

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra molekulární biologie

Charakterizace inhibičních vlastností proteinu TbIF1
vůči mitochondriálnímu komplexu F1-ATPázy u
bičíkovce *Trypanosoma brucei*.

Bakalářská práce

Hana Váchová

Vedoucí práce: RNDr. Alena Zíková Ph. D.

České Budějovice 2013

Váchová, H., 2013 Charakterizace inhibičních vlastností proteinu TbIF1 vůči mitochondriálnímu komplexu F1-ATPázy u bičíkovce *Trypanosoma brucei*. (Inhibiting properties of the inhibitory protein TbIF1 to *T. brucei* F1-ATPase. Bc. Thesis in Czech) – 51 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

To map and define the minimal inhibiting sequence of the inhibitory peptide TbIF1 and to improve its inhibiting property, a series of the N- and C- terminal truncations of TbIF1 was created. The mutated recombinant TbIF1 his-tagged proteins were over-expressed and purified from the *E.coli* cells and their binding and inhibiting properties were tested using purified F1-ATPase complex.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb., zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 24. dubna 2013

.....
Hana Váchová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla nejvíce poděkovat své školitelce Aleně Zíkové za vedení mé bakalářské práce, naučení základních technik, trpělivost a ochotu vysvětlit cokoliv, co jsem nevěděla. Dále bych chtěla poděkovat Míše, Káje, Zuzce, Honzovi a Brianovi za vytvoření příjemného pracovního kolektivu a hlavně ochotu mi s čímkoli pomoci a cokoliv vysvětlit. Také bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za morální podporu, chvíle odreagování a dodání sil k psaní této práce.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	<i>Trypanosoma brucei</i>	1
1.1.1	Seznámení se s organismem <i>Trypanosoma brucei</i>	1
1.1.2	Životní cyklus parazita <i>Trypanosoma brucei</i>	2
1.1.3	Spavá nemoc.....	3
1.1.4	Léčba a objev léků proti spavé nemoci	4
1.2	Mitochondrie.....	5
1.2.1	Mitochondrie krevní formy <i>T. brucei</i>	6
1.3	ATP syntáza	9
1.4	Inhibiční peptid	12
1.5	TbIF1	13
2	Cíle práce.....	15
3	Materiál a metody.....	16
3.1	Gen TbIF1 a navržení primerů pro jeho amplifikaci	16
3.2	PCR.....	17
3.3	DNA elektroforéza a izolace DNA z gelu	18
3.4	Restrikce	18
3.4.1.	Restrikční reakce PCR produktů TbIF1 mutantů.....	18
3.4.2	Restrikce vektoru pRUN	19
3.7	Ligace.....	20
3.8	Transformace do XL1-blue E.Coli	21
3.9	Izolace plasmidové DNA	21
3.10	Restrikce plasmidové DNA	21
3.11	Sekvenování.....	21
3.12	Příprava expresních buněk <i>E.coli</i> C41	22
3.13	Transformace do expresních buněk C41	22
3.14	Overexprese rekombinantního proteinu – pilotní pokus.....	22

3.15 SDS Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS PAGE).....	23
3.16 Western blot.....	24
3.17 Overexprese rekombinantního proteinu.....	25
3.18 Purifikace rekombinantního proteinu	25
3.18.1 Sklizení buněčné kultury	25
3.18.2 Sonikace lyzovaných bakterií.....	25
3.18.3 Vysoko-účinná kapalinová chromatografie HPLC	25
3.19 Dialýza	27
3.20 Zakoncentrování proteinu	27
3.21 Určení koncentrace proteinů pomocí Bradfordova činidla.....	27
3.23 Inhibiční ATPázová esej.....	28
4. Výsledky.....	30
4.1 Příprava mutantních forem TbIF1	30
4.2 Pilotní exprese mutantních forem TbIF1 proteinu.....	34
4.3 Purifikace rekombinantních proteinů TbIF1.....	38
4.4 Srovnání inhibičních vlastností mutantních forem TbIF1 s původním TbIF1	41
5 Diskuze a závěr	44
6 Seznam literatury.....	48

1 Úvod

1.1 *Trypanosoma brucei*

1.1.1 Seznámení se s organismem *Trypanosoma brucei*

Trypanozómy patří do třídy Kinetoplastida, podtřídy Trypanosomatida (Volf et al., 2007) a jsou nejnebezpečnějšími parazity z této skupiny (Kovářová, 2010). Způsobují spavou nemoc, která je přenášena krevsajícími mouchami tse-tse z rodu *Glossina* (Kennedy, 2013). Hlavní příčinou, proč jsou tak nebezpečné, je jejich schopnost měnit své povrchové antigeny. Při tomto procesu je přepínána exprese genu kódující povrchové glykoproteiny, a to umožňuje parazitovi opakovaně unikat imunitnímu systému savčího hostitele (Volf et al., 2007).

Nejznámější salivární trypanozómou je *Trypanosoma brucei* s podruhy *T. b. brucei*, *T. b. rhodesiense* a *T. b. gambiense*. Všechny 3 poddruhy jsou přenášeny glosinami, v nichž trypanozómy postupně prodělávají složitý vývoj, který je ukončen v přední části trávicího traktu a přenos je poté uskutečňován metacyklickými trypomastigoty během bodnutí a sání krve (Volf et al., 2007).

Trypanosoma brucei brucei se vyskytuje v celé subsaharské Africe (Hunt, 2010). Je to zvířecí parazit, který není schopen nakazit člověka, protože je lyzován lidským krevním sérem obsahujícím toxický typ lipoproteinů o vysoké hustotě, tzv. trypanozomatický lytický faktor (Volf et al., 2007). Jeho přenašečem je *Glossina pallidipes* (Hunt, 2010) a hostiteli jsou nejen divoká africká zvířata (antilopy, zebry, šelmy), ale i domácí zvířata (skot, koně, ovce, prasata aj.), u kterých způsobuje nemoc zvanou nagana (Volf et al., 2007).

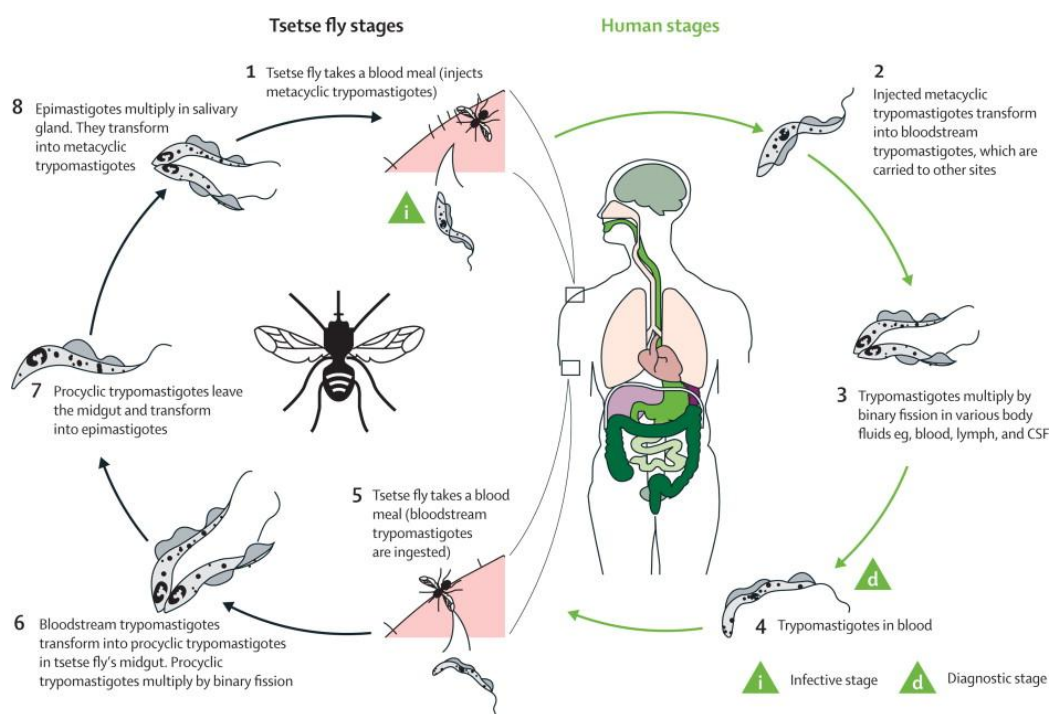
Trypanosoma rhodesiense se vyskytuje ve východní části Afriky a jejím přenašečem je *Glossina palpalis* (Hunt, 2010). Díky své odolnosti vůči účinku lidského séra je schopná nakazit kromě zvířat i člověka, u kterého způsobuje akutní spavou nemoc (východoafrická spavá nemoc). Bez léčby tato forma nemoci končí smrtí již po několika týdnech (Volf et al., 2007).

Trypanosoma gambiense se nachází v západní části Afriky a jejím přenašečem je *Glossina morsitans* (Hunt, 2010). Hlavním hostitelem je člověk, má však i zvířecí hostitele. Způsobuje chronickou spavou nemoc (západoafrickou spavou nemoc), která může probíhat i několik let a bez léčení je také letální (Volf et al., 2007).

1.1.2 Životní cyklus parazita *Trypanosoma brucei*

Trypanozómy podstupují dvoufázový životní cyklus ve hmyzím a savčím hostiteli (obr. 1.1). Tento životní cyklus zahrnuje komplexní vývoj morfologicky odlišných stádií, které se liší jak metabolicky (Besteiro et al., 2005), tak i přítomností různých povrchových antigenů (Volf et al., 2007).

Krevsající moucha tse-tse saje na infikovaném hostiteli, jímž je buď divoké či domácí zvíře v případě *T. b. brucei*, nebo člověk v případě *T. b. gambiense* a *T. b. rhodosiense*. Během sání se moucha tse-tse infikuje krevní formu trypanozóm, v jejích střevech se poté krevní forma trypanozóm přemění na hmyzí (procyklickou) formu, které se množí binárním dělením. Po určité době tyto trypanozómy pronikají do slinných žláz mouchy tse-tse, kde proběhne přeměna v epimastigotní a následně trypomastigotní stádia, která jsou připravena na přenos do hostitele (Kennedy, 2013). Během sání hmyzího přenašeče je inokulováno do místa vpichu několik metacyklických trypomastigotů. Trypanozómy se začnou šířit do lymfatických uzlin a krevního řečiště, kde se vyskytují jako dělicí se štíhlé formy (slender) a dalšího dělení neschopné tlusté formy (stumpy), které jsou připravené na další přenos do mouchy tse-tse. Po určité době pronikají štíhlé formy krevního stádia přes mozkomíšní bariéru do mozku a mozkomíšního moku, kde jsou vyvolávány hlavní příznaky spavé nemoci (Volf et al., 2007).



Obr. 1.1: Životní cyklus afrických trypanozóm (Hunt, 2013). V prvním kroku nasaje moucha tse-tse krevní nedělicí se trypanozomy. Ve střevech mouchy se tyto trypomastigoti přemění na procyklické trypomastigoty, jenž postupují do slinných žláz, kde se přeměňují na epimastigoty, kteří

se dále dělí a přeměňují se na infekce schopné formy metacyklických trypomastigotů. Tito infekční trypomastigoti pronikají do krevního oběhu lidského hostitele během sání mouchy tse-tse.

1.1.3 Spavá nemoc

Spavá nemoc neboli lidská africká trypanozomiáza (Human African Trypanosomiasis, HAT) je jednou ze světově zanedbávaných nemocí. Odhaduje se, že v subsaharské Africe je touto nemocí ohroženo okolo 60 milionů lidí. Problém onemocnění je navíc umocněn obrovským územím (až 10 milionů km² pevniny v Africe), na kterém se mouchy tse-tse vyskytují (Kennedy, 2013).

V roce 1998 odhadovala světová zdravotnická organizace (World Health Organization, WHO) počet případů spavé nemoci na 300 000. Díky snaze WHO, kontrole výskytu přenašeče a léčbě klesl počet nakažených v roce 2006 na 50 000 – 70 000 případů. V roce 2009 se množství nakažených snížilo pod 10 000. Poslední přehled poukazuje na to, že mezi lety 2000 – 2010, se vyskytovalo 94 případů spavé nemoci mimo endemické oblasti, z toho bylo diagnostikováno 43% v Evropě a 23% v USA (Kennedy, 2013).

Existují 2 formy spavé nemoci. Běžnější západoafrická spavá nemoc způsobovaná *T. b. gambiense*, zahrnuje až 97% případů. Avšak východoafrická spavá nemoc způsobovaná *T. b. rhodesiense*, která je zodpovědná pouze za 3% případů, způsobuje mnohem akutnější a závažnější onemocnění (Kennedy, 2013).

Každá forma nemoci má 2 fáze, které mají různé symptomy. Raná fáze probíhající za přítomnosti trypanozóm v krevním řečišti je doprovázená bolestmi hlavy, malátností, opakovanými horečkami (Volf et al., 2007), úbytkem váhy, nevolností a bolestmi kloubů (Kennedy, 2013). Jakmile trypanozómy proniknou do centrální nervové soustavy, je tato fáze nazývána pozdní. V této fázi dochází k poruchám spánku (až u 74% pacientů), bolestem hlavy (u 79% pacientů), poruchám pohybu a sensorického systému (Kennedy, 2013) a postupující katechizací. U neléčených pacientů tyto příznaky vedou ke smrti. Trypanozómy poškozují nakaženého člověka hlavně tím, že jeho tělo zaplavují vlnami populací s antigeně odlišným povrchem buňky. I přesto, že je každá vlna imunitním systémem zlikvidována, je během několika dnů nahrazena novou populační vlnou trypanozóm. Organismus je tak vystaven náhlému uvolnění toxinů a antigenů do krevního řečiště, ke kterému dochází po rozpadu trypanozóm a neustále se aktivuje. Tato neustálá aktivace imunitního systému vede nakonec k jeho vyčerpání (Volf et al., 2007).

1.1.4 Léčba a objev léků proti spavé nemoci

Navzdory důležitým pokrokům ve znalosti biologie tohoto parazita a patofyziologie této nemoci, nebyly v uplynulých 25 letech vyvinuty žádné nové léky. Finanční omezení tak bude nadále představovat významnou překážku ve vývoji léků. Je tedy více než znepokojivé, že léčba spavé nemoci je stále stejná jako před 25 lety. Léky, které jsou používány pro léčbu, jsou toxické a mají různou účinnost, navíc léčba trvá velmi dlouho (Croft et al., 2005).

Tab. 1.1: Léky používané k léčbě spavé nemoci.

Druh nemoci	První linie léčby	Druhá linie léčby
Raná fáze		
Východoafrická spavá nemoc <i>T. b. rhodesiense</i>	Suramin (intravenózně)	Pentamidin (intramuskulárně)
Západoafrická spavá nemoc <i>T. b. gambiense</i>	Pentamidin (intramuskulárně)	Suramin (intravenózně)
Pozdní fáze		
Východoafrická spavá nemoc <i>T. b. rhodesiense</i>	Melarsoprol (intravenózně)	N/A
Západoafrická spavá nemoc <i>T. b. gambiense</i>	Eflornithine (intravenózně) + nifurtimox (orálně)	Melarsoprol (intravenózně)

Léky jsou rozděleny na 2 skupiny – první a druhá linie léčby. První linie léčby je nasazena ihned po projevech nemoci v rané fázi. Léky jsou injekční preparáty, které musejí být podávány pravidelně a dlouhodobě. Druhá linie léčby je nasazena při nedostatečné odpovědi u léků první linie nebo v případě jejich nežádoucích vedlejších účinků.

Pro léčbu rané fáze západoafrické spavé nemoci je používán pentamidin, který byl poprvé uveden na trh v roce 1940. Tento lék je podáván intramuskulárně a je obvykle účinný, i když má několik vedlejších účinků – jsou jimi potenciální komplikace jako hyperglykémie nebo hypoglykémie a nízký tlak. Raná fáze východoafrické spavé nemoci je léčena suraminem, který je aplikován intravenózně. Byl poprvé nasazen v roce 1920. Obvykle je tento lék účinný, avšak může mít za následek selhání ledvin, kožní léze, anafylaktický šok, či neurologické komplikace (Kennedy, 2013).

Léčba pozdní fáze, při které trypanozomy překročí mozkomíšní bariéru CNS, je mnohem problematictější, protože používané léky jsou velmi toxické. Jediný lék, který je v současné době účinný pro léčbu pozdní fáze východoafrické spavé nemoci je melarsoprol,

který byl poprvé představen na trhu v roce 1949. Protože je velmi málo rozpustný ve vodě musí být podáván intravenózně v propylenglykolu. I tento lék je poměrně účinný, avšak stále je tu riziko, že selže a opět má několik nežádoucích účinků. Melarsoprol je velmi toxický a jeho injekce jsou pro pacienty velmi bolestivé. Po aplikaci se u 10% pacientů objeví encefalopatie, která vede u poloviny pacientů ke smrti. Melarsoprol je také od roku 2005 podáván ve druhé linii pozdní fáze západoafrické spavé nemoci. Dalším z léků je eflornithin v kombinaci s nifurtimoxem, který je podáván při pozdní fázi jako první linie léčiv u západoafrické spavé nemoci. Eflornithin je aplikován intravenózně a nifurtimox orálně (Kennedy, 2013).

V současné době je několik nových léků v různých fázích vývoje a testování. Nejvíce nadějí bylo vkládáno do derivátu diamidinu DB289. Bohužel se během klinických studií ukázalo, že je tento lék toxický hlavně pro jaterní a ledvinové buňky a tudíž byl jeho vývoj pozastaven. Dalším slibným kandidátem je nitroheterocyklický fexinidazol, perorální lék pro léčbu pozdní fáze východoafrické spavé nemoci, či látka zvaná SCYX-7158, která by měla být schopná léčit pozdní fázi spavé nemoci (Kennedy, 2013).

1.2 Mitochondrie

Mitochondrie jsou nápadné orgány v cytoplasmě, které jsou v určité podobě přítomné ve všech eukaryontních buňkách. Mají rozmanitou strukturu, ale všechny jsou 1 až několik μm dlouhé a jsou uzavřené 2 oddělenými membránami. Všechny jsou generátory chemické energie pro buňku. Získávají energii z oxidace cukrů a produkují základní palivo adenosin-5-trifosfát (ATP), které je potřebné pro většinu buněčných aktivit. Mitochondrie při své činnosti spotřebovávají kyslík a uvolňují oxid uhličitý, celý proces je proto nazýván buněčným dýcháním. Bez mitochondrií by živočichové, rostliny ani eukaryontní mikroorganismy nebyly schopny využívat kyslík k maximálnímu zisku energie (Alberts et al., 2005).

Mitochondriální respirační řetězec sestává z 5 různých proteinových komplexů, které jsou zodpovědné za elektronový transport, tvorbu protonového gradientu a syntézu ATP. Tyto komplexy jsou také známé jako mitochondriální komplexy I – V a jsou umístěné ve vnitřní mitochondriální membráně. Vnitřní membrána tvoří řadu záhybů, zvané kristy, které zasahují do prostoru matrix a zvětšují povrch vnitřní membrány mitochondrie. Tím je tak zajištěn velký povrch, na kterém může probíhat syntéza ATP. Každý proteinový komplex

kromě komplexu V obsahuje podjednotky s navázanými ionty kovů (napr. Fe-S klustery), či hemoproteiny a tyto podjednotky právě tvoří dráhu pro průchod elektronů komplexem. Dýchací komplexy jsou místy čerpání protonů a každý z nich může být vnímán jako proteinový stroj, který při přenosu elektronů čerpá protony napříč membránou. Proteiny dýchacího řetězce vedou elektrony tak, že se pohybují v přesném pořadí od jednoho enzymového komplexu k dalšímu. Redoxní energie substrátů NADH a sukcinátu je nejdříve přeměněna do elektrochemického protonového potenciálu přes vnitřní mitochondriální membránu pomocí respiračních komplexů I (NADH:ubichinonreduktáza), II (SDH, sukcinát:ubichinonreduktáza), III (bc₁, ubichinon:cytochrom c reduktáza) a IV (cytochrom c oxidáza). Elektrochemický protonový potenciál je poté využit komplexem V, zvaném také F₀F₁-ATP syntáza, k syntéze ATP z ADP a organického fosfátu oxidativní fosforylací (Alberts et al., 2005).

Trypanozómy mají unikátní mitochondrie (Besteiro et al., 2005). Jejich unikátnost spočívá v tom, že obsahují pouze 1 mitochondrii na buňku. Obsahují kinetoplast, který se vyskytuje v těsné blízkosti bazálního tělíska bičíku. Tento útvar je vlastně část mitochondrie, kde se nachází obrovské množství DNA v podobě konkatenovaných malých (mini) a velkých (maxi) kroužků. Maxikroužky sestávají z typické mitochondriální DNA kódující některé podjednotky respiračních komplexů, ale mnohem zajímavější jsou minikroužky, které obsahují geny pro guide RNA (gRNA). Tyto malé gRNA jsou důležité pro editování mitochondriální RNA, při kterém dochází k rozsáhlým změnám primární sekvence RNA transkriptu (Lukeš et al., 2010).

Během svého životního cyklu čelí trypanozóma dvěma naprosto odlišným prostředím, což je doprovázeno velkými změnami v mitochondriálním metabolismu parazitické buňky. Zatímco savčí krevní forma žije v krevním řečišti, což je prostředí bohaté na glukózu, tak procyklická hmyzí forma se nachází ve střevech mouchy tse-tse, což je naopak prostředí na glukózu chudé a hlavním zdrojem energie jsou aminokyseliny (Lukeš et al., 2010).

1.2.1 Mitochondrie krevní formy *T. brucei*

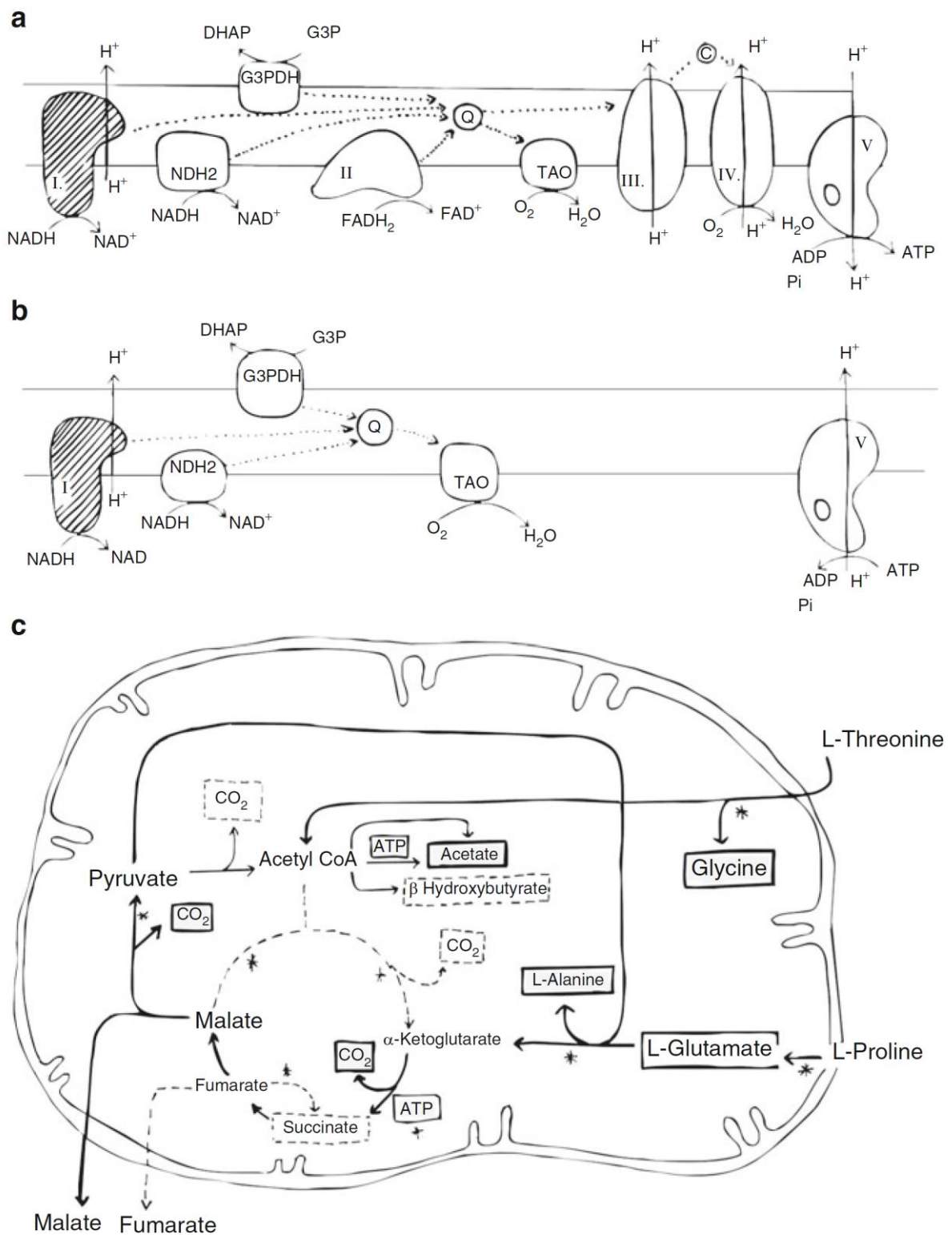
Mitochondrie krevní formy má pouze minoritní roli v energetickém metabolismu. Krebsův cyklus úplně chybí, tak jako většina komplexů respiračního řetězce (obr. 1.2b) (Chaudhuri et al., 1981). Jelikož se parazit po přenosu do krve nachází v prostředí s nadbytkem cukru glukózy, přestane vyrábět ATP pomocí oxidativní fosforylace a přepne na jednodušší, ale méně efektivní produkci ATP glykolýzou (Lukeš et al., 2010).

Možná se zdá, že mitochondrie krevní formy nemá žádnou funkci, ale opak je pravdou. Mitochondrie si zachovává svou esenciální formu, jelikož je stále důležitá pro zachování homeostázy vápenatých iontu, či pro syntézu železito-sirných klusterů. I přes absenci dýchacího řetězce, stále v mitochondrii dochází k re-oxidaci NADH a finálním akceptorem daných elektronů je kyslík. Pro udržení glykozomální a glykolytické redoxní rovnováhy přes glycerol-3-fosfát (Gly-3-P) a dihydroxyaceton fosfát (Clarkson et al., 1989), mitochondrie trypanozómy obsahuje unikátní enzym, tzv. alternativní oxidázu (TAO), jenž je kódována v jádře. Tato oxidáza je klíčem k udržení této rovnováhy (Chaudhury et al., 1998). Nicméně je nutno podotknout, že tato dráha nepřispívá k vytváření membránového potenciálu, jenž je esenciální pro každou mitochondrii a potažmo buňku. Zajímavostí tudíž je, že mitochondriální transmembránový protonový gradient je vytvářen pomocí hydrolytické aktivity respiračního komplexu V, F_0F_1 ATPázy (Nolan & Voorheis, 1992).

1.2.2 Mitochondrie hmyzí formy *T. brucei*

Mitochondrie procyklické formy *T. brucei* je plně vyvinutá, dokonce je fyziologicky a metabolicky podobná jiným eukaryotickým mitochondriím (Lukeš et al., 2010). Mitochondrie je bohatá na krysty, probíhá zde Krebsův cyklus a dýchací řetězec je plně funkční (obr. 1.2a) (Besteiro et al., 2005). Zajímavým faktem je, že trypanozoma se nespolehá pouze na výrobu ATP pomocí oxidativní fosforylace, ale také vyrábí ATP pomocí fosforylace substrátové (Coustou et al., 2003).

Jelikož se v této části životního cyklu parazit vyskytuje ve střevech mouchy tse-tse, jsou primárním zdrojem energie aminokyseliny, které se v tomto prostředí nacházejí. Hojně se zde vyskytují aminokyseliny prolin a treonin (Bringaud et al., 2006). Jelikož je transport elektronů na ubichinonu rozvětven, může být uskutečňován 2 způsoby. Buď přes alternativní dráhu pomocí alternativní oxidázy TAO (Njogu et al., 1980), anebo klasickou dráhou dýchacího řetězce přes komplexy I, II, III a IV. Klasická dráha respiračního řetězce tak vytváří nepostradatelný membránový potenciál, a tudíž je rotující F_0F_1 ATP syntáza použita k výrobě ATP (Besterio et al., 2005).



Obrázek 1.2: Respirační řetězec a uhlíkový cyklus mitochondrie *T. Brucei* (Lukeš et al., 2010).
 a) Respirační řetězec hmyzí formy *T. brucei*, který obsahuje všechny respirační komplexy (I – V). Elektrony z I a II komplexu jdou přes alternativní NADH dehydrogenázu II a glycerol-3-fosfát na ubiquinon, odkud putuje 25% elektronů na alternativní dehydrogenázu (TAO) a zbytek přes komplex III a cytochrom c na komplex IV. Díky proton-motivní síle dochází na komplexu V k syntéze ATP.
 b) Respirační řetězec krevní formy *T. Brucei* postrádá komplexy III, IV a cytochrom c.
 c) Krebsův cyklus hmyzí formy *T. Brucei*.

F₀F₁-ATP syntáza/ATPáza krevní formy *T. brucei* má esenciální funkci, její aktivita se liší od F₀F₁-ATP syntázy v lidské buňce, jenž funguje ve směru syntézy ATP. Z tohoto důvodu by specifická inhibice hydrolytické aktivity mohla vést ke smrti parazita, zatímco lidského komplexu by se inhibice nedotkla a dále by vyráběla ATP. Hydrolytickou aktivitu ATP syntázy je možné inhibovat pomocí inhibičního peptidu (Pullman & Monroy, 1963).

1.3 ATP syntáza

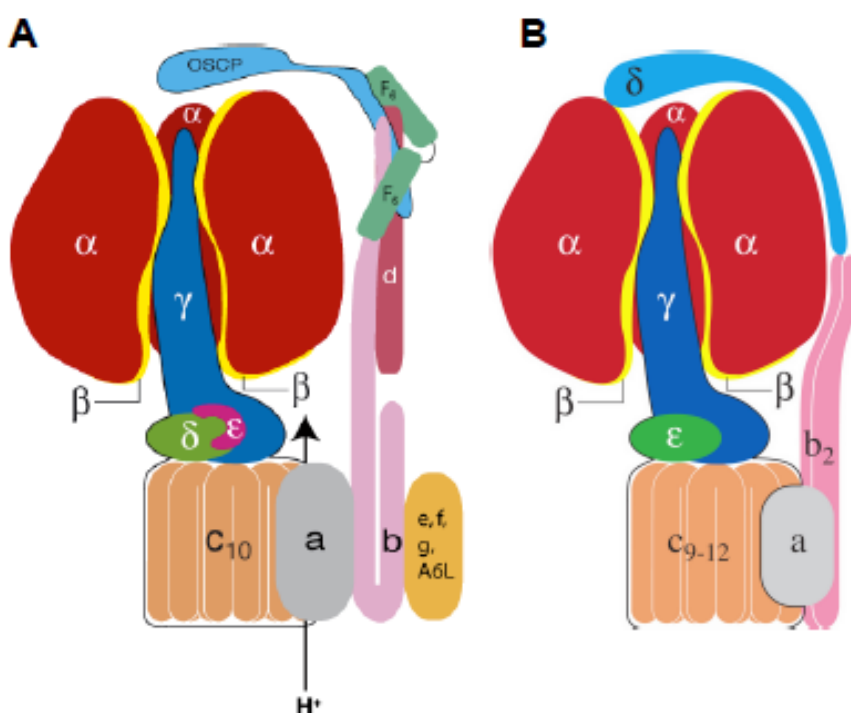
F₀F₁-ATP syntáza je evolučně velmi starý a konzervativní komplex. Nachází se v mitochondriích eukaryotických buněk, plasmatické membráně bakterií a také v chloroplastech rostlin a řas (Alberts et al., 2005).

Syntéza ATP pomocí rotujícího enzymatického komplexu byla vysvětlena tzv. chemiosmotickou teorií, za kterou byla v roce 1978 udělena Nobelova cena Peterovi Dennisovi Mitchellovi. Tato teorie vysvětluje spřažení oxidace redukováných kofaktorů se syntézou ATP z ADP a Pi v mitochondriích. Energie, která je získána oxidací kofaktorů v dýchacím řetězci, je nejprve využita k aktivnímu transportu vodíkových iontů přes vnitřní membránu mitochondrie do mezimembránového prostoru. Matrix mitochondrie je tak chudší o ionty H⁺ a získává tak vůči cytosolu záporný potenciál. Vzniká tak proton-motivní síla, která přenáší ionty H⁺ zpět do matrix. Zpětný transport H⁺ je umožněn právě ATP syntázou, která uvolněnou energii používá k syntéze ATP (Mitchell, 1961; Mitchell, 1972).

Prokaryotická ATP syntáza (obr. 1.3) je umístěna na plazmatické membráně bakterií. Sestává z 8 podjednotek stochiometricky zapsaných jako $\alpha_3\beta_3\gamma\delta ab_2c_{10}$. Geny těchto podjednotek jsou kódovány jedním operonem (Walker et al. 1984a). F₁ část se skládá z kruhu tří podjednotek α a tří podjednotek β . Periferní stopka sestává z podjednotek b a δ . Jeden její konec je zakotven do membrány, zatímco ten druhý se váže na N-terminální oblast F₁ části. Centrální stopka se skládá z podjednotek γ a ϵ . Spojuje F₁ a F₀ části a je esenciální pro funkci enzymu, jelikož díky její rotaci dochází k syntéze ATP. F₀ část je takzvaný protonový kanál, který je tvořen 10 podjednotkami c, které vytvářejí prstenec interakcí c kroužků s podjednotkou a a slouží k přenosu H⁺ iontů (Gay & Walker, 1981).

Eukaryotická ATP syntáza (obr. 1.3) se nachází na vnitřní mitochondriální membráně a účastní se výroby ATP pomocí oxidativní fosforylace (Boyer et al., 1997). F₁-ATPáza je silně konzervativní, avšak mitochondriální F₀-ATPáza získala během vývoje další podjednotky oproti bakteriální ATP syntáze (Devenish et al., 2008). Nejlépe prozkoumaným

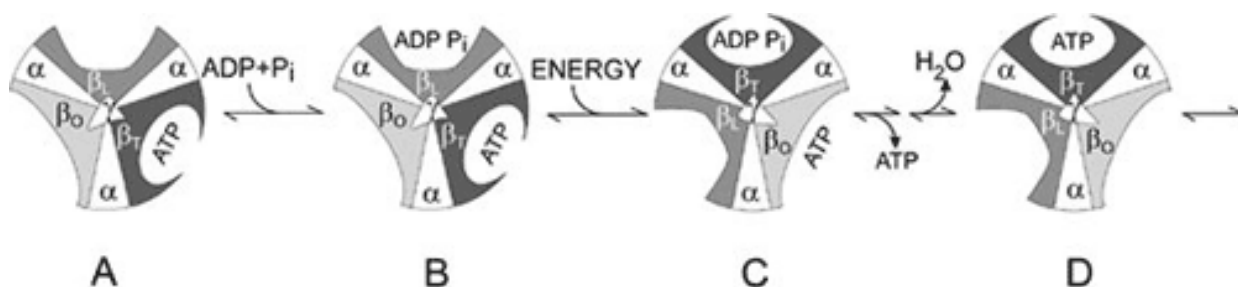
mitochondriálním enzymem je bovinní ATP syntáza, která obsahuje 16 různých podjednotek (Collinson et al., 1994). Většina těchto podjednotek je zakódována v jádře (Devenish et al., 2008). F₁ část se skládá z 5 podjednotek – $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$. F_o část obsahuje podjednotky a, b, c, d, e, f, g, OSCP, F₆ a A6L. Centrální stopka je složena z podjednotek $\gamma\delta\varepsilon$ a periferní stopka z podjednotek b, d, OSCP, F₆. Jeden konec periferní stopky je zakotven do membrány, zatímco ten druhý se váže na N-terminální oblast F₁ části. Centrální stopka spojuje F₁ a F_o části a je esenciální pro funkci enzymu, jelikož díky její rotaci dochází k syntéze ATP. Podjednotky a a c jsou zapojené do translokace protonů a přesné role zbývajících podjednotek nejsou zatím úplně jasné (Walker & Collinson, 1994).



Obr. 1.3: Mitochondriální a eubakteriální ATP syntáza (Bason, 2008). A mitochondriální ATP syntáza. B eubakteriální ATP syntáza. Podjednotky β jsou odstraněny, aby byl vidět komplex centrálního stonku.

F_oF₁ ATPáza využívá proton-motivní sílu k syntéze ATP z ADP a Pi. Syntéza ATP je dosažena otáčením c-kroužku a centrální stopky, ke kterému dochází v důsledku translokace protonů na rozhraní c-kroužku a podjednotky a. Rotace centrálního stonku je vyvažována periferní stopkou, která zde plní funkci jako stator (Rubinstein et al 2003; Dickson et al. 2006). Podjednotka alpha obsahuje 3 nekatalytická místa, na kterých nedochází k syntéze ATP, zatímco podjednotka beta obsahuje katalytická místa (Boyer, 1997) a zaujímá tak 3 samostatné konformace v závislosti na rotaci podjednotky gamma, která je asymetrická a tak se její interakce liší s každým uspořádáním podjednotek. Každá ze tří podjednotek beta má

odlišné obsazení nukleotidů. Například hovězí ATP syntáza podle krystalografické studie váže ADP na podjednotku β_{DP} (těsná konformace), druhá podjednotka β_{TP} váže ATP (volná konformace) a třetí podjednotka β_E je v takové konformaci, že neváže žádný nukleotid a zůstává tak prázdná (prázdná konformace). Během ATP syntézy (obr. 1.4) dochází k rotaci vždy o 120° (Abrahams et al., 1994).



Obr. 1.4: Mechanismus syntézy ATP podle Paula D. Boyera. (Převzato z http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1997/press.html). Asymetrická gamma podjednotka, která způsobuje změny ve struktuře beta podjednotky, se nachází uprostřed komplexu F_1 ATPázy. Světle šedá beta podjednotka zaujímá otevřenou konformaci (β_o nebo β_E), šedá beta podjednotka volnou konformaci (β_L nebo β_{TP}) a tmavě šedá podjednotka beta uzavřenou konformaci (β_T nebo β_{DP}). Mechanismus syntézy ATP začíná v okamžiku navázání ADP a P_i na podjednotku β_{DP} , v dalším kroku je z této podjednotky díky rotaci asymetrické podjednotky gamma vytvořena podjednotka β_{TP} a dojde k syntéze ATP. V dalším kroku se z této podjednotky stává podjednotka beta s volnou konformací a navázaná molekula ATP je tak uvolněna.

ATP syntáza představuje vratně spřažené zařízení – dokáže buď využívat toku protonů po jejich gradientu elektrochemického potenciálu k tvorbě ATP, nebo může využívat energii z hydrolyzy ATP k čerpání protonů přes membránu. Bude-li ATP syntéza ATP vyrábět či využívat, záleží na velikosti gradientu elektrochemického potenciálu protonů přes membránu, ve kterém se ATP syntáza nachází. Např. pokud je buňka z nějakého důvodu vystavena nízké až nulové koncentraci kyslíku, mitochondriální elektrochemický gradient selže a F_0F_1 ATP syntáza přepne ze syntézy ATP na hydrolyzu ATP, aby obnovila membránový potenciál. Například u anaerobních bakterií ATP syntáza spotřebovává ATP vytvořené glykolýzou, aby čerpala protony z buňky a tak zajistila daný protonový gradient, který buňka potřebuje k importu základních živin aktivním transportem (Alberts et al., 2005).

Aktivita ATP syntázy je regulovaná několika způsoby – in vivo pomocí ADP, membránovým elektrochemickým potenciálem ($\Delta\mu\text{H}^+$) a přírodním proteinovým inhibitorerem IF1. Snížení elektrochemického potenciálu může přimět ATP syntázu k hydrolýze ATP a tím pádem dochází k čerpání protonů ven z organely. Hydrolýza ATP je inhibována inhibičním proteinem (Cabezon et al., 2000).

1.4 Inhibiční peptid

Základní charakteristikou inhibičního proteinu je schopnost zastavení hydrolýzy ATP, nikoliv však syntézy ATP u mitochondriální F_0F_1 ATP syntázy (Cabezon et al., 2000).

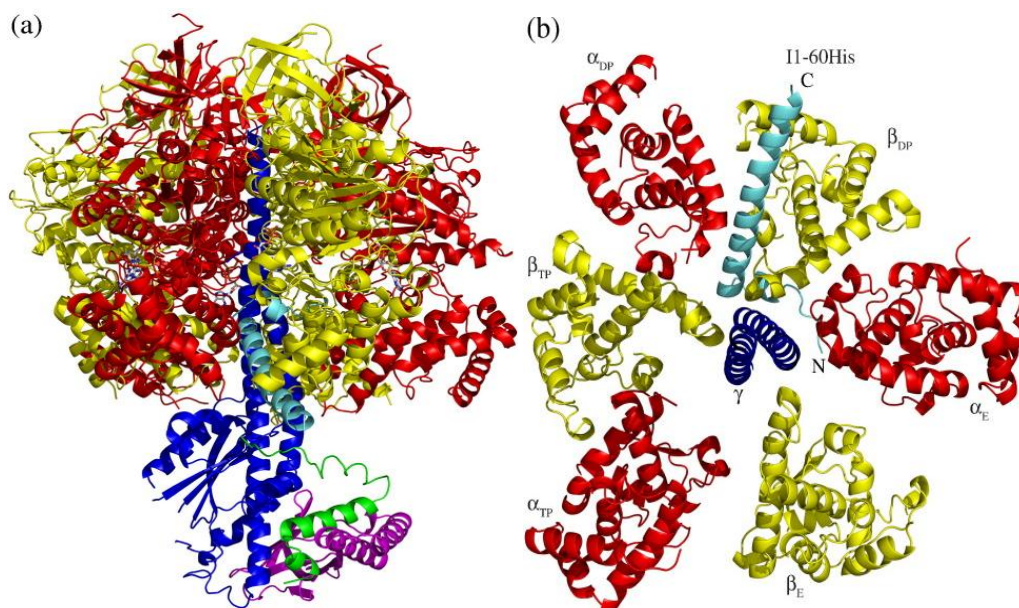
Inhibiční peptid IF1 se nachází v mitochondriích zvířat (Pullmann & Monroy, 1963), ale je také přítomen u kvasinek (Satre et al., 1975) a rostlin (Norling et al., 1990), avšak nevyskytuje se u bakterií (Bason, 2008). Je konzervativní napříč eukaryotickou říší a vykazuje vysokou homologii v rámci příbuzných skupin organismů (Campanella et al., 2009); např. sekvence aminokyselin 20 – 50 jsou z 90% identické mezi turem a člověkem a z 80% mezi turem a hlodavci (Bason, 2008).

Jedná se o malý protein (83 aminokyselin (AK) u *Bos taurus* a 63 AK u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*), jehož struktura je alpha-helikální (Cabezon et al., 2001). Řadou experimentů bylo ukázáno, že inhibiční peptid obsahuje minimální inhibiční sekvenci, která se nachází mezi AK 14 – 47 (Raaij et al., 1996) nebo mezi AK 22 – 46 (Stout et al., 1993) u *Bos taurus*, či mezi AK 17 – 41 u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Stout et al., 1993). Nejlépe prostudovaným inhibičním peptidem je protein pocházející z mitochondrie *B. taurus* (Pullman & Monroy 1963).

Pomocí krystalografických studií bylo ukázáno, že bovinní inhibiční faktor (bIF1) se váže na katalytické rozhraní mezi C-terminální oblastí podjednotek α_{DP} a β_{DP} a zároveň je v kontaktu s podjednotkami γ , β_{TP} a α_{E} (obr. 1.5). Takto navázaný bovinní IF1 zablokuje rotační mechanismus během hydrolýzy ATP, avšak ne během syntézy ATP (Bason et al., 2011).

Nedávné studie odhalily, že IF1 má velmi důležitou roli v energetickém metabolismu žijících buněk. Například u člověka je IF1 nadměrně exprimován v různých rakovinotvorných buňkách. Zde funguje jako molekulární přepínač z oxidativní fosforylace na glykolýzu. IF1 také udržuje koncentraci ATP během energetické krize. V tomto okamžiku

jsou buňky zbavené kyslíku a glukózy a pokud v nich není přítomen IF1, tak ztrácejí buněčné ATP a umírají rychleji než buňky obsahující IF1 (Fujikawa et al., 2012).



Obr. 1.5: Struktura bovinní F₁-ATPázy inhibované bovinním inhibičním peptidem IF1 (Bason et al., 2011). Podjednotky α (červená), β (žlutá), γ (tmavě modrá), δ (fialová), ϵ (zelená) a inhibitor (světle modrá). a) Boční pohled na F₁-ATPázu na vazebná místa na rozhraní mezi podjednotkami α_{DP} a β_{DP} , kde je navázán IF1. b) Pohled shora na C-terminální část podjednotek α a β ukazující interakci inhibičního peptidu s podjednotkou F₁-ATP syntázy.

1.5 TbIF1

V naší laboratoři Funkční biologie protist byl u *T. brucei* objeven homolog bovinního IF1 a kvasinkového IF1 a to TbIF1 (obr. 1.6). Pomocí specifické protilátky byl TbIF1 detekován pouze v buněčném lyzátu z procyklických buněk. Nicméně když byl TbIF1 over-exprimován v buňkách krevního stádia, došlo k úmrtí buněk a to díky snížení mitochondriálního membránového potenciálu. Jelikož exprese TbIF1 neměla vliv na syntézu ATP v hmyzím stadiu, tyto in vivo experimenty dokázaly, že TbIF1 inhibuje specificky hydrolytickou aktivitu F_oF₁ ATP syntázy/ATPázy a tudíž by tato inhibice byla selektivně letální pouze pro buňky parazita a ne pro buňky savčího hostitele. Z tohoto důvodu je velmi důležité studovat interakci TbIF1 a F_oF₁ ATPázy a také porozumět mechanismu vazby a inhibice tohoto malého peptidu vůči komplexu V. Předběžné výsledky ukázaly, že TbIF1 není až tak silným inhibitorem F₁-ATPázy (při srovnání s jeho bovinním homologem). Proto

bylo mým úkolem připravit sérii mutantních TbIF1 proteinů a poté testovat jejich schopnost vazby k F₁-ATPáze za účelem charakterizace minimální inhibiční sekvence TbIF1 a zvýšení jeho schopnosti vázat se a inhibovat F₁-ATPázu.

```

TbIF1      Mitochondriální cílový signál      Minimální inhibiční sekvence
MLPLRVLPFIAAGGYASQLRFYSEGKPTGHRKINLDD-DERWIEAEFDEKLRSP EERYA 59
bIF1      MAATALAARTRQAVWSVWAMQGRGFGSESGDNVRSSAGAVRDAGGAFGKREQAEEERYF 59
          :.  .*  :  .  *  :  ..*  :*  :..  .  *  .  *::  ::  ****

TbIF1      Dimerizační doména
LERQRETMKGLIKKIRNEHKQHMHESVRERDAQIDNLKEQIQTMEKKLQQLTNEKQ 115
bIF1      RARAKEQLAALKKHHENEISHHAKIEIER-LQKEIERHKQSIK----KLKQSEDD- 109
          *  :*  :  .*  *  :  .**  .:*  :*  *  :  :*.  *:.  *  :  :.

TbIF1      Mitochondriální cílový signál      Minimální inhibiční sekvence
MLPLRVLPFIAAGGYASQLRFYSEGKPTGHRKINLDDDERWIEAEFDEKLRSP EERYAL 60
yIF1      MLPRSALARSLQLQRGVAARFYSEG--STGTPRGSGSEDS-----FVKRERATEDFFVR 52
          ***  .*  .  *****  :  *  :  .  :*.  *  :  :  *:.  *:.

TbIF1      ERQRETMKGLIKKIRNEHKQHMHESVRERDAQIDNLKEQIQTMEKKLQQLTNEKQ 115
yIF1      QREKEQLR-----HLKEQLEKQKIDSLNKIDSMTK----- 85
          :*::*  ::  *:*..:::  :*.:.:::  *

```

Obr. 1.6: Srovnání proteinových sekvencí bovinního IF1, kvasinkového IF1 a TbIF1 pomocí programu ClustalW (2.1).

2 Cíle práce

1. Připravit expresní plasmidy obsahující mutantní formy genu *TbIF1*.
2. Vypurifikovat rekombinantní TbIF1 proteiny z bakteriálních buněk.
3. Srovnat inhibiční vlastnosti mutantních forem TbIF1 s původním TbIF1.

3 Materiál a metody

3.1 Gen TbIF1 a návržení primerů pro jeho amplifikaci

Pro zmnožení mutantních forem TbIF1 genu metodou PCR byly navrženy primery, které jsou uvedeny v tabulce 3.1 a 3.2. Na 5'konce bylo přidáno restrikční místo pro restrikční enzym NdeI a na 3'konce restrikční místa pro restrikční enzymy HindIII a NheI. Nukleotidová sekvence kódující 6 histidinů byla součástí reverzního primeru na C-terminálním konci.

Tab. 3.1: Navržené primery pro dlouhé verze mutantů TbIF1.

Jméno primeru	Sekvence
TbIF1 Δmin5-93 FW (NdeI)	TAGCATATGCATATGCAATTACGCTTCTAC
TbIF1 Δ5-93 FW (NdeI)	TAGCATATGCATATGACTGAAGGACACAG
TbIF1 Δ10-93 FW (NdeI)	TAGCATATGCATATGAAGATCAACCTGGAC
TbIF1 Δ15-93 FW (NdeI)	TAGCATATGCATATGGATGATGAGAGGTGG
TbIF 1-93_6His Rev (HindIII a NheI)	CGAAAGCTTGCTAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGTTGCTTCTCGT TCGTAACTGC

Tab. 3.2: Navržené primery pro krátké verze mutantů TbIF1.

Jméno primeru	Sekvence
TbIF1 Δmin5-93 FW (NdeI)	TAGCATATGCATATGCAATTACGCTTCTAC
TbIF1 Δ5-93 FW (NdeI)	TAGCATATGCATATGACTGAAGGACACAG
TbIF1 Δ10-93 FW (NdeI)	TAGCATATGCATATGAAGATCAACCTGGAC
TbIF1 Δ15-93 FW (NdeI)	TAGCATATGCATATGGATGATGAGAGGTGG
TbIF 1-64_6His Rev (HindIII a NheI)	CGAAAGCTTGCTAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGTACAGATTCCG TGCATGTGCTG

Červeně jsou označeny start kodony (ATG) pro metionin a stop kodony (TTA), zeleně sekvence 6 histidinů a modře restrikční místa.

3.2 PCR

Polymerázová řetězová reakce slouží k amplifikaci úseku DNA. Tato amplifikace funguje na principu replikace nukleových kyselin.

Reakce probíhala v 50 μ l. Složení PCR směsi je uvedeno v tabulkách 3.3 a 3.4. Pro zmnožení dlouhých forem TbIF1 byl použit plasmid pTv5 Tb4590, který obsahuje celý gen pro TbIF1 včetně mitochondriální signální sekvence. Tento plasmid byl poskytnut školitelkou. Pro namnožení krátkých verzí mutantů TbIF1 byl použit již mnou vytvořený plasmid pRUN TbIF1 Δ min5-93.

Tab. 3.3: Složení reakce PCR dlouhé verze mutantů TbIF1.

Templátová DNA - pTv5 Tb4590 (50 ng)	1 μ l
FW Primer (10 μ M)	1 μ l
Rev Primer (10 μ M)	1 μ l
dNTP's (každý nukleotid 10 mM)	1 μ l
5x Expand Rxn pufr	10 μ l
Expand Hi-Fi plus enzym	0,5 μ l
MilliQ H ₂ O	35,5 μ l

Tab. 3.4: Složení reakce PCR krátké verze mutantů TbIF1.

Templátová DNA – pRun TbIF1 Δ min5-93 (50 ng)	2 μ l
FW Primer (10 μ M)	1 μ l
Rev Primer (10 μ M)	1 μ l
dNTP's (každý nukleotid 10 mM)	1 μ l
5x Expand Rxn pufr	10 μ l
Expand Hi-Fi plus enzym	0,5 μ l
MilliQ H ₂ O	33,5 μ l

Program:

- | | | | |
|-------------------------|------|-----------|----------------|
| 1. Iniciační denaturace | 96°C | 3 minuty | } 30x opakovat |
| 2. Denaturace | 96°C | 30 vteřin | |
| 3. Nasedání primerů | 56°C | 30 vteřin | |
| 4. Polymerace | 72°C | 30 vteřin | |
| 5. Polymerace | 72°C | 7 minut | |

3.3 DNA elektroforéza a izolace DNA z gelu

Velikost amplifikovaných produktů byla ověřena elektroforézou v 1% agarózovém gelu. Gel byl připraven smícháním 0,6 g agarózy a 60 ml pufru TAE (2 M Tribase, 5,7% kyselina octová, 5 mM EDTA pH 8), zahřán v mikrovlné troubě a po vychlazení bylo přidáno 2,5 μ l ethidium bromidu (5 mg/ml). Produkty byly smíchány s nanášecí barvičkou 5xDNA Dye a nanесeny do jamek v gelu a po rozdělení byly z gelu vyizolovány podle protokolu kitu QIAquick Gel Extraction (QIAGEN).

3.4 Restrikce

Restrikční analýza slouží k rozštěpení úseků DNA v místech se zcela určitými sekvencemi nukleotidů pomocí restrikčních enzymů. Fragментy lze rozdělit podle jejich délky gelovou elektroforézou.

3.4.1. Restrikční reakce PCR produktů TbIF1 mutantů

Restrikční reakce amplifikovaných mutantních verzí TbIF1 izolovaných z gelu probíhala v 50 μ l 3 hodiny v termobloku při 37°C. Složení reakce je uvedeno v tabulce 3.5.

Tab. 3.5: Restrikční reakce.

10x pufr R	5 μ l
HindIII	1 μ l
NdeI	0,5 μ l
MilliQ H ₂ O	15,5 μ l
Amplifikované produkty PCR izolované z gelu	28 μ l

Malé množství (0,5 μ l) restrikčního enzymu NdeI bylo přidáváno do reakce každých 30 minut, jelikož jeho účinnost klesá po delší inkubaci ve 37°C.

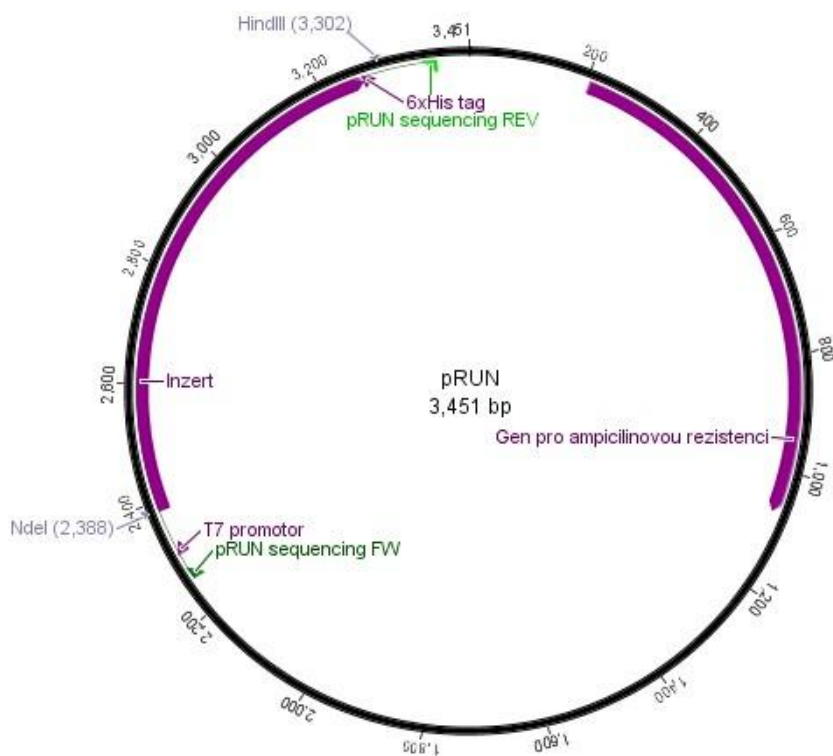
Restrikční reakce byla následně přečistěna pomocí protokolu kitu Gen EluteTM PCR Clean-up Kit (Sigma). Koncentrace a čistota mutantních forem TbIF1 byly zjištěny na přístroji Nanodrop 1000 Spectrophotometer Thermo Scientific (tab. 3.6).

Tab. 3.6: Přehled koncentrací a čistoty mutantních forem TbIF1.

Inzert	Koncentrace (ng/μl)	Čistota A_{260}/A_{280}
TbIF1 Δmin5-93	7,1	1,96
TbIF1 Δ5-93	7,5	1,85
TbIF1 Δ10-93	11,7	1,78
TbIF1 Δ15-93	13,2	1,93
TbIF1 Δmin5-64	8,5	1,79
TbIF1 Δ5-64	14,1	1,85
TbIF1 Δ10-64	13,6	1,99
TbIF1 Δ15-64	8,8	1,89

3.4.2 Restrikce vektoru pRUN

Vektor pRun (obr. 3.1) byl stříhán restrikčními enzymy HindIII a NdeI. Reakce probíhala v 50 μl 3 hodiny v termobloku při 37°C. Složení reakce je uvedeno v tabulce 3.7.



Obr. 3.1: Mapa vektoru pRun.

Tab. 3.7: Restrikční reakce vektoru pRun.

10x pufr R	5 μl
HindIII	1 μl
NdeI	0,5 μl
DNA (pRun IF1 I-93/2 GST I/II)	10 μl
MilliQ H ₂ O	33,5 μl

pRun byl poté izolován z 1% agarózového gelu podle protokolu kitu QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Opět byla změřena koncentrace a čistota na přístroji Nanodrop 1000 Spectrophotometer Thermo Scientific (tab. 3.8).

Tab. 3.8: Přehled koncentrací a čistoty pRun.

Inzert	Koncentrace (ng/μl)	Čistota A_{260}/A_{280}
pRUN pro dlouhé verze	13,3	1,68
pRUN pro krátké verze	8,3	1,92

3.7 Ligace

Ligace slouží ke spojení dvou lineárních molekul DNA na základě kompatibility 5' a 3' konce pomocí enzymu DNA ligázy a vytvoření kruhové molekuly (plasmidu).

Inzerty mutantních forem TbIF1 byly zaligovány do expresního vektoru pRun. Reakce probíhala v 10 μl ve 4°C po dobu 16 hodin. Složení ligačních směsí je uvedeno v tabulce 3.9 a 3.10.

Tab. 3.9: Ligační směs dlouhých verzí mutantů TbIF1.

	TbIF1Δmin5-93	TbIF1 Δ5-93	TbIF1 Δ10-93	TbIF1 Δ15-93	pRun
Inzert [ng/μl]	7,1	7,5	11,7	13,2	13,3
Inzert [μl]	2,5 μl	2,5 μl	1,5 μl	1,5 μl	-
pRun [13,3 ng/μl]	3,3 μl	3,3 μl	3,3 μl	3,3 μl	3,3 μl
T4DNA ligáza	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
T4 DNA 10x pufr	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
MilliQ H ₂ O	2,2 μl	2,2 μl	3,2 μl	3,2 μl	4,7 μl

Tab. 3.10: Ligační směs krátkých verzí mutantů TbIF1.

	TbIF1Δmin5-64	TbIF1 Δ5-64	TbIF1 Δ10-64	TbIF1 Δ15-64	pRun
Inzert [ng/μl]	8,5	14,1	13,6	8,8	8,3
Inzert [μl]	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	-
pRun [8,3 ng/μl]	3,5 μl	3,5 μl	3,5 μl	3,5 μl	3,5 μl
T4DNA ligáza	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
T4 DNA 10x pufr	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
MilliQ H ₂ O	3,5 μl	3,5 μl	3,5 μl	3,5 μl	4,5 μl

3.8 Transformace do XL1-blue E.Coli

Kompetentní buňky XL1-blue byly ponechány 20 minut na ledě, aby šetrně roztály. Poté bylo smícháno 100 μ l buněk a 5 μ l ligační směsi. Po 10-ti minutách na ledu následoval tepelný šok ve vodní lázni na 45 vteřin při 42°C a směs byla okamžitě dána na led na 2 minuty. Poté bylo přidáno 200 μ l SOC média (2% trypton, 0,5% kvasnicový extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukóza) a buňky se nechaly inkubovat na třepačce 45 minut ve 37°C. 300 μ l buněk bylo rozetřeno na ampicilinovou misku (100 μ g/ml) a ta byla inkubována 14 hodin v inkubátoru při 37°C.

3.9 Izolace plasmidové DNA

Jedna narostlá kolonie z každé misky byla vypíchnuta sterilním párátkem a vložena do 3 ml LB média (1 % trypton, 1 % NaCl, 0,5 % kvasný extrakt) s ampicilínem (100 μ g/ml) a ponechána na třepačce ve 37°C 14 hodin. Plasmidová DNA byla vyizolována podle protokolu kitu GenEluteTM HP Plasmid miniprep Kit (Sigma).

3.10 Restrikce plasmidové DNA

Restrikce byla provedena, aby bylo ověřeno, zda se inzerty vložily do vektoru pRun. Složení restrikční reakce je uvedeno v tabulce 3.11. Reakce probíhala v 15 μ l.

Tab. 3.11: Restrikční analýza krátkých i dlouhých verzí mutantů TbIF1.

10x pufr R	1,5 μ l
HindIII	0,2 μ l
NdeI	0,5 μ l
MilliQ H ₂ O	5,8 μ l
Plasmidová DNA	7 μ l

Restrikce probíhala v termobloku 2,5 hodiny ve 37°C. Správnost inzerťů byla ověřena na 1% agarózovém gelu.

3.11 Sekvenování

Sekvenování umožňuje zjistit pořadí nukleotidů v molekulách DNA, vyloučí se tím nesprávné konstrukty či mutace.

Plasmidy mutantních forem pRun_TbIF1 byly osekvenovány. V sekvenační směsi bylo přítomno 150 ng plasmidové DNA a primer pRun sequencing FW. Sekvence probíhala na našem servisním pracovišti.

3.12 Příprava expresních buněk *E.coli* C41

Expresní buňky C41 byly nabrány sterilním párátkem ze zamražené suspenze zásobních buněk, párátko bylo vhozeno do 3 ml LB média bez ampicilínu a buňky byly ponechány na třepačce ve 37°C přes noc. Druhý den bylo odebráno 500 µl buněk, které byly vloženy do 25 ml LB média a byly ponechány ve třepačce ve 37°C, dokud jejich optická hustota při 600 nm nebyla 0,4 – 0,6. Po dosažení hodnoty 0,4 byly buňky stočeny 10 minut/8000 rpm. Supernatant byl vylit a pelet byl resuspendován ve 20 ml sterilního ledového CaCl₂ (0,1 M CaCl₂). Směs byla inkubována 30 minut na ledu, stočena 10 minut/8000 rpm a pelet byl resuspendován ve 4 ml sterilního ledového CaCl₂. Buňky byly poté uskladěny v ledničce po dobu 14 dní a použity pro transformace připravených plasmidů pRUN s inzerty TbIF1.

3.13 Transformace do expresních buněk C41

100 µl expresních buněk C41 a 1 µl plasmidu bylo ponecháno 30 minut na ledu. Po inkubaci na ledu byl proveden tepelný šok ve vodní lázni ve 42°C na 45 vteřin, směs byla okamžitě dána na 2 minuty na led. Bylo přidáno 150 µl SOC média a směs byla inkubována na třepačce 30 minut při 37°C. Poté bylo rozetřeno 250 µl reakce na ampicilinové misky, které byly inkubovány 14 hodin ve 37°C v inkubátoru.

3.14 Overexprese rekombinantního proteinu – pilotní pokus

Při expresi proteinu lze pomocí různých expresních systémů vytvořit protein odvozený od konkrétního genu. V našem případě šlo o systém, který je založen na indukci exprese T7 RNA polymerázy z lac operonu přidáním indukčního činidla IPTG a následným nasednutím T7 RNA polymerázy na T7 promotor, jenž předchází sekvenci studovaného genu.

Sterilními párátky byla vybrána jedna narostlá kolonie od každého klonu, párátko byla vhozena do zkumavky se 3ml LB média s ampicilinem. Zkumavky byly nechány na třepačce ve 37°C 1 hodinu. Do 2 nových zkumavek pro každý klon se 3ml LB média s ampicilinem bylo napipetováno 1000 µl z narostlé kultury. Kultury byly inkubovány ve třepačce při

37°C, dokud jejich optická hustota při 600 nm nedosáhla hodnoty 0,4 – 0,6. Kultury byly rozdělené na indukované a neindukované. Do indukovaných byly přidány 4 µl 1 M isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) a obě kultury byly třepány ve 37°C 2 hodiny. Od každé kultury byl stočen 1 ml ve 4°C 5 minut/5000 rpm. Pelet byl resuspendován ve 100 µl 1xPBS (5,6 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 3,6 mM NaH₂PO₄·2H₂O, 0,145 M NaCl) a bylo přidáno 50 µl 3xSDS nanášecí barvičky (150 mM Tris pH 6,8, 6% SDS, 0,3% bromfenolová modř, 30% glycerol, 300 mM dithiothreitol). Vzorčky byly denaturovány v tepelném bloku v 97°C 7 minut.

3.15 SDS Polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS PAGE)

SDS Polyakrylamidová gelová elektroforéza slouží k separaci proteinů dle jejich velikosti. K proteinovým vzorkům je přidán dodecylsírán sodný (SDS), který proteiny denaturuje a učiní je záporně nabitými při teplotě nad 60°C a proteiny tak poté v gelu putují ke kladné anodě. Podle velikosti se každý protein pohybuje skrz gel s rozdílnou rychlostí. Menší proteiny pronikají póry v gelu snadněji než větší. Právě proto menší proteiny postoupí v gelu dále, zatímco větší se nacházejí blíže počátku. Nízkomolekulární proteiny se rozdělují na vysoko procentních gelech, v mém případě na 15%.

Aby byla ověřena exprese proteinů, byl připraven 15% SDS PAGE gel. Po sestavení elektroforetické aparatury, byl nalit mezi sklíčka 15% rozdělovací gel (1 gel – 1,4 ml H₂O, 30 ml 30% akrylamidmix, 1,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 60 µl 10% SDS, 60 µl 10% APS, 6 µl TEMED), po zatuhnutí na něj byl nalit 5% zaostřovací gel (1 gel – 1,7 ml H₂O, 420 µl 30% akrylamidmix, 315 µl 1 M Tris pH 6,8, 25 µl 10% SDS, 25 µl 10% APS, 5 µl TEMED). Po zatuhnutí gelu byly do jamek nanесeny jednotlivé vzorky a marker. Elektroforéza probíhala v 1x SDS elektroforetickém pufru (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS) po dobu 2 hodin. Ze začátku byl gel ponechán při 90V a po 30 minutách byla voltáž zvýšena na 120V. Všechny vzorky i marker postupovaly gelem současně.

Barvení SDS PAGE gelu probíhalo v roztoku Coomassie blue (50% metanol, 10% kyselina octová) 30 minut. Po obarvení byl gel odbarven odbarvovacím roztokem (7% metanol, 5% kyselina octová).

3.16 Western blot

Pomocí Western blot analýzy je možné detekovat určitý protein ve směsi proteinů pomocí primární protilátky (specifická proti studovanému proteinu) a sekundární protilátky (rozeznává navázanou primární protilátku). Western blot probíhá na membráně, na kterou byly přeneseny proteiny z SDS polyakrylamidového gelu pomocí elektrického pole. Blotovací sendvič sestává z anody – houbičky – papíru – membrány – gelu – papíru – houbičky – katody. Houbičky a papíry musí být namočený do blotovacího pufru, jinak by se gel a membrána spálily kvůli průchodu elektrického proudu. Záporně nabitý proteiny se účinkem elektrického pole přenesou z gelu na membránu, přitahuje je kladně nabitá anoda umístěná pod membránou. Membrána s přenesenými proteiny je inkubována v 5% mléku/PBS-T, jenž blokuje nespecifické navázání protilátky na membránu. Poté se přidá primární protilátka (protilátka proti studovanému proteinu, která s ním specificky reaguje) a membrána je v ní inkubována. Po promytí je membrána inkubována se sekundární protilátkou (protilátka proti primární protilátce), která je nejčastěji konjugována s reportérovým enzymem křenovou peroxidázou (HRP). Po promytí následuje detekce proteinů. Spočívá v tom, že křenová peroxidáza reaguje spolu s chemiluminiscenčním substrátem za vzniku luminiscenčního produktu, jehož luminiscence je detekována speciální kamerou.

Jelikož určité mutantní verze TbIF1 nebyly viditelné na coomassie barveném SDS PAGE gelu, pro ověření exprese proteinů byl proveden western blot. Během SDS PAGE elektroforézy s 15% gelem byla připravena přenosová polyvinylfluoridová (PVDF) membrána (BioTRaceTM PVDF – GeneTiCA), která byla na 30 vteřin ponořena do metanolu. Papírky, houbičky a gel byly namočený v 1x transferovém pufru (25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% metanol). Byl sestaven přenosový sendvič, který byl vložen do přenosové aparatury a proteiny byly přeneseny na membránu pomocí elektrického pole 90 minut při 90V.

Membrána byla uchována přes noc v 5% roztoku mléka v 1xPBS-T (1xPBS s 0,05% Tween). Druhý den byla membrána inkubována hodinu s komerční myší protilátce α -His v ředění 1:2000 při pokojové teplotě. Poté byla membrána 3x 10 minut promyta v 1xPBS-T a dále byla inkubována s komerční sekundární protilátkou (kozí antimyší v ředění 1:2000) 1 hodinu při pokojové teplotě. Membrána byla znovu promyta 3x 10 minut v 1xPBS-T.

Proteiny byly vizualizovány chemiluminiscenční metodou, při které byl jako substrát použit roztok peroxidu, který byl smíchán se substrátovým roztokem luminolu (Pierce®

ECL Western blotting Substrate, Thermo Scientific) v poměru 1:1 a napipetován na membránu po dobu 1 minuty. Signál byl detekován přístrojem Fuji Film Dark Intelliigent Box Las-3000 Lite Image reader.

3.17 Overexpresse rekombinantního proteinu

Do 20 ml LB média s ampicilinem byly sterilním párátkem přeneseny narostlé kolonie z ampicilínových misek. Buňky byly ponechány růst na třepačce při 37°C přes noc. Druhý den bylo 20 ml narostlé buněčné kultury přeneseno do 500 ml LB média s ampicilinem a kultura byla ponechána na třepačce, dokud její optická hustota při 600 nm nedosáhla hodnoty 0,4 – 0,6. Po dosažení hodnoty 0,4 bylo do buněčné kultury přidáno 500 µl 1 M IPTG a kultura se nechala inkubovat 2 hodiny na třepačce ve 37°C.

3.18 Purifikace rekombinantního proteinu

3.18.1 Sklizení buněčné kultury

Narostlá kultura byla stočena v kónických kyvetách ve 12°C 10 minut/4500 rpm. Bakteriální pelet byl resuspendován ve 20 ml PBS-G (1xPBS, 6 mM glukóza) a znovu stočen ve 12°C 15 minut/3800 rpm. Pelet byl poté resuspendován v 10 ml pufru A (25 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 25 mM Imidazol pH 8, 10% glycerol), do kterého byla přidána 1 tableta proteázového inhibitoru (Roche), lysozym (750 µg), který naruší bakteriální stěnu a DNázaI (100U). Směs se nechala 30 minut ve 4°C rotovat.

3.18.2 Sonikace lyzovaných bakterií

Při sonikaci jsou buňky rozbity na menší fragmenty pomocí ultrazvuku na přístroji zvaném sonikátor.

Vzorky byly sonikovány velkou jehlou (2 cm) 5 x 20 vteřin s 50% amplitudou s 1 minutou na ledu. Poté byl přidán lysozym (500 µg) a směs byla znovu rotována 15 minut ve 4°C. Vzorky lyzátu byly rozděleny po 1 ml do ependorfeč a byly stočeny ve 4°C 30 minut/15000 g. Supernatant byl přenesen do nové falkonky, objem byl doplněn pufrum A do 20 ml a lyzát byl přefiltrován filtrem (0,45 µm).

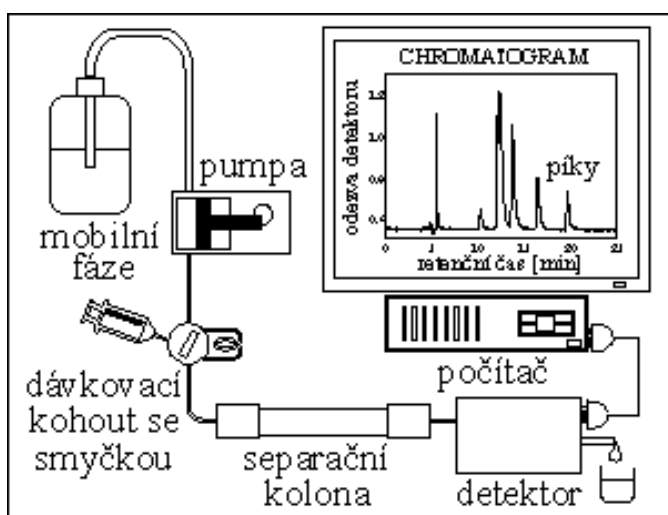
3.18.3 Vysoko-účinná kapalinová chromatografie HPLC

Vysoko-účinná kapalinová chromatografie (HPLC) slouží k separaci složek vzorku pro jejich další stanovení – například přítomnosti a koncentraci. Součástí HPLC aparatury je

výkonné vysokotlaké čerpadlo, díky kterému může kolonou menších rozměrů protékat mobilní fáze, a tak reagovat se stacionární fází v koloně, ve které jsou vázané částice o velikosti několik mikrometrů. Chromatografické metody se dále dělí na sorpční, gelové, iontové a afinitní.

Principem afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech (IMAC) jsou specifické interakce mezi 2 látkami. V tomto případě se využívá interakce protein-kovový iont. Cílové proteiny obsahují hexahistidinovou kotvu na C terminálním konci (sekvence 6 po sobě jdoucích histidinů), která reaguje s Ni^{2+} v kolonce Ni-NTA. Kolonka obsahuje nitrilotrioctovou kyselinu (NTA), která tvoří s kovy (Ni^{2+}) chelátové komplexy. Cílový protein je navázan na kolonku a eluován gradientem imidazolu (0-1 M) obsaženém v pufru. Imidazol má oproti histidinu vyšší afinitu k částicím kovu a tak jeho vysoká koncentrace vytěsni histidinovou kotvu navázanou na Ni^{2+} z Ni-NTA kolonky. Daný tagovaný protein je takto uvolněn do eluční fáze a posbírán do frakcí. Průchod proteinu přes kolonku lze sledovat díky UV detektoru, který zaznamenává změny složení mobilní fáze.

Purifikace rekombinantního proteinu byla provedena pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie HPLC, jejíž schéma je zobrazeno na obrázku 3.2 a prováděla se na přístroji ÄKTAprime plus GE Healthcare.



Obr. 3.2: Schéma vysoko-účinné kapalinové chromatografie.

(Převzato: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>)

Přístrojová pumpa byla nejprve promyta přefiltrovanou destilovanou vodou a hadičky A₁ a B byly zbaveny bublinek. Po promytí pumpy byla našroubovaná kolonka (HisTrapTM HP, GE Healthcare, objem 1 ml) nabitá nikelnatými ionty (Ni^{2+}). Kolonka byla promyta 5-ti objemy přefiltrované destilované vody, hadička A₁ byla vložena do pufru A a hadička B do

pufri B (pufri A + 500 mM Imidazol pH 8) a pumpa jimi byla znovu promyta. Po promytí byl nastaven průtok 0,5 ml/min přes kolonku a lyzát byl nanesen na kolonu pomocí hadičky A₁. V momentě, kdy se lyzát dostal na kolonku, byl nastaven sběrač frakcí a tak byla mobilní fáze po průchodu kolonkou odkapávána do připravených zkumavek. Po té, co prošel kolonkou veškerý lyzát za průtoku 1 ml/min, byl protein z kolonky eluován do připravených zkumavek zvyšující se koncentrací imidazolu pomocí lineárního gradientu pufri B. Po eluci cílového proteinu byly hadičky a celá pumpa promyta 20% etanolem.

Celková purifikace proteinu byla sledována v programu Primeview pomocí UV detektoru.

Eluční frakce purifikovaného proteinu byly ověřeny SDS PAGE elektroforézou, smícháním 30 µl frakce a 3xSDS Dye a nanesením na 15% gel.

3.19 Dialýza

Dialýza umožňuje přecistit proteiny od nežádoucích složek, jako jsou například soli obsažené v purifikačních pufrech.

Membrána (membra-Cel diallysis tubig od Serva cat. #44313 s MWCo 7-12 kDa) byla převařena v pufri s 10 mM EDTA pH 8 (10 mM EDTA pH 8, 10 mM Tris pH 7,2), poté byla propláchnuta a uchována v pufri 1 mM EDTA pH 8 (1 mM EDTA pH 8, 10 mM TRis pH 7,2).

Eluční frakce byly posbírány a přeneseny do dialyzační membrány, která byla uzavřena skřipci a byla ponechána na magnetické míchačce při pokojové teplotě 4 hodiny v 20 mM roztoku Trisu o pH 7,4.

3.20 Zakoncentrování proteinu

Přecistěné proteiny byly zakoncentrovány v centrifugační kolonce (Vivaspin6 – membrane 3000 MWCO PES – Satoriusstedin biotech) stočením při 7500 g, dokud objem ve zkumavce neklesl na 2 ml.

3.21 Určení koncentrace proteinů pomocí Bradfordova činidla

Tato metoda slouží ke zjištění koncentrace proteinů v roztoku. Barvivo Coomassie brilliant blue se váže na proteinové molekuly v kyselém pH, po vazbě barviva na proteiny

dochází k barevné změně roztoku, přičemž platí čím tmavější barva, tím koncentrovanější protein. Jako kalibrační protein se používá hovězí sérový albumin (BSA).

Do připravených zkumavek bylo napipetováno 20 μl od každého vzorku kalibrační řady 10% BSA v koncentraci od 62,5 $\mu\text{g/ml}$ – 1000 $\mu\text{g/ml}$ a 20 μl naředěných vzorků. Ke všem vzorkům a kalibrační řadě byl napipetován 1 ml Bradfordova roztoku (Coomassie Bio-rad protein assay 1:5). Po 10 minutách inkubace na stole při pokojové teplotě byly vzorky přeneseny do 96-jamkové destičky a reakce byla analyzována při OD595 na přístroji TECAN. Získané hodnoty absorbance byly přepočítány v Microsoft Office Excelu do koncentrací jednotlivých vzorků (tab. 3.13).

Tab. 3.13: Koncentrace mutantních forem TbIF1.

Inzert	Koncentrace ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
TbIF1 $\Delta_{\text{min}5-93}$	1,34
TbIF1 Δ_{1-93}	1,48
TbIF1 Δ_{5-93}	1,73
TbIF1 Δ_{10-93}	1,59
TbIF1 Δ_{15-93}	0,51
TbIF1 $\Delta_{\text{min}5-64}$	11,34
TbIF1 Δ_{1-64}	3,32
TbIF1 Δ_{5-64}	7,12
TbIF1 Δ_{10-64}	9,16
TbIF1 Δ_{15-64}	2,94

3.23 Inhibiční ATPázová esej

V esejovém pufru je obsažena laktátdehydrogenáza (LDK), pyruvátkináza (PK), fosfoenolpyruvát (PEP), Mg-adenozin trifosfát (MgATP) a nikotin adenin dinukleotid hydrid (NADH). Po přidání F_1 -ATPázy je spuštěna kaskáda reakcí vedoucích k oxidované formě NADH. K tomu aby se ATP navázalo na F_1 -ATPázu, musí být v reakční směsi přítomno magnesium, to je zde ve formě MgATP a vazba také závisí na hodnotě pH roztoku. F_1 -ATPáza hydrolyzuje přítomné MgATP za vzniku ADP a organického fosfátu (Pi). ADP a PEP jsou využity pyruvát kinázou ke vzniku pyruvátu a ATP. Pyruvát je dále za pomoci LDK a NADH redukován na laktát za vzniku NAD^+ . Redukované NADH má absorpční maximum při 340 nm a tudíž se měří úbytek redukovaného NADH při OD 340 nm.

Nepřetržité monitorování hydrolýzy ATP působením F_1 -ATPázy spojené s oxidací NADH bylo provedeno spektrofotometricky. Hydrolýza ATP byla spuštěna přidáním F_1 -ATPázy a byla monitorována klesající absorbance NADH při 340 nm. Pro studium inhibičních vlastností TbIF1 proteinu byla do reakce přidána různá množství rekombinantního proteinu a poté spektrofotometrický záznam odpovídal následující rovnici monoexponenciálního poklesu aktivity ATPázy:

$$y(t) = V(I)t + [(V(0) - V(I)/k_{app}) [1 - \exp(-k_{app}t)] + y_0$$

kde $y(t)$ je absorbance v čase t , y_0 absorbance v čase definovaná jako čas přidání TbIF1. $V(0)$ je rychlostní konstanta absorbance před přidáním TbIF1 v absorpčních jednotkách za sekundu (v poměru k počáteční činnosti ATPázy), $V(I)$ je konečná rychlost absorbance po přidání TbIF1 (úměrná konečné ATPázové činnosti), a k_{app} je zřejmá inhibiční konstanta v s^{-1} . Získaná k_{app} hodnota byla vynesena jako funkce koncentrace inhibitoru $[I]$ aby stanovila rychlostní konstanty k_{on} (v $M^{-1}s^{-1}$) a k_{off} (v s^{-1}) podle:

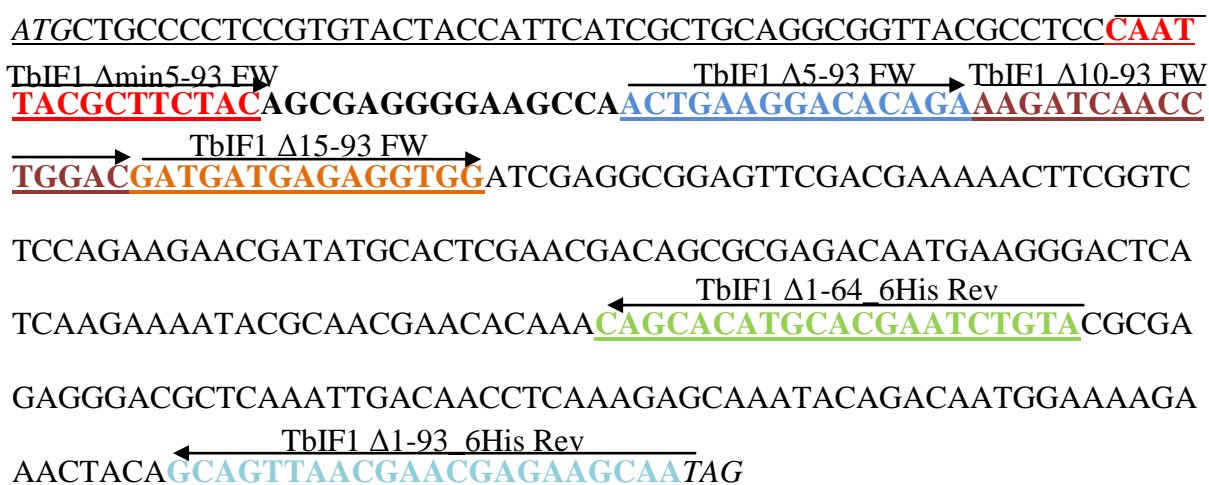
$$k_{app} = k_{on}[I] + k_{off}$$

Pro charakterizace inhibičních schopností TbIF1 proteinů byly připraveny dva ATPázové esejové pufrů; jeden o pH 6,5 (50 mM KCl, 50 mM MOPS, 2 mM $MgSO_4$) a druhý o pH 8 (50 mM KCl, 50 mM Tris pH 8, 2 mM $MgSO_4$). Pro samotnou reakci bylo do těchto pufrů přidáno 100 mM NADH, 100 mM PEP, 200 mM MgATP, 0,0005% LDH 0,0009% PK). Pro každou reakci byl do kyvetky napipetován 1 ml esejového pufru se 7,5 μ l F_1 -ATPázy, která mi byla poskytnuta spolupracovnicí v laboratoři. Směs byla promíchána a vložena do spektrofotometru. Po automatickém vynulování byl přidán vzorek proteinu mutantní formy TbIF1. Absorbance byla zaznamenávána po dobu 10 minut s každou koncentrací všech 8 mutantních forem proteinu TbIF1.

4. Výsledky

4.1 Příprava mutantních forem TbIF1

Pro přípravu mutantních forem TbIF1 genu byla provedena PCR reakce s navrženými primery. Celý čtecí rámec genu TbIF1 (obr. 4.1) je dlouhý 381 nukleotidů. Prvních 51 nukleotidů představuje predikovanou signální sekvenci. Po této sekvenci byly navrženy primery tak, aby výsledný PCR produkt pro jednotlivé mutantní formy byl vždy kratší o 15 nukleotidů.



Obr. 4.1: Celý čtecí rámec genu TbIF1 s vyznačenými nasedacími sekvencemi pro prime

ry. Mitochondriální signální sekvence je podtržena, červeně je označena nasedací sekvence pro primer TbIF1Δ_{min5-93} FW, modře pro TbIF1Δ₅₋₉₃ FW, hnědě pro TbIF1Δ₁₀₋₉₃ FW, oranžově pro TbIF1Δ₁₅₋₉₃ FW, světle zeleně pro TbIF1Δ_{1-64_6His} Rev a světle modře pro TbIF1Δ_{1-93_6His} Rev.

Výsledné proteinové sekvence pro jednotlivé mutantní formy TbIF1 proteinu se od sebe liší N-terminálním koncem, který je vždy o 5 aminokyselin kratší. Na C-terminální konec je přidána sekvence šesti histidinů, které slouží pro afinitní purifikace rekombinantních proteinů.

TbIF1Δ_{min5-93}:

QLRFYSEGK**PTEGHR**KIN**LDDDER**WIEAEFDEKLRSPEERYALERQRET**MKGLIKKI**
RNEHKQHMHESVRERDAQIDNLKEQIQ**TMEKKLQQLTNEKQH**HHHHH

TbIF1Δ₁₋₉₃ (původní TbIF1 protein, jehož počátek byl definován na základě homologie s kvasinkovým IF1 proteinem):

SEGKPT**EGHR**KINL**DDDER**WIEAEFDEKLRSPERRYALERQRETMKGLIKKIRNEHK
QHMHESVRERDAQIDNLKEQIQTMEKKLQQLTNEKQHSHHHHH

TbIF1 Δ 5-93:

TEGHRKINL**DDDER**WIEAEFDEKLRSPERRYALERQRETMKGLIKKIRNEHKQHMH
ESVRERDAQIDNLKEQIQTMEKKLQQLTNEKQHSHHHHH

TbIF1 Δ 10-93:

KINLDDDERWIEAEFDEKLRSPERRYALERQRETMKGLIKKIRNEHKQHMHESVRER
DAQIDNLKEQIQTMEKKLQQLTNEKQHSHHHHH

TbIF1 Δ 15-93:

DDERWIEAEFDEKLRSPERRYALERQRETMKGLIKKIRNEHKQHMHESVRERDAQI
DNLKEQIQTMEKKLQQLTNEKQHSHHHHH

Pro krátkou verzi TbIF1 proteinu, která neobsahuje potenciální dimerizační sekvenci na základě homologie s bovinním IF1 byl vytvořen peptid, který končí aminokyselinou 64 a po ní následuje opět sekvence šesti histidinů. N-terminální konec je vytvořen stejně jako v případě dlouhého TbIF1 proteinu.

TbIF1 Δ min5-64:

QLRFYSEGKPT**EGHR**KINL**DDDER**WIEAEFDEKLRSPERRYALERQRETMKGLIKKI
RNEHKQHMHESVHHHHHH

TbIF1 Δ 1-64 (původní TbIF1 protein, jehož počátek byl definován na základě homologie s kvasinkovým IF1 proteinem a dimerizační doména byla definována na základě homologie s bovinním IF1 proteinem):

SEGKPT**EGHR**KINL**DDDER**WIEAEFDEKLRSPERRYALERQRETMKGLIKKIRNEHK
QHMHESVHHHHHH

TbIF1 Δ 5-64:

TEGHRKINL**DDDER**WIEAEFDEKLRSPERRYALERQRETMKGLIKKIRNEHKQHMH
ESVHHHHHH

TbIF1 Δ 10-64:

KINLDDDERWIEAEFDEKLRSPERRYALERQRETMKGLIKKIRNEHKQHMHESVHH
HHHH

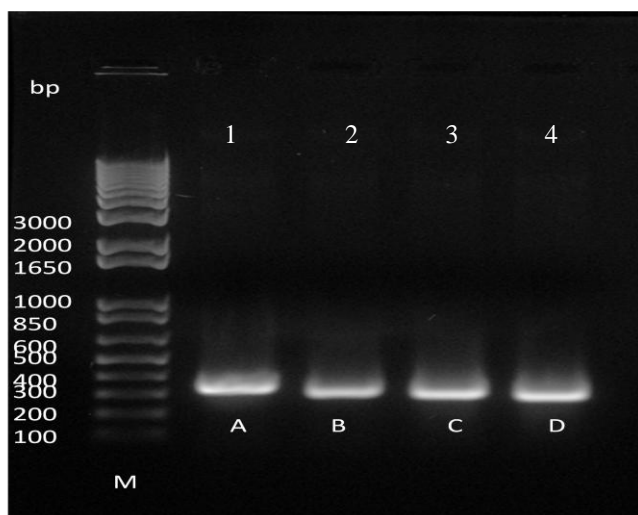
TbIF1 Δ 15-64:

DDERWIEAEFDEKLRSPERRYALERQRETMKGLIKKIRNEHKQHMHESVHHHHHH

Metodou PCR byly zmnožené požadované úseky DNA mutantních forem TbIF1 genu. Správná délka úseků byla ověřena na 1% agarózovém gelu (obr. 4.2 a obr. 4.3). Očekávané velikosti fragmentů jsou uvedeny v tabulce 4.1. Fragmenty byly vyizolovány pomocí kitu QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) a přečištěny pomocí kitu Gen EluteTM PCR Clean-up Kit (Sigma). Za účelem zaklonování všech fragmentů do pRun vektoru, byly přečištěné PCR produkty naštípány restrikními enzymy HindIII and NdeI. Vektor pRun byl taktéž rozstříhán restrikními enzymy NdeI a HindIII. Restrikce byla ověřena na 1% agarózovém gelu (obr. 4.4) a DNA o odpovídající velikosti 2900 pb byla vyizolován z gelu. Mutantní formy TbIF1 byly zaligovány do vektoru pRun a ligační směs byla transformována do buněk *E.coli* XL1-blue. Z narostlých kolonií byla pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep Kit QIAGEN vyizolována plasmidová DNA a byla provedena restrikní analýza s enzymy HindIII a NdeI k ověření, zda klonování proběhlo správně (data neukázána). Všech 8 vzorků mutantních forem TbIF1 bylo posláno na sekvenaci, aby byly vyloučeny případné mutace ve čtecím rámci.

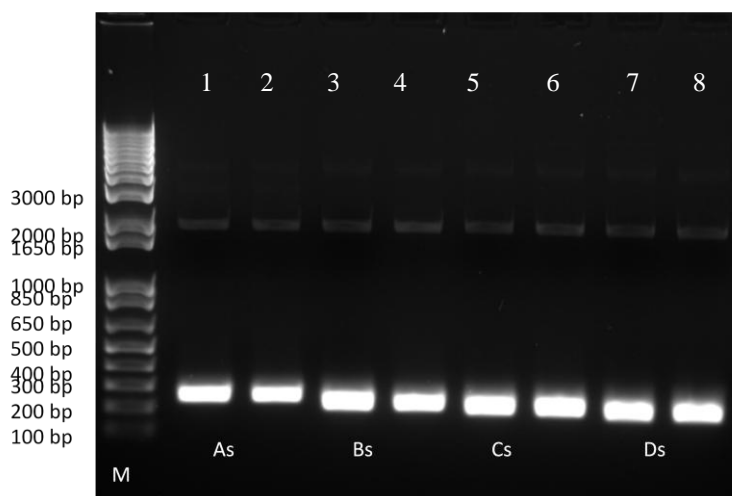
Tab. 4.1: Shrnutí velikostí dlouhých a krátkých mutantních forem TbIF1.

Název	FW primer	Rev primer	Velikost (pb)
TbIF1 Δ min5-93	TbIF1 FW Δ min5-93	TbIF 1-93_6His	330
TbIF1 Δ 5-93	TbIF1 FW Δ 5-93	TbIF 1-93_6His	300
TbIF1 Δ 10-93	TbIF1 FW Δ 10-93	TbIF 1-93_6His	285
TbIF1 Δ 15-93	TbIF1 FW Δ 15-93	TbIF 1-93_6His	270
TbIF1 Δ min5-64	TbIF1 FW Δ min5-93	TbIF 1-64_6His	243
TbIF1 Δ 5-64	TbIF1 FW Δ 5-93	TbIF 1-64_6His	213
TbIF1 Δ 10-64	TbIF1 FW Δ 10-93	TbIF 1-64_6His	198
TbIF1 Δ 15-64	TbIF1 FW Δ 15-93	TbIF 1-64_6His	183



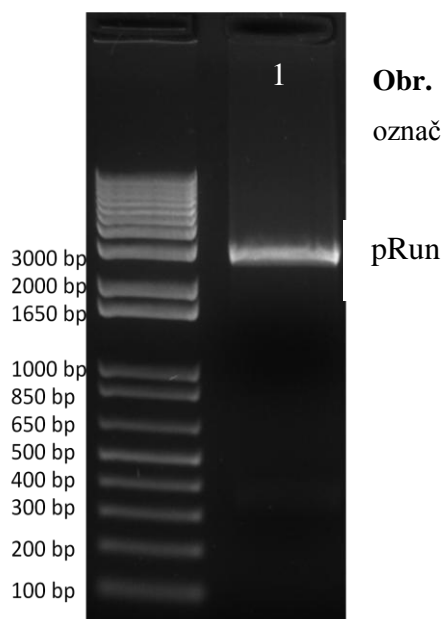
Obr. 4.2: PCR reakce pro dlouhé verze mutantů TbIF1. Písmeno M označuje marker (1 Kb plus DNA ladder), písmeno A označuje TbIF1 Δ min5-93, písmeno B TbIF1 Δ 5-93, písmeno C TbIF1 Δ 10-93 a písmeno D TbIF1 Δ 15-93.

Na obrázku 4.2 lze vidět výsledek PCR pro dlouhé verze mutantních forem TbIF1. Do první jamky 1 byl nanesen vzorek TbIF1 Δ min5-93, který má největší velikost. V jamce 2 je poté viditelný vzorek TbIF1 Δ 5-93, v jamce 3 TbIF1 Δ 10-93 a jamce 4 TbIF1 Δ 15-93, který má nejmenší velikost. Velikost fragmentů podle očekávání postupně klesá od největšího TbIF1 Δ min5-93 k nejmenšímu TbIF1 Δ 15-93.



Obr. 4.3: PCR reakce pro krátké verze mutantů TbIF1. Písmeno M označuje marker (1 Kb plus DNA ladder), písmeno As označuje TbIF1 Δ min5-64, písmeno Bs TbIF1 Δ 5-64, písmeno Cs TbIF1 Δ 10-64 a písmeno Ds TbIF1 Δ 15-64.

Na obrázku 4.3 je také patrné, že velikosti inzertů krátkých mutantních forem postupně klesají. Vzorky byly naneseny do 2 jamek, jelikož objem jednoho vzorku se nevešel do jedné jamky. Největší fragment TbIF1 Δ min5-64 se nachází v jamce 1 a 2, v jamce 3 a 4 je nanesen TbIF1 Δ 5-64, v jamce 5 a 6 je nanesen TbIF1 Δ 10-64 a v jamce 7 a 8 je nanesen TbIF1 Δ 15-64, který má nejmenší velikost. I velikosti těchto fragmentů postupně klesají od největšího TbIF1 Δ min5-64 k nejmenšímu TbIF1 Δ 15-64.



Obr. 4.4: Restrikční analýza vektoru pRun. Písmenem M je označen marker (1Kb plus DNA ladder).

Na obrázku 4.4 je vidět linearizovaný vektor pRun, který je nanesený v jamce 1. Takto linearizovaný vektor byl použit pro ligaci mutantních forem TbIF1. Jeho velikost je 2900 pb.

4.2 Pilotní exprese mutantních forem TbIF1 proteinu

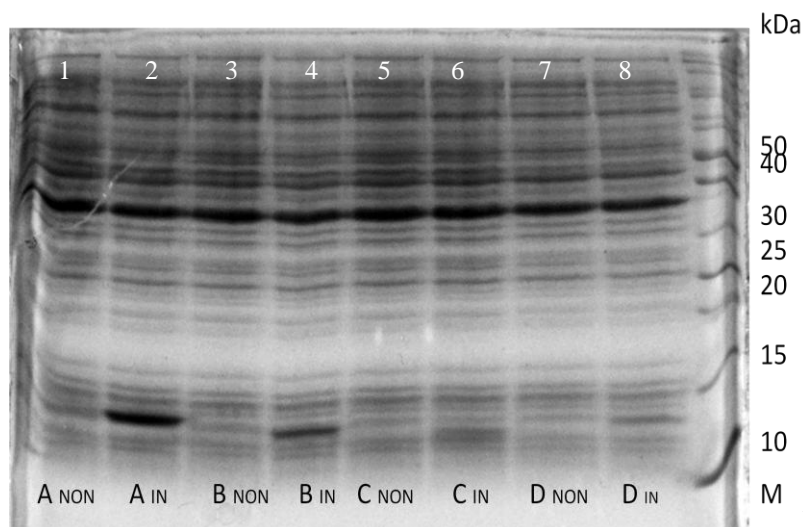
K ověření, zda dochází k expresi rekombinantních proteinů, byla provedena pilotní exprese mutantních proteinů TbIF1.

Ověřené plasmidy obsahující fragmenty TbIF1 genu byly zatransformovány do expresních buněk C41. Narostlé kolonie byly nasazeny do LB média a při optické hustotě 0,4 byly indukovány přidáním IPTG s výslednou koncentrací 1 mM. Bakteriální lyzáty z neindukovaných a indukovaných buněk byly naneseny na 15% SDS PAGE gel. Proteinový gel byl následně obarven Coomassie blue a odbarven odbarvovacím roztokem (obr. 4.5 a obr. 4.6). Očekávané velikosti proteinů jsou uvedené v tabulce 4.2.

Tab. 4.2: Molekulová hmotnost proteinů mutantních forem TbIF1.

Název	Molekulová hmotnost (kDa)
TbIF1 Δ min5-93	12,86
TbIF1 Δ 5-93	11,55
TbIF1 Δ 10-93	11,07
TbIF1 Δ 15-93	10,49
TbIF1 Δ min5-64	9,32
TbIF1 Δ 5-64	8,11
TbIF1 Δ 10-64	7,53
TbIF1 Δ 15-64	6,95

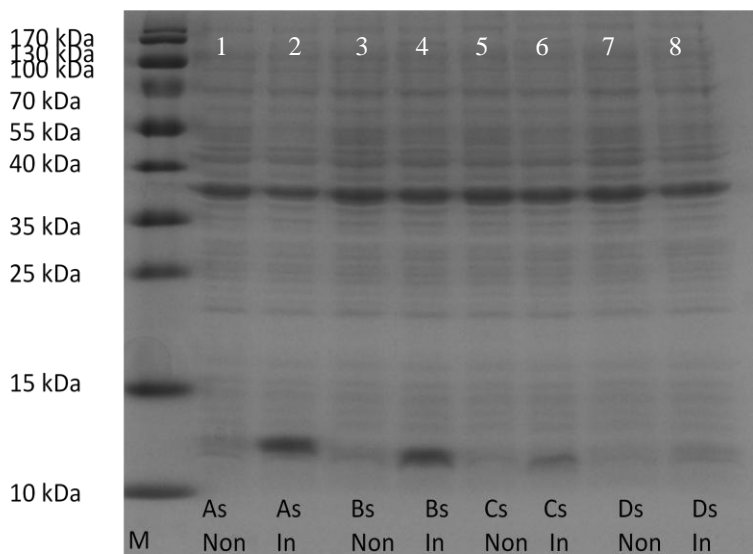
Na obrázku 4.5 je vidět exprese dlouhých mutantních forem TbIF1 proteinu. Do lichých jamek (1, 3, 5 a 7) byly naneseny neindukované bakteriální lyzáty vzorku TbIF1 Δ min5-93, TbIF1 Δ 5-93, TbIF1 Δ 10-93 a TbIF1 Δ 15-93. Do sudých jamek (2, 4, 6 a 8) byly naneseny vzorky z indukovaných buněk stejných vzorků. Z obrázku je zřejmé, že v případě vzorku TbIF1 Δ min5-93 a TbIF1 Δ 5-93 byla exprese úspěšná, overexprimované proteiny jsou zřetelně detekovatelné na barveném gelu a jejich velikost odpovídá očekávané velikosti (tab. 4.2). V případě vzorku TbIF1 Δ 10-93 a TbIF1 Δ 15-93 není exprese viditelná. Tento výsledek může poukazovat na nižší sensitivitu coomassie barvení, či na neúspěšnost exprese.



Obr. 4.5: Pilotní exprese dlouhých verzí TbIF1. Písmeno M označuje marker (unstained protein ladder), A_{IN} označuje indukované formy TbIF1 Δ min5-93, A_{NON} označuje neindukované formy TbIF1 Δ min5-93, B_{IN} označuje indukované formy TbIF1 Δ 5-93, B_{NON} označuje neindukované

formy TbIF1 Δ 5-93, C_{IN} označuje indukované formy TbIF1 Δ 10-93, C_{NON} označuje neindukované formy TbIF1 Δ 10-93, D_{IN} označuje indukované formy TbIF1 Δ 15-93, D_{NON} označuje neindukované formy TbIF1 Δ 15-93.

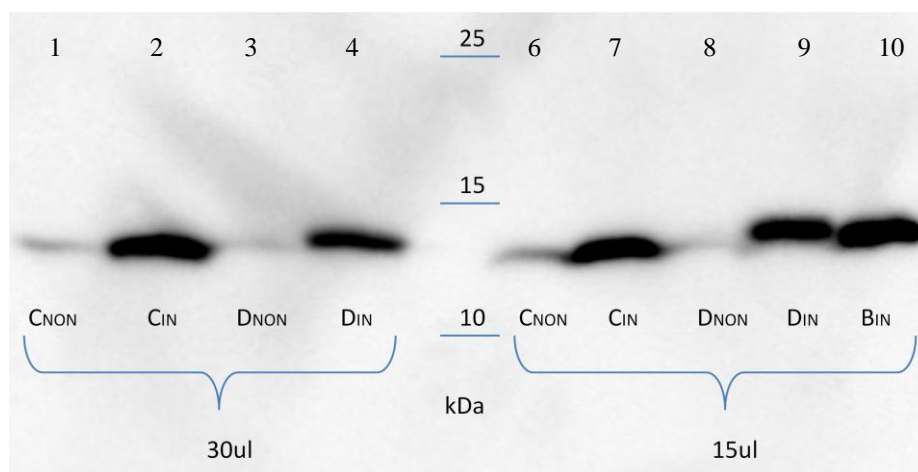
Na obrázku 4.6 je analyzována exprese krátkých mutantních forem TbIF1 proteinu. Stejně jako v předcházejícím případě, do lichých jamek byl nanesen buněčný lyzát z neindukovaných buněk a sudé dráhy obsahují vzorky z buněk indukovaných. Díky coomassie barvení je exprese zřetelně detekována ve vzorcích TbIF1 Δ min5-64, TbIF1 Δ 5-64 a TbIF1 Δ 10-64. Nutno podotknout, že jejich velikost odpovídá uvedeným velikostem v tabulce 4.2. V případě vzorku TbIF1 Δ 15-64 není jasné, zda exprese cílového proteinu byla úspěšná.



Obr. 4.6: Pilotní exprese krátkých verzí TbIF1. Písmeno M označuje marker (unstained protein ladder). As_{IN} označuje indukované formy TbIF1 Δ min5-64, As_{NON} označuje neindukované formy TbIF1 Δ min5-64, písmeno Bs_{IN} označuje indukované formy TbIF1 Δ 5-64, Bs_{NON} označuje neindukované formy TbIF1 Δ 5-64, Cs_{IN} označuje indukované

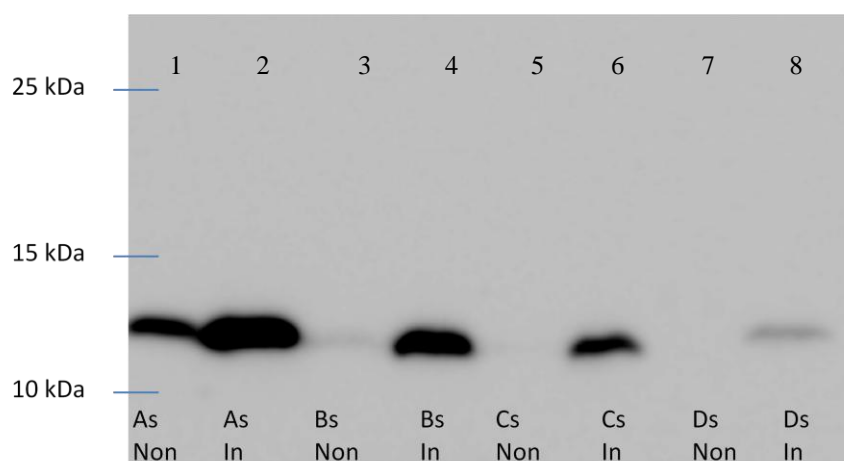
formy TbIF1 Δ 10-64, Cs_{NON} označuje neindukované formy TbIF1 Δ 10-64, Ds_{IN} označuje indukované formy TbIF1 Δ 15-64, Ds_{NON} označuje neindukované formy TbIF1 Δ 15-64.

Vzhledem k tomu, že některé proteiny mutantních forem, konkrétně proteiny TbIF1 Δ 10-93, TbIF1 Δ 15-93, TbIF1 Δ 10-64 a TbIF1 Δ 15-64, nebyly zřetelně viditelné na barveném SDS PAGE gelu, byla použita citlivnější metoda detekce a to imunoblotting. Vzorky z bakteriálních lyzátů byly naneseny na 15% SDS PAGE gel a proteiny byly přeneseny na PVDF membránu. Použitím primární protilátky myší α -His a sekundární anti-myší protilátky značené HRP, byly specificky zvýrazněny cílové proteiny na membráně. Bylo tak ověřeno, že i tyto mutantní formy TbIF1 jsou exprimovány (obr. 4.7 a obr. 4.8). Pozitivní klony mutantních forem TbIF1 byly dále použity na purifikaci proteinů.



Obr. 4.7: Western blot pro dlouhé verze mutantů TbIF1. Na gel byly naneseny různé objemy vzorků a to 15 μ l a 30 μ l. Písmeno M označuje marker (prestained protein ladder), písmeno C_{IN} označuje TbIF1 Δ 10-93, C_{NON} označuje neindukované formy TbIF1 Δ 10-93, D_{IN} označuje indukované formy TbIF1 Δ 15-93, D_{NON} označuje neindukované formy TbIF1 Δ 15-93. Jako kontrola indukce proteinů (B_{IN}) byla použita indukovaná forma TbIF1 Δ 5-93.

Jelikož bylo těžké odhadnout intenzitu chemiluminiscenčního signálu, byly na gel (obr. 4.7) naneseny dvě různá množství bakteriálního lyzáty (15 a 30 μ l). Jamky 1, 3, 5 a 7 obsahují vzorky získané z neindukovaných buněk, zatímco dráhy 2, 4, 6 a 8 obsahují rozdělené indukované lyzáty. Z obrázku je patrné, že exprese cílového proteinu byla úspěšná v každém případě. Nicméně, slabý signál byl také detekován ve vzorcích z neindukovaných buněk. Tomuto jevu se říká exprese v pozadí a dochází k ní aniž by se indukovala exprese proteinu. Do jamky 10 byl nanesen indukovaný lyzáat ze vzorku TbIF1 Δ 5-93, který sloužil jako pozitivní kontrola pro vazbu primární a sekundární protilátky.



Obr. 4.8: Western blot pro krátké mutantní formy TbIF1. Na gel bylo 15 μ l od každého vzorku. Písmeno M označuje marker (prestained protein ladder), A_{SIN} označuje indukované formy TbIF1 Δ min5-64, A_{SNON} označuje neindukované formy TbIF1 Δ min5-64, písmeno B_{SIN} označuje indukované formy TbIF1 Δ 5-64, B_{SNON} označuje neindukované formy TbIF1 Δ 5-64, C_{SIN} označuje indukované formy TbIF1 Δ 10-64, C_{SNON} označuje neindukované formy TbIF1 Δ 10-64, D_{SIN} označuje indukované formy TbIF1 Δ 15-64, D_{SNON} označuje neindukované formy TbIF1 Δ 15-64.

As_{NON} označuje neindukované formy TbIF1 Δ min5-64, písmeno B_{SIN} označuje indukované formy TbIF1 Δ 5-64, B_{SNON} označuje neindukované formy TbIF1 Δ 5-64, C_{SIN} označuje indukované formy TbIF1 Δ 10-64, C_{SNON} označuje neindukované formy TbIF1 Δ 10-64, D_{SIN} označuje indukované formy TbIF1 Δ 15-64, D_{SNON} označuje neindukované formy TbIF1 Δ 15-64.

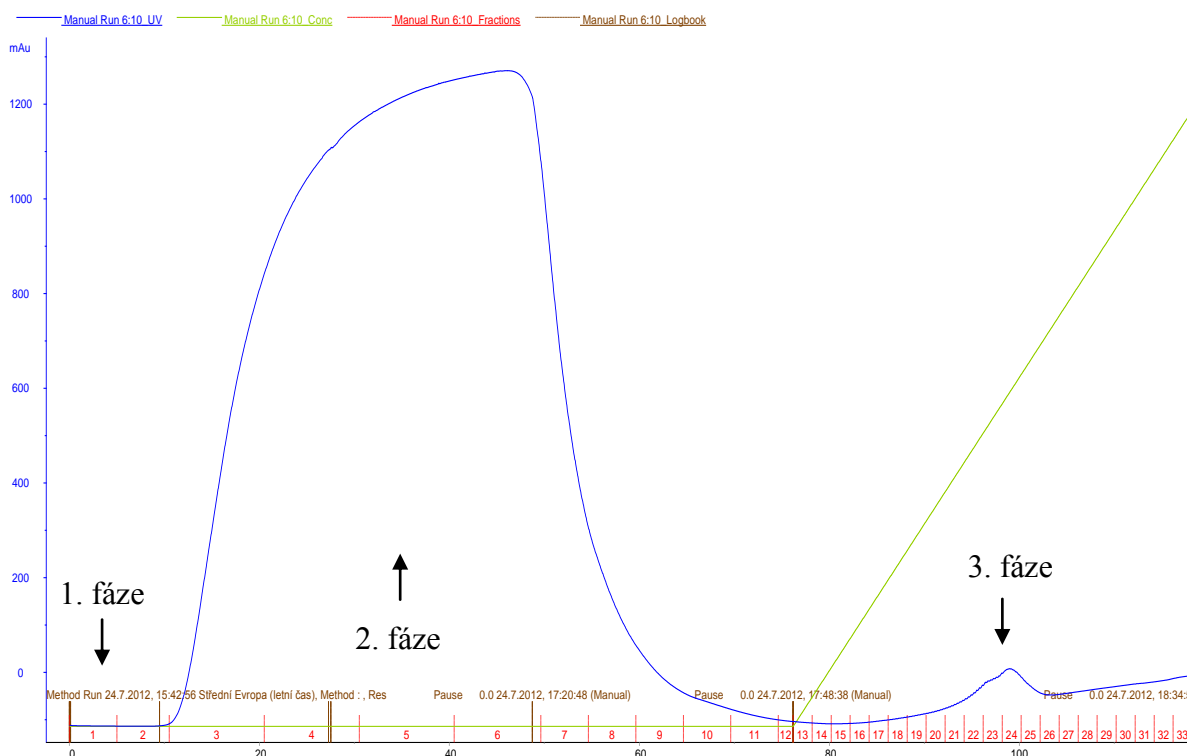
Na obrázku 4.8 z western blotu je patrné, že nejsilnější signál je detekován ve vzorku TbIF1 Δ min5-64, zatímco signál u vzorku TbIF1 Δ 15-64, je nejslabší. Nicméně i v tomto případě byla exprese detekována ve všech případech. U vzorku TbIF1 Δ min5-64 a TbIF1 Δ 5-64, je opět viditelná exprese cílového proteinu i v buňkách neindukovaných, což opět poukazuje na expresi v pozadí bez indukčního činidla IPTG.

Velikosti proteinů TbIF1 Δ 15-93 a TbIF1 Δ 15-64 neodpovídají předpokládaným velikostem, které jsou uvedeny v tabulce 4.2. Tato nezvyklá mobilita krátkých fragmentů je těžko vysvětlitelná a z tohoto důvodu byly vzorky odevzdány k analýze hmotnostní spektrometrií.

4.3 Purifikace rekombinantních proteinů TbIF1

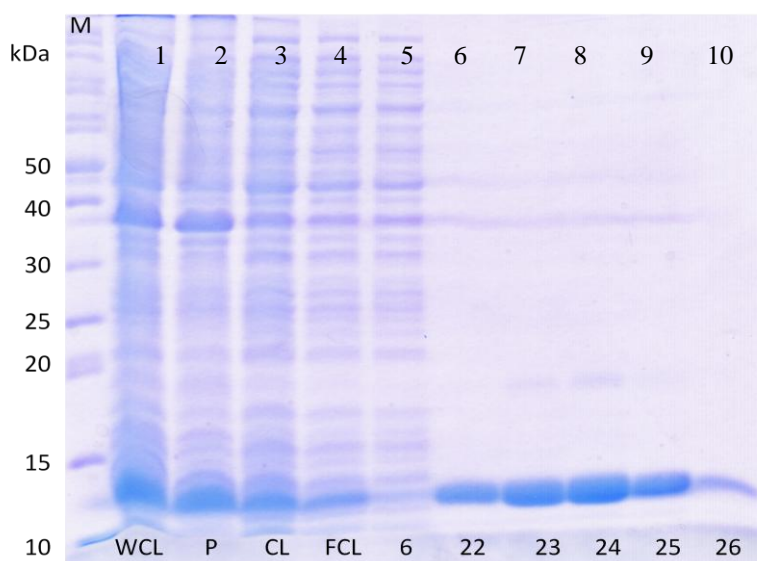
Pro další charakterizaci inhibičních schopností mutantních TbIF1 proteinů bylo nutné tyto proteiny vypurifikovat pomocí afinitní chromatografie.

Po ověření, že dochází k expresi cílových proteinů v expresních buňkách C41, byly pozitivní bakteriální buňky přeneseny do většího objemu LB média a po 2 hodinách indukce byly bakteriální pelety zlyzovány pomocí lyzosymu a následně rozbity sonikací. TbIF1 proteiny byly purifikovány pomocí HPLC AKTA prime přístroje, kde byl průběh purifikace proteinu z afinitní kolonky monitorován UV detektorem. Hodnoty UV detektoru byly zaznamenávány softwarem Primeview a vyneseny do grafu purifikačního profilu (obr. 4.9). Přítomnost proteinu byla ověřena na 15% SDS PAGE gelu, který byl obarven Coomassie blue (obr. 4.10). Vypurifikovaný protein byl poté dialyzován a zakoncentrován. Tímto způsobem byly získány rekombinantní proteiny všech 8 mutantních verzí TbIF1. Všechny vypurifikované a zakoncentrované proteiny byly nanášeny na 15% SDS PAGE gel, aby byla ověřena a porovnána jejich velikost (obr. 4.11).



Obr. 4.9: Purifikační profil TbIF1 Amin5-64.

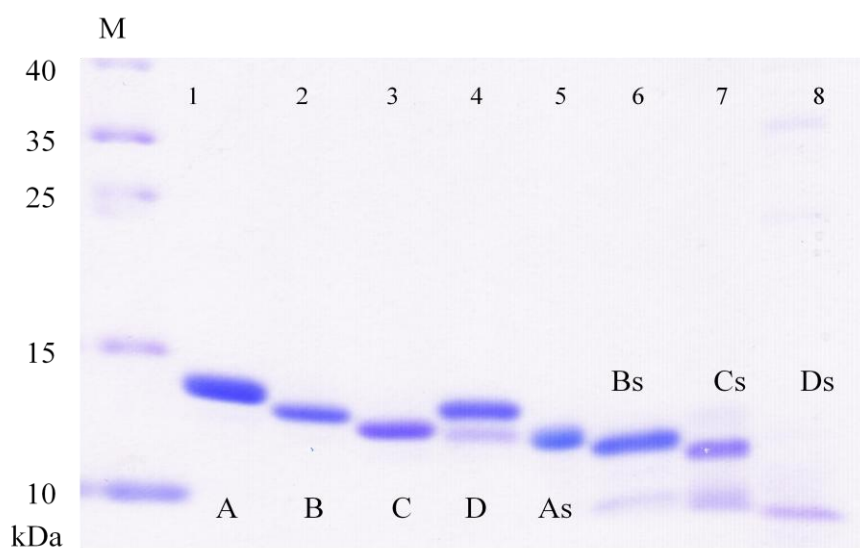
Na obrázku 4.9 je purifikační profil proteinu TbIF1 Δ min5-64. Modrá linie udává hodnoty UV detektoru, zelená linie udává hodnoty koncentrace imidazolu obsaženého v pufru B. Purifikační profil má 3 části. V první části dochází k ustálení startovacích podmínek. V druhé části dochází k nanesení bakteriálního lyzátu na kolonku (frakce 3 – 11). V třetí části, přístroj automaticky zvyšuje koncentraci imidazolu lineárním gradientem pufru B. Při určité koncentraci imidazolu dojde k eluci navázaného proteinu a ta je zaznamenána jako pík (frakce 22 – 26). Celá purifikace je sbírána do připravených zkumavek.



Obr. 4.10: Ověření vypurifikovaného proteinu TbIF1 Δ min5-64 na akrylamidovém gelu. Čísla 22, 23, 24, 25 a 26 označují eluční frakce, ve kterých je přítomen purifikovaný protein. Číslo 6 označuje frakci s proteinem, která protékla kolonou. WCL znamená lyzát po sonikaci, CL označuje supernatant, P označuje pelet a

FCL označují přefiltrovaný buněčný lyzát před purifikací.

Z obrázku 4.10 je patrné, že purifikace TbIF1 Δ min5-64 byla úspěšná. Do jamky 1 byl nanesen lyzát po sonikaci, do jamky 2 byl nanesen pelet, který byl po stočení v centrifuze resuspendovaný v pufru A. Tento vzorek slouží jako kontrola, kolik proteinu zůstává po lýze a sonikaci v nerozpustné frakci. Do 3. jamky byl nanesen supernatant po stočení, který obsahuje dostatečné množství rozpustného TbIF1 proteinu. V jamce 4 se nachází vzorek přefiltrovaného buněčného lyzátu, který byl nanesen na kolonu a v jamce 6 se nachází vzorek z frakce proteinu, který protekl NiNTA kolonkou. Dráhy 7 – 10 obsahují vzorky z elučních frakcí (22 – 26). Podobný purifikační profil byl získán pro všechny zbývající mutantní TbIF1 proteiny.



Obr. 4.11: Srovnání krátkých a dlouhých mutantních verzí TbIF1 na akrylamido-vém gelu. Písmeno M označuje marker (unstained protein ladder), A označuje TbIF1 Δ min5-93, B označuje TbIF1 Δ 5-93, C označuje TbIF1 Δ 10-

93, D označuje TbIF1 Δ 15-93, As označuje TbIF1 Δ min5-64, Bs označuje TbIF1 Δ 5-64, Cs označuje TbIF1 Δ 10-64, Ds označuje TbIF1 Δ 15-64.

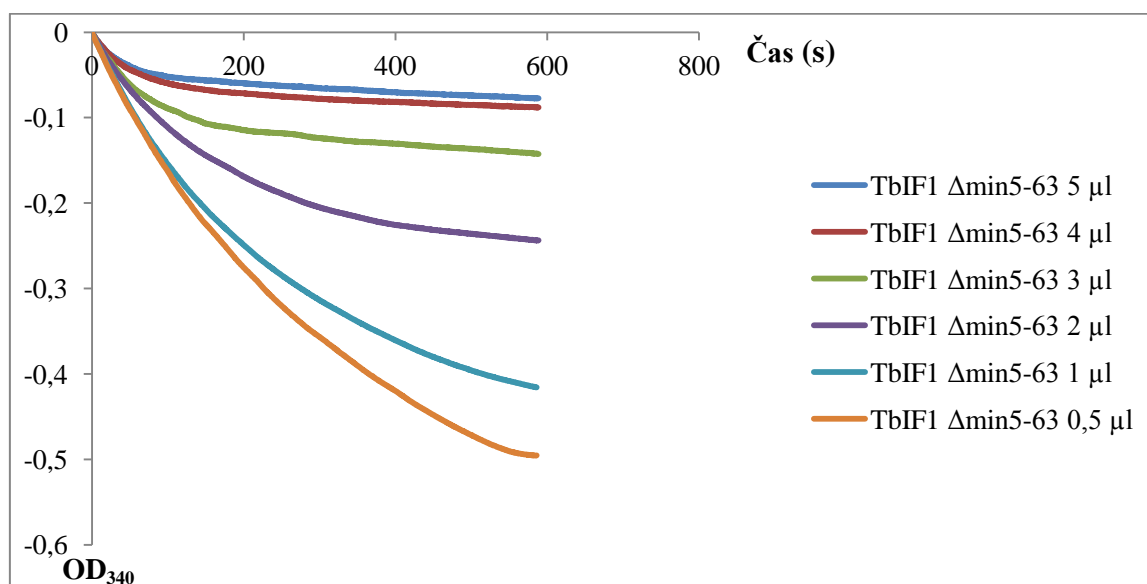
Na obrázku 4.11 je vidět porovnání velikostí krátkých a dlouhých mutantních verzí TbIF1. Pro dlouhé verze mutantních TbIF1 byl nanesen 1 μ g od každého vzorku, pro krátké verze mutantních TbIF1 byly naneseny 2 μ g od každého vzorku. Do jamky 1 byl nanesen TbIF1 Δ min5-93, do jamky 2 byl nanesen TbIF1 Δ 5-93, do jamky 3 byl nanesen TbIF1 Δ 10-93. Velikost těchto 3 vzorků odpovídá velikostem uvedeným v tabulce 4.2. Do jamky 4 byl nanesen TbIF1 Δ 15-93. U tohoto vzorku jsou patrné dva proužky, nicméně ani jeden neodpovídá predikované velikosti daného proteinu. Do jamky 5, 6 a 7 byly naneseny vzorky TbIF1 Δ min5-64, TbIF1 Δ 5-64 a TbIF1 Δ 10-64 s odpovídající velikostí (tab. 4.2). Do poslední jamky 8 byl nanesen TbIF1 Δ 15-64, jehož velikost opět neodpovídá předpokládané velikosti. V případě TbIF1 Δ 5-64 a TbIF1 Δ 10-64 proteinů jsou znatelně menší proužky, které jsou nejspíše výsledkem slabé degradace cílového proteinu.

4.4 Srovnání inhibičních vlastností mutantních forem TbIF1 s původním TbIF1

Spektrofotometrický test byl použit k charakterizaci inhibičních vlastností mutantních forem TbIF1.

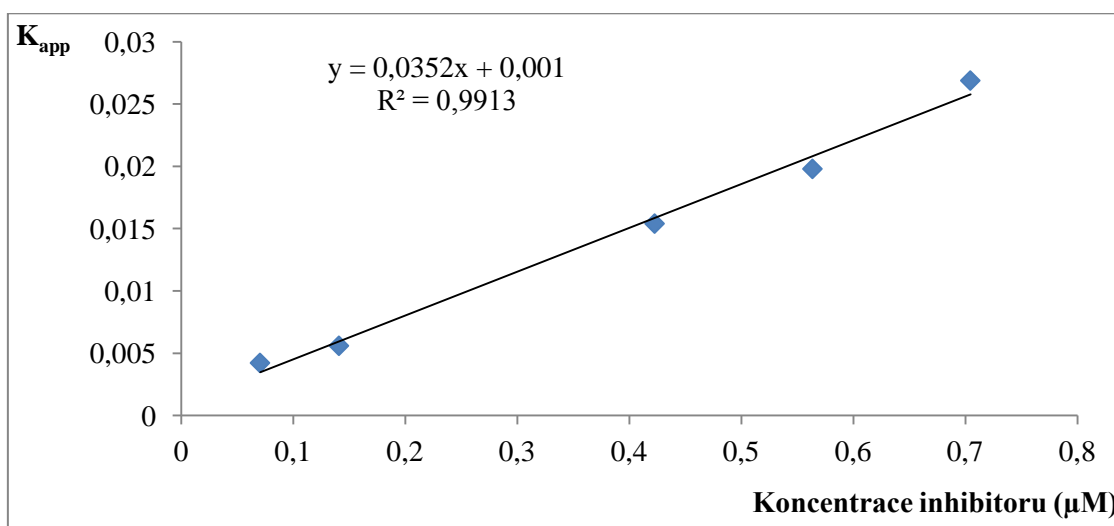
K 1 ml ATPázového pufru bylo přidáno 7,5 μl F_1 -ATPázy, která mi byla poskytnuta kolegyní v laboratoři. Změna absorbance při 340 nm byla zaznamenávána po dobu 10 minut pro 5 – 6 koncentrací od každého proteinu. Získané hodnoty změny absorbance v čase (obr. 4.12) byly zpracovány v programu GraphPad PRISM® a ze získaných hodnot byl vytvořen graf v Microsoft office Excell (obr. 4. 13). Z tohoto grafu byly získány 3 konstanty (tab. 4.3). K_I je disociační konstanta pro inhibitor vážící se na enzym, která je vyjádřena jako molarita (μM), k_{on} je vyjádřena jako μM za sekundu ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) a znamená rychlostní konstantu pro navázání inhibitoru, k_{off} je vyjádřena v záporných sekundách (s^{-1}) a znamená rychlostní konstantu pro odpojení inhibitoru. Tyto konstanty udávají, jak dobře se bude inhibitor vázat na F_1 -ATPázu, jak stabilní tato vazba bude a jak snadno se inhibitor odpojí. Čím vyšší je konstanta k_{on} , tím lépe se inhibitor naváže na F_1 -ATPázu a vazba je stabilnější. Čím je konstanta k_{off} nižší, tím menší je pravděpodobnost narušení vazby mezi inhibitorem a F_1 -ATPázou. A co se týče konstanty K_I , tak čím nižší je její hodnota, tím lepší a účinnější je inhibice F_1 -ATPázy inhibitorem.

Takto byla sledována inhibiční aktivita u všech 8 mutantních proteinů TbIF1, srovnání jejich inhibičních vlastností je uvedeno v tabulce 4.4.



Obr. 4.12: Ukázková ATPázová inhibiční esej TbIF1 $\Delta\text{min5-64}$ pH 6,5.

Na obrázku 4.12 byly na osu y naneseny hodnoty změny absorbance, na osu x čas v sekundách. Tak vznikly záporné exponenciální křivky, které znázorňují změny absorbance v čase, vyjadřující jak vzniká oxidovaná forma NADH. Pokud se podíváme na legendu vpravo a porovnáme ji s výsledným grafem, tak je patrné jak různé koncentrace TbIF1 inhibují hydrolytickou aktivitu F₁-ATPázu. Čím více inhibitoru bylo přidáno, tím účinnější byla inhibice.



Obr. 4.13: Ukázkový excelový graf pro výpočet K_I , k_{on} a k_{off} TbIF1 Δ min5-64 pH 6,5.

Obrázek 4.13 znázorňuje typický výsledek pokusu. Hodnoty k_{app} (zřejmá inhibiční konstanta v s⁻¹) vypočtené pomocí rovnice uvedené v metodice jsou v lineární závislosti s použitou koncentrací inhibitoru (μM). Získané body byly proloženy přímkou a z rovnice regrese byly získány hodnoty pro rychlostní konstanty k_{on} a k_{off} a poměrem k_{off}/k_{on} byla vypočítána hodnota konstanty K_I (tab. 4.3).

Tab. 4.3: Ukázková tabulka s hodnotami k_{on} , k_{off} a K_I pro TbIF1 Δ min5-64 pH 6,5.

TbIF1 Δ min5-64 ($\times 10^{-2}$)	
k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	3,52
k_{off} (s ⁻¹)	0,1
K_I (μM ⁻¹)	2,8

Inhibiční eseje byly provedeny u všech 8 mutantních TbIF1, byly vyhodnoceny v Microsoft office Excell a tímto způsobem byly získány hodnoty inhibičních konstant všech 8 mutantních TbIF1 proteinů, které jsou uvedeny v tabulce 4.4. Díky této tabulce je všechny lze porovnat s původními TbIF1 proteiny a zjistit tak jejich inhibiční vlastnosti.

Tab. 4.4: Přehled vazebných parametrů TbIF1 a jeho mutantů vůči F₁-ATPáze při pH 6,5.

Inhibiční protein	$K_{on} (M^{-1} s^{-1}) \times 10^{-2}$	$K_{off} (s^{-1}) \times 10^{-2}$	$K_I (\mu M^{-1}) \times 10^{-2}$
TbIF1 Δ min5-93	0,65	1,55	238
TbIF1 Δ 1-93_6xHis	1,04	0,23	22,1
TbIF1 Δ 5-93	1,6	0,85	51,2
TbIF1 Δ 10-93	3,92	0,8	20,9
TbIF1 Δ 15-93	0,56	0,87	153,8
TbIF1 Δ min5-64	3,52	0,1	2,8
TbIF1 Δ 1-64_6xHis	3,2	0,44	13,75
TbIF1 Δ 5-64	1,8	0,14	7,7
TbIF1 Δ 10-64	1,8	0,12	6,4
TbIF1 Δ 15-64	N/A	N/A	N/A

Vzhledem k tomu, že protein TbIF1 Δ 15-64 nevykazoval na akrylamidovém gelu správnou velikost, nebyl zahrnut do inhibiční ATPázové eseje. V případě peptidu TbIF1 Δ 15-93 byl i přes špatnou velikost tento inhibitor testován. Nicméně nezvykle nízká hodnota k_{on} a tudíž příliš vysoká hodnota K_I ukázala, že tento protein je velmi špatným inhibitorem F₁ATPazy. Pokud tedy porovnáme všechny ostatní inhibiční konstanty s původními TbIF1 proteiny (TbIF1 Δ 1-93_6xHis pro dlouhé verze a TbIF1 Δ 1-64_6xHis pro krátké verze) je patrné, že v případě dlouhých verzí hodnoty k_{on} postupně stoupají, zatímco u krátkých verzí tyto hodnoty k_{on} naopak klesají.

Jestliže tedy vybereme inhibitory s nejvyšší hodnotou k_{on} , nejnižší k_{off} a K_I je zřejmé, že nejlepšími inhibitory by byly TbIF1 Δ 10-93 a TbIF1 Δ min5-64. Oba inhibitory mají vyšší hodnotu k_{on} v porovnání s původními TbIF1. Avšak pokud porovnáme navzájem i tyto 2 inhibitory, tak je jasné, že lépe inhibuje TbIF1 Δ min5-64. Jeho hodnota k_{on} je vyšší než hodnota k_{off} , což znamená, že se snadno naváže a vzniklá vazba bude velmi stabilní. Jelikož je hodnota K_I nejnižší, lze z tohoto experimentu vyvodit závěr, že tento inhibitor nejlépe inhibuje.

5 Diskuze a závěr

V této práci jsem se zaměřila na charakterizaci inhibičních vlastností proteinu TbIF1 a jeho mutantních verzí. Pomocí PCR byly namnoženy úseky DNA odpovídající osmi mutantním verzím TbIF1. Amplifikované úseky DNA byly poté zaklonovány do expresního vektoru pRun a exprimovány v buňkách *E. coli* C41. Všech osm mutantních proteinů bylo vypurifikováno pomocí afinitní chromatografie z bakteriálního lyzátu a tyto proteiny byly dále použity v ATPázové inhibiční eseji. Na základě výsledků z této eseje byly kalkulovány konstanty k_{on} , k_{off} a K_i , které charakterizují schopnost daného peptidu vázat se a inhibovat hydrolytickou aktivitu F_1 ATPázy.

Úspěšnost indukce exprese studovaných proteinů byla prokázána pomocí coomassie barvení lyzátu z indukovaných buněk. V několika případech se stalo, že indukce proteinu nebyla na takto obarveném gelu dobře viditelná. V tomto případě jsem zvolila citlivější metodu detekce rekombinantního tagovaného proteinu a to western blotting s následnou vizualizací studovaných proteinů pomocí specifických protilátek. Western blot ukázal, že ve všech studovaných případech k expresi úspěšně docházelo, nicméně v případě TbIF1 Δ 15-93 a TbIF1 Δ 15-64 neodpovídala předpokládaná velikost. Tyto dva proteiny migrovali gelem pomaleji, než bylo predikováno. Chyby ve čtecím rámci, či v klonování TbIF1 Δ 15-93 a TbIF1 Δ 15-64 úseků DNA byly vyloučeny pomocí sekvenování. Specifické posttranslační modifikace těchto dvou proteinů by mohly být důvodem jejich pomalejší migrace gelem. Z tohoto důvodu byly oba dva vypurifikované proteiny předány k analýze pomocí hmotnostní spektrometrie a na výsledky této analýzy stále čekáme.

Analýza pomocí western blotu také poukázala na tvorbu proteinu i v neindukovaných buňkách, to znamená za absence indukčního činidla IPTG. Tento jev je poměrně častý, jelikož dochází k nízké transkripci T7 RNAP z lac operonu, která pak nasedá na T7 promotor, jenž je přítomný v expresním vektoru. V případě, že studovaný protein není toxický pro bakteriální buňku a je možné ho purifikovat za nativních podmínek, není třeba se tímto jevem příliš zabývat.

Srovnávací gel vypurifikovaných mutantních forem TbIF1 (obr. 4.11) poukazuje v některých případech na proteolýzu, jelikož jsou také detekovány menší proteinové fragmenty. Dlouhé formy TbIF1 proteinu se zdají být více stabilní, jelikož u verzí TbIF1 Δ min5-93, Δ 5-93, Δ 10-93 je detekován pouze band o očekávané velikosti. Jen v případě proteinu Δ 15-93 jsou viditelné dva bandy a jejich identita je zatím neznámá (viz výše).

V případě krátkých mutantních verzí je vidět, že pouze TbIF1 Δ min5-64 je dostatečně stabilní a je na gelu viditelný pouze band o očekávané velikosti. V případě TbIF1 Δ 5-64, TbIF1 Δ 10-64 jsou vidět menší bandy, které s největší pravděpodobností vypovídají o lehké proteolýze ve vzorku. Bohužel u TbIF1 Δ 15-64 jsme detekovali velmi slabý band o velikosti jiné, než ukázala westernová analýza. Právě z tohoto důvodu byl tento protein vyřazen ze studie.

Všechny nativní studované inhibiční peptidy obsahují na N-terminálním konci presekvence (obr. 1.6), které určují jejich lokalizaci do mitochondrie buňky. U bovinního peptidu se jedná o sekvenci prvních 25 AK (-25 AK až -1 AK), která je v mitochondrii odštěpena a vzniká tak zralý bIF1 s délkou 84 AK (Walker et al., 1987) o molekulové hmotnosti 9,58 kDa. Pro TbIF1 byla predikována mitochondriální signální sekvence, ale nebyla zatím experimentálně ověřena. Predikční programy poukazují, že prvních 17 AK je odštěpeno po vstupu TbIF1 do mitochondrie. Pokud je tato predikce správná, plně funkční TbIF1 protein by měl obsahovat 98 AK. Nicméně pomocí alignmentu s kvasinkovým IF1 proteinem byl stanoven začátek aktivního peptidu na tripeptidu SEG (obrázek 1.6) a takto zkrácený TbIF1 protein obsahuje 93 AK. Nicméně pro studium inhibičních vlastností TbIF1 proteinů jsme také zahrnuly peptid následující predikci mitochondriální signální sekvence a tento peptid nazýváme TbIF1 Δ min5-93 (obrázek 1.6). Kvasinkový yIF1 je nejmenší studovaný inhibiční peptid, jelikož zralý protein obsahuje pouhých 63 AK a jeho predikovaná molekulová hmotnost je 7,38 kDa.

V mitochondrii se bovinní IF1 vyskytuje ve 2 konformacích. Při pH nad 6,7 se bIF1 vyskytuje v inaktivní, vysoce α -helikální, neinhibující formě jako tetramer (Cabezón et al., 2000) a není tak schopen interakce s ATP syntázou (Fujikawa et al., 2012). Když pH klesne pod hodnotu 6,7, tetramer se rozpadá a dává vzniknout dimeru, který je aktivní, méně α -helikální a vykazuje inhibiční aktivitu (Cabezón et al., 2000), (Fujikawa et al., 2012). Změna konformace peptidů v závislosti na pH mitochondriálního matrixu je důležitá pro regulaci aktivity bIF1. Podobná forma regulace se vyskytuje také u yIF1, nicméně zde se jedná o neaktivní dimer a aktivní monomer (Robinson et al., 2013). Pro TbIF1 zatím nebyla podrobně studována regulace aktivity a změna konformace při různých pH, avšak naše předběžné výsledky poukazují na fakt, že jak při vysokých, tak i při nízkých hodnotách pH se TbIF1 vyskytuje stále jako monomer, nicméně jeho inhibiční schopnost roste se snižujícím se pH (Gahura et al., nepublikované výsledky).

Pomocí deleční analýzy bylo zjištěno, že bIF1 obsahuje tzv. minimální inhibiční sekvenci, která se nachází mezi aminokyselinami 22 – 46 (Stout et al., 1993), anebo 14 – 47 AK (Raaij et al., 1996). Podobná studie byla také provedena u yIF1 a u tohoto proteinu se minimální inhibiční sekvence nachází mezi aminokyselinami 17 – 41 AK (Stout et al., 1993). U TbIF1 nebyla zatím zjištěna úplně přesná oblast minimální inhibičních sekvencí.

Oblast dimerizační domény byla zatím upřesněna pouze pro bIF1, u kterého se tato oblast nachází mezi aminokyselinami 44 – 84 AK (Gordon-Smith et al., 2001). Na základě homologie TbIF1 a bIF1, byl u TbIF1 predikován úsek, který by mohl být zodpovědný za možnou dimerizaci proteinu (65 – 93). Funkční ověření této predikce je v plánu.

V případě inhibičních esejí byla u všech inhibičních peptidů prokázána důležitost N-terminální sekvence AK. Tyto AK se neúčastní inhibičních procesů, ale stabilizují inhibiční komplex (Bason et al., 2011; Adriananaivomananjaona et al., 2011). U kvasinkového IF1 dochází ke zvýšení k_{on} až po delecí první 15 AK, zatímco hodnotu k_{off} zvyšují všechny N-terminální delece oproti wt yIF1 (Adriananaivomananjaona et al., 2011). U bIF1 byly všechny hodnoty k_{on} vyšší u delečních mutantů na N-terminálním konci ve srovnání s wt bIF1, zatímco hodnoty k_{off} nevzrostly, dokud nebylo odstraněno prvních 14 AK (Bason et al., 2011).

Výsledky (tab. 4.3) ukazují, že ve skupině „dlouhých“ proteinů (až 93 AK) nejlépe inhibovala verze TbIF1 Δ 10-93. Výsledky získané ze srovnání dlouhých verzí TbIF1 proteinu (TbIF1 Δ min5-93, TbIF1 Δ 5-93, TbIF1 Δ 10-93, TbIF1 Δ 15-93) ukazují jak je prvních 15 AK důležitých ve vazbě na F_1 -ATPázu. Podporují hypotézu, vyslovenou již pro boviní IF1 protein, že prvních 10 AK na N-terminálním konci je důležitých pro vazbu TbIF1 na F_1 -ATPázou, nicméně mají slabý destabilizační charakter. In vivo tento jev může být důležitý pro odpojení inhibitorů z komplexu po obnovení respirace a membránového potenciálu. Tato teorie byla vyslovena pro boviní IF1, ale na její experimentální ověření se stále čeká. Naopak krátké formy inhibovaly komplex mnohem lépe než verze dlouhé a nejlépe inhibující variantou byla varianta TbIF1 Δ min5-64. Tyto výsledky budou muset být podpořeny dalším opakováním, nicméně může to naznačovat, že C-terminální část má silně destabilizační efekt na vazby TbIF1- F_1 -ATPáza a také na to, že predikce mitochondriálního signálu může být pravdivá, což by znamenalo, že v tomto případě má endogenní TbIF1 98 AK.

Má práce byla prvním krokem ve studiu inhibičních vlastností TbIF1 proteinů a doufám, že v této práci budu moci i nadále pokračovat v magisterském studiu. Jelikož F_0F_1

ATPáza se zdá být dobrým cílem pro budoucí léčiva a TbIF1 je schopen specificky inhibovat hydrolytickou aktivitu tohoto komplexu, je TbIF1 protein hodný dalšího detailního studia. I nadále bych se věnovala studiu závislosti pH na míře inhibice TbIF1 proteinu. Také bych navrhla vytvořit další mutanty a tím výrazně přispět k porozumění, jak se IF1 protein váže na F_0F_1 ATPázu a uvolňuje se z F_0F_1 ATP syntázy. Dalším krokem jsou ko-krytalizační studie komplexu TbIF1- F_1 ATPáza, které nám pomohou důkladně nahlédnout na přesný mechanismus vazby TbIF1 na F_1 -ATPázu a inhibici tohoto komplexu.

6 Seznam literatury

- Abrahams, J. P., A. G. Leslie, R. Lutter and J. E. Walker, (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**: 621-628.
- Adrianaivomananjaona, T., M. Moune-Dimala, S. Herga, V. David & F. Haraux, (2011) How the N-terminal extremity of *Saccharomyces cerevisiae* IF1 interacts with ATP synthase: A kinetic approach. *Biochim. Biophys. Acta* **1807**: 197-204.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter. *Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie*. 2.vydání (2005) Espero publishing, Ústí nad Labem.
- Bason, J. V. Studies of the regulation and the catalytic mechanism of ATP synthase. Cambridge, 2008, Dissertation (PhD.). University of Cambridge. Faculty of biology.
- Bason, J. V., M. J. Runswick, I. M. Fearnley & J. E. Walker (2011) Binding of the inhibitor protein IF1 to bovine F1-ATPase. *J. Mol. Biol.* **406**: 443-453.
- Besteiro, S., M. P. Barrett, L. Riviere & F. Bringaud, (2005) Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux. *Trends Parasitol* **21**: 185-191.
- Bienen, E.J., Hammadi, E. & Hill G.C., (1981) *Trypanosoma brucei*: biochemical and morphological changes during in vitro transformation of bloodstream- to procyclic-trypomastigotes. *Exp. Parasitol.*, **51**: 408-417.
- Boyer, P. D., (1997) The ATP synthase – a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 717-749.
- Bringaud, F., L. Rivière & V. Coustou, (2006) Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources, *Mol Biochem Parasitol.* **149**: 1-9.
- Cabezón, E., P. J. G. Butler, M. J. Runswick, & J. E. Walker, (2000) Modulation of the Oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *J. Biol. Chem.* **275**: 25460-25464.
- Cabezón, E., M. J. Runswick, A. G. Leslie & J. E. Walker, (2001) The structure of bovine IF1, the regulatory subunit of mitochondrial F1-ATPase. *EMBO J.* **20**: 6990-6996.
- Campanella, M., E. Casswell, S. CHong, Z. Farah, M. R. Wieckowski, A. Y. Abramov, A. Tinker & M. R. Duchon, (2008) Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1. *Cell Metabolism* **8**: 13-25.
- Clarkson, Jr., A. B., E. J. Bienen, G. Pollakis, & R. W. Grady, (1989) Respiration of Bloodstream Forms of the Parasite *Trypanosoma brucei brucei* Is Dependent on a Plant-like Alternative Oxidase. *J. Mol. Biol.* **264**: 17770-17776.

- Collinson, I. R., M. J. Runswick, S. K. Buchanan, I. M. Fearnley, J. M. Skehel, M. J. van Raaij, D. E. Griffiths & J. E. Walker, (1994) Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F1-ATPase. *Biochemistry* **33**: 7971-7978.
- Coustou, V., S. Besteiro, M. Biran, P. Diolez, V. Bouchaud, P. Voisin, P. A. M. Michels, P. Canioni, T. Baltz & Frederic Bringaud, (2003) ATP Generation in the Trypanosoma brucei Procyclic Form. *J Biol Chem.* **278**: 49625-49635.
- Croft, S. L., M. P. Barrett & J. A. Urbina, (2005) Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in Parasitology* **21**: 508-512.
- Devenish, R. J., M. Prescott & A. J. W. Rodgers, (2008) The Structure and Function of Mitochondrial F1F0-ATP Synthases. *Int Rev Cell Mol Biol.* **267**: 1-58.
- Dickson, V. K., J. A. Silvester, I. M. Fearnley, A. G. Leslie & J. E. Walker, (2006) On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase. *EMBO J.* **25**: 2911-2918.
- Fujikawa, M., H. Imamura, J. Nakamura & M. Yoshida, (2012) Assessing the actual contribution of IF1, an inhibitor of mitochondrial F0F1, to ATP homeostasis, cell growth, mitochondrial morphology and cell viability. *J. Biol. Chem.* **287**: 18781-18787.
- Gay, N. J. & Walker, J. E., (1981) The atp operon: nucleotide sequence of the promoter and the genes for the membrane proteins, and the 5 subunit of Escherichia coli ATP-synthase. *Nucleic Acids Res.* **9**: 3919-3926.
- Gordon-Smith, D. J., R. J. Carbajo, J. Chun Yang, H. Videler, M. J. Runswick, J. E. Walker & David Neuhaus, (2001) Solution structure of a C-terminal coiled-coil domain from bovine IF: the inhibitor protein of F1ATPase. *J. Mol. Biol.* **308**: 325-339.
- Hunt, R. C., EUKARYOTIC CELLS WITH A DIFFERENT WAY OF DOING THINGS <http://pathmicro.med.sc.edu/lecture/trypanosomiasis.htm>, (Duben 2013)
- Chaudhuri, M., W. Ajayi & G. C. Hill, (1998) Biochemical and molecular properties of the Trypanosoma brucei alternative oxidase. *Mol Biochem Parasitol.* **95**: 53-68.
- Kennedy, P. G. E., (2013) Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Lancet neural* **12**: 186-194.
- Kovářová, J. Detekce hemu u parazitických prvoků skupiny Trypanosomatidae. Č. Bud., 2010. Bakalářská práce (Bc.). JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUĎĚJOVICÍCH. Přírodovědecká fakulta
- Lukeš, J., Hashimi, H., Verner, Z. & Čičová, Z., (2010) The remarkable mitochondrion of trypanosomes and related flagellates. In: W. de Souza (Ed.), Structures and Organelles

- in Pathogenic Protists. Microbiology Monographs **17**. Springer-Verlag, Berlin,: 227–252.
- Mitchel, P., (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144 – 148.
- Mitchel, P., (1972) Chemiosmotic coupling in energy transduction: A logical development of biochemical knowledge. *Journal of bioenergetics* **3**: 5-24.
- Njogu R. M., C. J. Whittaker & G. C. Hill, (1980) Evidence for a branched electron transport chain in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* **1**: 29-39.
- Nolan, D.P. & H.P. Voorheis, (1992) The mitochondrion in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* is energized by the electrogenic pumping of protons catalysed by the F1F0-ATPase. *Eur. J. Biochem.*, **209** : 207-216.
- Norling, B., C. Tourikas, B. Hamasur & E. Glaser, (1990) Evidence for an endogenous ATPase inhibitor protein in plant mitochondria. Purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* **188**: 247-252.
- Pullmann, M. E. & G. C. Monroy, (1963) A naturely occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **238**: 3762-3768.
- Robinson, G. C., J. V. Bason, M. G. Montgomery, I. M. Fearnley, D. M. Mueller, A. G. W. Leslie, & J. E. Walker, (2013) The structure of F1-ATPase from *saccharomyces cerevisiae* inhibited by its regulatory protein IF1. *Open Biol* **3**: 120164.
- Rubinstein, J. L., J. E. Walker & R. Henderson, (2003) Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *EMBO J.* **22**: 6182-6192.
- Satre, M., M. B. de Jerphanion, J. Huet, P. V. Vignais, (1985) ATPase inhibitor from yeast mitochondria. Purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta* **387**: 241-255.
- Stout, J. S., B. E. Partridge, D. A. Dibbern & S. M. Schuster, (1993) Peptide analogs of the beef heart mitochondrial F1-ATPase inhibitor protein. *Biochemistry* **32**: 7496-7502.
- van Raaij, M. J., G. L. Orriss, M. G. Montgomery, M. J. Runswick, I. M. Rearnley, J. M. Skehel & J. E. Walker, (1996) The ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria: the minimal inhibitory sequence. *Biochemistry* **35**: 15618-15625.
- Volf, P., H. P & a kol., (2007) Paraziti a jejich biologie. In. Praha: Nakladatelství TRITON, pp.
- Walker, J. E., G. Falk, N. J. Gay & V. L. Tybulewicz, (1984). Genes for bacterial and mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **768**: 164-200.
- Walker, J. E., N. J. Gay, S. J. Powell, M. Kostina & M. R. Dyer, (1987) ATP synthase from bovine mitochondria: sequences of imported precursors of oligomycin sensitivity

conferral protein, factor 6, and adenosinetriphosphatase inhibitor protein. *Biochemistry* **26**: 8613-8619.

Walker, J. E & I. R. Collinson, (1994) The role of the stalk in the coupling mechanism of F1F0-ATPases. *FEBS Letters* **346**: 39-43.