



Středoškolská technika 2018

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

Charakterizace Pho15p patogenních kvasinek *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*

Sylva Neradová

Gymnázium, Pardubice, Mozartova 448
Mozartova 449, Pardubice

Anotace

Ve své práci jsem se zabývala fosfatázami Pho15p, které jsou kódovány geny *PHO15* patogenních kvasinek *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*. Geny *PHO15* jsou dosud nepopsané otevřené čtecí rámce, jejichž funkce jim je přiřazována na základě homologie s genem *PHO13* pивní kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Ačkoliv jsou proteiny Pho15p i Pho13p anotovány jako alkalické fosfatázy, jejich aminokyselinová sekvence je řadí spíše do rodiny HAD enzymů. Mým cílem bylo jejich funkci experimentálně ověřit a dále tyto enzymy charakterizovat. Pho15p byly připravovány rekombinantně. Expresce proteinů probíhala v bakteriích *Escherichia coli* BL21(DH3) transformovaných vektorem pET28b, který obsahoval kódující sekvenci pro CaPho15p nebo CpPho15p. Fosfatázy se v buňkách ukládaly do inkluzních tělísek. Tyto inkluze byly z buněk izolovány, rozpuštěny v kyselině octové s pomocí sonikace a následně převedeny dialýzou do vody. Pro purifikaci fosfatáz byla použita afinitní chromatografie. Aktivita enzymů byla stanovená s Pho15p imobilizovanými na nosiči. Bylo stanoveno pH optimum pro oba enzymy (8,3 pro CaPho15p; 8,0 pro CpPho15p). Bylo zjištěno, že vhodnými kofaktory Pho15p jsou, kromě hořečnatého kationtu, i manganaté a kobaltnaté kationty. Optimum koncentrace Mg^{2+} je pro oba enzymy 10mM/l. Optimum koncentrace Mn^{2+} a Co^{2+} je pro CaPho15p 10mM/l, zatímco pro CpPho15p 1mM/l. Ani u jednoho enzymu nebyla prokázána desulfurylační aktivita či defosforylace bílkovin.

Obsah

1. Úvod.....	4
2. Seznam použitých zkratk.....	6
3. Teoretická část	7
3.1. Rodina HAD enzymů	7
3.1.1. Rossmannova konformace a její modifikace.....	7
3.1.2. Konzervované motivy	8
3.1.3. Katalytický mechanismus	9
3.2. Substráty	9
3.2.1. p-nitrofenylfosfát.....	9
3.2.2. p-nitrofenylsulfát	10
3.2.3. Fosfoenolpyruvát.....	10
3.2.4. Fosfopeptidy.....	11
4. Metody	12
4.1. Použité chemikálie.....	12
4.2. Příprava rekombinantních proteinů	12
4.2.1. Exprese genů	13
4.2.2. Izolace inkluzních tělísek	14
4.2.3. Renaturace proteinů akumulovaných v inkluzních tělískách.....	15
4.3. Purifikace rekombinantních proteinů	15
4.3.1. Afinity chromatografie.....	15
4.4. Analýza vzorků.....	18
4.4.1. SDS-PAGE.....	18
4.4.2. Western Blot.....	18
4.4.3. Hmotnostní spektrometrie	19
4.5. Stanovení koncentrace proteinu.....	20
4.6. Stanovení aktivity proteinu.....	20
4.6.1. Stanovení optima aktivity pomocí PNPP	20
4.6.2. Stanovení substrátové specifity	21
4.6.3. Vyhodnocení spektrofotometrických měření.....	22
4.7. Spektroskopie cirkulárního dichroismu	23
4.8. Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací	23
4.8.1. Zeslabený úplný odraz	23
5. Výsledky	25
6. Závěr a diskuze	33

7. Použité zdroje.....	35
8. Seznam obrázků a tabulek.....	39

1. ÚVOD

Kvasinky *Candida albicans* a *Candida parapsilosis* patří k oportunním patogenům. Mohou vážně ohrožovat jedince se sníženou imunitou nebo narušenou mikroflórou. Kromě nepříjemných povrchových infekcí, jako jsou např. orální kandidóza nebo kandidóza kůže, jež jsou většinou léčitelné antimykotiky [1], způsobují také nebezpečné vnitřní kandidózy tělesných tekutin a tkání. Takováto onemocnění jsou spojována s vysokou úmrtností, neboť jejich léčba je náročná [2]. Infekce způsobené těmito patogeny často způsobují problémy v nemocnicích, kde se šíří skrze špatně vyčištěné nástroje a přístroje, a také na ruku personálu [3].

Genomy *C. albicans* i *C. parapsilosis* byly osekvenovány [4, 5] a jsou přes internet volně dostupné. I přesto, že jsou oba organismy intenzivně studovány, stále existuje mnoho otevřených čtecích rámců, které nemají experimentálně ověřenou funkci. Jejich předpokládaná funkce jim je přiřazena na základě homologie s geny jiných organismů, nejčastěji pивní kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Charakterizace nepopsaných otevřených čtecích rámců je součástí základního výzkumu a může vést k odhalení dalších faktorů, které by mohly ovlivňovat virulenci těchto patogenů, případně jejich schopnost adaptace na změny vnějšího prostředí.

Proteiny Pho15p z *C. albicans* a *C. parapsilosis* kódované geny *PHO15* (C1_07230W_A a CPAR2_206650) jsou anotovány jako alkalické fosfatázy. Jejich aminokyselinová sekvence však neodpovídá známým alkalickým fosfatázám a řadí je spíše do rodiny haloacid dehalogenáz (HAD) podobně jako homolog těchto enzymů, fosfatázu Pho13p z pивní kvasinky *S. cerevisiae*. U této fosfatázy bylo experimentálně potvrzeno, že se jedná o *p*-nitrofenyl fosfatázu [6]. *p*-nitrofenylfosfát je chromogenní nebílkovinný substrát, který se používá k stanovení aktivity fosfatáz ve spektrofotometrických měřeních [7]. Podle experimentu výzkumného týmu Tulevy, kde byl tento enzym získán přímo ze *S. cerevisiae*, by měla Pho13p defosforylovat i histon II-A a kasein [6], ovšem dle Kuznetsové a spol., kdy byl enzym vytvořen rekombinantně v *E. coli*, se jako přirozený substrát jeví spíše menší organické molekuly, zejména 2-fosfoglykolát, glycerol-2-fosfát a fosfoenolpyruvát [8].

Dosavadní studie o *CaPHO15* řadí tento gen k těm, jejichž transkripce je zvýšena při různých stresových podmínkách (core stress response) [9]. Dále se také podílí na přepínání mezi dvěma rozdílnými typy buněk, tzv. white a opačnou formou, které se liší v mnoha aspektech (např. rozdílná stavba buněk a kolonií, rozdílné umístění v hostiteli, nebo rozdílné interakce s imunitním systémem) [10, 26]. Jediná informace týkající se *CpPHO15* popisuje mírně zvýšenou transkripci v mutantním kmenu *C. parapsilosis*, postrádajícím transkripční faktor Bcr1p, který se účastní regulace biofilmu [11].

Cílem této práce bylo purifikovat a charakterizovat proteiny CaPho15p a CpPho15p. V teoretické části je zachycena charakteristika HAD enzymů, katalytický mechanismus HAD

fosfatáz a testované substráty, v další části jsou popsány a vysvětleny použité metody s konkrétními aplikovanými postupy. Nakonec jsou rozvedeny dosažené výsledky a diskuze.

2. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP	gadenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
ATPáza	adenosintrifosfatáza
ATR	zeslabený úplný odraz
<i>CaPHO15</i>	označení genu <i>PHO15</i> kvasinky <i>Candida albicans</i>
CaPho15p	označení proteinu kódovaného genem <i>CaPHO15</i>
CD	cirkulární dichroismus
<i>CpPHO15</i>	označení genu <i>PHO15</i> kvasinky <i>Candida parapsilosis</i>
CpPho15p	označení proteinu kódovaného genem <i>CpPHO15</i>
DNA	kyselina deoxyribonukleová
Dnáza	deoxyribonukleáza
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HAD	haloacid dehalogenáza
His kotva	histidinová kotva
IPTG	isopropyl- β -D-galaktopyranosid
LB medium	Luria-Bertanni medium
mRNA	messenger RNA
NAD	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukováná forma)
Ni-NTA, NiNTA	kyselina nikelnatonitriilotrioctová
PEP	fosfoenolpyruvát
<i>PHO13</i>	označení genu pro fosfatázu Pho13p kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pho13p	označení proteinu kódovaného genem <i>PHO13</i>
<i>PHO15</i>	označení genu pro fosfatázy Pho15p patogenních kvasinek <i>Candida albicans</i> a <i>Candida parapsilosis</i>
Pho15p	označení proteinů kódovaných genem <i>PHO15</i>
PNPP	<i>p</i> -nitrofenylfosfát
PNPS	<i>p</i> -nitrofenylsulfát
PVDF	polyvinylidenfluorid
RNA	kyselina ribonukleová
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
TFA	kyselina trifluoroctová
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

Tabulka 1 – Seznam použitých zkratk. Řazeno abecedně.

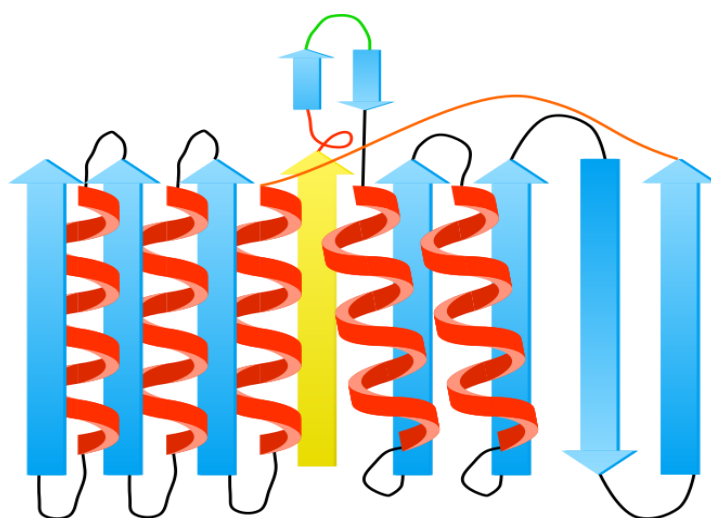
3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Rodina HAD enzymů

Rodina HAD enzymů je zastoupena napříč všemi říšemi života. Pojmenovaná je podle haloacid dehalogenáz původně izolovaných z bakterií rodu *Pseudomonas*, nicméně většinu této rodiny tvoří fosfatázy a ATPázy, dále v ní nalezneme také fosfonatázy (enzymy katalyzující defosforylaci fosfonoacetaldehydu) a fosmomutázy (enzymy katalyzující přenos fosfátu na uhlících cukru) [8]. Nejméně pět členů této rodiny se vyskytovalo již u posledního společného předka a dnes je diverzifikována do více než třiceti podrodin, které se dále diferencují. Enzymy příslušící do této rodiny si během evoluce vyvinuly specifity k široké škále substrátů [12] a účastní se různých buněčných dějů jako je primární a sekundární metabolismus, regulace enzymové aktivity, sbalování proteinů, „cell housekeeping“ nebo příjem živin [8].

3.1.1. Rossmannova konformace a její modifikace

Základní katalytická doména všech HAD enzymů obsahuje takzvanou Rossmannovu konformaci, která se skládá z tří na sobě navrstvených α/β sendvičů. Základ tvoří centrální β skládaný list, který obsahuje pět paralelních vláken. Dvě modifikace této konformace jsou charakteristické pro HAD enzymy. „Squiggle“, první z modifikací, je tvořen krátkou alfa šroubovicí, zatímco druhou modifikaci chlopeň (angl. „flap“), tvoří dva překřížené skládané listy. Oba tyto elementy jsou konzervovány mezi všemi HAD enzymy a zodpovídají za přechod mezi jejich otevřenou a uzavřenou konformací. Dále může Rossmannova konformace obsahovat cap domény, které jsou dvojího typu C1 a C2. C1 typ se nachází mezi strukturními motivy I a II přímo ve flap elementu a reguluje přístup do aktivního místa. Mezi dosud známými HAD enzymy je nejběžnější. Typ C2 je lokalizován mezi motivem II a III a zastřešuje aktivní místo. Proteiny této rodiny mohou mít jednu nebo obě „čepičky“, případně žádnou (C0). Cap domény se vyvinuly do rozmanitých forem a jsou úzce spjaty se substrátovou specifitou enzymu [8, 12, 13].



Obrázek 1 – Základní Rossmannova konformace HAD enzymů. Alfa helixy jsou znázorněny jako červené šroubovice. Beta skládané listy jsou znázorněny jako modré šipky. C-konec se nachází na vrcholu šipky. Žlutě je vyznačeno vlákno, kde se nachází aktivní místo. „Squiggle“ je znázorněn jako červená křivka nad žlutou šipkou. Zeleně je vyznačena cap doména C1, oranžově cap doména C2. Převzato a upraveno z [13].

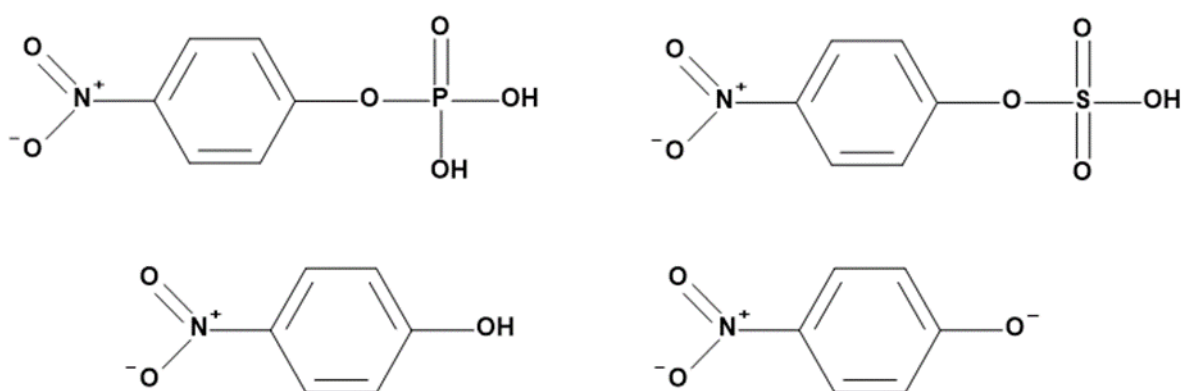
3.1.2. Konzervované motivy

Při porovnání sekvencí HAD enzymů bylo zjištěno, že všechny obsahují čtyři konzervované strukturní motivy. Motiv I je tvořen dvěma aspartáty, které odděluje variabilní aminokyselina. Jeho úloha spočívá v koordinaci hořečnatého kationtu Mg^{2+} jako kofaktoru. První z aspartátů také vystupuje jako nukleofil, na který se při katalýze váže fosfát substrátu. Motiv II má na svém konci serin nebo treonin. Centrální aminokyselinou motivu III je lysin. Tyto dva motivy přispívají ke stabilizaci intermediátu vzniklého během reakce. Poslední motiv IV je tvořen aspartáty v kombinaci s jinými aminokyselinami a stejně jako motiv I koordinuje hořečnatý kationt [8, 12, 13].

pH indikátor. Pod hodnoty pH 5,4 a méně je bezbarvý, při vyšších pH disociuje na *p*-nitrofenolát (viz Obrázek 4.4.) K nasycenosti dochází při pH 7,5 a výše. Absorpční maximum *p*-nitrofenolátu je 405nm [28].

3.2.2. *p*-nitrofenylsulfát

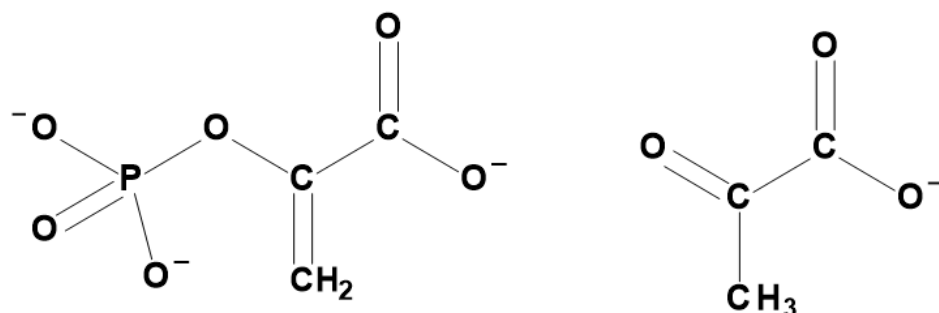
p-nitrofenylsulfát (PNPS; viz Obrázek 4.2.) je meziproduktem metabolismu parathionu, což je vysoce toxická organofosfátová sloučenina, používaná jako insekticid. Svou strukturou je velice podobný nitrofenylfosfátu, namísto zbytku kyseliny fosforečné se však váže zbytek kyseliny sírové. Sulfatázy katalyzují odštěpení sulfátové skupiny za vzniku volného sulfátu a nitrofenolu, který, jak už bylo výše zmíněno, je bezbarvý v kyselém až neutrálním pH a získává zabarvení žluté při pH 7,5 a výše. Absorpčního maxima dosahuje při 405nm.



Obrázek 4 – Strukturální vzorce substrátů. *p*-nitrofenylfosfát (1); *p*-nitrofenylsulfát (2); *p*-nitrofenol (3); *p*-nitrofenolát (4).

3.2.3. Fosfoenolpyruvát

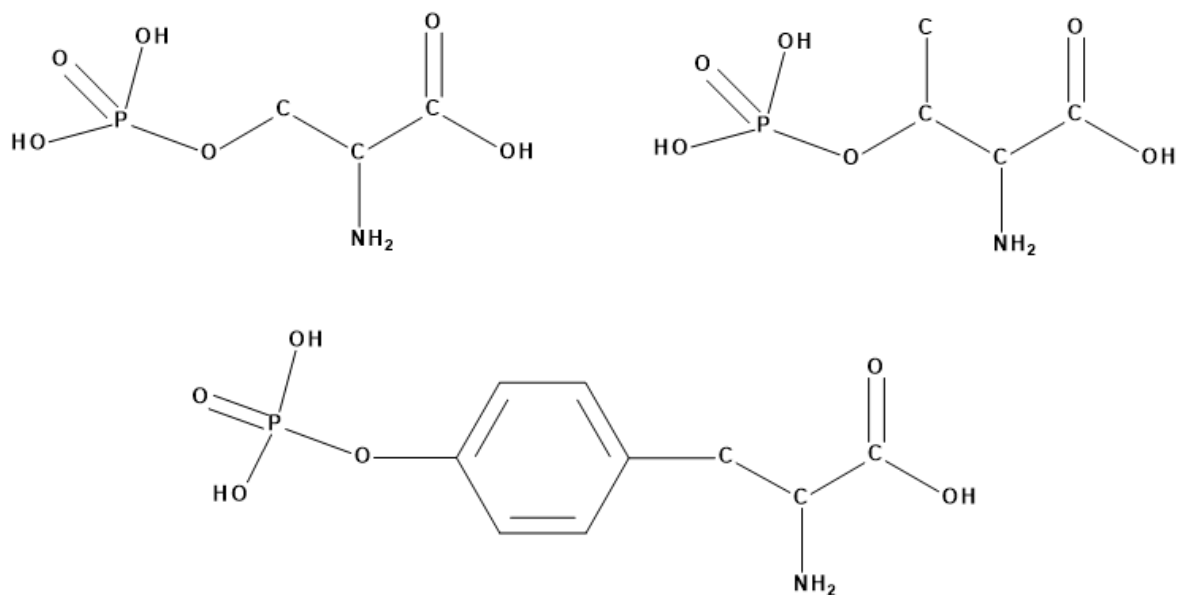
Fosfoenolpyruvát (PEP; viz Obrázek 5.1.) je malá organická molekula, která je součástí glykolytické dráhy. Umožňuje proces tzv. substrátové fosforylace, kdy fosfátová skupina přechází z fosfoenolpyruvátu na ADP za vzniku pyruvátu a ATP. Dále vzniká jako meziproduct při glukoneogenezi [34]. Je také součástí metabolického cyklu C4 rostlin, kde je primárním akceptorem oxidu uhličitého [35].



Obrázek 5 – Strukturální vzorce substrátů. Fosfoenolpyruvát (1); pyruvát (2).

3.2.4. Fosfopeptidy

Fosforylace proteinů je post-translační modifikací, která slouží k regulaci daného proteinu. Jedná se o reverzibilní reakci, kterou katalyzují kinázy. Opačnou reakcí je defosforylace, kterou umožňují právě fosfatázy. Nejčastěji fosforylovanými aminokyselinami bílkovin jsou serin, treonin a tyrosin. Fosfátová skupina nese náboj a je hydrofobní. Při jejím připojení na některou z aminokyselin tak logicky dochází ke strukturálním změnám, které mohou způsobit aktivaci, deaktivaci enzymu nebo modifikaci funkce proteinu [37].



Obrázek 6 – Strukturální vzorce fosfoaminokyselin. Fosfoserin (1), fosfotreonin (2), fosfotyrosin (3).

4. METODY

4.1. Použité chemikálie

Označení	Racionální vzorec / složení	Výrobce
Blokovací pufr	20 mM Tris-Cl pH = 7,5; 150 mM NaCl, 0,1% Triton, 5% nízkotučné sušené mléko	
Coomassie	Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain	Bio-Rad
Eluční roztok	300 mM imidazol, H ₂ O	
IPTG	isopropyl-β-D-galaktopyranosid	
Kanamycin	Kanamycin	
Kyselina octová	CH ₃ COOH	
LB medium	LB medium s nízkým obsahem solí	Duchefa Biochemie
LDH	Laktát dehydrogenáza	Roche
NADH	Nikotinamidadeninukleotid(redukováný)	Sigma Aldrich
Ni-NTA	Ni-NTA Agarose	Quiagen
Odbarvovací roztok	50% acetonitril, 50 mM NH ₄ HCO ₃	
PEP	fosfoenolpyruvát	Sigma Aldrich
PNPP	4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate	Sigma-Aldrich
PNPS	Potassium 4-nitrophenyl sulfát	Sigma-Aldrich
Promývací a vazebný roztok	10 mM imidazol, H ₂ O	
Promývací pufr ¹	100 mM Tris-Cl pH = 7,0; 2 M močovina, 5 mM EDTA, 2% Triton	
Promývací pufr ²	20 mM Tris-Cl pH = 7,5; 150 mM NaCl, 0,1% Triton	
Protilátkový pufr	20 mM Tris-Cl pH = 7,5; 150 mM NaCl, 0,1% Triton, 2% nízkotučné sušené mléko	
Směs fosfopeptidů	Phosphopeptide Standard Mixture (P33357)	Thermo Fisher Scientific
TFA	Kyselina trifluoroctová	
TN pufr	100 mM Tris-Cl pH = 7,4; 150mM NaCl	
Transfer pufr		
Trombin	Trombin	
Trombinový pufr	Tris-Cl pH = 9,5; 150 mM NaCl, 4 mM MgCl ₂	
Vzorkovací pufr pro SDS-PAGE	Laemmli Sample Buffer, 2-merkapt ethanol	Bio-Rad

Tabulka 2 - Seznam použitých chemikálií. Řazeno abecedně.

4.2. Příprava rekombinantních proteinů

Příprava rekombinantních proteinů využívá genetické modifikace organismů. V případě bakterií je tato modifikace zprostředkována skrze kruhové molekuly DNA, tzv. plazmidy či vektory. Námí zvolená kódující sekvence je z původního genomu namnožena a vložena do linearizovaného vektoru. Dnes již uměle syntetizovaných vektorů je celá řada, takže si

můžeme vybrat takový, který bude vyhovovat našim záměrům. Volba vektoru je úzce spjata se způsobem, jakým bude kontrolována exprese genu. Po dostatečně dlouhé kultivaci se buňky sklídí centrifugací. Následuje lýze buněk a izolace proteinu, jejíž postup se volí na základě toho, v jaké formě protein izolujeme (rozpuštěný nebo agregovaný do inkluzních tělísek), ale v zásadě se jedná o sérii centrifugování, promývání a sbírání vzorků z každého kroku, které potom analyzujeme.

Příprava vektorů nesoucích geny *PHO15* proběhla již před započítím práce.

4.2.1. Exprese genů

Exprese genů je řízena dvěma klíčovými místy v sekvenci vektoru – promotorem a operátorem. Promotor je úsek nukleotidů, na který nasedá RNA polymeráza. Syntézu RNA zahajuje tento enzym od tohoto místa směrem k 3' konci. Při konstrukci rekombinantního vektoru je obvyklé zvolit silný promotor, který v kombinaci s příslušnou RNA polymerázou zajistí, že exprese námi vloženého genu bude výrazně převyšovat expresi ostatních genů, abychom získali co nejvíce kýženého proteinu. Takové promotory a RNA polymerázy nalezneme zejména u virů (např. promotor a RNA polymeráza bakteriofága T7). Námi vložený gen ve vektoru bývá také součástí operonu, jehož transkripci můžeme zahájit přidáním induktoru. Operony jsou obecně shluky genů, které jsou transkribovány do jedné mRNA z jednoho promotoru. Například *lac* operon obsahuje geny pro enzymy štěpící laktózu. Pokud je v buňce nízká koncentrace laktózy, není důvod, aby se *lac* operon přepisoval. Na operátoru je *lac* operonu je navázán represor, který znemožňuje RNA polymeráze zahájit transkripci. Při zvýšené koncentraci laktózy se laktóza váže na represor, který tak změni svůj tvar a nemůže se navázat na operátor. Tím se aktivuje přepis *lac* operonu. Na represor se mohou navázat i molekuly homologní k laktóze (např. IPTG, isopropyl- β -D-galaktopyranosid) [16].

Inkluzní tělíska

Vysoká produkce rekombinantního proteinu je dvojsečná zbraň. Vyčerpává totiž bakteriální kontrolní systém kvality proteinů, a tak se částečně složené nebo nesložené proteiny ukládají do inkluzních tělísek. [19] Při použití dalšího vektoru nesoucího kódující sekvence pro chaperony, proteiny, které dokážou měnit konformaci jiných proteinů [20], je možné získat rekombinantní proteiny v solubilizované formě.

Konkrétní postup

Vektory pET-28b s inzertovanými geny *PHO15* byly připipetovány (cca 100 ng DNA) ke 100 μ l suspenze kompetentních buněk *E. coli* BL21(DH3), které byly připraveny pomocí CaCl_2 . Postup transformace je uveden v Tabulce 3. Narostlé kolonie byly přeočkovány do tekutého LB media s kanamycinem a kultivovány při 37°C za stálého třepání. Míra nárůstu kultury byla měřena spektrofotometrem (Scinco Nano-MD PDA UV-Vis Bio Spectrophotometer). Při dosažení hodnoty optické denzity při 600 nm v rozmezí 0,8-1 se exprese genů indukovala

přidáním IPTG (výsledná koncentrace 1 mM/l). Po dalších třech hodinách kultivace se buňky sklídily centrifugací 10 minut při přetížení 4000 g. Sedimentované buňky se poté mohou uchovávat v mrazáku.

krok	doba trvání	Teplota
inkubace na ledu	60 min	teplota ledu
teplotní šok	2 min	42°C
regenerace na ledu	1 min	teplota ledu
regenerace	60 min	37°C
inkubace se selekčním antibiotikem na Petriho miskách	cca 24 h	37°C

Tabulka 3 – Transformace vektoru pET-28b s inzertovanými geny *PHO15* do kompetentních buněk *E. coli* BL21(DH3).

4.2.2. Izolace inkluzních tělísek

Buňky musí být nejprve rozrušeny, aby se zpřístupnil jejich obsah. K tomu se využívá např. homogenizace vysokým tlakem nebo lysozym. Tento enzym, který je součástí např. slin, slz nebo krevní plazmy, narušuje buněčnou stěnu [21], takže dochází k lýzi buněk. Buněčný lyzát obsahuje také dlouhé molekuly DNA, které zapříčiňují viskózní konzistenci lyzátu. K rozrušení těchto DNA molekul se mohou použít DNázy, enzymy, které štěpí DNA na menší fragmenty, nebo ultrazvuk. Suspenze by pak měla ztratit svou hlenovitou konzistenci. Poměrně vysoká hustota inkluzních tělísek umožňuje jejich separaci centrifugací. Vzniklá peleta se poté musí promýt promývacím pufrem, který obsahuje nízké koncentrace chaotropních látek (např. močovina) nebo detergentů (např. Triton). Tímto krokem se odstraní kontaminující látky, které se mohly nahromadit na hydrofobním povrchu inkluzních tělísek [22].

Konkrétní postup

Zmražené buňky se resuspendovaly v TN pufru a po přidání lysozymu (1 mg na 1 g mokré biomasy) byly při laboratorní teplotě míchány půl hodiny. Lyzát se poté 3 minuty sonikoval (Hilscher UP100H Ultrasound Processor). Centrifugace probíhala po dobu 10 minut při přetížení 9000 g. Po oddělení supernatantu byl sediment obsahující inkluzní tělíška dvakrát promyt promývacím pufrem¹.

V případě, že jsme tento postup aplikovali na buňky, které obsahovaly navíc vektor s chaperony, byly rekombinantní proteiny obsažené v supernatantu po první centrifugaci. Pokud buňky obsahovaly pouze vektor nesoucí gen *PHO15*, nacházely se v promytém sedimentu.

4.2.3. Renaturace proteinů akumulovaných v inkluzních tělískách

Renaturace inkluzních tělísek obvykle zahrnuje dva kroky: denuraci agregátů a poté správné sbalení proteinu, renaturaci. K rozpuštění inkluzních tělísek se nejčastěji využívá vysoké koncentrace denaturujících látek (např. močovina, guanidin hydrochlorid), které rozruší nekovalentní vazby v proteinových agregátech v inkluzních tělískách. Redukční činidla (např. β -merkaptoethanol, dithiotreitol) se používají k odstranění disulfidických můstků. Odstranění denaturantů by mělo vést k správnému sbalení proteinu. K tomu lze využít např. dialýzu nebo vyředění [22, 23].

Při dialýze dochází k snižování koncentrace denaturantů tak, že jsou rozpuštěné proteiny převáděny z roztoku o vysoké koncentraci denaturantů do roztoku bez denaturantů. Výměna těchto roztoků probíhá přes semi-permeabilní membránu. Samozřejmostí je, že póry v této membráně jsou dostatečně malé, takže jimi molekula proteinu neprojde. Převod může být jednokrokový, nebo postupný. Při postupném snižování koncentrace denaturantů se snižuje riziko vzniku agregátů, ovšem je časově náročnější [22, 23].

Diluce neboli ředění je asi nejjednodušší metodou, při které se rozpuštěný protein ředí ve velkém objemu ředícího roztoku. Dochází k zředění denaturantů, protože ředící roztok obvykle žádné neobsahuje. Zároveň se snižuje koncentrace samotného proteinu, což může zamezit vzniku agregátů, které se obvykle tvoří při vysokých koncentracích proteinů [22, 23].

K stabilizaci proteinu nebo inhibici agregace lze také využít některých chemických látek (např. arginin, prolin, glycerol, cukry) [23].

Vhodný postup nelze předem stanovit a vždy je potřeba provést optimalizaci pro daný protein.

Konkrétní postup

Promytá peleta byla rozpuštěna v 60% kyselině octové s pomocí vortexování a sonikace. Nerozpuštěné zbytky byly centrifugací odděleny. Vzorek se poté den dialyzoval v destilované vodě.

4.3. Purifikace rekombinantních proteinů

K purifikaci rekombinantních proteinů se dnes využívá mnoho různých metod, nejčastěji se jedná o chromatografie. Volba metody se odvíjí od vlastností rekombinantního proteinu a také možností laboratoře, ve které pracujeme.

4.3.1. Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je metoda, která umožňuje purifikovat proteiny na základě jejich interakce s nosičem. Neimobilizované látky jsou odstraněny promýváním. Čištěný protein lze získat z nosiče různými způsoby. Je možné jej eluovat puřem obsahujícím kompetitivní látku

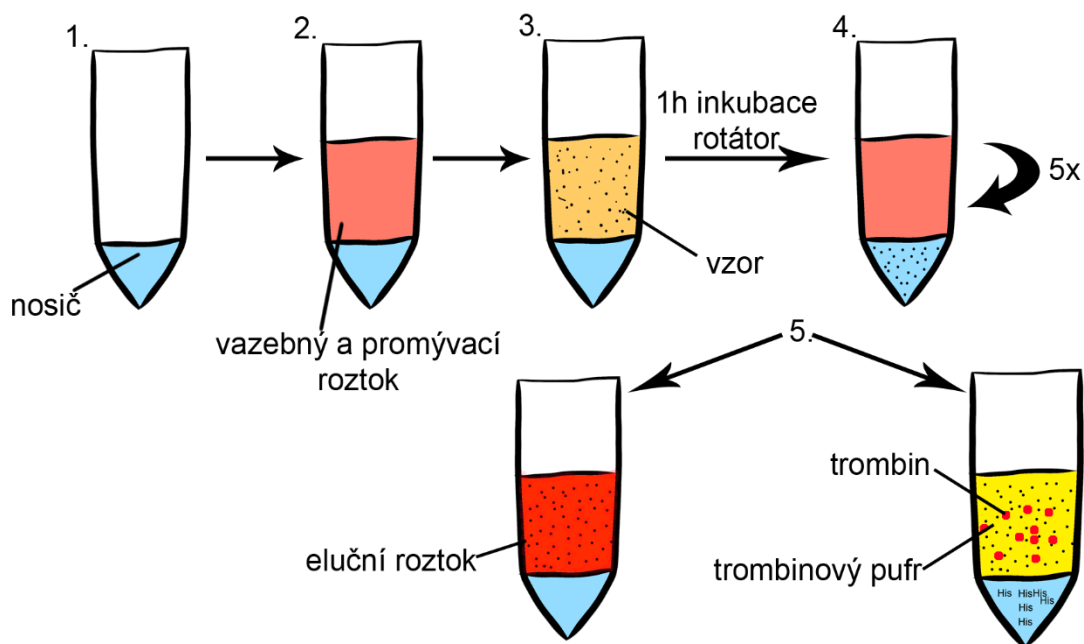
(např. imidazol pro His kotvu). Tato látka svou afinitou k nosiči převyšuje afinitu adsorbovaného proteinu. Dále se také uplatňuje změna pH (zvýšení i snížení), kdy vazba proteinu na nosič přestává být stabilní. Jinou možností je odštěpení proteinu od části, která se váže na nosič, pomocí určitého enzymu. To připadá v úvahu, pokud se mezi značkou a samotným proteinem vyskytuje místo, které daný enzym specificky rozpoznává (např. trombin).

Afinitní chromatografii můžeme provádět dvěma různými způsoby – vsádkově, nebo na koloně. V případě vsádkového uspořádání celou proceduru provádíme ve zkumavce, vzorek i jednotlivé roztoky přidáváme pipetou. Tato metoda je výhodná především při optimalizaci podmínek vazby, jelikož si vystačíme i s malými objemy a časová náročnost je podstatně nižší než u čištění na koloně. Ta navíc vyžaduje přístroj, na kterém budeme celé čištění provádět. Nosič sedimentuje v koloně, která je pak zapojena do systému hadiček. Pumpa poté vytváří tlak a pumpuje požadovaný roztok do kolony. Na druhou stranu, kolonové uspořádání umožňuje daleko jemnější rozdělení směsí. Vytváří se gradient koncentrace eluentu, protein je tedy uvolňován postupně, takže můžeme získat čistější frakce.

Konkrétní postup – vsádkové uspořádání

Nosič Ni-NTA byl napipetován do mikrozukmavky a centrifugován 30 s při přetížení 9660 g. Supernatant byl odsán do odpadu. Nosič se ekvilibroval přidávkem promývacího a vazebného roztoku a po promíchání a centrifugaci (30 s, 9660 g) byl supernatant opět odsán do odpadu. Poté byl k nosiči přidán vzorek s přidávkem imidazolu (výsledná koncentrace 10 mM/l) a tato suspenze se inkubovala 1 hodinu na rotátoru za laboratorní teploty. Následovala centrifugace (30 s, 9660 g). Nosič byl pětkrát promyt vazebným a promývacím roztokem. Po posledním promytí se přidal eluční roztok. Eluční frakce byla po centrifugaci odpipetována.

Při odštěpování proteinu trombinem se místo elučního roztoku přidal k nosiči trombin rozpuštěný v trombinovém pufru. Tato směs se inkubovala přibližně 16 hodin na rotátoru. Supernatant byl odebrán k analýze.



Obrázek 7 – Schéma vsádkové afinitní chromatografie s následnou elucí nebo štěpením trombinem

Konkrétní postup – kolonové uspořádání

Izolace proteinu v kolonovém uspořádání byla provedena na chromatografu BioLogic LP, který je vybaven UV detektorem (280/254 nm). Kolona o objemu 10 ml byla naplněna nosičem Ni-NTA Agarose od firmy Quiagen a promyta 30 ml redestilované vody. Program chromatografie je popsán v Tabulce 4. Nadávkování vzorku (4 ml CaPho15p po dialýze) proběhlo pro 2. kroku. Eluční frakce byly sbírány od počátku zvyšování absorbance až po její pokles.

krok	doba trvání	složení roztoku	průtok
ekvilibrace	do ustálení absorbance křivky	H ₂ O, 10 mM imidazol	1,75 ml/min
příprava na vazbu proteinu	do ustálení absorbance křivky	H ₂ O, 10 mM imidazol	0,25 ml/min
vazba proteinu	do poklesu absorbance	H ₂ O, 10 mM imidazol	0,25 ml/min
promyv	cca 10 min	H ₂ O, 10 mM imidazol	1 ml/min
eluce	40 min	H ₂ O, 10 mM imidazol (gradient 100-0%); H ₂ O, 500 mM imidazol (gradient 0-100%)	1 ml/min
	10 min	H ₂ O, 500 mM imidazol	

Tabulka 4 – program kolonové chromatografie

4.4. Analýza vzorků

4.4.1. SDS-PAGE

Metoda SDS-PAGE (z anglického sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) slouží k rozdělení proteinů na základě jejich molekulární hmotnosti. Jednotlivé vzorky ve vzorkovacím pufru a standard jsou nanášeny do jamek zaostřovacího gelu, ve kterém se po připojení ke zdroji stejnosměrného elektrického napětí všechny zarovnají do jedné linie. Poté přechází do gelu dělicího. Čím menší molekula je, tím rychleji postupuje, takže po obarvení gelu se zobrazí jako proužek blíže spodnímu okraji gelu. Vyhodnocení po obarvení provádíme na základě porovnání vzorků se standardem molekulových hmotností.

Konkrétní postup

Pro přípravu gelů byla použita aparatura od firmy Bio-Rad. Použity byly 15% dělicí gely, které se následně barvily stříbrem nebo Coomassie. Protokol barvení stříbrem je popsán v Tabulce 5. Gely byly připraveny podle protokolu firmy Bio-Rad.

krok	složení roztoku	doba trvání	počet opakování
fixace proteinů	50% methanol, 12% k. octová, 0,5 ml 37% formaldehydu na 1 l roztoku	60 min	1
promytí	50% methanol	15 min	3
aplikace redukčního činidla	0,2 g Na ₂ SO ₄ ·5H ₂ O na 1 l H ₂ O	1 min	1
promytí	H ₂ O	20 s	3
aplikace stříbra	2 g AgNO ₃ , 0,75 ml 37% formaldehydu na 1 l H ₂ O	20 min	1
promytí	H ₂ O	20 s	3
vyvolání	60 g Na ₂ CO ₃ , 0,2 g Na ₂ SO ₄ ·5H ₂ O, 0,5ML 37% formaldehydu na 1 l H ₂ O	cca 10 min, dokud se gel neobarví	1
zastavení vyvolávací reakce	50% methanol, 12% k. octová	cca 2 min, dokud se barvení nezastaví	1

Tabulka 5– Protokol barvení stříbrem.

4.4.2. Western Blot

Western Blot je metoda umožňující detekovat konkrétní protein na základě navázání specifických protilátek. Po proběhlé SDS-PAGE se proteiny pomocí elektrického proudu přenesou na PVDF nebo nitrocelulózovou membránu. Dále je nutné membránu blokovat, aby nedocházelo k nespecifickému vázání protilátek na membránu. To se provádí inkubací membrány s proteiny (např. kasein v odtučněném sušeném mléku), které se naváží na zbylá

volná místa na membráně. Primární protilátky, specifické pro protein, jehož přítomnost na membráně má být dokázána, se pak už nemohou navázat na membránu, ale pouze na daný protein. Následně se přidá konjugát sekundární protilátky a enzymu. Tento enzym je po přidání vhodného substrátu schopen katalyzovat reakci, která nám umožní detekovat jeho umístění, resp. umístění analyzovaného proteinu na membráně [24].

Konkrétní postup

Před samotným blotováním byla PVDF membrána namočená v methanolu a v destilované vodě. Mezi houbičky namočené v Transfer pufru se vložil gel a membrána. Poté se celý „sendvič“ umístil mezi anodu a katodu tak, že membrána byla blíž k anodě a gel blíž ke katodě. Po odstranění vzduchových bublin a důkladném uzavření se celá blotovací aparatura (Cleaver Scientific Semi Dry blottery) zapojila do zdroje stejnosměrného elektrického proudu s konstantním napětím 15V na 35 minut. Pro kontrolu, zda se proteiny úspěšně přenesly, byla membrána obarvena 0,5% Ponceau S. Blokování v blokovacím pufru probíhalo přibližně 1 hodinu. Následovala noční inkubace s primárními protilátkami v protilátkovém pufru. Poté byla membrána propláchnuta v promývacím pufru². Inkubace se sekundárními protilátkami v protilátkovém pufru trvala opět přibližně 1 hodinu. Nakonec byla membrána znovu propláchnuta promývacím pufrům.

Pro vyvolání byla použita křenuvá peroxidáza a luminofor firmy Bio-Rad.

4.4.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která se využívá k stanovení složení či struktury dané látky. Vzorek je do přístroje nejprve nadávkován a ihned se vypařuje působením ohřívače. Následně podstupuje látka ionizaci. Ionty procházejí elektromagnetickým polem, které je rozdělí na základě jejich náboje a hmotnosti. Lehčí a více nabití ionty se pohybují rychleji, než ionty těžší a méně nabitým. Dopadají na detektor, který zaznamenává poměr hmotnosti a náboje detekovaného iontu a také počet zaznamenaných iontů. Výsledkem hmotnostní spektrometrie je hmotnostní spektrum, které je vlastně závislostí relativního výskytu na poměru hmotnosti a náboje [36].

Konkrétní postup

Vzorky byly nejprve podrobeny SDS-PAGE a obarveny Coomassie. Z gelu byla vyříznuta část určená k analýze a přenesena do zkumavky, kde byla špičkou rozdrcena. K takto připravenému vzorku bylo přidáno 100 µl odbarvovacího roztoku. Vzorek byl inkubován po dobu 30 minut, dokud nedošlo k odbarvení. Následně bylo přidáno 500 µl 100% acetonitrilu. Vzorek se inkubuje, dokud nedojde k vysušení gelu. Zbylý supernatant je odsán. K dehydrovanému gelu bylo přidáno 30-50 µl 10mM dithiotreitolu. Po 30 minutách inkubace při 60°C byl gel opět vysušen 100% acetonitrem. Vzorek se nechal zchladnout na laboratorní teplotu, bylo přidáno 30-50 µl jodoacetamidu. Následovala inkubace ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Gel byl opět vysušen 100% acetonitrem.

Takto připravený vzorek byl podroben štěpení trypsinem přes noc při 37°C. Následně byl odsolen, a nakonec podroben analýze (Thermo Scientific MALDI-LTQ Orbitrap XL).

Přípravu vzorků pro hmotnostní spektrometrii, měření hmotnostních spekter a jejich vyhodnocování prováděli Mgr. Rudolf Kupčík a Mgr. Eliška Kročová.

4.5. Stanovení koncentrace proteinu

Pro stanovení koncentrace proteinu byla používána metoda BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) a Bradford (Bradford Reagent, Sigma - Aldrich).

Metoda BCA je založena na redukci měďnatého iontu Cu^{2+} na iont měďný Cu^+ peptidovými vazbami proteinu. Bicinchroninová kyselina poté vytvoří s Cu^+ iontem fialově zabarvený komplex, který absorbuje při 562 nm [29].

Metoda Bradford je založena na navázání barvy Coomassie Brilliant Blue G-250 s karboxylovými skupiny proteinu, což zapříčiní změnu absorpčního spektra. Vzniká modře zabarvený roztok, ve kterém měříme absorbanci při 595 nm [30].

4.6. Stanovení aktivity proteinu

4.6.1. Stanovení optima aktivity pomocí PNPP

Principem stanovení aktivity pomocí PNPP je katalýza rozkladu tohoto substrátu na *p*-nitrofenol a fosfát. Při této reakci dochází k zabarvení roztoku a také ke zvýšení absorbance při 405nm, která je přímo úměrná vzrůstajícímu množství *p*-nitrofenolu a tím pádem i aktivitě fosfatázy [14].

Konkrétní postup

Pho15p po dialýze byla imobilizována na nosiči (viz 4.3.1). Po promytí bylo k 20 μl nosiče přidáno 310 μl pufru s rozpuštěným substrátem (1,77 mM PNPP). Následovala 20minutová inkubace na rotátoru. Zkumavky byly centrifugovány 30 s při 9960 g. Supernatant byl napipetován do mikrotitrační destičky po 100 μl . V případě stanovování pH optima byly do každé jamky přidány 4 μl 9 M NaOH. Absorbance byla měřena při vlnové délce 405 nm (Labsystems Multiskan RC).

Při stanovení pH optima byla použita škála pufrů (50 mM Tris-Cl, 10 mM MgCl_2) s pH 4,5-9,5. Inkubace probíhala při 37°C.

Při stanovení optima koncentrace hořečnatých, manganatých a kobaltnatých kationtů byla použita škála pufrů (50 mM Tris pH = 8,3 pro CaPho15p a pH = 8,0 pro CpPho15p) s koncentrací MgCl_2 0,01 – 100 Mm/l. Inkubace probíhala při 37°C.

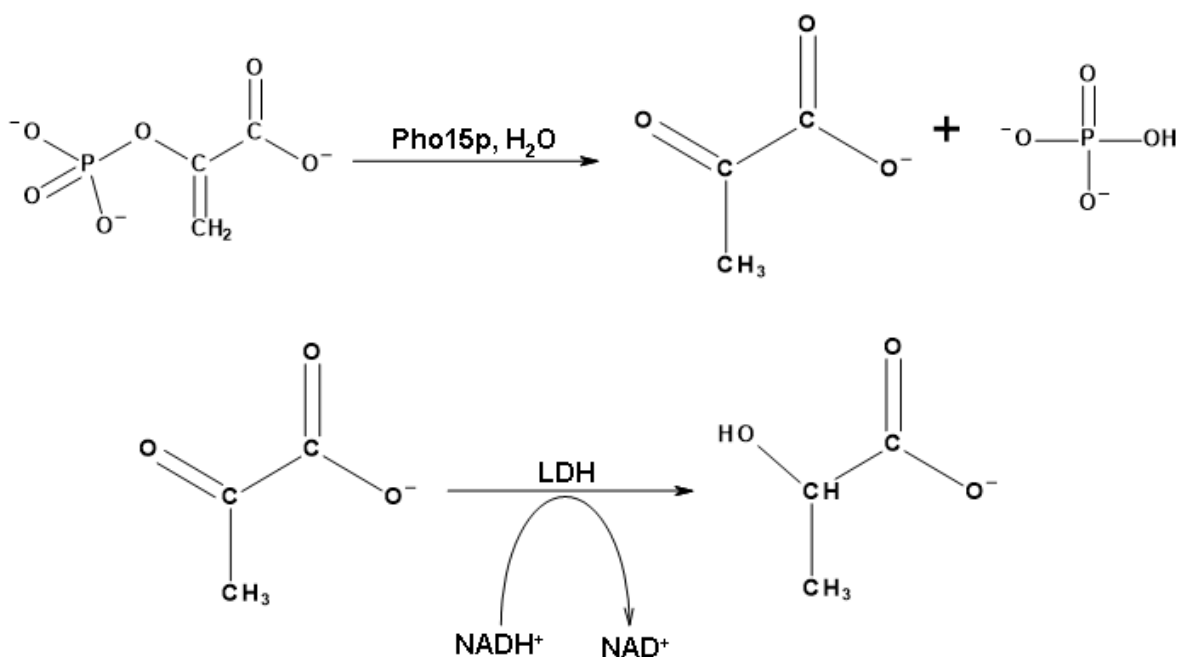
4.6.2. Stanovení substrátové specifity

p-nitrofenylsulfát draselný

Pho15p po dialýze byla imobilizována na nosiči (viz 4.3.1). Po promytí bylo k 20 μ l nosiče přidáno 310 μ l pufru (pro CaPho15 50 mM Tris pH = 8.3, 10 mM MgCl₂, nebo 10 mM MnCl₂, nebo 10 mM CoCl₂ pro CpPho15 50mM Tris pH = 8.0, 10 mM MgCl₂, nebo 1 mM MnCl₂, nebo 1 mM CoCl₂) s rozpuštěným substrátem (1,77; 17,7 a 177 mM PNPS). Následovala 20timuntová inkubace na rotátoru při 37°C. Zkumavky byly centrifugovány 30 s při 9960 g. Supernatant byl napipetován do mikrotitrační destičky po 100 μ l. Absorbance byla měřena při vlnové délce 405 nm.

Fosfoenolpyruvát

Pho15p po dialýze byla imobilizována na nosiči (viz 4.3.1). Po promytí bylo k 20 μ l nosiče přidáno 300 μ l pufru (pro CaPho15 50 mM Tris-Cl pH = 8.3, 10 mM MgCl₂, nebo 10 mM MnCl₂, nebo 10 mM CoCl₂; pro CpPho15 50 mM Tris-Cl pH = 8.0, 10 mM MgCl₂, nebo 1 mM MnCl₂, nebo 1 mM CoCl₂) s rozpuštěným substrátem (25 mM PEP). Následovala 40timinutová inkubace na rotátoru při 37°C. Zkumavky byly centrifugovány 30 s při 9960 g. Supernatant byl nepipetován do čisté zkumavky. K 300 μ l supernatantu bylo přidáno 5 μ l 30 mM NADH a enzym LDH (0,1 mg/ml). Po promíchání a krátké centrifugaci bylo z každé zkumavky napipetováno třikrát 100 μ l do mikrotitrační destičky. V přítomnosti pyruvátu jakožto substrátu a NADH jakožto kofaktoru katalyzuje LDH přeměnu pyruvátu na laktát za vzniku NAD. Právě NAD poté umožňuje celou reakci detekovat měřením absorbance při 340 nm. Tato vlnová délka odpovídá absorpci molekuly NADH, tudíž byla aktivita vyhodnocována jako pokles absorbance ve vzorcích ku absorbanci v blanku.



Obrázek 8 – Schéma defosforylace a detekce PEP.

Peptidy

Pho15p po dialýze byla imobilizována na nosiči (viz 4.3.1). Po promytí byl k 20 μ l nosiče přidán pufr (pro CaPho15 50 mM Tris-Cl pH = 8.3, 10 mM MgCl₂, nebo 10 mM MnCl₂, nebo 10 mM CoCl₂; pro CpPho15 50 mM Tris-Cl pH = 8.0, 10 mM MgCl₂, nebo 1 mM MnCl₂, nebo 1 mM CoCl₂) s rozpuštěným substrátem (75 pmol směsi fosfopeptidů). Následovala inkubace na rotátoru při 37°C. 20 μ l supernatantu bylo odebráno po 10, 20, 30, 60, 120 a 300 minutách. Reakce byly vždy ihned zastaveny přidáním 3 μ l 5% TFA. Vzorky byly odsoleny a analyzovány (Thermo Scientific MALDI-LTQ Orbitrap XL).

Tato měření zhotovoval a vyhodnocoval Mgr. Rudolf Kupčík.

4.6.3. Vyhodnocení spektrofotometrických měření

Při stanovování optim aktivity enzymů Pho15p a při testování aktivity v přítomnosti PNPS a PEP byly vzorky i blanky pipetovány do mikrotitrační destičky vždy v triplicátech. Naměřené hodnoty byly aritmeticky zprůměrovány a následně byla hodnota blanku odečtena od hodnoty vzorku. V případě PEPu byl naopak sledován pokles absorbance ve vzorku ku absorbanci v blanku. Aby bylo možné porovnávat hodnoty z jednotlivých měření, bylo třeba hodnoty vyjádřit relativně. Nejvyšší hodnota každého měření byla položena rovno jedné a ostatní hodnoty byly pode tohoto vztahu přepočteny. Následně byly příslušné hodnoty opět zprůměrovány, adekvátně porovnány s blankem a vyneseny do grafu. Směrodatná odchylka byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (v_i - \bar{v})^2}{N - 1} - \frac{\sum_{i=1}^N (b_i - \bar{b})^2}{N - 1}}$$

s je zde hodnota směrodatné odchylky, N je celkový počet hodnot, i je index dané hodnoty, v je hodnota vzorku, \bar{v} je aritmetický průměr všech hodnot vzorku, b je hodnota blanku a \bar{b} je aritmetický průměr všech hodnot blanku.

4.7. Spektroskopie cirkulárního dichroismu

Spektroskopie cirkulárního dichroismu (CD) využívá rozdílu absorpce levotočivě polarizované elektromagnetické vlny dané vlnové délky a pravotočivě polarizované elektromagnetické vlny o stejné vlnové délce, který vzniká při průchodu chirální látkou.

Elektromagnetické vlnění se skládá ze dvou složek – elektrické a magnetické, které oscilují ve fázi a jsou od sebe v prostoru otočené o 90°. Cirkulárně polarizovaná elektromagnetická vlna je taková vlna, ve které směr vektoru elektrické složky rovnoměrně rotuje v čase, zatímco velikost vektoru zůstává stále stejná. Zároveň, v každém bodě takto vytvořené křivky osciluje podle stejného vzoru i magnetická složka, pouze je kolmá na směr elektrické složky. Takováto vlna může být buďto pravotočivá, nebo levotočivá. Pokud obě složky složíme, získáme lineárně polarizovanou elektromagnetickou vlnu.

Elektromagnetické vlnění se ve spektrometru polarizuje při průchodu vhodnými hranoly nebo filtry. Jeho elektrické pole bude poté oscilovat v jedné rovině jako sinusoida. Toto vlnění je pomocí dalšího krystalu nebo elektrického zařízení rozloženo na dvě cirkulární složky – pravotočivou a levotočivou. Při průchodu opticky aktivním materiálem je jedna složka zpomalena více než druhá na základě struktury testovaného materiálu. Elektromagnetické vlnění je na konci detekováno. Metodu lze využít ke stanovení sekundární struktury proteinů [31].

4.8. Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) je spektroskopická metoda. Při absorpci infračerveného záření dochází ke změnám rotačních a vibračních módů molekul. Různé substituenty absorbují při charakteristických vlnových délkách. V případě metody infračervené spektroskopie dochází k vyzáření vlnění o různých vlnových délkách najednou. Tento krok je opakován, dokud není pokryto požadované spektrum. Poté se pomocí Fourierovy transformace data převedou do spojitého spektra. Metodu lze využít ke stanovení sekundární struktury proteinů [32].

4.8.1. Zeslabený úplný odraz

Zeslabený úplný odraz (ATR) je analytická spektroskopická metoda, která umožňuje zjednodušit přípravu vzorku. Při běžné spektroskopii prochází paprsek přímo skrz vzorek.

U kapalných a tuhých vzorků je spektrum absorpce ovlivněno jejich tloušťkou, takže nemohou být silnější než desetiny mikrometru. Z tuhých vzorků musí být zhotovena pasta, z kapalných vzorků se vytváří tenký film. Takto připravený materiál je nanesen mezi transparentní látku a poté je možné měřit.

Během ATR prochází infračervený paprsek nejprve skrz krystal s vysokým indexem lomu. Díky tomuto vnitřnímu lomu dochází ke vzniku evanescentní vlny, která je odražena a prochází krystalem do vzorku. Proniká maximálně do hloubky 5 μm , proto je důležité, aby byl vzorek v těsném kontaktu s krystalem. Absorpci části infračerveného záření vzorkem dojde k pozměnění vlny, která se opět vrací do krystalu. Na konci se nachází detektor [33].

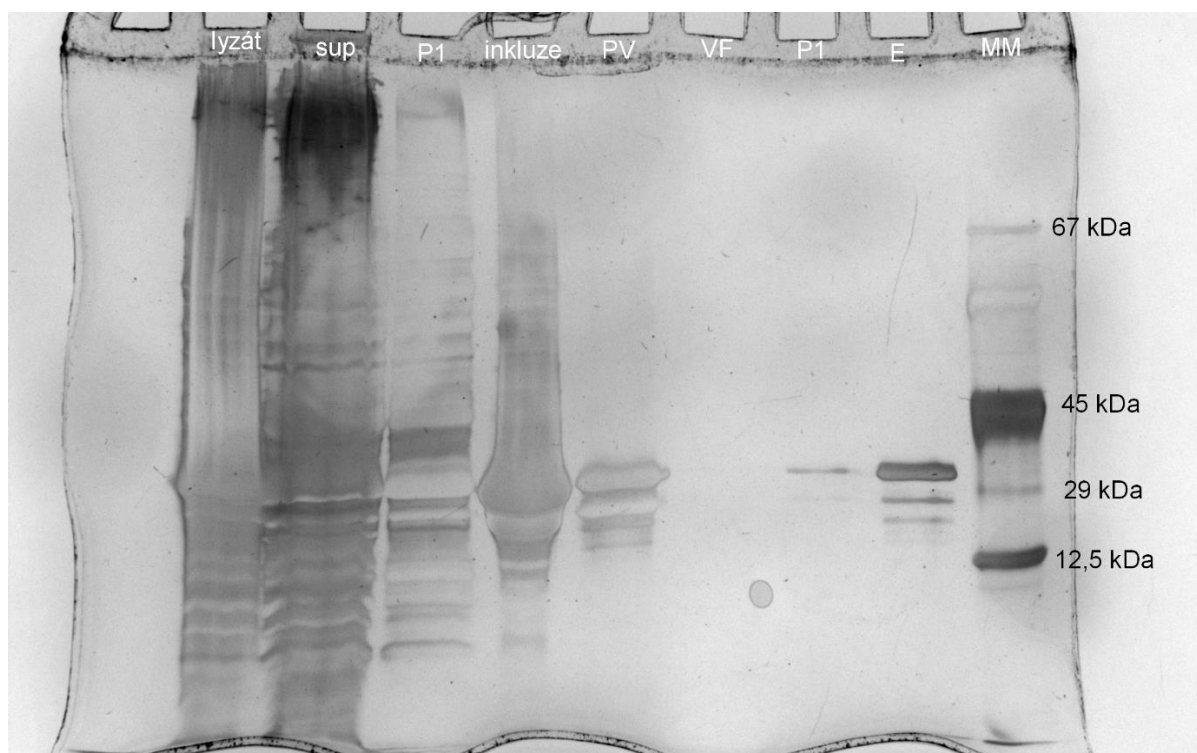
Konkrétní postup

FTIR úplného zeslabeného obrazu byl změřen na Nicolet 6700 spectrometer (Thermo Scientific USA). Pro každé měření bylo aplikováno 10 μl vzorku (NiNTA s imobilizovanou Pho15p nebo NiNTA). Vzorek byl vysušen dusíkem. Pro obě spektra byl odečten signál výparu vody. Výsledné spektrum bylo zhotoveno jako rozdíl mezi nosičem NiNTA s imobilizovanou Pho15p a čistého nosiče NiNTA.

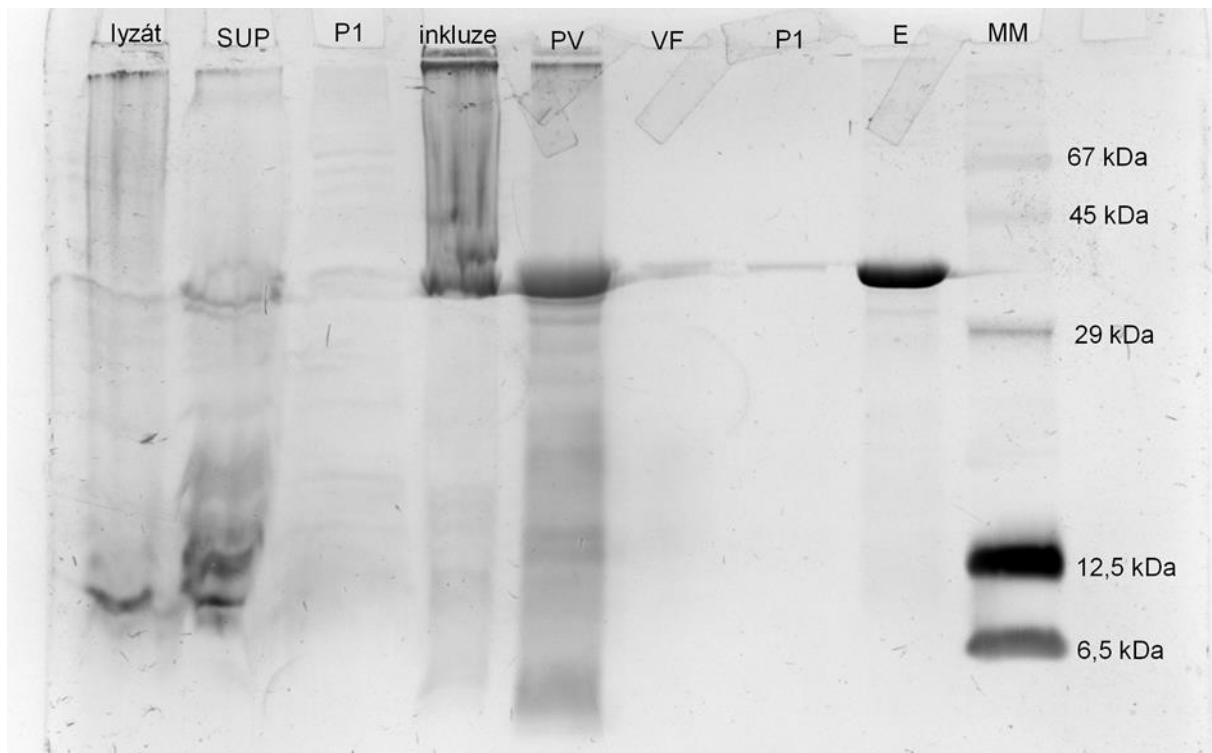
Měření byla prováděna s RNDr. Lucií Bednárovou, CSc., která zhotovila vyhodnocení získaných dat.

5. VÝSLEDKY

Aby bylo možné proteiny Pho15p charakterizovat, bylo nejprve nutné vytvořit funkční expresní a izolační systém. Hlavní překážku představoval fakt, že se proteiny ukládaly do inkluzních tělísek, která bylo potřeba solubilizovat. Při použití močoviny proteiny z roztoku precipitovaly. V případě využití dvouplazmidového systému, kdy druhý plazmid nesl geny kódující chaperony, zůstávaly fosfatázy Pho15p v cytosolu hostitelských buněk. Během purifikace ovšem došlo k jejich precipitaci. To mohlo být zapříčiněno přítomností jiných cytosolárních proteinů, které mohly svou precipitací vyvolat precipitaci Pho15p. Třetí variantou byla solubilizace inkluzních tělísek v kyselině octové a následná dialýza vodou. Tato cesta se jevila jako nejvíce funkční. Kultivace, indukce exprese, izolace a renaturace inkluzních tělísek jsou popsány v části 4. Metody. Následovala purifikace metodou vsádkové afinitní chromatografie. Pho15p byly díky histidinové kotvě imobilizovány na nosiči a po promytí eluovány 300 mM imidazolem (Obrázek 9 a 10).

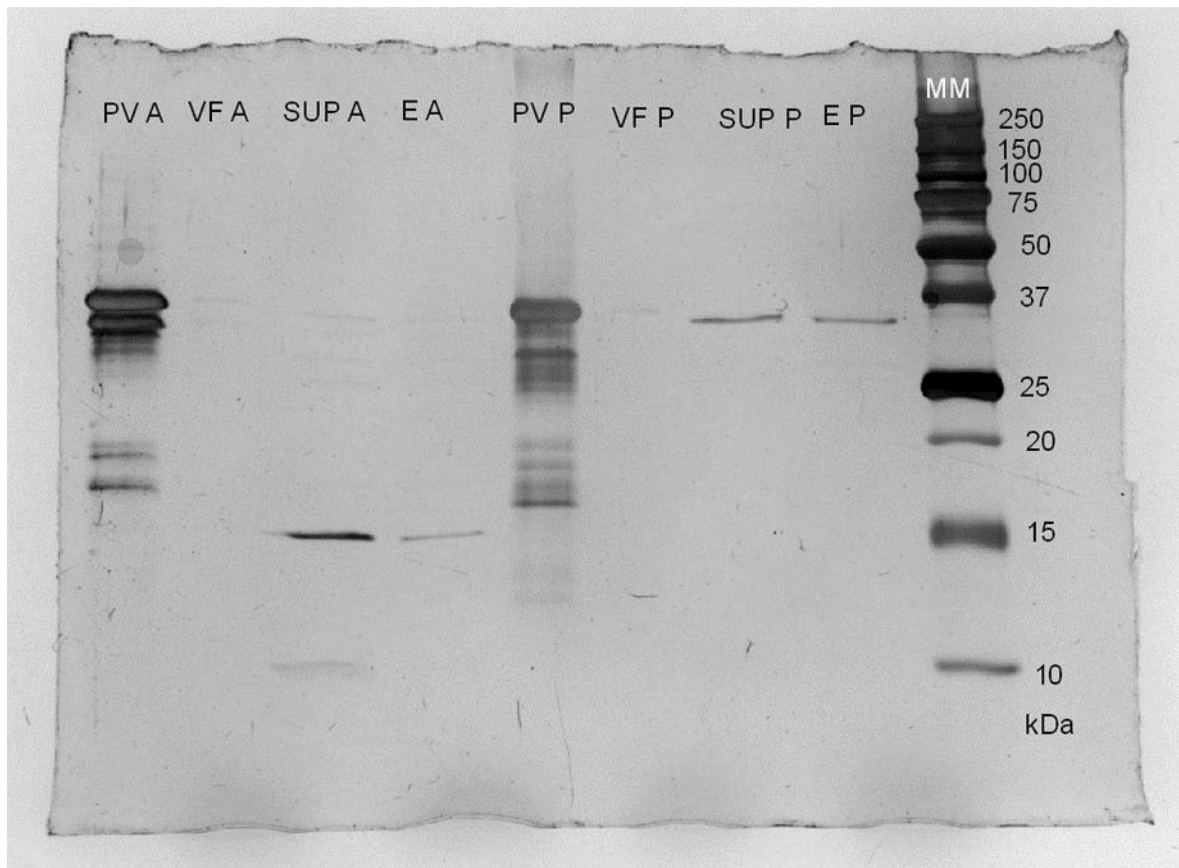


Obrázek 9 – SDS-PAGE izolace a afinitní purifikace Pho15p *C. albicans*. **Lyzát:** vzorek buněčného lyzátu po inkubaci s lysozymem a sonikací. **Sup:** vzorek supernatantu po centrifugaci buněčného lyzátu. **P1:** vzorek 1. promytí inkluzních tělísek. **Inkluz:** Vzorek inkluzních tělísek po promytí. **PV:** solubilizovaný vzorek Pho15p po dialýze s 10 mM imidazolem. **VF:** vzorek vazebné frakce po inkubaci s nosičem. **P1:** vzorek 1. promytí nosiče s imobilizovanou Pho15p. **E:** vzorek eluční frakce. **MM:** molekulový marker.



Obrázek 10 - SDS-PAGE izolace a afinitní purifikace Pho15p *C. parapsilosis*. **Lyzát:** vzorek buněčného lyzátu po inkubaci s lysozymem a sonikaci. **SUP:** vzorek supernatantu po centrifugaci buněčného lyzátu. **P1:** vzorek 1. promytí inkluzních tělísek. **Inkluze:** vzorek inkluzních tělísek po promytí. **PV:** solubilizovaný vzorek Pho15p po dialýze s 10 mM imidazolem. **VF:** vzorek vazebné frakce po inkubaci s nosičem. **P1:** vzorek 1. promytí nosiče s imobilizovanou Pho15p. **E:** vzorek eluční frakce. **MM:** molekulový marker.

Vzhledem k tomu, že imidazol je inhibítozem fosfatáz, nebylo možné získávat solubilní Pho15p eluci za použití koncentrovaného roztoku imidazolu. Konstrukce vektoru umožňovala odštěpení Pho15p od His kotvy pomocí trombinu. V případě CaPho15p docházelo ovšem ke štěpení samotné fosfatázy (Obrázek 10). U CpPho15p se odštěpovala správně (Obrázek 11), což bylo i experimentálně ověřeno pomocí Western Blotu (viz 4.4.2., Obrázek 12), ovšem koncentrace proteinu v získané frakci byla nízká. Navíc mohlo dojít k poškození proteinu pufrem pro trombin (viz 4.3.1.). V obou případech byl na nosič ještě aplikován eluční roztok s imidazolem (viz 4.3.1.). Lze vidět, že část odštěpeného proteinu zůstává uvízlá v nosiči.

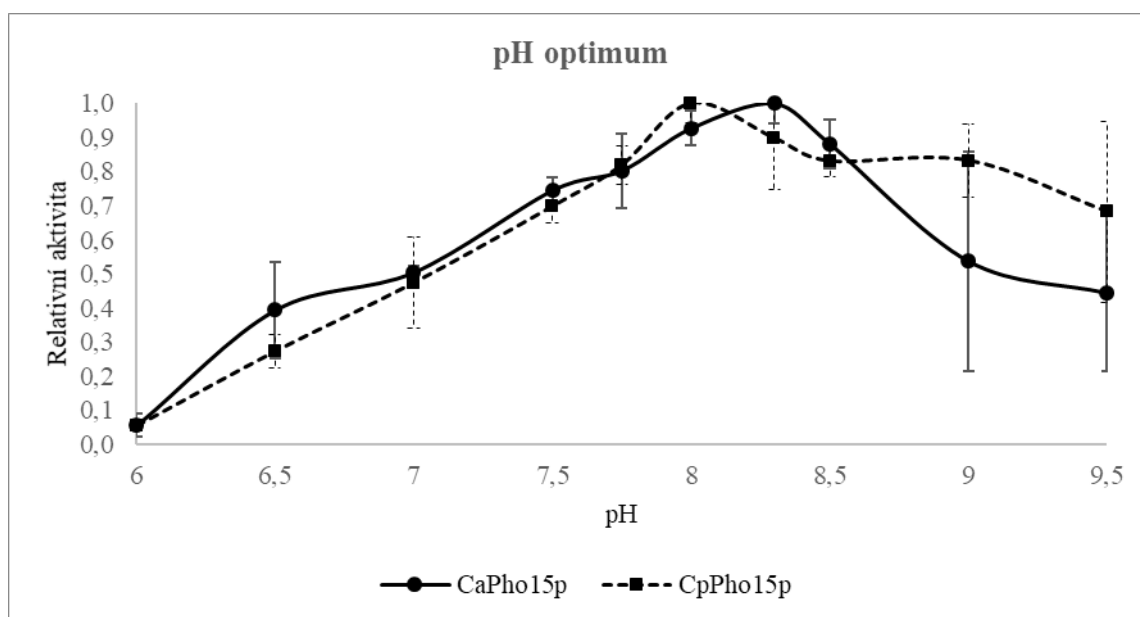


Obrázek 11 - SDS-PAGE afinitní chromatografie s odštěpením trombinem. PV A: solubilizovaný vzorek CaPho15p po dialýze s 10 mM imidazolem. **VF A:** vzorek vazebné frakce CaPho15p po inkubaci s nosičem. **SUP A:** vzorek supernatantu po inkubaci CaPho15p s trombinem. **EA:** vzorek eluční frakce CaPho15p. **PV P:** solubilizovaný vzorek CpPho15p po dialýze s 10mM imidazolem. **VF P:** vzorek vazebné frakce CpPho15p po inkubaci s nosičem. **SUP P:** vzorek supernatantu po inkubaci CpPho15p s trombinem. **EP:** vzorek eluční frakce CpPho15p. **MM:** molekulový marker.

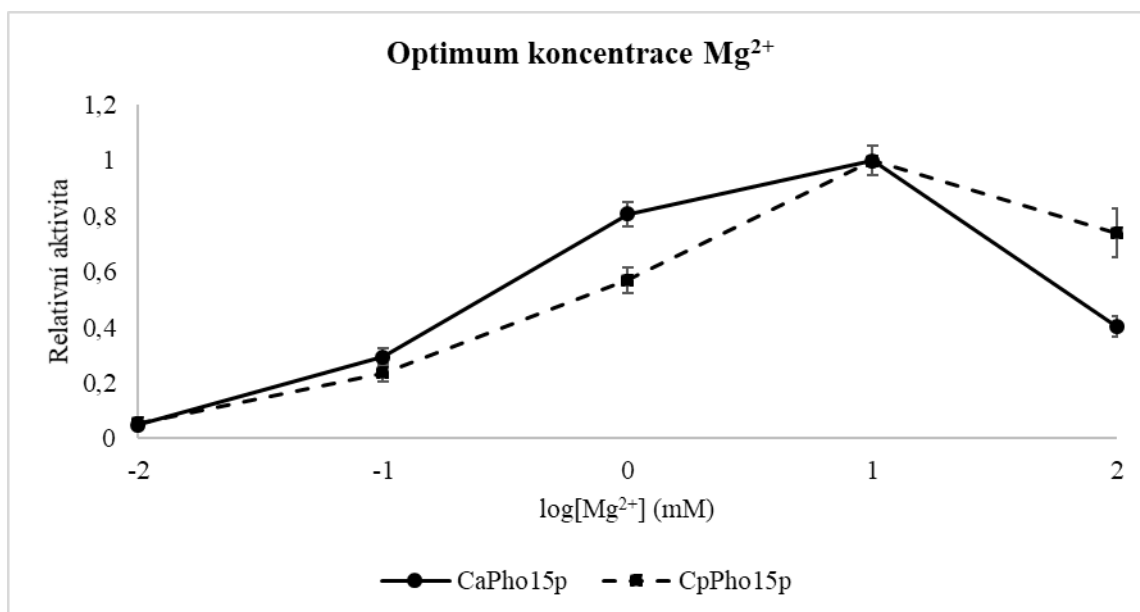


Obrázek 12 - Western Blot a chemiluminiscenční detekce. PV A: solubilizovaný vzorek CaPho15p po dialýze s 10 mM imidazolem. VF A: vzorek vazebné frakce CaPho15p po inkubaci s nosičem. SUP A: vzorek supernatantu po inkubaci CaPho15p s trombinem. EA: vzorek eluční frakce CaPho15p. PV P: solubilizovaný vzorek CpPho15p po dialýze s 10 mM imidazolem. VF P: vzorek vazebné frakce CpPho15p po inkubaci s nosičem. SUP P: vzorek supernatantu po inkubaci CpPho15p s trombinem. EP: vzorek eluční frakce CpPho15p. MM: molekulový marker.

Z těchto důvodů probíhala veškerá měření aktivit s Pho15p imobilizovanými na nosiči. Pro CaPho15p bylo stanoveno optimální pH 8,3; pro CpPho15p 8,0 (viz Obrázek 13). Optimální koncentrace Mg^{2+} kationtů byla stanovena jako 10mM/litr (viz Obrázek 14).

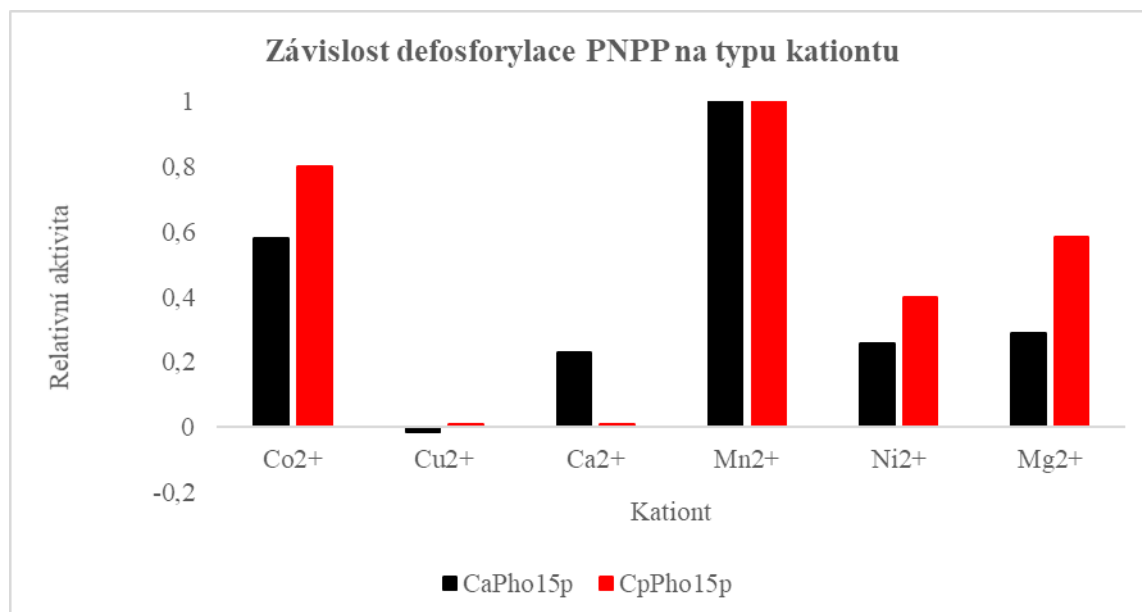


Obrázek 13 – pH optimum pro defosforylaci enzymem Pho15p.



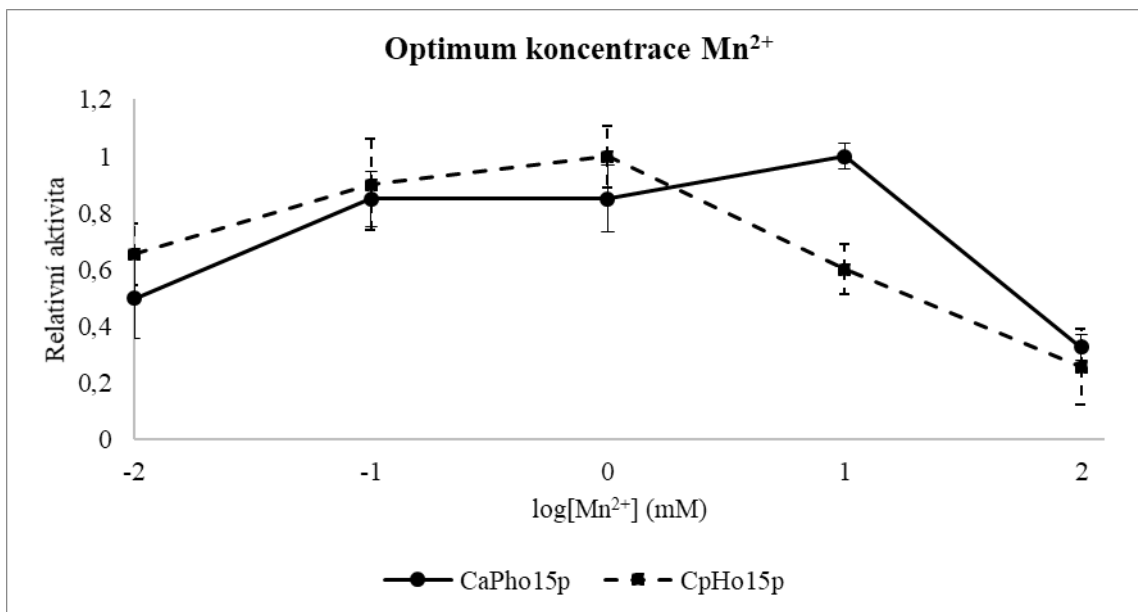
Obrázek 14 - Optimum koncentrace hořečnatých kationtů pro defosforylaci enzymem Pho15p.

Kromě hořčíku, který je běžným kofaktorem fosfatáz, byly vyzkoušeny jiné dvojmocné kovy. Vysoká aktivita byla detekována v přítomnosti Mn²⁺ a Co²⁺ iontů (viz Obrázek 15).

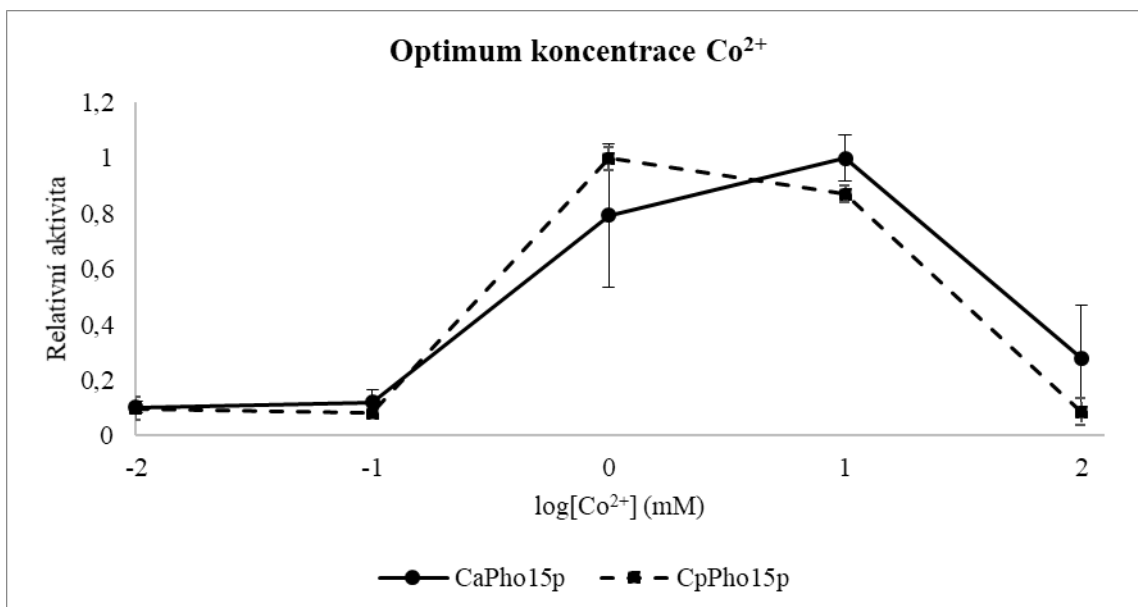


Obrázek 15 - Závislost defosforylace PNPP enzymem Pho15p na typu kationtu.

Pro CaPho15p bylo stanoveno optimum koncentrace Mn²⁺ i Co²⁺ kationtů jako 10 mM/l, pro CpPho15p je optimální koncentrace Mn²⁺ a Co²⁺ 1 mM/l (viz Obrázek 16 a Obrázek 17).

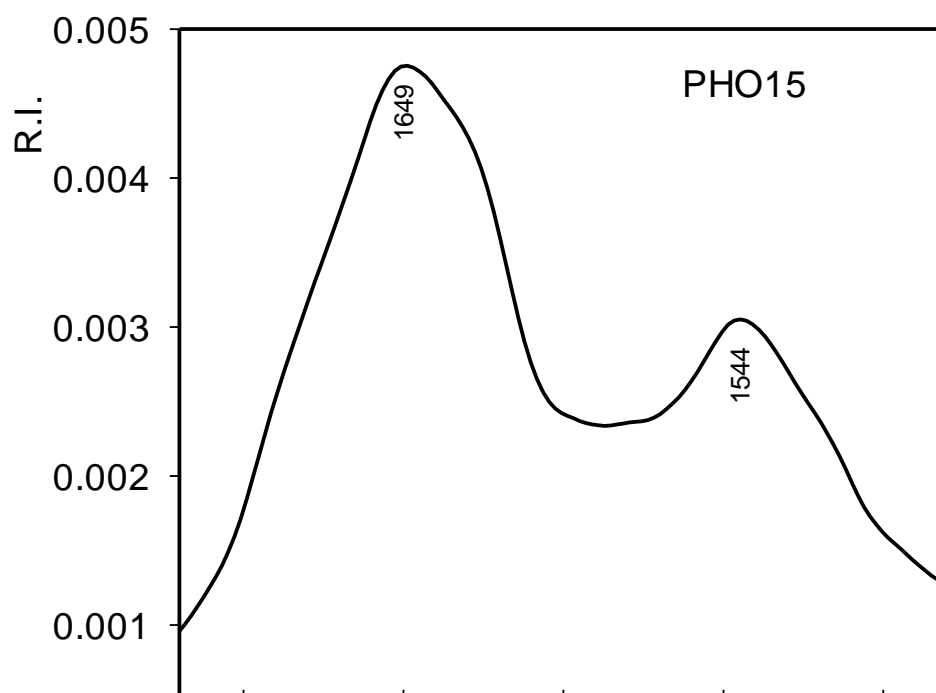
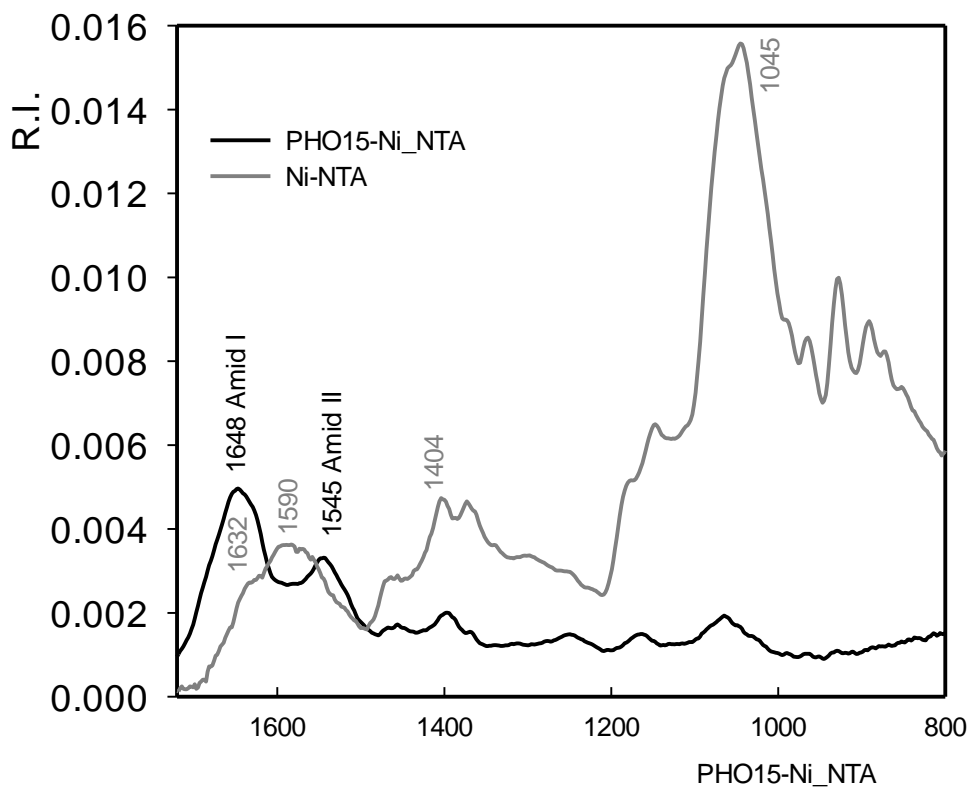


Obrázek 16 - Optimum koncentrace manganatých kationtů pro defosforylaci enzymem Pho15p.



Obrázek 17 - Optimum koncentrace kobaltnatých kationtů pro defosforylaci enzymem Pho15p.

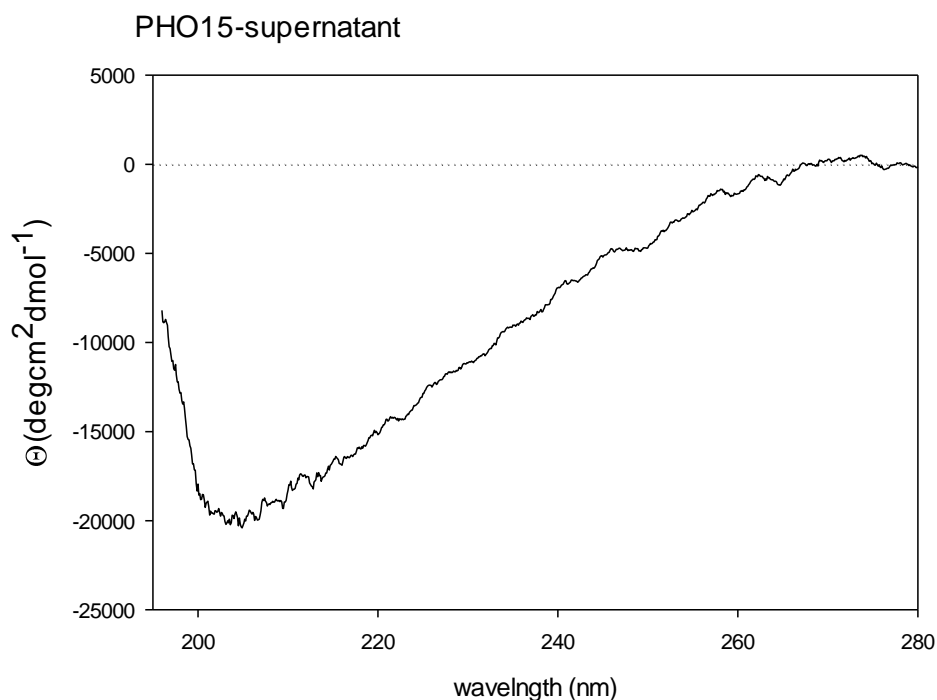
Analýzou FTIR (viz 4.8.) bylo zjištěno, že Pho15p imobilizovaná na nosiči NiNTA z části zaujímá sekundární strukturu β -skládaných listů (Obrázek 18).



Obrázek 18 - FTIR spektrum analýzy Pho15p analyzované na nosiči Ni-NTA (zhotovila RNDr. Lucie Bednářová, CSc.).

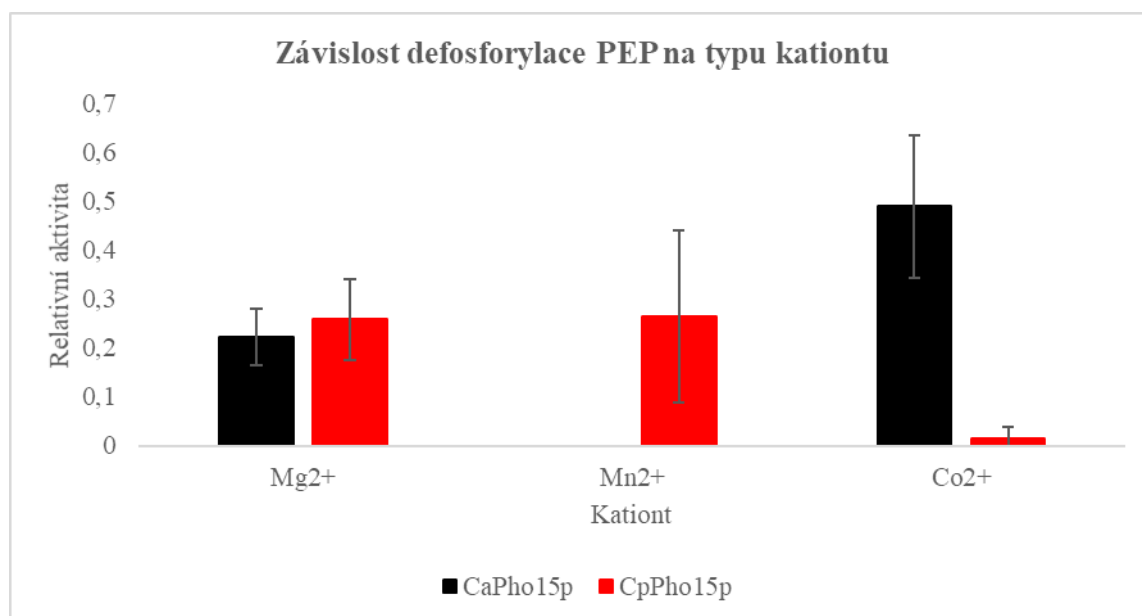
Analýze CD (viz 4.7.) byla podrobena frakce CpPho15p po odštěpení trombinem. V kombinaci s analýzou aminokyselin bylo zjištěno, že 25% z tohoto vzorku zaujímají α -

helixy, 15% β -skládané listy, 32% očky (angl. turn) a 29% náleží neuspořádaným strukturám (Obrázek 18).



Obrázek 19 - CD spektrum Pho15p odštěpené od nosiče trombinem (zhotovila RNDr. Lucie Bednářová, CSc.).

Ani u jednoho enzymu Pho15p nebyla prokázána desulfurylační aktivita ani defosforylace bílkovin. Bylo prokázáno, že obě Pho15p defosforylují PEP.



Obrázek 20 - Graf závislosti defosforylace PEP na typu kationtu

6. ZÁVĚR A DISKUZE

Cílem této práce bylo charakterizovat proteiny Pho15p, které jsou kódované genem *PHO15* patogenních kvasinek *C. albicans* a *C. parapsilosis*. Sekvence genomů obou kvasinek je známa, avšak existuje mnoho otevřených čtecích rámců, jejichž funkce nebyla nikdy experimentálně ověřena. *C. albicans* i *C. parapsilosis* způsobují problémy především v nemocnicích, kde napadají imunitně oslabené jedince, které mohou až zahubit. Studium nepopsaných částí genomu těchto patogenů je tedy důležitou součástí základního výzkumu a může přispět k odhalení důležitých faktorů, které by mohly pomoci při vývoji léčiv.

Východiskem bylo, že otevřený čtecí rámec *PHO15* kóduje fosfatázy. Tento předpoklad byl založen na základě homologie genu *PHO15* s genem *PHO13* kvasinky *S. cerevisiae*. *PHO13* je anotována jako alkalická fosfatáza a její funkce byla experimentálně ověřena. Je nutné podotknout, že *PHO15* i *PHO13* jsou, na základě jejich sekvencí, spíše fosfatázy patřící do rodiny HAD enzymů.

Enzymy Pho15p byly připravovány rekombinantně. Již před začátkem mé práce byly *PHO15* z obou kvasinek vloženy do vektoru pET28b. Ten byl poté transformován do bakterií *E. coli* BL21(DH3). Při dostatečném nárůstu kultury byla zahájena exprese genu *PHO15* přidáním IPTG. Vzhledem k silnému promotoru vektoru docházelo k vytvoření velkého množství proteinu, který se ukládal do inkluzních tělísek. Tyto agregáty bylo potřeba solubilizovat tak, aby proteiny přešly do nativní formy. Toho bylo nakonec docíleno 60% kyselinou octovou a následnou dialýzou do vody. Konstrukt vektoru byl navržen tak, aby vzniklé Pho15p obsahovaly histidinovu kotvu na svém N-konci. To umožnilo purifikaci Pho15p metodou afinitní chromatografie. Problém nastal ve chvíli, kdy bylo potřeba adsorbované proteiny z nosiče převést opět do roztoku. Eluce imidazolem se ukázala jako nemožná, neboť imidazol inhibuje funkci fosfatáz. Eluce snížením či zvýšením pH se též ukázala jako neúčinná. Další možností bylo odštěpit Pho15p od histidinové kotvy pomocí trombinu. Výtěžky ovšem nebyly příliš vysoké, navíc kvůli dlouhé inkubaci ve vysokém pH, které trombin potřeboval, mohlo pravděpodobně dojít k poškození Pho15p. V případě CaPho15p dokonce docházelo k naštěpení samotného rekombinantního proteinu. Z těchto důvodů byly proteiny nakonec ponechány nosiči. Imobilizace zabránila precipitaci enzymů, které navíc v takovémto stavu vykazovaly vysokou aktivitu a zároveň bylo ověřeno, že zůstávají stabilně imobilizované po dobu minimálně 1 měsíce.

Defosforylační funkce byla prokázána chromogenním nebílkovinným substrátem PNPP, který se běžně používá při ověřování defosforylační funkce. Obdobně byla otestována i desulfurylační aktivita na substrátu PNPS, která se ovšem nepotvrdila.

Před samotným testováním substrátové specifity byla stanovena pH optima a optima koncentrace kofaktorů. Ukázalo se, že kromě hořčičných kationtů, které jsou standardními kofaktory fosfatáz, probíhá defosforylace ve vysoké míře v přítomnosti manganatých a kobaltnatých kationtů. Rozdílné optimální koncentrace těchto iontů navíc naznačují, že

struktura aktivních míst CaPho15p a CpPho15p by mohla být odlišná. Přesné hodnoty všech optimálních hodnot jsou zaznamenány v části Výsledky. Na základě těchto hodnot byla poté otestována defosforylace přirozených substrátů, které lze nalézt v živých buňkách. Výběr substrátů byl založen především na literatuře týkající se enzymu Pho13p kvasinky *S. cerevisiae*. Zatímco defosforylace proteinů nebyla potvrzena, opakovaně se potvrdila defosforylace PEP. Tato malá organická molekula je součástí glykolýzy a glukoneogeneze, což by mohlo naznačovat, že se Pho15p účastní na energetickém hospodaření buňky, dokonce by mohla spadat do kategorie tzv. „metabolite repair enzymes“. Jejich úlohou je degradace vedlejších produktů metabolismu, které jsou ve vyšších koncentracích toxické. Tato funkce byla nedávno dokumentována u homologního enzymu Pho13p [38].

Nyní pracuji na stanovení kinetických parametrů defosforylace PEP. Dalšími kroky bude otestování dalších substrátů cukernatého charakteru, jako je fosfoglykolát nebo glycerolfosfát. V úvahu připadají nukleotidy a také fosfoerytronát, který vzniká jako vedlejší produkt metabolismu. V případě, že se u některé z těchto molekul defosforylace potvrdí, bude možné substráty navzájem porovnat.

7. POUŽITÉ ZDROJE

- [1] BONDARYK, Małgorzata, Wiesław KURZAŃKOWSKI a Monika STANISZEWSKA. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. *Advances in Dermatology and Allergology* [online]. 2013, 5, 293-301 [cit. 2017-10-07]. DOI: 10.5114/pdia.2013.38358. ISSN 1642-395x. Dostupné z: <http://www.termedia.pl/doi/10.5114/pdia.2013.38358>
- [2] WEIG, Michael a Alistair J.P. BROWN. Genomics and the development of new diagnostics and anti-*Candida* drugs. *Trends in Microbiology* [online]. 2007, 15(7), 310-317 [cit. 2017-10-07]. DOI: 10.1016/j.tim.2007.05.007. ISSN 0966842x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X07001060>
- [3] GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*. [online]. 2014, 20, 5-10 [cit. 2017-10-07]. DOI: 10.1111/1469-0691.12539. ISSN 1198743x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14603268>
- [4] JONES, T., N. A. FEDERSPIEL, H. CHIBANA, et al. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2004, 101(19), 7329-7334 [cit. 2017-10-07]. DOI: 10.1073/pnas.0401648101. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0401648101>
- [5] BUTLER, Geraldine, Matthew D. RASMUSSEN, Michael F. LIN, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* [online]. 2009, 459(7247), 657-662 [cit. 2017-10-07]. DOI: 10.1038/nature08064. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature08064>
- [6] TULEVA, Boriyana, Evgenia VASILEVA-TONKOVA a Danka GALABOVA. A specific alkaline phosphatase from *Saccharomyces Cerevisiae* with protein phosphatase activity. *FEMS Microbiol Lett.* [online]. 1998, 161(1), 139-144 [cit. 2017-10-07]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12940.x/abstract;jsessionid=2D5D1B6BEF58EC87DCC16D331FF32992.f04t01>
- [7] HARDIE, D. G. Protein phosphorylation: a practical approach. *New York: Oxford University Press*, 1993. ISBN 0199633053.
- [8] KUZNETSOVA, Ekaterina, Boguslaw NOCEK, Greg BROWN, et al. Functional Diversity of Haloacid Dehalogenase Superfamily Phosphatases from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2015, 290(30), 18678-18698 [cit. 2017-10-07]. DOI: 10.1074/jbc.M115.657916. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M115.657916>
- [9] ENJALBERT, B. Role of the Hog1 Stress-activated Protein Kinase in the Global Transcriptional Response to Stress in the Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 2005, 17(2), 1018-1032 [cit. 2017-10-07]. DOI: 10.1091/mbc.E05-06-0501. ISSN 1059-1524. Dostupné z: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E05-06-0501>

- [10] HNISZ, Denes, Tobias SCHWARZMÜLLER a Karl KUCHLER. Transcriptional loops meet chromatin: a dual-layer network controls white-opaque switching in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*. [online]. 2009, 74(1), 1-15 [cit. 2017-10-07]. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06772.x. ISSN 0950382x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2009.06772.x>
- [11] DING, Chen, Genevieve M. VIDANES, Sarah L. MAGUIRE, Alessandro GUIDA, John M. SYNNOTT, David R. ANDES, Geraldine BUTLER a Robert Alan ARKOWITZ. Conserved and Divergent Roles of Bcr1 and CFEM Proteins in *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *PLoS ONE* [online]. 2011, 6(12), e28151- [cit. 2017-10-07]. DOI: 10.1371/journal.pone.0028151. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0028151>
- [12] SEIFRIED, Annegrit, Jörg SCHULTZ a Antje GOHLA. Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease. *FEBS Journal* [online]. 2013, 280(2), 549-571 [cit. 2017-10-07]. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08633.x. ISSN 1742464x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2012.08633.x>
- [13] BURROUGHES, A. Maxwell, Karen N. ALLEN, Debra DUNAWAY-MARIANO a L. ARAVIND. Evolutionary Genomics of the HAD Superfamily: Understanding the Structural Adaptations and Catalytic Diversity in a Superfamily of Phosphoesterases and Allied Enzymes. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2006, 361(5), 1003-1034 [cit. 2017-10-07]. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.06.049. ISSN 00222836. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283606007777>
- [14] O'BRIEN, Patrick J. a Daniel HERSCHLAG. Alkaline Phosphatase Revisited: Hydrolysis of Alkyl Phosphates. *Biochemistry* [online]. 2002, 41(9), 3207-3225 [cit. 2017-10-07]. DOI: 10.1021/bi012166y. ISSN 0006-2960. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi012166y>
- [15] DEMAİN, Arnold L. a Preeti VAISHNAV. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* [online]. 2009, 27(3), 297-306 [cit. 2017-10-07]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008. ISSN 07349750. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975009000202>
- [16] KUCIEL, Jiří a Tomáš URBAN. *Principy genetiky*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2016. ISBN 9788075093851.
- [17] RUMML, Tomáš. *Laboratoře z genového inženýrství*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1997. ISBN 8070803002.
- [18] BERROW, Nick S., David ALDERTON a Raymond J. OWENS. The Precise Engineering of Expression Vectors Using High-Throughput In-Fusion™ PCR Cloning. *High Throughput Protein Expression and Purification* [online]. Doyle S.A.: Humana Press, 2009, s. 75-90 [cit. 2017-10-07]. DOI: 10.1007/978-1-59745-196-3_5. ISBN 978-1-58829-879-9. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-196-3_5
- [19] SINGH, Anupam, Vaibhav UPADHYAY, Arun Kumar UPADHYAY, Surinder Mohan SINGH a Amulya Kumar PANDA. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories* [online]. 2015,

14(1), - [cit. 2017-10-08]. DOI: 10.1186/s12934-015-0222-8. ISSN 1475-2859. Dostupné z: <http://www.microbialcellfactories.com/content/14/1/41>

[20] Od exocytózy po ekologii. SMYČKOVÁ, Marie, Daniel BOHUTÍNSKÝ, Jan ČERNÝ, et al. *Když musíš, tak musíš.. aneb Odpady v přírodě*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, Ústřední komise Biologické olympiády, 2017, s. 23. ISBN 978-80-213-2770-2.

[21] MANCHENKO, Gennady P. *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c1994. ISBN 978-0-8493-8935-1.

[22] Protein Expression - E.coli - In vitro denaturation and refolding - EMBL. *EMBL - European Molecular Biology Laboratory* [online]. Heidelberg: EMBL, 2017 [cit. 2017-10-08]. Dostupné z: https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_expression/ecoli/denaturation/

[23] YAMAGUCHI, Hiroshi a Masaya MIYAZAKI. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules* [online]. 2014, 4(1), 235-251 [cit. 2017-10-08]. DOI: 10.3390/biom4010235. ISSN 2218-273x. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2218-273X/4/1/235/>

[24] LICHTY, Jordan J., Joshua L. MALECKI, Heather D. AGNEW, Daniel J. MICHELSON-HOROWITZ a Song TAN. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression and Purification* [online]. 2005, 41(1), 98-105 [cit. 2017-10-08]. DOI: 10.1016/j.pep.2005.01.019. ISSN 10465928. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592805000276>

[25] YANG, Ping-Chang a Tahrin MAHMOOD. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* [online]. 2012, 4(9), 429- [cit. 2017-10-08]. DOI: 10.4103/1947-2714.100998. ISSN 1947-2714. Dostupné z: <http://www.najms.org/text.asp?2012/4/9/429/100998>

[26] LOHSE, Matthew B a Alexander D JOHNSON. White–opaque switching in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2009, 12(6), 650-654 [cit. 2017-11-28]. DOI: 10.1016/j.mib.2009.09.010. ISSN 13695274. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527409001441>

[27] LORENZ, Ulrike. Protein Tyrosine Phosphatase Assays. COLIGAN, John E., Barbara E. BIERER, David H. MARGULIES, Ethan M. SHEVACH a Warren STROBER, ed. *Current Protocols in Immunology* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2001 [cit. 2017-12-10]. DOI: 10.1002/0471142735.im1107s93. ISBN 0471142735. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142735.im1107s93>

[28] 100-02-7 CAS | p-NITROPHENOL INDICATOR | pH Indicator (Solid) | Article No. 05010. *Laboratory Chemicals, Lab Chemicals, Analytical Reagents, Laboratory Reagents, Lab Reagents, and Fine Chemicals from Loba Chemie Pvt. Ltd., Mumbai, India* [online]. Mumbai, India: Loba Chemie Pvt., c2017 [cit. 2017-12-10]. Dostupné z: <https://www.lobachemie.com/pH-Indicator-05010/pNITROPHENOL-INDICATOR-CASNO-100-02-7.aspx>

[29] SMITH, P.K., R.I. KROHN, G.T. HERMANSON, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* [online]. 1985, 150(1), 76-85 [cit. 2018-02-16].

DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7. ISSN 00032697. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269785904427>

[30] BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* [online]. 1976, 72(1-2), 248-254 [cit. 2018-02-16]. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3. ISSN 00032697. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>

[31] PELTON, John T. a Larry R. MCLEAN. Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure. *Analytical Biochemistry* [online]. 2000, 277(2), 167-176 [cit. 2018-02-17]. DOI: 10.1006/abio.1999.4320. ISSN 00032697. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269799943208>

[32] BYLER, D. Michael a Heino SUSI. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* [online]. 1986, 25(3), 469-487 [cit. 2018-02-17]. DOI: 10.1002/bip.360250307. ISSN 0006-3525. Dostupné z:
<http://doi.wiley.com/10.1002/bip.360250307>

[33] FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR). In: [Http://www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com) [online]. Shelton: PerkinElmer Life and Analytical Sciences, c1998-2018 [cit. 2018-02-18]. Dostupné z:
https://web.archive.org/web/20070216065646/http://las.perkinelmer.com/content/TechnicalInfo/TCH_FTIRATR.pdf

[34] KOLÁŘ, Karel, Milan KODÍČEK a Jiří POSPÍŠIL. *CHEMIE II pro gymnázia*. Druhé, upravené a doplněné vydání. Jinonická 80, Praha 5: SPN - pedagogické nakladatelství, akciová společnost, 2005. ISBN 80-7235-283-0.

[35] MAREČEK, Aleš a Jaroslav HONZA. *CHEMIE pro čtyřletá gymnázia: 3. díl*. Lazecká 70a, 77900 Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2005. ISBN 8071820571.

[36] Isotopes and mass spectrometry. In: *Khan Academy* [online]. c2018 [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/chemistry/atomic-structure-and-properties/mass-spectrometry/a/isotopes-and-mass-spectrometry>

[37] SMOLY, Ilan, Netta SHEMESH, Michal ZIV-UKELSON, Anat BEN-ZVI, Esti YEGER-LOTEM a David PENNY. An Asymmetrically Balanced Organization of Kinases versus Phosphatases across Eukaryotes Determines Their Distinct Impacts. *PLOS Computational Biology* [online]. 2017, 13(1), e1005221- [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005221. ISSN 1553-7358. Dostupné z:
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1005221>

[38] COLLARD, François, Francesca BALDIN, Isabelle GERIN, et al. A conserved phosphatase destroys toxic glycolytic side products in mammals and yeast. *Nature Chemical Biology* [online]. 2016, 12(8), 601-607 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1038/nchembio.2104. ISSN 1552-4450. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nchembio.2104>

Z přirozených substrátů bylo zatím zjištěno, že Pho15p defosforyluje fosfoenolpyruvát (PEP).

8. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 – Základní Rossmannova konformace HAD enzymů. Alfa helixy jsou znázorněny jako červené šroubovice. Beta skládané listy jsou znázorněny jako modré šípky. C-konec se nachází na vrcholu šípky. Žlutě je vyznačeno vlákno, kde se nachází aktivní místo. „Squiggle“ je znázorněn jako červená křivka nad žlutou šípkou. Zeleně je vyznačena cap doména C1, oranžově cap doména C2. Převzato a upraveno z [13]. **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 2 - Porovnání sekvencí Pho13p *S. cerevisiae* a Pho15p *C. albicans* a *C. parapsilosis*. Motiv I s aspartáty (DxD) je vyznačen tučně a podtrženě. Motivy II, III a IV jsou zvýrazněny. **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 3 – Schéma defosforylace. **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 4 – Strukturní vzorce substrátů. p-nitofenylfosfát (1); p-nitofenylsulfát (2); p-nitrofenol (3); p-nitrofenolát (4). **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 5 – Strukturní vzorce substrátů. Fosfoenolpyruvát (1); pyruvát (2). **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 6 – Strukturní vzorce fosfoaminokyselin. Fosfoserin (1), fosfotreonin (2), fosfotyrosin (3). **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 7 – Schéma vsádkové afinitní chromatografie s následnou elucí nebo štěpením trombinem **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 8 – Schéma defosforylace a detekce PEP. **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 9 – SDS-PAGE izolace a afinitní purifikace Pho15p *C. albicans*. Lyzát: vzorek buněčného lyzátu po inkubaci s lysozymem a sonikací. Sup: vzorek supernatantu po centrifugaci buněčného lyzátu. P1: vzorek 1. promytí inkluzních tělísek. Inkluze: Vzorek inkluzních tělísek po promytí. PV: solubilizovaný vzorek Pho15p po dialýze s 10 mM imidazolem. VF: vzorek vazebné frakce po inkubaci s nosičem. P1: vzorek 1. promytí nosiče s imobilizovanou Pho15p. E: vzorek eluční frakce. MM: molekulový marker. **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 10 - SDS-PAGE izolace a afinitní purifikace Pho15p *C. parapsilosis*. Lyzát: vzorek buněčného lyzátu po inkubaci s lysozymem a sonikací. SUP: vzorek supernatantu po centrifugaci buněčného lyzátu. P1: vzorek 1. promytí inkluzních tělísek. Inkluze: vzorek inkluzních tělísek po promytí. PV: solubilizovaný vzorek Pho15p po dialýze s 10 mM imidazolem. VF: vzorek vazebné frakce po inkubaci s nosičem. P1: vzorek 1. promytí nosiče s imobilizovanou Pho15p. E: vzorek eluční frakce. MM: molekulový marker. **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 11 - SDS-PAGE afinitní chromatografie s odštěpením trombinem. PV A: solubilizovaný vzorek CaPho15p po dialýze s 10 mM imidazolem. VF A: vzorek vazebné frakce CaPho15p po inkubaci s nosičem. SUP A: vzorek supernatantu po inkubaci CaPho15p s trombinem. EA: vzorek eluční frakce CaPho15p. PV P: solubilizovaný vzorek CpPho15p po dialýze s 10mM imidazolem. VF P: vzorek vazebné frakce CpPho15p po inkubaci s nosičem.

SUP P: vzorek supernatantu po inkubaci CpPho15p s trombinem. EP: vzorek eluční frakce CpPho15p. MM: molekulový marker. **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 12 - Western Blot a chemiluminiscenční detekce. PV A: solubilizovaný vzorek CaPho15p po dialýze s 10 mM imidazolem. VF A: vzorek vazebné frakce CaPho15p po inkubaci s nosičem. SUP A: vzorek supernatantu po inkubaci CaPho15p s trombinem. EA: vzorek eluční frakce CaPho15p. PV P: solubilizovaný vzorek CpPho15p po dialýze s 10 mM imidazolem. VF P: vzorek vazebné frakce CpPho15p po inkubaci s nosičem. SUP P: vzorek supernatantu po inkubaci CpPho15p s trombinem. EP: vzorek eluční frakce CpPho15p. MM: molekulový marker. **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 13 – pH optimum pro defosforylaci enzymem Pho15p. **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 14 - Optimum koncentrace hořečnatých kationtů pro defosforylaci enzymem Pho15p..... **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 15 - Závislost defosforylace PNPP enzymem Pho15p na typu kationtu. **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 16 - Optimum koncentrace manganatých kationtů pro defosforylaci enzymem Pho15p..... **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 17 - Optimum koncentrace kobaltnatých kationtů pro defosforylaci enzymem Pho15p..... **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 18 - FTIR spektrum analýzy Pho15p analyzované na nosiči Ni-NTA (zhotovila RNDr. Lucie Bednárová, CSc.)..... **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 19 - CD spektrum Pho15p odštěpené od nosiče trombinem (zhotovila RNDr. Lucie Bednárová, CSc.)..... **Chyba! Záložka není definována.**

Obrázek 20 - Graf závislosti defosforylace PEP na typu kationtu **Chyba! Záložka není definována.**

Tabulka 1 – Seznam použitých zkratk. Řazeno abecedně. **Chyba! Záložka není definována.**

Tabulka 2 - Seznam použitých chemikálií. Řazeno abecedně. **Chyba! Záložka není definována.**

Tabulka 3 – Transformace vektoru pET-28b s inzertovanými geny PHO15 do kompetentních buněk E. coli BL21(DH3). **Chyba! Záložka není definována.**

Tabulka 4 – program kolonové chromatografie **Chyba! Záložka není definována.**

Tabulka 5– Protokol barvení stříbrem..... **Chyba! Záložka není definována.**