

Příprava bakteriálních expresních systémů rekombinantní γ -laktamasy

Viktor Holomek

Bakalářská práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Viktor HOLOMEK**
Osobní číslo: **T09715**
Studijní program: **B 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Příprava bakteriálních expresních systémů
rekombinantní gama-laktamasy**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši na dané téma.
2. Navrhněte postup přípravy expresních systémů.
3. Provedte příslušné experimenty.
4. Teorii, výsledky a diskuzi sepište v předepsané formě.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Databáze vědecké literatury.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Marek Ingr, Ph.D.

Ústav fyziky a mater. inženýrství

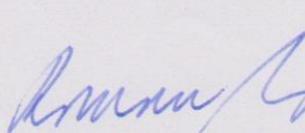
Datum zadání bakalářské práce:

13. února 2012

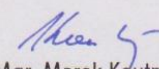
Termín odevzdání bakalářské práce:

18. května 2012

Ve Zlíně dne 13. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Holomek Viktor

Obor: Inženýrství ochrany životního prostředí

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 14.8.2012

Holomek

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užití-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

γ -laktamasa je enzym, který dokáže štěpit pětičlenné laktamové cykly. Jeho potenciálním substrátem je polyvinylpyrrolidon (PVP). PVP je obsažen ve větším množství v odpadních vodách, a proto je γ -laktamasa zkoumána také pro následné využití k jejich čištění. Cílem této bakalářské práce bylo připravit bakteriální expresní systémy rekombinantní γ -laktamasy. Gen pro enzym γ -laktamasy byl již dříve nasyntetizován. Byla provedena pouze PCR enzymu s his-tagem a primery, obsahující restriční místa. Dále byly provedeny metody k dosažení čistšího produktu. Inerty byly rozštěpeny restričními endonukleasami a pomocí DNA ligasy byla provedena ligace do vektorů pET22b a pUC19. Těmito upravenými vektory byly následně transformovány kompetentní bakteriální buňky *Escherichia coli* DH5 α . Pro ověření přítomnosti insertu bylo opět provedeno restriční štěpení endonukleasami a sekvence jednotlivých klonů byla ověřena sekvenční analýzou. Rekombinantní γ -laktamasou byly transformovány expresní buňky *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL. Byla otestována exprese rekombinantní γ -laktamasy a provedeny pokusy o její izolaci a stanovení aktivity.

Klíčová slova: γ -laktamasa, Polyvinylpyrrolidon, bakteriální expresní systém, aktivita

ABSTRACT

γ -laktamase is an enzyme, which can split five-membered lactam cycles. Polyvinylpyrrolidon (PVP) is a potential substrate of this enzyme. PVP is contained in wastewater, which is one of the reasons, why γ -laktamase is studied. The goal of this work is to prepare a bacterial expression systems of recombinant γ -laktamase. A gene of γ -laktamase was synthesized earlier. PCR was performed with primers containing C-terminal His-tag and restriction sites for cloning . PCR product was isolated and inserts were cleaved by restriction endonucleases and ligated by DNA ligase to the vector pET22b and pUC19. Competent bacterial cells *Escherichia coli* DH5 α were transformed with these vectors. Presence of the insert was checked by cleavage by restriction endonucleases and the sequence was verified by sequencing analysis. Expression cells *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL were transformed by expression plasmids containind the gene of the recombinant γ -laktamase. The expression of recombinant γ -laktamase was tested.

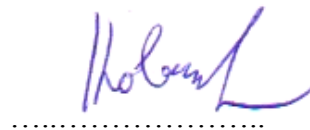
Keywords: γ -laktamase, Polyvinylpyrrolidone, bacterial expression system, activity

Tímto bych chtěl poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Marku Ingrovi, Ph.D. za odborné vedení, čas, který mi věnoval a za důležité rady, které mi při vypracování bakalářské práce poskytnul.

Dále bych chtěl poděkovat všem ostatním, jako rodině, přátelům a mým nejbližším, kteří mě podporovali a pomáhali nejen při sepsání bakalářské práce, ale po celou dobu mého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně 14. 5. 2012



.....
podpis

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 Γ-LAKTAMASA	13
1.1.1 Struktura γ -laktamas.....	16
1.1.2 Mechanismus katalytického účinku γ -laktamasy	18
1.1.3 Průmyslové použití γ -laktamasy	19
1.2 POLYVINYLPYRROLIDON PVP	21
II PRAKTICKÁ ČÁST	23
2 MATERIÁL A METODY	24
2.1 MATERIÁL	24
2.2 PŘÍSTROJE	25
2.3 METODY.....	26
2.3.1 PCR	26
2.3.2 Agarosová elektroforeza DNA	28
2.3.3 Izolace DNA z agarosového gelu	28
2.3.4 Restrikční štěpení DNA	29
2.3.5 Ligace	29
2.3.6 Transformace bakteriálních buněk plasmidem.....	30
2.3.7 Minipreparace plasmidové DNA	30
2.3.8 Exprese rekombinantního proteinu v E-coli.....	31
2.3.9 Sekvence plasmidů	32
2.3.10 Proteinová elektroforéza SDS PAGE [25].....	32
2.3.11 Purifikace γ -laktamasy na koloně s imobilizovanými Ni^{2+} ionty	34
2.3.12 Stanovení aktivity enzymu γ -laktamasy	35
3 VÝSLEDKY	36
3.1 AMPLIFIKACE GENU Γ-LAKTAMASY POMOCÍ PCR.....	36
3.2 RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ VEKTORŮ A INSERTŮ.....	37
3.3 LIGACE A TRANSFORMACE.....	39
3.4 MINIPREPARACE.....	39
3.5 EXPRESE Γ-LAKTAMASY	39
3.6 ČIŠTĚNÍ Γ-LAKTAMASY CHROMATOGRÁFIÍ NA KOLONĚ S IMOBILIZOVANÝMI Ni^{2+} IONTY.....	42
3.7 STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMU Γ-LAKTAMASY	45
DISKUSE	46
ZÁVĚR	51
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	55
SEZNAM OBRÁZKŮ	57

SEZNAM TABULEK.....	59
----------------------------	-----------

ÚVOD

Jelikož je γ -laktamasa čím dál tím více zkoumaným proteinem, kvůli jeho stereospecifickému štěpení 2-aza-bicyclo [2.2.1] hept-5-en-onu, stává se z něj látka, která se v poslední době začala používat v různých sférách průmyslu. Nejzajímavější je (+) γ -laktamasa, která selektivně hydrolyzuje (+) γ -laktam. Tato sloučenina je pak důležitým synthonem k produkci karbocyklických nukleosidů, které se poté hojně využívají k výrobě různých antivirotikům proti HIV nebo herpes.

γ -laktamasa se dá dále využít jako katalyzátor pro degradaci Polyvinylpyrrolidonu, což je látka obsahující γ -laktamový kruh. Otevřením tohoto kruhu by bylo možné jeho následné odstranění z čističek odpadních vod, kde je PVP v přebytku.

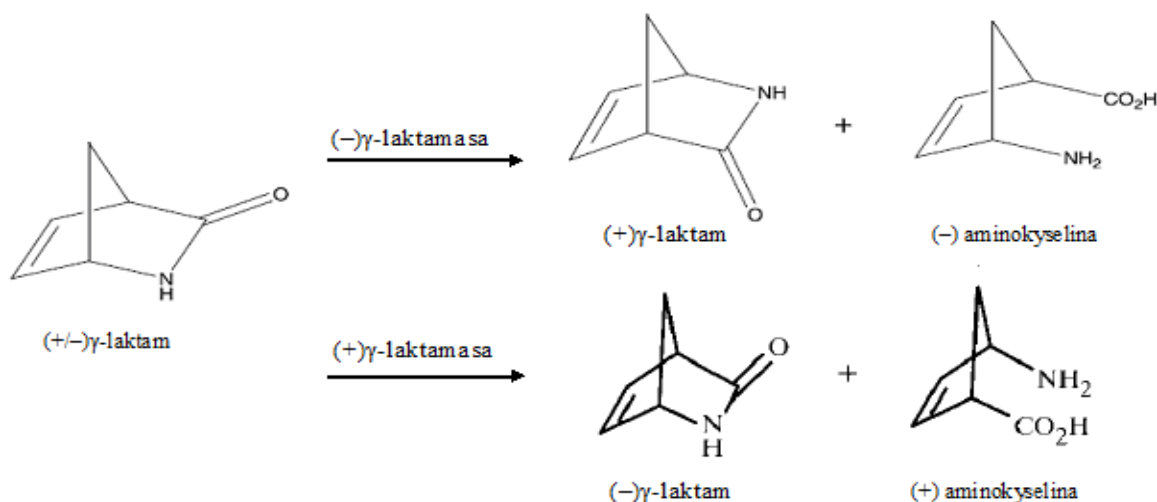
V následující práci je popsán mechanismus přípravy bakteriálních expresních systémů rekombinantní γ -laktamasy. Počínaje nesyntetizováním genu pomocí PCR až po zkoumání její exprese, což bylo i cílem bakalářské práce. Jako hlavním cílem bylo ale připravení expresního systému tak, aby byla možná exprese (+) γ -laktamasy z *Comamonas acidovorans* v *E. coli* s obsaženou C-koncovou histidinovou kotvou pro jednodušší purifikaci. Přestože se objevilo několik článků s pozitivními výsledky, stále se jedná o výzkum, který může trvat několik týdnů, ale také může zabrat i několik let.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 Γ -LAKTAMASA

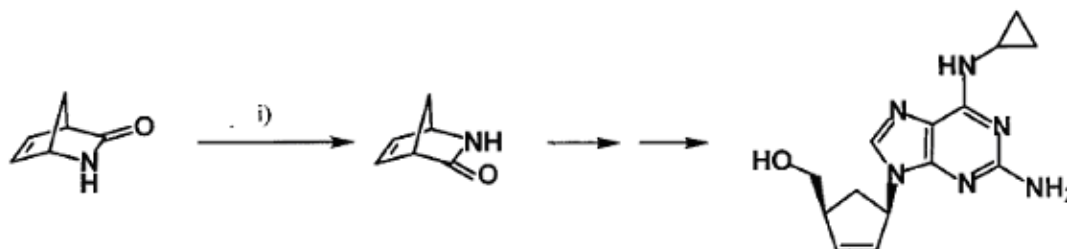
Některé půdní bakterie jsou schopny využívat N-acyl sloučeniny jako jejich jediný zdroj uhlíku a energie. Několik těchto mikroorganismů obsahuje enzymy zvané laktamasy, které mají schopnost štěpit laktamové cykly. Laktamy jsou cyklické amidy o různém počtu členů cyklu. Tříčlenné laktamy označujeme písmenem α , čtyřčlenné β , pětičlenné γ , atd. Nejznámější laktamasou je β -laktamasa, která je schopna degradovat antibiotika penicilinového typu a bývá tedy příčinou rezistence některých patogenních bakterií vůči těmto léčivům. Na druhou stranu se této vlastnosti využívá v metodách klonování genů za účelem zajištění rezistence bakterií transformovaných plasmidy.

γ -laktamasa, která je již méně známým enzymem, dokáže štěpit γ -laktamové, tj. pětičlenné, cykly. V současné době je předmětem studia díky stereospecifickému štěpení 2-aza-bicyclo [2.2.1] hept-5-en-onu (dále jen γ -laktam). V různých mikroorganismech byly totiž nalezeny γ -laktamasy, které jsou schopny selektivně hydrolyzovat jednotlivé enantiomery γ -laktamu. $(-)\gamma$ -laktamasa katalyzuje hydrolýzu enantiomeru o absolutní konfiguraci [1(R),4(S)], označovaného též $(-)$, zatím co $(+)\gamma$ -laktamasa hydrolyzuje enantiomer o opačné absolutní konfiguraci [1], který označujeme symbolem $(+)$, viz obr 1.



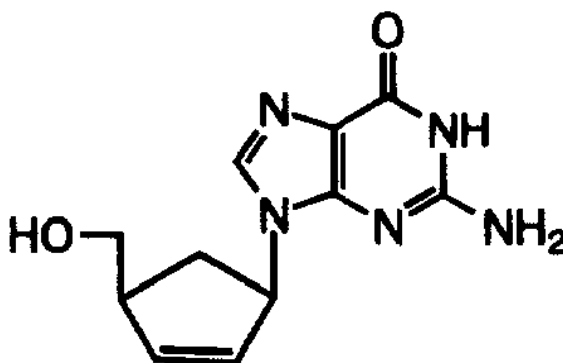
Obr. 1. Katalýza enzymu $(+/-)$ γ -laktamu za vzniku $(+)$ γ -laktamu, nebo $(-)\gamma$ -laktamu, přičemž opačné enantiomery jsou γ -laktamasou rozštěpeny [2].

Z hlediska průmyslového využití je zajímavá zejména (+) γ -laktamasa, která je schopna při aplikaci na racemickou směs enantiomerů selektivně hydrolyzovat (+) γ -laktam a ponechat nehydrolyzovaný (-) γ -laktam. Tato sloučenina totiž slouží jako univerzální synthon k produkci karbocyklických nukleosidů [3], což jsou analogy přirozených nukleotidů, v nichž je kyslík ribosy nahrazen methylenem [4].



Obr. 2. Karbocyklické nukleosidy z 2-aza-bicyclo [2.2.1] hept-5-en-onu, (i) 50 g L⁻¹ *Pseudomonas cepaecia*, 100 g L⁻¹ racemátu laktamu, 25°C 24h [4]

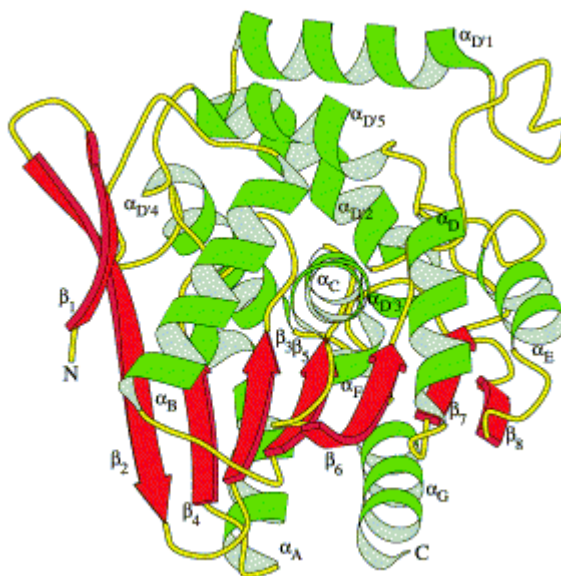
Významným zástupcem karbocyklických nukleosidů je např. anitvirotikum Carbovir používaný v léčbě onemocnění jako je herpes, nebo HIV [5].



Obr. 3. Karbocyklický nukleosid, Carbovir

První biokatalytický rozklad 2-aza-bicyclo [2.2.1] hept-5-en-onu byl publikován již před několika lety [5]. Testováním mnoha půd a vzorků kalu, při kterém byl použit N-acetyl-l-fenylalanin jako jediný zdroj uhlíku, bylo izolováno mnoho mikrobů se schopností hydrolyzy amidové vazby. Následné opětovné testování těchto vzorků na schopnost hydrolyzy γ -laktamu odhalilo kmen *Pseudomonas cepaecia*, který byl vysoce selektivní pro

hydrolýzu (+) γ -laktamu. Později byla tato γ -laktamasa klonována a rekombinantně exprimována v *E. coli* [6].



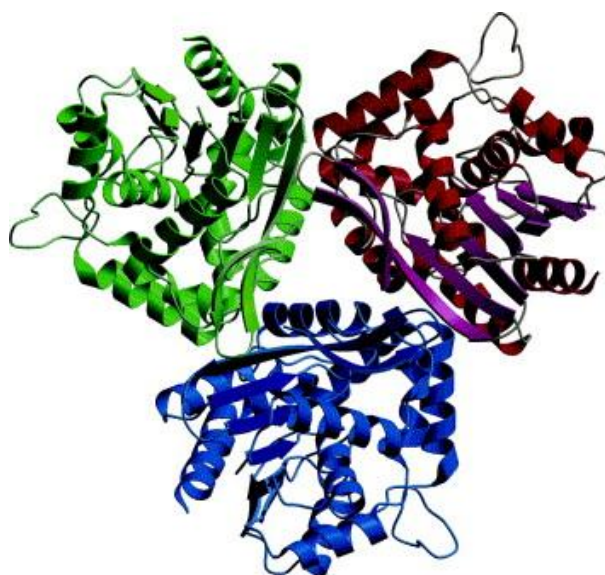
Obr. 4. Terciární struktura monomeru (-)
 γ -laktamasy z *Aureobacterium sp.*

Další (+) γ -laktamasa byla izolována z *Comomonas acidovorans* a byla klonována a exprimována v *Escherichia coli* [2]. Tento enzym náleží do acetamidasové/formamidasové rodiny enzymů (FmdA-AmdA Pfam) [7]. Kromě těchto dvou enzymů byla rekombinantně připravena expresí v *E.coli* také termostabilní (+) γ -laktamasa z archebakterie *Sulfolobus solfataricus* MT4 [8].

Mimoto bylo izolováno také několik (-) γ -laktamas. (-) γ -laktamasa izolovaná z bakterie rodu *Aureobacterium* byla následně taktéž klonována a připravena rekombinantní expresí v *E.coli* [1, [9]. U tohoto enzymu byla stanovena trojrozměrná struktura jeho molekuly metodou rentgenové difrakce. Díky tomu byl také lépe objasněn mechanismus hydrolýzy katalyzované (-) γ -laktamasou. Další rekombinantně připravená (-) γ -laktamasa pocházela z bakterie *Microbacterium hydrocarbonoxydans* [10, [11]. Kromě těchto dvou byla ještě izolována (-) γ -laktamasa z bakterie rodu *Rhodococcus* [12].

1.1.1 Struktura γ -laktamas

Trojrozměrná struktura γ -laktamas není dosud dobře prostudována. V databázi proteinových struktur Protein Data Bank (PDB) se nacházejí pouze dvě krystalové struktury γ -laktamas. První z nich je struktura ($-$) γ -laktamasy z rodu *Aureobacterium*, která byla krystalována v komplexu s inhibítor 3A,4,7,7A-tetrahydro-benzo [1,3] dioxol-2-onem [1, [7]. Ze struktury je patrné, že enzym tvoří homotrimer s aktivním místem v každé monomerní podjednotce.



Obr. 5. Strukturní diagram trimeru ($-$) γ -laktamasy z *Aureobacterium* sp.

Druhá uveřejněná struktura [13] patří γ -laktamase z bakterie *Delftia Acidovorans*. Tato struktura se jeví jako tetraedr složený ze dvou dimerů. Bližší informace však o ní nejsou známy, neboť nebyla dosud publikována formou odborného článku. Na následujícím obrázku je zobrazena kompletní sekvence γ -laktamasy z *Comamonas acidovorans*.

```
MTMITPSLHASAGRTLE
DPFFPTAIARSTPWPETLIKVDLNQSPYDNPQVH
NRWHPDIPMAVWVEPGAEFKLETYDWTGGAIKN
DDSAEDVRDVDLSTVHFLSGPVGVKGAQPGDLL
VVDLLDIGARDDSLWGFNGFFSKQNGGGFLDEHF
PLAQKSIWDFHGMFTKSRHIPGVNFAGLIHPGL
```


IGCLPDPKMLASWNERETGLIATDPDRIPGLAN
PPNATTAHMGQMQGEARDKAAAEGARTVPPREHG
GNCDIKDLSRGSRVFFPVYVDGAGLSVGDHFS
QGDGEITFWGPIEMPGWVHMKVSLIKGGMAKYG
IKNPIFKPSPMTPNYQGLPDLRRHLGGRKGQAAL
PGRDRGLPPGLPERHRVPEEIRLQRRPGLLAAG
HGARAGPHQRRGGRAQCLRHAVAAHGDLRLRHQ
SHGRGTTEDHHGRGGS AHRPGQVSPAYDTRHPPF
ARGRPCPPMTTAPHA ASTRCAASRSATSPRP
APAARRPRPASSARRAWPAPAPNSAAPTPTS
APGTSPGAHAMWPRAATRACATPSGCGCCSGASK
RGSTVTAPNGAKTFPTKRPWMISH

Obr. 6. Kompletní sekvence γ -laktamasy [5].

Tetramerní strukturu má pravděpodobně i (+) γ -laktamasa z bakterie *Comamonas acidovorans*, která je předmětem této bakalářské práce, což však bylo demonstrováno pouze porovnáním relativní molekulové hmotnosti monomeru změřené metodou hmotnostní spektrometrie a relativní molekulové hmotnosti nativního proteinu získané metodou sedimentační rovnováhy [14]. V citované práci je totiž popsána i krystalizace enzymu, ale kvalita krystalů pravděpodobně nebyla dostatečná pro provedení strukturní analýzy. Následné měření rentgenové difrakce totiž poskytlo pouze základní údaje o krystalové mřížce, ale neumožnilo stanovení trojrozměrné struktury enzymu.

Tato práce je navíc poněkud nekonzistentní s předcházejícím článkem [3], v němž je γ -laktamasa popisována jako enzym, jehož monomer má teoretickou molekulovou hmotnost 61 kDa a molekulovou hmotnost pozorovanou v SDS PAGE elektroforéze 53-55 kDa, zatímco zde se píše o molekulové hmotnosti 44294 Da. Přitom není zcela jasné, z jakého genu byla γ -laktamasa v práci [14] exprimována, protože tento gen zde není explicitně popsán. Z toho tedy vyplývá, že poznání struktury tohoto enzymu je dosud

značně nekompletní. Je navíc možné, že v obou pracích byl izolován pouze fragment γ -laktamasy vzniklý proteolýzou bakteriálními proteasami.

Narozdíl od výše uvedených enzymů je (+) γ -laktamasa ze *Sulfolobus solfataricus* tvořena jen jedním proteinovým řetězcem a nemá tedy podjednotkovou strukturu. To bylo demonstrováno porovnáním dat z gelové permeační chromatografie a sedimentační analýzy na jedné straně a elektroforézy SDS PAGE na straně druhé [15]. Obojí dává hodnotu cca 55 kDa, která je navíc ve shodě s teoreticky vypočtenou molekulovou hmotností proteinu na základě znalosti jeho genu (55784 Da). Krystalograficky stanovená 3D struktura však nebyla dosud publikována.

Z hlediska podjednotkové struktury byla studována rovněž (-) γ -laktamasa z bakterie *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, která byla rovněž připravena rekombinantní expresí v *E. coli* [4]. Z porovnání výsledků denaturující elektroforézy SDS PAGE a nativní gelové elektroforézy vyplývá, že tento enzym má dimerní strukturu.

Jak je tedy patrné, struktury γ -laktamas z různých mikroorganismů se poměrně výrazně liší na úrovni podjednotkové struktury, a to i přesto, že mají obdobnou funkci a v mnoha případech i vysokou sekvenční homologii.

1.1.2 Mechanismus katalytického účinku γ -laktamasy

Většina rekombinantně připravených γ -laktamas byla následně enzymologicky charakterizována jak vůči samotnému γ -laktamu, tak i vůči jiným amidovým substrátům, jelikož většina γ -laktamas má i obecnou amidasovou aktivitu [2][5][15]. Měření aktivity při použití γ -laktamu jako substrátu se provádí pomocí HPLC, u jiných substrátů se pak používá dalších metod v závislosti na povaze substrátu.

Mechanismus katalytického působení byl nejlépe prostudován u (-) γ -laktamasy z *Aureobacteria*, u níž je též známa trojrozměrná struktura [1]. Tato γ -laktamasa patří mezi „ α/β hydrolase fold“ enzymy, což je skupina různých hydrolas, jejichž aktivní místo se nachází v dutině tvořené uskupením 6 α -helixů a 8 β -skládaných listů [16]. Samotné aktivní místo je tvořeno triádou aminokyselin, z nichž jedna obsahuje nukleofilní skupinu (Ser, Cys, Asp), druhá je kyselá a třetí je aminokyselina histidin. Kromě toho k funkci enzymu přispívá ještě oxyaniontová dutina, což je místo stabilizující záporně nabitý reakční meziproduct prostřednictvím vodíkových vazeb ke dvěma dusíkům peptidické

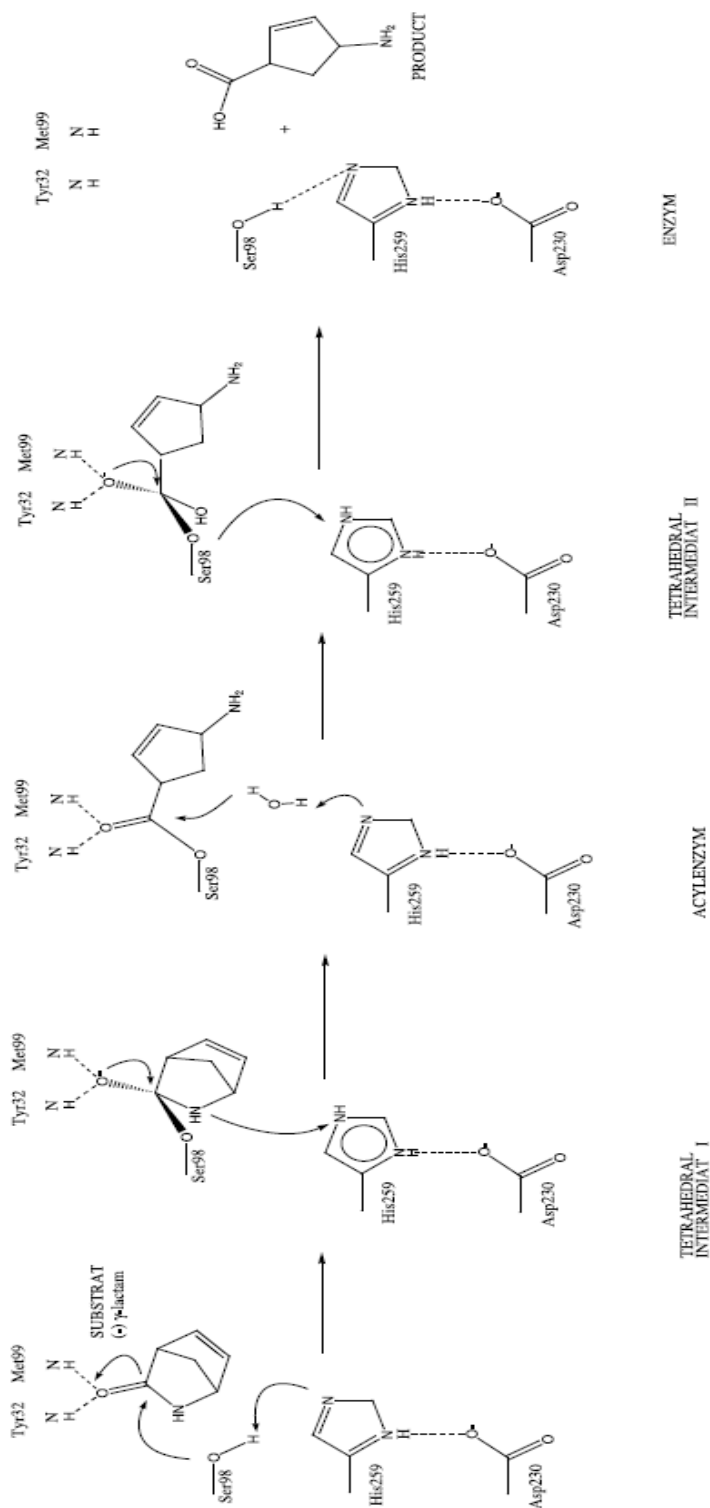
páteře proteinu, z nichž jeden zpravidla náleží aminokyselině následující za aminokyselinou nesoucí nukleofilní skupinu. V případě (-) γ -laktamasy z *Aureobacteria* je aktivní místo tvořeno serinem 98, histidinem 259 a kyselinou asparagovou 230. Oxyaniontová dutina je tvořena tyrosinem 32 a methioninem 99. Vlastní mechanismus katalýzy tohoto enzymu je znázorněn na obr. 6.

U dalších γ -laktamas není struktura aktivního místa tak podrobně prostudována. U termostabilní γ -laktamasy z *Sulfolobus solfataricus* je aktivní místo tvořeno serinem 195 a kyselinou asparagovou 191 [15],[17], což je ve shodě s homologní amidasou z *Rhodococcus rhodochrous* J1 [8]. Detailnější strukturní data ale nejsou známa.

U námi připravované γ -laktamasy z *C. acidovorans* je struktura aktivního místa prostudována jen velmi málo. Předpokládá se pouze přítomnost serinu, protože enzym je inhibován běžnými inhibitory serinových hydrolytických enzymů, zejména proteas (PMSF, BAM). Na druhou stranu nedochází k inhibici inhibitory metaloproteas (EDTA) ani cysteinových proteas (kyselina monoiodoctová), proto se tyto mechanismy účinku enzymu nepředpokládají [14].

1.1.3 Průmyslové použití γ -laktamasy

Hlavním důvodem průmyslového využití γ -laktamasy je již zmíněné dělení racemické směsi synteticky připraveného γ -laktamu. Jako první dosáhla průmyslového využití (+) γ -laktamasa z bakterie *Pseudomonas capaecia* [1]. Později však bylo zjištěno, že je v izolované formě v průmyslovém měřítku téměř nepoužitelný. Veliký problém byla totiž jeho stabilita. Pro zlepšení stability byl vyvinut katalyzátor v podobě bakteriálních buněk. Poté však bylo potřeba najít stabilnější enzym, protože enzym (+) γ -laktamasy z bakterie *Pseudomonas capaecia* se ukázal jako toxický pro použité bakteriální buňky, které kvůli tomu postupně odumíraly. Díky výzkumu byla následně objevena (+) γ -laktamasa z bakterie rodu *Comamonas acidovorans*. Tato γ -laktamasa byla několikrát termostabilnější a aktivnější než předešlá [5]. Tento enzym se z více než 50% shoduje s acetamidázou z *Mycobacterium smegmatis* a formamidasou z *Methylophilus methylotropus* [18].



Obr. 7. Schéma mechanismu hydrolýzy substrátu (-) γ -lactamu enzymem (-) γ -lactamasou [2,[16].

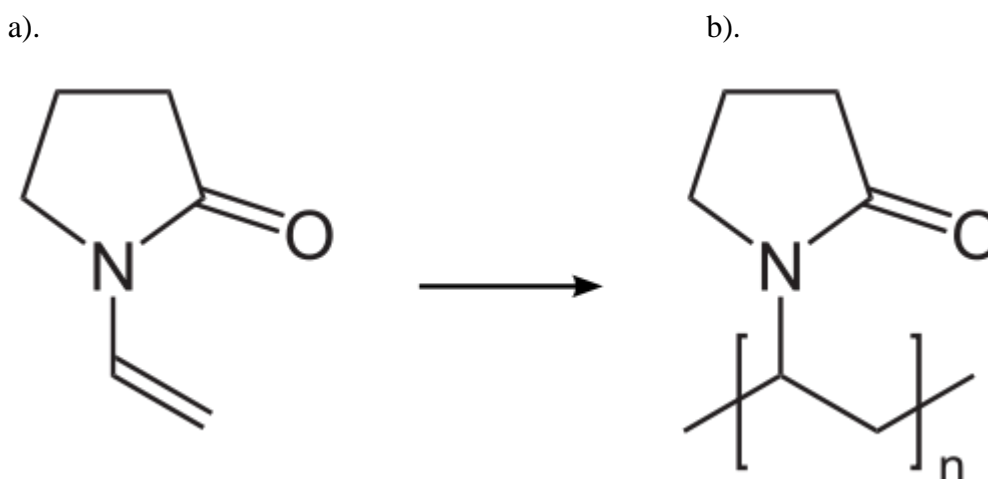
Jak (+) γ -laktamasa, tak (-) γ -laktamasa jsou schopny hydrolyzovat γ -laktam tak, aby byly vyprodukovány analogy γ -aminomáselných kyselin (GABA). Přičemž GABA je

hlavní inhibitor neurotransmiterů, centrální nervové soustavy u savců, a podílí se na velkém množství fyziologických aktivit [[10, [19, [20].

1.2 Polyvinylpyrrolidon PVP

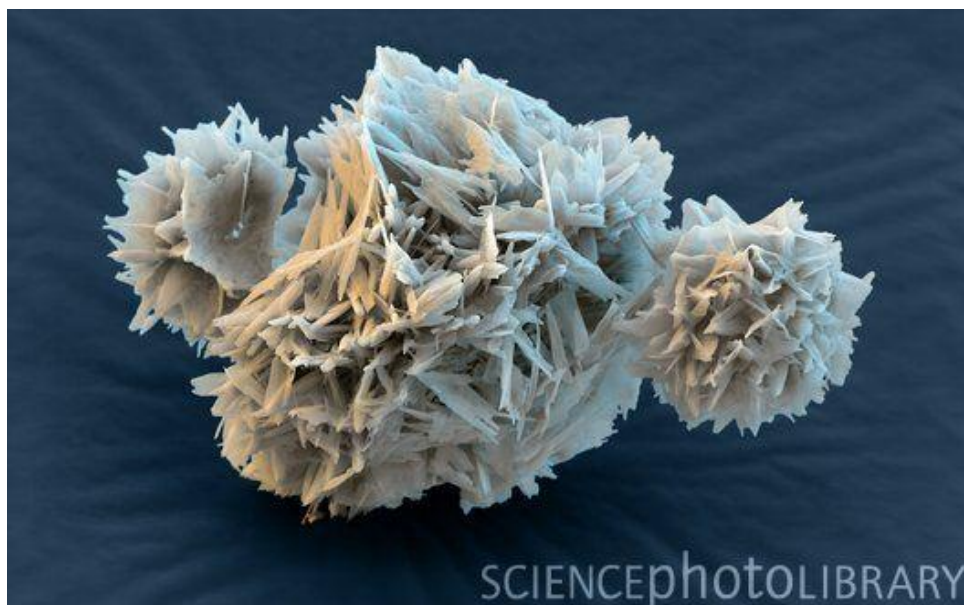
Polyvinylpyrrolidon je polymer rozpustný ve vodě stejně jako v polárních rozpouštědlech. Je vyrobený z monomeru N-vinylpyrrolidonu a vyrábí se jeho radikálovou polymerací. [21]

PVP byl objeven německým chemikem Waltrem Reppem, který díky tomu dostal v roce 1939 patent na jeden z nejzajímavějších produktů acetylenové chemie. Polyvinylpyrrolidon je také nazýván jako Polyvidon nebo Povidon a pod komerční značkou je známý jako Plasdone nebo Kollidon. Díky svému γ -laktamovému kruhu, který obsahuje, se stává potenciálním substrátem pro γ -laktamasu.



Obr. 8. Struktura: a). monomer N-vinylpyrrolidonu, b). homopolymer N-vinylpyrrolidonu

Polyvinylpyrrolidon je netoxická a biologicky inertní látka. Jednotlivé polymery mohou obsahovat stovky až miliony monomerů a mohou mít lineární, síťovou nebo rozvětvenou strukturu. V suchém stavu má podobu světlého vločkovitého prášku, který dokáže absorbovat až 40 % své hmotnosti vody. Díky tomu má výborné smáčecí schopnosti a ochotně tvoří filmy. Tyto vlastnosti se dají využít k výrobě nátěrů, nebo jako přísady pro nátěry. Původně byl PVP využíván jako expandér pro krevní plasmu. Nyní se hojně využívá v medicíně, farmacii, kosmetice, ale i v průmyslu.



Obr. 9. Krystal PVP zaznamenaný přístrojem SEM [22]

PVP má i negativní vlastnosti. I když je úřady považován za bezpečnou látku, může v krajních případech způsobovat po požití alergické reakce. Dále může vytvářet určité problémy hlavně v čističkách odpadních vod, protože nepodléhá samovolnému biologickému rozkladu. Kvůli těmto inertním vlastnostem se musí polyvinylpyrrolidon různě upravovat. Aby se dal PVP odstranit, musí se nejdříve otevřít jeho γ -laktamový kruh. To by se dalo provést enzymaticky, katalýzou pomocí γ -laktamasy. Proto je nutné zjistit, zdali jsou bakterie obsahující γ -laktamasu schopny degradovat PVP a využít ho jako svůj vlastní substrát v čističkách odpadních vod. Mimo jiné se dá teoreticky PVP odstranit i pomocí peroxidu vodíku, oxidací ozonem, nebo sorpcí na pevný povrch, jako je aktivní uhlí, nebo aktivovaný kal.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Materiál

DNA marker 200-1600 bp – Ascoprot Biotech

DNA marker 2000-10000 bp – Ascoprot Biotech

dNTPs (10 mM) – Top Bio

Kyselina octová – Lachema

Agarosa – Serva

Bromfenolová modř – Sigma

EDTA – Sigma

Ampicilin – Léčiva

BSA - BioLabs

Restrikční endonukleasy EcoRI, HindIII – New England BioLabs

Restrikční endonukleasy NdeI, XhoI – New England BioLabs

LB bouillon – Sigma

LB agar – Sigma

Phusion pufr (10x) – Finnzymes

Phusion polymerasa – Finnzymes

Pfu pufr (10x) – Promega

Pfu polymerasa – Promega

Ethanol – Lach-ner

Restrikční pufry NEB – New England BioLabs

T4 DNA ligasový pufr – Takara

T4 DNA ligasa – Takara

Acrylamid – Fluka

Glycyn – Fluka

Chloroform – Fluka

Fenol – Fluka

N, N, N, N-tetramethylethyldiamin (TEMED) – Fluka

Tris-HCl – Fluka

N, N-methylen-bis-akrylamid – Fluka

SDS – Fluka

Tris(hydroxymethyl)aminomethan – Fluka

Glycerol - Lachema

Sacharosa – Sigma

Destilovaná H₂O

HPLC voda - ÚOCHB

Hydroxid sodný – Lach-Ner

Ethidium bromid – Sigma

Izopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) – Biosynth AG

SYBR® Safe DNA – Invitrogen

Extrakční kit – NucleoSpin® Extract II – MACHEREY-NAGEL GmbH and Co. KG

Imidasol - Lachema

2.2 Přístroje

SDS PAGE elektroforéza – Sigma

Zdroj elektrického napětí pro elektroforézy – Consort

Agarosová elektroforéza – Shelton Scientific, JSB – 30

Autokláv – Tuttnauer

Orbitální inkubátor – LabLine

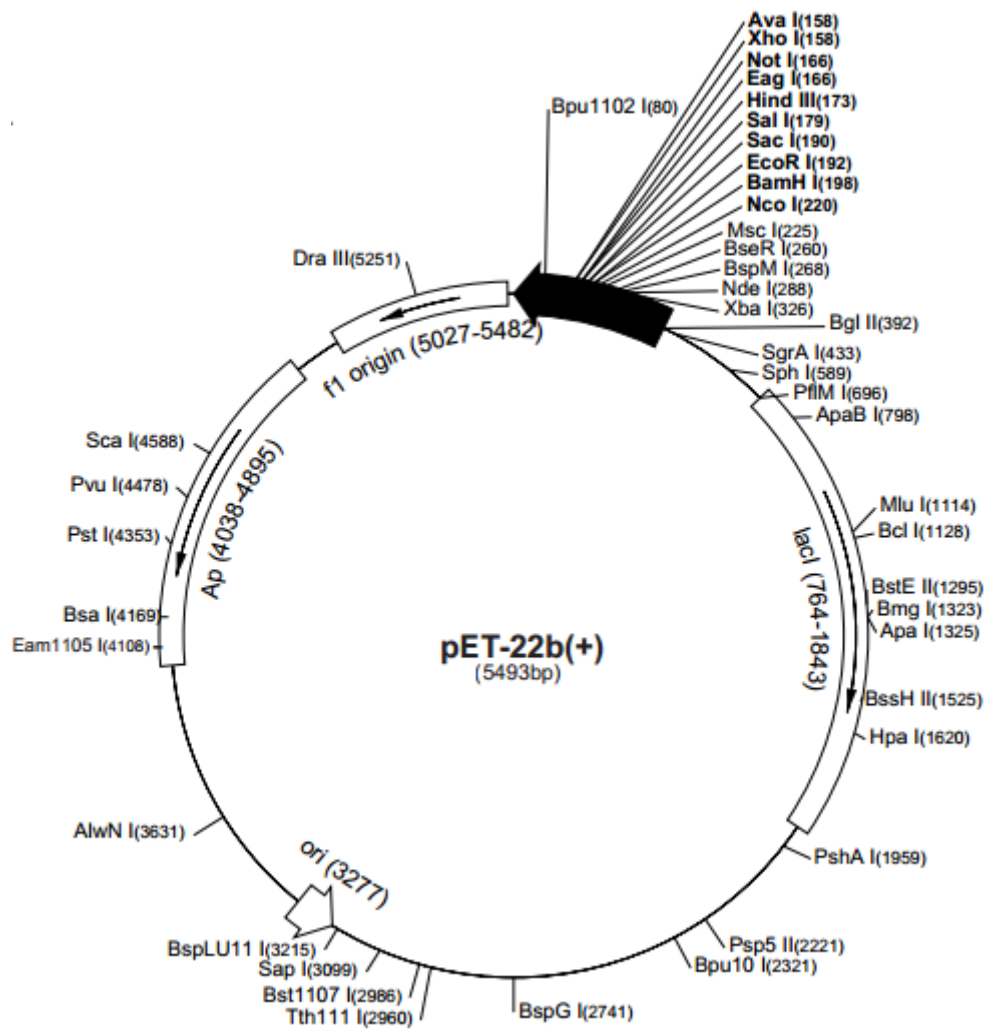
Laboratorní předvážky – AND

Vodní lázeň – Julabo

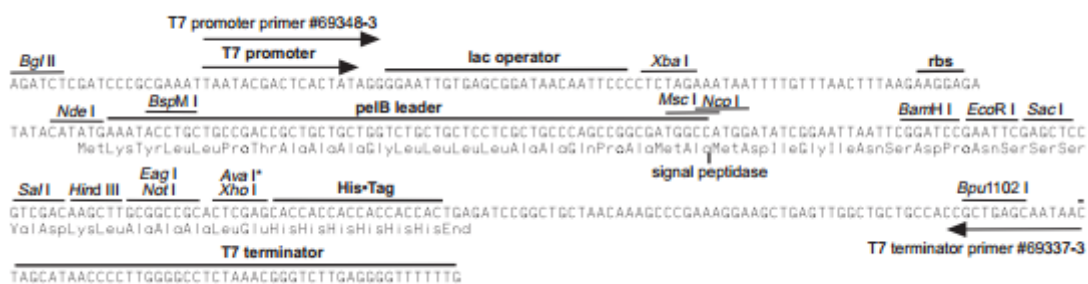
- | | |
|---------------------------------------|--------------------|
| Extenze | 72°C po dobu 1 min |
| 3. část (1 cyklus): Závěrečná extenze | 72°C po dobu 8 min |
| 4. část (1 cyklus): Chlazení | 4°C |

Reakce byla provedena současně se dvěma typy templátů

Plasmid pET22b, který byl použit k zaklonování genu γ -laktamasy je zobrazen na následujícím obrázku. Je zde zobrazena jak mapa plasmidu, tak celá sekvence genu.



Obr. 10. Cyklická mapa vektoru pET22b zobrazující expresní místa kódující sekvence



Obr. 11. Expresní sekvence vektoru pET22b

2.3.2 Agarosová elektroforeza DNA

Pro přípravu 1,4% agarosového gelu s fluoresenčním indikátorem SYBR Safe DNA gel stain bylo naváženo 0,42 g Agarosy a smícháno s 30 ml TAE-Pufu. Směs byla ohřáta v mikrovlnné troubě po dobu 2 min. Po vychladnutí gelu byly přidány 3 μ l SYBR Safe DNA gel stain 10000x zředěný a doplněno vodou na původní objem. Takto připravený gel byl nalit do formy a následně byl do něj vpraven hřeben pro vytvoření jamek. Po ztuhnutí byl hřeben vyjmut a gel byl přemístěn do elektroforetické vany, kde byl celý ponořen do TAE Pufu. Do jamek byly nepipetovány vzorky smíchané se vzorkovým pufrem. Následně byla zahájena elektroforeza, která probíhala při napětí 110 V po dobu 30 min. Po 30 minutách byl gel vyjmut a vložen na transiluminátor propouštějící jen modré světlo, kterým byl fluorescenční indikátor excitován a emitoval v zelené oblasti viditelného světla. Pro lepší zviditelnění fluoreskujících proužků byl použit oranžový filtr.

Pro výrobu 1,4% agarosového gelu s ethidium bromidem byl použit obdobný postup jako u předchozího, jen místo SYBR Safe DNA gel stain bylo použito 30 μ l ethidium bromidu o finální koncentraci 0,5 μ g/ml.

2.3.3 Izolace DNA z agarosového gelu

Pro izolaci DNA z agarosového gelu byla použita souprava firmy MACHEREY-NAGEL GmbH and Co.KG, Nucleospin extrakt II.

Nejdříve bylo provedeno vyřezání potřebných fragmentů DNA z agarosového gelu. Ty byly vloženy do mikrozkuvek, které byly následně zvaženy. Ke 100 mg agarosového gelu bylo přidáno 200 μ l NT pufu. V mikrozkuvkách byl v přidaném pufu gel rozpuštěn. Rozpuštění probíhalo při 50°C po dobu 10 min. Takto získaný obsah byl převeden do nucleospin kolonky (zde došlo k navázání DNA), která byla následně

odstředěna při 11000x g a teplotě 24°C po dobu 1 min. Promývání membrány nucleospin kolonky bylo provedeno 600 µl NT3 pufru. Tento obsah byl taktéž odstředěn na centrifuze při 11000 x g po dobu 1 min. Aby se membrána nucleospin kolonky vysušila, byla kolonka znovu odstředěna 2 min při 11000 x g. Navázaná DNA byla uvolněna z membrány pomocí 20 µl TE pufru, která byla následně inkubována 1 min a poté byla stočena 1 min při 11000 x g.

2.3.4 Restrikční štěpení DNA

Vektor pUC19 byl štěpen restrikčními endonukleasami EcoRI a Hind III a vektor pET22b restrikčními endonukleasami NdeI a XhoI. Restrikční štěpení odpovídajícími dvojicemi enzymů bylo provedeno i s příslušnými inserty.

Do první mikrozkušavky bylo napipetováno 8 µl izolovaného PCR produktu genu γ -laktamasy, 0,5 µl restrikční endonukleasy EcoRI, 0,5 µl restrikční endonukleasy Hind III, 2 µl pufru M (Takara) a 9 µl destilované H₂O.

Do druhé mikrozkušavky bylo napipetováno 8 µl izolovaného PCR produktu genu γ -laktamasy, 0,5 µl restrikční endonukleasy NdeI, 0,5 µl restrikční endonukleasy XhoI, 0,2 µl 100x BSA, 2 µl NEB2 pufru a 9 µl destilované H₂O.

Do třetí mikrozkušavky byly napipetovány 3 µl vektoru pUC19, 0,5 µl restrikční endonukleasy EcoRI, 0,5 µl restrikční endonukleasy Hind III, 2 µl pufru M (Takara) a 14 µl destilované H₂O.

Do čtvrté mikrozkušavky byly napipetovány 3 µl vektoru pET22b, 0,5 µl restrikční endonukleasy NdeI, 0,5 µl restrikční endonukleasy XhoI, 0,2 µl 100x BSA, 2 µl NE2 pufru a 14 µl destilované H₂O.

Po naplnění mikrozkušavek následovalo stočení v odstředivce a poté inkubace po dobu 2,5 hodiny. Po inkubaci byly vzorky nanесeny na gel se SYBR Safe gel stain a vizolovány. Pro kontrolu byla provedena agarosová elektroforéza.

2.3.5 Ligace

Ligace byla provedena za účelem spojení genů s vyštěpenými fragmenty DNA.

Do první mikrozkušavky bylo napipetováno 0,5 μ l DNA ligasy, 1 μ l vektoru pUC19, 10 μ l insertu (obsahující gen γ -laktamasy), 2 μ l pufru pro T4 DNA ligasu, 6,5 μ l destilované H₂O.

Do druhé mikrozkušavky bylo napipetováno 0,5 μ l DNA ligasy, 1 μ l vektoru pET22b, 10 μ l insertu (obsahující gen γ -laktamasy), 2 μ l pufru pro T4 DNA ligasu, 6,5 μ l destilované H₂O.

U obou ligací byl analogicky proveden slepý pokus, v němž byla místo insertu použita destilovaná H₂O.

2.3.6 Transformace bakteriálních buněk plasmidem

K transformaci byly použity kompetentní buňky DH5 α .

Alikvot kompetentních buněk DH5 α byl rozmražen na ledu. Ten byl následně rozdělen na dva alikvoty po 100 μ l do vychlazených sterilních mikrozkušavek. Do první z nich bylo napipetováno 20 μ l plasmidu pET22b s insertem. Do druhé bylo pro kontrolu napipetováno 20 μ l plasmidu bez insertu. Vzorke byly ihned vloženy do ledové lázně, ve které se nechaly chladit po dobu 30 min. Poté byly mikrozkušavky s buňkami na 90 s vloženy do lázně o teplotě 42°C. Po daném čase byly opět vloženy na 60 s zpět do ledu. K buňkám bylo přidáno 600 μ l LB média bez antibiotika a nechaly se inkubovat 45 min při 37°C. Během inkubace byly připraveny plotny s LB agarem. Sterilní LB agar byl rozpuštěn v mikrovlnné troubě a následně ochlazen. Ke 20 ml LB agaru bylo přidáno 20 μ l ampicilinu. Na každou plotnu bylo nalito 10 ml roztoku, který se ponechal ztuhnout. Po inkubaci bylo z každého vzorku odpipetováno 200 μ l kultury, která byla rozetřena hokejkou na plotnu s LB agarem a antibiotikem. Plotny se ponechaly inkubovat přes noc.

2.3.7 Minipreparace plasmidové DNA

Z plotny narostlých bakterií byly špičkou odpíchnuty kolonie vektoru pET22b a vektoru pUC19 a vloženy do sterilních plastových zkušavek (Falkon). Do těchto 50 ml zkušavek bylo dáno 10 ml LB média a 10 μ l ampicilinu. Byla zahájena inkubace při 37°C, která byla ponechána přes noc. Narostlé bakteriální kultury byly odstředěny při 4200 x g, 4°C po dobu 10 min. Supernatant byl vylit a sraženina rozsuspendována v 800 μ l PBS pufru a vortexována. Vzniklá suspenze byla převedena do mikrozkušavky a stočena při 7000-15000 x g, 4°C po dobu 1 min. Supernatant byl odstředěn a sraženina byla

rozsuspendována ve 100 μ l roztoku MINIPREP I a zvortexována. Ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 200 μ l roztoku MINIPREP II. Opakovanou inverzí mikrozkuřavky byl obsah promíchán a dále ponechán 5 min při 4°C. Následně bylo přidáno 150 μ l roztoku MINIPREP III. Vzorek byl taktěž promíchán inverzí a inkubován 5 min na ledu. Po odstání byla suspenze stočena při 15000 x g a 4°C po dobu 7 min. Supernatant byl převeden do nové mikrozkuřavky a bylo k němu přidáno 450 μ l směsi fenol-chloroform (v poměru 1:2) a vortexován. Suspenze byla stočena při 15000 x g a 4°C po dobu 2 min. Po stočení byla horní vrstva vzorku přepipetována do nové mikrozkuřavky. K preparátu bylo přidáno 990 μ l EtOH do výsledné koncentrace 70 %. Po promíchání byla směs ponechána v klidu při -18 °C minimálně 20 min. Poté byla směs stočena při 15000 x g a 4°C po dobu 12 min a supernatant byl opět slit. Ke sraženině bylo přidáno 200 μ l 70% EtOH vychlazeného na -18 °C po stěně mikrozkuřavky. Po přidání byl supernatant ihned znovu odpipetován a sraženina byla ponechána při pokojové teplotě tak dlouho, dokud nebyla důkladně vysušena. Po vysušení byla sraženina rozsuspendována v 50-100 μ l TE pufru s přidavkem RNasy a byla ponechána inkubaci při 37°C po dobu 2 hodin. Z každého vzorku bylo odebráno 5 μ l a přepipetováno do nové mikrozkuřavky. Následně bylo provedeno štěpení restričními endonukleasami, aby byla ověřena přítomnost insertu. K plasmidu pET22b bylo přidáno NdeI a XhoI. K plasmidu pUC19 bylo přidáno EcoRI a Hind III. Oba dva vektory byly inkubovány přes noc. Pro kontrolu byla provedena agarosová elektroforéza.

Roztoky použité při minipreparaci:

MINIPREP I: 20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM glukosa, pH~8,3

MINIPREP II: 0,2 M NaOH, 1% SDS

MINIPREP III: 3 M CH₃COOK, 2 M CH₃COOH

TE pufr: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH~8,0

PBS Pufr: 10 mM PO₄³⁻, 100 mM NaCl, pH~7,2

2.3.8 Expresa rekombinantního proteinu v E-coli

Expresa proteinu byla prováděna v expresním systému využívajícím bakteriofágovou T7 RNA-polymerasu [23]. Z ploten narostlých bakterií byly odpíchnuty minimálně 2 kolonie. Každá z těchto kolonií byla zaočkována 5 ml LB média a tyto bakteriální kultury byly inkubovány v orbitálním inkubátoru při 37°C a 250 RPM přes noc. 15-ti μ l

jednotlivých narostlých kultur bylo zaočkováno po 7 ml nového média a kultury byly inkubovány za stejných podmínek jako v předchozím případě. Po každých 30 min bylo z každé kultury odebráno 250 μ l roztoku a byla měřena optická hustota při 600 nm proti slepému vzorku, kterým bylo čisté LB médium. Jakmile byla absorbance rovna hodnotě 0,5, byly odebrány vzorky na SDS PAGE elektroforézu. 500 μ l každého vzorku bylo odstředěno a rozsuspendováno ve 20 μ l vody a 20 μ l 2x vzorkového pufru pro SDS PAGE. Všechny kultury byly rozděleny na dvě části. K jedné byl přidán induktor IPTG do koncentrace 1 mM a druhý byl ponechán bez přídavku IPTG. Následně byla měřena, vždy po 1 hodině, optická hustota při 600 nm po dobu 2 h. Poté bylo narůstání zastaveno a ze všech vzorků bylo odebráno 500 μ l pro SDS PAGE elektroforézu. Vzorky byly odstředěny a rozsuspendovány ve 20 μ l vody a 20 μ l vzorkového pufru SDS PAGE.

2.3.9 Sekvence plasmidů

Sekvenční analýza byla provedena servisně v sekvenační laboratoři PřF UK Praha Langerovou metodou [24].

2.3.10 Proteinová elektroforéza SDS PAGE [25]

Mezi dvě skla pro SDS PAGE elektroforézu byla umístěna těsnicí guma a skla byla sevřena třemi svorkami. Poté bylo mezi skla nalito 10 ml 15% separačního gelu, který byl ihned zalit 5 ml zaostřovacího gelu. Do zaostřovacího gelu byl vsunut hřeben. Po ztuhnutí gelů byla skla přesunuta do aparatury pro SDS PAGE elektroforézu a vrchní část zaostřovacího gelu byla zalita elektrodovým pufrem. Následně byl hřeben vyjmut a jednotlivé dráhy byly upraveny tak, aby přepážky byly mezi sebou stejně daleko. Do první dráhy byl napipetován standard a do dalších drah jednotlivé vzorky, které byly nejdříve 5 min povařeny, kvůli snadnějšímu dávkování. Po nadávkování byla aparatura uzavřena a byla spuštěna elektroforéza. Elektroforéza probíhala při 130 V. Jakmile modré barvivo (Serva Blue G) indukující čelo elektroforézy dorazilo ke spodní části aparatury, byla elektroforéza ukončena, gel vyjmut a barven v barvicím roztoku. Po 1 hodině barvení byl gel několikrát promyt odbarvovacím roztokem do té doby, než byly viditelné všechny proužky.

Roztoky použité při SDS PAGE:

15% separační gel: 5,0 ml 30,8% T, 2,6% C, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH~8,8), 0,1 ml

	10% (w/v) SDS, 0,1 ml 10% (w/v) Na ₂ S ₂ O ₈ , 0,004 ml TEMED, 2,3 ml H ₂ O
6% zaostřovací gel:	1,0 ml 30,8% T, 2,6% C, 1,25 ml 0,5 M Tris (pH~6,8), 0,06 ml 10% (w/v) SDS, 0,06 ml 10% (w/v) Na ₂ S ₂ O ₈ , 0,006 ml TEMED, 2,6 ml H ₂ O
5x elektrodový pufr :	0,125 M Tris (7,6 g), 200 mM glycin (37,5 g), 0,5 % (w/v) SDS (25 g)
6x vzorkový pufr:	3,5 ml 1M Tris (pH~6,8), 3,0 ml glycerol, 1 g SDS, 600 µl 2-merkapt ethanol, 1,2 mg bromfenolová modř, destilovaná voda na doplnění objemu do 10 ml
Barvicí roztok:	10% kyselina octová, 0,1% Serva Blue G
Odbarvovací roztok:	10% kyselina octová

Výše uvedené je barvení Serva Blue G, což je barvivo podobné Coomassie Blue. Některé gely ale byly barveny stříbrem. Postup je následující.

Gel byl vložen do vhodné nádoby a za mírného míchání byl inkubován v následujících roztocích: 1,5 h ve fixačním roztoku (může být i déle, např. přes noc). 3 x po 15 min v oplachovacím roztoku. 2 min v citlivostním roztoku. 2 x po 1 min v destilované vodě. 20 min v barvicím roztoku. 40 s ve vodě. Ve vyvolávacím roztoku byl inkubován do zřetelného vyvolání všech proužků na gelu. Následně bylo přilito ekvivalentní množství zakončovacího roztoku, aby došlo k neutralizaci uhličitanu kyselinou octovou. Poté bylo ponecháno v klidu do doby, než ustane vývoj bublin a nakonec byl gel uchován v destilované vodě.

Použité roztoky:

Fixační roztok:	50% ethanol, 12% kys. octová, 0,05% formaldehyd
Oplachovací roztok:	20% ethanol
Citlivostní roztok:	0,02% thiosíran sodný Na ₂ S ₂ O ₃
Barvicí roztok:	0,2% dusičnan stříbrný, 0,076% formaldehyd – musí se skladovat v chladu a temnu (chladnička, tmavá láhev)

Vyvolávací roztok:	6% uhličitan sodný, 0,0004% thiosíran sodný, 0,05% formaldehyd
Zakončovací roztok:	12% kyselina octová

2.3.11 Purifikace γ -laktamasy na koloně s imobilizovanými Ni^{2+} ionty

Vzorky byly složeny ze 2 částí. V první části byl za vzorek považován buněčný supernatant. Byla s ním provedena purifikace na niklové koloně za použití roztoků č.1 a 2. Druhá část byla tvořena sedimentem, který byl následně promyt až do inkluzí. Zde byly použity roztoky č. 4 a 5 s močovinou.

První část, která byla promyta do supernatantu, byla připravena z namnožených bakterií, které byly následně zmrazeny a centrifugovány. Supernatant byl slit a vzniklá sraženina byla rozpuštěna v A Pufriu. Následně byla provedena sonace ultrazvukem a opět centrifugace. Supernatant byl uložen k následnému využití k purifikaci. Sraženina byla rozsuspendována v SA pufriu a uložena.

Druhá část byla promyta do inkluzí. Vzorky byly stočeny po 30 min při 11500 RPM a 4 °C. Ke sraženině bylo přidáno 25 ml TA Pufriu. Poté byly vzorky 3x po 30s sonikovány ultrazvukem. Opět byly vzorky stočeny, tentokrát 25 min při 11500 RPM a 4 °C. Supernatant byl uschován a sraženina použita k purifikaci.

Inkluze po promývání byly rozpuštěny v 16 ml močovinového pufriu (roztok č.3) a inkubovány přes noc při laboratorní teplotě za stálého míchání. Další den byly centrifugovány po dobu 12 min při 13750 RPM a 25 °C. Sraženina byla rozsuspendována v destilované vodě a byl z ní odebrán vzorek na elektroforézu SDS PAGE. Supernatant i inkluze byly naředěny pufrem (roztok č.4) na 40 ml. Kolona byla ekvilibrována roztokem č.4 (č.1), poté byl čerpán vzorek, obojí při průtoku 1,5 ml/min. Roztokem č.5 (č.2) byly uvolněny proteiny z kolony gradientem 500 mM imidazolu. Po dobu 10-ti minut bylo uvolňováno prvních 5 % roztoku č.5 (č.2). Následných 30 minut bylo určených k uvolnění 5-100% roztoku č.5 (č.2). A dalších 10 minut 100%. Odběry frakcí byly prováděny každé 3 minuty do čistých zkumavek. Celkem bylo odebráno 15 frakcí po 8 ml. Ze všech frakcí byly odebrány vzorky na elektroforézu SDS PAGE.

Roztoky použité při Purifikaci:

Roztok č.1: 20 mM TRIS, 200mM NaCl

Roztok č.2: 20 mM TRIS, 200mM NaCl, 500 mM imidazol

Roztok č.3: 20 mM TRIS, 9M močovina, 0,1% 2-merkaptoethanol

Roztok č.4: 20 mM TRIS, 8mM močovina, 0,1% merkapt ethanol

Roztok č.5: 20 mM TRIS, 8mM močovina, 0,1% merkapt ethanol, 500mM imidazol

2.3.12 Stanovení aktivity enzymu γ -laktamasy

Aktivita enzymu γ -laktamasy byla stanovena pomocí ninhydrinového testu [12, [26]. V tomto testu reaguje ninhydrin s volnými NH_2 - skupinami za vzniku modrofialového zbarvení. Test je tedy pozitivní pro všechny aminokyseliny s výjimkou cysteinu, kde v důsledku reakce činidla s SH - skupinou vzniká zbarvení oranžové. Naopak s amidovými skupinami dává test negativní reakci. Proto je možné použít ho ke stanovení amidasové aktivity γ -laktamasy, kde substrátem je N-acetylfenylalanin. Samotný substrát dává reakci negativní, ale po hydrolyze amidu a uvolnění NH_2 - skupiny fenylalaninu je reakce pozitivní.

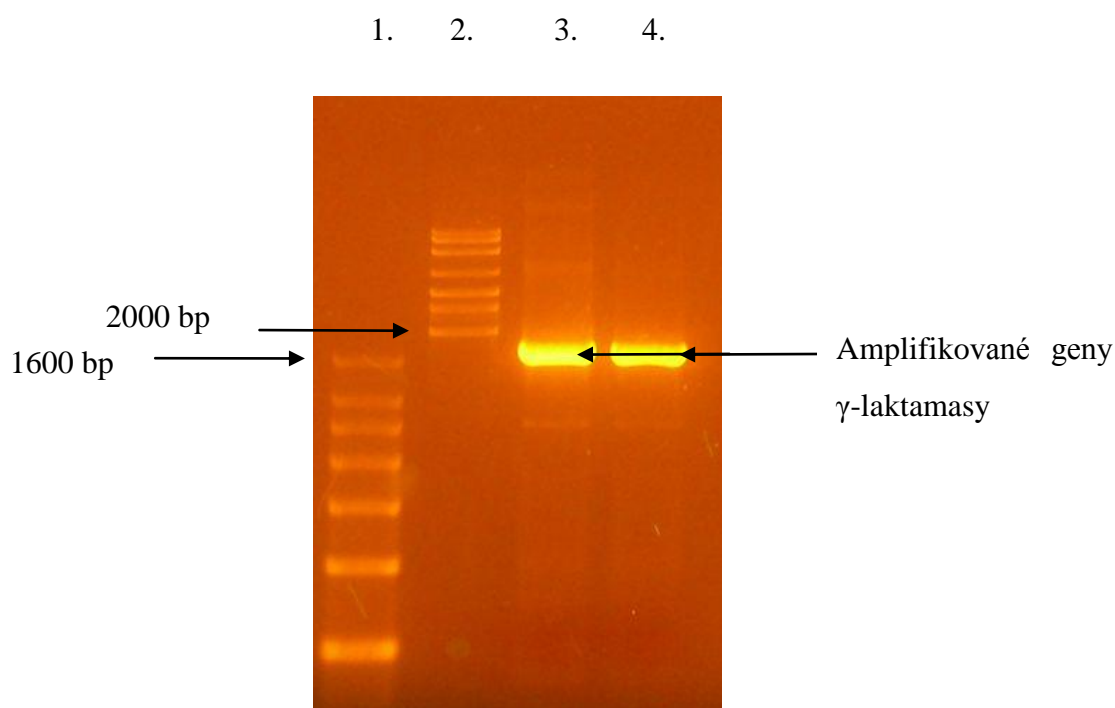
Byl připraven zásobní 0,4% roztok ninhydrinu ve vodě a zásobní roztok reakčního pufru 100 mM TRIS (pH~7). Reakční směs byla připravena smícháním 500 μl zásobního roztoku ninhydrinu, 450 μl reakčního pufru a 50 μl vzorku testovaného na přítomnost aminokyselin s volnou NH_2 - skupinou. (V případech, kdy měl vzorek větší objem, bylo použito méně pufru – minimálně 350 μl – jelikož jeho pufrací kapacita je dostatečná.) Směs byla zahřívána ve vařící vodě 15-30 s.

Jako pozitivní kontrola testu byly použity čisté aminokyseliny L-arginin (10 mg/ml), L-glycin (10 mg/ml) a DL-fenylalanin (racemická směs fenylalaninu) (10 mg/ml). Jako negativní kontrola byl použit N-acetylfenylalanin. Následně byla provedena reakce se vzorkem buněk z narostlé bakteriální kultury, a to nejdříve jako slepý pokus bez přídavku substrátu N-acetylfenylalaninu a následně s jeho přídavkem v koncentraci (10 mg/ml). Narostlá buněčná kultura obsahující γ -laktamasu byla odebrána a upravena tak, aby ji bylo možné použít k ninhydrinovému testu. K 500 μl zásobního roztoku ninhydrinu a 450 μl reakčního pufru bylo přidáno 50 μl buněčné kultury.

3 VÝSLEDKY

3.1 Amplifikace genu γ -laktamasy pomocí PCR

Gen γ -laktamasy byl amplifikován (zmnožen) metodou PCR s využitím primerů obsahujících štěpicí místa restričních endonukleáz použitých pro klonování do příslušných plasmidů. Reakce byla prováděna se dvěma různými koncentracemi templátu, kde templát ve 2. reakci byl 10x zředěn oproti templátu v 1. reakci.

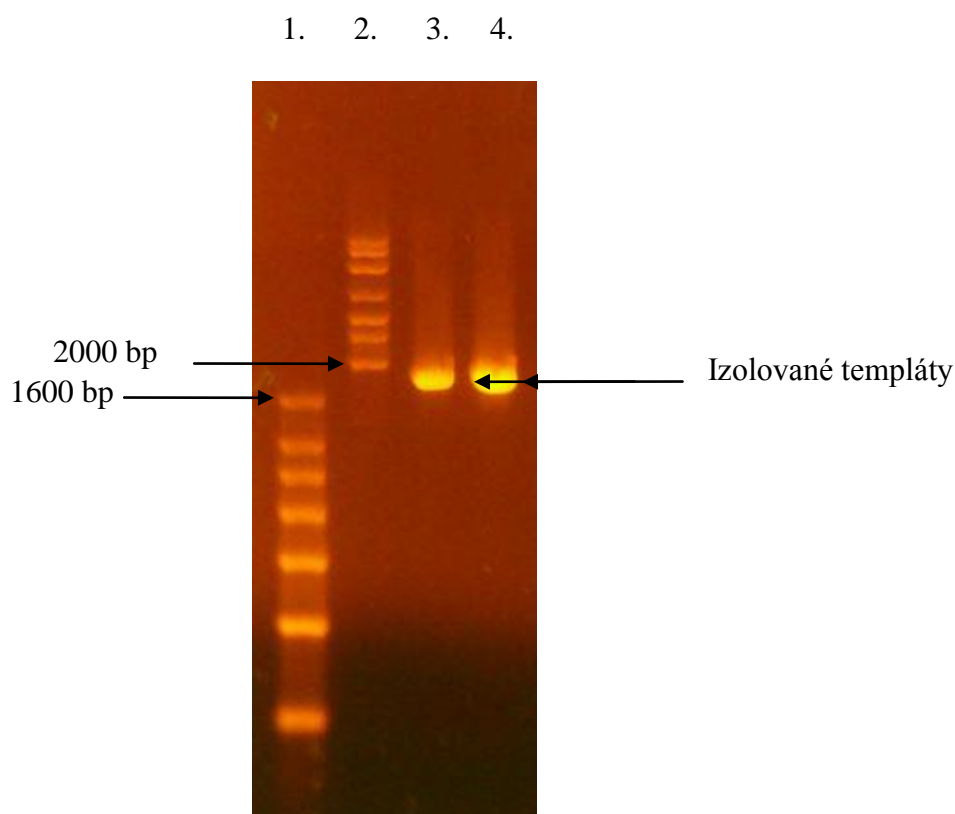


Obr. 12. Agarosová elektroforéza PCR produktů: 1. standard DNA (200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1600 bp), 2. standard DNA (2000, 2500, 3000, 4000, 6000, 8000, 10000 bp), 3. a 4. PCR produkt: amplifikovaný gen γ -laktamasy rozdělen na 2 podíly.

Na obr. 9 je zobrazen výsledek agarosové elektroforézy. Výsledné PCR produkty jsou vidět v dráhách 3 a 4. Z gelu je patrné, že jejich poloha mezi proužky standardů o velikostech 1600 a 2000 bp odpovídá očekávané velikosti 1700 bp. Dále je vidět, že koncentrace templátu neměla významný vliv na množství produktu, které je v obou

reakcích dostatečně vysoké. V reakci se zředěnějším templátem je však o něco méně nespecifických produktů, jejichž množství je však v obou reakcích relativně nízké.

PCR produkt byl izolován agarosovou elektroforézou a extrahován z gelu pomocí izolační soupravy (kitu). Izolované produkty byly analyzovány agarosovou elektroforézou (obr. 10). Z obrázku je vidět dostatečné množství i čistota obou vzorků.



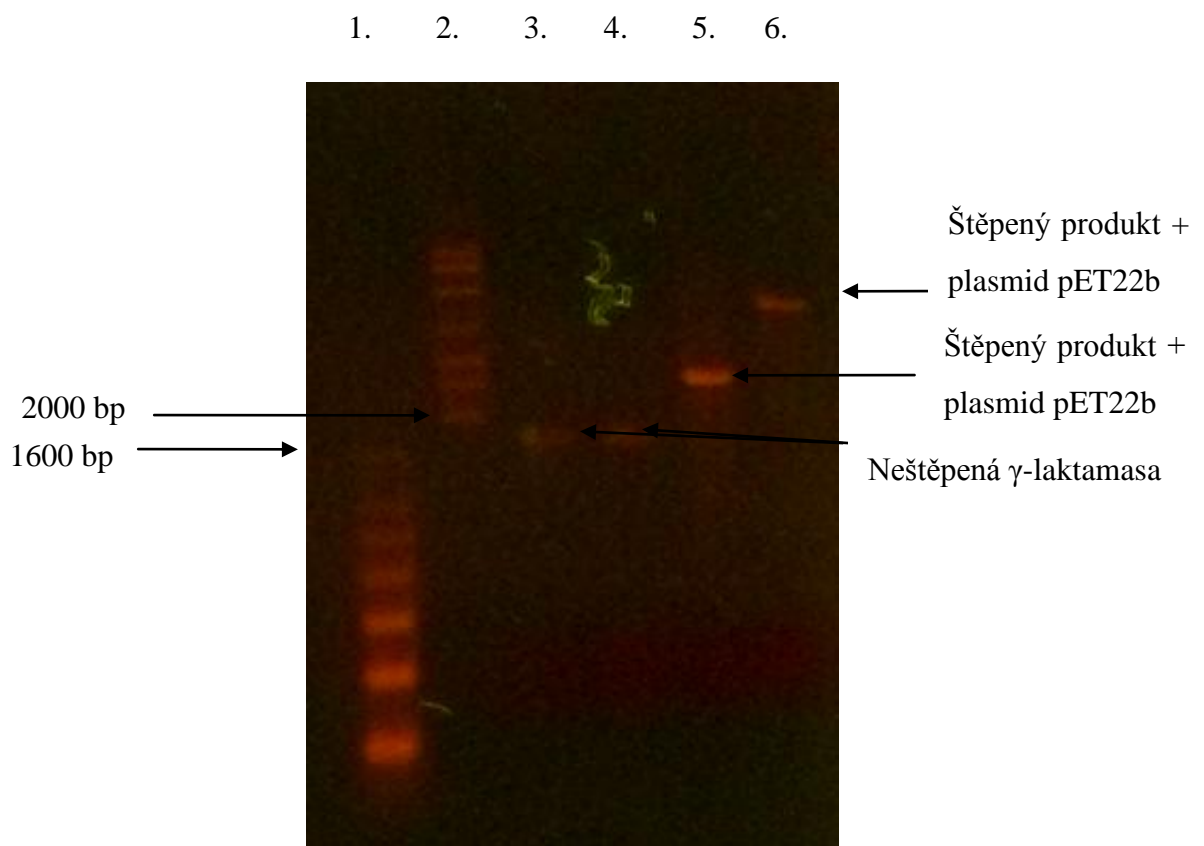
Obr. 13. Agarosová elektroforéza izolovaných produktů: 1. standard DNA (200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1600), 2. standard DNA (2000, 2500, 3000, 4000, 6000, 8000, 10000), 3. a 4. izolované PCR produkty

3.2 Restrikční štěpení vektorů a insertů

PCR produkty byly upraveny štěpením pomocí restrikčních endonukleas pro klonování do dvou plasmidů pUC19 a pET22b. Plasmid pET22b bude dále používán jako expresní vektor pro přípravu rekombinantní γ -laktamasy. Klonování do plasmidu pUC19 má pouze pomocný význam. Tento konstrukt lze využít v případě, že se nedaří provést přímé

klonování do pET22b z důvodu nízké účinnosti štěpení PCR produktu restrikčními endonukleasami.

Bylo proto provedeno restrikční štěpení PCR produktu a plasmidu pET22b restrikčními endonukleasami NdeI a XhoI a zároveň restrikční štěpení druhého podílu PCR produktu a plasmidu pUC19 restrikčními endonukleasami EcoRI a HindIII. Všechny štěpené vzorky DNA byly izolovány pomocí agarosové elektroforézy a izolačního kitu. Izolované produkty byly zkontrolovány pomocí agarosové elektroforézy (obr. 11).



Obr. 14. Agarosová elektroforéza izolovaných produktů: 1. standard DNA (200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1600), 2. standard DNA (2000, 2500, 3000, 4000, 6000, 8000, 10000), 3. γ -laktamasa (EcoRI/HindIII), 4. γ -laktamasa (NdeI/XhoI), 5. pUC19 (EcoRI/HindIII), 6. pET22b (NdeI/XhoI)

Proužky v jednotlivých drahách odpovídají svojí polohou předpokládaným velikostem, které jsou 1731 a 1743 bp pro inzert štěpený EcoRI a HindIII, resp. NdeI a XhoI, 2635 bp pro vektor pUC19 a 5364 bp pro vektor pET22b.

3.3 Ligace a transformace

Inserty obsahující geny γ -laktamasy ligovány pomocí DNA-ligasy do plasmidů pUC19 a pET22b. Analogicky byly provedeny slepé pokusy bez inzertů.

Kompetentní buňky DH5 α byly transformovány produkty jednotlivých ligací včetně slepých pokusů. Na každé z nich bylo okolo 40 kolonií kromě kontrolního vzorku, který byl negativní. Jako kontrolní vzorky byly použity vzorky s pUC19 a pET22b. Z několika kolonií byla připravena plazmidová DNA metodou minipreparace.

3.4 Minipreparace

Po minipreparaci bylo provedeno restriční štěpení restričními endonukleásami. V případě plasmidu pET22b byly přidány endonukleázy NdeI a XhoI. Co se týče plasmidu pUC19, tak k němu byly přidány restriční endonukleázy EcoRI a Hind III. Pro kontrolu ověření přítomnosti insertu byla provedena agarosová elektroforéza s fluorescenčním indikátorem ethidium bromidem.

3.5 Exprese γ -laktamasy

Rekombinantní γ -laktamasa byla exprimována v 3 x 0,5 l LB média s ampicilinem. Přitom byla každých 30 minut měřena jejich optická hustota při 600 nm (OD_{600}) až do dosažení hodnoty cca 1,0 (*Tab. 1*).

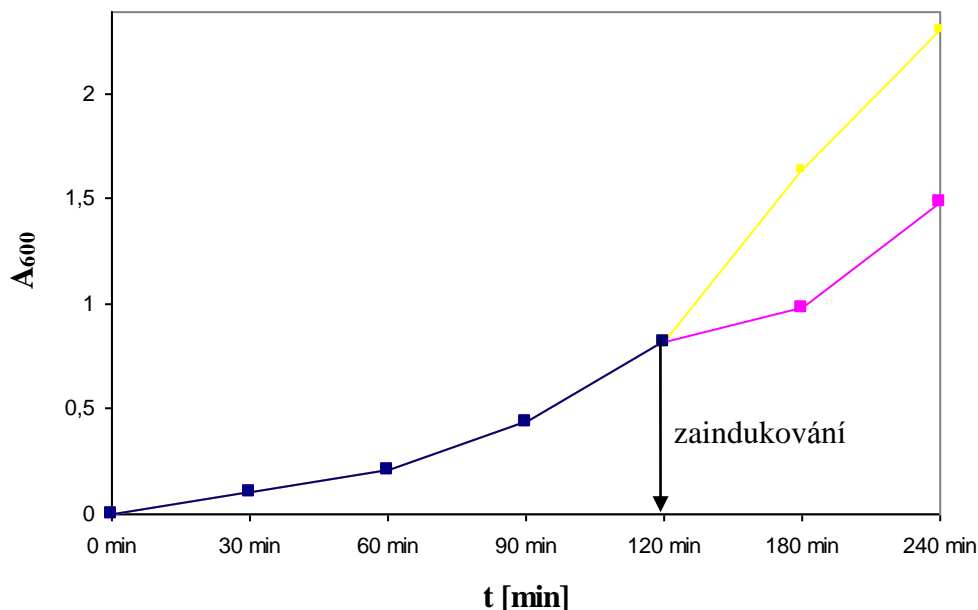
Tab. 1. Hodnoty OD_{600} při nárůstu kultury č. 1 před indukci, které byly měřeny každých 30 min

	30 min	60 min	90 min	120 min
vz. č. 1	0,1	0,21	0,44	0,94

Poté byl z rostoucí kultury odebrán vzorek o objemu 10 ml do sterilní plastové zkumavky, který byl dále kultivován bez indukce IPTG jako slepý pokus pro účely porovnání růstových křivek indukované a neindukované kultury. Hlavní část kultury byla indukována IPTG do finální koncentrace 1 mM. Hodnoty optických hustot obou kultur byly měřeny v intervalech po 1 hodině. Výsledky jsou uvedeny v *Tab. 2*.

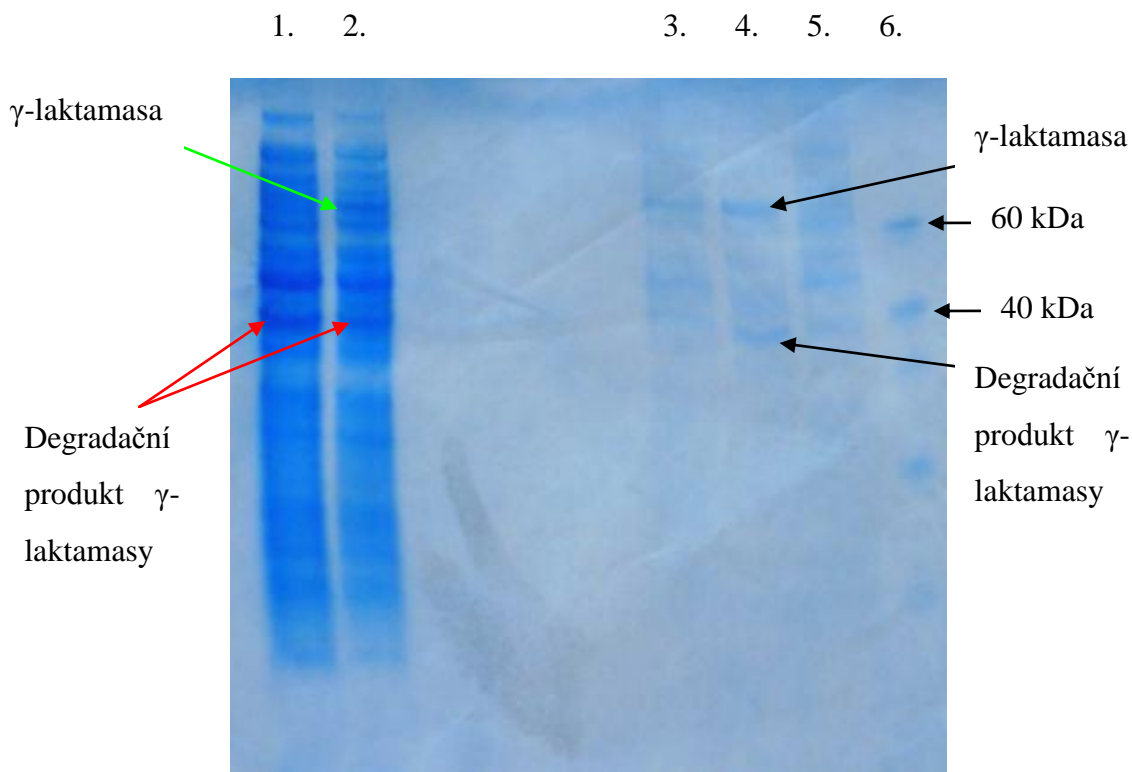
Tab. 2. Hodnoty OD kultury č.1 měřené každých 60 min po indukci

vz.č.1	180 min	240 min
Kultura indukovaná IPTG	0,98	1,49
Kultura neindukovaná IPTG (slepý pokus)	1,64	2,3



Obr. 15. Růstová křivka kultury bakterií č.1 exprimující γ -laktamasu. Modrá křivka zobrazuje nárůst kultur od zaočkování do zaindukování. Žlutá křivka zobrazuje nárůst kultur, které byly ponechány bez induktoru IPTG (slepý pokus). Růžová křivka naopak nárůst s obsaženým induktorem IPTG.

Po ukončení exprese γ -laktamasy byla provedena destrukce buněk ultrazvukem a byly odebrány vzorky na elektroforézu SDS PAGE, která byla provedena pro srovnání vzorků bakteriálních kultur před indukci a po indukci a vzorků sedimentu a supernatantu buněk po sonikaci. Gel z elektroforézy je zobrazen na obr. 16.



Obr. 16. Elektroforéza γ -laktamasy s his-tagem – indukce. 1. γ -laktamasa před indukci, 2. γ -laktamasa po indukci, 3. γ -laktamasa před ultrazvukem, 4. γ -laktamasa sraženina po ultrazvuku, 5. γ -laktamasa supernatant po ultrazvuku, 6. Protein marker (60, 40, 30, 20, 10 kDa),

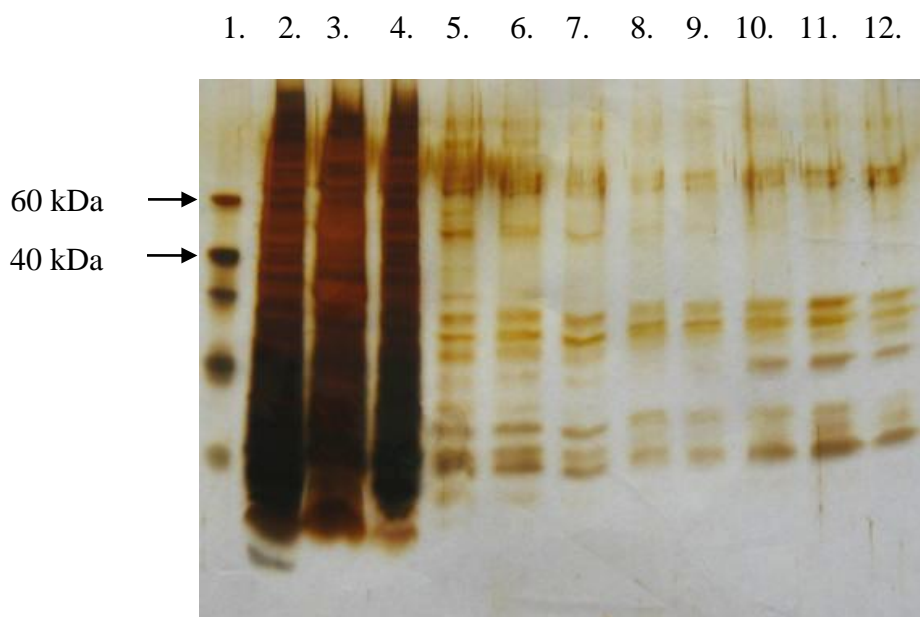
Z obrázku je vidět, že exprese γ -laktamasy je velmi slabá a není ani příliš jasná, zda k ní vůbec dochází. Zelená šipka označuje proužek, který by mohl patřit γ -laktamase, protože se na rozdíl od jiných vyskytuje v indukované kultuře s podstatně vyšší intenzitou než v kultuře neindukované. U tohoto proužku přibližně souhlasí i molekulová hmotnost, jejíž teoreticky zjištěná hodnota pro γ -laktamasu s histidinovou kotvou je 62685 Da. Na obrázku je dále červenou šipkou označen i proužek proteinu, který je možným degradačním produktem γ -laktamasy obsahující správný C-konec, ale mající odštěpený N-konec. Tato hypotéza pramení z pozorování, že protein této velikosti pravděpodobně obsahuje sekvenci histidinové kotvy, protože pozorujeme jeho záchyt v afinitní chromatografii na koloně s imobilizovanými nikelnatými ionty, jak bude popsáno v následujícím odstavci.

Z elektroforézy je dále patrné, že oba označené proteiny, které by mohly odpovídat kompletní γ -laktamase nebo jejímu degradačnímu produktu, zůstávají spíše v peletě po

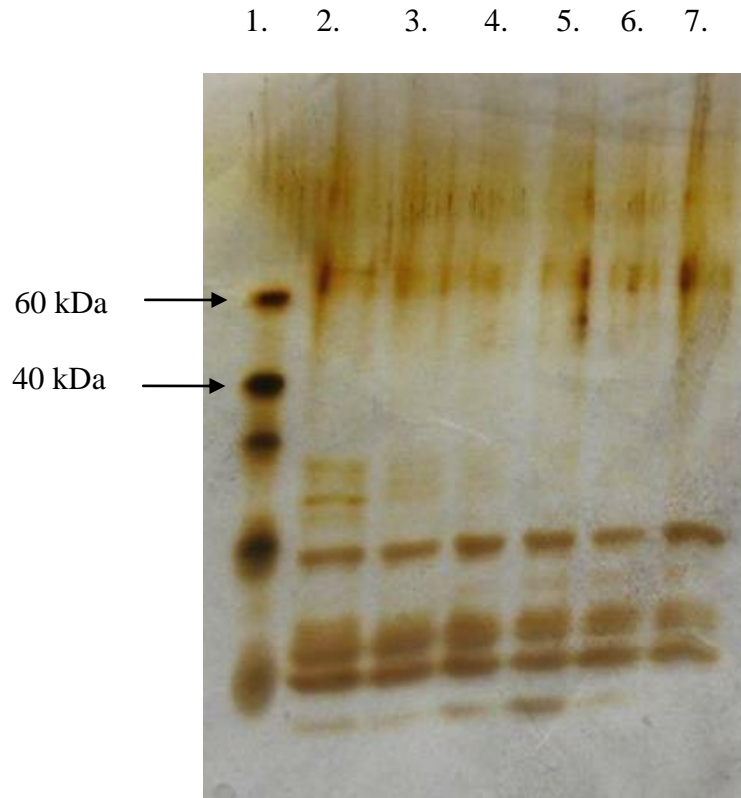
odstředění buněk po sonikaci než v buněčném supernatantu, takže jsou pravděpodobně deponovány v buňce ve formě inkluzních tělísek.

3.6 Čištění γ -laktamasy chromatografií na koloně s imobilizovanými Ni^{2+} ionty

Buněčný supernatant získaný destrukcí narostlých bakteriálních kultur byl zředěn a podroben chromatografii na koloně s imobilizovanými Ni^{2+} ionty. Jako první byl k němu přidán roztok č.1. Ten byl čerpán přes niklovou kolonu, ve které se vzorek zadržoval. Po vyčerpání roztoku č.1 byl použit roztok č.2, který postupně vymýval niklovou kolonu a díky tomu bylo možno odebírat vzorky do jednotlivých zkumavek. Všechny vzorky v jednotlivých zkumavkách byly podrobeny kontrole pomocí elektroforézy. Výsledky jsou zobrazeny v obrázcích (*Obr. 17, Obr. 18*)



Obr. 17. Purifikace γ -laktamasy na niklové koloně. První část elfa. 1. Protein marker (60, 40, 30, 20, 10 kDa), 2. γ -laktamasa supernatant, 3. γ -laktamasa sraženina, 4. FT po purifikaci, 5.-12. Gradient frakce č. 2-9

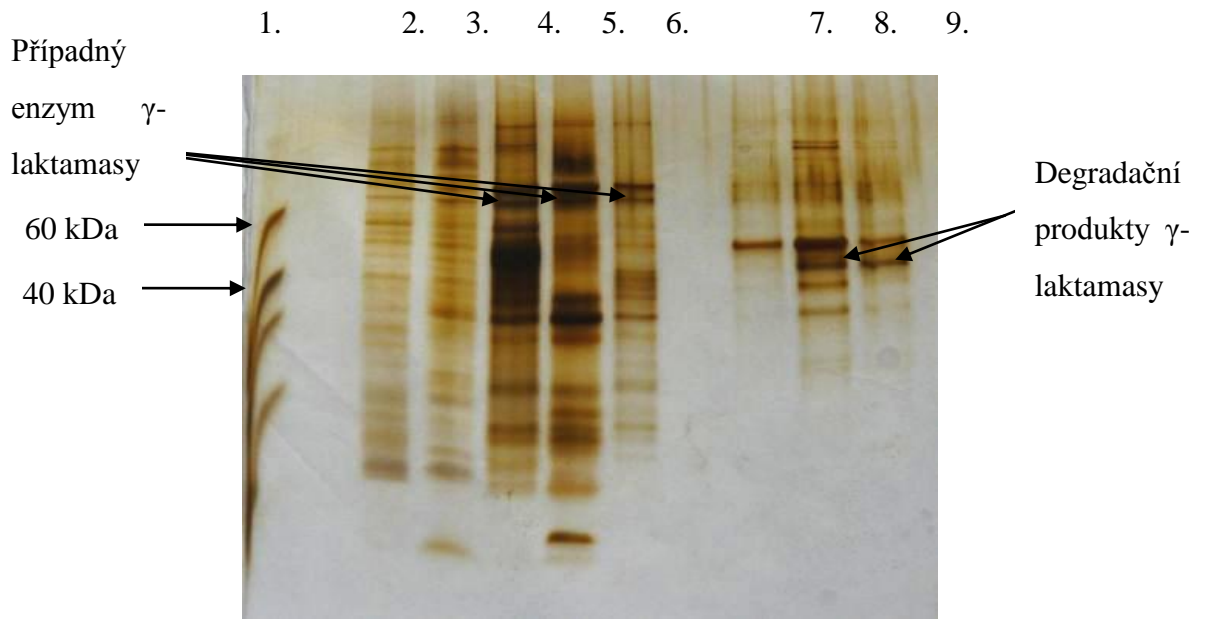


Obr. 18. Purifikace γ -laktamasy na niklové koloně. Druhá část elfa.
1. Protein marker (60, 40, 30, 20, 10 kDa), 2.-7. Gradient frakce č.
10-15

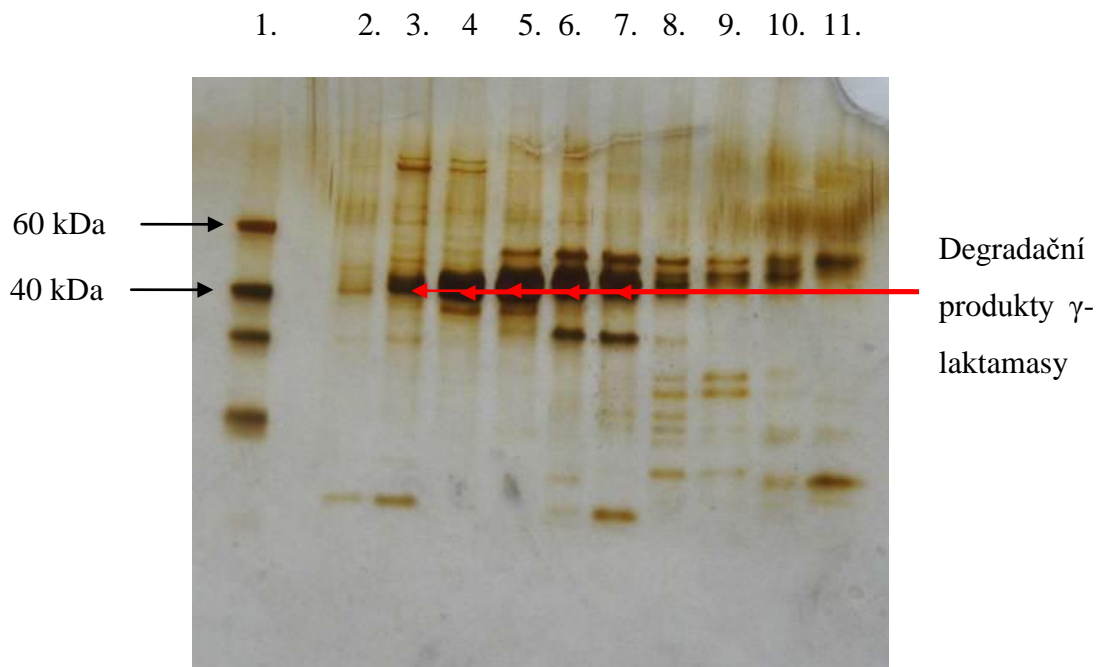
Z gelů je vidět, že žádný protein velikosti γ -laktamasy se na koloně nezachytil a nebyl z ní ani eluován. Eluovány byly jen některé nespecificky zachycené proteiny, které ale svou velikostí γ -laktamase neodpovídají. Je tedy pravděpodobné, že se γ -laktamasa ukládá v buňkách ve formě inkluzních tělísek.

Proto byl proveden pokus o izolaci γ -laktamasy z inkluzních tělísek, a to jednak pro prokázání její přítomnosti v bakteriální kultuře, jednak pro případné provedení renaturace.

Ze sedimentu byly promyty inkluze. Jediný rozdíl oproti předchozí chromatografii bylo v použití rozdílných roztoků. Při čerpání byl použit roztok č. 4: 20 mM TRIS, 8 mM močovina, 0,1% ME a k promývání roztok č. 5: 20 mM TRIS, 8 mM močovina, 0,1% ME, 500 mM imidasol.



Obr. 19. Purifikace γ -laktamasy na niklové koloně v močovíně. První část elfa. 1. Protein Marker (60, 40, 30, 20, 10 kDa), 2. γ -laktamasa – supernatant po 3x ultrazvuku. 3. γ -laktamasa – supernatant po 6x ultrazvuku. 4. γ -laktamasa – supernatant, 5. γ -laktamasa – sraženina (ze 14.9.2011), 6. γ -laktamasa – Ft po purifikaci, 7-9. γ -laktamasa z chromatografie vz. č. 3-5.



Obr. 20. Purifikace γ -laktamasy na niklové koloně v močovíně. Druhá část elfa. 1. Protein Marker (60, 40, 30, 20, 10 kDa), 2.-11. γ -laktamasa z Chromatografie vz. č. 6-15

Z gelů vyplývá, že se podařilo v dostatečném množství izolovat protein o relativní molekulové hmotnosti 40-45 kDa, který ale svou velikostí neodpovídá γ -laktamase. Protože se ale na koloně zachytil ve značném množství a došlo k jeho významnému načištění, je pravděpodobné, že obsahuje sekvenci histidinové kotvy a jedná se tedy o C-koncový fragment γ -laktamasy vzniklý štěpením bakteriálními proteasami. Tuto hypotézu by ale bylo třeba potvrdit analýzou příslušného proužku z gelu metodou hmotnostní spektrometrie příslušného proužku z gelu, což se už ale v rámci této bakalářské práce nepodařilo realizovat.

3.7 Stanovení aktivity enzymu γ -laktamasy

Jako první byl proveden test účinnosti reakce ninhydrinu. Před povařením byly všechny 3 vzorky beze změny, jen arginin po přidavku ninhydrinu mírně zežloutnul. Po 1 minutě vaření byly viditelné barevné změny roztoků. Jelikož je pozitivní test alfa-aminokyselin podle článků dokázán barevnou změnou do modra až fialova [26], byly roztoky s Glycinem a Argininem prohlášeny za pozitivní. Jakékoliv ostatní zbarvení znamená negativní test [26]. Roztok s Cysteinem byl zbarven do béžové až oranžové barvy, tudíž byl prohlášen za negativní.

Podobný test byl proveden i s dalšími vzorky, tentokrát ale pro důkaz aktivity enzymu γ -laktamasy. V jednom z nich bylo 50 μ l buněk obsahující enzym γ -laktamasy. Po přidání 500 μ l ninhydrinu a po povaření byly všechny vzorky negativní.

DISKUSE

Expresní systém (+) γ -laktamasy z *Comamonas acidovorans* byl již dříve připraven v bakalářské práci M. Magyerkové [18]. Tento expresní systém obsahuje prostou sekvenci enzymu čítající 575 aminokyselin, která není fúzována s žádnými dalšími proteinovými sekvencemi usnadňujícími izolaci γ -laktamasy. Vzhledem k tomu, že exprese γ -laktamasy dosažená ve výše uvedené práci byla velmi nízká a prakticky znemožňovala purifikaci enzymu, rozhodli jsme se připravit expresní systém pro produkci fúzního proteinu s N-koncovou histidinovou kotvou, tedy sekvencí šesti histidinů. Tato sekvence umožňuje selektivní zachycení proteinu v metodě afinitní chromatografie na koloně s imobilizovanými Ni^{2+} ionty.

Dříve připravený expresní vektor pET22b obsahující sekvenci γ -laktamasy byl použit jako templát pro PCR reakci. V této reakci byly použity primery obsahující sekvenci N-koncové histidinové kotvy a dvě dvojice restričních míst pro subklonování do dvou plasmidů, pomocného plasmidu pUC19 a expresního plasmidu pET22b. Použití dvou plasmidů sice není pro dosažení našeho cíle nezbytné, nicméně použití pomocného plasmidu je vhodnou pojistkou proti eventuálním komplikacím při klonování do plasmidu expresního. V některých případech se totiž stává že štěpení restričními endonukleasami použitými pro klonování do expresního plasmidu není dostatečně účinné, což společně s nižší účinností transformace bakteriálních buněk tímto plasmidem může způsobit, že počet kolonií, narostlých na Petriho miskách s agarem, je velmi nízký, nebo i nulový. Naopak použití plasmidu pUC19 a restričních endonukleas EcoRI a HindIII obvykle tímto nedostatkem netrpí. Zaklonovaný insert potom může být po izolaci plasmidu vyštěpen s podstatně vyšší účinností a subklonován do expresního plasmidu pET22b [27].

Klonování genu γ -laktamasy tedy bylo provedeno oběma uvedenými způsoby a několik klonů obou typů konstruktů, odvozených jak od pUC19 tak od pET22b, bylo posláno do sekvenční laboratoře k provedení sekvenční analýzy. Tato analýza potvrdila správnost několika klonů obojího typu. K experimentům týkajícím se exprese proteinu byl tedy použit jeden z ověřených klonů expresního vektoru pET22b se zaklonovaným genem γ -laktamasy.

Exprese γ -laktamasy s C-koncovou histidinovou kotvou byla prováděna v bakteriálních buňkách *E. coli* kmene BL21(DE3)RIL. Bakteriální kultura byla indukována induktorem IPTG, ale její část byla ponechána jako slepý pokus bez indukce. U obou kultur

byla měřena optická hustota při 600 nm z průběhu i na konci nárůstu. Z výsledku vyplývá, že konečná optická hustota indukované kultury byla přibližně 1,5x nižší než u kultury neindukované. To je v souladu s předpokladem, že v indukované kultuře dochází k expresi rekombinantního proteinu. Exprese v použitých buňkách je totiž řízena silným bakteriofágovým promotorem, a proto v podstatné míře vyčerpává biosyntetický aparát buňky. Proto je samotný růst bakterií pomalejší.

Exprese γ -laktamasy v *E. coli* byla vyhodnocena pomocí SDS PAGE elektroforézy porovnáním proteinového obsahu bakteriálních buněk před indukcí a po indukci. Z této analýzy vyplynulo, že γ -laktamasa je v buňkách produkována dosti slabě, protože proužek, který jí velikostně odpovídal, byl sice přítomen v buňkách po indukci, zatímco v buňkách před indukcí chyběl, ale jeho intenzita byla velice slabá. Proto ani není možné expresi jednoznačně potvrdit.

Nízká exprese proteinu může svědčit o tom, že produkováný protein je aktivní a jeho amidásová aktivita působí na bakterie toxicky. To může zpomalovat jejich nárůst, jakož i samotnou expresi proteinu. Tento jev byl pozorován i v předchozí práci u konstruktů bez histidinové kotvy, kde byla navíc sledována i exprese z nesprávného expresního vektoru obsahujícího pouze část genu γ -laktamasy. Exprese tohoto fragmentu je relativně vysoká, což je asi způsobeno jeho pravděpodobnou neaktivitou a tedy i netoxicitou. Naopak exprese kompletní γ -laktamasy byla v této práci nízká, což bylo pozorováno i v našich experimentech.

Přestože exprese γ -laktamasy byla velmi nízká, pokusili jsme se o její izolaci. Nejdříve jsme se snažili izolovat protein z buněčného supernatantu po destrukci bakteriálních buněk. Zředěný buněčný supernatant byl nanesen na kolonu s imobilizovanými Ni^{2+} ionty a zachycené proteiny byly eluovány gradientem imidazolu. Frakce byly analyzovány pomocí SDS PAGE elektroforézy. Na gelu ovšem nebyly pozorovatelné žádné výrazné proužky odpovídající svou velikostí γ -laktamase. Většina proteinů přítomných ve vzorku nanášeném na kolonu protekla bez zachycení, z kolony pak bylo eluováno pouze několik proteinů, zachycených pravděpodobně nespecificky, které γ -laktamase svou velikostí neodpovídají. To může svědčit buď o nedostatečném zachycení enzymu na nosiči, nebo o tom, že enzym je nerozpustný a ukládá se v buňkách ve formě inkluzních tělísek.

Vzhledem k možnosti ukládání γ -laktamasy v inkluzních tělískách byl proveden pokus o její izolaci z tohoto materiálu a následnou renaturaci. Inkluze byly rozpuštěny v pufru

obsahujícím 8M močovinu jakožto chaotropní činidlo. V tomto prostředí pak byla provedena afinitní chromatografie na koloně s imobilizovanými nikelnatými ionty. Po eluci zachycených proteinů z kolony bylo získáno několik frakcí, které obsahovaly velké množství výrazně načištěného proteinu o relativní molekulové hmotnosti v rozmezí 40-45 kDa. Tato velikost je ovšem podstatně nižší než je předpokládáno u γ -laktamasy. Protože však sekvence histidinové kotvy není ve vlastních proteinech *E. coli* přítomna, je pravděpodobné, že zachycený protein je C-koncovým fragmentem γ -laktamasy, která ztratila svůj N-konec v důsledku odštěpení některou bakteriální proteasou. Tuto hypotézu by ale bylo třeba potvrdit charakterizací trypsinových štěpů tohoto proteinu metodou hmotnostní spektrometrie, což se z časových důvodů nepodařilo uskutečnit.

Vzhledem k tomu, že γ -laktamasa je s dosti značnou pravděpodobností produkována jako fragment vzniklý proteolytickým štěpením přímo při nárůstu v bakteriích, je třeba zkontrolovat, zda je tento fragment pozorovatelný už při nárůstu buněk. Na obr. 12 na str. 37 jsou pozorovatelné proužky proteinů o velikosti diskutovaného fragmentu, ale tyto proužky jsou přítomny jak v buňkách před indukci, tak po indukci. To může mít více vysvětlení. Buďto tyto proužky patří vlastním proteinům z *E. coli* a fragment γ -laktamasy není přítomen nebo je jimi překryt, nebo dochází k expresi γ -laktamasy už před indukci. To se u některých proteinů stává, ale v případě expresních plasmidů pET nebývá tento jev příliš silný. Konečně je také možné, ale nepříliš pravděpodobné, že ke štěpení γ -laktamasy dochází až po ukončení nárůstu nebo v procesu destrukce buněk a vede ke srážení vzniklého fragmentu. V tomto posledním případě by bylo možné degradaci omezit přidávkem inhibitorů proteolytických enzymů.

Expres a purifikace γ -laktamasy z *Comamonas acidovorans* v *E. coli* byla již dříve publikována [5, [17]. V těchto pracích jsou použity mírně odlišné expresní systémy, navíc γ -laktamasa není značena histidinovou kotvou. V publikaci [5] je prováděna exprese za nižší teploty, bakterie jsou navíc kultivovány ve velkoobjemovém fermentoru. Gonsalvez a spol. [17] bližší podmínky exprese neuvádějí. V obou článcích je ale konstatována dobrá exprese a následná účinná purifikace γ -laktamasy. V určitém rozporu s tím je fakt, že ani jedni autoři neuvádějí žádný obrázek gelu z SDS PAGE elektroforézy, jímž by prokázali čistotu proteinu, ani žádná přesná data o množství vyprodukovaného proteinu. To je poněkud překvapivé zejména u práce [5], kde je protein produkován v poloprůmyslovém měřítku.

Další nesrovnalostí v publikovaných člancích [5, [17] je pozorovaná molekulová hmotnost exprimovaného proteinu. Gonsalvez a spol. [17] sice detailně nepopisují svůj expresní plazmid, pouze konstatují jeho získání od firmy Chirotech Ltd., ale je možné předpokládat, že se jedná o plazmid vyvinutý autory Taylor a spol. [5], protože jde o stejnou výzkumnou skupinu. Obě skupiny autorů však uvádějí rozdílnou pozorovanou molekulovou hmotnost monomeru γ -laktamasy, podle Taylora a spol. [5] je 53-55 kDa (údaj z SDS PAGE), zatímco Gonsalvez a spol. [17] naměřili pomocí hmotnostní spektrometrie 44294 Da. K tomu je navíc třeba dodat, že teoretická molekulová hmotnost je 61 kDa. Třebaže tedy není přesně známo, z jakých expresních plazmidů byly oba proteiny exprimovány, je možné, že se také jednalo pouze o fragmenty γ -laktamasy. Kratší z obou popisovaných fragmentů svojí molekulovou hmotností odpovídá tomu, který byl izolován i inkluzních tělísek i v našem experimentu. Delší fragment by mohl odpovídat proteinu, který je v naší chromatografii přítomen společně s fragmentem kratším, ale v podstatně menší míře.

Za pozornost stojí také poznámka autorů Taylor a spol. [5], že exprese proteinu nevyžadovala indukci IPTG. Přitom v jejich expresním systému je exprese genu řízena laktózovým promotorem, stejně jako v našem systému. V našem experimentu jsme sice pozorovali zvýšenou intenzitu proužku odpovídajícího kompletní γ -laktamase v buňkách po indukci oproti buňkám před indukcí, ale i před indukcí je v tomto místě pozorovatelný proužek. Pokud bychom navíc přijali hypotézu o degradaci γ -laktamasy na zkrácené fragmenty, pak tyto pozorujeme v dostatečné intenzitě před i po indukci. To by mohlo znamenat, že γ -laktamasa, produkovaná už i ve stopovém množství, působí v těchto expresních systémech jako induktor, což nám komplikuje interpretaci výsledků.

V obou citovaných publikacích popisují autoři jimi vyprodukovanou γ -laktamasu, jakkoli jsou jejich produkty vzájemně různé, jako aktivní a exprimovanou jako rozpustný protein. Námi izolovaný fragment byl nalezen v inkluzních tělískách, tedy v denaturované formě. To může být dáno příliš prudkou expresí, poněvadž narozdíl od obou citovaných prací jsme použili expresní systém se silnějším promotorem a prováděli expresi za teploty 37 °C, zatímco Taylor a spol. [5] za 25 °C. Podmínky exprese by tedy bylo žádoucí ještě optimalizovat.

Všechny uvedené hypotézy je ale třeba potvrdit nebo vyvrátit pomocí dalších experimentů, které už z časových důvodů nemohly být provedeny v rámci této bakalářské

práce. V první řadě je nutné ověřit identitu fragmentu izolovaného z inkluzních tělísek pomocí hmotnostní spektrometrie. Bude-li tento protein opravdu fragmentem γ -laktamasy, je možné dále upravovat podmínky jeho exprese a purifikace tak, aby byl produkován jako rozpustný protein a mohla být změřena jeho enzymová aktivita. Podaří-li se identifikovat jeho N-konec, je možné pokusit se mutací aminokyselin okolo místa štěpení degradaci proteinu omezit.

γ -laktamasa z *Comamonas acidovorans* byla pro náš účel zvolena z toho důvodu, že byla v literatuře popsána její produkce ve větším než laboratorním měřítku a použité metody se jevíly vhodné i pro náš projekt. Nicméně vzhledem k problémům, které příprava tohoto enzymu přináší, a nejasnostem v literárních zdrojích, by mohlo být nakonec vhodnější zaměřit se na některou jinou γ -laktamasu, například termostabilní γ -laktamasu ze *Sulfolobus solfataricus*. Její produkce a charakterizace je v literatuře rovněž popsána [8, [15] a tento enzym se jeví jako strukturně jednodušší a v mnoha ohledech méně problematický než námi studovaná γ -laktamasa. Výhodou by navíc mohla být i jeho termostabilita.

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo připravit nový expresní systém pro expresi (+) γ -laktamasy z *Comamonas acidovorans* v *E. coli* tak, aby byl tento enzym produkován ve fúzi s C-koncovou histidinovou kotvou (sekvencí 6 histidinů). Dalším cílem bylo otestovat expresi tohoto proteinu a pokusit se o jeho izolaci.

Prvního z cílů, přípravy expresního systému, bylo dosaženo v plném rozsahu. Expresní plazmid na bázi vektoru pET22b byl připraven ligačním spojením tohoto vektoru s genem γ -laktamasy tak, aby byl protein při expresi prodloužen o sekvenci histidinové kotvy nacházející se na plazmidu. Jako zdroj genu byl použit dříve připravený expresní systém, který poskytoval γ -laktamasu samotnou, tedy bez histidinové kotvy. Správnost sekvence získaného konstruktů byla potvrzena sekvenční analýzou.

Druhého z cílů, otestování exprese a pokusu o izolaci proteinu, bylo dosaženo jen částečně. γ -laktamasa byla exprimována v *E. coli*, přičemž její produkce byla nízká a ne zcela zřetelná. Při pokusu o izolaci enzymu, jakožto rozpustného proteinu z buněčného supernatantu, se ho nepodařilo zachytit a následně eluovat z kolony s imobilizovanými nikelnatými ionty v prokazatelném množství. Navíc při testování jeho aktivity vůči N-acetylfenylalaninu se všechny testované frakce jevily jako negativní. Naopak při pokusu o izolaci γ -laktamasy z inkluzních tělísek se na stejné koloně podařilo významně načistit protein, jehož molekulová hmotnost však byla nižší, než má klonovaná γ -laktamasa. Mohlo by se tedy jednat o produkt degradace γ -laktamasy bakteriálními proteasami, který je zkrácen z N-konce, ale obsahuje C-koncovou histidinovou kotvu.

K potvrzení této hypotézy je však potřeba provést další experimenty, zejména hmotnostní spektrometrii tohoto proteinu. V případě pozitivních výsledků je pak možno pokračovat v dalších experimentech za účelem získání aktivního enzymu. V opačném případě by bylo vhodné pokračovat v projektu s γ -laktamasou z jiného mikroorganismu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Taylor, S.J.C., McCague, R., Wisdom, R., Lee, C., Dickson, K., Ruecroft, G. Development of the biocatalytic resolution of 2-azabicyclo[2.2.1]-hept-5-en-3-one as an entry to single enantiomer carbocyclic nucleosides. *Tetrahedron Assym.* **4**, 1117–1128 (1993)
- [2] Line, K., Isupov, M.N., Littlechild, J.A. The Crystal Structure of a (–) γ -lactamase from an *Aureobacterium* Species Reveals a Tetrahedral Intermediate in the Active Site. *J. Mol. Biol.* **338**, 519–532 (2004)
- [3] Daluge, S., Vince, R.J. *J. Org. Chem.* **43**, 2311 (1978)
- [4] Marquez, V.E., Lim, M.I. *Med. Res. Rev.* **6**, 1 (1986)
- [5] Taylor, S.J.C., Brown, R.C., Keene, P.A., Taylor, I.N. Novel Screening Methods—The Key to Cloning Commercially Successful Biocatalysts. *Bioorg. & Med. Chem.* **7**, 2163–2168 (1999)
- [6] Brabban, A.D., Littlechild, J.A., Wisdom, R. Stereospecific γ -lactamase activity in a *Pseudomonas fluorescens* species. *J. Industrial Microbiol.* **16**, 8–14 (1996)
- [7] Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Ewiler, L. The Pfam protein families database. *Nucl. Acids Res.* **30**, 276–280 (2002)
- [8] D'Abusco, A.S., Ammendola, S., Scandurra, R., Politi, L. Molecular and biochemical characterization of the recombinant amidase from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles.* **5**, 183–192.
- [9] Taylor, S.J.C., Sutherland, A.G., Lee, C., Wisdom, R., Thomas, S., Roberts, S.M., Evans, C. Chemoenzymatic synthesis of (–)-carbovir utilizing a whole cell-catalyzed resolution of 2-azabicyclo(2.2.1)hept-5-en-3-one. *ChemInform* **22**, 7 (1991)
- [10] Yang, M., Gao, Q., Wu, S., Wang, J., Zheng, G. Characterization of a recombinant (–) γ -lactamase from *Microbacterium hydrocarbonoxydans*. *Biotech. Lett.* **34**, 275–279 (2012)

- [11] Wang, J., Guo, X., Zheng, G., Wen, C. Purification and characterization of a novel (–)gamma-lactamase from *Microbacterium hydrocarbonoxydans*. *Ann Microbiol.* **59**, 345–348 (2009)
- [12] Moore, S., Stein, W.H. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* **176**, 367–388 (1948)
- [13] <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1HL7> (
- [14] Taylor, S.J.C., McCague, R., Wisdom, R., Lee, C. Development of the biocatalytic resolution of 2-azabicyclo(2.2.1)hept-5-en-3-one as an entry to single-enantiomer carbocyclic nucleosides. *ChemInform* **24**, 41 (1993)
- [15] Toogood, H.S., Brown, R.C., Line, K., Keene, P.A., Taylor S.J.C., McCague, R., Littlechild, J.A. The use of a thermostable signature amidase in the resolution of the bicyclic synthon (rac)-g-lactam. *Tetrahedron.* **60**, 711 – 716 (2004)
- [16] Holmquist, M. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* **1**, 209–235 (2000)
- [17] Gonsalvez, I.S., Isupov, M.N., Littlechild, J.A. Crystallization and preliminary X-ray analysis of a γ -lactamase. *Acta Cryst.* **D57**, 284 – 286 (2001)
- [18] Magyerková, M. Bakalářská práce: Příprava expresního systému γ -lactamasy a otestování exprese v *E.coli*, Universita Karlova, Praha (2011)
- [19] Foster A.C., Kemp J.A. Glutamate and GABA-based CNS therapeutics. *Curr. Opin. Pharm.* **6**, 7–17 (2006)
- [20] Li K., Xu E. The role and the mechanism of gammaaminobutyric acid during central nervous system development. *Neuro. Bull.* **24**, 195–200 (2008)
- [21] <http://en.wikipedia.org/wiki/Polyvinylpyrrolidone>
- [22] <http://www.sciencephoto.com/media/10007/enlarge>
- [23] Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorf, J.W. Use of T7 RNA-polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60–89 (1990)

-
- [24] Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467 (1977)
- [25] Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*. **227**, 680–685 (1970)
- [26] <http://www.chemistry.ccsu.edu/glagovich/teaching/316/qualanal/tests/ninhydrin.html>
- [27] Osobní sdělení RNDr. Marek Ingr, Ph.D.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

LB	Luria-Bertani médium
Bp	Base Pair
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PCR	Polymerase-chain reaction
His-tag	Polyhistidine tag
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
E.coli	Escherichia Coli
HPLC	High-performance liquid chromatography
γ -laktam	2-aza-bicyclo[2.2.1]hept-5-en-on
HIV	Human Immunodeficiency Virus
PDB	Protein Data Bank
GABA	Kyselina gama-aminomáselná
HF pufr	High fidelity
dNTP	Deoxynukleotid trifosfát
TAE pufr	elektroforetický Tris-acetátový pufr
TE pufr	Tris/EDTA pufr
LB	Lysogeny broth
PBS	Phosphate Buffered Saline
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
RPM	Revolutions per minute
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
IPTG	isopropylthio- β -galaktosid
TEMED	Tetramethylethylenediamin
OD	Optical Density

Ninhydrin	1,2,3indanetrion monohdrát
SEM	scanning electron micrograph
PMSF	fenylmethylylsulfonylchlorid
BAM	benzamidin
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Katalýza enzymu (+/-) γ -laktamu za vzniku (+) γ -laktamu, nebo (-) γ -laktamu, přičemž opačné enantiomery jsou γ -laktamasou rozštěpeny [2].	13
Obr. 2. Karbocyklické nukleosidy z 2-aza-bicyclo [2.2.1] hept-5-en-onu, (i) 50 g L ⁻¹ <i>Pseudomonas cepaacia</i> , 100 g L ⁻¹ racemátu laktamu, 25°C 24h [4].	14
Obr. 3. Karbocyklický nukleosid, Carbovir	14
Obr. 4. Terciární struktura monomeru (-) γ -laktamasy z <i>Aureobacterium sp.</i>	15
Obr. 5. Strukturní diagram trimeru (-) γ -laktamasy z <i>Aureobacterium sp.</i>	16
Obr. 6. Kompletní sekvence γ -laktamasy [5].	17
Obr. 7. Schéma mechanismu hydrolýzy substrátu (-) γ -laktamu enzymem (-) γ -laktamasou [2, 16].	20
Obr. 8. Struktura: a). monomer N-vinylpyrrolidonu, b). homopolymer N-vinylpyrrolidonu	21
Obr. 9. Krystal PVP zaznamenaný přístrojem SEM [22]	22
Obr. 10. Cyklická mapa vektoru pET22b zobrazující expresní místa kódující sekvence	27
Obr. 10. Expresní sekvence vektoru pET22b	28
Obr. 12. Agarosová elektroforéza PCR produktů: 1. standard DNA (200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1600 bp), 2. standard DNA (2000, 2500, 3000, 4000, 6000, 8000, 10000 bp), 3. a 4. PCR produkt: amplifikovaný gen γ -laktamasy rozdělen na 2 podíly.	36
Obr. 13. Agarosová elektroforéza izolovaných produktů: 1. standard DNA (200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1600), 2. standard DNA (2000, 2500, 3000, 4000, 6000, 8000, 10000), 3. a 4. izolované PCR produkty	37
Obr. 14. Agarosová elektroforéza izolovaných produktů: 1. standard DNA (200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1600), 2. standard DNA (2000, 2500, 3000, 4000, 6000, 8000, 10000), 3. γ -laktamasa (EcoRI/HindIII), 4. γ -laktamasa (NdeI/XhoI), 5. pUC19 (EcoRI/HindIII), 6. pET22b (NdeI/XhoI)	38
Obr. 15. Růstová křivka kultury bakterií č.1 exprimující γ -laktamasu. Modrá křivka zobrazuje nárůst kultur od zaočkování do zaindukování. Žlutá křivka zobrazuje nárůst kultur, které byly ponechány bez induktoru IPTG (slepý pokus). Růžová křivka naopak nárůst s obsaženým induktorem IPTG.	40

- Obr. 16.* Elektroforéza γ -laktamasy s his-tagem – indukce. 1. γ -laktamasa před indukcí, 2. γ -laktamasa po indukci, 3. γ -laktamasa před ultrazvukem, 4. γ -laktamasa sraženina po ultrazvuku, 5. γ -laktamasa supernatant po ultrazvuku, 6. Protein marker (60, 40, 30, 20, 10 kDa),..... 41
- Obr. 17.* Purifikace γ -laktamasy na niklové koloně. První část elfa. 1. Protein marker (60, 40, 30, 20, 10 kDa), 2. γ -laktamasa supernatant, 3. γ -laktamasa sraženina, 4. FT po purifikaci, 5.-12. Gradient frakce č. 2-9..... 42
- Obr. 18.* Purifikace γ -laktamasy na niklové koloně. Druhá část elfa. 1. Protein marker (60, 40, 30, 20, 10 kDa), 2.-7. Gradient frakce č. 10-15 43
- Obr. 19.* Purifikace γ -laktamasy na niklové koloně v močovině. První část elfa. 1. Protein Marker (60, 40, 30, 20, 10 kDa), 2. γ -laktamasa – supernatant po 3x ultrazvuku. 3. γ -laktamasa – supernatant po 6x ultrazvuku. 4. γ -laktamasa – supernatant, 5. γ -laktamasa – sraženina (ze 14.9.2011), 6. γ -laktamasa – Ft po purifikaci, 7-9. γ -laktamasa z chromatografie vz. č. 3-5. 44
- Obr. 20.* Purifikace γ -laktamasy na niklové koloně v močovině. Druhá část elfa. 1. Protein Marker (60, 40, 30, 20, 10 kDa), 2.-11. γ -laktamasa z Chromatografie vz. č. 6-15 44

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1.</i> Hodnoty OD ₆₀₀ při nárůstu kultury č. 1 před indukcí, které byly měřeny každých 30 min.....	39
<i>Tab. 2.</i> Hodnoty OD kultury č.1 měřené každých 60 min po indukci	40

Sigla (místo uložení bakalářské práce)	Univerzitní knihovna UTB ve Zlíně
Název bakalářské práce	Příprava bakteriálních expresních systémů rekombinantní γ-laktamasy
Autor bakalářské práce	Viktor Holomek
Vedoucí bakalářské práce	RNDr. Marek Ingr, Ph.D.
Vysoká škola	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Adresa vysoké školy	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01, Zlín
Fakulta (adresa, pokud je adresa jiná než adresa VŠ)	Fakulta technologická, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín
Katedra (adresa, pokud je adresa jiná než adresa VŠ)	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72, Zlín
Rok obhájení BP	2012
Počet stran	60
Počet svazků	3
Vybavení (obrázky, tabulky...)	Obrázky, tabulky
Klíčová slova	γ-laktamasa, Polyvinylpyrrolidon, bakteriální expresní systém, aktivita