



Středoškolská technika 2017

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

MOLEKULÁRNÍ PODSTATA MODRÉHO METALOPROTEINU – AZURINU

Zina Briki

Gymnázium Praha 7

Nad Štolou 1510/1, 170 00 Praha

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Miroslava Šulce, PhD. a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Praze dne.....

podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli, doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, PhD., za možnost pracovat na tomto projektu, za trpělivost, ochotu a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kamile Babické, která mě s panem docentem spojila a v této práci mě velmi podporovala. Můj dík patří i Mgr. Renatě Ptáčkové, PhD. za pomoc a rady při provádění experimentální části. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům a sestře, kteří mě vždy podporovali a při zpracovávání této práce byli pro mě velkou oporou.

Tato práce byla financována projektem UNCE 204025/2012.

Anotace

Předkládaná práce se zabývá studiem struktury a funkce metaloproteinů azurinu z mikroorganismu *Pseudomonas aeruginosa*, který je zástupcem cupredoxinů. Tyto proteiny obsahují ve své struktuře atom mědi a participují na přenosu elektronu. Pro studium jsme použili metodu světlem iniciovaného chemického zesílení (PIXL, z angl. photo induced cross-linking), která umožňuje inkorporaci strukturního analogu methioninu s diazirinovou skupinou (pMet) do sekvence azurinu a následnou fotoiniciací tvorbu karbenu, který byl využit pro studium iniciace přenosu elektronu v molekule azurinu, nebo tvorby nového zesílení, čehož bylo využito při studiu dimerů či jiných oligomerů azurinu v roztoku. V experimentální části je azurin s inkorporovaným foto-methioninem exprimován auxotrofním kmenem bakterií *E.coli* s cílem určit úlohu methioninů v pozicích 13, 44, 56, 64, 109 a 121 na protein-proteinové interakce a při přenosu elektronu. Po purifikaci proteinu a foto-síťovacích experimentech lze konstatovat, že dochází k tvorbě dimerů a jedná se pravděpodobně o transienční interakci (viz výsledky SDS-PAGE). Také bylo potvrzeno, že methioninová residua v blízkosti atomu mědi mohou participovat na přenosu elektronu přes atom mědi (viz výsledky UV-VIS analýzy). Práce nejen potvrdila předpokládanou transienční dimerizaci azurinu, ale průlomově ukázala na nové možnosti studia elektron transportních dějů metodou PIXL.

Klíčová slova

Metaloproteiny, PIXL, foto-methionin, azurin

Annotation

This work is focused on the structure and function of the metalloprotein azurin which occurs in the microorganism *Pseudomonas aeruginosa*. This protein is a cupredoxin, which means it contains a copper atom in its structure and it participates on electron-transport. For this study we used the photo induced cross-linking method (PIXL), which enables us to incorporate a structure analogue of methionine with a diazirine group (pMet) into the structure of azurin and afterwards to initiate the production of reactive carbene by UV light, which was used for studies on the initiation of electron-transport in the molecule of azurin, or the creation of a new cross-link, which was used for studying dimers or other oligomers of azurin in solution. In the experimental part, azurin with incorporated photo-methionine is expressed by auxotrophic type bacteria *E. coli* to determine the function of methionines present in positions 13, 44, 56, 64, 109 and 121 in protein-protein interactions as well as in electron-transport. The protein purification and photo-induced cross-linking experiments revealed only low levels of covalent dimer production and most likely it is a transient interaction (see the results of SDS-PAGE). It was also confirmed that methionine residues near the copper atom can participate on electron-transport across the copper atom (see the results of UV-VIS). Not only did this work confirm the estimated transient dimerization of azurin, but it also indicated new groundbreaking options of studying electron-transport by the PIXL method.

Keywords

Metalloproteins, PIXL, photo-methionine, azurin

Obsah

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Seznam použitých zkratk | 8 |
| 2 | Úvod | 10 |
| 3 | Teoretická část | 11 |
| 3.1 | Proteiny | 11 |
| 3.1.1 | Složení | 11 |
| 3.1.2 | Struktura a funkce | 11 |
| 3.1.3 | Proteosyntéza | 13 |
| 3.2 | Technika světlem iniciovaného chemického zesílení | 14 |
| 3.3 | Cupredoxiny a azurin | 15 |
| 4 | Cíle práce | 17 |
| 5 | Materiály | 18 |
| 5.1 | Chemikálie | 18 |
| 5.2 | Bakteriální kmeny a plazmidy | 20 |
| 5.3 | Přístrojové vybavení | 20 |
| 6 | Metody | 21 |
| 6.1 | Transformace buněk | 21 |
| 6.2 | Příprava minerálního média LM9 | 21 |
| 6.3 | Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného | 22 |
| 6.4 | Izolace plazmidu | 22 |
| 6.5 | Stanovení míry inkorporace na MS | 22 |
| 6.6 | Exprese | 23 |
| 6.6.1 | Růstová křivka | 24 |
| 6.7 | Purifikace | 24 |
| 6.8 | Charakterizace vzorků | 25 |
| 6.8.1 | Stanovení koncentrace proteinu | 25 |
| 6.8.2 | UV-VIS spektrometrie | 26 |
| 6.9 | Fotolýza | 26 |
| 7 | Výsledky a diskuze | 28 |
| 7.1 | Izolace plazmidu | 28 |
| 7.2 | Stanovení míry inkorporace na MS | 29 |
| 7.3 | Exprese | 29 |
| 7.3.1 | Růstová křivka | 29 |

| | | |
|-----|----------------------------|----|
| 7.4 | Purifikace | 30 |
| 7.5 | Charakterizace vzorků..... | 33 |
| 7.6 | Fotolýza..... | 34 |
| 8 | Závěry | 36 |
| 9 | Použitá literatura | 37 |
| 10 | Seznam obrázků..... | 39 |

1 Seznam použitých zkratk

| | |
|-------------------|--|
| 4AZU | protein azurin složený ze čtyř podjednotek ¹ |
| Å | ångström; jednotka délky |
| aa-tRNA | aminoacyl-tRNA |
| BCA | kyselina bicinchoninová |
| BSA | hovězí sérový albumin, z angl. bovine serum albumine |
| Da | Dalton; jednotka hmotnosti |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| IPTG | isopropoxy- β -D-1-thiogalaktopyranosid |
| Leu | leucin |
| LM9 | minerální médium |
| MALDI | ionizace/desorpce laserem za přítomnosti matrice (z angl. matrix assisted laser desorption/ionization) |
| Met | methionin |
| MS | hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry) |
| MW | molekulová hmotnost |
| OD ₆₀₀ | optická denzita při vlnové délce 600 nm |
| PBS | fyziologický roztok pufrovaný fosfátovým pufrem (z angl. phosphate buffered saline) |
| pH | záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových kationtů |
| PIXL | technika světlem-indukovaného zesítnění, z angl. photo induced cross-linking |
| pLeu | foto-leucin |
| pMet | foto-methionin |
| RPM | otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute) |

| | |
|----------|--|
| SDS | dodecylsulfát sodný (z angl. sodium dodecyl sulfate) |
| SDS-PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (z angl. sodium dodecylsulphate- polyacrylamide gel electrophoresis) |
| TOF | detektor doby letu částice při hmotnostní spektrometrii (z angl. time of flight) |
| Tris | tris(hydroxymethyl)aminoethan |
| UV-VIS | ultrafialová-viditelná spektroskopie (z angl. ultra violet-visible spectroscopy) |
| v/v | objemová procenta |
| w/v | poměr hmotnost/objem |

2 Úvod

Proteiny jsou základními stavebními jednotkami organismů. Zastávají mnoho nezbytných funkcí v živých soustavách a část z nich je pro organismy nenahraditelná. Výzkum struktury a funkce proteinů je velmi důležitý pro pochopení jejich úlohy v organismu.

Tato práce se zabývá proteinem azurinem, který je dobře prostudovaným proteinem mikroorganismu *Pseudomonas aeruginosa*. Azurin je zástupcem cupredoxinů, což jsou proteiny s navázaným kationtem mědi ve struktuře. Díky tomu lze azurin snadno poznat – má totiž krásně modrou barvu. Tento protein funguje jako elektron-transportní molekula a ačkoliv je známa jeho krystalická struktura, tak je zde celá řada nejasností nejen ohledně tvorby oligomerů, ale také ohledně přenosu elektronu napříč proteinem.

Cílem této práce je zjistit, jaké protein-proteinové interakce zaujímá azurin v roztoku a také zda se methioninová residua okolo atomu mědi podílí na přenosu elektronu. K naplnění těchto cílů je použita technologie světlem iniciovaného chemického zesílení (PIXL), která umožňuje inkorporaci fotoaktivovaného strukturního analogu methioninu (pMet) do struktury proteinu, který při ozáření UV světlem vytváří radikální částici napadající vazby ve svém okolí. Vzniklé produkty jsou následně analyzovány různými metodami (SDS-PAGE, UV-VIS spektroskopie).

Získané výsledky této práce by měly nejen objasnit nejasnosti ohledně dimerizace/oligomerizace azurinu, ale zároveň budou i prvním testem možné využitelnosti metody PIXL pro studium elektron-transportních dějů v proteinech. Současně modelový protein azurin a jeho případné studium dalších interakcí s vazebnými partnery je důležité nejen s ohledem na funkci azurinu v mikroorganismu (je považován za jeden z virulenních faktorů), ale i z pohledu studia a využití vlivu peptidů azurinu v protinádorové léčbě.

3 Teoretická část

3.1 Proteiny

3.1.1 Složení

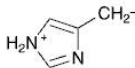
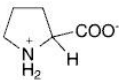
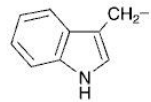
Proteiny jsou biomakromolekuly, které mají v živých soustavách nezastupitelnou funkci. Jsou složeny z polypeptidových řetězců tvořených obvykle 20 proteinogenními α -aminokyselinami (obr. 1). Aminokyseliny jsou spojeny tzv. peptidovou vazbou do řetězce, jehož prostorové uspořádání určuje funkční vlastnosti proteinu. V peptidové vazbě jsou π -elektrony mezi uhlíkem karboxylové skupiny a dusíkem α -aminokyseliny delokalizované, z čehož vyplývá, že vazba je planární a rotace kolem ní není možná. Rotace je možná pouze v tetrahedrálních úhlech ψ a ϕ podél vazeb N-C $_{\alpha}$ a C $_{\alpha}$ -C. Povolené kombinace úhlů ϕ/ψ znázorňuje tzv. Ramachandranův diagram, který díky tomu zároveň i značí preferenci jednotlivých sekundárních struktur.¹⁰

Kromě aminokyselin má většina proteinů vázané také jiné složky, jak kovalentně, tak i nekovalentně. Podle typu složky se pak proteiny mohou dělit na mnoho skupin, např.:

- Glykoproteiny – vázanou složkou je sacharid (např. mucin)
- Lipoproteiny – vázanou složkou je lipid (např. chylomikrony)
- Nukleoproteiny – vázanou složkou je ribonukleová kyselina – RNA (např. ribozomy)
- Fosfoproteiny – vázanou složkou je fosfátová skupina (např. kasein)
- Metaloproteiny – vázanou složkou je kation kovu (např. Cu²⁺ v azurinu)¹²

3.1.2 Struktura a funkce

Za primární strukturu proteinu je považován polypeptidový řetězec. Pořadí neboli sekvence aminokyselin v řetězci je kódována v genomu organismu a je pro každý protein jedinečná. Řetězec končí na jedné straně aminoskupinou (N-konec), na druhé straně karboxylovou skupinou (C-konec). Sekvence se vždy značí od N-konce k C-konci.

| | | | |
|---------------|--|-----|---|
| L-Alanin | -CH ₃ | Ala | A |
| L-Arginin | -(CH ₂) ₃ -NH-C(=NH ₂ ⁺)-NH ₂ | Arg | A |
| L-Asparagin | -CH ₂ -CONH ₂ | Asn | N |
| L-Aspartát | -CH ₂ -COO ⁻ | Asp | D |
| L-Cystein | -CH ₂ -SH | Cys | C |
| L-Glutamát | -CH ₂ -CH ₂ -COO ⁻ | Glu | E |
| L-Glutamin | -CH ₂ -CH ₂ -CONH ₂ | Gln | Q |
| L-Glycin | -H | Gly | G |
| L-Histidin |  | His | H |
| L-Isoleucin | -CH(CH ₃)-CH ₂ -CH ₃ | Ile | I |
| L-Leucin | -CH ₂ -CH(CH ₃) ₂ | Leu | L |
| L-Lysin | -CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₂ -NH ₃ ⁺ | Lys | K |
| L-Methionin | -CH ₂ -CH ₂ -S-CH ₃ | Met | M |
| L-Fenylalanin | -CH ₂ -C ₆ H ₅ | Phe | F |
| L-Prolin |  | Pro | P |
| L-Serin | -CH ₂ -OH | Ser | S |
| L-Threonin | -CH(OH)-CH ₃ | Thr | T |
| L-Tryptofan |  | Trp | W |
| L-Tyrosin | -CH ₂ -C ₆ H ₄ -OH | Tyr | Y |
| L-Valin | -CH(CH ₃) ₂ | Val | V |

Obr. 1 Proteinogenní aminokyseliny. Zleva: název aminokyseliny, strukturální vzorec, třípísmenný kód, jednopísmenný kód. Převzato a upraveno z: <https://leporelo.info/pics/pic/aminokyseliny-tabulka.jpg> (cit. dne 20. 2. 2017)

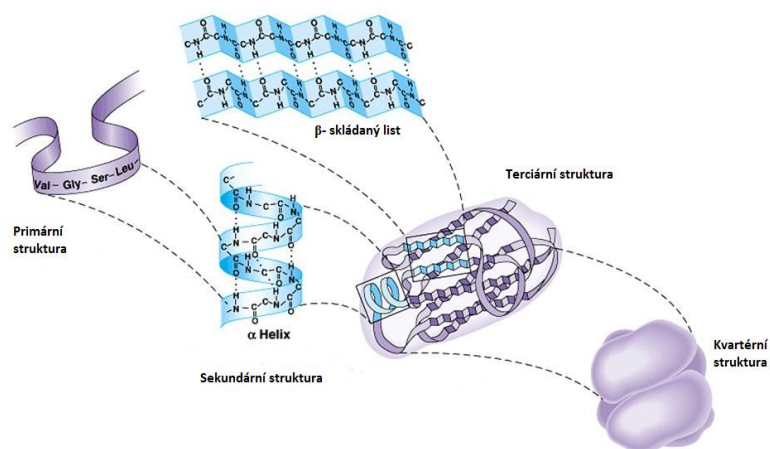
Díky slabým nevazebným interakcím mohou primární struktury vytvářet různé prostorové konformace.¹⁰

Sekundární struktura je opakující se prostorové uspořádání řetězce aminokyselin na krátkou vzdálenost, které je stabilizováno vodíkovými můstky karbonylu CO a amidu NH hlavního polypeptidového řetězce. Rozlišujeme dva základní typy sekundární struktury: α -helix a β -skládaný list. Šroubovici α -helixu stabilizují vodíkové můstky mezi kyslíkem z karboxylové skupiny jedné aminokyseliny a vodíkem z amidické skupiny čtvrté následující aminokyseliny. Šroubovice α -helixu je pravotočivá. Ve struktuře β -skládaného listu (nebo také z angličtiny β -sheet) vodíkové vazby stabilizují dva polypeptidové řetězce. Pokud oba řetězce mají stejnou orientaci (tj. jejich N-konce jsou na stejné straně), je β -sheet paralelní, pokud mají řetězce orientaci opačnou, jde o β -sheet antiparalelní.

Terciární strukturou označujeme výslednou prostorovou konformaci proteinu. Podílí se na ní nejen sekundární struktury, ale také různé iontové či nepolární interakce nebo také kovalentní vazby (př. disulfidové můstky) mezi postranními řetězci z různých částí polypeptidu.¹² Podle tvaru terciární struktury rozlišujeme dva typy proteinů - globulární a fibrilární.² V globulárních proteinech jsou polypeptidové řetězce sbaleny do klubíčka. Ve fibrilárních proteinech jsou naopak řetězce natažené a vytvářejí svým příčným propojením vlákna.

Kvartérní strukturu mají proteiny, které se skládají z více řetězců. Řetězce jsou v prostoru stabilizovány, stejně jako v případě terciární struktury, pomocí nevazebných interakcí a tvoří tím podjednotky jednoho většího funkčního celku.¹²

Funkce proteinů v organismech závisí na struktuře proteinu. Fibrilární proteiny jsou většinou stavebními materiály, tvoří strukturální celky či kontraktilní molekuly. Proteiny také mohou koordinovat a regulovat chemické děje v organismech, těmto proteinům se pak říká hormony. Enzymy jsou jiným typem proteinů, které katalyzují metabolické děje. Proteiny dále mohou sloužit jako složky imunitního systému (např. imunoglobulin G), zásobní látky (např. kasein) nebo také jako transportní částice, ať už elektronů, iontů či jiných biomolekul.¹⁰



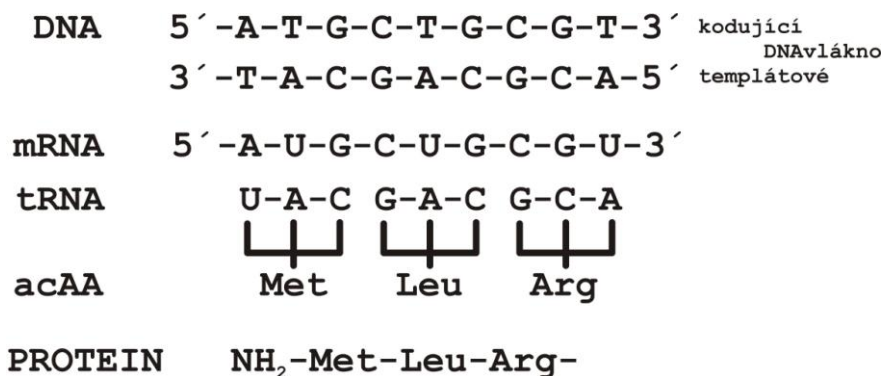
Obr. 2 Hierarchie struktury proteinů. Převzato a upraveno z: http://images.slideplayer.com/27/8939913/slides/slide_26.jpg (cit. dne 20.2.2017)

3.1.3 Proteosyntéza

Proteosyntéza je proces, při kterém se v buňkách syntetizují proteiny.

Sekvence proteinů je kódována v DNA pomocí bází adeninu, guaninu, thyminu a cytosinu. Aby mohla proběhnout proteosyntéza, musí se informace z DNA přepsat (transkribovat) na molekulu mediátorové RNA (mRNA, z angl. messenger RNA). To se děje pomocí enzymu RNA polymerázy, která přeruší vodíkové můstky v části DNA, kde se nachází informace o proteinu. V tomto místě se molekula DNA rozplete a k jednomu z vláken DNA se komplementárně tvoří vlákno mRNA – proti adeninu z DNA stojí v mRNA místo thyminu uracil, proti guaninu cytosin.¹¹

Při translaci probíhá překlad informace z mRNA a samotná výroba primární struktury proteinu. Translace probíhá na ribonukleoproteinu zvaném ribozom, který se nachází v cytoplazmě buňky nebo je vázaný na endoplazmatické retikulum. Dvě podjednotky ribozomu se naváží na mRNA a začnou podle vlákna mRNA syntézu polypeptidového řetězce s krokem jednoho tripletu. Ke startovnímu tripletu AUG se páruje tRNA svým antikodonem UAC, která nese počáteční aminokyselinu, methionin. Ribozom se posune o triplet podél mRNA. Na další triplet se napojí tRNA s příslušnou aminokyselinou. Na tu se napojí peptidovou vazbou methionin z předchozího tripletu a translace pokračuje tímto způsobem dál.



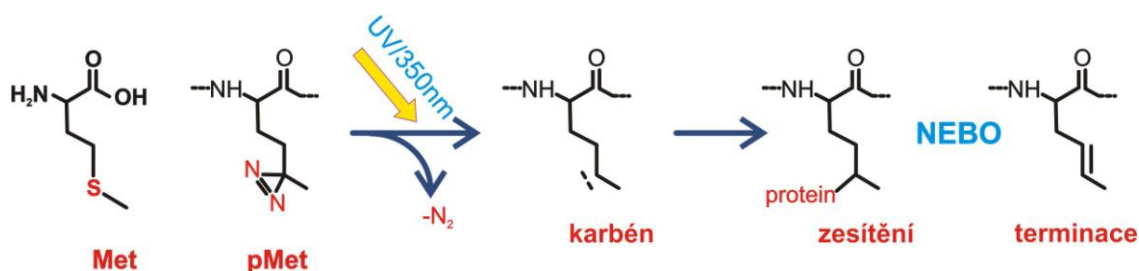
Obr. 3 Schéma centrálního dogmatu. Obrázek poskytl doc. RNDr. Miroslav Šulc, PhD.

Aminoacyl-tRNA sythetasa (aa-tRNA synthetasa) je enzym, který umožňuje připojení aminokyseliny k příslušné tRNA. Tento enzym nejprve katalyzuje navazování aminokyseliny na 3' terminální hydroxyl ribózy molekuly ATP. Při této reakci vzniká aminoacyladenylát, který následně reaguje s tRNA za katalýzy stejného enzymu.¹² Díky chybovosti aa-tRNA synthetas lze v některých případech namísto původní aminokyseliny navázat její strukturální analog, což nám umožňuje zkoumat strukturně-funkční děje proteinů.¹⁵

Aminokyseliny jsou v mRNA kódovány tzv. genetickým kódem, což jsou tripletety nukleotidů, které se nazývají kodóny. Protože existují 4 báze, lze vytvořit dohromady 64 tripletních kodónů. Ve většině organismů 61 z nich kódují 20-23 proteinogenních aminokyselin (více tripletů může kódovat jednu aminokyselinu, což se označuje jako degenerovaný genetický kód), z nichž jeden je „start“ kodón, který značí začátek translace a zároveň kóduje methionin. Třem zbylým se říká „stop“ kodóny a značí zastavení syntézy proteinů.⁵

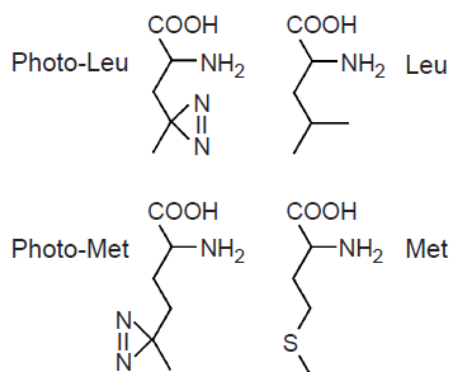
3.2 Technika světlem iniciovaného chemického zesíťení

Světlem iniciované chemické zesíťení je technika, která využívá fotolytických reakcí k vytvoření kovalentních vazeb např. v místech protein-proteinových interakcí. V roce 2005 byly navrženy Suchankovou et al. dva strukturální analogy aminokyselin, foto-methionin a foto-leucin. Tyto fotolabilní aminokyseliny nejsou pro buňky toxické a jsou běžně aktivovány a včleňovány (inkorporovány) do primární sekvence proteinů namísto přirozených aminokyselin. Ve své struktuře mají fotolabilní diazirinový kruh (viz obr. 4), který se při ozáření proteinu UV zářením o vlnové délce maxima 350 nm rozpadne na nestabilní karbén, který buď napadá vazby v blízkém okolí (do vzdálenosti 5 Å⁸), nebo terminuje (tvorba dvojné vazby). Tím vytváří novou kovalentní vazbu ve struktuře proteinu (viz obr. 5).¹⁵



Obr. 5 Schéma aktivace foto-methioninu. Obrázek poskytl doc. RNDr. Miroslav Šulc, PhD.

Autoři foto-methionin a foto-leucin testovali na jejich ovlivnění produkce proteinů v buňkách a jejich celkovou životaschopnost. Bylo zjištěno, že buněčné kultury rostou v růstovém médiu s fotoaktivovanými aminokyselinami pomaleji, než když médium obsahuje přirozené aminokyseliny, avšak vliv na jejich životaschopnost to nemá. Jedinou nevýhodou této techniky je nízká míra inkorporace strukturálních analogů do struktury proteinu. Ukázalo se, že ačkoli jsou buňky pěstované v růstovém médiu bez přítomnosti jakýchkoli přirozených protějšků fotoaktivovaných aminokyselin, tak rostoucí buňky spotřebovávají přirozené aminokyseliny z uhynulých buněk a až poté začnou spotřebovávat fotoaktivované aminokyseliny, což je dáno rozdílnou hodnotou disociačních konstant analogů aminokyselin pro dané aa-tRNA synthetasy. Procento inkorporace těchto strukturálních analogů je často nízké v závislosti na podmínkách exprese. I přesto je tato metoda výhodná z hlediska variability experimentálního provedení a možností, které umožňuje ve výzkumu proteinů.¹⁴



Obr. 4 Strukturální vzorce přirozených aminokyselin (vpravo) a jejich strukturálních analogů (vlevo). Převzato a upraveno z ¹⁴.

3.3 Cupredoxiny a azurin

Cupredoxiny jsou metaloproteiny obsahující ve své struktuře atom mědi, kolem kterého většinou aminokyseliny histidin, histidin a cystein zaujímají specifickou konformaci (trigonální bipyramida s dvěma axiálními ligandy). Tyto proteiny jsou relativně malé (8-14 kDa) a fungují jako elektron transportní molekuly v anaerobní respiraci. Mezi takovéto proteiny patří např. plastocyanin nebo azurin.^{7, 13}

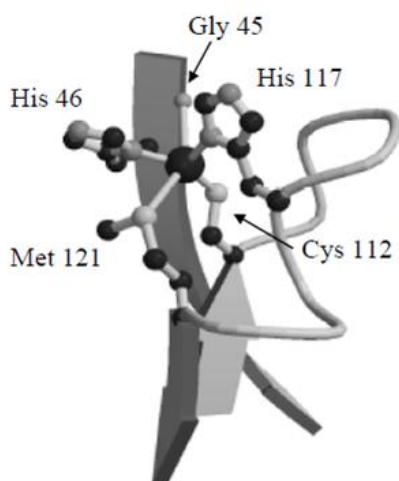
Cupredoxiny jsou tvořené pevným β -soudkem (z angl. β -barrel), který je tvořen dvěma tzv. „ β -sandwich“ obvykle složených z osmi vláken β -skládaného listu. Atom mědi a k němu vázaná rezidua se obvykle vyskytují uvnitř β -barrelu, zároveň ale jsou blízko k protein-proteinovému rozhraní, což znamená, že rezidua okolo atomu mědi mohou participovat na oligomerizaci proteinů.³



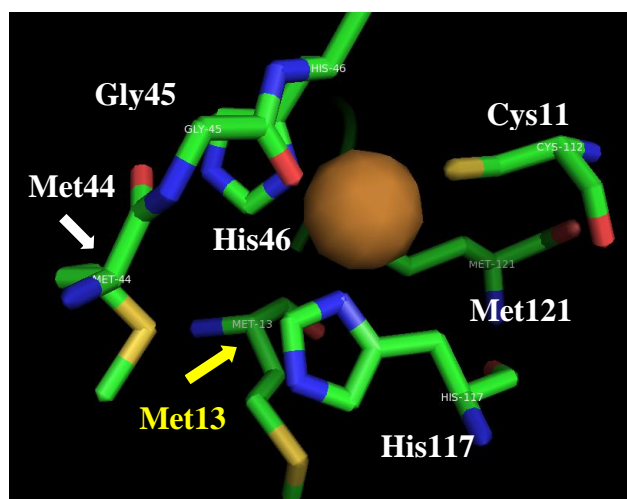
Obr. 6 3D model krystalové struktury azurinu 4AZU¹. Jednotlivé molekuly proteinu jsou barevně odlišeny. První snímek je pohled shora, druhý pohled ze strany. Šipky ukazují na atomy mědi. Snímky vytvořeny v programu PyMOL.

Obrázek 6 znázorňuje krystalovou strukturu azurinu 4AZU.¹ Protein v prezentované struktuře tvoří čtyři samostatné řetězce azurinu a azurin se tedy jeví velmi symetricky. Je ovšem otázkou, jaké skutečné protein-proteinové interakce vykazuje v roztoku. V roce 2013 byla publikována práce o azurinu, která se mimo elektron-transportní funkci azurinu zabývala také jeho oligomerizací v roztoku. V jejich experimentech byl použit azurin s navázaným rheniem v pozici 126 a tryptofanem v pozici 122, které s mědí tvoří komplex přenášející elektrony. Výsledky ukázaly, že azurin tvoří převážně monomery, dimery se tu ale také vyskytují. Lze tedy usoudit, že dimerizace azurinu v roztoku je možná a pravděpodobně na ní participují residua v okolí atomu mědi. Jednalo se ovšem o uměle vytvořený protein (např. vazba rhenia), a proto je třeba tato data ověřit na více fyziologickém modelu.¹⁶

Ve 3D struktuře azurinu tvoří kation mědi trigonální vazby se sírou z cysteinu v pozici 112 a s dusíky z imidazolového cyklu histidinů v pozicích 46 a 117. Také vytváří slabé interakce se sírou z methioninu v pozici 121 a s kyslíkem karbonylu glycinu v pozici 45 (viz obr. 7). Methionin v pozici 121 se od mědi vyskytuje ve vzdálenosti 2,6 – 3,3 Å, což je poměrně blízko, proto by přes něj mohl probíhat transport elektronu. Toto methioninové residuum se mimo jiné nachází v blízkosti protein-proteinového rozhraní. Dalšími blízkými residui jsou methioniny v pozicích 13 a 44 (v obr. 8 označené šipkami), které se oba nachází v blízkosti ekvatoriálního His117, proto je také možné, že přes ně transport elektronu probíhá. Tato práce se proto zaměří na vliv Met13, Met44 a Met121 na přenos elektronu, ale také bude zkoumat vliv všech methioninových residuí (13, 44, 56, 64, 109 a 121) na tvorbu dimeru či jiného oligomeru v roztoku.



Obr. 7 Model struktury azurinu kolem atomu mědi. Převezato z ⁷.



Obr. 8 Methioninová residua v blízkém okolí atomu mědi. Snímek vytvořen v programu PyMOL.

4 Cíle práce

Tato práce má dva hlavní cíle. Jelikož azurin ve své krystalové struktuře tvoří oligomerní struktury, které tuto oligomerizaci vykazují při experimentálním provedení metody LILBID MS¹³ i v roztoku, je jedním z hlavních cílů studie kvartérní strukturu azurinu ověřit. Druhým cílem je zjistit, zda foto-methioniny inkorporované do sekvence azurinu v pozicích 13, 44 a 121 mohou iniciovat či participovat na přenosu elektronu. Tyto dva cíle lze následovně rozdělit na několik dílčích cílů:

1. *In silico* analýza modelu 3D struktury azurinu (4AZU) s cílem nalezení potenciální funkce methioninových reziduí a jejich možné participace na protein-proteinových interakcích či na přenos elektronů.
2. Transformace auxotrofního kmene *Escherichia coli* expresním plazmidem azurinu s následnou optimalizací kultivace a exprese proteinu v minerálním médiu obsahujícím foto-methionin.
3. Purifikace azurinu s inkorporovaným foto-methioninem.
4. Provedení experimentů metody PIXL s následnou analýzou SDS-PAGE pro potvrzení či vyvrácení předpokládané oligomerizace azurinu.
5. Provedení experimentů metody PIXL s následnou UV-VIS spektroskopickou analýzou (přenos elektronu, fotoredukce mědi).

5 Materiály

5.1 Chemikálie

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Penta)

NaCl (Fluka)

KH_2PO_4 (Lachner)

MgSO_4 (Sigma Aldrich)

NH_4Cl (Lachema)

Ethylmorfolin (Sigma Aldrich)

Purifikovaný agar (Oxoid)

Glycerol (Lachema)

Coomassie Brilliant Blue – R250 (Sigma Aldrich)

Ampicilin, sodná sůl (Roth)

Akrylamid (Roth)

Tetramethylethyldiamin (Serva)

Trizma® base (Sigma Aldrich)

L-Methionin (Sigma Aldrich, Roth)

Thiamin hydrochlorid (Sigma Aldrich)

L-Lysin (Sigma Aldrich)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Penta)

$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Penta)

Bromfenolová modř (Roth)

L-Leucin (United States of America Biochemical Corporation)

L-Valin (United States of America Biochemical Corporation)

L- Threonin (United States of America Biochemical Corporation)

L-Isoleucin (Sigma Aldrich)

L-Fenylalanin (Lachema)

Foto-methionin (Thermo Fischer Scientific)

Lys-C endoproteasa (Roche)

Dodecylsulfát sodný (Sigma Aldrich)

Kyselina octová (Sigma Aldrich)

Acetonitril LC-MS grade (Merck)

Voda, LC-MS grade (Merck)

CaCl₂ (Fluka)

D-(+)-Glukosa (Sigma Aldrich)

Kyselina ethylendiamintetraoctová (Fluka)

ZnSO₄ · 7H₂O (Fluka)

MnCl₂ · 4H₂O (Lachema)

H₃BO₃ (Lachema)

Jodacetamid (Sigma Aldrich)

Isopropoxy-β-D-1-thiogalaktopyranosid (Roth)

Page Ruler Broad Range Unstained protein ladder (Thermo Fischer Scientific)

Tris(2-karboxyethyl)fosfinhydrochlorid (Sigma Aldrich)

kyselina α-kyanoskořicová (Bruker Daltonics)

KOH (Lachema Brno)

CHCl₃ (Chemapol Praha)

Fenylazid (Sigma Aldrich)

Kyselina bicinchoninová (Sigma Aldrich, BCA solution I)

MgCl₂ (Lachema)

Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)

5.2 Bakteriální kmeny a plazmidy

Escherichia coli B834 (Novagen®)

Plazmid pUG4 s geny kódující azurin a rezistenci na ampicilin⁹

5.3 Přístrojové vybavení

Souprava na elektroforézu Hoefer Scientific Instruments SE200

Pipety a špičky Gilson

Laboratorní váhy AND ER-120A

Předvážky Ohaus Scout™ Pro

Míchačka Variomag Mono Komet

Třepačka IKA® Rocker 2D basic

Spektrofotometr DeNovix DS-11+

Fotolyzér Oriol 60100 (100 W)

Sonikátor Elma® ECB

Prosvětlovací pult Hama® LP 555

Inkubátor Ultimate Dry bath Incubator

Stolní minicentrifuga Eppendorf F-45-12-11

Centrifuga Hettich Zentrifugen Universal 320 R

Vakuový koncentrátor Labconco CentriVap®micro IR

Inkubátor IKA® KS4000 iControl

QIAprep® Spin MiniprepKit

Gallenkamp economy incubator size 1

pH metr Jenway 3310, Jenway

MALDI-TOF Ultraflex III, Bruker Daltonics

6 Metody

6.1 Transformace buněk

Kompetentní buňky *E. coli* B834 uskladněné při teplotě -80°C byly rozmrazeny na ledu a následně k nim bylo přidáno 1,5 μl roztoku plazmidů nesoucích gen pro azurin ($c = 61,64 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $A_{260}:A_{280} = 1,84$). Buňky byly inkubovány na ledu dalších 10 minut. Poté byly přeneseny do inkubátoru Ultimate Dry Bath Incubator předehřátého na 42°C , kde byly bakterie pomocí teplotního šoku plazmidem transformovány. V inkubátoru byly ponechány 1 minutu, potom byly přeneseny na led. Po 5 minutách byl k bakteriím přidán 1 ml LB média předehřátého na 37°C a buňky byly inkubovány po dobu 40 minut při 37°C a 190 RPM v inkubátoru IKA® KS4000 iControl. Následně byly bakterie centrifugovány ve stolní minicentrifuze Eppendorf F-45-12-11 po dobu 2 minut při 4000 RPM. Ze supernatantu byl odebrán 1 ml, peleta byla resuspendována v jeho zbytku. Vzorke byly nanoseny na LB agarové plotny s ampicilinem (finální koncentrace 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a byly inkubovány přes noc za teploty 37°C v inkubátoru Gallenkamp Economy Incubator Size 1. Další den byly plotny vyhodnoceny a uloženy do 4°C .

6.2 Příprava minerálního média LM9

LM9 neboli limitní médium 9 je médium obsahující devět různých látek či skupin látek, někdy je označováno též jako minerální médium. Pro účinnou inkorporaci foto-methioninu médium neobsahuje přirozený methionin. Médium bylo připraveno vždy v objemu 50 ml smísením následujících složek a doplněním do objemu 50 ml sterilní vodou:

- 10 ml 5x M9 (42 mM Na_2HPO_4 , 22 mM KH_2PO_4 , 18 mM NH_4Cl , 8.6 mM NaCl)
- 1 ml 20% glukózy (w/v)
- 250 μl 1M MgSO_4
- 500 μl 1% vit. B1 (w/v)
- 5 ml 10x aminokyselin (L-Ile, L-Val, L-Leu 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, L-Lys, L-Phe, L-Thr 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)
- 50 μl 0,1M MgCl_2
- 50 μl roztoku minerálů (80.6 mM EDTA, 2.15 mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 92.5 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.56 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 13.5 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10.6 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.62 mM H_3BO_3 , pH 7.5)
- 50 μl 100 mg/ml ampicilin

6.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (nebo SDS-PAGE, z angl. sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) je metoda, která se používá k separaci proteinů. Dodecylsulfát sodný (SDS) vytvoří s proteiny záporně nabitý komplex, tím je denaturuje a proteiny při průchodu proudem gelem putují k anodě. Pohyblivost proteinů v gelu je dána velikostí molekuly - čím je molekula menší, tím má větší pohyblivost, tudíž vykáže delší dráhu v elektrickém poli a gelu.⁶

Z buněčné kultury bylo vždy odebráno 0,5 ml vzorku do mikrozkušavky. Vzorek byl centrifugován na stolní minicentrifuze Eppendorf F-45-12-11 po dobu dvou minut při 14500 RPM. Po skončení centrifugace byl pipetou odebrán supernatant a peleta byla resuspendována ve 40 μ l vody a 10 μ l 5x koncentrovaného SDS redukujícího pufru (10% SDS, 20% glycerol, 30 mM Tris - HCl pH 6,8, 0,25% bromfenolová modř, 10% 2-merkaptoethanol). Vzorek byl zamražen v -18°C , následně krátce povařen. Do každé jamky bylo nanášeno 20 μ l vzorku, do volných drah byl nanášen SDS redukující pufr a voda. Pro separaci byl použit 15% polyakrylamidový gel (návod) a jako standard Page Ruler Broad Range Unstained Protein Ladder. Elektroforéza probíhala při limitním proudu 20 mA/gel a limitem napětí 200 V a získané gely byly barveny a odbarvovány Coomassie Brilliant Blue – R250 (CBB-R250).

6.4 Izolace plazmidu

Použitý plazmid byl izolován pomocí sady QIAprep® Spin MiniprepKit podle návodu přiloženého výrobcem. Koncentrace plazmidu byla stanovena pomocí spektrofotometru DeNovix DS-11+ z odečtené hodnoty absorbance při vlnové délce 260 nm. Z poměru hodnot $A_{260}:A_{280}$ byla stanovena čistota preparátu.

6.5 Stanovení míry inkorporace na MS

Hmotnostní spektrometrie je metoda založená na rozdělení iontů podle jejich molekulové hmotnosti v elektrickém poli. Molekuly jsou ionizovány laserem v přítomnosti matrice (MALDI - ionizace laserem za přítomnosti matrice, z angl. matrix assisted laser ionisation/desorption) Ionizované molekuly jsou silným elektrickým napětím urychleny a vstupují do detektoru letu se stejným momentem hybnosti TOF (z angl. time of flight), ve kterém se pohybují určitou rychlostí podle své molekulové hmotnosti a náboje, kterou je detektor letu schopen určit (hodnota poměru molekulové hmotnosti a náboje). MALDI-TOF spektrometrie se hojně využívá k určení proteinů, peptidů i jiných látek.⁴

Z gelu byl proužek azurinu skalpelem vyříznut a nakrájen na malé kostičky o objemu cca. 1 mm³. Tyto kostičky byly přemístěny do mikrozkušavky a odbarveny 100 μ l odbarvovacího roztoku (50 mM ethylmorfolin pH 8,1, 50% acetonitril (v/v)). Směs byla ponořena do sonikační lázně do odbarvení gelu.

Po odbarvení byl roztok odebrán a ke kostičkám gelu bylo přidáno 100 μ l acetonitrilu a směs byla 5 minut ponechána v sonikační lázni. Roztok byl odebrán, ke kostičkám gelu bylo přidáno 100 μ l vody a směs byla ponořena na 5 minut do sonikační lázně. Tento postup byl opakován dvakrát. Nakonec bylo ke kostičkám gelu přidáno 100 μ l vody a 100 μ l acetonitrilu a směs byla ponechána 5 minut v sonikační lázni, poté byl roztok odebrán.

Gel byl po odbarvení a promytí vysoušen na vakuovém rotačním koncentrátoru Labconco CentriVap micro IR po dobu 5 minut. Poté bylo do gelu přidáno 14 μ l Lys-C endoproteasy (50 ng/ μ l) rozpuštěné v 50 mM ethylmorfolinu pH 8,1 a 10% acetonitrilu (v/v). Směs byla inkubována 16 hodin při 37°C.

K 14 μ l směsi bylo přidáno 7 μ l acetonitrilu a 0,5% kyseliny trifluoroctové a směs byla sonikována v sonikační lázni po dobu 20 minut. Z této směsi bylo nanášeno 0,5 μ l na MALDI terčík. Po zaschnutí byla směs převrstvena 0,5 μ l MALDI matrice (kyselina α -kyanoskořicová 5 mg/ml rozpuštěná v 50% acetonitrilu (v/v) a 0,1 kyseliny trifluoroctové (v/v)). Hmotnostní spektra byla změřena systémem MALDI-TOF/TOF Ultra FLEX III doc. RNDr. Miroslavem Šulcem, PhD. Inkorporace pMet byla vypočtena z průměru intenzit signálů m/z peptidu s Met a s pMet.

6.6 Exprese

Pro kultivaci a expresi *E.coli* byly testovány čtyři podmínky – 0, 1, 2 a 3.

V podmínkách 0, 1 a 2 byly vybrané transformované kolonie z agarových ploten zaočkovány a kultivovány v 25 ml LB média s přidáním ampicilinem při 37°C a 190 RPM. Optická hustota suspenze byla pravidelně měřena, a to na spektrofotometru DeNovix DS-11+. Po dosažení OD_{600} cca. 0,6 byla suspenze centrifugována v centrifuze Hettich Zentrifugen Universal, úhlový rotor 1620a při 3000 RPM a 6°C, supernatant byl odebrán a peleta byla resuspendována v pufovaném fyziologickém roztoku fosfátovým puforem (PBS). Tento krok byl opakován dvakrát. Po poslední centrifugaci byl supernatant odebrán a peleta resuspendována v LM9 médiu. Následující postup se lišil podle podmínek:

V podmínkách 0 byla peleta po opláchnutí PBS resuspendována v LM9 médiu s přidáním 1 ml roztoku pMet (koncentrace 1,25 mg/ml) a ponechána 20 minut při 30°C. Poté byl do suspenze přidán isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG) do finální koncentrace 0,4 mM, který působí jako indukční faktor exprese. Bakterie byly kultivovány při 30°C a 190 RPM s postupným časovým odběrem vzorků a výsledným sklizením buněk po 20 hodinách.

V podmínkách 1 byly bakterie resuspendované v LM9 médiu inkubovány bez přítomnosti Met 20 hodin při 30°C. Po 20 hodinách „hladovění“ byl do suspenze přidán 1 ml roztoku pMet (koncentrace 1,25 mg/ml) a IPTG (finální koncentrace 0,4 mM) a bakterie byly kultivovány dalších 20 hodin při 30°C a 190 RPM.

V podmínkách 2 byly buňky resuspendované v LM9 médiu uloženy na hodinu do 4°C. Poté k nim byl přidán 1 ml roztoku pMet (1,25 mg/ml) a kultura byla ponechána 20 minut při 30°C.

Nakonec bylo do suspenze přidáno IPTG (finální koncentrace 0,4 mM) a buňky byly inkubovány 20 hodin při 30°C a 190 RPM.

Podmínky 3 se lišily od podmínek 1 tím, že růst bakterií do hodnoty OD₆₀₀ přibližně 0,6 probíhal po celou dobu v LM9 médiu s přidavkem Met (1,25 mg/ml). Pak následovalo promytí buněk PBS a „hladovění“ (bez přítomnosti Met) po dobu 20 hodin při 30°C. Poté byl do suspenze přidán 1 ml pMet (1,25 mg/ml) a buňky byly inkubovány po dobu 20 minut při 30°C. Nakonec byla exprese azurinu započata přidavkem IPTG (finální koncentrace 0,4 mM) a bakterie byly kultivovány dalších 20 hodin při teplotě 30°C a 190 RPM.

Před sklizní byly buňky centrifugovány v centrifuze Hettich Zentrifugen Universal 320R při 3000 RPM a 6°C. Supernatant byl odebrán a peleta byla promyta roztokem 50mM Tris-Cl pH 8,1, 1mM EDTA bez nebo s přidanou 20% sacharosou (w/v). Po promytí byla peleta uskladněna v teplotě -20°C.

6.6.1 Růstová křivka

Kultivace bakterií pro růstové křivky probíhala ve dvou podmínkách, jednou probíhala kultivace v LB médiu, podruhé v LM9 médiu. Absorbance ve vzorcích buněčné kultury byla stanovena při vlnové délce 600 nm po naředění médii tak, aby A₆₀₀ nepřesáhla 1,0.

Podmínky:

- a. Růst bakterií do určité OD₆₀₀, poté přidavek IPTG.
- b. Růst bakterií do určité OD₆₀₀, poté promytí PBS a přidavek pMet a IPTG.

6.7 Purifikace

Pelety buněk ze sedmi expresních experimentů (50 ml média v 500 ml Erlenmayerově baňce) uskladněné při teplotě -20°C byly volně rozmrazeny, poté byly resuspendovány v 9 ml ledově studeného 500 μM roztoku MgCl₂. Suspenze byla ponechána cca. 15 minut na ledu, poté byla znovu uložena do -20°C. Po uběhnutí cca. 15 minut byla suspenze rozmrazena v sonikační lázni. Směs byla přenesena z 13 ml do 50 ml falkony a byl k ní přidán 1 ml roztoku směsi inhibitorů proteas (1 tableta rozpuštěná v 1 ml 500 μM MgCl₂). Suspenze byla centrifugována při 9000 RPM a 4°C po dobu 20 minut na centrifuze Hettich Zentrifugen Universal 320R, rotor 1620a. Peleta byla v supernatantu resuspendována a směs byla sonikována na ledu čtyřikrát po dobu 20 sekund s minutovou pauzou mezi jednotlivými úseky (puls 0,1 s, amplituda 55%), celkově na cyklus přibližně hodnota E = 1,6 kJ. Po sonikaci byla suspenze centrifugována na centrifuze Hettich Zentrifugen Universal 320R, rotor 1620a při 4°C. Ze supernatantu byl odebrán vzorek (p01) a byla změřena jeho absorbance na spektrofotometru DeNovix DS-11+. Tento supernatant byl spojen s předchozím (prvním) supernatantem. Peleta byla resuspendována ve 4 ml 500 μM MgCl₂ a byla sonikována na ledu za již popsaných podmínek. Suspenze byla centrifugována po dobu 10 minut. Z pelety byl odebrán vzorek (p02) a byla resuspendována a směs byla sonikována za již popsaných podmínek. Směs byla centrifugována, supernatant byl charakterizován (vzorek p03) a spojen

s předchozími supernatanty. Z pelety byl odebrán vzorek (p04) a peleta byla zamrazena a uskladněna při teplotě -20°C .

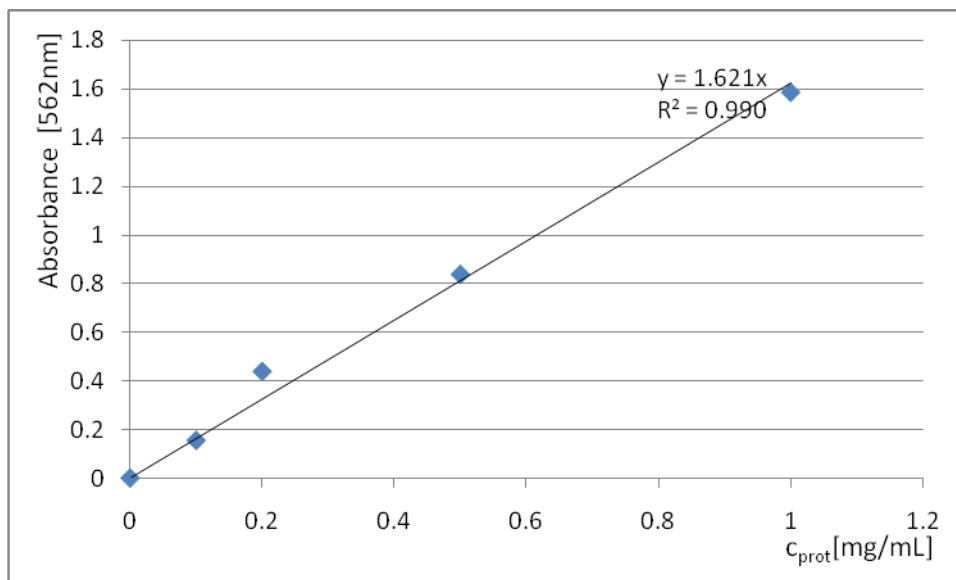
K spojeným supernatantům bylo na ledu za stálého míchání na míchačce Variomag Mono Komet přikapáváno 0,5 ml 100 mM CuSO_4 v průběhu 5 minut. Přibližně 5 minut byla směs míchána, poté bylo přidáno po kapkách dalších 200 μl 100 mM CuSO_4 . Ze směsi byl vždy odebrán vzorek (měření UV-VIS). Během dalších cca. 6 minut bylo do směsi přidáno 2,5 ml 500 mM octanu amonného a 50 μl kyseliny octové bylo upraveno pH směsi na 4,5. Při míchání směsi po dobu 20 minut došlo ke kyselé precipitaci proteinů. Poté byla směs centrifugována při 4°C a 9000 RPM po dobu 20 minut na centrifuze Hettich Zentrifugen Universal 320R, rotor 1620a. Z pelety (precipitátu) byl odebrán vzorek pro SDS-PAGE (p06). Supernatant byl odebrán (vzorek p05, charakterizace UV-VIS) a bylo přikapáváno 200 μl 100 mM CuSO_4 (odebrán další vzorek - měření UV-VIS). Směs byla inkubována přes noc v inkubátoru Gallenkamp economy incubator size 1 při teplotě 35°C . Poté proběhla centrifugace precipitátu na centrifuze Hettich Zentrifugen Universal 320R, rotor 1620a, 9000 RPM a 4°C . Peleta byla resuspendována ve vodě a byl z ní odebrán vzorek (p08, měření UV-VIS), ze supernatantu byl odebrán vzorek (p09, měření UV-VIS a SDS-PAGE) a byl připraven na dialýzu. Roztok byl dialyzován 2x po dvou hodinách proti 800 ml 100 mM roztoku octanu amonného pH 4,5. Po skončení dialýzy byla směs centrifugována na centrifuze Hettich Zentrifugen Universal 320R rotor 1620a při 4°C a 9000 RPM 20 minut. Ze supernatantu byl odebrán vzorek (měření UV-VIS) a byl nanesen na připravenou chromatografickou kolonu SP Sepharose Fast-Flow (8 ml nosiče, průměr 0,12 x 7 cm, ekvilibrace 10 mM octanem sodným pH 4,5). Po nanesení vzorku supernatantu na kolonu byla nejprve promyta 35 ml ekvilibračního roztoku (10 mM octan sodný) pro odmytí přebytečného CuSO_4 a jiných kontaminujících látek (vzorek p10, měření UV-VIS). Poté byl vzorek promyt 15 ml 20 mM octanem sodným. Následovalo promytí 10 ml 40 mM octanu sodného. K eluci azurinu byl použit 100 mM octan sodný a frakce byly sbírány po 1,5 ml. U každé frakce bylo na spektrofotometru DeNovix DS-11+ měřeno spektrum UV-VIS a vybrané vzorky byly připraveny pro SDS-PAGE (20 μl vzorku + 5 μl SDS redukujícího pufu).

6.8 Charakterizace vzorků

6.8.1 Stanovení koncentrace proteinu

Pro charakterizaci vzorků bylo připraveno činidlo smísením BCA (kyselina bicinchoninová, BCA Solution I – Sigma Aldrich) a 4% roztoku CuSO_4 v poměru $\text{BCA}:\text{CuSO}_4 = 49:1$. Do 95 μl takto připraveného činidla bylo přidáno 5 μl vzorku a všechny vzorky byly inkubovány v inkubátoru Gallenkamp economy incubator size 1 po dobu 1 hodiny při 37°C . S ohledem na dynamický rozsah použité metody, bylo nutné některé vzorky před stanovením ředit vodou (Merck). Ředění je uvedeno u jednotlivých výsledků.

Pro určení koncentrace azurinu byla připravena kalibrační přímka s hovězím sérovým albuminem (BSA, z angl. bovine serum albumine). Do 95 μ l BCA činidla bylo přidáno 5 μ l BSA o různých koncentracích, a to 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml a 1 mg/ml.



Obr. 9 Kalibrační křivka stanovení koncentrace proteinu (BSA).

Po inkubaci všech vzorků byla určena jejich absorbance při 562 nm na spektrofotometru DeNovix DS-11+ a porovnáním s kalibrační přímkou BSA byla určena koncentrace azurinu.

6.8.2 UV-VIS spektrometrie

UV-VIS spektrometrie je metoda založená na identifikaci látek pomocí jejich absorpčního spektra. Každá látka absorbuje světlo při jiné vlnové délce v závislosti na její barvě či struktuře. Například DNA absorbuje při vlnové délce 260 nm, proteiny při 280 nm a modré látky obsahující měďnatý kation při 630 nm.

Pro charakterizaci vzorků bylo měřeno UV-VIS spektrum v rozsahu vlnových délek 250-750 nm, případně stanovena hodnota absorbance při dané vlnové délce (např. pro stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA byla měřena absorbance při 562 nm, BCA totiž tvoří s proteiny fialové komplexy, které absorbují světlo právě při 562 nm). Na mikroobjemový čip (délka dráhy 0,1 mm) bylo nanášeno 1 μ l vzorku. Měření probíhalo na spektrofotometru DeNovix DS-11+.

6.9 Fotolýza

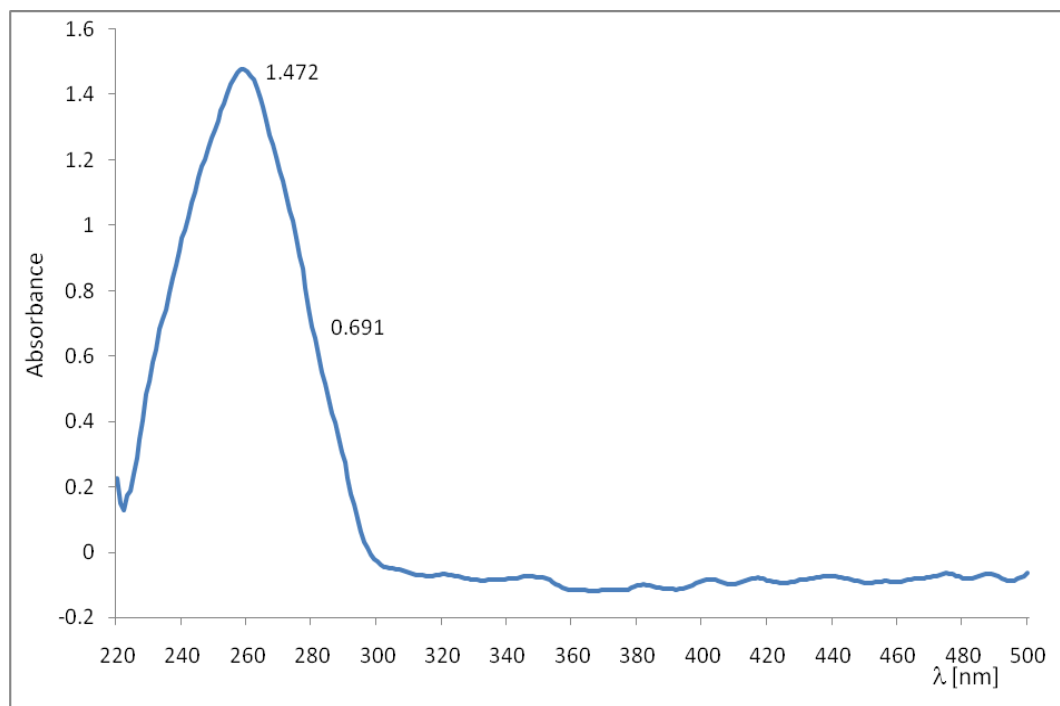
Bylo připraveno celkem pět vzorků na fotolýzu. V prvních třech vzorcích bylo smícháno 10 μ l 50 mM Tris-Cl pH 7,4 pufru, 4 μ l vzorku azurinu a 6 μ l vody. První vzorek (1) nebyl vystaven fotolýze, druhý (2) byl vystaven fotolýze (fotolýzér Oriol, 100W, 350nm) po dobu 3 minut a poslední (3) po dobu 1 minuty. V dalších dvou vzorcích bylo smícháno 10 μ l

50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl pH 7,4 pufru, 4 μ l vzorku azurinu a 6 μ l vody. Vzorek (4) byl vystaven fotolýze, po dobu 3 minut a poslední (5) po dobu 1 minuty. Fotolyzér byl spuštěn cca. 0,5 hodiny s chlazením parabolického fokusačního zrcadla a kyvetového prostoru před začátkem fotolýzy. Nakonec byly všechny vzorky připraveny pro SDS-PAGE přidavkem 5 μ l 5x koncentrovaného SDS redukujícího pufru (10% SDS, 20% glycerol, 30 mM Tris-Cl pH 6,8, 0,25% bromfenolová modř, 10% 2-merkaptoethanol) s následnou 5 minutovou inkubací při teplotě 100°C.

7 Výsledky a diskuze

7.1 Izolace plazmidu

Plazmid byl z bakterií *E. coli* úspěšně izolován a z odečtené hodnoty absorbance při 260 nm (1,472) byla určena jeho koncentrace, která činí 73,6 ng/μl. Z poměru absorbancí $A_{260}:A_{280}$ (1,472/0,691) byla určena čistota izolovaného plazmidu, kdy poměr byl roven 2,13 a izolovaný preparát má velice nízký obsah kontaminujících proteinů. Na obrázku 10 je znázorněno absorpční spektrum izolovaného plazmidu využitě pro stanovení koncentrace a čistoty.



Obr. 10 Absorpční spektrum izolované DNA expresního plazmidu s genem azurinu.

7.2 Stanovení míry inkorporace na MS

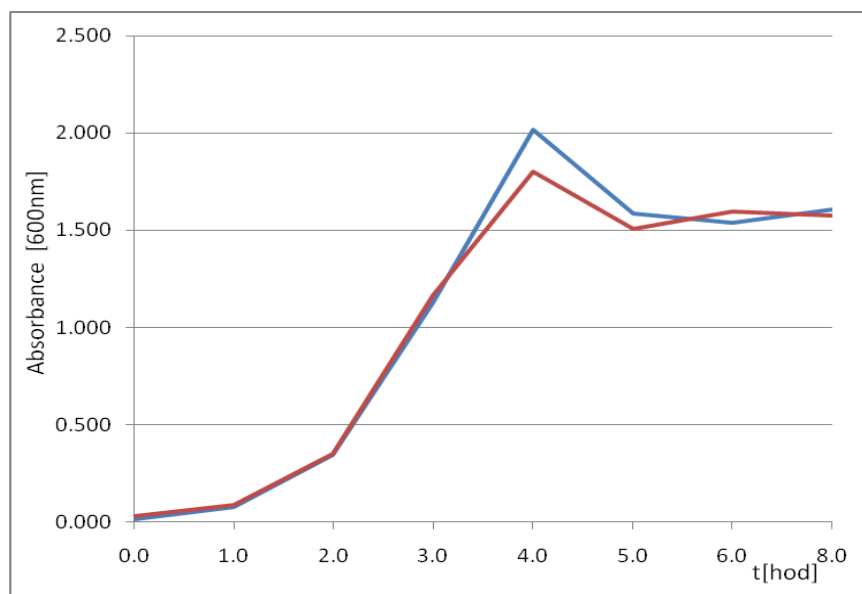
Míra inkorporace pMet byla stanovena při každých podmínkách exprese. V podmínkách 0 činila 30%, v podmínkách 1 se pohybovala okolo 80-90%, v podmínkách 2 byla cca. 30-40% a nejvyšší byla inkorporace v podmínkách 3, kdy činila 95%. Z těchto výsledků se dá předpokládat, že pMet je do struktury inkorporován snáze, když jsou buňky vystaveny „hladovění“, tedy 20 hodin bez přísunu Met či pMet.

7.3 Exprese

Kompetentní buňky *E. coli* B834 byly úspěšně transformovány plazmidem pUG4 kódující gen pro azurin a také rezistenci na antibiotikum ampicilin. Na kontrolních miskách nedošlo k nárůstu žádných kontaminujících kolonií.

7.3.1 Růstová křivka

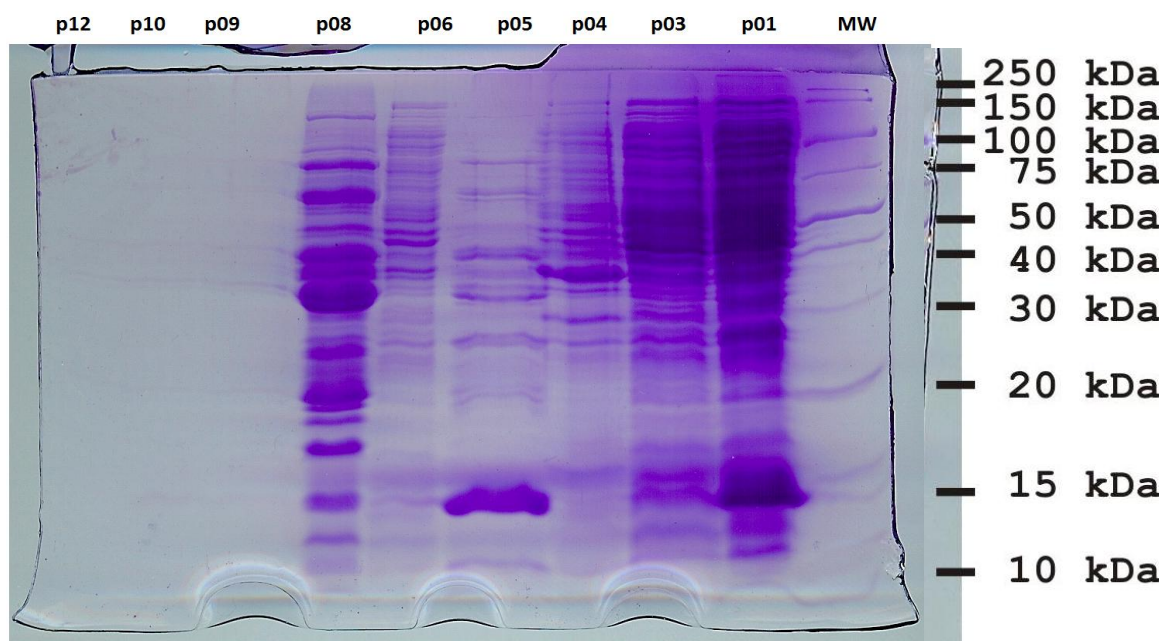
Průběhy kultivací bakterií *E. coli* B834 transformované plazmidem pUG4 nesoucí gen pro azurin byl zanesen do růstových křivek. Následující graf (obr. 10) znázorňuje růstové křivky kultivace *E. coli* v LM9 médiu v podmínkách a (růst do OD₆₀₀ cca 1,0, poté přidavek IPTG do finální koncentrace 0,4 mM) a b (růst do OD₆₀₀ cca 1,0, promytí 3x PBS, přidavek pMet a IPTG do finální koncentrace 0,4 mM). Z grafu je vidět, že růstové křivky při obou podmínkách vykazují podobný průběh. Podobně tomu bylo i při kultivaci buněk v LB médiu.



Obr. 11 Růstové křivky kultivace *E. coli* B834 s plazmidem kódujícím azurin v LM9 médiu: pod v podmínky a (modrá linie): růst do OD₆₀₀ cca 1,0, poté přidavek IPTG (finální koncentrace 0,4 mM), podmínky b (červená linie): růst do OD₆₀₀ cca 1,0, promytí 3x PBS, přidavek pMet a IPTG (finální koncentrace 0,4 mM).

7.4 Purifikace

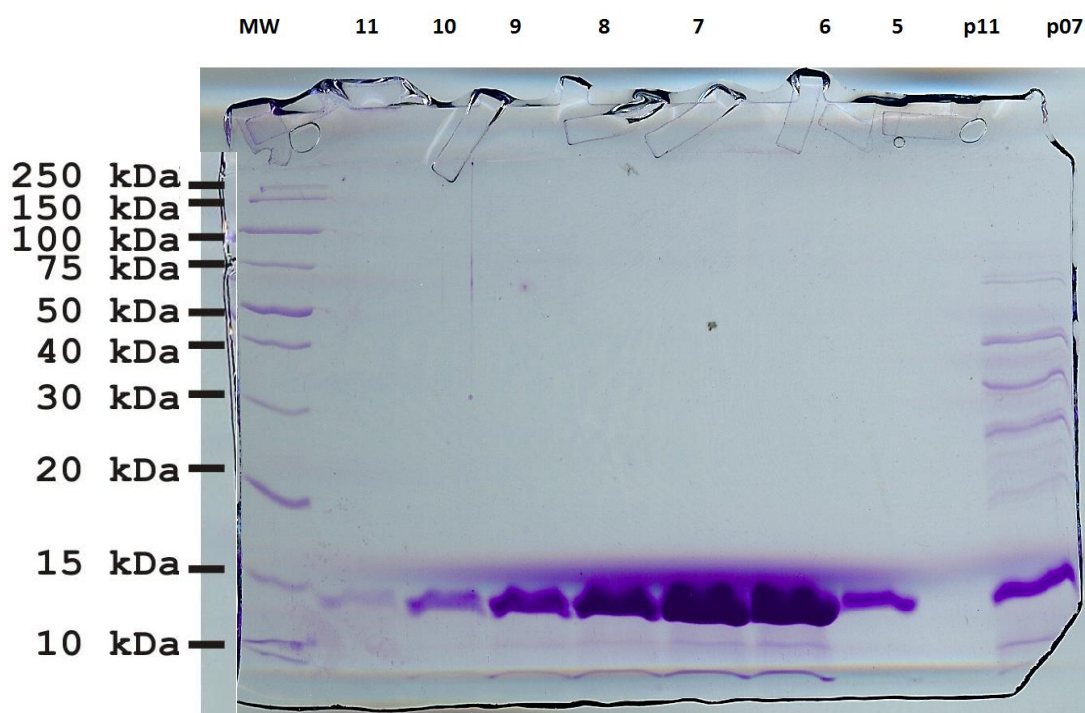
Pelety uskladněné při teplotě -20°C byly volně rozmrazeny, poté byly resuspendovány v hypertonickém prostředí $500\ \mu\text{M}$ roztoku MgCl_2 , díky čemuž měla většina buněk popraskat. Suspenze byla ponechána 5 minut na ledu, poté byla znovu uložena do -20°C pro účinnější rozbití buněk krystalky ledu. Suspenze byla poté rozmrazena v sonikační lázni a byla k ní přidána jedna tableta směsi inhibitorů proteas pro ochranu proteinů před naštěpením. Po centrifugaci jsme však zjistili, že vzniklá peleta byla příliš velká, proto byla peleta v supernatantu resuspendována a směs byla sonikována na ledu sonikační probou. Velikost pelety je pravděpodobně dána tím, že nedošlo k buněčné lýzi. Tu lze zvýšit inkubací v Tris/sacharosa/EDTA pufru, který byl následně k resuspendaci sklizených buněk použitý. Sonikaci jsme pro zvýšení výtěžku lýze buněk provedli několikrát a získané supernatanty byly spojeny. Na obrázku 12 je znázorněn gel (15% SDS-PAGE) ze vzorků získaných při purifikaci. Vzorky p01 a p03 jsou supernatanty, které byly spojeny, vzorek p04 je poslední peleta (pro SDS-PAGE 10x ředěná). V oblasti 15 kDa se u vzorků p01 a p03 nachází azurin, v peletě p04 se již skoro nevyskytuje. Z toho vyplývá, že se nám podařilo získat veškerý možný azurin z buněčné směsi.



Obr. 12 SDS-PAGE gel ze vzorků z purifikace.

Následně byla provedena kyselá precipitace octanem sodným, při které došlo k vysrážení kontaminujících proteinů. Na gelu na obrázku 12 se nachází vzorek z precipitátu p06 (vzorek pro SDS-PAGE ředěný 10x) a vzorek ze supernatantu p05. Vzorek p05 vykazuje velké množství azurinu, na vzorku p06 je vidět, že se vysráželo mnoho kontaminujících látek. Supernatant byl poté inkubován přes noc při 35°C. Po inkubaci se vysrážely další kontaminující látky, ze kterých byl odebrán vzorek p08 (pro SDS-PAGE 2x ředěný). Z gelu je zřejmé, že v precipitátu se nachází nejen kontaminující proteiny, ale také malé množství azurinu, čímž došlo k dalšímu načištění preparátu azurinu. Vzorky p09 a p10 (frakce o objemu 5 ml) byly odebrány při nanášení vzorku p07 na kolonu SP Sepharosy (p09~ 10-15ml, p10 ~ 15-20 ml). Je pravděpodobné, že byly vymyty některé nečistoty, ale vzhledem k jejich velkému zředění nejsou na gelu viditelné. Vzorek p12 byl odebrán při promytí kolony 20 mM octanem sodným a podobně jako v předchozím případě, nečistoty byly pravděpodobně vymyty, ovšem nejsou na gelu viditelné pro vysoké zředění směsi (celkový objem 15 ml).

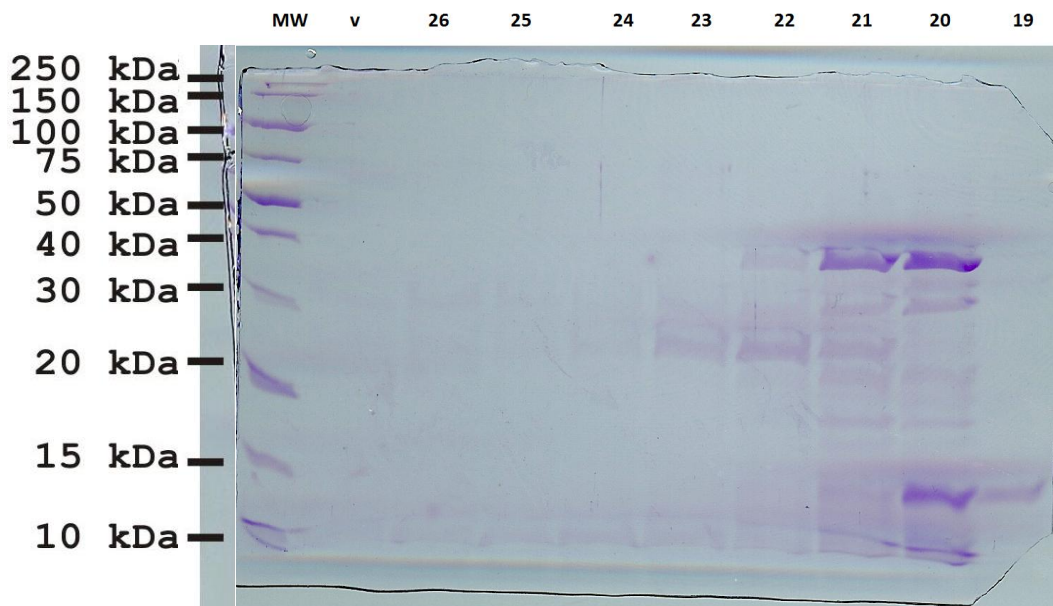
Následující gely na obrázcích 13 a 14 ukazují průběh chromatografie. Na gelu (obr. 13) je vzorek p07 supernatant získaný po inkubaci směsi, který byl nanesen na kolonu SP Sepharosy. Z gelu je vidět, že preparát skutečně obsahuje mnoho azurinu, avšak obsahuje také mnoho kontaminujících složek. Vzorek p11 (celkový objem 10 ml) byl odebrán při promytí kolony 10 mM octanem sodným. Stejně jako u vzorků p09, p10 a p12, na gelu nejsou vymyté látky viditelné pro vysoké zředění směsi. Vzorky 5 až 11 (velikost frakce 1,5 ml) zachycují postupnou eluci azurinu 100 mM roztokem octanu sodného. Z gelu je patrné, že kromě koncentrovaného pruhu azurinu se sice ve směsi vyskytují i další složky, i tak při porovnání množství azurinu a kontaminujících složek to nemá na čistotu finálního preparátu velký vliv.



Obr. 13 SDS-PAGE gel ze vzorků purifikace.

Další gel (obr. 14) znázorňuje frakce z chromatografie, které byly odebrány při eluci 500 mM octanem sodným. Ve frakcích 19, 20 a 21 (objem frakce 1,5 ml) se stále eluuje malé množství azurinu, avšak mnohem více se vyplavuje nečistot (proužky o MW 20-50 kDa). Ve zbylých frakcích už není vidět rozdělení látek, pravděpodobně kvůli míře zředění.

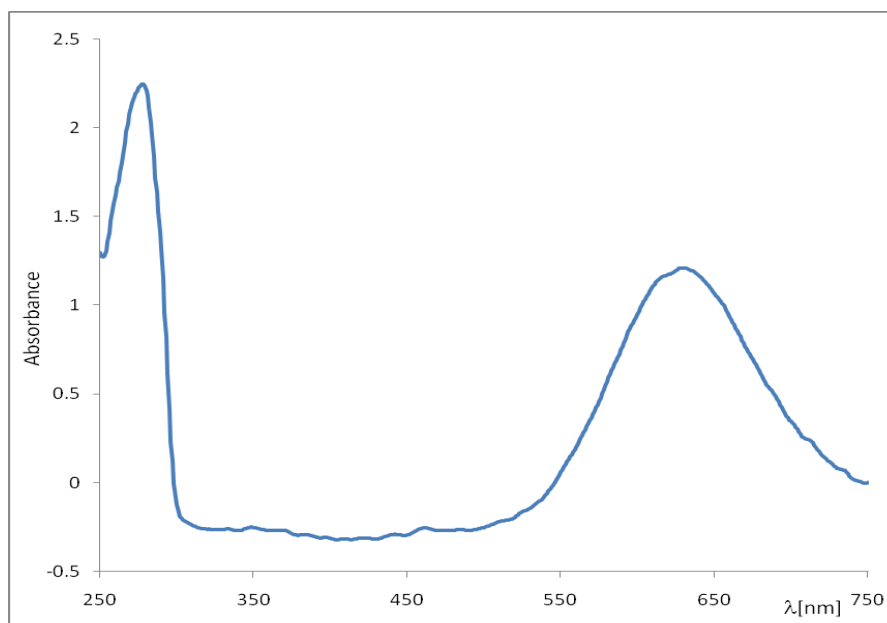
Při chromatografii bylo pravidelně měřeno absorpční spektrum frakcí při 280 nm a 630 nm. Poměr $A_{630}:A_{280}$ by se u poměrně čistého preparátu azurinu měl pohybovat okolo 0,6. Při eluci azurinu tomu tak v získaných frakcích bylo, tedy získané vzorky azurinu jsou velmi čisté a neobsahují mnoho nečistot.



Obr. 14 SDS-PAGE gel ze vzorků z purifikace.

7.5 Charakterizace vzorků

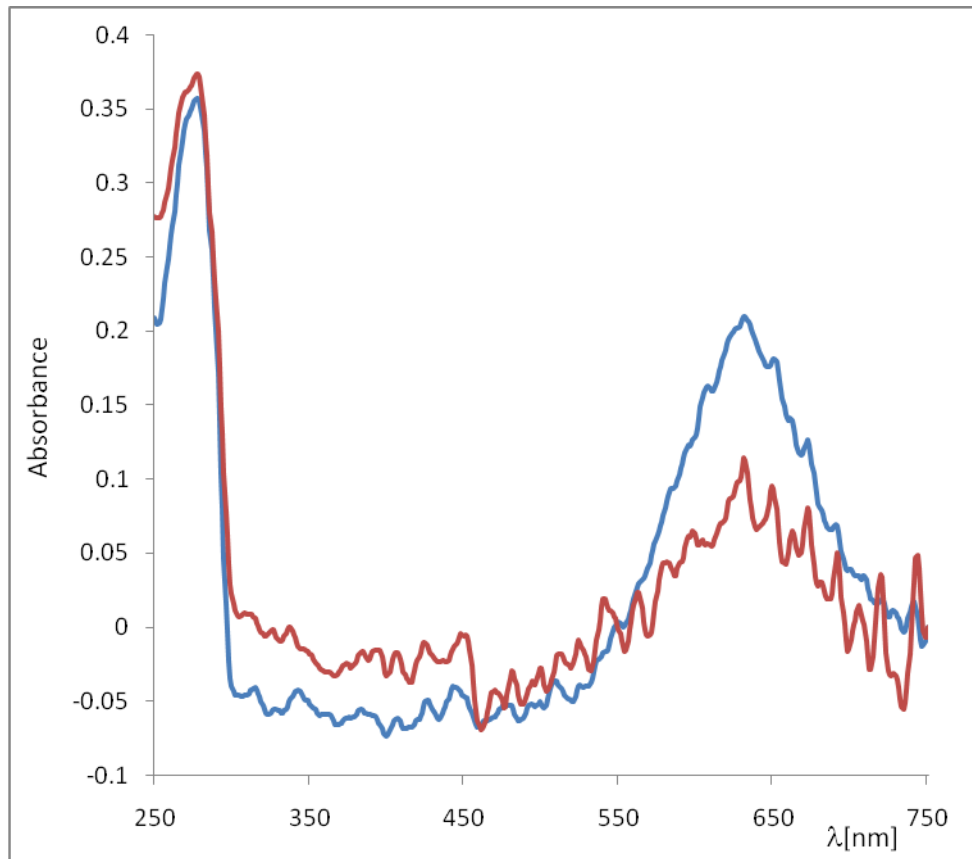
Finální preparát byl připraven spojením frakcí 5 až 11, které, jak znázorňuje gel z SDS-PAGE analýzy na obrázku 12, obsahují téměř čistý azurin. Spojené frakce byly úspěšně zahuštěny pomocí koncentrátoru a po dialýze byl vzorek charakterizován. Bylo změřeno absorpční spektrum preparátu, které znázorňuje obrázek 15, a z něho byly stanoveny hodnoty A_{280} (2,206) a A_{630} (1,209). Výsledná hodnota poměru $A_{630}:A_{280}$ byla 0,55 a značí vysoce purifikovaný protein. Stanovená hodnota koncentrace proteinu finálního preparátu pomocí metody BCA je 1,67 mg/ml. Finální preparát byl ředěn 10x pro stanovení koncentrace proteinu a hodnota A_{562} byla 0,270.



Obr. 15 Absorpční spektrum finálního preparátu azurinu.

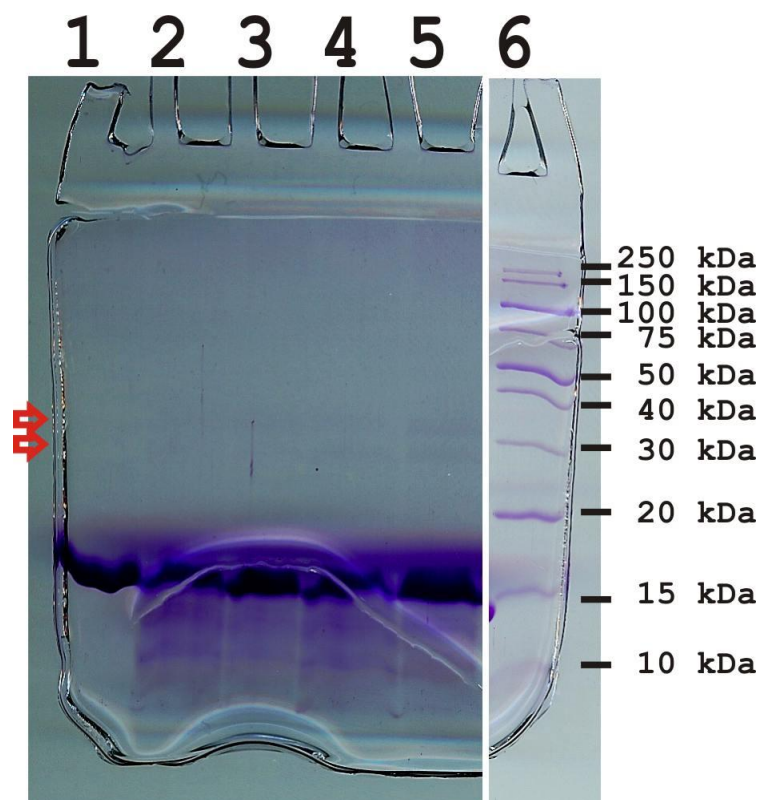
7.6 Fotolýza

Po přípravě vzorků proběhla fotolýza. Některé fotolyzované vzorky azurinu se z modré odbarvily, proto bylo předpokládáno, že přenos elektronu přes Met13, Met44 nebo Met121 proběhl. Následující graf (obr. 16) potvrzuje tento předpoklad, kdy oproti vzorku, který neprošel fotolýzou, poklesla specificky hodnota A_{630} u vzorku fotolyzovaného, aniž by došlo ke změně hodnoty A_{280} .



Obr. 16 Absorpční spektra vzorků azurinu před fotolýzou (modrá křivka) a po 3 minutách fotolýzy (fotolyzér Oriol, 100W, 350 nm).

Po fotolýze byla provedena také SDS-PAGE pro analýzu tvorby případných dimerů/oligomerů. Na obrázku 17 je výsledný gel, kdy vzorek 1 je kontrolní (neprošel fotolýzou), vzorky 2 a 4 byly fotolyzované 3 minuty a vzorky 3 a 5 byly fotolyzované 1 minutu. Fotolýza vzorků 4 a 5 probíhala za přítomnosti NaCl. Na gelu je viditelný pruh monomerního azurinu s hodnotou MW 15 kDa. V oblastech 27 a 30 kDa (označeno šipkami) se ale vyskytují dva proteinové proužky s odpovídající hodnotou MW dimerní molekule azurinu. V obou byly pomocí MS určeny peptidy azurinu (analýza provedena doc. RNDr. Miroslavem Šulcem, PhD.). Azurin tedy může tvořit dimery, jde však o slabou transientní interakci.



Obr. 17 SDS-PAGE gel ze vzorků po fotolýze. Vzorek 6 je standard (MW).

8 Závěry

Tato práce se zabývala vlastními protein-proteinovými interakcemi metaloproteinů azurinu a jeho elektron-transportní funkcí. V teoretické části se zaměřila na obecnou charakteristiku proteinů a věnovala pozornost cupredoxinům a technologii světlem iniciovaného chemického zesílení (PIXL), která byla pro experimenty využita.

V experimentální části byl azurin s inkorporovaným strukturním analogem methioninu úspěšně exprimován v auxotrofním kmeni bakterií *E.coli* s mírou inkorporace podle podmínek exprese. Průběh kultivace byl sledován a všechny zaznamenané růstové křivky vykazovaly podobný průběh. Po purifikaci azurinu s inkorporovaným foto-methioninem byla provedena jeho UV-VIS charakterizace. Následné provedení foto-síťovacích experimentů potvrdilo, že methioninová residua částečně participují v roztoku na tvorbě dimerních struktur azurinu, tudíž azurin v malé míře tvořil kovalentní dimery a jedná se pravděpodobně o transientní interakci. Toto zjištění je ve shodě nejen s experimenty LILBID MS¹³, ale i s popsanou 3D strukturou v modelu 4AZU¹. Také bylo zjištěno, že methioniny v blízkosti mědi nejspíše participují na přenosu elektronů v azurinu, a to díky změně UV-VIS spektra po fotolýze.

Cílem do budoucna je experimentálně ověřit vliv leucinových residuí vyskytujících se na protein-proteinové hranici na kvartérní strukturu azurinu pomocí technologie PIXL s využitím foto-leucinu. Další studium se zaměří na prohloubení našich znalostí o vlivu participaci methioninových residuí na přenosu elektronu napříč proteinem s pomocí kombinace technologií PIXL, MS, „site-directed“ mutagenesis a dalších experimentálních metod.

9 Použitá literatura

1. 4AZU CRYSTAL STRUCTURE ANALYSIS OF OXIDIZED PSEUDOMONAS AERUGINOSA AZURIN AT PH 5.5 AND PH 9.0. A PH-INDUCED CONFORMATIONAL TRANSITION INVOLVES A PEPTIDE BOND FLIP. RCSB PDB [online]. 1994 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=4AZU>
2. Bílkovina. In: Wikipedie: otevřená encyklopedie [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/B%C3%ADlkovina>
3. DENNISON, Christopher. The role of ligand-containing loops at copper sites in proteins. *Nat. Prod. Rep* [online]. 2008, 25(1), 15-24 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1039/B707987G. ISSN 0265-0568. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B707987G>
4. HAVLIŠ, Jan. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. *FEBS Letters* [online]. 1999, 78(1999/8), 448 [cit. 2017-03-26]. ISSN 00145793. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/hmotnostni-spektrometrie-maldi-tof>
5. Intro to gene expression (central dogma) (article). Khan Academy [online]. [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma/central-dogma-transcription/a/intro-to-gene-expression-central-dogma>
6. Introduction to SDS-PAGE. Experimental biosciences laboratory resources [online]. 2012 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/gellab2.html>
7. JEUKEN, Lars J.C., Marcellus UBBINK, Johannes H. BITTER, Pieter VAN VLIET, Wolfram MEYER-KLAUCKE a Gerard W. CANTERS. The structural role of the copper-coordinating and surface-exposed histidine residue in the blue copper protein azurin. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2000, 299(3), 737-755 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1006/jmbi.2000.3754. ISSN 00222836. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283600937549>
8. KALKHOF, Stefan, Christian IHLING, Karl Mechtler a Andrea SINZ. Chemical Cross-Linking and High-Performance Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry for Protein Interaction Analysis: Application to a Calmodulin/Target Peptide Complex. *Analytical Chemistry*. 2005, 77(2), 495-503 [cit. 2017-03-28] DOI:10.1021/ac0487294.

9. KARLSSON, B.Göran, Torbjörn PASCHER, Margareta NORDLING, Rolf H.A. ARVIDSSON a Lennart G. LUNDBERG. Expression of the blue copper protein azurin from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* [online]. 1989, 246(1-2), 211-217 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1016/0014-5793(89)80285-6. ISSN 00145793. Dostupné z: [http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793\(89\)80285-6](http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793(89)80285-6)
10. KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Color atlas of biochemistry* [online]. 2nd ed., rev. and enl. New York: Thieme, c2005 [cit. 2017-03-26]. Thieme flexibook. ISBN 31-310-0372-3.
11. MAREČEK, Aleš a Jaroslav HONZA. *Chemie pro čtyřletá gymnázia, 3. díl. 2.* Brno: Proton, 2014. ISBN 978-80-900402-6-4.
12. PEČ, Pavel a Danuše PEČOVÁ. *Učebnice středoškolské chemie a biochemie.* Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2001 [cit. 2017-03-26]. ISBN 80-718-2034-2.
13. SOKOLOVÁ, Lucie, Heather WILLIAMSON, Jan SÝKORA, Martin HOF, Harry B. GRAY, Bernd BRUTSCHY a Antonín VLČEK. *Mass Spectrometric Characterization of Oligomers in Pseudomonas aeruginosa Azurin Solutions* [online]. [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1021/jp110460k. ISBN 10.1021/jp110460k. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp110460k>
14. SUCHANEK, Monika, Anna RADZIKOWSKA a Christoph THIELE. Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nature Methods* [online]. 2005-3-23, 2(4), 261-268 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1038/nmeth752. ISSN 1548-7091. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nmeth752>
15. ŠULC, Miroslav a Renata PTÁČKOVÁ. Biotechnologické aspekty světlem iniciovaného síťování - PIXL (z angl. photo-induced cross-linking): nové alternativní techniky pro studium 3D struktury proteinů či vzájemných interakcí. *Bioprospect: Bulletin biotechnologické společnosti.* 2016, 26(4/2016), 79-83.
16. TAKEMATSU, Kana, Heather WILLIAMSON, Ana María BLANCO-RODRÍGUEZ, et al. Tryptophan-Accelerated Electron Flow Across a Protein-Protein Interface. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2013, 135(41), 15515-15525 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1021/ja406830d. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja406830d>

10 Seznam obrázků

| | |
|---|----|
| Obr. 1 Proteinogenní aminokyseliny. | 11 |
| Obr. 2 Hierarchie struktury proteinů..... | 12 |
| Obr. 3 Schéma centrálního dogmatu..... | 13 |
| Obr. 5 Strukturní vzorce přirozených aminokyselin a jejich strukturních analogů.. .. | 14 |
| Obr. 4 Schéma aktivace foto-methioninu. | 14 |
| Obr. 6 3D model krystalové struktury azurinu 4AZU.. .. | 15 |
| Obr. 7 Model struktury azurinu kolem atomu mědi.. .. | 16 |
| Obr. 8 Methioninová residua v blízkém okolí atomu mědi.. .. | 16 |
| Obr. 9 Kalibrační křivka stanovení koncentrace proteinu (BSA)..... | 26 |
| Obr. 10 Absorpční spektrum izolované DNA expresního plazmidu s genem azurinu..... | 28 |
| Obr. 11 Růstové křivky kultivace <i>E. coli</i> B834 s plazmidem kodující azurin v LM9 médiu...29 | 29 |
| Obr. 12 SDS-PAGE gel ze vzorků z purifikace..... | 31 |
| Obr. 13 SDS-PAGE gel ze vzorků purifikace. | 32 |
| Obr. 14 SDS-PAGE gel ze vzorků z purifikace..... | 33 |
| Obr. 15 Absorpční spektrum finálního preparátu azurinu. | 33 |
| Obr. 16 Absorpční spektra vzorků azurinu před fotolýzou a po 3 minutách fotolýzy | 34 |
| Obr. 17 SDS-PAGE gel ze vzorků po fotolýze.. .. | 35 |