

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Andrea Mančíková

**Funkční studie alelických variant urátových transportérů *SLC2A9* na modelu
oocytů *Xenopus laevis***

**Functional studies of the allelic variants of urate transporters *SLC2A9*
on the model of *Xenopus laevis* oocytes**

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13.8.2013

.....

Bc. Andrea Mančíková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Ing. Vladimíru Krylovi, Ph.D. za odborné vedení, motivaci, užitečné rady a trpělivost, Ing. Mgr. Blance Stibůrkové, Ph.D. za konzultace a předané zkušenosti. Děkuji svému manželovi za podporu během mého studia a svým dětem za pochopení.

Abstrakt

Koncentrace urátu v lidském krevním řečišti je dána rovnováhou mezi degradací purinů v organismu a jejich eliminací. Přestože se na této rovnováze podílejí environmentální faktory, dědičnost zde hraje majoritní roli. Vychýlení z této rovnováhy může pro lidský organismus znamenat rizika spojená s patologicky nízkými či vysokými hodnotami urikémie.

U zdravých jedinců je významná část urátu reabsorbována v proximálních tubulech ledvin zpět do krve. Na reabsorpci a sekreci urátu se podílí řada transportérů, jejichž intaktní funkce je pro jeho přenos buňkami proximálních tubulů nezbytná. Membránový transportér GLUT9 (*SLC2A9*), jehož funkce v přenosu urátu byla objevena poměrně nedávno, se významně podílí na regulaci hladiny urátu v lidském organismu. GLUT9 byl v závislosti na izoformách lokalizován jak na apikální, tak i bazolaterální membráně buněk proximálních tubulů.

V české populaci byl zaznamenán rozsáhlý soubor jedinců s rozdílnými hodnotami hladiny urátu v séru a s polymorfismy v genu pro GLUT9 (*SLC2A9*). V této práci jsou shrnuty dosavadní výsledky exprese variantních GLUT9 lidských proteinů na membránách oocytů *Xenopus laevis* a funkčních studií těchto variantních proteinů v přenosu [14C] radioaktivně značeného urátu.

Funkční studie alelických variant GLUT9 na modelu oocytů *Xenopus laevis* ukázaly signifikantní změny v přenosu urátu u variant V169M, D281H, P350L, R294H. Zároveň u těchto variantních proteinů byla detekována lokalizace na plazmatické membráně oocytů.

Klíčová slova:

urátové transportéry, GLUT9, *SLC2A9*, oocyty *Xenopus laevis*, funkční studie

Abstract

Urate level in human bloodstream is influenced by purins degradation in organism and its elimination. Enviromental factors are important for this balance, but heredity has a key role. Disbalance of processes increase the risk of deseases caused by patalogical blood urate levels.

Healthy people have the most of generated urate reabsorbed and returned back to bloodstream *via* proximal tubules of the kidneys. The various membrane transporters participate on urate handling in human kidneys. Their intact function is necessary for transcellular transport. In its different isoforms, membrane transpoter GLUT9 (*SLC2A9*) is located on the apical and basolateral membrane of proximal tubule cells. His function in transmission of urate was detected just recently. GLUT9 is probably the one of most important proteins from regulators of blood urate levels in humans.

We have an extensive set of individuals with different serum urate levels and *SLC2A9* gene polymorfism from the Czech population. In this thesis there are results from the expression of human GLUT9 allelic variants performed on *Xenopus laevis* oocytes and functional studies of these proteins uptaking [¹⁴C] radiolabelled urate.

We have detected significant changes of urate transmission through V169M, D281H, P350L, R294H allelic variants of GLUT9. Simultaneously these variants protein were detected on the plasma membrane *Xenopus* oocytes.

Keywords

urate transporters, GLUT9, *SLC2A9*, *Xenopus laevis* oocytes, functional studies

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Literární přehled	12
2.1	Kyselina močová	12
2.2	Fyziologie urátu.....	13
2.3	Renální transport urátu	14
2.3.1	Model čtyř-komponentního přenosu.....	15
2.4	Transportéry urátu v proximálních tubulech	16
2.4.1	URAT 1 (<i>SLC22A12</i>)	16
2.4.2	GLUT9 (<i>SLC2A9</i>)	17
2.5	Oocyty <i>Xenopus laevis</i>	22
2.5.1	Oocyty jako expresní vektor pro studium funkce membránových transportérů.....	22
2.5.2	Oocyty po ukončení růstu ve fázi zárodečného vajíčku.....	24
3	Cíle	25
4	Materiál a metody	26
4.1	Ligace cDNA do vektoru pGEM®-T Easy.....	26
4.2	Mutageneze	27
4.2.1	Methylační a mutageneční reakce	27
4.2.2	Stanovení koncentrace DNA	28
4.2.3	DNA, gelová elektroforéza	29
4.2.4	Rekombinační reakce	30
4.2.5	Transformace bakterií DH α - T1 <i>E. Coli</i>	30
4.2.6	Izolace plazmidu PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega)	33
4.2.7	Stanovení koncentrace DNA	34
4.2.8	Restrikční analýza.....	34
4.2.9	DNA gelová elektroforéza	35
4.2.10	Sekvence	35
4.2.11	Izolace plazmidu Genopure Plasmid Midi Kit (Roche)	36
4.2.12	Stanovení koncentrace DNA	37
4.2.13	Restrikční analýza	37
4.2.14	DNA gelová elektroforéza	37

4.3	Příprava cRNA	37
4.3.1	Příprava templátu DNA pro <i>in vitro</i> transkripci.....	37
4.3.2	<i>In vitro</i> transkripce z T7 RNA polymerázového promotoru	39
4.3.3	Purifikace RNA pomocí RNeasy Mini Kitu (Qiagen).....	39
4.3.4	Stanovení koncentrace RNA.....	40
4.3.5	RNA gelová elektroforéza	40
4.4	Exprese SLC2A9 v oocytech <i>Xenopus laevis</i>	41
4.4.1	Příprava oocytů <i>X. laevis</i> pro mikroinjikace cRNA.....	41
4.4.2	Mikroinjikace cRNA do oocytů.....	44
4.5	Funkční studie.....	44
4.6	Vizualizace a lokalizace GLUT9 v rámci oocytu <i>X.laevis</i>	47
4.6.1	Imunocytochemické značení GLUT9 v oocytech.....	47
5	Výsledky.....	48
5.1.	Soubor alelických variant <i>SLC2A9</i>	48
5.2.	Příprava cDNA wt variant <i>SLC2A9L</i> a <i>SLC2A9S</i>	49
5.3.	Příprava cDNA alelických variant <i>SLC2A9L</i> a <i>SLC2A9S</i>	52
5.4.	Příprava cRNA	53
5.5.	Mikroinjikace cRNA.....	55
5.6.	Funkční studie	55
5.7.	Vizualizace a lokalizace GLUT9 v rámci oocytu <i>X. laevis</i>	61
5.7.1.	Imunocytochemie	61
6	Diskuze.....	63
6.1	Příprava cDNA wt variant <i>SLC2A9L</i> a <i>SLC2A9S</i>	63
6.2	Příprava cDNA alelických variant <i>SLC2A9L</i> a <i>SLC2A9S</i>	63
6.3	Příprava cRNA	64
6.4	Mikroinjikace	65
6.5	Funkční studie	65
6.5.1	Metodika.....	65
6.5.2	Výsledky měření.....	67
6.6	Vizualizace a lokalizace GLUT9 v rámci oocytu <i>X.laevis</i>	71
7	Závěr	72

Seznam použitých zkratek:

BFM	bromfenolová modř
bp (b)	páry bází v DNA (báze v RNA)
cDNA (cRNA)	komplementární DNA (RNA)
cpm	(counts per minute) počet rozpadů radioaktivních částic zaznamenaných scintilátorem za minutu
dbSNP	(Database of single nucleotide polymorphisms and multiple small-scale variations that include insertions/deletions, microsatellites, and non-polymorphic variants) databáze polymorfismů http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/
DMSO	dimethylsulfoxid
DPM	(desintegration per minutes) skutečný počet rozpadů radioaktivních částic za minutu
EB pufr	(Elution Buffer) eluční pufr
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FDU	(Fast Digest Units) jednotky restriční endonukleázy: restrikce 1 µg substrátové DNA v 5 až 15 minutách při doporučené teplotě a pufru
GLUT9	Homo sapiens solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 9 (<i>SLC2A9</i>) synonymní označení: GLUTX; UAQTL2; URATv1
GLUT9L	delší izoforma 540 aminokyselin, transkript 1874 bází, synonymní označení: GLUT9, GLUT9a, GLUT9 varianta 1 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_020041.2
GLUT9S	kratší izoforma 512 aminokyselin, transkript 1885 bází, synonymní označení: GLUT9ΔN, GLUT9b, GLUT9 varianta 2 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_001001290
IPTG	isopropylthio-β-galactosid
PCR	polymerázová řetězová reakce

rpm	(revolutions per minute) otáčky za minutu
SAM	S-adenosyl methionin
S.O.C.	(Super Optimal broth with Catabolite repression) médium pro růst bakteriální kultury
TBE pufr	pufr Tris/ borát/ EDTA
ÚDMP	Ústav dědičných metabolických poruch 1.LF UK a VFN v Praze
wt	(wild type) popsáný divoký typ genu
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosidáza

1 Úvod

Výzkumný projekt a téma předložené diplomové práce byl iniciovaný Ing. Mgr. Blankou Stibůrkovou, Ph.D. z Ústavu dědičných metabolických poruch (ÚDMP) 1.LF a VFN v Praze. V unikátním souboru detailně biochemicky a klinicky charakterizovaných pacientů s rozdílnými hodnotami urikémie byl identifikován polymorfismus v genu *SLC2A9* kódující membránový transportér GLUT9 v proximálních tubulech lidských ledvin. U těchto pacientů se nepředpokládá významný vliv sekundárních faktorů na kolísání hladiny kyseliny močové v krvi.

Potenciál GLUT9 v regulaci urátu zatím nebyl plně prostudován. Tento transportér by mohl být jedním z nejvýznamnějších regulátorů urátu v rámci komplexního transportozómu v lidských ledvinách.

Výběr expresního systému v oocytech *Xenopus laevis* byl zvolen na základě zkušeností a spolupráce Ing. Mgr. Blanky Stibůrkové, Ph.D. s laboratoří Prof. Kimiyoshi Ichida, MD. - Department of Pathophysiology, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, kde se dlouhodobě věnují studii urátových transportérů.

Laboratoř vývojové biologie Ing. RNDr. Vladimíra Krylova, Ph.D. Přírodovědecké fakulty UK v Praze disponuje chovy *Xenopus laevis* a *Xenopus tropicalis* a dlouhodobě využívá tyto obojživelníky jako modelový organismus.

Při studiích transportérů jsme brali v úvahu rozdílnost obou izoform GLUT9 jak v lokalizaci, tak ve schopnosti přenášet urát z vnějšího prostředí do buňky jakoby se jednalo o dva různé membránové proteiny. Z tohoto důvodu bylo nutné připravit všechny cDNA a cRNA pro alelické varianty obou izoform a pracovat s nimi odděleně.

Po vyhodnocení výsledků všech funkčních studií plánujeme zhodnotit získané poznatky v širších souvislostech s ohledem na současnou hypotézu o funkcích jednotlivých izoform GLUT9 v transportu a směrování urátu přes buňky proximálních tubulů. Díky jedinečnému souboru nasbíraných biochemických dat k jednotlivým nositelům alelických variant je možné uvažovat o vlivu změn funkce GLUT9 na hodnoty

urikémie v krvi, případně clearance urátu v moči, v ideálním případě prokázat korelaci mezi alelickými variantami genu *SLC2A9* a výše uvedenými biochemickými markery.

2 Literární přehled

2.1 Kyselina močová

Konečným produktem metabolismu purinů u lidí je kyselina močová. Většina savců dále katabolizuje kyselinu močovou na allantoin za účasti enzymu urát oxidázy (urikázy). Důsledkem mutace v genu pro urát oxidázu u humanoidních primátů došlo ke ztrátě její enzymatické aktivity. Existují teorie, že ztráta urikázy s sebou nesla pro vyšší primáty evoluční výhody. (Schild *et al.*, 2007) V krvi člověka je na rozdíl od ostatních savců koncentrace kyseliny močové o mnoho vyšší (200 – 500 μM). (Abramson a Lipkowitz, 1990)

Kyselina močová je považována za jeden z nejvýznamnějších antioxidantů. Více jak 50% přispívá k antioxidační kapacitě krve. (Álvarez-Lario a Macarón-Vincente, 2010) Neenzymaticky reaguje s volnými radikály - superoxidem, oxidem dusnatým a peroxynitritem (Kim *et al.*, 2009), také s peroxidem vodíku a hydroxylovým radikálem. Při reakcích dochází k ireverzibilním degradacím volných radikálů na metabolity - allantoin, 6-aminouracil nebo triuret. (Gersch *et al.*, 2009)

Z teleologické perspektivy by se organismus měl metabolického odpadu jednoduše zbavit. Přesto lidské ledviny reabsorbují velkou část filtrovaného urátu, více než ostatní savci s výjimkou šimpanzů a opic rodu *Cebus* (Malpa). Důsledkem ztráty urikázy a vysoké renální reabsorpce kyseliny močové u lidí jsou vysoké hladiny kyseliny močové v organismu, které jsou blízko pod hranicí rozpustnosti v plazmě. Právě nízká rozpustnost kyseliny močové vysvětluje její fyziopatologický a toxikologický efekt. (Schild *et al.*, 2007)

Ve vysokých koncentracích může mít kyselina močová na organismus řadu negativních dopadů. Mohou se projevit účinky, jakými jsou například indukce proliferace hladkého svalstva cév a dysfunkce endotelu. Zvýšené hladiny kyseliny močové bývají spojené s hypertenzí, kardiovaskulární patologií, diabetem, inzulinovou rezistencí, obezitou a nefropatií. (Stein, 2008) Dalším významným lidským onemocněním současnosti je dna, která charakterizována zvýšenou hladinou kyseliny močové v krvi, ukládáním jejích krystalů v kloubech a akutní zánětlivou artritidou. (Choi *et al.*, 2005)

V lidské populaci existují velké individuální rozdíly v sérových hladinách kyseliny močové. Přesto, že se na této variabilitě podílejí environmentální faktory, dědičnost zde hraje majoritní roli. (Stein, 2008) Normální rozsah sérových hladin kyseliny močové se pohybuje v rozmezí 120 - 380 μM a liší se v závislosti na pohlaví. Na základě výsledků studií byla hyperurikémie u mužů definována jako koncentrace kyseliny močové v séru $> 386 \mu\text{M}$ případně $> 420 \mu\text{M}$. (Klemp *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2003) U žen je tato hranice pro hyperurikémii stanovena $> 360 \mu\text{M}$. Je-li koncentrace kyseliny močové v séru nižší než 2 mg/dl (120 μM), hovoříme o renální hypourikémii. (Hisatome *et al.*, 1996)

Renální hypourikémie je dědičné, heterogenní onemocnění charakterizované poruchou tubulární reabsorpce kyseliny močové. Zvýšené vylučování může být provázeno těžkými komplikacemi jako je nefrolitiáza a akutní selhání ledvin. (Dinour *et al.*, 2010)

2.2 Fyziologie urátu

Kyselina močová (2,6,8-trioxypurin) ve fyziologických podmínkách disociuje (hydroxylová skupina na pozici 8). V plazmě je z 98% kyselina močová disociována a přítomna jako urát sodný, jehož méně než 5% je vázáno na plazmatické proteiny. U člověka dvě třetiny denní produkce kyseliny močové prochází ledvinami, další jedna třetina je eliminována gastrointestinálním traktem. (Roch-Ramel a Guisan, 1999) Výsledná koncentrace v séru je dána rovnováhou mezi produkcí a eliminací. (Anzai *et al.*, 2007)

Urát v aniontové formě vstupuje do proximálních tubulů ledvin, koncentrace v primárním filtrátu je podobná jako v plazmě. Kyselina močová i urát, stejně jako ostatní hydrofilní látky, jsou charakteristické svou obtížnou prostupností pro buňky tubulů bez přítomnosti pomocných mechanismů. Transportní mechanismus pro urát a ostatní organické ionty je lokalizován v proximálních tubulech. Distální část nefronů a sběrné kanálky jsou pro urát téměř nepropustné. V lidských ledvinách je významné množství urátu reabsorbováno. Finálně je vylučováno pouze 10% množství z původního primárního filtrátu. Urát není v tubulech pouze reabsorbován, ale dochází zde i k jeho sekreci. (Roch-Ramel a Guisan, 1999)

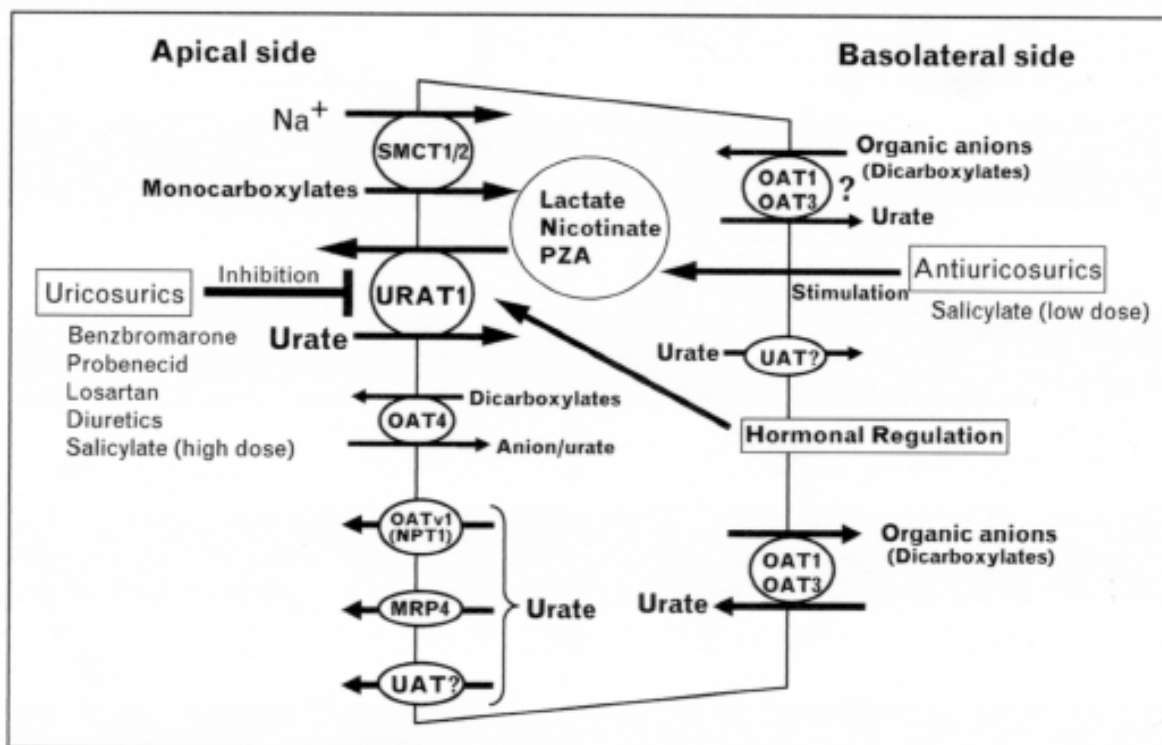
2.3 Renální transport urátu

Kvůli nedostupnosti vhodného modelového organismu jsou studie přenosu urátu v lidských ledvinách obtížné. Experimenty s clearance překvapivě ukázaly výrazné rozdíly mezi různými druhy savců. (Schild *et al.*, 2007) Transportní systém pro urát je mezidruhově specifický. (Enomoto *et al.*, 2002)

U lidí byly první studie limitovány na sledování interference různých substancí s exkrecí urátu při podávání léků. Mezi substance, které snižují sekreci urátu patří laktát, acetoacetát, β -hydroxybutyrát, nikotinát, pyrazinamid/pyrazinoát. Pyrazinamid se jako lék využívá při léčbě tuberkulózy. Jeho aktivní metabolit pyrazinoát působí jako inhibitor sekrece urátu a při jeho podávání dochází u pacientů k hyperurikémii. Naopak mezi substance ovlivňující zvýšení sekrece urátu patří orotát a léky, které se využívají k léčbě hyperurikémie: probenecid, sulfipyrazon, benzbromaron. Stejně tak lék na hypertenzi – lozartan a diuretikum – kyselina tienilová. (Roch-Ramel a Guisan, 1999)

Při reabsorpci urátu dochází k výměně (v antiportu) za buněčné metabolity jako laktát, β -hydroxybutyrát a acetoacetát. Tyto anionty jsou recyklovány a dopravovány zpět do buněk pomocí kotransportu se sodnými ionty. Díky tomu dochází k udržení trvalého gradientu intracelulárních aniontů, které řídí vstup urátu do buněk. Pokud je množství metabolitů vyšší, dochází k vyšší stimulaci reabsorpce urátu, k poklesu jeho exkrece a vzniku hyperurikémie. K tomu dochází například během půstu či hladovění, kdy se v buňkách hromadí ketolátky nebo při experimentálním podávání β -hydroxybutyrátu a acetoacetátu. (Emmerson, 1978)

Model transcelulárního transportu urátu (viz Obr. 1) ukazuje, jak sodné ionty vstupují do buněk přes apikální membránu spolu s monokarboxylovými kyselinami přes dva kotransportéry sodných iontů a aniontů SMCT1/2 a jak je transport sodných iontů nepřímo spřažen s transportem urátu přes URAT1. Látky, které mají afinitu k URAT1 mohou být urikosurické v případě, že působí z lumen tubulů (benzbromaron, probenecid) nebo antiurikosurické v případě, že působí na URAT1 z cytoplazmy. V důsledku tyto látky regulují hladinu urátu v krvi. Organické anionty jsou aktivně pumpovány do buněk přes apikální či bazolaterální membránu, případně jsou produkovány buňkou a přes URAT1 stimulují reabsorpci urátu. (Anzai *et al.*, 2007)



Obr.1 Model transcelulárního transportu v proximálních tubulech (Anzai et al., 2007)

2.3.1 Model čtyř-komponentního přenosu

Na základě studií dvou skupin - jedinců s onemocněním dna a zdravých jedinců - sledování vlivu pyrazinamidu na inhibici sekrece, benzbromaronu na reabsorpci sekretovaného urátu byl potvrzen model čtyř-komponentního systému transportu urátu. Podle tohoto modelu by k přenosu urátu přes buňky tubulů mělo docházet v po sobě následujících krocích reabsorpce a sekrece. Procesy by měly být lokalizovány odděleně v rámci tubulu. Model zahrnuje:

1. glomerulární filtrát do kterého vstupuje veškerý urát z krve. 99% urátu dále postupuje
2. reabsorpcí přes buňky tubulů, v kroku 3. je 50% urátu sekretováno zpět do lumen a následně se ve 4. kroku post-sekreční reabsorpcí 40% urátu dostává zpět do krve. Vylučováno je tak 10% urátu z primární moči. (Levinson a Sorensen, 1980)

Model byl postulován na základě předpokladu, že většina exkretovaného urátu pochází ze sekrece a že pyrazinamid je inhibítoem sekrece, co se zatím nepotvrdilo. Roch-Ramel a Guisan (1999) navrhují, že sekrece je v průběhu transportu urátu ledvinami

menší než se předpokládalo a že sekrece a reabsorpce mohou koexistovat v rámci celého proximálního tubulu.

2.4 Transportéry urátu v proximálních tubulech

2.4.1 URAT 1 (*SLC22A12*)

V lidských ledvinách byl jako první transportér, který reguluje hladinu urátu v krvi, identifikován urát/aniontový kanál URAT1.

Byly identifikovány další proteiny přenášející urát jako UAT (uric acid transporter), OAT1 (organic anionic transporter 1), OAT3, OAT4, OATv1/NPT1 (sodium phosphate transporter 1), MRP4 (multidrug resistance-associated protein) a OAT10 (Rafey *et al.*, 2003; Anzai *et al.*, 2005; Bahn *et al.*, 2008; Eraly *et al.*, 2008), ale URAT1 byl ve své době prokázán jako jediný, jehož mutace a ztráta funkce má přímou souvislost se sníženou reabsorpcí, která zapříčiňuje renální hypourikémii. (Enomoto *et al.*; 2002) Na rozdíl od multispecifických transportérů organických iontů (OAT) vykazuje URAT1 substrátovou specifitu. (Enomoto *et al.*, 2002)

V této souvislosti byl sekvenován gen pro URAT1 (*SLC22A12*) u nezávislých pacientů s renální hypourikémií a sledován vztah sérové hladiny urátu a clearance urátu k charakterizovanému genotypu. Renální hypourikémie je charakterizována zvýšenou clearance urátu. 9,4% těchto pacientů prodělalo akutní selhání ledvin, u 12,5% pacientů byla diagnostikována urolitiáza. Ichida *et al.* (2004) identifikovali 10 mutací v genu *SLC22A12* vedoucích ke ztrátě funkce proteinu. Hladiny urátu v séru byly signifikantně nižší u heterozygotů než u zdravých jedinců. Více signifikantní rozdíl byl zaznamenán u homozygotů a smíšených heterozygotů. Podíl clearance urátu a kreatininu v závislosti na genotypu prokázal efekt genové dóze a korespondoval s hladinou urátu v séru. Na druhou stranu byli identifikováni pacienti beze změn v genu *SLC22A12*, u kterých se předpokládala změna v nekódující oblasti genu ovlivňující expresi či sestřih. Odpověď při zatěžkávacích zkouškách odpovídala pak spíše reakci zdravých jedinců než jedinců s poruchou v URAT1 přenašeči. Tyto skutečnosti naznačovaly, že existuje další transportér, který se významně podílí na regulaci urátu v séru. Vzhledem k významnému

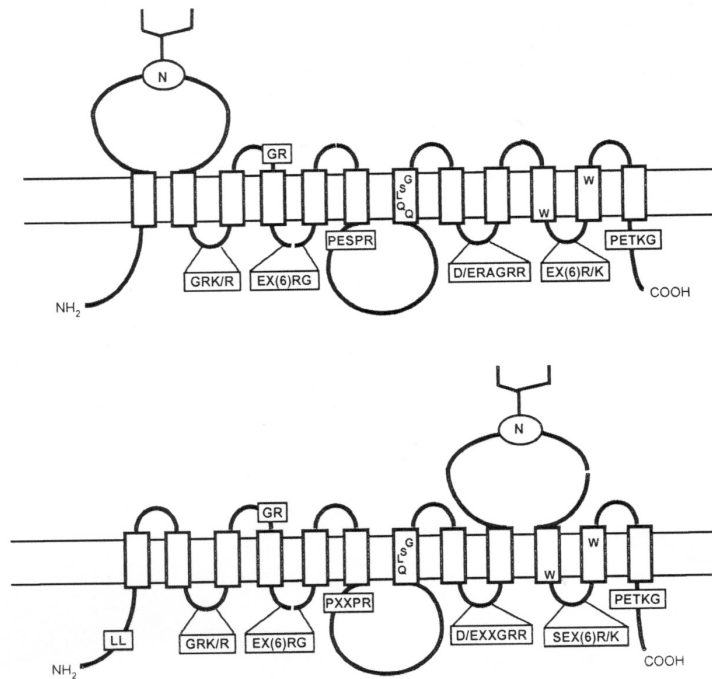
podílu mutací v *SLC22A12* u sledovaného souboru pacientů se však nepředpokládalo, že by schopnost neznámého transportéru regulovat urát, měla být vyšší. (Ichida *et al.*, 2004)

Bylo patrné, že musí existovat další přenašeče na bazolaterální straně buněk proximálních tubulů, přes které prochází urát z buněk do extracelulárního prostoru a posléze do krevního řečiště. K nalezení dalších potenciálních transportérů Anzai *et al.* (2008) využili vyhledávání homologů lidského a myšího URAT1 proteinu (gen *SLC22A12*) a OAT4 proteinu (gen *SLC22A11*) v Swiss-Prot protein databázi. Překvapivě našli několik členů proteinů z rodiny transportérů usnadňujících přenos glukózy: GLUT6, GLUT9, GLUT10, GLUT12 a GLUT14, které měly vzdálené podobnosti s OAT4. K dalšímu studiu byl vybrán GLUT9 (gen *SLC2A9*) patřící do třídy II SLC2 rodiny, jehož lokalizace byla potvrzena především v ledvinách a v játrech. (Anzai *et al.*, 2008)

2.4.2 GLUT9 (*SLC2A9*)

Geny *SLC2A* obecně patří mezi genovou nadrodinu transportérů GLUT usnadňujících přenos glukózy. Tyto integrální membránové proteiny se účastní přenosu glukózy a dalších hexóz do buněk. Zatím bylo identifikováno 14 GLUT proteinů, které mají společné některé strukturní a sekvenční znaky - 12 transmembránových helixů a konzervované sekvence aminokyselin. (Joost *et al.*, 2001) Transportéry GLUT se člení do 3 tříd na základě porovnání jejich aminokyselinových sekvencí. GLUT9 stejně jako GLUT5, 7 a 11 patří do třídy II. (Doblato a Moley, 2009) Všechny transportéry nadrodiny GLUT mají 12 transmembránových helixů seskupených do dvou skupin po šesti, obklopujících centrální vodní pór. Jednotliví členové nadrodiny GLUT se však liší substrátovou afinitou, specifickým výskytem v různých tkáních a hormonální regulací. (Hruz a Mueckler, 2001)

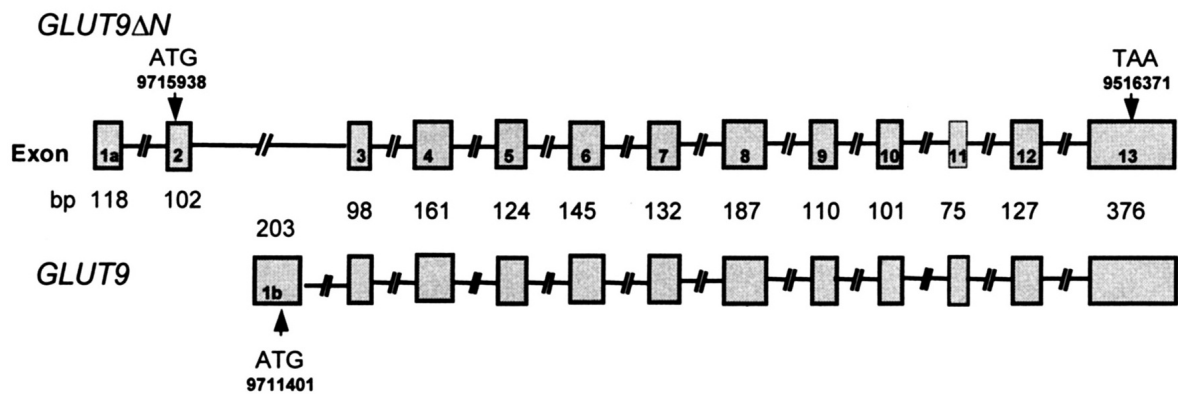
Transportéry GLUT třídy I (kam patří GLUT1 - 4) a třídy II mají porovnatelnou strukturu (viz Obr. 2), zatímco transportéry třídy III se liší v pozici velké extracelulární smyčky obsahující N - glykosylované místo, dále v prolin obsahující sekvenci mezi transmembránovými helixy 6 a 7 a přítomností dileucinového motivu poblíž N-koncové domény (kromě GLUT10) . (Uldry a Thorens, 2004)



Obr. 2 Schématický model struktury transportérů GLUT třídy I, II (v horní části) a III (v dolní části obrázku) (Uldry a Thorens, 2004)

Lidský GLUT9 byl zpočátku považován za transportér usnadňující přenos glukózy. Přestože byla prokázána jeho aktivita při přenosu glukózy, nejednalo se o tak efektivní transport jako u klasických glukózových přenašečů třídy I, jako je GLUT4. (Doege *et al.*, 2000).

V genové mapě se *SLC2A9* nachází na chromozomu 4: 4p15.3-p16 a je exprimován ve dvou sestřihových izoformách (viz Obr. 3): GLUT9 (12 exonů, 540 aminokyselin) a GLUT9ΔN (13 exonů, 512 aminokyselin). GLUT9 je transkribován primárně v ledvinách, játrech, placentě a leukocytech. GLUT9ΔN byl pozorován pouze v ledvinách a placentě. (Augustin *et al.*, 2004)



Obr. 3 Alternativní sestřih genu pro GLUT9 (Augustin et al., 2004)

Důsledkem rozdílu v sekvenci aminokyselin na vznikajícím N-konci proteinu byla pozorována rozdílná lokalizace v polarizovaných buňkách psích ledvin. (Augustin et al., 2004)

Obě izoformy jsou exprimovány na plazmatické membráně oocytů *Xenopus laevis* po injikaci cRNA a mají ekvivalentní aktivitu urátového transportu. Autoři vybrali jednu z izoform (delší variantu GLUT9L) k další charakterizaci. Podíl vtoku urátu oocytů exprimujících GLUT9L a kontrolních oocytů byl devětkrát vyšší. GLUT9L nepotvrdil významný vtok organických iontů, které byly spojovány s přenosem přes URAT1, předpokládá se, že GLUT9L má vyšší substrátovou specifitu. (Anzai et al., 2008)

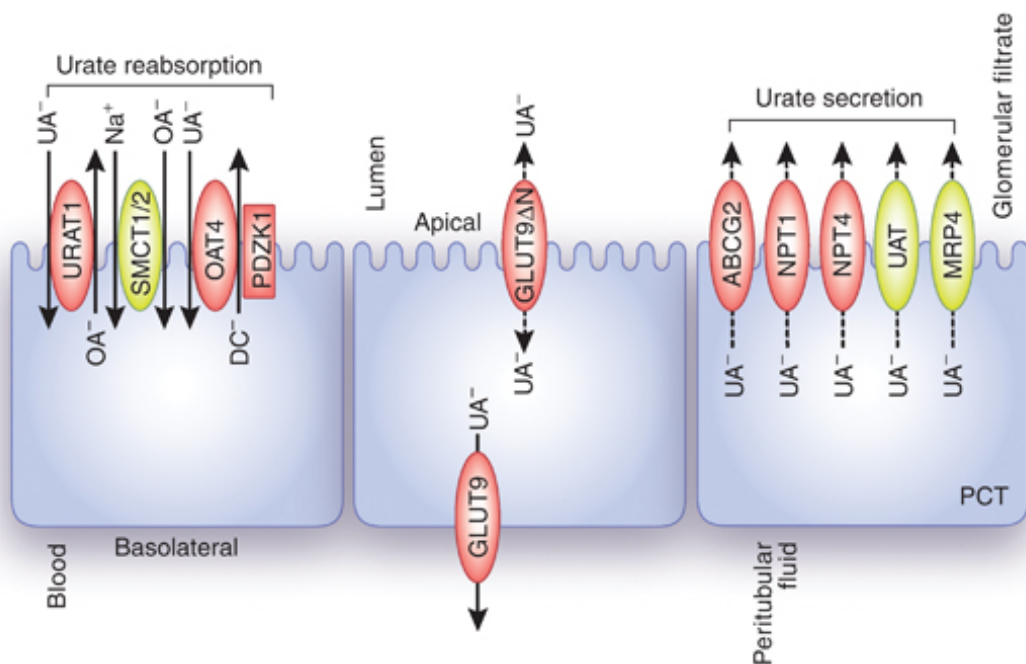
Obě izoformy jsou schopny signifikantně rychleji přenášet vysoké množství urátu ve srovnání s jejich schopností přenášet glukózu nebo fruktózu. Jedná se o vysokoafinitní transportér glukózy/fruktózy, ale ve srovnání s ostatními transportéry ve své genové rodině má při přenosu glukózy/fruktózy velice nízkou hodnotu v_{max} . Vazebná místa pro hexózy a urát jsou odlišná, mezi těmito dvěma substráty nedochází ke kompetici na stejné straně membrány. Hodnota $v_{max} = 304$ pmol/ oocyt/ 20 min indikuje, že se v případě přenosu urátu jedná o vysokokapacitní transportér. (Caufield et al., 2008)

Na transport urátu nemá vliv snížení koncentrace extracelulárních sodných iontů, přenos urátu je přes GLUT9 nezávislý na kotransportu se sodnými ionty. Aktivita GLUT9 je citlivá k depolarizaci membrány. Při snížení koncentrace draselných iontů v extracelulárním prostoru se přenos urátu zvyšuje. Pozorování vtoku urátu v závislosti na koncentračním gradientu chloridových iontů ukázalo, že rychlost přenosu urátu přes

GLUT9 se nemění a nedochází k výměně za chloridové ionty jako při přenosu urátu přes URAT1. Byla však pozorována závislost přenosu na extracelulárním pH.

Při zjišťování substrátové specifity byl sledován cis-inhibiční efekt některých sloučenin. Ukázalo se, že GLUT9 má odlišné farmakologické vlastnosti než URAT1. V souladu s předpokládanou vysokou substrátovou specifitou pro urát vycházejí pozorování potvrzující, že na vtok urátu přes GLUT9 nemají inhibiční vliv hexózy (glukózy, fruktóza), laktát, nikotinát, orotát a ketolátky (acetoacetát, β -hydroxybutyrát). Pyrazinoát, který inhibuje přenos urátu přes URAT1 také neměl žádný inhibiční účinek na přenos urátu přes GLUT9, zatímco losartan (blokátor angiotensinových receptorů II) dokázal GLUT9 mírně inhibovat. GLUT9 může být potenciálním cílem pro nové urikosurické látky. (Anzai *et al.*, 2008)

Předpokládá se, že ve fyziologických podmínkách má GLUT9 roli přenašeče urátu z buněk ven. Proto byl sledován přenos radioaktivně značeného urátu [^{14}C] ve směru z buněk do média v závislosti na čase. K měření byly použity GLUT9L – exprimující oocyty *Xenopus laevis*. Do oocytů byl vnesen injekčně značený urát. Hodnoty radioaktivity média měřené v čase ukázaly významný nárůst množství značeného urátu v médiu. Vzhledem k lokalizaci GLUT9L především na bazolaterální membráně bylo navrženo, že odtok urátu z buněk zajišťuje právě GLUT9L v “tandemu” po předchozím kroku, kdy přes URAT1 vstupuje urát z tubulů do buněk na apikální straně (viz Obr. 4). U izoformy GLUT9S, která je exprimována na apikální straně buněk se spekuluje, že by se mohla podílet na sekreci urátu, současně však zatím není plně objasněn její podíl na intracelulární dispozici urátu v buňkách proximálních tubulů. (Nakanishi *et al.*, 2013) Witkowska *et al.* (2012) navrhuje, že funkční rozdíl mezi dvěma izoformami se projevívá v přítomnosti hexóz uvnitř buněk. Při studiích zaznamenali rozdílný vtok urátu do buněk exprimujících rozdílné izoformy.



Obr. 4 GLUT9 na bazolaterální a GLUT9 Δ N na apikální membráně buněk proximálních tubulů
(Wright *et al.*; 2010)

Intaktní funkce obou transportérů (URAT1 a GLUT9) je nejspíše nezbytná pro normální reabsorpci urátu. Tato predikce je podpořena existencemi mutací v genu pro GLUT9 u pacientů s idiopatickou renální hypourikémií, kteří nemají mutaci v genu pro URAT1. (Anzai *et al.*, 2008) Koexprese obou transportérů v epiteliálních buňkách lidských ledvin byla potvrzena imunohistochemicky. (Nakanishi *et al.*, 2013)

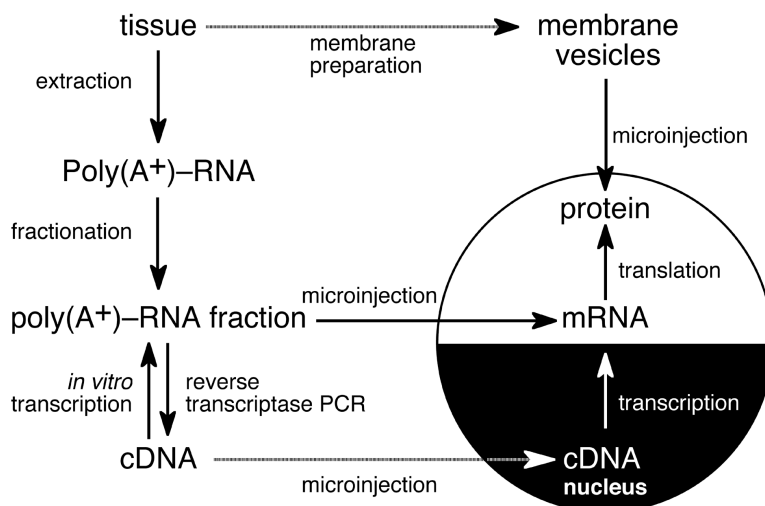
Alelické varianty *SLC2A9* jsou asociovány s poklesem clearance urátu, vedoucí ke změnám koncentrace urátu v séru oproti normálu. (Caufield *et al.*, 2008) Pacienti s homozygotní mutací a ztrátou funkce v genu *SLC2A9* trpí masivní renální hypourikémií, jejíž příčinou je chybějící reabsorpce urátu. (Dinour *et al.*, 2010; Stibůrková *et al.*, 2011)

Díky identifikacím transportních proteinů a díky genetickým studiím u pacientů s poruchou sérových hladin urátu se poznání renálního transportu urátu v posledních letech zvýšilo. Dosud však chybí dostatek informací k tomu, abychom byli schopni plně porozumět přesnému mechanismu obousměrného přenosu urátu. Další studie jsou stále nezbytné. (Anzai *et al.*, 2007)

2.5 Oocyty *Xenopus laevis*

2.5.1 Oocyty jako expresní vektor pro studium funkce membránových transportérů

Expresní systém v oocytech *X. laevis* (viz Obr. 5) byl objevený J.B. Gurdonem (Gurdon *et al.*, 1971) a později vyvinutý i ke studiu iontových kanálů v *in vivo* experimentech. (Barnard *et al.*, 1982) Oocyty drápatek byly od té doby využívány k expresi velkého množství proteinů různých živočišných tkání. (Rungger, 2002)



Obr. 5 Schéma zobrazuje využití oocytů *Xenopus* pro studium exogenních proteinů - mikroinjekce mRNA, cDNA či membránové suspenze (Sigel a Minier, 2005)

Tento expresní systém umožnil funkční identifikaci neznámých proteinů, jejich molekulární charakterizaci, umožnil stanovení funkčně relevantních domén u transportérů iontových kanálů a receptorů. Velikost oocytů, snadná manipulace a vysoká míra exprese jsou výhodou oproti dalším tradičním expresním systémům (*E. coli*, kvasinkovým či buněčným eukaryotickým liniím). (Markovich, 2008)

Jedním z typů studií využívající exprese genů v oocytech bylo sledování změn funkce mutovaných proteinů, které jsou příčinou lidských onemocnění - například studium

mutantních napětově ovládaných sodných kanálů, zapříčiňujících onemocnění kosterního svalstva. (Featherstone *et al.*, 1998).

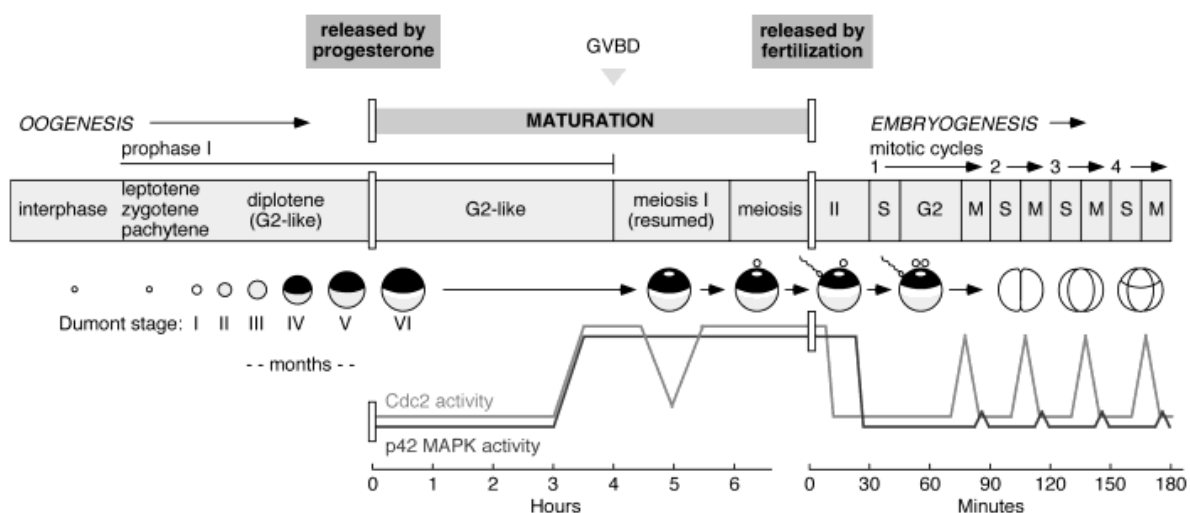
Goldin (2006) srovnává výsledky studií analýzy kauzálních mutací pro generalizovanou epilepsii s febrilními záchvaty plus (GEFS+) s využitím exprese genů v oocytech *Xenopus* (Alekov *et al.*, 2000; Alekov *et al.*, 2001; Spampanato *et al.*, 2001; Spampanato *et al.*, 2003) a s využitím exprese v svačích buněčných liniích (Lossin *et al.*, 2002; Lossin *et al.*, 2003). Výsledky těchto studií jsou někdy porovnatelné, někdy se liší. Není však jasné, která z pozorovaných změn v aktivaci či inaktivaci sodných kanálů skutečně reflektuje efekt mutací v neurálních buňkách *in vivo*. V závislosti na typu studie se tato pozorování efektu některých mutací liší.

Přestože expresní systém v oocytech drápatek je cenným nástrojem pro studium funkce iontových kanálů, existuje řada důležitých faktorů, které je třeba zvážit při rozhodování, zda tento systém využít. Jednou z hlavních výhod je fakt, že tyto buňky neexprimují velké množství iontových kanálů a receptorů, takže exogenní protein může být studován bez vlivu endogenních kanálů. Tato výhoda nemusí platit vždy, protože k expresi některých kanálů a receptorů zde také dochází. (Weber, 1999) Kanály však exprimují pouze některé ovariální oocyty, navíc množství aplikované RNA je obvykle mnohem vyšší než je mRNA endogenních kanálů. Z tohoto důvodu je možné zaznamenat tok přes exogenní kanály bez signifikantního vlivu endogenních kanálů. Další výhodou je fakt, že některé kanály mohou být exprimovány pouze v oocytech drápatek, nikoliv v savčích buňkách. Dopředu však není možné predikovat, které kanály budou spadat do této skupiny.

Na druhou stranu, podobně jako v jiných buňkách, se cílená exprese některých kanálů v oocytech nepodařila. Většina kanálů z této skupiny však nebyla úspěšně exprimována ani v dalších heterologních systémech. Potenciální nevýhodou je variabilita v kvalitě oocytů z hlediska sezónních faktorů. Významný faktem je, že oocyty nejsou přirozenou tkání, ve které původně k expresi kanálů dochází. Pozorované funkční vlastnosti nemusí být totožné. Navíc buněčný transport polarizovaných buněk je odlišný, některé kanály nemusí být dopraveny na vnější membránu oocytu a nelze tedy dále studovat, zda se jedná o vliv mutace či specializovaného buněčného transportu. (Goldin, 2006)

2.5.2 Oocyty po ukončení růstu ve fázi zárodečného váčku

Oocyty se nacházejí v břišní dutině dospělých samic v ovariálním vaku. Zde jsou oocyty uloženy ve shlucích obklopené folikulárními buňkami a pojivovou tkání protkanou cévami. Část oocytů může být chirurgicky odebrána jedné samici až třikrát. Oocyty jsou ve stádiu v zárodečného váčku V - VI (viz Obr. 6) využívány pro elektrofyziologické studie. (Bianchi a Driscoll, 2006)



Obr. 6 Schéma oogeneze, maturace a časné embryogeneze u *Xenopus* (Ferrel, 1999)

Imaturované oocyty ve stádiu VI po ukončení růstu mají velikost okolo 1,3 mm a intracelulární objem 1 μ l, zhruba milionkrát vyšší objem než typická somatická buňka (1pl). Zhruba polovinu z tohoto objemu zaujímá žloutek, který je koncentrován ve světlé vegetální polovině oocyty. V druhé tmavě pigmentované polovině oocyty je zárodečný váček o velikost 300 - 400 nm s cytoplazmou (Ferrel, 1999).

3 Cíle

Cílem této diplomové práce je:

- exprese identifikovaných alelických variant genu SLC2A9 lidského membránového proteinu GLUT9 v oocytech *Xenopus laevis*,
- funkční studie alelických variant GLUT9 na membránách oocytů s použitím radioaktivně značeného [8-14C] urátu,
- vyhodnocení schopnosti wild type variant delší izoformy GLUT9L a kratší izoformy GLUT9S přenášet urát z vnějšího prostředí do buněk,
- hodnocení vlivu mutací na změnu schopnosti přenášet urát do buněk porovnáním s wild type variantami
- vizualizace proteinů a jejich lokalizace v rámci buňky

4 Materiál a metody

4.1 Ligace cDNA do vektoru pGEM[®]-T Easy

Materiál:

- pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega)

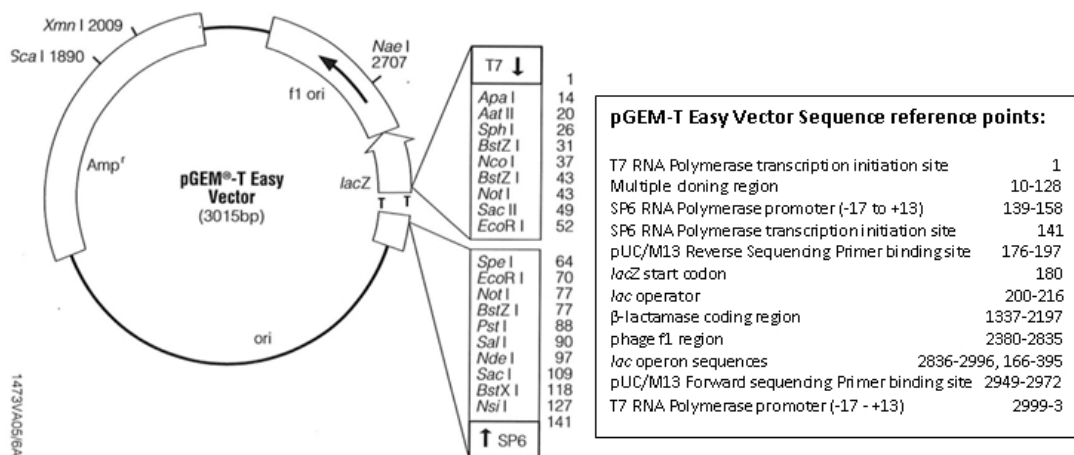


Figure 1 – Map of the pGEM-T Easy Vector

Obr.7 pGEM[®]-T Easy (Promega)

- PCR produkt

Postup:

- Příprava ligační reakce podle protokolu Promega:

2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase Pufr	5,0 µl
pGEM [®] -T Easy Vector (50ng)	1,0 µl
PCR produkt (80 ng)	2,0 µl
T4 DNA Ligase (3U/ µl)	1,0 µl (3U)
Nuclease-free voda	1,0 µl

- Promíchání pipetováním a inkubace 1h při pokojové teplotě

Množství PCR produktu v ng vyplývá ze vztahu:

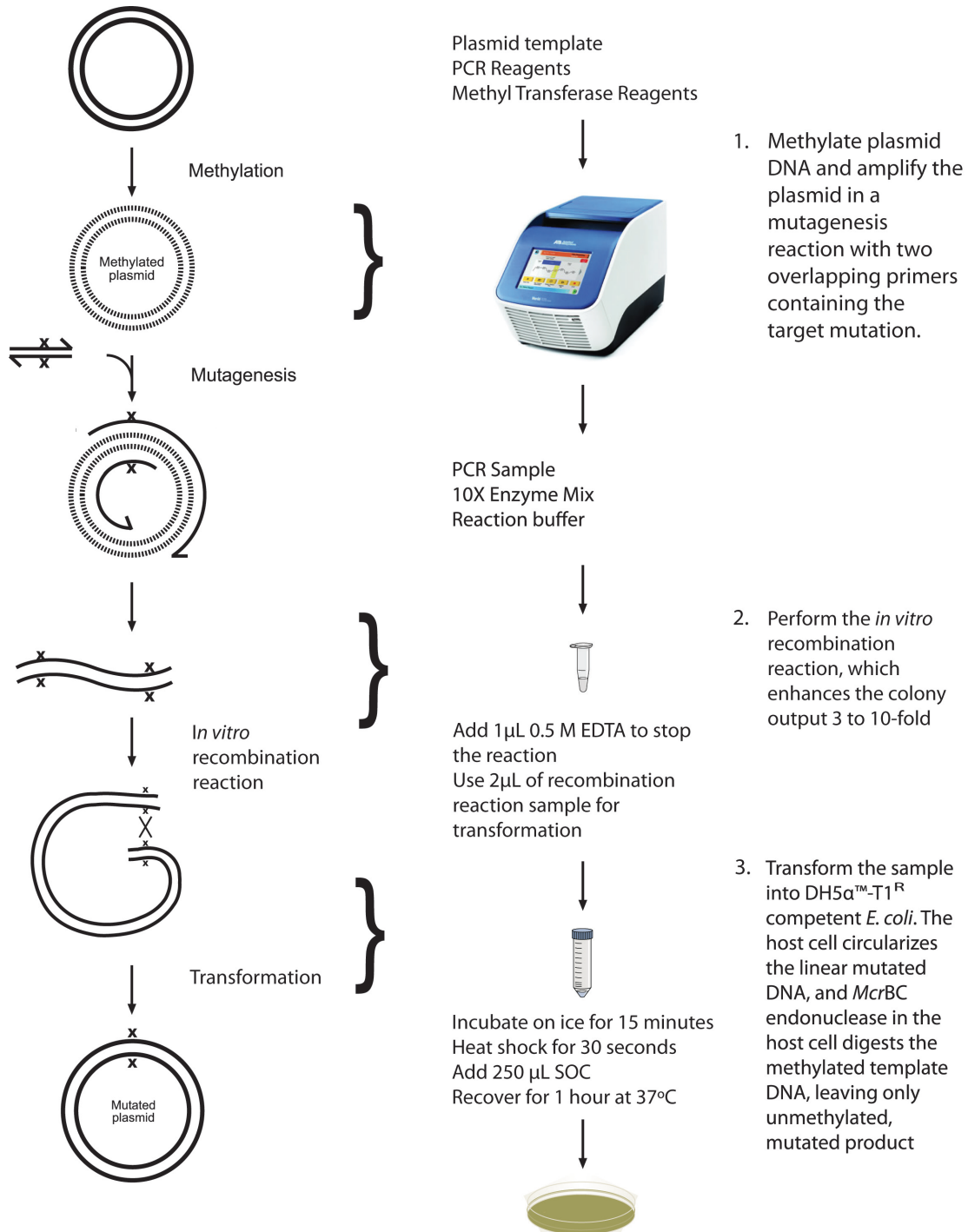
vektor (ng) x velikost inzertu (kb)/velikost vektoru (kb) x molární poměr inzert: vektor

4.2 Mutageneze

4.2.1 Methylační a mutageneční reakce

Materiál:

- GENEART Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen) popis a scéma systému:



Obr. 8 Schéma mutagenečního systému (Invitrogen)

- AccuPrime Pfx DNA Polymeráza (Invitrogen) - 2,5 U / μ l (jednotka - 1U polymerázy inkorporuje 10 nmol dexyribonukleotidů za 30 min při 74°C)
- Templátová DNA
- 10 μ M primery

Postup:

- Příprava reakce:

10X AccuPrime Pfx Reaction mix	5,0 μ l
10X Enhancer	5,0 μ l
Primery (10 μ M)	po 1,5 μ l
Výsledná koncentrace každého primeru v roztoku	0,3 μ M
Templátová DNA (<i>SLC2A9</i> v pGEM T Easy vektoru)	20 ng
DNA Methyláza (4U/ μ l)	1,0 μ l (4U)
25X SAM	2,0 μ l
AccuPrime Pfx polymeráza (2,5 U/ μ l)	0,4 μ l (1 U)
dH ₂ O	doplnění do celkového objemu 50,0 μ l
- Nastavení cyklieru pro PCR reakci s ohledem na velikost vektoru a vloženého genu podle doporučení protokolu Invitrogen:

37°C	20 min
94°C	2 min
18 cyklů:	94°C 20 s
	57°C 30 s
	68°C 2 min 30 s
68°C	5 min
4°C	po ukončení programu

4.2.2 Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA, případně RNA byly stanoveny spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm na Nanodropu ND - 1000.

4.2.3 DNA, gelová elektroforéza

Vzorky DNA byly nanášeny do 1% agarózového gelu, který je vhodný pro separaci fragmentů o velikosti 1000 až 10000 bp.

Materiál pro přípravu 1% agarózového gelu:

- 5x koncentrovaný TBE pufr: 200 mM Tris, 10 mM EDTA, 450 mM H₃BO₃
- Bromfenolová modř (BFM): 50% glycerol, 0,13 M EDTA, 0,12% BFM
- Agaróza (Lonza)
- Ethidium bromid (Sigma): zásobní roztok v koncentraci 1 mg/ 1 ml
- Velikostní standard DNA: GeneRuler DNA Ladder Mix 0,5 µg/µl (Fermentas)

Postup:

- Příprava roztoku agarózy:
 - 1 x TBE pufr 50 ml
 - Agaróza 500 mg
- Zahřívání roztoku agarózy v pufru, dokud se agaróza zcela nerozpustí
- Po schlazení směsi na cca 50°C přidání 50 µl ethidium bromidu
- Nalítí gelu do připravené vaničky, vložení hřebenu
- Tuhnutí gelu zhruba 40 minut
- Složení aparatury a zalití vany s gelem TBE pufrem
- Nanášení vzorků DNA s bromfenolovou modří v poměru objemů 3:1
- Nanesení velikostního standardu DNA 5 µl
- Nastavení elektrického napětí na 70V - 100V v závislosti na velikosti gelu
- Vyhodnocení fragmentů DNA pod UV transluminátorem při vlnové délce 254 nm a snímání digitální černobílou kamerou (The IMAGINGSOURCE)
- Upravení snímků v programu IC Capture (The IMAGINGSOURCE)

4.2.4 Rekombinační reakce

Materiál:

- Vzorek PCR z mutageneční reakce
- dH₂O

z kitu GENEART Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen):

- 10X Enzyme mix
- 5X Reaction Buffer
- 0,5 M EDTA

Postup:

- Příprava rekombinační reakce:

5X Reaction Buffer	4 μl
dH ₂ O	10 μl
Vzorek PCR z mutageneční reakce	4 μl
10X Enzyme mix	2 μl
- Promíchání a inkubace 10 minut při pokojové teplotě
- Zastavení reakce přidáním 1 μl 0,5 M EDTA
- Promíchání a přenesení na led
- Bezprostřední použití produktu k transformaci bakterií

4.2.5 Transformace bakterií DHα - T1 *E. Coli*

4.2.5.1 Příprava ploten s agarovou půdou, ampicilinem, X-Gal

Materiál:

- Nutrient Agar (Oxoid)
- dH₂O
- Autokláv
- Petriho misky (6 cm)
- Ampicilin (Ampicilin sodium salt Amresco)
- IPTG zásobní roztok v koncentraci 100 mM (Fermentas)

- X-Gal (Fermentas)
- DMSO (Sigma)

Postup:

- Příprava roztoku agaru:

Nutrient Agar	5,6 g
dH ₂ O	200 ml
- Sterilizace roztoku v autoklávu
- Schlazení roztoku pod 50°C
- Přidání ampicilinu (2 µl/ 1 ml)
- Přelití na plotny, tuhnutí cca 45 min
- Příprava X-Gal na plotny (množství na 1 plotnu):

Rozpuštění 1,2 mg X-Gal v 50 µl DMSO
Přidání 100 µl 100 mM IPTG
- Nanesení roztoku X-Gal na plotny (150 µl/ plotnu)

4.2.5.2 Vlastní transformace bakterií

Materiál:

- Rekombinační reakce
- Bakterie DH5α - T1 *E. Coli* - součástí kitu GENEART Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen)
- S.O.C. médium - součástí kitu GENEART Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen)
- Připravené plotny s agarovou půdou, ampicilinem a X-Gal
- Vodní lázeň 42°C
- Nádobka s ledem
- Vyhřívaná třepačka (Thermomixer Comfort Eppendorf)
- Termostat

Postup:

- Zahřátí S.O.C. média na pokojovou teplotu
- Rozmražení 2,0 ml mikrozkušavky s obsahem 50 µl bakterií na ledu zhruba 5 - 7 minut
- Přenesení 2 µl rekombinační reakce k bakteriím, promíchání jemným poklepáváním
- Zavíčkování mikrozkušavky a inkubace na ledu 12 minut
- Ponoření do 42 °C vodní lázně na 30 sekund
- Inkubace na ledu 2 minuty
- Přenesení z ledu a přidání 250 µl S.O.C. média
- Inkubace 1 hodinu při 37°C v třepačce při 225 rpm
- Vysévání 30 µl a 50 µl bakterií v médiu na agarové plotny
- Inkubace v termostatu v 37°C 16 hodin

4.2.5.3 Selektce bakteriálních klonů a kultivace v tekutém médiu

Materiál:

- Agarové plotny s pozitivními klony po 16 hodinové inkubaci v termostatu
- Čisté agarové plotny s ampicilinem
- 10 ml uzavíratelné zkumavky
- Tryptose phosphate broth (Oxoid)
- Ampicilin (Ampicilin sodium salt Amresco)
- Třepačka (Shaking incubator NB 205 N-BIOTEK.Inc)
- Inokulační sterilní kličky (Deltalab)

Postup:

- Příprava tryptózo - fosfátového média:

Tryptose phosphate broth	2,95 g
dH ₂ O	100 ml

Sterilizace v autoklávu

Přidání ampicilinu (2 µl/ 1 ml) po schlazení směsi pod 50°C

Rozdělení média do 10 ml zkumavek po 2 ml

- Výběr 5 pozitivních klonů transformovaných bakterií
- Stěr části klonu a přenesení do 2 ml tryptózo - fosfátového média
- Stěr druhé části stejného klonu a přenesení na čistou agarovou plotnu pro uchování v lednici po dobu maximálně 1 měsíce. V případě pozitivní sekvenace lze tento klon použít pro velkoobjemovou kultivaci a následnou izolaci plazmidové DNA. (viz kapitola 4.2.11)
- Inkubace bakterií ve 2 ml tryptózo - fosfátového média na třepačce 16 hodin při teplotě 37°C

4.2.6 Izolace plazmidu PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega)

Materiál:

- Vybrané bakteriální klony po inkubaci 16 hodin při teplotě 37°C v tryptózo - fosfátovém médiu
- PureYield™ Plasmid Miniprep System(Promega)
- Mikrozkušavky 1,5 ml
- dH₂O
- Centrifuga pro mikrozkušavky (14 500 cpm)

Postup:

- Odběr 1 ml z bakteriální kultury, přenesení do mikrozkušavky
- Centrifugace 5 minut při 14 500 rpm
- Vylití supernatantu, doplnění 600 µl dH₂O

Dále podle protokolu Promega:

- Přidání 100 µl lyzačního pufru (Cell Lysis Buffer) a promísění směsi překlápěním zkumavky dokud se roztok v celém objemu nezbarví do modra
- Po 2 - 3 minutách přidání 350 µl studeného 4-8°C neutralizačního roztoku (Neutralization Solution) a důkladné promísění překlápěním zkumavky dokud roztok a precipitát nezmění zcela barvu do světle žluté

- Centrifugace 3 minuty při 14 500 rpm
- Přenesení supernatantu pipetou (900 µl) na kolonku (PureYield™ Minicolumn) umístěné do sběrné mikrozkušavky (PureYield™ Collection Tube)
- Centrifugace 15 sekund při 14 500 rpm
- Vylití supernatantu a umístění kolonky do stejné sběrné mikrozkušavky
- Přidání 200 µl promývacího roztoku Endotoxin Removal Wash
- Centrifugace 15 sekund při 14 500 rpm
- Přidání 400 µl promývacího roztoku Column Wash Solution
- Centrifugace 30 sekund při 14 500 rpm
- Přenesení kolonky do čisté 1,5 ml mikrozkušavky a přidání 30 µl elučního pufru (Elution Buffer) přímo na membránu kolonky, ponechání 1 minutu
- Vymytí izolované DNA centrifugací 15 sekund při 14 500 rpm,
- Uchování v -20°C

4.2.7 Stanovení koncentrace DNA

viz kapitola 4.2.2

4.2.8 Restrikční analýza

Materiál:

- Restrikční endonukleáza Fast Digest EcoRI
- Pufr Fast Digest Buffer (Thermo Scientific - Fermentas)
- dH₂O
- Zahřívací blok (Dry Block Thermostat TDB-120 Biosan)
- Mikrozkušavky 0,5 ml
- Bromfenolová modř (BFM): 50% glycerol, 0,13 M EDTA, 0,12% BFM

Postup:

- Příprava roztoku:

Fast Digest EcoRI	1,0 µl (1FDU)
Fast Digest Buffer (10x)	2,0 µl
Vzorek DNA	200 - 300 ng

dH₂O doplnění do celkového objemu 20 μl

- Inkubace 10 min při teplotě 37°C
- Přidání bromfenolové modři v poměru objemů - vzorek:BFM/ 3:1
- Nanesení do agarózového gelu pro elektroforézu

4.2.9 DNA gelová elektroforéza

viz kapitola 4.2.3

4.2.10 Sekvence

Vzorky byly sekvenovány v Laboratoři sekvenace DNA Přírodovědecké fakulty UK Praha na 3130 Genetic Analyzer (Applied biosystems). Pro vyhodnocení jsem využívala software SerialCloner 2.6.0 a 4Peaks pro OS X/Mac.

Materiál:

- DNA
- iH₂O
- primery

Pro sekvenaci každého klonu jsem používala 4 primery s následnou komplementaritou:

- ve vektoru pGEM T Easy před 5'koncem vloženého genu (M13 Forward Sequencing Primer binding site 2949-2972) (viz Obr. 7)
- ve vektoru pGEM za 3'koncem vloženého genu (M13 Reverse Sequencing Primer binding site 176-197) (viz Obr. 7)
- na pozici 408-429 ve vložené genové sekvenci pro *SLC2A9L*, případně 419-440 ve vložené genové sekvenci pro *SLC2A9S* (forward primer - 2F)
- na pozici 1280-1371 ve vložené genové sekvenci pro *SLC2A9L*, případně 1291-1382 ve vložené genové sekvenci pro *SLC2A9S* (reverse primer - 3R)

Postup:

Vzorky jsem připravovala s ohledem na aktuální požadavky laboratoře.

4.2.11 Izolace plazmidu Genopure Plasmid Midi Kit (Roche)

Materiál:

- Bakteriální kultura v 100 ml tryptózo - fosfátového média po inkubaci 16 hodin při 37°C
- Genopure Plasmid Midi Kit (Roche)
- 70% Ethanol (Penta)
- Isopropanol (Penta)
- dH₂O
- EB pufr (Qiagen)
- Kónické zkumavky s uzávěrem 50 ml
- Mikrozukavky 1,5 ml
- Vyhřívaná vodní lázeň (50°C)
- Centrifuga s chlazením (5°C), 4000 rpm výkyvný rotor na kónické zkumavky, 14 500 rpm úhlový rotor na mikrozukavky (Universal 32-R Hettich)

Postup:

- Přenesení 30 ml bakteriální kultury do kónické zkumavky
- Centrifugace 10 minut, 4000 rpm s výkyvným rotorem při teplotě 5°C
- Odstranění supernatantu, resuspendování v 4 ml suspenzního pufru (Suspension Buffer + RNase)
- Přidání 4 ml lyzačního pufru (Lysis Buffer), promíchání překlápěním zkumavky 6 až 8 krát, inkubace 2 až 3 minuty při pokojové teplotě
- Přidání 4 ml chlazeného (5°C) neutralizačního pufru (Neutralization Buffer), získání homogenní směsi překlápěním zkumavky
- Inkubace 5 minut na ledu
- Čištění lyzátu přes filtrační papír, filtrace do čisté kónické 50 ml zkumavky
- Ekvilibrace kolonky 2,5 ml ekvilibračního pufru (Equilibration Buffer) umístěné v kónické zkumavce
- Přenesení vyčištěného lyzátu na kolonku s gravitačním průtokem,
- Promývání kolonky 5 ml promývacího pufru (Wash Buffer), promývání dvakrát

- Přenesení kolonky do čisté kónické zkumavky, eluce plazmidu 5 ml předeřhřátého elučního pufru (50°C)
- Precipitace plazmidové DNA přidáním 3,6 ml isopropanolu
- Rozdělení směsi do 6 mikrozkuavek po cca 1,43 ml
- Centrifugace 30 minut, 14 500 rpm při 5°C
- Odstranění supernatantu, přidání 1 ml 70% ethanolu do každé zkumavky
- Centrifugace 10 minut, 14 500 rpm při 5°C
- Opatrné odstranění ethanolu pipetou, sušení peletu 10 minut při pokojové teplotě
- Rozpuštění DNA přidáním 50 µl EB pufru, přepipetování DNA s EB pufrem ze zkumavek 1 až 5.

4.2.12 Stanovení koncentrace DNA

viz kapitola 4.2.2

4.2.13 Restrikční analýza

viz kapitola 4.2.8

4.2.14 DNA gelová elektroforéza

viz kapitola 4.2.3

4.3 Příprava cRNA

4.3.1 Příprava templátu DNA pro *in vitro* transkripci

4.3.1.1 Linearizace plazmidové DNA

Materiál:

- cDNA v pGEM T Easy vektoru
- Restrikční endonukleáza Scal (Fermentas)
- Pufř Scal Buffer (Fermentas)
- iH₂O

- Zahřívací blok (Dry Block Thermostat TDB-120 Biosan)
- Mikrozkušavky 0,5 ml
- 0,5M EDTA (Invitrogen)

Postup:

- Příprava roztoku:

Scal (10 U/ μ l)	2,0 μ l (20 U)
Scal Buffer	5,0 μ l
Plazmidová DNA	5,0 μ g
dH ₂ O	doplnění do celkového objemu 50 μ l
- Inkubace 1 hodinu při teplotě 37°C
- Přidání 2,5 μ l 0,5 EDTA

4.3.1.2 Purifikace DNA pomocí GeneJET PCR Purification Kitu (Fermentas)

Materiál:

- Reakční směs štěpené plazmidové DNA
- GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas)
- Stolní centrifuga pro mikrozkušavky
- Mikrozkušavky 1,5 ml

Postup:

- Přidání 50 μ l (1:1) pufru Binding Buffer k reakční směsi štěpené plazmidové DNA 50 μ l a přenesení 100 μ l směsi na purifikační kolonku GeneJET purification column.
- Centrifugace 60 sekund, 14 500 rpm, odstranění roztoku ze sběrné zkumavky
- Promývání kolonky 700 μ l Wash Buffer
- Centrifugace 1 minutu při 14 500 rpm, odstranění roztoku ze sběrné zkumavky
- Centrifugace prázdné kolonky 1 minutu, přemístění kolonky do čisté 1,5 ml mikrozkušavky
- Eluce 20 μ l Elution Buffer, centrifugace 1 minutu při 14 500 rpm.
- Uchování v -20°C

4.3.1.3 Stanovení koncentrace DNA

viz kapitola 4.2.2

4.3.1.4 DNA gelová elektroforéza

viz kapitola 4.2.3

4.3.2 *In vitro* transkripce z T7 RNA polymerázového promotoru

Materiál:

- Templát - přečištěná linearizovaná DNA
- mMESSAGE mMACHINE Kit (Ambion - Invitrogen)
- Mikrozkušavky 1,5 ml
- Zahřívací blok (Dry Block Thermostat TDB-120 Biosan)

Postup:

- Příprava transkripční reakce podle protokolu Invitrogen:

2X NTP/CAP	10,0 µl
10X Reaction Buffer	2,0 µl
Nuclease-free voda	doplnění do celkového objemu 20,0 µl
Přečištěná linearizovaná DNA	1,0 µg
Enzyme Mix	2,0 µl
- Inkubace 2 hodiny při 37°C

4.3.3 Purifikace RNA pomocí RNeasy Mini Kitu (Qiagen)

Materiál:

- Reakční směs mRNA z *in vitro* transkripce
- RNeasy Mini Kit (Qiagen)
- 96 - 100% ethanol
- Mikrozkušavky 1,5 ml
- Stolní centrifuga pro mikrozkušavky (14 500 rpm)

Postup:

Podle protokolu RNA Cleanup z RNA RNeasy Mini Kit (Qiagen):

- Doplnění reakční směsi do 100 µl RNase-free vody
- Přidání 350 µl Buffer RTL
- Přidání 250 µl 96 - 100 % ethanolu, promíchání pipetováním
- Přenesení vzorku na kolonku RNeasy Mini spin column umístěné do sběrné zkumavky
- Centrifugace 15 sekund při 14 500 rpm, odstranění roztoku ze sběrné zkumavky
- Promývání pomocí 500 µl Buffer RPE na kolonku, centrifugace 15 sekund při 14 500 rpm
- Promývání pomocí 500 µl Buffer RPE na kolonku, centrifugace 2 minuty při 14 500 rpm
- Přenesení kolonky do čisté 1,5 ml mikrozkušavky. Eluce 30 µl RNase-free vody
- Centrifugace 1 minutu při 14 500 rpm
- Uchování v -70°C

4.3.4 Stanovení koncentrace RNA

viz kapitola 4.2.2

4.3.5 RNA gelová elektroforéza

viz kapitola 4.2.3

Nanášení velikostního standardu RNA RiboRuler RNA Ladder, High Range (Thermo Scientific)

4.4 Exprese SLC2A9 v oocytech *Xenopus laevis*

4.4.1 Příprava oocytů *X. laevis* pro mikroinjikace cRNA

Roztoky:

- ND-96 kultivační médium pro oocyty

Materiál:

NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, NaOH (PENTA)

1M HEPES pufr (SIGMA-ALDRICH)

Pyruvát sodný (SIGMA)

Gentamycin - Gentaveto - 5(V M.D.)

dH₂O

Složení:

NaCl 96,0 mM, KCl 2,0 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1,0 mM, HEPES 5,0 mM, pyruvát sodný 2,5 mM, gentamycin 1 μl/1 ml, dH₂O, pH 7,6 úprava pH pomocí NaOH

- OR-2 médium pro oplachování a přípravu oocytů

Materiál:

NaCl, KCl, MgCl₂, NaOH (PENTA)

1M HEPES pufr (SIGMA-ALDRICH)

dH₂O

Složení:

NaCl 82 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 1,0 mM, HEPES 5,0 mM, dH₂O, pH 7,6 úprava pH pomocí NaOH

4.4.1.1 Příprava samice *X. laevis* a odběr oocytů

Organismy:

Samice *X. laevis* byla oddělena od ostatních samic v chovu do zvláštní kádě, týden před odběrem oocytů dostávala pravidelně ve stravě vitamin E 100 - Zentiva.

Materiál:

- Tricaine (SIGMA)

- H₂O
- Skleněná kádinka 1,0 l
- Táč s ledem
- Vysterilizované chirurgické nástroje (skalpel, jehla, vstřebatelné chirurgické nitě 0,2 mm, nůžky)
- 70% ethanol (PENTA)
- Petriho miska (6 cm)
- roztok OR-2

Postup:

- Příprava roztoku do skleněné kádinky:
 - Tricaine 0,25 g
 - H₂O 200 ml
- Ponoření samice do roztoku, zajištění kádinky víčkem s otvory pro výměnu vzduchu
- Uspání samice v roztoku 30 minut
- Přenesení samice na táč s ledem do polohy na hřbetu.
- Řez kůže a pobřišnice skalpelem v tříselné oblasti o délce 1,5 cm
- Vyjmutí části ovariálního vaku pinzetou, odstrižení části vaku cca 2 cm³ a ponoření do roztoku OR-2 v Petriho misce
- Zašití pobřišnice a kůže chirurgickými stehy
- Přenesení samice do vysoké kádinky 1l do 3/4 naplněné čistou vodou, zajištění víčkem s otvory

4.4.1.2 Ošetření oocytů před mikroinjikací

Materiál:

- Kolagenáza (Collagenase from Clostridium histolyticum SIGMA-ALDRICH)
- Binokulární lupa (Stemi 2000 ZEISS)
- Roztoky OR-2, ND-96
- Pasteurovy pipety

- Petriho misky (6 a 9 cm)
- Kónické zkumavky 50 ml
- kývačka

Postup:

- Příprava roztoku kolagenázy:

Kolagenáza	30 mg
OR-2	15 ml
- Přenesení odebraných oocytů v misce s OR-2 pod binokulární lupu, oddělení ovariálních obalů dvěma ostrými pinzetami
- Přenesení oocytů Pasteurovou pipetou do 10 ml OR-2 v kónické zkumavce, oocyty musí při manipulaci zůstat stále ponořené v roztoku
- Proplachování oocytů opatrným převrácením zkumavky
- Odebrání OR-2 a přidání 15 ml roztoku kolagenázy, kývání na kývačce 1,5 - 2 hodiny až do oddělení oocytů z obalů a z mezibuněčné hmoty
- Vylití roztoku kolagenázy a přidání 30 ml OR-2, kývání na kývačce 30 minut
- Po separaci 90 - 95% oocytů vylití OR-2 doplnění čistým roztokem OR-2, proplachování oocytů, dokud roztok není čirý
- Opatrné přenesení oocytů do Petriho misky s roztokem OR-2 a selekce oocytů pod binokulární lupou
- Výběr oocytů s průměrem minimálně 1 mm - největší oocyty v růstové fázi zárodečného váčku, dokonale kulaté s rovnoměrnou barvou na obou pólech, bez skvrn a bez zbytků mezibuněčné hmoty
- Přenášení vybraných oocytů Pasteurovo pipetou do čisté Petriho misky s roztokem ND-96
- Selekcce v druhém kroku "ideálních" oocytů a jejich přenášení do Petriho misky s průměrem 6 cm a s roztokem ND-96. Do jedné misky 40 oocytů pro 1 variantu cRNA (včetně neinjikovaných kontrol)
- Inkubace v uzavřené Petriho misce 30 minut při pokojové teplotě

4.4.2 Mikroinjikace cRNA do oocytů

Materiál:

- Ošetřené oocyty v 6 mm Petriho misce v médiu ND-96
- Mikroinjektor IM300 (Narishige)
- cRNA
- Nádoba s ledem
- Pasteurova pipeta
- Zásobní lahvičky se závitkem 50 ml
- Roztok ND-96

Postup:

- Výpočet objemu injikovaného množství cRNA podle koncentrace přečištěné cRNA (50 ng/ oocyt)
- Nasátí 5 - 6 μ l cRNA do kapiláry mikroinjektoru, kalibrace přístroje na injikaci požadovaného objemu na jeden impuls
- Uchovávání rozmrazené cRNA před injikací na ledu
- Injikace roztoku cRNA do vegetální hemisféry oocytu těsně pod rozhraní animální a vegetální hemisféry, inkubace 10 minut při pokojové teplotě
- rozdělení injikovaných oocytů do 2 zásobních lahviček se závitkem 50 ml s roztokem ND-96 - pro funkční studie 32 oocytů, pro imunocytochemické značení 8 oocytů.
- Inkubace 48 hodin v ND-96 při 18°C, průběh translace cRNA *in vivo*

4.5 Funkční studie

Roztoky:

- ND-96 (viz kapitola 4.4.1)
- Zásobní roztok radioaktivně značené kyseliny močové (roztok A)

Materiál:

- Radioizotop Uric Acid [8-14]C, 50-60 mCi/mmol (1.85-2.22 GBq/mmol) v pevném skupenství (American Radiolabeled Chemicals, Ins.)

- K_2HPO_4 (PENTA)
- KOH (PENTA)
- iH_2O

Složení: Radioizotop rozpuštěný ve 2,5 ml vodného roztoku 10mM K_2HPO_4 : 1 M KOH (99 : 1), výsledná aktivita 0,1 mCi/ ml, uchování v $-20^\circ C$

- Roztok neznačeného urátu (roztok B)

Materiál:

- Urát sodný (Uric Acid Sodium Salt U2875-5G, Sigma) v pevném skupenství
- ND-96

Složení: 100 μM urát sodný v roztoku ND-96

- Radioaktivní roztok

Materiál:

- Zásobní roztok radioaktivně značené kyseliny močové (roztok A)
- Roztok neznačeného urátu sodného (roztok B)

Složení: 0,975% roztok B, 0,025% roztok A (výsledná aktivita: 0,64 GBq/mmol)

- 0,0625 M vodný roztok NaOH

Materiál:

- Injikované oocyty po inkubaci 48 hodin v ND-96 při $18^\circ C$
- 24 jamková destička (1 ks pro studie 4 skupin oocytů s odlišnými variantami cRNA)
- Pasteurovy pipety
- Nádobka s ledem
- Scintilátor TRI-CARB 2900TR Liquid Scintillation Analyzer (Packard)
- Scintilační zkumavky
- Scintilační roztok (Biodegradable Counting Scintillant Amersham Biosciens)
- Časovače
- Ochranné pomůcky - plášť, rukavice, brýle
- Exsikátor

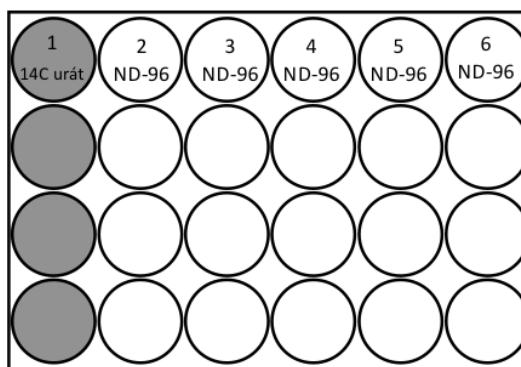
Postup:

- Příprava roztoku neznačeného urátu (roztok B), rozpouštění vysoce nerozpustného urátu sodného sonikací a zahříváním při maximální teplotě 70°C
- Příprava pro 32 oocytů injikovaných 1 variantou cRNA:
 - Radioaktivní roztok 0,5 ml, uchování na ledu
 - ND-96 5,0 ml, uchování na ledu
 - 0,0625 M NaOH 0,2 ml

- Pipetování zchlazeného 0,5 ml radioaktivního roztoku do jamky 1 (viz Obr. 9)
- Přenesení všech 32 oocytů Pasteurovou pipetou ze zásobní lahvičky do radioaktivního roztoku

(s výjimkou prasklých nebo porušených oocytů), inkubace v roztoku 30 minut

- Po cca 7-8 minutách od přenesení poslední skupiny oocytů do radioaktivního roztoku,



Obr. 9 Schéma rozložení roztoků na 24 - jamkové destičce

přenesení další skupiny oocytů s odlišnou cRNA do 0,5 ml radioaktivního roztoku v jamce 1 v další řadě

- Po 30 minutách inkubace odsátí radioaktivního roztoku Pasteurovou pipetou a přidání 1 ml chlazeného ND-96 na oocyty. Pipetáž po 1 ml chlazeného ND-96 do jamek 2 - 6 v řadě.
- Postupné přenášení oocytů Pasteurovou pipetou z jamky 1 do 2 až 6 s minimálním množstvím roztoku v pipetě, oplach oocytů v čistém ND-96
- Z poslední jamky č. 6 rozdělení oocytů do 6 scintilačních zkumavek, do každé přenesení 5 oocytů, v případě všech neporušených oocytů likvidace 2 náhradních
- Přidání 40 μ l 0,0625 M NaOH do každé scintilační zkumavky, poklepáním lýže oocytů

- Příprava BLANK zkumavek bez přítomnosti radioaktivního roztoku: 10 μ l ND-96, 40 μ l 0,0625 M NaOH
- Příprava IZOTOP zkumavek s očekávanou radioaktivitou v daném objemu: 10 μ l radioaktivního roztoku, 40 μ l 0,0625 M NaOH
- Sušení vzorků ve scintilačních zkumavkách 48 hodin v exsikátoru
- Po vysušení přidání 0,5 ml scintilačního roztoku do každé zkumavky, zavíčkování
- Měření radioaktivního rozpadu ve vzorcích na kapalném scintilátoru

4.6 Vizualizace a lokalizace GLUT9 v rámci oocyty *X. laevis*

4.6.1 Imunocytochemické značení GLUT9 v oocytech

Fixace oocytů ve 4% paraformaldehydu a zalití do parafínových bločků byla provedena v Histologické laboratoři ÚDMP. Nařezané preparáty byly značeny primární polyklonální protilátkou rabbit anti-SLC2A9 (MBL Japan) se specifitou k C-koncové doméně GLUT9. Kontrolní URAT1 protein byl značen osvědčenou primární protilátkou rabbit anti-SLC22A12 (SIGMA). Sekundární protilátky byly zvoleny Alexa Fluor 488 a 568 goatanti-mouse IgG(H+L) (Life Technologies).

Pro kolokalizační studie mutantních proteinů a endoplasmatického retikula (ER) byla jako marker ER zvolena mouse anti-PDI monoklonální protilátka (Stressgen, Belgium).

5 Výsledky

5.1 Soubor alelických variant *SLC2A9*

Součástí retrospektivního souboru detailně biochemicky a klinicky testovaných jedinců včetně známé medikace je skupina 100 pacientů s patologickými hodnotami urikémie (většinou hyperurikémičtí jedinci) a kontrolní skupina 150 normourikémických jedinců. V těchto dvou skupinách bylo identifikováno 17 alelických variant *SLC2A9*, z toho 6 synonymních a 11 nesynonymních jednobodových záměn, 1 jedno nukleotidová inzerce s následkem posunu čtecího rámce. Studium alelických variant jsme omezili na nesynonymní záměny a inzertní mutaci. Popis identifikovaných alelických variant *SLC2A9* (viz Tab. 1) jsem dostávala průběžně od Mgr. Ing. Blanky Stibůrkové, Ph.D. z ÚDMP .

nukleotidové záměny	aminokyselinové záměny	dbSNP reference
	nesynonymní mutace:	
c.73G>A	p.G25R	rs2276961
c.707G>A	p.G216R	-
c.824C>T	p.T275M	rs112404957
c.841G>C	p.D281H	rs73225891
c.844G>A	p.V282I	rs16890979
c.881G>A	p.R294H	rs3733591
c.1059A>G	p.N333S	-
c.1049C>T	p.P350L	rs2280205
c.505G>A	p.V169M	rs144196049
c.208G>A	p.A17T	rs6820230
c.215G>A	p.G72D	-
c.416 ins C	p.I118HfsX27	-
	synonymní mutace:	
c.123T>C	p.S41S	rs112581525
c.383T>C	p.L108L	rs13113918
c.375G>A	p.T125T	rs10939650
c.469G>A	p.G136G	-
c.504C>T	p.I168I	rs3733589
c.628T>C	p.L189L	rs13125646

Tab. 1 Popis alelických variant *SLC2A9*

5.1. Příprava cDNA wt variant *SLC2A9L* a *SLC2A9S*.

Z ÚDMP jsme získali cDNA lidského genu delší *SLC2A9L* a kratší *SLC2A9S* sestřihové izoformy. Obě se lišily od popsaných wt variant. *SLC2A9L* se lišila ve 3 nukleotidech A116G, C638T, A905G od wt varianty popsané v GenBank - "NCBI Reference Sequence: NM_020041.2 Homo sapiens solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 9 (*SLC2A9*), transcript variant 1, mRNA", 1874 bází. *SLC2A9S* se lišila ve 4 nukleotidech C394T, A447G, C639T, T1121C od wt varianty popsané v GenBank - "NCBI Reference Sequence: NM_001001290.1 Homo sapiens solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 9 (*SLC2A9*), transcript variant 2, mRNA", 1885 bází.

Pro klonování a expresi genu jsme zvolili "high copy number" bakteriální vektor pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega) s T7 RNA polymerázovým promotorem a cDNA jsem následujícím způsobem upravila a vložila do vektoru:

- Úprava cDNA pro ligaci do vektoru - PCR reakce s bez použití primerů s pomocí LA DNA polymerázou (Top-Bio) - přidání deoxypolyadenosinů na 3'konec genu
- Kontrola velikosti získaného fragmentu gelovou elektroforézou (viz kapitola 4.2.3), spektrofotometricky měření koncentrace DNA (viz kapitola 4.2.2)
- Ligace cDNA do vektoru pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega) (viz kapitola 4.1)
- Transformace bakterií DH5 α - T1 *E. Coli* (viz kapitola 4.2.5) a výsev bakterií v S.O.C. médiu na misky s agarovou půdou, s ampicilinem a s X-Gal v množství 20, 50 a 150 μ l. Inkubace při 37°C přes noc.
- Stěr 5 klonů z s variantou genu GLUT9S a s variantou genu GLUT9L, zaočkování do 2 ml tekutého tryptózo-fosfátového média, inkubace při 37°C 16 hodin, přeočkování vybraných klonů na záložní agarové misky (viz kapitola 4.2.5.3)
- Izolace plazmidové DNA - PureYield[™] Plasmid Miniprep System(Promega) (viz kapitola 4.2.6)
- Restrikční analýza, gelová elektroforéza (viz kapitola 4.2.8 a 4.2.3)
- Sekvence 2 klonů z každé varianty (viz kapitola 4.2.10)

Vzhledem k tomu, že varianta S a L se liší pouze v prvním exonu, bylo možné primery pro sekvenaci univerzálně používat pro přípravu sekvenačních reakcí obou variant.

- Výběr finálního klonu pro každou variantu, stěr ze záložní agarové misky a množení ve 100 ml tekutého tryptózo-fosfátového média, inkubace při 37°C 16 hodin a izolace plazmidové DNA - Genopure Plasmid Midi Kit (Roche) (viz kapitola 4.2.11)
- Kontrolní sekvenace (viz kapitola 4.2.10)

Místně specifickou mutagenezí jsem v cDNA *SLC2A9L* a v cDNA *SLC2A9S* vnesených do vektoru pGEM[®]-T Easy nahrazovala odlišné nukleotidy od popsaných wt variant. U *SLC2A9L* na těchto 3 pozicích: A116G, C638T, A905G, u *SLC2A9S* na těchto 4 pozicích: C394T, A447G, C639T, T1121C. Mutageneční PCR reakce může v jednom kroku nahradit nukleotidy pouze v jednom specifickém místě genu, proto bylo nutné celý následující postup opakovat v případě *SLC2A9L* třikrát, v případě *SLC2A9S* čtyřikrát:

- Metylační a mutageneční reakce (viz kapitola 4.2.1)

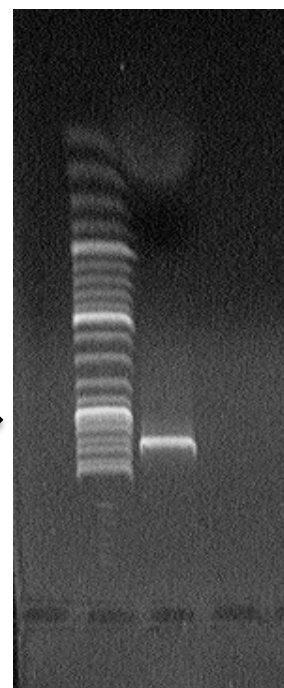
Primery pro mutageneční reakce jsem navrhovala tímto způsobem:

Oba primery (forward i reverse) musí obsahovat požadovanou mutaci. Místo mutace (v našem případě substituce či inserce 1 báze) musí být umístěno v centrální oblasti primeru. Oba primery by měly být dlouhé 30 až 45 nukleotidů, nezapočítává se délka mutace v našem případě 1 báze. Zvolila jsme primery dlouhé 35 nukleotidů, substituovaný (případně inzertovaný) nukleotid byl umístěn uprostřed.

- Gelová elektroforéza (viz kapitola 4.2.3)

Velikost fragmentu amplifikované DNA po mutagenezi jsem kontrolovala gelovou elektroforézou (viz Obr. 10)

3000 bp →



Obr. 10 Příprava wt varianty *SLC2A9S*, fragment cca 5000 bází, záměna C639T v *SLC2A9S* (ve vektoru pGEM T Easy).

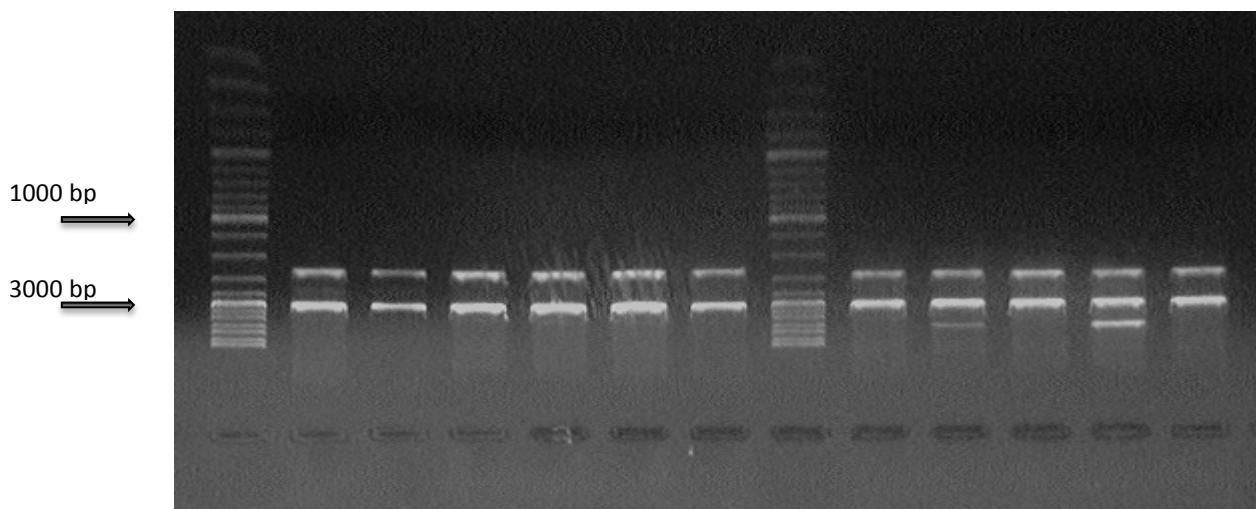
- Rekombinační reakce (viz kapitola 4.2.4)
- Transformace bakterií DH α - T1 *E. Coli* (viz kapitola 4.2.5)

Pro optimální hustotu klonů se osvědčilo vysévání 30 μ l S.O.C. média s transformovanými bakteriemi / 1 plotnu s agarovou půdou, ampicilinem a X-Gal. Po 16 hodinách inkubace při 37°C jsem vybrala 5 pozitivních klonů pro růst v tryptózo-fosfátovém médiu a na záložní agarové plotny.

- Izolace plazmidové DNA - PureYield™ Plasmid Miniprep System(Promega) z 5 vybraných klonů (viz kapitola 4.2.6)

Plazmidovou DNA jsem eluovala do nejmenšího doporučeného objemu 30 μ l pufru protokolem Promega. Výtěžky se pohybovaly v rozmezí 80 - 220 ng / μ l podle klonu.

- Stanovení koncentrace izolované DNA (viz kapitola 4.2.2)
- Restrikční analýza (viz kapitola 4.2.8)
- Gelová elektroforéza (viz kapitola 4.2.3)



Obr. 11 Restrikční analýza pomocí *EcoRI*. Plazmidová DNA ze 6 bakteriálních klonů GLUTL(A905G) a z 5 klonů GLUTS(T1121C). Kromě fragmentů o velikosti vložené genové sekvence (cca 2000 bp) a vektoru pGEM T Easy (cca 3000 bp) je u dvou klonů patrný fragment nedostatečně štěpené plazmidové DNA (5000 bp).

Plazmidovou DNA klonů, u kterých velikost fragmentů po restrikční analýze (viz Obr 11) odpovídala velikosti vložené genové sekvence (cca 2000 bp) a vektoru pGEM T Easy (cca 3000 bp) jsem nechala osekvenovat. Pro sekvenaci jsem vybrala 3 klony z každé varianty, při úspěšné mutagenézi byl alespoň 1 ze 3 sekvenovaných klonů byl bezchybný.

- Sekvenace 3 klonů (viz kapitola 4.2.10)

Po úspěšné sekvenaci bylo možné přistoupit k další mutagenezi a záměně dalšího nukleotidu v genu až k získání popsané wild type varianty.

V posledním kroku po sekvenaci a ověření shodnosti s wt variantou jsem si připravila 100 ml tryptózo - fosfátového média (viz kapitola 4.2.5.3). Rozdělila jsem médium - 2 ml do uzavíratelné zkumavky a 98 ml do Erlenmeyerovy baňky. Ze zásobní agarové ploty uchované maximálně měsíc při 5°C jsem přenesla konkrétní klon do 2 ml média, inkubovala kulturu na třepačce 8 hodin při 37°C, poté odebrala 1 ml z kultury a přenesla do 98 ml média v Erlenmeyerově baňce. Inkubovala jsem kulturu dalších 16 hodin na třepačce při teplotě 37°C.

Následovala:

- Izolace plazmidové DNA - Genopure Plasmid Midi Kit (Roche) (viz kapitola 4.2.11)

Výtěžky po izolaci se pohybovaly v rozmezí 1400 - 2200 ng / µl v objemu 50 µl elučního pufu.

- Kontrolní sekvenace (viz kapitola 4.2.10)

5.2. Příprava cDNA alelických variant *SLC2A9L* a *SLC2A9S*

Pro izoformu GLUT9L a GLUT9S byly jedinečné pouze 2 alelické varianty a to aminokyselinové záměny v N-koncové doméně proteinu p.G25R pro GLUT9L a p.A17T pro GLUT9S. Ostatní nesynonymní mutace jsem připravovala v obou izoformách GLUT9L a GLUT9S.

Navrhla jsem primery pro mutageneční reakce stejným způsobem jako při tvorbě wt variant cDNA (viz kapitola 5.2). Pro příklad uvádím navržený primeru pro záměnu deoxyadenosinu za deoxyguanosin v cDNA na pozici 505 **V169M (c.505G>A; rs144196049)**:

V169M - forward: CCTTTGAAATGCTCATC**A**TGGGACGCTTCATCATG

V169MR - reverse: CATGATGAAGCGTCCCA**T**GATGAGCATTTCAAAGG

Jako templátovou DNA v mutageneční reakci jsem používala cDNA wt *SLC2A9L* a cDNA wt *SLC2A9S* v pGEM TEasy vektoru získanou v předchozích krocích (viz kapitola 5.2). Obdobně jako při tvorbě wt variant jsem připravovala jednotlivé alelické varianty následujícím způsobem:

- Metylační a mutageneční reakce (viz kapitola 4.2.1)
- Gelová elektroforéza (viz kapitola 4.2.3)
- Rekombinační reakce (viz kapitola 4.2.4)
- Transformace bakterií DH α - T1 *E. Coli* (viz kapitola 4.2.5)
- Izolace plazmidové DNA - PureYield™ Plasmid Miniprep System(Promega) z 5 vybraných klonů (viz kapitola 4.2.6)
- Stanovení koncentrace izolované DNA (viz kapitola 4.2.2)
- Restrikční analýza (viz kapitola 4.2.8)
- Gelová elektroforéza (viz kapitola 4.2.3)
- Sekvence 3 klonů (viz kapitola 4.2.10)
- příprava 100 ml tryptózo - fosfátového média, růst klonu v médiu 8 a 16 hodin při 37°C a izolace plazmidové DNA - Genopure Plasmid Midi Kit (Roche) (viz kapitola 4.2.11)
- Kontrolní sekvenace (viz kapitola 4.2.10)

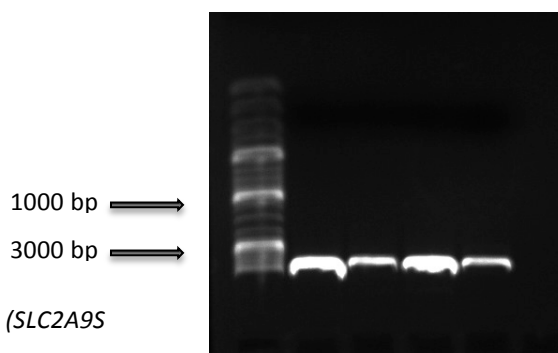
Podařilo se mi připravit cDNA všech alelických variant s nesynonymními mutacemi (viz Tab. 1) v obou izoformách a cDNA variant specifických pro každou z izoform (p.G25R pro GLUT9L a p.A17T pro GLUT9S). Celkem 22 odlišných cDNA.

5.3. Příprava cRNA

Templát pro transkripci *in vitro* jsem připravovala linearizací cDNA každé varianty *SLC2A9* v pGEM T Easy vektoru podle postupu v kapitole 4.3.1.1. Zvolila jsem restrikční endonukleázu *ScaI* se specifitou štěpení v genu pro ampicilinovou rezistenci ve vektoru (viz Obr. 7).

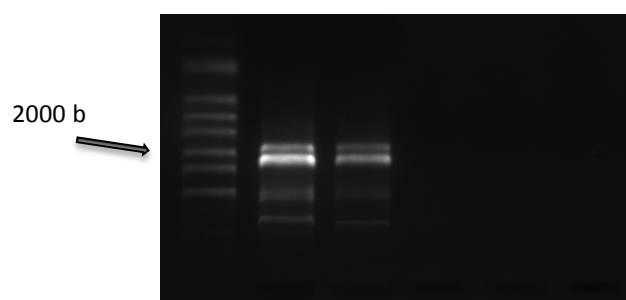
Po přečištění štěpené plazmidové DNA - DNA GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas) (viz kapitola 4.3.1.2) bylo nutné výsledek štěpení plazmidu vizualizovat gelovou elektroforézou (viz kapitola 4.2.3). V případě štěpení veškeré DNA byl patrný

jediný fragment o velikosti 5000 bp (viz Obr. 12). Množství získané lineární DNA bylo v rozmezí 1,7 µg - 4,0 µg / 20 µl.



Obr. 12 Výsledek štěpení plazmidové DNA pomocí *ScaI* (*SLC2A9S* - *A17T*, *V169M*, *D281H*, *SLC2A9L* - *G25R*)

Transkripce *in vitro* pomocí mMESSAGE mMACHINE Kit (Ambion - Invitrogen) probíhá z T7 RNA polymerázového promotoru. Pro transkripční reakci (viz kapitola 4.3.2) se doporučuje v jedné reakci 20 µl použít až 1 µg templátové lineární DNA, ale maximálně v poměru 6 µl rozpuštěné DNA : 14 µl objemu ostatních složek reakce. Pro jednu transkripční reakci jsem používala 0,5 - 1 µg lineární DNA. Abych z této transkripce získala dostatečně koncentrovanou cRNA, kterou je možné využít pro mikroinjikace, připravovala jsem dvojnásobné množství transkripčních reakcí a výslednou cRNA jsem purifikovala do 30 µl vody čištěné od RNáz pomocí RNA RNeasy Mini Kit (Qiagen) (viz kapitola 4.3.3) Množství získané cRNA bylo v rozmezích 413,0 - 852,0 ng/ µl. Abych sjednotila injikované objemy rozpuštěné cRNA od všech variant, ředila jsem cRNA na 640,0 ng/ µl, případně koncentrovala cRNA ve vakuové centrifugační odparce. Před injikací jsem vizualizovala cRNA gelovou elektroforézou (viz kapitola 4.3.5). Na obrázku (viz Obr. 13) je patrný transkript o velikosti větší než 2000 bází a další fragmenty (lineární templátová DNA - 5000 bp a pravděpodobně delší transkripty vzniklé přepisem zbytkového množství nedostatečně štěpené plazmidové DNA).



Obr. 13 cRNA po transkripci *in vitro* (*GLUT9L P350L*, *GLUT9S P350L*)

5.4. Mikroinjikace cRNA

Oocyty pro studie jsme odebírali střídavě od 3 samic *X. laevis*. V rámci jedné studie jsem používali vždy oocyty od jedné samice. Po odběru zůstávaly samice v karanténě a k dalšímu odběru u konkrétní samice jsme přistoupili nejdříve po 2 měsících od posledního odběru. Střídali jsme místo řezu pro odběr oocytů v pravé a levé tříselné oblasti.

Do oocytu jsme injikovali 50 ng cRNA, tedy 78,0 nl/ oocyt. Maximální množství testovaných variant v jedné funkční studii bylo omezeno především časem, ve kterém jsme byli schopni připravené oocyty injikovat na jednom mikroinjektoru. Časové rozpětí mezi prvními injikovanými a posledními injikovanými oocyty jsme stanovili na 2,5 hodiny. Za tuto dobu jsme byli schopni injikovat 7 variant genu (včetně kontrolních wt variant), tedy 280 oocytů.

5.5. Funkční studie

Od počátku projektu jsme uskutečnili 13 studií. Při prvních 7 studiích jsme řešili výběr vhodného scintilátoru a problémy s metodikou (viz kapitola 6.5.1). 8. studie byla provedena s kontrolními vzorky pro ověření finální metodiky. Výsledky, které zde uvádím jsou z 9., 12. a 13. studie. Kvalita oocytů při 10. a 11. studii byla pravděpodobně ovlivněna sezónními faktory (viz kapitola 2.5.1), v době odběru oocytů kulminovaly vysoké letní teploty a při měření se objevilo vysoké procento oocytů s porušenou membránou. Proto výsledky 10. a 11. studie neuvádím a nebudou součástí celkového výstupu získaných dat.

Hodnoty cpm zaznamenané scintilátorem (viz Tab. 2, 3, 4) jsem nejdříve statisticky hodnotila analýzou rozptylu (ANOVA) testem. V každé studii se jedná o soubor 8 skupin, v každé skupině 3 - 6 měření. Chybějící hodnoty v některých skupinách (naměřené řádově tisíce cpm v jednom měření) jsme z hodnocení vyřadili, považujeme je za důsledek porušené membrány některých oocytů při inkubaci v radioaktivním roztoku. Ostatní měření se pohybují řádově ve stovkách cpm/ 4-5 oocytů.

Výsledky testování ANOVA:

studie 11.6.2013	F = 3,87	p<0,01	kritická hodnota F = 2,26
studie 21.7.2013	F = 5,77	p<0,001	kritická hodnota F = 2,33
studie 23.7.2013	F = 19,40	p<0,001	kritická hodnota F = 2,25

Hodnoty cpm byly zaznamenány pro každou scintilační zkumavku s obsahem 4 až 5 oocytů. Pro srovnání jsou hodnoty měření cpm, výpočty DPM, průměrů a směrodatných odchylek vztažené na 1 oocyt (viz Tab. 2, 3, 4). Ve třech uvedených studiích byl pro měření vtoku urátu použit radioaktivní roztok se stejnou specifickou aktivitou 0,6436 Bq/pmol (38,61 DPM/pmol).

11.06.13 účinnost detekce 74,9%

varianta	neinjikované		GLUT9L		GLUT9S		GLUT9S	
	URAT1 wt	GLUT9L wt	G25R	GLUT9S wt	A17T	V169M	GLUT9S	D281H
	18,40	20,20	27,00	13,20	103,20	43,20	45,20	5,20
	7,00	14,20	25,80	22,80	29,80	28,75	9,60	6,40
	7,00	21,00	23,60	4,80	36,80	15,20	12,40	22,40
	9,40	33,80	10,20	25,60	47,80	12,80	12,00	12,80
	9,40	11,00	29,60	15,00	24,80	20,20	11,20	4,80
	6,75		23,67	15,25	50,50	58,00	27,00	44,00
cpm průměr	9,66	20,04	23,31	16,11	48,82	29,69	19,57	15,93
SD	4,45	8,75	6,80	7,39	28,44	17,72	14,07	15,29
DPM (průměr)	12,88	26,72	31,09	21,48	65,10	39,59	26,09	21,25
SD	5,94	11,67	9,07	9,86	37,93	23,63	18,77	20,39
pmol/oocyt/30								
min	0,33	0,69	0,80	0,56	1,69	1,03	0,68	0,55
SD	0,15	0,30	0,23	0,26	0,98	0,61	0,49	0,53

Tab. 2 Hodnoty cpm po odečtení průměrné hodnoty pozadí průměrované na jeden oocyt ze studie 11.6.2013

21.07.13 účinnost detekce 75,0%

varianta				GLUT9L		GLUT9S	GLUT9S	GLUT9S
	neinjik.	URAT1 wt	GLUT9L wt	R294H	GLUTS wt	T275M	R294H	P350L
	38,80	71,80	41,40	58,20	83,00	50,60	93,20	40,20
	26,40	91,80	35,40	53,00	72,00	64,00	128,80	29,40
	33,60	84,80	34,80	103,20	43,20	85,20	111,00	42,80
		68,00	69,60	88,20	75,20	52,00	77,40	65,20
			75,40	125,40	84,80			34,60
			36,00		119,40			63,20
cpm průměr	32,93	79,10	48,77	85,60	79,60	62,95	102,60	45,90
SD	6,23	11,11	18,62	30,47	24,60	16,01	22,21	14,93
DPM (průměr)	43,91	105,47	65,02	114,13	106,13	83,93	136,80	61,20
SD	8,30	14,81	24,83	40,63	32,79	21,34	29,62	19,90
pmol/oocyt/30								
min	1,14	2,73	1,68	2,96	2,75	2,17	3,54	1,58
SD	0,21	0,38	0,64	1,05	0,85	0,55	0,77	0,52

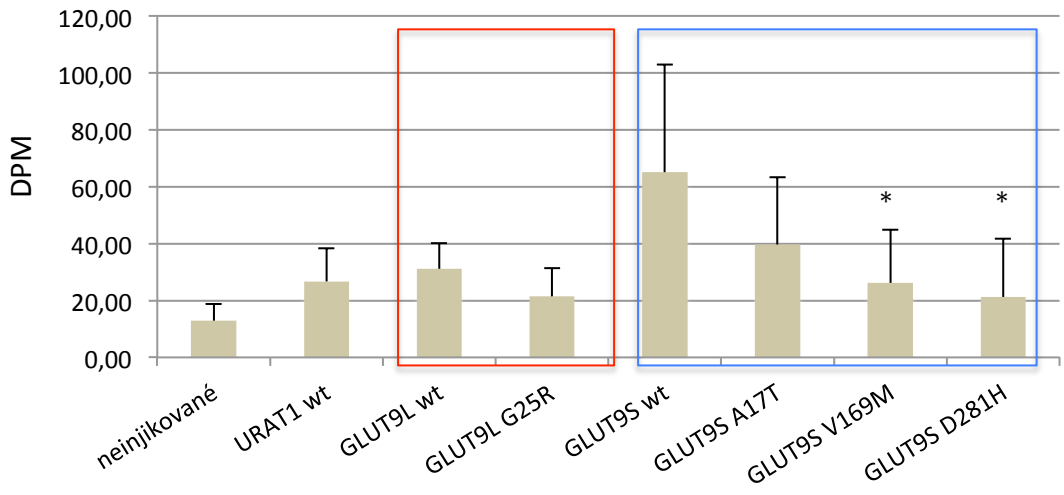
Tab. 3 Hodnoty cpm po odečtení průměrné hodnoty pozadí průměrované na jeden oocyt ze studie 21.7.2013

23.07.13 účinnost detekce 73,1%

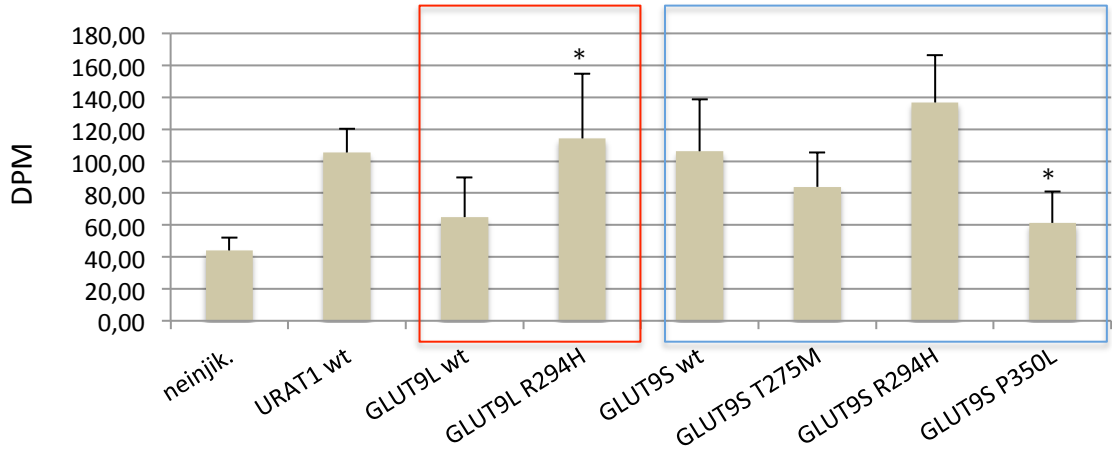
varianta				GLUT9L	GLUT9L	GLUT9L	GLUT9S	GLUT9S
	neinjik.	URAT1 wt	GLUT9L wt	V169M	V282I	P350L	GLUT9S wt	V282I
	30,60	93,60	38,60	71,60	47,80	77,20	55,40	36,00
	33,00	164,00	42,40	48,20	45,40	79,60	56,00	35,00
	29,20	116,00	50,80	55,20	47,60	62,60	50,80	37,40
	35,80	108,40	54,00	59,40	65,00	70,60	58,60	30,00
	31,80	86,20	69,40	49,40	32,20	66,40	62,60	86,60
	22,20	120,60	51,40	65,00	36,60	77,60	59,80	33,00
cpm průměr	30,43	114,80	51,10	58,13	45,77	72,33	57,20	43,00
SD	4,62	27,44	10,73	9,10	11,36	6,89	4,09	21,51
DPM (průměr)	41,63	157,05	69,90	79,53	62,61	98,95	78,25	58,82
SD	6,32	37,53	14,68	12,44	15,54	9,42	5,59	29,43
pmol/oocyt/30								
min	1,08	4,07	1,81	2,06	1,62	2,56	2,03	1,52
SD	0,16	0,97	0,38	0,32	0,40	0,24	0,14	0,76

Tab. 4 Hodnoty cpm po odečtení průměrné hodnoty pozadí průměrované na jeden oocyt ze studie 23.7.2013

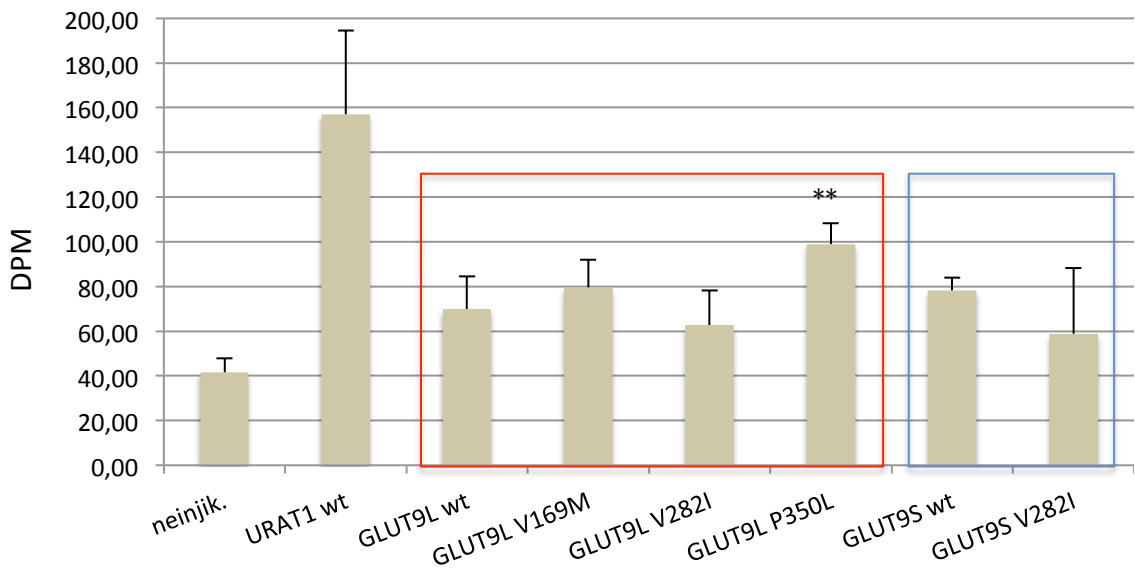
Výsledky testování jsou zaneseny v grafech (viz Graf 1, Graf 2, Graf 3). Pro snazší orientaci jsou izoformy odlišeny ve dvou oblastech (GLUT9L červeně, GLUT9S modře). Oocyty s expresí URAT1 wt slouží jako pozitivní kontrola. Signifikantní rozdíl v přenosu urátu alelické varianty od wt varianty (GLUT9L nebo GLUT9S) byl testován dvouvýběrovým t-testem na hladině pravděpodobnosti $p < 0,05$ (*), případně $p < 0,01$ (**).



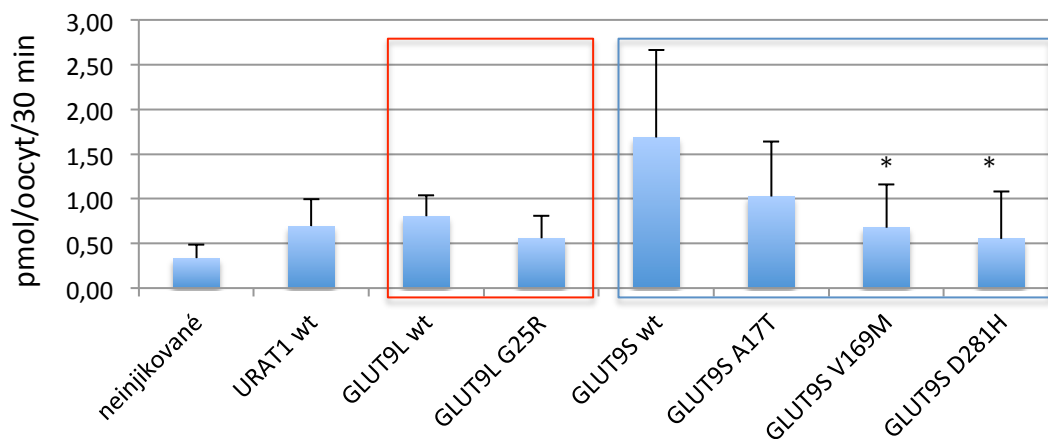
Graf 1 Hodnoty DPM/oocyt (studie 11.6.13)



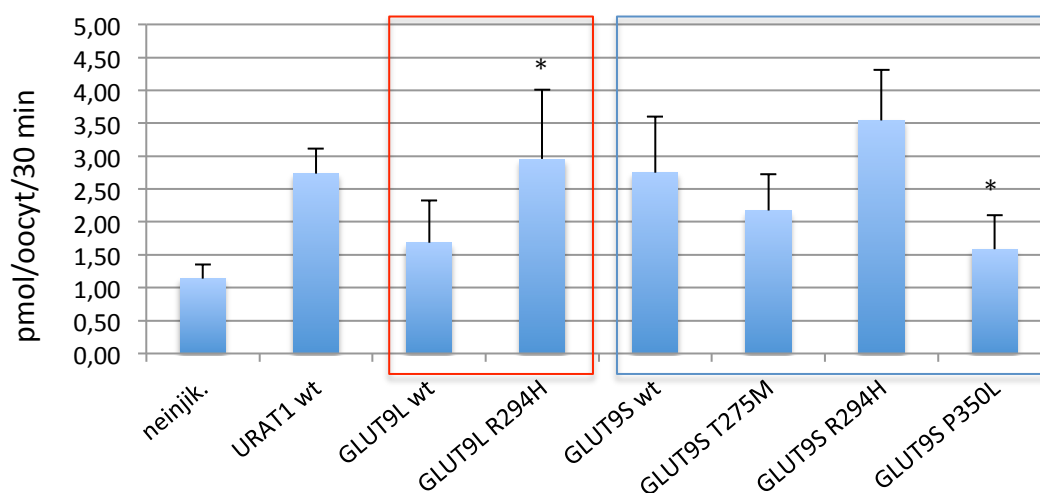
Graf 2 Hodnoty DPM/oocyt (studie 21.7.13)



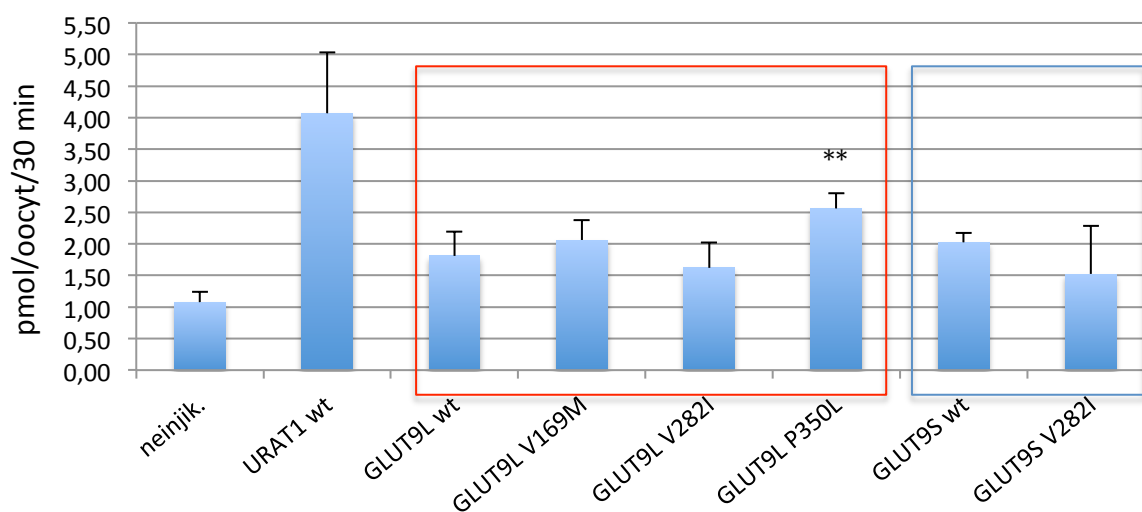
Graf 3 Hodnoty DPM/oocyt (studie 23.7.13)



Graf 4 Vtok urátu pmol/oocyt/30 min (studie 11.6.13)

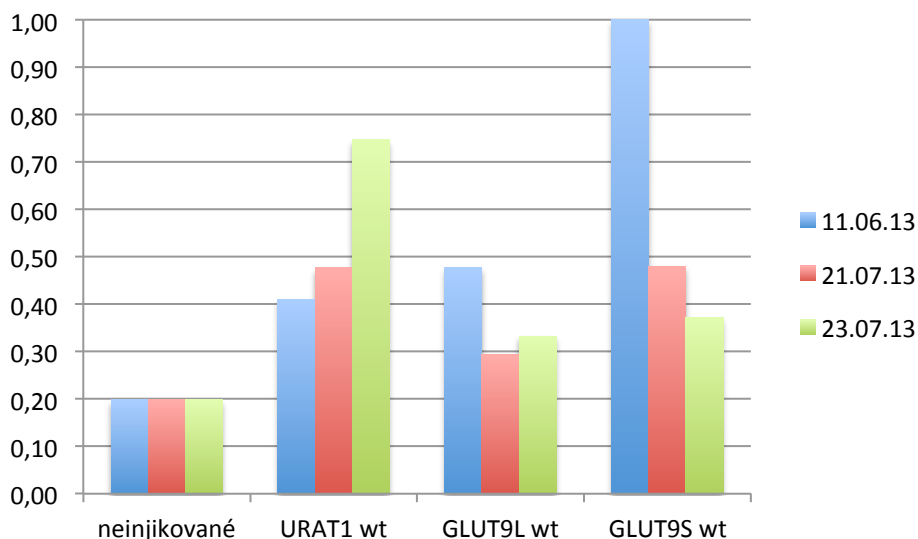


Graf 5 Vtok urátu pmol/oocyt/30 min (studie 21.7.13)



Graf 6 Vtok urátu pmol/oocyt/30 min (studie 23.7.13)

Vtok urátu po 30 minutách inkubace v roztoku je vypočten a v pmol/ oocyt/ 30 min a zanesen do grafů (viz Graf 4, 5, 6).



Graf 7 Porovnání naměřených hodnot u wt variant ze 3 studií (v %)

Průměrné hodnoty DPM wt variant ve 3 studiích jsou vztaženy k hodnotám DPM neinjikovaných oocytů (viz Graf 7). Lze srovnat relativní nárůsty změřeného vtoku urátu do oocytů s exprimovanými wt variantami.

5.2 Vizualizace a lokalizace GLUT9 v rámci oocytu *X. laevis*

5.2.1 Imunocytochemie

Po inkubaci oocytů 48 hodin při teplotě 18°C jsme 8 oocytů každé varianty v roztoku ND-96 předali Histologické laboratoři ÚDMP, kde oocyty fixovali ve 4% paraformaldehydu a zalili je do parafinových bločků.

Pro imunocytochemickou analýzu GLUT9 byly v ÚDMP postupně testovány protilátky od více firem se snahou získat protilátku sensitivně a specificky reagující v parafinových řezech. Otestováno bylo celkem pět protilátek od pěti různých výrobců. Protilátky se testovaly na parafinových a kryostatových řezech lidské ledviny, kde byla exprese GLUT9 potvrzena v proximálních tubulech. U parafinových řezů byla rovněž prováděna demaskace epitopů. Z pěti zakoupených protilátek se ukázala jako vhodná pro další práci

pouze polyklonální rabbit anti-SLC2A9 (MBL Japan), která znázorňovala bazolaterální pól proximálních tubulů lidských ledvin a byla relativně specifická a sensitivní v xenopích oocytech.

Expres proteinů a jejich lokalizace na membránách oocytů byla detekována u obou wt variant GLUT9S(L), všech testovaných alelických variant GLUT9S(L) i u kontrolní wt varianty URAT1 ve výše uvedených studiích - 11.6.13, 21.7.13 a 23.7.13 (ústní sdělení, Stibůrková ÚDMP).

6 Diskuze

6.1 Příprava cDNA wt variant *SLC2A9L* a *SLC2A9S*

Výsledky mutageneční PCR reakcí byly i při zachování stejných podmínek zpočátku velice odlišné, v některých případech nebylo možné amplifikovanou DNA na gelu identifikovat vůbec. Jedinou odlišnou komponentou v reakcích byly primery a jejich mírně rozdílná T_m . Zkoušela jsem amplifikovat DNA v teplotním gradientu 50°C, 54°C a 57°C. Ukázalo se, že v těchto problematických místech zůstávaly výtěžky stále nulové. V dalším kroku jsem přidávala k AccuPrime Pfx DNA polymeráze 50mM MgSO₄ v množství od 0,3 μl do 1μl. Optimální výtěžky jsem získala při přidání 0,5 μl MgSO₄, který jsem pak přidávala do všech následujících mutagenečních reakcí. Problémy s amplifikací a jejich řešení jsou popsány v protokolech GENEART Site-Directed Mutagenesi System (Invitrogen) a AccuPrime Pfx DNA Polymeráza (Invitrogen).

Tato část molekulárně biologické práce byla časově nejnáročnější, jak jsem uváděla mutageneční PCR reakce může v jednom kroku nahradit nukleotidy pouze v jednom specifickém místě genu, takže celý proces od mutageneční reakce po sekvenaci nemohl probíhat paralelně ze dvou templátových cDNA jako v případě přípravy cDNA pro jednotlivé alelické varianty .

6.2 Příprava cDNA alelických variant *SLC2A9L* a *SLC2A9S*

Některé mutageneze jsem musela opakovat dvakrát až třikrát. Jedním z důvodů byl nedostatečný výtěžek při mutageneční reakci. Další důvody, které byly patrné až po sekvenaci, pro opakování celého postupu byly:

- ve dvou případech nedošlo k záměně v místě požadované mutace
- třikrát došlo k nukleotidové záměně v jiném náhodném místě genové sekvence, pravděpodobně DNA polymerázou při amplifikaci (mutageneční reakci)
- dvakrát jsem v rámci sekvenace po izolaci plazmidu z bakterií našla v cDNA inserce o velikosti 20 až 30 nukleotidů.

Pokud uvážím, že se jedná o přípravu 22 různých cDNA, pak jsem řešila tyto drobné problémy u cca 40% variant.

6.3 Příprava cRNA

Templát pro transkripci in vitro vzniklý štěpením plazmidové DNA s vloženou genovou sekvencí bylo nutné vizualizovat gelovou elektroforézou a vyhnout se použití templátové DNA, která by obsahovala cirkulární DNA molekuly. Díky vysoké procesivitě RNA polymerázy by z nedostatečně štěpeného templátu (i z nepatrného množství cirkulární DNA) vznikaly při transkripci variabilně dlouhé přepisy RNA. Problematická může být však přítomnost i tak malého množství cirkulární DNA, které je obtížné na gelu vizuálně detekovat. (viz protokol mMACHINE Kit Ambion - Invitrogen)

Na obrázku (viz kapitola 5.4. Obr. 13) jsou vidět nanesené vzorky RNA po přečištění transkripční reakce pomocí RNA RNeasy Mini Kit (Qiagen). Fragment o velikosti cca 2000 bází odpovídá velikosti transkriptu mRNA pro GLUT9L a GLUT9S (rozdíl mezi velikostí mRNA mezi izoformami je pouze 11 bází). Dalším fragmentem, který je patrný u každého vzorku je pravděpodobně linearizovaná DNA, která zůstává i po přečištění v roztoku. Její velikost je znatelně vyšší, což odpovídá velikosti genové sekvence s vektorem (cca 4900 bází v případě GLUT9 a cca 8000 bází v případě URAT1, jehož genová sekvence je vložena ve vektoru pcDNA3 o velikosti 5,4 kb). Abych degradovala stávající DNA po transkripční reakci, testovala jsem použití DNázy (TURBO DNase - součástí kitu mMACHINE Kit, Ambion - Invitrogen) podle protokolu Invitrogen 15 min při 37°C. Po této době však docházelo i k degradaci cRNA. Při přípravě cRNA řešili stejný problém s degradací RNA po použití DNáz z kitu v laboratoři ÚDMP. (ústní sdělení Stibůrková ÚDMP). Zbývající DNA jsem poté ve vzorku ponechávala, její množství vzhledem k cRNA bylo 1:20, případně menší a nebránilo expresi proteinu v cytoplasmě.

Ve vzorcích uskladněné cRNA při -70°C po dobu několika měsíců jsem kontrolovala případnou degradaci gelovou elektroforézou. Ukázalo se, že po 7 měsících jsou fragmenty RNA stejně veliké jako bezprostředně po transkripci, zatímco po 13 měsících uskladnění byla u některých vzorků patrná vysoká degradace RNA.

6.4 Mikroinjikace

Maximální objem roztoku rozpuštěné cRNA, který jsme testovali pro injikaci do jednoho oocyty, byl 120 nl (50ng cRNA). Pro srovnání ve studii Bianchi a Driscoll (2006) pozitivně hodnotí injikované množství do 69 nl, ani při takto vysokém injikovaném objemu (120 nl) nedošlo k narušení membrán oocytů a imunocytochemická kontrola potvrdila na membránách expresi exogenního proteinu. Objem injikované rozpuštěné cRNA jsme se snažila minimalizovat (vzhledem k velikosti a objemu cytoplazmy oocytů *X. laevis*) a sjednotit pro všechny varianty cRNA, abychom dosáhli stejných podmínek při translaci exogenních proteinů v cytoplazmě. S ohledem na množství získávané cRNA transkripcí in vitro (413,0 - 852,0 ng/ μ l) jsem zvolila střední hodnotu z množství získaných vzorků cRNA (640,0 ng/ μ l) a koncentrováním, případně ředěním jsem upravovala roztoky cRNA na tuto koncentraci. Injekovaný objem takto koncentrované cRNA vycházel na 78,0 nl / oocyt. Ukázalo se, že je vhodný pro injikaci, oocyty zůstávaly neporušené a exprese proteinů GLUT9 a kontrolního URAT1 byla detekována imunocytochemicky.

6.5 Funkční studie

6.5.1 Metodika

V prvních 7 studiích jsme používali stejnou metodiku pro měření jako v laboratoři Prof. Kimiyoshi Ichida, MD. - Department of Pathophysiology (viz kapitola 1.), která se v této laboratoři používá standardně při studiu urátových transportérů (Ichida *et al.*, 2004). Jedna alelická varianta (jedna varianta cRNA) se injikuje do 8 oocytů a radioaktivní rozpad značeného [¹⁴C] urátu se v Micro Beta Plate Counteru měří pro každý oocyt jednotlivě. Ze skupiny 8 měření v každé variantě se vybírají neodchýlená data pro statistickou analýzu a pro výpočet vtoku urátu v pmol.

Tímto způsobem jsme při měření radioaktivního rozpadu [¹⁴C] značeného urátu v jednom oocyty získávali značné množství hodnot cpm na úrovni kontrolního neznačeného pozadí, navíc hodnoty pro jednotlivé izoformy byli natolik variabilní (včetně neinjekovaných a kontrolních URAT1 exprimujících oocytů), že nebylo možné uvažovat o dalším hodnocení dat. Oocyty jsme vkládali jednotlivě do 96- jamkové scintilační destičky

a pro měření využívali stejný typ scintilátoru (Micro Beta Plate Counter) podle původního protokolu. Uvažovali jsme o možných negativních vlivech na získané výsledky, kterými mohly být například nedostatečně opláchnuté oocyty po inkubaci v radioaktivním roztoku či porušená membrána oocytů při manipulaci. Tyto kroky jsme se proto snažili optimalizovat.

Abychom zaznamenali vyšší hodnoty cpm v objemu oocyty (poločas rozpadu ^{14}C je více jak 5,7 tisíce let), připravili jsme pro měření vtoku urátu radioaktivní roztok o relativně vysoké specifické aktivitě (32 %) - téměř každá třetí molekula urátu v roztoku obsahovala značený uhlík [^{14}C] při zachování koncentrace urátu v roztoku (100 μM). Získaná měření byla bohužel i po 7. studii nepoužitelná pro další interpretaci a to i přesto, že kontrolní značení protilátkou pro GLUT9 proteiny na membránách oocytů byla pozitivní (ústní sdělení pracovníků histologické laboratoře ÚDMP).

Rozhodli jsme se, že zvýšíme počet oocytů pro jedno měření radioaktivního rozpadu ^{14}C . Místo 8 oocytů pro testování jedné varianty v radioaktivním roztoku jsme testovali oocytů 30 a rozdělili je do 6 scintilačních zkumavek po 5 kusech. Další zvýšení počtu oocytů pro jedno měření by zvýšilo přesnost detekce radioaktivního rozpadu, avšak při zachování minimálního počtu měření pro jednu skupinu (6 měření). Z praktických důvodů - mikroinjikace určitého množství oocytů jednou variantou cRNA včetně mikroinjikace kontrolních oocytů (URAT1, GLUT9L wt, GLUT9S wt) v dostatečně úzkém časovém horizontu (2,5 hodiny) - jsme zvolili právě toto množství oocytů pro testování. 30 oocytů pro funkční studie, 2 náhradní pro případnou lyzi při manipulaci a 8 oocytů pro imunocytochemické značení.

Nevýhodou při takto naplánované studii je skutečnost, že se ve skupině 5 oocytů ve scintilační zkumavce může vyskytnout jeden oocyt, který měl v době inkubace v radioaktivním roztoku narušenou membránou a vtok urátu i detekovaná hodnota cpm narůstá o jeden řád (detekovány tisíce cpm). Tím ztrácíme 1 či více ze 6 měření v souboru.

Při studiu lidského urátového transportéru ABCG2 na oocytech *Xenopus laevis* (Woodward *et al.*, 2009) autoři uvádějí, že po injikaci nechali inkubovat oocyty 4 dny při teplotě 15-20°C. Vtok urátu měřili po 1 až 2 hodinách v 50 μM roztoku ^{14}C urátu či přes noc v 500 μM roztoku urátu při 15°C. Po umytí oocytů v roztoku ND-96 umístili do každé scintilační zkumavky 2 oocyty .

Při porovnání vtoku urátu do oocytů s exprimovanými wt variantami a vtoku do oocytů neinjikovaných (viz Graf 7) jsou viditelné rozdíly mezi studii. V další studii bych navrhovala bych zvýšit koncentraci urátu na 200 - 300 μM v radioaktivním roztoku, kdy stoupne rychlost přenosu urátu přes GLUT9 více jak dvakrát (Vitart *et al.*, 2008). Tato koncentrace je v rozmezí fyziologických podmínek extracelulárního prostředí člověka. Při vyšších koncentracích urátu v oocytech bychom mohli přesněji s vyšším rozdílem od kontrolního pozadí detekovat rozpad ^{14}C scintilátorem v takto malých objemech.

6.5.2 Výsledky měření

Před interpretací každé studie posuzují signifikantní nárůst hodnot naměřených DPM u oocytů s exprimovanými wt variantami (URAT1, GLUT9L, GLUT9S) s hodnotami DPM u oocytů neinjikovaných dvouvýběrovým t-testem ($p < 0,05$). Ve třech uvedených studiích test potvrdil signifikantní rozdíl hodnot.

Při měření kinetických parametrů vtoku urátu u oocytů s expresí URAT1 byla odhadnuta Michaelisova konstanta (K_m) = 371 \pm 28 μM a $v_{\text{max}} \approx 0,42$ pmol/oocyt/min (Enomoto *et al.*, 2002). Při koncentraci extracelulárního urátu 100 μM při inkubaci 30 minut v roztoku jsem předpokládala vtok urátu do oocytu 2,68 pmol/oocyt/30min. Při studiích 21.7. a 23.7. vyšel průměrný vtok urátu do oocytů/(URAT1+) 2,73 pmol/oocyt/30min a 4,07 pmol/oocyt/30min (viz Graf 5, Graf 6), což se dá považovat za pozitivní výsledek a kontrolu úspěšného experimentu. Naopak studie z 11.6. vykazuje velice nízký vtok urátových iontů nejen přes URAT1, ale i přes další transportéry (viz Graf 4).

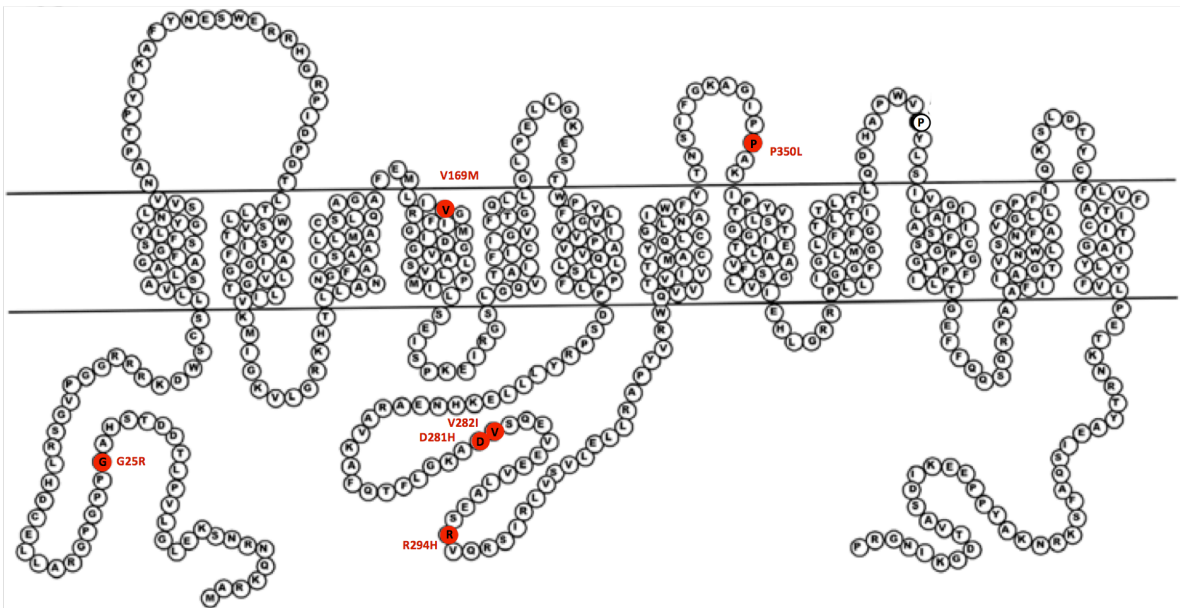
Při studiu enzymatické aktivity GLUT9L a GLUT9S Caufield *et al.* (2008) tvrdí, že izoformy mají ekvivalentní aktivitu urátového transportu. Ke studiu kinetických parametrů vybrali Caufield *et al.* (2008) pouze jednu izoformu (delší variantu GLUT9L). Podle této studie jsou stanovené hodnoty $K_m = 921$ μM a $v_{\text{max}} = 304$ pmol/oocyt/ 20 min a podíl vtoku urátu oocytů exprimujících GLUT9 a kontrolních vodou injikovaných oocytů byl po 20 minutách devětkrát vyšší. Při měření vtoku urátových iontů v čase se ukázalo, že po 30 minutové inkubaci je stále mírná tendence oocytů přijímat vyšší množství urátu než po 20

minutové inkubaci v radioaktivním roztoku. Po injikaci cRNA inkubovali oocyty 4 dny při 18°C, naše inkubace trvala 2 dny při 18°C. Při výše uvedené kinetice bychom očekávali vtok urátu do oocytů (GLUT9+) více jak 28 pmol/oocyt/30 min (při koncentraci extracelulárního urátu 100 µM). Další publikovaná studie (Vitart *et al.*, 2008) však odhaduje hodnoty $K_m = 890 \mu\text{M}$ a $v_{\text{max}} = 5,33 \text{ pmol/oocyt/ min}$. Při těchto parametrech bychom očekávali vtok urátu do oocytů (GLUT9+) okolo 16 pmol/oocyt/ 30 min. Naše naměřené hodnoty a výpočty jsou výrazně nižší. Maximální průměrná hodnota vtoku urátu přes GLUT9 je ve studii z 21.7.2013: 2,75 pmol/oocyt/ 30 min.

V interpretaci výsledků schopnosti jednotlivých alelických variant přenášet urát do buněk jsem zatím omezena na výsledky studií, které dosud máme k dispozici (viz kapitola 5.6). V dalších studiích budeme data verifikovat, funkční studie všech alelických variant budou opakována nejméně dvakrát.

Naše měření ze všech studií ukazují, že GLUT9S má vyšší schopnost přenášet urát do oocytu než GLUT9L. Přesto, že signifikantní rozdíl na 5% hladině pravděpodobnosti dvouvýběrovým t-testem nebyl potvrzen, při všech studiích se GLUT9S jeví aktivnější v přenosu urátu. Tento mírný rozdíl může vést k odlišnostem při testování alelických variant s wt variantou své izoformy t-testem, například varianta R294H v izoformě GLUT9L má signifikantní rozdíl (nárůst) vtoku urátu ke své wt izoformě a u R294H v GLUT9S izoformě není rozdíl vzhledem k wt GLUT9S statisticky průkazný. Podobně se jeví hodnocení varianty V169M - v izoformě GLUT9S je signifikantní rozdíl (pokles) potvrzen, v izoformě GLUT9L nikoliv. (viz Graf 4, 5, 6)

Při úvaze o vlivu mutací na stabilitu domén proteinu mohou porovnat charakter původních a nově vnesených aminokyselin a jejich umístění v rámci proteinu podle navrženého schématu. (viz Obr. 14) Varianty označené na obrázku červeně jsme již podrobili funkčním studiím.



Obr.14 Predikovaná struktura GLUT9 - izoforma L - 12 transmembránových segmentů s vyznačenými záměnami aminokyselin, které jsme dosud využili k testování ve funkčních studiích. N a C terminální sekvence směřují cytoplazmatického prostoru (upraveno podle Anzai et al., 2008).

Nahrazení nejmenší aminokyseliny glycinu na pozici 25 argininem s dlouhým pozitivně nabitým postranním řetězcem bude mít pravděpodobně vliv na uspořádání N-koncové domény. Podle charakteru okolních aminokyselin je tento glycin součástí velice těsné a rigidní struktury (-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Gly) (Nelson a Cox, 2008). Podle měření (viz Graf 1), která zatím máme k dispozici není patrný signifikantní pokles v přenosu urátu.

Valin na pozici 169 ve čtvrtém transmembránovém helixu (viz Obr. 14) je nahrazen methioninem s thioetherovou nepolární skupinou v delším postranním řetězci. Mohlo by dojít k narušení stabilizace helixu. V izoformě GLUTS je patrný pokles přenosu urátu (viz Graf 1), v izoformě GLUTL nikoliv (viz Graf 3).

Ve velké centrální cytoplazmatické smyčce (viz Obr. 14) je záporně nabitý aspartát na pozici 281 nahrazen pozitivně nabitým histidinem, což ovlivní elektrostatické interakce v bezprostředním okolí. Pokud by se tato doména dostávala do kontaktu se substrátem, pak by tato záměna mohla mít vliv i na přenos negativně nabitého urátu. V izoformě GLUT9S je zaznamenán signifikantní pokles v přenosu urátu (viz Graf 1).

Dále byla ve stejné smyčce nalezena možná záměna valinu za izoleucin na pozici 282. Tyto dvě aminokyseliny mají podobný charakter postranních řetězců. Nemělo by dojít k nějakému výraznému narušení struktury či interakcí. Ani naše měření nezaznamenala signifikantní rozdíl od wt variant (viz Graf 3).

Další nalezenou variantou v této centrální smyčce na pozici 294 je záměna pozitivně nabitého argininu za histidin, který může být při neutrálním pH jak protonován tak deprotonován, často se účastní při katalytických reakcích jako donor či akceptor protonu. (Nelson a Cox, 2008) Měření (viz Graf 2) zaznamenala signifikantní nárůst v přenosu urátu u izoformy GLUTL. U GLUTS izoformy je nárůst patrný, avšak není statisticky signifikantní

Prolin na pozici 350 je nepolární alifatická aminokyselina stejně jako leucin, záměna však může mít vliv na uspořádání extracelulární smyčky mezi sedmým a osmým transmembránovým helixem (viz Obr. 14). Amino (imino) skupina prolinu je v rigidní konformaci a na rozdíl od leucinu redukuje strukturální flexibilitu polypeptidu ve svém okolí. (Nelson a Cox, 2008) Zde se výsledky pro jednotlivé izoformy liší, zatímco u izoformy GLUTLS jsme zaznamenali signifikantní pokles v přenosu urátu (viz kapitola 5.6, Graf 2), u izoformy GLUTL naopak nárůst (viz kapitola 5.6, Graf 3). Každá z izoform je ve svém přirozeném prostředí v ledvinách vystavena jiným podmínkám extracelulárního prostoru - izoforma GLUTS směřuje do lumen, zatímco izoforma GLUT9L je exprimována na bazolaterální membráně (Augustin *et al.*, 2004). Při použití xenopích oocytů jsou obě izoformy vystaveny stejnému prostředí a jsou exprimované na stejné membráně. Při záměně aminokyseliny v extracelulární smyčce bych očekávala podobnou změnu v interakci se substrátem. Je zde určitá pravděpodobnost, že i při zachování stejných podmínek můžeme ve dvou studiích dojít k odlišným výsledkům. Varianta P350L byla studována pro každou izoformu v jiné studii. V dalších opakováních budeme řadit každou variantu pro obě izoformy do jedné studie.

Varianta A17T se vyskytuje v N-koncové doméně kratší izoformy (GLUTS). Právě tento cytosolický konec GLUTS se liší v sekvenci aminokyselin a je 28 o aminokyselin kratší než u GLUTL. (Augustin *et al.*, 2004) Na pozici 17 nahrazuje polární nenabitý threonin nepolární alanin v blízkosti vnitřního membránového listu před zanořením polypeptidu do prvního transmembránového helixu (-Ala-Lys-Lys-Lys-Leu-). Měření (viz kapitola 5.6 Graf 1) neukazují signifikantní pokles přenosu urátu od wt varianty.

6.6 Vizualizace a lokalizace GLUT9 v rámci oocyty *X. laevis*

Vzhledem k tomu, že všechny alelické varianty GLUT9 byly lokalizovány na membránách buněk, signifikantní poklesy v přenosu urátu jednotlivých alelických variant hodnocené výše byly způsobeny změnou ve struktuře proteinu, nikoliv změnou v adresování proteinu na plazmatickou membránu oocytů.

7 Závěr

Zavedení metodiky pro expresi lidského urátového transportéru GLUT9 v oocytech *Xenopus laevis* v laboratoři Vývojové biologie PŘF UK lze považovat za rozšíření možnosti využití našich drápatek v expresi exogenních membránových proteinů obecně.

Studium přenosu urátu přes varianty membránového proteinu GLUT9 ukázalo signifikantní poklesy v přenosu u variant V169M, D281H a P350L v kratších izoformách GLUT9S, které jsou v polarizovaných buňkách ledvin lokalizovány na apikální membráně směřující do tubulu. Signifikantní nárůst v přenosu urátu byl zaznamenán u variant R294H a P350L v delších izoformách proteinu GLUT9L, které jsou v buňkách tubulů umístěny na bazolaterální membráně.

Studované alelické varianty proteinu GLUT9: A17T, G25R, V169M, D281H, R294H, T275M, P350L, V282I byly lokalizovány na plazmatické membráně oocytů, žádná z těchto mutací nemá dopad na lokalizaci proteinu v rámci nepolarizované buňky oocytu.

Další opakování funkčních studií zmíněných alelických variant a verifikace výsledků jsou nezbytná, stejně tak jako studie zbývajících alelických variant, které máme k dispozici.

Seznam použité literatury:

- ABRAMSON RG, LIPKOWITZ MS. 1990. Evolution of the uric acid transport mechanisms in vertebrate kidney. *Basic principles in transport, comparative physiology*; 3: 115-153
- ALEKOV AK, RAHMAN MM, MITROVIC N. *et al.* 2000. A sodium channel mutation causing epilepsy in man exhibits defects in fast inactivation and activation *in vitro*. *J. Physiol*; 529: 533-539
- ALEKOV AK, RAHMAN MM, MITROVIC N. *et al.* 2001. Enhanced inactivation and acceleration of activation of the sodium channel associated with epilepsy in man. *Eur. J. Neurosci.*; 13: 2171-2176
- ÁLVAREZ-LARIO B., MACARRÓN-VINCENTE J. 2010. Uric acid and evolution. *Rheumatology*; 49: 2010-2015
- ANZAI N., ENOMOTO A., ENDOU H. 2005. Renal urate handling: clinical relevance of recent advances. *Curr Rheumatol Rep*; 7(3): 227-234
- ANZAI N., KANAI Y., ENDOU H. 2007. New insights into renal transport of urate. *Curr Opin Rheumatol*; 19: 151-157
- ANZAI N., ICHIDA K., JUTABHA P. *et al.* 2008. Plasma Urate Level Is Directly Regulated by a Voltage-driven Urate Efflux Transporter URATv1 (SLC2A9) in Humans. *J Biol. Chemistry*; 283(40): 26834-26838
- AUGUSTIN R., CARAYANNOPOULOS MO *et al.* 2004. Identification and characterization of human glucose transporter-like protein-9 (GLUT9): alternative splicing alters trafficking. *J Biol. Chemistry*; 279(16): 16229-36
- BAHN A., HAGOS Y., REUTER S. *et al.* 2008. Identification of a new urate and high affinity nicotinate transporter, hOAT10 (SLC22A13). *J Biol. Chemistry*; 283(24): 16332-41
- BARNARD EA, MILEDI R., SUMIKAWA K. 1982. Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *ProcR. Soc. London*; 215: 241-246
- BIANCHI L., DRISCOLL M. 2006. Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. *WormBook, The C.elegans Research Community*; doi/10.1895/wormbook.1.117.1, <http://www.wormbook.org>

- CAULFIELD MJ, MUNROE PB, O'NEILL D. *et al.* 2008. SLC2A9 Is a High-Capacity Urate Transporter in Humans. *Plos Medicine*; 5(10): e197 doi: 10.1371/journal.pmed.0050197
- CHOI HK, MOUNT DB, REGINATO AM. 2005. Pathogenesis of gout. *Ann. Intern. Med.*; 143: 499-516
- DINOUR D., GRAY NK, CAMPBELL S. *et al.* 2010. Homozygous SLC2A9 mutations cause severe renal hypourikemia. *J Am. Soc. Nephrol.*; 21: 64-72
- DOBLATO M. , MOLEY KH. 2009. Facilitative glucose transporter 9, a unique hexose and urate transporter (review). *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 297: E831-E835
- DOEGE H., BOCIANSKI A., JOOST HG, SCHURMANN A. 2000. Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem. J*; 350: 771-776
- EMMERSON BT. Abnormal Urate Excretion Associated with Renal and Systemic Disorders, Drugs and Toxins. Kapitola 11. Uric Acid; ISBN 978-3-642-66869-2: 287-324
- ENOMOTO A., KIMURA H., CHALROUNGDU A. *et al.* 2002. Molecular identification of renal urate-anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature*; 417: 447-451
- ERALY SA, VALLON V., RIEG T *et al.* 2008. Multiple organic anion transporters contribute to net renal excretion of uric acid. *Physiol. Genomics*; 33(2): 180-92
- FEATHERSTONE DE, FUJIMOTO E., RUBEN PC. 1998. A defect in skeletal muscle sodium channel deactivation exacerbates hyperexcitability in human paramyotonia congenita. *J. Physiol.*; 506: 627-638
- FERREL J. 1999. Xenopus oocyte maturation new lessons from a good egg. *BioEssays*; 21: 833-842
- GERSCH CH., PALII SP, IMARAM W. *et al.* 2009. Reactions of peroxynitrite with uric acid: formation of reactive intermediates, alkylated products and triuret, and in vivo production of triuret under conditions of oxidative stress. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acid*; 28(2):118-149
- GOLDIN AL. 2006. Expression of ion Channels in Xenopus Oocyte. Expression and Analysis of Recombinant Ion Channel; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim; ISBN: 3-527-31209-9

- GURDON JB, LANE CD, WOODLAND, HR *et al.* 1971. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*; 233: 177–182
- HISATOME I., TSUBOI M., SHIGEMASA C. 1996. Renal hypouricemia. *Nippon Rinsho*; 54(12): 3337-33342
- HRUZ PW, MUECKLER MM. 2001 Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol Membr Biol*; 18(3):183-93.
- ICHIDA K., AMADA M., HISATOME I. *et al.* 2004. Clinical and Molecular Analysis Patients with Renal Hypouricemia in Japan-Influence of URAT1 Gene on Urinary Urate Excretion. *J Am Soc Nephrol*; 15: 164-173
- JOHNSON RJ, KANG DH, FREIG D. *et al.* 2003. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension*; 41(6): 1183-1190
- JOOST HG, THORENS B. 2001. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* 18: 247–256
- KIM KM, HENDERSON GN, FRYE RF *et al.* 2009. Simultaneous determination of uric acid metabolites allantoin, 6-aminouracil, and triuret in human urine using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*; 877(1-2): 65-70
- KLEMP P., STANSFIELD SA, CASTLE B. *et al.* 1997 Gout is on the increase in New Zealand. *Annals of the Rheumatic Diseases*; 56: 22-26
- LEVINSON DJ, SORENSEN LB. 1980. Renal handling of uric acid in normal and gouty subjects: evidence for a 4-component system. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 39: 173-179
- LOSSIN C., WANG D., RHODES TH *et al.* 2002. Molecular basis of an inherited epilepsy. *Neuron*; 34: 977-884
- LOSSIN C., RHODES TH, DESAI RR *et al.* 2003. Epilepsy-associated dysfunction in the voltage-gated neuronal sodium channel SCN1A. *J. Neurosci.*; 23: 11289-11295
- MARKOVICH D. 2008. Expression cloning and radiotracer uptakes in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature Protocols*; 3: 1975-1980
- NAKANISHI T., OHYA K., SHIMADA S. *et al.* 2013. Functional cooperation of URAT1 (*SLC22A12*) and URATv1 (*SLC2A9*) in renal reabsorption of urate. *Nephrol. Dial. Transplant*; 28: 603-611

- NELSON DL, COX MM. 2008. Lehninger Principles of Biochemistry. 5. vydání. ISBN -13: 978-0-7167-7108-1: 72-92
- RAFEY MA, LIPKOWITZ MS, LEAL-PINTO E., *et al.* 2003. Uric Acid Transport. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*; 12(5): 511-516
- ROCH-RAMEL F., GUISAN B. 1999. Renal Transport of Urate in Humans. *News Physiol. Sci.*; 14: 80-84
- RUNGGER D. 2002 *Xenopus helveticus*, an endangered species?. *Int. J. Dev Biol*; 46: 49-63
- SCHILD L., ROCH-RAMEL F., DIEZI J. 2007. Renal Transport of Organic Ions and Uric acid. Kapitola 8: Robert W. Schrier: *Diseases of The Kidney and Urinary Tract*; ISBN 13:978-0-7817-9307-0; 1(8. vydání): 218-233
- SIGEL E., MINIER F. 2005. The *Xenopus* oocyte: System for the study of functional expression and modulation of proteins. *Mol. Nutr. Food. Res.*; 49: 228–234
- SPAMPANATO J., ESCAYG A., MEISLER MH *et al.* 2001. Functional effects of two voltage-gated sodium channel mutations that cause generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2. *Neuro-sci.*; 21:7481-7490
- SPAMPANATO J., ESCAYG A., MEISLER MH *et al.* 2003. The generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2 mutation W1204R alters voltage-dependent gating of Nav1.1 sodium channels. *Neuroscience*; 116: 43-48
- STEIN RA 2008. The genetic basis of uric acid variance. *Clinical Genetics*; 74(5): 410-413
- STIBŮRKOVÁ B., ICHIDA K., SEBESTA I. 2011. Novel homozygous insertion in *SLC2A9* gene caused renal hypouricemia. *Molecular Genetics and Metabolism*; 102: 430-435
- ULDRY M, THORENS B. 2004 The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch* 447: 480–489
- VITART V., RUDAN I., HAYWARD C. *et al.* 2008. *SLC2A9* is newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nature Genetics*; 40(4): 437-442
- WEBER W-M. 1999. Ion currents of *Xenopus laevis* oocyte: state of the art. *Biochim. Biophys. Acta*; 1421: 213-233
- WITKOWSKA K., SMITH KM, YAO SY *et al.* 2012. Human SLC2A9a and SLC2A9b isoforms mediate electrogenic transport of urate with different characteristics in the presence of hexoses. *Am J of Physiol Renal Physiol*; 303(4): F527-F539

WRIGHT AF, RUDAN I, HASTIE ND *et al.* 2010. A 'complexity' of urate transporters. *Kidney Int*; 78(5): 446-452

WOODWARD OM, KOTTGEN A, CORESH J *et al.* 2009. Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *PNAS*; 106(25): 10338-10342