

Univerzita Karlova v Praze
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra biochemie



**Příprava expresních konstruktů interakčních
partnerů fosducinu**

Preparation of expression constructs of phosducin binding partners

Bakalářská práce
Biochemie

Školitel: doc. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.
Garant: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2012

Kateřina Koláčková

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomáhali během mé bakalářské práce, především svému školiteli doc. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. a Mgr. Daliboru Koškovi za odborné vedení, cenné rady, věnovaný čas a trpělivost, které mi v průběhu mé práce poskytli.

Dále bych chtěla poděkovat své garantce oboru prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za pečlivou korekturu mé práce.

Děkuji ostatním studentům a pracovníkům naší laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí a v neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům za jejich podporu a všestrannou pomoc, kterou mi poskytují po celou dobu mého studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením svého školitele doc. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....
Kateřina Kolářková

Abstrakt

Klíčová slova: SUG1, fosducin, G proteinová signální dráha, exprese, pGEX-4T-1, pST39

Fosducin je kyselý cytosolický protein, který se účastní regulace G proteinové signální dráhy v tyčinkách fotoreceptorů a má vliv na stresem indukovanou hypertenzi. Jedním z jeho důležitých interakčních partnerů je protein SUG1, který je součástí 26S proteasomu a řadí se do rodiny proteinů majících ATPasovou aktivitu.

Tato bakalářská práce je součástí širšího výzkumu, který se snaží objasnit fyziologické funkce interakce mezi proteiny SUG1 a fosducinem. Hlavním cílem této práce bylo připravit expresní konstrukty proteinu SUG1 (lidská isoforma 1), které budou vhodné pro přípravu tohoto proteinu v bakteriích *E. coli* BL21 (Rosetta).

Gen kódující protein SUG1 byl vnesen do dvou různých plasmidových DNA určených pro expresi rekombinantních proteinů v bakteriích. Sekvence připravených konstruktů byla ověřena pomocí sekvenace a následně byly provedeny expresní testy, které potvrdily produkci rekombinantních fúzních proteinů.

Hlavním výsledkem této bakalářské práce bylo zjištění, že se protein SUG1 (lidská isoforma 1) v expresním systému *E. coli* BL21 (Rosetta) dobře exprimuje. Toto zjištění je základem pro budoucí vývoj purifikačního protokolu a následné studium biofyzikálních vlastností tohoto proteinu a jeho interakcí s fosducinem.

Abstract

Key words: SUG1, phosducin, G protein signaling, expression, pGEX-4T-1, pST39

Phosducin is an acidic protein found in cytosol and is involved in G protein signaling within rods of photoreceptors. Phosducin also influences stress-dependent hypertension. One of phosducin's important binding partners is SUG1, a 26S proteasome subunit, which belongs to a family of proteins that have an ATPase activity.

This bachelor thesis takes part in a broader research, which tries to clarify physiological functions of the interaction of SUG1 with phosducin. Main goal of this study was to prepare constructs of SUG1 (human isoform 1) suitable for the recombinant protein production in an expression system *E. coli* BL21 (Rosetta).

Gene that encodes SUG1 was inserted into two different plasmid DNAs that allow expression of SUG1 as two different fusion proteins in a prokaryotic expression system. Nucleotide sequences of these constructs were verified using sequencing. Next, expression tests revealed sufficient production of both recombinant fusion proteins.

The main result of this bachelor thesis is the successful expression of human SUG1 in *E. coli* BL21 (Rosetta) cells. This result will enable the development of the purification protocol for the large scale expression of both recombinant fusion proteins as well as the biophysical study of SUG1 and its interaction with phosducin. (In Czech)

Seznam použitých zkratek

A	adenin
Amp	ampicilin
Aps	persulfát amonný
ATP	adenosintrifosfát
BL 21 (Rosetta)	kmen bakterií <i>E. Coli</i>
bp	base pair (pár bázi)
BSA	hovězí sérový albumin
C	cytosin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAMKII	Ca ²⁺ /kalmulin dependentní protein kinasa II
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytosintrifosfát
DL5α	kmen bakterií <i>E. Coli</i>
ddNTP	směs dideoxyribonukleotidtrifosfátů
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
dNTP	směs deoxyribonukleotidtrifosfátů
ds	double-stranded DNA (dvouvláknová DNA)
DTT	dithiothreitol
dTTP	deoxythymidintrifosfát
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
g	tíhové zrychlení, gram
G	guanin
G _α , G _β , G _γ	α, β a γ podjednotka G proteinu
GDP	guanosindifosfát
GEF	guanin ribonucleotide- exchange factor
GPCR	G protein coupled receptor
GST	glutathion-S-transferasa
G _t	G protein transducin

GTP	guanosintrifosfát
HAE	horizontální agarosová elektroforesa
HF	high fidelity
His-tag	motiv šesti histidinů za sebou
IPTG	isopropyl- β -D-thio-galaktopyranosid
KpnI	restrikční enzym
LB	médiun dle Luria- Bertaniho
Lys	lysin
MM PCR	Master Mix PCR směs (komerčně dostupná)
NotI	restrikční enzym
ot./min	otáčky za minutu
PAGE	elektroforesa na polyakrylamidovém gelu
PCR	polymerasová řetězová reakce
Pd	fosducinu
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pGEX-4T-1	komerčně dostupný plasmid
PKA	cAMP dependentní protein kinasa A
pQ1	komerčně dostupný plasmid
pST39	komerčně dostupný plasmid
RNA	ribonukleová kyselina
S	sedimentační koeficient
SalI	restrikční enzym
SDS	dodecylsulfát sodný
Ser	serin
ss	single- stranded (jednovláknová)
T	thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borátový pufr
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit (jednotka katalytické aktivity)

XbaI

restrikční enzym

% (v/v)

objemová procenta

% (w/v)

hmotnostní procenta

Obsah

Seznam použitých zkratk	6
1 Úvod	11
2 Literární přehled	12
2.1 G proteinová signální dráha a G proteiny	12
2.1.1 G proteinová signalizace v tyčinkách fotoreceptorů	14
2.2 Fosducin	14
2.2.1 Struktura fosducinu	15
2.2.2 Posttranslační modifikace fosducinu	16
2.2.3 Vazba fosducinu na $G_i\beta\gamma$	16
2.2.4 Další funkce fosducinu	17
2.3 SUG1	17
3. Cíl práce	19
4. Metody a materiál	20
4.1 Použitý materiál	20
4.1.1 Chemikálie	20
4.1.2 Přístroje	21
4.1.3 Ostatní materiál	21
4.2 Pracovní postup a metodika práce	22
4.2.1 Plasmidy	22
4.2.2 Kultivace bakterií	24
4.2.3 Skladování bakterií	24
4.2.4 Transformace bakterií	25
4.2.5 Isolace plasmidové DNA	25
4.2.6 PCR	26
4.2.7 Horizontální agarosová elektroforesa	29
4.2.8 Čištění PCR produktu	30
4.2.9 Štěpení DNA restrikčními enzymy	30
4.2.10 Separace DNA z agarosového gelu	31
4.2.11 Ligace	32
4.2.12 „Colony PCR“	33
4.2.13 Sekvenování DNA	34
4.2.14 Expresní testy	35
4.2.15 SDS elektroforesa (SDS-PAGE)	36
5. Výsledky	38
5.1 Transformace bakterií, jejich kultivace a izolace plasmidové DNA	38
5.2 Amplifikace genu kodujícího lidský SUG1	38

5.3 Restrikční štěpení DNA.....	40
5.4 Ligace a „colony PCR“.....	40
5.5 Sekvenování DNA.....	42
5.6 Expresní testy a SDS-PAGE.....	42
6. Diskuse	45
7. Závěr	47
Seznam citované literatury.....	48
Příloha 1.....	50
Příloha 2.....	51
Příloha 3.....	53

1. Úvod

Laboratoř biofyzikální chemie doc. Tomáše Obšila se již řadu let zabývá protein-proteinovými interakcemi, zejména pak mezi proteiny, které se účastní přenosu signálu v buňce. Takovými bílkovinami jsou i proteiny 14-3-3, což jsou vysoce konzervované kyselé proteiny exprimované ve všech eukaryotických buňkách. Tyto bílkoviny hrají důležitou roli jako regulátory mnoha buněčných funkcí, např. G proteinových signálních drah [1]. Jedním z jejich významných interakčních partnerů je fosducin, protein, jehož hlavní a nejlépe prozkoumanou funkcí je regulace signalizace při adaptaci na světlo v tyčinkách fotoreceptorů sítnice. V nedávné době se však o fosducinu začalo hovořit také v souvislosti s hypertenzí stresového původu, což z něj dělá protein velmi atraktivní pro další výzkum. Také naše laboratoř se o fosducin začala zajímat, především kvůli jeho interakcím s již zmíněnými proteiny 14-3-3. Nicméně tyto bílkoviny nejsou jedinými vazebnými partnery fosducinu. Dalším z významných interakčních partnerů fosducinu je SUG1, protein, který je součástí 26S proteasomu a jehož fyziologické funkce ještě stále nejsou dostatečně dobře známy.

Tato bakalářská práce, jejímž hlavním cílem bylo připravit konstrukty vhodné pro expresi lidského proteinu SUG1, je součástí širšího výzkumu, kterým se zabývá Laboratoř biofyzikální chemie. Tento výzkum by měl pomoci objasnit charakter interakce fosducinu se SUG1 a také možné fyziologické funkce tohoto komplexu.

2. Literární přehled

2.1 G proteinová signální dráha a G proteiny

Buněčná komunikace je základní vlastností všech buněk a formuje funkce a schopnosti každého žijícího organismu [2]. Ve vyšších eukaryotických buňkách se objevují extracelulární signální molekuly, které fungují v rámci celého organismu a kontrolují jeho metabolismus, růst, diferenciaci tkání, syntézu a sekreci proteinů a složení intra- a extracelulárních tekutin. Mnohé extracelulární signální molekuly jsou syntetizovány a uvolňovány různými typy buněk v rámci organismu. Ve všech případech produkují signální molekuly specifickou odpověď pouze v cílových buňkách, které mají pro tyto molekuly receptory. Většina receptorů váže jen jednu molekulu, případně skupinu úzce souvisejících molekul. Většina signálních molekul je příliš velká a příliš hydrofilní na to, aby pronikla plazmatickou membránou, proto se váže na receptory na povrchu buňky, kterými jsou integrální proteiny v plasmatické membráně. Signální molekula vystupuje jako ligand a její navázání na receptor vyvolává jeho konformační změnu, která je přenesena jeho membránovou doménou do domény cytosolické. Pravděpodobně nejpočetnější skupinou receptorů, které se nacházejí v organismech od kvasinky po člověka, jsou tzv. receptory spřažené s G proteiny, GPCR (z anglického G-protein coupled receptors). Buněčnou signalizaci lze rozdělit na:

- endokrinní, při které jsou signální molekuly syntetizovány a sekretovány buňkou a následně transportovány i do vzdálených cílových buněk v rámci organismu
- parakrinní, kdy signální molekuly uvolněné buňkou ovlivňují pouze ty cílové buňky, které jsou v jejich blízkosti
- autokrinní, při které buňky odpovídají na látky, které samy uvolní.

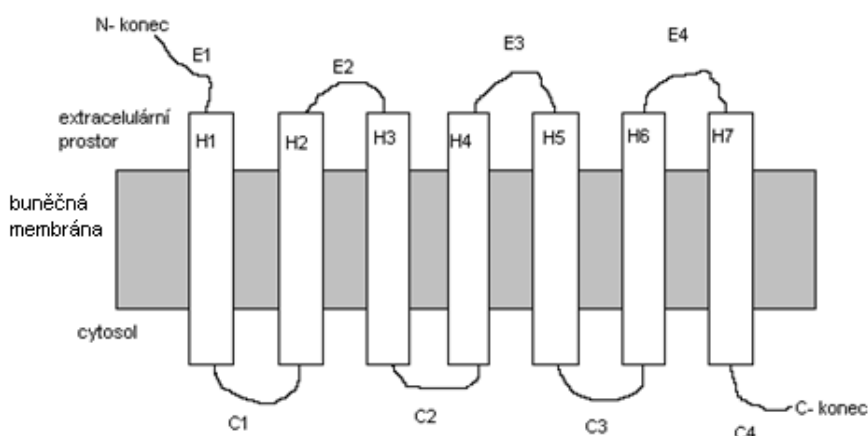
Při buněčné signalizaci se objevují dvě velké skupiny proteinů, které mají GTPasovou aktivitu. Jsou to jednak monomerní Ras proteiny, které regulují především buněčné dělení a buněčné pohyby a dále to je skupina G proteinů, což jsou trimery, které se přímo váží a jsou aktivovány určitými receptory na povrchu buněk. Aktivovaný receptor pak funguje jako guanin nukleotid výměnný faktor, GEF (z anglického guanine nucleotide- exchange factor), který se zaměřuje na uvolňování GDP a vazbu GTP.

Aktivace prakticky všech receptorů nacházejících se na povrchu buněk vede přímo či nepřímo ke změnám ve fosforylaci proteinů přes aktivaci proteinkinasy, které proteiny fosforylují nebo proteinfosfatasy, které naopak proteiny defosforylují.

Aktivace GPCR molekulou ligandu „spouští“ aktivaci spřažených trimerních G proteinů, které pak interagují s proteiny signálního přenosu. Všechny signální dráhy spojené s GPCR se vyznačují těmito společnými prvky:

- spřaženým heterotrimerním G proteinem, který funguje jako „spínač“, když neustále přechází mezi svou aktivní a inaktivní formou
- efektorovým proteinem vážícím se na membránu
- zpětnou regulací a desenzibilizací signální dráhy
- krátkodobým efektem na buňku.

Všechny GPCR mají stejnou orientaci v membráně a obsahují sedm transmembránových α -helixů, čtyři extracelulární segmenty a čtyři cytosolické segmenty [2] (viz obr. 2.1).



Obr. 2.1. Znárodnění ukotvení GPCR do membrány. Je zde patrných sedm transmembránových helixů (H1-H7), čtyři extracelulární segmenty (E1-E4) a čtyři cytosolické segmenty (C1-C4).

G proteiny hrají důležitou roli při stanovení specifity a temporálních vlastností buněčných odpovědí na signály [3]. Heterotrimerní G proteiny sestávají ze tří podjednotek označovaných jako $G\alpha$, $G\beta$ a $G\gamma$. Podjednotky α a β jsou spojeny s membránou pomocí kovalentně navázaných lipidů. Během intracelulární signalizace zůstávají β a γ podjednotky spojeny dohromady a tvoří tzv. $G\beta\gamma$ podjednotku. V klidovém stavu, kdy není

na receptor navázán žádný ligand, obsahuje $G\alpha$ navázaný GDP a tvoří komplex s $G\beta\gamma$. Vazba ligandu na GPCR změnil konformaci jeho cytosolických segmentů a umožnil mu aktivovat $G\alpha$ podjednotku tím, že dojde k uvolnění GDP z $G\alpha$. Následně se na „prázdné“ místo pro GDP $G\alpha$ podjednotky rychle naváže GTP, což změnil konformaci jejích „spínacích“ segmentů. Tyto změny následně vedou k oslabení vazby $G\alpha$ jak s receptorem, tak s $G\beta\gamma$. Aktivovaný stav $G\alpha$ /GTP trvá jen krátce, protože GTP je řádově v minutách hydrolyzován na GDP, což je katalyzováno vlastní GTPasovou aktivitou $G\alpha$ podjednotky. Konformace $G\alpha$ se pak vrátí zpět do původního inaktivovaného $G\alpha$ /GDP stavu. Nakonec se $G\alpha$ /GDP znovu spojí s $G\beta\gamma$ a tento heterotrimerní komplex se znovu stane připraveným k interakci s aktivovaným GPCR [2].

2.1.1 G proteinová signalizace v tyčinkách fotoreceptorů

Jednou z nejlépe popsaných signálních drah spojených s heterotrimerními G proteiny je systém přenosu signálu v tyčinkách zrakových buněk [4]. V této dráze je receptorem spřaženým s G proteinem GPCR rodopsin, který přijímá fotony přes svůj sítnicový chromofor, katalyzuje výměnu nukleotidů a tím aktivuje G protein transducin. α -podjednotka transducinu ($G_t\alpha$), na které je navázán GTP, disociuje z $\beta\gamma$ -podjednotky ($G_t\beta\gamma$) a aktivuje cGMP fosfodiesterasu. Výsledný pokles koncentrace cGMP má za následek uzavření cGMP-řízených kationtových kanálů, což vede k buněčné hyperpolarizaci. V tyčinkách adaptovaných na tmu taková akce jednoho fotonu stačí k aktivaci jedné molekuly rodopsinu a vede k degradaci více než sta tisíc molekul cGMP, což je dostatečné množství k vytvoření nervového impulsu. Tato amplifikace je zjevně moc vysoká pro vidění za denního světla. Tyčinky receptorů tedy podstupují adaptaci na světlo a tím se jejich metabolismus, genová exprese a obnova membrány na tuto změnu připraví. Rodopsinkinasa a arestin, které inaktivují rodopsin, jsou zapojeny v rychlé, krátkodobé regulaci této signální dráhy [4]. Naopak fosducin hraje důležitou roli při dlouhodobých adaptacích na světlo v tyčinkách fotoreceptorů [5].

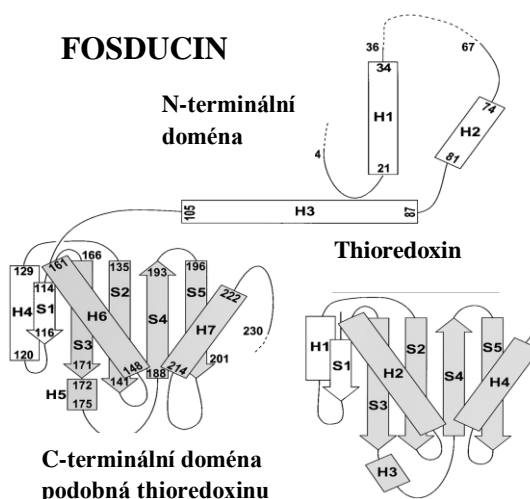
2.2 Fosducin

Fosducin (Pd) je kyselý rozpustný fosfoprotein, jehož relativní molekulová hmotnost je 28000 [6], nachází se v cytoplazmě a označuje se tedy jako cytosolický protein [7]. Tento protein je vysoce konzervovaný mezi savčími druhy, byla však identifikována

také jeho homologa, která se vyskytují u široké škály nesavčích eukaryot [8]. Pd je ve vysokých koncentracích exprimován v tyčinkách fotoreceptorů sítnice a pinealocytech epifyzy a v menší míře se nachází v centrální nervové soustavě [9] a sympatických gangliích [10]. Pd slouží jako regulátor intracelulárního přenosu signálu, především u mechanismů spojených s adaptací na světlo [7]. Tyto procesy jsou spojeny s fosforylací/defosforylací Pd a jeho vazbou na $\beta\gamma$ -podjednotky heterotrimerního G-proteinu transducinu ($G_t\beta\gamma$) [8].

2.2.1 Struktura fosducinu

Fosducin sestává z 244-246 aminokyselin v závislosti na živočišném druhu, ve kterém se nachází [6]. Rentgenovou strukturní analýzou bylo zjištěno, že se tento protein skládá ze dvou domén, které spolu neinteragují, ale „omotávají“ se okolo stran $G_t\beta$ a vytváří tak rozsáhlý interakční povrch. Těmito doménami jsou N-terminální a C-terminální doména. N-terminální doména je především helikální a zdá se být velmi flexibilní, především v oblastech, které neinteragují s $G_t\beta\gamma$, což by mohlo být způsobeno její vysokou hydrofilitou. Nachází se v ní hlavní fosforylační místo fosducinu, Ser73, které je díky jejímu uspořádání dostupné kinasám a fosfatasám [4]. N-terminální doména obsahuje fragment 63 aminokyselin, který je zodpovědný za vazbu k $G_t\beta\gamma$ [11, 12]. C-terminální doména se skládá z pěti β -skládaných listů a doprovodných α -helixů. Tato doména je strukturně podobná proteinu thioredoxinu (viz obr. 2.2), nicméně tato podobnost, jak se zdá, nemá nic společného s její funkcí, ale pouze se strukturou [4].



Obr. 2. 2: Znáznornění dvou domén fosducinu, ukázka strukturní podobnosti C-terminální domény s thioredoxinem (převzato z [4] a upraveno).

2.2.2 Posttranslační modifikace fosducinu

Fosforylace je dobře známá pro svou regulaci aktivity fosducinu [8]. Hlavním fosforylačním místem tohoto proteinu je Ser73, který se nachází v N-terminální doméně [13]. Dlouho byla za jediný regulátor fosforylace Pd považovaná cAMP dependentní proteinkinasa A (PKA), která Pd fosforyluje právě na zmíněném Ser73 [14], čímž snižuje jeho vazebnou afinitu k $G_i\beta\gamma$ asi třikrát [4, 5, 15]. Nejnovější studie však ukazují, že existuje ještě další proteinkinasa mající velký vliv na fosforylaci Pd, a to Ca^{2+} /kalmodulin dependentní proteinkinasa II (CAMKII), která jej může fosforylovat kromě Ser73 taky na Ser6, Ser36, Ser54 a Ser106. Tím snižuje jeho vazebnou afinitu k $G_i\beta\gamma$ až třístokrát a zároveň může způsobit multiplikaci signálních událostí, např. účinnou vazbu k fosfoserin-vazebnému proteinu 14-3-3 ζ [8]. Pd je defosforylován světlem poháněnou proteinovou fosfatasou 2A [16].

Na úrovni posttranslačních změn je Pd regulován také malým modifikátorem SUMO, který je spřízněný s ubiquitinem [8]. Vazebný motiv pro „SUMOylaci“ se nachází v N-terminální doméně na Lys33. Analogicky jako u fosforylace i „SUMOylace“ je schopná snížit afinitu Pd k $G_i\beta\gamma$ a navíc jej chrání před ubiquitinací a následnou proteasomální degradací [17].

2.2.3. Vazba fosducinu na $G_i\beta\gamma$

Fosducin, který se nachází především v tyčinkách fotoreceptorů sítnice, hraje důležitou roli v adaptaci na změny způsobené světlem. V savčích sítnicových fotoreceptorech vyvolávají fotony intracelulární signální události, které následně vedou k elektrickému podnětu na synapsích, což umožňuje neurální odpověď [18]. Pd blokuje G proteinovou signalizaci tím, že přerušuje interakci mezi $G_i\beta\gamma$ a $G_i\alpha$. Toto narušení vede k inhibici vazby transducinu s jeho GPCR, kterým je světlem aktivovaný rodopsin [19]. Ve fotoreceptorech, které jsou adaptované na světlo, se Pd nachází v nenafosforylovaném stavu a pevně se váže k podjednotce $G_i\beta\gamma$, kterou následně přenáší do cytosolu. Tím předchází jejímu opětovnému spojení s $G_i\alpha$ podjednotkou, čímž má inhibiční vliv na GTPasovou aktivitu této α -podjednotky a tedy snižuje amplifikaci signálu fotonu [8]. Naopak ve fotoreceptorech adaptovaných na tmu je Pd fosforylován [4, 5, 15], což snižuje jeho afinitu k $G_i\beta\gamma$. Ihned po jeho fosforylaci se $G_i\beta\gamma$ může znovu spojit s $G_i\alpha$ a vytvořit tak heterotrimerní transducin. Díky tomuto ději se následně objeví maximální amplifikace fotonového signálu [8].

2.2.4. Další funkce fosducinu

Přestože je vazba Pd na $\beta\gamma$ -podjednotku G proteinu transducinu jeho nejvíce studovanou funkcí, jsou známy i další biochemické vlastnosti tohoto proteinu. V roce 2000 bylo zjištěno, že C-terminální doména fosducinu je důležitým transkripčním faktorem v kvasinkách. Byli nalezeni dva potenciální interakční partneři fosducinu SUG1 (viz kapitola 2.3), 26S proteasomální podjednotka a CRX, specifický transkripční faktor pro sítnici a epifýzu. Fosducin se tedy podílí i na regulaci transkripce [20]. Proteinová interakce Pd se SUG1 pravděpodobně souvisí s proteasomální degradací Pd [21], nicméně s jistotou to zatím říci nelze.

Nedávno bylo také zjištěno, že Pd je důležitým regulátorem kardiovaskulárního systému, protože moduluje krevní tlak a podílí se na vzniku hypertenze indukované stresem [8, 10].

2.3. SUG1

SUG1 je integrální součástí 26S proteasomu, což je universální multiproteinový komplex, který zprostředkovává degradaci ubiquitinovaných proteinů. Tento protein se skládá ze 406 aminokyselin a jeho relativní molekulová hmotnost je 46000 [21, 22]. SUG1 je členem velké rodiny domnělých ATPas, se kterými sdílí čtyři konzervované motivy charakteristické pro ATP dependentní DNA/RNA helikasy [23]. Je známo, že DNA helikasy jsou zapojeny do různých buněčných procesů, včetně transkripce DNA, replikace, oprav a rekombinace a tudíž by helikasová aktivita SUG1 mohla být zapojena do mnoha takových buněčných procesů, především díky jeho interakcím s dalšími proteiny [24]. K ověření správnosti této domněnky je však zapotřebí dalšího výzkumu. Jisté je, že SUG1, mající ATPasovou aktivitu, je přítomen v téměř všech jaderných proteasomech [25].

SUG1 však nemá pouze proteolytickou funkci. Tento protein se účastní také regulace transkripce, kde zastává roli represoru některých genů, včetně vlastního SUG1 genu [22]. SUG1 je zastoupen v rámci celé eukaryotické říše, např. kvasničný SUG1 je součástí holoenzymu RNA polymerasy II, lidský SUG1, který je nazýván také Trip1 nebo p45, interaguje s receptorem thyroïdního hormonu a myší SUG1 interaguje s různými jadernými receptory [23].

Interakce Pd se SUG1 a jeho isoformami naznačuje, že by SUG1 mohl hrát určitou roli také při regulaci intracelulárních signálních drah tím, že by zaměřoval regulační

proteiny v dráze vedoucí k proteasomální degradaci [21]. Takovému tvrzení přispívá fakt, že se SUG1 váže na základní transkripční faktor, vazebný protein TATA (z anglického TATA-binding protein) [22], nicméně i tato hypotéza ještě vyžaduje další zkoumání.

3. Cíl práce

Hlavním cílem této práce bylo:

- Připravit konstrukty pro expresi lidského SUG1 v bakteriálním expresním systému.
 - Připravit konstrukt SUG1 v expresním plasmidu pGEX-4T1, který umožní exprimovat SUG1 jako fúsní protein s GST na N-konci.
 - Připravit konstrukt SUG1 v expresním plasmidu pST 39, který umožní exprimovat SUG1 jako fúsní protein s 6×His-tag na C-konci prostřednictvím tzv. „leakage“ exprese.
- Provést expresní testy s připravenými konstrukty v bakteriích *E. coli* BL21(Rosetta).

4. Metody a materiál

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Chemikálie

- agar (Luria Bertani)- Carl Roth GmbH, Německo
- agarosa GTQ- Carl Roth, GmbH, Německo
- akrylamid- Carl Roth, GmbH, Německo
- ampicilin- Sigma, USA
- bacto trypton (pepton)- Carl Roth, Německo
- bacto yeast extract (kvasničný extrakt)- Carl Roth GmbH, Německo
- bis-akrylamid- Carl Roth, GmbH, Německo
- bromfenolová modř, New England BioLabs, USA
- Coomassie Brilliant Blue R-250- Lachema a.s., ČR
- DTT (dithiotreitol)- New England BioLabs, USA
- EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) - Genomed, Německo
- etanol, Lachema a.s., ČR
- GelRed, New England BioLabs, USA
- glycerol- Lachema a.s., ČR
- guanidin hydrochlorid- Genomed, Německo
- hydroxid sodný- Genomed, Německo
- chlorid draselný- New England BioLabs, USA
- chlorid sodný, Carl Roth GmbH, Německo
- IPTG- Carl Roth GmbH, Německo
- isopropylalkohol- Genomed, Německo
- kyselina boritá- Lachema a.s., ČR
- kyselina chlorovodíková- Genomed, Německo
- kyselina octová- Lachema a.s., ČR
- metanol- Lachema a.s., ČR
- persulfát amonný- Sigma, USA
- SDS- Sigma, USA
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin), Carl Roth GmbH, Německo
- Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan)- Genomed, Německo

- trypton- Carl Roth GmbH, Německo
- β -merkaptotanol- Carl Roth GmbH, Německo

4.1.2 Přístroje

- agarosová elektroforesa- RELS-MIDI
- centrifuga pro mikrozkušavky- M24, Boeco
- elektroforesa pro SDS- BioRad, Itálie
- elektrický vařič- Eta
- iluminátor- UVT-14 M, Herolab
- laboratorní váhy- HF-200g, AND, USA
- přístroj pro PCR - Mastercycler Personal, Eppendorf
- termostat- BT 120M, Lab. přístroje, ČR
- třepačka- Orbital Incubator, Gallenkap
- vodní lázeň- Memmert, UK
- vortex- RX³, Velp Scientifica, Itálie
- zdroj napětí pro elektroforesu- Consort E143, Belgie

4.1.3 Ostatní materiál

- DNA primery- Generi Biotech s.r.o., ČR
- *E. coli* BL21 (Rosetta), Stratagene, USA
- *E. coli* DL5 α (TOP 10), Stratagene, USA
- High Phusion polymerasa- New England BioLabs, USA
- High Phusion CG pufr- New England BioLabs, USA
- High Phusion HF pufr- New England BioLabs, USA
- KpnI- New England BioLabs, USA
- laboratorní sklo- Simax, ČR
- mikrozkušavky- Eppendorf, Německo
- NotI- New England BioLabs, USA
- PCR Master Mix- Thermo Scientific, USA
- Pfu DNA polymerasa- Stratagene, USA
- Pfu Ultra pufr- Stratagene, USA

- pGEX-4T-1- GE Health Care, USA
- pipety- Eppendorf, Německo
- pST39- dar od dr. Evžena Bouři, NIH, USA
- pufr O- Fermentas, Kanada
- pufr Tango- Fermentas, Kanada
- rukavice, Beromed GmbH, Německo
- Sall- New England BioLabs, USA
- standard molekulových vah- Precision Plus Protein™ Dual Color Standard- BioRad, USA
- standard velikosti oligonukleotidů- Gene Ruler 1kB DNA Ladder, Fermentas, Kanada
- špičky pro pipety, INSET, ČR
- T4 DNA ligasa- Fermentas, Kanada
- T4 DNA „ligase“ pufr- Fermentas, Kanada
- vektor- pGEX-4T-1- Invitrogen, USA
- vektor- pST39
- XhoI- Fermentas, Kanada
- zdroj deionizované vody Milli Q- Millipore, USA

4.2 Pracovní postup a metodika práce

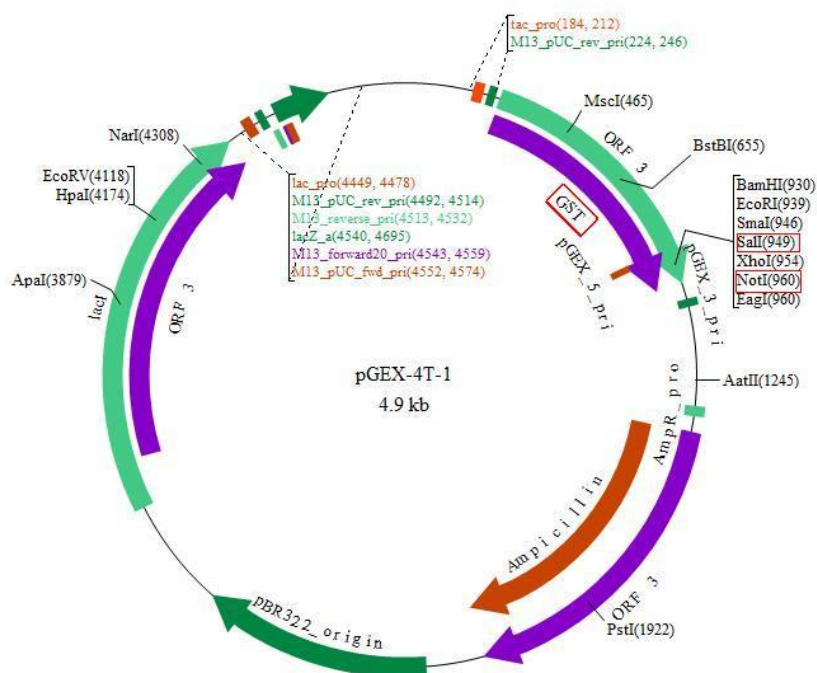
4.2.1 Plasmidy

Pro práci byly použity plasmidy pGEX-4T-1 a pST39. Oba tyto vektory jsou resistantní vůči antibiotiku ampicilinu (Amp). Vektor pGEX-4T1 umožňuje expresi rekombinantních proteinů jako fuzních proteinů s glutathion-S-transferasou (GST) na N-konci (viz obr. 4.1, str. 23). GST se skládá z 220 aminokyselin a má relativní molekulovou hmotnost 26000. Výhodou plasmidu pGEX-4T-1 je také to, že obsahuje restriční místa pro endonukleasy Sall a NotI, které jsou vhodné pro vnesení proteinu SUG1 do tohoto vektoru.

Tato restriční místa mají sekvenci:

NotI: 5'- gcggccgc - 3'

Sall: 5'- gtcgac- 3'



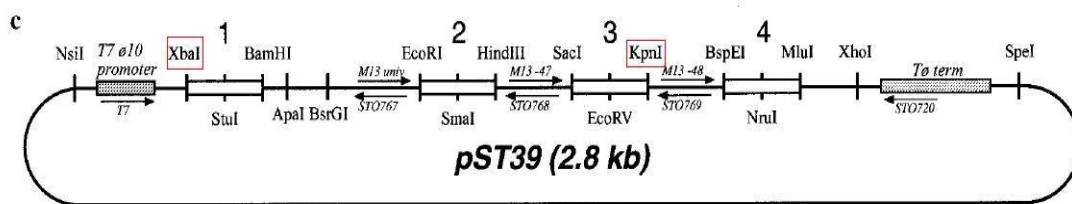
Obr. 4.1: Mapa plasmidu pGEX-4T-1. V červených rámečcích jsou označena restrikční místa pro endonukleasy NotI a SalI a taky motiv pro GST (převzato z [26] a upraveno).

Plasmid pST39 obsahuje restrikční místa XbaI a KpnI (viz obr. 4.2, str. 24), která umožňují vnesení sekvence SUG1 do tohoto vektoru (protože sekvence SUG1 neobsahuje místa štěpená těmito enzymy). pST39 umožňuje expresi rekombinantních proteinů jako fuzních proteinů s motivem šesti histidinů v řadě, tzv. „His-tag“, na C-konci. „His-tag“ má relativní molekulovou hmotnost 1000 a velmi zjednodušuje purifikaci proteinů, neboť umožňuje použití chelatační chromatografie (typicky na začátku purifikace). S vektorem pST39 je možné proteiny exprimovat i v nepřítomnosti induktoru prostřednictvím tzv. „leakage“ exprese.

Sekvence restrikčních míst u plasmidu pST39 je následující:

XbaI: 5'- tctaga - 3'

KpnI: 5'- ggtacc - 3'



Obr. 4.2: Mapa plasmidu pST39, na které jsou v červených rámečcích vyznačena štěpná místa pro restriční endonukleasy XbaI a KpnI (převzato z [27] a upraveno).

4.2.2 Kultivace bakterií

Bakterie byly kultivovány v tekutém LB médiu (médiu dle Luria-Bertaniho) v třepačce při teplotě 37 °C za konstantního třepání 200 ot./min nebo při teplotě 37 °C v termostatu na pevném LB agaru (viz složení LB agaru níže), v obou případech cca 16 hodin. Do obou kultivačních směsí bylo přidáno antibiotikum Amp tak, aby jeho konečná koncentrace byla 100 µg/ml.

Příprava LB média

LB agar (8 g) byl rozpuštěn ve 200 ml deionizované vody v uzavíratelné 200 ml skleněné láhvi. Roztok byl následně sterilizován v autoklávu (15 min, 120 kPa, 121 °C), ochlazen a uchováván při teplotě 4 °C.

Příprava LB agarových misek

LB agar (8 g) byl rozpuštěn ve 200 ml deionizované vody v uzavíratelné 200 ml skleněné láhvi. Roztok byl následně sterilizován v autoklávu (15 min, 120 kPa, 121 °C) a ochlazen. Poté do něj byl přidán roztok ampicilinu tak, aby jeho konečná koncentrace v LB agaru byla 100 µg/ml. Roztok byl promíchán a nakonec nalit do Petriho misek (~20 ml na jednu Petriho misku).

- Složení LB agaru: trypton (10 g/dm³), kvasničný extrakt (5 g/dm³), NaCl (10 g/dm³), agar (15 g/dm³)

4.2.3 Skladování bakterií

Při krátkodobém skladování byly bakterie uchovávány na Petriho miskách obalených parafilmem v lednici při teplotě 4 °C. Při skladování dlouhodobém byly bakterie

smíchány s glycerolem tak, aby jeho finální koncentrace byla 30 % (v/v). Tato směs byla uchována v mikrozkuvkách při teplotě -78 °C.

4.2.4 Transformace bakterií

Transformace, neboli proces horizontálního přenosu genetické informace z kruhové DNA do kompetentních buněk, se provádí metodou teplotního šoku („heat shock“), při které jsou bakterie nejprve inkubovány v ledu a následně jsou vystaveny teplotě 42 °C po dobu 45 s ve vodní lázni. V tomto kroku dochází k vnesení plasmidové DNA. Následně jsou bakterie na 1 minutu vloženy na led.

K rozmraženým kompetentním buňkám *E. coli* DL5α v mikrozkuvce bylo přidáno 100 ng plasmidové DNA (pGEX-4T-1, resp. pST39) a směs byla inkubována 15 minut při teplotě 0 °C. Následně byla směs inkubována 45 s ve vodní lázni při teplotě 42 °C a poté 1 minutu při teplotě 0 °C. Dále byl ke směsi přidán 1 ml sterilního LB média neobsahujícího antibiotikum a tato směs byla inkubována po dobu 45 minut při konstantním třepání 200 ot./min a teplotě 37 °C. Následně byla směs centrifugována při 845 g po dobu 2 minut, poté byl odstraněn supernatant tak, aby ho v mikrozkuvce asi 50 µl zůstalo a v tomto objemu byla resuspendována vzniklá peleta buněk. Tato bakteriální kultura byla asepticky nanesena na Petriho misku s LB agarem obsahujícím Amp o konečné koncentraci 100 µl/ml. Petriho miska byla následně inkubována v termostatu při teplotě 37 °C přes noc.

Po inkubaci byly vybrány 2 bakteriální kolonie ke kultivaci a přeneseny do zkumavek obsahujících 5 ml tekutého LB média s obsahem Amp o koncentraci 100 µl/ml. Zkumavky s bakteriálními koloniemi byly následně inkubovány při teplotě 37 °C v třepačce (200 ot./min) 16 hodin.

4.2.5 Isolace plasmidové DNA

Pro izolaci plasmidu, neboli kruhové dvouvláknové DNA (dsDNA), která je schopná autonomní replikace, z bakterií *E. coli* (DH5α) inkubovaných cca 16 hodin v 5 ml LB média v třepačce (200 ot./min) při teplotě 37 °C byl využit JetQuick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, Německo) a bylo postupováno podle instrukcí uváděných výrobcem. Tedy: buňky byly nejprve centrifugovány v mikrozkuvkách (1 min, 15871 g), následně bylo k buňkám přidáno 250 µl roztoku G1 a tato směs byla promíchána. Poté bylo přidáno

250 μ l roztoku G2 a směs byla při laboratorní teplotě inkubována po dobu cca 5 minut. Nakonec bylo přidáno 350 μ l roztoku G3, směs byla lehce promíchána a centrifugována při 15871 g po dobu 10 minut. Supernatant byl následně odpipetován do kolony s filtrem, která byla součástí sady. Kolona byla umístěna do rezervoáru, který byl rovněž součástí sady, a opět došlo k centrifugaci, tentokrát po dobu 1 minuty při 15871 g. Roztok, který přes kolonu protekl, byl odstraněn a kolona byla vrácena do rezervoáru. Do kolony bylo následně odpipetováno 500 μ l roztoku G4, poté proběhla centrifugace při 15871 g po dobu 1 minuty. Při stejných podmínkách byla provedena ještě jedna centrifugace pro odstranění zbytků roztoku G4. Kolona byla nakonec vložena do mikrozkušavky, bylo na ni odpipetováno 40 μ l sterilní vody o teplotě 60 °C, směs byla inkubována při laboratorní teplotě cca 1 minutu a ještě centrifugována, opět při 15871 g po dobu 1 minuty. V tomto kroku došlo k eluci dsDNA z kolony společně s vodou.

Složení roztoků:

- G1: 50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 100 μ g/ml RNAsa (Genomed)
- G2: 200 mM NaOH, 1% SDS (w/v) (Genomed)
- G3: acetát sodný, guanidin hydrochlorid (Genomed)
- G4: etanol, chlorid sodný, EDTA, Tris/HCl (Genomed)

4.2.6 PCR

Polymerasová řetězová reakce, PCR (polymerase chain reaction), je reakce řízená enzymy a dochází při ní k amplifikaci určitého úseku DNA. V podstatě se jedná o replikaci DNA in vitro. PCR má velké laboratorní využití např. při určování otcovství, klonování, diagnostice infekčních onemocnění atd.

Pro provedení PCR reakce potřebujeme templátovou (matricovou) DNA obsahující úsek, který chceme amplifikovat; oligoribonukleotidy (primery), které určují počátek a konec amplifikovaného segmentu; DNA polymerasu, která syntetizuje dceřiné vlákno podle templátové DNA; všechny čtyři dNTPs (deoxyribonukleotidtrifosfáty- dATP, dGTP, dCTP a dTTP), ze kterých DNA polymerasa syntetizuje nově vznikající komplementární vlákno; pufr, který zajišťuje vhodné prostředí pro reakci a sterilní vodu.

DNA polymerasa syntetizuje komplementární vlákno ve směru od jeho 5'-konce k 3'-konci. DNA polymerasa nevytváří vlákno „de novo“, ale pouze připojuje dNTPs k 3'-konci nového dceřiného vlákna, a proto se do reakční směsi přidávají primery, což jsou

uměle syntetizované oligoribonukleotidy, které při vhodných reakčních podmínkách nasedají na komplementární úsek mateřské DNA a na jejichž 3'-konce připojuje DNA polymerasa zmíněné dNTPs.

Polymerasová řetězová reakce se provádí ve třech opakujících se krocích. V prvním kroku je teplota nastavena na 94-98 °C a dochází při něm k separaci dvou vláken dsDNA. V druhém kroku se teplota sníží na 45-65 °C a dochází k nasednutí (annealingu) oligoribonukleotidů (primerů) na komplementární úsek mateřské, teď již jen jednovláknové, ssDNA. Ve třetím kroku se teplota zvýší na 70-74 °C a dochází při něm k prodlužování (elongaci) řetězce. Tyto tři kroky se většinou opakují 20-30x a tím dojde k syntéze požadovaného množství DNA. Konečný PCR produkt pak obsahuje velké množství požadovaného úseku DNA, neboť amplifikace roste geometrickou řadou.

PCR byla použita pro amplifikaci sekvence kódující lidský homolog proteinu SUG1. Design oligoribonukleotidů byl konzultován s Mgr. Daliborem Koškem. Byly navrženy následující oligoribonukleotidy:

- **pro sekvenci kódující SUG1 s následnou ligací do pGEX-4T-1 měly oligoribonukleotidy sekvenci:**

SUG1 pGEX-4T-1 fw1

5'- caa cgt cga ctc atg gcg ctt gac gga cca gag cag atg gag-3'

SUG1 pGEX-4T-1 rev

5'- agt agc ggc cgc tca ctt cca taa ttt ctt gat gga cat gtt-3'

- **pro sekvenci kódující SUG1 s následnou ligací do pST 39 měly oligoribonukleotidy sekvenci:**

SUG1 pST39 fw

5'- cag act cta gaa ata att ttg ttt aac ttt aag aag gag ata tac ata tgg cgc ttg acg gac cag agc aga tgg ag-3'

SUG1 pST39 rev

5'- cag acg gta ccc tag tgg tga tga tgg tga tgg ctg ctg ttc ttc cat aat ttc ttg atg gac atg ttt ttc tc-3'

PCR reakce byla realizována pomocí dvou různých DNA polymeras. V případě genu SUG1 následně vneseného do plasmidu pGEX-4T-1 to byla Pfu Ultra DNA polymerasa (Stratagene, USA) a v případě genu SUG1 následně vneseného do vektoru pST39 to byla High Phusion DNA polymerasa (New England BioLabs, USA).

Složení PCR reakční směsi:

Gen kódující SUG1 následně vnesený do pGEX-4T-1

- 38,5 µl sterilní H₂O
- 5 µl reakční Pfu Ultra pufr
- 0,5 µl templátová DNA (SUG1 v plasmidu pQ1)
- 1 µl 10 mM DTP
- 2 µl 0,1 mM primer SUG1 pGEX-4T-1 fw1
- 2µl 0,1 mM primer SUG1 pGEX-4T-1 rev
- 1 µl Pfu Ultra DNA polymerasa (2,5 U/µl)

Gen kódující SUG1 následně vnesený do pST39

- 28,4 µl sterilní H₂O
- 10 µl reakční HF pufr
- 0,1 µl templátová DNA (SUG1 v plasmidu pQ1)
- 1 µl 10 mM DTP
- 5 µl 0,1 mM primer SUG1 pST39 fw
- 5 µl 0,1 mM primer SUG1 pST39 rev
- 0,5 µl High Phusion DNA polymerasa (2 U/µl)

Složení reakčního Pfu pufru: 0,1 M KCl; 0,1 M (NH₄)₂SO₄; 0,2 M Tris/HCl (pH 8,8); 0,02 M MgSO₄; 1% Triton-X-100; 1 g/dm³ BSA

Složení reakčního HF pufru: výrobce neuvádí

PCR reakce byla provedena v termocykleru Mastercycler Personal (Eppendorf).

Program pro PCR reakční směs s primery SUG1 pGEX-4T-1 fw1 a SUG1 pGEX-4T-1 rev a Pfu polymerasou byl nastaven takto:

1. 95°C, 2 min
2. 1. fáze: 95°C, 30 s
3. 2. fáze: 45°C, 30 s
4. 3. fáze: 72°C, 2 min
5. 72°C, 10 min
6. 4°C, dokud nebyl produkt z termocykleru vyjmut

Cyklus byl opakován od 2. do 4. kroku 25x.

Program pro PCR reakční směs s primery SUG1 pGEX-4T-1 fw1 a SUG1 pGEX-4T-1 rev a HF polymerasou byl nastaven takto:

1. 98°C, 30 s
2. 1. fáze: 98°C, 10 s
3. 2. fáze: 55°C, 30 s
4. 3. fáze: 72°C, 1 min 30 s
5. 72°C, 10 min
6. 4°C, dokud nebyl produkt z termocykleru vyjmut

Cyklus byl opakován 25x od 2. do 4. kroku.

4.2.7 Horizontální agarosová elektroforesa

Horizontální agarosová elektroforesa (HAE) je elektromigrační separační metoda, která k dělení molekul využívá jejich odlišnou mobilitu ve stejnosměrném elektrickém poli. Jelikož DNA má záporný náboj, putuje od katody k anodě v závislosti na své velikosti, kdy se menší molekuly pohybují rychleji než molekuly velké.

Příprava gelu na HAE byla provedena následujícím způsobem. Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 0,6 g agarosy. Následně bylo přidáno 60 ml 1x koncentrovaného TBE pufru a tato směs byla zvážena na laboratorních váhách a následně povařena cca 3 minuty v mikrovlnné troubě. Poté, co díky varu došlo k úplnému rozpuštění agarosy, byl roztok doplněn deionizovanou vodou na původní hmotnost. Poté bylo do roztoku přidáno 0,4 µl GelRedu, což je fluorescenční sonda, která se váže na DNA a po excitaci UV světlem fluoreskuje. Tato směs byla následně nalita do vaničky, která je k tomuto účelu určená a nechala se cca 40 minut zatuhnout. Poté se vanička s gelem přenesla do nádoby s elektrodami, která byla naplněna 1x koncentrovaným TBE pufrem. Při nanášení vzorků na gel byl do první jamky pipetován standard obsahující směs fragmentů DNA o známých délkách, podle nichž se při vyhodnocování odečítala velikost zkoumané DNA. Standardem byl Gene Ruler 1 kB DNA Ladder (Fermentas, Kanada). Elektroforesa byla prováděna za konstantního napětí 100 V.

- Složení TBE pufru (1x koncentrovaný, pH 8): 100 mM Tris; 90 mM kyselina boritá; 1 mM EDTA
- Složení směsi pro elektroforesu: 7 µl sterilní H₂O, 3 µl PCR produktu, 3 µl Loading Dye (New England BioLabs, USA)

Výsledky z HAE byly zkontrolovány na iluminátoru UVT-14M (Herolab).

4.2.8 Čištění PCR produktu

Pro získání čistého produktu PCR reakce byla použita sada PCR Product Purification Spin Kit/50 (Genomed, Německo). Bylo postupováno podle instrukcí výrobce, tedy: k 50 μl PCR produktu bylo přidáno 200 μl roztoku H1, směs byla promíchána a následně převedena na kolonu s filtrem, která byla nasazena do rezervoáru. Směs pak byla centrifugována při 15871 po dobu 1 minuty. Poté, co byl vylit supernatant, bylo na kolonu odpipetováno 500 μl roztoku H2 a směs byla opět centrifugována při 15871 g po dobu 1 minuty. Supernatant byl odstraněn a byla provedena centrifugace za stejných podmínek pro odstranění zbytků roztoku H2. Kolona byla následně vložena do mikrozkušavky a bylo na ni odpipetováno 42 μl sterilní H_2O . Poté, co byla směs inkubována cca 1 minutu při laboratorní teplotě, byla centrifugována při 15871 g po dobu 2 minut.

Složení roztoků:

- H1: koncentrovaný guanidin hydrochlorid, EDTA, pufr Tris/HCl, isopropanol (Genomed)
- H2: etanol, NaCl, EDTA, pufr Tris/HCl (Genomed)

4.2.9 Štěpení DNA restrikčními enzymy

Výsledný přečištěný produkt PCR reakce, tedy amplifikovaný gen kódující SUG1, bylo třeba naštěpit restrikčními endonukleasami tak, aby místa štěpení byla shodná se restrikčními místy plasmidové DNA.

V našem případě byl gen kódující SUG1 a plasmid pGEX-4T-1 štěpen restrikčními enzymy SalI a NotI a pro vnesení sekvence kódující SUG1 do vektoru pST39 bylo použito restrikčních endonukleas XbaI a KpnI. Po přidavku těchto štěpících enzymů byla směs inkubována po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C v termostatu a poté bylo správné štěpení zkontrolováno pomocí agarosové elektroforezy.

Štěpící směs obsahovala:

1. Štěpení plasmidu pGEX-4T-1
 - 5 μl sterilizované H_2O
 - 1,2 μl pufru O.
 - 5 μl plasmidové DNA pGEX-4T-1
 - 0,4 μl SalI (20 U/ μl)
 - 0,4 μl NotI (10 U/ μl)

2. Štěpení DNA kódující SUG1 pro pGEX-4T-1

- 10 μl přečištěného PCR produktu
- 1,2 μl pufru O.
- 0,4 μl SalI (20 U/ μl)
- 0,4 μl NotI (10 U/ μl)

3. Štěpení plasmidu pST39

- 5 μl sterilizované H_2O
- 1,2 μl pufru T.
- 0,3 μl XbaI (10 U/ μl)
- 0,6 μl KpnI (10 U/ μl)

4. Štěpení DNA kódující SUG1 pro pST39

- 10 μl přečištěného PCR produktu
- 1,2 μl pufru T.
- 0,3 μl XbaI (10 U/ μl)
- 0,6 μl Kpn I (10 U/ μl)

Složení pufru O.: 500 mM Tris/HCl (pH 7,5); 100 mM MgCl_2 ; 1 M NaCl; 0,1 mg/ml BSA

Složení pufru T.: 330 mM Tris/acetát; 100 mM octan hořečnatý; 660 mM octan draselný; 0,1 mg/ml BSA

4.2.10 Separace DNA z agarosového gelu

Po naštěpení plasmidové DNA, genu pro rekombinantní protein a následném zkontrolování výsledků pomocí agarosové elektroforesy, byly DNA z gelu vypreparovány a následně vloženy do mikroskopických kumavek. K odstranění agarosy byla použita sada Jetquick Gel Extraction Spin Kit (Genomed, Německo). Při separaci bylo postupováno podle instrukcí výrobce, tedy: nejprve bylo k agarose v mikroskopické kumavce, jejíž součástí byla i DNA, přidáno 300 μl roztoku L1 na každých 100 mg agarosy. Tato směs byla následně inkubována ve vodní lázni při teplotě 50 $^\circ\text{C}$, dokud se všechna agarosa nerozpustila. Směs byla zároveň každé 3 minuty promíchávána. Následně byla rozpuštěná směs přenesena na kolonu s filtrem, která byla součástí sady, a ta byla nasazena do rezervoáru. V takovém provedení byla směs centrifugována při 15871 g po dobu 1 minuty. Po odstranění supernatantu byla tatáž kolona opět nasazena do rezervoáru a bylo na ni přeneseno 500 μl

roztoku L2. Směs byla centrifugována 1 minutu při 15871 g. Při stejných podmínkách byla provedena ještě jedna centrifugace pro odstranění zbytků roztoku L2. Kolona, na jejímž filtru byl usazen čistý štěpený vektor resp. gen kódující protein, byla následně nasazena do mikrozkuřavky, na střed kolony bylo odpipetováno 30 μl sterilní H_2O a tato směs byla centrifugována při 15871 g po dobu 2 minut. Tím byl získán čistý naštěpený DNA plasmid resp. sekvence kódující protein.

Složení roztoků:

- L1: Chaotropická sůl, TBE- solubilizer (Genomed)
- L2: NaCl, EDTA, Tris/HCl (Genomed)

4.2.11 Ligace

Ligace slouží ke spojení molekuly štěpeného plasmidu se štěpenou molekulou DNA kódující rekombinantní protein. K tomu je zapotřebí DNA ligasy, enzymu, který kovalentně spojuje fragmenty DNA. V našem případě bylo použito T4 DNA ligasy (Fermentas, Kanada), což je enzym, který byl získán z buněk *E. coli* infikovaných T4 fágem.

Ligační směs obsahovala 2 μl ligačního pufru specifického pro T4 DNA ligasu (viz složení T4 ligačního pufru); 7 μl čistého PCR produktu (sekvence kódující SUG1); 0,5 μl plasmidové DNA (pGEX-4T-1 resp. pST39) a 0,5 μl T4 DNA ligasy (5 U/ μl). Po namíchání směsi v mikrozkuřavce byla směs inkubována po dobu cca 30 minut při laboratorní teplotě. V průběhu této inkubace byly na ledu rozmrazeny kompetentní buňky *E. coli* (kmen DL5 α). Po uplynutí inkubační doby byla ligační směs přidána ke kompetentním buňkám a směs byla inkubována 10 minut při teplotě 0 $^{\circ}\text{C}$. Následně byl proveden „heat shock“ (45 s při 42 $^{\circ}\text{C}$) a směs byla inkubována v ledu po dobu 1 minuty. Poté byla směs ponechána 40 minut v termostatu při teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$. Směs byla následně 2 minuty centrifugována při 1503 g, supernatant byl odstraněn tak, aby jej na dně mikrozkuřavky cca 50 μl zůstalo, směs byla resuspendována a poté asepticky nanesena na nahřátou LB agarovou Petriho misku obsahující Amp o koncentraci 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Miska byla inkubována v termostatu při 37 $^{\circ}\text{C}$ cca 16 hodin.

- Složení T4 ligačního pufru (pH 7,8 při 25 $^{\circ}\text{C}$): 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl_2 , 5 mM ATP, 100 mM DTT

4.2.12 „Colony PCR“

„Colony PCR“ je analytická metoda, která slouží ke kontrole proběhnuté ligace. Od PCR reakce popsané v kapitole 4.2.6 (str. 26) se liší tím, že jako templátová DNA se zde používá plasmidová DNA přítomná v bakteriálních buňkách. Bakteriální kolonie, která obsahuje příslušný plasmid, je tedy přímo přenesena do reakční „colony PCR“ směsi.

Po namíchání směsi pro tzv. „colony PCR“ (viz níže) byly jednotlivé kolonie, které při inkubaci „narostly“ na LB agarových miskách, přeneseny pomocí špiček pro pipety a tyto špičky byly ponořeny do „colony PCR“ směsi tak, aby se dotkly dna mikrozkušavky. Tím se do směsi dostala bakteriální kolonie obsahující kýženou rekombinantní DNA. Špičky, kterými byly kolonie přeneseny z LB agarových misek do mikrozkušavek byly uchovány pro další práci.

Složení směsi pro tzv. „colony PCR“:

- 8 µl sterilní H₂O
- 1 µl 0,1 mM fw primeru (SUG1 pGEX-4T-1 fw1 resp. SUG1 pST39 fw)
- 1 µl 0,1 mM rev primeru (SUG1 pGEX-4T-1 rev resp. SUG1 pST39 rev)
- 10 µl MM PCR (MasterMix PCR- směs obsahující Taq polymerasu)

Program na termocykleru byl pro „colony PCR“ nastaven takto:

- Pro vektor pGEX-4T-1 obsahující insert SUG1:
 1. 95°C, 10 min
 2. 95°C, 30 s
 3. 45°C, 30 s
 4. 72°C, 2 min
 5. 72°C, 10 min
 6. 4°C, dokud nebyl produkt z termocykleru vyjmut

Cyklus byl opakován 25x od 2. do 4. kroku.

- Pro vektor pST39 obsahující insert SUG1:
 1. 95°C, 10 min
 2. 95°C, 30 s
 3. 55°C, 30 s
 4. 72°C, 2 min
 5. 72°C, 10 min
 6. 4°C, dokud nebyl produkt z termocykleru vyjmut

Cyklus byl opakován 25x od 2. do 4. kroku.

Poté, co byl produkt „colony PCR“ zkontrolován pomocí agarosové elektroforesy, byly uchované špičky se zbytky bakteriálních kolonií vhozeny do 5 ml sterilního LB média obsahujícího Amp o finální koncentraci 100 µg/ml. Tato směs byla následně inkubována přes noc na třepačce (200 ot./min) při teplotě 37 °C. Následná izolace plasmidové DNA z bakteriálních buněk byla provedena pomocí JetQuick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, Německo) (viz kapitola 4.2.5, str. 25).

Nakonec byla plasmidová DNA naštěpena restrikními endonukleasami stejně, jako je uvedeno v kapitole 4.2.9 (str. 30). Restrikní štěpení bylo provedeno ke kontrole, zda byla do plasmidu vnesena sekvence genu *SUG1* o správné délce. Délka molekul DNA byla ověřena pomocí agarosové elektroforesy.

4.2.13 Sekvenování DNA

Sekvenování DNA je metoda, která se používá ke zjištění pořadí nukleových bází (A-adenin, G-guanin, C-cytosin a T-thymin) ve vláknech DNA. V dnešní době je nejvíce využívanou metodou sekvenace tzv. Sangerova metoda, která je založena na sekvenování pomocí detekce ukončení prodlužujícího se vlákna DNA. Vlastní sekvenace se pak uskutečňuje ve čtyřech zkumavkách obsahujících dideoxyribonukleotidy (ddNTPs). Každá ze zkumavek obsahuje pouze jeden druh dideoxyribonukleotidů (ddATP, ddGTP, ddCTP nebo ddTTP), templátovou DNA, oligoribonukleotidy (primery), DNA polymerasu a deoxyribonukleotidy (dNTPs). Fragmenty DNA, které reakcí vzniknou, mají různou délku a jsou zakončeny ddNTPs, které jsou fluorescenčně označeny. Tyto fragmenty jsou následně denaturovány a elektroforeticky roztrženy. Vzhledem k tomu, že každá směs obsahuje jiný ddNTP a má při elektroforese vlastní dráhu, lze pak podle zón, kam jednotlivé fragmenty doputovaly, odečíst sekvenci DNA.

Čistý produkt „colony PCR“ byl zaslán k analýze do Laboratoře sekvenace DNA, Viničná 7, Praha 2. Laboratoř si pro analýzu vyžádala, aby DNA, jejíž sekvence měla být zjištěna, byla v koncentraci 5-10 ng/100 bp celkové délky produktu a oligoribonukleotidy v koncentraci 3,2-5 pmol v celkovém objemu 14 µl reakční směsi.

Směsi pro sekvenční reakci obsahovaly:

1. Pro zjištění sekvenace plasmidu pGEX-4T-1 s insertem *SUG1*
 - 11 µl sterilní H₂O

- 2 µl „colony PCR“ produktu (SUG1 v pGEX-4T1)
- 1 µl 0,1 mM primeru (pGEXSUG1rev resp. pGEX4T1seqrev)

Sekvence primerů použitých pro sekvenční analýzu SUG1 v pGEX-4T-1

pGEXSUG1rev: 5'-act cag gca gat tga tct taa g-3'

pGEX4T1seqrev: 5'-gtg act ggg tca tgg ctg cgc c-3'

Sekvenační primer pGEXSUG1rev byl navržen k ověření správné ligace SUG1 do pGEX-4T-1 v restrikčním místě NotI . Sekvenační primer pGEX4T1seqrev byl navržen k ověření správné ligace v restrikčním místě Sall a ke kontrole čtecího rámce při spojení „GST-tag“ se SUG1.

2. Pro zjištění sekvence plasmidu pST39 s insertem SUG1

- 8 µl sterilní H₂O
- 5 µl Colony PCR produktu (SUG1 v pST39)
- 1 µl primeru (T7 promotor, resp. T7 terminator)- přidáno pracovníky Laboratoře sekvence DNA

Sekvence primerů použitých pro sekvenační analýzu SUG1 v pST39:

T7 promotor: 5'-taa tac gac tca cta tag gg-3'

T7 terminator: 5'-gct agt tat tgc tca gcg g-3'

4.2.14 Expresní testy

„Osekvenovaná“ plasmidová DNA obsahující gen pro SUG1 byl transformována do buněk *E. coli* BL21 (Rosetta). V tomto bakteriálním expresním systému byla následně provedena exprese proteinu. Kmen BL21 (Rosetta) bakterie *E. coli* je vhodný pro efektivní expresi proteinů a umožňuje jejich indukci pomocí IPTG (isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid). IPTG je derivátem galaktosy a indukuje expresi rekombinantních proteinů v buňkách. Po jeho přidání k buněčné suspenzi dochází ke spuštění proteosyntézy rekombinantního proteinu. IPTG nebyl použit při expresi SUG1 v pST39, kde exprese probíhá formou tzv. leakage exprese.

Poté, co na LB agarových miskách „narostly“ kolonie bakterií *E. coli* BL21 (Rosetta), které obsahovaly požadovaný vektor s konstruktem SUG1, byly kolonie přeneseny vždy do dvou zkumavek obsahujících cca 5 ml sterilního média LB s Amp o

koncentraci 100 µg/ml. Zkumavky byly inkubovány v třepačce při 200 ot./min a teplotě 37 °C cca 16 hodin. Po uplynutí inkubační doby byly bakteriální kultury ve zkumavkách promíchány na vortexu a vždy 1 ml této kultury byl odpipetován do nové zkumavky. Po přidání 4 ml nového sterilního LB média s Amp o koncentraci 100 µg/ml byly tyto nové zkumavky opět inkubovány v třepačce za stejných podmínek. Po dvou hodinách bylo ze zkumavek odebráno 20 µl bakteriální kultury a do zkumavek bylo přidáno 15 µl IPTG (pouze v případě buněk obsahujících pGEX-4T-1 s insertem SUG1). Následně byly zkumavky opět inkubovány v třepačce při 200 ot./min a teplotě 37 °C. Dalších 20 µl bakteriální kultury bylo ze zkumavek odebráno vždy po dalších 2 a 4 hodinách a poslední vzorek byl odebrán po cca 16 hodinách.

4.2.15 SDS elektroforesa (SDS-PAGE)

SDS elektroforesa je migrační metoda, při které dochází k rozdělení proteinů na základě jejich odlišné hmotnosti. V elektrickém poli se proteiny pohybují podle svého náboje buď ke katodě anebo k anodě. Když se však proteiny vloží do prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS), což je aniontový detergent vážící se na proteiny v konstantním poměru, získají proteiny jednotný záporný náboj a pohybují se pouze k elektrodě kladné, anodě. Rychlost pohybu proteinů je ovlivněna jejich hmotností a to tak, že menší (lehčí) molekuly se pohybují rychleji. Při nanášení vzorků na gel se do první jamky pipetuje standard molekulových vah neboli roztok proteinů, jejichž molekulové hmotnosti jsou známy. Podle tohoto standardu se při vyhodnocování odečítá hmotnost zkoumaného proteinu. Jako standard molekulových vah byl použit Precision Plus Protein Dual Color Standard (BioRad, USA).

Do odebraných vzorků bylo odpipetováno 5 µl SDS-PAGE Sample pufru a směs byla inkubována 5 minut při 100°C. Následně byla směs nanášena do jamek zaváděcího gelu a elektroforesa běžela při standardním napětí 150 V.

Po elektroforese byl gel přenesen do barvicího roztoku a inkubován 30 min při teplotě ~50 °C. Následně byl 30 min inkubován s odbarvovacím roztokem při teplotě ~50 °C. Nakonec byl gel přenesen do čerstvého odbarvovacího roztoku a v něm byl ponechán dalších 48 hodin.

Složení gelů, pufrů a roztoků, které byly použity při SDS- PAGE

- Separáční gel (12%): 2,6 ml deionizovan H₂O; 2,5 ml pufr pro separační gel; 3 ml akrylamid/bis-akrylamid; 45 μ l APS (persulfát amonn ); 5 μ l TEMED
- Zaváděcí gel: 6,15 ml deionizovan H₂O; 2,55 ml pufr pro zaváděcí gel; 1,34 ml akrylamid/bis-akrylamid; 50 μ l APS; 10 μ l TEMED
- Pufr pro separační gel: 21 ml deionizovan H₂O; 75 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8); 4 ml 10% SDS
- Pufr pro zaváděcí gel: 46 ml deionizovan H₂O; 50 ml 0,5M Tris/HCl (pH 6,8); 4 ml 10% SDS
- SDS- PAGE Sample pufr (5x koncentrovan ): 0,9 ml sterilní H₂O; 0,6 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,8); 5 ml 50% glycerol; 2 ml 10% SDS; 0,5 ml β -merkaptoetanol; 1 ml 10% bromfenolov modř
- Pufr pro elektroforesu: 50 mM Tris/HCl (pH 8,3); 385 mM glycin; 0,1% SDS
- Akrylamid/bis-akrylamid: 29,2 g akrylamid; 0,8 g bis-akrylamid; doplněno deionizovanou vodou do 100 ml
- Barvc  roztok: 450 ml deionizovan H₂O; 450 ml metanol; 100 ml ledov kyselina octov; 1 g Coomassie Brilliant Blue R 250
- Odbarvovací roztok: 800 ml deionizovan H₂O; 100 ml metanol; 100 ml ledov kyselina octov

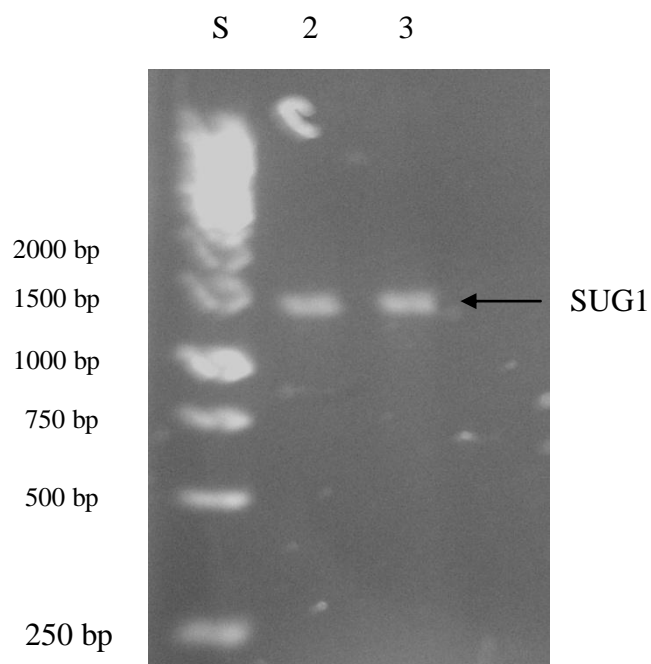
5. Výsledky

5.1 Transformace bakterií, jejich kultivace a izolace plasmidové DNA

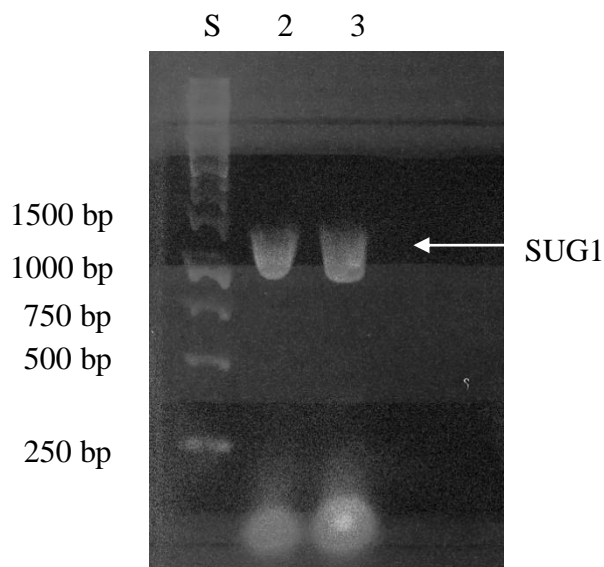
Horizontální přenos genetické informace z plasmidové DNA do kompetentních bakterií *E. coli* (kmen DL5a) byl uskutečněn metodou teplotního šoku (viz 4.2.4, str. 25). Po následné inkubaci těchto bakterií a nárůstu jejich kolonií na Petriho misce s LB agarem obsahujícím antibiotikum ampicilin o koncentraci 100 µg/ml, byly vždy dvě bakteriální kolonie přeneseny do zkumavek obsahujících cca 5 ml LB média obsahujícího ampicilin o koncentraci 100 µg/ml a tyto zkumavky byly následně inkubovány (viz 4.2.4, str. 25). Poté byla plasmidová DNA z bakterií izolována pomocí JetQuick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, Německo) (viz 4.2.5, str. 25).

5.2 Amplifikace genu kódujícího lidský SUG1

Gen kódující protein SUG1 byl získán od školitele a následně amplifikován pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR), která probíhala za podmínek uvedených v kapitole 4.2.6, str 26). Velikost amplifikované DNA byla zkontrolována pomocí agarosové elektroforesy (viz 4.2.7, str. 29) a to tak, že do první jamky na agarosovém gelu byl nanesen 1 µl standardu Gene Ruler 1kB DNA Ladder (Fermentas, Kanada) obsahující směs DNA fragmentů o známé délce a do dalších jamek pak byla odpipetována směs 7 µl sterilní H₂O; 3 µl produktu PCR a 3 µl loading dye. Elektroforesa probíhala asi 45 minut při napětí 100 V. Zóny migrace byly následně odečteny na iluminátoru UVT-14 M (Herolab) (viz obr. 5. 1 a 5. 2, str. 39).



Obr. 5.1: Zóny migrace amplifikovaného genu kódujícího isoformu 1 lidského proteinu *SUG1* pro následné štěpení a ligaci do vektoru *pGEX-4T-1*. „S“ označuje dráhu standardu obsahujícího směs DNA fragmentů o známé velikosti, ve druhé a třetí dráze jsou zřejmé zóny migrace genu kódujícího *SUG1*.



Obr. 5.2: Zóny migrace amplifikovaného genu kódujícího isoformu 1 lidského proteinu *SUG1* pro následné štěpení a ligaci do plasmidu *pST39*. „S“ značí dráhu standardu obsahujícího směs DNA fragmentů o známé velikosti, ve druhé a třetí dráze jsou zřejmé zóny migrace genu kódujícího *SUG1*.

5.3 Restrikční štěpení DNA

Výsledná amplifikovaná DNA z PCR reakce (viz obr. 5.1 a 5.2, str. 39) byla přečištěna pomocí PCR Product Purification Spin Kit (Genomed, Německo) (viz 4.2.8, str. 30) a následně štěpena restrikčními endonukleasami. Zároveň byl příslušnými restrikčními enzymy naštěpen i plasmid pGEX-4T-1, resp. pST39 (viz 4.2.9, str. 30). Správné štěpení bylo zkontrolováno pomocí agarosové elektroforezy (viz 4.2.7, str. 29).

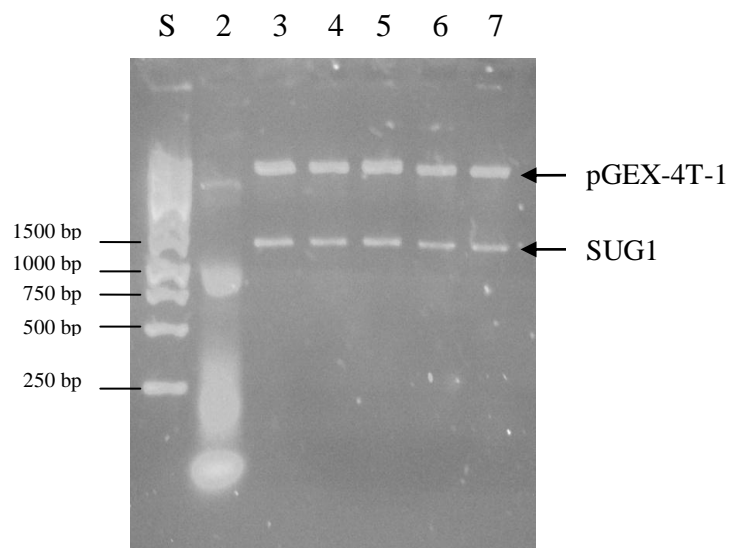
Poté byla provedena separace DNA z agarosového gelu. Po získání částí gelu obsahujících plasmid či gen pro SUG1, byl vektor i gen proteinu extrahován pomocí Jetquick Gel Extraction Spin Kit (Genomed, Německo) (viz 4.2.10, str. 31).

5.4 Ligace a „colony PCR“

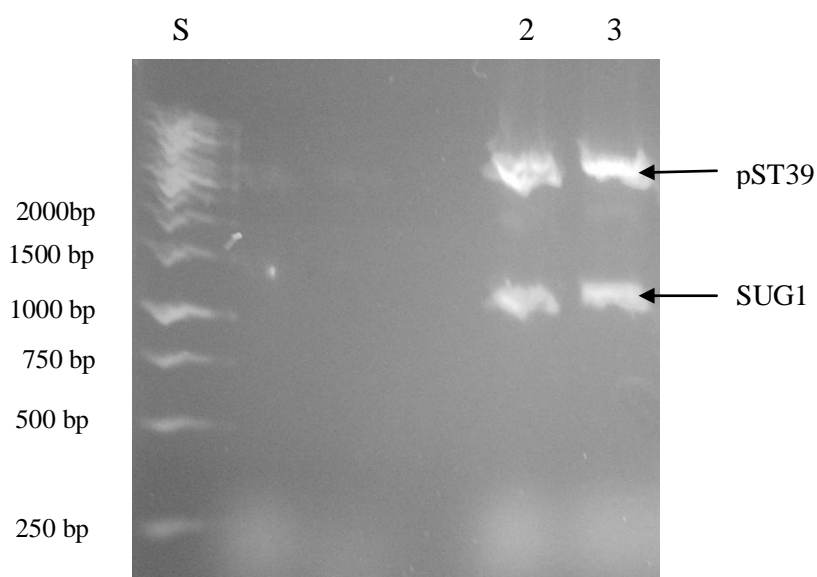
Dalším experimentálním krokem bylo vnesení genu SUG1 do plasmidu, neboli ligace, která byla použita katalyzována T4 DNA ligasou. Tento enzym kovalentně spojil volné kohezní konce vektoru (pGEX-4T-1, resp. pST39) a proteinu SUG1, které se spolu navzájem párovaly. Samotná ligace byla uskutečněna v prostředí ligačního pufru (viz 4.2.11, str. 32).

Pro kontrolu výsledků ligace byla použita metoda tzv. „colony PCR“ (viz 4.2.12, str. 33). V obou případech (jak u pGEX-4T-1, tak u pST39) následná gelová elektroforeza ukázala, že ligace proběhla a DNA obsahuje gen SUG1. Proto bakterie, u nichž byla zkontrolována přítomnost rekombinantní DNA, byly dále přeneseny do 5 ml LB média s Amp o konečné koncentraci 100 µg/ml a inkubovány přes noc při 37 °C za konstantního třepání 200 ot./min. Druhý den byla plasmidová DNA (obsahující vložený gen SUG1) izolována a byla provedena kontrolní restrikční analýza (viz obr. 5.3 a 5.4, str. 41).

Na obrázcích 5.3 a 5.4 (str. 41) je patrné, že plasmidová DNA obsahovala gen pro SUG1, protože po inkubaci s restrikčními enzymy NotI a Sall (pGEX4T-1) a XbaI a KpnI (pST39) vznikl fragment o velikosti, která přesně odpovídá délce genu kódujícího SUG1.



Obr. 5.3: Restrikční analýza konjektu *SUG1* v *pGEX-4T-1*. Zóny migrace těchto dvou produktů jsou zjevné v dráhách 3-7. „S“ značí dráhu pro standard obsahující směs DNA fragmentů o známé délce. Plasmidová DNA byla štěpena restrikčními endonukleasami *NotI* a *Sall*.



Obr. 5.4: Restrikční analýza konjektu *SUG1* v *pST39*. Zóny migrace těchto dvou produktů jsou zjevné v dráze 2 a 3. „S“ značí dráhu pro standard se směsí DNA fragmentů o známé délce. Plasmidová DNA byla štěpena restrikčními endonukleasami *XbaI* a *KpnI*.

5.5 Sekvenování DNA

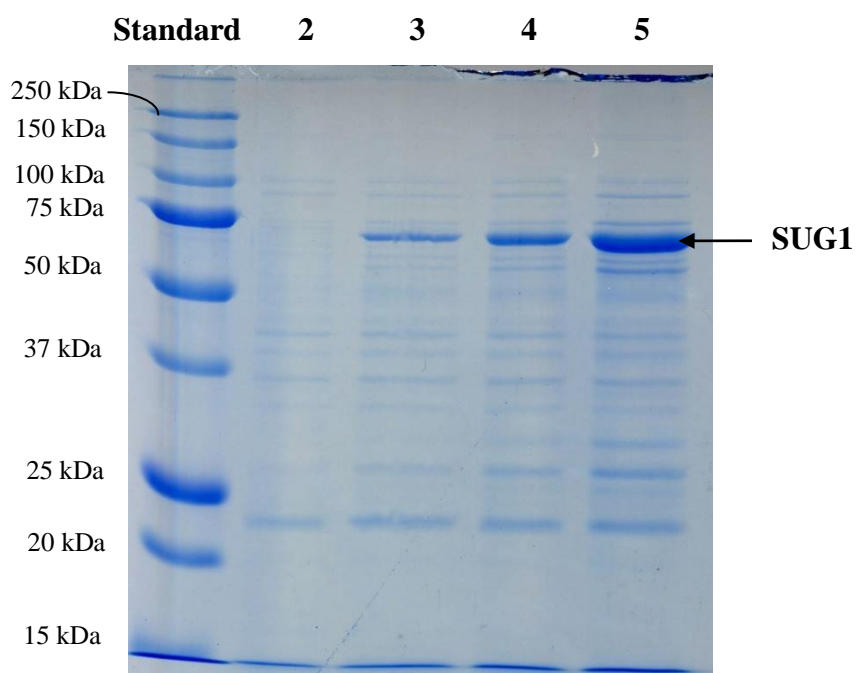
Vzorky, které obsahovaly SUG1 vnesené do příslušného plasmidu, byly odeslány do Laboratoře sekvence DNA, Viničná 7, Praha 2. Poté, co byly získány výsledky, tedy záznamy o pořadí bází v řetězci kruhové DNA, bylo pomocí databáze NCBI BLAST[®] zkontrolováno, že vektory pGEX-4T-1 resp. pST39 v sobě mají obsaženu sekvenci kódující lidský SUG1 (viz 4.2.13, str. 34). Výsledné sekvence jsou přiloženy v Příloze 2 (str. 51) a 3 (str. 53).

5.6 Expresní testy a SDS-PAGE

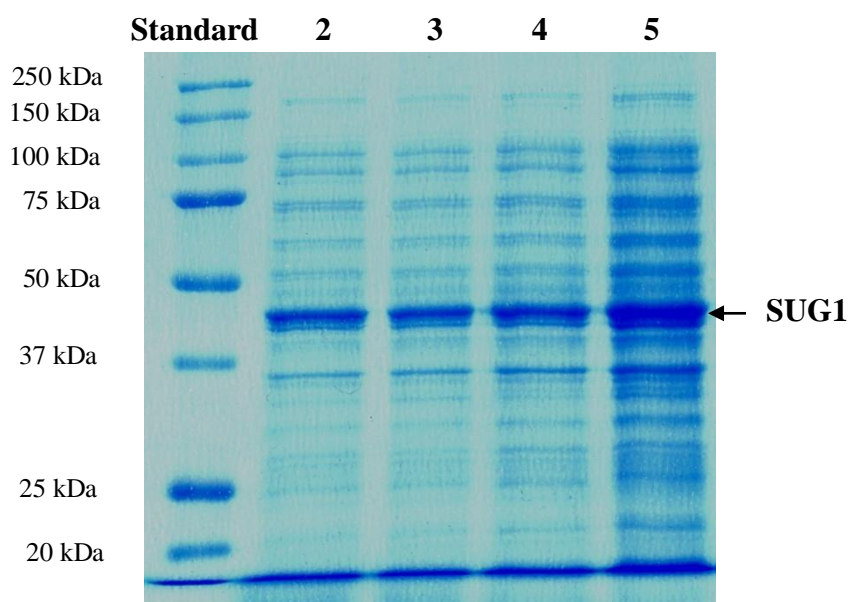
Poté, co byly produkty „colony PCR“ transformovány do buněk *E. coli* BL21 (Rosetta), bakteriálního kmene vhodného pro expresi rekombinantních proteinů, byly provedeny testy exprese. V 5 ml LB média obsahujícího Amp o finální koncentraci 100 µg/ml byly vypěstovány buněčné kultury, které obsahovaly cílový protein SUG1. SUG1 obsažený v pGEX-4T-1 byl indukován pomocí IPTG, zatímco SUG1 nacházející se v sekvenci pST39 takovou indukci nepotřeboval (viz 4.2.1, str. 22). Bakteriální kultury byly inkubovány v třepačce při 200 ot./min a teplotě 37 °C. Vzorky z těchto kultur byly odebrány po 2 hodinách a následovala indukce exprese proteinu pomocí IPTG v případě SUG1 v pGEX-4T-1. Další vzorky byly odebrány po dalších 2, 4 a cca 16 hodinách (viz 4.2.14, str. 35).

Poté, co byly odebrány všechny potřebné vzorky, byla exprese proteinu SUG1 zkontrolována pomocí SDS-PAGE (viz 4.2.15, str. 36). Na obr. 5.5 (str. 43) a 5.6 (str. 44) je zřejmé, že SUG1 se v bakteriálním systému exprimuje velmi dobře, přičemž jeho exprese roste s časem.

Z obr. 5.5 (str. 43) a 5.6 (str. 44) je také možné odečíst velikost exprimovaného rekombinantního proteinu SUG1 (sekvence aminokyselin lidského SUG1 viz Příloha 1, str. 50). V případě obr. 5.5 (str. 43), na kterém je zobrazena exprese proteinu SUG1 majícího na svém N-konci „GST-tag“, je relativní molekulová hmotnost tohoto proteinu cca 72000. Z obrázku 5.6 (str. 44) lze odečíst relativní molekulovou hmotnost proteinu SUG1 nesoucího na svém C-konci „His-tag“ jako cca 47000.



Obr. 5.5: SDS-PAGE gel po expresi SUG1 dříve vneseném do vektoru pGEX-4T-1. V první dráze jsou vidět zóny migrace standardu molekulových vah, druhá dráha obsahuje neindukovaný vzorek. Třetí dráha patří proteinu SUG1 ve vzorku odebraném 2 hodiny po indukci, čtvrtá dráha vzorku odebranému 4 hodiny po indukci a konečně pátá dráha znázorňuje expresi SUG1 ve vzorku odebraném po dalších cca 16- ti hodinách.



Obr. 5.6: SDS-PAGE gel po expresi proteinu SUG1, který byl „insertován“ do vektoru pST39. V první dráze jsou vidět zóny migrace standardu molekulových vah, druhá dráha obsahuje vzorek odebraný po 2 hodinách. Třetí dráha patří proteinu SUG1 ve vzorku odebraném po 4 hodinách, čtvrtá dráha vzorku odebranému po 6 hodinách a konečně pátá dráha znázorňuje expresi SUG1 ve vzorku odebraném po dalších cca 16- ti hodinách.

6. Diskuse

Tato bakalářská práce byla vypracována za účelem přípravy expresních konstruktů jednoho z interakčních partnerů fosducinu, což je protein hrající důležitou roli v regulaci G proteinové signální dráhy v tyčinkách fotoreceptorů a v regulaci krevního tlaku. Vazebným partnerem, kterým se tato práce zabývá, je SUG1, který je známý jako podjednotka 26S proteasomu a člen rodiny domnělých ATPas. Příprava expresních konstruktů lidského proteinu SUG1 je prvním stupněm ve výzkumu, kterým se začala zabývat Laboratoř biofyzikální chemie.

Prvním krokem k úspěšné expresi proteinu SUG1 bylo vnesení genu kódujícího jeho lidskou isoformu 1 do dvou různých plasmidových DNA. Těmito plasmidy byly pGEX-4T-1 a pST39. pGEX-4T1 umožňuje expresi rekombinantních proteinů s glutation-S-transferasou, tzv. „GST-tag“ na N-konci. GST zjednodušuje purifikaci proteinu díky jeho vysoké afinitě ke glutationu. Druhým plasmidem, do kterého byl vnesen gen se sekvencí pro SUG1, byl vektor pST39, který umožňuje expresi rekombinantních proteinů jako fusionských proteinů s motivem šesti histidinů v řadě, tzv. „His-tag“, na C-konci. Tento motiv je také velmi užitečný při následné purifikaci proteinů, protože při ní umožňuje použít chelatační chromatografii. Obě tyto plasmidové DNA navíc nesou informaci o resistenci vůči β -laktamovému antibiotiku ampicilinu. K vnesení sekvence kódující lidskou isoformu 1 proteinu SUG1 bylo použito základních metod molekulární biologie (transformace bakterií, amplifikace pomocí PCR, štěpení restrikčními endonukleasami a ligace).

Následně bylo potřeba zjistit nukleotidovou sekvenci těchto konstruktů pro kontrolu s publikovanými sekvencemi, aby se předešlo chybám, jakými by mohly být např. vnesení jiné než požadované sekvence do plasmidových DNA či nežádoucí mutace. Nicméně zkontrolováním získaných sekvencí bylo zjištěno, že se v obou plasmidech, tedy jak v pGEX-4T-1, tak v pST39, opravdu nachází požadovaná sekvence kódující isoformu 1 lidského proteinu SUG1.

S takto připraveným konstruktem pak mohly být provedeny expresní testy, které napověděly, zda bude možné protein následně purifikovat. Jak SUG1, který byl insertem v plasmidu pGEX-4T-1 a tudíž obsahoval na svém N-konci, tzv. „GST-tag“, tak SUG1, který byl původně vnesen do vektoru pST39 a obsahoval na svém C-konci tzv. „His-tag“, se exprimoval v bakteriálním expresním systému *E. coli* BL21 (Rosetta).

Pro tuto chvíli lze tedy říct, že by v budoucnu mělo být možné lidskou isoformu 1 proteinu SUG1 purifikovat a následně studovat její biofyzikální vlastnosti a interakce s fosducinem.

7. Závěr

Hlavní výsledky této práce jsou:

- Pomocí technik molekulární biologie byly připraveny konstrukty pro expresi lidského SUG1 v bakteriálním expresním systému a to:
 - konstrukt SUG1 v expresním plasmidu pGEX-4T1
 - konstrukt SUG1 v expresním plasmidu pST 39
- S připravenými konstrukty byly provedeny expresní testy v bakteriích *E. coli* BL21 (Rosetta), které potvrdily, že se SUG1 exprimuje. Zdánlivá relativní molekulová hmotnost exprimovaných rekombinantních proteinů souhlasí s teoretickou relativní molekulovou hmotností odvozenou na základě jejich sekvence.

Seznam citované literatury

- [1] Obsil, T., Obsilova, V.: Seminars in Cell & Developmental Biology, 22, p. 663-672 (2011)
- [2] Lodish, H. et al.: Cell Signaling I: Signal Transduction and Short-Term Cellular Responses, v knize Molecular Cell Biology (W. H. Freeman and Company), 6th edition New York, str. 623-638 (2008)
- [3] Hamm, H. E.: The Journal of Biological Chemistry, 273, p. 669-672 (1998)
- [4] Gaudet, R., Bohm, A., Sigler, P. B.: Cell, 87, p. 577-588 (1996)
- [5] Wilkins, J. F., Bitensky, M. W., Williardson, B. M.: The Journal of Biological Chemistry, 271, p. 19232-19237 (1996)
- [6] Lee, R. H., Fowler, A., McGinnis, J. F., Lolley R. N., Craft, Ch. M.: The Journal of Biological Chemistry, 265, p. 15867-15873 (1990)
- [7] Schulz, R.: Pharmacological Research, 43, p. 1-10 (2001)
- [8] Beetz, N., Lutz, H.: Cellular and Molecular Life Sciences, 68, p. 599-612 (2011)
- [9] Grassi, G.: The Journal of Clinical Investigation, 119, p. 3515-3518 (2009)
- [10] Beetz, N., Harrison, M. D., Brede, M., Zong, X., Urbanski, M. J., Sietmann, A., Kaufling, J., Barrot, M., Seeliger, M. W., Vieira-Coelho, M. A., Harnet, P., Gaudet, D., Seda, O., Tremblay, J., Kotchen, T. A., Kaldunski, M., Nüsing, R., Szabo, B., Jacob, H. J., Cowley, A. W., Biel, M., Stoll, M., Lohse, M. J., Broeckel, U., Lutz H.: The Journal of Clinical Investigation, 119, p. 3597- 3612 (2009)
- [11] Xu, J., Wu, D., Slepak, V. Z., Simon, M. I.: Biochemistry, 92, p. 2086-2090 (1995)
- [12] Savage J. R., McLaughlin, J. N., Skiba N. P., Hamm, H. E., Williardson, B. M.: The Journal of Biological Chemistry, 275, p. 30399-30407 (2000)
- [13] Gaudet, R., Savage J. R., McLaughlin J. N., Williardson, B. M., Sigler, P. B.: Molecular Cell, 3, p. 649-660 (1990)
- [14] Lee, R. H., Brown, B. M., Lolley, R. N.: The Journal of Biological Chemistry, 265, p. 15860-15866 (1990)
- [15] Lee, B. Y., Thulin, C. D., Williardson, B. M.: The Journal of Biological Chemistry, 279, p. 54008-54017 (2004)
- [16] Brown, B. M., Carlson, B. L., Zhu, X., Lolley, R. N., Craft, C. M.: Biochemistry, 41, p. 13526-13538 (2002)

- [17] Klenk, Ch., Humrich, J., Quitterer, U., Lohse, M. J.: The Journal of Biological Chemistry, 281, p. 8357-8364 (2006)
- [18] Ripps, H.: The FASEB Journal, 24, p. 970-975 (2010)
- [19] Williardson, B. M., Howlett, A. C.: Cellular Signalling, 19, p. 2417-2427 (2007)
- [20] Zhu, X., Craft, Ch. M.: Biochemical and Biophysical Research Communications, 270, p. 504-509 (2000)
- [21] Zhu, X., Craft, Ch. M.: Molecular Vision, 4, p. 13-20 (1998)
- [22] Xu, Q., Singer, R. A., Johnston, G. C.: Molecular and Cellular Biology, 15, p. 6025-6035 (1995)
- [23] Makino, Y., Yamano, K., Kanemaki, M., Morikawa, K., Kishimoto, T., Shimbara, N., Tanaka, K., Tamura, T.: The Journal of Biological Chemistry, 272, p. 23201-23205 (1997)
- [24] Fraser, R. A., Rossignol, M., Heard, D. J., Egly, J-M.: The Journal of Biological Chemistry, 272, p. 7122-7126 (1997)
- [25] Wang, W., Chevray, P. M., Nathans, D.: Biochemistry, 93, p. 8236-8240 (1996)
- [26] <http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pGEX-4T-1.htm>, převzato dne 13. 5. 2012
- [27] http://www.lablife.org/p?a=vdb_view&id=g2.YVTBiHR8L5sPRfGBIQQK.ikmmnA-, převzato dne 13. 5. 2012

Příloha 1

- **Sekvence aminokyselin isoformy 1 lidského SUG1 (převzato z databáze UniProt)**

10	20	30	40	50	60
MALDGPEQME	LEEGKAGSGL	RQYYLSKIEE	LQLIVNDKSQ	NLRRLQAQRN	ELNAKVRLLR
70	80	90	100	110	120
EELQLLQEQG	SYVGEVVRAM	DKKKVLVKVH	PEGKRVVDVD	KNIDINDVTP	NCRVALRNDS
130	140	150	160	170	180
YTLHKILPNK	VDPLVSLMMV	EKVPDSTYEM	IGGLDKQIKE	IKEVIELPVK	HPELFEALGI
190	200	210	220	230	240
AQPKGVLLYG	PPGTGKTLA	RAVAHHTDCT	FIRVSGSELV	QKFIGEGARM	VRELFVMARE
250	260	270	280	290	300
HAPSIIIFMDE	IDSIGSSRLE	GGSGGDSEVQ	RTMLELLNQL	DGFEATKNIK	VIMATNRIDI
310	320	330	340	350	360
LDSALLRPPGR	IDRKIEFPPP	NEEARLDILK	IHSRKMNLTR	GINLRKIAEL	MPGASGAEVK
370	380	390	400		
GVCTEAGMYA	LRERRVHVTQ	EDFEMAVAKV	MQKDSEKNMS	IKKLWK	

- **Sekvence nukleotidů kódující isoformu 1 lidského SUG1 (převzato z databáze PubMed u upraveno)**

ATGGCGCTTGACGGACCAGAGCAGATGGAGCTGGAGGAGGGGAAGGCAGGCAGCGGACTCC
GCCAATATTATCTGTCCAAGATTGAAGAACTCCAGCTGATTGTGAATGATAAGAGCCAAAA
CCTCCGGAGGCTGCAGGCACAGAGGAACGAACTAAATGCTAAAGTTCGCCTATTGCGGGAG
GAGCTACAGCTGCTGCAGGAGCAGGGCTCCTATGTGGGGAAAGTAGTCCGGGCCATGGATA
AGAAGAAAGTGTGGTCAAGGTACATCCTGAAGGTAAATTTGTTGTAGACGTGGACAAAAA
CATTGACATCAATGATGTGACACCCAATTGCCGGGTGGCTCTAAGGAATGACAGCTACACT
CTGCACAAGATCCTGCCCAACAAGGTAGACCCATTAGTGTCACTGATGATGGTGGAGAAAG
TACCAGATTCAACTTATGAGATGATTGGTGGACTGGACAAACAGATCAAGGAGATCAAAGA
AGTGATCGAGCTGCCTGTTAAGCATCCTGAGCTCTTCGAAG
CACTGGGCATTGCTCAGCCCAAGGGAGTGCTGCTGTATGGACCTCCAGGCACTGGGAAGA
CACTGTTGGCCCGGGCTGTGGCTCATCATAACGGACTGTACCTTTATTCGTGTCTCTGGCT
CTGAACTGGTACAGAAATTCATAGGGGAAGGGGCAAGAATGGTGAGGGAGCTGTTTGTCA
TGGCACGGGAACATGCTCCATCTATCATCTTCATGGACGAAATCGACTCCATCGGCTCCT
CGCGGCTGGAGGGGGTCTGGAGGGGACAGTGAAGTGCAGCGCACGATGCTGGAGTTGC
TCAACCAGCTCGACGGCTTTGAGGCCACCAAGAACATCAAGGTTATCATGGCTACTAATA
GGATTGATATCCTGGACTCGGCACTGCTTCGCCAGGGCGCATTGACAGAAAAATTGAAT
TCCCACCCCAATGAGGAGGCCCGGCTGGACATTTTGAAGATTCATTCTCGGAAGATGA
ACCTGACCCGGGGGATCAACCTGAGAAAAATTGCTGAGCTCATGCCAGGAGCATCAGGGG
CTGAAGTGAAGGGCGTGTGCACAGAAGCTGGCATGTATGCCCTGCGAGAACGGCGAGTCC
ATGTCACCTCAGGAGGACTTTGAGATGGCAGTAGCCAAGGTCATGCAGAAGGACAGTGAGA
AAAACATGTCCATCAAGAAATTATGGAAGTGAAGTGGACAGCCTTTGTGTGTATCTCTCCA
ATAAAGCTCTGTGGGCCAAGTCTCTAGGAAAAAAAAAAAAA

Příloha 2

- Výsledná sekvence konstruktů **SUG1** v **pST39** s primerem **T7** promoter

CCCTTGAAATAATTTTTTGTTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT**ATG**GCGCTTGACGGA
CCAGAGCACTATGGAGCTGGAGGAGGGGAAGGCAGGCAGCGGACTCCGCCAATATTATCTG
TCCAAGATTGAAGAACTCCAGCTGATTGTGAATGATAAGAGCCAAAACCTCCGGAGGCTGC
AGGCACAGAGGAACGAACTAAATGCTAAAGTTTCGCCTATTGCGGGAGGAGCTACAGCTGCT
GCAGGAGCAGGGCTCCTATGTGGGGGAAGTAGTCCGGGCCATGGATAAGAAGAAAGTGTTG
GTCAAGGTACATCCTGAAGGTAAATTTGTTGTAGACGTGGACAAAAACATTGACATCAATG
ATGTGACACCCAATTGCCGGGTGGCTCTAAGGAATGACAGCTACACTCTGCACAAGATCCT
GCCCAACAAGGTAGACCCATTAGTGTCACTGATGATGGTGGAGAAAGTACCAGATTCAACT
TATGAGATGATTGGTGGACTGGACAAACAGATCAAGGAGATCAAAGAAGTGATCGAGCTGC
CTGTTAAGCATCCTGAGCTCTTCGAAGCACTGGGCATTGCTCAGCCCAAGGGAGTGCTGCT
GTATGGACCTCCAGGCACTGGAAAGACACTGTTGGCCCGGGCTGTGGCTCATCATAACGGAC
TGTACCTTTATTTCGTGTCTCTGGCTCTGAATTGGTACAGAAATTCATAGGGGAAGGGGCAA
GAATGGTGAGGGAGCTGTTTGTTCATGGCACGGGAACATGCTCCATCTATCATCTTCATGGA
CGAAATCGACTCCATCGGCTCCTCGCGGCTGGAGGGGGTCTGGAGGGGACAGTGAAGTG
CAGCGCACGATGCTGGAGTTGCTCAACCAGCTCGACGGCTTTGAGGCCACCAAGAACATCA
AGGTTATCATGGCTACTAATAGGATTGATATCCTGGACTCGGCACTGCTTCGCCCAGGGCG
CATTGACAGAAAAATTGAATTTCCACCCCCCAATGAGGAAGGCCCGGCTGGACATTTTTG
AAGATTCATTCTTCCGGAGAATGACCCTGACCCCGGGGGATCCAACCCTTGAGAAAAAT
TTGCTTGAGCTTCATTGTCCATGGAGCCATTCAATGGGCCTGGAAATGGAAAGGCGTGTGC
ACTCGGAAGCCTTGCATTATATGCCCTTTGTCTCGAGATAAC

V sekvenci je červeně označen počátek nukleotidové sekvence isoformy 1 SUG1.

- **Výsledná sekvence konstruktů SUG1 s primerem T7 terminator**

AGTGCCGCCCTTAATTTGCCGAAGAAGCTACCAGCTTGCTGCCAGAGCAAGGGCTCTATG
TGAGGAAAGTAAGTCCGGATCATTGATTAAGAAGAAAGTGTTTGGTCCAAGGGTAACATC
CTGAAAGGGTAATTTGTTGTAAGACGTGGACCAAAAACATTGACATCAATGATGTGGACA
CCCCAATTGCCGGGTGGCTCTAAGGAATGACAGCTACACTCTGCACAAGATCCTGCCCAA
CAAGGTAGACCCATTAGTGTCACTGATGATGGTGGAGAAAGTACCAGATTCAACTTATGA
GATGATTGGTGGACTGGACAAACAGATCAAGGAGATCAAAGAAGTGATCGAGCTGCCTGT
TAAGCATCCTGAGCTCTTCGAAGCACTGGGCATTGCTCAGCCCAAGGGAGTGCTGCTGTA
TGGACCTCCAGGCACTGGAAAGACACTGTTGGCCCGGGCTGTGGCTCATCATAACGGACTG
TACCTTTTATTCGTGTCTCTGGCTCTGAATTGGTACAGAAATTCATAGGGGAAGGGGCAAG
AATGGTGAGGGAGCTGTTTGTCAATGGCACGGGAACATGCTCCATCTATCATCTTCATGGA
CGAAATCGACTCCATCGGCTCCTCGCGGCTGGAGGGGGTCTGGAGGGGACAGTGAAGT
GCAGCGCACGATGCTGGAGTTGCTCAACCAGCTCGACGGCTTTGAGGCCACCAAGAACAT
CAAGGTTATCATGGCTACTAATAGGATTGATATCCTGGACTCGGCACTGCTTCGCCCAGG
GCGCATTGACAGAAAAATTGAATTCACACCCCAATGAGGAGGCCCGGCTGGACATTTT
GAAGATTCATTCTCGGAAGATGAACCTGACCCGGGGATCAACCTGAGAAAAATTGCTGA
GCTCATGCCAGGAGCATCAGGGGCTGAAGTGAAGGGCGTGTGCACGGAAGCTGGCATGTA
TGCCCTGCGAGAACGGCGAGTCCATGTCACTCAGGAGGACTTTGAGATGGCAGTAGCCAA
GGTCATGCAGAAGGACAGTGAGAAAAACATGTCCATCAAGAAATTATGGAAGAACAGCAG
CCATCACCATCATCACCACTAGGGTACCAGCGGATAACAATTTACATCCGGATTTCGCGA
ACGCGTCTCGAGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAAGAAAGGTTAGTTGC

V sekvenci je červeně označen „His-tag“ a zeleně je označeno restriční místo KpnI.

Příloha 3

- **Výsledná sekvence konstruktů SUG1 s primerem pGEXSUG1rev**

GGCATAATCGTTGCTCAAAGGCATCGTCGGTATAATGTTTGCGACTCATACCGTCCGCCA
AATCTGATGAGCTGTTGACAATATCATCGCTCGGATAATTGTGTGGATTGTGAGCGGATA
CAATTTACAACAGAAACAGTTATTCATGTCCCTATACTAGTATTGAAAATTAAGGGCTT
GTGCAACCCACCTCGACTTCTTTTGGAAATATCTTGAAGAAAAAATATGAAGAGCATTGT
TATGAGCGCGATGAAGGTGATAAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTT
TCCCAATCTTCCCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCA
TACGTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGA
TTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGAATTGCATATA
GTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAA
TGTTTCGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTG
ACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATAACATGGACCCAATGTGCCTGGATG
CGTTCCCAAATTAGTTTTGTTTTAAAAACGTATTGAAGCTATCCCACAAATTGATAAGT
ACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
GTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCCCGGAATTCCTGGT
GACTCATGCGCCTTGACGGACCAGAGCAGATGGAGCTGGAGGAGGGGAAGGCAGGCAGCG
GACTCCGCCAATATTATCTGTCCAAGATTGAAGAACTCCAGCTGATTGTGAATGATAAGA
GCCAAAACCTCCGGAGGCTGCAGGCACAGAGGAACGAACTAAATGCTAAAGTTCGCCTAT
TGCGGGAGGAGCTACAGCTGCTGCAGGAGCAGGGCTCCTTATGTGGGGGAAGTAAGTTCC
CGGAC

V sekvenci je červeně označeno restriční místo Sall a zeleně je označen iniciační kodón SUG1.

- **Výsledná sekvence konstruktů SUG1 s primerem pGEX4T1seqrev**

TTTTTGTCTCACCACACATATCTCGTGCTGGGTGCTCTACTGAGAGATATTACACAGTTA
ATACTCTTCCACAGAAGTATCTCTCTCCACACACAGTGTGTGCCCCATTATCTTACTT
TATAGAGTGGTGGGAGAGAAAATCCCACATTTTCACTTATGAAGATATGCGGGGGTTGG
CCACACCTATTCTGGGGTTTAAAGAAAGGGATCCGCTTCCCCTTTTAAAGATTCCCGGGTT
TTTTGAAACCATGGCCTTGTTTACCCCAAGGAAGGTTCTTTTTTGGCCCTCCAGGCCA
CTGGAAAACCCCTGTTGGCCCCGGGGCTGGGGGCTTCTTCATACGGACTTGACCCTTTA
TTTGGGGTTTTTGGGCTTGGAATTTGGACCAGAAAATTCATAGGGGAAAGGGGCCAGAAA
TGGTGAGGGGAGCTGTTTTTTCATGGCACGGGAACCAGGTCCCATCTATCATTTTTTCATG
GACGGAAATTGACTCCCATCGGCTTCCCTCGCGGGCTGGGAGGGGGTTTCTGGAGGGGGA
CCAGTGAAAGTGCAGCGCCACGATGCTGGAGTTTGCTCAACCAAGCTTCGACGGGCTTTG
AGGGCCACCAAGAAACATCAAGGGTTTATCATGGCTACTAAATAGGATTGATATCCTGGA
CTCGGGCACTGCTTCGCCCAGGGCGCATTGACAGAAAATTGAATTCCCACCCCCAATG
AGGAGGCCCGGCTGGACATTTTGAAGATTCATTCTCGGAAGATGAACCTGACCCGGGGGA
TCAACCTGAGAAAAATTGCTGAGCTCATGCCAGGAGCATCAGGGGCTGAAGTGAAGGGCG
TGTGCACGGAAGCTGGCATGTATGCCCTGCGAGAACGGCGAGTCCATGTCACTCAGGAGG
ACTTTGAGATGGCAGTAGCCAAGGTCATGCAGAAGGACAGTGAGAAAAACATGTCCATCA
AGAAATTATGGAAGTGA **GCGGCCG** CATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGGTTTC
GGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTG
TAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCTCAGCGGGTTGGGGGTTTAAAGA
ATTC

V sekvenci je červeně označeno restriční místo NotI.

