

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

# **Klonování, exprese a purifikace lidské AKR1B1**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Hradec Králové 2011

Tereza Lundová

### **Čestné prohlášení**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

12. 5. 2011

### **Poděkování**

Touto cestou chci poděkovat svému školiteli Prof. Ing. Vladimíru Wsólovi, Ph.D. a Mgr. Tereze Hartmanové za velmi vstřícnou odbornou pomoc a užitečné rady během vypracování této diplomové práce.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra biochemických věd

Kandidát: Tereza Lundová

Školitel: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Název diplomové práce: Klonování, exprese a purifikace lidské AKR1B1

Aldosareduktasa (EC 1.1.1.21) AKR1B1 je jedním ze 13 lidských enzymů z AKR nadrodiny. Všechny lidské AKR jsou cytosolické a NADP(H) dependentní. AKR1B1 hraje důležitou roli v metabolismu endogenních i exogenních látek. Hlavním endogenním substrátem je glukosa. Její redukce na sorbitol je důsledně spojena se sekundárními diabetickými komplikacemi. Z xenobiotik je metabolizován pomocí AKR1B1 daunorubicin, protinádorové léčivo ze skupiny antracyklinů, které je redukováno na daunorubicinol. Tento metabolit je méně aktivní než původní léčivo a je příčinou antracyklinem způsobené kardiotoxicity. V současnosti je mnoho projektů zaměřených na zkoumání AKR1B1 jako cílového enzymu a hledání specifických inhibitorů.

Rekombinantní protein byl připraven v *E. coli* společně s pET-28b(+) expresním vektorem. Nejprve byla izolována z *E. coli* cDNA pro AKR1B1 v pOTB7. Kódová sekvence AKR1B1 byla namnožena pomocí PCR. PCR byla provedena s Phusion Hot Start II polymerasou a párem forward a reverse primerů, které obsahují restrikční místa pro *NdeI* a *XhoI*. Jako vektor byl použit plasmid pET-28b(+). Purifikované PCR fragmenty i plasmid byly dvojitě štěpeny výše uvedenými restrikčními endonukleasami a purifikovány, následovala ligace do mnohočetného klonovacího místa. Po ligaci byla provedena transformace za použití metody tepelného šoku. K expresi proteinu byl využit kmen *E. coli* BL21 (DH3), indukce byla provedena přidáním 1 mM IPTG. Protein byl purifikován pomocí kitu Ni-NTA Fast Start, kde purifikace je založena na afinitě proteinu k nikelnatým iontům a koncentrace proteinu byla stanovena metodou dle Bradfordové.

# ABSTRACT

Charles University in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Tereza Lundová

Supervisor: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Title of diploma thesis: Cloning, expression and purification of human AKR1B1

Aldose reductase (EC 1.1.1.21) AKR1B1 is one of the 13 human enzymes of the AKR superfamily. All human AKRs are cytosolic and NADP(H) dependent. AKR1B1 plays an important role in metabolism of endogenous and exogenous substances. The main endogenous substrate is glucose. Its reduction to sorbitol is consistently linked to secondary diabetic complications. From xenobiotics metabolized by AKR1B1, daunorubicin, an anticancer drug from the group of anthracyclines, is reduced to daunorubicinol. This metabolite is less active than parent drug and is the cause of anthracycline related cardiotoxicity. At present, many projects are focused on AKR1B1 as a target enzyme and specific inhibitors of AKR1B1 are looking for.

The recombinant protein of AKR1B1 was prepared in *E. coli* together with the pET expression system. First, cDNA for AKR1B1 in pOTB7 was isolated from *E. coli*. The coding sequence of AKR1B1 was amplified by a PCR. PCR was performed with Phusion Hot Start II polymerase and pair of forward and reverse primers, which contained *Nde*I and *Xho*I restriction sites. As the vector, pET-28b(+) plasmid was used. Both the purified PCR fragments and the plasmid were double digested with the above mentioned restriction endonucleases and purified, followed by the ligation into the multiple cloning site. After ligation, the transformation using the heat shock method was performed. *E. coli* BL21 (DH3) strain was used to overexpress the protein. The overexpression was induced by the addition of 1 mM IPTG. The protein was purified by Ni-NTA Fast Start Kit, where the purification is based on the affinity of the protein to nickel ions. Concentration of protein was determined by Bradford assay.

# OBSAH

<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>OBSAH.....</b>	<b>6</b>
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>9</b>
2.1 REDUKČNÍ REAKCE V METABOLISMU .....	9
2.2 KARBONYL-REDUKUJÍCÍ ENZYMY .....	9
2.2.1 <i>Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem.....</i>	<i>10</i>
2.2.2 <i>Aldo-ketoreduktasy .....</i>	<i>11</i>
2.3 ALDOSAREDUKTASA (AKR1B1) .....	15
2.3.1 <i>Charakteristika .....</i>	<i>15</i>
2.3.2 <i>Role AKR1B1 v organismu .....</i>	<i>15</i>
2.3.3 <i>Regulace exprese AKR1B1 .....</i>	<i>18</i>
2.3.4 <i>Inhibitory AKR1B1.....</i>	<i>19</i>
2.3.5 <i>AKR1B1 versus AKR1B10 .....</i>	<i>19</i>
<b>3 CÍL PRÁCE.....</b>	<b>20</b>
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>21</b>
4.1 POUŽITÝ MATERIÁL .....	21
4.1.1 <i>Biologický materiál .....</i>	<i>21</i>
4.1.2 <i>Chemikálie .....</i>	<i>21</i>
4.1.3 <i>Enzymy.....</i>	<i>22</i>
4.1.4 <i>Markery .....</i>	<i>23</i>
4.1.5 <i>Kíty.....</i>	<i>23</i>
4.2 POUŽITÉ POMŮCKY A PŘÍSTROJE .....	23
4.2.1 <i>Pomůcky .....</i>	<i>23</i>
4.2.2 <i>Přístroje .....</i>	<i>24</i>
4.3 PŘÍPRAVA PUFRŮ A ŽIVNÝCH MÉDIÍ.....	25

4.3.1	<i>Příprava pufrů a roztoků</i> .....	25
4.3.2	<i>Příprava živných médií</i> .....	26
4.4	PRACOVNÍ POSTUP .....	27
4.4.1	<i>Izolace plasmidové DNA</i> .....	27
4.4.2	<i>Stanovení koncentrace a čistoty DNA</i> .....	29
4.4.3	<i>PCR</i> .....	29
4.4.4	<i>Horizontální elektroforéza- analýza DNA</i> .....	31
4.4.5	<i>Izolace fragmentu DNA pomocí agarosového gelu</i> .....	33
4.4.6	<i>Vložení kódové sekvence do plasmidu</i> .....	34
4.4.7	<i>Vnesení DNA do E.coli</i> .....	37
4.4.8	<i>Sekvenace</i> .....	39
4.4.9	<i>Exprese proteinu AKR1B1</i> .....	39
4.4.10	<i>Purifikace proteinu kitem Ni-NTA Fast Start</i> .....	41
4.4.11	<i>Elektroforéza bílkovin</i> .....	41
4.4.12	<i>Měření koncentrace proteinu dle Bradfordové</i> .....	44
4.4.13	<i>Převedení do uchovávacího pufru</i> .....	45
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>46</b>
5.1	<b>KLONOVÁNÍ AKR1B1</b> .....	<b>46</b>
5.1.1	<i>Izolace plasmidu pOTB7 obsahujícího cDNA pro AKR1B1</i> .....	<b>46</b>
5.1.2	<i>Izolace kódové sekvence AKR1B1</i> .....	<b>48</b>
5.1.3	<i>Klonování AKR1B1</i> .....	<b>50</b>
5.2	<b>EXPRESÉ AKR1B1</b> .....	<b>53</b>
5.3	<b>PURIFIKACE PROTEINU AKR1B1</b> .....	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>POUŽITÉ ZKRATKY</b> .....	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>60</b>

# 1 ÚVOD

Redukční reakce jsou nezbytnou součástí metabolismu každého organismu. Redukce karbonylové skupiny má pak význam především detoxikační, neboť mnoho látek exogenního původu obsahuje právě tuto skupinu. Zajímavá je oblast léčiv používaných v chemoterapii, mezi něž patří například doxorubicin, daunorubicin a oracin. Ne vždy je však redukce žádoucí, například může zkrátit dobu účinku léčiva či vytvořit látku ještě toxičtější. Proto jsou karbonyl-redukující enzymy v posledních letech předmětem mnoha studií a to z hlediska jak jejich substrátové specifity tak i z hlediska možné inhibice.

K experimentům se často využívají enzymy připravené molekulárně-genetickými metodami. Nejčastěji se využívá expresního systému bakterie *E. coli*. Výhodou této metody jsou relativně nízké náklady, jednoduchá manipulace a vysoká produktivita. Značnou nevýhodou těchto prokaryontních organismů je neschopnost posttranslačních modifikací, což může být někdy problémem při produkci proteinů vyšších organismů. V případě enzymů je vždy nutno zvážit, zda daný protein má nějaké posttranslační modifikace ovlivňující jeho aktivitu. Tento jev však nebývá častý a proto je mnoho výsledků ohledně karbonyl-redukujících enzymů získáno na základě proteinu produkovaného v *E. coli*.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Redukční reakce v metabolismu

Redukce karbonylové skupiny je významným krokem v biotransformaci mnoha xenobiotických karbonylových sloučenin. Metabolickým následkem je buď aktivace, nebo inaktivace závisící na daném xenobiotiku. Nicméně v mnoha případech vznik hydroxylové skupiny poskytuje látku více hydrofilní a vytváří produkt I. fáze, který může být konjugován, např. glukuronidací nebo sulfatací, což usnadňuje exkreci (Oppermann & Maser, 2000).

### 2.2 Karbonyl-redukující enzymy

Karbonyl-redukující enzymy jsou v přírodě všudypřítomné. Byly prokázány v různých organismech, jako jsou rostliny, bakterie, kvasinky, ryby, hmyz a především u savců. Značná část výzkumné práce je zaměřena na lidské enzymy redukující karbonyl. Bylo zjištěno, že se vyskytují v různých tkáních jako například játra, plíce, srdce, ledviny, mozek, vaječníky a nadledviny (Hoffmann & Maser, 2007).

V současnosti je většina karbonyl-redukujících enzymů uskupena do dvou odlišných proteinových nadrodin, dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) a aldo-ketoreduktasy (AKR) (Oppermann & Maser, 2000).

Hlavní cytosolické karbonyl-redukující enzymy u savců jsou: karbonylreduktasa (EC 1.1.1.184), aldehydreduktasa (EC 1.1.1.2), aldoreduktasa (EC 1.1.1.21) (Oppermann & Maser, 2000).

Karbonyl-redukující enzymy byly purifikovány a charakterizovány na základě substrátové specifity (Hoffmann & Maser, 2007). Účastní se I. fáze biotransformace xenobiotik, ale jsou také zapojeny do metabolismu endogenních steroidních hormonů, žlučových kyselin a kyseliny arachidonové (Oppermann & Maser, 2000).

Zvláštní skupinu proto představují hydroxysteroiddehydrogenasy (HSD). Porovnáním sekvencí totiž bylo zjištěno, že HSD náleží buď k AKR či SDR. Dosud

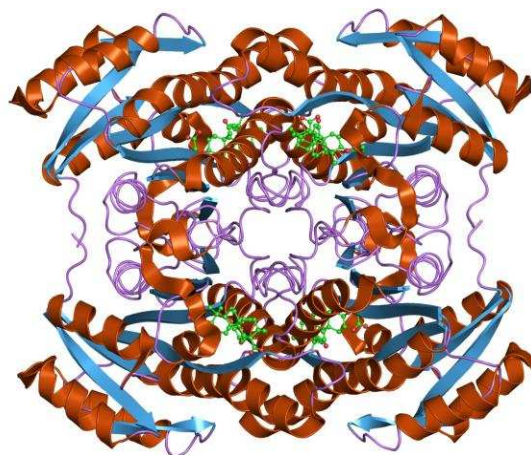
bylo popsáno 12 lidských pluripotentních HSD, z nichž některé byly zřejmě objeveny dvakrát, neboť právě ony mají tu schopnost metabolizovat endogenní steroidy i redukovat karbonylové sloučeniny (Hoffmann & Maser, 2007).

Typickým příkladem je mikrosomální karbonyl-redukující enzym 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 1 (11 $\beta$ -HSD1), u které bylo dokázáno, že je zapojena v důležitých detoxikačních reakcích, např. jako NNK reduktasa (Oppermann & Maser, 2000).

### 2.2.1 Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem

V dnešní době představují SDR velkou a velmi rozmanitou nadrodinu, která obsahuje více než 3000 enzymů, eukaryontních i prokaryontních. Nachází se buď v cytosolu coby rozpustné proteiny nebo jsou membránově vázané. Průměrná délka proteinů této nadrodiny je 250- 350 aminokyselin. Většinou se jedná o homodimery či homotetramery.

Obecně jsou v primární struktuře rozlišovány tyto části: N- koncová část, kde je doména vázající kofaktor, katalytické aktivní místo se nachází uprostřed, dále je rozeznáván úsek vážící substrát a C- koncové prodloužení mající význam pro oligomerizaci. Společným strukturním rysem této nadrodiny, zjištěným díky 3D analýze, je tzv. Rossmannův záhyb, tvořený  $\beta\alpha\beta$  motivem, na který se váže kofaktor NAD(H) či NADP(H). Tato doména je charakteristická i pro mnoho jiných dehydrogenas. Jako názorná ukázka struktury poslouží Obrázek 1.



Obrázek 1: Homotetramer 20- $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenasy v komplexu s NADH (DonabelSDSU.bot, 2009).

SDR enzymy mají široké substrátové spektrum. Podílejí se na metabolismu steroidů, cukrů, aromatických uhlovodíků, prostaglandinů a některých xenobiotik. Nejvýznamnějšími a dosud nejvíce prostudovanými zástupci jsou CBR1 a 11 $\beta$ -HSD.

Dnes je rozlišováno pět rodin SDR nadrodiny. Původní rozdělení do dvou velkých rodin „klasické“ a „prodloužené“, bylo později rozšířeno o tři nové rodiny označené jako „střední“, „odlišné“ a „komplexní“, které zahrnují alkoholdehydrogenasy s krátkým řetězcem, enoylreduktasy a multifunkční enzymy. „Klasické“ SDR jsou tvořené asi 250 aminokyselinami a nedávno byly rozříděny ještě do 7 podrodin. „Prodloužené“ SDR mají přibližně 350 aminokyselin a jsou u nich rozlišovány 3 podrodiny (Hoffmann & Maser, 2007; Oppermann & Maser, 2000; Oppermann U. , 2007).

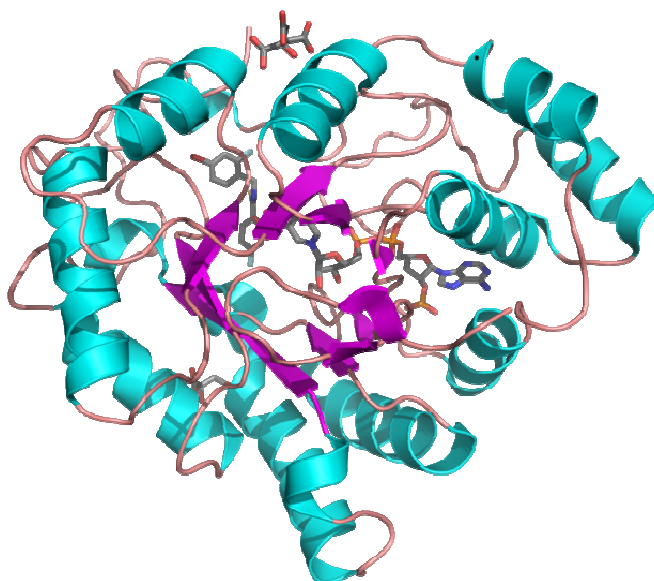
Mezi jednotkami různých rodin a podrodin SDR, nejsou navzdory překrývající se substrátové specifitě, strukturální podobnosti s AKR proteiny (Hoffmann & Maser, 2007).

### 2.2.2 Aldo-ketoreduktasy

Nadrodinu AKR tvoří více než 150 prokaryontních a eukaryontních, NAD(P)H dependentních oxidoreduktas, které se nachází v cytosolu jako monomerní proteiny (37 kDa) (Penning & Drury, 2007). Enzymy jsou tvořeny asi 320 aminokyselinami (Hoffmann & Maser, 2007).

AKR mají společnou strukturu řetězcových záhybů, které vytváří  $(\alpha/\beta)_8$  soudek, ve kterém se střídá 8  $\alpha$ -helixů (modrá) a 8  $\beta$ -řetězců (fialová), (Penning & Drury, 2007), viz Obrázek 2. Charakteristickým rysem  $(\alpha/\beta)_8$  soudku je přítomnost aktivního místa na C- konci, které je optimalizováno pro vysoce-afinitní interakci s nukleotidy, ačkoliv není přítomen Rossmannův záhyb (Barski et al., 2008). Katalytickou tetradu tvoří Tyr, His, Asp, Lys, kde katalytická aktivita je založena na amfolytické OH-skupině Tyr (Oppermann & Maser, 2000). AKR katalyzují bi-bi reakčním mechanismem, ve kterém vazba kofaktoru NAD(P)H předchází vazbě karbonylového substrátu, redukce probíhá v centrálním komplexu a následuje uvolnění alkoholu a NAD(P)<sup>+</sup> produktů (Penning & Drury, 2007). Měřením disociační

konstanty  $K_D$  bylo zjištěno, že většina AKR preferuje NADPH před NADH (Barski et al., 2008).



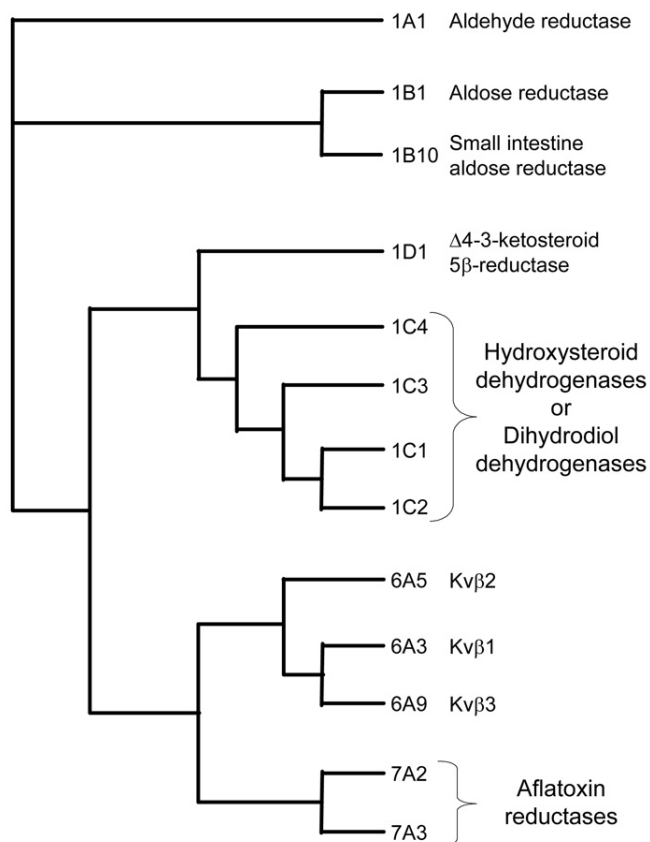
**Obrázek 2: Struktura AKR1B1 v komplexu s NADP+, citrátem a malou molekulou inhibitoru (Fvasconcellos, 2009).**

Jejich hlavní funkcí je redukovat aldehydy a ketony na odpovídající primární a sekundární alkoholy. Lidské AKR jsou zapojeny do metabolismu cukrů, reaktivních lipidových aldehydů, ketoprostaglandinů a ketosteroidů, a xenobiotik zahrnujících léčiva a chemické karcinogeny. Přeměňují karbonylové skupiny na alkoholové skupiny, které jsou vhodné pro konjugační reakce katalyzované UDP-glukuronyltransferasami či sulfotransferasami. Formálně tak mohou být AKR zařazeny mezi enzymy biotransformační fáze I (Penning & Drury, 2007). Tyto enzymy postrádají kovové nebo flavinové kofaktory, proto jsou relativně neúčinné jako alkoholdehydrogenasy (Barski et al., 2008).

Mnoho savčích AKR je potenciálním terapeutickým cílem a navrhování strukturně-založených léčiv může vést ke sloučeninám s požadovanou specifitou a klinickou účinností (Jez et al., 1997).

Na základě sekvenční podobnosti je tato nadrodina rozdělena do 15 rodin, kdy jednotky jedné rodiny si jsou podobné na více než 40 %. Některé rodiny jsou pak rozděleny ještě do podrodin označovaných písmenem. Dnes je známo 13 lidských AKR, které spadají do tří rodin savčích AKR a to AKR1, AKR6, AKR7 (Barski

et al., 2008), viz. Obrázek 3. Jejich konkrétní úloha v organismu bude popsána v následujících kapitolách.



**Obrázek 3: Fylogenetický strom lidských AKR (Barski et al., 2008).**

### 2.2.2.1 Rodina AKR1

U Aldo-ketoreduktas z rodiny AKR1 jsou rozlišovány 4 podrodiny lišící se substrátovou specifitou, především z hlediska látek endogenního původu.

AKR1A1 (aldehydreduktasa) byla objevena jako první AKR, coby klíčový enzym zapojený v biosyntéze kyseliny askorbové. Tento enzym má širokou substrátovou specifitu, přičemž preferuje karboxylovou skupinu. Lidský organismus není schopen syntézy kyseliny askorbové, proto přetrvání funkčního genu ukazuje, že protein může mít roli, která dodnes nebyla objevena (Barski et al., 2008).

AKR1B podrodina obsahuje 2 lidské enzymy AKR1B1 a AKR1B10. AKR1B10 je znám svou vysokou redukční aktivitou vůči retinaldehydu (Gallego et al., 2007). Bude jim věnována samostatná kapitola.

Enzymy AKR1C mají důležitou roli v působení steroidních hormonů (Penning & Drury, 2007), podílí se na redukci ketosteroidů za vzniku hydroxysteroidů (Oppermann & Maser, 2000).

AKR1C1 je především 20 $\alpha$ -HSD a redukuje progesteron na málo účinný 20 $\alpha$ -hydroxyprogesteron, cílovou tkání je např. endometrium. Pro AKR1C2 je charakteristická schopnost redukovat 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron za vzniku opět méně účinného 3 $\alpha$ -androstandiolu, neboť vykazuje hlavně 3 $\alpha$ -HSD aktivitu, cílovou tkání je např. prostata. AKR1C3 vykazuje široké spektrum účinku, za zmínku stojí především schopnost redukovat estron na vysoce účinný 17 $\beta$ -estradiol v prsní tkáni a endometriu, kde projevuje svoji schopnost 17 $\beta$ -HSD aktivitu. Dále je známo, že se účastní syntézy prostaglandinů (Penning & Drury, 2007).

#### **2.2.2.2 Rodina AKR6**

Tato rodina zahrnuje 3 lidské proteiny, které tvoří  $\beta$ -podjednotku napěťově řízeného draselného kanálu (Hoffmann & Maser, 2007). Tyto proteiny se pojí při biosyntéze kanálu v endoplasmatickém retikulu s  $\alpha$ -podjednotkou (Barski et al., 2008).

#### **2.2.2.3 Rodina AKR7**

Dva lidské enzymy této rodiny jsou společně také označovány jako aflatoxinreduktasy, pro svoji schopnost metabolizovat aflatoxin B1. Jedná se o dimerní proteiny, s odlišnou tkáňovou specifitou. AKR7A3 má větší aktivitu v rámci redukce aflatoxinu B1- dialdehydu než AKR7A2 a nachází se především v žaludku, pankreatu, játrech a ledvinách (Barski et al., 2008).

U AKR7A2 bylo také zjištěno, že v lidském mozku redukuje semialdehyd sukcinátu na  $\gamma$ -hydroxybutyrát. Semialdehyd sukcinátu vzniká transaminací neurotransmiteru  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny (GABA).  $\gamma$ -hydroxybutyrát byl klinicky užíván jako anestetikum a v léčbě poruch spánku, také je znám jako rekreační droga (Lyon et al., 2007).

## **2.3 Aldosareduktasa (AKR1B1)**

Tento enzym poprvé izoloval Hers v roce 1960 jako glukosu redukující jednotku (Barski et al., 2008). Přičemž role AKR1B1 při normální hladině glukosy není dosud zcela jasná (Huang et al., 2010). V literatuře se často setkáváme různými označeními tohoto enzymu: AKR1B1, AR, ADR, ALR2, ALDR1, MGC1804, v systému klasifikace enzymů jej pak nalezneme pod číselným kódem EC 1.1.1.21.

### **2.3.1 Charakteristika**

AKR1B1 je protein tvořený z 316 aminokyselin, jehož molekulová hmotnost je 35,8 kDa. Nachází se v cytosolu a jeho aktivita je závislá na NADPH.

Tento enzym je přítomen téměř ve všech tkáních (Shen et al., 2011), purifikována byla z placenty (Petrash, 2004). Dalším výrazným zdrojem aldosareduktasy jsou nadledviny, ovšem její fyziologická funkce v této tkáni není dosud objasněna (Chang et al., 2003). Huang et al. (2010) prokázali, že AKR1B1 se exprimuje nejen v čočce ale i rohovce, sítnici a řasnatém tělísku.

V aktivním místě se nachází katalytická tetráda, která je složena z Tyr-48, His-110, Lys-77 a Asp-43. pK skupin zapojených do kyselobazické katalýzy je 6,5- 7. Později bylo prokázáno, že mutace Y48F vede ke vzniku inaktivní molekuly (Barski et al., 2008), protože právě tento Tyr slouží jako donor protonu. Důležitým regulačním místem AKR1B1 je Cys-298, který je zapojen do stabilizace koenzymu (Petrash, 2004).

Jedinečným rysem AKR1B1 je jeho citlivost k oxidaci. Některé studie naznačují, že oxidace Cys-298 je fyziologický proces. Tyto studie ukazují, že Cys-298 AKR1B1 by mohl být glutathionován, nitrosylován nebo oxidován na sulfenylovou kyselinu. Glutathionovaná forma AKR1B1 a forma se sulfenylovou kyselinou byly detekovány in vivo (Barski et al., 2008).

### **2.3.2 Role AKR1B1 v organismu**

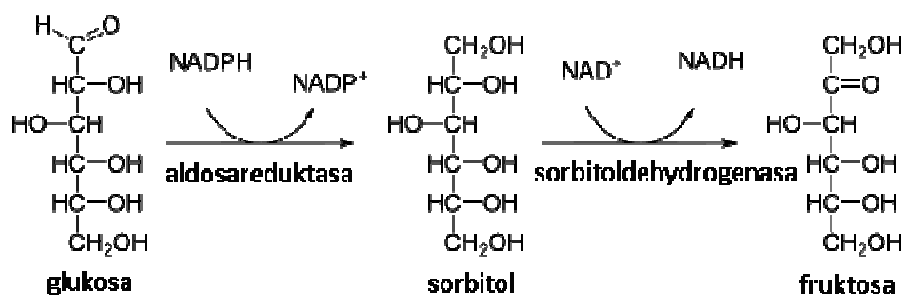
Enzym katalyzuje redukci mnoha substrátů fyziologického významu, zahrnující produkty peroxidace lipidů (4-hydroxynonenal, oxidované fosfolipidy),

AGE prekurzory (methylglyoxal, 3-deoxyglukoson), glutathionové konjugáty nenasycených aldehydů, retinoidy, prostaglandiny, steroidy (isokortikosteroidy, 20-ketosteroidy) (Endo et al., 2009). Hlavní roli má však v redukci glukosy viz 2.3.2.1.

V dnešní době jsou známy i substráty AKR1B1 exogenního původu, patří sem látky znečišťující životní prostředí (akrolein), protinádorová léčiva (daunorubicin) a další toxické karbonylové sloučeniny (Petrash, 2004; Barski et al., 2008).

### 2.3.2.1 Úloha AKR1B1 v metabolismu glukosy

Aldosareduktasa katalyzuje první krok metabolizace glukosy skrze polyolovou cestu. Jedná se o NADPH dependentní přeměnu glukosy na sorbitol. V druhém kroku se pak uplatňuje sorbitoldehydrogenasa, která oxiduje sorbitol na fruktosu s využitím  $\text{NAD}^+$  (Petrash, 2004), viz Obrázek 4.



Obrázek 4: Polyolová cesta (Yikrazuul, 2009).

Výsledkem polyolové cesty je tedy přeměna glukosy na fruktosu s využitím NADPH a produkcí NADH. Při normo-glykémii je touto cestou metabolizováno jen malé množství glukosy, většina je využita jako substrát pro glykolýzu či pentosový cyklus. Jiná situace však nastává při hyperglykémii, kdy až 33 % glukosy může být metabolizováno na sorbitol a fruktosu (Petrash, 2004). Přičemž sorbitol je klíčovým faktorem vzniku diabetické katarakty (Huang et al., 2010).

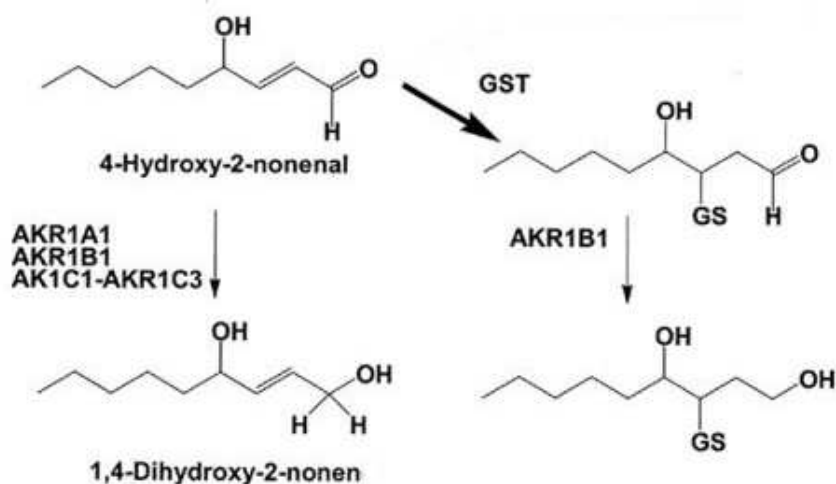
Proto je katalyzátor prvního kroku polyolové cesty AKR1B1 zajímavým terapeutickým cílem. Již bylo mnoho úsilí zaměřeno na výzkum inhibitorů AKR1B1 a tím zablokování syntézy sorbitolu v diabetických tkáních (Petrash, 2004). Navzdory úspěchu v prevenci diabetických komplikací při experimentech na zvířecích modelech léčených inhibitory aldosareduktasy, nebyla tato léčebná strategie dosud úspěšná při převedení na lidi (Chang et al., 2003).



Galaktosa je také substrátem polyolové cesty, ale odpovídající keto-cukr není produkován, protože sorbitol(polyol)dehydrogenasa je neschopná oxidace galactiolu (Petrash, 2004).

### 2.3.2.2 AKR1B1 a peroxidace lipidů

Glutathiontransferasy (GST) ještě ponechají reaktivní aldehyd glutathionového konjugátu 4-hydroxy-2-nonenalu, ten je však upřednostňovaným substrátem pro AKR1B1 (Penning & Drury, 2007), více viz Obrázek 5.

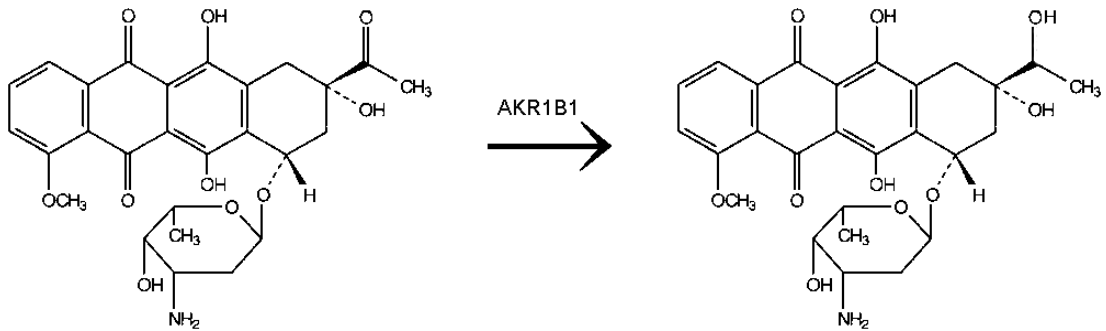


Obrázek 5: Metabolismus lipidových aldehydů katalyzovaný AKR (Penning & Drury, 2007).

### 2.3.2.3 Vliv AKR1B1 na daunorubicin

Daunorubicin je protinádorové léčivo antracyklinového typu, které se využívá k léčbě rakoviny plic a je hlavní složkou chemoterapie akutní leukemie. Jeho sekundární alkoholový metabolit daunorubicinol má sníženou chemoterapeutickou účinnost a proto je tato redukce považována za původce chemoterapeutické resistance daunorubicinu. Také je známo, že daunorubicinol způsobuje poškození srdce (Balendiran et al., 2009).

Bylo prokázáno, že AKR1B1 redukuje daunorubicin na daunorubicinol, viz Obrázek 6.



**Obrázek 6: Redukce daunorubicinu na daunorubicinol (apps.who.int, 2011).**

Plebuch et al. (2007) zjistili, že nadměrná exprese daunorubicin redukcujících enzymů zvyšuje chemoresistenci tím, že dochází k inaktivaci daunorubicinu. Studie byla založena na transfekci cDNA kódující tyto enzymy do nádorových buněk. Mezi tyto enzymy patří kromě AKR1B1 ještě AKR1B10, AKR1A1 a CBR1.

Proto jsou dnes studovány inhibitory těchto enzymů, neboť jejich snížená aktivita může vést k poklesu chemoresistence daunorubicinu a omezené tvorbě jeho kardiotoxického metabolitu.

### 2.3.3 Regulace exprese AKR1B1

Exprese AKR1B1 je regulována na transkripční úrovni pomocí nitrobuňčné osmolality. Nukleární faktor kappa B (NFκB) je redox-citlivý transkripční faktor, který sdílí vazebné místo v promotoru genu pro AKR1B1. NFκB je indukovatelný transkripční faktor s inaktivní cytoplasmatickou a aktivní DNA-vazebnou formou. Zvýšený tok glukosy skrze polyolovou cestu vede k redox změnám a oxidačnímu stresu, který aktivuje NFκB. Ramana et al. (2004) prokázali, že inhibice AKR1B1 brání hyperglykemií indukované aktivaci NFκB a snižuje tím jeho DNA- vazebnou aktivitu (Yang et al., 2008).

Yang et al. (2008) pozorovali expresi AKR1B1 při hyperglykémii, indukovanou pomocí NFκB, u osob s diabetickou nefropatií v porovnání s osobami bez diabetických komplikací a vliv sorbinilu, což je inhibitor AKR1B1, na tuto expresi. Zjistili že, hladina AKR1B1 u diabetiků s nefropatií byla zvýšena, ale v přítomnosti inhibitoru snížena.

### 2.3.4 Inhibitory AKR1B1

Klinické použití AKR1B1 inhibitorů je limitováno díky nežádoucím účinkům těchto léčiv (Barski et al., 2008). Ve studiích na zvířatech a II. fázi klinických zkoušek bylo zjištěno, že farmakologická inhibice enzymu zlepšuje diabetickou neuropatii a nefropatii (Baba et al., 2009).

Baba et al. (2009) zjistili, že enzymová aktivita AKR1B1 je zvýšena v ischemickém srdci a že takto aktivovaný enzym byl resistantní k inhibici pomocí inhibitorů jako je sorbinil, protože docházelo k oxidaci Cys-298. Oxidace tohoto cysteinu urychluje katalýzu a brání vazbě inhibitoru (Barski et al., 2008).

### 2.3.5 AKR1B1 versus AKR1B10

Aminokyselinová sekvence AKR1B1 a AKR1B10 je ze 70 % stejná (Balendiran et al., 2009). Krystalová struktura ukazuje, že AKR1B1 a AKR1B10 vážou velmi podobně inhibitor tolrestat, ale rozdílnost je pozorována v odpovídajících modelech komplexů s retinaldehydem (Gallego et al., 2007).

AKR1B10 je primárně exprimován v gastrointestinálním traktu a nadledvinách, zatímco AKR1B1 je přítomna téměř ve všech tkáních (Shen et al., 2011). Proto také enzym AKR1B10 byl pojmenován small intestine reductase a AKR1B1-like protein 1 (ARL-1) (Huang et al., 2010). V několika studiích bylo prokázáno, že AKR1B10 je zvýšen v lidském hepatocelulárním karcinomu (Gallego et al., 2007).

AKR1B1 a AKR1B10 mohou mít rozdílné funkční vlastnosti v čočce a studie Huang et al. (2010) naznačuje, že AKR1B10 nepřispívá k patogenezi diabetické katarakty u lidí.

Shen et al. (2011) porovnávali enzymovou aktivitu AKR1B1 a AKR1B10 vůči karbonylovým sloučeninám. Výsledky této studie ukazují, že oba enzymy vykazují aktivitu vůči glutathionovým konjugátům karbonylových sloučenin, ale AKR1B1 s větším účinkem. Naopak AKR1B10 je účinnější při redukci karbonylových sloučenin jako akrolein,  $\beta$ -methakrolein 4-hydroxynonenal, trans-2-hexenal a trans-2,4-hexadienal na fyziologické úrovni než AKR1B1.

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo získat purifikovaný rekombinantní protein, lidský enzym AKR1B1. Práce byla rozdělena na několik dílčích kroků:

- Izolace cDNA pro AKR1B1 vložené do plasmidu pOTB7
- Amplifikace kódové sekvence AKR1B1 pomocí PCR a navržených primerů
- Klonování kódové sekvence do expresního vektoru pET28b(+) a následná analýza
- Exprese rekombinantního proteinu v *E. coli* BL21 (DH3)
- Purifikace získané lidské AKR1B1 a její analýza

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použitý materiál

#### 4.1.1 Biologický materiál

cDNA AKR1B1 ve vektoru pOTB7,

(dodáno v *E. coli* DH10B)

Source BioScience imaGenes  
(Berlin, Německo)

Reverse primer

(5'-ACG CCT CGA GTC AAA ACT CTT CAT-3')

GeneriBiotech (HK, ČR)

Forward primer

(5'-CTG GCA CAT ATG GCA AGC CGT CTC-3')

GeneriBiotech (HK, ČR)

pET-28b(+) vektor

Novagen (Darmstadt, Německo)

*E. coli* HB101

(F<sup>-</sup>, *thi-1*, *hsdS*<sub>20</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), *supE*44, *recA*13, *ara*-14, *leuB*6, *proA*2, *lacY*1, *galK*2, *rpsL*20 (str<sup>r</sup>), *xyl*-5, *mtl*-1)

Promega (Madison, USA)

*E. coli* BL21

(F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS*<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), *dcm*, *gal*, λ(DE3), pLysS, Cm<sup>r</sup>)

Promega (Madison, USA)

#### 4.1.2 Chemikálie

2-merkптоethanol

Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)

Agarosa pro DNA analýzu

Serva (Heidelberg, Německo)

Akrylamid, f.e. ≥ 99%

Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)

APS (Persíran amonný), f.e. ≥ 99%

Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)

Bacto Agar

Becton (Le Pont de Claix, Francie)

Bacto Tryptone

Becton (Le Pont de Claix, Francie)

Bacto Yeast extract

Becton (Le Pont de Claix, Francie)

Bradford reagent

Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)

Bromfenolová modř- sodná sůl

Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)

BSA (100x)

NEB (Frankfurt am Main, Německo)

BSA ≥ 99,9%

Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)

BugBuster Protein Extraction Reagent

Novagen (Darmstadt, Německo)

Coomassie brilliant blue G-250	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a.	Penta (Chrudim, ČR)
Dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát, p.a.	Penta (Chrudim, ČR)
dNTP Mix	Finnzymes (Espoo, Finsko)
EDTA ≥ 99% (m/m)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Ethanol 99% (v/v)	Dr. Krulich (Hradec Králové, ČR)
Ethidiumbromid	AppliChem (Darmstadt, Německo)
Glycerol 85% (v/v)	Dr. Krulich (Hradec Králové, ČR)
Hydrogenfosforečnan didraselný dihydrát, p.a.	Penta (Chrudim, ČR)
Hydroxid sodný, p.a.	Penta (Chrudim, ČR)
Chloramfenikol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Chlorid sodný, p.a.	Penta (Chrudim, ČR)
Chlorid vápenatý dihydrát, p.a.	Penta (Chrudim, ČR)
IPTG	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Isopropanol ≥ 99%, pro molekulární biologii	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Kyselina boritá, p.a.	Penta (Chrudim, ČR)
Kyselina chlorovodíková 36% (v/v)	Penta (Chrudim, ČR)
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	Finnzymes (Espoo, Finland)
NEBuffer 4 (10x)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
N,N'-Methylenbis(akrylamid), f.e. ≥ 99%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Phusion HF Reaction Buffer (5x)	Finnzymes (Espoo, Finland)
T4 DNA Ligase Buffer (5x)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan, p.a.	Penta (Chrudim, ČR)
TEMED, f.e. ≥ 99%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Ultra-pure LMP Agarose	Invitrogen (Carlsbad, USA)

#### 4.1.3 Enzymy

Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA	Finnzymes (Espoo, Finland)
--	----------------------------

polymerasa (100 U)	
RE <i>XhoI</i> (20 000 U/μl)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
RE <i>NdeI</i> (20 000 U/μl)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
RE <i>BamHI</i> (20 000 U/μl)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
RE <i>EcoRI</i> (20 000 U/μl)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
T4 DNA Ligasa (400 U/μl)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
T4 DNA Ligasa (2 000 000 U/μl)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)

#### 4.1.4 Markery

2- log DNA Ladder	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
Loading Dye Solution (6x)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
SYBR Safe DNA gel stain	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Precision Plus Protein Standard All Blue	Bio-Rad (Hercules, USA)

#### 4.1.5 Kity

QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN (Hilden, Německo)
QIAEX II Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden, Německo)
QIAexpress Ni- NTA Fast Start	QIAGEN (Hilden, Německo)

## 4.2 Použité pomůcky a přístroje

### 4.2.1 Pomůcky

Amicon Ultra-4, Ultracel-10	Milipore
Automatické pipety, špičky (0,5 μl- 5 ml)	Eppendorf
Mikrozkumavky (1,5 ml)	Eppendorf
PCR mikrozkumavky (0,2 ml)	Eppendorf

Laboratorní sklo: Erlenmayerovy baňky, kádinky, odměrné válce, skleněné zkumavky

Sterilní plastové pomůcky: hokejky, Petriho misky, titrační mikrodestičky, zkumavky s šroubovacím víčkem

## 4.2.2 Přístroje

Analytické váhy	Scaltec SBC22	Sartorius
Autokláv		Vaposteri
Box s laminárním prouděním	Faster TWO 30	Chemos CZ
Centrifuga	BiofugeStratos	Heraeus
Centrifuga	MiniSpin	Eppendorf
Denzitometr	Infinite M200	Tecan
Hlubokomrazicí box	Herafreeze	Heraeus
Horizontální elektroforéza	Easycast B1	ThermoScientific
Horizontální elektroforéza	Mini Horizontal HE33	Hofer
Horizontální elektroforéza	Mupid-One	Nippon Genetics
Horkovzdušný sterilizátor	BD 400	Binder
Inkubátor s třepací jednotkou	NB-205	n-Biotek
Inkubátor	INB 200	Memmert
Magnetické míchadlo	Big-squid	IKA
Mikrovlnná trouba		Zanussi
Personal Thermal Cycler	MJ Mini	Bio-Rad
PH metr	Orion 410A	Thermo
Předvážky	PT310	Sartorius
Spektrofotometr	ND-1000	NanoDrop
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Ultradestilační přístroj	Milli-Q	Millipore
Vertikální elektroforéza	Mini Protean 3	Bio-Rad
Vodní lázeň s termostatem	P5 + DC10	Thermo Haake
Výrobník ledové tříště	AF 80	Scotsman
UV transluminátor s kamerou	Infinity VX2	Bio-Print
UV transluminátor s kamerou	GelDoc XR	Bio-Rad
Zdroj pro elektroforézu	PowerPac Universal	Bio-Rad



## 4.3 Příprava pufrů a živných médií

### 4.3.1 Příprava pufrů a roztoků

#### 4.3.1.1 Používané roztoky

- EDTA 0,5 M, pH= 8,0
- Ethanol 70% → sterilizace: filtrace
- Glycerol 85% → sterilizace: 1 hodina při 121°C
- IPTG 1M (skladování při -20°C)
- Kanamycin 10 mg/ml (skladování při -20°C)
- Chloramfenikol 34 mg/ml (skladování při -20°C)

#### 4.3.1.2 Složení jednotlivých pufrů

Tris-Cl pufr: 10 mM Tris, pH= 8,5

TE pufr: 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH= 8,0

TAE pufr (1x): 40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA, pH= 8,0

TBE pufr (5x): 45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá, 10 mM EDTA, pH= 8,3

Fosfátový pufr (1M): 1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1M  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$

Pozn.: Všechny tyto pufrы byly sterilizovány filtrací a uchovávány v lednici.

#### 4.3.1.3 Složení roztoků pro SDS-PAGE

- Akrylamid (AA) 30% + bisakrylamid (bis-AA) 0,8%
- Tris-Cl pufr 1,5 M, pH 8,8
- Tris-Cl pufr 0,5 M, pH 6,8
- SDS 10%
- APS 10% (připravován vždy čerstvý)

Elektrodotový pufr (5x): 125 mM Tris, 1M glycin, 0,5% SDS, pH= 8,3

Vzorkový pufr: 50 mM Tris-Cl pH 6,8, 10% glycerol, 2% SDS, 0,04% bromfenolová modř, 0,05% 2- merkaptoethanol

Barvicí roztok: 0,25% Coomassie Brilliant Blue G250v 10% kyselině octové

Odbarvovací roztok: 10% kyselina octová

## 4.3.2 Příprava živných médií

### 4.3.2.1 Luria- Bertani médium

Jedná se o nejčastěji užívané živné médium při experimentální práci s laboratorními kmeny *E. coli*, zkráceně označované jako LB médium. Médium je připravováno z tryptonu, kvasinkového extraktu, chloridu sodného a ultra-čisté vody. Jednotlivé komponenty byly naváženy, viz Tabulka 1, a rozpuštěny v daném objemu vody. Posléze bylo upraveno pH na 7 pomocí 0,1 M NaOH, neboť ideální pH prostředí pro růst *E. coli* je 7 - 7,5. Nakonec bylo médium před použitím vysterylizováno v autoklávu. LB médium je žluté a čiré. Zpravidla bylo připravováno 200 ml.

Tabulka 1: Složení LB média.

komponenta	množství na 100 ml média
kvasničný extrakt (Bacto yeast)	0,5 g
trypton (Bacto tryptone)	1 g
NaCl	1 g
voda	100 ml

### 4.3.2.2 LB médium s agarem

Tato pevná půda byla připravována stejně jako LB médium, s přídavkem 2 g agaru (Bacto agar) na 100 ml média. Po sterilizaci a následném zchladnutí na cca 50°C, bylo možné přidat antibiotikum. V tomto případě byl přidáván kanamycin v koncentraci 50 µg/ ml média. Antibiotikum bylo důkladně rozmícháno a půda byla přelita na Petriho misky. Po ztuhnutí agarů byly misky připraveny k použití. Z 200 ml média bylo připraveno 10 misek.

## **4.4 Pracovní postup**

### **4.4.1 Izolace plasmidové DNA**

Metoda je založena na lýze bakterií a uvolnění nukleových kyselin do roztoku. Nežádoucí RNA je odstraněna RNAsou. Oddělení plasmidové DNA od chromozomální DNA je provedeno alkalickou denaturací lineárních fragmentů chromozomální DNA, plasmidová DNA je v superspiralizované konformaci a proto denaturována není. Zároveň jsou díky přítomnosti SDS, který se podílí i na lýze buňky, odstraněny proteiny. Vlivem okyselení acetátem draselným dochází k jejich precipitaci a agregují i denaturované molekuly DNA, ty jsou pak odstraněny centrifugací. V případě vyšších požadavků na čistotu následuje přečištění na principu iontoměničové chromatografie přes kolonku. Zakoncentrování izolované DNA je na principu izopropanolové precipitace DNA (Anonymous, 2005; Brown, 2007).

#### **4.4.1.1 Pomnožení *E. coli* DH10B s plasmidem pOTB7**

Malé množství *E. coli* bylo z kolonií na agaru přeneseno pomocí špičky do sterilní skleněné zkumavky s víčkem s 1 ml LB média. Bakterie se nechaly namnožit při 30°C v třepacím inkubátoru při 220 rpm, po dobu 2 hodin. Poté byly přeočkovány do sterilní Erlenmayerovy baňky s víčkem, kde bylo 40 ml LB média a chloramfenikol o koncentraci 34 µg/ml média. Plasmid pOTB7 totiž obsahuje gen pro resistenci k chloramfenikolu. Množení probíhalo přes noc při 37°C v třepacím inkubátoru při 200 rpm.

#### **4.4.1.2 Pomnožení *E. coli* HB101 s plasmidem pET-28b(+)**

Bakterie obsahující plasmid pET-28b(+) jsou resistantní vůči kanamycinu. *E. coli* s transformovaným plasmidem byly po preinkubaci, postup viz 4.4.7.3, přeočkovány do 20 ml nebo 40 ml LB média s kanamycinem (50 µg/ml média) a množeny přes noc při 37°C v třepacím inkubátoru nastaveném na 200- 220 rpm.

#### **4.4.1.3 Velká purifikace plasmidové DNA pomocí kitu QIAGEN Plasmid Midi**

Noční kultura byla za sterilních podmínek přelita do zkumavky Beckman a centrifugována při 4000 rpm po dobu 10 minut. Poté byl supernatant vylit. Peleta

byla resuspendována ve 4 ml pufru P1, který obsahuje RNasu A. Dále byly přidány 4 ml lyzačního pufru P2, směs byla opatrně promíchána a inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Nakonec byl přidán předchlazený neutralizační pufr P3, směs byla opět opatrně promíchána a inkubována 15 minut na ledu. Poté byla provedena centrifugace při 20 000 x g, 4°C, 30 minut. Supernatant obsahoval plasmidovou DNA a byl dále zpracováván, peleta tvořená bílou sraženinou bílkovin byla zlikvidována.

Pomocí 4 ml pufru QBT byla aktivována kolonka QIAGEN- tip 100, pufr procházel gravitačním tokem. Na aktivovanou kolonku byl přelit supernatant přes filtrační papír, aby nedošlo k ucpání kolonky zbytky bílkovinných precipitátů. Poté byla kolonka dvakrát promyta 10 ml QC pufru. Před elucí pomocí 5 ml QF pufru byla pod kolonkou vyměněna nádobka za sterilní zkumavku s víčkem. Eluát byl precipitován 3,5 ml izopropanolu a precipitát DNA byl zcentrifugován při 15 000 x g a 4°C, 30 minut. Supernatant byl zlikvidován a DNA peleta byla promyta ve 2 ml 70 % ethanolu pro odstranění zbytků izopropanolu. Po opětovné centrifugaci 10 minut při 15 000 x g a 4°C se peleta nechala uschnout a poté byla rozpuštěna ve vhodném množství TE pufru (pH 8,0) či Tris-Cl pufru (pH 8,5). Vzorek byl přepipetován do sterilní mikrozukavky Eppendorf.

#### **4.4.1.4 Pomnožení *E. coli* HB101 s plasmidem pET-28b(+) z kolonie**

Do 2 ml LB média s kanamycinem (50 µg/ml média) byla sterilní špičkou přenesena jedna kolonie. Množení probíhalo při 37°C, 180 rpm 4 hodiny či déle do vzniku výrazného zákalu média. Kultura byla rozdělena do dvou mikrozukavek po 1 ml. Jedna byla zpracována dle 4.4.1.5, druhá byla uschována.

#### **4.4.1.5 Malá purifikace plasmidové DNA pomocí kitu QIAGEN Plasmid Midi**

Kultura z předchozího kroku v mikrozukavce byla centrifugována 1 minutu při 13 000 rpm. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v 200 µl pufru P1, poté bylo přidáno 200 µl pufru P2 a po šetrném promíchání byl vzorek inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Denaturace byla ukončena přidáním 200 µl předchlazeného neutralizačního pufru P3. Po 15 minutové inkubaci na ledu byla provedena centrifugace při 13 000 rpm trvající 15 minut a supernatant byl přepipetován do čisté mikrozukavky. DNA obsažená v supernatantu byla

vysrážena pomocí 600  $\mu$ l izopropanolu. Následným zcentrifugováním (13 000 rpm, 10 minut) byla získána DNA peleta. Supernatant byl zlikvidován a peleta byla ještě promyta v 500  $\mu$ l 70 % ethanolu. Po další centrifugaci (13 000 rpm, 10 minut) byl supernatant opět vylit. Peleta byla po uschnutí rozpuštěna v 20  $\mu$ l Tris-Cl (pH 8,5).

#### **4.4.2 Stanovení koncentrace a čistoty DNA**

Pro mnoho kroků během klonování je nutné znát koncentraci i čistotu DNA, se kterou je pracováno. K tomu byla použita UV spektrofotometrie, kdy je z absorbance UV záření o vlnové délce 260 nm vzorkem vypočtena hmotnostní koncentrace. Čistota je zjišťována poměrem absorbancí při 260 a 280 nm. Vzorek je čistý, je-li tento poměr v rozmezí 1,8- 2,0. K měření bylo použito vždy 1,5  $\mu$ l vzorku, každý vzorek byl proměřen třikrát. Vzhledem k tomu, že všechny vzorky byly rozpuštěny v Tris-Cl pufru (pH 8,5), byl tento pufr používán i jako blank.

#### **4.4.3 PCR**

Polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) slouží k amplifikaci vybraného úseku DNA. Jedná se jednoduchou enzymatickou metodu založenou na třech cyklicky se opakujících krocích: denaturace, annealing, polymerace. Při denaturaci se vlivem zvýšení teploty na 92- 95°C od sebe oddělí jednotlivá vlákna dvoušroubovice. V další fázi dojde k ochlazení na 50- 60°C, což umožňuje hybridizaci primerů, neboli jejich nasednutí ke komplementární části množeného úseku DNA. Volba teploty závisí na složení a velikosti použitých primerů a je proto důležitá pro úspěšný výsledek reakce. V posledním kroku zvaném extenze dochází, po opětovném zvýšení teploty na 70- 80°C, k prodlužování primerů, tedy vlastní syntéze nového vlákna komplementárního k templátu. Syntéza nového vlákna probíhá výhradně ve směru 5'  $\rightarrow$  3'. V této fázi se uplatňuje DNA polymerasa (Brown, 2007).

V PCR jsou používány speciální termostabilní polymerasy, které si zachovávají enzymovou aktivitu i při vysokých teplotách, jimž jsou vystaveny v denaturační fázi. Teplotní optimum těchto polymeras se pohybuje kolem 75°C. V tomto experimentu byla používána Phusion Hot Start II HF DNA polymerasa

s exonukleasovou aktivitou 3' → 5' umožňující opravu chybně vložených nukleotidů, čímž je desetkrát zvýšena přesnost kopií. Tato polymerasa vytváří tupé konce.

Pro získání požadovaného úseku byly navrženy primery, viz Tabulka 2. Zároveň byla pomocí těchto primerů amplifikovaná sekvence prodloužena o restrikční místa pro enzymy *NdeI* a *XhoI* (viz podtržené nukleotidy).

**Tabulka 2: Primery pro PCR amplifikaci kódové sekvence AKR1B1.**

primer	sekvence	restrikční endonukleasa
forward	5'- <u>CTG GCA CAT ATG</u> GCA AGC CGT CTC-3'	<i>NdeI</i>
reverse	5'- <u>ACG CCT CGA GTC</u> AAA ACT CTT CAT-3'	<i>XhoI</i>

Reakční směs pro PCR byla připravována dle potřeby v objemu 20  $\mu\text{l}$  či 50  $\mu\text{l}$ , viz Tabulka 3. Zde jsou uvedeny jednotlivé složky reakce a jejich koncentrace. Používaný pufr obsahoval mimo jiné i 7,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , do reakce tedy vstupovalo 1,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  i bez přídavku  $\text{MgCl}_2$  iontů.

**Tabulka 3: Složení reakční směsi pro PCR, uvedeny všechny složky včetně koncentrací.**

složka	konc. zásobního roztoku	finální koncentrace	20 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
DNA polymerasa	2 U/ $\mu\text{l}$	0,02 U/ $\mu\text{l}$	0,2	0,5
templátová DNA	-	-	1	1
dNTPs	10 mM	200 $\mu\text{M}$	0,4	1
reverse primer	10 $\mu\text{M}$	200 nM	0,4	1
forward primer	10 $\mu\text{M}$	200 nM	0,4	1
pufr	5 x	1 x	4	10
$\text{MgCl}_2$	50 mM	2 mM	0,8	2
$\text{H}_2\text{O}$	-	-	12,8	32

Reakce probíhá v termocykleru, který mění teploty dle nastaveného programu, nastavení užívané v tomto experimentu je uvedeno v Tabulka 4. Byly

používány speciální tenkostěnné mikrozkušavky, aby přenos tepla trval co nejkratší dobu a byla zajištěna stejná teplota v celém objemu reakční směsi.

**Tabulka 4: Nastavení termocyklieru.**

<b>fáze</b>	<b>teplota</b>	<b>čas</b>	<b>počet cyklů</b>
první denaturace	98°C	30 s	1
denaturace	98°C	10 s	
annealing	55,9°C	30 s	32
extenze	72°C	30 s	
finální extenze	72°C	10 min	1

#### **4.4.4 Horizontální elektroforéza- analýza DNA**

Během jednotlivých kroků klonování je horizontální elektroforéza na agarosovém gelu nepostradatelnou analytickou metodou. Umožňuje určit velikost DNA, na základě její pohyblivosti v gelu s určitou porozitou v elektrickém poli. Kratší fragmenty v tomto prostředí putují ke katodě rychleji než ty delší. V případě klonování je nutné zohlednit typ analyzované DNA, neboť kruhová DNA se pohybuje rychleji než lineární. U kruhové DNA jsou rozlišovány ještě dvě formy superspiralizovaná (supercoiled), též označovaná ccc (covalently-closed-circular) a otevřená kruhová, oc (open-cirkular), která se vyznačuje nižší pohyblivostí. Bude-li ve směsi fragment téže délky ale různých konformací, bude nejdále od startu ccc DNA, uprostřed nalezneme oc formu a nejbližší startu zůstane lineární DNA (Brown, 2007).

##### **4.4.4.1 Příprava agarosového gelu**

Byl připravován 0,8 % agarosový gel, který je vhodný pro analýzu fragmentů v rozmezí 0,5 – 10 kb, což plně odpovídá potřebám tohoto experimentu.

Nejprve bylo naváženo 0,32 g agarosy, ta byla rozmíchána ve 40 ml TBE (0,5x zřed.) pufru. Tato směs byla povařena v mikrovlnné troubě, čímž došlo k rozpuštění agarosy a vznikl čirý roztok. Po zchlazení minimálně na 50°C bylo v poměru 1:1000 přidáno fluorescenční barvivo ethidiumbromid, tedy 4 µl. Takto

připravený roztok byl nalit na vaničku, poté byl nasazen hřebínek a gel byl ponechán přibližně hodinu tuhnout. Veškeré manipulace s ethidiumbromidem byly prováděny v nitrilových rukavicích, neboť se jedná o silný mutagen.

Ze ztuhlého gelu byl opatrně vyjmut hřebínek tak, aby nebyly poškozeny jamky. Vanička s gelem byla přemístěna do elektroforetické vany a zalita elektroforetickým pufrem TBE (0,5x zřed.), přičemž jamky musely být zcela ponořeny.

#### 4.4.4.2 Vlastní elektroforéza

Jednotlivé vzorky byly nanášeny v množství závislém na jejich předpokládané koncentraci. Každý vzorek byl na kousku parafilmu promíchán s adekvátním množstvím nanášecího pufru (Loading 6x konc.) a poté přepipetován do jamky, více viz Tabulka 5.

**Tabulka 5: Objemy nanášených vzorků na agarosovou elektroforézu.**

<b>vzorek</b>	<b>objem</b>	<b>+</b>	<b>loading (6x konc.)</b>
PCR produkt	5 $\mu$ l	+	1 $\mu$ l
restrikční směs	20 $\mu$ l	+	4 $\mu$ l
purifikovaný plasmid	2 $\mu$ l	+	1 $\mu$ l
žebříček	1 $\mu$ l	+	1 $\mu$ l

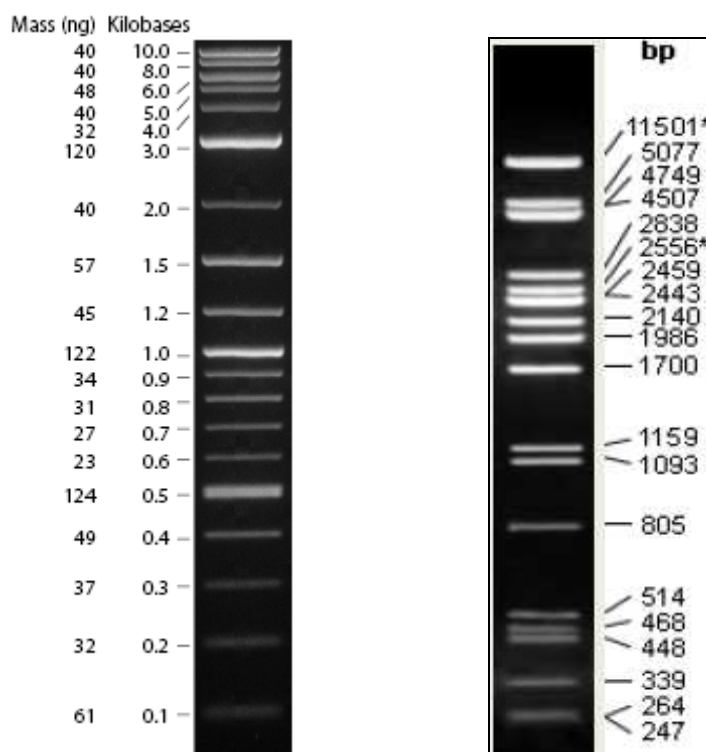
Po nanesení vzorků bylo nasazeno víko a celá vana byla připojena ke zdroji. Důležité je umístění pólů, záporný musí být u jamek a kladný na konci gelu, neboť k němu DNA putuje. Separace probíhala přibližně 60 min při konstantním napětí 90 V.

#### 4.4.4.3 Detekce a vizualizace DNA

Jednotlivé rozseparované fragmenty DNA v gelu byly zobrazeny pomocí systému GelDocXR. Gel byl vyjmut z elektroforetické vany, osušen od elektroforetického pufru, který vizualizaci ruší a umístěn na fotografickou plošku. Byl ozařován UV zářením o vlnové délce 254 nm. Zobrazení a vyfotografování gelu bylo prováděno prostřednictvím programu Quantiti One.



Velikost jednotlivých proužků (bandů) byla stanovena pomocí žebříčku, u něž jsou známy velikosti fragmentů. Pro tyto experimenty bylo využíváno dvou typů žebříčků s lineárními fragmenty DNA: komerčně dodaný 2- log DNA ladder, viz Obrázek 7 a ručně připravený štěpením  $\lambda$  DNA, viz Obrázek 8.



Obrázek 7: Žebříček 2- log DNA (NEB, 2011).      Obrázek 8: Žebříček  $\lambda$  DNA/ PstI (Grabicová, 2007).

#### 4.4.4.4 Postup dle ÚMP

V některých případech byl připravován 1 % agarosový gel v TAE pufru, též obsahující ethidiumbromid 1:1000. Elektroforéza byla provedena na vaně Mupid-One při 100 V, 35 minut. V tomto případě byl používán žebříček (označován  $\lambda$ /PstI) připravený restrikčním  $\lambda$  DNA pomocí PstI. K vyfotografování gelu byl použit UV transluminátor s kamerou Infinity WX2.

#### 4.4.5 Izolace fragmentu DNA pomocí agarosového gelu

Při PCR mohou vznikat další fragmenty DNA lišící se velikostí. Požadovaný fragment je pak třeba od ostatních oddělit. Nejjednodušším způsobem je separace pomocí gelové elektroforézy s následnou extrakcí DNA z příslušného bandu. Pro tyto účely byla použita speciální ultra-čistá agarosa s nízkým bodem tání.

#### **4.4.5.1 Elektroforéza na ultra-čisté agarose**

Postup byl charakterizován několika modifikacemi oproti standardní horizontální elektroforéze. Separace byla prováděna na větší vaně (Easycast B1), proto byl připravován i gel ve větším objemu, 60 ml. Další odlišností bylo použité fluorescenčního barvivo, kdy ethidiumbromid byl nahrazen barvivem SYBR Safe dávkovaným též v poměru 1:1000. Bylo nanášeno 20  $\mu$ l vzorku smíchaného se 4  $\mu$ l nanášecího pufru. Samotná elektroforéza pak probíhala při konstantním proudu 60 mA po dobu 90 minut

#### **4.4.5.2 Extrakce DNA z agarosového gelu**

Extrakce byla provedena kitem QIAEX II Gel Extraction Kit. Princip spočívá v rozpuštění agarosy a kvantitativní adsorpci DNA na silikagelové částice v přítomnosti roztoku o vysoké iontové síle a  $\text{pH} \leq 7,5$ , eluce je pak vyvolána aplikací roztoku s nízkou iontovou silou o  $\text{pH} 8,5$  (Anonymous, 2008).

Band o požadované velikosti byl vyříznut z gelu skalpelem, přemístěn do mikroskopické zkumavky a zvážen. Poté bylo přidáno trojnásobné množství pufru QXI (př. ke 100  $\mu$ g gelu bylo přidáno 300  $\mu$ l QXI). Pufry QXI obsahuje pH indikátor, ten má při  $\text{pH} 7,5$  žlutou barvu. Proto byla barva vzorku zkontrolována, pokud byla růžová, bylo přidáno 10  $\mu$ l 3 M acetátu sodného. Poté byl přidán resuspendovaný QIAEX II (10  $\mu$ l) a vzorek byl inkubován při  $50^\circ\text{C}$  10 minut, každé 2 minuty byl vortexován. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a k peletě bylo přidáno 500  $\mu$ l QXI. Vzorek byl vortexován a opět zcentrifugován. Vzniklá peleta byla dvakrát promyta pomocí 500  $\mu$ l pufru PE, ve kterém byla vždy resuspendována a následně zcentrifugována. Supernatant byl vždy zlikvidován. Nakonec se peleta usušila. K eluci bylo použito 20  $\mu$ l Tris-Cl o  $\text{pH} 8,5$ . Po pěti minutové inkubaci následovala centrifugace, po které byl supernatant obsahující extrahovanou DNA přepipetován do čisté mikroskopické zkumavky. Veškeré centrifugace probíhaly 30 sekund při 13 000 rpm.

#### **4.4.6 Vložení kódové sekvence do plasmidu**

Restrikční endonukleasy (RE) II. typu štěpí DNA v přesně dané sekvenci zpravidla 4- 6 nukleotidů, čehož je v klonovacích technikách hojně využíváno.

Restrikcí vzniklé kohezivní konce lze snadno zaligovat, pokud jsou komplementární (Rumlová et al, 2003). V experimentu byl jako vektor používán plasmid pET-28b, který má v MCS (multiple cloning site, mnohočetné klonovací místo) sekvenci rozpoznávanou enzymem *XhoI* a sekvenci rozpoznávanou enzymem *NdeI*. O tyto sekvence byla pomocí použitých primerů a PCR prodloužena i kódová sekvence AKR1B1.

#### 4.4.6.1 Restrikce kódové sekvence pro AKR1B1 a plasmidu pET-28b(+)

Restrikční směs byla pipetována za sterilních podmínek do mikrozkušavek. Nejprve byl připraven master mix tvořený pufrům, BSA a vodou. K odebraným 13  $\mu\text{l}$  master mixu byla přidána templátová DNA, nakonec byly přidány restrikční endonukleasy (dávková množství viz Tabulka 6). Takto připravené vzorky byly inkubovány 60 minut při 37°C v thermomixeru, kde bylo nastaveno třepání 500 rpm trvající 10 sekund a opakující se každých 10 minut. Následným zvýšením teploty na 65°C byly restrikční endonukleasy po dobu 20 minut inaktivovány.

Stejným způsobem byla provedena restrikční analýza. Jako templátová DNA byla použita analyzovaná DNA. K analýze bylo používáno i jiných enzymů jako *BamHI*, *EcoRI*. Složení reakční směsi bylo stejné, RE bylo dávkováno vždy po 1  $\mu\text{l}$ , v případě štěpení pouze jednou endonukleasou, byl doplněn 1  $\mu\text{l}$  vody do celkového objemu 20  $\mu\text{l}$ .

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro restrikční štěpení DNA.

složka	objem 20 $\mu\text{l}$
templátová DNA	5 $\mu\text{l}$
pufr NEB 4	2 $\mu\text{l}$
BSA (10x)	2 $\mu\text{l}$
<i>XhoI</i> (20 000 U/ml)	1 $\mu\text{l}$
<i>NdeI</i> (20 000 U/ml)	1 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	9 $\mu\text{l}$

#### 4.4.6.2 Odsolení a zakoncentrování DNA roztoku

Ligační reakce může být rušena přítomností některých solí a proteinů, proto byly roztoky DNA po restrikci přečišťovány pomocí kitu QIAEX II Gel Extraction Kit, princip viz 4.4.5.

K restrikční směsi o objemu 20  $\mu$ l bylo přidáno 60  $\mu$ l pufru QXI, byla zkontrolována žlutá barva vzorku, indikující správné pH. QIAEX II byl 30 sekund vortexován a poté dávkován v objemu 10  $\mu$ l. Následovala inkubace trvající 10 minut. Každé 2 minuty byl vzorek promíchán na vortexu. Centrifugací získaná peleta byla dvakrát promyta v 500  $\mu$ l PE pufru. Do běla usušená peleta byla resuspendována ve 20  $\mu$ l Tris-Cl o pH 8,5 a inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Pokud byl přečišťován plasmid probíhala inkubace při 50°C. Po zcentrifugování byl supernatant přemístěn do čisté mikrozkušavky. Centrifugace byla provedena vždy při 13 000 rpm po dobu 30 sekund.

#### 4.4.6.3 Ligace kódové sekvence AKR1B1 a pET-28b(+)

Pro úspěšnou ligaci je nutno znát obsah DNA v jednotlivých vzorcích. Ten byl zjišťován pomocí UV spektroskopie, postup při měření viz 4.4.2. Do ligační směsi bylo vždy dáno 50- 100 ng plasmidu a přidáno trojnásobné množství vkládané sekvence, výpočet viz Rovnice 1. Dále ligační směs obsahovala 2  $\mu$ l pufru pro T4 DNA ligasu (5x konc.), 0,5  $\mu$ l T4 DNA ligasy (2 000 000 U/ $\mu$ l) a destilovanou vodu, kterou byla směs doplněna na celkový objem 10  $\mu$ l. Ligasa byla pipetována jako poslední. Ligační reakce probíhala při teplotě 16°C po dobu 2 hodin. Nakonec byl enzym inaktivován po dobu 10 minut při 65°C. Takto připravený ligát byl transformován do buněk HB101, viz 4.4.7.3.

$$M_{AKR1B1} = 0,951 \text{ kb}$$

$$M_{pET-28b} = 5,368 \text{ kb}$$

$$m_{AKR1B1} = \frac{3 \cdot M_{AKR1B1}}{M_{pET-28b}} \cdot m_{pET-28b} \Rightarrow m_{AKR1B1} = 0,5314 \cdot m_{pET-28b}$$

**Rovnice 1: Vzorec pro výpočet množství AKR1B1 potřebného pro ligační reakci, kde M- molekulová hmotnost, m-hmotnost.**

Během experimentů byla používána i ligasa o koncentraci 400 U/ $\mu$ l, viz Tabulka 7, kde jsou i porovnány pracovní podmínky s oběma ligasami. Přičemž jediné co se shodovalo, byla teplota 16°C při níž reakce probíhala.

**Tabulka 7: Porovnání pracovních podmínek používaných ligas.**

enzym	koncentrace	dávkování	doba reakce	inaktivace
T4 DNA ligasa	400 U / $\mu$ l	1 $\mu$ l	12- 16 hodin	-
T4 DNA ligasa	2 000 000 U / $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	2 hodiny	10 minut 65°C

#### 4.4.7 Vnesení DNA do *E.coli*

Pojmem transformace se označuje proces transportu DNA do prokaryontní buňky. Při chemické transformaci se využívá nejčastěji roztoku  $\text{CaCl}_2$ , který pravděpodobně modifikuje buněčnou stěnu, čímž je umožněna adheze DNA k povrchu buňky. Následně vlivem krátkého zvýšení teploty na 42°C (zpravidla 30- 90 sekund) dojde ke vstupu DNA do buňky. Tento tzv. Heat shock je základním postupem při vnášení DNA do *E. coli*, neboť se jedná o metodu velice levnou, rychlou a účinnou (Brown, 2007).

V experimentech byly používány dva kmeny bakterie *E. coli*. Kmen HB101 byl používán při množení prázdného plasmidu a konstruktů (kódová sekvence zaligovaná do plasmidu). Oproti tomu kmen BL21(DH3) byl používán k expresi požadovaného proteinu.

##### 4.4.7.1 Příprava kompetentních buněk

Kompetentní buňky jsou buňky ošetřené buď chemicky či fyzikálně, schopné přijmout DNA.

Komerčně zakoupené buňky, dlouhodobě uchovávané při -80°C, byly po vyjmutí z freezeru pozvolna rozmrazeny na ledové lázni. Po jemném promíchání bylo odebráno 100  $\mu$ l suspenze a přeneseno do 2 ml LB média ve sterilní zkumavce. Toto bylo inkubováno při 37°C a 180 rpm přes noc. Takto byl získán STOCK 1.

Ze stocku 1 bylo odebráno 0,5 ml a přeočkováno do 3 ml LB média a opět inkubováno při 37°C a 180 rpm, ale pouze 4 hodiny. Poté byla změřena optická

denzita (OD) buněčné suspenze oproti samotnému LB médiu. Po dosažení OD = 0,6 byla buněčná suspenze rozdělena do tří mikrozkušavek Eppendorf po 1 ml, ty byly označeny jako STOCK 2.

Stock 2 byl centrifugován při 11 000 rpm během 15 sekund. Supernatant byl zlikvidován a k peletě byl přidán 1 ml ledově vychlazeného 50 mM chloridu vápenatého. Buňky byly v roztoku rozmíchány a posléze inkubovány 30 minut na ledu. Poté byly opět stočeny při 12 000 rpm, 15 sekund a supernatant byl vylit. K peletě bylo přidáno 0,5 ml 50 mM ledově vychlazeného CaCl<sub>2</sub>, peleta byla jemně resuspendována a po 30 minutové inkubaci na ledu byly buňky připraveny k vlastní transformaci. Takto připravené buňky byly nazvány STOCK 3.

#### **4.4.7.2 Měření optické denzity**

Z buněčné suspenze bylo odebráno 150 µl a přeneseno do jamky na titrační destičce. Do druhé jamky bylo napipetováno stejné množství čistého LB média. Na spektrofotometru Tecan byla změřena absorbance při 595 nm. Od absorbance kultury byla odečtena absorbance média. Při OD 0,6 dosahuje exponenciální fáze růstu bakterií téměř vrcholu.

#### **4.4.7.3 Vlastní transformace**

K transformaci bylo smícháno vždy 50 µl stock 3 a 1 µl purifikovaného plasmidu nebo 5 µl ligátu. Tato směs byla inkubována 30 minut na ledu a poté byl proveden tepelný šok při 42°C, 60 sekund, načež byly mikrozkušavky se směsí okamžitě přemístěny zpět do ledové lázně. Po pěti minutách bylo přidáno 400 µl LB média a vzorek byl preinkubován 1 hodinu při 37°C, 110 rpm v třepacím inkubátoru.

Takto předmnožené buňky byly přeočkovány, buď do tekutého média viz 4.4.1.2 nebo na pevnou půdu viz 4.4.7.4.

#### **4.4.7.4 Vyočkování na tuhou půdu**

Pokud byl do bakterií transformován ligát, byl produkt preinkubace získaný v předchozím kroku přelit na plotnu s LB agarem a kanamycinem připravenou dle 4.3.2.2 a rovnoměrně rozetřena pomocí sterilní hokejky po celém povrchu gelu.

Po zaschnutí byla plotna přikryta víkem a umístěna do inkubátoru s teplotou 37°C gelem nahoru. Nárůst kolonií nastal po 12-24 hod.

#### 4.4.8 Sekvenace

Správnost kódové sekvence zabudované do plasmidu byla ověřena sekvenací. Ta byla provedena ve firmě GeneriBiotech, automatickým sekvenátorem ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer. Jedná se o kapilární elektroforézu s fluorescenčním detektorem (GeneriBiotech, Sekvenace, 2009). Princip reakce vychází z enzymatické metody (Sanger et al, 1977) a využívá fluorescenčně značených terminačních dideoxyribonukleotidů (ddNTPs).

K sekvenační reakci byly zvoleny primery (viz Tabulka 8) ohraničující MCS na plasmidu pET-28b(+).

**Tabulka 8: Primery pro sekvenační reakci.**

<b>název primeru</b>	<b>sekvence primeru</b>
T7-prom	TAATACGACTCACTATAGGG
T7-term_Inv	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG

Výsledky byly zpracovány v programu FinchTV, který je volně ke stažení (Geospitza, 2010) a zkontrolovány s kódovou sekvencí v programu ClustalW (dostupné z Genome, 2011).

#### 4.4.9 Exprese proteinu AKR1B1

K expresi proteinu byl používán isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosid (IPTG), protože používaný pET-28b(+) obsahuje laktosový operon.

##### 4.4.9.1 Příprava zásobního roztoku s BL21 (DH3)

Plasmid s vloženou sekvencí byl transformován do expresních *E. coli* BL21 (DH3), postup viz 4.4.7.3. Po hodinové preinkubaci byly bakterie přeočkovány do zkušavky se 2 ml LB média s kanamycinem (50  $\mu$ g/ ml média) a inkubovány přes noc v třepacím inkubátoru při 37°C a 180 rpm.

Z této kultury byl připraven tzv. glycerol stock 1, kdy bylo 750 µl buněčné suspenze rozmícháno v 250 µl 85 % glycerolu. Takto připravené buňky byly uschovány při -80°C.

#### **4.4.9.2 Příprava buněčného lyzátu pro ověření exprese**

Zbytek noční kultury z předchozího kroku byl přeočkován do 20 ml LB média s kanamycinem (50 µg/ ml média) a inkubován při 37°C a 200 rpm. Během toho byla měřena optická denzita, viz 4.4.7.2. Po dosažení OD = 0,6 byla indukována exprese pomocí IPTG, jehož finální koncentrace v celém objemu byla 1 mM. Kultura byla inkubována 4 hodiny v třepacím inkubátoru při 37°C a 200 rpm. Poté byla provedena centrifugace za těchto podmínek: 6000 x g, 4°C, 15 minut. Supernatant byl odstraněn a peleta byla zpracována. Před a po indukci byly odebrány kontrolní vzorky po 1 ml.

Buněčná peleta byla důkladně resuspendována ve 3 ml činidla BugBuster Protein Extraction Reagent a tato směs byla inkubována na třepačce 20 minut při pokojové teplotě. Lyzát byl zcentrifugován při 16 000 x g, 4°C po dobu 20 minut. Supernatant byl přemístěn do sterilní zkumavky s víčkem a uchováván při 4°C. Peleta byla uschována pro analytické účely při -20°C.

#### **4.4.9.3 Exprese proteinu**

Do 10 ml LB média s kanamycinem (50 µg/ ml média) ve sterilní zkumavce s víčkem byly přeočovány 2 µl z glycerol stocku 1 *E. coli* BL21 (DH3) obsahujících plasmid s kódovou sekvencí AKR1B1. Buňky byly množeny při 37°C, 200 rpm přes noc.

Z noční kultury byl odebrán vzorek 1 ml, pro případnou kontrolní izolaci plasmidové DNA. Zbytek byl přeočkován do 250 ml předehřátého LB média s kanamycinem (50 µg/ ml média). Během inkubace probíhající při 37°C a 200 rpm byla měřena OD (viz 4.4.7.2). Po dosažení OD = 0,6 byl opět odebrán 1 ml, sloužící jako kontrola před indukci (vzorek označen PBI) a poté byla indukována exprese přidáním 250 µl 1 M IPTG, koncentrace v kultuře tedy byla 1 mM. Po čtyřhodinové inkubaci při 37°C a 220 rpm byla odebrána kontrola po indukci 1ml (označena PAI)



a kultura byla centrifugována 15 minut při 6 000 x g. Supernatant byl zlikvidován a peleta byla zpracována dle 4.4.10. Do doby zpracování byla uschována při -20°C.

#### **4.4.10 Purifikace proteinu kitem Ni-NTA Fast Start**

Protein byl purifikován v nativním stavu komerčním kitem na principu afinitní chromatografie. Produkovaný rekombinantní protein má na svém C- konci 6 histidinů, touto značkou se váže na sorbent, jehož součástí jsou  $\text{Ni}^{2+}$  ionty (Anonymous, 2006).

Peleta získaná z 250 ml kultury byla po vyndání z mrazáku ponechána 15 min na ledu, aby roztála. Během této doby bylo odebráno 10 ml nativního lyzačního pufru, k němuž bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  lysozymu a 10  $\mu\text{l}$  Benzonase Nukleasy. V tomto roztoku byla peleta resuspendována. Lýza probíhala 30 minut na ledu, aby uvolněné proteiny nebyly poškozeny proteasami buňky. Poté byl lyzát centrifugován při 14 000 x g a 4°C 30 minut. Mezitím byla připravena kolonka se sorbentem. Po resuspendování sorbentu ve skladovacím roztoku byla kolonka umístěna do stojanu a bylo ulomeno těsnění na dolním vyústění. Dále bylo odšroubováno víčko kolonky, skladovací roztok protekl gravitačním tokem a posléze byl zlikvidován. Supernatant obsahující rozpustné proteiny byl přenesen na kolonu, peleta byla uschována pro SDS-PAGE analýzu. První frakce tvořená buněčným lyzátem ochuzeným o zachycený rekombinantní protein byla označena FT (flow through). Poté byly nanесeny dvakrát 4 ml nativního promývacího pufru. Získané frakce byly označeny jako W1 a W2 (wash). Nakonec byl rekombinantní protein eluován 1 ml nativního elučního pufru. Eluce byla provedena dvakrát, získané eluáty byly označeny E1 a E2. Všechny frakce byly jímány do čisté zkumavky a uloženy do lednice při 4°C do SDS-PAGE analýzy.

#### **4.4.11 Elektroforéza bílkovin**

Stejně jako při elektroforéze DNA bylo i u proteinů cílem rozdělit je dle velikosti. Nejčastěji se používá polyakrylamidový gel, připravovaný kopolymerací akrylamidu a N,N-methylen-bisakrylamidu. Byla zvolena metoda dle Laemlliho při níž jsou proteiny denaturovány, disulfidické vazby jsou rozrušeny

2-merkptoethanolem. Denaturované proteiny jsou obaleny tenzidem dodecylsulfátem sodným (SDS), čímž získají stejný náboj. Proto je metoda označována jako SDS-PAGE. Pro přesnější výsledky bylo využito dvou gelů o různé porozitě. Vrchní gel má větší póry, molekuly jím procházejí tedy rychle a zakoncentrovávají na hranici se spodním gelem, jehož porozita je menší. Vrchní gel je proto nazýván koncentrační. Vlivem následného zvýšení napětí dochází ve spodním gelu k vlastní separaci proteinů, odtud název separační gel (Jáč, 2009).

#### 4.4.11.1 Příprava polyakrylamidového gelu

Aparatura pro přípravu polyakrylamidového gelu byla důkladně omyta a sestavena. Byl připravován gel o tloušťce 1,5 mm. Jako první byl namíchán roztok pro separační gel, viz Tabulka 9, který byl po přidání iniciátorů polymerace (APS a TEMED) promíchán a pipetou nanesen mezi skla do  $\frac{3}{4}$ , poté byl převrstven isobutanolem, aby nedocházelo k vysušení. Objem gelu odpovídal přibližně 8 ml roztoku. Po 45 minutové polymeraci byl isobutanol slit a spláchnut destilovanou vodou. Po vysušení byl pipetou nanesen koncentrační gel, který byl namíchán též viz Tabulka 9. Naneseny byly 1- 2 ml roztoku a bezprostředně nato byl nasazen hřebínek. Tento gel byl ponechán polymerovat 90 minut. Poté byl hřebínek opatrně vyjmut, jamky byly propláchnuty destilovanou vodou a gel byl připraven k použití.

**Tabulka 9: Složení a příprava koncentračního a separačního gelu pro SDS-PAGE.**

<b>složka</b>	<b>separační gel 12,5%</b>	<b>koncentrační gel 4%</b>
H <sub>2</sub> O	3,2 ml	3,125 ml
Tris-Cl 1,5M (pH 8,8)	2,5 ml	-
Tris-Cl 0,5M (pH 6,8)	-	1,25 ml
AA 30% + bis-AA 0,8%	4,2 ml	0,5 ml
SDS 10%	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
APS 10%	58 $\mu$ l	30 $\mu$ l
TEMED	4 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l
objem	$\approx$ 10 ml	$\approx$ 5 ml

#### **4.4.11.2 Příprava vzorku**

Analyzovaný protein musel být před analýzou denaturován, proto byl v poměru 4 : 1 smíchán se vzorkovým pufrům a inkubován 3 minuty při 95°C.

V případě pelet bylo použito k analýze vždy 2 µl. Protein v roztoku byl nanášen v množství 2- 10 µl.

#### **4.4.11.3 Vertikální elektroforéza**

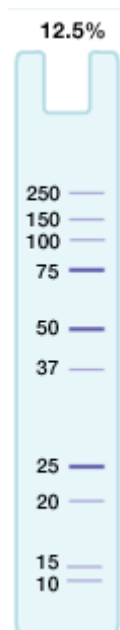
Elektroforetická aparatura byla sestavena s gelem připraveným výše uvedeným postupem 4.4.11.1, uložena do nádoby s ledem a poté byl do horního elektrodového prostoru nalit elektrodový pufr 1x zředěný (80 ml 5x konc + 320 ml ultračisté vody). Připravené vzorky a žebříček byly nanášeny a jamky byly opatrně doplněny elektrodovým pufrům 1x zředěným. Tímto pufrům byl doplněn horní elektrodový prostor a zbytek byl nalit do dolního prostoru. Nakonec byla elektroforetická vana připojena ke zdroji, na kterém bylo nastaveno 100 V. Po průchodu vzorků koncentračním gelem bylo napětí zvýšeno na 200 V. Elektroforéza byla ukončena po doběhnutí vzorků na konec gelu.

#### **4.4.11.4 Barvení gelu**

K barvení gelu byl použit 0,25% roztok Coomassie Brilliant Blue G-250 v 10% kyselině octové. Gel vyjmutý ze skel a odříznutý od koncentračního gelu byl vložen do roztoku barvy v plastové krabičce a inkubován 15 minut při 60°C. Poté byla barva slita a gel byl odbarvován pomocí 10% kyseliny octové, ta byla několikrát vyměněna. Odbarvení bylo podpořeno mícháním na třepačce. Po opětovné výměně kyseliny byl gel v roztoku ponechán přes noc a ráno byl vyhodnocen.

#### **4.4.11.5 Dokumentace gelu**

Gel byl vyfotografován pomocí systému GelDocXR za použití bílého světla a bílého pozadí. K určení velikosti proteinu byl použit žebříček Precision Plus Protein Standard All Blue (10- 250 kDa), viz Obrázek 9.



Obrázek 9: Žebříček Precision Plus Protein Standard All Blue (10- 250 kDa), (Bio-Rad, 2011)

#### 4.4.12 Měření koncentrace proteinu dle Bradfordové

Metoda využívá interakce barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 s aminokyselinami v bílkovině, které mají aromatické jádro či bazický charakter (Rumlová et al, 2003). U tohoto barviva jsou rozlišovány dvě formy kationická (nevázaná), která vykazuje červenou barvu a anionická (vázaná), ta má barvu modrou.

Jako standard byl použit BSA (bovinní sérový albumin). Nejprve byl připraven zásobní roztok o koncentraci 1 mg/ml, kdy bylo naváženo 0,003 g BSA a rozpuštěno ve 3 ml 1M fosfátového pufru o pH 7,4. Z tohoto zásobního roztoku byla připravena kalibrační řada (Tabulka 10).

Vlastní stanovení bylo provedeno na mikrotitrační destičce. Stanovovaný protein byl 5x předředěn, k 10  $\mu$ l bylo přidáno 40  $\mu$ l 1M fosfátového pufru. Do jamky bylo pipetováno 10  $\mu$ l vzorku (kalibrační řada, stanovovaný protein, slepý vzorek), poté bylo multi-kanálovou pipetou přidáno 240  $\mu$ l Bradford reagentu do každé jamky. Po deseti minutové inkubaci byla změřena absorbance při 592 nm. Každý vzorek byl nanesen třikrát a hodnoty absorbance byly zprůměrovány. Jako slepý vzorek byl použit samotný fosfátový pufr.

Tabulka 10: Příprava kalibrační řady standardů BSA pro stanovení bílkoviny dle Bradfordové.

<b>koncentrace BSA</b>	<b>objem BSA (1mg/ml)</b>	<b>objem fosfátového pufru (1 M, pH 7,4)</b>
<b>0,1 mg/ml</b>	50 µl	450 µl
<b>0,2 mg/ml</b>	100 µl	400 µl
<b>0,4 mg/ml</b>	200 µl	300 µl
<b>0,6 mg/ml</b>	300 µl	200 µl
<b>0,8 mg/ml</b>	400 µl	100 µl
<b>1 mg/ml</b>	500 µl	-

#### 4.4.13 Převedení do uchovávacího pufru

Protein byl po purifikaci rozpuštěn v elučním pufru, který dále obsahoval zbytky imidazolu z lyzačního pufru. Imidazol může snižovat aktivitu enzymu, proto byl protein převeden do fosfátového pufru. Principem je zachycení proteinu na celulosové membráně.

Eluát byl přepipetován na kolonku Amicon Ultra-4 s filtrem Ultracel-10 a centrifugován při 4 000 x g 10 minut. Protein zachycený na membráně byl čtyřikrát promyt pomocí 2 ml fosfátového pufru (1M). Po každém nanesení pufru byla provedena centrifugace při 4 000 x g po dobu 20 minut, tak aby pufr nebyl zcela přefiltrován, vždy zůstalo přibližně 300- 500 µl. Nakonec byl protein, který měl žlutou barvu, resuspendován v nezfiltrovaném pufru a přenesen do čisté zkumavky, kde byl případně dle potřeby naředěn. V této fázi byla změřena koncentrace bílkoviny metodou dle Bradfordové, viz 4.4.12.

Teprve poté byl protein rozmíchán v glycerolu 85% 1 : 1 a zjištěná koncentrace byla přepočítána. Takto získaný enzym byl uložen při - 20°C a připraven k použití.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Klonování AKR1B1

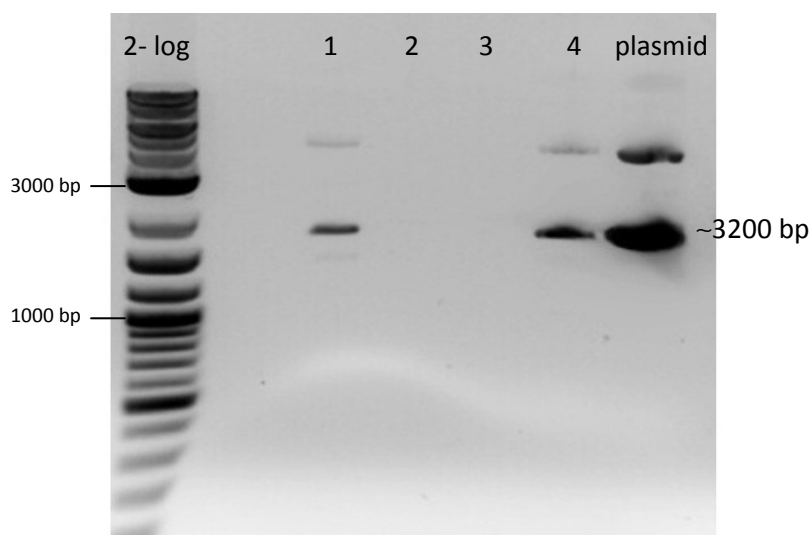
#### 5.1.1 Izolace plasmidu pOTB7 obsahujícího cDNA pro AKR1B1

Kódová sekvence (CDS), která přímo odpovídá sekvenci aminokyselin cílového proteinu AKR1B1 (viz Obrázek 10, žluté zvýraznění), byla objednána v podobě cDNA, jejíž délka je 1398 bp. cDNA se získává zpětnou transkripcí mRNA, přičemž v případě eukaryontních organismů jedna mRNA odpovídá jednomu proteinu, jak je tomu i v případě klonovaného enzymu AKR1B1. Objednaná cDNA byla výrobcem zaklonována pomocí enzymů *EcoRI* a *XhoI* do plasmidu pOTB7, jehož délka po ošetření zmíněnými endonukleasami je 1795 bp. Výsledná délka takto vytvořeného plasmidu je tedy 3193 bp. Výrobce deklaruje vloženou sekvenci MGC: 1804, kde kód MGC (Mammalian Gene Collection, savčí genová kolekce) odkazuje na zaklonovanou nukleotidovou sekvenci, viz Obrázek 10, která je uložena v databázi NCBI.

```
1   ACGGGCTATT TAAAGGTACG CGCCGCGGCC AAGGCCGCAC CGTACTGGGC GGGGGTCTGG
61  GGAGCGCAGC AGCCATGGCA AGCCGTCTCC TGCTCAACAA CGGCGCCAAG ATGCCCATCC
121 TGGGGTTGGG TACCTGGAAG TCCCTCCAG GGCAGGTGAC TGAGGCCGTG AAGGTGGCCA
181 TTGACGTCGG GTACCGCCAC ATCGACTGTG CCCATGTGTA CCAGAATGAG AATGAGGTGG
241 GGGTGGCCAT TCAGGAGAAG CTCAGGGAGC AGGTGGTGAA GCGTGAGGAG CTCTTCATCG
301 TCAGCAAGCT GTGGTGCACG TACCATGAGA AGGGCCTGGT GAAAGGAGCC TGCCAGAAGA
361 CACTCAGCGA CCTGAAGCTG GACTACCTGG ACCTCTACCT TATTCACTGG CCGACTGGCT
421 TTAAGCCTGG GAAGGAATTT TTCCATTGG ATGAGTCGGG CAATGTGGTT CCCAGTGACA
481 CCAACATTCT GGACACGTGG GCGGCCATGG AAGAGCTGGT GGATGAAGGG CTGGTGAAAG
541 CTATTGGCAT CTCCAACTTC AACCATCTCC AGGTGGAGAT GATCTTAAAC AAACCTGGCT
601 TGAAGTATAA GCCTGCAGTT AACCAGATTG AGTGCCACCC ATATCTCACT CAGGAGAAGT
661 TAATCCAGTA CTGCCAGTCC AAAGGCATCG TGGTGACCGC CTACAGCCCC CTCGGCTCTC
721 CTGACAGGCC CTGGGCCAAG CCCGAGGACC CTTCTCTCCT GGAGGATCCC AGGATCAAGG
781 CGATCGCAGC CAAGCACAAT AAAACTACAG CCCAGGTCCT GATCCGGTTC CCCATGCAGA
841 GGAACCTGGT GGTGATCCCC AAGTCTGTGA CACCAGAACG CATTGCTGAG AACTTTAAGG
901 TCTTTGACTT TGAAGTGAAG AGCCAGGATA TGACCACCTT ACTCAGCTAC AACAGGAACT
961 GGAGGGTCTG TGCCTTGTTG AGCTGTACCT CCCACAAGGA TTACCCCTTC CATGAAGAGT
1021 TTTGAAGCTG TGGTTGCCTG CTCGTCCCCA AGTGACCTAT ACCTGTGTTT CTTGCCTCAT
1081 TTTTTTCCTT GCAAATGTAG TATGGCCTGT GTCACCTCAGC AGTGGGACAG CAACCTGTAG
1141 AGTGGCCAGC GAGGGCGTGT CTAGCTTGAT GTTGGATCTC AAGAGCCCTG TCAGTAGAGT
1201 AGAAGTCTCT TCCAGTTTGC TTTGCCCTTC TTTCTACCCT GCTGGGGAAA GTACAACCTG
1261 AATACCCTTT TCTGACCAAA GAGAAGCAAA ATCTACCAGG TCAAAATAGT GCCACTAACG
1321 GTTGAGTTTT GACTGCTTGG AACTGGAATC CTTTCAGCAA GACTTCTCTT TGCCTCAAAT
1381 AAAAAGTGCT TTTGTGAG
```

Obrázek 10: Nukleotidová sekvence cDNA pro AKR1B1 s vyznačenou kódovou sekvencí (žlutá) a start kodonem ATG (červená) (Kolektiv autorů, 2006a).

Tato plasmidová DNA obsahující cDNA pro AKR1B1 v plné délce byla dodána v bakteriích *E. coli*, kmen DH10B. Ty byly namnoženy dle 4.4.1.1 a následně byla izolována plasmidová DNA kitem QIAGEN Plasmid Purification (Midi), kdy v posledním kroku byla DNA peleta rozpuštěna ve 400  $\mu$ l TE pufru (pH 8,0). Velikost získaného plasmidu byla zjištěna pomocí gelové elektroforézy (4.4.4), viz Obrázek 11. Během izolace byly odebírány kontrolní vzorky.

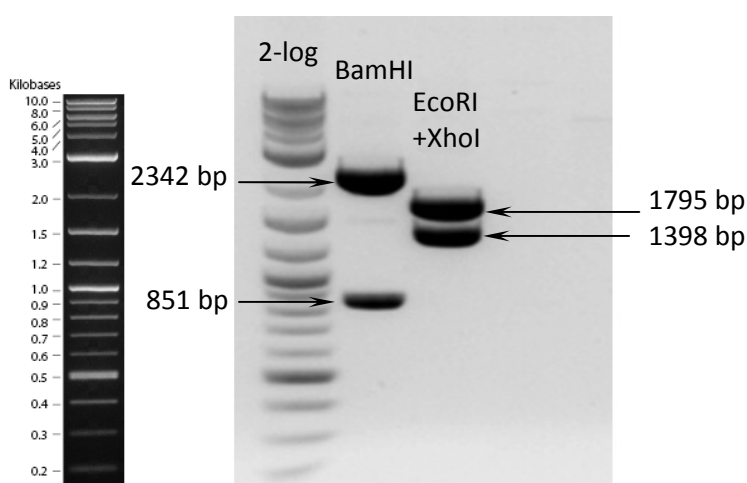


**Obrázek 11:** Izolace plasmidu pOTB7 obsahujícího cDNA pro AKR1B1. Analýza pomocí gelové elektroforézy, podmínky separace: 0,8% agarosový gel v TBE pufru, 90 V, 60 minut, aplikováno 5  $\mu$ l každého vzorku, 1  $\mu$ l žebříčku 2- log DNA. Kde: 1- supernatant po lýze bakterií obsahující plasmidovou DNA, 2- supernatant ochuzený o DNA, která byla zachycena na koloně, 3- promývací roztok prošlý kolonou, 4- eluce obsahující purifikovaný plasmid, 5- zakoncentrovaný plasmid.

Výsledky gelové elektroforézy potvrzují správný průběh izolace. Vzorek 1 byl odebrán ze supernatantu získaného po lýze buněk a precipitaci bílkovin a chromozomální DNA, který jak Obrázek 11 naznačuje, obsahuje plasmidovou DNA. Z frakce získané po nanesení tohoto supernatantu na kolonu, byl odebrán vzorek 2. Na gelu není vidět žádný proužek, neboť v tomto kroku by DNA měla být zachycena na koloně. Vzorek 3 odpovídá promývacímu roztoku prošlému kolonou, který taktéž neobsahuje DNA. Z eluční frakce byl odebrán vzorek 4, ten obsahuje plasmidovou DNA uvolněnou z kolony. V poslední dráze se nachází přečištěný a zakoncentrovaný plasmid. Jeho velikost po zohlednění superspiralizované konformace odpovídá předpokládaným 3193 bp.

### 5.1.1.1 Restrikční analýza izolovaného plasmidu

Pro ověření dodané cDNA byla provedena restrikční analýza (4.4.6.1), kdy byl izolovaný plasmid naštěpen v prvním případě pomocí *Bam*HI, který štěpí pOTB7 v pozici 80 a vloženou sekvenci cDNA pro AKR1B1 v pozici 765. Výsledkem štěpení byly dva fragmenty o velikosti 2342 bp a 851 bp. V druhém případě bylo provedeno zpětné vyštěpení vkládaného insertu pomocí *Eco*RI a *Xho*I za vzniku dvou fragmentů. Jeden odpovídá plasmidu pOTB7 1795 bp a druhý vložené cDNA 1398 bp, viz Obrázek 12. Elektroforéza byla provedena postupem popsáním na straně 31.



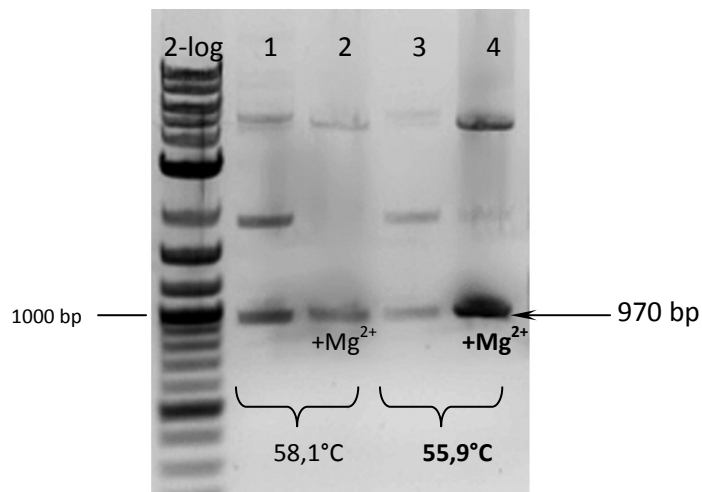
**Obrázek 12:** Restrikční analýza plasmidu pOTB7 obsahujícího cDNA pro AKR1B1. Podmínky restrikce: 37°C, 1 hodina. Analýza produktů štěpení pomocí gelové elektroforézy, podmínky separace: 0,8% agarosový gel v TBE pufru, 90 V, 60 minut, aplikováno 20  $\mu$ l každého vzorku, 1  $\mu$ l žebříčku 2- log DNA.

### 5.1.2 Izolace kódové sekvence AKR1B1

Namnožení požadovaného úseku DNA bylo provedeno pomocí PCR amplifikace. Byly navrženy primery ohraničující kódovou sekvenci, přičemž forward primer byl prodloužen o sekvenci rozpoznávanou restrikční endonukleasou *Nde*I a reverse primer o sekvenci, kterou štěpí enzym *Xho*I, viz Tabulka 2. Tím byla kódová sekvence (CDS) jejíž délka je 951 bp, celkem prodloužena na 970 bp.

Nejprve byla provedena optimalizace metody, kdy byly testovány různé teploty annealingu (55,9°C a 58,1°C) a množství  $Mg^{2+}$  iontů v reakci, viz Obrázek 13.

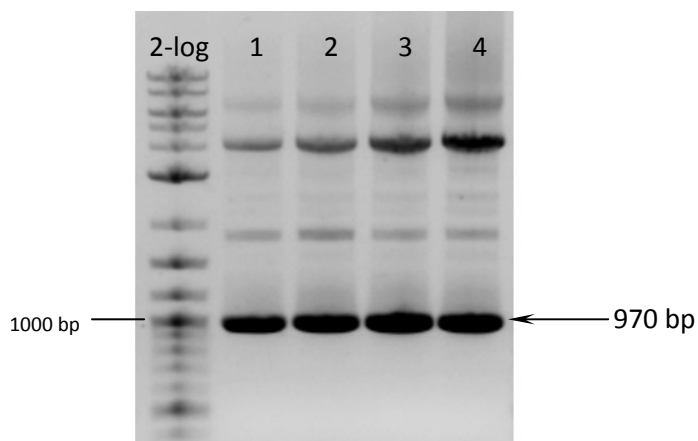




**Obrázek 13: Optimalizace PCR. Analýza PCR produktů pomocí gelové elektroforézy, podmínky separace: 0,8% agarosový gel v TBE pufru, 90 V, 60 minut, aplikován 1  $\mu$ l žebříčku 2- log DNA, 5  $\mu$ l každého vzorku (1- 4).**

Podle výsledků z gelové elektroforézy byly zvoleny tyto pracovní podmínky za použití polymerasy Phusion Hot Start II: annealing při 55,9°C a přídavek  $Mg^{2+}$  iontů v množství 2 mM, finální koncentrace v reakci po zohlednění obsahu těchto iontů v reakčním pufru (1,5 mM) byla 3,5 mM.

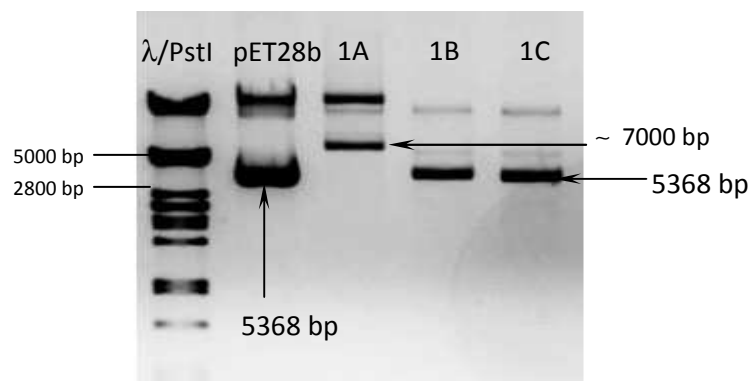
V druhé fázi byla provedena reakce v objemu 50  $\mu$ l k získání dostatečného množství PCR produktů pro další manipulace (Obrázek 14). S těmito produkty 1- 4 bylo pracováno při všech dalších experimentech.



**Obrázek 14: PCR amplifikace kódové sekvence AKR1B1. Analýza pomocí gelové elektroforézy, podmínky separace: 0,8% agarosový gel v TBE pufru, 90 V, 60 minut, aplikován 1  $\mu$ l žebříčku 2- log DNA, 5  $\mu$ l každého vzorku (1- 4).**

### 5.1.3 Klonování AKR1B1

Tento krok se dlouho nedařilo dovést k úspěšnému konci. Nejprve bylo provedeno několik pokusů, kdy byl restričními endonukleasami (*XhoI* a *NdeI*) ošetřen přímo PCR produkt bez jakéhokoliv předchozího čištění, stejně tak byl ošetřen i plasmid pET-28b(+), který má ve svém MCS (mnohočetné klonovací místo) sekvenční rozpoznávané těmito endonukleasami. Teprve poté bylo provedeno přečištění DNA kitem QIAEX II dle návodu popsaného v kapitole 4.4.6.2, následovalo změření koncentrace těchto vzorků a na základě výsledků byla připravena ligační směs plasmidu a insertu v poměru 1 : 3. Po ligační reakci byl ligát transformován do *E. coli* HB101. Nakonec byly bakterie přeočkovány na LB agar s kanamycinem (50 µg/ml), který vede k selekci klonů obsahujících uzavřený plasmid pET-28b(+), který totiž obsahuje gen odpovědný za resistenci ke kanamycinu. Ostatní bakterie v tomto prostředí tedy hynou. Po inkubaci přes noc zpravidla sice narostlo pár kolonií, nikdy ne však více než deset. Po následné izolaci plasmidové DNA pomocí kitu QIAGEN Plasmid Purifikation a její analýze na agarosovém gelu dle 4.4.4.4, bylo zjištěno, že ani v jednom případě nedošlo ke vzniku požadovaného konstruktů. Příkladem je Obrázek 15.

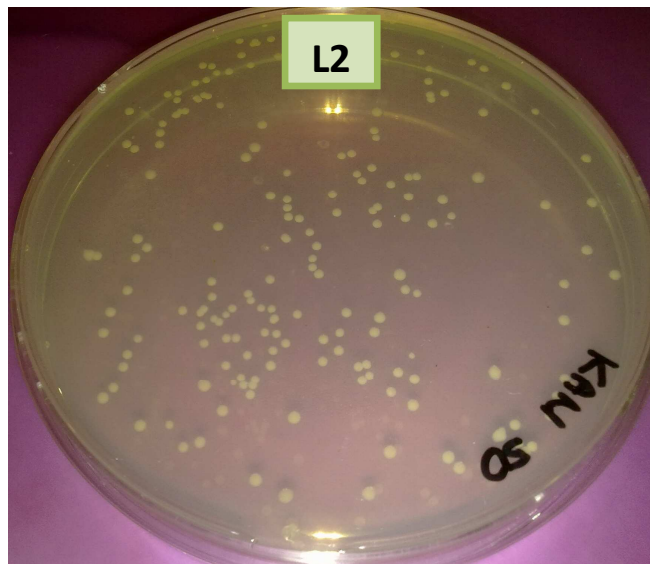


**Obrázek 15: Ligace 1. Analýza ligačních produktů po izolaci plasmidové DNA z kolonie pomocí gelové elektroforézy, podmínky separace: 1% agarosový gel v TAE, 100 V, 35 minut, aplikován 1 µl žebříčku λ/PstI, 2 µl uzavřeného plasmidu pET-28b(+), 5 µl každého vzorku (1A- C).**

Při porovnání s prázdným uzavřeným pET-28b byl v případě vzorku 1A pravděpodobně do plasmidu zaligován delší fragment vznikající při PCR, viz Obrázek 14, než ten, který je tvořen pouze kódovou sekvencí. U vzorků 1B a 1C se jedná

evidentně o prázdné plasmidy. Jejich přítomnost může být způsobena neúčinnou restrikcí, neboť některé složky PCR reakce mohou inhibovat restrikční endonukleasy. Dalším důvodem může být zpětné zaligování vyštěpené sekvence z oblasti MCS. Proto byly učiněny následující kroky, aby byla zvýšena pravděpodobnost vzniku správného konstruktů.

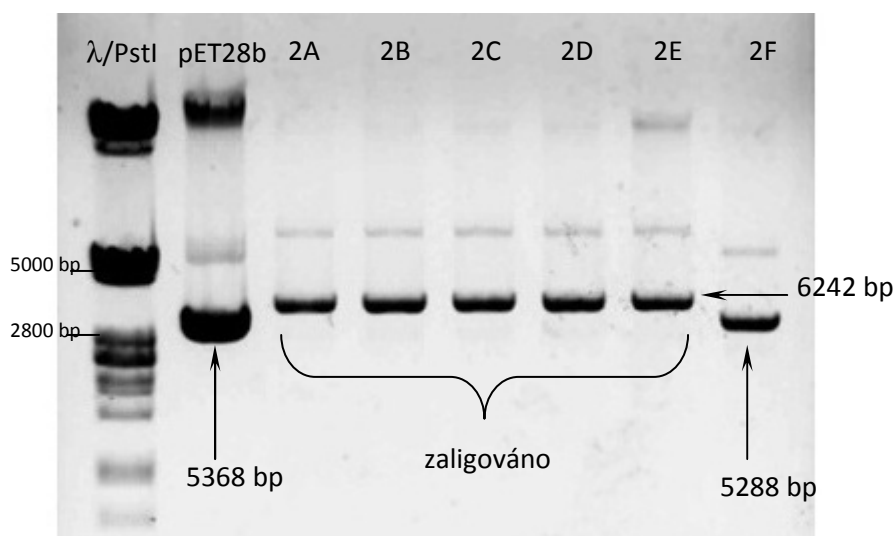
Nejprve byl PCR produkt elektroforeticky rozdělen na gelu z ultra-čisté agarosy, poté byl extrakcí z gelu izolován DNA fragment o délce 970 bp, postup viz 4.4.5. Ten byl stejně jako plasmid pET-28b(+) štěpen pomocí *NdeI* a *XhoI*. Fragment tvořený CDS AKR1B1 byl po restrikci přečištěn kitem QIAEX II, protokol viz 4.4.6.2. Plasmid byl, pomocí elektroforézy na ultra-čisté agarose s následnou extrakcí DNA fragmentu příslušné velikosti oddělen od vyštěpené sekvence, jejíž délka činí 80 nukleotidů. S takto ošetřeným vektorem a insertem byla provedena ligace dle kapitoly 4.4.6.3. Po proběhlé ligační reakci bylo 5  $\mu$ l této směsi transformováno do *E. coli* HB101 a po hodinové inkubaci v tekutém médiu byly buňky přeočkovány na Petriho misku s LB agarem a kanamycinem (50  $\mu$ g/ml média). Plotna byla inkubována v termostatu při 37°C po dobu přibližně 16 hodin.



**Obrázek 16:** Petriho miska s LB agarem a kanamycinem. Naočkovány *E. coli* HB101 obsahující produkty ligace 2. Inkubace při 37°C, 16 hodin.

Vyrostlo přibližně 100 kolonií (Obrázek 16) z nichž bylo 10 odebráno a namnoženo dle 4.4.1.4. U šesti z nich byla izolována plasmidová DNA metodou

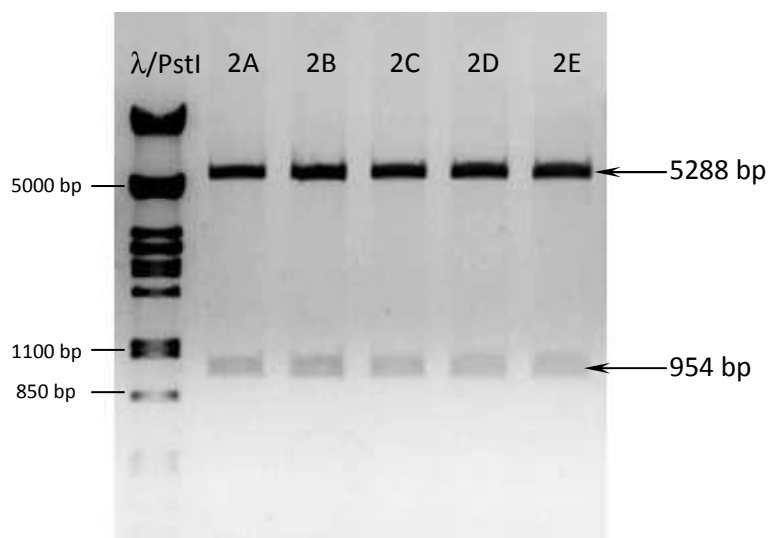
popsanou v kapitole 4.4.1.5, za použití kitu QIAGEN Plasmid Purification. Úspěšnost ligace byla zjišťována pomocí gelové elektroforézy (4.4.4.4), kde byl vedle žebříčku nanesen i prázdný plasmid, pro lepší odhad velikosti analyzované DNA (Obrázek 17).



**Obrázek 17: Ligace 2. Analýza ligačních produktů (ligace 2) po izolaci plasmidové DNA z kolonie pomocí gelové elektroforézy, podmínky separace: 1% agarosový gel v TAE, 100 V, 35 minut, aplikován 1  $\mu$ l žebříčku  $\lambda$ /PstI, 2  $\mu$ l uzavřeného plasmidu pET-28b(+), 5  $\mu$ l každého vzorku (2A- E).**

U vzorků 2A- 2E byla, v porovnání s prázdným uzavřeným plasmidem pET-28b (5368 bp), zjištěna větší velikost izolované plasmidové DNA, odpovídající předpokládaným 6242 bp, tedy plasmidu po naštěpení (5288 bp) s vloženou kódovou sekvencí pro AKR1B1 o délce 954 bp. Vzorek 2F je pravděpodobně tvořen prázdným plasmidem pET-28b(+). Proto s ním již dále nebylo pracováno. Velikosti neodpovídají žebříčku, protože ten je tvořen lineárními fragmenty DNA s jinou elektroforetickou pohyblivostí než má plasmidová DNA, která je v superspiralizované konformaci.

K ověření velikosti konstruktů a vložené sekvence byla použita restriční analýza s využitím enzymů *XhoI* a *NdeI* (4.4.6.1), jednalo se tedy o tzv. zpětnou restrikcii. Vzorky byly po štěpení analyzovány gelovou elektroforézou provedenou podle 4.4.4.4. U všech vzorků byly nalezeny dva očekávané fragmenty odpovídající samotnému otevřenému plasmidu pET-28b (5288 bp) a insertu CDS AKR1B1 (954 bp), viz Obrázek 18. Vzhledem k tomu, že tyto fragmenty jsou lineární, korelují velikosti bandů se žebříčkem.



**Obrázek 18:** Restrikční analýza ligačních produktů (ligace 2) pomocí enzymů *XhoI* a *NdeI*. Podmínky restrikce: 37°C, 1 hodina. Analýza restrikčních fragmentů pomocí gelové elektroforézy, podmínky separace: 1% agarosový gel v TAE, 100 V, 35 minut, aplikován 1  $\mu$ l žebříčku  $\lambda$ /PstI, 20  $\mu$ l každého vzorku (2A- E).

Vzorek 2A byl namnožen a odeslán na sekvenaci do firmy GenериBiotech. Z výsledků bylo zjištěno, že se v dané sekvenci nachází jedna mutace. V pozici 768 se místo guaninu nachází adenin. Jedná se ovšem o třetí pozici tripletu, přičemž oba tyto triplety kódují stejnou aminokyselinu.



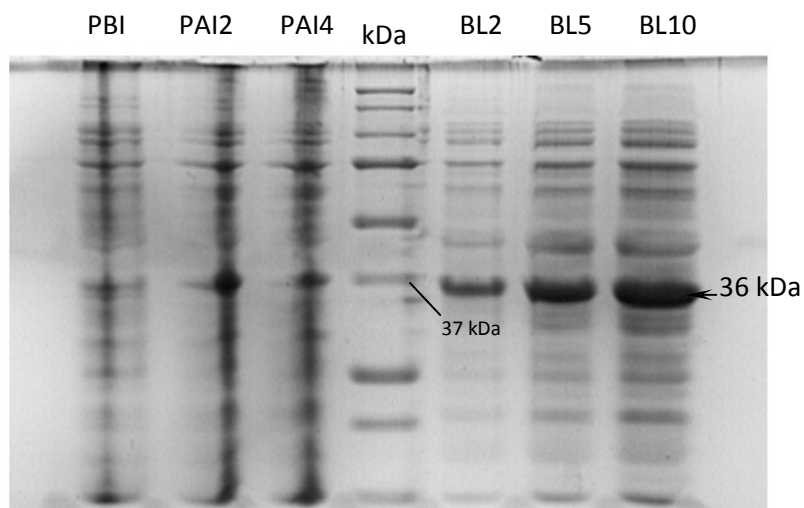
## 5.2 Exprese AKR1B1

Ligační produkt 2A, u něhož byla ověřena sekvence, byl transformován do expresních *E. coli* BL21 (DH3) dle 4.4.9.1. Nejprve bylo nutno zjistit, zda vůbec k expresi proteinu dochází. Proto byly bakterie namnoženy pouze ve 20 ml LB média s kanamycinem (50  $\mu$ g/ml). Pomocí 1 mM IPTG byla vyvolána exprese probíhající 4 hodiny. Poté byl připraven buněčný lyzát pomocí činidla BugBuster Protein Extraction Reagent (postup viz 4.4.9.2).

Během exprese byly odebrány vzorky, pro kontrolu úspěšnosti exprese. Jedná se o vzorky označené PBI (peleta před indukcí) a PAI (peleta po indukci), které byly na polyakrylamidový gel naneseny vedle sebe, aby bylo možné porovnat změnu

proteinového složení způsobenou zvýšenou expresí AKR1B1. Po indukci byly odebrány 2 vzorky, jeden po 2 hodinách exprese a druhý po 4 hodinách.

Buněčný lyzát (BL) slouží k ověření indukce exprese a velikosti proteinu produkovaného ve zvýšené míře pomocí SDS-PAGE. Nanesen byl do tří drah v množství 2  $\mu$ l, 5  $\mu$ l a 10  $\mu$ l. Výsledek analýzy, viz Obrázek 19.



**Obrázek 19: Ověření exprese proteinu AKR1B1. Analýza pomocí SDS-PAGE, podmínky separace: 4 % polyakrylamidový koncentrační gel, 100 V, 10 minut; 12,5 % polyakrylamidový koncentrační gel, 200 V, 40 minut. Kde: PBI- peleta před indukcí, PAI- peleta po indukci, BL- buněčný lyzát nanášen v různých množstvích (2- 10  $\mu$ l), kDa- žebříček Precision Plus Protein Standard All Blue.**

Tyto výsledky potvrzují, že byl ve zvýšené míře produkován protein o velikosti 36 kDa, což souhlasí s velikostí enzymu AKR1B1. Ten je tvořený z 316 aminokyselin, sekvence uvádí Obrázek 20.

```

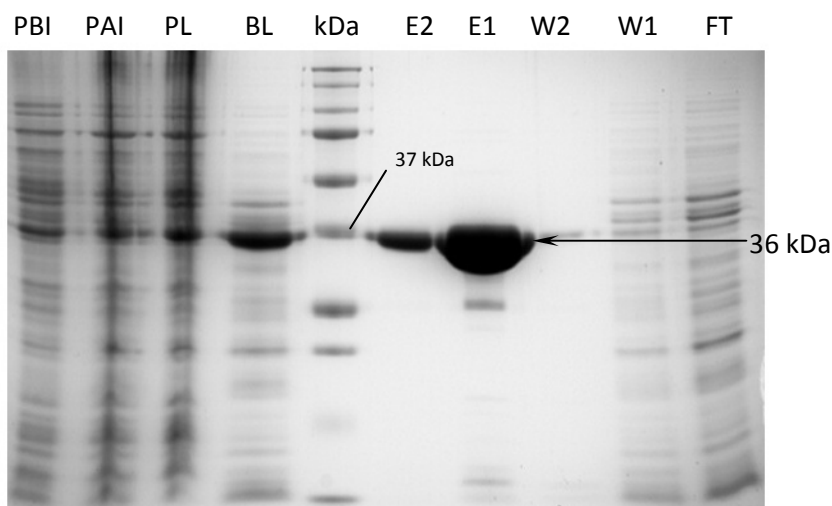
1 MASLLLLNNG AKMPILGLGT WKSPPGQVTE AVKVAIDVGY RHIDCAHVYQ NENEVGVAIQ
61 EKLREQVVKR EELFIVSKLW CTYHEKGLVK GACQKTLSDL KLDYLDLYLI HWPTGFKPGK
121 EFFPLDESGN VVPSDTNILD TWAAMEELVD EGLVKAIGIS NFNHLQVEMI LNKPGLKYKP
181 AVNQIECHPY LTQEKLIQYC QSKGIVVTAY SPLGSPDRPW AKPEDPSLLE DPRIKAIAAK
241 HNKTTAQVLI RFPMQRNLVV IPKSVTPERI AENFKVFDVE LSSQDMTTLI SYNRNWRVCA
301 LLSCTSHKDY PFHEEF

```

**Obrázek 20: Sekvence aminokyselin proteinu AKR1B1 (Kolektiv autorů, 2006b).**

### 5.3 Purifikace proteinu AKR1B1

Posledním krokem této práce bylo získat dostatečné množství čistého rekombinantního proteinu v nativní formě. Proto byla provedena exprese ve velké kultuře, 250 ml LB média (4.4.9.3). Exprimovaný protein bylo nutno izolovat od ostatních bílkovin buňky. Byla zvolena metoda na principu afinitní chromatografie využívající šesti histidinů na konci bílkoviny, produkované na podkladě genetické informace vložené do vektoru pET-28b. K purifikaci byl použit kit Ni-NTA Fast Start. Jednotlivé frakce včetně eluce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE, Obrázek 21.



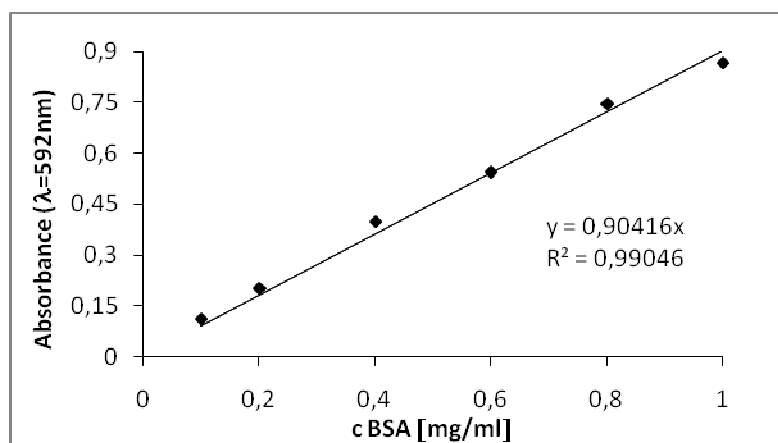
**Obrázek 21:** Purifikace proteinu AKR1B1 kitem Ni-NTA Fast Start. Analýza pomocí SDS-PAGE, podmínky separace: 4 % polyakrylamidový koncentrační gel, 100 V, 10 minut; 12,5 % polyakrylamidový koncentrační gel, 200 V, 40 minut. Kde: PBI- peleta před indukcí, PAI- peleta po indukci, PL- peleta po lýze buněk, BL- buněčný lyzát, E- eluce, W- promytí, FT- supernatant ochuzený o protein zachycený na koloně, kDa- žebříček Precision Plus Protein Standard All Blue.

V dráze PBI je nanášena peleta z kontrolního vzorku odebraného před indukcí, v dráze PAI je kontrola odebraná po expresi. Peleta zbývající po lýze bakterií je v dráze označené PL a vzorek odebraný ze supernatantu po této lýze, který je tvořen buněčným lyzátem, označen BL. Proces purifikace kontrolován odebíranými frakcemi. První eluce E1 je tvořena značným množstvím téměř čistého proteinu AKR1B1 zakonzentrovaného v 1 ml. Přesto i v druhé eluci E2 se nachází ještě

významné množství rekombinantního proteinu. V případě pelet byly připravovány nanášené vzorky z 2  $\mu$ l, na vzorky z jednotlivých frakcí bylo použito 10  $\mu$ l.

Čistý protein AKR1B1 byl rozpuštěn v elučním pufru. Tento pufr obsahuje imidazol, který může snižovat aktivitu enzymu. Proto byla provedena výměna roztoku, ve kterém byl protein rozpuštěn, za fosfátový pufr. Byla k tomu použita kolonka Amicon Ultra-4 s celulosou membránou Ultracel- 10, postup viz 4.4.13. Takto byly zpracovány obě eluce (E1 a E2).

U získaného enzymu byla změřena koncentrace metodou dle Bradfordové (viz 4.4.12). Ze získané kalibrační křivky (Obrázek 22) byla zjištěna koncentrace proteinů u obou vzorků.



**Obrázek 22:** Stanovení koncentrace bílkoviny dle Bradfordové- kalibrační křivka. Závislost absorbance na koncentraci standardu BSA.

Nakonec byl protein uložen do 85 % glycerolu 1:1. Tak byl získán enzym AKR1B1 ve dvou koncentracích: 1,25 mg/ml odpovídající první eluci a 0,4 mg/ml získaný druhou elucí.



## 6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo připravit rekombinantní enzym aldosareduktasu s využitím technik molekulární biologie a zároveň zavést metodu přípravy rekombinantních proteinů na této katedře, což se také podařilo.

Nejprve byla získána cDNA AKR1B1, z níž byl pomocí metody PCR a vhodně navržených primerů získán DNA fragment, tvořený kódovou sekvencí pro AKR1B1 ohraničenou rozpoznávacími místy pro restriční endonukleasy *XhoI* a *NdeI*. Při PCR vznikaly kromě požadovaného fragmentu i další nespecifické fragmenty. Proto byl z PCR produktu izolován fragment odpovídající délky, s využitím gelové elektroforézy na ultra-čisté agarose. U něj byla provedena dvojitá restrikce již zmíněnými endonukleasami. Stejně tak byl natráven i klonovací vektor pET-28b(+). Plasmid a insert byly spojeny ligační reakcí za vzniku rekombinantní plasmidové DNA, která byla množena v *E. coli* HB101. Ověřovací sekvenací byla zjištěna jedna mutace nemající vliv na kódovanou aminokyselinu.

K expresi proteinu byly použity buňky *E. coli* BL21(DH3). Exprimovaný protein byl izolován a purifikován metodou založenou na afinitní chromatografii. Poté byl převeden do fosfátového pufru a uskladněn do glycerolu 85% 1:1. Tímto byl enzym připraven k dalším experimentům, které by měly být zaměřeny především na studium potenciálních substrátů z oblasti xenobiotik.

## 7 POUŽITÉ ZKRATKY

AGE	produkty pozdní glykace
AKR	aldo-ketoreduktasa
bp	páry bází
BSA	bovinní sérový albumin
CBR	karbonylreduktasa
CDS	kódová sekvence
cDNA	copy DNA
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
ddNTP	dideoxyribonukleotidtrifosfát
EC	Enzyme Comission codes, číselný klasifikační systém pro enzymy
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
f.e.	for elektroferesis, pro elektroforézu
GABA	$\gamma$ -aminomáselné kyseliny
GST	glutathiontransferasa
HCl	chlorovodíková kyselina
HSD	hydroxysteroiddehydrogenasa
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
kDa	kilodalton
LB medium	Luria- Bertani medium
MCS	Multiple cloning site, mnohočetné klonovací místo
MGC	Mammalian Gene Collection, savčí genová kolekce
MgCl <sub>2</sub>	chlorid hořečnatý
NaCl	chlorid sodný
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotidfosfát
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs

NF $\kappa$ B	Nukleární faktor kappa B
Ni-NTA	nikl-nitritotrioctová kyselina
NNK	4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanon
p.a.	per analysis, pro analýzu
PCR	Polymerase Chain Reaction, polymerasová řetězová reakce
rpm	otáčky za minutu
RNasa A	ribonukleasa A
RE	restrikční endonukleasa
SDR	Short-chain Dehydrogenase/Reductase, dehydrogenasa/reduktasa s krátkým řetězcem
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza
TE	tris- EDTA
TAE	tris- acetát- EDTA
TBE	tris- borát- EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethan
ÚMP	Ústav molekulární patologie
zřed.	zředěný

aminokyselina			aminokyselina		
Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparagová kys.	Asp	D	Fenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamová kys.	Glu	E	Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptofan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

## 8 LITERATURA

Anonymous. (2008). *QIAEX II Handbook*. Hilden: QIAGEN.

Anonymous. (2006). *QIAexpress Ni-NTA Fast Start Handbook*. Hilden: QIAGEN.

Anonymous. (2005). *QIAGEN Plasmid Purification Handbook*. Hilden: QIAGEN.

*apps.who.int*. (2011). Získáno 5. květen 2011, z World Health Organization:  
<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/h1807e/p35b.gif>

Baba, S. P., Wetzelberger, K., Hoetker, J. D., & Bhatnagar, A. (2009). Posttranslational glutathionylation of aldose reductase (AKR1B1): A possible mechanism of protein recovery from S-nitrosylation. *Chemico-Biological Interactions*, 178, 250-258.

Balendiran, G. K., Martin, H. J., El-Hawari, Y., & Maser, E. (2009). Cancer biomarker AKR1B10 and carbonyl metabolism. *Chemico-Biological Interactions*, 178, 134-137.

Barski, O. A., Tipparaju, S. M., & Bhatnagar, A. (2008). The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metabolism Reviews*, 40, 553-624.

Bio-Rad. (2011). *Precision Plus Protein Prestained Standards*. Získáno 28. duben 2011, z <http://www.bio-rad.com/prd/en/US/adirect/biorad?cmd=BRCatgProductDetail&productID=241601>

Brown, T. A. (2007). *Klonování genů a analýza DNA*. (M. Fellner, Překl.) Olomouc: Univerzita Palackého.

DonabelSDSU.bot. (2009). *PDB 1hdc EBI.jpg*. Získáno 10. květen 2011, z Wikipedia:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/File:PDB\\_1hdc\\_EBI.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:PDB_1hdc_EBI.jpg)

Endo, S., Matsunaga, T., Mamiya, H., et al. (2009). Kinetic studies of AKR1B10, human aldose reductase- like protein: Endogenous substrates and inhibition by steroids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 487, 1-9.

Fvasconcellos. (2009). *Aldose reductase 1us0.png*. Získáno 28. Duben 2011, z Wikipedia:

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/ce/Aldose\\_reductase\\_1us0.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/ce/Aldose_reductase_1us0.png)

Gallego, O., Ruiz, F. X., Ardévol, A., et al. (2007). Structural basis for the high all-trans-retinaldehyde reductase activity of the tumor marker AKR1B10. *PNAS* , 104, 20764-20769.

GeneriBiotech. (2009). *Sekvenace*. Získáno 13. duben 2011, z <http://www.generi-biotech.com/sekvenace-na-zakazku/>

Genome. (2011). *Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW* . Získáno 18. březem 2011, z <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>

Geospitza. (2010). *FinchTV*. Získáno 11. březem 2011, z <http://www.geospitza.com/Products/finchtv.shtml>

Grabicová, L. (2007). *Sulfiddehydrogenasy bakterie Acidithiobacillus ferrooxidans*. Brno: Masarykova Univerzita v Brně.

Hers, H. G. (1960). Aldose reductase. *Biochim Biophys Acta* , 37, 120-126.

Hoffmann, F., & Maser, E. (2007). Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metabolism Reviews* , 39, 87-144.

Huang, S. P., Palla, S., Ruzycski, P., et al. (2010). Aldo-Keto Reductases in the Eye. *Journal of Ophthalmology* , doi:10.1155/2010/521204.

Chang, Q., Harter, T. M., Rikimaru, L. T., & Petrash, J. M. (2003). Aldo-keto reductases as modulators of stress response. *Chemico-Biological Interactions* , 143-144, 325-332.

Jáč, P. (2009). Využití elektromigračních metod v analýze proteinů. *Přednáška z Vybrané separační metody* . Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v HK, UK v Praze.

Jez, J. M., Bennet, M. T., Schlegel, B. P., et al. (1997). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. J.* , 326, 625-636.

Kolektiv autorů. (2006a). *Homo sapiens aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase), mRNA (cDNA clone MGC:1804 IMAGE:3357652), complete cds*. Získáno 5. květen 2011, z NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BC000260?report=GenBank>

Kolektiv autorů. (2006b). *Aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase) [Homo sapiens]*. Získáno 5. květen 2011, z NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/12652999>

Lyon, R. C., Johnston, S. M., Watson, D. G., et al. (2007). Synthesis and catabolism of gamma-hydroxybutyrate in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: role of the aldo-keto reductase AKR7A2. *The Journal of Biological Chemistry* , 282, 25986-25992.

NEB. (2011). *2-Log DNA Ladder (0.1–10.0 kb)*. Získáno 5. duben 2011, z New England Biolabs Inc.: <http://www.neb.com/nebecomm/products/productN3200.asp>

Oppermann, U. C., & Maser, E. (2000). Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicology* , 144, 71-81.

Oppermann, U. (2007). Carbonyl reductases: The complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone- reducing enzymes and their role in physiology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* , 47, 293-322.

Penning, T. M., & Drury, J. E. (2007). Human aldo- keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* , 464, 241- 250.

Petrash, J. M. (2004). All in the family: Aldose reductase and closely related aldo- keto reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences* , 61, 737-749.

Plebuch, M., Soldan, M., Hungerer, C., et al. (2007). Increased resistance of tumor cells to daunorubicin after transfection of cDNAs coding for anthracycline inactivating enzymes. *Cancer Letters* , 255, 49-56.

Ramana, K. V., Friedrich, B., Srivasta, S., et al. (2004). Activation of nuklear faktor-kappaB by hyperglykemia in vascular smooth muscle cells is regulated by aldose reductase. *Diabetes* , 53, 2910-2920.

Rumlová, M., Pačes, V., & Ruml, T. (2003). *Základní metody genového inženýrství*. Praha: JPM Tisk s.r.o.

Shen, Y., Zhong, L., Johnson, S., & Cao, D. (2011). Human aldo-keto reductases 1B1 and 1B10: A comparative study on their enzyme activity toward electrophilic carbonyl compounds. *Chemico-Biological Interaction* , doi:10.1016/j.cbi.2011.02.004.

Yang, B., Hodgkinson, A., Oates, P. J., et al. (2008). High glucose induction of DNA-binding activity of the transcription factor NFkappaB in patients with diabetic nephropathy. *Biochimica at Biophysica Acta* , 1782, 295-302.

Yikrazuul. (2009). *Polyol pathway*. Získáno 5. květen 2011, z Wikimedia commons: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/99/Polyol\\_pathway.svg/620px-Polyol\\_pathway.svg.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/99/Polyol_pathway.svg/620px-Polyol_pathway.svg.png)