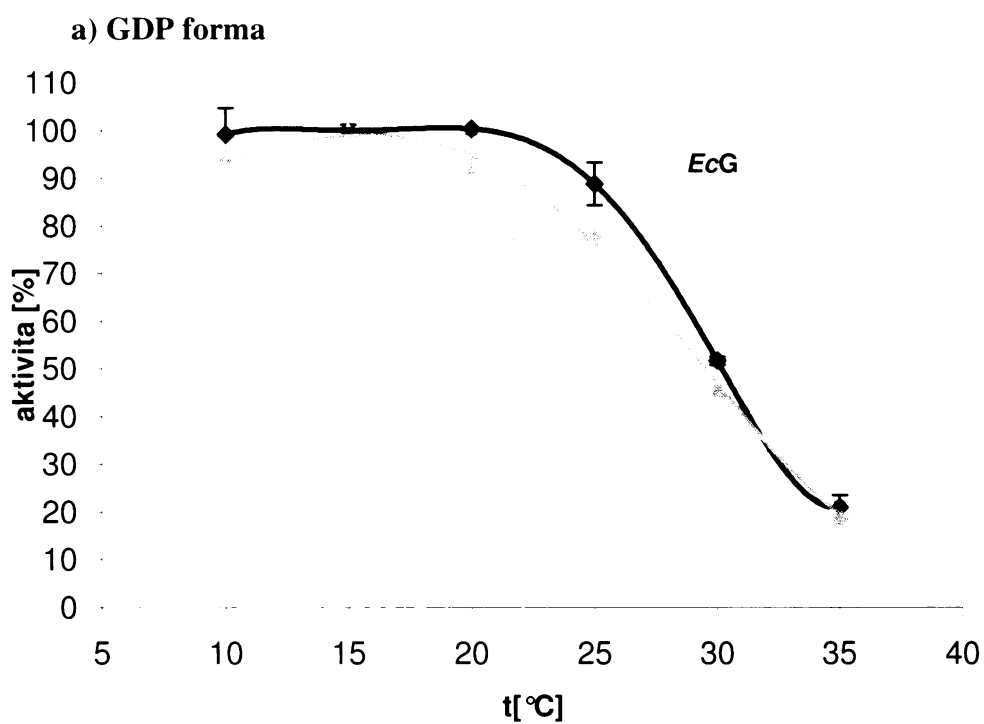
Obr. 5.11 GTPázová aktivita – časová závislost hydrolyzy GTP účinkem *BstG* (◆), *BstGI14V+A65S* (▲)

Protein	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]
<i>BstG</i>	$(8,17 \pm 0,46) \times 10^{-3}$
<i>BstGI14V+A65S</i>	$(8,83 \pm 0,35) \times 10^{-3}$

Tab. 5.8 Hodnoty rychlostních konstant katalýzy ( $k_{cat}$ ) G-domén.

### 5.3.4 Vliv mutace v poloze 14 a 65 na termostabilitu a aktivitu G-domény z *E.coli*

Záměny I14V a A65S vedou ke zvýšení termostability G-domény o 8,5°C v GTP formě, v GDP formě dochází k velmi malému poklesu (o 1,5°C) (obr. 5.12, str. 75, tab. 5.9, str. 76).



Obr. 5.12 Teplotní závislost schopnosti G-domén vázat a) GDP, b) GTP; EcG (◆), EcGV14I+S65A (▲).

Protein	$\theta_{1/2} [^{\circ}\text{C}]$	
	GDP	GTP
<i>EcG</i>	30	27,5
<i>EcGV14I+S65A</i>	28,5	36

Tab. 5.9 Teploty, kdy je 50% proteinů aktivních ( $\theta_{1/2}$ ) ve vazbě GDP nebo GTP.

## 6 Diskuze

### 6.1 EF-Tu z *B. stearothermophilus* a *E. coli*

EF-Tu z *B. stearothermophilus* patří mezi termofilní enzymy s teplotním optimumem aktivity okolo 55 °C. Díky spolupráci s oddělením krystalografie Dr. Hilgenfelda v Jeně jsme měli k dispozici počítačem vytvořené homologní modely tohoto proteinu v aktivní i neaktivní konformaci. Jako vzory pro modelování sloužily krystalové struktury EF-Tu·GDPNP z *T. thermophilus* [4] a EF-Tu·GDP z *E. coli* [40]. Díky vysoké identitě sekvencí EF-Tu z *B. stearothermophilus* a proteinu z *T. thermophilus* a *E. coli*, která je 78 % resp. 75 %, lze počítačové modely trojrozměrné struktury EF-Tu z *B. stearothermophilus* považovat za velmi reálné [24].

Již dříve bylo experimentálně prokázáno, že EF-Tu z *B. stearothermophilus* může funkčně nahradit EF-Tu z *E. coli* a oba mohou pracovat v proteosyntetických systémech s ribozómy z opačných organizmů [28; 107]. Přitom EF-Tu z *B. stearothermophilus* je stabilní při teplotě nejméně o 20-25°C vyšší než EF-Tu z *E. coli*, je tedy značně termostabilnější.

To byly hlavní důvody, spolu s rozsáhlým souborem znalostí o struktuře obou proteinů, které vedly k myšlence využít právě tyto molekuly EF-Tu z obou těchto organizmů k hledání strukturálních motivů podmiňujících jejich rozdílnou termostabilitu.

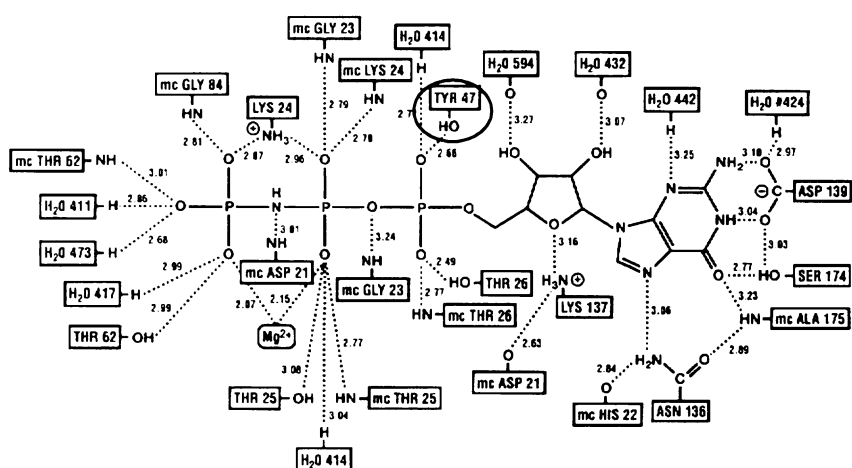
### 6.2 Výběr aminokyselin vhodných k záměně

EF-Tu z *B. stearothermophilus* a *E. coli* mají 75 % sekvencní identitu, liší se tedy 97 aminokyselinami, G-domény mají 81% homologii, což odpovídá 38 záměnám. Na základě porovnání struktur a sekvencí těchto proteinů, byly vybrány aminokyseliny, které by mohly být zodpovědné za vyšší termostabilitu EF-Tu z *B. stearothermophilus*. V této práci byly vybrány aminokyseliny nacházející se v poloze 14, 46 a 65 v G doméně proteinu. Ve všech případech byla provedena vzájemná výměna aminokyselin mezi proteiny.

Jak již bylo zmíněno v úvodu, základ termostability celého EF-Tu je dán termostabilitou G-domény. Z tohoto důvodu byly vybrány aminokyseliny nacházející se v G-doménách elongačních faktorů.

V krystalové struktuře EF-Tu·GDPNP z *T. thermophilus* bylo zjištěno, že Tyr v poloze 46 vytváří vodíkový můstek s  $\alpha$ -fosfátem GTP [4] (obr. 6.1). U

*B. stearotherophilus* se v poloze 46 také nachází Tyr [24], zatímco v EF-Tu z *E. coli* je v této pozici Phe, který nemůže vytvářet stejné interakce. To nás vedlo k hypotéze, že tato dodatečná vazba by mohla být jedním z příspěvků ke zvýšení tepelné stability u termofilního EF-Tu ve srovnání s EF-Tu z *E. coli* [24]. Záměnou těchto aminokyselin měla být tato hypotéza ověřena, tj. měl se zjistit vliv tohoto vodíkového můstku navíc na termostabilitu a funkci EF-Tu (resp. samotných G-domén).



Obr. 6.1 Diagram interakcí mezi GDPNP (nehydrolyzovatelný analog GTP) a ak zbytky EF-Tu z *T. thermophilus*, vodíkové můstky jsou značeny čárkovaně; modře je označen Tyr 47 (resp. Tyr 46 u EF-Tu z *B. stearotherophilus*), upraveno podle [4].

Aminokyseliny 14 a 65 se nacházejí v jádře G-domény. V případě proteinu z *B. stearotherophilus* se v poloze 14 nachází Ile a v poloze 65 Ala. Naopak v proteinu z *E. coli* jsou v těchto polohách Val 14 a Ser 65, tedy zbytky méně hydrofobní než Ile a Ala. Z předchozí práce v laboratoři [86] vyplynulo, že jedním (a možná hlavním) z principů vyšší termostability G-domény z *Bst*EF-Tu ve srovnání s G-doménou z *Ec*EF-Tu je vyšší hydrofobicita jejího jádra, charakterizovaná snížením dostupnosti nepolárních ak zbytků pro molekuly rozpouštědla. K experimentálnímu ověření významu právě těchto ak zbytků v polohách 14 a 65 pro termostabilitu byly proto provedeny jejich vzájemné výměny. Práce navazuje na předběžné výsledky [86].

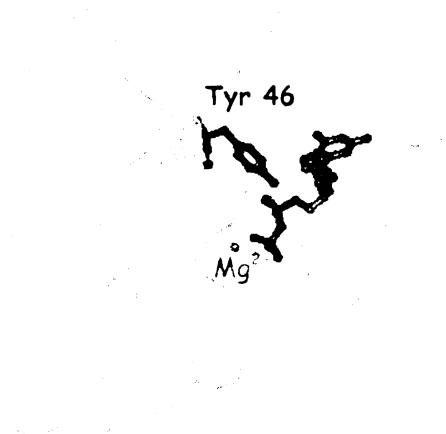
### 6.3 Konstrukce proteinů

Všechny experimenty byly provedeny s rekombinantně připravenými proteiny, které obsahovaly na N-konci tři ak zbytky navíc oproti buněčným elongačním faktorům (resp. G-doménám). Již dříve bylo v naší laboratoři ověřeno, že tyto tři ak zbytky nemají vliv na vazebné ani katalytické vlastnosti proteinů.

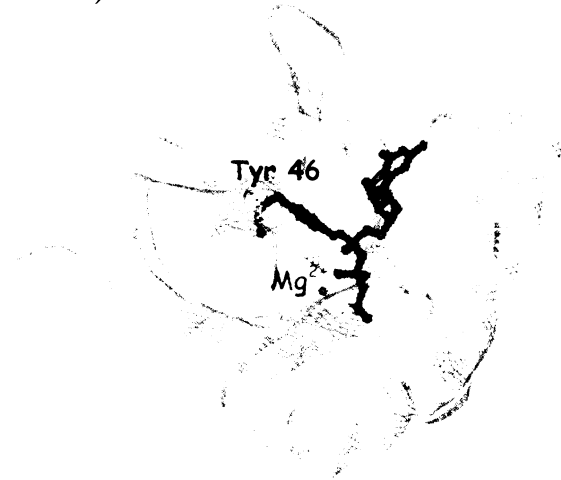
## 6.4 Mutace v poloze 46

Dle očekávání došlo u proteinů z *B. stearotherophilus* po vnesení záměny Y46F (obr. 6.2) k poklesu termostability (tab. 5.2, str. 68). Tento pokles byl však velmi malý, největší nastal u *Bst*GY46F v GDP formě a činil asi 2°C pro  $\theta_{1/2}$ . V ostatních případech došlo k poklesu maximálně 0,5°C. Ačkoliv jde o velmi malý rozdíl, tento trend byl pozorován při každém měření. Podobně málo výrazně zasáhla tato mutace, ovšem ve svém reciprokém provedení, i do termostability proteinů z *E. coli* (tab. 5.4, str.71). Jen v případě *Ec*EF-TuF46Y došlo ke zvýšení stability jeho GDP formy o 1°C, mutace vůbec neovlivnila GTP formu EF-Tu ani G-doménu. Přidání (resp. odebrání) hydroxylové skupiny podílející se na vazbě nukleotidu nemá tedy velký vliv na termostabilitu proteinu. To je překvapivé, neboť je známo, že zásah do aminokyselinových zbytků podílejících se na vazbě nukleotidu mívá vážné důsledky.

a) GDP forma



b) GTP forma



Obr. 6.2 Terciární struktura G-domény z *B. stearotherophilus* a) v GDP formě; b) v GTP formě. Modře je vyznačen Tyr 46.

Dalším překvapivým zjištěním byla nezměněná rychlost disociace nukleotidů z komplexu s termostabilními proteiny s mutací Y46F. Vysvětlením může být velké množství především vodíkových můstků podílejících se na vazbě nukleotidu. V krystalové struktuře EF-Tu z *T. thermophilus* v aktivní formě bylo zjištěno 29 vodíkových vazeb podílejících se na vazbě GTP (obr. 6.1, str. 78) [4]. Jak je patrné z našich výsledků, odebrání vodíkové vazby z Tyr 46 nevede zřejmě k větší labilizaci vazby nukleotidů.

Očekávaný výsledek byl získán při měření rychlosti disociace EF-Tu·GDP z *E. coli*. Rychlost disociace *EcEF-TuF46Y*·GDP byla snížena o 14 % při 0°C (resp. o 30 % při 37°C) vzhledem k hodnotě nemutovaného proteinu. U GTP formy *EcEF-TuF46Y* byl však pozorován zcela opačný trend, disociace GTP z mutovaného proteinu byla zrychlena o 50 % při 0°C:  $k_{-1}(\text{EcEF-Tu}\cdot\text{GTP}) = (2,02 \pm 0,36) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{-1}(\text{EcEF-TuF46Y}\cdot\text{GTP}) = (3,10 \pm 0,45) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Z prozatím dosažených výsledků vyplývá, že hydroxylová skupina Tyr nějak stabilizuje vazbu GDP, ale destabilizuje vazbu GTP. Zdá se, že v aktivní konformaci dochází k stérickému pnutí po přidání hydroxylové skupiny. Tuto skutečnost nelze dosud bohužel ověřit na modelu proteinu, neboť model aktivní konformace EF-Tu z *E. coli* není k dispozici. Pro vytvoření přesnějších závěrů bude vhodné provést stejná měření i s příslušnými G-doménami z *E. coli*. Bude zajímavé zjistit, zda k stérickému pnutí dochází v rámci G-domény nebo při mezidoménových interakcích v rámci celého faktoru. Dále bude důležité zjistit rychlosti asociací s nukleotidy a určit disociační konstanty pro takto mutované proteiny.

Nejzajímavějším výsledkem je zjištění, že záměny výrazně ovlivnily kinetiku hydrolýzy GTP. Došlo ke změnám v rychlostních konstantách hydrolýzy GTP. Záměna Y46F v *BstGY46F* způsobila zpomalení hydrolýzy o 30 % oproti nativní *BstG* a opačný trend byl pozorován pro *EcEF-TuF46Y* zde měla záměna F46Y za výsledek naopak zvýšení rychlosti hydrolýzy GTP o 45 % vzhledem k nemutované formě. Záměny neměly vliv na teplotní optimum katalýzy, zcela ve shodě s předchozími vazebnými experimenty. Tento výsledek si zaslouží zvláštní pozornost vzhledem k snížené rychlosti disociace GDP u této mutanty. Pokud by docházelo k rychlejší disociaci GDP po hydrolýze, pak by bylo možné rychlejší katalýzu vysvětlit rychlejší reaktivací proteinu. Pozorovali jsme však pravý opak a nelze tedy odmítnout ani hypotézu, že možným vysvětlením zrychlení je spoluúčast tohoto ak zbytku při hydrolýze GTP. To by znamenalo, že Tyr 46 by se stal novým ak zbytkem podílejícím se na katalytickém procesu GTP hydrolýzy v *BstEF-Tu*. Mechanismus hydrolýzy GTP není dosud zcela objasněn a dosud nejsou známy všechny ak zbytky podílející se na hydrolýze. V našem případě bude nutné zjistit rychlost katalýzy pro G-domény z *E. coli* a celé elongační faktory z *B. stearothermophilus*.

## 6.5 Mutace v poloze 14 a 65

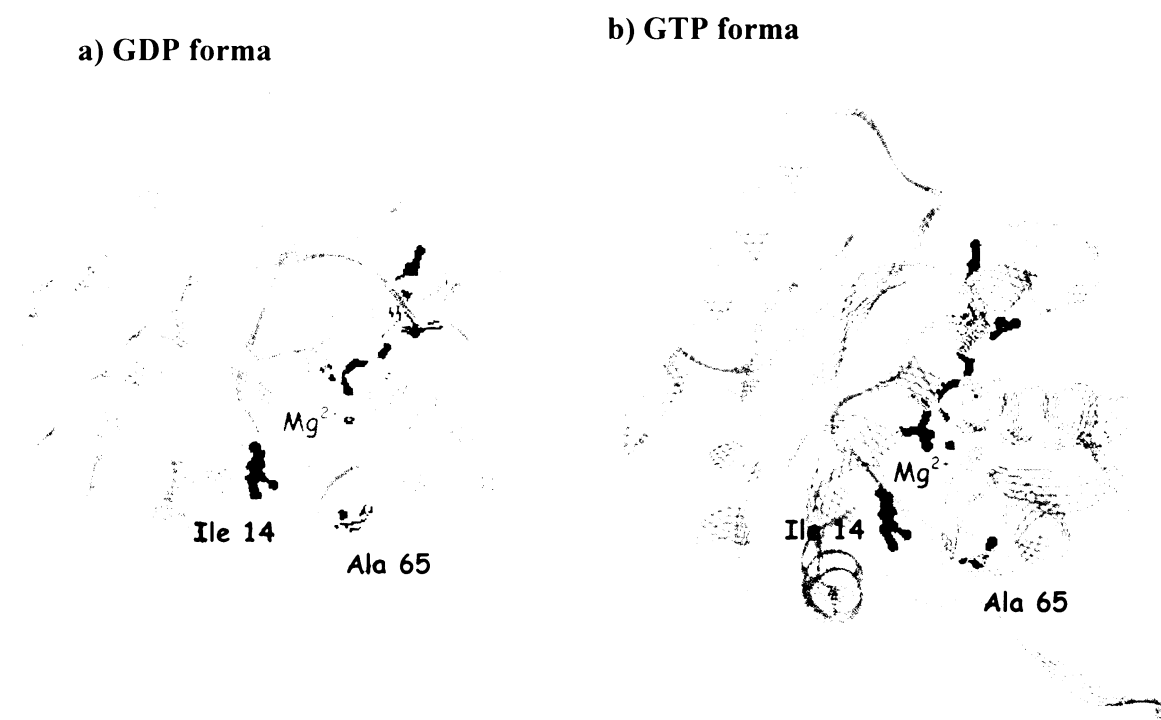
Dle očekávání poklesla termostabilita G-domén z *B. stearothermophilus* nesoucích záměny I14V a A65S v obou formách o 6°C. Došlo také k poklesu teplotního optima



GTPázové aktivity z 55°C na 50°C, rychlost katalýzy však byla dokonce mírně (o necelých 10 %) zvýšena. Pro G-doménu z *E. coli* nesoucí záměny V14I a S65A byl zjištěn velmi malý pokles termostability u GDP formy (o 1,5°C). Oproti tomu u GTP formy *EcGV14I+S65A* výrazně vzrostla termostabilita a to o 8,5°C. Tyto výsledky jsou plně v souladu s očekáváním, jediným překvapením je pokles termostability mutovaného proteinu v GDP formě. Pro tuto skutečnost není zatím žádné vysvětlení.

Tyto výsledky jsou zcela ve shodě s předešlými výsledky získanými v naší laboratoři, kdy bylo zjištěno, že pro jednotlivé záměny I14V nebo A65S došlo ke snížení termostability G-domén z *B. stearothermophilus* v obou formách o 4 – 6°C v  $\theta_{1/2}$  a u *EcGV14I* byl zaznamenán nárůst termostability o 2°C pouze u její **GTP formy** [86]. Zajímavé je, že jak při jednoduché tak i dvojité záměně došlo ke zvýšení termostability pouze v GTP formě. Odpověď je pravděpodobně možné hledat v konformaci obou forem G-domén. V GTP formě jsou ak zbytky nacházející se v polohách 14 a 65 více zanořené do nitra G-domény a jsou tedy méně přístupné polárním rozpouštědlu (obr 6.3). Pokud tudíž vložíme do těchto pozic hydrofobnější ak zbytky, jejich vliv na lepší sbalení proteinu a vyšší termostabilitu se projeví především v GTP formě.

Vzhledem k velkému nárůstu termostability bude znovu změřena termostabilita G-domén obsahujících jen jednu záměnu. Také bude změřena GTPázová aktivita G-domén z *E. coli*.



Obr. 6.3 Terciární struktura G-domény z *B. stearothermophilus* a) v GDP formě; b) v GTP formě. Červeně jsou vyznačeny ak zbytky Ile 14 a Ala 65.

## 7 Závěr

Bylo vytvořeno šest konstruktů pGEX-5X-3/*Ec*GV14I+S65A, pGEX-5X-3/*Bst*G114V+A65S, pGEX-5X-3/*Ec*GF46Y, pGEX-5X-3/*Ec*EF-TuF46Y, pGEX-5X-3/*Bst*GY46F a pGEX-5X-3/*Bst*EF-TuY46F pro přípravu rekombinantních forem EF-Tu a G-domén EF-Tu z *E. coli* a *B. stearothermophilus* obsahujících aminokyselinovou záměnu v poloze 46 a nebo dvě záměny současně v polohách 14 a 65. Sekvence vložených genů byla ověřena sekvenováním. Účelem experimentů bylo ověřit význam těchto aminokyselinových zbytků pro funkce a termostabilitu obou elongačních faktorů.

Pomocí GST purifikačního systému (afinitní chromatografie) byly izolovány mutantní formy G-domén a EF-Tu nesoucí požadované záměny a tytéž proteiny v nemutované formě. Termostabilita a aktivity těchto proteinů byly určeny.

Bylo zjištěno, že přítomnost (resp. nepřítomnost) hydroxylové skupiny v poloze 46 neměla výrazný vliv na termostabilitu proteinů. Byla však ovlivněna disociace nukleotidů z komplexů s proteiny z *E. coli*. Přítomnost hydroxylové skupiny navíc u *Ec*EF-TuF46Y snížila rychlost disociace GDP a naopak zvýšila rychlost disociace GTP. Nejzajímavějším výsledkem bylo objevení pozitivního účinku hydroxylové skupiny Tyr 46 na rychlost hydrolýzy GTP GTPázovým centrem G-domény. Tyr 46 by se tak mohl stát další aminokyselinou, která se katalytického procesu účastní.

Dále byl ověřen vliv hydrofobicity jádra na termostabilitu proteinů. Potvrdilo se, že záměny I14V a A65S snižující hydrofobicitu způsobily pokles termostability G-domény z *B. stearothermophilus* v obou jejích formách. Naopak zvýšením hydrofobicity jádra G-domény z *E. coli* pomocí záměn V14I a S65A bylo dosaženo výrazného zvýšení termostability proteinu v aktivní GTP formě. Experimenty tak potvrdily hypotézu, že zvýšení hydrofobicity je jedním z principů, který zajišťuje elongačním faktorům z termofilních bakterií vyšší tepelnou stabilitu než mají elongační faktory mezofilů.

## 8 Seznam použité literatury

1. Vieille C. & Zeikus G.J. (2001) *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 65, 1-43
2. Li W.F., Zhou X.X. & Lu P. (2005) *Biotechnol.Adv.* 23, 271-281
3. Zengel J.M. & Lindahl L. (1990) *Biochim.Biophys.Acta* 1050, 317-322
4. Berchtold H., Reshetnikova L., Reiser C.O., Schirmer N.K., Sprinzl M. & Hilgenfeld R. (1993) *Nature* 365, 126-132
5. Kjeldgaard M., Nissen P., Thirup S. & Nyborg J. (1993) *Structure.* 1, 35-50
6. Spahn C.M. & Nierhaus K.H. (1998) *Biol.Chem.* 379, 753-772
7. Pape T., Wintermeyer W. & Rodnina M. (1999) *EMBO J.* 18, 3800-3807
8. Brown S. & Blumenthal T. (1976) *J.Biol.Chem.* 251, 2749-2753
9. Brown D. & Gold L. (1996) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 11558-11562
10. Georgiou T., Yu Y.N., Ekunwe S., Buttner M.J., Zuurmond A., Kraal B., Kleanthous C. & Snyder L. (1998) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 2891-2895
11. Kraal B., Lippmann C. & Kleanthous C. (1999) *Folia Microbiol.(Praha)* 44, 131-141
12. Jacobson G.R. & Rosenbusch J.P. (1976) *Nature* 261, 23-26
13. Arai K., Clark B.F., Duffy L., Jones M.D., Kaziro Y., Laursen R.A., L'Italien J., Miller D.L., Nagarkatti S., Nakamura S., Nielsen K.M., Petersen T.E., Takahashi K. & Wade M. (1980) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77, 1326-1330
14. Alexander C., Bilgin N., Lindschau C., Mesters J.R., Kraal B., Hilgenfeld R., Erdmann V.A. & Lippmann C. (1995) *J.Biol.Chem.* 270, 14541-14547
15. Caldas T.D., El Yaagoubi A. & Richarme G. (1998) *J.Biol.Chem.* 273, 11478-11482
16. Spirin A.S., Kostiaschkina O.E. & Jonák J. (1976) *J.Mol.Biol.* 101, 553-562
17. Parmeggiani A. & Sander G. (1981) *Mol.Cell Biochem.* 35, 129-158
18. Mesters J.R., Zeef L.A., Hilgenfeld R., de Graaf J.M., Kraal B. & Bosch L. (1994) *EMBO J.* 13, 4877-4885
19. Anborgh P.H. & Parmeggiani A. (1991) *EMBO J.* 10, 779-784
20. Landini P., Bandera M., Soffientini A. & Goldstein B.P. (1993) *J.Gen.Microbiol.* 139, 769-774

21. Cetin R., Krab I.M., Anborgh P.H., Cool R.H., Watanabe T., Sugiyama T., Izaki K. & Parmeggiani A. (1996) *EMBO J.* 15, 2604-2611
22. Worner W., Glockner C., Mierzowski M. & Wolf H. (1983) *Fems Microbiology Lett.* 18, 69-73
23. Cappellano C., Monti F., Sosio M., Donadio S. & Sarubbi E. (1997) *Microbiology* 143 ( Pt 2), 617-624
24. Krasný L., Mesters J.R., Tieleman L.N., Kraal B., Fučík V., Hilgenfeld R. & Jonák J. (1998) *J.Mol.Biol.* 283, 371-381
25. Jonák J., Sedláček J. & Rychlík I. (1971) *FEBS Lett.* 18, 6-8
26. Sedláček J., Jonák J. & Rychlík I. (1971) *Biochim.Biophys.Acta* 254, 478-480
27. Jonák J., Petersen T.E., Clark B.F. & Rychlík I. (1982) *FEBS Lett.* 150, 485-488
28. Jonák J., Pokorna K., Meloun B. & Karas K. (1986) *Eur.J.Biochem.* 154, 355-362
29. Jonák J. & Karas K. (1989) *FEBS Lett.* 251, 121-124
30. Krásný L., Vacik T., Fučík V. & Jonák J. (2000) *J.Bacteriol.* 182, 6114-6122
31. Lindahl L. & Zengel J.M. (1986) *Annu.Rev.Genet.* 20, 297-326
32. Cousineau B., Cerpa C., Lefebvre J. & Cedergren R. (1992) *Gene* 120, 33-41
33. Filer D. & Furano A.V. (1981) *J.Bacteriol.* 148, 1006-1011
34. Sela S., Yogev D., Razin S. & Bercovier H. (1989) *J.Bacteriol.* 171, 581-584
35. Nomura M., Gourse R. & Baughman G. (1984) *Annu.Rev.Biochem.* 53, 75-117
36. Printz M.P. & Miller D.L. (1973) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 53, 149-156
37. Jonák J. & Rychlík I. (1973) *Biochim.Biophys.Acta* 324, 554-562
38. Kjeldgaard M., Nyborg J. & Clark B.F. (1996) *FASEB J.* 10, 1347-1368
39. Polekhina G., Thirup S., Kjeldgaard M., Nissen P., Lippmann C. & Nyborg J. (1996) *Structure.* 4, 1141-1151
40. Abel K., Yoder M.D., Hilgenfeld R. & Jurnak F. (1996) *Structure.* 4, 1153-1159
41. Song H., Parsons M.R., Rowsell S., Leonard G. & Phillips S.E. (1999) *J.Mol.Biol.* 285, 1245-1256
42. Ludwig W., Weizenegger M., Betzl D., Leidel E., Lenz T., Ludvigsen A., Mollenhoff D., Wenzig P. & Schleifer K.H. (1990) *Arch.Microbiol.* 153, 241-247
43. Gilman A.G. (1987) *Annu.Rev.Biochem.* 56, 615-649

44. Nissen P., Kjeldgaard M., Thirup S., Polekhina G., Reshetnikova L., Clark B.F. & Nyborg J. (1995) *Science* 270, 1464-1472
45. Nissen P., Thirup S., Kjeldgaard M. & Nyborg J. (1999) *Structure.Fold.Des* 7, 143-156
46. Clark B.F.C. & Nyborg J. (1997) *Curr.Opin.Struct.Biol.* 7, 110-116
47. Nyborg J. & Kjeldgaard M. (1996) *Curr.Opin.Biotechnol.* 7, 369-375
48. Kawashima T., Berthet-Colominas C., Wulff M., Cusack S. & Leberman R. (1996) *Nature* 379, 511-518
49. Wang Y., Jiang Y., Meyering-Voss M., Sprinzl M. & Sigler P.B. (1997) *Nat.Struct.Biol.* 4, 650-656
50. Jonák J., Anborgh P.H. & Parmeggiani A. (1998) *FEBS Lett.* 422, 189-192
51. Wilson K.S. & Noller H.F. (1998) *Cell* 92, 337-349
52. Wilson D.N. & Nierhaus K.H. (2003) *Angew.Chem.Int.Ed Engl.* 42, 3464-3486
53. Noller H.F., Yusupov M.M., Yusupova G.Z., Baucom A. & Cate J.H. (2002) *FEBS Lett.* 514, 11-16
54. Yusupov M.M., Yusupova G.Z., Baucom A., Lieberman K., Earnest T.N., Cate J.H.D. & Noller H.F. (2001) *Science* 292, 883-896
55. Cochella L. & Green R. (2005) *Science* 308, 1178-1180
56. Rodnina M.V., Stark H., Savelsbergh A., Wieden H.J., Mohr D., Matassova N.B., Peske F., Daviter T., Gualerzi C.O. & Wintermeyer W.G. (2000) *Biological Chemistry* 381, 377-387
57. Traut R.R. & Monro R.E. (1964) *J.Mol.Biol.* 10, 63-72
58. Rychlík I. (1966) *Biochim.Biophys.Acta* 114, 425-427
59. Vieille C., Hess J.M., Kelly R.M. & Zeikus J.G. (1995) *Appl.Environ.Microbiol.* 61, 1867-1875
60. Burdette D.S., Vieille C. & Zeikus J.G. (1996) *Biochem.J.* 316 ( Pt 1), 115-122
61. Davies G.J., Gamblin S.J., Littlechild J.A. & Watson H.C. (1993) *Proteins* 15, 283-289
62. Vieille C. & Zeikus J.G. (1996) *Trends in Biotechnology* 14, 183-190
63. Nicholls A., Sharp K.A. & Honig B. (1991) *Proteins* 11, 281-296
64. Scandurra R., Consalvi V., Chiaraluce R., Politi L. & Engel P.C. (1998) *Biochimie* 80, 933-941

65. Ladenstein R. & Antranikian G. (1998) *Adv.Biochem.Eng Biotechnol.* 61, 37-85
66. Vogt G., Woell S. & Argos P. (1997) *J.Mol.Biol.* 269, 631-643
67. Tanner J.J., Hecht R.M. & Krause K.L. (1996) *Biochemistry* 35, 2597-2609
68. Menendez-Arias L. & Argos P. (1989) *J.Mol.Biol.* 206, 397-406
69. Mrabet N.T., Van den B.A., Van d.b., I, Stanssens P., Laroche Y., Lambeir A.M., Matthijssens G., Jenkins J., Chiadmi M., van Tilbeurgh H. & . (1992) *Biochemistry* 31, 2239-2253
70. Goodenough P.W. & Jenkins J.A. (1991) *Biochem.Soc.Trans.* 19, 655-662
71. Pace C.N. (1992) *J.Mol.Biol.* 226, 29-35
72. Matsumura M., Signor G. & Matthews B.W. (1989) *Nature* 342, 291-293
73. Vieille C., Epting K.L., Kelly R.M. & Zeikus J.G. (2001) *Eur.J.Biochem.* 268, 6291-6301
74. Wrba A., Schweiger A., Schultes V., Jaenicke R. & Zavodsky P. (1990) *Biochemistry* 29, 7584-7592
75. Kanaya S. & Itaya M. (1992) *J.Biol.Chem.* 267, 10184-10192
76. Jaenicke R. & Bohm G. (1998) *Curr.Opin.Struct.Biol.* 8, 738-748
77. Russell R.J., Ferguson J.M., Hough D.W., Danson M.J. & Taylor G.L. (1997) *Biochemistry* 36, 9983-9994
78. Knapp S., deVos W.M., Rice D. & Ladenstein R. (1997) *J.Mol.Biol.* 267, 916-932
79. Facchiano A.M., Colonna G. & Ragone R. (1999) *Protein Eng* 12, 893
80. Hensel R., Jakob I., Scheer H. & Lottspeich F. (1992) *Biochem.Soc.Symp.* 58, 127-133
81. Stemmer W.P.C. (1994) *Nature* 370, 389-391
82. Anborgh P.H., Parmeggiani A. & Jonák J. (1992) *Eur.J.Biochem.* 208, 251-257
83. Cetin R., Anborgh P.H., Cool R.H. & Parmeggiani A. (1998) *Biochemistry* 37, 486-495
84. Nock S., Grillenbeck N., Ahmadian M.R., Ribeiro S., Kreutzer R. & Sprinzl M. (1995) *Eur.J.Biochem.* 234, 132-139
85. Zeidler W., Egle C., Ribeiro S., Wagner A., Katunin V., Kreutzer R., Rodnina M., Wintermeyer W. & Sprinzl M. (1995) *Eur.J.Biochem.* 229, 596-604
86. Šanderová H., Hůlková M., Maloň P., Kepková M. & Jonák J. (2004) *Protein Sci.* 13, 89-99

87. Šanderová H. & Jonák J. (2005) *Biochim.Biophys.Acta* 1752, 11-17
88. Sanangelantoni A.M., Cammarano P. & Tiboni O. (1996) *Microbiology* 142 ( Pt 9), 2525-2532
89. Masullo M., Ianniciello G., Arcari P. & Bocchini V. (1997) *Eur.J.Biochem.* 243, 468-473
90. Arcari P., Masullo M., Arcucci A., Ianniciello G., De Paola B. & Bocchini V. (1999) *Biochemistry* 38, 12288-12295
91. Parmeggiani A., Swart G.W., Mortensen K.K., Jensen M., Clark B.F., Dente L. & Cortese R. (1987) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 3141-3145
92. Jensen M., Cool R.H., Mortensen K.K., Clark B.F. & Parmeggiani A. (1989) *Eur.J.Biochem.* 182, 247-255
93. Jensen M., Cool R.H., Mortensen K.K., Clark B.F. & Parmeggiani A. (1989) *Eur.J.Biochem.* 182, 247-255
94. Peter M.E., Reiser C.O., Schirmer N.K., Kiefhaber T., Ott G., Grillenbeck N.W. & Sprinzl M. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18, 6889-6893
95. Cambillau C. & Claverie J.M. (2000) *J.Biol.Chem.* 275, 32383-32386
96. Harmark K., Cool R.H., Clark B.F. & Parmeggiani A. (1990) *Eur.J.Biochem.* 194, 731-737
97. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Second edition. 1989.
98. Hanahan D. (1983) *J.Mol.Biol.* 166, 557-580
99. Marmur J. (1961) *J.Mol.Biol.* 3, 208-218
100. Smith D.B. & Johnson K.S. (1988) *Gene* 67, 31-40
101. Knudsen C.R., Clark B.F., Degn B. & Wiborg O. (1992) *Biochem.Int.* 28, 353-362
102. Bradford M.M. (1976) *Anal.Biochem.* 72, 248-254
103. Laemmli U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685
104. Jonák J., Anborgh P.H. & Parmeggiani A. (1994) *FEBS Lett.* 343, 94-98
105. Knudsen C.R., Kjaersgard I.V., Wiborg O. & Clark B.F. (1995) *Eur.J.Biochem.* 228, 176-183
106. Tomincová H., Krásný L. & Jonák J. (2002) *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* 770, 129-135
107. Skoultchi A., Ono Y., Moon H.M. & Lengyel P. (1968) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 60, 675-682

