

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Studium molekulární podstaty stability proteinů

Martin Havlásek
Jihomoravský kraj

Brno 2019

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Studium molekulární podstaty stability proteinů

Study of molecular basis of protein stability

AUTOŘI: Martin Havlásek

ŠKOLA: Gymnázium Brno – Řečkovice,
příspěvková organizace
Terezy Novákové 2
Brno – Řečkovice
621 00

KRAJ: Jihomoravský kraj

KONZULTANTI: Mgr. Antonín Kunka
prof. RNDr. Zbyněk Prokop, Ph.D
RNDr. Kateřina Cibulková

Brno 2019

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem svou práci nesoucí název „Studium molekulární podstaty stability proteinů“ vypracoval samostatně pod odborným vedením Mgr. Antonína Kunky a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů na konci práce.

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

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

V Brně dne:

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Mé největší díky patří především Mgr. Antonínu Kunkovi za výborné vedení mé práce, za nepřeborné množství informací a rad, za dlouhodobou podporu, cenné připomínky při zpracování práce do písemné podoby, a především za všechnen čas, který mi věnoval. Dále bych rád poděkoval prof. Mgr. Jiřímu Damborskému, Dr. a prof. RNDr. Zbyňku Prokopovi, Ph.D. za příležitost pracovat v Loschmidtových laboratořích Masarykovy univerzity v Brně. Mé další díky patří RNDr. Kateřině Cibulkové za podporu, trpělivost a cenné rady při písemném zpracování práce. V neposlední řadě děkuji skvělému vědeckému týmu Loschmidtových laboratoří za ochotu pomoci vždy, když bylo zapotřebí, za příjemnou atmosféru a přátelské prostředí.



MUNI

ANOTACE

Práce je součástí výzkumného projektu zabývajícím se studiem molekulárních principů stability proteinů a poznání strukturně-funkčních vztahů umožňujících racionální inženýrství zvýšené stability proteinů pro biotechnologické a biomedicínské aplikace. V teoretické části se práce zabývá problematikou struktury a stability proteinů a jejího vlivu na přirozenou funkci proteinů, dále se věnuje metodám studia a strategiím inženýrství stability proteinů. V experimentální části se tato práce věnuje analýze teplotní stability a biochemické charakterizaci šesti mutantních variant modelové rodiny enzymů halogenalkandehalogenáz. Výchozím templátem pro studovanou mutagenezi sloužila varianta halogenalkandehalogenázy DhaA115 stabilizována metodami proteinového inženýrství. V této práci je detailně popsána příprava cílových proteinů od konstrukce plazmidů kódujících dané enzymy, přes jejich transformaci do hostitelského organismu a následnou expresi a finální purifikaci čistých enzymů. Cílové enzymy jsou podrobně charakterizovány stanovením jejich čistoty, ověřením jejich kvartérní struktury, kontrolou správnosti sbalení měřením dehalogenázové aktivity jednotlivých enzymů a stanovením teplotní stability pomocí spektroskopických metod. V závěru této práce jsou poté výsledky shrnuty a následně porovnány s divokým typem proteinu DhaA, izolovaného z bakteriálního kmene *Rhodococcus rhodochrous* a jeho stabilizovanou variantou DhaA115.

KLÍČOVÁ SLOVA

protein, enzym, halogenalkandehalogenáza, DhaA, stabilita, struktura, denaturace, cirkulární dichroismus, fluorescenční spektroskopie

ANNOTATION

This thesis is an integral part of wide-scale project focused on study of molecular principles of protein stability and understanding of their structure-function relation which enables rational engineering of stabilized proteins for biotechnological and biomedical applications. In the theoretical part, the thesis is dealing with problematics of protein structure and stability and its impact on the biological function of proteins, further it is dedicated to methods of study and strategies of engineering of the stability of proteins. In the experimental part, the thesis is dealing with analysis of thermostability and biochemical characterization of six mutant variant of model protein family haloalkane dehalogenases. As the default template for directed mutagenesis was

used haloalkane dehalogenase DhaA115 stabilized using protein engineering. In this thesis the process of preparation of target proteins is described, starting with construction of plasmids encoding protein's sequence of amino acids, to its transformation, expression and final purification. All newly produced proteins have undergone a series of tests including analysis of the purity, determination of the quaternary structure, verifying of proper folding by measuring of dehalogenation activity and most importantly determining thermostability of tested proteins using spectroscopical methods. In the end of this work all acquired data were concluded and compared with wild type of protein DhaA from *Rhodococcus rhodochrous* and its stabilised variant DhaA115.

KEYWORDS

protein, enzyme, haloalkandehalogenase, DhaA, stability, structure, denaturation, circular dichroism, fluorescence spectroscopy

OBSAH

1	Úvod	9
2	Cíle práce	11
3	Teorie	12
3.1	Stabilita proteinů	12
3.1.1	Termodynamická stabilita.....	14
3.1.2	Kinetická stabilita.....	15
3.1.3	Agregace a amyloidogeneze	17
3.2	Principy stability proteinů.....	19
3.2.1	Vodíkové můstky	19
3.2.2	Hydrofobní efekt	19
3.2.3	Elektrostatické interakce.....	20
3.2.4	Konformační entropie.....	21
3.3	Stabilizace proteinů	22
3.3.1	Sekvenční metody	22
3.3.2	Strukturní metody.....	23
3.3.3	Kombinované metody.....	24
3.4	Halogenalkandehalogenázy.....	26
3.4.1	Struktura halogenalkandehalogenáz.....	26
3.4.2	Význam a využití halogenalkandehalogenáz.....	27
3.4.3	Halogenalkandehalogenáza DhaA	27
4	Materiál a metody.....	30
4.1	Materiál	30
4.1.1	Přístroje.....	30
4.1.2	Software	31
4.1.3	Chemikálie	31
4.2	Metody	33
4.2.1	Řízená mutageneze pomocí dvoukrokové PCR.....	33
4.2.2	Transformace chemokompetentních buněk <i>Escherichia coli</i>	38
4.2.3	Exprese rekombinantního proteinu.....	39
4.2.4	Metaloafintní chromatografie.....	40
4.2.5	Gelová permeační chromatografie	41
4.2.6	SDS gelová elektroforéza	41
4.2.7	Nativní gelová elektroforéza.....	42
4.2.8	Stanovení dehalogenázové aktivity Iwasakiho metodou	43

4.2.9	Spektroskopie cirkulárního dichroismu.....	44
4.2.10	Fluorescenční spektroskopie.....	45
4.2.11	Globální analýza denaturačních křivek.....	46
5	Výsledky.....	48
5.1	Příprava proteinů.....	48
5.1.1	Mutagenese.....	48
5.1.2	Tranformace, exprese a purifikace.....	48
5.2	Charakterizace proteinů.....	52
5.2.1	Určení kvarterní struktury.....	52
5.2.2	Stanovení dehalogenázové aktivity.....	55
5.2.3	Měření CD spektra.....	56
5.2.4	Teplotní denaturace.....	57
5.2.5	Globální analýza denaturačních křivek.....	60
6	Diskuze.....	63
7	Závěr.....	66
8	Reference.....	67
9	Seznam tabulek.....	72
10	Seznam obrázků.....	72

1 ÚVOD

Proteiny jsou biologické makromolekuly složené z lineárních řetězců tvořených dvaceti různými proteinogenními aminokyselinami. V přírodě zastávají široké spektrum esenciálních funkcí jako například funkci stavební, mechanickou, transportní, katalytickou nebo signální. Jednou z nejvýznamnějších skupin proteinů jsou enzymy plnící nenahraditelnou roli biokatalyzátorů chemických procesů, které by bez jejich pomoci trvaly mnohdy až stovky let nebo by neprobíhaly vůbec [1]. Pro úspěšné plnění své biologické funkce musí nejdříve lineární řetězec aminokyselin zaujmout specifické prostorové uspořádání, tzv. nativní stav, do kterého se protein dostává samovolným procesem zvaným sbalování [2]. V přirozených podmínkách má v tomto stavu nejnižší energii, a proto v tomto uspořádání setrvává. Při změnách okolních podmínek jako například zvýšení teploty, změna pH, nebo přítomnost chemických denaturantů, může protein o svoji nativní strukturu, a tudíž biologickou funkci, přijít. [3]. V některých případech se protein může špatně sbalit a dostat se tak do nefunkční prostorové konformace, která často vede k tvorbě agregátů. Akumulace špatně sbalených proteinů je nebezpečná pro organismus a je příčinou mnoha závažných zdravotních onemocnění, jako je například Alzheimerova choroba [4].

Schopnost proteinů setrvat v nativním stavu a odolávat nepříznivým podmínkám je pro zaručení jejich fungování klíčová [5]. Tato vlastnost se označuje jako stabilita proteinů a její zvyšování je jedním z hlavních cílů proteinového inženýrství. Na stabilitu proteinů má vliv řada chemicko-fyzikálních efektů mezi jednotlivými aminokyselinami, jako například elektrostatické interakce, množství vodíkových můstků, přítomnost disulfidických vazeb, efektivní sbalení hydrofobních rezidui uvnitř struktury a další. Tyto interakce jsou zakódovány v pořadí aminokyselin, které určuje výslednou strukturu proteinu. Vlastnosti proteinů včetně jejich stability lze tedy ovlivnit vhodnou záměnou jednotlivých aminokyselin v řetězci [6].

Stabilizace struktury proteinu vkládáním náhodných mutací je velmi neefektivní a náročný proces, který zřídka vede k úspěšnému výsledku [7]. Proto byla vynalezena celá řada výpočetních nástrojů, které na základě kvantově chemických výpočtů nebo fylogenetickou analýzou sekvence umožňují identifikaci mutací, které mají vliv na výslednou stabilitu a které tak výrazně zlepšují úspěšnost cílené mutageneze. Takové racionální přístupy využívají experimentální biochemická data a strukturně-funkční poznání k jejich validaci a následně i zpřesnění navržených designů mutageneze.

Příkladem úspěšné strategie je stabilizace halogenalkandehalogenázy DhaA115 pomocí nástroje FireProt [36]. Vlivem 11 vložených mutací je tento enzym dosud nejstabilnější z celé proteinové

rodiny. Analýza biofyzikálních a strukturních experimentů v kombinaci s počítačovou simulací rozbalování DhaA115 umožnila popsat molekulární podstatu stability této varianty [59, 60]. Počítačová simulace odhalila oblasti proteinu, u kterých dochází za zvýšené teploty k rychlému rozpadu struktury. Na základě těchto výsledků byly navrženy mutace, které by měly vést k stabilizaci této oblasti a tím i celého proteinu. Cílem této práce je příprava, exprese, purifikace a charakterizace variant, nesoucí tyto mutace a jejich kombinace, a porovnání jejich stability se stabilitou DhaA115.

2 CÍLE PRÁCE

Tato práce si klade za cíl (i) detailně zpracovat literaturu zabývající se stabilitou a způsoby stabilizace proteinů, (ii) zkonstruovat mutované geny kódující sekvenci navržených enzymů, (iii) navržené geny transformovat do hostitelských buněk pomocí vektorových plazmidů, (iv) enzymy připravit heterologní expresí a purifikovat s pomocí afinitní chromatografie, (v) purifikované enzymy detailně charakterizovat stanovením jejich čistoty a výtěžků, ověřením jejich biologické funkce, popsáním kvartérní struktury jednotlivých enzymových variant a určením jejich teplotní stability pomocí spektroskopických metod a (vi) v závěru práce shrnout výsledky experimentální práce a porovnat s daty získanými divokým typem proteinu DhaA a jeho stabilizovanou variantou DhaA115.

3 TEORIE

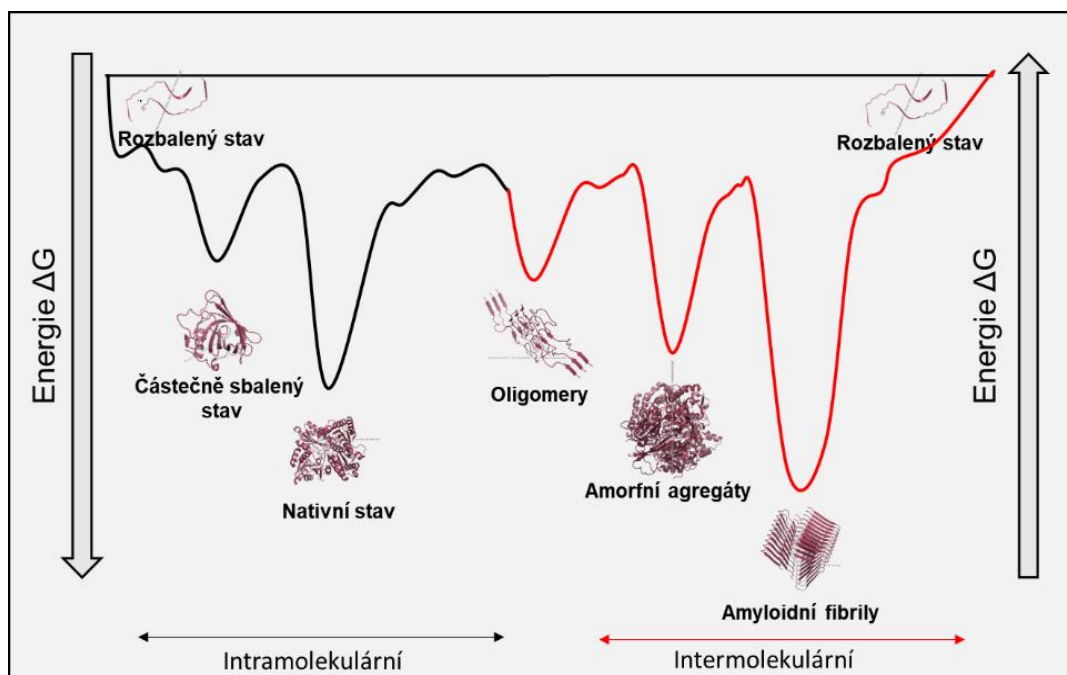
3.1 Stabilita proteinů

Stabilita proteinů je jednou z klíčových vlastností ovlivňujících jejich biologickou funkci, díky čemuž se v biotechnologickém a farmaceutickém průmyslu stala předmětem intenzivního výzkumu. Stabilita neboli schopnost proteinu setrvat ve své funkční formě za daných podmínek (teplota, tlak, pH, přítomnost chemických rozpouštědel) po určitý čas (např. konverze veškerého substrátu v bioreaktoru), často omezuje jinak širokou a pestrou škálu jejich využití [5]. Aby mohl protein správně plnit svoji biologickou funkci, musí se dostat do specifické prostorové konformace [2]. Proces, kterým se lineární aminokyselinový řetězec proteinů dostává do této, tzv. nativní, konformace, se nazývá sbalování proteinů.

Sbalování proteinu je samovolný proces vzniku stabilního, biologicky funkčního prostorového usprádaní řetězce aminokyselin syntetizovaného při translaci mRNA na ribozomech. Výsledná terciární struktura je zakódovaná v aminokyselinové sekvenci proteinu, která zároveň kóduje i průběh, jakým je této konformace dosaženo. Tato skutečnost byla popsána Christianem Anfinsenem a je dnes známá jako Anfinsenovo dogma [6]. Proces sbalování v buňce většinou probíhá souběžně se syntézou polypeptidového řetězce (tzv. kotranslační sbalování) a usnadňují ho proteiny zvané chaperony. Ty se vážou na specifické úseky nově syntetizovaného řetězce a napomáhají sbalení proteinu do jeho funkční konformace. Většinou se jedná o části bohaté na hydrofobní aminokyseliny, které by v opačném případě měly tendenci tvořit kontakty mezi sebou, což by vedlo k nesprávnému sbalení. V laboratorních podmínkách (*in vitro*) je proces sbalování závislý na vnějším prostředí, nejvíce na teplotě, pH, koncentraci solí nebo přítomnosti rozpouštědel a chaotropních látek v roztoku. Sbalování je unikátní pro každý protein. U menších, globulárních bílkovin se jedná většinou o jednoduchou, jednokrokovou reakci, jež trvá řádově mikrosekundy až sekundy. U větších a strukturně složitějších proteinů probíhá složitěji a pomaleji (desítky sekund až hodiny). Vícedoménné proteiny zaujmají nativní konformaci postupným sbalováním, během kterého lze často pozorovat částečně sbalené konformace, tzv. intermediáty. Ty většinou existují velice krátkou dobu, ale byly pozorovány i intermediáty stabilní po několik dní [8]. Tyto transientní konformace jsou kritické pro protein, neboť jejich hromadění může vést k agregaci.

Protein o svoji strukturu může částečně nebo úplně přijít procesem obráceným ke sbalování, tzv. denaturací [3]. Oba děje (sbalování a denaturace) jsou dynamické a existuje mezi nimi rovnováha. Vlivem vnějších podmínek, jako je vysoká teplota, tlak, změna pH nebo přítomnost chemických látek dochází k narušení této rovnováhy ve prospěch denaturovaného stavu, čehož se využívá pro studium stability.

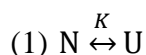
Kvantifikace stability proteinů je odvozena z principů chemické termodynamiky a kinetiky chemických reakcí. Vychází z předpokladu, že všechny možné konformace proteinu jsou mezi sebou v dynamické rovnováze a pravděpodobnost, s jakou se v nich nachází, je dána jejich energetickými hladinami (Obrázek 1).



Obrázek 1: Schéma popisující energetické vztahy mezi možnými konformacemi proteinu. Levá část (černě) popisuje změny v rámci jednoho řetězce. Pravá část (červeně) popisuje konformační stavy zahrnující více identických řetězců. Vlivem podmínek dochází k energetickým změnám jednotlivých lokálních minim (energie konformací) a maxim (kinetické bariéry). Zdroj: vlastní.

3.1.1 Termodynamická stabilita

Rovnice popisující termodynamickou stabilitu proteinů jsou odvozeny z jednoduchého denaturačního modelu, který předpokládá existenci pouze dvou stavů proteinu – nativního a denaturovaného. Termodynamická stabilita se odvozuje z rovnováhy mezi molekulami proteinu nacházející se v nativním (N, z angl. native) a denaturovaném stavu (U, z angl. unfolded), vyjádřené v podobě rovnovážné konstanty K :

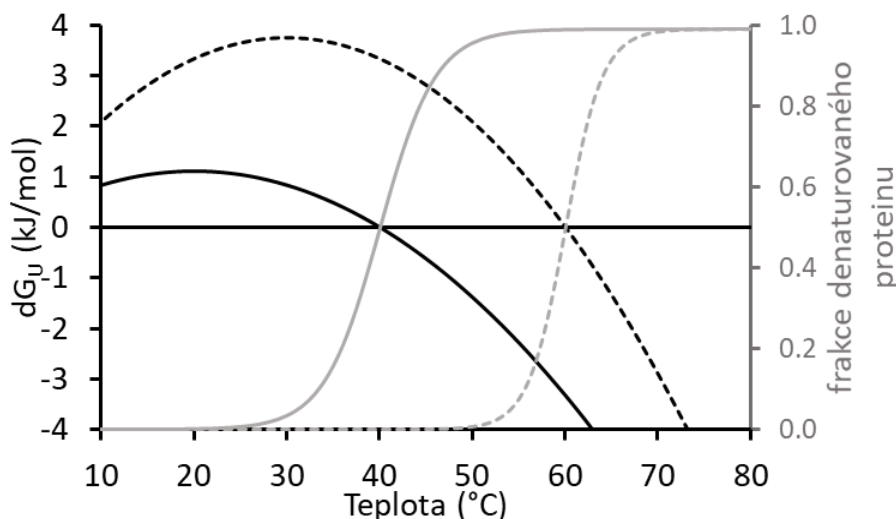


$$(2) K = [U]/[N],$$

kde $[U]$ a $[N]$ symbolizují koncentrace proteinových molekul v denaturovaném, respektive nativním stavu v rovnováze. Z rovnovážné konstanty lze vypočítat Gibbsovu volnou energii rozbalování ΔG_U , podle vztahu:

$$(3) \Delta G_U = -RT \ln K,$$

kde R je univerzální plynová konstanta a T termodynamická teplota vyjádřená v kelvinech. Podle znaménka před hodnotou ΔG_U lze určit, zda se za daných podmínek (teplota, pH, ...) bude většina molekul proteinu nacházet v nativním ($\Delta G_U > 0$), nebo denaturovaném ($\Delta G_U < 0$) stavu (Obrázek 2).



Obrázek 2: Energetické schéma znázorňující frakci molekul v denaturované stavu (šedá) a Gibbsovu volnou energii rozbalování (dG_U , černá) dvou různě stabilních proteinů. Stabilnější protein, jehož ΔG_U je vyšší, je zobrazen přerušovanou čarou a pro jeho denaturaci je zapotřebí více energie. Zdroj: vlastní.

V teplotě, při které $\Delta G_U = 0$, má konstanta K hodnotu 1 a právě 50 % molekul proteinu se nachází v nativním a 50 % molekul ve stavu denaturovaném. Tato teplota se nazývá teplota tání

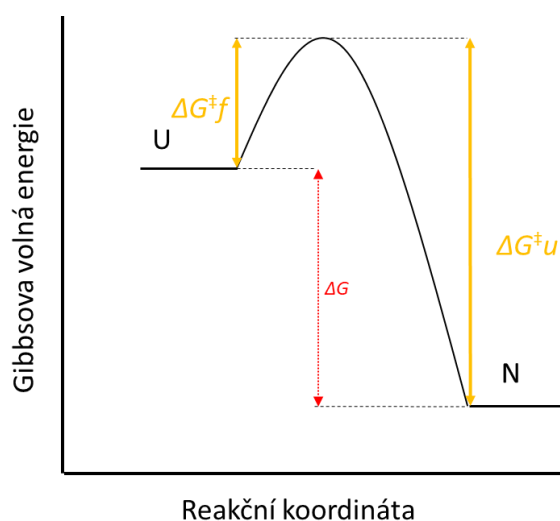
proteinu (T_m). Hodnota teploty tání se využívá pro charakterizaci teplotní stability proteinů, které vratně denaturují [2,9].

Hodnoty ΔG_U se v přírodě pohybují v řádech desítek kJ/mol v závislosti na délce aminokyselinového řetězce, což představuje ve srovnání s energií vazeb vyskytujících se v proteinu poměrně malé kvantum energie. Výsledná rovnováha je tudíž velmi delikátní a lze ji narušit i malým zásahem do struktury nebo prostředí proteinu [1]. Změnu Gibbsovy volné energie rozbalování lze rozložit na příspěvky změn entropie (ΔS), odrážející stupeň volnosti a solvataci proteinu a změnu entalpie (ΔH), reflektující interakce mezi jednotlivými residui, podle rovnice.

$$(4) \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

3.1.2 Kinetická stabilita

Na základě experimentálních důkazů bylo zjištěno, že stabilita proteinů není řízena pouze termodynamicky, ale závisí také na kinetice procesů sbalování a denaturace. Vysoká kinetická stabilita proteinu znamená, že protein zůstává v nativním stavu po dlouhou dobu díky vysoké energetické bariéře oddělující ho od denaturovaného stavu (Obrázek 3).



Obrázek 3: Schéma popisující sbalování proteinu z rozbaleného stavu (U) do stavu nativního (N). Žlutě je znázorněna Gibbsova aktivační energie sbalování a rozbalování, červeně Gibbsova energie sbalování ΔG . Zdroj: vlastní.

Velikost energetické bariéry, která charakterizuje kinetickou stabilitu, je dána rychlostmi procesů sbalování a rozbalování. Z hodnot rychlostních konstant lze odvodit velikosti aktivačních energií procesů sbalování a denaturace odvozené z teorie aktivovaného komplexu z Eyringovy rovnice:

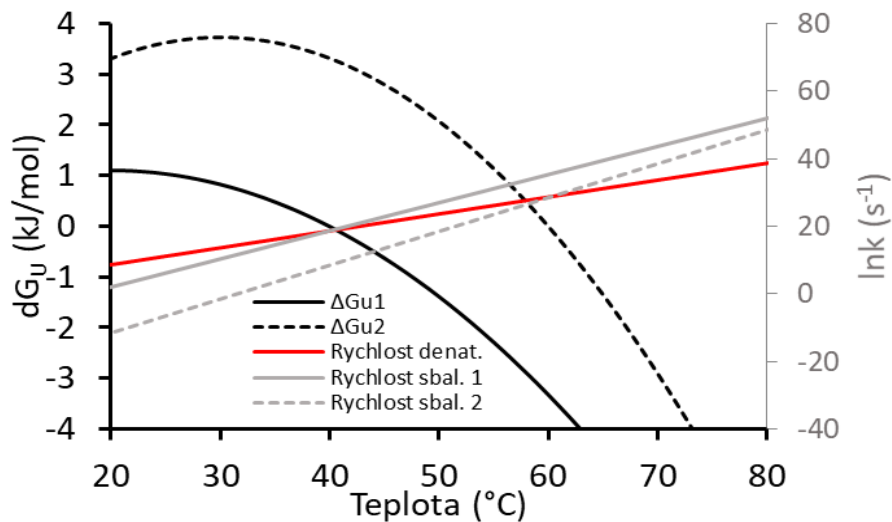
$$(5) k = \frac{\kappa k_B T}{h} e^{-\Delta G_u^\ddagger / RT}$$

kde ΔG_U^\ddagger je změna Gibbsovy aktivační energie rozbalování, κ je koeficient propustnosti, k_B je Boltzmannova konstanta a h je konstanta Planckova. Snížením aktivační energie sbalování dochází ke zrychlení této reakce, bez dopadu na rychlost denaturace a obráceně [2,9]

Výše uvedenou rovnovážnou konstantu lze popsat z hlediska kinetiky jako:

$$(6) K = k_u / k_f,$$

kde k_u je rychlostní konstanta denaturace proteinu a k_f je rychlostní konstanta opačné reakce, tedy sbalování proteinu. Zvýšení termodynamické stability, ΔG_U , lze tak v přírodě dosáhnout zpomalením rychlosti denaturace nebo zrychlení sbalování (Obrázek 4).



Obrázek 4: Schéma demonstrující kineticky řízenou stabilizaci proteinů. Pro teplotu tání (T_m) platí stejně jako u termodynamické stability $K=1$, což odpovídá teplotě, při které je rychlost sbalování i rozbalování stejná. Křivky $\Delta G_U(T)$ (černě) jsou zde stejné jako na obrázku 2. Oba proteiny mají shodnou rychlost denaturace, ale protein zobrazený přerušovanou čarou má vyšší rychlost sbalování, tudíž je stabilnější. Zdroj: vlastní.

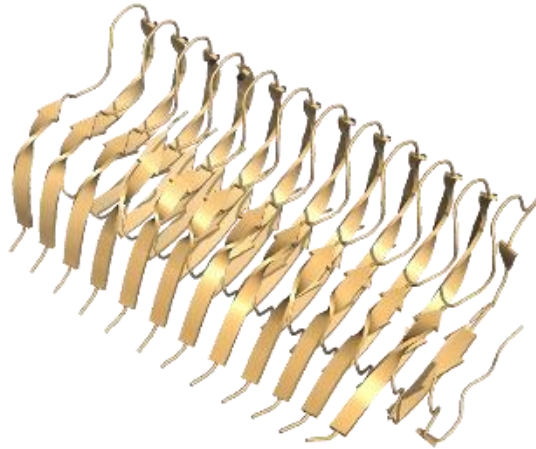
3.1.3 Agregace a amyloidogeneze

Výše uvedené kapitoly byly zaměřeny na změny konformací proteinů v rámci jednoho řetězce. Tato kapitola pojednává o procesech souvisejících s interakcemi mezi více řetězci, které jsou ve specifických podmínkách energeticky výhodnější.

Agregace proteinů je proces, během kterého mezi sebou interagují molekuly proteinů nebo jejich části za vzniku amorfních celků, které zpravidla postrádají původní biologickou funkci, ale jsou stabilní a často nerozpustné [10]. Ve většině případů k agregaci dochází během chybného sbalování proteinu, ale v některých případech nastává agregace vlivem okolních podmínek (tradičně snížení pH) přímo z nativního stavu. Agregace proteinů je pro buňky nežádoucí proces, a proto disponují řadou nástrojů, jak se agregaci bránit. Jedním z nich je přítomnost chaperonů, které jsou kromě napomáhání správnému sbalení proteinu schopny špatně sbalené proteiny rozbít a zabránit tak potenciální agregaci. Dalším obranným nástrojem jsou specifické proteázy schopné degradovat vzniklé nesbalené, špatně sbalené proteiny a jejich agregáty.

Většina agregátů představuje amorfní neuspořádané struktury, které vznikají zejména náhlými změnami elektrostatických interakcí. Speciálním případem agregace je tvorba amyloidních fibril s charakteristickou strukturou a vysokou organizovaností [11].

Amyloidní agregáty jsou dlouhé, většinou nerozvětvené fibrilární struktury složené především z β skládaných listů. K jejich vzniku dochází z existujících β vláken nebo přeměnou α helixů na β skládané listy, které jsou mezi sebou stabilizovány pomocí vodíkových můstků. Právě vysoká uspořádanost této struktury má za následek jejich vysokou stabilitu a odolnost vůči degradačním procesům. Amyloidy vznikají z nukleačního jádra, na které se začnou z obou stran napojovat jednotlivé podjednotky. Maturovaná fibrila je charakteristická dlouhým β skládaným listem, jehož vlákna jsou kolmá na osu fibrily. Amyloidní struktura je rozpoznatelná pomocí cirkulárního dichroismu díky zvýšenému obsahu β struktur, fluorescencí pomocí fibril-specifických sond, charakteristickou difrakcí rentgenového záření nebo pomocí elektronového mikroskopu [12] (Obrázek 5).



Obrázek 5: Struktura amyloidu beta. PDB ID: 4MXU.

Akumulace špatně složených proteinů a jejich agregátů v buňkách způsobuje celou řadu zdravotních problémů, jako jsou neurodegenerativní nemoci Alzheimerova, Parkinsonova nebo Huntingova choroba, ale také systémové poruchy jako je diabetes mellitus 2. typu. Právě pro své patogenní vlastnosti je důležité mechanismům agregace a samotného sbalování proteinů porozumět, proto je toto téma v dnešní době velmi atraktivní v oblasti vědy a výzkumu [4].

3.2 Principy stability proteinů

3.2.1 Vodíkové můstky

Vodíkové můstky patří mezi primární elektrostatické interakce, ke kterým dochází mezi atomem vodíku molekuly nebo molekulového fragmentu X-H, kde X představuje atom s vysokou elektronegativitou (nejčastěji N, O, F nebo Cl), a volným elektronovým párem silně elektronegativního atomu stejné nebo jiné molekuly [13]. Význam vodíkových můstků napříč biomolekulami je významný, příkladem může být spojení jednotlivých vláken DNA pomocí vodíkových můstků mezi atomy vodíku a kyslíku jednotlivých dusíkatých bází. V případě proteinů jsou hlavní příčinou vzniku sekundárních struktur (α -helix, β -skládaný list, smyčky), což z nich dělá jednu z hnacích sil při sbalování proteinů [14]. V nativním stavu mají tyto interakce značný vliv na stabilitu proteinu [2].

Výsledky cílené mutagenese stanovily příspěvek jedné vodíkové vazby k celkové stabilitě proteinu v rozmezí 0,9 až 1,8 kcal/mol [15]. Ve sbaleném proteinu se nachází průměrně 1,1 vodíkového můstku na každé reziduum, z čehož 65 % je mezi atomy tvořících peptidovou vazbu, 23 % je mezi atomem peptidové vazby a postranním řetězcem a 12 % vodíkových můstků mezi postranními řetězci [16].

Vodíkové můstky také snižují vzdálenost mezi interagujícími atomy, čímž umožňují působení van der Waalsových sil, jež také hrají důležitou roli při stabilizaci proteinu [17].

3.2.2 Hydrofobní efekt

Hydrofobním efektem se obecně rozumí nerozpustnost nepolárních látek ve vodném prostředí. U proteinů jsou zdrojem tohoto efektu hydrofobní aminokyseliny (alanin, glycin, prolin, leucin, izoleucin, valin, methionin, fenylalanin a tryptofan). Při sbalování aminokyselinového řetězce se protein snaží své hydrofobní rezidua ukrýt v nitru své struktury a zabránit tak jejich kontaktu s vodou. Tento proces je velice rychlý, nastává jako první krok při sbalování a nazývá se tzv. hydrofobní kolaps. Energie, která se při něm uvolní, je ovlivněna zejména dvěma složkami: (i) potenciálním poklesem entropie vody při kontaktu s hydrofobními rezidui [18] a (ii) van der Waalsovými silami působícími ve sbaleném proteinu [19,20]. Solvatace nepolárních reziduí je entropicky nevýhodný proces, protože molekuly vody jsou kolem nich pravidelně uspořádány. Při transferu do hydrofobního prostředí proteinu dochází k uvolnění těchto molekul, čímž se zvýší jejich neuspořádanost a dochází k nárůstu entropie celého systému.

Pro kvantifikaci hydrofobního efektu byly připraveny mutantní varianty proteinů, které se od původních lišily absencí nepolární skupiny $-\text{CH}_2-$. Porovnáním stabilit 148 mutantních variant 13 proteinů bylo stanoveno, že každá $-\text{CH}_2-$ skupina přispívá $1,1 \pm 0,5$ kcal/mol k výsledné stabilitě proteinu [21].

3.2.3 Elektrostatické interakce

Elektrostatické interakce jsou silová působení mezi nabitými nebo polarizovatelnými skupinami. Tyto tzv. dipóly mohou působit i na nepolární skupiny jiných látkách a indukovat dipóly dočasné. Energie elektrostatických interakcí je charakterizována Coulombovým zákonem:

$$(7) \quad E = Q_1 Q_2 / D r,$$

kde Q jsou náboje látek, D je dielektrická konstanta a r vzdálenost nábojů [22].

V molekulách proteinů mohou díky elektrostatickým interakcím vznikat tzv. solné můstky, což jsou nekovalentní vazby mezi aminokyselinami s opačným nábojem, jejichž vznik je podmíněn dostatečnou blízkostí reziduí a vhodným pH. Tyto vazby vznikají mezi pozitivně nabitou imidazolovou skupinou histidinu, aminovou skupinou lysinu nebo guanidinovou skupinou argininu a negativně nabitými karboxylovými skupinami kys. asparagové, glutamové, thiolovou skupinou cysteinu a hydroxylovou skupinou tyrosinu. Solné můstky hrají důležitou roli při vazbě ligandu, substrátu, inhibitoru nebo například při katalýze [23].

Elektrostatické interakce mají veliký vliv také na stabilitu proteinu. Historicky se předpokládalo, že největší vliv na stabilitu mají interakce v jádře proteinů, ale později bylo experimentálně dokázáno, že správná síť těchto vazeb na povrchu proteinu může také vést k významnému zvýšení stability [24]. Modulace a optimalizace elektrostatických interakcí na povrchu proteinů se tak jeví jako potenciální strategie pro stabilizaci proteinů [25]. Důležitost optimální elektrostatické sítě potvrzuje i fakt, že proteiny izolované z termofilních organismů, jako je například jeden z nejstabilnějších objevených proteinů CutA1, obsahují větší množství těchto vazeb než v homologních proteinech z mezofilních organismů [26,27].

Další elektrostatickou vazbu v proteinech představují tzv. π interakce, což jsou interakce mezi záporně nabitou π -elektronovou hustotou aromatických reziduí s dalším π -systémem, kovy a kladně nebo záporně nabitými skupinami. Tyto interakce, stejně jako předchozí elektrostatická působení, zastávají v proteinech celou řadu funkcí. Pro π -kation interakce je důležitá především role během vazby ligandu do aktivního místa proteinu, ale spolu s interakcemi π - π mají dle experimentálních poznatků vliv také na stabilitu proteinu. Až 60 % aromatických reziduí

v proteinu mezi sebou tvoří páry nebo celé sítě vzájemně interagujících aromatických struktur, čímž přispívají ke stabilitě nativní struktury proteinu [28]. Vazby π -kation, nejčastěji π -arginin stabilizují protein nejvíce ve vysokých teplotách blízcích se teplotě tání proteinu [29].

3.2.4 Konformační entropie

Konformační entropie u makromolekul reflektuje celkový počet všech možných konformací dané struktury, tzv. stupňů volnosti. Menší míra volnosti struktury znamená nižší konformační entropii. Čím větší počet možných nesbalených konformací má polypeptidický řetězec, tím vyšší je ztráta entropie při složení do konkrétního nativního stavu. Redukcí počtu možných konformací se tedy zvyšuje stabilita nativního stavu proteinu. Tohoto principu se využívá i při stabilizaci proteinu, kde je tendence konformační entropii aminokyselinového řetězce snížit. Toho může být dosaženo pomocí vhodných mutací (substituce prolinem nebo nahrazení glycinu) nebo vytvořením disulfidických můstků [30].

Disulfidické můstky jsou vazby mezi atomy síry -SH skupin dvou cysteinů. Dopad disulfidických můstků na stabilitu lze odhadnout podle rovnice:

$$(8) \Delta S = -2,1-3/2R \ln(n),$$

kde n je počet aminokyselin ve smyčce vytvořené disulfidickým můstkem a R je plynová konstanta [31].

O výsledném efektu vloženého disulfidického můstku ale rozhodují další okolnosti. Jedním z nich jsou geometrické vlastnosti můstku. Roli hraje vzdálenost cysteinů, torzní úhly, ale také místo, kde jsou umístěné. Bylo dokázáno, že můstky stabilizují protein efektivněji, nacházejí-li se v oblastech, které se rozbalují nejdříve [32].

3.3 Stabilizace proteinů

Jak již bylo zmíněno výše, stabilita je jednou z klíčových vlastností proteinů, na které je závislá jejich biologická funkce. Právě díky svému významu je zvýšení stability předmětem proteinového inženýrství. Nejuniverzálnější a pravděpodobně nejčastější strategií pro stabilizaci proteinů je cílená mutagenese, tzn. vhodná záměna jedné nebo více aminokyselin v sekvenci tak, aby se ve výsledné proteinové struktuře co nejvíce zesílily strukturní efekty popsané v přechodí kapitole. Jelikož úspěšnost náhodně vložených mutací je pouze asi 2 %, představuje stabilizace komplexní a náročný proces. Z těchto důvodů bylo sestrojena celá řada výpočetních nástrojů zaměřených na zlepšení přesnosti předpovědi změny stability důsledkem mutace u navržených proteinů [7]. Existující nástroje lze volně klasifikovat podle způsobů, jimiž identifikují a navrhuji vhodné mutace. Mezi základní typy patří sekvenční a strukturní metody a přístupy, které je kombinují.

3.3.1 Sekvenční metody

Jak název napovídá, sekvenční metody predikují změnu ve stabilitě důsledkem mutací pouze ze sekvence. Využívají tedy primárně fyzikální a chemické vlastnosti jednotlivých aminokyselin a na jejich základě poté vyhodnocují výslednou stabilitu proteinu [33].

3.3.1.1 Rekonstrukce proteinových předků

Metoda rekonstrukce proteinových předků (z angl. ancestral sequence reconstruction) umožňuje předpovědět pravděpodobné předky současných proteinů na základě fylogenetické analýzy. Přístup je založen na předpokladu, že v minulosti panovalo na Zemi drsné klima a pro přežití jakýchkoliv organismů byla nezbytná adaptace jejich (ancestrálních) proteinů vyšším teplotám. Prvním krokem analýzy je vytvoření fylogenetického stromu pomocí mnohonásobného sekvenčního přiložení sekvencí příbuzných proteinů. Na základě fylogenetického stromu lze poté zkonstruovat sekvence předků, které se nacházejí na jednotlivých uzlech stromu. Výhodou této metody je její univerzálnost bez znalosti struktury proteinu [34]. Jednou z limitací je potřeba vysokého množství příbuzných sekvencí. Na základě porovnání sekvencí příbuzných ancestrálních proteinů lze určit stabilizující mutace, příkladem může být stabilizace zrekonstruovaného LPBCA thioredoxinu na základě mutací odvozených od příbuzného ancestrálního proteinu [35].

3.3.1.2 Inženýrství na základě konsenzu

Konsenzus je sekvenční metoda stabilizace proteinů, jejímž základem je mnohonásobné přiložení homologních sekvencí proteinů a analýza četnosti jednotlivých aminokyselin v dané pozici.

Z přílohy je následně vytvořena tzv. konsenzuální sekvence, která v každé pozici obsahuje nejčastěji se vyskytující aminokyselinu. Rezidua, u kterých se napříč sekvencemi nachází pouze jediná aminokyselina (nebo jediný typ, např. elektronový donor), se označují jako konzervovaná a bývají nezbytná pro funkci nebo stabilitu. Jednou ze stabilizačních strategií je tak analýza konzervovaných pozic v cílové sekvenci a mutace aminokyselin, které se v těchto pozicích liší (tzv. back-to-consensus) [34,36].

3.3.1.3 Řízená evoluce

Metoda řízené evoluce funguje na principu urychlení přirozené evoluce cílového proteinu. Prvním krokem je generování velkého množství mutantních variant s cílem zlepšit jejich určitou vlastnost např. termodynamickou stabilitu. Druhým krokem je exprese navržených variant a následná selekce těch, které jsou v měřeném parametru (stabilita, aktivita) účinnější než divoký typ. Příkladem selekce stability může být vystavení kolonií, které exprimují mutantní varianty cílového proteinu, teplu a následné stanovení jejich residuální aktivity. Kolonie s nejvyšší aktivitou pravděpodobně exprimují protein, který dokáže odolat zvýšené teplotě a udržet si funkci. Z vybraných kolonií je poté plazmid vyizolován a pomocí sekvenace jsou určeny přítomné mutace. Plazmid následně může být použit jako templát pro další cykly řízené evoluce. Výhodou řízené evoluce je její univerzálnost. Kritickým bodem je však složitost selekce vhodných sekvencí a nepříliš vysoká efektivita [37].

3.3.2 Strukturní metody

Strukturní metody jsou založené na analýze a optimalizaci prostorového uspořádání aminokyselin a strukturních prvků proteinu, jako jsou torzní úhly, vzdálenosti jednotlivých reziduí, výskyt vodíkových můstků a dalších interakcí. Vzhledem k velkému množství stabilitu ovlivňujících faktorů byla vytvořena řada nástrojů založených na kvantové chemii, jejichž cílem je kvantifikovat změny v energetice struktury proteinu vkládáním mutací [33].

3.3.2.1 Rosetta ddG

Jeden z velmi pokročilých a sofistikovaných nástrojů, obsahující celou řadu funkcí a algoritmů využívaných v proteinovém inženýrství, jako například předpověď struktury makromolekul ze sekvence nebo analýza energetických změn ve stabilitě důsledkem mutací, se nazývá RosettaCommons. Protokol využívaný k předpovědi stability navrhovaného enzymu nese název Rosetta-ddg [38]. Výpočetní operace pracuje se vstupními informacemi z PDB souboru struktury cílového proteinu a vytváří strukturní model mutantní varianty. Software následně vypočítá rozdíl

mezi stabilitami obou struktur - $\Delta\Delta G$. Pokud je tato hodnota vyšší než stanovená prahová hodnota, mutace je ohodnocena jako stabilizující [39]. Rosetta-ddg patří k nejvíce využívaným nástrojům pro evaluaci energetických změn důsledkem mutací. Její hlavní nevýhodou jsou nároky na výpočetní výkon, čas a nároky na expertizu uživatele.

3.3.2.2 *FoldX*

Dalším nástrojem, který k analýze stability využívá 3D strukturu proteinu, je software FoldX. Kromě informací o stabilitě také umožňuje studovat vliv mutací na dynamiku a sbalení proteinu a další vlastnosti souvisejících se stabilitou proteinů [40]. Oba zmíněné softwary jsou často součástí bioinformatických platforem, které využívají kombinaci více nástrojů pro komplexní analýzu vlastností proteinů.

3.3.2.3 *PopMusic*

Posledním příkladem je webový server PopMusic, který vypočítává termodynamickou stabilitu a její změny lineární kombinací statistických potenciálů, jejichž koeficienty jsou odvozeny na základě velikosti plochy kontaktu daného rezidua s okolním solventem. Výsledky všech predikcí jsou pro uživatele volně dostupné [41].

3.3.3 **Kombinované metody**

Všechny zmíněné nástroje byly úspěšně aplikovány při stabilizaci proteinů, nicméně každý z nich má své limity [42]. V praxi je proto dobré nespolehat se na výsledky analýzy jediného softwaru, ale raději jednotlivé přístupy kombinovat mezi sebou. Moderní nástroje predikce stability pracují většinou právě s kombinovaným přístupem pro dosažení co nejpřesnějších výsledků.

3.3.3.1 *FRESCO*

FRESCO je jeden z nejvyžívanějších bioinformatických nástrojů pro návrh stabilizujících mutací v proteinech. Pro zvýšení přesnosti, minimalizaci falešně pozitivních výsledků a snížení počtu mutací, které je nutné experimentálně ocharakterizovat, aplikuje FRESCO při analýze několik filtrů. V prvním kroku tento nástroj kombinuje algoritmy Rosetta-ddg, FoldX a Dynamic Disulfide Discovery pro vygenerování stovek potenciálně stabilizujících mutací. V dalším kroku jsou na základě vizuální kontroly vyřazeny ty mutace, které jsou chemicky nebo strukturně nesmyslné. Posledním krokem *in silico* analýzy je analýza flexibility pomocí simulací molekulární dynamiky, během které jsou vyřazeny mutace, které ji zvyšují. Mutace, které prošly všemi filtry jsou následně zkonstruovány a experimentálně ocharakterizovány. Stabilizující mutace jsou

následně kombinovány. Nevýhodou tohoto nástroje je nutnost vizuálně procházet velké množství mutací a experimentální náročnost charakterizace nových variant. Jedním z takto navržených proteinů je mutantní varianta proteinu LEH (Limonene-1,2-epoxide hydroláza), jejíž teplota tání byla zvýšena o 35 °C oproti divokému typu [43].

3.3.3.2 *PROSS*

Jedná se kombinovaný bioinformatický nástroj sloužící k navrhování stabilních variant proteinů pomocí vícebodových mutací. PROSS funguje na platformě serveru využívajícího kombinace Rosetta-ddG algoritmu s fylogenetickými informacemi o sekvenci proteinu. V prvním kroku dochází k mnohonásobnému přiložení sekvencí, čímž dojde k vyhodnocení aminokyselin, jež jsou v daném regionu ojedinělé. Vybraná rezidua jsou poté nahrazena a příspěvek jednotlivých mutací ke stabilitě proteinu je ověřen pomocí nástroje Rosetta. Navržené mutace je možné následně kombinovat pro navržení vícebodových mutací [44].

3.3.3.3 *FireProt*

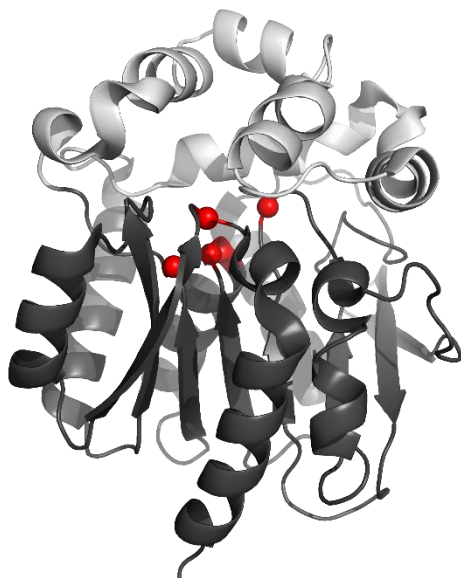
FireProt je volně dostupný kombinovaný nástroj proteinového inženýrství sloužící k návrhu a evaluaci mnohonásobných stabilizujících mutací. FireProt využívá jako vstupní informaci sekvenci, strukturu nebo kombinaci obou. Tento nástroj kombinuje dva přístupy vycházející z fylogenetické analýzy a kvantových výpočtů. V prvním přístupu jsou na základě mnohonásobného přiložení navrženy mutace v místech, které se liší od konsenzuální sekvence. Jejich efekt je vypočítán pomocí FoldX a potenciálně stabilizující mutace jsou zkombinované do výsledného návrhu. V tzv. energetickém přístupu se nejprve provede korelační a konzervační analýza, která má za cíl vyloučit mutace, které by měly vliv na funkci proteinu. Následně se pomocí nástrojů FoldX a Rosetta identifikují potenciálně stabilizující mutace, které jsou následně zkombinovány mezi sebou, popřípadě s mutacemi identifikované prvním přístupem. Výhodou tohoto nástroje je především predikovat stabilit několikabodových mutantů, příkladem úspěšně navrženého proteinu je halogenalkandehalogenáza DhaA115 [36,45].

3.4 Halogenalkandehalogenázy

Halogenalkandehalogenázy (HLDs, z angl. Haloalkane dehalogenases), s označením EC 3.8.1.5., podle IUBMB (z angl. International Union of Biochemistry and Molecular Biology) jsou enzymy ze široké rodiny α/β hydroláz, katalyzující hydrolytické štěpení vazby uhlík – halogen v halogenderivátech uhlovodíků za vzniku příslušného alkoholu, halogenidového aniontu a protonu. Katalýza dehalogenace byla pozorována při reakcích s chlorovanými, bromovanými a jodovanými uhlovodíky. Enzymatická dehalogenace fluorovaných uhlovodíků dosud nebyla popsána u žádné haloalkandehalogenázy (díky vysoké energii vazby C–F) a představuje jeden z významných cílů proteinového inženýrství této skupiny enzymů. HLDs jsou většinou enzymy bakteriálního původu. První HLD (DhlA) byla objevena a vyizolována z bakterie *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 [46]. Následně byly HLD objeveny i v symbiotických, mořských nebo patogenních bakteriích a v zástupcích domén Archea a dokonce i u Eukaryot. Díky jejich zajímavým vlastnostem jako je aktivita k toxickým látkám, široká specifita a vysoká selektivita, představují HLD zajímavé cíle pro biotechnologický průmysl, a proto jsou předmětem intenzivního výzkumu [47].

3.4.1 Struktura halogenalkandehalogenáz

Strukturou spadají HLDs do rodiny α/β – hydroláz, což je jedna z nejrozsáhlejších enzymových tříd, zahrnující strukturně velice podobné, ale funkčně odlišné skupiny enzymů jako jsou lipázy, thioesterázy, dienlaktonhydrolázy nebo acetylcholinesterázy. Terciární struktura HLDs se skládá z dvou domén – hlavní a víčkové (anglicky main and cap domains) (Obrázek 6). Zatímco hlavní doména je konzervovaná pro celou rodinu α/β – hydroláz, struktura víčkové domény je velmi pestrá, variabilní a je složena výhradně z α – helixů a smyček. Rozdíl ve struktuře víčkových domén u jednotlivých HLDs je daný pouze délkou, orientací a počtem alfa helixů. Tato doména definuje substrátovou specifitu jednotlivých HLDs. Aktivní místo HLDs se nachází v dutině mezi doménami, která je s povrchem spojena tunely, sloužící k transportu a výměně substrátu a produktů katalytické reakce. Dutina je převážně hydrofobní a nachází se zde pětice aminokyselin (tzv. katalytická pentáda), která je zodpovědná za katalytickou schopnost enzymu. Na základě rozdílných katalytických pentád se HLD dělí do tří podskupin s označením HLD-I, HLD-II a HLD-III [48,49].



Obrázek 6: Terciární struktura HLDs. Barevně jsou odlišeny domény, hlavní doména je znázorněna tmavou a doména víčková světlou barvou. Červeně jsou zobrazeny rezidua katalytické pentády. PDB ID: 1BN7.

3.4.2 Význam a využití halogenalkandehalogenáz

Schopnost odštěpit halogenu z uhlovodíkového řetězce dělá z HLDs velice zajímavou skupinu proteinů s širokým spektrem využití. HLDs se využívají při detekování nebo degradaci toxických, chemicky odolných halogenovaných uhlovodíků [50]. Příkladem detekování halogenderivátů mohou být bioindikátory pro detekci 1,2 – dichlorethanu a dibrometanu, které jsou schopny detekovat i stopové koncentrace od několika ng/l [51]. Další využití nacházejí HLDs díky své enantioselektivitě ve farmacii při syntéze opticky čistých alkoholů, které jsou prekurzory při výrobě léčiv. Některé HLDs dokáží degradovat bojový plyn yperit, a tudíž je lze uplatnit i ve vojenském průmyslu [52]. Mezi výhody používání HLDs patří jejich snadná příprava a šetrnost k životnímu prostředí. Nevýhodou je výrazná závislost jejich aktivity na teplotě a pH, poměrně nízká stabilita, a tím i životnost, a často nízká efektivita. Úkolem proteinového inženýrství je proto odstranění těchto nevýhod a zlepšení vlastností HLDs tak, aby jejich využití v biotechnologických aplikacích bylo co nejúčinnější [48].

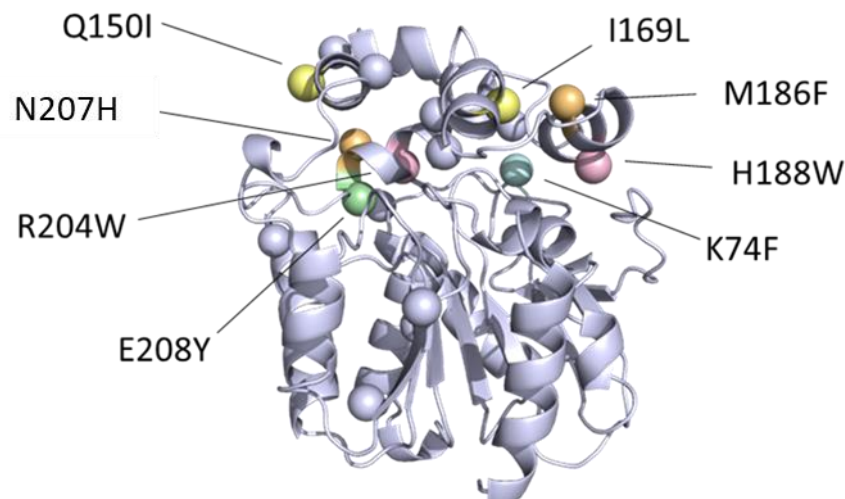
3.4.3 Halogenalkandehalogenáza DhaA

Protein DhaA je bakteriální enzym z podrodiny HLD-II. Původně byl objeven a následně vyzolován z gram-pozitivních bakterií kmene *Rhodococcus rhodochrous* [53]. Primární strukturu proteinu DhaA tvoří řetězec aminokyselin čítající 293 aminokyselin. Víčková doména se skládá

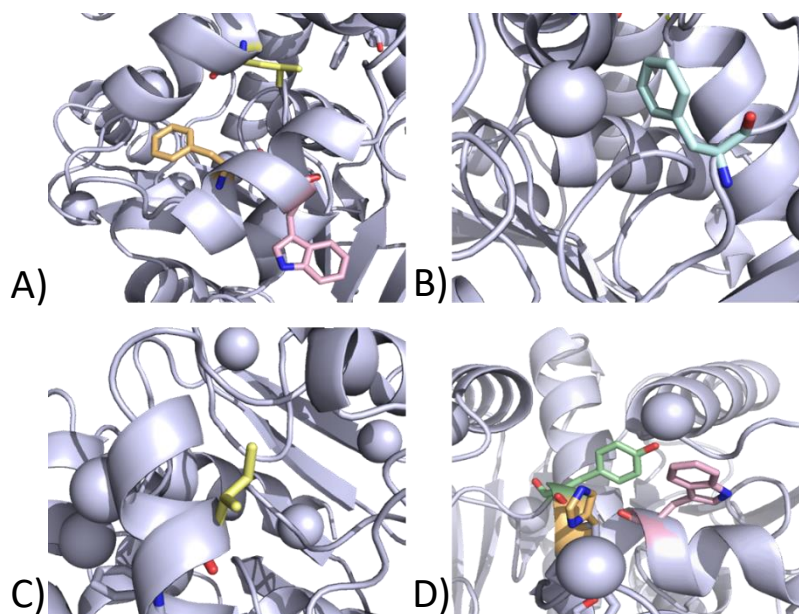
z šesti α – helixů spojených mezi sebou pomocí smyček. Stejně jako u ostatních HLD, aktivní místo DhaA je lokalizováno v dutině, která je spojena s povrchem dvěma tunely – hlavním a vedlejším. V aktivním místě se nachází katalytická pentáda, tvořena nukleofilem (kyselina asparagová), katalytickou bází (histidin), katalytickou kyselinou (kyselina glutamová) a dvě halogenid-stabilizující aminokyseliny (tryptofan a asparagin). V přírodě je přirozeným substrátem DhaA 1-chlorbutan, ale enzymovou aktivitu vykazuje i vůči jiným substrátům [48].

Díky svým zajímavým katalytickým vlastnostem je tento protein předmětem proteinového inženýrství za účelem zdokonalení jeho vlastností, jako je stabilita, aktivita nebo substrátová specifita. Příkladem takto vytvořeného proteinu je mutantní varianta DhaA31, která byla navržena pro degradaci toxického TCP [54]. Dalším příkladem inženýrované varianty, tentokrát s cílem zlepšení stability, je enzym DhaA115, který byl navržen pomocí výše zmíněného softwaru FireProt. Varianta DhaA115 nese celkem 11 mutací a jeho teplota tání (T_m , z angl. melting temperature) je o 24,6 °C vyšší než u divokého typu DhaA, což z ní dělá nejstabilnější popsanou HLDs. Na rozdíl od DhaA tvoří varianta DhaA115 vyšší oligomerní stavy. Pomocí rentgenové krystalografie byla popsána struktura pro monomer a dimer [60]. Analýza elektronové difrakce ukázala, že dimerizace probíhá záměnou domén dvou podjednotek mechanismem, který dosud nebyl popsán pro žádnou z HLDs [60].

Právě nezvykle vysoká stabilita proteinu DhaA115 vedla k výzkumu jeho jednotlivých stabilizujících mutací. Mechanismus rozbalování tohoto enzymu byl intenzivně studován experimentálními metodami i pomocí molekulových dynamik. Na základě této analýzy byly identifikovány regiony, které se během denaturace rozbalují jako první, a do kterých byly umístěny cílené mutace vedoucí k další stabilizaci struktury tohoto proteinu. Tato podrobná studie ukázala, že na začátku rozbalování dochází k oddělení víčkové domény od domény hlavní. Podstatou navržených mutací je posílení interakcí držících domény u sebe. Následně byly vybrány vhodné mutace, jejichž vliv na stabilitu byl poté predikován pomocí nástroje Rosetta. Celkově bylo navrženo šest mutantních variant (Obrázek 7 a 8), jejichž charakterizace je předmětem této práce.



Obrázek 7: Struktura navržených mutací proteinu DhaA. Šedé kuličky znázorňují mutace, které obsahuje protein DhaA115. Barevně jsou vyobrazeny mutace navržených proteinů studovaných v této práci. Světle modrou barvou je vyznačena mutace K74F, kterou nese protein DhaA184, zeleně E208Y, která je obsažena v proteinu DhaA185, žlutou dvojice mutací Q150I a I169L (varianta DhaA186) a růžovou barvou jsou označeny mutace H188W a R204W (DhaA188). Protein DhaA187 nese mutace Q150I, I169L (žluté) a N207H a M186F (oranžové). Varianta DhaA189 obsahuje mutace Q150I + I169L + M186F + H188W + R204W + N207H. Zdroj: vlastní.



Obrázek 8: Vybrané oblasti struktury obsahující navržené mutace (A) I169, M186, H188W, (B) K74F, (C) Q150I, (D) R204W, N207H, E208Y. Zdroj: vlastní.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Přístroje

- Analytické váhy HR-120-EC (A&D, Velká Británie)
- Autokláv MLS-3780 (Sanyo, Japonsko)
- Biologická třepačka Innova 44/44R (New Brunswick Scientific, USA)
- Centrifuga 6-16K (Sigma, Německo)
- Dávkovač deionizované vody Neptune Ultimate (Purite, Velká Británie)
- Elektroforetická souprava PowerPac (Bio-Rad Inc, USA)
- Flowbox BIOBAN 48 (Angelantoni Life Science s.r.l., Itálie)
- Hlubokomrazící box Innova U725 (New Brunswick Scientific, Německo)
- Magnetická míchačka US 150 (Bibby Scientific Limited, Velká Británie)
- Multifunkční reader mikrotitračních destiček Synergy H4 (BioTek Instruments Inc., USA)
- pH elektroda Hamilton (Thermo Scientific, USA)
- purifikátor BioLogic DuoFlow Maximizer 20 systém (Bio-Rad, USA)
- purifikátor FPLC Akta (GE Healthcare Life Sciences, Německo)
- stolní třepací inkubátor NB-205 (N-BIOTEK, Jižní Korea)
- Spektrofotometr DS 11 (DeNovix inc, USA)
- Spektrometr Circular Dichroism Spectrometer Chirascan V100 (Applied Photophysics, Inc., USA)
- Spektrometr UNcle (UNchained labs, USA)
- termoblok AccuBlock Digital Dry Bath (Labnet International Inc., USA)
- termocycler GenePro (Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., Čína)
- ultrazvuková vodní lázeň Ultrasonic Compact Cleaner PS0300 (Notus Powersonic, Slovensko)
- ultrazvukový procesor UP200S (Hielscher, Německo)
- vortex RS-VA10 (Phoenix Instrument, Německo)

4.1.2 Software

- BioLogic DuoFlow 5.30 (Bio-Rad, USA)
- Chirascan (Applied Photophysics. USA)
- Gen5 2.09.2 (BioTek Instruments Inc., USA)
- Microsoft Excel (Microsoft, USA)
- Origin (OriginLab corporation, USA)
- Unicorn (GE Healthcare, Německo)
- PyMOL (Schrödinger, Inc., USA)

4.1.3 Chemikálie

Pro zajištění nejpřesnějších výsledků byly použity pouze chemikálie klasifikované jako p.a. (z lat., pro analysi), které jsou určeny pro analytické účely.

- 2-merkptoethanol (Sigma-Aldrich)
- Agar (Sigma-Aldrich)
- Agarosa (Serva)
- Ampicilin (Serva)
- Bradfordové činidlo (Sigma-Aldrich)
- Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich)
- CutSmart pufr (New England Biolabs)
- Coomasie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner)
- DNA polymeráza (New England Biolabs)
- DNáza (Sigma-Aldrich)
- Dpnl (Biolabs)
- Deoxynukleotidy (New England Biolabs)
- EDTA¹ (Sigma-Aldrich)
- Ethanol 96% (Penta)
- Kyselina dusičná (Sigma-Aldrich)
- Glycerol (Sigma-Aldrich)

¹ Kyselina ethyldiamintetraoctová

- Glycin (Sigma-Aldrich)
- Hydrogenfosforečnan draselný (Penta)
- Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich)
- Chlorid sodný (Penta)
- Imidazol (Sigma-Aldrich)
- IPTG² (Duchefa-Biochemie)
- LB³ (Sigma-Aldrich)
- Methanol (Sigma-Aldrich)
- Peroxodisíran amonný (Sigma-Aldrich)
- Phusion high fidelity pufr (New England Biolabs)
- Polyakrylamid (Sigma-Aldrich)
- Síran nikelnatý (Penta)
- SDS⁴ (Sigma-Aldrich)
- TEMED⁵ (Sigma-Aldrich)
- Tris⁶ (Sigma-Aldrich)

² Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

³ lysogeny broth

⁴ Dodecylsíran sodný

⁵ Tetramethylethylenediamin

⁶ 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol

4.2 Metody

4.2.1 Řízená mutageneze pomocí dvoukrokové PCR

Metoda dvoukrokové PCR (z angl., polymerase chain reaction) se využívá k vytváření cílených mutací v DNA. Tato metoda je založena na dvou po sobě následujících PCR. V první reakci se exponenciálně množí úsek mezi dvěma navrženými krátkými iniciačními oligonukleotidy (tzv. primery), který nese kýženou mutaci (popřípadě více mutací). Před druhou reakcí je tento úsek dsDNA (tzv. megaprimer) obvykle oddělen od zbytku PCR směsi elektroforézou v agarózovém gelu a následně izolován pomocí komerčního kitu. V druhém kole PCR je megaprimer použit jako iniciační oligonukleotid pro syntézu celého plazmidu.

Tabulka 1: Tabulka navržených proteinů a jejich mutací.

Protein	Mutace
DhaA184	DhaA115 + K74F
DhaA185	DhaA115 + E208Y
DhaA186	DhaA115 + Q150I + I169L
DhaA187	DhaA115 + Q150I + I169L + M186F + N207H
DhaA188	DhaA115 + H188W + R204W
DhaA189	DhaA115 Q150I + I169L + M186F+ H188W + R204W + N207H

Varianty nesoucí jednu aminokyselinovou záměnu (DhaA184, 185) byly připraveny pomocí PCR navrženým mutantním *forward primerem* a univerzálním *pET reverse primerem*. Dvojbodové mutace (DhaA186, 188) byly vytvořeny pomocí dvou mutagenních primerů, z nichž každý nesl jednu mutaci. Pro plazmid kódující variantu DhaA187 byl jako výchozí templát použit plazmid DhaA186 a každý primer obsahoval jednu ze zbývajících mutací. Plazmid DhaA187 byl následně použit jako templát k vytvoření varianty DhaA189. Přehled všech použitých primerů a výchozích DNA je uveden v tabulce.

Tabulka 2: Seznam použitých primerů a výchozí DNA.

Varianta	Fw primer (5'-3')	Rv primer (5'-3')	Výchozí DNA
DhaA184	ATTGGTATGGGTAAGCGATTT TCCTGATCTGGATTATCGTTTC	pET_rev	DhaA115
DhaA185	CCGCTGTGGCGCTTCCGAATTA TCTGCCGATTGCCGGTGAACCT	pET_rev	DhaA115
DhaA186	GAATTTGCACGTGAACTGTTTAT TGCATTTTCGTACCCCGGATGTG	AAATTTTCGGCAGGATGCCTTCCA GAAATGCGTTCTGATCAATAAT	DhaA115
DhaA187	CGTCCGCTGACCGAAGTTGAATT TGATCATTATCGTGAACCGTTT	TTCACCGCAATCGGCAGTTCAT GCGGAAAGCGCCACAGCGGTTC	DhaA186
DhaA188	CTGACCGAAGTTGAAATGGATTG GTATCGTGAACCGTTTCTGAAA	AATCGGCAGTTCATTCGGAAACC ACCACAGCGGTTACGCCACAC	DhaA115
DhaA189	CTGACCGAAGTTGAAATTTGATTG GTATCGTGAACCGTTTCTGAAA	AATCGGCAGTTCATGCGGAAACC ACCACAGCGGTTACGCCACAC	DhaA187

1. Syntéza megaprimeru

Ve sterilních podmínkách byla připravena směs podle následující tabulky:

Tabulka 3: Tabulka použitých komponent, jejich koncentrace a objem.

Komponenta	Koncentrace	Objem (μl)
Deionizovaná H ₂ O	-	33,5
Polymerizační pufr (5x)	1x	10
Nukleotidy	10 mM každý	1
Fw primer	10 μM	2
Rv primer	10 μM	2
DNA	Cca 100 ng/ μl	1
DNA Polymeráza	2000 U/ml	0,5

1.1. PCR byla provedena v termocykleru s následujícími parametry:

Tabulka 4: Tabulka popisující průběh PCR.

	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace DNA	98 °C	30 s	1
Denaturace DNA	98 °C	10 s	
Nasedání primerů	55 °C	20 s	30
Dosyntetizování DNA	72 °C	30 s	
Finální dosyntetizování DNA	72 °C	2 min	1

2. Izolace megaprimeru z PCR směsi

2.1. DNA Elektroforéza v agarózovém gelu

Agarózový gel (1%) byl připraven rozpuštěním 1 g agarózy ve 100 ml TAE pufru⁷ (Tris - acetate-EDTA). K roztoku bylo před ztuhnutím přidáno interkalančí DNA barvivo GelRed (6 μl). Gel tuhnul po dobu 30 minut. K 50 μl PCR směsi bylo přidáno 10 μl nanášecího pufru a celý roztok byl nanesen na gel. Elektroforéza probíhala po dobu 35 minut při 120 V a 400 mA. Separovaná a obarvená DNA byla vizualizována v gelu modrým světlem (Blue

⁷ 40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA

light Transilluminator). Frakce odpovídající megaprimeru byla určena na základě porovnání s hmotnostním standardem a vyříznuta z gelu.

2.2. Extrakce byla provedena komerční soupravou NucleoSpin® podle uvedeného návodu.

- a) Rozpuštění gelu s megaprimery
- b) Nanesení směsi na kolonku se silika gelem.
- c) Přečištění pufrem
- d) Eluce megaprimery

2.3. Koncentrace megaprimery byla stanovena spektroskopicky z hodnot absorpance světla o vlnové délce 260 nm.

3. Celoplazmidová PCR

Ve sterilních podmínkách byla připravena směs podle následující tabulky.

Tabulka 5: Tabulka použitých komponent, jejich koncentrace a objem.

Komponenta	Koncentrace	Objem (μl)
Deionizovaná H ₂ O	-	17,5
Polymerizační pufr (5x)	1x	5
Nukleotidy	10 mM každý	0,5
MegaPrimer	Cca 100 ng/ μl	1
DNA	Cca 100 ng/ μl	0,5
DNA Polymeráza	2000 U/ml	0,25

3.1. PCR byla provedena v termocykleru s následujícími parametry:

Tabulka 6: Tabulka popisující průběh PCR.

	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace DNA	98 °C	30 s	1
Denaturace DNA	98 °C	10 s	
Nasedání primerů	55 °C	20 s	30
Syntéza DNA	72 °C	2 min 30 s	
Finální syntéza DNA	72 °C	8 min	1

4. Odstranění templátové DNA restričním štěpením

Ke směsi PCR bylo přidáno 3 μl 5X CutSmart pufru (NEB) a 2 μl restričního enzymu DpnI (20 U/ μl). Štěpení probíhalo po dobu 2 hodin při 37 °C. Následně byl enzym DpnI denaturován inkubací při teplotě 80 °C po dobu 20 minut.

5. Transformace buněk *Escherichia coli* DH5 α

Bakterie *E. coli* DH5 α jsou geneticky upravené tak, aby maximalizovaly úspěšnost transformace. Pro dosažení cílových vlastností obsahuje několik mutací. Nejvýznamnější mutací je *recA*, představující substituci glycinu 160 kyselinou asparagovou za účelem znemožnění reakcí s bakteriálními rekombinázi. Další charakteristickou mutací je *endA1*, která inaktivuje enzym endonukleázu, která má schopnost degradovat vnášený plazmid.

Ke 100 μl bakteriální suspenze bylo přidáno 10 μl PCR směsi po štěpení DpnI. Transformace byla provedena teplotním šokem, který je podrobněji popsán níže.

6. Příprava inokulační kultury

Několik bakteriálních kolonií bylo sterilně přeneseno do 10 ml LB roztoku s ampicilinem (100 $\mu\text{g/ml}$).

Směs byla inkubována přes noc při 37 °C a při 200 rpm (z angl., revolutions per minute).

7. Izolace plazmidu

7.1. Plazmidy byly z bakteriální suspenze izolovány pomocí komerční soupravy NucleoSpin®.

- a) Lýza bakteriálních buněk
- b) Centrifugace směsi
- c) Nanesení supernatantu na kolonu se silika gelem
- d) Přechištění DNA
- e) Eluce plazmidu

7.2. Úspěšnost mutagenese byla ověřena pomocí sekvenace plazmidu, provedená firmou Eurofins Genomics.

4.2.2 Transformace chemokompetentních buněk *Escherichia coli*

Transformace je proces, při kterém buňka přijímá cizí genetickou informaci ze svého okolí. Metoda transformace teplotním šokem využívá přítomnosti Ca^{2+} iontů, které vyvolávají v buňkách pocit hladovění a zároveň usnadňují překonání elektrostatické repulze mezi DNA a povrchem buňky. Při náhlém zvýšení teploty na 42 °C se bakteriální buňky dostávají do stresového stavu a snaží se přijmout cizorodou DNA z okolí. Změna teploty má také vliv na permeabilitu membrány, což usnadňuje proces přenosu. Po opětovném zchlazení buněk dochází k návratu do klidového režimu.

Cílový enzym byl exprimován v bakteriálních buňkách *E. coli* BL 21 (DE3), které byly transformovány plazmidem pET21b nesoucí gen kódující daný protein.

1. Zmražené chemokompetentní buňky *E. coli* a příslušný plazmid byly rozmrazeny na ledu.
2. K 20 μl buněčné suspenze bylo přidáno 2 μl plazmidu. Směs byla následně inkubována na ledu po dobu 30 minut.
3. Buňky s plazmidem byly vystaveny teplotnímu šoku po dobu 45 sekund v termálním bloku zahřátém na 42 °C a následně zchlazeny na ledu (5 min).
4. K buňkám bylo v aseptických podmínkách přidáno 100 μl živného roztoku – SOC (z angl. Super optimal broth) média.
5. Roztok s buněčnou suspenzí byl následně inkubován při 37 °C a 200 rpm ve stolní třepačce po dobu 1 hodiny.
6. Buněčná suspenze byla za sterilních podmínek napipetována na Petriho misku s agarovým LB médiem obsahující selekční činidlo – antibiotikum ampicilin o koncentraci 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a následně pomocí laboratorní hokejky rozetřena po celém povrchu.
7. Petriho miska byla inkubována přes noc při teplotě 37 °C.

4.2.3 Exprese rekombinantního proteinu

Expresa rekombinantních proteinů je biotechnologická metoda využívaná pro přípravu proteinů ve vhodných hostitelských organismech (např. bakterie, kvasinky, hmyzí nebo savčí buňky). Pravděpodobně nejhojněji využívaná je bakterie *E. coli*, a to především díky snadným úpravám jejího genomu a její rychlé a efektivní kultivaci.

V této práci byl pro expresi cílového proteinu využit kmen *E. coli* BL21 (DE3), jenž je geneticky modifikován pro snadné načasování a ovlivnění exprese rekombinantního proteinu. Genom kmene BL21 (DE3) obsahuje gen *lacI*, jehož funkcí je tvorba *lac* represoru, a konstrukt DE3, který kóduje T7 RNA polymerázu. Funkcí T7 RNA polymerázy je transkripce sekvence plazmidu, která kóduje cílový protein. Za standardních podmínek se na promotor genu DE3 váže *Lac* represor, který blokuje transkripci a tvorbu T7 RNA polymerázy. Díky tomu za těchto podmínek nedochází k transkripci cílového proteinu. Pro zahájení exprese se k buňkám přidává IPTG⁸, které se váže na *lac* represor, čímž ho uvolní z promotoru a umožní tak tvorbu T7 RNA polymerázy, která začne transkribovat gen kódující rekombinantní protein.

1. Příprava inokulační kultury

- a. Z Petriho misky byla pomocí očkovací kličky sterilně přenesena jedna kolonie do 10 ml roztoku LB média obsahující ampicilin o koncentraci 100 µg/ml.
- b. Naočkované médium bylo inkubováno přes noc při 37 °C za stálého třepání 200 rpm.

2. Kultivace

- a. Inokulační kultura byla přenesena do sterilního LB (1 l) obsahující ampicilin (100 µg/ml)
- b. Směs byla inkubována při 37 °C a 115 rpm do dosažení optické hustoty (OD_{600nm}) ~ 0,6.
- c. Expresa rekombinantního proteinu byla indukována přidáním IPTG do výsledné koncentrace 0,5 mM.
- d. Expresa probíhala po dobu 20 hodin při 20 °C a 115 rpm.

3. Sklizení

- a. Buňky byly zcentrifugovány při 4000 rpm a 4 °C po dobu 15 minut.

⁸ Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

- b. Supernatant byl odstraněn a zbylý buněčný pelet rozsuspendován v purifikačním pufru A⁹.
- c. Získaná směs byla poté přelita do uzavíratelných nádob a zmrazena při -70 °C.

4.2.4 Metaloafinitní chromatografie

Metaloafinitní chromatografie proteinu na imobilizovaných kovových iontech (IMAC, z angl. Immobilized metal ion affinity chromatography) je jednou z často využívaných metod pro izolaci rekombinantního proteinu z buněk. Principem této metody je vysoká afinita kovových iontů (nejčastěji Ni²⁺ nebo Co²⁺) k aminokyselině histidin, která je umístěna na C-konec proteinu v šesti opakováních (tzv. hexa-histidinová kotva) jako součást příslušného genu na plazmidu pET21b. Nikelnaté ionty roztoku NiSO₄ jsou imobilizovány na koloně, která obsahuje matici z NTA¹⁰. Buněčný extrakt je nanesen na kolonu a při průtoku dochází k navázání cílového proteinu na nikelnaté ionty, zatímco ostatní proteiny buněčného lyzátu kolonou protékají. Cílový protein je následně eluován pufrům s vysokou koncentrací imidazolu, jehož afinita k Ni²⁺ iontům je vyšší než u histidinu.

1. Zmražená buněčná suspenze byla rozmrazena ve vodní lázni. Po jejím rozmražení byla do směsi přidána DNáza (výsledná koncentrace 2 µg/ml), která štěpí molekuly deoxyribonukleových kyselin a zvyšuje tak efektivitu následné purifikace.
2. Buňky ve směsi byly následně dezintegrovány pomocí sonikace¹¹ s amplitudou 50 µm, která probíhala ve třech cyklech po 2 minutách. Po dobu procesu byla směs chlazená ledem.
3. Buněčný extrakt byl následně zcentrifugován při 14 000 rpm a teplotě 4 °C po dobu 60 minut.
4. Pro následující proces purifikace byly připraveny tyto pufrы:
 - a. Purifikační pufr A (ekvilibrační pufr)
 - b. Purifikační pufr B (eluční pufr)¹²
5. Supernatant byl následně přefiltrován kvůli odstranění větších částic (velikost póru: 0,44 µm) a injektován do automatizovaného systému pro rychlou kapalinou chromatografii proteinu (FLPC, z angl. Fast Protein Liquid Chromatography)

⁹ 16 mM K₂HPO₄, 4mM KH₂PO₄, 500mM NaCl, 10mM imidazol

¹⁰ nitriloctová kyselina

¹¹ metoda dezintegrace buněčných stěn pomocí pulsů ultrazvukových vln

¹² 16mM K₂HPO₄, 4mM KH₂PO₄, 500mM NaCl, 500mM imidazol

6. Purifikace probíhala automaticky v pěti krocích:
 - a. Nanesení vzorku na kolonu a promytí systému ekvilibračním pufrem.
 - b. Vymytí nenavázaných proteinů ekvilibračním pufrem.
 - c. Eluce slabě navázaných proteinů 10% gradientem elučního pufru.
 - d. Eluce navázaných proteinů 60% gradientem elučního pufru.
 - e. Vymytí systému a kolony elučním pufrem.
7. Po skončení byly zvlášť odebrány frakce vymyté 10% gradientem a 60% gradientem elučního pufru. Z každé frakce byl odebrán vzorek pro analýzu obsažených proteinů pomocí SDS-PAGE.
8. Kolona byla deaktivována odstraněním nikelnatých iontů pomocí stripovacího pufru¹³ a následně uchována v 20% ethanolu.
9. Frakce byly nadále uchovány při teplotě 4 °C.

4.2.5 Gelová permeační chromatografie

Metoda gelové permeační chromatografie (GPC, z angl. Gel permeation chromatography) je separační metoda, která se používá pro rozdělení částic ze směsi na základě jejich velikosti a tvaru. Během analýzy protéká směs přes kolonu s pórovitou matricí. Molekuly stejně velké nebo menší jako póry matrice do pórů vnikají, tudíž procházejí kolonou déle, což má za následek zvýšení jejich retenčního času. Naopak větší molekuly díky své velikosti v pórech nezůstávají vůbec, nebo jen velmi krátký čas. K jejich vymytí tedy dochází dříve.

1. Jako mobilní fáze byl použit 50mM draselno-fosfátový pufr o pH 7,5.
2. Systém a kolona byly promyty pufrem.
3. Směs proteinu byla nanesena na gelovou kolonu Superdex 16/600 200 pg HiLoad
4. Separace probíhala elucí fosfátovým pufrem rychlostí 1 ml/min.
5. Jednotlivé oddělené frakce, detekované pomocí UV absorbance o vlnové délce 280 nm, byly odebírány v 2 ml alikvotech a uchovány při teplotě 4 °C

4.2.6 SDS gelová elektroforéza

SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE, z angl., sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) je analytická separační metoda založená na rozdílné rychlosti

¹³ 20mM Tris, 500mM NaCl, 130mM EDTA

migrace jednotlivých proteinů v elektrické poli. Běžně se využívá například k stanovení čistoty proteinu ve vzorku. Jedná se o elektroforézu v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS, z angl., sodium dodecylsulfate). SDS přidané ke vzorku proteinu způsobí jeho denaturaci a udělí molekulám proteinu jednotný záporný náboj. Směs obsahuje také 2-merkaptoalkohol, který plní funkci redukčního činidla a redukuje sulfidické můstky v proteinu. Denaturované molekuly proteinu tak migrují gelem rozdílnou rychlostí pouze na základě jejich velikosti.

1. Vzorky byly připraveny smícháním 3-10 μl jednotlivých frakcí z purifikace s 6 μl nanášejícího pufru¹⁴ a doředěny sterilní H_2O na výsledný objem 26 μl .
2. Předem připravený polyakrylamidový gel (11%) byl uložen do elektroforetické aparatury a následně zalit Tris-glycinovým pufrem¹⁵.
3. Do první jamky bylo napipetováno 5 μl hmotnostního standardu (=směs denaturovaných proteinů se známou molekulovou hmotností obarvených bromfenolovou modří) a do dalších jednotlivých jamek bylo poté nanášeno 10 μl jednotlivých vzorků.
4. Elektroforéza probíhala přibližně 40 minut při konstantním napětí 200 V.
5. Po skončení byly proteiny v gelu 30 minut detekovány inkubací s barvivem *InstantBlue Protein Stain*.
6. Pro odstranění přebytečného barviva byl gel vložen na 30 minut do destilované vody.
7. Analýza gelu byla provedena pomocí densitometrie.

4.2.7 Nativní gelová elektroforéza

Nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu je elektroforetická metoda sloužící k analýze kvartérní struktury proteinu, tzn. rozlišení jednotlivých oligomerních stavů. Na rozdíl od SDS-PAGE při analýze nedochází k denaturaci vzorku (absence SDS), a proto je rychlost migrace proteinu ovlivněna kromě velikosti také tvarem a nábojem proteinu. Vzhledem k tomu není tato metoda vhodná k určování hmotnosti proteinu, ale spíše k určení jeho kvartérní struktury. K migraci dochází, protože většina proteinů v zásaditém pufru nese záporný náboj. Vzorky byly připraveny smícháním 20 μl roztoku proteinu a 20 μl nanášejícího pufru¹⁶.

¹⁴ 10% glycerol, 6% 2-merkaptoethanol, 2% SDS, 0,2% bromfenolová modř a 0,05M Tris

¹⁵ 50mM Tris, 0,1 % SDS, 384mM glycin a 2mM EDTA

¹⁶ 62.5 mM Tris, 10% glycerol, 0.01 % Bromophenol blue

1. Předem připravený polyakrylamidový gel (11%) byl uložen do elektroforetické aparatury a následně zalit pufr¹⁷.
2. Do jamek bylo napipetováno 15 μ l vzorku.
3. Elektroforéza probíhala přibližně 180 minut při konstantním napětí 150 V.
 Detekce a analýza gelu byla provedena stejným způsobem jako u SDS elektroforézy popsané výše.

4.2.8 Stanovení dehalogenázové aktivity Iwasakiho metodou

Halogenalkandehalogenázy jsou enzymy schopné hydrolyticky štěpit vazbu mezi uhlíkem a halogenem v halogenovaných uhlovodících za vzniku příslušného alkoholu, halogenidového anionu a protonu [55]. V této práci byla dehalogenázová aktivita jednotlivých enzymových variant stanovena pomocí detekce volných halogenidových aniontů metodou dle Iwasakiho [56]. Principem této metody je vytěsnění thiokyanátového aniontu (SCN^-) z Iwasakiho činidla I (thiokyanát rtuťnatý - $\text{Hg}(\text{SCN})_2$) enzymaticky vznikajícím halogenidem X^- . Vytěsněný thiokyanátový aniont tvoří po přidání Iwasakiho činidla II (Síran železito-amonný - $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$) komplex s železitým iontem (FeSCN^{2+}), který je červeně zbarvený a lze ho detekovat pomocí absorpance světla o vlnové délce 460 nm.

1. Rozpouštění substrátu a měření enzymových aktivit probíhalo při teplotě 37°C.
2. Roztok se substrátem byl připraven smícháním 10 ml glycinového pufru¹⁸ s 10 μ l 1,2-dibromoetanem a následně byl inkubován při po dobu 30 minut.
3. Pro stanovení aktivity byly do mikrozkušavek připraveny následující roztoky:
 - a. Slepý vzorek pufru (1 ml glycinového pufru, 100 μ l 35% HNO_3)
 - b. Slepý vzorek enzymu (1 ml roztoku enzymu v glycinovém pufru, 100 μ l 35% HNO_3)
 - c. Slepý vzorek substrátu (1 ml roztoku substrátu po inkubaci, 100 μ l 35% HNO_3)
 - d. Mikrozkušavky pro jednotlivé odběry (100 μ l 35% HNO_3)
4. Reakce byla zahájena přidáním 200 μ l enzymu o koncentraci 1 mg/ml do reakční směsi.
5. V jednotlivých časových intervalech bylo z reakční směsi odebíráno 1 ml do připravených mikrozkušavek s kyselinou dusičnou, čímž došlo k denaturaci enzymu a zastavení reakce.
6. Po odebrání všech vzorků bylo do každé mikrozkušavky přidáno 100 μ l Iwasakiho roztoku I a 200 μ l Iwasakiho roztoku II.

¹⁷ 25mM Tris, 192mM Glycine, pH 8,3

¹⁸ 100mM glycin, pH 8.6

7. Po promíchání byl každý vzorek rozpipetován po 100 μ l na mikrodestičku v osmi opakováních.
8. Vzorkům byla měřena absorbance při 460 nm.
9. Aktivity jednotlivých enzymů byly vypočítány z hodnot absorbance pomocí směrnice kalibrační křivky závislosti absorbance při 460 nm na známé koncentraci bromidu draselného (s přidáním Iwasakiho činidla).

4.2.9 Spektroskopie cirkulárního dichroismu

Cirkulární dichroismus (CD) je velmi citlivá metoda využívaná pro pozorování strukturních změn biomolekul, jako jsou proteiny, nebo nukleové kyseliny. Princip metody je založen na rozdílné absorpci levotočivě a pravotočivě polarizovaného světla zkoumanou látkou. Při průchodu modulátorem je rovinně polarizované světlo štěpeno na dvě kruhově polarizované složky. Výsledné záření se po průchodu látkou liší od původního díky odlišné absorpci těchto složek. Tento rozdíl je měřen v jednotkách elipticity a nazývá se cirkulární dichroismus. Podmínkou pro analýzu pomocí CD je chiralita zkoumané látky. CD lze využít pro monitorování konformačních změn proteinů, jako je denaturace, při které dochází k rozbalení struktury proteinu. Tyto změny můžeme sledovat zejména z důvodu absorpce peptidických vazeb v oblasti 180-240 nm, které se vyskytují v sekundárních elementech proteinu, jako jsou alfa helixy a beta skládané listy. Dalšími absorbujícími látkami jsou poté disulfidické můstky (260 nm) a aromatická rezidua (250-290 nm). Výsledná CD spektra vznikají jako součet všech spekter jednotlivých absorbujících elementů [57].

Měření spektra

1. CD spektra proteinů byla naměřena spektrometrem Circular Dichroism Spectrometer Chirascan V100.
2. Do spektrofotometrické kyvety bylo napipetováno 0,3 ml roztoku proteinu (koncentrace přibližně 0,2 mg/ml).
3. V programu Chirascan byly nastaveny následující parametry:
 - Teplota 25° C.
 - Rozmezí vlnových délek 190-260 nm.
 - Šířka jednotlivého vlnového pásma 1 nm.
 - Integrační čas 0,5 s.
 - 5 opakování.

4. Výsledné spektrum bylo získáno zprůměrováním 5 měření a odečtením spektra pufru, naměřeného za stejných podmínek.
5. Hodnoty elipticity byly následně normalizovány pomocí koncentrace a počtu residuí proteinu na průměrnou elipticitu jednoho rezidua (MRE, z angl. mean residual ellipticity).

Měření profilu teplotní denaturace

1. Do spektrofotometrické kyvety bylo napipetováno 0,3 ml roztoku proteinu (koncentrace přibližně 0,2 mg/ml).
2. V programu Chirascan byly nastaveny následující parametry:
 - Rozmezí teplot: 25–93 °C.
 - Vlnová délka světla: 227 nm.
 - Rychlost změny teploty: 1 °C/1 min.
3. Pro porovnání stability jednotlivých variant byla zvolena teplota odpovídající inflexnímu bodu teplotní křivky (tzv. zdánlivá teplota tání). Tento bod byl stanoven aproximací křivky sigmoidní funkcí pomocí nelineární regrese.

4.2.10 Fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční spektroskopie je univerzálně používána technika v přírodních vědách, hojně využívána i pro sledování změn ve struktuře proteinů. Při osvětlení vzorku proteinu světlem o vhodné vlnové délce (260-290 nm) dochází k excitaci elektronů v aromatických aminokyselinách (tryptofan, tyrosin a fenylalanin). Při jejich přechodu zpět na původní energetickou hladinu se energie uvolňuje ve formě fotonu o vyšší vlnové délce. Fluorescenční spektrum proteinů je nejvíce ovlivněno spektrem tryptofanu, a to zejména proto, že ze zmíněných aminokyselin má nejvyšší kvantový výtěžek (tzn. poměr emitovaných a absorbovaných fotonů). Fluorescence tryptofanu je významně ovlivněna prostředím a jeho spektrum se mění v závislosti na jeho okolí. Při procesu denaturace dochází k rozbalování proteinu a tryptofan, který je hydrofobní, a proto se často nachází sbalený uvnitř, se dostává do kontaktu s vodou. Při tomto procesu se emisní maximum posouvá do vyšších vlnových délek (tzv. červený posun, angl. red shift), čehož lze využít při monitorování tohoto procesu [58].

1. Fluorescenční spektra vzorků byla měřena na přístroji UNcle (UNchained labs)
2. Excitace proteinových fluoroforů byla provedena světlem o vlnové délce 266 nm a emisní spektra měřena v rozmezí 300-400 nm.

3. Spektra byla monitorována v rozmezí 25-95 °C rychlostí 1 °C/min.

Pro vyhodnocení byla využita závislost průměrné emisní vlnové délky (AEW, z angl. average emission wavelength) v rozmezí 300-400 nm na teplotě. Pro výpočet AEW platí následující rovnice:

$$(9) AEW = \frac{\sum I_{\alpha} \alpha}{\sum I_{\alpha}},$$

kde α značí vlnovou délku a I_{α} fluorescenční intenzitu ve vlnové délce α .

4.2.11 Globální analýza denaturačních křivek

Energetika rozbalování jednotlivých variant byla kvantifikována globální analýzou naměřených denaturačních křivek v programu Calfitter [61]. Experimentálně bylo zjištěno, že mechanismus rozbalování proteinu DhaAwt a DhaA115 je částečně reversibilní a skládá se minimálně ze dvou kroků. Jelikož studované varianty obsahují malý počet mutací, lze u nich očekávat podobný mechanismus. V této práci jsou analyzovány pouze dvě křivky pro každou variantu, a proto je nutné pro kvantifikaci Gibbsovy aktivační energie rozbalování zapotřebí aproximovat mechanismus rozbalování jednoduchými modely. Z toho důvodu byla data analyzována pomocí následujících tří modelů.

Prvním modelem je jednokrokový ireversibilní mechanismus ($N \rightarrow D$), popisující kineticky řízenou denaturaci (D) nativního stavu (N). Model umožňuje robustní odhad kinetické bariéry rozbalování s vysokou přesností, protože je nejjednodušší a má nejméně parametrů, ale není přesný při proložení dat.

Druhý model – dvoukrokový, částečně reversibilní model ($N \rightleftharpoons I \rightarrow D$) popisuje univerzální mechanismus rozbalování proteinů, u kterého je nativní stav (N) v rovnováze s intermediátem (I), který ireversibilně denaturuje (D). Tento model nejlépe vystihuje skutečný mechanismus rozbalování testovaných variant, ale kvůli malému experimentálnímu datasetu kvantifikuje druhý krok rozbalování proteinu s vysokou odchylkou.

Posledním testovaným modelem je dvoukrokový ireversibilní mechanismus ($N \rightarrow I \rightarrow D$), který popisuje krajní případ předchozího modelu, ve kterém je rychlost zpětné reakce sbalování ($I \rightarrow N$) zanedbatelná v porovnání s rychlostí rozbalování ($N \rightarrow I$). Model poskytuje nejpřesnější proložení dat, ale kvůli malé velikosti analyzovaného datasetu má vysokou nepřesnost v odhadu druhého kroku, podobně jako v případě předchozího modelu.

Výsledná hodnota Gibbsovy aktivační energie rozbalování byla stanovena jako vážený průměr hodnot parametrů, získaných na základě proložení dat třemi výše zmíněnými modely, podle následující rovnice:

$$(10) \quad \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N w_i x_i}{\sum_{i=1}^N w_i},$$

kde w_i odpovídá váze hodnoty parametru x_i (konkrétně ΔG^\ddagger z jednotlivých proložení křivek) a je rovna obrácené hodnotě standardní odchylky (SD) hodnot získaných daným modelem ($w_i = 1/SD_i$). Vážená odchylka hodnot spočítaných váženým průměrem byla vypočítána podle rovnice:

$$(11) \quad Y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N w_i (x_i - \bar{x})^2}{\frac{(M-1)}{M} \sum_{i=1}^N w_i}},$$

kde w_i je váha hodnoty x_i , \bar{x} je vážený průměr a M je počet hodnot x_i . (tzn. 3).

5 VÝSLEDKY

5.1 Příprava proteinů

5.1.1 Mutagenese

Plazmidy nesoucí genetickou informaci připravovaných enzymů byly vytvořeny metodou řízené mutagenese pomocí dvoukrokové PCR.

Plazmidy pro varianty DhaA184, 185, 186, 187, 188 a 189 byly úspěšně navrženy a připraveny. Správná sekvence genů byla ověřena pomocí sekvenace (Obrázek 9).

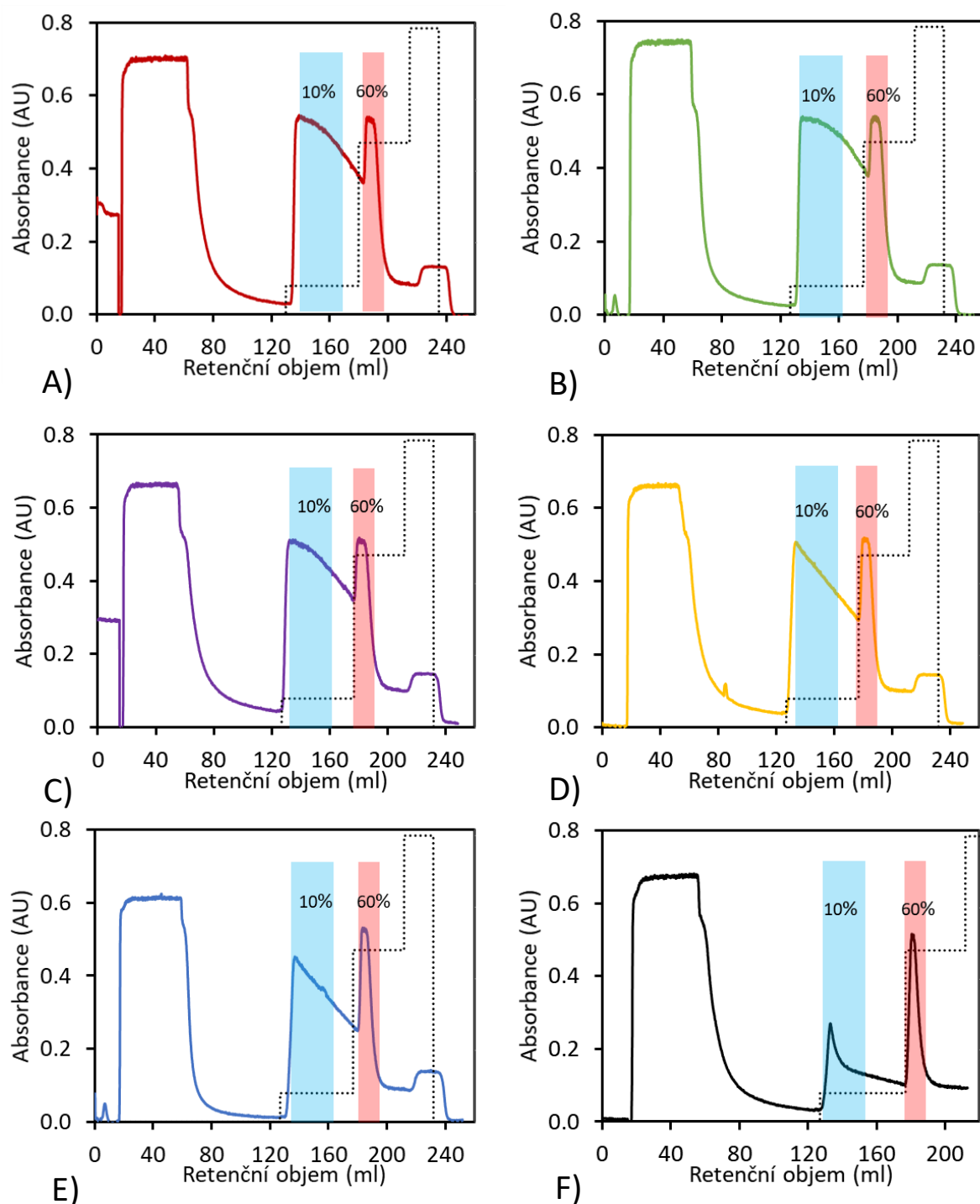


Obrázek 9: Záznam sekvenčního ověření připravených plasmidů.

5.1.2 Transformace, exprese a purifikace

Cílové enzymy byly exprimovány v chemokompetentních buňkách bakterie *E. coli* BL21 (DE3), jež byly transformovány vektorem nesoucím DNA daného proteinu.

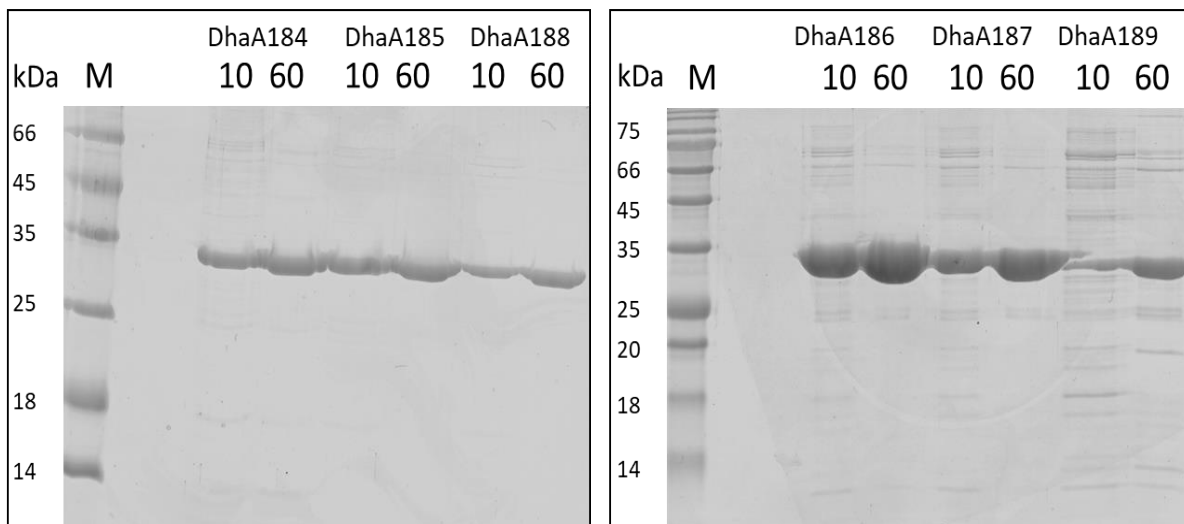
Purifikace proteinů byla provedena pomocí metaloafinitní chromatografie (Obrázek 10).



Obrázek 10: Záznam purifikace proteinu DhaA184 (A), DhaA185 (B), DhaA186 (C), DhaA187 (D), DhaA188 (E) a DhaA189 (F) zachycený absorpčním detektorem. Plná křivka reprezentuje absorbanci při vlnové délce 280 nm v závislosti na retenčním objemu. Přerušovaná křivka znázorňuje koncentraci elučního pufru v průběhu procesu (0 %, 10 %, 60 % a 100 %). Barevně jsou znázorněny sebrané frakce (modrá odpovídá frakcím vymytým 10% gradientem elučního pufru, červená 60% gradientem).

Cílové proteiny byly eluovány ve dvou frakcích, odpovídající 10% a 60% gradientu elučního pufru. Frakce byly následně odděleně uchovávány při teplotě 4 °C.

Čistota cílového proteinu v jednotlivých frakcích byla poté ověřena pomocí SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (Obrázek 11).



Obrázek 11: SDS-PAGE analýza frakcí proteinu DhaA184, 185, 186, 187, 188 a 189. Všechny vzorky putovaly gelem jako pás odpovídající proteinu o molekulové hmotnosti přibližně 35 kDa.

Analýzou intenzit vzorků v gelu pomocí denzitometru byla výsledná čistota proteinů u vzorků DhaA184, 185, 186, 187 a 188 stanovena na více než 90 %. Frakce proteinu DhaA189 obsahovaly více než 10 % nečistot, jak je patrné z gelu na obrázku. U všech proteinů byla čistota 60 % gradientu vyšší než 10 %. Vizuelní rozdíly mezi gely na obrázku jsou důsledkem různých koncentrací proteinových vzorků při analýze.

Koncentrace všech frakcí byla stanovena spektrofotometricky a použita pro výpočet celkového výtěžku proteinu na litr bakteriální kultury (Tabulka 7).

Tabulka 7: Tabulka popisující výtěžky jednotlivých proteinů.

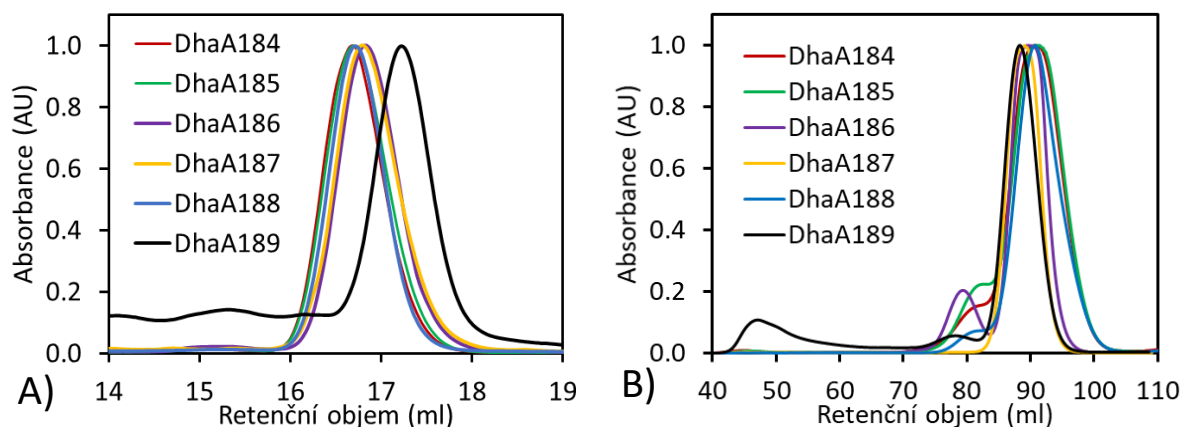
	10% gradient	60% gradient	Celkový výtěžek
DhaA184	46,2 mg	29,7 mg	75,9 mg
DhaA185	41,4 mg	20,7 mg	62,1 mg
DhaA186	46,8 mg	27,9 mg	74,7 mg
DhaA187	26,4 mg	21,6 mg	48 mg
DhaA188	11,7 mg	12,6 mg	24,3 mg
DhaA189	3,4 mg	9 mg	12,4 mg

Průměrný výtěžek variant byl přibližně 50 mg, což je méně, než činí výtěžek DhaA115 (cca 110 mg/l bakteriální kultury). Nejvyšší výtěžky byly zaznamenány u variant DhaA184 a 186. Naopak výrazně nižší výtěžek měla varianta DhaA189.

5.2 Charakterizace proteinů

5.2.1 Určení kvarterní struktury

Kvarterní struktura všech studovaných enzymů byla určena pomocí gelové permeační chromatografie (Obrázek 12).



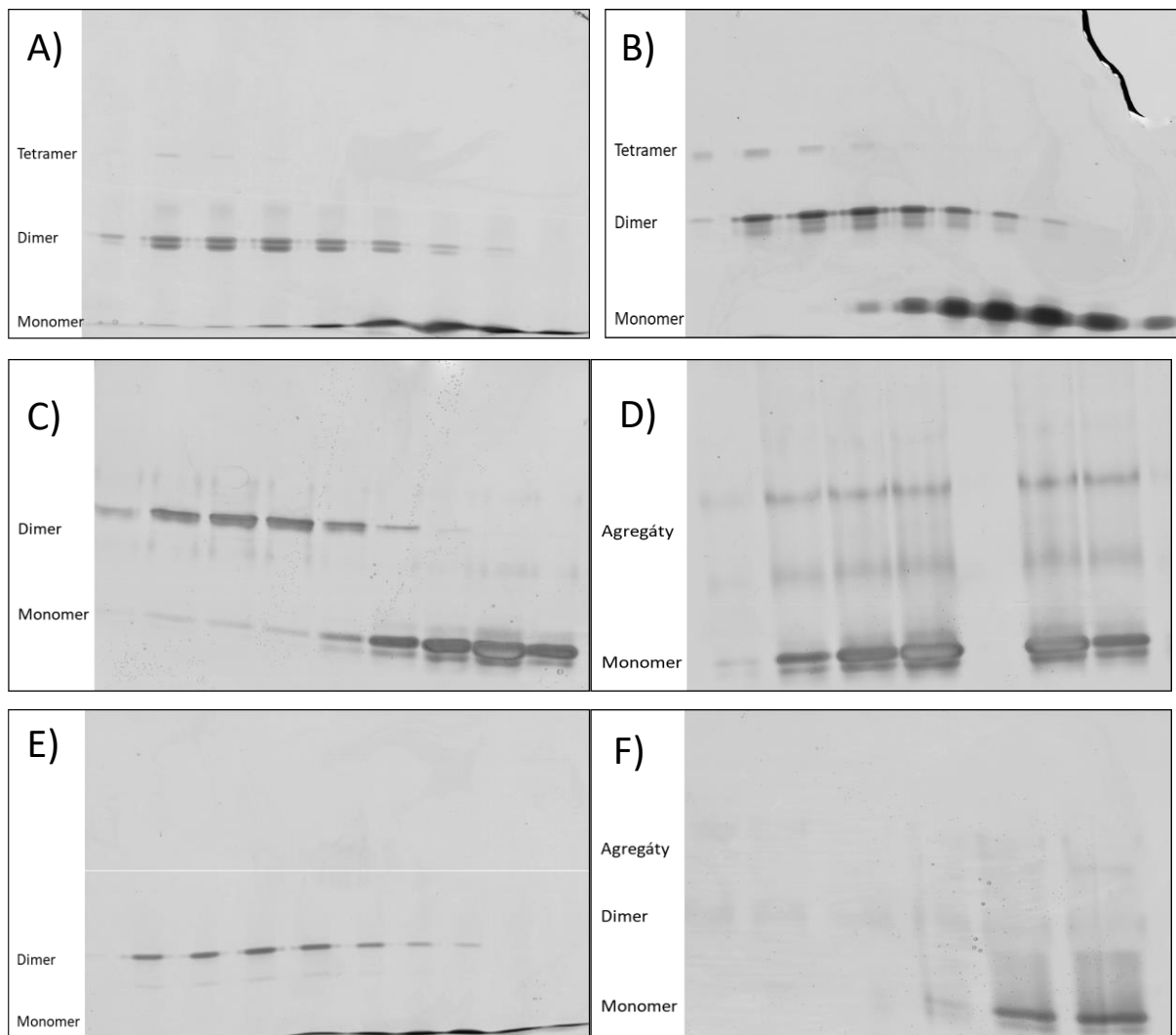
Obrázek 12: Záznam analýzy frakcí 10% (A) a 60% (B) gradientu pomocí gelové permeační chromatografie.

Frakce vymyté 10% gradientem elučního pufru u všech variant obsahovaly převážně čistý monomer (pík v retenčním objemu ~ 17 ml). Frakce 60% gradientu obsahovaly kromě monomeru ve všech případech (s výjimkou DhaA187) také malé množství dimeru a v případě variant DhaA184 a 185 i stopové množství tetrameru. U varianty DhaA189 je patrný drobný pík v retenčním objemu ~ 50 ml, který odpovídá agregovanému proteinu. Pomocí integrálního výpočtu bylo stanoveno procentuální zastoupení jednotlivých konformací (Tabulka 8).

Tabulka 8: Tabulka procentuálního zastoupení jednotlivých konformací studovaných enzymů. Protein s nejvyšším zastoupením monomeru (M) byla varianta DhaA187, která jako jediná neobsahovala žádné jiné oligomerní stavy. Naopak nejvíce oligomerních stavů (zejména dimeru (D) obsahovala varianta DhaA186. U varianty DhaA189 byla pozorována výrazná agregace (A).

	Gradient	M(%)	D (%)	A(%)
DhaA184	10%	99	1	-
	60%	90	7	-
DhaA185	10%	98	1,5	-
	60%	90	9	-
DhaA186	10%	93	2	-
	60%	85	14	-
DhaA187	10%	93	-	-
	60%	99	-	-
DhaA188	10%	98,5	0,5	-
	60%	95	4	-
DhaA189	10%	70	5	20
	60%	83	4	13

Pro vyšší rozlišení jednotlivých oligomerních stavů byly vzorky 60% gradientu analyzovány metodou NATIVE-PAGE (Obrázek 13).



Obrázek 13: NATIVE-PAGE analýza proteinů DhaA184 (A), 185 (B), 186 (C), 187 (D), 188 (E) a 189 (F).

Výsledky analýzy jsou v souladu s výsledky získanými z GPC. Varianty DhaA184 a 185 obsahují kromě monomeru ještě dimer a tetramer, varianty DhaA186, 188 a 189 kromě monomeru pouze dimer. Na gelu se vzorkem DhaA189 jsou patrné agregáty, viditelné jako nejasný pás cílového proteinu. Podobný jev lze pozorovat i u varianty DhaA187, což je ale v rozporu s GPC a je pravděpodobně způsoben stářím vzorku v době analýzy.

5.2.2 Stanovení dehalogenázové aktivity

Pro ověření správnosti sbalení studovaných proteinů byla testována jejich biologická funkce. Dehalogenázová aktivita enzymů byla stanovena pomocí Iwakiho metody (Tabulka 9).

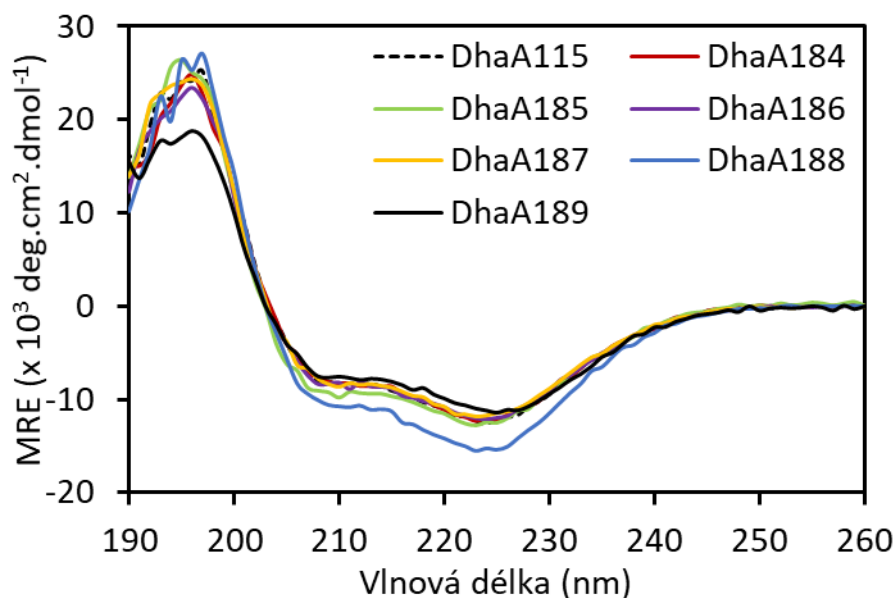
Tabulka 9: Tabulka enzymových aktivit testovaných variant se substrátem 1,2 dibromethan při teplotě 37 °C.

	Aktivita ($\mu\text{mol s}^{-1}/\text{mg enzymu}$)
DhaA184	0,033 \pm 0,0014
DhaA185	0,014 \pm 0,0008
DhaA186	0,010 \pm 0,0007
DhaA187	0,057 \pm 0,0022
DhaA188	0,009 \pm 0,0004
DhaA189	0,064 \pm 0,0056

Hodnoty aktivit se významně liší, což je důsledkem posunu teplotního optima každého proteinu do jiných teplot. Všechny studované enzymy vykazovaly enzymovou aktivitu, z čehož lze usoudit, že proteiny byly správně sbaleny a vložené mutace neměly negativní dopad na jejich biologickou funkci.

5.2.3 Měření CD spektra

Správnost sbalení byla kromě stanovení dehalogenázové aktivity ověřena také pomocí spekter cirkulárního dichroismu (Obrázek 14).

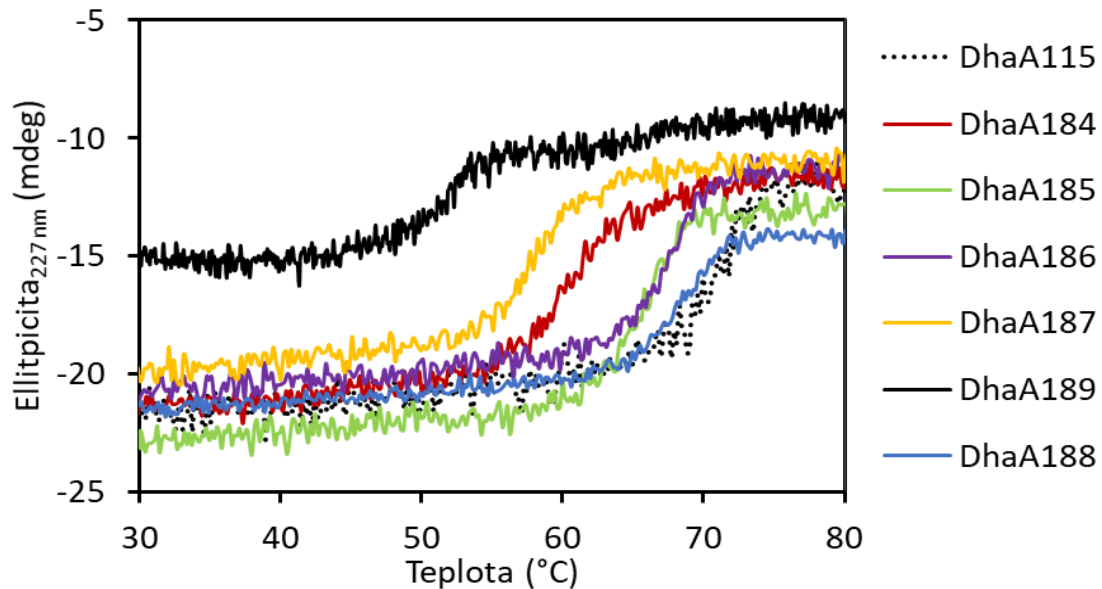


Obrázek 14: Normalizovaná CD spektra studovaných proteinů.

Spektra všech testovaných proteinů vypadají velmi podobně jako spektrum nativního stavu proteinu DhaA115, což potvrzuje výsledky o správnosti sbalení proteinů stanovené pomocí dehalogenázové aktivity. Nejnižší hodnoty elipticity byly naměřeny ve vlnových délkách 224 a 227 nm, což je pro spektra halogenalkandehalogenáz charakteristické. Spektrum proteinu DhaA188 má nižší hodnoty minima, což je pravděpodobně způsobeno drobnými změnami v sekundární struktuře proteinu vložení dvou tryptofanů.

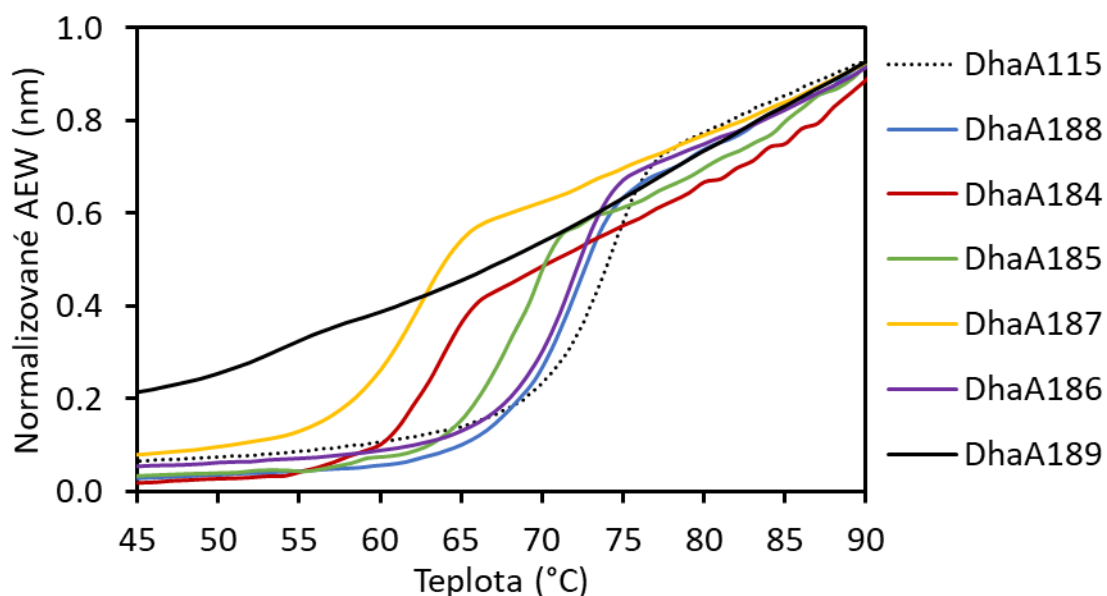
5.2.4 Teplotní denaturace

Teplotní denaturace byla studována pomocí dvou spektroskopických metod, fluorescenční spektroskopii (Obrázek 16) a spektroskopii cirkulárního dichroismu (Obrázek 15).



Obrázek 15: CD denaturační křivky studovaných proteinů sestaveny jako závislost elipticity ve vlnové délce 227 nm na rostoucí teplotě.

Pro všechny křivky je charakteristická změna signálu v teplotním rozmezí přibližně 50-70 °C, což odpovídá postupnému rozpadu sekundárních struktur během rozbalování proteinu. Křivky se liší posunutím sigmoidního přechodu vůči teplotě, ve které dochází k jejich denaturaci.



Obrázek 16: Fluorescenční denaturační křivky studovaných proteinů sestavených jako závislost průměrné emisní vlnové délky na rostoucí teplotě.

Pro křivky všech variant kromě DhaA189 je společný růst hodnot AEW v teplotním rozmezí 55-75 °C, který je způsoben změnami v terciární struktuře během rozbalování proteinu. Křivky se liší posunutím sigmoidního přechodu vůči teplotě, ve které dochází k jejich denaturaci. Křivka varianty DhaA189 má odlišný tvar a zmíněný přechod neobsahuje, což je způsobeno nejspíše vysokou mírou agregace tohoto proteinu.

Pro porovnání stabilit jednotlivých variant byla pro účely této práce zvolena teplota, odpovídající inflexnímu bodu jednotlivých sigmoidních křivek (T_m) (Tabulka 10). Tato teplota je označena jako teplota tání (T_m), nicméně díky nevratnosti denaturačního procesu se nejedná o “pravou” teplotu tání zmíněnou v teoretickém úvodu.

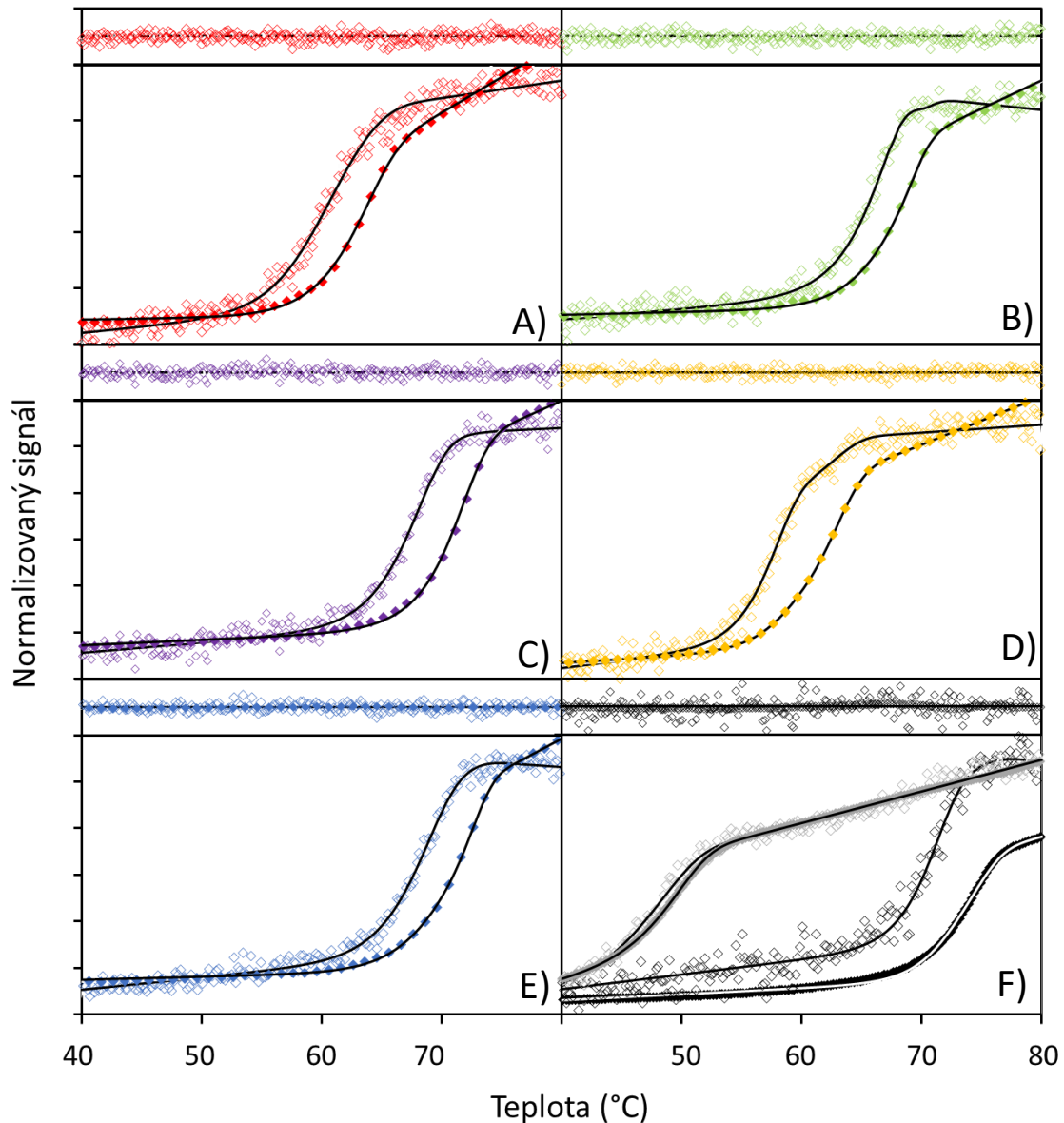
Tabulka 10: Tabulka stanovených teplot tání T_m . Pomlčkou jsou znázorněny případy, které nebylo možné analyzovat.

	Fluorescence		Cirkulární dichroismus	
	T_m (°C)	ΔT_m (°C)	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
DhaA184	64,0 ± 0,0	-10,2	60,4 ± 0,1	-10,4
DhaA185	68,3 ± 0,3	-5,9	65,4 ± 0,1	-5,4
DhaA186	72,0 ± 0,0	-2,2	67,2 ± 0,1	-3,6
DhaA187	62,1 ± 0,2	-12,1	58,1 ± 0,1	-12,7
DhaA188	72,0 ± 0,1	-2,2	68,2 ± 0,1	-2,6
DhaA189	-	-	51,2 ± 0,1	-19,4
DhaA115	74,2 ± 0,1	0	70,8 ± 0,2	0
DhaAwt	50,7 ± 0,4	-23,5	48,5 ± 0,2	-22,3

Na základě prvotní analýzy bylo zjištěno, že nejstabilnější jsou proteiny DhaA188 a DhaA186. Naopak nejméně stabilní jsou varianty DhaA184, DhaA187 a DhaA189. Žádná z variant není dle analýzy stabilnější než varianta DhaA115.

5.2.5 Globální analýza denaturačních křivek

Denaturační křivky získané pomocí fluorescenční spektroskopie a spektroskopie cirkulárního dichroismu byly pro každou variantu analyzovány globálně v programu Calfitter (Obrázek 17). Varianta DhaA189 nebyla z důvodu agregace analyzována.



Obrázek 17: Normalizované denaturační křivky závislosti cirkulárního dichroismu (otevřené symboly) a fluorescence (plné symboly) na teplotě jednotlivých variant. (A) DhaA184, (B) DhaA185, (C) DhaA186, (D) DhaA187, (E) DhaA188, (F) DhaAwt (šedá) a DhaA115 (černá). Proložení dat dvoukrokovým ireversibilním modelem rozbalování je znázorněno černou čarou (bílou v případě fitu fluorescenční křivky DhaA115), křivka proložená daty DhaAwt představuje fit do dvoukrokového, částečně reversibilního modelu. Nad grafy denaturačních

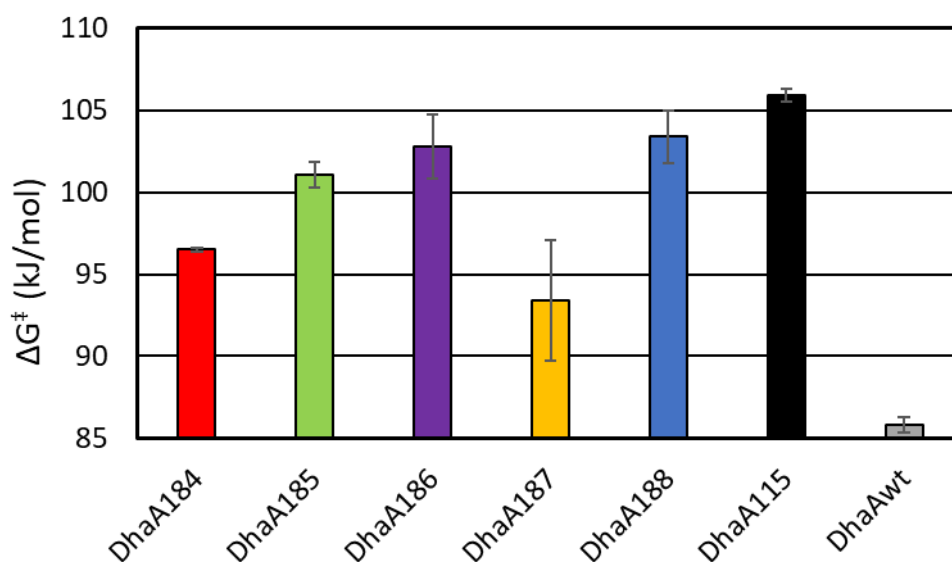
křivek je zobrazen graf znázorňující odchylky jednotlivých bodů od proložené křivky, popisující jeho přesnost (tzv. residuály).

Globální analýza dat pomocí tří různých modelů umožnila robustní kvantifikaci mechanismu rozbalování jednotlivých variant a odhalila, že vložené mutace mají největší efekt na Gibbsovu aktivační energii rozbalování (Tabulka 11). Pro vzájemné porovnání jejich hodnot byla zvolena teplota 64 °C, odpovídající aritmetickému průměru inflexních bodů všech analyzovaných křivek testovaných proteinů (hodnoty z tabulky 10), jelikož přesnost proložení dat modelem je v tomto bodě nejvyšší.

Tabulka 11: Tabulka hodnot Gibbsovy aktivační energie testovaných proteinů získaných pomocí proložení dat třemi různými modely denaturace. Proložení dat DhaAwt dvoukrokovým ireversibilním modelem poskytovalo parametry s vysokou odchylkou, a proto nejsou v tabulce uvedeny. Zkratky N, D a I představují nativní, rozbalený a intermediální stav.

Model	Jednokrokový ireversibilní	Dvoukrokový ireversibilní	Dvoukrokový částečně reversibilní	
Krok	N->D	N->I	N=I	I->D
Parametr	$\Delta G_{64^\circ\text{C}}^\ddagger$ [kJ/mol]	$\Delta G_{64^\circ\text{C}}^\ddagger$ [kJ/mol]	$\Delta G_{U,64^\circ\text{C}}$ [kJ/mol]	$\Delta G_{64^\circ\text{C}}^\ddagger$ [kJ/mol]
DhaA184	96,5 ± 0,4	96,6 ± 0,5	-4,4 ± 2,4	96,2 ± 2,4
DhaA185	100,6 ± 0,5	101,4 ± 0,6	3,0 ± 1,7	103,4 ± 4,8
DhaA186	102,6 ± 0,5	101,7 ± 0,8	5,6 ± 1,1	107,1 ± 2,4
DhaA187	95,0 ± 0,5	87,9 ± 1,4	-11,2 ± 2,1	95,1 ± 2,1
DhaA188	103,3 ± 0,4	102,5 ± 0,7	6,1 ± 1,0	107,7 ± 2,7
DhaA115	105,8 ± 0,4	106,7 ± 2,1	11,2 ± 3,6	105,7 ± 7,4
DhaAwt	86,0 ± 0,7	n.d.	-11,5 ± 6,2	84,9 ± 3,7

Výsledný odhad hodnoty Gibbsovy aktivační energie rozbalování byl stanoven jako vážený průměr hodnot získaných třemi použitými modely (Obrázek 18).



Obrázek 18: Graf srovnávající velikost Gibbsovy aktivační energie rozbalování u testovaných proteinů.

Velikosti energetických bariér získaných globální analýzou dat korelují s T_m naměřenými pomocí spektroskopických metod. Gibbsovy aktivační energie rozbalování variant DhaA186 a 188 jsou nejvyšší ze všech testovaných proteinů a blíží se hodnotě originální varianty DhaA115. Naopak nejnižší hodnoty energetické bariéry mají varianty DhaA184 a DhaA187, které jsou nejméně stabilní. Protein DhaA189 nebyl kvůli vysoké tendenci agregovat analyzován.

6 DISKUZE

Všechny vytyčené cíle této práce byly úspěšně splněny. Plazmidy kódující sekvenci navržených proteinů byly úspěšně připraveny řízenou mutagenezí pomocí dvoukrokové PCR. Úspěšnost mutagenese byla poté ověřena pomocí sekvenace.

Připravenými plazmidy byly poté transformovány buňky bakteriálního kmene *E. coli* BL21 (DE3), ve kterých úspěšně proběhla exprese cílových enzymů. Proteiny byly purifikovány metodou metaloafinitní chromatografie. Čistota enzymů DhaA184, DhaA185, DhaA186, DhaA187 a DhaA188 byla vyšší než 90 %. Varianta DhaA189 této čistoty nedosahovala. Výtěžky proteinů se pohybovaly kolem 50 mg na 1 litr buněčné kultury, nejvyšší hladiny exprese dosahovala varianta DhaA184 a 186 (přibližně 75 mg/l) a naopak nejnižších hodnot dosahoval protein DhaA189 (12,4 mg/l).

U proteinů byla následně pomocí gelové permeační chromatografie a nativní elektroforézy určena jejich kvartetní struktura. Všechny studované varianty tvoří dominantně monomery, a kromě varianty DhaA187 i část dimerů. Proteiny DhaA184 a DhaA185 tvoří navíc i malé množství tetrameru. U některých variant je patrná agregace (nejvíce u DhaA189). Další charakterizace spočívala v ověření správnosti sbalení stanovením dehalogenázové aktivity pomocí Iwasakiho metody. U všech testovaných proteinů byla prokázána enzymová aktivita, všechny varianty byly tedy správně sbaleny a vložené mutace neměly destruktivní dopad na jejich biologickou funkci.

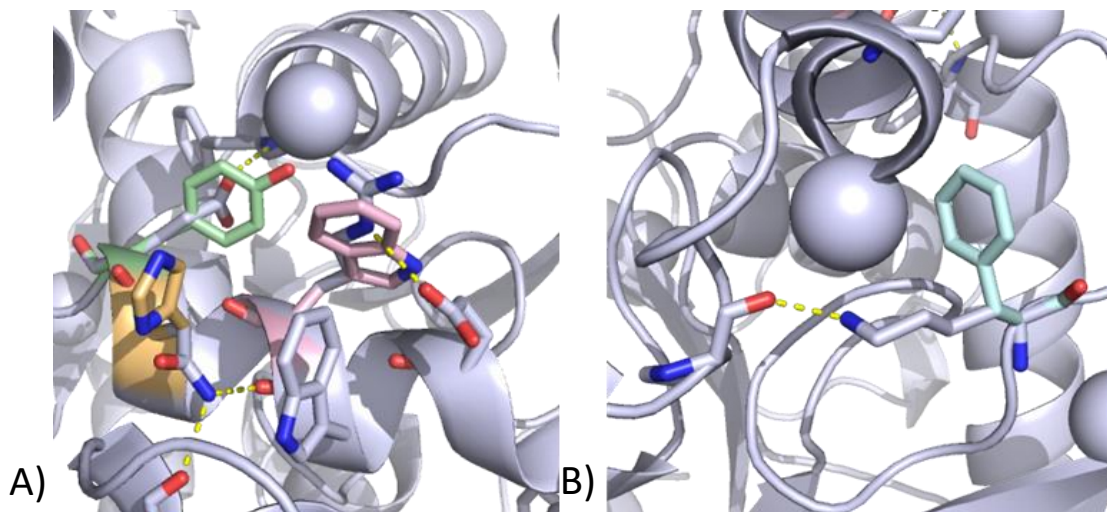
Hlavním studovaným atributem navržených variant byla jejich teplotní stabilita, jež byla monitorována pomocí fluorescenční spektroskopie a spektroskopie cirkulárního dichroismu. Na základě obou metod byly určeny a porovnány teploty tání jednotlivých proteinů. Získané teploty tání se mírně liší, hodnoty z fluorescenční spektroskopie dosahovaly přibližně o 3 °C vyšších hodnot než u cirkulárního dichroismu, na základě čehož lze říci, že proces rozbalování začíná změnami v sekundární struktuře, které lze zachytit pomocí CD a až poté dochází k expozici aromatických reziduí vodnému prostředí, což je pozorované pomocí fluorescence. Nejvyšší stability byly naměřeny u proteinů DhaA188 a DhaA185 (72,6 °C; 70,2 °C), naopak nejméně stabilní byly proteiny DhaA189 a DhaA187 (51,2 °C, 62,1 °C).

Na základě získaných dat lze říci, že všechny navržené proteiny se podařilo úspěšně připravit a charakterizovat, přičemž míra exprese a čistota vzorků dosahovala relativně vysokých hodnot. Výjimkou je protein DhaA189, u kterého bylo pozorovatelné vysoké množství nečistot

a agregace a zároveň nízká míra exprese, což spolu s přihlédnutím k jednoznačně nejnižší naměřené stabilitě ukazuje, že vložené mutace narušily důležité intramolekulární interakce původní struktury. V porovnání s variantou DhaA115 (přibližně 100 mg/l) jsou však výtěžky u všech variant mírně sníženy.

Stejný trend je patrný i při porovnání naměřených stabilit, které u žádné z testovaných variant nedosahovaly hodnoty naměřené u varianty DhaA115. Na základě globální analýzy dat bylo zjištěno, že vložené mutace mají největší efekt na energetickou bariéru rozbalování nativního stavu, což je v souladu se stabilizační strategií, která mutace navrhla s cílem tuto bariéru zvýšit. Bohužel experimentální výsledky ukázaly, že efekt těchto mutací je opačný a má za následek snížení kinetické bariéry u všech studovaných variant a tudíž snížení jejich stability. Kombinace mutací Q150I + I169L a H188W + R204W narušila stabilitu nejméně, což je patrné z hodnot ΔG^\ddagger variant DhaA186 a 188, které jsou pouze nepatrně nižší než u původní varianty DhaA115. Naopak mutace K74F a kombinace mutací M186F + N207H mají výrazný destabilizační efekt, což je patrné z výsledných stabilit proteinů DhaA184, respektive DhaA187 a 189.

Tento validační set mutantů poskytl velmi důležité informace pro další vývoj kombinovaného predikčního nástroje FireProt. Získaná data naznačují nepřesnosti v predikci stability jedné komponenty výpočtu založené na nástroji Rosetta ddG. Významnou roli může hrát také narušení elektrostatických interakcí vložením navržených mutací (Obrázek 19) a to zejména mezi aminokyselinami a solventem, jelikož použité predikční nástroje nedokáží tyto interakce zahrnout do svých výpočtů. Dalším důvodem snížení stability navrženými mutacemi může být špatné modelování rozbalování proteinu pomocí počítačové simulace, na základě čehož došlo k nesprávnému určení oblastí proteinu, které se rozbalují první. Zmíněné hypotézy bude možné dále testovat pomocí přesnější molekulové dynamiky v kombinaci s experimentální studií zaměřenou na detailnější mechanismus rozbalování.



Obrázek 19: Vložené mutace, které vedly ke ztrátě elektrostatických interakcí ve struktuře proteinu DhaA115. Vložení mutací (A) N207H, R204W, E208Y a (B) K74F způsobilo zánik některých elektrostatických interakcí (žlutá přerušovaná čára), což mohlo mít za následek destabilizaci struktury. Modře jsou vyobrazeny atomy dusíku, červeně kyslíku. Zdroj: vlastní.

Naměřená data navíc mohou poskytnout zajímavé výsledky přesahující rámec tohoto projektu: (i) navržené mutace mají efekt na agregaci proteinu a poskytují zajímavé výsledky, které lze využít pro studium a možnost ovlivnění tohoto procesu pomocí proteinového inženýrství, (ii) mutace mají vliv na tvorbu oligomerních stavů, čehož lze využít při studiu oligomerizace proteinu DhaA115 a (iii) zjištěný destabilizační efekt mutací K74F a M186F + N207H lze využít pro kalibraci použitých výpočetních nástrojů. Mutace Q150I, I169L, H188W, R204W, E208Y, které měly relativně nízký destabilizační efekt, lze studovat dále individuálně nebo v jiných kombinacích, popřípadě lze v těchto pozicích provést mutace jiné. Mutace v pozici 74 (K74F) vede k výraznému poklesu stability, což může indikovat důležitost této oblasti na celkovou stabilitu proteinu DhaA115. Toho lze využít při dalších pokusech stabilizace tohoto proteinu například vložení jiné aminokyseliny do této pozice.

7 ZÁVĚR

Všechny cíle této práce byly úspěšně splněny. Vektory kódující navržené enzymy byly úspěšně připraveny řízenou mutagenezí pomocí dvoukrokové PCR, jejíž úspěšnost byla ověřena pomocí sekvenace. Cílové proteiny byly poté úspěšně exprimovány v chemokompetentních buňkách bakterie *E. coli*. Proteiny byly následně izolovány pomocí metaloafinitní chromatografie. Čistota vzorků byla prokázána pomocí SDS elektroforézy v polyakryamidovém gelu.

U všech proteinů byla pomocí kombinace gelové permeační chromatografie a nativní elektroforézy určena jejich kvarterní struktura. Všechny studované proteiny se vyskytovaly především ve formě monomeru, a kromě varianty DhaA187 tvořily proteiny malé množství dimeru. U variant DhaA184 a DhaA185 bylo pozorováno i stopové množství tetrameru. U proteinu DhaA189 bylo výrazné zastoupení agregovaných struktur. Správnost sbalení všech enzymů byla prokázána pomocí stanovení dehalogenázové aktivity Iwasakiho metodou. Teplotní stabilita proteinů byla poté určena dvěma spektroskopickými metodami (fluorescence a CD).

Nejstabilněji se chovaly varianty DhaA188 a DhaA185 s naměřeným T_m přibližně 72, respektive 70 °C. Nejnižší stabilita byla zjištěna proteinu DhaA189, což spolu vzhledem k jeho nízké expresi a nízké čistotě svědčí o destabilizačním vlivu vložených mutací na původní strukturu proteinu. S těmito výsledky koreluje následná globální analýza dat, na základě, které byl zjištěn destabilizační efekt mutací na energetické bariéry rozbalování proteinu. Nejmenší efekt byl zjištěn u mutací Q150I + I169L a H188W + R204W u proteinů DhaA186, respektive DhaA188, jejichž stabilita byla jen nepatrně menší než stabilita proteinu DhaA115. Naopak největší vliv na destabilizaci měly mutace variant DhaA184, DhaA187 a 189, tedy mutace K74F, respektive kombinaci mutací M186F + N207H.

Celkově výsledky ukazují, že vysoká stabilita proteinu DhaA115 je důsledkem velkého množství efektů a její modulace lokálními zásahy do struktury není vhodnou strategií pro další stabilizaci, pro niž bude nutné zvolit komplexnější přístup. Připravené varianty lze nicméně dále využít pro studium molekulární podstaty agregace a tvorby vyšších oligomerních stavů proteinu DhaA115.

8 REFERENCE

- [1] D. VOET, J. G. VOET. BIOCHEMISTRY, 4th edition, 2010. ISBN: 978-0-470-57095-1
- [2] PACE CN, GRIMSLEY RG, SCHOLTZ. Protein Stability, *eLS*, 2009
- [3] BOMMARIUS AS, PAYE MF. Stabilizing biocatalysts. *Chem Soc Rev*, 2013, č. 42(15), s. 6534-65.
- [4] HARTL FU. Protein misfolding diseases. *Annu Rev Biochem*, 2017, č. 86, s. 21-26.
- [5] DELLER MC, KONG L, RUPP B. Protein stability: a crystallographer's perspective. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2016, č. 72, s. 72-95.
- [6] CH. B. ANFINSEN. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science*, 1973, č. 181, s. 223-230.
- [7] BROOM A, JACOBI Z, TRAINOR K, MIERING EM. Computational tools help improve protein stability but with a solubility tradeoff. *J Biol Chem*, 2017, č. 292(35), s. 14349-14361.
- [8] BAKER D, AGARD DA. Kinetics versus thermodynamics in protein folding. *Biochemistry*, 1994, č. 33(24), s. 7505-9.
- [9] SANCHEZ-RUIZ JM. Protein kinetic stability. *Biophys Chem*, 2010, č. 148(1-3), s. 1-15.
- [10] TRAINOR K, BROOM A., MEIERING EM. Exploring the relationships between protein sequence, structure and solubility. *Curr. Opin. Struct. Biol*, 2017, č. 42, s. 136-146.
- [11] GREGOIRE S, IRWIN J, KWON I. Techniques for monitoring protein misfolding and aggregation in vitro and in living cells. *Korean J Chem Eng*, 2012, č. 29(6), s. 693-702.
- [12] DOBSON CM, Principles of protein folding, missfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol*, 2004, č. 15(1), s. 3-16.
- [13] ARUNAN E, DESIRAJU G, KLEIN R, SADLEJ J, SCHEINER S, ALKORTA I, CLARY DC, CRABTREE RH, DANNENBERG JJ, HOBZA P, KJAERGAARD HG, LEGON AC, MENNUCCI B, NESBITT DJ. *Pure Appl. Chem*, 2011, č. 83, s. 1637-1641.
- [14] TANFORD C. *Adv. Protein Chem*, 1968, č. 23, s. 121-282.
- [15] FERSHT AR. *Trends Biochem. Sci*, 1987, č. 12, s. 301-304.
- [16] STICKE DF, PRESTA LG, DILL KA, ROSE GD, *J. Mol. Biol.* 1992, č. 226, s.1143-1159.

- [17] SCHELL D, TSAI J, SCHOLTZ JM, PACE CN. Proteins Struct. *Funct Bioinforma*, 2006, č. 63, s. 278–282.
- [18] PRIVALOV PL, GILL SJ. Stability of Protein Structure and Hydrophobic Interaction. *Adv. Protein Chem.* 1988, č. 39, s. 191–234.
- [19] LOLADZE VV, ERMOLENKO DN, MAKHATADZE GI. Thermodynamic consequences of burial of polar and non-polar amino acid residues in the protein interior. *J. Mol. Biol*, 2002, č. 320, s. 343–357.
- [20] RATNAPARKHI GS, VARADARAJAN R. *Biochemistry*, 2000, č. 39, s.12365–12374.
- [21] PACE CN, FU H, FRYAR KL, LANDUA J, TREVINO SR, SHIRLEY BA, HENDRICKS MM, IIMURA S, GAJIWALA K, SCHOLTZ JM, GRIMSLEY GR. Contribution of hydrophobic interactions to protein stability. *J. Mol. Biol.* 2011, č. 408, s. 514–528.
- [22] SHRIVER J. *Methods in Molecular Biology: Protein Structure, Stability, and Interactions.* Humana Press, 2008, č. 490, s. 1-353.
- [23] PRIVALOV PL. *Protein Structure, Stability, and Interactions.* Humana Press, 2009.
- [24] MARSHALL S, MORGAN CS, MAYO SL. Electrostatics significantly affect the stability of designed homeodomain variants. *J. Mol. Biol.* 2002, č. 316, s.189–199.
- [25] STRICKLER SS, GRIBENKO AV, GRIBENKO AV, KEIFFER TR, TOMLINSON J, REIHLE T, LOLADZE VV, MAKHATADZE GI. Protein stability and surface electrostatics: a charged relationship. *Biochemistry*, 2006, č. 45(9), s.2761-6.
- [26] DOMINY BN, MINOUX H, BROOKS CL. An electrostatic basis for the stability of thermophilic proteins. *Proteins*, 2004, č. 57(1), s.128-41.
- [27] SAWANO M, YAMAMOTO H, OGASAHARA K, KIDOKORO S, KATOH S, OHNUMA T, KATOH E, YOKOYAMA S, YUTANI K. Thermodynamic basis for the stabilities of three CutA1s from *Pyrococcus horikoshii*, *Thermus thermophilus*, and *Oryza sativa*, with unusually high denaturation temperatures. *Biochemistry*, 2007, č. 47(2), s. 721–730.
- [28] BURLEY SK, PETSKE GA. Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. *Science*, 1985, č. 229, s. 23-28.
- [29] PUCCI F, ROOMAN M. Physical and molecular bases of protein thermal stability and cold adaptation. *Cur Opin Struct Biol*, 2017, č. 42, s. 117-128.

- [30] MATTHEWS BW, NICHOLSON H, BECKTEL WJ. Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, č. 84(19), s. 6663-6667.
- [31] PACE CN, SCHOLTZ JM, GRIMSLEY GR. Forces stabilizing proteins. *FEBS letters*, 2014, č. 14, s. 2177–2184.
- [32] DOMBKOWSKI AA, SULTANA KZ, CRAIG DB. Protein disulfide engineering. *FEBS letters*, 2014, č. 2, s. 206–212.
- [33] KHAN S, VIHINEN M. Performance of protein stability predictors. *Hum Mutat*, 2010, č. 6, s. 675–84.
- [34] WIJMA HJ, FLOOR RJ, JANSEN DB. Structure- and sequence-analysis inspired engineering of proteins for enhanced thermostability. *Curr Opin Struct Biol*, 2013, č. 23(4), s. 588-594.
- [35] ROMERO-ROMERO ML, RISSO VA, MARTINEZ-RODRIGUEZ S, IBARRA-MOLERO B, SANCHEZ-RUIZ JM. Engineering ancestral protein hyperstability. *Biochem J*, 2016, č. 473(20), s. 3611-3620.
- [36] BEDNAR, BEERENS, SEBESTOVA, BENDS, SAGAR KHARE, CHALOUPKOVÁ, PROKOP, BREZOVSKY, BAKER, DAMBORSKY. FireProst: Energy and Evolution Based computational Design of Thermostable Multiple Point Mutants. *PLoS Comput Biol*, 2015, č. 11.
- [37] GERSHENSON A, ARNOLD FH. Enzyme stabilization by directed evolution. *Genetic engineering*, 2000, č. 22, s. 55-76.
- [38] ROHL CA, STRAUSS CE, MISURA KM, BAKER D. Protein structure prediction using Rosetta. *Methods enzymol*, 2004, č. 383, s. 66-93.
- [39] KELLOGG EH, LEAVER-FAY A, BAKER D. Role of conformational sampling in computing mutation-induced changes in protein structure and stability. *Proteins*, 2011, č. 79(3), s. 830-8.
- [40] SCHYMKOWITZ J, BORG J, STRICHER F. The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acid Research*, 2005, č. 33.
- [41] DEHOUCK Y, KWASIGROCH JM, GILIS D, ROOMAN M. PoPMuSiC 2.1: a web server for the estimation of protein stability changes upon mutation and sequence optimality. *BMC Bioinformatics*, 2011, č. 12(1).

- [42] BUß O, RUDAT J, OCHSENREITHER K. FoldX as Protein Engineering Tool: Better Than Random Based Approaches?. *Comput Struct Biotechnol J*, 2018, č. 16, s. 25-33.
- [43] WIJMA HJ, FURST MJLJ, JANSSEN DB. A Computational Library Design Protocol for Rapid Improvement of Protein Stability: FRESCO. *Methods Mol Biol*, 2018, č. 1685, s. 69-85.
- [44] GOLDENZWEIG A, GOLDSMITH M, HILL SE, GERTMAN O, LAURINO P, ASHANI Y, DYM O, UNGER T, ALBECK S, PRILUSKY J, LIEBERMAN RL, AHARONI A, SILMAN I, SUSSMAN JL, TAWFIK DS, FLEISHMAN SJ. Automated Structure- and Sequence-Based Design of Proteins for High Bacterial Expression and Stability. *Mol Cell*, 2018, č. 70(2).
- [45] MUSIL M, STOURAC J, BENDL J, BREZOVSKY, PROKOP Z, ZENDULKA J, MARTINEK T, BEDNAR D, DAMBORSKY J. FireProt: web server for automated design of thermostable proteins. *Nucleic Acids Res*, 2017, č. 45, s. 393-399.
- [46] KEUNIG S, JANSSEN DB, WITHOLT B. Purification and characterization of hydrolytic haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *J Bacteriol*, 1985, č. 163, s. 635-639.
- [47] KUNKA A, DAMBORSKY J, PROKOP Z. Haloalkane Dehalogenases From Marine Organisms. *Methods Enzymol*, 2018, č. 605, s. 203-251.
- [48] DAMBORSKÝ J, CHALOUPKOVÁ R, PAVLOVÁ M, CHOVANCOVÁ E, BREZOVSKÝ J. Structure-function relationships and engineering of haloalkane dehalogenases. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 2010, s. 1081-1098.
- [49] CHOVANCOVÁ, KOSINSKY, BUJNICKY, DAMBORSKÝ. Phylogenetic analysis of haloalkane dehalogenases. *Proteins*, 2007. č. 67. s. 305-316.
- [50] KOUDELAKOVA, BIDMANOVA, DVORAK, PAVELKA, CHALOUPKOVA, PROKOP, DAMBORSKY. Haloalkane dehalogenases: biotechnological applications. *Biotechnol J*, 2013, č. 8, s. 32-45.
- [51] CAMPBELL, MÜLLER, REARDON. Development of a fiber optic enzymatic biosensor for 1,2-dichloroethane. *Biotechnol Lett*, 2006, č. 28, s. 883-887.
- [52] PROKOP, OPLUSTIL, DEFRANK, DAMBORSKÝ. Enzymes fight chemical weapons. *Biotechnol J*, 2006, č. 1, s. 1370-1380.
- [53] KULAKOVA AN, LARKIN MJ, KULAKOV LA. The plasmid-located haloalkane dehalogenase gene from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064. *Microbiology*, 1997, č. 143, s. 109-115.

- [54] PAVLOVÁ, KLVANA, PROKOP, CHALOUPKOVÁ, BANÁŠ, OTYEPKA, WADE, TSUDA, NAGATA, DAMBORSKÝ. Redesigning dehalogenase access tunnels as a strategy for degrading an anthropogenic substrate. *Nature Chemical Biology*, 2009, č. 5, s. 727-733.
- [55] DAMBORSKY J, RORIJE E, JESENSKÁ A, NAGATA Y, KLOPMAN G, PEIJENBURG WJGM. Structure–specificity relationships for haloalkane dehalogenases. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, č. 20, s. 2681-2689.
- [56] IWASAKI I, UTSUMI S, OZAWA T. New Colorimetric Determination of Chloride using Mercuric Thiocyanate and Ferric Ion. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1952, č. 25, s. 226.
- [57] S. M. KELLY, T. J. JESS, N. C. PRICE. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*, 2005, č. 1751, s. 119-139.
- [58] LAKOWICZ, JOSEPH R. Protein Fluorescence. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. edice, 2006, ISBN 978-0-387-46312-4.
- [59] MARQUES, KUNKA, BEDNAR, PROKOP, DAMBORSKY, Combination of experimental and in silico methods in stabilization of haloalkane dehalogenase. 2020, manuskript v přípravě.
- [60] CHMELOVA, MARKOVA, MARQUES, CARPENTIER, BEDNAR, DAMBORSKY, MAREK. Structural basis for engineered thermostability in haloalkane dehalogenases. 2020, manuskript v přípravě.
- [61] MAZURENKO S, STOURAC J, KUNKA A, NEDELJKOVIC S, BEDNAR D, PROKOP Z, DAMBORSKY J. CalFitter: a web server for analysis of protein thermal denaturation data. *Nucleic Acids Res*, 2018, č. 2 (46), s.344-349.

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Tabulka navržených proteinů a jejich mutací.	33
Tabulka 2: Seznam použitých primerů a výchozí DNA.	34
Tabulka 3: Tabulka použitých komponent, jejich koncentrace a objem.	35
Tabulka 4: Tabulka popisující průběh PCR.	35
Tabulka 5: Tabulka použitých komponent, jejich koncentrace a objem.	36
Tabulka 6: Tabulka popisující průběh PCR.	36
Tabulka 7: Tabulka popisující výtěžky jednotlivých proteinů.	51
Tabulka 8: Tabulka procentuálního zastoupení jednotlivých konformací.	53
Tabulka 9: Tabulka enzymových aktivit testovaných variant.	55
Tabulka 10: Tabulka stanovených teplot tání T_m .	59
Tabulka 11: Tabulka hodnot Gibbsovy aktivační energie.	61

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma popisující energetiku proteinových konformací.	13
Obrázek 2: Energetické schéma znázorňující dG_u během rozbalování proteinu.	14
Obrázek 3: Schéma popisující energetiku rozbalování proteinu.	15
Obrázek 4: Schéma demonstrující kineticky řízenou stabilizaci proteinů.	16
Obrázek 5: Amyloidní struktura.	18
Obrázek 6: Terciární struktura HLDs.	27
Obrázek 7: Struktura navržených mutací proteinu DhaA.	29
Obrázek 8: Vybrané sektory struktury obsahující navržené mutace.	29
Obrázek 9: Záznam sekvenčního ověření připravených plasmidů.	48
Obrázek 10: Záznam purifikace proteinů.	49
Obrázek 11: SDS-PAGE analýza frakcí proteinů.	50
Obrázek 12: Záznam analýzy frakcí pomocí gelové permeační chromatografie.	52
Obrázek 13: NATIVE-PAGE analýza proteinů.	54
Obrázek 14: Normalizovaná CD spektra studovaných proteinů.	56
Obrázek 15: CD denaturační křivky studovaných proteinů.	57
Obrázek 16: Fluorescenční denaturační křivky studovaných proteinů.	58
Obrázek 17: Nafitované denaturační křivky proteinů.	60
Obrázek 18: Graf srovnávající velikost Gibbsovy aktivační energie rozbalování	62
Obrázek 19: Vložené mutace narušující vazebné interakce v proteinu.	65