

Produkce rekombinantní TEV proteasy v *E. coli*

Bc. Aleš Krejčí

Diplomová práce
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Aleš KREJČÍ**

Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**

Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Produkce rekombinantní TEV proteasy v E. coli**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši na zadané téma s využitím dostupných databází (Web of Science, PubMed, Current Content) a dalších dostupných materiálů.
2. Pokuste se o totální syntézu genu TEV proteasy pomocí komerčně získaných oligonukleotidů.
3. S využitím komerčně získaného plazmidu připravte expresní vektor obsahující žádaný gen a transformujte jím vhodný kmen E. coli.
4. Optimalizujte podmínky produkce TEV proteasy, podle časových možností vyzkoušejte koexpresi TEV proteasy s molekulárními chaperony E. coli případně další postupy vedoucí k vyššímu výtěžku žádaného proteinu v nativní formě.
5. Funkčnost získané TEV proteasy se pokuste vhodným způsobem ověřit.
6. Veškerá naměřená data zpracujte přehledně písemnou formou, výsledky (s výhodou) znázorněte pomocí tabulek a grafů s využitím počítače a dostupného programového vybavení.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce:

doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

Datum zadání diplomové práce:

19. února 2008

Termín odevzdání diplomové práce:

16. května 2008

Ve Zlíně dne 19. února 2008



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.
pověřený ředitel ústavu

ABSTRAKT

Jedním z hlavních cílů mé diplomové práce je provést totální syntézu genu TEV proteasy, a to pomocí komerčně získaných oligonukleotidů.

Dalším bodem je optimalizovat podmínky produkce rekombinantní TEV proteasy a pro získaný protein nalézt co nejvhodnější purifikační postup s použitím různých druhů chromatografií, jako je afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů, chromatografie na iontoměničích či gelová permeační chromatografie.

Nakonec je potřeba stanovit kinetické parametry (K_M , k_{cat}) jak získané, tak komerčně dodávané TEV proteasy a výsledky z obou enzymových kinetik vzájemně porovnat.

Klíčová slova: TEV proteasa, oligonukleotidy, purifikace proteinu, chromatografie, kinetické parametry.

ABSTRACT

One of chief aims of my diploma work is make total gene synthesis of TEV protease by means of commercially available oligonucleotides.

Another point is optimize conditions for production of recombinant TEV protease and find most suitable purification procedure for the obtained protein with using different kinds of chromatographies, such as immobilized metal affinity chromatography, ion-exchange chromatography or gel permeation chromatography.

Last point is determine kinetic parameters (K_M , k_{cat}) both obtained and commercially available TEV protease and compare the results of both enzymatic kinetics.

Key words: TEV protease, oligonucleotides, protein purification, chromatography, kinetic parameters.

Děkuji tímto vedoucímu doc. Mgr. Marku Koutnému, Ph.D. a konzultantovi RNDr. Marku Ingrovi, Ph.D. za odborné vedení, rady a připomínky, které mi poskytli během zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Pavlu Dřímaloovi, Ph.D., Ing. Radku Hrubému a Ing. Haně Pištěkové, jakožto zaměstnancům firmy Ascoprot Biotech, s. r. o.

V neposlední řadě bych rád poděkoval svým rodičům a přátelům za pomoc a podporu v průběhu mého studia.

„Radost z uvažování a z chápání je nejkrásnějším darem přírody.“

ALBERT EINSTEIN

Souhlasím s tím, že s výsledky mé práce může být naloženo podle uvážení vedoucího diplomové práce a ředitele ústavu. V případě publikace budu uveden jako spoluautor.

Prohlašuji, že jsem na celé diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval.

V Prostějově dne 15. května 2008

.....

podpis

OBSAH

ÚVOD.....	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 BIOPOLYMERY – ZÁKLAD ŽIVÝCH SYSTÉMŮ	10
1.1 PROTEINY (BÍLKOVINY)	10
1.1.1 PRIMÁRNÍ STRUKTURA PROTEINŮ	10
1.1.2 SEKUNDÁRNÍ A TERCIÁRNÍ STRUKTURA PROTEINŮ	12
1.1.3 KVARTÉRNÍ STRUKTURA PROTEINŮ	12
2 ENZYMY JAKO BIOLOGICKÉ KATALYZÁTORY	13
2.1 STRUKTURA A VLASTNOSTI ENZYMŮ	13
2.2 NÁZVOSLOVÍ A KLASIFIKACE ENZYMŮ	13
2.3 ENZYMOVÁ KINETIKA	14
2.3.1 MECHANISMUS KATALYTICKÉHO ÚČINKU ENZYMŮ	14
2.3.1.1 ROVNICE MICHAELISE A MENTENOVÉ	15
3 TECHNOLOGIE REKOMBINANTNÍ DNA	17
3.1 KLONOVANÍ GENŮ	17
3.2 ŠTĚPENÍ DNA POMOCÍ RESTRIKČNÍCH ENDONUKLEÁZ A VZNIK REKOMBINANTNÍ MOLEKULY DNA	18
3.3 KLONOVACÍ VEKTORY	20
3.3.1 BAKTERIOFÁGY	21
3.3.2 PLASMIDY	21
3.4 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	23
3.4.1 PRINCIP PCR	24
3.5 SYNTÉZA GENU [20]	27
4 PRODUKCE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ V <i>E. COLI</i>	29
4.1 EXPRESÉ GENŮ	29
4.1.1 GENETICKÝ KÓD	29
4.1.2 TRANSKRIPCE (BIOSYNTÉZA RNA)	31
4.1.3 TRANSLACE (BIOSYNTÉZA PROTEINŮ)	31
4.1.4 REGULACE GENOVÉ EXPRESÉ	32
4.1.5 PROMOTORY PRO EXPRESI V <i>E. COLI</i>	33
5 PRODUKCE REKOMBINANTNÍ TEV PROTEASY V <i>E. COLI</i>	34
5.1 CHARAKTERISTIKA PROTEAS	34
5.2 TOBACCO ETCH VIRUS	35
5.3 TEV PROTEASA	35
5.3.1 ENZYMATICKÝ MECHANISMUS TEV PROTEASY	36
5.3.2 TYPICKÉ REAKČNÍ PODMÍNKY TEV PROTEASY	37
5.3.3 SPECIFITA TEV PROTEASY V POZICI P1'	37
5.3.4 MECHANISMUS AUTOPROTEOLÝZY	39
II METODICKÁ ČÁST	41
6 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ZAŘÍZENÍ	42
7 SYNTÉZA GENU TEV PROTEASY POMOCÍ PCR REAKCE [36]	44

7.1	ELEKTROFORÉZA V AGARÓZOVÉM GELU.....	47
8	EXPRESE REKOMBINANTNÍ TEV PROTEASY	49
9	DETEKCE A ANALÝZA REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ	52
9.1	STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ DLE BRADFORDOVÉ	52
9.2	ELEKTROFORÉZA V TRIS-TRICINOVÉM PUFRU [38]	54
9.3	BARVENÍ GELŮ STRĚBREM [40]	55
10	DENATURACE A REFOLDING INKLUZÍ TEV PROTEASY	57
11	PURIFIKACE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ	59
11.1	AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE NA VÁZANÝCH KOVOVÝCH IONTECH	59
11.2	CHROMATOGRRAFIE NA IONTOMĚNIČÍCH	61
11.3	GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE	63
12	ENZYMOVÁ KINETIKA TEV PROTEASY [27]	64
III	VÝSLEDKY A DISKUSE	68
13	NÁVRH SYNTÉZY GENU PRO TEV PROTEASU	69
14	SYNTÉZA GENU PRO TEV PROTEASU	73
15	PURIFIKACE REKOMBINANTNÍ TEV PROTEASY	74
15.1	PURIFIKACE TEV PROTEASY VE FORMĚ INKLUZÍ.....	75
15.2	PURIFIKACE TEV PROTEASY V NATIVNÍM STAVU	82
16	STANOVENÍ KINETICKÝCH PARAMETRŮ TEV PROTEASY	89
16.1	MĚŘENÍ ENZYMOVÉ KINETIKY TEV PROTEASY POMOCÍ HPLC METODY	91
16.1.1	MĚŘENÍ ENZYMOVÉ KINETIKY PŘIPRAVENÉ TEV PROTEASY	91
16.1.2	MĚŘENÍ ENZYMOVÉ KINETIKY KOMERČNĚ DODÁVANÉ TEV PROTEASY	95
16.2	STANOVENÍ KINETICKÝCH PARAMETRŮ PŘIPRAVENÉ A KOMERČNĚ DODÁVANÉ TEV PROTEASY	96
	ZÁVĚR	99
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	101
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	105
	SEZNAM OBRÁZKŮ	107
	SEZNAM TABULEK.....	109
	PŘÍLOHY	110

ÚVOD

Rekombinantní proteiny se využívají v biotechnologii a při různých farmaceutických aplikacích. Mohou být použity např. jako imunogeny, kontrolní antigeny, ligandy pro afinitní purifikaci protilátek či proteinů, subjekty strukturních (např. rentgenová krystalografie) a enzymatických studií nebo jako reagens v biomedicínském výzkumu a vývoji.

V oblasti proteomiky je jedním z hlavních úkolů vyvíjet vysoce účinné metody pro proteinovou expresi a purifikaci. Vývoj těchto metod bývá ale komplikován odlišnými chemickými vlastnosti proteinů. Od té doby, co mohou tzv. *fúzní značky* upravovat chování proteinů, je možné zlepšovat rozpustnost a detekci proteinů. Jelikož mohou ale fúzní značky zasahovat do funkčních a strukturních studií, je vhodné je z cílového proteinu odstranit. K uvolnění cílových proteinů od fúzních značek se používají *proteasy*. Zpočátku to byla enterokinasa, trombin či faktor Xa. Nicméně tyto savčí proteasy nebyly tak specifické jako proteasy virové, které zahrnují např. TEV proteasu, lidský rhinovirus a TVMV proteasu. Z nich ale největší pozornost vzbudila *TEV proteasa*. Ta se stala důležitým nástrojem pro odstranění fúzních značek z rekombinantních proteinů, protože v pozici P1' štěpného proteinového řetězce toleruje mnoho různých aminokyselin.

Produkce TEV proteasy v *E. coli* byla problematická jednak kvůli autoinaktivaci a jednak kvůli nízké rozpustnosti. Autoinaktivace byla do značné míry odstraněna pomocí aminokyselinových substitucí v pozici 219 polyproteinového řetězce TEV proteasy. Rozpustnost byla zvýšena použitím fúzních značek, začleněním mutací, koexpresí s chaperony či exprese za nízké teploty. Problémy s rozpustností mohou být eventuálně vyřešeny i refoldingem TEV proteasy, která je exprimována ve formě inkluzních tělísek. Tyto snahy měly za následek zvýšení její objemové produktivity.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOPOLYMERY – ZÁKLAD ŽIVÝCH SYSTÉMŮ

Živé systémy jsou po chemické stránce tvořeny souborem různých chemických sloučenin, které jsou pro jejich existenci zcela nezbytné. Svým významem mezi nimi dominují látky polymerního charakteru, tj. bílkoviny, nukleové kyseliny a polysacharidy. Tyto makromolekulární látky, které realizují převážnou většinu funkcí živé hmoty, se souhrnně označují jako *biopolymery*. Z funkčního hlediska zauímají výjimečné postavení mezi biopolymery především *proteiny* a *nukleové kyseliny* [1].

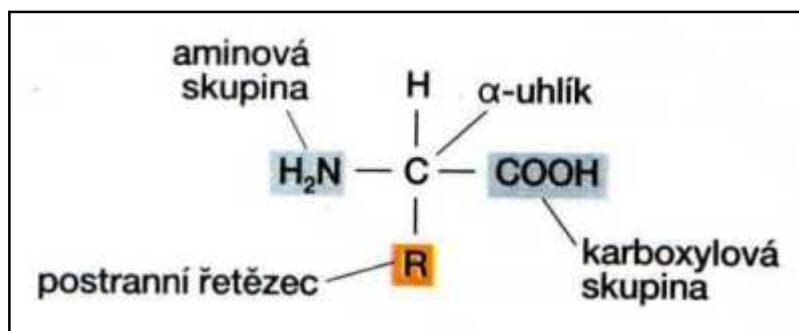
1.1 PROTEINY (BÍLKOVINY)

Molekuly proteinů se podílejí na všech životních procesech, které probíhají v biologických systémech. Jsou stavebními složkami všech živých buněčných struktur, zprostředkovávají chemický metabolismus, jako signály nebo receptory signálů regulují buněčné procesy, jako katalyzátory urychlují v organismech chemické reakce, umožňují specifický transport látek přes membrány. Proteiny mají samozřejmě mnohem a mnohem více funkcí [2].

1.1.1 PRIMÁRNÍ STRUKTURA PROTEINŮ

Základním stavebním kamenem proteinů jsou *aminokyseliny*. O proteinech mluvíme tehdy, pokud jsou tvořeny více než 100 aminokyselinovými zbytky, čemuž odpovídá $M_r > 10^4$. V opačném případě se jedná o *peptidy*. Zastoupení jednotlivých druhů aminokyselin v molekulách proteinů a jejich pořadí se nazývá *primární struktura* [1].

Z chemického hlediska jsou aminokyseliny odvozeny od karboxylových kyselin, kde je na α -uhlík navázána aminová skupina $-NH_2$. Obecný vzorec aminokyselin je znázorněn na Obr. 1, kde symbol R označuje postranní řetězec, který představuje zbytek aminokyseliny [1].



Obr. 1: Základní obecný vzorec aminokyselin [1].

Z biologických systémů bylo izolováno několik set různých aminokyselin. K nejdůležitějším patří dvacet aminokyselin, z nichž jsou budovány molekuly všech proteinů naší planety. Říkáme jim *proteinogenní* nebo také *kódované* aminokyseliny [3].

Proteinogenní aminokyseliny se podle chemického charakteru postranních řetězců dělí do čtyř skupin: a) *nepolární (hydrofobní)*, b) *polární (hydrofilní)*, c) *bazické* (obsahují bazické dusíkaté skupiny), d) *kyselé* (mají dva karboxyly) [4].

Aminokyseliny se označují buď třípísmenným, nebo jednopísmenným symbolem. V Tab. I je uvedeno značení proteinogenních aminokyselin pomocí těchto symbolů společně s jejich zařazením do jednotlivých skupin podle charakteru postranních řetězců [3].

Tab. I: *Názvy, symboly a typy proteinogenních aminokyselin [3].*

Triviální název	Symboly		Typ	Triviální název	Symboly		Typ
	tří-	jedno-			tří-	jedno-	
	písmenné				písmenné		
Alanin	Ala	A	hydrofobní	Glycin	Gly	G	polární
Leucin	Leu	L		Serin	Ser	S	
Isoleucin	Ile	I		Threonin	Thr	T	
Valin	Val	V		Tyrosin	Tyr	Y	
Prolin	Pro	P		Asparagin	Asn	N	
Fenylalanin	Phe	F		Glutamin	Gln	Q	
Tryptofan	Trp	W		Cystein	Cys	C	
Methionin	Met	M		Lysin	Lys	K	
Kyselina asparágová	Asp	D		kyselé	Arginin	Arg	
Kyselina glutamová	Glu	E	Histidin		His	H	

Aminokyseliny jsou v molekule proteinu vzájemně propojeny peptidovou vazbou -CO-NH-, kdy se aminová skupina -NH₂ na α -uhlíku jedné aminokyseliny spojuje s karboxylovou skupinou -COOH sousední aminokyseliny. Při tvorbě peptidové vazby dochází k odštěpení jedné molekuly vody, čímž jde vlastně o kondenzaci [1].

Když se pospojuje více aminokyselin, vznikne peptidový řetězec. Každý peptidový řetězec je na jednom konci zakončen skupinou -NH₂ (aminový či N-konec) a na druhém skupinou -COOH (karboxylový či C-konec) [1].

1.1.2 SEKUNDÁRNÍ A TERCIÁRNÍ STRUKTURA PROTEINŮ

Sekundární struktura proteinů je dána vnitřním prostorovým uspořádáním jednotlivých částí peptidového řetězce. Existuje několik typů sekundární struktury, ale nejrozšířenějšími z nich jsou α -helix a β -skládaný list. Typ α -helix je pravidelná šroubovice (většinou pravotočivá) peptidového řetězce. Ve struktuře β -skládaného listu probíhají úseky peptidového řetězce paralelně vedle sebe. Obě tato uspořádání jsou stabilizována vodíkovými můstky [1, 3].

Konečnou strukturu molekuly proteinu, tj. prostorové uspořádání celého peptidového řetězce, popisuje *terciární struktura* proteinů. Na spojení jednotlivých úseků této struktury se podílejí např. disulfidové můstky (vytvořené mezi dvěma zbytky cysteinů), vodíkové můstky peptidových vazeb, iontové interakce mezi kladně a záporně nabitými skupinami, interakce hydrofobních zbytků aminokyselin apod. [1, 5]

1.1.3 KVARTÉRNÍ STRUKTURA PROTEINŮ

Molekuly některých proteinů jsou složeny z většího počtu peptidových řetězců, tzv. *podjednotek*, navzájem propojených nekovalentními vazbami. Vzájemné prostorové uspořádání podjednotek se označuje jako *kvartérní struktura* proteinů [1].

2 ENZYMY JAKO BIOLOGICKÉ KATALYZÁTORY

Enzymy jsou biokatalyzátory, které se podílejí na řízení většiny chemických reakcí, které probíhají v živých systémech. Jejich schopností je urychlovat průběh těchto chemických reakcí [3].

2.1 STRUKTURA A VLASTNOSTI ENZYMŮ

Enzymy se řadí mezi *globulární proteiny*, jež se vyznačují téměř kulovitým tvarem a velmi dobrou rozpustností ve vodě. Z 60 - 70 % jsou enzymy povahy složených proteinů, a tudíž se skládají z proteinové části, nazvané *apoenzym*, a nízkomolekulové neaminokyselinové části, nazvané *kofaktor*. Funkcí kofaktoru je zabezpečit přenos atomů nebo jejich skupin. Může jím být buď kovový ion, nebo organická molekula, popřípadě obě složky najednou. Pokud je kofaktor pevně vázán na proteinovou část enzymu, označuje se jako *prostetická skupina*. V jiném případě může být kofaktor s proteinovou částí vázán jen slabě a tím se od ní může lehce oddělit. Takovýto kofaktor se nazývá *koenzym* [5].

Enzymová reakce probíhá v oblasti enzymové molekuly, která se nazývá jako *aktivní místo*. Zde jsou prostorově uspořádány zbytky aminokyselin, které představují katalytické skupiny podílející se na tvorbě a štěpení vazeb [4].

Charakteristickou vlastností enzymů je především jejich *specifita*, která se týká jednak katalyzované reakce (*účinková specifita*), jednak substrátů (*substrátová specifita*) [4].

Účinková specifita spočívá v tom, že každý z enzymů katalyzuje jednu konkrétní reakci, tzn. daný substrát je tímto enzymem přeměňován pouze jedním způsobem [4].

Substrátová specifita znamená, že jeden enzym je schopen přeměňovat jen určité typy substrátů. Některé z enzymů přeměňují pouze jeden substrát, čímž mluvíme o *absolutní specifitě*. Jiné zase přeměňují skupiny substrátů téhož typu a tím jde o *skupinovou specifitu* [4].

2.2 NÁZVOSLOVÍ A KLASIFIKACE ENZYMŮ

Na počátku studií se enzymům dávaly náhodné triviální názvy, většinou zakončené *-in*. Tyto názvy souvisely s jejich výskytem nebo funkcí v organismu. Některé z nich se používají dodnes, jako např. pepsin, trypsin apod. Později byla pro enzymy zvolena

koncovka *-asa* a jejich názvy byly tvořeny jednak podle substrátu, jehož přeměnu enzym katalyzuje, a jednak podle katalyzované reakce, které substrát podléhá. Na základě stále rostoucího počtu známých enzymů zavedla Mezinárodní unie biochemie a molekulární biologie (IUBMB) v roce 1961 systematickou klasifikaci enzymů, kde jsou enzymy rozděleny podle katalyzovaných reakcí do šesti hlavních tříd [3]:

1. *Oxidoreduktasy* – katalyzují oxidačně redukční reakce.
2. *Transferasy* – realizují přenos skupin (např. $-\text{CH}_3$, $-\text{NH}_2$ apod.) z jedné sloučeniny (donoru) na druhou sloučeninu (akceptor).
3. *Hydrolasy* – katalyzují hydrolytické štěpení vazeb, které vznikly kondenzací (např. peptidové, glykosidové apod.).
4. *Lyasy* – katalyzují nehydrolytické štěpení vazeb C-C, C-O, C-N a dalších.
5. *Isomerasy* – realizují přesun atomů a jejich skupin uvnitř molekul substrátů.
6. *Ligasy* – katalyzují vznik energeticky náročných vazeb za současné spotřeby ATP.

2.3 ENZYMOVÁ KINETIKA

Náplní enzymové kinetiky je studium vlivu různých chemických a fyzikálních faktorů na rychlost enzymově katalyzovaných reakcí. Ta závisí na koncentraci substrátů, množství enzymu, fyzikálně-chemických vlastnostech prostředí (pH, teplota apod.) a přítomnosti inhibitorů [3].

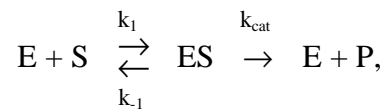
2.3.1 MECHANISMUS KATALYTICKÉHO ÚČINKU ENZYMŮ

Jednou z významných teorií, které vysvětlují mechanismus účinku enzymů, je *teorie Leonora Michaelise* (1875 - 1947) a *Maud L. Mentenové* (1879 - 1960), která byla poprvé formulována v roce 1913. Její podstatou je, že molekuly enzymů vážou substrát za vzniku meziprojektu, jež se označuje jako *enzym-substrátový komplex* (ES). Tato teorie v podstatě položila základ pro kvantitativní popis kinetiky enzymových reakcí [3].

Podle počtu substrátů se enzymové reakce dělí na *jedno-* (katalyzují je hydrolasy, lyasy a isomerasy), *dvou-* (katalyzují je oxidoreduktasy, transferasy a lyasy) a *třísubstrátové* (katalyzují je ligasy), výjimečně i na vícesubstrátové [3].

2.3.1.1 ROVNICE MICHAELISE A MENTENOVÉ

Aby Michaelis a Mentenová mohli vysvětlit podstatu enzymové kinetiky, navrhli pro mechanismus katalytického účinku enzymů následující *reakční schéma*:



kde symbol E představuje enzym, S substrát, ES enzym-substrátový komplex, P produkt, k_1 rychlostní konstantu pro tvorbu ES , k_{-1} rychlostní konstantu pro disociaci ES a k_{cat} katalytickou konstantu, tzv. *číslo přeměny*, které vyjadřuje počet molekul ES přeměněných jednou enzymovou molekulou za jednu sekundu [4].

Výše uvedené reakční schéma je tvořeno třemi elementárními procesy. Bimolekulární proces, při kterém se substrát váže na enzym za vzniku ES , popsán rychlostní konstantou k_1 , a dále monomolekulární procesy zpětného rozpadu ES na enzym a substrát, a přeměny ES na produkt za současného uvolnění enzymu. Těmto dvěma procesům odpovídají rychlostní konstanty k_{-1} , resp. k_{cat} [5].

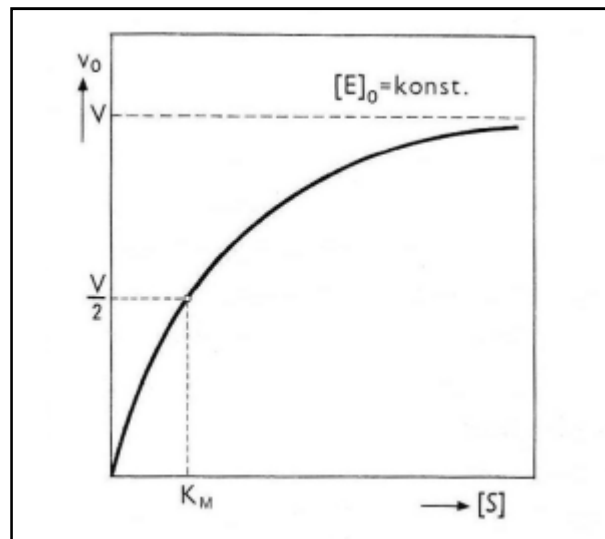
Na základě těchto skutečností odvodili Michaelis a Mentenová vztah pro závislost mezi počáteční rychlostí v jednosubstrátové reakce a koncentrací substrátu $[S]$:

$$v = \frac{V [S]}{K_M + [S]}, \quad (1)$$

kde V je maximální (limitní) rychlost a K_M je Michaelisova konstanta. Maximální (limitní) rychlost V , která je součinem celkové koncentrace enzymu E_0 a rychlostní konstanty k_{cat} , vyjadřuje rychlost enzymové reakce, při níž dochází k úplnému nasycení enzymu substrátem. Michaelisova konstanta K_M závisí zejména na reakčních podmínkách prostředí (např. na pH, teplotě apod.) [5].

Výše uvedená rovnice platí pro ustálený stav, tzn. rychlost vzniku ES je v každém okamžiku rovna rychlosti jeho zániku ($k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_{\text{cat}}[ES]$) [3].

Jestliže rovnici Michaelise a Mentenové znázorníme graficky, vznikne hyperbolická křivka, která je znázorněna na Obr. 2 [5].



Obr. 2: Grafické znázornění rovnice Michaelise a Mentenové [5].

Z rovnice (1) plyne, že Michaelisova konstanta K_M je rovna koncentraci substrátu, při níž je dosaženo poloviny maximální rychlosti V . Ze dvou reakcí, které mají stejné K_M , probíhá větší rychlostí ta, která má vyšší hodnotu V . Naopak ze dvou reakcí o stejném V probíhá rychleji reakce o nižší hodnotě K_M . Z tohoto důvodu se často jako *míra aktivity enzymu* užívá výraz k_{cat}/K_M , který má význam rychlostní konstanty příslušné reakce za velmi nízké koncentrace substrátu [5].

3 TECHNOLOGIE REKOMBINANTNÍ DNA

Technologie rekombinantní DNA zahrnuje postupy, při nichž se kombinují úseky DNA ze dvou zdrojů do jedné molekuly, která se jako taková v přirozeném stavu nevyskytuje. Tyto postupy využívají možností štěpení DNA, třídění fragmentů štěpené DNA, identifikace a izolace určitých fragmentů a jejich spojování pomocí ligace [1, 6].

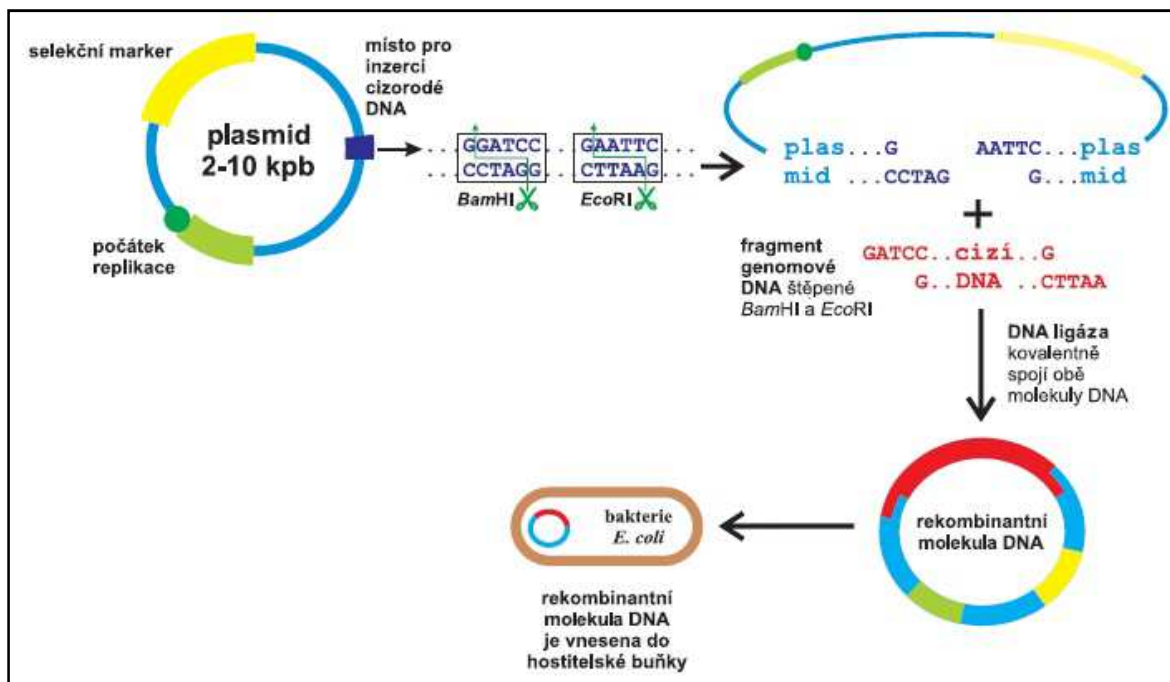
Praktické využití našla technologie rekombinantní DNA především v medicíně (genová terapie, diagnostika) či biotechnologiích (produkce geneticky modifikovaných rostlin či inzulínu v *Escherichia coli*, zavádění nových metabolických drah). Důležitou součástí této technologie je technika *klonování genů* [7].

3.1 KLONOVÁNÍ GENŮ

Pod pojmem „*klonování genů*“ se rozumí namnožení specifického úseku DNA v hostitelském organismu, který je schopen efektivně tento úsek několikanásobně namnožit a vytvářet tak jeho identické kopie. Pro klonování je nutné nejprve vytvořit tzv. *rekombinantní molekulu DNA* a to tak, že úsek DNA obsahující gen, který má být klonován, se vloží do kruhové molekuly DNA nazývané *klonovací vektor* [7, 8]. Další kroky, které jsou pro klonování zcela nezbytné, jsou následující [8]:

- a) Klonovací vektor obsahující gen (genový konstrukt) se přenesou do buňky hostitele, kterým bývá obvykle bakterie *Escherichia coli*.
- b) V bakteriální buňce dojde k replikaci genového konstrukt.
- c) Jakmile se bakteriální buňka rozdělí, kopie rekombinantní molekuly DNA se přenesou do dceřiných buněk a začne opět replikace.
- d) Ukončením několikanásobného buněčného dělení vznikne kolonie neboli *klon* identických bakteriálních buněk, přičemž každá buňka klonu bude obsahovat jednu nebo více kopií rekombinantní molekuly DNA.

Na Obr. 3 jsou znázorněny výše uvedené kroky klonování genů.



Obr. 3: Schéma klonování genů v bakteriích [7].

3.2 ŠTĚPENÍ DNA POMOCÍ RESTRIKČNÍCH ENDONUKLEÁZ A VZNIK REKOMBINANTNÍ MOLEKULY DNA

V roce 1970 nastal klíčový zlom v rozvoji genetického inženýrství, neboť došlo k objevu *restrikčních endonukleáz*, jimiž byla usnadněna tvorba rekombinantních molekul DNA. Průkopníky použití těchto enzymů byli tři molekulární biologové – *Werner Arber*, *Daniel Nathans* a *Hamilton O. Smith*, kteří za jejich objev získali v roce 1978 Nobelovu cenu [8].

K tomu, aby mohla být vytvořena rekombinantní molekula DNA, je zapotřebí každou vektorovou molekulu na jednom jediném místě rozštěpit, aby se otevřel kruh a mohla do něj být vložena nová DNA. *Restrikční endonukleázy* (zkráceně *restriktázy*), které jsou nejčastěji izolovány z bakterií, rozeznají v dvouřetězcové molekule DNA specifickou nukleotidovou sekvenci. V místě jejího výskytu tuto molekulu štěpí, čímž vytvářejí fragmenty definované délkou, obvykle v rozmezí 4 - 12 párů bazí (výjimečně mohou být fragmenty i delší). Rozpoznávací sekvence většiny běžně používaných restrikčních endonukleáz se vyznačují tím, že jsou při čtení z obou jejích konců stejné. Pak mluvíme o tzv. *palindromech*, z nichž některé jsou vidět v Tab. II [8].

Některé restrikční endonukleázy štěpí cílovou sekvenci tak, že na každém konci fragmentu vzniknou krátké jednořetězcové přesahy nazývané *kohezní (lepivé) konce*. Tyto

konce se mohou spojit vodíkovými můstky na základě komplementarity bazí s koncem jiného fragmentu DNA generovaného stejným enzymem (nebo enzymem produkujícím stejné kohezní konce). Následným propojením konců pomocí enzymu DNA ligázy vznikne rekombinantní molekula DNA. DNA ligáza, která vytváří vazbu mezi 3'-hydroxylovou skupinou ribózy jedné molekuly DNA a fosfátem na 5'-hydroxylyu ribózy molekuly druhé, umožňuje i spojení DNA fragmentů generovaných restričními endonukleázami, které nevytvářejí kohezní konce, ale tzv. *tupé konce* [7].

Názvy restričních endonukleáz se odvozují od bakterií, ze kterých byly izolovány. Jsou tvořeny třemi, příp. čtyřmi písmeny a římskou číslicí. Navíc první tři písmena v názvu jsou psána kurzívou. Příkladem může být enzym *EcoRI*, kde 1. písmeno vyjadřuje rodové jméno bakterie (*Escherichia*), 2. a 3. písmeno druhové jméno bakterie (*coli*), 4. písmeno kmen bakterie (**RY13**) a římská číslice pořadové číslo nalezené restriční endonukleázy v daném kmeni bakterie (**I**) [9].

Různé druhy bakterií produkují různé druhy restričních endonukleáz. Dosud bylo nalezeno okolo 3 400 těchto enzymů, které rozpoznávají a štěpí více než 250 cílových sekvencí [10]. Existují 3 skupiny restričních endonukleáz, značené jako typ I, II a III [10, 11]:

- a) *Restriční endonukleázy typu I* (např. *EcoB*, *EcoK*) a *III* (např. *EcoPI*, *HinfIII*) rozpoznávají specifické sekvence dvouřetězcové DNA, které nemusí být vždy symetrické, a štěpí na náhodných místech mimo tuto oblast.
- b) *Restriční endonukleázy typu II* rozpoznávají specifické sekvence s rotační symetrií (tzv. palindromové sekvence) a štěpí v tom místě, kde se tyto sekvence vyskytují.

Restriční endonukleázy typu I a III nenalezly v genetickém inženýrství takové uplatnění jako restriční endonukleázy typu II, které jsou naproti tomu pro klonování velmi důležité. V Tab. II jsou uvedeny některé z restričních endonukleáz typu II [8].

Restriční endonukleázy typu II se dále dělí na několik dalších podtypů, které jsou uvedeny v příloze P I společně s jejich obecnými charakteristikami.

Tab. II: Přehled restričních endonukleáz typu II [8].

Enzym	Organismus	Rozpoznávací sekvence	Typ konce a jeho přesah
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>		Kohezní 5'-AATT
<i>KpnI</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Kohezní 3'-CATG
<i>NdeI</i>	<i>Neisseria denitrificans</i>		Kohezní 5'-AT
<i>BbsI</i>	<i>Brevibacillus laterosporus</i>		Kohezní 5'-Y ₃ Y ₄ Y ₅ Y ₆
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>		Tupý

Symboły A, G, T, C, uvedené v Tab. II, označují organické dusíkaté báze – adenin, guanin, thymin a cytosin. První dvě z nich jsou báze purinové a zbývající dvě jsou báze pyrimidinové. Uvedené heterocyklické sloučeniny se podílejí na tvorbě nukleotidů, které jsou základními stavebními jednotkami DNA. Důležitou vlastností těchto bazí je komplementarita jejich struktur. Komplementární báze jsou dvojice bazí, jedné purinové a jedné pyrimidinové, navzájem vázané vodíkovými vazbami. Tyto dvojice tvoří adenin s thyminem a guanin s cytosinem. V prvním případě jde o párování bazí dvěma vodíkovými vazbami, v druhém případě třemi vodíkovými vazbami. Zbývající symboly (X, Y), které jsou uvedeny v Tab. II, označují libovolné, vůči sobě komplementární báze. Místa štěpení jsou zde navíc vyznačena šipkami [3].

3.3 KLONOVACÍ VEKTORY

Aby klonovací vektor, jakožto základní komponenta klonovacího experimentu, správně fungoval, musí vykazovat určité vlastnosti. Především musí mít schopnost

proniknout do hostitelské buňky, v níž replikací vytvoří velké množství kopií rekombinantní molekuly DNA, které poté předá dceřiným buňkám. Při klonování se klade důraz také na velikost použitého vektoru. Ta by měla být co nejmenší, aby manipulace s vektory, jako např. izolace, byla jednoduchá. Tyto požadavky splňují v bakteriálních buňkách zejména dva druhy molekul DNA: *bakteriofágy* a *plasmidy* [8].

3.3.1 BAKTERIOFÁGY

Bakteriofágy, zkráceně *fágy*, jsou viry napadající bakterie. Základem stavby každého fága je *bílkovinná kapsida*, která je složená ze dvou částí: *hlavičky* (obsahující molekulu DNA, příp. RNA) a *bičíku*, z něhož vyrůstají vlákna, kterými se fág přichytává k bakterii. DNA nese mnoho genů, včetně genů potřebných k replikaci fága [8, 12].

Proces infekce bakteriální buňky bakteriofágem se skládá ze tří následujících kroků [8]:

1. fág se přichytí na vnější stranu bakterie, do níž injektuje svoji DNA,
2. fágová molekula DNA se v buňce replikuje,
3. po replikaci se bakteriální buňka z důvodu porušení svých fyziologických vlastností, způsobených fágem, rozpadne (lyzuje) a nově vzniklé fágové částice se uvolní ven.

Výše uvedené kroky se souhrnně označují jako *lytický cyklus*. Existuje též i tzv. *cyklus lyzogenní*, který se od předchozího cyklu liší tím, že se fágová molekula DNA nereplikuje ihned, ale začlení se do bakteriálního chromozomu. Poté přechází do dceřiných buněk. Tato forma fágové DNA se nazývá *profág*. Bakterie nesoucí profága, nazývaná *lyzogen*, je vůči stejnému fágu imunní. Profág se časem z lyzogenu uvolní a přechází do lytického cyklu, v němž se replikuje. Po replikaci se bakteriální buňka opět rozpadá [8].

3.3.2 PLASMIDY

Plasmidy jsou malé, kruhové molekuly DNA, které se vyskytují v celé řadě bakteriálních buněk. Každý plasmid obsahuje sekvenci, nazvanou *počátek replikace* (*ori*, z angl. *origin of replication*), která zajišťuje jeho replikaci v bakteriální buňce a to nezávisle na hlavním bakteriálním chromozomu. Dále obsahují gen, který hostitelské buňce zajišťuje vlastnosti potřebné v soutěži s buňkami jinými, které tento plasmid nenesou. V tomto případě mluvíme o tzv. *selekcčním markeru* (angl. *selectable marker*), kterým může být např. rezistence k antibiotikům, jako jsou ampicilin či kanamycin. Aby mohla být do plasmidu vložena cizí molekula DNA s použitím technologie rekombinantní

DNA, obsahují plasmidy ještě tzv. *mnohočetné klonovací místo* (MCS, z angl. *multiple cloning site*). Zde lze plasmidy pomocí různých restričních endonukleáz rozštěpit [6, 8].

Jak již bylo zmíněno, jedním z hlavních požadavků pro práci s klonovacími vektory je jejich velikost. U plasmidů se za ideální považuje velikost do 10 kbp [8].

V současné době jsou téměř všechny plasmidy používané při klonování geneticky upravené. Jedním z nejpoužívanějších klonovacích vektorů je *pUC19*, obsažený v bakterii *E. coli* [6, 11].

Název „pUC19“, stejně jako názvy jiných plasmidů, se řídí standardními pravidly vektorového názvosloví [8]:

- ✓ „p“ znamená, že jde o plasmid,
- ✓ „UC“ označuje laboratoř, ve které byl plasmidový vektor vyvinut (UC v tomto případě odkazuje na **U**niversity of **C**alifornia, kde došlo ke konstrukci pUC19),
- ✓ číslo „19“ odlišuje tento plasmid od ostatních plasmidů vyvinutých ve stejné laboratoři (existují též plasmidy pUC18, pUC21, ...).

Jednou z vlastností, která činí tento plasmid v genetickém inženýrství tak oblíbeným, je jeho velikost. Plasmid pUC19 je dlouhý 2 686 bp. To umožňuje snadnou purifikaci jak samotného vektoru, tak i zkonstruované rekombinantní molekuly DNA [8, 11].

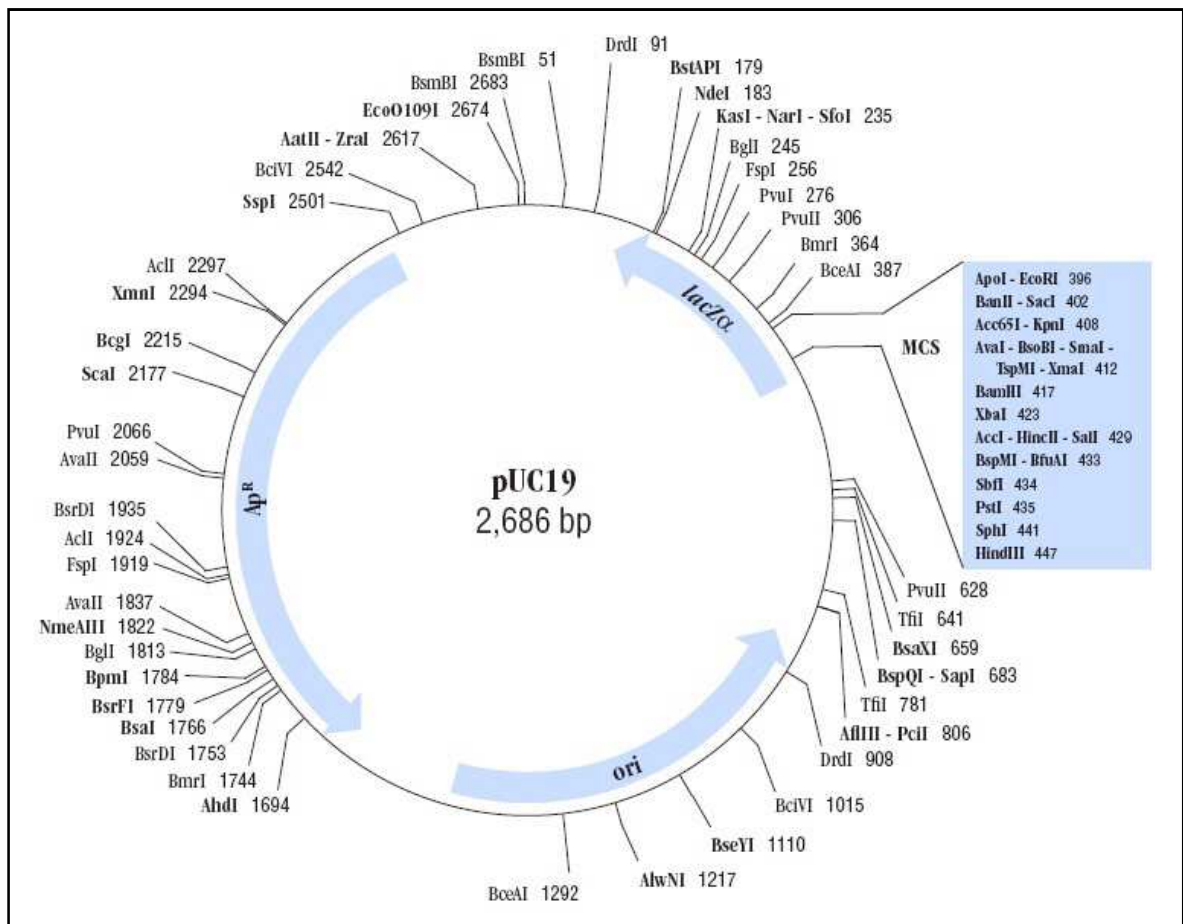
Další výhodou pUC19 je to, že jde o plasmid s *vysokým počtem kopií* (angl. *high copy number plasmids*), neboť neobsahuje gen, tzv. *rop* gen, který kóduje protein zodpovědný za kontrolu jeho replikace. Počátek replikace, který řídí množení vektoru v hostitelských buňkách, pochází z plasmidu *pMB1*. V transformovaných buňkách *E. coli* může být okolo 20 molekul pUC19, přičemž je možné tento počet zvýšit až na 500 [8, 11].

pUC19 nese gen pro rezistenci k ampicilinu a tzv. gen *lacZ'*, kódující část enzymu β -galaktosidasy, který štěpí laktózu na glukózu a galaktózu. Tento enzym je běžně kódován genem *lacZ*, který je součástí chromozomu *E. coli*. V genu *lacZ'* jsou navíc nahromaděna všechna klonovací místa [8].

Výhodou je to, že klonování pomocí pUC19 umožňuje identifikovat rekombinantní buňky na základě jejich neschopnosti syntetizovat výše zmíněný enzym. To znamená, že buňky s normálním plasmidem pUC19 budou tvořit β -galaktosidasu, kdežto rekombinanty nikoliv. Princip identifikace spočívá v tom, že se rekombinantní buňky nanesou na agarové médium obsahující ampicilin a X-gal, tj. analog laktózy, jehož štěpením β -galaktosidasou

vzniká modře zbarvený produkt. Nerekombinantní kolonie, tj. buňky produkující β -galaktosidasu, se zbarví modře, zatímco rekombinanty, které jsou neschopné tvořit tento enzym, zůstanou bílé. Tato metoda se nazývá *blue/white screening* [8].

Na Obr. 4 je znázorněna struktura plasmidu pUC19 se svými restrikcími místy.



Obr. 4: Genetická a fyzikální mapa plasmidu pUC19.

3.4 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Stěží dokázal některý z vynálezů či objevů změnit biologickou vědu natolik, jak tomu bylo v případě *polymerázové řetězové reakce* (PCR, z angl. *polymerase chain reaction*). Rychlé zmnožení (též *amplifikace*) přesně definovaného úseku DNA *in vitro* umožňuje v molekulární biologii či genetice právě tato zmíněná metoda, přičemž původního vzorku DNA může být velmi malé množství, třeba i jen jedna molekula. Princip této metody objevil v roce 1983 americký biochemik *Kary B. Mullis* (* 1944), který o deset let později obdržel z rukou švédského krále Nobelovu cenu za objev a realizaci PCR [13].

Přestože je PCR známa již více než 30 let, počet jejích aplikací se neustále rozrůstá. Široké uplatnění nachází především v medicíně, kde se jí využívá např. v diagnostice při detekci virových infekcí či geneticky vrozených chorob, v soudním lékařství k určování otcovství apod. Dále je PCR hojně využívána také v kriminalistice k identifikaci pachatele nebo v potravinářství při detekci geneticky modifikovaných potravin [14].

3.4.1 PRINCIP PCR

Aby mohla být PCR provedena v praxi, jsou k tomu zapotřebí následující komponenty:

1. **Templátová DNA**, která představuje v podstatě vzorek obsahující dvoušroubovici DNA, jejíž určitý úsek má být namnožen.
2. **Dva primery**, které jsou komplementární ke koncovým sekvencím úseku templátové DNA, který má být namnožen. Užívané primery jsou *oligonukleotidy*, což jsou krátké úseky jednořetězcové DNA, obvykle o délce 17 - 25 bp (výjimečně mohou být i delší). Oligonukleotidy se připravují buď enzymaticky, nebo chemickou syntézou [11, 13]. Důležitým předpokladem úspěšného provedení PCR je správná volba primerů, pro které platí několik orientačních zásad [8, 13, 15]:
 - a) Jak již bylo uvedeno výše, primery obsahují obvykle 17 - 25 bp.
 - b) Hybridizační teploty (annealing temperature, T_a), při kterých oba primery nasedají na templát, by se od sebe neměly výrazně lišit. Navíc by měly být obě tyto teploty blízké tzv. teplotě tání (melting temperature, T_m) hybridu mezi primerem a templátem, která se obvykle pohybuje mezi 55 až 65°C. Podle vzorce

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C) \text{ [}^\circ\text{C]}, \quad (2)$$

kde $(A + T)$ je počet bazí A a T v sekvenci primerů a $(G + C)$ počet bazí G a C, lze orientačně odhadnout optimální teplotu T_m , která je společně s teplotami T_a zásadní pro správný průběh PCR. Teplotu T_a poté zjistíme tak, že teplotu T_m , vypočtenou podle vzorce (2), snížíme o 1 - 2°C. K přesnějším výpočtům lze využít celé řady programů dostupných na internetu. Zde jsou některé z webových odkazů: [16, 17, 18].

- c) Optimální zastoupení G/C párů by mělo být v rozmezí 40 - 60 %.

d) Je nutné zabránit tvorbě sekundárních struktur primerů, neboť ty by mohly negativně ovlivnit průběh PCR.

3. **Termostabilní DNA polymeráza.** Jde o enzym, který má schopnost katalyzovat připojování nukleotidů k 3'-konci nově vznikajícího vlákna DNA. Jelikož replikace probíhá pouze na jednom vlákně ve směru od 5'-konce k 3'-konci, vyznačují se všechny DNA polymerázy $5' \rightarrow 3'$ polymerázovou aktivitou. Některé z DNA polymeráz mají kromě zmíněné polymerázové aktivity také *exonukleázovou aktivitu*, která umožňuje opravit chybně zařazené nukleotidy. To znamená, že DNA polymeráza s takovouto aktivitou rozpozná špatný nukleotid a nahradí jej nukleotidem správným. Termostabilní DNA polymerázy byly izolovány z termofilních bakterií říše *Archaea* (dříve *Archaeobacteria*), žijících v horkých pramenech či v blízkosti podmořských vulkánů. Dnes je známa celá řada DNA polymeráz [11]. V Tab. III jsou uvedeny nejpoužívanější DNA polymerázy při PCR technikách a některé z jejich vlastností.

Tab. III: Přehled nejpoužívanějších DNA polymeráz [19].

DNA polymeráza	Bakteriální zdroj	Optimální teplota	Termostabilita	Exonukleázová aktivita
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>	75 - 80°C	97,5°C (9 min)	$5' \rightarrow 3'$
Tth	<i>Thermus thermophilus</i>	75 - 80°C	95°C (20 min)	$5' \rightarrow 3'$
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>	72 - 78°C	95°C (3 h)	$3' \rightarrow 5'$
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i>	60 - 65°C	100°C (2 h)	$3' \rightarrow 5'$

Z DNA polymeráz uvedených v Tab. III je tou nejspolehlivější *Pfu polymeráza*, jelikož vykazuje nejnižší četnost chyb. *Pfu polymeráza* dělá jednu chybu na 10^6 až 10^8 zařazených bazí. Naopak *Taq polymeráza*, která je vůbec nejlépe prostudovanou DNA polymerázou, dělá jednu chybu na 10^4 bazí. Je to způsobeno tím, že postrádá $3' \rightarrow 5'$ exonukleázovou aktivitu [11].

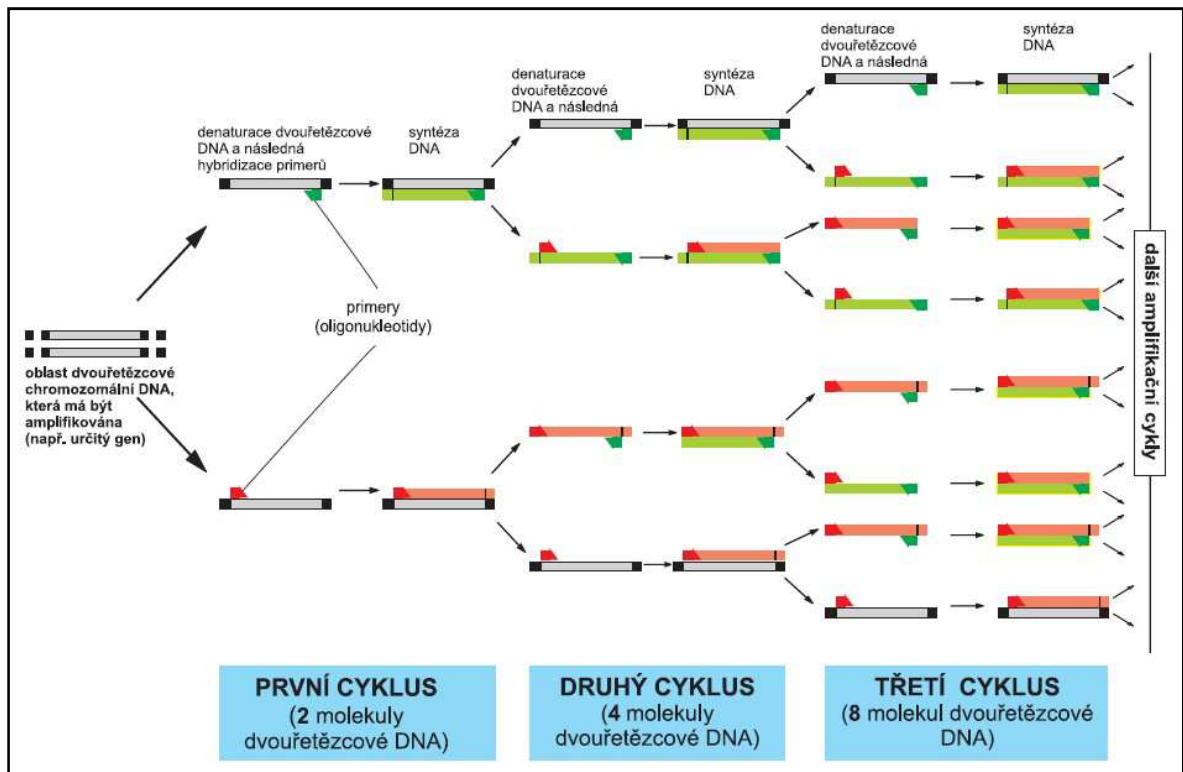
4. **Směs čtyř deoxyribonukleotidů** (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, souhrnně značené jako *dNTPs*), které představují základní stavební kameny pro syntézu nových řetězců DNA [8, 11].
5. **Vhodný pufr**, který udržuje stabilní pH. Může obsahovat Mg^{2+} ionty buď ve formě $MgCl_2$, nebo $MgSO_4$. Hořčík zde zastává funkci stabilizátoru DNA polymerázy. Zvýšením koncentrace Mg^{2+} dojde k nárůstu výtěžku PCR, ale zároveň se sníží specifita reakce [15].

6. *Demineralizovaná voda.*

Podstata této metody spočívá v opakování několika cyklů, přičemž každý z nich, který trvá 2 - 5 minut, se skládá ze tří základních kroků:

1. ***Denaturace.*** Prvním krokem PCR je tepelná denaturace dvoušroubovice DNA, která spočívá v tom, že se reakční směs, obsahující výše uvedené komponenty, zahřeje po dobu 30 - 60 s na teplotu v rozsahu 92 - 95°C. Tím dojde k rozpadu vodíkových můstků mezi vlákny DNA a v důsledku toho k rozpletení samotné dvoušroubovice na dva řetězce [8, 11].
2. ***Annealing*** (nasedání primerů). Druhý krok PCR je v podstatě opakem denaturace. Reakční směs je ochlazená na teplotu cca 45 - 60°C, což umožňuje připojení primerů ke komplementárním úsekům DNA. Doba trvání se pohybuje mezi 30 až 90 s [8, 11].
3. ***Extenze*** (prodlužování řetězců). V posledním kroku dochází k syntéze nových řetězců, které slouží jako templáty pro další cykly a kromě prvního cyklu jsou samotným produktem reakce. Tato reakce, která je katalyzována termostabilní DNA polymerázou, probíhá většinou při teplotě 72°C po dobu 45 - 90 s. DNA polymeráza, která má při této teplotě vysokou aktivitu, nasedá na 3'-konec primeru a ve směru 5' → 3' komplementárně prodlužuje nově vytvořený řetězec připojením dalších nukleotidů. Po skončení posledního kroku PCR následuje při stejné teplotě obvykle ještě několik minut trvající tzv. *závěrečná extenze*, která slouží v podstatě k dokončení syntézy [8, 11, 13].

Na Obr. 5 je znázorněna amplifikace definovaného úseku dvouřetězcové DNA pomocí PCR.



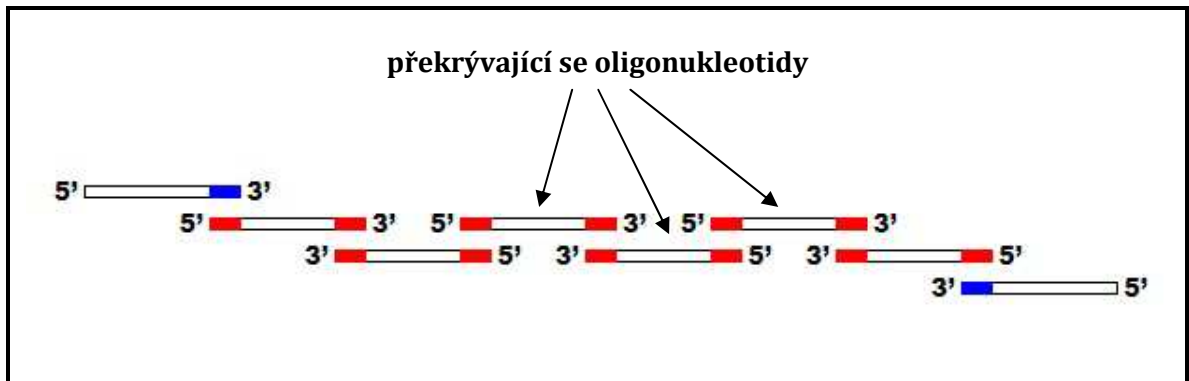
Obr. 5: Schéma průběhu PCR [7].

Všechny tři výše uvedené kroky se cyklicky opakují obvykle 20 až 30 krát. Pomocí PCR lze teoreticky získat 2^n nových řetězců, kde n je počet cyklů. Při n opakujících se cyklech roste počet nově vytvořených řetězců exponenciálně [15].

3.5 SYNTÉZA GENU [20]

Ke zvýšení specifity a přesnosti se syntézy genů často provádějí pomocí dvoustupňové PCR reakce, která je složena dvěma po sobě následujícími amplifikačními reakcemi. Při této modifikaci PCR (Obr. 6) se používají dva druhy oligonukleotidů: vnitřní a vnější. V prvním stupni PCR jsou spojeny vnitřní oligonukleotidy, a to jejich částečným překrýváním, což dává vzniknout templátu použitému ve druhém stupni reakce. Ve druhém stupni PCR je amplifikován produkt 1. PCR za použití vnějších oligonukleotidů jako PCR primerů, které jsou komplementární ke koncovým úsekům primárního produktu [21].

Důvodem dvoustupňové PCR je to, že v prvním stupni vznikne konkurenčními reakcemi mnoho nežádoucích a nespecifických produktů. Amplifikován je však pouze ten produkt, který obsahuje oba koncové vnitřní oligonukleotidy, ostatní produkty jsou naopak potlačeny. Tímto je amplifikován jen žádoucí, specifický produkt.



Obr. 6: Schéma dvoustepňové PCR reakce s použitím 8 oligonukleotidů. Oligonukleotidy s červeně označenými konci = vnější, oligonukleotidy s modře označenými konci = vnitřní.

4 PRODUKCE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ V *E. COLI*

Posledních několik desítek let se technika klonování genů těší v biotechnologii velké pozornosti, protože z přirozeného hostitele umožňuje vyjmout gen, který kóduje buď živočišný, nebo rostlinný protein. Ten lze poté vložit do klonovacího vektoru a vnést do bakterie. Jestliže jsou uvedené kroky správně provedeny, gen se exprimuje a bakteriální buňka syntetizuje *rekombinantní protein* [8].

Nejpoužívanějším hostitelem v produkci rekombinantních proteinů se stala bakterie *Escherichia coli*, a to nejen kvůli svým známým charakteristickým rysům, ale také kvůli rychlému růstu a nízké ceně.

Exprese rekombinantních proteinů v *E. coli* se obvykle vyznačuje tím, že za krátkou dobu a z malého množství kultivačního objemu je možné získat velké množství požadovaného produktu, který lze poté použít pro purifikaci a následnou strukturní a funkční analýzu proteinů. V praxi je ale produkce rekombinantních proteinů mnohem složitější. Jednak jsou potřeba zvláštní typy klonovacích vektorů a jednak jsou výtěžky silně závislé na typu konkrétních proteinů a dalších podmínkách [8, 11].

4.1 EXPRESE GENŮ

Expresí genů, též *genovou expresí*, se rozumí komplex procesů, kterými je genetická informace ve formě DNA přeměněna v konkrétní buněčné struktury. Gen, u něhož exprese probíhá, se nazývá *gen exprimující*. Produkty genové exprese jsou molekuly proteinů, ale také i molekuly RNA. Proces „exprese genů“ se skládá ze dvou základních kroků. Prvním krokem je přenos genetické informace z DNA do RNA zvaný *transkripce*. Dalším krokem je překlad této informace z jazyka nukleotidů do jazyka aminokyselin, tj. z molekul RNA do molekul proteinů. V tomto případě mluvíme o *translaci* [1, 22].

4.1.1 GENETICKÝ KÓD

Genetický kód představuje soubor pravidel, podle nichž se genetická informace, která je uložena buď v DNA, nebo v RNA, převádí na primární strukturu proteinů, tj. do sekvence aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Mezi charakteristické znaky genetického kódu, který je uveden v Tab. IV, patří [23]:

- a) *Kodon* neboli *triplet*. Jde o tři po sobě jdoucí báze v molekule mRNA, které určují druh aminokyseliny. Kodony plní i jiné funkce, příkladem jsou iniciační a terminační kodony v procesu biosyntézy proteinů.
- b) Každý kodon kóduje jen jednu z 20 standardních aminokyselin uvedených v Tab. I.
- c) Genetický kód je degenerovaný, tzn. každá aminokyselina, s výjimkou methioninu a tryptofanu, může být kódována více kodony. Jelikož jsou pro začlenění 20 standardních aminokyselin do polypeptidových řetězců k dispozici čtyři různé druhy bazí, existuje celkem $4^3 = 64$ možných kombinací kodonů.
- d) Genetický kód je až na několik výjimek univerzální, tzn. je stejný jak pro prokaryotické, tak pro eukaryotické organismy.
- e) Kódová slova se nepřekrývají a nejsou vzájemně izolována: **AATCGCTGG...**

Za objevem genetického kódu stojí trojice amerických biochemiků – *Robert W. Holley, Har G. Khorana a Marshall W. Nirenberg*. V roce 1968 obdrželi Nobelovu cenu nejen za samotný objev genetického kódu, ale i za to, že dokázali objasnit jeho funkci v procesu biosyntézy proteinů [23].

Tab. IV: *Genetický kód* [4].

První báze 5'-konec	Druhá (střední) báze				Třetí báze 3'-konec
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	„stop“	„stop“	A
	Leu	Ser	„stop“	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

4.1.2 TRANSKRIPCE (BIOSYNTÉZA RNA)

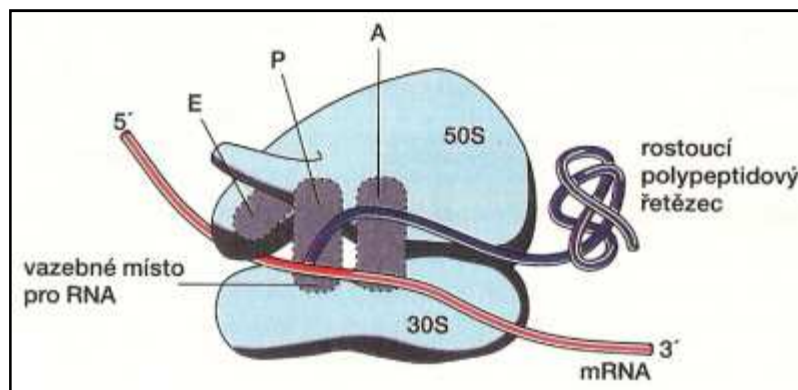
Aby mohla být transkripce vůbec zahájena, je zapotřebí rozplést dvoušroubovici DNA na dvě vlákna. Jedno z těchto vláken, a to vlákno *nekódující*, se stane maticí pro transkripci. Toto vlákno se též označuje jako *templátové*. Rozhodující úlohu při transkripci ale sehrává enzym *RNA-polymeráza*. Nejznámější je RNA-polymeráza pocházející z bakterie *E. coli*, jejíž molekula o $M_r = 480$ kDa je tvořena z pěti různých podjednotek – ze dvou α podjednotek, dvou β podjednotek a jedné σ podjednotky zvané *faktor σ* . Faktor σ zajišťuje jednak vyhledávání správného („templátového“) řetězce DNA a jednak vazbu RNA-polymerázy na specifickou sekvenci nukleotidů, na tzv. *promotor*. Připojením RNA-polymerázy na promotor je zahájena vlastní syntéza RNA, kdy dochází k postupnému připojování RNA nukleotidů na základě komplementarity bazí, tzn. adenin s uracilem a guanin s cytosinem. Směr pohybu RNA-polymerázy, tj. směr transkripce, je vždy od 3'-konce DNA, kdežto směr tvorby molekuly RNA je antiparalelní, tj. ve směru 5' \rightarrow 3'. Transkripce je ukončena v místě zvaném *terminátor*. Ten je tvořen nukleotidovou sekvencí, která tvoří páry bazí sama se sebou. Vzniká tak úsek, který má podobu vlásenky. Takováto změna struktury molekuly RNA způsobí, že se RNA-polymeráza odpojí od DNA, čímž tedy dojde k ukončení transkripce [1, 8].

4.1.3 TRANSLACE (BIOSYNTÉZA PROTEINŮ)

Důležitou roli při syntéze proteinů hraje tzv. *Shine-Dalgarnova sekvence*. Jde o krátkou nukleotidovou sekvenci na mRNA, která je vazebným místem pro *ribozomy* (RBS, z angl. *ribosome binding site*). Ty se skládají ze dvou podjednotek – malé a velké. Malá podjednotka (30S) je tvořena cca 20 proteiny a jednou molekulou rRNA (16S rRNA), zatímco velká je tvořena cca 30 proteiny a dvěma molekulami rRNA (5S rRNA a 23S rRNA). Na ribozomech jsou čtyři vazebná místa, která mají zásadní význam pro translaci [1, 24]. Jedno z nich je místem pro vazbu mRNA, zbývající tři jsou místa pro vazbu tRNA [1]:

- ✓ *místo A (aminoacylové)* pro vazbu tRNA nesoucí příslušnou aminokyselinu,
- ✓ *místo P (peptidylové)* pro tvorbu peptidové vazby mezi jednotlivými aminokyselinami,
- ✓ *místo E (exit)*, kde tRNA opouští ribozom.

Na Obr. 7 je zobrazen ribozom se svými vazebnými místy.



Obr. 7: Vazebná místa na ribozomu [1].

Ribozomy se pohybují podél mRNA ve směru $5' \rightarrow 3'$. Syntéza proteinů není zahájena v Shine-Dalgarnově sekvenci, ale v místě, které se nachází o několik nukleotidů za ní. Toto místo se nazývá *start-kodon* (též *iniciační kodon*). V bakterii *E. coli* je start-kodonem převážně triplet AUG (91 %, kóduje methionin), výjimečně GUG (8 %) a UUG (1 %). Od tohoto místa začínají ribozomy zachytávat správné molekuly tRNA s příslušnými aminokyselinami, které se spojují do polypeptidového řetězce. Syntéza proteinů je ukončena v okamžiku, kdy ribozomy narazí na jeden ze tří tzv. *stop-kodonů* (též *terminačních kodonů*), a to UAG, UAA nebo UGA. Stop-kodon se v ribozomu dostává do místa A. Jelikož zde není rozpoznán žádnou tRNA, dojde k uvolnění polypeptidu z ribozomu a rozpadu translačního komplexu [1, 24].

4.1.4 REGULACE GENOVÉ EXPRESE

Genová exprese je regulována jak po stránce kvalitativní, tak po stránce kvantitativní. Proteiny, jakožto produkty genové exprese, se podílejí na celé řadě životních procesů, které probíhají v biologických systémech. Aby bylo uskutečnění určité biochemické reakce nebo metabolické dráhy efektivní, musí být reakční komponenty přítomny v určité koncentraci, v určitém čase a na určitém místě. Z těchto důvodů je potřeba, aby byla genová exprese velmi přesně regulována [1].

Jestliže se na promotor naváže *repressor*, tj. protein vzniklý na základě regulačního genu, zabrání se vazbě RNA-polymerázy na promotor. Tím se zastaví průběh transkripce. Tento krok se označuje jako *represe*. Konformaci represoru lze ale ovlivnit nízkomolekulární látkou, tzv. *induktorem*. Když se induktor naváže na repressor, změní se jeho konformace tak, že se repressor stane v podstatě inaktivním. Jakmile se repressor uvolní

z promotoru, může RNA-polymeráza bez sebemenších problémů nasednout na promotor. Tomuto kroku, kterým je opětovně zahájena transkripce, říkáme *indukce* [1].

4.1.5 PROMOTORY PRO EXPRESI V *E. COLI*

Rozhodující složkou expresních vektorů jsou promotory, které regulují připojování RNA-polymerázy k molekule DNA. Vysoce efektivní promotory jsou zárukou vysoké produkce jak molekul mRNA, tak i rekombinantních proteinů [8, 11]. Pro expresi v *E. coli* se nejčastěji používají následující promotory [8, 25]:

- a) **Promotor *lac***, který řídí transkripci genu *lacZ* kódujícího enzym β -galaktosidasu. Ta štěpí laktózu na glukózu a galaktózu. K indukci promotoru *lac* se nejčastěji používá analog laktózy, a to isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (zkráceně IPTG). Výhodou IPTG oproti laktóze je, že není metabolizován *E. coli*. To znamená, že jeho koncentrace zůstává během experimentu konstantní a rychlost růstu buněk je neměnná. Nevýhodou je naopak jeho vysoká cena.
- b) **Promotor *trp***, který řídí transkripci genů kódujících takové enzymy, které se účastní biosyntézy tryptofanu. Tato aminokyselina je zodpovědná za negativní regulaci promotoru *trp*. Promotor *trp* lze indukovat kyselinou indol-3-akrylovou, což je analog tryptofanu.
- c) **Promotor T7**, který je izolován z bakteriofága T7 a je specifický pro RNA-polymerázu kódovanou tímto fágem. Tato RNA-polymeráza je mnohem aktivnější než RNA-polymeráza pocházející z *E. coli*.

5 PRODUKCE REKOMBINANTNÍ TEV PROTEASY V *E. COLI*

Hlavní překážkou v produkci rekombinantních proteinů v *E. coli* je jejich tendence hromadit se ve formě nerozpustných a biologicky neaktivních agregátů známých jako inkluzní tělíska. Existuje celá řada způsobů jak předejít jejich tvorbě, např. použitím plasmidů s nízkým počtem kopií či slabých promotorů, působením nízké teploty, koexpresí s molekulárními chaperony, fermentací za vysokých hodnot pH nebo fúzí se solubilizačními partnery [24].

Posledně jmenovaný způsob je ze všech nejpoužívanější. Rekombinantní proteiny jsou často spojovány s různými proteinovými nebo peptidovými partnery, tzv. *fúzními značkami*, aby se zvýšila jejich rozpustnost. Fúzní značky mají i další výhody. Zvyšují výtěžky rekombinantních proteinů, chrání je před intracelulární proteolýzou a usnadňují jejich detekci a purifikaci. Mezi nejčastěji používané fúzní značky patří zejména *protein vážící maltosu* (MBP, z angl. *maltose-binding protein*) z *Escherichia coli* nebo *glutathion-S-transferasa* (GST) ze *Schistosoma japonicum* [26, 27].

Jelikož však mají fúzní značky takový potenciál, že mohou zasahovat do biologické aktivity proteinů, bránit jejich krystalizaci nebo z jiného hlediska ovlivňovat jejich chování, je vhodné je z cílového proteinu odstranit. Ke štěpení fúzních rekombinantních proteinů se používají jak chemické, tak enzymatické metody. Nicméně chemické reagenty trpí nedostatkem specifity a často pracují za takových podmínek, že mohou nenávratně poškodit fúzního partnera. Na druhé straně enzymatické reagenty pracují za mírnějších reakčních podmínek a vykazují větší sekvenční specifitu [26].

Důležitými nástroji při štěpení fúzních rekombinantních proteinů se staly *proteasy*, z nichž je stále více populární *TEV proteasa*, a to kvůli své vysoké sekvenční specifitě.

Aminokyseliny štěpeného proteinového řetězce v okolí místa štěpení se konvenčně označují následujícím způsobem: aminokyseliny nacházející se od místa štěpení směrem k N-konci se označují P1, P2, P3,, směrem k C-konci P1', P2', P3',

5.1 CHARAKTERISTIKA PROTEAS

Proteiny podléhají v buňkách neustálým změnám, které mohou vést k jejich rozkladu na základní jednotky – aminokyseliny. Ty se mohou zapojit buď do biosyntézy nových proteinů, nebo do jiných metabolických procesů, popřípadě se rozloží na oxid uhličitý a amoniak. Rozklad proteinů zajišťují *proteolytické enzymy* neboli *proteasy*, které se dělí do

dvou skupin. První skupinu tvoří *endopeptidasy* (též *proteiny*), které katalyzují hydrolytické štěpení vazeb uvnitř polypeptidového řetězce. Druhou skupinu tvoří *exo-peptidasy* (též *peptidasy*), které katalyzují hydrolytické odštěpování koncových aminokyselin z polypeptidových řetězců. Mohou být buď N-koncové, tzv. *amino-peptidasy*, nebo C-koncové, tzv. *karboxy-peptidasy*. Proteasy jsou podle IUBMB klasifikovány jako součást třetí třídy enzymů, kterou jsou hydrolasy [28, 29]. V biotechnologii nacházejí uplatnění především proteiny, které se podle struktury katalytického místa dělí do čtyř následujících skupin [3, 28]:

1. *Aspartátové* – jejich katalytické centrum obsahuje dvě karboxylové skupiny. Mají optimum pH v kyselé oblasti. Patří sem např. pepsin či chymosin.
2. *Serinové* – jejich katalytické centrum obsahuje hydroxylovou skupinu zbytku serinu. Mají optimum pH v mírně alkalické oblasti. Patří sem např. trypsin či trombin.
3. *Cysteinové* – jejich katalytické centrum obsahuje thiolovou skupinu zbytku cysteinu. Vedle samotné TEV proteasy se sem dále řadí nejrůznější mikrobiální, živočišné a rostlinné enzymy.
4. *Metalloproteasy* – je pro ně typická tvorba komplexu s iontem kovu. Patří sem např. karboxy-peptidasa A.

5.2 TOBACCO ETCH VIRUS

Tobacco etch virus (TEV) je druh rostlinného patogenního viru, který patří do čeledi *Potyviridae*, kde je členem rodu *Potyvirus*. První zmínky o TEV pocházejí z roku 1928 z amerického státu Kentucky od *Valleau* a *Johnsona*. TEV způsobuje infekční onemocnění několika lilkovitých plodin, jako je *Capsicum annuum* (paprika setá), *Capsicum frutescens* (paprika křovitá neboli chilli), *Nicotiana tabacum* (tabák virginský) a *Lycopersicon esculentum* (rajče jedlé). Tím se snižuje úrodnost zmíněných plodin. Nákaza tímto druhem viru se projevuje tak, že listy infikovaných rostlin jsou dosti skvrnitě, svraštělé a vrásčité [30].

5.3 TEV PROTEASA

TEV proteasa je vysoce specifická proteasa, mnohem specifičtější než jiné, běžně používané proteasy, jako jsou faktor srážení krve X (Xa), enterokinasa či α -trombin. Je velmi účinným enzymem používaným při štěpení fúzních rekombinantních proteinů. Rozpoznává sekvenci sedmi aminokyselin **EXXYXQ↓G/S** (P6 ... P1↓P1'), kde X značí

libovolnou hydrofobní aminokyselinu. Kanonickou sekvencí, která se nejčastěji vyskytuje v TEV viru, je sekvence ENLYFQ↓G/S. Štěpné místo se nachází mezi glutaminem a glycinem (Q↓G), nebo glutaminem a serinem (Q↓S). Naproti tomu faktor Xa rozpoznává aminokyselinovou sekvenci **IEGR**↓X, kde X značí libovolnou aminokyselinu vyjma argininu a prolinu, enterokinasa rozpoznává sekvenci **DDDDK**↓X, kde X značí libovolnou aminokyselinu vyjma prolinu, a trombin rozpoznává sekvenci **LVPR**↓G. Další štěpené sekvence vyskytující se v genomu TEV viru jsou následující: (1) EIIYTQ↓S, (2) EDLVEQ↓A, (3) ETIYLQ↓S, (4) EPVYFQ↓G, (5) ELVYSQ↓G, (6) EDLTFE↓S, (7) GHKVM↓S [31, 32, 33].

Zdrojem TEV-PR bývá expresní vektor odvozený od běžně používaných vektorů pro fúzní rekombinantní proteiny, např. pMal-C2 (New England BioLabs), pThio-His (Invitrogen), pGEX (Amersham-Pharmacia), pET (Novagen) [34].

5.3.1 ENZYMATICKÝ MECHANISMUS TEV PROTEASY

Struktura TEV proteasy je podobná strukturám serinových proteas, jako je např. trombin nebo chymotrypsin. Stejně jako u nich, tak i u TEV proteasy závisí aktivita na tzv. *katalytické triádě*, jež hydrolyzuje peptidickou vazbu. Jediný rozdíl je v tom, že serinový nukleofil je v katalytické triádě His-Asp-Ser nahrazen cysteinem. Katalytická triáda vypadá potom takto: His⁴⁶-Asp⁸¹-Cys¹⁵¹, kde číslo v exponentu značí polohu aminokyselin od N-konce, jak se vyskytují v TEV protease. Každá z aminokyselin v této triádě má svou funkci. Kyselina asparágová polarizuje histidin, který nejdříve funguje jako báze – v první fázi přijímá proton od cysteinu a v druhé od molekuly vody, a následně působí v každé fázi jako kyselina. Cystein nukleofilně atakuje uhlík skupiny -COOH substrátu. Tím, jak je serin nahrazen cysteinem, se pravděpodobně vysvětluje, proč je TEV proteasa tak odolná vůči mnoha běžně používaným proteasovým inhibitorům. PMSF nebo AEBSF (1 mM), TLCK (1 mM), bestatin (1 mg.ml⁻¹), pepstatin A (1 mM), EDTA (1 mM) a E-64 (3 mg.ml⁻¹) – to je kompletní složení směsi (od firmy Roche) užívané k inhibici proteas. Aktivitu TEV proteasy také inhibuje zinek, a to při koncentraci 5 mmol.l⁻¹ a vyšší. Činidla, která reagují s cysteinem, jako např. jodoacetamid, jsou silnými inhibitory TEV proteasy [35].

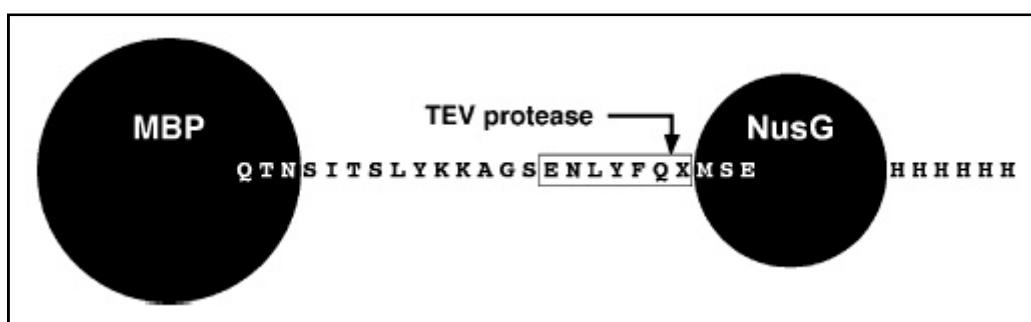
5.3.2 TYPICKÉ REAKČNÍ PODMÍNKY TEV PROTEASY

TEV proteasa je aktivní v rozmezí teplot 4 - 30°C a pH 6,0 - 8,5. Standardní reakční pufr pro TEV proteasu je obvykle tvořen 50 mM Tris (pH 8,0), 0,5 mM EDTA a 1 mM DTT. Ve většině případů probíhá štěpná reakce přes noc, ačkoli podstatná část substrátu zreaguje již v prvních několika hodinách a prodloužení inkubační doby nemusí vést k proporciónálnímu zvýšení štěpení [31, 35].

Štěpení TEV proteasou se ale doporučuje provádět při pokojové teplotě (20°C) nebo při teplotě 4°C. TEV proteasa je pravděpodobně 3x méně aktivní při teplotě 4°C než při 20°C. Toleruje celou řadu pufrů zahrnujících fosfát, MES a acetát. TEV-PR není navíc nepříznivě ovlivněna přidávkem glycerolu nebo sorbitolu, ale zato je citlivá na některé detergenty [35].

5.3.3 SPECIFITA TEV PROTEASY V POZICI P1'

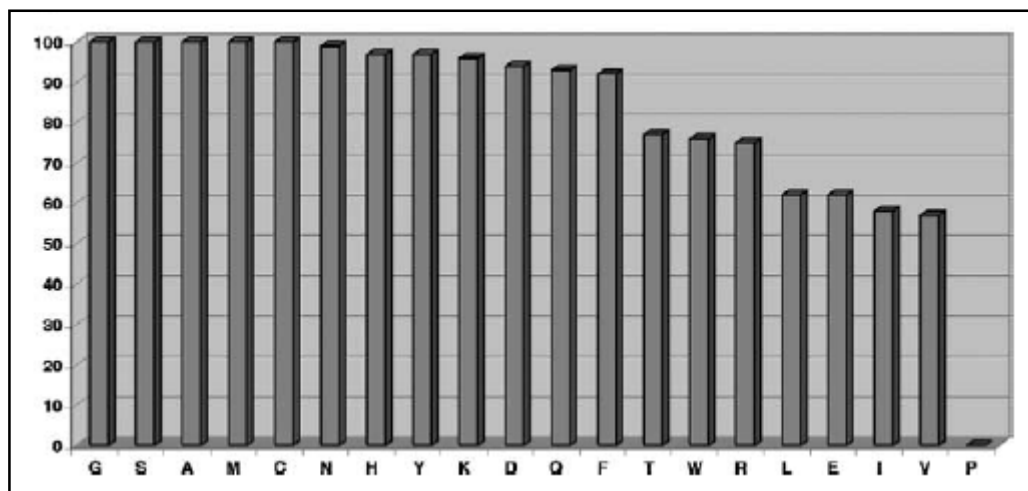
Třebaže se v kanonických sekvencích vyskytuje v pozici P1' pouze glycin nebo serin, bylo zjištěno, že TEV proteasa je dostatečně aktivní i tehdy, vyskytují-li se v této pozici aminokyseliny jiné. Kapust a kol. [26] provedli studii specifity TEV proteasy v pozici P1'. Jako modelový substrát, jenž je znázorněn na Obr. 8, si zvolili fúzi mezi MBP z *Escherichia coli* a NusG z *Aquifex aeolicus*. Aby se usnadnila purifikace tohoto fúzního proteinu obsahujícího kanonickou sekvenci ENLYFQ↓X, byla na jeho C-konec přidána hexahistidinová kotva (HHHHHH) [26].



Obr. 8: Schematické znázornění fúzního proteinu MBP-NusG [26].

MBP-NusG byl vybrán nejen kvůli tomu, že je vhodným substrátem pro TEV proteasu, ale také proto, že je v *E. coli* jednak dobře exprimován a jednak vysoce rozpustný. Kapust a kol. provedli experiment, kdy dvacet fúzních proteinů MBP-NusG, každý s jinou aminokyselinou v pozici P1', nechali štěpit TEV proteasou *in vivo*. Zjistili, že jedinou aminokyselinou, při jejímž umístění v P1' je TEV proteasa zcela neaktivní, je

prolin. V případě ostatních aminokyselin je aktivita proteasy v rozmezí 50 - 100 % aktivity naměřené při štěpení kanonických sekvencí, což je patrné z Obr. 9. Těto vlastnosti lze s výhodou využít při štěpení fúzních rekombinantních proteinů, protože cílový protein má po odštěpení správný N-konec bez nadbytečných aminokyselin patřících sekvenci štěpného místa [26].



Obr. 9: Aktivita TEV proteasy štěpící *in vivo* kanonickou sekvencí ENLYFQ↓X v pozici P1' [26].

Na základě výsledků ze štěpení fúzního proteinu MBP-NusG TEV proteasou určili pro sadu syntetických peptidů (TENLYFQXXGTRR-NH₂), každý s jinou aminokyselinou v pozici P1', kinetické parametry K_M a k_{cat} . Tyto údaje jsou uvedeny v Tab. V. V porovnání se substrátem s Gly v pozici P1' neměla žádná P1' substituce za následek zlepšenou katalytickou konstantu (k_{cat}), naproti tomu bylo dosaženo jak vyšších, tak nižších hodnot K_M . Všeobecně vzato, pořadí katalytických účinností (k_{cat}/K_M) peptidů bylo v souladu s hierarchií účinností stanovených pro substráty fúzního proteinu MBP-NusG, ačkoliv se fúzní proteiny s Gln a Trp v pozici P1' zdály být zpracovány s poměrně větší účinností nežli jim odpovídající peptidy [26].

Menší nesrovnalosti mezi výsledky získanými u fúzních proteinů MBP-NusG a peptidových substrátů mohly být způsobeny rozdílnými reakčními podmínkami, jako např. pH, iontovou silou, které tak mohou v případě některých P1' aminokyselinových residuí ovlivnit kinetiku substrátového štěpení [26].

Tab. V: Kinetické parametry oligopeptidového substrátu *TENLYFQXGTRR-NH₂* s aminokyselinovými substitucemi v pozici P1' [28].

AMK v pozici P1'	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [mM ⁻¹ .s ⁻¹]
Ser	0,043 ± 0,006	0,194 ± 0,007	4,51 ± 0,65
Gly	0,087 ± 0,017	0,268 ± 0,025	3,08 ± 0,67
Ala	0,090 ± 0,015	0,271 ± 0,019	3,01 ± 0,54
Met	0,076 ± 0,007	0,180 ± 0,005	2,37 ± 0,23
Tyr	0,050 ± 0,010	0,031 ± 0,001	0,62 ± 0,13
Asp	0,057 ± 0,004	0,021 ± 0,001	0,37 ± 0,03
Gln	0,321 ± 0,025	0,073 ± 0,001	0,23 ± 0,02
Glu	0,094 ± 0,022	0,014 ± 0,001	0,15 ± 0,04
Lys	0,224 ± 0,046	0,027 ± 0,002	0,12 ± 0,03
Leu	0,240 ± 0,047	0,014 ± 0,001	0,06 ± 0,01
Val	–	–	0,010 ± 0,001

5.3.4 MECHANISMUS AUTOPROTEOLÝZY

Značnou nevýhodou wild-type TEV proteasy, nehledě na její cenu, je to, že snadno štěpí sama sebe, a to mezi Met²¹⁸ a Ser²¹⁹ polyproteinového řetězce. Tím vzniká zkrácený enzym se značně sníženou aktivitou. Rozpoznávací sekvencí v místě, kde dochází k autoproteolýze, je sekvence **GHKVFM↓S**. Není ale známo, zda má štěpení v tomto místě nějaký biologický význam, jako např. regulační. Během purifikace způsobuje autolýza značné ztráty TEV proteasy. Navíc není jednoduché oddělit zkrácenou formu enzymu od proteasy skutečné velikosti. Nestejnorodost vyplývající z autoinaktivace během štěpení fúzního proteinu snižuje enzymatickou účinnost a komplikuje odstranění proteasy ze štěpených produktů. Kromě toho je problematická i ztráta aktivity TEV proteasy během jejího skladování [27, 33].

Z rychlosti autoinaktivace, která je úměrná koncentraci TEV proteasy, lze usoudit, že se jde o bimolekulární reakční mechanismus. To by naznačovalo, že se jedná o *intermolekulární* reakci, tedy že jedna molekula TEV-PR štěpí molekulu druhou. Bylo ale zjištěno [27], že katalyticky aktivní proteasa nebyla schopna přeměnit katalyticky neaktivní proteasu na její zkrácenou formu. Přídavkem vzrůstajících koncentrací katalyticky neaktivní proteasy ke stálému množství wild-type enzymu se zvýšila rychlost jeho autoinaktivace. Tyto výsledky tedy naznačily, že autoinaktivace TEV proteasy je

reakcí *intramolekulární* (jedna molekula štěpí sama sebe), která je usnadněna alosterickou interakcí mezi molekulami TEV-PR [27].

Autoproteolýzu lze do značné míry odstranit pomocí aminokyselinových substitucí v pozici 219 polyproteinového řetězce, v níž se vyskytuje serin. Celá řada mutantů TEV-PR je vysoce odolná vůči autoproteolýze. Ve snaze vytvořit co nejstabilnější proteasu, zkonstruovali Kapust a kol. [27] několik mutantů TEV-PR v poloze 219 a poté stanovili jejich enzymovou stabilitu a katalytickou aktivitu. V Tab. VI a VII jsou uvedeny jednak katalytické aktivity a jednak kinetické parametry některých těchto mutantů, a to v porovnání s wild-type proteasou [27].

Tab. VI: *Katalytická aktivita některých mutantů TEV proteasy odolných vůči autoproteolýze [33].*

Mutant	% aktivita	% pokles autoproteolýzy
S219D	~ 100	10x
S219E	~ 80	100x
S219V	~ 110	100x
S219P	50	autoproteolýza nedetekována

Tab. VII: *Kinetické parametry wild-type proteasy a jejích mutantů [27].*

Enzym	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [mM ⁻¹ .s ⁻¹]
Wild-type	0,061 ± 0,010	0,16 ± 0,01	2,62 ± 0,46
Zkrácená forma	0,448 ± 0,049	0,16 ± 0,01	0,36 ± 0,05
S219D	0,054 ± 0,011	0,15 ± 0,01	2,78 ± 0,60
S219E	0,074 ± 0,005	0,12 ± 0,01	1,62 ± 0,17
S219V	0,041 ± 0,010	0,19 ± 0,01	4,63 ± 1,16
S219P	0,066 ± 0,008	0,09 ± 0,01	1,36 ± 0,22

Jak plyne z obou výše uvedených tabulek, tak mají mutanty S219D, S219E, S219V a S219P sníženou autoproteolytickou aktivitu a hodnoty K_M a k_{cat} mají podobné s wild-type proteasou. Kromě toho, že byl mutant S219V daleko stabilnější než wild-type proteasa, byl také účinnějším katalyzátorem [27, 33].

II. METODICKÁ ČÁST

6 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ZAŘÍZENÍ

Chemikálie:

- 1,4-dithiothreitol p. a. (Roth, Německo)
- Acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich, Německo)
- AcTEV proteasa (Invitrogen, USA)
- Agaróza (Serva, Německo)
- DNA marker (Top-Bio, s. r. o., Česká republika)
- Chlorid draselný p. a. (Lach-Ner, s. r. o., Česká republika)
- Chlorid sodný p. a. (Lach-Ner, s. r. o., Česká republika)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, Německo)
- Glycerol (Fluka, Německo)
- Guanidin-hydrochlorid p. a. (Fluka, Německo)
- Hydrogenfosforečnan sodný p. a. (Lachema, Česká republika)
- Imidazol p. a. (Roth, Německo)
- Kyselina 2-morfolin-ethan sulfonová p. a. (Roth, Německo)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (Penta, Česká republika)
- Kyselina octová p. a. (Lach-Ner, s. r. o., Česká republika)
- Kyselina trifluoroctová p. a. (Sigma-Aldrich, Německo)
- Močovina p. a. (Fluka, Německo)
- Oligonukleotidy (East Port, s. r. o., Česká republika)
- PCR dNTP mix (Top-Bio, s. r. o., Česká republika)
- Pfu DNA polymeráza (Promega, USA)
- Protein Assay (Bio-Rad, USA)
- SDS Page Protein marker (Serva, Německo)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan p. a. (Fluka, Německo)

Zařízení:

- Analytické váhy Sartorius Basic (Sartorius AG, Německo)
- Dialyzační membrány Spectra/Por 1 MWCO 6000: 50 mm (Spectrum Laboratories, USA)
- Digitální pH-redox-teploměr GMH 3530 (Greisinger Electronic, Německo)

Digitální pipeta Nichipet EX: 0,1-2 μ l, 0,5-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l, 1-5 ml (Nichiryo, Japonsko)

Elektrický vařič ETA 2119 (ETA, a. s., Česká republika)

Filtrační souprava (Sigma-Aldrich, Německo)

Chromatografická stanice Clarity pro Windows (DataApex, s. r. o., Česká republika)

Kapalinový chromatograf Waters 600E (Waters Corp., USA)

Kolona HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR: 120 ml (GE Healthcare, USA)

Kolona HisTrap HP: 5 ml (GE Healthcare, USA)

Kolona Q Sepharose Fast Flow: 10 ml (GE Healthcare, USA)

Kolona Reprosil 100 C18: 250 x 4 mm (Watrex, s. r. o., Česká republika)

Kolona SP Sepharose Fast Flow: 10 ml (GE Healthcare, USA)

Magnetická míchačka Monotherm (H+P Labortechnik AG, Německo)

Membránová vývěva s kompresorem N86 KN.18 (KNF Neuberger, Německo)

Membránové filtry Pragopor 6: velikost pórů 0,40 μ m (Pragochema, s. r. o., Česká republika)

PCR termocyklér (Techne Progene, Velká Británie)

Peristaltická pumpa P-1 (Amersham Biosciences, USA)

Předvážky (Adam Equipment, Velká Británie)

Sběrač frakcí Gradi Frac (Pharmacia, Švédsko)

Spektrofotometr Helios Gama (Thermo Electron Corp., USA)

Stříkačka Gastight, série 1710: 100 μ l (Hamilton, USA)

Termostat EC-PA/KÜ (Julabo Labortechnik, Německo)

Třepačka MS1 Minishaker (IKA, USA)

Ultrazvuková čistička PS 04000A (Powersonic, s. r. o., Slovensko)

Univerzální stolní centrifuga Rotanta 460R (Hettich, Německo)

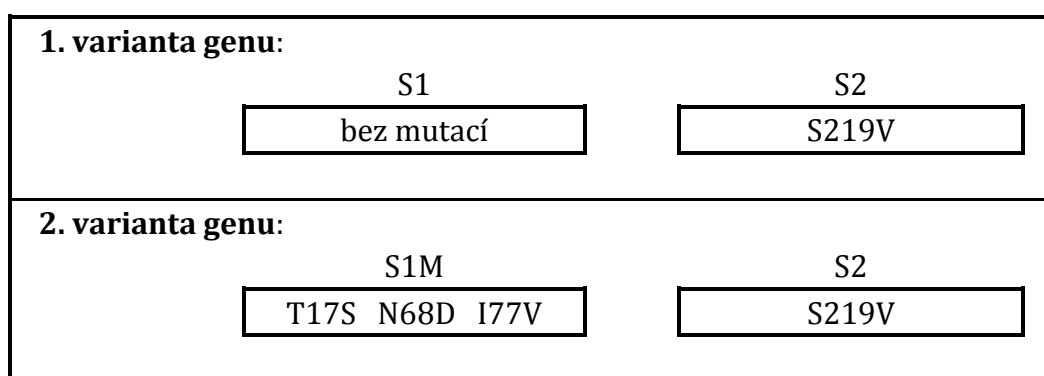
UV detektor LCD 2040 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika)

UV transiluminátor (ULTRA♦LUM, USA)

Zdroj napětí pro elektroforézu Consort E844 (Sigma-Aldrich, Německo)

7 SYNTÉZA GENU TEV PROTEASY POMOCÍ PCR REAKCE [36]

Prvním krokem diplomové práce bylo navrhnout gen pro TEV-PR. O návrhu genu je podrobně pojednáno v kapitole 13. Celkem byly vytvořeny dvě varianty genů, z nichž jedna zahrnovala pouze mutaci S219V, druhá navíc mutace T17S, N68D a I77V. Každý z obou genů byl rozdělen na dva syntony (tj. synteticky pospojované oligonukleotidy), což je znázorněno na Obr. 10. Důvodem rozdělení bylo to, aby se snížila pravděpodobnost vzniku nekompletních produktů a aby případně bylo možno sekvenovat každý synton zvlášť.



Obr. 10: Varianty genů TEV-PR.

Z Obr. 10 vyplývá, že ke konstrukci obou genů byly použity celkem tři syntony, a to S1, S1M a S2. Ty byly vytvořeny spojením syntetických oligonukleotidů pomocí *dvoustupňové PCR*, která byla složena ze dvou po sobě následujících amplifikačních reakcí (kapitola 3.5). Tato modifikace PCR umožňuje dosáhnout vyšší specifičnosti amplifikace požadované sekvence.

Oligonukleotidy:

- ✓ nasyntetizovány firmou East Port, s. r. o. a dodány v lyofilizovaném stavu
- ✓ poté rozpuštěny v takovém množství ddH₂O, aby jejich koncentrace byla 100 μM
- ✓ takto připravený zásobní roztok byl 5x zředěn na finální koncentraci 20 μM a skladován při teplotě -20°C

Tab. VIII: Oligonukleotidy pro přípravu syntonů S1 a SIM.

Název	Sekvence
TPR1-1	5'- CAGTGAATTCATATGCATCACCATCATCATCATGCGAATCTCTTTTTAAAGGCCCGCGTGA ^{51,3°C} TTACAACCCGATCTCGTC -3'
TPR1-2	5'- ^{55,7°C} TTACAACCCGATCTCGTCACTATCTGCCACCTGACCAACGAAA -3'
TPR1-2M	5'- ^{55,7°C} TTACAACCCGATCTCGTCAAGCATCTGCCACCTGACCAACGAAA -3'
TPR1-3	5'- ^{47,1°C} CTTGTTGGTGATGATGAA ^{51,3°C} CGGGCCGAAGCCGATACCGTACAGGGAGGTGGTGTGGCCGTCGCTTTCGTTGGTCAGGTGGC -3'
TPR1-4	5'- ^{50,8°C} TTCATCATACCAACAAGCACTTGTTCGTGTAATAACGGTACTCTGTTGGTGCAGTCCCTGCACGGTGTTTTAAGGT -3'
TPR1-5	5'- ^{51,2°C} TGCGGATGATGATCATGT ^{51,3°C} CGCGCCGTCAATCAGGTGCTGCTGGAGGGTAGTGGTGTCTTTACCTTAAAAACACCGTGC -3'
TPR1-5M	5'- ^{51,2°C} TGCGGATGATGATCATGT ^{51,3°C} CGCGCCGTCAACCAGGTGCTGCTGGAGGGTAGTGGTATCCTTTACCTTAAAAACACCGTGC -3'
TPR1-6	5'- ^{52,2°C} ACATGATCATCATCCGATGCCGAAAGACTTCCACCGTCCCTCAGAAACTGAAATTCGCGAACCTCAGCGTGAAGAA -3'
TPR1-7	5'- AGCTAAGCTTGAAGACATGGACTTAGTTTGAAGTTGGTGGTTACCAGACAATACG ^{52,2°C} TTCTTCAGCTGAGGTTTC -3'

Tab. IX: Oligonukleotidy pro přípravu syntonu S2.

Název	Sekvence
TPR2-1	5'- ACTGGAATTCGAAGACCGGTCCATGAGTTCTATGGTGTCCGATACCTCCTGCACCTCCCAT ^{53,1°C} CCTCCGACGGTATCTTCT -3'
TPR2-2	5'- ^{50,4°C} CCTCCGACGGTATCTTCTGGAACACTGGATCCAGACCAAGATGGTCAAGTGCAGTCCGTTCTCCGTTAGTCAGCACTCGTGAT -3'
TPR2-3	5'- ^{48,9°C} CTGGTGAAGTAGTTGTTCTGTGTTGGTGAAGTTAGAGGCACTATGGATACCAACGATGAAACCATCAGGAGTGCTGACTAA -3'
TPR2-4	5'- ^{59,3°C} GAACAACACTACTCCACGCGTCCCTAAAACTTCATGGAAGTCTGACGAACAGGAGGCGCAGCAGTGGGTGAGTGGCT -3'
TPR2-5	5'- ^{49,3°C} CTCTGGTTTACCATGAA ^{51,3°C} AACTTTATGACCACCCAGAGAACCGAATCTGCGTTCAGACGCCAGCCACTCACCCTGCT -3'
TPR2-6	5'- ^{48,7°C} TTCATGGTGAACAGAGGAACCATTCAGCCGTTAAGGAAGCTACTCACTGATGAACGA ^{51,3°C} ACTGGTGTACTCTCAGTA -3'
TPR2-7	5'- GTACAAGCTTCTCGAGTCATTACTGAGAGTACACCACT -3'

Překryvy oligonukleotidů s uvedenými teoretickými teplotami nasedání jsou vyznačeny barevně odlišenými konci.

Reakční směsi pro 1. PCR (50 µl):

- (1) **Synton S1:** oligonukleotidy TPR1-2, TPR1-3, TPR1-4, TPR1-5, TPR1-6, TPR1-7 (každý po 1 µl), 10 mM dNTP mix (1 µl), 10X PCR pufr (5 µl), Pfu polymeráza 3U/µl (1 µl), ddH₂O (37 µl).

- (2) **Synton S1M**: oligonukleotidy TPR1-2M, TPR1-3, TPR1-4, TPR1-5M, TPR1-6, TPR1-7 (každý po 1 μ l), 10 mM dNTP mix (1 μ l), 10X PCR pufr (5 μ l), Pfu polymeráza 3U/ μ l (1 μ l), ddH₂O (37 μ l).
- (3) **Synton S2**: oligonukleotidy TPR2-2, TPR2-3, TPR2-4, TPR2-5, TPR2-6, TPR2-7 (každý po 1 μ l), 10 mM dNTP mix (1 μ l), 10X PCR pufr (5 μ l), Pfu polymeráza 3U/ μ l (1 μ l), ddH₂O (37 μ l).

Reakční směsi pro 2. PCR (50 μ l):

- (1) **Synton S1**: templát S1 = reakční směs po 1. PCR (1 μ l), oligonukleotidy TPR1-1, TPR1-7 (každý po 1 μ l), 10 mM dNTP mix (1 μ l), 10X PCR pufr (5 μ l), Pfu polymeráza 3U/ μ l (1 μ l), ddH₂O (40 μ l).
- (2) **Synton S1M**: templát S1M = reakční směs po 1. PCR (1 μ l), oligonukleotidy TPR1-1, TPR1-7 (každý po 1 μ l), 10 mM dNTP mix (1 μ l), 10X PCR pufr (5 μ l), Pfu polymeráza 3U/ μ l (1 μ l), ddH₂O (40 μ l).
- (3) **Synton S2**: templát S2 = reakční směs po 1. PCR (1 μ l), oligonukleotidy TPR2-1, TPR2-7 (každý po 1 μ l), 10 mM dNTP mix (1 μ l), 10X PCR pufr (5 μ l), Pfu polymeráza 3U/ μ l (1 μ l), ddH₂O (40 μ l).

Pozn.: 10X PCR pufr znamená, že PCR pufr je v zásobním roztoku 10-násobně koncentrovaný: do reakční směsi o objemu 50 μ l bylo tedy nadávkováno 5 μ l tohoto pufru.

Všechny amplifikační reakce byly prováděny v *PCR termocykléru*, což je programovatelný termostat s vysokou přesností teploty v reakčním bloku a rychlým přechodem mezi jednotlivými teplotami. V Tab. X je uveden teplotní program PCR, na jehož základě byla syntéza genu prováděna.

Tab. X: Teplotní program PCR reakce.

#	Cyklus	Teplota [°C]	Doba [s]	Počet opakování
1	úvodní denaturace	94	600	1
2	denaturace	94	30	30
3	nasedání primerů	47	30	
4	polymerace	73	60	
5	závěrečná polymerace	73	480	1

7.1 ELEKTROFORÉZA V AGARÓZOVÉM GELU

K identifikaci produktů z PCR reakce byla použita jedna z nejběžněji používaných metod analýzy DNA, a to *elektroforéza v agarózovém gelu* [11]. Fragmenty DNA migrovaly v elektrickém poli ve směru od katody (–) k anodě (+), a to tak, že kratší fragmenty se pohybovaly rychleji a tudíž se dostaly dále od startu než fragmenty delší.

V Tab. XI jsou uvedeny gely o různých koncentracích agarózy, kterými lze separovat DNA velikostí 0,1 - 25 kb [11]. V rámci diplomové práce byl použit 1,4% agarózový gel.

Tab. XI: *Rozmezí molekulových hmotností DNA separovaných v gelu o různých koncentracích agarózy [11].*

Koncentrace agarózy [%]	Délka fragmentů DNA [kb]
0,3	5 - 25
0,6	1 - 20
0,7	0,8 - 10
0,9	0,5 - 7
1,2	0,4 - 6
1,5	0,2 - 3
2,0	0,1 - 2

Velikosti jednotlivých produktů z PCR reakce byly srovnány s velikostí tzv. *markerů*, tj. fragmentů DNA známých molekulových hmotností, resp. obsahující známý počet párů bazí.

Zásobní roztok 50X TAE pufu (200 ml):

2 M Tris (48,46 g), 0,05 M EDTA (2,29 g), 5,71% ledové HAc (11,4 ml), ddH₂O do 200 ml, pH upraveno na 8,0.

Pracovní roztok TAE pufu:

zásobní roztok TAE pufu zředěn ddH₂O v poměru 1:49.

5X vzorkový pufr (10 ml):

40% sacharosa (4,0 g), 0,1% bromfenolová modř (0,01 g), ddH₂O (10 ml).

Příprava 1,4% agaróзовého gelu:

Navážené množství agarózy (0,84 g) bylo nasypáno do Erlenmeyerovy baňky o objemu 200 ml a bylo k ní přidáno 60 ml pracovního roztoku TAE pufru. Baňka byla umístěna na plotýnku elektrického vařiče a její obsah byl uveden do varu. Jakmile byla suspenze čirá a nebyly v ní patrné žádné nerozpuštěné částice, nechala se při laboratorní teplotě zchladnout na cca 60°C. Poté bylo k roztoku přidáno 60 μl ethidium bromidu (zásobní roztok o koncentraci 0,5 mg.l^{-1}) do finální koncentrace 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Důležité upozornění! Ethidium bromid je silně karcinogenní. Od chvíle, kdy se začalo pracovat s tímto činidlem, bylo nutné používat ochranné latexové rukavice.

Provedení elektroforézy:

Takto připravený gel byl nalit do elektroforetické vaničky a na jeden z jeho konců byl ihned vložen hřeben pro vytvoření 13 startovních jamek pro nanášení vzorků. Gel tuhnul při laboratorní teplotě po dobu 15 - 20 minut. Po dokonalém ztuhnutí byl hřeben vyjmut tak, aby nedošlo k porušení dna některé jamky. Vanička s gelem byla vložena do elektroforetické aparatury a to tak, že startovní jamky byly umístěny v těsné blízkosti katody (černý vodič). Poté bylo zkontrolováno, zda byl gel pokryt 2 až 3 mm vrstvou TAE pufru a zda nebyly ve startovních jamkách vzduchové bublinky. Poté byly do jamek nanášeny jednotlivé vzorky. Do první jamky byly napipetovány 4 μl DNA markeru a do ostatních jamek analyzované vzorky smíchané se 5X vzorkovým pufrem, přičemž max. objem vzorku byl 25 μl . V DNA markeru byl vzorkový pufr již obsažen. Po nanesení všech vzorků byla elektroforetická aparatura uzavřena víkem a připojena ke zdroji elektrického napětí. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 110 V po dobu 30 min. Vanička s gelem byla následně vyjmuta z aparatury a gel byl přenesen na UV transiluminátor, kde byl vystaven záření o vlnové délce 312 nm, které vyvolalo fluorescenci ethidia ve viditelné oblasti světla. Nakonec byl gel vyfotografován digitálním fotoaparátem.

8 EXPRESE REKOMBINANTNÍ TEV PROTEASY

Expres proteinu v bakteriích byla prováděna na jiném pracovišti, a proto zde bude pouze stručně popsána.

LB médium (1 L):

10 g trypton, 5 g kvasinkový extrakt, 5 g NaCl, 1 L ddH₂O.

Pufir PBS (1 L):

100 mM NaCl (5,84 g), 10 mM Na₂HPO₄·12H₂O (3,58 g), ddH₂O (1 L), pH upraveno na 7,2.

Pufir A (1 L):

50 mM Tris (6,06 g), 50 mM NaCl (2,92 g), 5 mM EDTA (1,15 g), ddH₂O (1 L), pH upraveno na 8,0.

Pufir SA (1 L):

50 mM Tris (6,06 g), 50 mM NaCl (2,92 g), 5 mM EDTA (1,15 g), 1 M NaCl (58,44 g), ddH₂O (1 L), pH upraveno na 8,0.

Pufir TA (1 L):

50 mM Tris (6,06 g), 50 mM NaCl (2,92 g), 5 mM EDTA (1,15 g), 1% Triton X-100 (10 ml), ddH₂O do 1 L, pH upraveno na 8,0.

Pufir B (1 L):

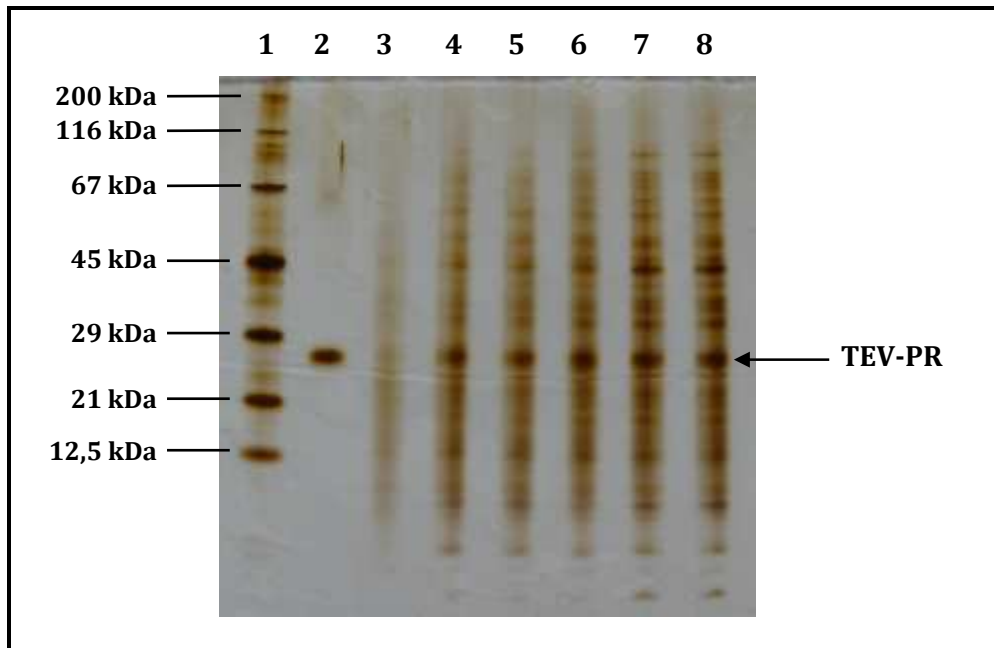
50 mM Tris (6,06 g), 250 mM NaCl (14,61 g), 5 mM EDTA (1,15 g), ddH₂O (1 L), pH upraveno na 8,0.

Pro získání velkého množství rekombinantní TEV-PR byl použit expresní vektor pET-22b se silným T7 promotorem pro *E. coli* (příloha P II). Bakteriální buňky BL21 (DE3) RIL byly transformovány expresním vektorem metodou teplotního šoku. Transformované buňky byly kultivovány při 37°C přes noc na agarové plotně obsahující LB médium a ampicilin v koncentraci 0,1 mg.ml⁻¹. Narostlé kolonie byly setřeny z plotny do tekutého LB média s ampicilinem o stejné koncentraci rozděleného po 0,5 L do 2L-Erlenmeyerových baněk. Bakteriální kultury byly kultivovány v orbitálním inkubátoru při 37°C za frekvence třepání 200 rpm do hodnoty OD₆₀₀ = 1,0. Další postup závisel na požadované formě exprimovaného proteinu:

1. Pro získání proteinu ve formě inkluzních tělísek byla kultura indukována přidavkem IPTG do finální koncentrace 0,5 mM. Protein byl produkován po dobu 3 h za teploty 37°C. Buňky byly odstředěny při 4 500 g za teploty 4°C po dobu 15 min, promyty pufrům PBS a znovu odstředěny do 50 ml Falcon zkumavek, resuspendovány v pufru A, 3x zmrazeny a rozmrazeny, inkubovány 1 h za laboratorní teploty s lysozymem v koncentraci 0,1 mg.ml⁻¹, poté inkubovány 1 h za laboratorní teploty po přidání deoxycholátu sodného do finální koncentrace 0,02 %, sonikovány 4x 1 min za chlazení ledem a odstředěny při 15 000 g za teploty 4°C po dobu 30 min. Peleta byla resuspendována v pufru SA s pomocí sonikace 3x 1 min, suspenze byla odstředěna při 15 000 g za teploty 4°C po dobu 30 min. Stejným způsobem byla inkluzní tělíska promyta pufrům TA.
2. Pro získání proteinu rozpuštěného v cytoplazmě buněk v nativním stavu byla kultura ochlazená na teplotu 20°C a indukována přidavkem IPTG do finální koncentrace 0,1 mM a kultivována za této teploty po dobu 18 h. Buňky byly odstředěny při 4 500 g za teploty 4°C po dobu 15 min, resuspendovány v pufru B, inkubovány 1 h při teplotě 4°C, sonikovány 4x 1 min a odstředěny při 15 000 g za teploty 4°C po dobu 30 min. Buněčný supernatant a peleta byly uchovány k další analýze a izolaci proteinu.

Z časových důvodů byla v bakterii *E. coli* exprimována pouze ta varianta genu pro TEV-PR, která ve svém řetězci obsahovala jak mutace pro potlačení autoproteolýzy, tak mutace zvyšující rozpustnost.

Na Obr. 11 je zobrazen fotografický záznam gelu z tricinové elektroforézy, který dokumentuje nárůst TEV-PR při teplotě 20°C před a po indukci.



Obr. 11: *Nárůst TEV-PR v bakteriálních buňkách BL21 (DE3) RIL při teplotě 20°C před a po přidavku IPTG. Šipkou jsou označeny bandy TEV-PR.*

1 - SDS Page Protein marker [2 μ l], 2 - komerčně dodávaná TEV-PR [3 μ l], 3 - TEV-PR před indukcí [5 μ l], 4 - TEV-PR 2 h po indukci [5 μ l], 5 - TEV-PR 4 h po indukci [5 μ l], 6 - TEV-PR 14 h po indukci [5 μ l], 7 - TEV-PR 16 h po indukci [5 μ l], 8 - TEV-PR 18 h po indukci [5 μ l]

9 DETEKCE A ANALÝZA REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

9.1 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ DLE BRADFORDOVÉ

Koncentrace proteinů byla stanovena jednou z nejpoužívanějších kolorimetrických metod, a to *metodou dle Bradfordové* [37]. Princip této metody spočívá v tom, že se specifické činidlo (Coomassie Brilliant Blue G-250) váže v proteinech na bazické a aromatické aminokyseliny, což se projevuje změnou barvy. Ta je způsobena posunem absorpčního maxima vázaného barviva ze 465 na 595 nm.

Činidlo dle Bradfordové:

0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 95% (v/v) ethanol, 85% (w/v) kyselina fosforečná.

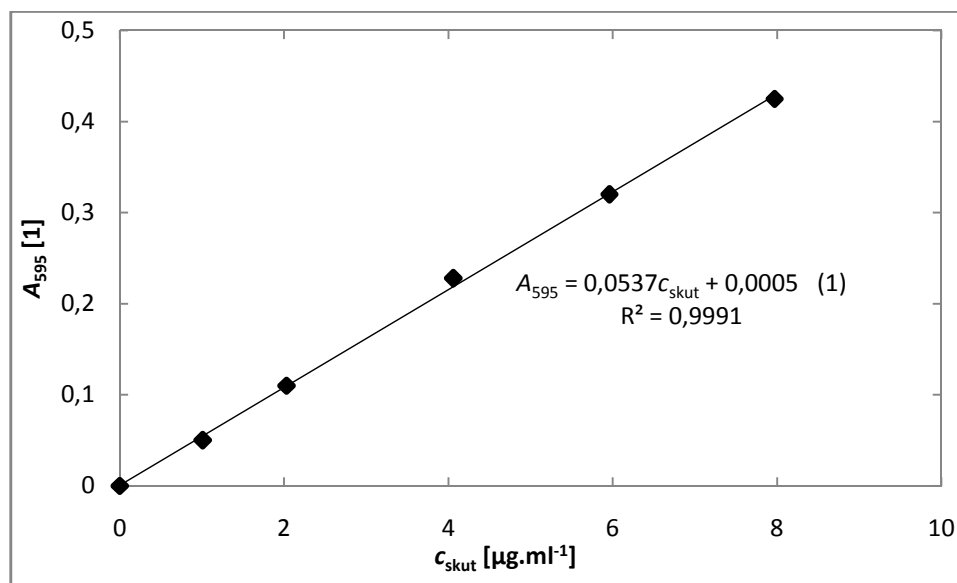
Sestrojení kalibrační křivky:

Ke stanovení koncentrace proteinů byla sestrojena kalibrační křivka, tj. závislost koncentrace kalibračních roztoků na příslušných absorbancích, která je znázorněna na Obr. 12. Pro kalibraci byl jako standardní roztok použit hovězí sérový albumin (BSA) o koncentraci $1,45 \text{ mg.ml}^{-1}$. Ze zásobního roztoku BSA byly připraveny kalibrační roztoky v rozmezí koncentrací $0 - 15 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ dle Tab. XII. Poté bylo do jednotlivých 1,5 ml mikrozkušavek přidáno 800 μl každého tohoto roztoku a 200 μl činidla dle Bradfordové (v tomto případě Protein Assay od firmy Bio-Rad, kat. číslo 500-0006). Takto vzniklé směsi byly po důkladném promíchání inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 5 min. Po uplynutí této doby byly změřeny jejich absorbance při vlnové délce 595 nm proti blanku, který obsahoval pouze 800 μl ddH₂O a 200 μl činidla dle Bradfordové. Zbarvení směsí je stabilní nejméně po dobu 1 h.

Tab. XII: Naměřené a vypočtené hodnoty potřebné pro sestavení kalibrační křivky.

#	$c_{\text{teor}} [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$	$c_{\text{skut}} [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$	$A_{595} [1]$
1	0	0,00	0,000
2	1	1,01	0,050
3	2	2,03	0,110
4	4	4,06	0,228
5	6	5,96	0,320
6	8	7,97	0,425
7	10	10,01	0,494
8	12	12,04	0,578
9	15	14,94	0,659

c_{teor} - teoretická koncentrace BSA [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$], c_{skut} - skutečná koncentrace BSA [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$], A_{595} - absorbance při 595 nm [1]



Obr. 12: Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové.

Stanovení koncentrace proteinu ve vzorku:

Vzorek obsahující žádaný protein byl v 1,5 ml mikrozkuhavce naředěn ddH₂O do celkového objemu 800 μl tak, aby po přidání 200 μl činidla Bradfordové bylo zbarvení takto vzniklé směsi srovnatelné se zbarvením blanku. Inkubace probíhala po dobu 5 min při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Naměřená hodnota byla dosazena do rovnice (1) a tím byla vypočtena koncentrace proteinu ve vzorku vyjádřená v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

9.2 ELEKTROFORÉZA V TRIS-TRICINOVÉM PUFRU [38]

Elektroforéza v Tris-tricinovém pufru je technika, která byla použita k separaci proteinů, a to na základě jejich elektroforetické pohyblivosti. Ta závisí na délce polyproteinového řetězce, a tedy nepřímo na molekulové hmotnosti. Oproti klasické SDS-PAGE (z angl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) [39] má tu výhodu, že dovoluje separovat proteiny menší než 10 - 15 kDa.

Separční a zaostřovací gel:

Tab. XIII: *Složení separačního a zaostřovacího gelu (pro jeden gel v použité aparatuře).*

Složka	Separční gel (10 ml)	Zaostřovací gel (6,25 ml)
ddH ₂ O	2,0 ml	4,2 ml
Zásobní roztok akrylamidu	2,0 ml	0,5 ml
Gelový pufr	3,33 ml	1,55 ml
50% glycerol	2,67 ml	–
TEMED	10 μl	10 μl
10% peroxidisíran amonný	100 μl	100 μl

TEMED a peroxidisíran amonný byly k prvním čtyřem komponentám v Tab. XIII pokaždé přidávány až těsně před nalitím obou gelů mezi skla, a to z toho důvodu, že po jejich přidání začal gel ihned polymerovat.

Zásobní roztok akrylamidu (49,5 % T, 3 %) (100 ml):

Akrylamid (48,0 g), Bisakrylamid (1,5 g), ddH₂O (100 ml).

Pozn.: T znamená celkovou % koncentraci akrylamidu a bisakrylamidu, C % koncentraci bisakrylamidu vzhledem k celkové koncentraci T.

Gelový pufr (250 ml):

3 M Tris (90,86 g), 0,3% SDS (0,75 g), ddH₂O (250 ml), pH upraveno na 8,45.

Anodový pufr (1 L):

0,2 M Tris (24,23 g), ddH₂O (1 L), pH upraveno na 8,9.

Katodový pufr (500 ml):

0,1 M Tris (6,06 g), 0,1 M Tricin (8,96 g), 0,1% SDS (0,5 g), ddH₂O (500 ml).

2X vzorkový redukující pufr (10 ml):

0,1 M Tris (0,12 g), 24% glycerol (2,4 ml), 8% SDS (0,8 g), 0,2% bromfenolová modř (0,02 g), 200 mM 2-merkptoethanol (140,8 μ l), ddH₂O do 10 ml.

Provedení elektroforézy:

V prvé řadě byla sestavena skla, a to tak, že na vodorovnou podložku byl umístěn držák na skla. Ta do něj byla vložena tak, že vykrojené sklo bylo z vnější strany aparatury. Mezi skla byly umístěny mezerníky, tzv. spacers a hned nato byl mezi ně nejprve nalit separační a poté zaostřovací gel. Jakmile byl zaostřovací gel nalit, byl do něj vložen hřeben pro vytvoření 10 startovních jamek pro nanášení vzorků. Gely tuhly při laboratorní teplotě po dobu cca 20 min. Po dokonalém ztuhnutí byla skla obrácena tak, že sklo s výřezem bylo umístěno z vnitřní strany aparatury. Hřeben byl opatrně vyjmut z gelu a vzniklé jamky byly promyty menším množstvím katodového pufru. Poté byly do jamek nanášeny jednotlivé vzorky. Do první jamky byly napipetovány 2 μ l proteinového markeru, do zbylých jamek vzorky obsahující zkoumané proteiny zředěné vzorkovým redukujícím pufrům v poměru 1:1. Po napipetování vzorků byl držák se skly a gely vložen do držáku s elektrodami. Do elektrodových komor byl nalit anodový pufr. Elektroforetická aparatura byla poté připojena ke zdroji elektrického napětí. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 140 V, a to tak dlouho, než čelo elektroforézy dosáhlo spodního okraje gelu.

9.3 BARVENÍ GELŮ STŘÍBREM [40]

Je jednou z nejpoužívanějších metod pro detekci proteinů separovaných pomocí gelové elektroforézy, v tomto případě tricinové. Detekce v zásadě závisí na tom, že se Ag⁺ ionty váží v proteinech na postranní řetězce aminokyselin, především na -SH a -COOH skupiny. Každý protein je tedy stříbrem barven v závislosti na svém aminokyselinovém složení.

Fixační roztok (1 L):

50% technický C₂H₅OH (500 ml), 12% HAc (120 ml), 0,05% HCHO (37%) (1,35 ml), ddH₂O do 1 L.

Oplachovací roztok (1 L):

20% technický C₂H₅OH (200 ml), ddH₂O do 1 L.

Citlivostní roztok (1 L):

0,02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,2 g), ddH₂O (1 L).

Barvicí roztok (100 ml):

0,2% AgNO_3 (0,2 g), 0,076% HCHO (37%) (205 μl), ddH₂O do 1 L.

Vyvolávací roztok (1 L):

6% Na_2CO_3 (60 g), 0,000 4% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (4 mg), 0,05% HCHO (37%) (1,35 ml), ddH₂O do 1 L.

Zakončovací roztok (1 L):

12% HAc (120 ml), ddH₂O do 1 L.

Sušicí roztok (1 L):

20% technický $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (200 ml), 3% glycerol (3 ml), ddH₂O do 1 L.

Provedení barvení stříbrem

Gel byl:

- (1) po dobu 2 h inkubován ve *fixačním roztoku*.
- (2) po dobu 20 min inkubován v *oplachovacím roztoku*. Tento krok byl opakován celkem 3x.
- (3) po dobu 2 min inkubován v *citlivostním roztoku*.
- (4) 2x oplachován ddH₂O, vždy po dobu 1 min.
- (5) po dobu 20 min inkubován v *barvicím roztoku*.
- (6) po dobu 20 - 60 s promýván značným množstvím ddH₂O.
- (7) krátce promyt *vyvolávacím roztokem*.
- (8) po dobu 2 - 5 min inkubován v cca 300 ml *vyvolávacího roztoku*. V tomto kroku bylo pozorně sledováno vyvíjení gelu. Jakmile bylo dosaženo požadované intenzity bandů, reakce byla ukončena, a to přidavkem 50 ml *zakončovacího roztoku* přímo na gel, který byl ponořen ve *vyvolávacím roztoku*. Po dobu 10 min byl gel mírně míchán. Vyvíjení bylo u konce, jakmile skončilo bublání roztoku.
- (9) před sušením inkubován po dobu 2 h v *sušicím roztoku*.

10 DENATURACE A REFOLDING INKLUZÍ TEV PROTEASY

Protože je TEV-PR málo rozpustná, exprimuje se často ve formě tzv. *inkluzních tělísek*, což jsou nerozpustné agregáty nevhodně strukturovaného proteinu. Jelikož bylo potřeba získat protein v nativním stavu, muselo dojít k vytvoření správné konformace. Z toho důvodu byl takto strukturovaný protein rozpuštěn v denaturačním pufru, který obsahoval chaotropní činidlo. Tím bývají jednoduché organické látky, jako močovina nebo guanidin, které rozplétají proteinové řetězce do náhodných, velmi volných konformací.

Denaturační pufr (50 ml):

10 mM Tris (0,061 g), 50 mM Na₂HPO₄·12 H₂O (0,90 g), 9 M močovina (27,03 g), 0,1% 2-merkaptoethanol (50 µl), ddH₂O do 50 ml, pH upraveno na 8,0.

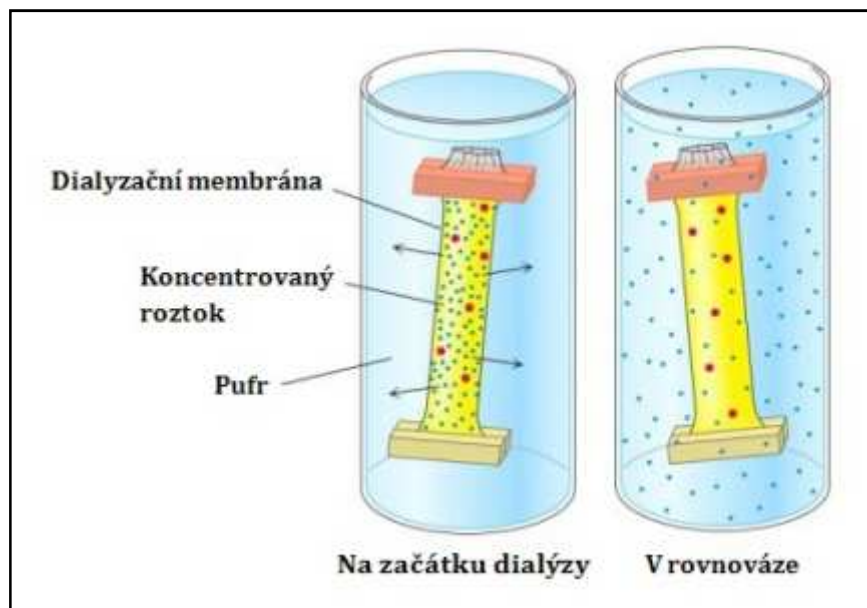
Refoldingový pufr (1 L):

- (1) 100 mM Tris (12,11 g), 500 mM NaCl (29,22 g), 5 mM DTT (0,771 g), 0,5 mM EDTA (0,115 g), 50% glycerol (500 ml), ddH₂O do 1 L, pH upraveno na 8,5.
- (2) 100 mM Tris (12,11 g), 500 mM NaCl (29,22 g), 5 mM DTT (0,771 g), 0,5 mM EDTA (0,115 g), 40% glycerol (400 ml), ddH₂O do 1 L, pH upraveno na 8,5.
- (3) 100 mM Tris (12,11 g), 500 mM NaCl (29,22 g), 5 mM DTT (0,771 g), 0,5 mM EDTA (0,115 g), 25% glycerol (250 ml), ddH₂O do 1 L, pH upraveno na 8,5.

Provedení denaturace:

Ke vzorku inkluzí TEV-PR bylo přidáno určité množství denaturačního pufru obsahující 9 M močovinu. Vzniklá směs byla nejprve promíchána třepáním na Vortexu a potom odstředěna na centrifuze po dobu 15 min při 16 000 g. Získaný supernatant, z něhož bylo odebráno 20 µl na elektroforézu, byl přemístěn do 50 ml Falcon zkumavky a míchán za laboratorní teploty po dobu 2 - 3 h. Naopak sraženina byla třepáním na Vortexu rozpuštěna v cca 5 ml denaturačního pufru a odstředěna po dobu 15 min při 16 000 g. Získaný supernatant (opět odběr 20 µl na elektroforézu) byl přidán k supernatantu předchozímu, jenž byl míchán na míchačce. Sraženina byla opět rozpuštěna v denaturačním pufru. Tento krok se opakoval ještě 2x.

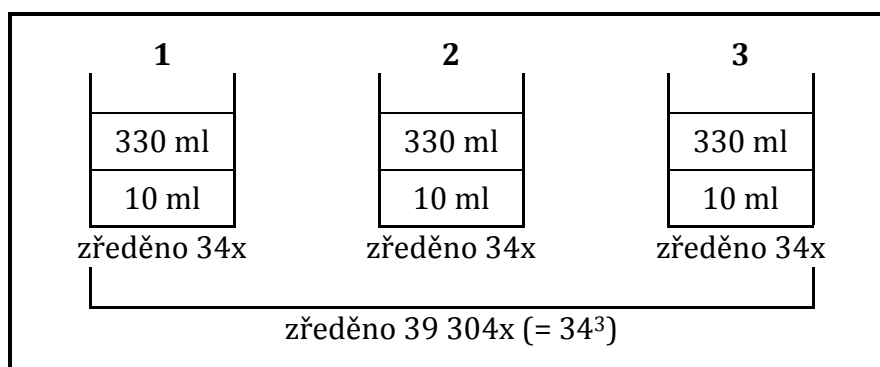
Po denuraci byl vzorek TEV-PR dialyzován proti zvolenému refoldingovému pufru, a to kvůli odstranění nadbytečného množství močoviny. Na Obr. 13 je znázorněn průběh dialýzy.



Obr. 13: Schematické znázornění průběhu dialýzy.

Provedení dialýzy:

Nejprve byla celulosová dialyzační membrána na dobu cca 15 min ponořena do ddH₂O, aby se odstranil glycerin jako zvláčňovadlo a další konzervační látky. Poté byl do membrány, která byla na jednom konci uzavřena svorkou, nalit vzorek TEV-PR. Jakmile byla membrána naplněna vzorkem, uzavřel se její druhý konec a zkontrolovalo se, zda vzorek v nějakém místě neuniká. Dialýza byla prováděna při teplotě 4°C ve třech krocích za účelem dosažení co nejvyššího zředění močoviny ve vzorku TEV-PR. Postup byl následující: refoldingový pufr byl rozdělen na tři stejné podíly a vzorek TEV-PR byl postupně ponořen do každého z nich na dobu cca 10 h. Na Obr. 14 je znázorněno schéma dialýzy vzorku TEV-PR o objemu 10 ml proti 1 L refoldingového pufru.



Obr. 14: Schéma dialýzy vzorku TEV-PR ve třech podílech refoldingového pufru.

11 PURIFIKACE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ

Purifikací rekombinantního proteinu rozumíme sérii metod vedoucích k izolaci čistého proteinu z bakteriální kultury. Sestává zejména z metod chromatografických, ale i některých doplňujících postupů, jako např. čištění inkluzních tělísek. V rámci této diplomové práce byly použity tyto techniky:

- a) *afinitní* chromatografie,
- b) chromatografie na *iontoměničích*,
- c) *gelová permeační* chromatografie,

přičemž prvně zmíněná metoda umožňuje purifikaci proteinů na základě specifických interakcí, druhá na základě jejich nábojů a poslední na základě jejich rozdílných molekulových velikostí.

11.1 AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE NA VÁZANÝCH KOVOVÝCH IONTECH

Jedním ze základních purifikačních kroků pro rekombinantní proteiny je *afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech* (IMAC, z angl. *immobilized metal affinity chromatography*) [41]. Na konec genu rekombinantního proteinu se připojí kodony pro tzv. *histidinovou kotvu* (His-tag, sekvence šesti histidinů na N- nebo C-konci fúzního proteinu). Uvedená metoda je založena na interakcích mezi histidinovou kotvou a Ni^{2+} ionty.

Používané pufrы:

(1) **Pufry vazebné (500 ml):**

✓ **Pufr A1:**

50 mM Tris (3,03 g), 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (8,95 g), 8 M močovina (240,2 g), 0,1% 2-merkaptoethanol (500 μl), ddH₂O do 500 ml, pH upraveno na 8,0 a přefiltrováno přes membránový filtr Pragopor 6.

✓ **Pufr A2:**

100 mM Tris (6,06 g), 0,5 mM EDTA (0,057 g), 50% glycerol (250 ml), 0,1% 2-merkaptoethanol (500 μl), ddH₂O do 500 ml, pH upraveno na 8,0 a přefiltrováno přes obyčejný filtrační papír.

(2) Pufry eluční (100 ml):✓ **Pufr A3:**

Z pufru A1 bylo odebráno 100 ml a přidáno takové množství imidazolu, aby jeho koncentrace byla $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$, takže $m(\text{imidazol}) = 3,40 \text{ g}$. Hodnota pH upravena na 8,0 a přefiltrováno přes obyčejný filtrační papír.

Použitá kolona:

✓ HisTrap HP: 5 ml

- matrice: vysoce zesíťovaná 6% agaróza

Provedení IMAC chromatografie:

Kolona byla nejprve ekvilibrována pufrům A, a to 20-násobkem jejího objemu. Poté byl na kolonu nanesen vzorek obsahující žádaný protein. Ten se prostřednictvím histidinové kotvy vázal na Ni^{2+} ionty. Vzorek proteklý kolonou, tzv. *flow-through* (FT), byl zachytáván do kádinky, a to z toho důvodu, kdyby se všechen protein na koloně nezachytil. Po nanesení vzorku byla kolona promývána opět pufrům A, a to tak dlouho, dokud hodnota absorbance při 280 nm nedosáhla nulové hodnoty. Stejně jako FT, tak i promývací roztok byl zachytáván do kádinky, a to proto, kdyby se protein z kolony uvolňoval ještě před vlastní elucí. Navázaný protein byl z kolony uvolňován jedním z následujících způsobů:

- a) lineárním gradientem imidazolu, jako kompetitivního činidla, ve směsném pufru A a B,
- b) snížením pH.

Přesné podmínky aplikace zmíněných gradientů jsou popsány ve výsledkové části.

Úplná regenerace kolony:

Regenerace kolony byla prováděna po 5 - 7 purifikacích. Bylo postupováno dle manuálu ke koloně [42].

Regenerační pufr (100 ml):

20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0,72 g), 0,5 M NaCl (2,92 g), 50 mM EDTA (1,86 g), ddH₂O (100 ml), pH upraveno na 7,4.

Vazebný pufr (500 ml):

20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (3,58 g), 0,5 M NaCl (14,61 g), 30 mM imidazol (1,02 g), ddH₂O (500 ml), pH upraveno na 7,4.

1. Kolona byla nejprve promyta regeneračním pufrem za účelem vymytí Ni^{2+} iontů, a to 20-násobkem objemu kolony.
2. Takto promytá kolona byla poté čištěna následujícím způsobem:
 - a) pro vymytí iontově vázaných proteinů byla kolona nejprve promyta menším množstvím 1,5 M roztokem NaCl a potom ddH₂O, a to 20-násobkem objemu kolony
 - b) pro vymytí hydrofobně vázaných proteinů byla kolona po dobu 1 - 2 h promývána 1 M roztokem NaOH. Poté byla kolona nejprve promyta vazebným pufrem, a to 20-násobkem jejího objemu, a hned nato ddH₂O (20-násobkem objemu kolony).
 - c) pro vymytí lipoproteinů a lipidů byla kolona nejprve po dobu 15 - 20 min promývána 30% roztokem isopropanolu, a to 20-násobkem objemu kolony, a potom opět ddH₂O (20-násobkem objemu kolony)

Poté byla kolona promyta 0,1 M roztokem NiSO₄ (20-násobkem objemu kolony) za účelem opětovného navázání Ni^{2+} iontů. Dále byla kolona nejprve promyta ddH₂O, a to 5-násobkem jejího objemu, a potom stejným množstvím vazebného pufru pro ekvilibraci kolony.

11.2 CHROMATOGRRAFIE NA IONTOMĚNIČÍCH

Chromatografie na iontoměničích (IEC, z angl. *ion-exchange chromatography*) je metoda, která separuje proteiny na základě jejich různé afinity k iontoměničům, způsobené rozdíly v nábojích. V rámci diplomové práce byly použity dva druhy iontoměničů:

- a) *katex* se záporně nabitými funkčními skupinami, jimiž váže kationty,
- b) *anex* s kladně nabitými funkčními skupinami, jimiž váže anionty.

Důležitou roli při separaci proteinů s užitím zmíněné metody hraje pH. Náboj proteinů závisí totiž jak na pH prostředí, tak na izoelektrickém bodu (pI) proteinu, přičemž platí následující:

- a) $\text{pH} < \text{pI} \rightarrow$ protein nese kladný náboj, a proto se váže na katex,
- b) $\text{pH} > \text{pI} \rightarrow$ protein nese záporný náboj, a proto se váže na anex,
- c) $\text{pH} = \text{pI} \rightarrow$ náboj proteinu je nulový, a proto se na iontoměniče neváže.

Na internetu nalezneme celou řadu programů, pomocí níž lze vypočítat hodnotu izoelektrického bodu proteinů z jejich primární sekvence [45, 46].

Používané pufry:

- na katex:

(1) Pufry vazebné (500 ml):✓ **Pufř B1:**

50 mM Tris (3,03 g), 0,5 mM EDTA (0,057 g), 50 mM MES (5,33 g), 0,1% 2-merkapt ethanol (500 μ l), ddH₂O do 500 ml, pH upraveno na hodnotu buď 6,0, anebo na 7,0 a poté přefiltrováno přes membránový filtr Pragopor 6.

(2) Pufry elučňí (100 ml):✓ **Pufř B2:**

Z pufřu A4 bylo odebráno 100 ml a přidáno takové množství NaCl, aby jeho koncentrace byla 1 mol.l⁻¹, takže $m(\text{NaCl}) = 5,84$ g. Hodnota pH upravena buď na 6,0, anebo na 7,0 a poté přefiltrováno přes membránový filtr Pragopor 6.

- na anex:

(1) Pufry vazebné (500 ml):✓ **Pufř C1:**

50 mM Tris (3,03 g), 50 mM Na₂HPO₄.12H₂O (8,95 g), 0,1% 2-merkapt ethanol (500 μ l), ddH₂O do 500 ml, pH upraveno na 7,5 a přefiltrováno přes membránový filtr Pragopor 6.

(2) Pufry elučňí (100 ml):✓ **Pufř C2:**

Z pufřu C1 bylo odebráno 100 ml a přidáno takové množství NaCl, aby jeho koncentrace byla 1 mol.l⁻¹, takže $m(\text{NaCl}) = 5,84$ g. Hodnota pH upravena na 7,5 a přefiltrováno přes membránový filtr Pragopor 6.

Použitě kolony:✓ **Katex:** SP Sepharose Fast Flow: 10 ml

- matrice: zesíťovaná 6% agaróza
- funkční skupina: sulfopropylová (-O-CH₂CHOHCH₂OCH₂CH₂CH₂SO₃⁻)

✓ **Anex:** Q Sepharose Fast Flow: 10 ml

- matrice: zesíťovaná 6% agaróza
- funkční skupina: kvartěrní amoniová (-O-CH₂CHOHCH₂OCH₂CHOHCH₂N⁺(CH₃)₃)

Provedení chromatografie na iontoměničích:

Kolona byla nejprve ekvilibrována pufrům A, a to 10-násobkem jejího objemu. Poté byl na kolonu nanesen vzorek obsahující žádaný protein. Po jeho nanesení byla kolona promývána opět pufrům A, a to tak dlouho, dokud hodnota absorbance při 280 nm nedosáhla nulové hodnoty. Poté byl navázaný protein uvolňován z kolony lineárním gradientem iontové síly, v tomto případě NaCl, ve směsném pufru A a B, přičemž přesné podmínky aplikace gradientu jsou popsány ve výsledkové části. Stejně jako u IMAC chromatografie, tak i zde byly zachytávány frakce z FT a promývání.

11.3 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRRAFIE

Gelová permeační chromatografie (GPC, z angl. gel permeation chromatography) je metoda, kterou se separují proteiny na základě rozdílných velikostí a tvarů jejich molekul. Stacionární fáze je zde tvořena gelem s póry určité velikosti. Je-li na kolonu nanášena směs molekul o různých velikostech, procházejí kolonou nejprve velké molekuly a potom molekuly malé. Ty jsou v koloně zadržovány nejdéle, protože do pórů stacionární fáze pronikají snáze než molekuly velké.

Používané pufrů pro GPC (500 ml):

100 mM Tris (6,06 g), 0,5 mM EDTA (0,057 g), 25% glycerol (125 ml), 0,1% 2-merkaptoethanol (500 μ l), ddH₂O do 500 ml, pH upraveno na 8,0 a přefiltrováno přes obyčejný filtrační papír.

Použitá kolona:

- ✓ HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR: 120 ml
 - matrice: zesíťovaný kopolymer allyl dextranu a N,N-methylenbisakrylamidu

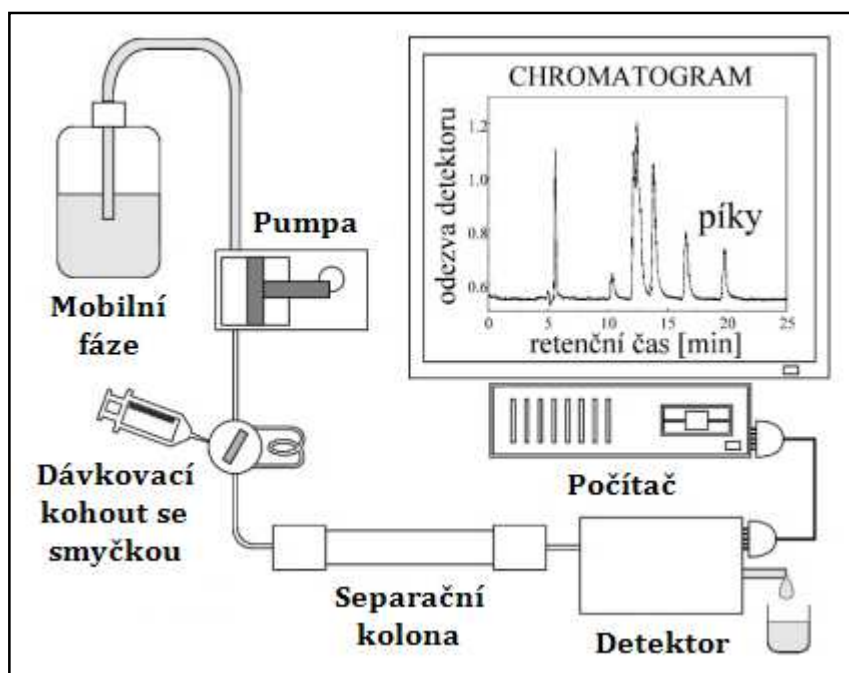
Provedení gelové permeační chromatografie:

Kolona byla nejprve kondicionována pufrům pro GPC, a to 10-násobkem jejího objemu. Poté byl na kolonu nanesen vzorek obsahující žádaný protein. Po jeho nanesení byl na kolonu čerpán pufr pro GPC. Tím byly z kolony na základě rozdílných molekulových velikostí uvolňovány všechny proteiny obsažené ve vzorku včetně proteinu žádaného.

12 ENZYMOVÁ KINETIKA TEV PROTEASY [27]

Pro stanovení kinetických parametrů TEV proteasy, a to K_M a k_{cat} , byla použita vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC, z angl. *high performance liquid chromatography*) na reverzní fázi. Stanovení bylo založeno na separaci peptidového substrátu, štěpeného TEV proteasou, na koloně a jeho detekci pomocí UV detektoru při 214 nm. Při této vlnové délce absorbují všechny peptidy. K separaci docházelo na základě odlišné hydrofobicity fragmentů vzniklých štěpením peptidového substrátu se silikagelovým nosičem s navázanými hydrofobními řetězci C18 (oktadecyl).

Na Obr. 15 je znázorněno schéma chromatografického systému, který byl používán během diplomové práce.



Obr. 15: Schéma chromatografického systému pro HPLC.

Veškeré vzorky byly analyzovány pomocí kapalinového chromatografu Waters 600E za následujících podmínek:

- ✓ **kolona:** Reprosil 100 C18: 250 x 4 mm,
- ✓ **mobilní fáze:** 18,5% acetonitril + 0,05% TFA v destilované vodě,
- ✓ **průtok mobilní fáze:** 0,5 ml.min⁻¹,
- ✓ **detekce:** UV 214 nm,
- ✓ **objem nástřiku:** 20 μl,
- ✓ **teplota:** laboratorní teplota.

Separace fragmentů v koloně byla prováděna pomocí *isokratické eluce*, tzn. po celou dobu separace protékala kolonou konstantní rychlostí mobilní fáze o konstantním složení.

Mobilní fáze (1 L):

18,5% acetonitril (185 ml), 0,05% kyselina trifluoroctová (0,5 ml), destilovaná voda do 1 L.

Mobilní fáze byla před každou analýzou po dobu cca 10 min odplyněna na ultrazvukové lázni. Každá z analýz byla započata až po ustálení základní linie (baseline). Toho bylo dosaženo správnou ekvilibrací chromatografického systému (kolona a detektor), tj. dostatečné vyhřátí detektoru (cca 30 min), nastavení správné citlivosti detektoru, odstranění vzduchových bublin z kolony zvýšením průtoku mobilní fáze atd.

Peptidový substrát [27]:

- ✓ k přípravě peptidového substrátu byl použit peptid, který:
 - byl nasyntetizován firmou VIDIA, s. r. o. a dodán v lyofilizovaném stavu,
 - má následující strukturu: H-TENLYFQ↓SGTRR-NH₂ v jednopísmenném aminokyselinovém kódu (tučně je vyznačena specifická sekvence pro TEV-PR, šipka označuje štěpné místo),
 - má relativní molekulovou hmotnost $M_r = 1\,470,62 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- ✓ na přípravu 1 ml substrátu o koncentraci $3,4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo použito:
 - 5 mg peptidu, 1 ml ddH₂O
- ✓ z peptidového substrátu byly poté připravovány reakční směsi pro HPLC analýzu, a to tak, že se finální koncentrace substrátu ve směsích pohybovaly v rozmezí $0 - 2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
- ✓ během diplomové práce byly připraveny celkem dva zásobní roztoky peptidového substrátu, které byly později odeslány na jiné pracoviště za účelem provedení aminokyselinové analýzy, tj. jedna z nejběžnějších technik, kterou lze stanovit množství každé aminokyseliny vyskytující se v daném proteinu [45]. Na základě této analýzy bylo zjištěno následující:
 - a) skutečná koncentrace zásobního roztoku používaného při měření enzymových kinetik komerčně dodávané AcTEV-PR byla 4,89 mM,
 - b) skutečná koncentrace zásobního roztoku používaného při měření enzymových kinetik připravené TEV-PR byla 3,41 mM.

Používané kinetické pufrы:

- ✓ **KP1:** 50 mM Tris, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8,0 (dodáván jako 20X koncentrát společně s AcTEV-PR firmy Invitrogen)
- ✓ **KP2:** 50 mM Na₂HPO₄·12 H₂O, 5 mM DTT, 800 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, pH 7,0 [27]

Reakční směsi pro stanovení enzymové kinetiky TEV-PR:

Složení reakčních směsí pro stanovení enzymové kinetiky jak připravené, tak komerčně dodávané TEV-PR se lišilo v závislosti na finálních koncentracích peptidového substrátu ve směsích o celkovém objemu 40 μ l. Koncentrace peptidu ve směsích se pohybovaly v rozmezí 0 - 2,5 mmol.l⁻¹.

a) připravená TEV-PR v kinetickém pufru KP1:

pufr KP1 (2 μ l), 100X DTT (0,4 μ l), připravená TEV-PR (0,5 μ l), peptidový substrát (Tab. XIV), ddH₂O do 40 μ l.

b) připravená TEV-PR v kinetickém pufru KP2:

pufr KP2 (20 μ l), připravená TEV-PR (0,5 μ l), peptidový substrát (Tab. XIV), ddH₂O do 40 μ l.

c) komerčně dodávaná TEV-PR v kinetickém pufru KP1:

pufr KP1 (2 μ l), 100X DTT (0,4 μ l), komerčně dodávaná TEV-PR (0,1 μ l), peptidový substrát (Tab. XIV), ddH₂O do 40 μ l.

Tab. XIV: *Finální koncentrace peptidového substrátu v reakčních směsích.*

$c_{\text{peptid}} [\text{mmol.l}^{-1}]$	$V_{\text{peptid}} [\mu\text{l}]$	$c_{\text{peptid}} [\text{mmol.l}^{-1}]$	$V_{\text{peptid}} [\mu\text{l}]$
0,02	0,235	0,3	3,53
0,03	0,353	0,4	4,69
0,04	0,471	0,6	7,04
0,05	0,588	1,0	11,76
0,06	0,706	1,5	17,65
0,08	0,941	2,0	23,53
0,1	1,176	2,5	29,41
0,2	2,35		

c_{peptid} - finální koncentrace peptidového substrátu [mmol.l⁻¹], V_{peptid} - pipetované množství peptidového substrátu [μ l]

Ukončovací roztok (10 ml):

4,5 M guanidin-hydrochlorid (4,30 g), 1% kyselina trifluoroctová (100 μ l), ddH₂O do 10 ml.

Měření enzymové kinetiky:

Enzymová kinetika byla měřena jak pro připravenou, tak pro komerčně dodávanou TEV-PR. Pro připravenou TEV-PR bylo stanovení provedeno ve dvou různých pufrech, a to v KP1 a KP2, pro komerčně dodávanou TEV-PR pouze v pufru KP1.

Množství TEV-PR v reakční směsi bylo voleno tak, aby peptidový substrát byl rozštěpen max. do 10 %. Bylo to z toho důvodu, aby se naměřené rychlosti co nejvíce blížily rychlostem počátečním. To samé platilo i v případě volby optimální doby inkubace, které se pohybovaly v rozmezí 10 - 20 min.

Reakční směsi byly inkubovány při teplotě 30°C. Činnost TEV-PR v reakční směsi byla po určité době inaktivována přidávkem 160 μ l ukončovacího roztoku.

III. VÝSLEDKY A DISKUSE

13 NÁVRH SYNTÉZY GENU PRO TEV PROTEASU

Při návrhu genu pro TEV proteasu se vycházelo z publikovaných prací [26, 46], v nichž byly popsány výhody zavedení některých mutací do proteinového řetězce. Podkladem pro návrh genu byla sekvence wild-type TEV proteasy.

Na serveru **www.expasy.org** byla nejprve nalezena její aminokyselinová sekvence zapsaná pomocí jednopísmenného kódu (Obr. 16).

GESLFGKPRD	YNPISSTICH	LTNESDGHTT	SLYGIGFGPF	IITNKHLFRR	NNGTLLVQSL	60
HGVFKVKNTT	TLQQHLIDGR	DMIIIRMPKD	FPPFPQKLKF	REPQREERIC	LVTTFQTKS	120
MSSMVSDTSC	TFPSSDGIFW	KHWIQTKDQ	CGSPLVSTRD	GFIVGIHSAS	NFTNTNNYFT	180
SVPKNFMELL	TNQEAAQWVS	GWRLNADSVL	WGGHKVFM SK	PEEPFQPVKE	ATQLMNELVY	240
SQ						242

Obr. 16: Aminokyselinová sekvence wild-type TEV-PR. Mezi červeně zvýrazněnými aminokyselinami se nachází místo samoštěpení TEV-PR.

Z Obr. 16 je vidět, že sekvence wild-type TEV-PR je tvořena 242 aminokyselinami. Jelikož je každá z aminokyselin kódována jedním kodonem, dostáváme tímto celkem 726 bazí.

Jak již bylo podrobněji řečeno v kapitole 5.3.4, štěpí wild-type TEV proteasa sama sebe mezi aminokyselinami Met²¹⁸ a Ser²¹⁹, což značně komplikuje její biotechnologické použití. Navíc je také špatně rozpustná. Obě tyto skutečnosti byly při návrhu syntézy genu zohledněny.

Za účelem omezení autoproteolýzy byl serin v pozici 219 proteinového řetězce nahrazen valinem (mutace S219V) [29]. Pro zvýšení rozpustnosti TEV-PR byly provedeny následující mutace: T17S, N68D a I77V [46].

Celkem byly pro TEV-PR vytvořeny dvě varianty genů, z nichž jedna zahrnovala pouze mutaci S219V, druhá navíc mutace T17S, N68D a I77V. Jakmile byly do návrhu genu vneseny příslušné mutace, bylo dále provedeno následující:

- a) na C-konec genu byla přidána tzv. *hexahistidinová kotva* (His₆), tj. šest po sobě jdoucích histidinů. Ty umožňují použít IMAC chromatografii, protože vykazují vysokou afinitu k Ni²⁺ iontům.

- b) jelikož se jedná o protein pocházející z jiného organismu, byla provedena optimalizace použití kodonů pro *E. coli* programem DNA2.0 Inc. za účelem zvýšení úrovně jeho exprese. Dále bylo zkontrolováno, zda gen neobsahuje štěpicí místa pro restriční endonukleázy, které mají být použity pro klonování.
- c) aby mohl být gen pro TEV-PR v bakteriích exprimován, musí na začátku proteinového řetězce obsahovat tzv. *start-kodon*, kterým bývá syntéza genu zahájena. Tímto kodonem je triplet ATG, který kóduje methionin.
- d) aby mohla být syntéza genu ukončena, musí gen na konci řetězce obsahovat jeden z tzv. *stop-kodonů*, v tomto případě to byl triplet TAA a TGA. Na Obr. 17 je zobrazen gen pro TEV-PR se začleněním histidinové kotvy a příslušných mutací do řetězce.

CATCACCATCATCATCATGGCGAATCTCTTTTTTAAAGGCCCGCGTGATTACAACCCGATC	60
H H H H H H G E S L F K G P R D Y N P I	20
TCGTCAAGCATCTGCCACCTGACCAACGAAAGCGACGGCCACACCACCTCCCTGTACGGT	120
S S S I C H L T N E S D G H T T S L Y G	40
ATCGGCTTCGGCCCGTTTCATCATCACCAACAAGCACTTGTTCGTCGTAATAACGGTACT	180
I G F G P F I I T N K H L F R R N N G T	60
CTGTTGGTGCAGTCCCTGCACGGTGTTCCTTAAAGGTAAAGGATACCACTACCCTCCAGCAG	240
L L V Q S L H G V F K V K D T T T L Q Q	80
CACCTGGTTGACGGCCGCGACATGATCATCATCCGATGCCGAAAGACTTTCACCGTTC	300
H L V D G R D M I I I R M P K D F P P F	100
CCTCAGAAACTGAAATTCGCGAACCTCAGCGTGAAGAACGTATTTGTCTGGTAACCACC	360
P Q K L K F R E P Q R E E R I C L V T T	120
AACTTCCAAACTAAGTCCATGAGTTCTATGGTGTCCGATACCTCCTGCACCTTCCCATCC	420
N F Q T K S M S S M V S D T S C T F P S	140
TCCGACGGTATCTTCTGGAAACTGGATCCAGACCAAAGATGGTCAGTGCGGTTCTCCG	480
S D G I F W K H W I Q T K D G Q C G S P	160
TTAGTCAGCACTCGTGATGGTTTCATCGTTGGTATCCATAGTGCCTCTAACTTACCAAC	540
L V S T R D G F I V G I H S A S N F T N	180
ACGAACAACACTACTTACCAGCGTCCCTAAAAAATTCATGGAAGTCTGACGAACCAGGAG	600
T N N Y F T S V P K N F M E L L T N Q E	200
GCGCAGCAGTGGGTGAGTGGCTGGCGTCTGAACGCAGATTTCGGTTCTCTGGGGTGGTCAT	660
A Q Q W V S G W R L N A D S V L W G G H	220
AAAGTTTTTCATGTTGAAACCAGAGGAACCATTTTCAGCCGGTTAAGGAAGCTACTCAACTG	720
K V F M V K P E E P F Q P V K E A T Q L	240
ATGAACGAACTGGTGTACTCTCAG	744
M N E L V Y S Q	248

Obr. 17: Nukleotidová a aminokyselinová sekvence TEV-PR včetně začlenění His-tagu a mutací T17S, N68D, I77V a S219V. *Modře* jsou označeny kodony, které byly změněny z důvodu potřeby zvýšení teploty tání některých překryvů minimálně nad 45 °C, lépe však nad 50 °C. *Zeleně* jsou označeny mutace pro zvýšení rozpustnosti, *červeně* mutace pro omezení autoproteolýzy. *Fialově* je označena histidinová kotva.

- e) výsledný gen byl rozdělen do dvou syntonů. Jelikož všechny tři mutaci odlišující výše uvedené dvě varianty genu spadají do oblasti syntonu 1, byl tento navržen ve dvou variantách označených S1 a S1M. Synton S2 je pro obě varianty stejný. Na oba konce

každého syntonu byla přidána dvě restriční místa, přičemž vnější byla použita pro zaklonování genu do plasmidu pUC19 (*EcoRI*, *HindIII*) a vnitřní pro spojení syntonů (*BbsI*) a zaklonování do plasmidu pET-22b (*NdeI*, *XhoI*) (Obr. 18 a 19).

<p>Synton 1: CAGTGAATTCATATG CATCACCATCATCATCATGGCGAATCTCTTTTTAAAGGCCCGCGTGATTACAACCCGATC TCGTCAACTATCTGCCACCTGACCAACGAAAGCGACGGCCACACCCTCCCTGTACGGT ATCGGCTTCGGCCCGTTTCATCATCACCAACAAGCACTTGTTTTCGTCGTAATAACGGTACT CTGTTGGTGCAGTCCCTGCACGGTGTTTTTAAGGTAAAGAACACCACTACCCTCCAGCAG CACCTGATTGACGGCCGCGACATGATCATCATCCGCATGCCGAAAGACTTTCCACCGTTC CCTCAGAAACTGAAATTCCGCGAACCTCAGCGTGAAGAACGTATTTGTCTGGTAACCACC AACTTCCAACT AAGTCCATGTCTTCAAGCTTAGCT</p>	A
<p>Synton 2: ACTGGAATTCGAAGACCG GTCCATGAGTTCTATGGTGTCCGATACCTCCTGCACCTTCCCATCCTCCGACGGTATCTT CTGGAAACTGATCCAGACCAAAGATGGTCAGTGCAGTTCTCCGTTAGTCAGCACTCG TGATGGTTTCATCGTTGGTATCCATAGTGCCTCTAACTTACCAACACGAACAACTACTT CACCAGCGTCCCTAAAACTTCATGGAAGTCTGACGAACCAGGAGGCGCAGCAGTGGGT GAGTGGCTGGCGTCTGAACGCAGATTCGGTTCTCTGGGGTGGTCATAAAGTTTTTCATGGT GAAACCAGAGGAACCATTTTCAGCCGGTTAAGGAAGCTACTCAACTGATGAACGAACTGGT GTACTCTCAG TAATGACTCGAGAAGCTTGTAC</p>	B

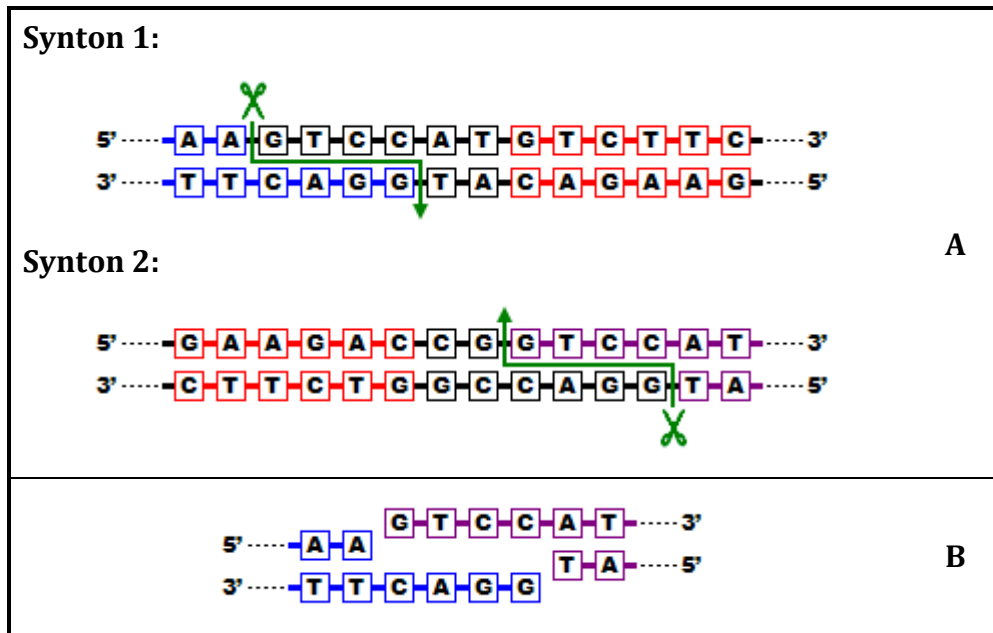
Obr. 18: Rozdělení genu *TEV-PR* do dvou syntonů.

A – Sekvence syntonu 1:

CAGT, **AGCT** = přesahy o 4 bázích, **GAATTC** = restriční místo pro *EcoRI*, **CATATG** = restriční místo pro *NdeI*, **GTCTTC** = restriční místo pro *BbsI*, **AAGCTT** = restriční místo pro *HindIII*.

B – Sekvence syntonu 2:

ACTG, **GTAC** = přesahy o 4 bázích, **GAATTC** = restriční místo pro *EcoRI*, **GAAGAC** = restriční místo pro *BbsI*, **TAA**, **TGA** = stop-kodony, **CTCGAG** = restriční místo pro *XhoI*, **AAGCTT** = restriční místo pro *HindIII*.



Obr. 19: Schéma štěpení a spojování obou syntonů.

A – Štěpení syntonů:

Červeně je označeno restrikní místo pro *Bbs*I.

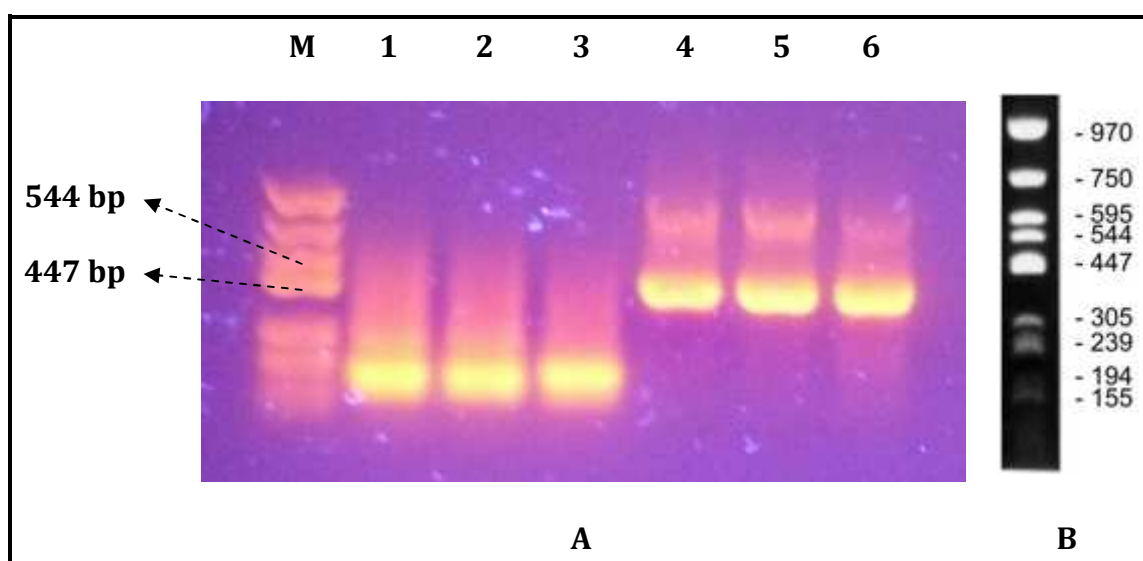
B – Spojování syntonů:

Modře je označen synton 1, fialově synton 2.

- f) syntony byly následně rozděleny na 7 oligonukleotidů délky 80 bp (s výjimkou posledního, který byl přizpůsoben celkové délce genu) s překryvy 18 bp (Obr. 6). Byly vypočítány teploty tání jednotlivých překryvů. V případech, kdy byla teplota tání příliš nízká (nižší než 47°C), byla provedena záměna některého kodonu za účelem jejího zvýšení. (Sekvence v obrázcích jsou uvedeny v této finální verzi.)
- g) syntéza oligonukleotidů byla objednána u externího dodavatele

14 SYNTÉZA GENU PRO TEV PROTEASU

Syntéza každého syntonu byla provedena dvoustupňovou PCR reakcí popsanou v kapitole 3.5. Detekce výsledku z dvoustupňové PCR byla provedena pomocí elektroforézy v 1,4% agarózovém gelu s přidaným ethidium bromidem a výsledek byl vizualizován pod UV zářením při 312 nm. Velikosti PCR produktů byly určeny jejich porovnáním s DNA markerem (Top-Bio, s. r. o.) známých velikostí, a to v rozmezí 155 - 970 bp. Výsledek PCR byl fotograficky zdokumentován. Na Obr. 20 je zobrazen fotografický záznam agarózového gelu.



Obr. 20: *Kontrola výsledku z dvoustupňové PCR.*

A – Fotografický záznam agarózového gelu:

M - PCR marker, 1 - synton S1 = produkt 1. PCR, 2 - synton S1M = produkt 1. PCR, 3 - synton S2 = produkt 1. PCR, 4 - synton S1 = produkt 2. PCR, 5 - synton S1M = produkt 2. PCR, 6 - synton S2 = produkt 2. PCR.

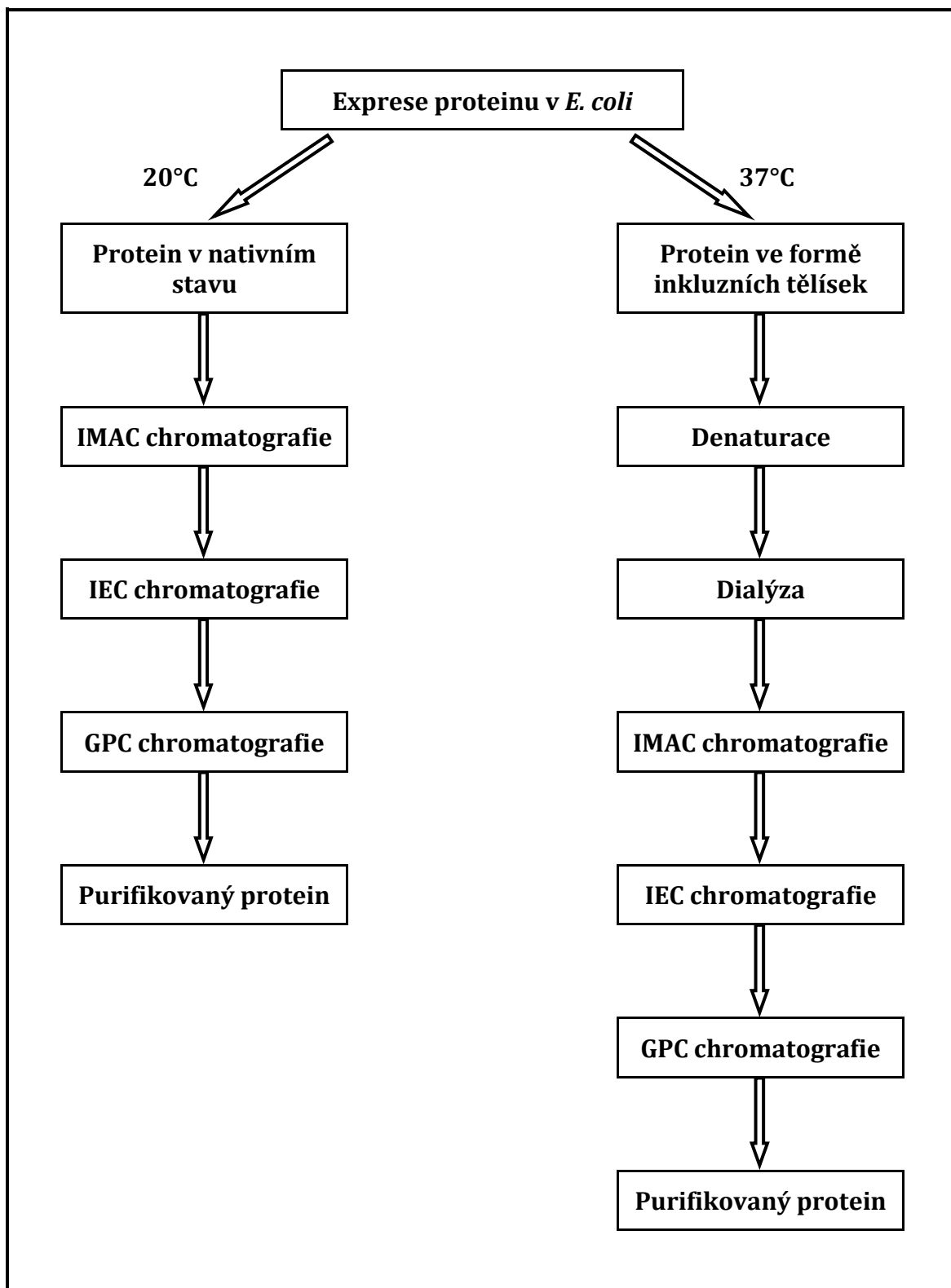
B – Velikosti fragmentů DNA markeru (155 - 970 bp): fotografie z webového katalogu Top-Bio, s. r. o. [47].

Při kontrole výsledku PCR experimentu se vycházelo z navržených sekvencí všech tří syntonů. Syntony S1 a S1M byly délky 412 bp a synton S2 délky 410 bp. Na základě fotografického záznamu byly syntony z 2. PCR reakce, jakožto finální produkty dvoustupňové PCR, srovnány s DNA markerem a bylo zjištěno, že syntéza proběhla úspěšně.

Zaklonování syntonů do plasmidu pUC19, jejich spojení a vytvoření expresního vektoru zaklonováním celého genu do plasmidu pET-22b bylo prováděno na jiném pracovišti.

15 PURIFIKACE REKOMBINANTNÍ TEV PROTEASY

Na Obr. 21 je znázorněno obecné schéma, podle něhož byla rekombinantní TEV-PR purifikována.



Obr. 21: Obecné purifikační schéma.

Protože pro purifikaci proteinů neexistuje univerzální postup, vycházelo se jak z několika publikovaných prací [48], tak i ze samotných vlastností TEV-PR, jako např. ze složení proteinového řetězce, molekulové hmotnosti či izoelektrického bodu žádaného proteinu.

Průběh každého purifikačního kroku byl monitorován pomocí elektroforézy v Tris-tricinovém pufru. Touto metodou byla nejenom ověřena čistota získaného preparátu, ale byly též získány orientační kvantitativní informace o zastoupení žádaného proteinu v jednotlivých preparátech.

15.1 PURIFIKACE TEV PROTEASY VE FORMĚ INKLUZÍ

Jak vyplývá ze schématu na Obr. 21, rekombinantní protein se při teplotě 37°C usazuje v bakteriích ve formě inkluzních tělísek. Z tohoto důvodu byly inkluze nejprve rozpuštěny v denaturačním pufru obsahující 9 M močovinu jakožto chaotropní činidlo. Dále následovala renaturace proteinu dialýzou. Poté byl už protein purifikován za pomoci jednotlivých chromatografických metod.

TEV proteasa ve formě inkluzí byla nejprve purifikována podle postupu, který ve své publikaci popsali Lucast a kol. [48]. Jejich rekombinantní TEV-PR obsahovala vedle histidinové kotvy ještě mutaci S219N. Purifikaci tohoto proteinu prováděli s použitím IMAC chromatografie. Žádaný protein byl na kolonu vázán puftrem o pH 8,0 (6 M močovina, 100 mM fosfát, 10 mM Tris). Z kolony byl takto navázaný protein uvolňován puftrem o stejném složení, ale s nižší hodnotou pH, a to 4,5. Zmíněný postup byl vyzkoušen i v průběhu diplomové práce, ale bez výsledku. Při sníženém pH se žádaný protein z kolony neuvolňoval. Vzhledem k tomu bylo od tohoto postupu upuštěno a bylo postupováno jinou cestou.

Pro purifikaci inkluzí TEV-PR se jako optimální jevil postup, který je uveden v následujícím schématu. Některé aspekty procesu optimalizace jsou diskutovány jak v samotném schématu, tak i v dalším textu pod ním.

Vzorek inkluzí TEV-PR byl nejprve rozdělen na dva stejné podíly.

Krok 1:

První podíl o hmotnosti 0,24 g byl rozpuštěn v denaturačním pufru s 9 M močovinou.

Krok 2:

Supernatant o objemu 15 ml získaný odstředěním denaturovaného vzorku proteinu při 16 000 g po dobu 15 min byl zředěn v poměru 1:1 vazebným pufrem „A1“, který obsahoval 8 M močovinu. Hodnota pH byla upravena na 8,0. Ve vzorku byla poté stanovena koncentrace proteinu dle Bradfordové: $c_{\text{prot}} = 621,0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Krok 3:

Takto upravený vzorek byl přečištěn pomocí **IMAC chromatografie**, která byla prováděna za laboratorní teploty při pH 8,0. TEV-PR byla z kolony uvolňována lineárním gradientem imidazolu (0 - 0,5 M v 50 ml) při průtoku $2,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (Obr. 22). Jednotlivé frakce byly odebírány po 2 min.

Krok 4:

Frakce s nejvyšším obsahem TEV-PR (5-9) byly spojeny, přičemž celkový objem byl 23 ml. Ve spojených frakcích byla poté stanovena koncentrace proteinu dle Bradfordové: $c_{\text{prot}} = 658,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Krok 5:

Frakce byly poté dialyzovány v refoldingovém pufru obsahujícím 50% glycerol, který bránil srážení TEV-PR ve vzorku. Během dialýzy došlo vlivem osmotického tlaku způsobeného 50% glycerolem ke zmenšení objemu vzorku z 23 ml na 7 ml.

Krok 6:

Po dialýze byl vzorek rozdělen na dva stejné podíly. Jeden z podílů byl purifikován pomocí IMAC chromatografie a druhý pomocí katexové chromatografie.

IMAC chromatografie**Katexová chromatografie****Krok 7a:**

První podíl byl zředěn 4x vazebným pufrem „A2“ obsahujícím ale 40% glycerol. Hodnota pH byla upravena na 8,0. Ve vzorku byla stanovena koncentrace proteinu dle Bradfordové: $c_{\text{prot}} = 307,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Krok 7b:

Druhý podíl byl zředěn 10x vazebným pufrem „B1“ obsahujícím ale 50% glycerol. Hodnota pH byla upravena na 7,0. Ve vzorku byla stanovena koncentrace proteinu dle Bradfordové: $c_{\text{prot}} = 59,4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Krok 8a:

Purifikace prováděná pomocí **IMAC chromatografie** probíhala za laboratorní teploty při pH 8,0. TEV-PR byla z kolony uvolňována lineárním gradientem imidazolu (0 - 0,5 M v 50 ml) při průtoku $2,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (Obr. 25). Jednotlivé frakce byly odebírány po 2 min.

Krok 8b:

Purifikace prováděná pomocí **katexu** probíhala za laboratorní teploty při pH 7,0. TEV-PR byla z kolony uvolňována lineárním gradientem NaCl (0 - 1 M ve 100 ml) při průtoku $2,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (Obr. 26). Jednotlivé frakce byly odebírány po 4 min.

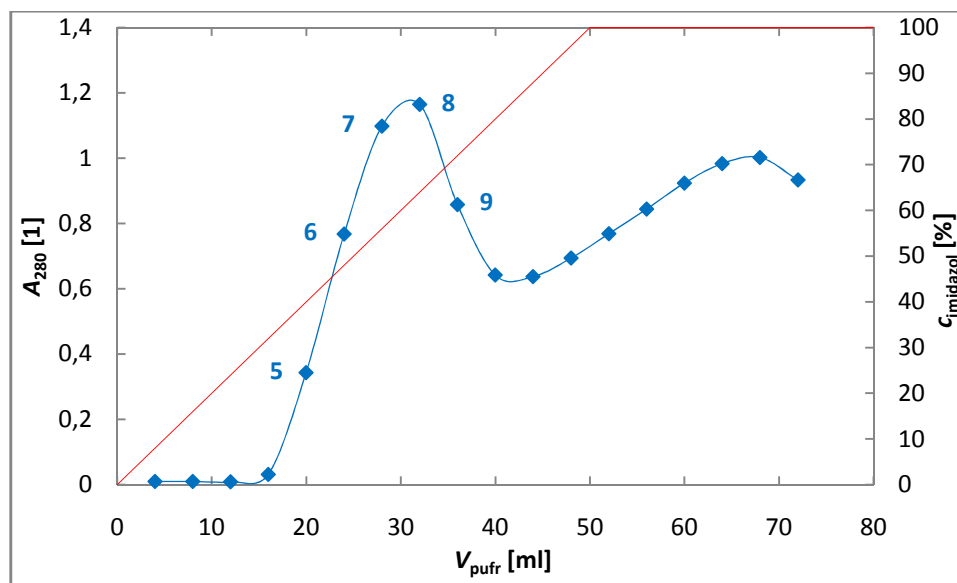
Krok 9a:

Frakce s nejvyšším obsahem TEV-PR (8-13) byly spojeny, přičemž celkový objem byl 10,5 ml. Ve spojených frakcích byla poté stanovena koncentrace proteinu dle Bradfordové: $c_{\text{prot}} = 185,8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.
Konečný výtěžek proteinu: 2,0 mg v 10,5 ml.

Krok 9b:

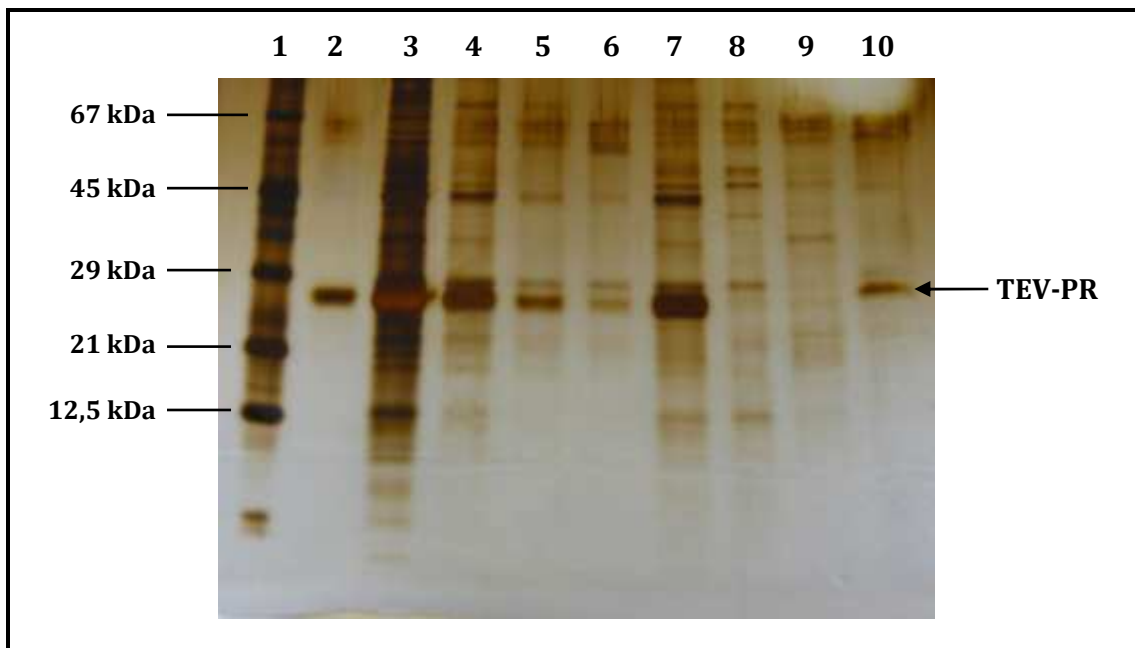
Frakce s nejvyšším obsahem TEV-PR (18-22) byly spojeny, přičemž celkový objem byl 4,3 ml. Ve spojených frakcích byla poté stanovena koncentrace proteinu dle Bradfordové: $c_{\text{prot}} = 316,0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.
Konečný výtěžek proteinu: 1,4 mg v 4,3 ml.

Nejprve bylo potřeba převést inkluze do nativní formy, a to jejich rozpuštěním v pufru s obsahem močoviny (**krok 1**). Supernatant, který byl získán odstředěním denaturovaného vzorku proteinu, byl zředěn za účelem snížení koncentrace proteinu ve vzorku, a to pro jeho lepší navázání na kolonu (**krok 2**). Takto upravený vzorek proteinu byl přečištěn pomocí IMAC chromatografie při pH 8,0 (**krok 3**). Průběh chromatografie je znázorněn na Obr. 22.



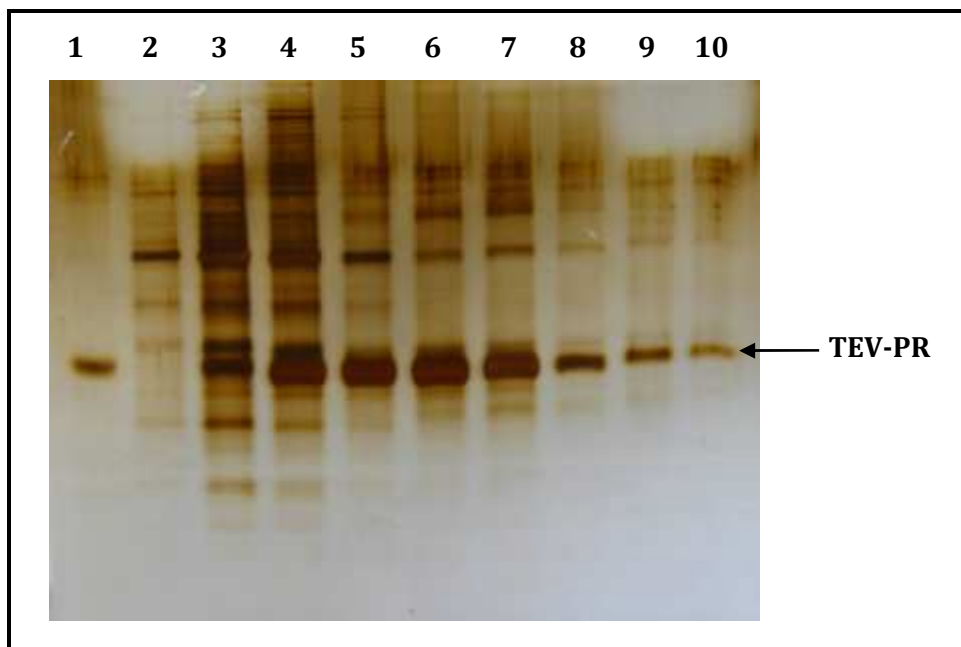
Obr. 22: Průběh afinitní chromatografie na vázaných Ni^{2+} iontech při pH 8,0. *Modrá* křivka znázorňuje průběh uvolňování TEV-PR z kolony a *červená* křivka průběh lineárního gradientu imidazolu (0 - 0,5 M v 50 ml). *Modře* zbarvená čísla označují frakce, které byly po provedené chromatografii spojeny.

Na základě absorbance při 280 nm, stanovení koncentrace proteinu dle Bradfordové, příp. na základě výsledků z tricinové elektroforózy byly po provedené IMAC chromatografii spojeny frakce s nejvyšším obsahem TEV-PR (**krok 4**). V tomto případě to byly frakce 5 až 9 (Obr. 23 a 24).



Obr. 23: Fotografický záznam gelu č. 1 z tricínové elektroforézy po provedené IMAC chromatografii při pH 8,0.

1 - SDS Page Protein marker [2 μ l], 2 - komerčně dodávaná TEV-PR [3 μ l], 3 - TEV-PR po rozpuštění a odstředění (1) [2 μ l], 4 - TEV-PR po rozpuštění a odstředění (2) [2 μ l], 5 - TEV-PR po rozpuštění a odstředění (3) [2 μ l], 6 - resuspendovaná sraženina [2 μ l], 7 - TEV-PR před nástřikem na kolonu (2x zředěn) [2 μ l], 8 - FT [5 μ l], 9 - promývání [10 μ l], 10 - frakce 13 [20 μ l]



Obr. 24: Fotografický záznam gelu č. 2 z tricínové elektroforézy po provedené IMAC chromatografii při pH 8,0.

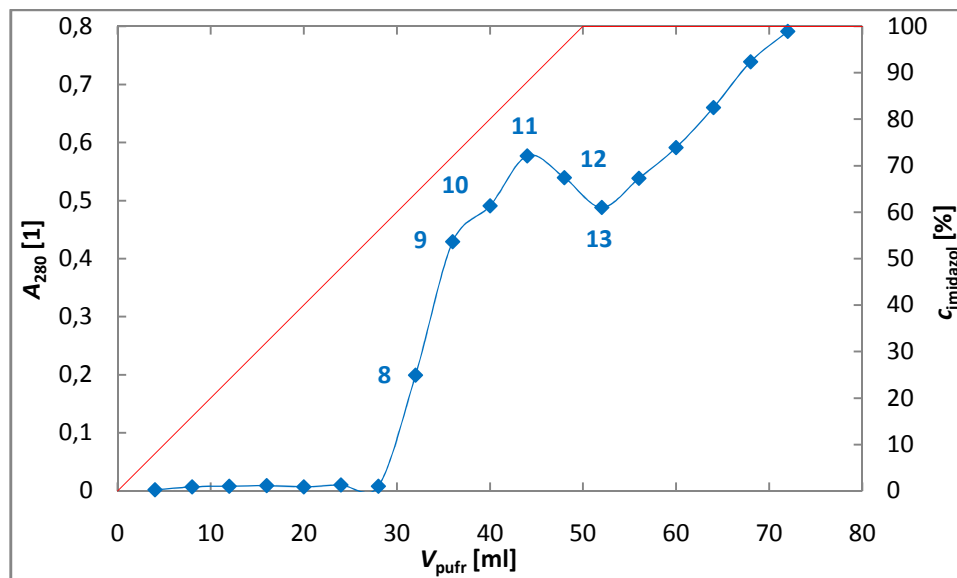
1 - komerčně dodávaná TEV-PR [3 μ l], 2 - frakce 4 [15 μ l], 3 - frakce 5 [10 μ l], 4 - frakce 6 [5 μ l], 5 - frakce 7 [2 μ l], 6 - frakce 8 [2 μ l], 7 - frakce 9 [5 μ l], 8 - frakce 10 [5 μ l], 9 - frakce 11 [10 μ l], 10 - frakce 12 [10 μ l]

Červeně jsou označeny frakce, které byly na základě výsledku z tricinové elektroforézy spojeny.

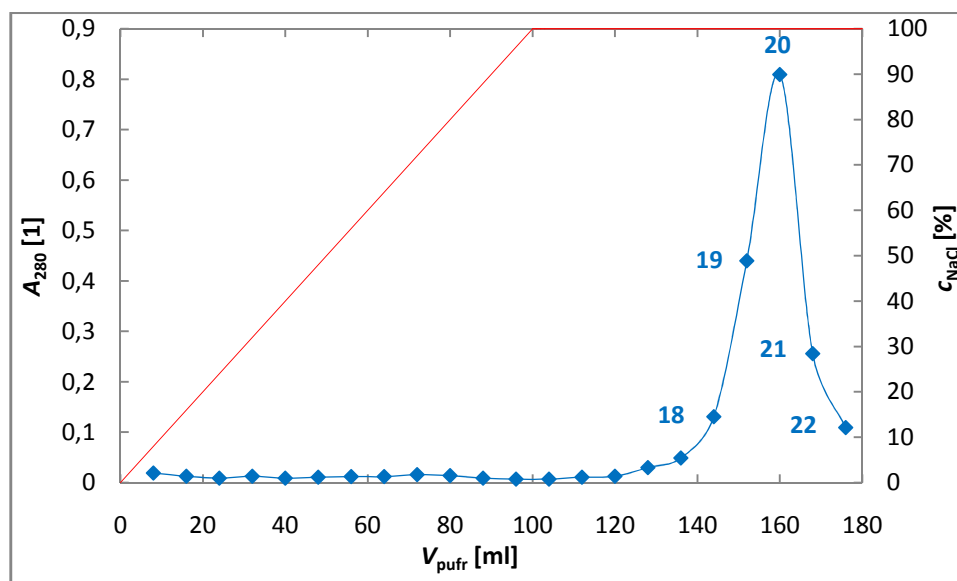
Spojené frakce byly poté dialyzovány v refoldingovém pufru s 50% glycerolem podle postupu, který ve své práci popsali Lucast a kol. [48] (**krok 5**). V průběhu diplomové práce bylo množství glycerolu ve zmíněném pufru ale optimalizováno, a to z toho důvodu, že vzorky s obsahem 50% glycerolu byly příliš viskózní, což s sebou při provádění dalších purifikací přinášelo určité problémy, jako např. při nanášení vzorku na kolonu.

Po dialýze byl vzorek rozdělen na dva stejné podíly, přičemž jeden z podílů byl purifikován pomocí IMAC chromatografie a druhý pomocí chromatografie na katexu (**krok 6**), která byla prováděna na základě výpočtu izoelektrického bodu TEV-PR [43, 44]. Ten byl poměrně vysoký, a to $pI = 8,37$, tudíž pod touto hodnotou je TEV-PR nabitá kladně. V tomto případě se pracovalo při pH 7,0, takže zmíněná podmínka byla dobře splněna. V průběhu diplomové práce byla zkoušena i katexová chromatografie za nižších hodnot pH, a to při pH 6,0, aby se zjistilo, při jakém pH se žádaný protein na kolonu váže nejlépe. Katexová chromatografie nebyla ale tak specifická jako IMAC chromatografie, protože se při jejím použití zachytávají na koloně i další proteiny, které jsou při daném pH (buď při pH 6,0, nebo při pH 7,0) také kationty.

Na Obr. 25 je znázorněn průběh afinitní chromatografie na vázaných Ni^{2+} iontech při pH 8,0, pomocí níž byl po dialýze v 50% glycerolu purifikován první podíl spojených frakcí. Na Obr. 26 je zase znázorněn průběh katexové chromatografie při pH 7,0, pomocí níž byl po dialýze v 50% glycerolu purifikován druhý podíl spojených frakcí (**krok 8a,b**).



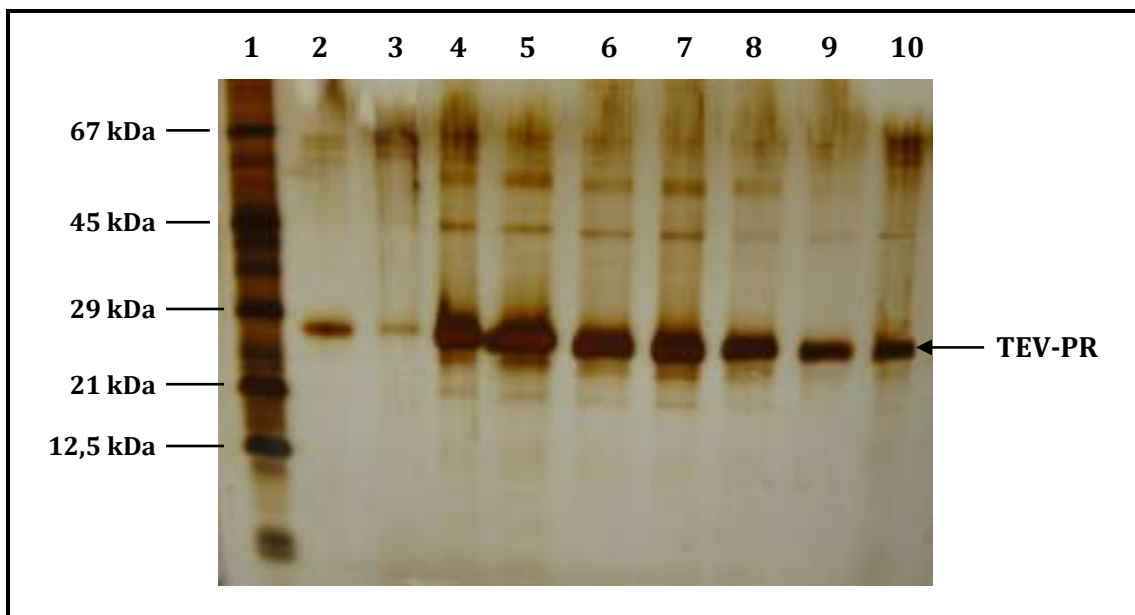
Obr. 25: Průběh afinitní chromatografie na vázaných Ni^{2+} iontech při pH 8,0. *Modrá* křivka znázorňuje průběh uvolňování TEV-PR z kolony a *červená* křivka průběh lineárního gradientu imidazolu (0 - 0,5 M v 50 ml). *Modře* zbarvená čísla označují frakce, které byly po provedené chromatografii spojeny.



Obr. 26: Průběh katexové chromatografie při pH 7,0. *Modrá* křivka znázorňuje průběh uvolňování TEV-PR z kolony a *červená* křivka průběh lineárního gradientu NaCl (0 - 1 M ve 100 ml). *Modře* zbarvená čísla označují frakce, které byly po provedené chromatografii spojeny.

Na základě absorbance při 280 nm, stanovení koncentrace proteinu dle Bradfordové, příp. na základě výsledků z tricinové elektroforézy byly spojeny frakce s nejvyšším obsahem TEV-PR (**krok 9a,b**). V případě prvního podílu purifikovaného pomocí IMAC

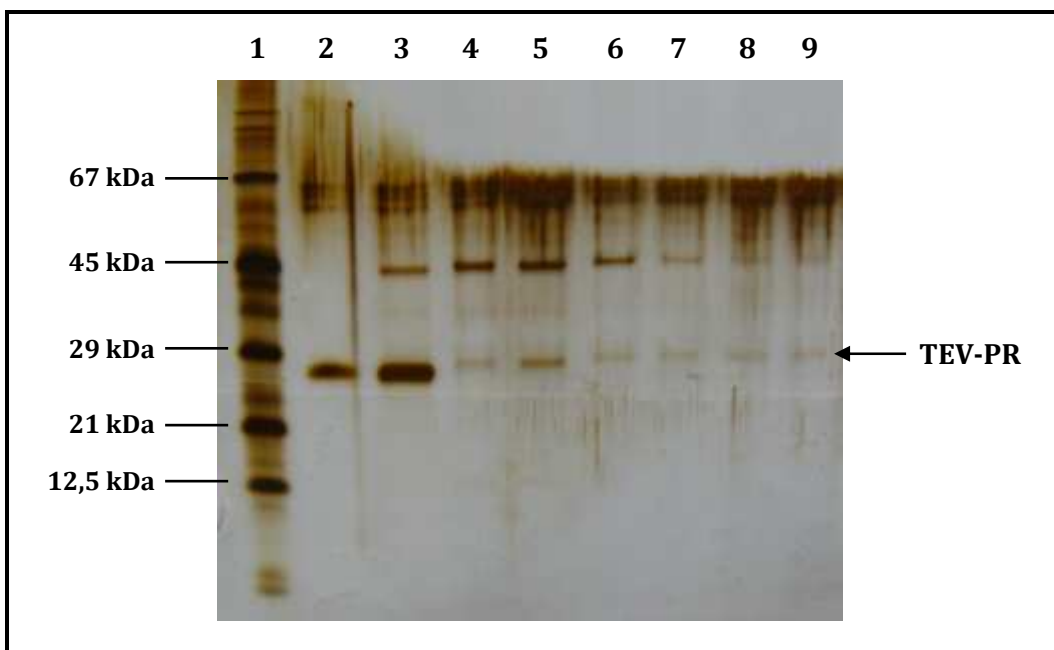
chromatografie to byly frakce 8 až 13 (Obr. 27), v případě druhého podílu purifikovaného pomocí katexové chromatografie to byly frakce 18 až 22 (Obr. 28 a 29).



Obr. 27: Fotografický záznam gelu z tricinové elektroforézy po provedené IMAC chromatografii při pH 8,0.

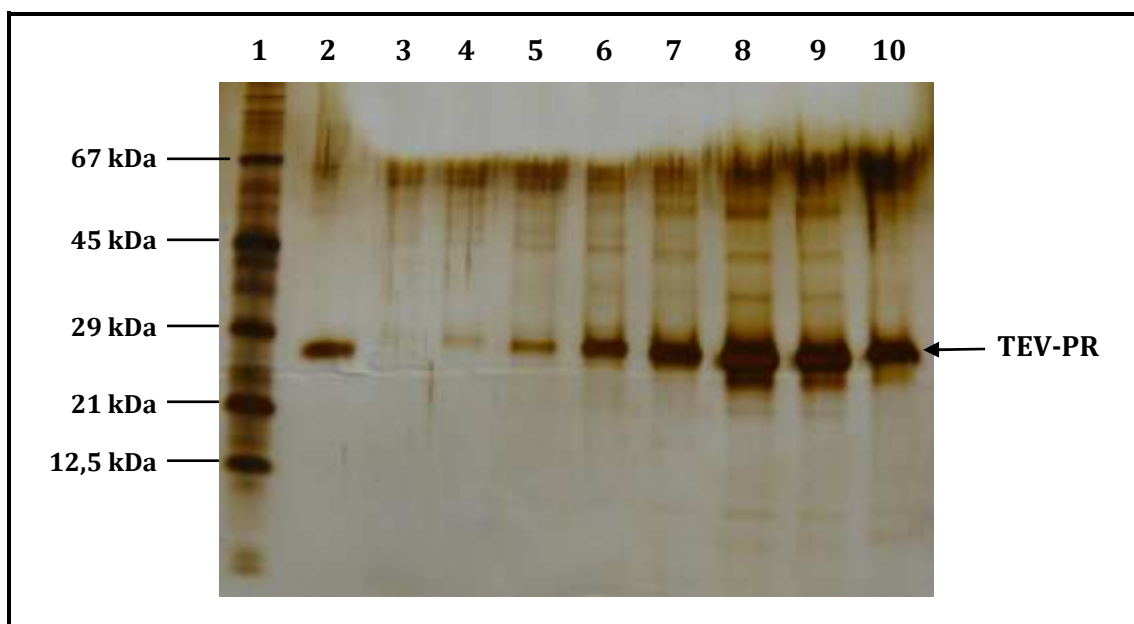
1 - SDS Page Protein marker [2 μ l], 2 - komerčně dodávaná TEV-PR [3 μ l], 3 - frakce 7 [20 μ l], 4 - frakce 8 [10 μ l], 5 - frakce 9 [10 μ l], 6 - frakce 10 [5 μ l], 7 - frakce 11 [5 μ l], 8 - frakce 12 [5 μ l], 9 - frakce 13 [5 μ l], 10 - frakce 14 [15 μ l]

Červeně jsou označeny frakce, které byly na základě výsledku z tricinové elektroforézy spojeny.



Obr. 28: Fotografický záznam gelu č. 1 z tricinové elektroforézy po provedené katexové chromatografii při pH 7,0.

1 - SDS Page Protein marker [2 μ l], 2 - komerčně dodávaná TEV-PR [3 μ l], 3 - TEV-PR před nástřikem na kolonu (10x zředěn) [5 μ l], 4 - FT [15 μ l], 5 - promývání [15 μ l], 6 - frakce 1 [25 μ l], 7 - frakce 4 [25 μ l], 8 - frakce 8 [25 μ l], 9 - frakce 9 [25 μ l]



Obr. 29: Fotografický záznam gelu č. 2 z tricínové elektroforézy po provedené katexové chromatografii při pH 7,0.

1 - SDS Page Protein marker [2 μ l], 2 - komerčně dodávaná TEV-PR [3 μ l], 3 - frakce 14 [25 μ l], 4 - frakce 15 [20 μ l], 5 - frakce 16 [15 μ l], 6 - frakce 17 [15 μ l], 7 - frakce 18 [10 μ l], 8 - frakce 19 [5 μ l], 9 - frakce 20 [5 μ l], 10 - frakce 21 [10 μ l]

Červeně jsou označeny frakce, které byly na základě výsledku z tricínové elektroforézy spojeny.

15.2 PURIFIKACE TEV PROTEASY V NATIVNÍM STAVU

V případě exprese probíhající při teplotě 20°C byl protein tvořen v cytoplasmě ve formě buněčného supernatantu, tj. v nativním stavu, tudíž nebylo nutné provádět jeho denaturaci a následný refolding.

Optimalizovaný postup purifikace TEV-PR v nativním stavu je uveden v následujícím schématu, přičemž některé aspekty procesu optimalizace jsou opět diskutovány jak v samotném schématu, tak i v dalším textu pod ním.

Krok 1:

Vzorek buněčného supernatantu o objemu 45 ml byl odstředěn při 16 000 g po dobu 15 min.

Krok 2:

Odstředěný supernatant byl zředěn vazebným pufrem „C1“ na výsledný objem 100 ml. Hodnota pH byla upravena na 7,5. Ve vzorku byla poté stanovena koncentrace proteinu dle Bradfordové: $c_{\text{prot}} = 1\,461,8 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

Krok 3:

Takto upravený vzorek byl přečištěn pomocí **anexové chromatografie**, která byla prováděna za laboratorní teploty při pH 7,5. Při použití tohoto druhu chromatografie byl aplikován lineární gradient NaCl (0 - 1 M ve 40 ml) při průtoku 2,0 ml.min⁻¹. Jednotlivé frakce byly odebírány po 2 min.

Krok 4:

U takto přečištěného vzorku, jehož objem byl stejný jako před použitím chromatografie na anexu ($V = 100$ ml), bylo nejprve upraveno pH na 8,0 a poté v něm byla stanovena koncentrace proteinu dle Bradfordové: $c_{\text{prot}} = 582,0 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Vzorek byl dále přečištěn pomocí IMAC chromatografie.

Krok 5:

IMAC chromatografie byla prováděna za laboratorní teploty při pH 8,0. TEV-PR byla z kolony uvolňována lineárním gradientem imidazolu (0 - 0,5 M v 50 ml) při průtoku 2,0 ml.min⁻¹ (Obr. 32). Jednotlivé frakce byly odebírány po 2 min.

Krok 6:

Frakce s nejvyšším obsahem TEV-PR (5-9) byly spojeny, přičemž celkový objem byl 21 ml. Ve spojených frakcích byla poté stanovena koncentrace proteinu dle Bradfordové: $c_{\text{prot}} = 288,2 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

Krok 7:

Frakce byly rozděleny na dva stejné podíly, přičemž jeden z nich byl přečištěn pomocí katexové chromatografie při pH 7,0 a druhý byl dialyzován v refoldingovém pufru s 25% glycerolem. Ten byl poté přečištěn také pomocí katexové chromatografie, ale při pH 6,0.

IMAC chromatografie

Katexová chromatografie

Krok 8a:

U nedialyzovaného vzorku bylo upraveno pH na 7,0 a poté v něm byla stanovena koncentrace proteinu dle Bradfordové: $c_{\text{prot}} = 266,0 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

Krok 8b:

Během dialýzy došlo ke zmenšení objemu vzorku z 11 ml na 6 ml. Vzorek byl poté zředěn 10x vazebným pufrem „B1“ obsahujícím 25% glycerol. Hodnota pH byla upravena na 6,0. Ve vzorku byla stanovena koncentrace proteinu dle Bradfordové: $c_{\text{prot}} = 30,82 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

Krok 9a:

Purifikace prováděná pomocí **katexu** probíhala za laboratorní teploty při pH 7,0. TEV-PR byla z kolony uvolňována lineárním gradientem NaCl (0 - 1 M ve 40 ml) při průtoku 2,0 ml.min⁻¹. Jednotlivé frakce byly odebírány po 2 min.

Krok 9b:

Purifikace prováděná pomocí **katexu** probíhala za laboratorní teploty při pH 7,0. TEV-PR byla z kolony uvolňována lineárním gradientem NaCl (0 - 1 M ve 100 ml) při průtoku 2,0 ml.min⁻¹ (Obr. 34). Jednotlivé frakce byly odebírány po 4 min.

Krok 10a:

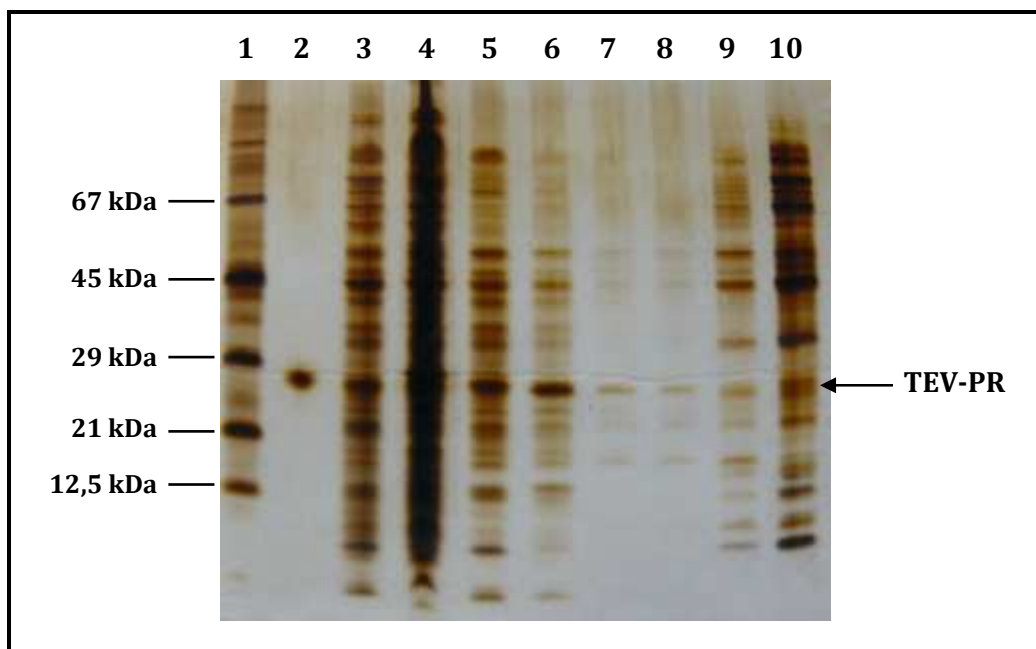
Frakce s nejvyšším obsahem TEV-PR (5-6) byly spojeny. K nim byly přidány frakce z promývání, v nichž byl na základě výsledku z tricinové elektroforézy prokázán obsah TEV-PR. Celkový objem poté byl 16 ml. Ve spojených frakcích byla stanovena koncentrace proteinu dle Bradfordové: $c_{\text{prot}} = 66,39 \mu\text{g.ml}^{-1}$. **Konečný výtěžek proteinu: 1,1 mg v 16 ml.**

Krok 10b:

Frakce s nejvyšším obsahem TEV-PR (7-9) byly spojeny, přičemž celkový objem byl 12 ml. Ve spojených frakcích byla poté stanovena koncentrace proteinu dle Bradfordové: $c_{\text{prot}} = 73,28 \mu\text{g.ml}^{-1}$. **Konečný výtěžek proteinu: 0,88 mg ve 12 ml.**

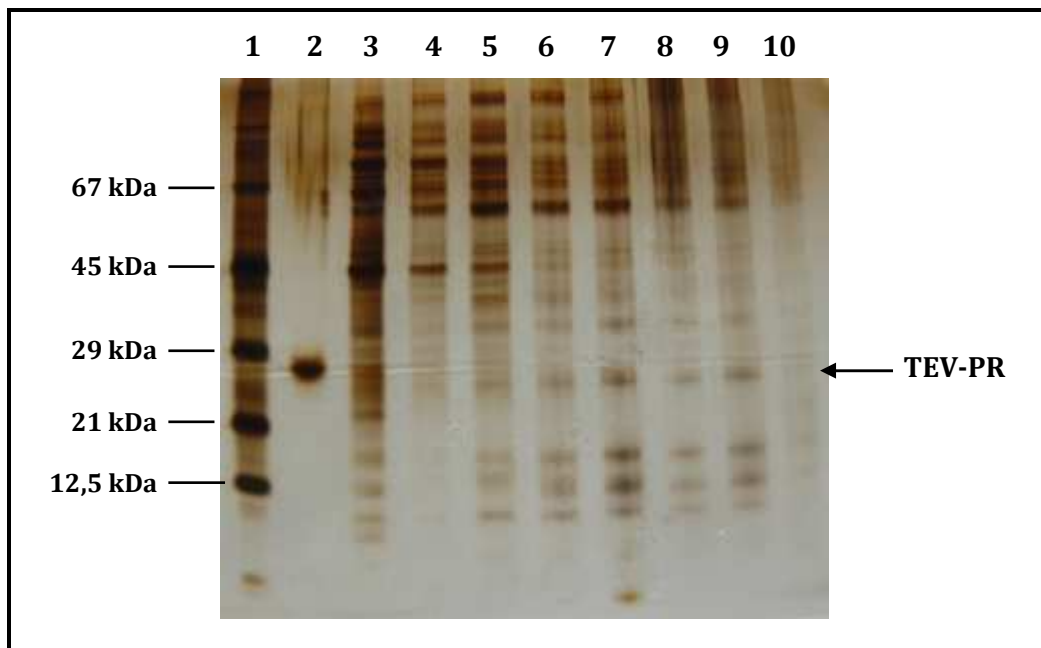
Na základě výpočtu izoelektrického bodu TEV-PR ($pI = 8,37$) bylo zjištěno, že při $pH < pI$ nese kladný náboj, tudíž se váže na katex. V tomto případě byla pro přečištění buněčného supernatantu použita chromatografie na anexu při $pH 7,5$. Při použití tohoto druhu chromatografie vzorek s obsahem žádaného proteinu kolonou pouze protekl, a to s tím, že se na koloně zachytily takové balastní proteiny, které byly při tomto pH nabitý záporně (**krok 3**).

Na základě výsledku z tricinové elektroforézy (Obr. 30 a 31) bylo zjištěno, že po provedení chromatografie na anexu nedošlo k významnému navázání TEV-PR na kolonu (**krok 4**).



Obr. 30: Fotografický záznam gelu č. 1 z tricinové elektroforézy po provedené anexové chromatografii při $pH 7,5$.

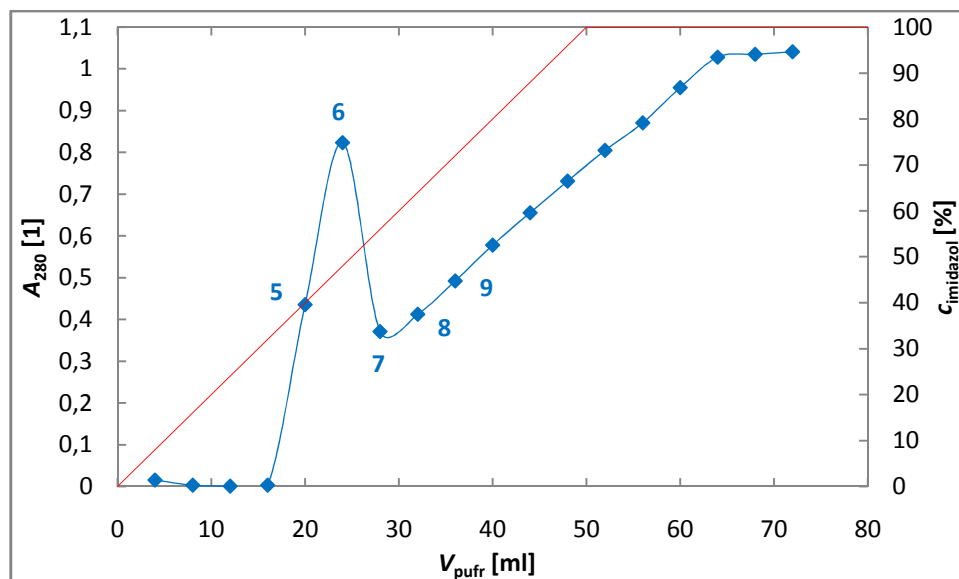
1 - SDS Page Protein marker [2 μl], 2 - komerčně dodávaná TEV-PR [3 μl], 3 - TEV-PR před nástřikem na kolonu [2 μl], 4 - resuspendovaná sraženina [10 μl], 5 - FT [2 μl], 6 - promývání [5 μl], 7 - frakce 1 [15 μl], 8 - frakce 3 [15 μl], 9 - frakce 5 [10 μl], 10 - frakce 6 [5 μl]



Obr. 31: Fotografický záznam gelu č. 2 z tricínové elektroforézy po provedené anexové chromatografii při pH 7,5.

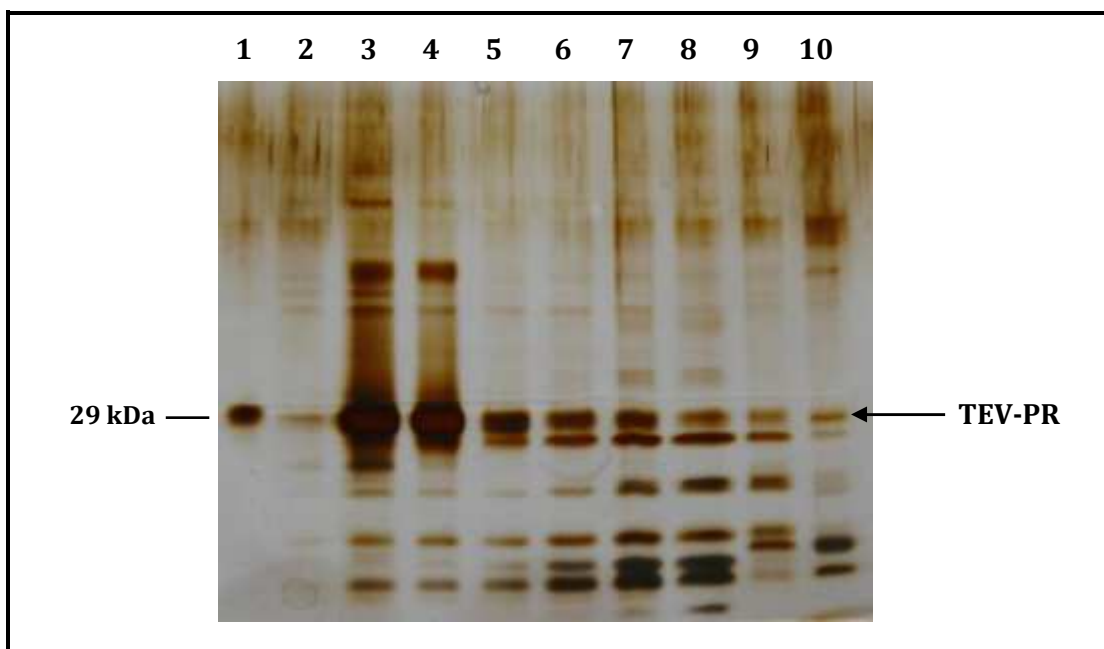
1 - SDS Page Protein marker [2 μ l], 2 - komerčně dodávaná TEV-PR [3 μ l], 3 - frakce 7 [2 μ l], 4 - frakce 8 [2 μ l], 5 - frakce 9 [2 μ l], 6 - frakce 10 [2 μ l], 7 - frakce 11 [2 μ l], 8 - frakce 13 [2 μ l], 9 - frakce 15 [2 μ l], 10 - frakce 17 [2 μ l]

Vzorek přečištěný přes anex byl dále purifikován pomocí IMAC chromatografie při pH 8,0. Průběh této chromatografie je znázorněn na Obr. 32 (**krok 5**).



Obr. 32: Průběh afinitní chromatografie na vázaných Ni^{2+} iontech při pH 8,0. *Modrá* křivka znázorňuje průběh uvolňování TEV-PR z kolony a *červená* křivka průběh lineárního gradientu imidazolu (0 - 0,5 M v 50 ml). *Modře* zbarvená čísla označují frakce, které byly po provedené chromatografii spojeny.

Na základě absorbance při 280 nm, stanovení koncentrace proteinu dle Bradfordové, příp. na základě výsledků z tricinové elektroforézy byly po provedené IMAC chromatografii spojeny frakce s nejvyšším obsahem TEV-PR (**krok 6**). V tomto případě to byly frakce 5 až 9 (Obr. 33).

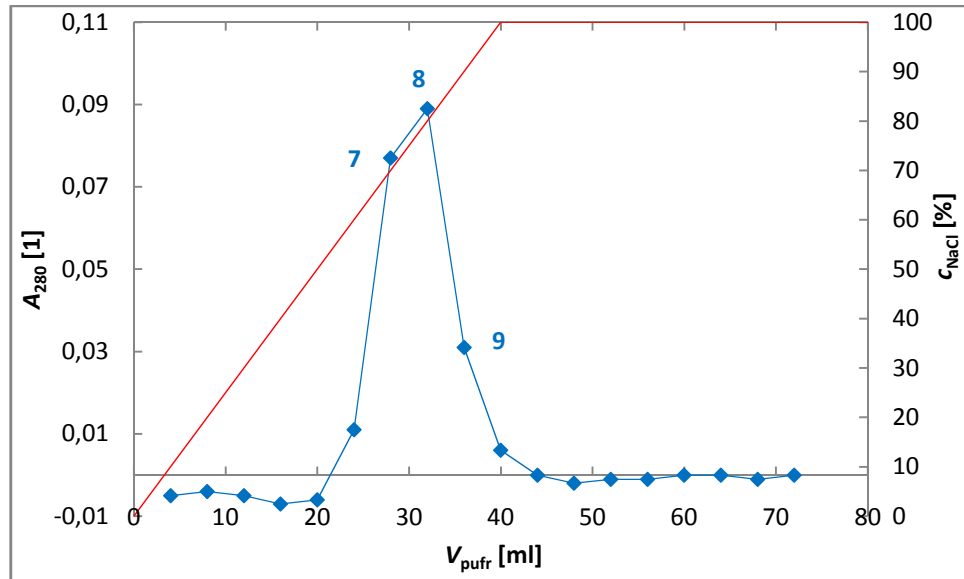


Obr. 33: Fotografický záznam gelu z tricinové elektroforézy po provedené IMAC chromatografii při pH 8,0.

1 - komerčně dodávaná TEV-PR [3 μ l], 2 - frakce 4 [20 μ l], 3 - **frakce 5** [15 μ l], 4 - **frakce 6** [10 μ l], 5 - **frakce 7** [10 μ l], 6 - **frakce 8** [10 μ l], 7 - **frakce 9** [15 μ l], 8 - frakce 10 [15 μ l], 9 - frakce 14 [20 μ l], 10 - frakce 16 [20 μ l]

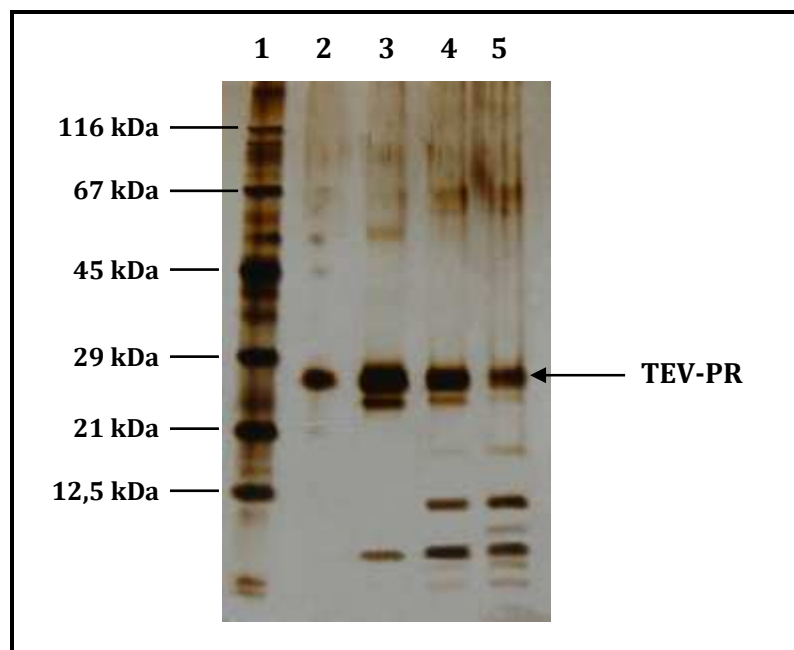
Červeně jsou označeny frakce, které byly na základě výsledku z tricinové elektroforézy spojeny.

Spojené frakce byly poté rozděleny na dva stejné podíly, přičemž jeden z nich byl purifikován pomocí chromatografie na katexu při pH 7,0 a druhý byl dialyzován v refoldingovém pufru s 25% glycerolem. Ten byl poté purifikován také pomocí chromatografie na katexu, ale při pH 6,0 (**krok 7**). Její průběh je znázorněn na Obr. 34 (**krok 9b**).



Obr. 34: Průběh katexové chromatografie při pH 6,0. *Modrá* křivka znázorňuje průběh uvolňování TEV-PR z kolony a *červená* křivka průběh lineárního gradientu NaCl (0 - 1 M v 40 ml). *Modře* zbarvená čísla označují frakce, které byly po provedené chromatografii spojeny.

Na základě absorbance při 280 nm, stanovení koncentrace proteinu dle Bradfordové, příp. na základě výsledků z tricinové elektroforézy byly po provedené chromatografii na katexu při pH 6,0 spojeny frakce s nejvyšším obsahem TEV-PR (**krok 10b**). V tomto případě to byly frakce 5 až 9 (Obr. 35).



Obr. 35: Fotografický záznam gelu z tricinové elektroforézy po provedené katexové chromatografii při pH 6,0.

1 - SDS Page Protein marker [2 μ l], 2 - komerčně dodávaná TEV-PR [3 μ l], 3 - **frakce 8** [10 μ l], 4 - **frakce 9** [15 μ l], 5 - frakce 10 [30 μ l]
Červeně jsou označeny frakce, které byly na základě výsledku z tricínové elektroforézy spojeny.

Porovnáním konečných výtěžků z purifikací obou forem TEV-PR, a to inkluzí a buněčného supernatantu, bylo zjištěno, že vyšších výtěžků bylo dosaženo při purifikaci TEV-PR ve formě inkluzních tělísek. V případě inkluzí bylo z 0,5 L média získáno cca 6 mg, kdežto v případě buněčného supernatantu byly z 0,5 L média získány pouze cca 2 mg.

Převědeme-li inkluze do nativní formy, je tvorba této sraženiny svým způsobem i výhodná, a to z toho důvodu, že vlastní bakteriální proteiny se do inkluzí neukládají, takže protein v nich usazený může být poměrně čistý.

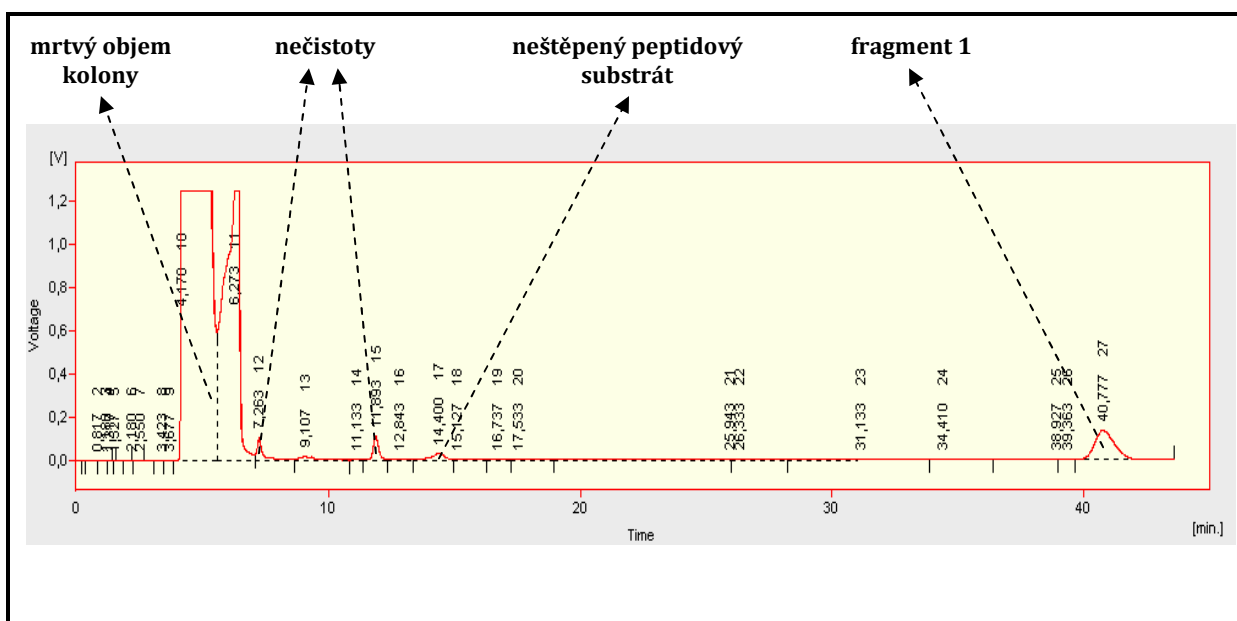
16 STANOVENÍ KINETICKÝCH PARAMETRŮ TEV PROTEASY

Jedním z hlavních cílů této diplomové práce bylo stanovit kinetické parametry K_M a k_{cat} pro připravenou TEV-PR a porovnat je s parametry komerčně dodávané AcTEV-PR. Stanovení bylo založeno na separaci fragmentů vzniklých štěpením peptidového substrátu TEV proteasou. Separace byla prováděna metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) na reverzní fázi.

Štěpením peptidu, jehož primární strukturu tvořila aminokyselinová sekvence TENLYFQSGTRR, vznikly dva fragmenty, a to: (1) TENLYFQ a (2) SGTRR. Ty byly na použité koloně Reprosil 100 C18 separovány na základě jejich odlišných hydrofobicit. Z aminokyselinového složení obou fragmentů lze vidět, že prvně jmenovaný fragment je hydrofobnější než fragment druhý, což je způsobeno tím, že fragment 2 neobsahuje žádnou z hydrofobních aminokyselin, jeho sekvence je tvořena pouze aminokyselinami polárními a bazickými (viz. Tab. I).

Na chromatogramech, které byly výsledkem HPLC analýz, byl pozorován pík neštěpeného substrátu a pík fragmentu 1. Fragment 2 byl eluován v mrtvém objemu z důvodu své hydrofilní povahy a jeho pík je tudíž překryt nečistotami pocházejícími z reakční směsi štěpené TEV-PR.

Jak je možno vidět na Obr. 36 pík neštěpeného substrátu byl eluován v retenčním objemu 7,2 ml a pík fragmentu 1 v retenčním objemu 20,4 ml.

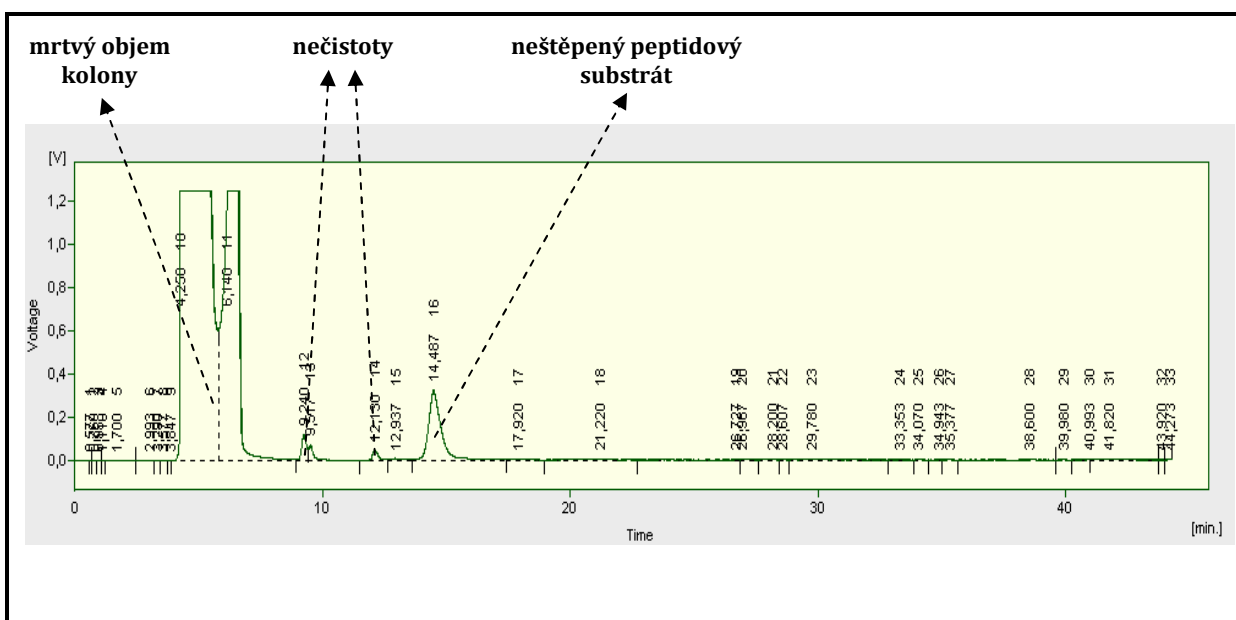


Obr. 36: Průběh chromatografického záznamu.

Vedle zmíněných píků byly na chromatogramech pozorovány i píky jiné. Ty mohly odpovídat kyselině tetrafluoroctové (ta byla přítomna jak v reakční směsi, tak v mobilní fázi, přičemž její procentuální zastoupení v obou z nich nebylo stejné), případně dalším látkám v reakční směsi. Každému z píků odpovídá určitý retenční čas. V některých případech byly naměřeny mírně odlišné hodnoty retenčních časů, což mohlo být způsobeno drobnými odchylkami ve složení nově připravené mobilní fáze.

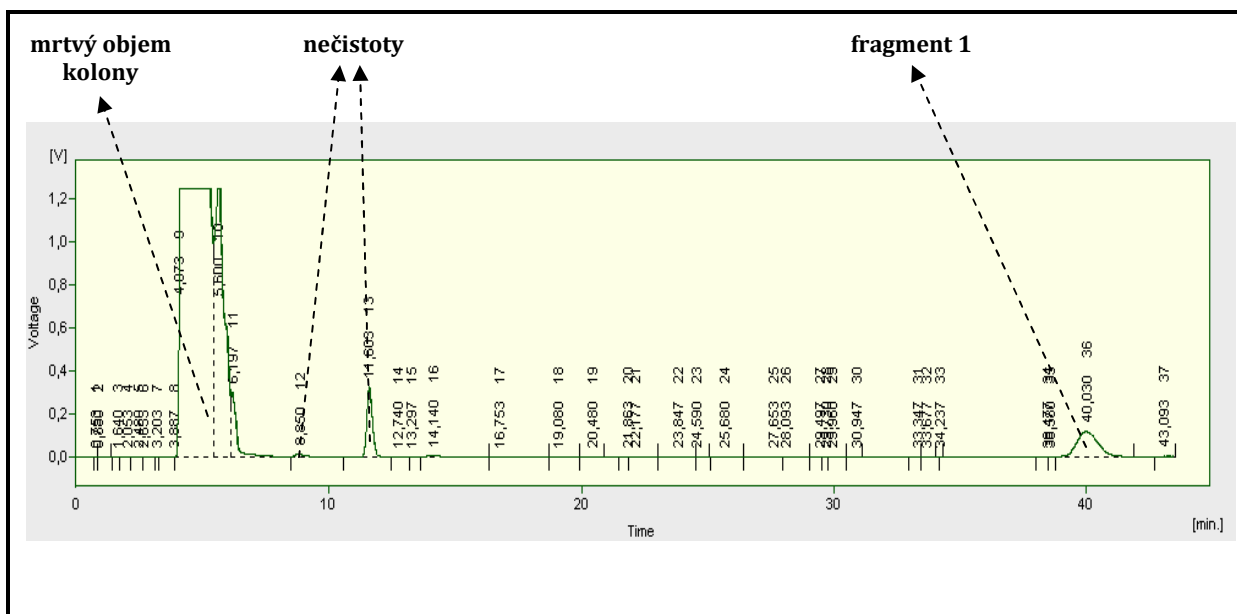
Zda píky na Obr. 36 opravdu náležely neštěpenému substrátu a fragmentu 1, bylo zjištěno následujícími způsoby:

a) v případě neštěpeného substrátu byla provedena HPLC analýza reakční směsi, která neobsahovala TEV-PR (Obr. 37)



Obr. 37: HPLC analýza reakční směsi bez TEV-PR.

b) v případě fragmentu 1 byla provedena HPLC analýza reakční směsi, v níž byl peptidový substrát TEV proteasou totálně rozštěpen (Obr. 38).



Obr. 38: HPLC analýza reakční směsi s totálně rozštěpeným peptidovým substrátem.

Těmito uvedenými způsoby bylo též ověřováno, a to po provedení některých purifikačních kroků, zda je připravená TEV dostatečně aktivní, tzn. štěpí-li peptidový substrát na specifickém místě.

16.1 MĚŘENÍ ENZYMOVÉ KINETIKY TEV PROTEASY POMOCÍ HPLC METODY

Enzymové kinetiky jak připravené, tak komerčně dodávané TEV-PR byly měřeny pomocí HPLC metody. Aby se naměřené rychlosti enzymových reakcí co nejvíce blížily rychlostem počátečním, bylo potřeba určit jednak optimální množství TEV-PR v reakčních směsích a jednak optimální dobu inkubace těchto směsí.

16.1.1 MĚŘENÍ ENZYMOVÉ KINETIKY PŘIPRAVENÉ TEV PROTEASY

Enzymová kinetika připravené TEV-PR byla měřena v prostředí dvou různých kinetických pufrů – KP1 a KP2.

A) Měření enzymové kinetiky v prostředí kinetického pufru KP1

Na základě celé řady měření byly nejprve stanoveny optimální reakční podmínky, za kterých HPLC analýza probíhala. Reakční podmínky byly následující:

- do reakčních směsí bylo pipetováno po 0,5 μ l TEV-PR,
- připravené reakční směsi byly inkubovány po dobu 15 min.

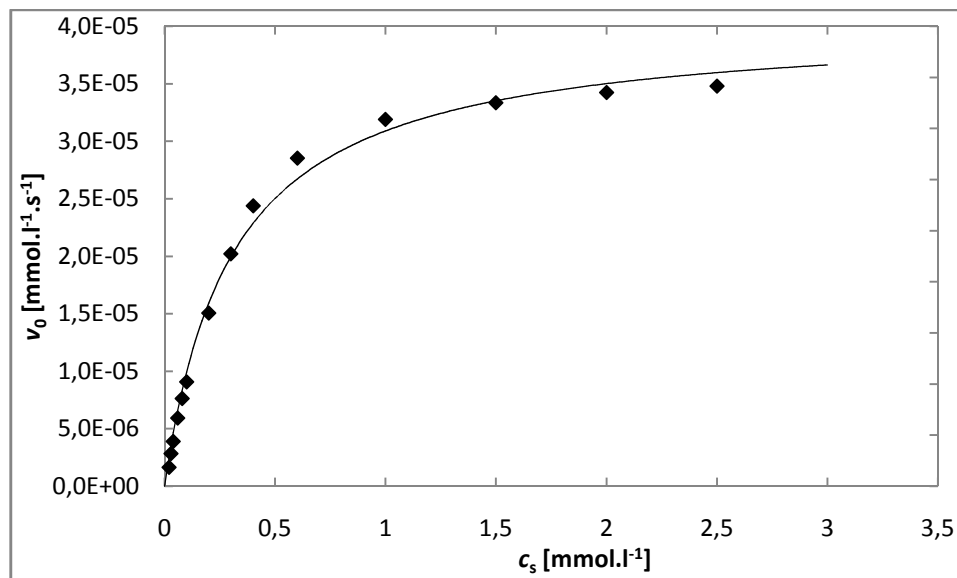
Veškerá naměřená data jsou uvedena v Tab. XV.

Tab. XV: HPLC analýza připravené TEV-PR s použitím kinetického pufru KP1.

c_s [mM]	S [mV.s ⁻¹]	F1 [mV.s ⁻¹]	v_0 [mM.s ⁻¹]
2,5	28 015,981	390,954	$3,478 \cdot 10^{-5}$
2,0	25 609,496	384,704	$3,423 \cdot 10^{-5}$
1,5	19 611,712	374,742	$3,334 \cdot 10^{-5}$
1,0	13 718,935	358,414	$3,189 \cdot 10^{-5}$
0,601 8	8 721,709	320,684	$2,853 \cdot 10^{-5}$
0,401 2	5 419,406	273,990	$2,438 \cdot 10^{-5}$
0,300 9	4 236,329	227,104	$2,020 \cdot 10^{-5}$
0,200 6	2 175,460	169,097	$1,504 \cdot 10^{-5}$
0,100 3	1 328,416	101,755	$9,053 \cdot 10^{-6}$
0,080 2	1 187,581	85,596	$7,615 \cdot 10^{-6}$
0,060 2	840,367	66,465	$5,913 \cdot 10^{-6}$
0,040 1	802,749	43,814	$3,898 \cdot 10^{-6}$
0,030 1	780,011	31,839	$2,833 \cdot 10^{-6}$
0,020 1	734,544	18,455	$1,642 \cdot 10^{-6}$

c_s - finální koncentrace peptidového substrátu v reakční směsi [mM], S - plocha píku neštěpeného peptidového substrátu [mV.s⁻¹], F1 - plocha píku fragmentu 1 [mV.s⁻¹], v_0 - počáteční rychlost enzymové reakce [mM.s⁻¹]

Z naměřených dat v Tab. XV byla sestrojena saturační křivka, tj. závislost počáteční rychlosti v_0 enzymové reakce na koncentraci substrátu c_s za konstantní koncentrace enzymu E_0 . Plochy píků odpovídající různým koncentracím substrátu v reakční směsi byly přepočítány na hodnoty v_0 . Při výpočtu se vycházelo z velikosti plochy píku fragmentu 1 za podmínek úplného rozštěpení substrátu. Protože plocha odpovídá známé vstupní koncentraci substrátu, je možno za předpokladu lineární závislosti mezi plochou píku F1 a množstvím rozštěpeného substrátu vypočítat úbytek koncentrace substrátu pro jeho různé koncentrace. Saturační křivka TEV-PR, jejíž stanovení probíhalo v kinetickém pufru KP1, je zobrazena na Obr. 39.



Obr. 39: Saturační křivka připravené TEV-PR v prostředí kinetického pufru KP1.

B) Měření enzymové kinetiky v prostředí kinetického pufru KP2

Měření enzymové kinetiky v prostředí kinetického pufru KP2 nebylo tak ideální jako v případě pufru KP1, protože z časových a technických důvodů nebyly jednak dostatečně optimalizovány reakční podmínky a jednak nebylo naměřeno tolik hodnot počátečních reakčních rychlostí. Reakční podmínky byly tudíž zachovány jako v případě měření enzymové kinetiky v pufru KP1, tzn.:

- množství TEV-PR pipetované do reakčních směsí bylo $0,5 \mu\text{l}$,
- připravené reakční směsi byly inkubovány po dobu 15 min.

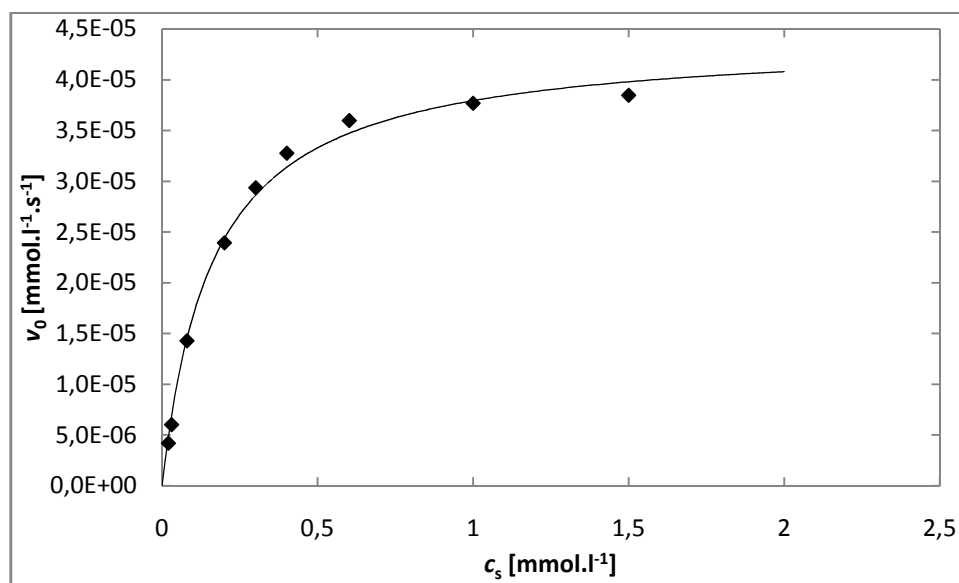
Veškerá data, která byla naměřena při této HPLC analýze, jsou uvedena v Tab. XVI.

Tab. XVI: HPLC analýza připravené TEV-PR s použitím kinetického pufru KP2.

c_s [mM]	S [mV.s ⁻¹]	F1 [mV.s ⁻¹]	v_0 [mM.s ⁻¹]
1,5	19 185,985	432,522	$3,848 \cdot 10^{-5}$
1	14 122,595	423,357	$3,766 \cdot 10^{-5}$
0,601 8	10 534,178	404,458	$3,598 \cdot 10^{-5}$
0,401 2	5 765,427	368,256	$3,276 \cdot 10^{-5}$
0,300 9	4 815,960	330,124	$2,937 \cdot 10^{-5}$
0,2	4 115,834	268,822	$2,392 \cdot 10^{-5}$
0,08	3411,695	160,537	$1,428 \cdot 10^{-5}$
0,030 1	502,207	67,585	$6,013 \cdot 10^{-6}$
0,02	462,354	47,244	$4,203 \cdot 10^{-6}$

c_s - finální koncentrace peptidového substrátu v reakční směsi [mM], S - velikost plochy píku neštěpeného peptidového substrátu [mV.s⁻¹], F1 - velikost plochy píku fragmentu 1 [mV.s⁻¹], v_0 - počáteční rychlost enzymové reakce [mM.s⁻¹]

Z naměřených dat v Tab. XVI byla opět sestrojena saturační křivka (Obr. 40).



Obr. 40: Saturační křivka připravené TEV-PR v prostředí kinetického pufru KP2.

16.1.2 MĚŘENÍ ENZYMOVÉ KINETIKY KOMERČNĚ DODÁVANÉ TEV PROTEASY

Měření enzymové kinetiky bylo provedeno i pro komerčně dodávanou AcTEV-PR (od fy Invitrogen). Řadou pokusů byly nalezeny tyto optimální reakční podmínky:

- reakční směsi byly inkubovány po dobu 10 min,
- pipetované množství TEV-PR do reakčních směsí bylo 0,1 μl .

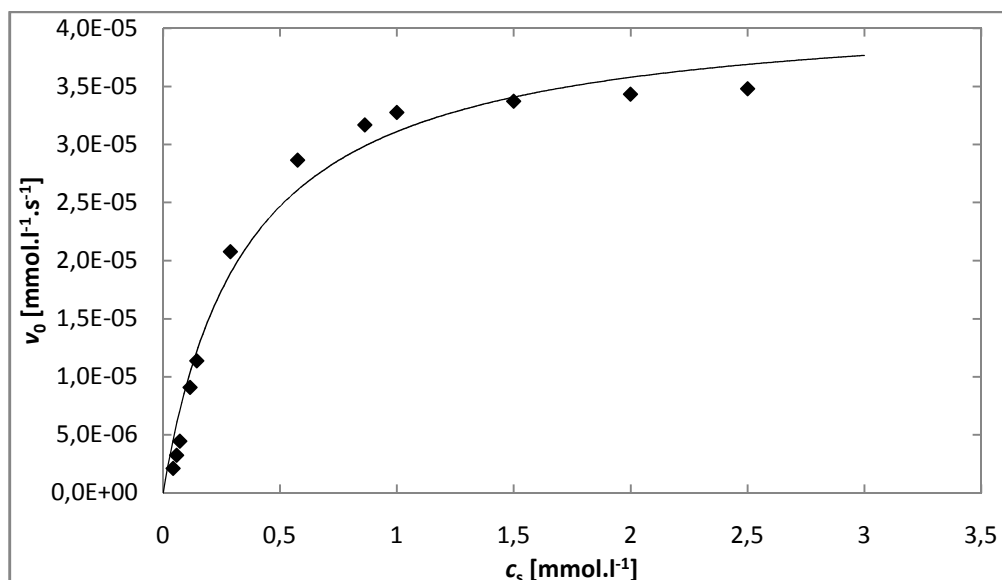
V Tab. XVII jsou uvedena data naměřená při této HPLC analýze.

Tab. XVII: *HPLC analýza komerčně dodávané TEV-PR s použitím kinetického pufru KPI.*

c_s [mM]	S [mV.s ⁻¹]	F1 [mV.s ⁻¹]	v_0 [mM.s ⁻¹]
2,5	23 762,555	260,724	$3,479 \cdot 10^{-5}$
2,0	18 630,899	257,221	$3,433 \cdot 10^{-5}$
1,5	15 185,144	252,572	$3,371 \cdot 10^{-5}$
1,0	13 725,102	245,491	$3,276 \cdot 10^{-5}$
0,862 9	10 907,861	237,405	$3,168 \cdot 10^{-5}$
0,575 3	7 251,655	214,757	$2,866 \cdot 10^{-5}$
0,287 6	3 772,777	155,691	$2,078 \cdot 10^{-5}$
0,143 8	1 939,584	85,233	$1,137 \cdot 10^{-5}$
0,115 1	1 423,067	68,05	$9,081 \cdot 10^{-6}$
0,071 9	365,069	33,37	$4,453 \cdot 10^{-6}$
0,057 5	336,621	24,312	$3,244 \cdot 10^{-6}$
0,043 1	306,116	15,977	$2,132 \cdot 10^{-6}$
0,028 8	282,234	7,334	$9,787 \cdot 10^{-7}$

c_s - finální koncentrace peptidového substrátu v reakční směsi [mM], S - velikost plochy píku neštěpeného peptidového substrátu [mV.s⁻¹], F1 - velikost plochy píku fragmentu 1 [mV.s⁻¹], v_0 - počáteční rychlost enzymové reakce [mM.s⁻¹]

Na Obr. 41 je zobrazena saturační křivka, která byla sestrojena z naměřených dat uvedených v Tab. XVII.



Obr. 41: Saturační křivka komerčně dodávané TEV-PR v prostředí kinetického pufru KPI.

16.2 STANOVENÍ KINETICKÝCH PARAMETRŮ PŘIPRAVENÉ A KOMERČNĚ DODÁVANÉ TEV PROTEASY

Kinetické parametry rovnice Michaelise a Mentenové K_M a v_{max} byly stanoveny metodou počátečních reakčních rychlostí. Aby mohla být metoda aplikována, bylo pro sérii reakčních směsí o konstantní koncentraci enzymu a různé koncentraci substrátu naměřeno co nejvíce hodnot počátečních reakčních rychlostí v_0 . Zmíněné kinetické parametry byly poté získány pomocí nelineární regrese s využitím softwarového vybavení. Existuje celá řada programů, které vyhodnocují konstanty K_M a v_{max} . V rámci diplomové práce byl použit program „ENZFITTER“ (ver. 1.03). Rychlostní konstanta k_{cat} přeměny enzym-substrátového komplexu na produkt byla vypočtena ze vztahu $v_{max} = E_0 \cdot k_{cat}$, kde E_0 je koncentrace daného enzymu vyjádřená v mM. Koncentrace obou enzymů, tj. připravené a komerčně dodávané TEV-PR, byly stanoveny metodou dle Bradfordové a vyjádřeny v jednotkách hmotnostní koncentrace:

- a) připravená TEV-PR: $c_m = 1\,230,9 \mu\text{g.ml}^{-1}$,
- b) komerčně dodávaná AcTEV-PR: $c_m = 1\,811,0 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

Uvedené koncentrace bylo nutné přepočítat na koncentrace látkové, a to na základě jejich molekulových hmotností. Ty byly určeny z jejich primárních sekvencí s užitím jednoho z mnoha programů dostupných na internetu [43, 44]. Jak pro připravenou, tak pro komerčně dodávanou TEV-PR platí následující: $M_r = 28,3 \text{ kDa}$. Při přepočtech na látkové

koncentrace bylo zohledněno i to, kolikrát byl daný enzym v reakční směsi o objemu 40 μl zředěn. V případě připravené TEV-PR (jak v pufru KP1, tak v pufru KP2) to bylo ředění v poměru 1:80, v případě komerčně dodávané AcTEV-PR v poměru 1:400. V Tab. XVIII jsou uvedeny kinetické parametry náležející připravené a komerčně dodávané TEV-PR.

Tab. XVIII: *Naměřené a vypočtené parametry enzymových kinetik připravené a komerčně dodávané TEV-PR v prostředí kinetických pufrů KP1 a KP2.*

Stanovení	K_M [mM]	v_{\max} [mM.s ⁻¹]	k_{cat} [s ⁻¹]
Připravená TEV-PR v KP1	0,31	$4,039 \cdot 10^{-5}$	0,074
Připravená TEV-PR v KP2	0,16	$4,411 \cdot 10^{-5}$	0,081
Komerční AcTEV-PR v KP1	0,35	$4,210 \cdot 10^{-5}$	0,26

K_M - Michaelisova konstanta [mM], v_{\max} - maximální (limitní) rychlost enzymové reakce [mM.s⁻¹], k_{cat} - rychlostní konstanta [s⁻¹]

Měření enzymové kinetiky připravené TEV-PR v kinetickém pufru KP2 bylo prováděno na základě určení K_M připravené TEV-PR v prostředí kinetického pufru KP1, jejíž hodnota byla 0,31 mM. Ta byla poté porovnána s hodnotou publikovanou, a to $K_M = 0,041$ mM [27]. Jak je možno vidět, tak se obě uvedené hodnoty od sebe dosti liší. Jedním z důvodů, proč tomu tak mohlo být, je to, že měření enzymové kinetiky, které prováděli Kapust a kol. [27], probíhalo za jiných reakčních podmínek, a to v prostředí kinetického pufru KP2.

Z Tab. XVIII, ale i z jednotlivých saturačních křivek vyplývá následující:

- 1) hodnoty K_M připravené a komerčně dodávané TEV-PR, jejichž enzymové kinetiky byly měřeny v prostředí kinetického pufru KP1, jsou si blízké. Na základě zjištěných výsledků lze usoudit, že oba zmíněné enzymy mají v prostředí kinetického pufru KP1 přibližně stejnou afinitu k peptidovému substrátu, který byl během diplomové práce používán.
- 2) porovnáme-li hodnoty K_M připravené TEV-PR, u níž bylo měření enzymové kinetiky prováděno v prostředí dvou různých pufrů, a to KP1 a KP2, zjistíme, že hodnota K_M uvedená v Tab. XVIII jako druhá v pořadí ($K_M = 0,16$) se výrazně přiblížila k hodnotě publikované ($K_M = 0,041$). Rozdíly mezi prvními dvěma hodnotami v Tab. XVIII mohly být způsobeny některým z faktorů ovlivňujících aktivitu enzymu, jako je pH prostředí nebo složení pufrů.

Protože štěpení substrátu probíhalo pokaždé za stejné teploty, a to při 30°C, lze vliv teploty tímto vyloučit.

Jinak tomu bylo ale v případě pH prostředí, které bylo v obou kinetických pufrch jiné – v pufru KP1 mělo pH hodnotu 8,0, kdežto v pufru KP2 7,0. Jak bylo uvedeno v kapitole 5.3.2, je TEV-PR aktivní v rozmezí pH 6,0 - 8,5. Z hodnot K_M náležejících připravené TEV-PR lze usoudit, že při pH 7,0 byla aktivita enzymu vyšší než při pH 8,0.

Dalším z faktorů mající vliv na určení K_M může být samotné složení pufrů. Kinetický pufr KP2 obsahoval na rozdíl od pufru KP1 10% glycerol a 800 mM NaCl. Vliv těchto činidel nebyl detailně studován, je pouze známo, že glycerol nemá nepříznivé účinky na aktivitu TEV-PR [35]. Na druhé straně poměrně vysoká koncentrace NaCl může zvyšovat hydrofobní interakce mezi enzymem a substrátem.

- 3) stanovení K_M pomocí programu „ENZFITTER“ není sice až tak ideální, ale je přesnější než vyhodnocení grafické. Je to způsobeno tím, že první body na saturační křivce jsou podhodnocené v důsledku jednobodové aproximace počáteční rychlosti, a to tím více, čím menší je koncentrace peptidového substrátu. Tímto tvar saturační křivky neodpovídá přesně tvaru očekávané hyperboly.
- 4) porovnáme-li hodnoty k_{cat} připravené TEV-PR, jejíž enzymová kinetika byla měřena v prostředí dvou různých pufrů, zjistíme, že jsou v obou případech stejné. V porovnání s hodnotou publikovanou, a to $k_{cat} = 0,19 \text{ s}^{-1}$ [27], jsou ale tyto hodnoty cca 2,5x menší. V případě komerčně dodávané AcTEV-PR je hodnota k_{cat} oproti publikované hodnotě zase o něco vyšší. Důvodem, proč jsou hodnoty k_{cat} připravené a komerčně dodávané TEV-PR tak odlišné od hodnoty publikované, může být to, že:
 - a) stanovení koncentrace proteinu metodou dle Bradfordové není až tak přesné,
 - b) preparát připravené TEV-PR, který byl používán při měření enzymových kinetik, nemusel být ještě úplně čistý. Mohl obsahovat balastní proteiny či špatně sbalené molekuly TEV-PR, což mohlo zvyšovat celkovou koncentraci proteinu ve srovnání s proteinem nativním.
 - c) komerčně dodávaná AcTEV-PR neobsahuje ve svém proteinovém řetězci mutace zvyšující její rozpustnost, a to T17S, N68D a I77V.

Rozdíl mezi publikovanou hodnotou K_M a hodnotou (příp. hodnotami) K_M , která byla stanovena v této diplomové práci, zůstává nevysvětlen. K objasnění této otázky by bylo potřeba provést více měření za různých reakčních podmínek, což nebylo v rámci této práce z časových důvodů možné.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat podmínky produkce a purifikace rekombinantní TEV proteasy v *E. coli*. Optimalizace spočívala hlavně v tom, aby bylo dosaženo co nejvyšší čistoty a výtěžku žádaného proteinu.

V prvé řadě byly navrženy dvě varianty genů. První z nich obsahovala mutaci S219V, kterou bylo potlačena autoproteolýza TEV-PR. Druhá varianta zahrnovala kromě zmíněné mutace S219V ještě další tři mutace, a to: T17S, N68D a I77V. Ty byly do proteinového řetězce genu začleněny z důvodu zvýšení rozpustnosti TEV-PR v *E. coli*. Obě varianty genů byly připraveny úplnou syntézou, tj. spojením syntetických oligonukleotidů délky 80 bp, pomocí PCR reakce. Ta proběhla ve dvou, po sobě jdoucích amplifikačních krocích. Tento postup zajistil specifickou amplifikaci pouze žádaného produktu a potlačení nežádoucích vedlejších produktů.

Dalším krokem diplomové práce, který byl prováděn na jiném pracovišti, bylo zaklonování obou variant genů nejprve do plasmidu pUC19 a poté do expresního plasmidu pET22-b. Posledně jmenovaný plasmid nesoucí příslušný gen byl transformován do bakterie *E. coli*. Expres probíhala při dvou různých teplotách, a to při 20°C a 37°C. V prvním případě byl žádaný protein tvořen v cytoplasmě ve formě buněčného supernatantu, tj. v nativním stavu, v druhém případě ve formě nežádoucích inkluzních tělísek. Ty bylo nutné před vlastními purifikačními kroky nejprve rozpustit v denaturačním pufru obsahujícím 9 M močovinu a poté je dialyzovat proti refoldingovému pufru s obsahem glycerolu, který tak bránil vzniku nerozpustných agregátů TEV-PR. Tím bylo dosaženo převedení proteinu do nativní konformace.

Purifikace TEV-PR byla nejprve prováděna podle postupu uvedeného v jedné z publikovaných prací [48]. Protože nebylo dosaženo uspokojivého výsledku, bylo od tohoto postupu dále upuštěno. Žádaný protein byl poté purifikován na základě svých známých vlastností, jako je např. jeho molekulová hmotnost, izoelektrický bod či sekvence AMK v proteinovém řetězci. Byla použita celá řada chromatografických metod založených na rozdílných principech, a to afinitní chromatografie na vázaných Ni²⁺ iontech, chromatografie na katexu a anexu, gelová permeační chromatografie. U většiny prováděných purifikací byla jako první používána IMAC chromatografie založená na interakci mezi Ni²⁺ ionty a histidinovou kotvou, která byla přidána na C-konec proteinového řetězce TEV-PR. Dalším purifikačním krokem bylo použití katexové

chromatografie. Ta byla používána na základě určení izoelektrického bodu připravené TEV-PR, který byl poměrně vysoký, a to $pI = 8,37$. Pod touto hodnotou byla TEV-PR nabitá kladně. U některých preparátů byla na základě výsledků z tricinové elektroforézy použita jako dočišťovací metoda gelová permeační chromatografie.

Aktivita purifikovaných preparátů TEV-PR byla ověřována pomocí HPLC metody, kterou byly analyzovány reakční směsi obsahující syntetický peptidový substrát. Štěpení substrátu TEV proteasou probíhalo po dobu 2 h a 24 h. Bylo zjištěno, že aktivita připravené TEV-PR byla mnohdy vyšší než u komerčně dodávané AcTEV-PR.

Před samotným zahájením těchto analýz byly nastaveny reakční podmínky pro HPLC metodu. V rámci vývoje metody pro stanovení aktivity byly testovány různé možnosti provedení a složení mobilní fáze a nakonec byla vyvinuta HPLC metoda s isokratickou elucí, která znamenala úsporu času oproti dříve popsané metodě s gradientovou elucí [27].

Na závěr diplomové práce byly u připravené a komerčně dodávané TEV-PR v prostředí dvou různých pufrů stanoveny kinetické parametry K_M a k_{cat} . Použité kinetické pufrů se od sebe lišily především rozdílnými hodnotami pH. Získané hodnoty K_M a k_{cat} byly porovnány jednak mezi sebou navzájem a jednak s hodnotami publikovanými [27]. Bylo zjištěno, že hodnoty K_M připravené a komerčně dodávané TEV-PR, jejichž enzymové kinetiky byly měřeny v pufru o pH 8,0, byly přibližně stejné, avšak v porovnání s publikovanou hodnotou se neshodovaly. Důvodem mohlo být to, že stanovení hodnoty K_M , kterou ve své práci publikovali Kapust a kol. [27], bylo prováděno v prostředí pufru o pH 7,0. Vzhledem k tomu bylo měření enzymové kinetiky provedeno i v prostředí pufru o nižším pH, ale z časových důvodů to bylo možné jen u připravené TEV-PR. Takto stanovená hodnota K_M se výrazně přiblížila k publikované hodnotě. Rozdíl mezi oběma těmito hodnotami zůstává ale nevysvětlen.

Co se rychlostní konstanty k_{cat} týká, tak rozdíl mezi hodnotami připravené TEV-PR, jejichž enzymové kinetiky byly měřeny v prostředí pufru o pH 7,0 a 8,0, byl minimální. V porovnání s hodnotou publikovanou [27] byly ale tyto hodnoty nižší, což mohlo být způsobeno tím, že použité preparáty TEV-PR nebyly v době měření enzymových kinetik až tak úplně čisté. Hodnota k_{cat} komerčně dodávané AcTEV-PR byla naopak o něco vyšší. Důvodem mohlo být hlavně to, že komerčně dodávaná AcTEV-PR obsahuje ve svém řetězci pouze mutaci S219V.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] NEČAS, O. a kolektiv. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. Jinočany: Nakladatelství H&H, 2000. 554 s. ISBN 80-86022-46-3.
- [2] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2005. 168 s. ISBN 80-7318-295-5.
- [3] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie I*. Praha: Academia, 1992. 180 s. ISBN 80-200-0438-6.
- [4] ŠÍPAL, Z., ANZENBACHER, P., PEČ, P., POSPÍŠIL, J., RŮŽIČKA, I. *Biochemie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1992. 479 s. ISBN 80-04-21736-2.
- [5] VODRÁŽKA, Z., KRECHL, J. *Bioorganická chemie*. Praha: SNTL, 1991. 480 s. ISBN 80-03-00547-7.
- [6] RACLAVSKÝ, V. *Metody molekulární genetiky* [online]. [cit. 2008-01-22]. Dostupný z WWW: <http://biologie.upol.cz/metody>.
- [7] KOTRBA, P., KNEJZLÍK, Z., CHODORA, Z. *Izolace, klonování a analýza DNA* [online]. [cit. 2008-01-22]. Dostupný z WWW: www.otevrena-veda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/1kotrba.pdf.
- [8] BROWN, T. A. *Klonování genů a analýza DNA: Úvod*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2007. 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6.
- [9] *Restriction enzymes* [online]. [cit. 2008-01-24]. Dostupný z WWW: www.odnaviaiescola.com/enzymes.pdf.
- [10] *Restriction Endonucleases Overview* [online]. [cit. 2008-01-24]. Dostupný z WWW: http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/overview.asp.
- [11] RUML, T., RUMLOVÁ, M., PAČES, V. *Genové inženýrství*. Praha: VŠ chemicko-technologická, 2002. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.
- [12] *Bakteriofág* [online]. [cit. 2008-01-25]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Bakteriof%C3%A1g>.
- [13] *Molekulární metody* [online]. [cit. 2007-12-11]. Dostupný z WWW: www.natur.cuni.cz/~muncling/MOLE.DOC.
- [14] *Molekulární biologie – vybrané aplikace* [online]. [cit. 2007-12-11]. Dostupný z WWW: www.interactivebioscience.cz/admin/_docs/Podzimni_skola_2006-sbornik.pdf.
- [15] *Polymerázová reťazová reakcia* [online]. [cit. 2007-12-11]. Dostupný z WWW: www.158.195.42.129/web/Files/2007-2008/Cvicenie%205%20PCR.DOC.
- [16] *Calculating Primer Melting Temperatures for DNA Sequencing* [online]. [cit. 2008-01-15]. Dostupný z WWW: <http://www.iit-biotech.de/iit-cgi/oligo-tm.pl>.

- [17] *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator* [online]. [cit. 2008-01-15]. Dostupný z WWW:
<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>.
- [18] *Melting Temperature (Tm) Calculation* [online]. [cit. 2008-01-15]. Dostupný z WWW:
<http://insilico.ehu.es/tm.php>.
- [19] ŠMEHILOVÁ, M. *Purifikace a využití termostabilní DNA-polymerázy exprimované v Escherichia coli*. Bakalářská práce. Olomouc: Univerzita Palackého, 2004. 41 s.
- [20] KODUMAL, S. J., PATEL, K. G., REID R., MENZELLA, H. G., WELCH, M., SANTI, D. V. *Total synthesis of long DNA sequences: Synthesis of contiguous 32-kb polyketide synthase gene cluster*. Proc Natl Acad Sci 101. 2004, s. 15573-15578.
- [21] *Onkologické centrum J. G. Mendela: Laboratoř molekulární biologie* [online]. [cit. 2008-04-18]. Dostupný z WWW:
<http://www.onkologickecentrum.cz/downloads/vysetreni/laborator-metody.pdf>.
- [22] HONYŠ, D. *Regulace genové exprese – úloha a osud RNA v eukaryotické buňce* [online]. [cit. 2008-01-26]. Dostupný z WWW:
www.otevrena-veda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/2Honys.pdf.
- [23] *Genetický kód* [online]. [cit. 2008-01-30]. Dostupný z WWW:
http://cs.wikipedia.org/wiki/Genetick%C3%BD_k%C3%B3d.
- [24] SCHUMANN, W., FERREIRA, L. C. *Production of recombinant proteins in Escherichia coli*. Genetics and Molecular Biology. 2004.
- [25] *Lac operon* [online]. [cit. 2008-02-09]. Dostupný z WWW:
http://en.wikipedia.org/wiki/Lac_operon.
- [26] KAPUST, R. B., TÖZSÉR, J., COPELAND, T. D., WAUGH, D. S. *The PI' specificity of tobacco etch virus protease*. Biochemical and Research Communications 294. 2002, s. 949-955.
- [27] KAPUST, R. B., TÖZSÉR, J., FOX, J. D., ANDERSON, D. E., CHERRY, S., COPELAND, T. D., WAUGH, D. S. *Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency*. Protein Engineering. 2001, s. 993-1000.
- [28] ŠKÁRKA, B., FERENČÍK, M. *Biochémiá*. Bratislava: Alfa, 1983. 640 s. ISBN 63-556-83.
- [29] ŠTOSOVÁ, T., HAVLIŠ, J., LENOBEL, R., ŠEBELA, M. *Proteolytické enzymy: význam pro proteomiku*. Chemické listy 102. 2005, s. 896-905.
- [30] BREMAN, L. L. *Tobacco etch virus* [online]. [cit. 2008-01-30]. Dostupný z WWW:
<http://www.doacs.state.fl.us/pi/enpp/pathology/pathcirc/pp297.pdf>.
- [31] *Enhanced TEV protease extends enzyme stability for long-term activity* [online]. [cit. 2008-01-25]. Dostupný z WWW:
http://www.invitrogen.com/Content/Focus/320_022127_Focus25_3.pdf.

- [32] SÖRENSEN, H. P., MORTENSEN, K. K. *Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli*. Journal of Biotechnology 115. 2005, s. 113-128.
- [33] *Biotech S. O. S. Short course: Tobacco etch virus (TEV) protease* [online]. [cit. 2008-02-20]. Dostupný z WWW:
http://biotechsos.com/Summaries/TEV_SC.pdf.
- [34] KAPUST, R. B., WAUGH, D. S. *Controlled intracellular processing of fusion proteins by TEV protease*. Protein Expression and Purification 19. 2000, s. 312-318.
- [35] WAUGH, D. S. *TEV protease FAQ* [online]. [cit. 2007-12-16]. Dostupný z WWW:
http://mcl1.ncifcrf.gov/waugh_tech/faq/tev.pdf.
- [36] MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, E. *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51. 1986, s. 263-273.
- [37] BRADFORD, M. M. *A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding*. Anal. Biochem. 72. 1976, s. 248-254.
- [38] SCHÄGGER, H., von JAGOW, G. *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal. Biochem. 166. 1987, s. 368-379.
- [39] LAEMMLI, U. K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227. 1970, s. 680-685.
- [40] MERRIL, C. R. *Development and mechanisms of silver stains for electrophoresis*. Acta Histochem. Cytochem. 19. 1986, s. 655-657.
- [41] PORATH, J., CARLSSON, J., OLSSON, I., BELFRAGE, G. *Metal chelate affinity chromatography, a new to protein fractionation*. Nature 258. 1975, s. 598-599.
- [42] *Instrukční manuál ke koloně HisTrap HP 5 ml* [online]. [cit. 2008-02-11]. Dostupný z WWW:
http://www.apczech.cz/pdf/Instructions_71502768_HisTrap_HP_Kit.pdf.
- [43] *Calculation of protein isoelectric point* [online]. [cit. 2008-03-13]. Dostupný z WWW:
<http://isoelectric.ovh.org/>.
- [44] *Calculate molecular weight and isoelectric point* [online]. [cit. 2008-03-13]. Dostupný z WWW:
http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html.
- [45] *Amino acid analysis* [online]. [cit. 2008-04-24]. Dostupný z WWW:
<http://www.protein.iastate.edu/aaa.html>.
- [46] Van den BERG, S., LÖFDAHL, P., HÄRD, T., BERGLUND, H. *Improved solubility of TEV protease by directed evolution*. Journal of Biotechnology 121. 2006, s. 291-298.
- [47] *DNA marker* [online]. [cit. 2008-02-15]. Dostupný z WWW:
<http://www.top-bio.cz/prod.asp?p=14>.

-
- [48] LUCAST, L. J., BATEY, R. T., DOUDNA, J. A. *Large-scale purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus protease*. *BioTechniques* 30. 2001, s. 544-554.
- [49] PINGOUD, A., FUXREITER, M., PINGOUD, V., WENDE, W. *Type II restriction endonucleases: structure and mechanism*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005, s. 685-707.
- [50] PINGOUD, A., JELTSCH, A. *Structure and function of type II restriction endonucleases*. Oxford University Press. 2001, s. 3705-3727.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

TEV	Tobacco etch virus.
TVMV	Tobacco vein mottling virus.
M_r	Relativní molekulová hmotnost.
ATP	Adenosin-5'-trifosfát.
DNA	Deoxyribonukleová kyselina.
kbp	Kilo báze.
bp	Páry bazí.
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid.
dATP	2'-deoxyadenosin-5'-trifosfát.
dCTP	2'-deoxycytidin-5'-trifosfát.
dGTP	2'-deoxyguanosin-5'-trifosfát.
dTTP	2'-deoxythymidin-5'-trifosfát.
dNTPs	Deoxyribonukleotidtrifosfáty.
Mg^{2+}	Hořečnatý.
RNA	Ribonukleová kyselina.
kDa	Kilo Dalton.
mRNA	Mediátorová RNA.
rRNA	Ribozomální RNA.
S	Svedberg.
tRNA	Transferová RNA.
TEV-PR	TEV proteasa.
PMSF	Fenylmethylsulfonylfluorid.
AEBSF	4-(2-aminoethyl)-benzensulfonylfluorid-hydrochlorid.
TLCK	Tosyl-L-lysin-chlormethylketon.

EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina.
DTT	Dithiothreitol.
MES	Kyselina 2-(N-morpholino)ethansulfonová.
AMK	Aminokyselina.
HAc	Kyselina octová.
OD ₆₀₀	Optická hustota při 600 nm.
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid.
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin.
SDS	Dodecylsíran sodný.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Základní obecný vzorec aminokyselin [1].....	10
Obr. 2: Grafické znázornění rovnice Michaelise a Mentenové [5].	16
Obr. 3: Schéma klonování genů v bakteriích [7].....	18
Obr. 4: Genetická a fyzikální mapa plasmidu pUC19.	23
Obr. 5: Schéma průběhu PCR [7].....	27
Obr. 6: Schéma dvoustupňové PCR reakce s použitím 8 oligonukleotidů.	28
Obr. 7: Vazebná místa na ribozomu [1].	32
Obr. 8: Schematické znázornění fúzního proteinu MBP-NusG [26].	37
Obr. 9: Aktivita TEV proteasy štěpící <i>in vivo</i> kanonickou sekvenci ENLYFQ↓X v pozici P1' [26].....	38
Obr. 10: Varianty genů TEV-PR.	44
Obr. 11: Nárůst TEV-PR v bakteriálních buňkách BL21 (DE3) RIL při teplotě 20°C před a po přidavku IPTG.....	51
Obr. 12: Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové.....	53
Obr. 13: Schematické znázornění průběhu dialýzy.	58
Obr. 14: Schéma dialýzy vzorku TEV-PR ve třech podílech refoldingového pufru.....	58
Obr. 15: Schéma chromatografického systému pro HPLC.....	64
Obr. 16: Aminokyselinová sekvence wild-type TEV-PR.	69
Obr. 17: Nukleotidová a aminokyselinová sekvence TEV-PR včetně začlenění His-tagu a mutací T17S, N68D, I77V a S219V.	70
Obr. 18: Rozdělení genu TEV-PR do dvou syntonů.	71
Obr. 19: Schéma štěpení a spojování obou syntonů.	72
Obr. 20: Kontrola výsledku z dvoustupňové PCR.....	73
Obr. 21: Obecné purifikační schéma.	74
Obr. 22: Průběh afinitní chromatografie na vázaných Ni ²⁺ iontech při pH 8,0.....	77
Obr. 23: Fotografický záznam gelu č. 1 z tricinové elektroforézy po provedené IMAC chromatografii při pH 8,0.	78
Obr. 24: Fotografický záznam gelu č. 2 z tricinové elektroforézy po provedené IMAC chromatografii při pH 8,0.	78
Obr. 25: Průběh afinitní chromatografie na vázaných Ni ²⁺ iontech při pH 8,0.....	80
Obr. 26: Průběh katexové chromatografie při pH 7,0.....	80

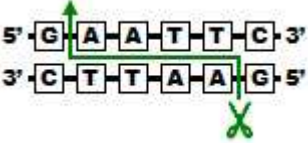
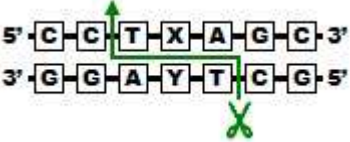
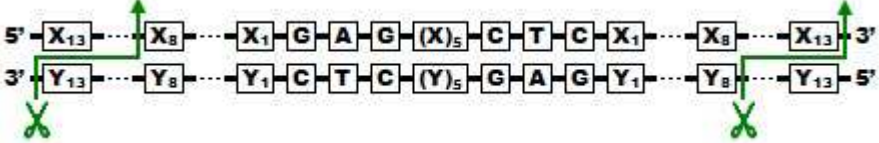
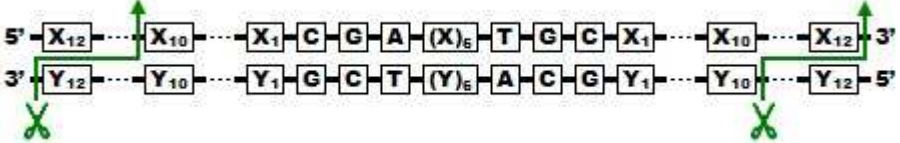
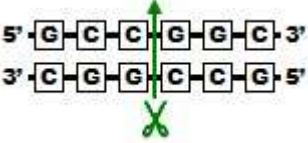
Obr. 27: Fotografický záznam gelu z tricinové elektroforézy po provedené IMAC chromatografii při pH 8,0.	81
Obr. 28: Fotografický záznam gelu č. 1 z tricinové elektroforézy po provedené katexové chromatografii při pH 7,0.	81
Obr. 29: Fotografický záznam gelu č. 2 z tricinové elektroforézy po provedené katexové chromatografii při pH 7,0.	82
Obr. 30: Fotografický záznam gelu č. 1 z tricinové elektroforézy po provedené anexové chromatografii při pH 7,5.	84
Obr. 31: Fotografický záznam gelu č. 2 z tricinové elektroforézy po provedené anexové chromatografii při pH 7,5.	85
Obr. 32: Průběh afinitní chromatografie na vázaných Ni^{2+} iontech při pH 8,0.	85
Obr. 33: Fotografický záznam gelu z tricinové elektroforézy po provedené IMAC chromatografii při pH 8,0.	86
Obr. 34: Průběh katexové chromatografie při pH 6,0.	87
Obr. 35: Fotografický záznam gelu z tricinové elektroforézy po provedené katexové chromatografii při pH 6,0.	87
Obr. 36: Průběh chromatografického záznamu.	89
Obr. 37: HPLC analýza reakční směsi bez TEV-PR.	90
Obr. 38: HPLC analýza reakční směsi s totálně rozštěpeným peptidovým substrátem.	91
Obr. 39: Saturační křivka připravené TEV-PR v prostředí kinetického pufu KPI.	93
Obr. 40: Saturační křivka připravené TEV-PR v prostředí kinetického pufu KP2.	94
Obr. 41: Saturační křivka komerčně dodávané TEV-PR v prostředí kinetického pufu KPI.	96

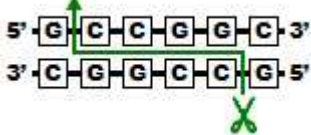
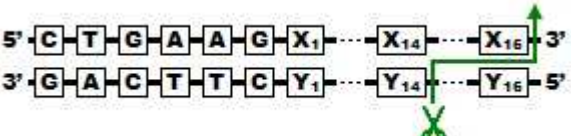
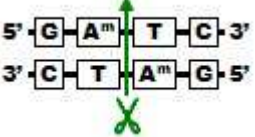
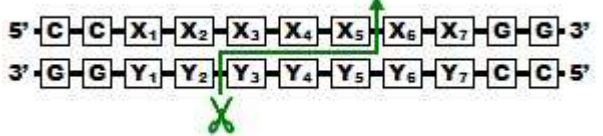
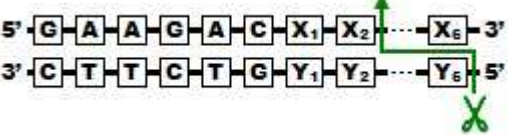
SEZNAM TABULEK

Tab. I: <i>Názvy, symboly a typy proteinogenních aminokyselin [3]</i>	11
Tab. II: <i>Přehled restričních endonukleáz typu II [8]</i>	20
Tab. III: <i>Přehled nejpoužívanějších DNA polymeráz [19]</i>	25
Tab. IV: <i>Genetický kód [4]</i>	30
Tab. V: <i>Kinetické parametry oligopeptidového substrátu TENLYFQXGTRR-NH₂ s aminokyselinovými substitucemi v pozici P1' [28]</i>	39
Tab. VI: <i>Katalytická aktivita některých mutantů TEV proteasy odolných vůči autoproteolýze [33]</i>	40
Tab. VII: <i>Kinetické parametry wild-type proteasy a jejích mutantů [27]</i>	40
Tab. VIII: <i>Oligonukleotidy pro přípravu syntonů S1 a SIM</i>	45
Tab. IX: <i>Oligonukleotidy pro přípravu syntony S2</i>	45
Tab. X: <i>Teplotní program PCR reakce</i>	46
Tab. XI: <i>Rozmezí molekulových hmotností DNA separovaných v gelu o různých koncentracích agarózy [11]</i>	47
Tab. XII: <i>Naměřené a vypočtené hodnoty potřebné pro sestavení kalibrační křivky</i>	53
Tab. XIII: <i>Složení separačního a zaostřovacího gelu (pro jeden gel v použité aparatuře)</i>	54
Tab. XIV: <i>Finální koncentrace peptidového substrátu v reakčních směsích</i>	66
Tab. XV: <i>HPLC analýza připravené TEV-PR s použitím kinetického pufru KP1</i>	92
Tab. XVI: <i>HPLC analýza připravené TEV-PR s použitím kinetického pufru KP2</i>	94
Tab. XVII: <i>HPLC analýza komerčně dodávané TEV-PR s použitím kinetického pufru KP1</i>	95
Tab. XVIII: <i>Naměřené a vypočtené parametry enzymových kinetik připravené a komerčně dodávané TEV-PR v prostředí kinetických pufrů KP1 a KP2</i>	97

PŘÍLOHA P I: DĚLENÍ RESTRIKČNÍCH ENDONUKLEÁZ TYPU II

[49, 50]

Podtyp	Obecná charakteristika
Ortodoxní	<p>Jsou to takové enzymy, které rozpoznávají tzv. „palindromovou“ sekvenci o délce 4 - 8 bp. Uvnitř této sekvence pak štěpí molekulu DNA. Štěpení poskytuje buď zarovnané, tzv. tupé konce, vznikající uprostřed rozpoznávací sekvence, nebo tzv. kohezní konce, což jsou jednovláknové úseky přečnívající na 3' nebo 5'-koncích. Nejznámějším a nejlépe prostudovaným zástupcem je <i>EcoRI</i>:</p> 
IIA	<p>Jsou to takové enzymy, které rozpoznávají asymetrickou (nepalindromovou) sekvenci nukleotidů bez ohledu na to, zda štěpení probíhá mimo tuto sekvenci nebo uvnitř ní. Jedním ze zástupců této skupiny, který stojí za zmínku, je <i>Bpu10I</i>. Jde o dimer s neidentickými podjednotkami, z nichž každá je zodpovědná za štěpení jednoho řetězce molekuly DNA.</p> 
IIB	<p>Jsou to takové enzymy, které štěpí molekulu DNA na obou stranách rozpoznávací sekvence. Jako příklad lze uvést <i>BpII</i>, který štěpí obě vlákna DNA následujícím způsobem:</p> 
IIC	<p>Jsou to takové enzymy, jejichž struktura je tvořena z restrikčních a modifikačních domén, které nese jednoduchý polypeptidový řetězec. Jedním z prvně objevených enzymů této skupiny byl <i>BcgI</i>:</p> 
IIE	<p>Jsou to takové enzymy, které v cílové sekvenci nukleotidů vyžadují pro efektivnější štěpení DNA dvě specifická místa, z nichž jedno představuje cíl štěpení a druhé dodává těmto enzymům odpovídající konformaci, aby byly aktivní (tzn. že, druhé místo funguje jako allosterický efektor). Jedním z nejlépe prostudovaných zástupců je např. <i>NaeI</i>:</p> 

<p>IIF</p>	<p>Jsou to takové enzymy, které vyžadují stejně jako enzymy typu IIE v cílové sekvenci nukleotidů dvě specifická místa s tím rozdílem, že obě jsou cílem štěpení. Mezi nejznámější zástupce patří např. <i>NgoMIV</i>:</p> 
<p>IIG</p>	<p>Jsou to takové enzymy, které vykazují jak restriční, tak modifikační aktivitu, která je nesena jednoduchým polypeptidovým řetězcem. Účinnost těchto enzymů může být stimulována nebo tlumena kofaktorem S-(5'-adenosyl)-L-methioninem (zkráceně AdoMet). Jedním z nejlépe prostudovaných zástupců je např. <i>Eco57I</i>:</p> 
<p>IIM</p>	<p>Jsou to takové enzymy, které rozpoznávají specifické metylované sekvence a štěpí je v přesně definovaných místech. Nejznámějším zástupcem je <i>DnpI</i>:</p> 
<p>IIT</p>	<p>Jsou to takové enzymy, které jsou tvořeny dvěma různými podjednotkami, které vykazují restriční a modifikační aktivitu. Jako příklad lze uvést <i>BsII</i>, který vyhledává cílovou sekvenci nukleotidů jako heterotetramer:</p> 
<p>IIS</p>	<p>Jsou to takové enzymy, které rozpoznávají asymetrickou sekvenci nukleotidů a obvykle štěpí mimo tuto sekvenci na jednu či druhou stranu v přesně definovaných místech. Jako příklad lze uvést <i>BbsI</i>:</p> 

PŘÍLOHA P II: CHARAKTERISTIKA EXPRESNÍHO VEKTORU PET-22B

pET-22b(+) sequence landmarks	
T7 promoter	361-377
T7 transcription start	360
<i>pelB</i> coding sequence	224-289
Multiple cloning sites (<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-225
His* Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	764-1843
pBR322 origin	3277
<i>bla</i> coding sequence	4038-4895
<i>f1</i> origin	5027-5482

