

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Biofyzikální chemie



Kateřina Koláčková

Studium interakcí ASK1 kinasy s thioredoxinem

Study of interaction between ASK1 kinase and thioredoxin

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením mého školitele doc. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D. a všechny použité informační zdroje a literaturu jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Kateřina Koláčková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za jeho cenné rady a ochotu při vedení této práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D., Mgr. Daliboru Koškovi a ostatním členům laboratoře za jejich podporu a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Zvláštní poděkování patří doc. RNDr. Miroslavu Štěpánkovi, Ph.D. za odborné rady a velkou vstřícnost při měření dynamického rozptylu světla a zpracování dat. Na závěr bych chtěla poděkovat svým rodičům za jejich bezvýhradnou podporu v průběhu celého mého studia.

Abstrakt

MAP kinasová signalizační kaskáda hraje důležitou roli při vzniku buněčných odpovědí na různé stresové podněty z vnějšího prostředí. Tato signalizační kaskáda je třístupňová: MAP kinasy kinasy kinasy (MAP3K) fosforylací aktivují MAP kinasy kinasy (MAP2K) a ty následně fosforylují a tím aktivují MAP kinasy (MAPK), čímž regulují spoustu buněčných funkcí jako je apoptosa, buněčné dělení či morfogenese. Jednou z důležitých MAP3K je proteinkinasa ASK1 (z angl. apoptosis signal-regulating kinase 1), která je důležitým regulátorem imunitních a stresových buněčných odpovědí. Vzhledem k tomu, že zvýšená aktivita ASK1 souvisí s rozvojem závažných onemocnění, jako jsou např. rakovina, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění, je ASK1 zajímavým cílem ve farmacii při vývoji nových léčiv. Lidská ASK1 sestává z 1374 aminokyselin a dělí se na tři domény: centrální Ser/Thr katalytickou doménu a dvě coiled-coil domény, z nichž první se nachází na N- a druhá na C-konci molekuly této proteinkinasy. ASK1 je regulována pomocí svých vazebných partnerů, mezi které patří také malý celulární redoxní protein thioredoxin (Trx-1), který se váže na N-terminální část ASK1. Trx-1 je silným antioxidantem a chrání tak buňky před toxickými podněty z okolí. Mechanismus regulace aktivity ASK1 pomocí Trx-1 je jedním z nejvíce studovaných a přestože ještě není zcela vyřešen, zdá se, že probíhá díky redoxním reakcím probíhajícím na Trx-1. Interakce s ASK1 je schopný pouze redukovaný Trx-1, při jeho oxidaci dochází k disociaci.

Cílem této práce bylo: (i) příprava Trx-1 a čtyř různě dlouhých fragmentů N-terminální části ASK1; (ii) základní biofyzikální charakterizace připravených proteinů; a (iii) studium interakcí mezi fragmenty ASK1 a Trx-1 kvůli upřesnění polohy vazebného místa pro Trx-1. Výsledky ukázaly, že pouze dva ze čtyř připravených fragmentů ASK1 jsou rozpustné (sekvence 46-302 a 88-302). Dále bylo zjištěno, že oba tyto fragmenty interagují s Trx-1 v redukčních podmínkách se stejnou vazebnou afinitou. Závěrem lze říci, že vazebné místo pro Trx-1 v molekule ASK1 se nachází v oblasti 88-302 a že tato oblast vytváří doménu, kterou lze samostatně připravit a použít jako model pro studium interakcí mezi ASK1 a Trx-1.

Abstract

MAP kinase signaling cascade plays an important role in the cellular response to various stress stimuli from the external environment. This signaling cascade is divided into three levels: MAP kinase kinase kinases (MAP3K) phosphorylate and thus activate MAP kinase kinases (MAP2K) and those subsequently phosphorylate and thus activate MAP kinase (MAPK) pathway, which regulates many cellular functions such as apoptosis, cell differentiation and morphogenesis. One of the important MAP3K is protein kinase ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1), which is an important regulator of cellular immune and stress responses. Given that the increased activity of ASK1 is related to the development of serious diseases such as cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases, ASK1 is an interesting target in the pharmacy in the development of new drugs. Human ASK1 consists of 1374 amino acids and is divided into three domains: a central Ser/Thr catalytic domain and two coiled-coil domains, of which the first is located at the N- and the second at the C-terminus of the molecule of this protein kinase. ASK1 is regulated by its binding partners, which include a small cellular redox protein thioredoxin (Trx-1), which binds to the N-terminal part of ASK1. Trx-1 is a potent antioxidant and so it protects cells against toxic stimuli from the environment. The mechanism of the regulation of ASK1 activity using Trx-1 is one of the most studied, and although it is not completely solved, it appears that it is related to the redox reactions which take place within the Trx-1 molecule. Interaction with ASK1 is possible only while Trx-1 is reduced, its oxidized form dissociates from ASK1 molecule immediately.

Aim of this study was following: (i) preparation of Trx-1 and four fragments of N-terminal part of ASK1 with different lengths; (ii) basic biophysical characterization of prepared proteins; and (iii) the study of the interactions between fragments of ASK1 and Trx-1 to specify the position of the binding site for Trx-1. Results showed that only two of the four prepared fragments of ASK1 are soluble (sequences 46-302 and 88-302). Furthermore, it was found out that both fragments interact with Trx-1 under reducing conditions with the same binding affinity. At the end it can be said that the binding site for Trx-1 in ASK1 molecule is located within the sequence of 88-302 and that this area creates a domain that can be separately prepared and used as a model for study of the interactions between ASK1 and Trx-1.

(In Czech)

Seznam použitých zkratk

β Me	β -merkaptoethanol
Amp	ampicilin
APS	persulfát amonný
ASK1	z angl. apoptosis signal-regulating kinase 1
ASK1 ⁴⁶⁻³⁰²	N-terminální fragment ASK1, sekvence aminokyselin 46-302
ASK1 ⁴⁶⁻³²²	N-terminální fragment ASK1, sekvence aminokyselin 46-322
ASK1 ⁸⁸⁻³⁰²	N-terminální fragment ASK1, sekvence aminokyselin 88-302
ASK1 ⁸⁸⁻³²²	N-terminální fragment ASK1, sekvence aminokyselin 88-322
ATP	adenosintrifosfát
AUC	analytická ultracentrifugace
BamHI	restrikční endonukleasa
BL21 (DE3)	kmen bakterií <i>E. coli</i>
CCC	C-terminální coiled-coil doména ASK1
c(s)	distribuce sedimentačního koeficientu
Cys	cystein
Cys ³²	cystein na pozici 32 v molekule Trx-1
Cys ³⁵	cystein na pozici 35 v molekule Trx-1
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytosintrifosfát
DH5 α	kmen bakterií <i>E. coli</i>
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DLS	dynamický rozptyl světla (z angl. dynamic light scattering)
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
dNTPs	směs deoxyribonukleotidtrifosfátů
dsDNA	dvouvláknová DNA (z angl. double-stranded DNA)
DTT	1,4- dithiothreitol
dTTP	deoxythymidintrifosfát
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	z angl. epidermal growth factor
ERK	z angl. extracellular signal-regulated kinase
GB-1	B1 doména proteinu G ze Streptokoků

Gly	glycin
GPC	gelová permeační chromatografie
HAE	horizontální agarosová elektroforesa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
JNK	c-Jun N-terminální kinasy
Kan	kanamycin
LB	Luria-Bertani
Lys	lysin
MAPK	mitogeny aktivovaná proteinkinasa
MAP kaskády	mitogeny aktivované proteinkinasové kaskády
MAP2K	mitogeny aktivovaná proteinkinasa kinasa
MAP3K	mitogeny aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa
M _w	relativní molekulová hmotnost
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
NCC	N-terminální coiled-coil doména ASK1
NotI	restrikční endonukleasa
ot./min	otáčky za minutu
PAGE	elektroforesa v polyakrylamidovém gelu
PDGF	z angl. platelet-derived growth factor
pQE-30	komerčně dostupný plasmid
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
Pro	prolin
pRSFDuet-1	komerčně dostupný plasmid
pSer	fosforylovaný serin
pThr	fosforylovaný threonin
ROS	reaktivní kyslíkové formy (z angl. reactive oxygen species)
RTG	rentgenový
S	sedimentační koeficient
SDS	dodecylsulfát sodný
Ser	serin
Ser ⁹⁶⁷	serin na pozici 967 v molekule ASK1

ssDNA	jednovláknová DNA (z angl. single-stranded DNA)
TBE	tris-borátový pufr
TEMED	N,N,N',N'-tetraethylendiamin
Thr	threonin
Thr ⁸³⁸	threonin na pozici 838 v molekule ASK1
TNF- α	z angl. tumor necrosis factor α
TRAF2, TRAF6	z angl. tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 resp. 6
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	tryptofan
Trx-1	lidská forma thioredoxinu
Trx-S ₂	oxidovaná forma Trx-1
Trx(SH) ₂	redukována forma Trx-1
Tyr	tyrosin
U	unit (jednotka katalytické aktivity)
USP9X	z angl. ubiquitin-specific peptidase 9, X-linked
UV	ultrafialový
%(w/v)	hmotnostní procenta

Obsah

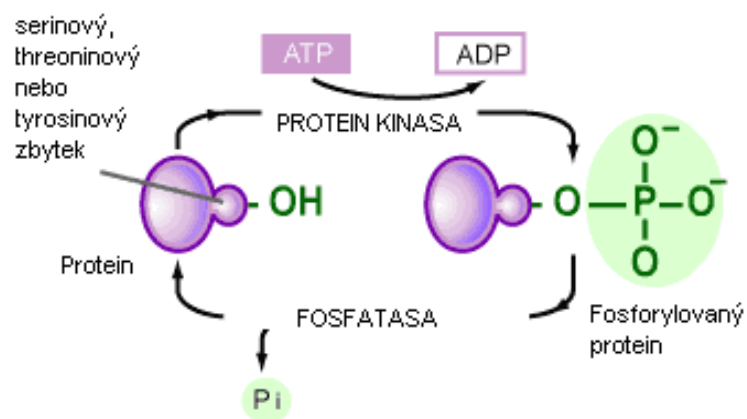
Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Seznam použitých zkratk.....	6
1. Přehled literatury.....	11
1.1 Fosforylace.....	11
1.2 MAP kinasové signalizační kaskády	12
1.2.1 ERK MAP kinasa	13
1.2.2 MAPkinasy p38 a JNK.....	14
1.3 ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1)	14
1.3.1 Aktivace ASK1.....	15
1.3.2 Vazební partneři ASK1	17
2. Cíle práce	20
3. Použitý materiál a metody.....	21
3.1 Použitý materiál	21
3.1.1 3.1.2. Chemikálie.....	21
3.1.2 Přístroje a vybavení	22
3.1.3 Ostatní materiál	23
3.2 Metodika práce.....	24
3.2.1 Příprava expresních konstruktů fragmentů N-terminální části ASK1 kinasy ASK1 ⁴⁶⁻³⁰² a ASK ¹⁸⁸⁻³⁰²	24
3.2.2 Exprese a purifikace čtyř různých sekvencí N-terminální části proteinu ASK1 kinasy (ASK1 ⁴⁶⁻³⁰² , ASK1 ⁸⁸⁻³⁰² , ASK1 ⁴⁶⁻³²² a ASK1 ⁸⁸⁻³²²)	34
3.2.3 Exprese a purifikace thioredoxinu (Trx-1).....	41
3.2.4 Biofyzikální charakterizace připravených fragmentů N-terminální části ASK1.....	43

3.2.5	Ověření interakcí mezi připravenými fragmenty N-terminální části ASK1 kinasy a thioredoxinem v redukčních podmínkách.....	46
4.	Výsledky	49
4.1	Příprava expresních konstruktů různých fragmentů N-terminální části ASK1 kinasy.....	49
4.2	Purifikace čtyř fragmentů N-terminální části ASK1, ASK1 ⁴⁶⁻³⁰² , ASK1 ⁸⁸⁻³⁰² , ASK1 ⁴⁶⁻³²² a ASK1 ⁸⁸⁻³²²	50
4.2.1	Niklová chelatační chromatografie.....	51
4.2.2	Gelová permeační chromatografie	53
4.3	Purifikace Trx-1	57
4.3.1	Niklová chelatační chromatografie.....	58
4.3.2	Gelová permeační chromatografie	58
4.4	Biofyzikální charakterizace ASK146-302 a ASK188-302	59
4.4.1	AUC c(s) distribuce	59
4.4.2	Dynamický rozptyl světla.....	61
4.5	Ověření interakcí mezi fragmenty N-terminální části ASK1 ASK46-302 a ASK188-302 a Trx-1	62
4.5.1	Nativní elektroforesa	62
4.5.2	Analytická ultracentrifugace	64
5.	Diskuze.....	67
6.	Závěr	70
	Příloha 1.....	74
	Příloha 2.....	77

1. Přehled literatury

1.1 Fosforylace

Fosforylace (viz obr. 1.1) je jedním z nejběžnějších mechanismů používaných při regulaci proteinové aktivity. Dochází při ní k adici fosfátových skupin na hydroxylové skupiny serinových, threoninových či tyrosinových zbytků. Fosforylace je katalyzována proteinkinasami, defosforylace pak fosfatasami. Protichůdná aktivita proteinkinas a fosfatas zajišťuje buňce „spínač“, který může sepnout či vypnout funkce mnoha proteinů. Fosforylace mění proteinový náboj a obecně vede ke konformačním změnám v molekule proteinu. Tyto fosforylační efekty mohou výrazně pozměnit vazbu ligandu na protein či jiné vlastnosti proteinu vedoucí ke zvýšení či snížení jeho aktivity. Různé proteinkinasy a fosfatasy jsou specifickými katalyzátory fosforylace/defosforylace různých cílových proteinů a mohou tak regulovat celou řadu buněčných signálních drah. Často dochází k fosforylaci jiné proteinkinasy, než která reakci katalyzuje, a tím dochází k vytvoření kinasové kaskády, která zesiluje buněčný signál a zlepšuje jeho buněčnou kontrolu [1].



Obr. 1.1: Schéma fosforylace a defosforylace proteinu. Adicí fosfátových skupin z donoru adenosin trifosfátu (ATP) dochází k fosforylaci postranních řetězců aminokyselin serinu (Ser), threoninu (Thr) či tyrosinu (Tyr). Tato reakce je katalyzována proteinkinasami. Opačným procesem je pak defosforylace, při které enzymy fosfatasy katalyzují odštěpení fosfátové skupiny z proteinu a vznik ATP. Upraveno dle [2].

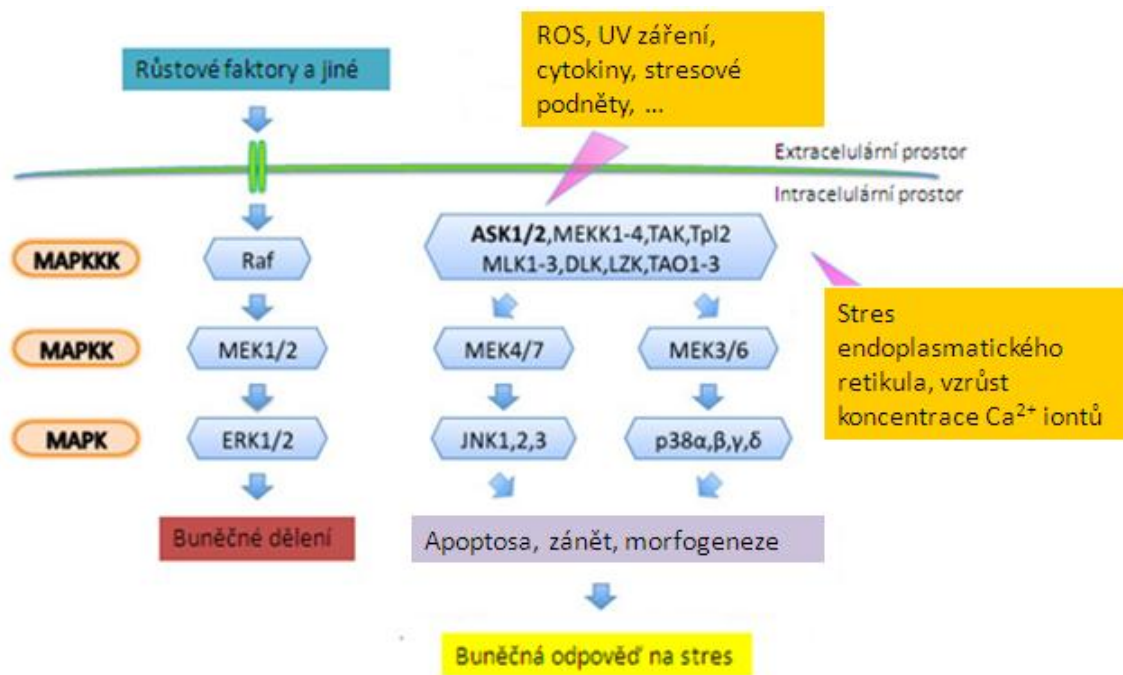
1.2 MAP kinasové signalizační kaskády

Vzhledem k tomu, že jsou všechny organismy neustále vystavovány mnoha nebezpečným podnětům z vnějšího okolí, je pro ně důležité na tyto situace patřičně odpovídat a udržovat si stálost vnitřního prostředí, protože při jejím narušení může dojít ke vzniku mnoha život ohrožujících onemocnění [3]. V buňkách eukaryot se nachází mnoho signalizačních drah, které na stresové situace odpovídají a pomáhají tak k adaptaci organismu na změny vnějšího prostředí.

Takovými signalizačními drahami jsou i mitogeny aktivované proteinkinasové (MAP) kaskády, což jsou multifunkční signalizační dráhy, které jsou evolučně konzervované ve všech eukaryotických buňkách [4, 5]. MAP kinasové signalizační kaskády patří mezi nejvíce studované signalizační systémy přenášející podněty z extracelulárního prostoru do buněčného jádra [6]. Vzhledem k tomu, že ovlivňují regulaci transkripce a translace, jsou velmi důležité při mnoha buněčných procesech [5, 7]. Regulují zásadní buněčné funkce, které jsou nutné pro udržení homeostasy, tedy především expresi cytokinů a proteas, správný postup v buněčném cyklu, buněčnou adhesi, pohyblivost a její metabolismus [8].

U savců byly doposud charakterizovány tři hlavní MAP kinasové kaskády vedoucí k MAP kinasám ERK (z angl. extracellular signal-regulated kinase), c-Jun N-terminálním kinasám (JNK) a p38 MAP kinasám [9]. Všechny tyto signalizační dráhy sestávají ze tří tříd serinových/treoninových (Ser/Thr) kinas- MAP kinas kinas kinas (MAP3K), MAP kinas kinas (MAP2K) a již zmíněných MAP kinas (MAPK). MAP3K fosforylují a tím aktivují MAP2K, které následně fosforylují a tím aktivují MAPK [6, 7, 8, 9, 10, 11].

Signalizační kaskáda vedoucí k MAP kinasám ERK je aktivována různými cytokiny a růstovými faktory a je důležitá při buněčném růstu a dělení. Naproti tomu jsou signalizační kaskády vedoucí k MAP kinasám JNK a p38 spouštěny především chemickými a fyzikálními stresory jako jsou UV a RTG záření, teplotní a osmotický šok a protizánětlivé cytokiny, např. TNF- α (z angl. tumor necrosis factor α). Tyto kaskády pak ovlivňují buněčnou adaptaci na stresové podněty, buněčnou smrt či přežití [6]. Schéma MAP kinasových signalizačních kaskád je zobrazeno na obr. 1.2 na str. 13.



Obr. 1.2: Schéma signální MAP kinasové kaskády. Vnější signály, jako jsou ROS, UV záření, teplotní šok a další stresové podněty aktivují MAP3K, které následně fosforylují a aktivují MAP2K. Ty pak fosforylují a aktivují MAPK, kterými jsou např. JNK, p38 a ERK. Jejich aktivací dochází k buněčné apoptose, zánětlivému bujení či morfogenesi, tedy k buněčným odpovědím na stresové podněty. Upraveno dle [12].

1.2.1 ERK MAP kinasa

Signalizační kaskáda vedoucí k ERK MAP kinase se účastní kontroly buněčného růstu a dělení způsobených mitogeny, růstovými faktory a cytokiny [6]. Zdá se, že také reaktivní kyslíkové formy ROS (z angl. reactive oxygen species) jsou zapojeny do aktivace ERK signální kaskády skrz růstové faktory. Bylo zjištěno, že receptory epidermálního růstového faktoru EGF (z angl. epidermal growth factor) a růstového faktoru odvozeného z krevních destiček PDGF (z angl. platelet-derived growth factor) jsou podrobeny fosforylaci, jako odpovědi na podněty oxidačního stresu, kterými jsou např. H_2O_2 a UV záření. Zásah do těchto fosforylací molekulární mutagenesí omezuje aktivaci ERK MAP kinas. Existuje domněnka, že ROS jsou vytvářeny v buňkách, které jsou stimulovány výše zmíněnými růstovými faktory EGF a PDGF a tedy, že aktivace signální kaskády pomocí ROS je konsistentní s pozorováním, že pouze málo ROS je mitogenních [13].

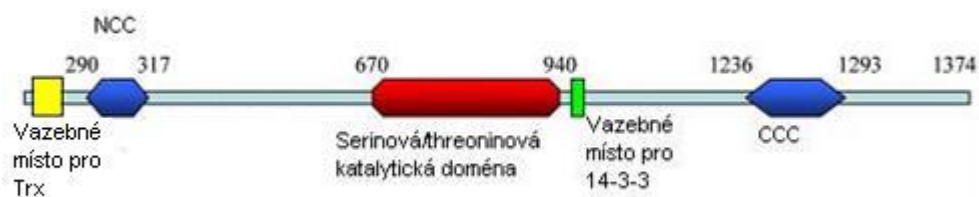
1.2.2 MAPkinasy p38 a JNK

Signalizační dráhy vedoucí k aktivaci p38 a JNK MAP kinas kontrolují adaptaci buňky na stresové podněty, buněčnou smrt, ale také její přežití. Tyto MAP kinasy jsou aktivovány především chemickými a fyzikálními faktory, jako jsou UV a RTG záření, teplotní a osmotický šok a prozánětlivé cytokiny, tedy např. TNF- α a interleukin-1 [5]. Tyto cytotoxické podněty často zaměřují nadměrný vznik ROS. Zdá se tedy, že aktivace p38 a JNK MAP kinas je alespoň z části zprostředkována právě skrz ROS. Vzhledem k tomu, že každá MAP kinasa ovlivňuje široké spektrum biologických procesů, je možné, že jsou MAP kinasové kaskády zásadními regulátory buněčných odpovědí způsobených ROS [13]. Přestože je přesný mechanismus aktivace těchto MAP kinas stále neznámý, můžeme s jistotou říct, že se na něm podílí jedna z MAP kinas kinas kinas ASK1 kinasa (z angl. apoptosis signal-regulating kinase 1), která při své aktivaci dále fosforyluje MAP kinasy kinasy, konkrétně MAP2K4/MAP2K7 vedoucí k aktivaci JNK MAP kinasy a MAP2K3/MAP2K6 vedoucí k aktivaci p38 MAP kinasy [10].

1.3 ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1)

ASK1 nebo také MAP3K5 je jednou z výše zmíněných MAP kinas kinas kinas, které fosforylací aktivují MAP2K4/MAP2K7-JNK a MAP2K3/MAP2K6-p38 signalizační kaskády vedoucí k buněčným odpovědím na stresové podněty či apoptosu. Lidská ASK1 kinasa je polypeptid, který se skládá z 1374 aminokyselin [10] a jeho molekulová hmotnost je 170 kDa [14].

ASK1 sestává ze Ser/Thr katalytické domény ve své středové části a dvěma coiled-coil doménami, které se nacházejí jak na N- (N-terminální coiled-coil doména, NCC), tak na C- konci (C-terminální coiled-coil doména, CCC) molekuly ASK1 [15], jak je zobrazeno na obr. 1.3 na str. 15. Struktura celé molekuly ASK1 dosud nebyla vyřešena. Známa je pouze krystalová struktura katalytické domény, která byla získána v komplexu se stautosporinem [16].



Obr. 1.3: Doménová struktura ASK1. Obě koncové coiled-coil domény jsou zobrazeny modře, středová katalytická doména je vyobrazena červeně a za ní následuje motiv pro vazbu proteinů 14-3-3. Predikované vazebné místo pro Trx-1 se nachází u N-terminální domény a je označeno žlutě. Upraveno dle [16].

1.3.1 Aktivace ASK1

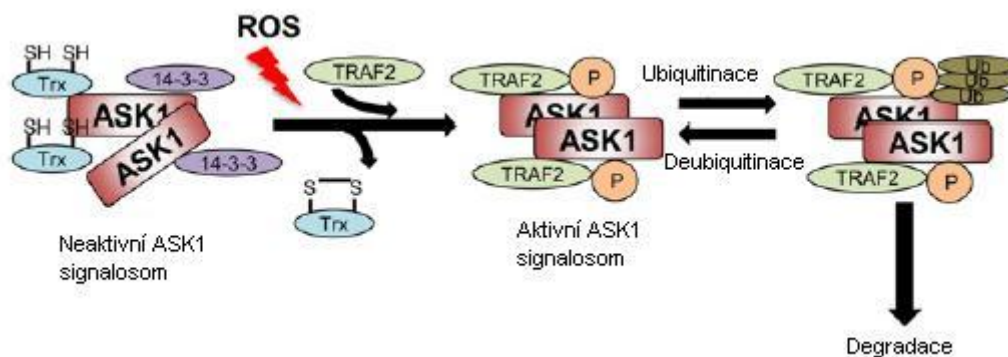
Aktivita ASK1 je spojována s mnoha závažnými onemocněními, kterými jsou neurodegenerativní nemoci (Alzheimerova, Parkinsonova choroba), rakovina a také onemocnění kardiovaskulárního systému [9]. Pochopení mechanismů vedoucích k aktivaci ASK1 je tedy velice důležité.

K aktivaci ASK1 dochází, stejně jako u dalších MAP3K (viz kapitola 1.2, str. 12), pomocí různých podnětů, kterými jsou např. oxidační stres, zvýšení vnitrobuněčné koncentrace Ca^{2+} iontů, stres endoplasmatického retikula [3], chemické a fyzikální podněty jako jsou UV či RTG záření, lipopolysacharidy či $\text{TNF-}\alpha$ [5]. Aktivací ASK1 dochází k fosforylaci MAP2K4/MAP2K7-JNK a MAP2K3/MAP2K6-p38 signalizačních drah, což vede k buněčným odpovědím, jakými jsou apoptosa [10, 17], sekrece cytokinů a buněčné dělení [3]. Jedním z nejstudovanějších mechanismů aktivace ASK1 je však její aktivace autofosforylací v závislosti na přítomnosti ROS [18].

Kinasová aktivita lidské ASK1 je aktivována autofosforylací threoninu Thr^{838} , který se nachází v aktivační smyčce katalytické domény. Tento aktivační flexibilní motiv je konzervovaný mezi živočišnými druhy a jeho fosforylace reguluje kinasovou aktivitu nejen ASK1, ale také dalších proteinkinas [19].

Endogenní ASK1 vytváří vysokomolekulární komplex (1500-2000 kDa) zvaný ASK1 signalosom. Základní konfigurace a aktivita tohoto útvaru vychází z homooligomerizace ASK1 skrz CCC doménu. V tomto signalosomu se kromě oligomerů ASK1 nacházejí také další molekuly, např. vazebný partner ASK1, thioredoxin (Trx-1) [20]. V takovém uspořádání je ASK1 signalosom neaktivní, což indikuje, že homooligomerizace ASK1 skrz CCC doménu je sice důležitá, ale nedostatečná pro aktivaci

ASK1. K aktivaci je tedy zapotřebí impulsu v podobě ROS stimulace, která vede k disociaci Trx-1 interagujícímu s N-terminální částí ASK1. ASK1 v signalosomu poté oligomerizuje také skrz svou NCC doménu, což umocňuje interakci mezi katalytickými doménami jednotlivých molekul ASK1. To následně umožní autofosforylaci Thr⁸³⁸ a tím i aktivaci ASK1 [13]. ASK1 signalosom stimulovaný pomocí ROS vytváří komplex o ještě větší molekulové hmotnosti než jakou má komplex neaktivní [20], což vede k závěru, že k aktivaci ASK1 signalosomu jsou nutné ještě i další faktory. Těmi jsou tzv. TRAF2 a TRAF6 (z angl. tumor necrosis factor receptor-associated factor), které doplňují ASK1 signalosom a pomáhají při jeho aktivaci [21]. Pravděpodobný mechanismus takové aktivace ASK1 signalosomu je zobrazen na obr. 1.4.



Obr. 1.4: Pravděpodobný mechanismus aktivace ASK1 signalosomu. V neaktivním stavu je ASK1 homo-oligomerizována skrz svou CCC doménu a na N-terminální části ASK1 je navázán Trx-1. Po stimulaci pomocí ROS dochází k disociaci Trx-1 z ASK1 a na jeho vazebné místo nasedají TRAF2/6, čímž dojde k aktivaci ASK1 signalosomu. Pokud je komplex následně ubiquitinován, dochází k jeho degradaci. Upraveno dle [15].

Kromě fosforylace existují ještě další regulační mechanismy aktivace ASK1. Za zmínku stojí ubiquitinace. Bylo zjištěno, že interakce ASK1 s proteinem Roquin-2, která je vyvolaná oxidací ASK1 peroxidem vodíku, vede k ubiquitinaci ASK1 a její následné degradaci [22]. Tato ubiquitinace je katalyzována enzymem USP9X (z angl. ubiquitin-specific peptidase 9, X-linked) [23]. Regulace ASK1 ubiquitinací je, na rozdíl od regulace fosforylací, relativně pomalá a ireversibilní. Je tedy možné, že samotné buňky si volí mechanismus regulace v závislosti na stresových či buněčných podnětech [3].

1.3.2 Vazební partneři ASK1

Schopnost interakce ASK1 s různými vazebními partnery je důležitou součástí regulace její aktivity. Mezi její významné interakční partnery patří proteiny 14-3-3 a taky již zmíněný protein Trx-1, jejichž vazba s ASK1 má zásadní vliv na regulaci této proteinkinasy a ovlivňuje tak spoustu buněčných procesů důležitých při odpovědích na stresové a toxické podněty.

1.3.2.1 Proteiny 14-3-3 a jejich vliv na regulaci ASK1

Proteiny 14-3-3 jsou kyselé vysoce konzervované bílkoviny, které jsou exprimovány ve všech eukaryotických buňkách. Hrají důležitou roli při regulaci mnoha buněčných procesů skrz interakce s mnoha strukturně i funkčně rozmanitými vazebními partnery. Proteiny 14-3-3 se specificky vážou na sekvence obsahující fosfoserin nebo fosfothreonin (pSer nebo pThr), čímž zásadně ovlivňují regulaci přenosu buněčného signálu, kontrolu buněčného cyklu, metabolismu a apoptosy [24].

Bylo zjištěno, že ASK1 specificky interaguje s proteiny 14-3-3 skrz Ser⁹⁶⁷, který se nachází v její Ser/Thr katalytické doméně. Toto vazebné místo je evolučně konzervované a lze tedy říci, že je zásadní pro regulaci katalytické aktivity ASK1. Interakce mezi ASK1 a proteiny 14-3-3 vyžaduje, jako většina asociací, při kterých figurují proteiny 14-3-3, fosforylaci, v tomto případě Ser⁹⁶⁷ v molekule ASK1 [25]. Detailní mechanismus regulace ASK1 pomocí interakce s proteiny 14-3-3 nebyl sice doposud vyřešen, nicméně ze známých poznatků je zřejmé, že fosforylace Ser⁹⁶⁷ je pro tuto regulaci zcela zásadní. Zdá se, že v buňkách, které jsou v klidovém stavu, je ASK1 vysoce fosforylována kinasou specifickou pro fosforylaci Ser⁹⁶⁷ a tím pádem interaguje s proteiny 14-3-3. Pokud však dojde k stimulaci ASK1 pomocí ROS, dojde k aktivaci fosfatasy specifické pro defosforylaci Ser⁹⁶⁷, což má za následek defosforylaci ASK1, disociaci proteinů 14-3-3 a následnou stimulaci katalytické aktivity ASK1 [26].

1.3.2.2 Thioredoxin

Savčí thioredoxiny jsou skupina malých proteinů o molekulové hmotnosti přibližně 12 kDa, jež podléhají NADPH-dependentní redukci díky enzymu thioredoxin-reduktase a na oplátku redukují cysteinové skupiny jiných proteinů.

Jedním z nejstudovanějších thioredoxinů je lidský Trx-1, který sestává ze 104 aminokyselin. Tento protein se nachází jednak v extracelulárním prostoru, kde je jeho funkce spjatá s buněčným růstem a chemotaxí, v cytoplasmě, kde působí jako antioxidant a

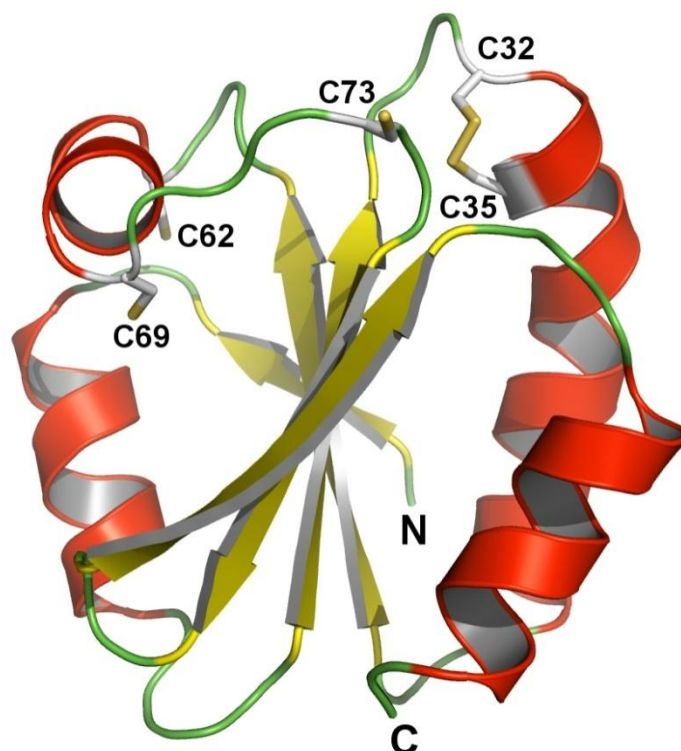
redukční kofaktor a také v buněčném jádře, kde reguluje aktivitu transkripčního faktoru [27] při jeho vazbě na DNA [28].

Trx-1 je známý tím, že ovlivňuje redoxní stav proteinů, jejichž aktivní místo je tvořeno dvěma redoxně aktivními cysteiny [29]. Bylo zjištěno, že Trx-1 je silným antioxidantem, protože dokáže redukovat aktivní kyslíkové formy ROS a chrání tak buňky před toxickým peroxidem vodíku a TNF- α . Na druhou stranu se však zdá, že ROS dokáží Trx-1 oxidovat, což by mohlo znamenat, že Trx-1 je zároveň jejich molekulárním cílem [28].

Aktivita Trx-1 je již dlouho spojována se vznikem mnoha závažných onemocnění, včetně rakoviny. Tento protein byl nalezen v nádorech, kde byl zapojen do agresivního růstu zhoubných buněk. Je tedy cílem mnoha studií zabývajících se vývojem nových léčiv, které by jednou mohly omezovat jeho aktivitu a tím by pomohly zabránit vzniku nádorového bujení. [27].

Struktura Trx-1

Struktura Trx-1 je charakterizována tzv. thioredoxinovým sbalením, tedy 3D strukturou, která je velice podobná u všech thioredoxinů [30]. Struktura Trx-1 se skládá z centrálního jádra pěti β -vláken, které jsou obklopeny čtyřmi α -helixy s evolučně konzervovaným aktivním místem se sekvencí Trp-Cys³²-Gly-Pro-Cys³⁵-Lys [31]. Tato sekvence se nachází na konci β -vlákna (β 2) a na začátku dlouhého α -helixu [32]. Dva cysteinové zbytky (Cys³² a Cys³⁵) v tomto redoxním centru poskytují sulfhydrylové skupiny, které se účastní redukční činnosti tohoto proteinu. Thioredoxin je znám ve dvou formách. Oxidovaná forma (Trx-S₂) obsahuje v aktivním centru disulfidický můstek, který je redukován pomocí NADPH a flavoproteinu Trx-reduktasy na dithiol. Redukovaná forma (Trx-(SH)₂) se chová jako silná disulfidická oxido-reduktasa [28]. Rozdíl ve struktuře oxidované (viz obr. 1.5 na str. 19) a redukované formy je relativně malý, zahrnuje konformační změnu v a okolo redoxně aktivního disulfidu tvořeného Cys³² a Cys³⁵ s několika konformačními mezistavy redukované formy [30].



Obr. 1.5: Struktura oxidované formy Trx-1. Na obrázku je vyobrazena sekundární struktura oxidované formy Trx-1, tedy pět β -vláken obklopených čtyřmi α -helixy. Vyznačeny jsou všechny cysteiny nacházející se ve struktuře Trx-1. Mezi cysteiny 32 a 35 je zobrazen disulfidický můstek. Obrázek byl vytvořen pomocí program PyMol 0.99 [33].

Mechanismus interakce Trx-1s ASK1 kinasou

Trx-1 je přímým inhibítorem ASK1 kinasou [28]. Vyvolává ubiquitinaci a degradaci ASK1, čímž brání vzniku apoptosy navozené díky aktivaci proteinkinasou ASK1 a zároveň inhibuje její kinasovou aktivitu [14]. Trx-1 interaguje s N-terminální částí ASK1 a bylo zjištěno, že pravděpodobným vazebným místem pro Trx-1 v molekule ASK1 je oblast aminokyselin 46-277 [18]. Interakce mezi těmito dvěma proteiny je závislá na redoxním stavu Trx-1, protože byla pozorována pouze v redukčních podmínkách [28]. Oxidovaná, ani redoxně inaktivní forma Trx-1 s ASK1 neinteraguje [14].

Disociací Trx-1 z ASK1 kinasou dochází k aktivaci ASK1, což vyvolává homo-oligomerizaci a následnou autofosforylaci této proteinkinasou na Thr⁸³⁸. Mechanismus této regulace je zobrazen na obr. 1.4 na str. 16.

2. Cíle práce

1. Připravit různé fragmenty N-terminální části lidské ASK1 kinasy s cílem upřesnit pozici vazebného místa pro Trx-1:
 - Připravit konstrukty pro expresi ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰² v buňkách *E. coli* pomocí plasmidu pRSFDuet-1
 - Exprimovat a vypurifikovat ASK1⁴⁶⁻³⁰², ASK1⁸⁸⁻³⁰², ASK1⁴⁶⁻³²² a ASK1⁸⁸⁻³²² jako fusní proteiny s N-terminální histidinovou kotvou a GB-1 proteinem
2. Připravit lidský Trx-1:
 - Exprimovat a vypurifikovat Trx-1 (mutant C⁷³S) jako fusní protein s N-terminální histidinovou kotvou
3. Provést biofyzikální charakterizaci připravených fragmentů N-terminální části ASK1 pomocí analytické ultracentrifugace a dynamického rozptylu světla
4. Ověřit interakce mezi připravenými fragmenty N-terminální části ASK1 kinasy a Trx-1 v redukčních podmínkách pomocí analytické ultracentrifugace a nativní elektroforesy

3. Použitý materiál a metody

3.1 Použitý materiál

3.1.1 3.1.2. Chemikálie

1,4- dithiothreitol (DTT)- Carl Roth GmbH, Německo

β -merkptoethanol (β -Me)- Sigma-Aldrich, USA

agarosa GTQ- Carl Roth GmbH, Německo

akrylamid- Carl Roth GmbH, Německo

ampicilin- Sigma-Aldrich, USA

azid sodný- Sigma-Aldrich, USA

bacto trypton (pepton)- Carl Roth GmbH, Německo

bacto yeast extract (kvasničný extrakt)- Carl Roth GmbH, Německo

bis-akrylamid- Carl Roth GmbH, Německo

bromfenolová modř- New England BioLabs, USA

Coomassie Brilliant Blue R 250- LKB Bromma, Švédsko

dihydrát ethylendiamintetraoctanu disodného ($\text{Na}_2\text{-EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)- LACH-NER, s.r.o., ČR

dodecylsírán sodný (SDS)- Carl Roth GmbH, Německo

ethanol- Penta- Ing. Petr Švec, ČR

fenylmethylsufonylfluorid (PMSF)- Carl Roth GmbH, Německo

Gel Red- New England BioLabs, USA

Gene Ruler 1 kB DNA ladder- Fermentas, Kanada

glycerol- Penta- Ing. Petr Švec, ČR

glycin- Carl Roth GmbH, Německo

guanidin hydrochlorid- Genomed, Německo

hexahydrát síranu nikelnatého- Penta- Ing. Petr Švec, ČR

hydroxid sodný- Genomed, Německo

chlorid draselný- Penta- Ing. Petr Švec, ČR

chlorid hořečnatý- LACH-NER, s.r.o., ČR

chlorid sodný- Carl Roth GmbH, Německo

imidazol- Carl Roth GmbH, Německo

isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)- EMD Biosciences, Inc., Německo

isopropylalkohol- Genomed, Německo

kanamycin- Sigma-Aldrich, USA

kyselina boritá- LACH-NER, s.r.o., ČR
kyselina chlorovodíková- Penta- Ing. Petr Švec, ČR
kyselina octová- Penta- Ing. Petr Švec, ČR
Loading Dye- New England BioLabs, USA
Luria-Bertani (LB) agar- Carl Roth GmbH, Německo
lysozym- SERVA Electrophoresis GmbH, Německo
methanol- Penta- Ing. Petr Švec, ČR
mix deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTPs)- Thermo Scientific, USA
N,N,N',N'-tetraethylendiamin (TEMED)- Carl Roth GmbH, Německo
PCR Master Mix (MM PCR)- Thermo Scientific, USA
persulfát amonný (APS)- Sigma-Aldrich, USA
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard- Bio-Rad Laboratories, USA
pufr HF pro Phusion High-Fidelity polymerasu- New England BioLabs, USA
pufr pro BamHI- Fermentas, Kanada
pufr pro T4 DNA ligasu- Fermentas, Kanada
tetraethylendiamin- Carl Roth GmbH, Německo
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)- Carl Roth GmbH, Německo
trypton- Carl Roth GmbH, Německo

3.1.2 Přístroje a vybavení

3505 pH Meter- Nova Capital Ltd., Velká Británie
automatické pipety- Eppendorf AG, Německo
centrifuga 5804R- Eppendorf, Německo
centrifuga Hermle Z323K- Hermle Labortechnik GmbH, Německo
centrifuga Sigma 8K- Sigma Laborzentrifugen, Německo
dialyzační membrána, typ 27/32 - Carl Roth GmbH, Německo
elektrický vařič- Eta, ČR
horizontální elektroforesa RELSMIDI, Gentaur GmbH, Německo
HPLC-AKTA- Amersham Biosciences, Švédsko
iluminátor UVT-14M, Herolab GmbH, Německo
kolona pro niklovou chelatační chromatografii- Bio-Rad Laboratories, USA
kolona Superdex 75 10/300- GE Healthcare, USA
kolona Superdex 200 Hiload 10/600- Amersham Biosciences, Švédsko

kolona Superdex 200 Hiload 26/60- Amersham Biosciences, Švédsko
koncentrátory Amicon Ultra (cut off 10000)- EMD Millipore, USA
křemenná kvjeta- Agilent Technologies, Inc., USA
laboratorní váhy HF-200g- And, USA
nanofotometr P-Class- Implen GmbH, Německo
nylonové membránové filtry 0,45 μm - GE Healthcare, USA
orbitální inkubátor Gallenkamp Orbital Incubator- Gemini BV, Holandsko
orbitální inkubátor Multitron- Infors AG (Švýcarsko)
peristaltická pumpa- IDEX Health&Science SA, Švýcarsko
ProteomLab™ XL-I analytická ultracentrifuga- Beckman Coulter, USA
Sonicator 3000- Misonix, Inc., USA
spektrofotometr Agilent 8453- Agilent Technologies, Inc., USA
stříkačky- Chirana T. Injecta, a.s., Slovenská republika
termoblok- Grant, UK
termocykler Mastercycler Personal- Eppendorf, Německo
termostat BT120M, Laboratorní přístroje, ČR
vertikální elektroforesa- Bio-Rad Laboratories, USA
vodní lázeň- Memmert GmbH, Německo
vortex RX³- VELP Scientifica, Itálie
zdroj napětí pro elektroforesu- Bio-Rad Laboratories, USA
zařízení pro měření rozptylu světla- ALV 5000 GmbH, Německo

3.1.3 Ostatní materiál

BamHI- Fermentas, Kanada
DNA oligonukleotidy- Generi Biotech s.r.o., ČR
Escherichia coli, kmen BL21(DE3)- Stratagene, USA
Escherichia coli, kmen Top 10 (DH5 α)- Stratagene, USA
GeneJet Gel Extraction kit- Thermo Scientific, USA
Gene Jet PCR Purification kit- Thermo Scientific, USA
GeneJet Plasmid Miniprep kit- Thermo Scientific, USA
Chelating Sepharose Fast Flow- GE Healthcare, USA
laboratorní sklo- Simax, ČR
mikrozkumavky- Eppendorf, Německo

Phusion High- Fidelity polymerasa- New England BioLabs, USA
plasmid pRSFDuet-1- dar od dr. Evžena Bouří, ÚOCHB, AV ČR v.v.i.
NotI- Fermentas, Kanada
T4 DNA ligasa- Fermentas, Kanada

3.2 Metodika práce

3.2.1 Příprava expresních konstruktů fragmentů N-terminální části ASK1 kinasy ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK¹⁸⁸⁻³⁰²

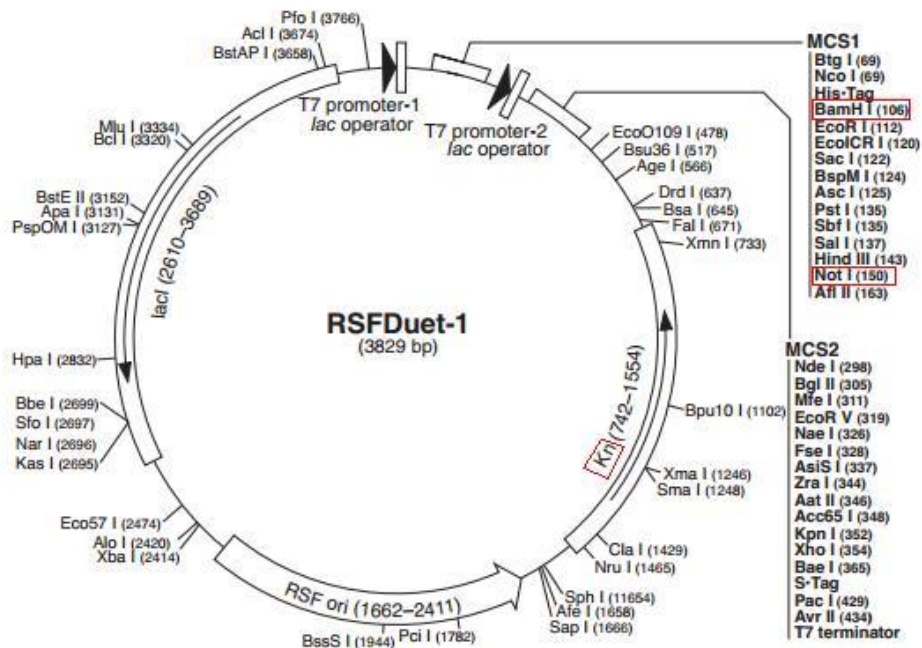
3.2.1.1 Plasmidy

Plasmidy jsou kruhové dvouvláknové molekuly DNA (dsDNA), které jsou schopné samostatné replikace. Jejich výhodou je, že mohou obsahovat genetickou informaci, která bakteriím, které takovéto molekuly přijmou, může poskytnout např. resistenci vůči určitému antibiotiku. Taková získaná genetická informace je pak užitečná při následné expresi.

K práci byl použit plasmid pRSFDuet-1 (viz obr. 3.1, str. 25) resistantní vůči antibiotiku kanamycinu (Kan), který umožňuje expresi rekombinantních proteinů jako fusních proteinů s motivem šesti histidinů v řadě, tzv. histidinové kotvy a na ní navázaném GB-1 proteinu (B1 doména proteinu G ze Streptokoků) na N-konci. Tato skutečnost pomáhá k lepší rozpustnosti výsledného fusního proteinu a zároveň k jeho snadnější izolaci, protože umožňuje použití niklové chelatační chromatografie (viz kapitola 3.2.2.3, str. 35) jako prvního purifikačního kroku. Plasmid pRSFDuet-1 má také výhodu v tom, že obsahuje místa pro restriční endonukleasy NotI a BamHI, které jsou vhodné pro vnesení genetické informace kódující fragmenty N-terminální části ASK1, ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK⁸⁸⁻³⁰². Tato restriční místa mají následující sekvenci:

NotI: 5'-gcggccgc-3'

BamHI: 5'-ggatcc-3'



Obr. 3.1: Mapa plasmidu *pRSFDuet-1*. Motiv pro antibiotikum kanamycin a restrikční místa pro endonukleazy *NotI* a *BamHI* jsou označena v červených rámečcích. Převzato a upraveno dle [34].

3.2.1.2 Příprava média dle Luria-Bertaniho (LB média)

LB agar (8 g), viz tab. 3.1, str. 26, byl rozpuštěn ve 200 ml destilované vody v uzavíratelné skleněné lahvi. Roztok byl sterilizován v autoklávu (15 min, 120 kPa, 121 °C), ochlazen a uchováván při teplotě 4 °C.

3.2.1.3 Příprava LB agarových misek

LB agar (8 g), viz tab. 3.1, str. 26, byl rozpuštěn ve 200 ml destilované vody v uzavíratelné skleněné lahvi. Roztok byl sterilizován v autoklávu (15 min, 120 kPa, 121 °C) a ochlazen. Následně do něj byl přidán roztok Kan tak, aby byla jeho konečná koncentrace 30 µg/ml. Roztok byl promíchán a nalit do Petriho misek (cca 20 ml roztoku na jednu Petriho misku).

Tab. 3.1: Složení LB agaru, doplněno destilovanou vodou na objem 200 ml.

Látka	Množství
trypton	2 g
kvasničný extrakt	1 g
NaCl	2 g
agar	3 g

3.2.1.4 Transformace bakterií

Transformace je horizontální přenos genetické informace z plasmidu do kompetentních bakteriálních buněk a provádí se tzv. teplotním šokem („heat shock“), při kterém jsou buňky nejprve inkubovány v ledu a následně jsou zahřívány ve vodní lázni o teplotě 42 °C po dobu 45 s. V tomto kroku dochází k vnesení plasmidové DNA do buněk. Nakonec jsou bakteriální buňky ochlazeny díky inkubaci v ledu po dobu 1 minuty.

K rozmraženým kompetentním bakteriálním buňkám *E. coli DH5α* bylo přidáno 0,5 µl plasmidové DNA (pRSFDuet-1) a tato směs byla inkubována po dobu 15 minut při teplotě 0 °C. Směs byla vložena do vodní lázně o teplotě 42 °C a inkubována po dobu 45 s a následně při teplotě 0 °C po dobu 1 minuty. Ke směsi byl přidán roztok LB média, které neobsahovalo antibiotikum, a tato směs byla inkubována v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 45 minut. Směs byla centrifugována při 3000 ot./min po dobu 2 minut. Supernatant byl odebrán tak, aby jej v mikrozkuhavce asi 50 µl zůstalo a v tomto objemu byla resuspendována vzniklá peleta kompetentních buněk. Bakteriální kultura byla asepticky nanesena na LB agarovou Petriho misku obsahující Kan o konečné koncentraci 30 µg/ml. Petriho miska byla poté inkubována při 37 °C po dobu cca 16 hodin v termostatu.

Po inkubaci byly vybrány vždy 2 bakteriální kolonie ke kultivaci a ty byly přeneseny do zkumavek obsahujících 5 ml tekutého LB média s obsahem Kan o konečné koncentraci 30 µg/ml. Tyto miniprepy byly inkubovány při teplotě 37 °C v orbitálním inkubátoru (200 ot./min) přibližně 16 hodin.

3.2.1.5 Isolace plasmidové DNA

Pro izolaci plasmidu z bakterií *E. coli DH5α* byla použita komerčně dostupná sada GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, USA) a bylo postupováno podle návodu uvedeného výrobcem.

Nejprve byly buňky centrifugovány v mikrozkmavkách (1 min, 13000 ot./min), supernatant byl odebrán, ke vzniklé buněčné peletě bylo přidáno 250 μ l resuspendačního pufru a tato směs byla promíchána. Ke směsi bylo dále přidáno 250 μ l lyzačního pufru a 350 μ l neutralizačního pufru. Směs byla lehce promíchána a centrifugována při 13000 ot./min po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant byl následně nanesen na kolonu s filtrem, která byla umístěna do rezervoáru (kolona i rezervoár byli součástí sady). Poté byl tento supernatant na koloně opět centrifugován, tentokrát při 13000 ot./min po dobu 1 minuty. Roztok, který protekl přes filtr na koloně, byl odstraněn a kolona byla vrácena zpět do rezervoáru. Následně bylo do kolony nanášeno 500 μ l promývacího pufru a kolona byla opět centrifugována při 13000 ot./min po dobu 1 minuty. Při stejných podmínkách došlo k další centrifugaci za účelem odstranění zbytků promývacího pufru z kolony. Kolona byla vložena do mikrozkmavky a bylo na ni přeneseno 50 μ l elučního pufru. Tato směs byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 1 minuty a poté 1 minutu centrifugována při 13000 ot./min. V tomto kroku tedy došlo k eluci požadované plasmidové DNA z kolony společně s elučním pufrem.

Složení resuspendačního, lyzačního, promývacího a neutralizačního pufru výrobce neuvádí. Eluční pufr je složen z 10 mM Tris-HCl (pH 8,5).

3.2.1.6 PCR

Polymerasová řetězová reakce, PCR (z angl. polymerase chain reaction), je enzymy řízená reakce, při které dochází k namnožení (amplifikaci) určitého úseku DNA. Jedná se tedy o replikaci *in vitro*. Pro PCR reakci je potřeba mít matricovou DNA obsahující sekvenci pro amplifikaci, oligoribonukleotidy (tzv. primery) určující počátek a konec amplifikované sekvence, DNA polymerasu syntetizující dceřiné vlákno podle matricové DNA, všechny čtyři deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTPs)- dATP, dGTP, dCTP, dTTP, ze kterých polymerasa syntetizuje nové komplementární dceřiné vlákno, pufr zajišťující vhodné reakční prostředí a sterilní vodu.

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

podmínkách schopny nasednout na komplementární úsek matricové DNA. Na jejich 3'-konce pak DNA polymerasa připojuje již zmíněné dNTPs.

PCR se provádí ve třech opakujících se krocích. V prvním kroku je teplota nastavena na 94-98 °C a dochází při něm k separaci dvou vláken dsDNA. Ve druhém kroku se teplota sníží na 45-65°C a dochází k nasednutí (annealingu) primerů na komplementární úsek matricové, teď už jen jednovláknové, ssDNA. Ve třetím kroku se teplota zvýší na 70-74 °C a dochází k prodlužování (elongaci) řetězce. Tyto tři kroky se opakují ve většině případů 20-30x a díky tomu dochází k syntéze požadovaného množství DNA. Konečný PCR produkt pak obsahuje obrovské množství požadované sekvence DNA, protože amplifikace roste geometrickou řadou.

PCR byla použita k namnožení sekvence kódující fragmenty N-terminální části ASK1 kinasy ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰². Sekvence oligoribonukleotidů byla navržena Mgr. Daliborem Koškem a byla následující:

- pro sekvenci kódující ASK1⁴⁶⁻³⁰² s následnou ligací do plasmidu pRSFDuet-1 měly oligoribonukleotidy sekvenci:

ASK146forwBamHIGB

5'-ca tat gga tcc ctg cca ccg ccg ccg ccg-3'

ASK1 302revNotI

5'-c gta ggc ggc cgc cta tcg ctg ccg aat tct tgc-3'

- pro sekvenci kódující ASK1⁸⁸⁻³⁰² s následnou ligací do pRSFDuet-1 měly oligoribonukleotidy sekvenci:

ASK188forwBamHIGB

5'-ca tat gga tcc agc cga cgg acc acg gtg-3'

ASK1 302revNotI

5'-c gta ggc ggc cgc cta tcg ctg ccg aat tct tgc-3'

PCR reakce byla provedena pomocí Phusion High-Fidelity DNA polymerasy (New England BioLabs, USA) (2,00 U/ml) v termocykleru Mastercycler Personal (Eppendorf, Německo).

Složení PCR reakčních směsí jsou uvedeny v tabulkách 3.2 a 3.3 na str. 29.

Tab. 3.2: Složení PCR reakční směsi pro DNA kódující ASK1⁴⁶⁻³⁰² v objemu 50 μ l.

Látka	Objem
sterilní H ₂ O	28,4 μ l
reakční HF pufr	10 μ l
matricová DNA (gen kódující ASK1)	0,1 μ l
dNTPs	1 μ l
primer ASK146frowBamHIGB (0,1 mM)	5 μ l
primer ASK1302revNotI (0,1 mM)	5 μ l
HF DNA polymerasa (2 U/ml)	0,5 μ l

Tab. 3.3: Složení PCR reakční směsi pro DNA kódující ASK1⁸⁸⁻³⁰² v objemu 50 μ l.

Látka	Objem
sterilní H ₂ O	28,4 μ l
reakční HF pufr	10 μ l
matricová DNA (gen kódující ASK1)	0,1 μ l
dNTPs	1 μ l
primer ASK188frowBamHIGB (0,1 mM)	5 μ l
primer ASK1302revNotI (0,1 mM)	5 μ l
HF DNA polymerasa (2 U/ml)	0,5 μ l

Složení reakčního HF pufru výrobce neuvádí.

U obou reakčních směsí byl program pro PCR nastaven následovně:

1. 95 °C, 2 min
2. 1. fáze: 95 °C, 30 s
3. 2. fáze: 55 °C, 30 s
4. 3. fáze: 72 °C, 2 min
5. 72 °C, 10 min
6. 4 °C, do vyjmutí PCR produktu z termocykleru

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

3.2.1.7 Horizontální agarosová elektroforesa

Horizontální agarosová elektroforesa (HAE) je elektromigrační separační metoda, u které dělení molekul závisí na jejich odlišné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém

poli. DNA má záporný náboj a putuje od katody k anodě v závislosti na své velikosti. Menší molekuly v agarosovém gelu migrují rychleji než molekuly velké.

Příprava gelu pro HAE byla následující: do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 0,6 g agarosy, k ní bylo přidáno 60 ml 1x koncentrovaného TBE pufru (viz tab. 3.4) a tato směs byla zvážena na laboratorních vahách. Směs byla povařena v mikrovlnné troubě, dokud se agarosa dokonale nerozpustila, tedy po dobu cca 3 minut. Roztok byl následně znovu zvážen a doplněn destilovanou vodou na původní hmotnost. Nakonec bylo do roztoku přidáno 0,4 μ l fluorescenční sondy GelRed, která se váže na DNA a při ozařování UV světlem fluoreskuje. Směs byla nalita do vaničky určené pro HAE a nechala se cca 40 minut zatuhnout při laboratorní teplotě. Vanička se zatuhlým gelem se následně přenesla do nádoby s elektrodami naplněné 1x koncentrovaným TBE pufrem.

Při nanášení vzorků byl do první jamky nanesen standard obsahující směs fragmentů DNA o různých známých delkách, podle nichž se pak při vyhodnocování odečítala velikost kýžené DNA. Jako standard byl používán Gene Ruler 1 kB DNA Ladder (Fermentas, Kanada). Do dalších jamek byla nanášena reakční směs, jejíž složení je popsáno v tab. 3.5. HAE probíhala cca 45 minut při konstantním napětí 100 V a po dokončení byly z gelu odečteny migrační zóny na iluminátoru UVT-14 M (Herolab, Německo).

Tab. 3.4: Složení 1x koncentrovaného TBE pufru, pH 8

Látka	Konečná koncentrace
Tris-HCl	100 mM
kyselina boritá	90 mM
EDTA	1 mM

Tab. 3.5: Složení směsi pro HAE v objemu 13 μ l.

Látka	Objem
sterilní H ₂ O	7 μ l
PCR produkt	3 μ l
Loading Dye	3 μ l

3.2.1.8 Čištění PCR produktu

Pro získání čistého produktu PCR reakce byla použita komerčně dostupná sada GeneJet PCR Purification Kit (Thermo Scientific, USA) a bylo postupováno podle návodu uvedeného výrobcem. K 50 μl PCR produktu bylo přidáno 50 μl vazebného pufru, směs byla promíchána a převedena na kolonu s filtrem, která byla nasazena do rezervoáru. Směs byla následně centrifugována při 13000 ot./min po dobu 1 minuty. Supernatant byl odstraněn, na kolonu bylo nanášeno 700 μl promývacího pufru a směs byla opět centrifugována při 13000 ot./min po dobu 1 minuty. Po odstranění supernatantu byla kolona ještě jednou centrifugována při stejných podmínkách, aby došlo k úplnému odstranění roztoku promývacího pufru z filtru kolony. Ta byla následně vložena do mikrokumavky a bylo na ni přeneseno 50 μl elučního pufru. Směs byla po dobu 1 minuty inkubována při laboratorní teplotě a nakonec centrifugována 1 minutu při 13000 ot./min.

Složení vazebného a promývacího pufru výrobce neuvádí. Eluční pufr se skládá z 10 mM Tris-HCl (pH 8,5).

3.2.1.9 Štěpení DNA restrikčními endonukleasami

Přečištěný produkt PCR reakce, tedy namnožená DNA kódující ASK1⁴⁶⁻³⁰² resp. ASK1⁸⁸⁻³⁰², bylo třeba štěpit restrikčními enzymy tak, aby byla štěpná místa shodná s restrikčními místy plasmidové DNA.

Za účelem vnesení sekvence kódující ASK1⁴⁶⁻³⁰² resp. ASK1⁸⁸⁻³⁰² do plasmidu pRSFDuet-1 byly použity restrikční endonukleasy NotI a BamHI. Po přidavku restrikčních enzymů byla směs inkubována při 37 °C po dobu 1 hodiny v termostatu a poté bylo štěpení zkontrolováno pomocí HAE. Složení štěpicích směsí je popsáno v tab. 3.6 resp. 3.7 na str. 32.

Tab. 3.6: Složení štěpicí směsi plasmidu pRSFDuet-1 v objemu 12,2 μl .

Látka	Objem
sterilní H ₂ O	5 μl
plasmid pRSFDuet-1	5 μl
pufr pro BamHI (viz tab. 3.8, str. 32)	1,2 μl
NotI (10 U/ μl)	0,5 μl
BamHI (10 U/ μl)	0,5 μl

Tab. 3.7: Složení štěpící směsi DNA kódující ASK1⁴⁶⁻³⁰² resp. ASK1⁸⁸⁻³⁰² v objemu 12,2 μ l.

Látka	Objem
čistý PCR produkt (DNA kódující ASK1 ⁴⁶⁻³⁰² /ASK1 ⁸⁸⁻³⁰²)	10 μ l
pufr pro BamHI (viz tab. 3.8)	1,2 μ l
NotI (10 U/ μ l)	0,5 μ l
BamHI (10 U/ μ l)	0,5 μ l

Tab. 3.8: Složení pufru pro BamHI.

Látka	Konečná koncentrace
Tris-HCl (pH 8 při 37 °C)	10 mM
MgCl ₂	5 mM
KCl	100 mM
Triton X-100	0,02 % (w/v)
BSA	0,1 mg/ml

3.2.1.10 Separace DNA z agarosového gelu

Po štěpení plasmidů, DNA kódující rekombinantní fragmenty N-terminální části ASK1, ASK1⁴⁶⁻³⁰² resp. ASK1⁸⁸⁻³⁰² a následném zkontrolování výsledků pomocí HAE, byly DNA z gelu vyřezány a vloženy do mikrozkušavek. K odstanění agarosy byla použita komerčně dostupná sada GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, USA). Při extrakci bylo postupováno podle návodu uvedeného výrobcem. Nejprve bylo k agarose jejíž součástí byla i požadovaná DNA přidáno 100 μ l vazebného pufru na každých 100 mg agarosy. Tato směs byla inkubována při 55 °C ve vodní lázni a každé 3 minuty byla promíchávána, dokud se veškerá agarosa nerozpustila. Rozpuštěná směs byla nanášena na kolonu s filtrem, ta byla nasazena do rezervoáru a následovala centrifugace při 13000 ot./min po dobu 1 minuty. Supernatant byl odstraněn, na kolonu bylo nanášeno 100 μ l vazebného pufru a tato směs byla opět centrifugována při stejných podmínkách. Supernatant byl odstraněn a na kolonu bylo převedeno 700 μ l promývacího pufru a směs byla centrifugována po dobu 1 minuty při 13000 ot./min. Při stejných podmínkách byla provedena ještě jedna centrifugace pro odstranění zbytku promývacího pufru z filtru

kolony. Ta byla nakonec vložena do mikrozkušavky a bylo na ni nanášeno 50 µl elučního pufru a směs byla centrifugována po dobu 1 minuty při 13000 ot./min.

Složení vazebního a promývacího pufru výrobce neuvádí. Eluční pufr byl složen z 10 mM Tris-HCl (pH 8,5).

3.2.1.11 Ligace

Ligace slouží ke spojení molekuly štěpené plasmidové DNA se štěpenou DNA kódující rekombinantní protein. K tomu je potřeba DNA ligasa, což je enzym, který spojuje dva DNA fragmenty kovalentní vazbou. V tomto případě byla použita T4 DNA ligasa (Fermentas, Kanada), což je enzym získaný z buněk *E. coli*, které byly infikovány T4 fágem.

Tab. 3.9: Složení ligační směsi v objemu 10 µl.

Látka	Objem
Extrahovaná DNA kódující ASK1 ⁴⁶⁻³⁰² resp. ASK1 ⁸⁸⁻³⁰²	7 µl
T4 ligační pufr (viz tab. 3.10, str. 34)	2 µl
Extrahovaný plasmid pRSFDuet-1	0,5 µl
T4 DNA ligasa (5 U/ µl)	0,5 µl

Připravená ligační směs byla inkubována po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Mezitím byly na ledu rozmrazeny kompetentní buňky *E. coli DH5α*. Ligační směs byla přidána k rozmraženým buňkám a tato směs byla inkubována po dobu 10 minut při teplotě 0 °C. Po uplynutí této doby byl proveden teplotní šok, tzv. „heat shock“ ve vodní lázni při teplotě 42 °C po dobu 45 s a následně byla směs inkubována při teplotě 0 °C po dobu 1 minuty. K buněčné směsi byl přidán 1 ml LB média neobsahujícího antibiotikum a tato směs byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 45 minut v termostatu. Směs byla následně centrifugována při 4200 ot./min po dobu 2 minut. Část supernatantu byla po centrifugaci odstraněna tak, aby v mikrozkušavce zůstalo cca 50 µl tohoto supernatantu. Vzniklá peleta buněk byla v tomto objemu promíchána a asepticky nanášena na LB agarovou Petriho misku, která obsahovala Kan o koncentraci 30 µg/ml. LB agarová Petriho miska s nanášenou buněčnou kulturou byla inkubována v termostatu při teplotě 37 °C cca 16 hodin.

Tab. 3.10: Složení T4 ligučního pufru (pH 7,8 při 25 °C).

Látka	Konečná koncentrace
Tris-HCl	400 mM
MgCl ₂	100 mM
ATP	5 mM
DTT	100 mM

3.2.1.12 Sekvenační analýza

Poslední kontrolou správnosti vnesení sekvencí kódující fragmenty N-terminální části proteinu ASK1 kinasy ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰² do plasmidu pRSFDuet-1 byla sekvenační analýza kterou provedla Laboratoř sekvenace DNA, Viničná 7, Praha 2.

K následné práci byly použity ještě další dva fragmenty N-terminální části ASK1 kinasy ASK1⁴⁶⁻³²² a ASK1⁸⁸⁻³²², které byly připraveny Mgr. Daliborem Koškem.

3.2.2 Exprese a purifikace čtyř různých sekvencí N-terminální části proteinu ASK1 kinasy (ASK1⁴⁶⁻³⁰², ASK1⁸⁸⁻³⁰², ASK1⁴⁶⁻³²² a ASK1⁸⁸⁻³²²)

3.2.2.1 Exprese

Pro výrobu fragmentů N-terminální části proteinkinasy ASK1 byl zvolen expresní systém bakterie *E. coli BL21 (DE3)*, který je vhodný pro indukci exprese rekombinantního proteinu pomocí induktoru isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosidu (IPTG). IPTG je derivát galaktosy, který se do buněčné kultury přidává k indukci exprese rekombinantního proteinu. Po jeho přidavku se bakterie přestanou množit a dojde ke spuštění proteosyntesy rekombinantního proteinu.

Připravené rekombinantní DNA byly vneseny do kompetentních buněk *E. coli BL 21 (DE3)* pomocí transformace (viz kapitola 3.2.1.4, str. 26). Z vyrostlých bakteriálních kolonií a LB média byly další den připraveny miniprepy, které byly inkubovány v orbitálním inkubátoru při 200 ot./min a teplotě 37 °C po dobu cca 16 hodin (viz kapitola 3.2.1.4, str. 26). Následující den byly miniprepy převedeny do 1 l LB média (vždy 1 miniprep na 1 l LB média), do kterého byl dále přidán roztok Kan tak, aby jeho konečná koncentrace byla 30 µg/ml. Připravené bakteriální kultury byly inkubovány v orbitálním inkubátoru při 210 ot./min a teplotě 37 °C, dokud optická hustota směsi nedosahovala 0,5-0,7 cm⁻¹ při vlnové délce 600 nm. Při měření optické hustoty byl jako referenční roztok

používán roztok LB média s přidavkem Kan o výsledné koncentraci 30 µg/ml. Po dosažení žádané optické density byly bakteriální kultury ochlazeny na 25 °C a byl k nim přidán 1 ml 0,5 M roztoku induktoru IPTG (výsledná koncentrace 0,5 mM). Inkubace pokračovala v orbitálním inkubátoru při 210 ot./min a teplotě 25°C cca 18 hodin.

3.2.2.2 Sonikace

Bakteriální suspenze obsahující žádaný fusní protein byly po inkubaci centrifugovány při 3500 ot./min a teplotě 4 °C po dobu 15 minut. Supernatant byl odstraněn a vzniklé bakteriální pelety byly resuspendovány v lyzačním pufru (viz tab. 3.11) v poměru 100 ml lyzačního pufru na 3 l buněčné suspenze. Resuspendované buňky byly následně zmrazeny při -80 °C. Další den byly resuspendované pelety rozmrazeny a po přidání lysozymu v poměru 0,1 mg lysozymu na 1 ml buněčné suspenze byla tato směs inkubována na magnetické míchačce při 4 °C po dobu cca 20 minut. Do směsi byl přidán 1 ml 0,1M roztoku inhibitoru proteas fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF) v ethanolu. Tato směs byla chlazená a sonikována při výkonu 57 W po dobu 15 minut čistého času ultrazvukového impulsu v cyklech 3 s expozice, 17 s regenerace. Sonikací bylo dosaženo rozrušení buněčných membrán a uvolnění buněčného obsahu, tedy i žádoucího exprimovaného proteinu, do roztoku. Směs byla následně centrifugována při 13500 ot./min a 4 °C po dobu 40 minut. Vzniklá peleta obsahovala fragmenty rozbitých buněk a v supernatantu se nacházely všechny rozpustné bakteriální proteiny.

Tab. 3.11: Složení lyzačního pufru.

Látka	Konečná koncentrace
PBS	1x
NaCl	1 M
β-merkaptoethanol (β-Me)	4 mM
imidazol	2 mM

3.2.2.3 Niklová chelatační chromatografie

Niklová chelatační chromatografie se řadí mezi afinitní chromatografie, které umožňují koordinačně kovalentní vazbu fusního proteinu na matici, kterou zpravidla tvoří polymerní materiál. V případě niklové chelatační chromatografie je takovou maticí chelatační sefarsa s navázanými nikelnatými ionty, která s vysokou afinitou váže motiv

šesti histidinů tzv. histidinovou kotvu, tedy fusní značku rekombinantního proteinu. Histidinová kotva je uměle zabudována do proteinové sekvence na jejím C- nebo N-konci, protože není její přirozenou součástí. Histidin se dokáže navázat na Ni²⁺ ionty koordinačně kovalentní vazbou díky svému imidazolovému kruhu a afinita této vazby je přímo úměrná počtu histidinů ve vlastní fusní značce. Při promývání kolony matrice s navázaným Ni²⁺ ionty specificky interaguje pouze s proteiny, které obsahují histidinovou kotvu. Eluce požadovaného rekombinantního proteinu lze dosáhnout promytím kolony pufrům, který obsahuje velký nadbytek imidazolu.

Na kolonu určenou pro niklovou chelatační chromatografii bylo naneseno cca 2,5 ml polymerního nosiče Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, USA) a kolona byla promyta 20 ml destilované vody, 50 ml 0,1 M roztoku hexahydrátu síranu nikelnatého, 15 ml destilované vody a nakonec 10 ml vazebného pufru (viz tab. 3.12). Matrice byla resuspendována v 5 ml vazebného pufru a přenesena do kádinky obsahující získanou směs bakteriálních proteinů. Tato směs byla inkubována při 4 °C asi 20 minut, aby došlo k efektivnímu navázání rekombinantního proteinu s fusní histidinovou kotvou na matici. Po skončení inkubace byla směs nanesena zpátky na kolonu připojenou k peristaltické pumpě a promyta 400 ml 10% elučního pufru (viz tab. 3.13, str. 37) ve vazebném pufru. Následná eluce požadovaného rekombinantního proteinu byla provedena pouze gravitačně prokapáním směsi 15 ml elučního pufru do 15 ml dialyzačního pufru (viz tab. 3.24, str. 40). Chelatační sefaroza byla regenerována 50 ml regeneračního roztoku (viz tab. 3.14, str. 37).

Tab. 3.12: Složení vazebného pufru pro niklovou chelatační chromatografii,

Látka	Konečná koncentrace
PBS	1x
NaCl	1 M
β-Me	2 mM
imidazol	1 mM

Tab. 3.13: Složení elučního pufru pro niklovou chelatační chromatografii.

Látka	Konečná koncentrace
PBS	1x
NaCl	1 M
β -Me	2 mM
imidazol	0,6 M

Tab. 3.14: Složení regeneračního roztoku pro promytí kolony.

Látka	Konečná koncentrace
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	50 mM
NaCl	0,5 M

3.2.2.4 SDS elektroforesa

SDS elektroforesa je migrační metoda, při které dochází k rozdělení proteinů v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) na základě jejich odlišné molekulové hmotnosti. Menší (lehčí) molekuly se pohybují rychleji než molekuly větší (těžší). V přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS), aniontového detergentu vázícího se na proteiny v konstantním poměru, získají proteiny jednotný záporný náboj a pohybují se tak ke kladné elektrodě, tedy k anodě.

Při nanášení vzorků na gel byl do první jamky vždy nanesen standard molekulových vah, což je vlastně roztok obsahující proteiny o různé známé molekulové hmotnosti. Podle tohoto standardu byly následně odečítány molekulové hmotnosti požadovaného proteinu. K práci byl používán standard molekulových vah Precision Plus Protein Dual Color Standard (BioRad, USA).

Do odebraných vzorků o objemu 15 μ l bylo odpipetováno 5 μ l SDS-PAGE vzorkovacího pufru (viz tab. 3.19, str. 39) a směs byla inkubována po dobu 5 minut při teplotě 100 °C. Poté byla směs převedena do jamek zaváděcího gelu (viz tab. 3.16, str. 38) a elektroforesa probíhala v pufru pro SDS-PAGE elektroforesu (viz tab. 3.20, str. 39) při standardním napětí 150 V po dobu cca 1:10 h. Po ukončení elektroforesy byl gel přenesen do barvicího roztoku (viz tab. 3.22, str. 39) a inkubován 30 min při teplotě cca 50 °C. Následně byl gel inkubován v odbarvovacím roztoku (viz tab. 3.23, str. 39) při stejných

podmínkách. Nakonec byl gel přenesen do čerstvého odbarvovacího roztoku a v něm byl inkubován dalších 48 hodin.

Tab. 3.15: Složení 15 % separačního gelu (množství potřebné na výrobu jednoho gelu).

Látka	Objem
destilovaná H ₂ O	1,75 ml
pufr pro separační gel (viz tab. 3.17)	2 ml
akrylamid/bis-akrylamid (viz tab. 3.21, str. 38)	3,75 ml
persulfát amonný (APS)	75 µl
TEMED	8 µl

Tab. 3.16: Složení 5 % zaváděcího gelu (množství potřebné na výrobu jednoho gelu).

Látka	Objem
destilovaná H ₂ O	2,25 ml
pufr pro zaváděcí gel (viz tab. 3.18, str. 38)	1 ml
akrylamid/bis-akrylamid (viz tab. 3.21, str. 38)	0,5 ml
APS	75 µl
TEMED	8 µl

Tab. 3.17: Složení pufru pro separační gel, doplněno destilovanou H₂O na objem 100 ml.

Látka	Objem
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	75 ml
10% SDS	4 ml

Tab. 3.18: Složení pufru pro zaváděcí gel, doplněno destilovanou H₂O na objem 100 ml.

Látka	Objem
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	50 ml
10% SDS	4 ml

Tab. 3.19: Složení 5 x koncentrovaného SDS-PAGE vzorkovacího pufru, celkový objem 10 ml.

Látka	Objem
sterilní H ₂ O	0,9 ml
1 M Tris-HCl	0,6 ml
50% glycerol	5 ml
10% SDS	2 ml
β-Me	0,5 ml
10% bromfenolová modř	1 ml

Tab. 3.20: Složení pufru pro SDS-PAGE elektroforézu.

Látka	Konečná koncentrace
Tris-HCl (pH 8,3)	50 mM
glycin	385 mM
SDS	0,1 %

Tab. 3.21: Složení akrylamid/bis-akrylamidu, doplněno destilovanou H₂O na objem 100 ml.

Látka	Množství
akrylamid	29,2 g
bis-akrylamid	0,8 g

Tab. 3.22: Složení barvicího roztoku, doplněno destilovanou vodou na objem 1 l.

Látka	Objem/množství
methanol	450 ml
ledová kyselina octová	100 ml
Coomassie Brilliant Blue R 250	1 g

Tab. 3.23: Složení odbarvovacího roztoku, doplněno destilovanou H₂O na objem 1 l.

Látka	Objem
methanol	100 ml
ledová kyselina octová	100 ml

3.2.2.5 Dialýza

Vzhledem k tomu, že v roztoku proteinu se po niklové chelatační chromatografii nachází velké množství imidazolu, který proteiny destabilizuje, je potřeba jej z roztoku odstranit. K tomu slouží dělicí metoda dialýza, při které dochází k průchodu nízkomolekulárních látek polopropustnou membránou o dané velikosti pórů tak, aby nebyla propustná pro žádaný protein. Dělení látek probíhá na základě koncentračního gradientu mezi roztokem uvnitř a dialyzačním pufrem vně dialyzační membrány.

Roztok proteinu byl převeden do dialyzační membrány o velikosti pórů, které odpovídají velikosti proteinu o molekulové hmotnosti 14 kDa a ta byla vložena do dialyzačního pufru (viz tab. 3.24). Dialýza probíhala při 4°C po dobu cca 10 hodin.

Tab. 3.24: Složení dialyzačního pufru.

Látka	Konečná koncentrace
Tris-HCl	20 mM
NaCl	0,2 M
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	2 mM
β-Me	2 mM
glycerol	10 % (w/v)

3.2.2.6 Gelová permeační chromatografie

Dalším a posledním purifikačním krokem byla gelová permeační chromatografie (GPC). GPC je metoda, při které jsou látky děleny na základě svých hydrodynamických poloměrů. Pevnou fází kolony tvoří zrnitý porézní gel, v tomto případě dextran navázaný na zesíťovanou agarosu, a ten je promýván mobilní fází, kterou tvoří pufr pro GPC (viz tab. 3.25, str. 41). Póry gelu mají pouze určité velikosti, a proto do nich mohou difundovat jen molekuly s menším nebo stejným hydrodynamickým poloměrem a tím jsou bržděny při průchodu kolonou. Nejrychlejší retenční čas mají tedy molekuly s velkým hydrodynamickým poloměrem, které do pórů nevnikají a putují pouze mezi zrny pevné matrice, čímž dojde k rozdělení proteinů z původního roztoku.

Předialyzovaný proteinový roztok byl nejprve koncentrován centrifugací při 2500 ot./min a 4 °C na objem 2 ml koncentrátorem Amicon Ultra (EMD Millipore, USA) propustným pro molekuly menší než 10 kDa a poté přefiltrován přes filtr s velikostí pórů

0,45 μm . Takto připravený vzorek byl poté purifikován na koloně Superdex 200 Hiload 26/60 připojené k přístroji HPLC-AKTA (Amersham Biosciences, Švédsko). Před přidáním vzorku byla kolona promyta pufr pro GPC rychlostí 3 ml/min a po přidání vzorku byla průtoková rychlost snížena na 2 ml/min. Jednotlivé frakce byly sbírány po 1 ml do mikrozkuhavek. Výsledná data byla vyhodnocena pomocí programu Unicorn 4.1.1.

Tab. 3.25: Složení pufru pro GPC.

Látka	Konečná koncentrace
Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM
NaCl	150 mM
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	2 mM
DTT	5 mM
glycerol	10% (w/v)

3.2.2.7 Určení proteinové koncentrace

Koncentrace proteinu byla změřena při vlnové délce 280 nm. Při této vlnové délce dochází k absorpci aromatických skupin postranních řetězců aminokyselin. Referenčním roztokem byl pufr pro GPC, který byl používán jako mobilní fáze u gelové permeační chromatografie. Z naměřené hodnoty absorbance roztoku proteinu byla následně vypočítána molární koncentrace proteinu c [$\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$] pomocí následujícího vztahu, který definuje Lambertův-Beerův zákon:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c,$$

kde A je absorbance, ϵ je molární absorpční koeficient [$\text{dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$] a l je délka optické dráhy kyvety [cm]. Molární absorpční koeficient byl získán z primární proteinové sekvence pomocí internetové aplikace ProtParam [35].

3.2.3 Exprese a purifikace thioredoxinu (Trx-1)

Expresní konstrukt se sekvencí kódující thioredoxin Trx-1 (Cys⁷³Ser) byl získán od RNDr. Veroniky Obšilové, Ph.D. Tento mutant byl připraven proto, že nekatalytický Cys⁷³ způsobuje při vysokých koncentracích proteinu v roztoku tvorbu dimerů, které nejsou fyziologicky relevantní. Mutací tohoto Cys⁷³ na Ser se tvorbě takových dimerů zabrání.

Trx-1 byl vnesen do plasmidu pQE-30, který obsahoval N-terminální histidinovou kotvu a resistenci na antibiotikum ampicilin (Amp) a tedy následná exprese a izolace Trx-1 byla téměř analogická s expresí a purifikací fragmentů N-terminální části ASK1, která byla popsána v 3.2.2, str. 34.

3.2.3.1 Exprese Trx-1

K přípravě Trx-1 byl zvolen expresní systém bakterie *E. coli BL21 (DE3)*, který je vhodný pro indukci exprese rekombinantního proteinu pomocí IPTG (viz kapitola 3.2.2.1, str. 34). Rekombinantní DNA byla vnesena do těchto kompetentních buněk pomocí transformace (viz kapitola 3.2.1.4, str. 26). Z vyrostlých bakteriálních kolonií a LB média s Amp o výsledné koncentraci 100 µg/ml byly další den připraveny miniprepy, které byly inkubovány v orbitálním inkubátoru při 200 ot./min a teplotě 37 °C po dobu cca 16 hodin (viz kapitola 3.2.1.4, str. 26). Následující den byly miniprepy převedeny do 1 l LB média (vždy 1 miniprep na 1 l LB média), do kterého byl přidán Amp o výsledné koncentraci 100 µg/ml. Připravené bakteriální kultury byly inkubovány v orbitálním inkubátoru při 210 ot./min a teplotě 37 °C, dokud optická hustota směsi nedosahovala cca 0,7 cm⁻¹ při vlnové délce 600 nm. Při měření optické hustoty byl jako referenční roztok používán roztok LB média s přidaným Amp o výsledné koncentraci 100 µg/ml. Po dosažení žádané optické hustoty byly bakteriální kultury ochlazeny na 30 °C a po přidání 1 ml 0,5M roztoku induktoru IPTG (výsledná koncentrace 0,5 mM) pokračovala inkubace v orbitálním inkubátoru při 210 ot./min a teplotě 30 °C cca 18 hodin.

3.2.3.2 Sonikace

Postup při sonikaci byl zcela totožný jako ten, který byl popsán při sonikaci N-terminálních fragmentů ASK1 v kapitole 3.2.2.2, str. 35.

3.2.3.3 Niklová chelatační chromatografie

Složení používaných pufrů i postup při niklové chelatační chromatografii byl stejný jako postup popsáný v kapitole 3.2.2.3, str. 35.

3.2.3.4 Dialýza

Roztok proteinu byl převeden do dialyzační membrány o velikosti pórů, které odpovídají velikosti proteinu o molekulové hmotnosti 8 kDa a ta byla vložena do dialyzačního pufru. Dialýza byla prováděna při 4°C po dobu cca 10 hodin. Složení dialyzačního pufru bylo stejné jako v kapitole 3.2.2.5, str. 40.

3.2.3.5 Gelová permeační chromatografie

Dialyzovaný proteinový roztok byl nejprve koncentrován centrifugací při 2500 ot./min a 4 °C na objem 1 ml koncentrátorem Amicon Ultra (EMD Millipore, USA) propustným pro molekuly menší než 10 kDa a poté přefiltrován přes filtr s velikostí pórů 0,45 µm. Takto připravený vzorek byl poté purifikován na koloně Superdex 75 10/300 připojené k přístroji HPLC-AKTA (Amersham Biosciences, Švédsko). Před přidáním vzorku byla kolona promývána pufrům pro GPC průtokovou rychlostí 0,5 ml/min, která byla stejná i po následném přidání vzorku. Jednotlivé frakce byly sbírány po 0,5 ml do mikrozkuumavek. Výsledná data byla vyhodnocena pomocí programu Unicorn 4.1.1.

Složení pufru pro GPC bylo zcela totožné jako při gelové permeační chromatografii fragmentů N-terminální části ASK1 popsané v kapitole 3.2.2.6, str. 40.

3.2.3.6 Určení proteinové koncentrace

Koncentrace proteinu byla změřena stejným postupem, jaký byl popsán v kapitole 3.2.2.7, str. 41.

3.2.4 Biofyzikální charakterizace připravených fragmentů N-terminální části ASK1

K biofyzikální charakterizaci připravených proteinů byly zvoleny dvě techniky, které umožňují studovat oligomerní stav molekul v roztoku, jejich molekulovou hmotnost či hydrodynamický poloměr. První z těchto technik byl dynamický rozptyl světla a druhou analytická ultracentrifugace, která byla využita i při následném studiu interakcí mezi připravenými fragmenty N-terminální části ASK1 a Trx-1.

3.2.4.1 Dynamický rozptyl světla

Rozptyl světla je založen na průchodu elektromagnetického záření roztokem, který obsahuje rozptýlené částice makromolekul. Elektrikomagnetické vlnění interferuje s elektrony makromolekul a indukuje jejich oscilující dipólové momenty, které jsou zdrojem rozptýleného záření. Rozptyl světla je možné pozorovat, pokud dochází ke konstruktivní interferenci rozptýleného záření, tedy pouze v heterogenních roztocích.

Jednou z velmi používaných metod je dynamický rozptyl světla (DLS), neboli fotonová korelační spektroskopie. DLS se používá pro stanovení hydrodynamického poloměru částic rozptýlených v roztoku a ke stanovení jejich difusního koeficientu. Je založen na měření časové závislosti intenzity rozptylu částic v roztoku a vyhodnocuje se ve

tvaru autokorelační funkce. Autokorelační funkce vyjadřuje souvislost mezi intenzitou rozptýleného záření I v čase t a intenzitou rozptýleného záření v čase $t + \tau$ a je definována vztahem:

$$g^2(\tau) = \frac{\langle I(t) I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}. \quad [1]$$

Z této funkce lze získat distribuční funkci relaxačních časů $A(\tau_R)$ pomocí inverzní Laplaceovy transformace:

$$g^2(\tau) = 1 + \beta \int_0^\infty A(\tau_R) e^{-\frac{\tau}{\tau_R}} d\tau_R, \quad [2]$$

kde β je tzv. koherenční faktor, který charakterizuje zachování koherence záření v detekčním objemu.

Funkci relaxačních časů je možné převést na distribuci hydrodynamických poloměrů $\tau A(\tau)$ v případě platnosti vztahů:

$$D = \frac{1}{\tau_R q^2}, \quad [3]$$

kde q je rozptylový faktor a D je difusní koeficient, který je dán Stokesovým-Einsteinovým vztahem:

$$D = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{6\pi\eta_0 R_H}, \quad [4]$$

kde f je frikční koeficient, který je přímo úměrný viskozitnímu koeficientu rozpouštědla η_0 a hydrodynamickému poloměru R_H studovaných částic [36].

Metodou DLS byly změřeny vzorky ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰². Roztoky těchto proteinů byly nejprve dialyzovány proti pufru pro DLS (viz tab. 3.26, str. 45), zakonzentrovány na koncentraci 40 μM a přefiltrovány přes filtr s velikostí pórů 0,45 μm . Po přenesení připravených vzorků do měřících kyvet byly v softwaru ALV Correlator Software 4.0 nastaveny parametry měření. Úhel dopadu byl nastaven na 90° a index lomu na 1,332. Každé měření probíhalo třikrát v deseti opakováních na přístroji ALV-5000.

Data pro výnos distribuce hydrodynamických poloměrů byla vyhodnocena s pomocí doc. RNDr. Miroslava Štěpánka, Ph.D. na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie, PřF UK.

Tab. 3.26: Složení dialyzačního pufru pro DLS.

Látka	Konečná koncentrace
Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	2 mM
NaCl	150 mM
DTT	5 mM

3.2.4.2 Analytická ultracentrifugace

Analytická ultracentrifugace (AUC) je metoda studia hydrodynamických či termodynamických vlastností biomakromolekul pohybujících se v odstředivých polích. Distribuce biomakromolekul je během AUC monitorována absorpční nebo interferenční optikou.

AUC lze rozdělit na dvě různé metody. První z nich je metoda sedimentačních rychlostí, která se používá při studiu hydrodynamických vlastností biomakromolekul. Mezi oblastí obsahující konstantní koncentraci biomakromolekul a oblastí bez jejich výskytu se vytváří sedimentační rozhraní. Rychlost, jakou se toto rozhraní pohybuje, je charakterizována tzv. sedimentačním koeficientem S , který závisí také na velikosti a tvaru biomakromolekul. Analýzou se většinou zjišťuje, kolik složek s různými S sedimentuje. Data získaná při analýze se následně transformují do distribuce sedimentačního koeficientu $c(S)$ s dekonvulovaným difusním koeficientem. Metodou sedimentačních rychlostí lze odhadnout molekulovou hmotnost globulárních molekul, v případě znalosti molekulové hmotnosti také orientačně tvar biomakromolekul a zdánlivou konstantu tvorby komplexu v případě více složek ve vzorkovém roztoku.

Druhou metodou AUC je metoda sedimentační rovnováhy, při které je měřený vzorek centrifugován při rychlosti zpravidla nižší než při metodě sedimentačních rychlostí. Taková rychlost umožní vyrovnání sedimentačního a difusního toku. Metodou sedimentační rovnováhy lze získat hodnotu relativní molekulové hmotnosti

biomakromolekul, jejich oligomerní stav a hodnotu rovnovážné konstanty při asociaci komplexu.

V této práci byla metoda sedimentačních rychlostí využita jak k biofyzikální charakterizaci připravených proteinů, tak ke studiu vazebných interakcí mezi fragmenty N-terminální části ASK1⁴⁶⁻³⁰² resp. ASK1⁸⁸⁻³⁰² a jejich vazebným partnerem Trx-1. Jediným rozdílem v analýze biofyzikální charakterizace a studiem interakcí bylo ve složení vzorků. Při analýze vazebných interakcí v redukčních podmínkách byly v reakční směsi obsaženy jak ASK1⁴⁶⁻³⁰² resp. ASK1⁸⁸⁻³⁰², tak Trx-1, zatímco při biofyzikální charakterizaci proteinů pomocí AUC byly do každého vzorku naneseny samotné proteiny. Měření bylo provedeno přístrojem Proteom Lab™ XL-I analytická centrifuga (Beckman Coulter, USA) na Katedře biochemie PřF UK.

Před analýzou byly vzorky dialyzovány proti AUC pufru (viz tab. 3.27) a charakteristické hodnoty toho pufru (viskozita a hustota), stejně tak jako parciální specifický objem proteinů byly vypočítány pomocí programu SEDNTERP [37]. Měření probíhalo při rychlosti 48000 ot./min a sedimentační profily byly měřeny absorpční optikou při vlnové délce 280 nm. Distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ byly vypočítány pomocí softwaru SEDFIT [38]. Pro charakterizaci termodynamické rovnováhy a výpočet zdánlivé disociační konstanty byl použit software SEDPHAT [39] (metoda vazebných isoterm). Naměřené hodnoty byly proloženy modelem $A + B \rightleftharpoons AB$. Sedimentační koeficienty jednotlivých komponent byly použity jako vstupní parametry. Zpracování dat i samotné měření bylo provedeno s pomocí Mgr. Dalibora Koška.

Tab. 3.27: Složení pufru pro AUC

Látka	Konečná koncentrace
Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM
NaCl	200 mM
β -Me	2 mM

3.2.5 Ověření interakcí mezi připravenými fragmenty N-terminální části ASK1 kinasy a thioredoxinem v redukčních podmínkách

Jak už bylo předesláno v předchozí kapitole, důležitou technikou pro studium interakcí mezi připravenými fragmenty N-terminální části ASK1, ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰²,

a Trx-1 byla především AUC. Další technikou, která umožňuje rychlé a snadné ověření interakcí mezi připravenými fragmenty ASK1 a Trx-1, byla nativní elektroforesa.

3.2.5.1 Nativní elektroforesa

Nativní elektroforesa je separační metoda, při níž k migraci látek dochází na základě jejich celkového náboje a velikosti. Platí zde, že čím je molekula větší, tím pomaleji migruje a naopak, čím má molekula větší elektrický náboj, tím se v gelu pohybuje rychleji. Nativní elektroforesa v tomto případě sloužila k ověření získaných výsledků z analytické centrifugace, tedy jako další metoda pro sledování interakce mezi N-terminální doménou ASK1 kinasy a Trx-1.

Vzorky byly připraveny tak, aby v nich fragmenty N-terminální části ASK1⁴⁶⁻³⁰² resp. ASK1⁸⁸⁻³⁰² s Trx-1 byly ve stejném molárním poměru. K roztoku proteinu resp. směsi proteinů bylo vždy přidáno ještě 5 μ l vzorkového pufru pro nativní elektroforesu (viz tab. 3.30, str. 48) a 1x koncentrovaného TBE pufru (viz tab. 3.28), tak, aby byl objem reakční směsi doplněn do 30 μ l. Vzorek, ve kterém se nacházela směs ASK1⁴⁶⁻³⁰² resp. ASK1⁸⁸⁻³⁰² a Trx-1, byl před nanesením na gel 30 minut inkubován při laboratorní teplotě, aby došlo k vytvoření komplexu.

Po nanesení vzorků na 12% polyakrylamidový gel probíhala elektroforesa v 1x koncentrovaném TBE pufru při konstantním napětí 140 V a chlazení celé aparatury na ledu cca 2,5 hodiny.

Tab. 3.28: Složení 10x koncentrovaného TBE pufru, doplněno destilovanou H₂O na objem 1 l.

Látka	Množství
Tris	107,8 g
H ₃ BO ₃	55 g
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	7,4 g

Tab. 3.29: Složení 12% nativního gelu (množství potřebné pro přípravu jednoho gelu).

Látka	Objem
destilovaná H ₂ O	5 ml
akrylamid/bis-akrylamid (viz tab. 3.21 str. 38)	4 ml
10 x TBE (pH 8,3)	1 ml
APS	75 µl
TEMED	8 µl

Tab. 3.30: Složení vzorkovacího pufru pro nativní elektroforesu, doplněno destilovanou H₂O na objem 10 ml.

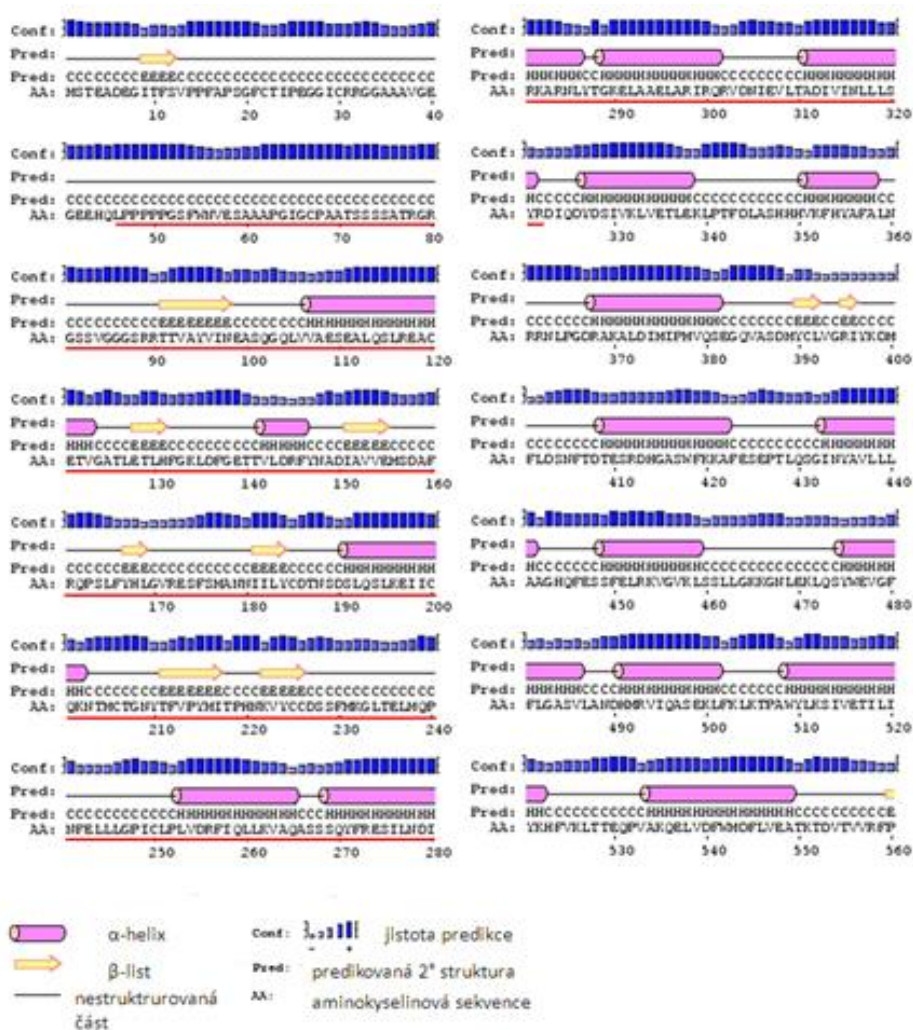
Látka	Objem/množství
10x TBE (pH 8,3)	1 ml
bromfenolová modř	10 mg
glycerol	3 ml

4. Výsledky

4.1 Příprava expresních konstruktů různých fragmentů N-terminální části ASK1 kinasy

Prvním cílem této diplomové práce byla příprava čtyř expresních konstruktů, které následně umožní přípravu dvou fragmentů N-terminální části ASK1 kinasy s různou délkou. Tyto fragmenty by měly obsahovat oblast ASK1, která je odpovědná za interakci s Trx-1. Na základě predikce sekundární struktury lidské ASK1 (Obr. 4.1, str. 50) byly vybrány čtyři sekvence obsahující vazebné místo pro Trx-1 [18] a tyto čtyři fragmenty byly následně vloženy do expresního plasmidu. V rámci této diplomové práce byly připraveny dva konstrukty, které obsahovaly sekvence ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰² v plasmidu pRSFDuet-1. Další dva konstrukty obsahující sekvence ASK1⁴⁶⁻³²² a ASK1⁸⁸⁻³²² v plasmidu pRSFDuet-1 byly připraveny Mgr. Daliborem Koškem.

DNA kódující lidskou ASK1 kinasu byla získána od Mgr. Dalibora Koška a následně byla amplifikována polymerasovou řetězovou reakcí probíhající za reakčních podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 3.2.1.6, str. 27. Amplifikovaná DNA kódující ASK1⁴⁶⁻³⁰² resp. ASK1⁸⁸⁻³⁰² byla zkontrolována pomocí horizontální agarosové elektroforesy (viz kapitola 3.2.1.7, str. 29). Plasmidová i amplifikovaná DNA byla štěpena pomocí restrikčních endonukleas NotI a BamHI (viz kapitola 3.2.1.9, str. 31). Štěpení bylo zkontrolováno horizontální agarosovou elektroforesou a separací z gelu byly získány části gelu, které obsahovaly buď plasmidovou DNA nebo amplifikovanou DNA kódující ASK1⁴⁶⁻³⁰² resp. ASK1⁸⁸⁻³⁰². Tyto DNA byly následně extrahovány z gelu pomocí komerčně dostupné sady GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, USA), viz kapitola 3.2.1.10, str. 32. Ligací, jejíž postup je popsán v kapitole 3.2.1.11 na str. 33, byla DNA kódující ASK1⁴⁶⁻³⁰² resp. ASK1⁸⁸⁻³⁰² vnesena do příslušné plasmidu pRSFDuet-1. K tomuto kovalentnímu spojení volných kohesních konců plasmidové a amplifikované DNA byl nutný enzym katalyzující tento proces, tedy T4 DNA ligasa. Nakonec byla rekombinantní DNA odeslána k sekvenční analýze do Laboratoře sekvence DNA Přf UK, Viničná 7, Praha 2. Výsledky z této analýzy jsou přiloženy jako Příloha 2.



Obr. 4.1: Predikce sekundární struktury ASK1 pomocí metody Psipred [40]. Na obrázku je zobrazena pravděpodobná sekundární struktura molekuly ASK1 v rozmezí sekvence aminokyselin 1-560. Oblast, ve které by se podle predikce [18] mělo vyskytovat vazebné místo pro Trx-1 je vyznačeno červenou linkou.

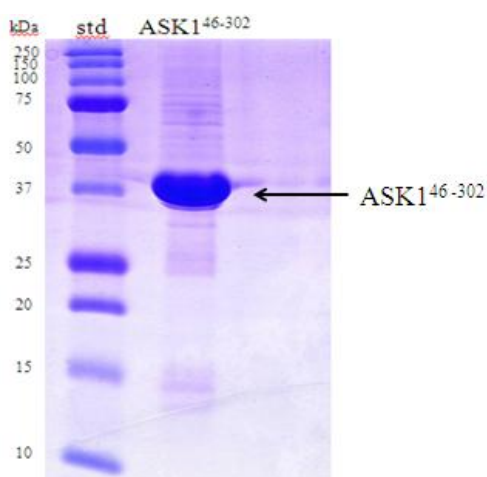
4.2 Purifikace čtyř fragmentů N-terminální části ASK1, ASK1⁴⁶⁻³⁰², ASK1⁸⁸⁻³⁰², ASK1⁴⁶⁻³²² a ASK1⁸⁸⁻³²²

Čtyři různé fragmenty N-terminální části ASK1 byly exprimovány a následně purifikovány jako fusní proteiny s N-terminální histidinovou kotvou a na ní navázaným GB-1 proteinem. Úspěšně byly připraveny dva fragmenty N-terminální části ASK1, ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰². Příprava dalších dvou fragmentů tohoto proteinu, ASK1⁴⁶⁻³²² a ASK1⁸⁸⁻³²², nebyla úspěšná, protože tyto dva fragmenty se podařilo získat pouze ve velmi nízkých výtěžcích, a proto nebyly použity při následných biofyzikálních charakterizacích.

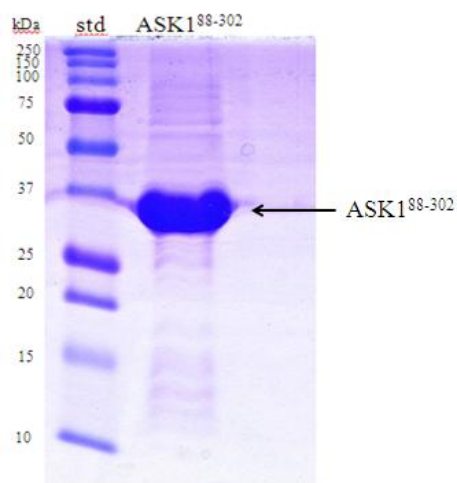
4.2.1 Niklová chelatační chromatografie

Při purifikaci každého fragmentu N-terminální části ASK1 byla prvním purifikačním krokem vždy niklová chelatační chromatografie viz kapitola 3.2.2.3, str. 35. Při eluci roztoku proteinu z kolony byl tento roztok jímán do rezervoáru, který obsahoval 10 ml dialyzačního pufru (viz tab. 3.24, str. 40), kvůli zajištění vyšší stability proteinu při následné dialýze. Vzorek tohoto roztoku byl analyzován pomocí SDS-PAGE (viz kapitola 3.2.2.4, str. 37).

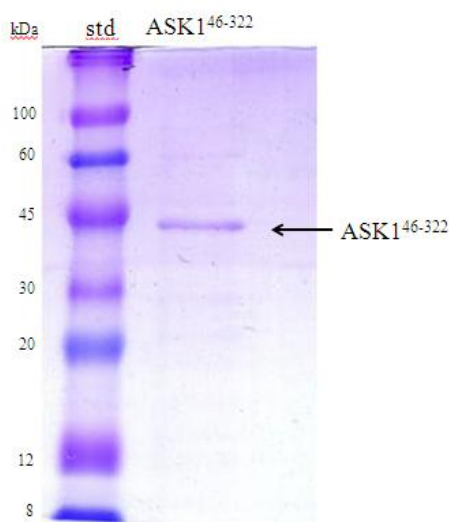
Na výsledných obrázcích z SDS-PAGE je patrné, že fragmenty ASK1⁴⁶⁻³⁰² (obr. 4.2) a ASK1⁸⁸⁻³⁰² (obr. 4.3, str. 52) se exprimovaly velice dobře na rozdíl od fragmentů ASK1⁴⁶⁻³²² (obr. 4.4, str. 52) a ASK1⁸⁸⁻³²² (obr. 4.5, str. 53), jejichž rozpustnost byla velice nízká. Z obrázků lze také odečíst relativní molekulovou hmotnost exprimovaných fragmentů N-terminální části ASK1.



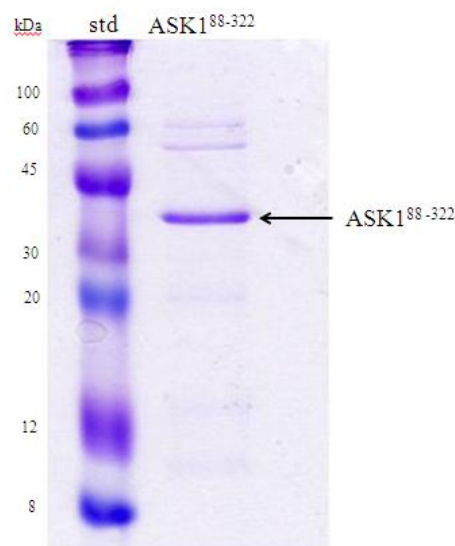
Obr. 4.2: 15% SDS-PAGE gel fragmentu ASK1⁴⁶⁻³⁰² po niklové chelatační chromatografii. V první dráze jsou vidět zóny migrace standardu molekulových vah, druhá dráha obsahuje fragment N-terminální části ASK1, ASK1⁴⁶⁻³⁰², jehož predikovaná relativní molekulová hmotnost je 37989.



Obr. 4.3: 15% SDS-PAGE gel fragmentu $ASK1^{88-302}$ po niklové chelatační chromatografii. V první dráze jsou vidět zóny migrace standardu molekulových vah, druhá dráha obsahuje fragment N-terminální části $ASK1$, $ASK1^{88-302}$, jehož predikovaná relativní molekulová hmotnost je 34110.



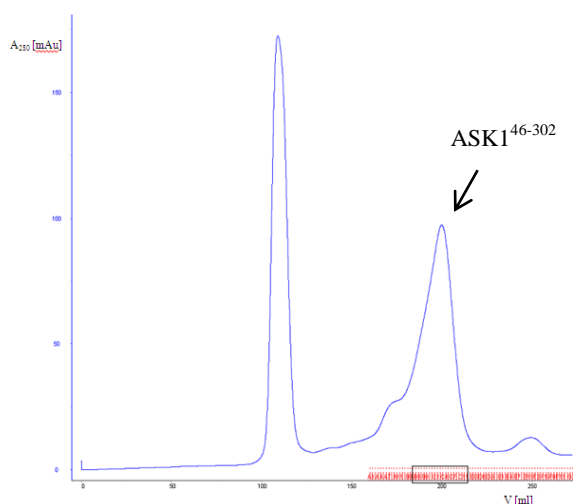
Obr. 4.4: 15% SDS-PAGE gel fragmentu $ASK1^{46-322}$ po niklové chelatační chromatografii. V první dráze jsou vidět zóny migrace standardu molekulových vah, druhá dráha obsahuje fragment N-terminální části $ASK1$, $ASK1^{46-322}$, jehož predikovaná relativní molekulová hmotnost je 40358.



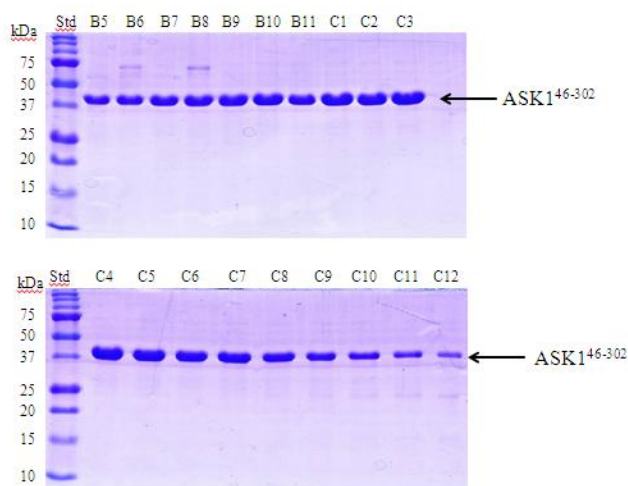
Obr. 4.5: 15% SDS-PAGE gel fragmentu ASK1⁸⁸⁻³²² po niklové chelatační chromatografii. V první dráze jsou vidět zóny migrace standardu molekulových vah, druhá dráha obsahuje fragment N-terminální části ASK1, ASK1⁸⁸⁻³²², jehož predikovaná relativní molekulová hmotnost je 36480.

4.2.2 Gelová permeační chromatografie

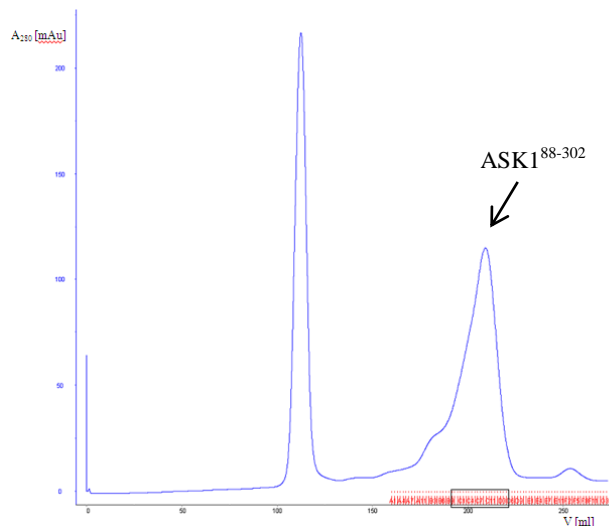
Druhým purifikačním krokem byla gelová permeační chromatografie, jejíž princip byl popsán v kapitole 3.2.2.6 na str. 40. Pro získání čistého proteinu byla u fragmentů N-terminální části ASK1, ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰² použita kolona Superdex 200 Hiloal 26/60 a u fragmentů ASK1⁴⁶⁻³²² a ASK1⁸⁸⁻³²² kolona Superdex 200 10/600. Z chromatogramů, které obsahují lokální maximum definující fragmenty N-terminální části ASK1 bylo zjištěno, ve kterých frakcích se žádaný protein nachází. Frakce byly sbírány po 1 ml u fragmentů ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰², resp. po 0,5 ml u fragmentů ASK1⁴⁶⁻³²² a ASK1⁸⁸⁻³²². Po analýze vzorků na SDS-PAGE byly sbírané frakce sloučeny, byla změřena proteinová koncentrace a purifikovaný protein byl uchován při -80 °C pro další experimenty. Celkový výtěžek fragmentu ASK1⁴⁶⁻³⁰² ze 3 l LB média byl 10,8 mg, výtěžek fragmentu ASK1⁸⁸⁻³⁰² ze stejného objemu LB média byl 20,8 mg. S těmito dvěma fragmenty byly dále provedeny analýzy interakce s Trx-1. Výtěžek fragmentů ASK1⁴⁶⁻³²² a ASK1⁸⁸⁻³²² byl v podstatě neměřitelný, také vzhledem k nečistotám, které lze vidět na SDS PAGE gelu po druhém purifikačním kroku (viz obr. 4.11, str. 56 a 4.13, str. 57).



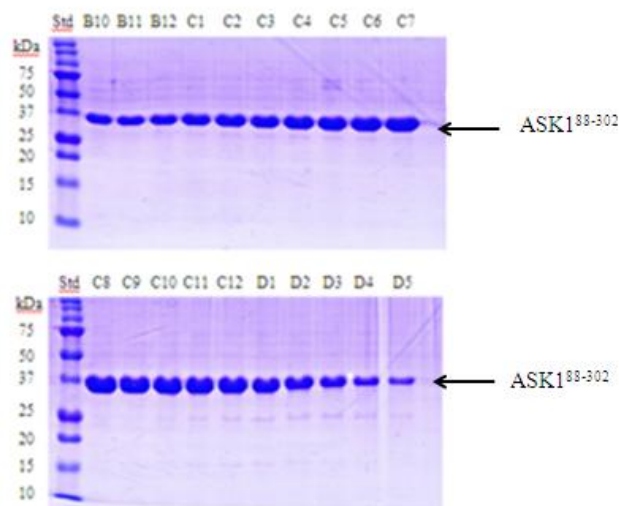
Obr. 4.6: Eluční profil N-terminálního fragmentu ASK1⁴⁶⁻³⁰² po gelové permeační chromatografii na koloně Superdex 200 Hiloadd 26/60. Modrá křivka označuje závislost absorbance eluátu při vlnové délce 280 nm na elučním objemu. Lokální maximum označené šipkou odpovídá N-terminálnímu fragmentu ASK1⁴⁶⁻³⁰². Další výrazné lokální maximum pravděpodobně odpovídá agregátům a dalším vysokomolekulárním nečistotám, které byly při této metodě odděleny z roztoku připravovaného proteinu. V černém rámečku jsou označeny frakce jímány pro další experimenty.



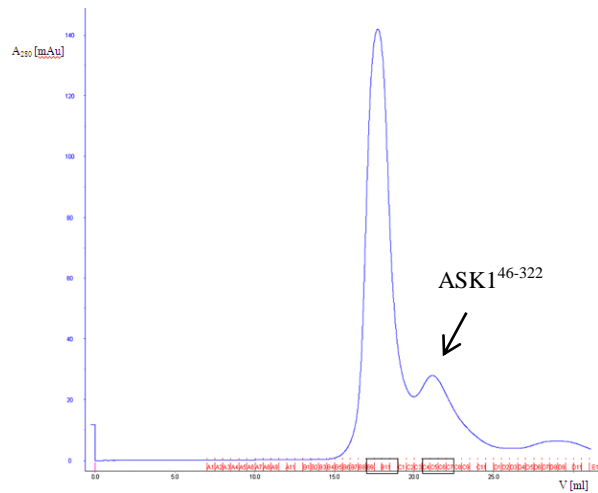
Obr. 4.7: 15% SDS-PAGE gel fragmentu ASK1⁴⁶⁻³⁰² po gelové permeační chromatografii. V první dráze jsou vidět zóny migrace standardu molekulových vah, dráhy označené jako B5-C12 korespondují s jímánymi frakcemi označenými černým rámečkem na obr. 4.6.



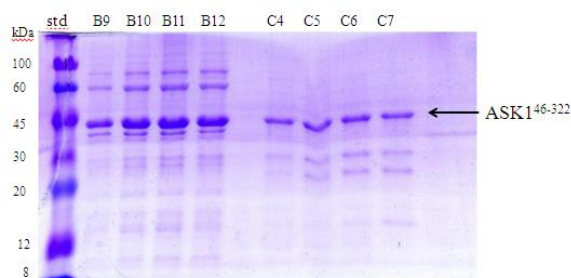
Obr. 4.8: Eluční profil N-terminálního fragmentu ASK1⁸⁸⁻³⁰² po gelové permeační chromatografii na koloně Superdex 200 Hiload 26/60. Modrá křivka označuje závislost absorbance eluátu při vlnové délce 280 nm na elučním objemu. Lokální maximum označené šipkou značí N-terminální fragment ASK1⁸⁸⁻³⁰². Další výrazné lokální maximum značí agregáty a další vysokomolekulární nečistoty, které byly při této metodě odděleny z roztoku kýženého proteinu. V černém rámečku jsou označeny frakce jímány pro další experimenty.



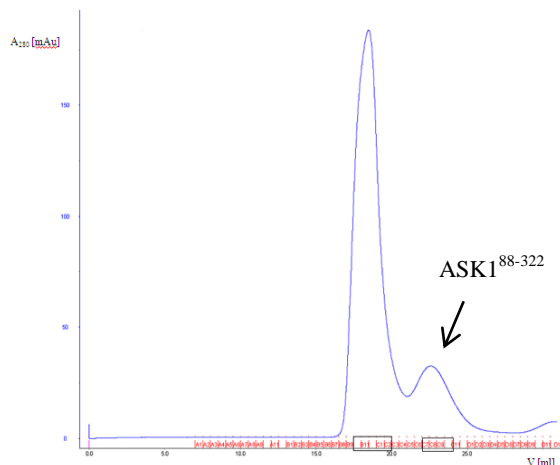
Obr. 4.9: 15% SDS-PAGE gel fragmentu ASK1⁸⁸⁻³⁰² po gelové permeační chromatografii. V první dráze jsou vidět zóny migrace standardu molekulových vah, dráhy označené jako B10-D5 korespondují s jímánymi frakcemi označenými černým rámečkem na obr. 4.8.



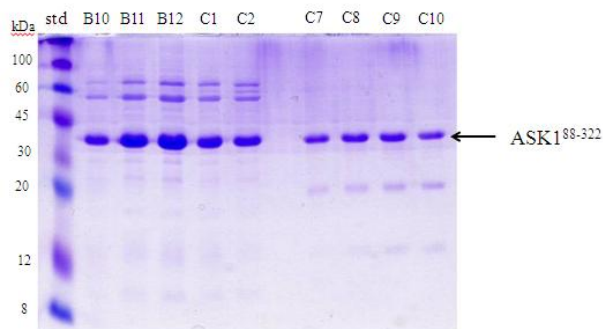
Obr. 4.10: Eluční profil N-terminálního fragmentu ASK1⁴⁶⁻³²² po gelové permeační chromatografii na koloně Superdex 200 10/600. Modrá křivka označuje závislost absorbance eluátu při vlnové délce 280 nm na elučním objemu. Lokální maximum označené šipkou značí N-terminální fragment ASK1⁴⁶⁻³²². Dvě spojená lokální maxima značí nedokonalé oddělení agregátů a dalších vysokomolekulárních nečistot z roztoku požadovaného proteinu. V černých rámečcích jsou označeny jímání frakce.



Obr. 4.11: 15% SDS-PAGE gel fragmentu ASK1⁴⁶⁻³²² po gelové permeační chromatografii. V první dráze jsou vidět zóny migrace standardu molekulových vah, dráhy označené jako B9-B12 a C4-C7 korespondují s jímáními frakcemi označenými černými rámečky na obr. 4.10.



Obr. 4.12: Eluční profil N-terminálního fragmentu ASK1⁸⁸⁻³²² po gelové permeační chromatografii na koloně Superdex 200 10/600. Modrá křivka označuje závislost absorbance eluátu při vlnové délce 280 nm na elučním objemu. Lokální maximum označené šipkou značí N-terminální fragment ASK1⁸⁸⁻³²². Dvě spojitá lokální maxima značí nedokonalé oddělení agregátů a dalších vysokomolekulárních nečistot z roztoku požadovaného proteinu. V černých rámečkách jsou označeny jímání frakce.



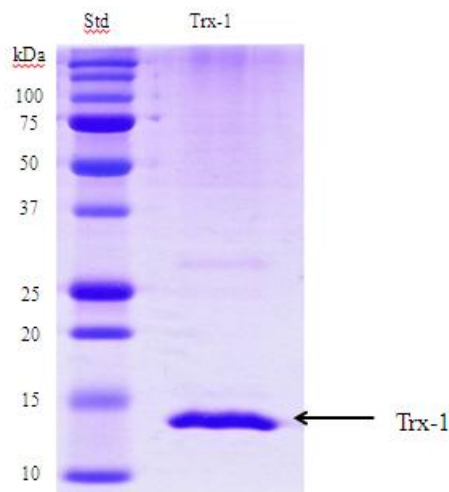
Obr. 4.13: 15% SDS-PAGE gel fragmentu ASK1⁴⁶⁻³²² po gelové permeační chromatografii. V první dráze jsou vidět zóny migrace standardu molekulových vah, dráhy označené jako B10-C2 a C7-C10 korespondují s jímáními frakcemi označenými černými rámečky na obr. 4.12.

4.3 Purifikace Trx-1

Trx-1 byl exprimován a následně izolován jako fusní protein s N-terminální histidinovou kotvou. Exprese a purifikace byla provedena postupem popsáním v kapitole 3.2.3, str. 41.

4.3.1 Niklová chelatační chromatografie

Niklová chelatační chromatografie byla provedena postupem popsáním v kapitole 3.2.3.3, str. 42. Při eluci roztoku Trx-1 z kolony byl tento roztok jímán do rezervoáru, který obsahoval 10 ml dialyzačního pufru (viz tab. 3.24, str. 40), což zajistilo vyšší stabilitu proteinu při následné dialýze. Vzorek tohoto roztoku byl analyzován pomocí SDS-PAGE (viz kapitola 3.2.2.4, str. 37) a její výsledek je zobrazen na obr. 4.14.

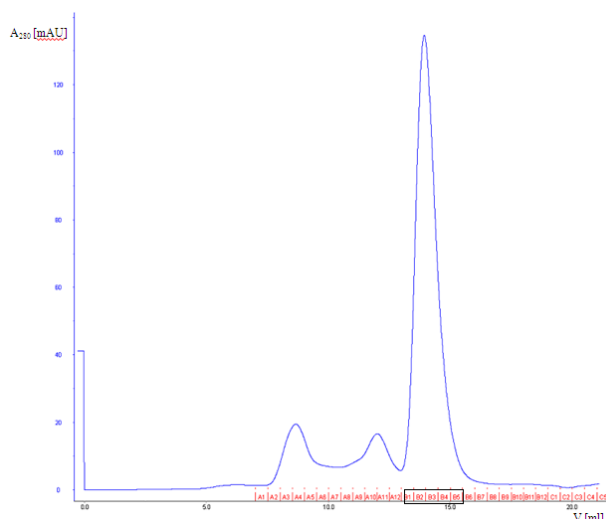


Obr. 4.14: 15% SDS-PAGE gel proteinu Trx-1 po niklové chelatační chromatografii. V první dráze jsou vidět zóny migrace standardu molekulových vah, druhá dráha obsahuje kýžený protein Trx-1, jehož predikovaná relativní molekulová hmotnost je 12989.

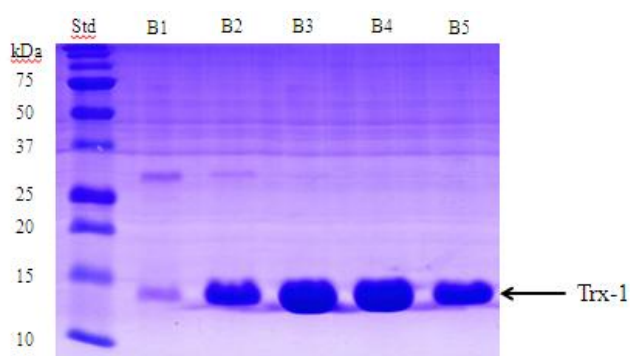
4.3.2 Gelová permeační chromatografie

Druhým isolačním krokem při purifikaci Trx-1 byla gelová permeční chromatografie. Postup, kterým byla provedena, je uveden v kapitole 3.2.3.5 na str. 43.

Pro získání čistého Trx-1 použita kolona Superdex 75 10/300. Z chromatogramu, který obsahuje lokální maximum definující Trx-1 (obr. 4. 15, str. 59) bylo zjištěno, ve kterých frakcích se žádaný protein nachází. Frakce byly sbírány po 0,5 ml. Po analýze vzorků na SDS-PAGE byly sbírané frakce sloučeny, byla změřena proteinová koncentrace a purifikovaný protein byl uchován při -80 °C pro další experimenty. Celkový výtěžek proteinu Trx-1 ze 3 l LB média byl 3,3 mg.



Obr. 4.15: Eluční profil Trx-1 po gelové permeační chromatografii na koloně Superdex 75 10/300. Modrá křivka označuje závislost absorbance eluátu při vlnové délce 280 nm na elučním objemu. Lokální maximum označené šipkou značí Trx-1. Další dvě lokální maxima značí agregáty a další vysokomolekulární nečistoty, které byly při této metodě odděleny z roztoku požadovaného proteinu. V černém rámečku jsou označeny frakce jímány pro další experimenty.



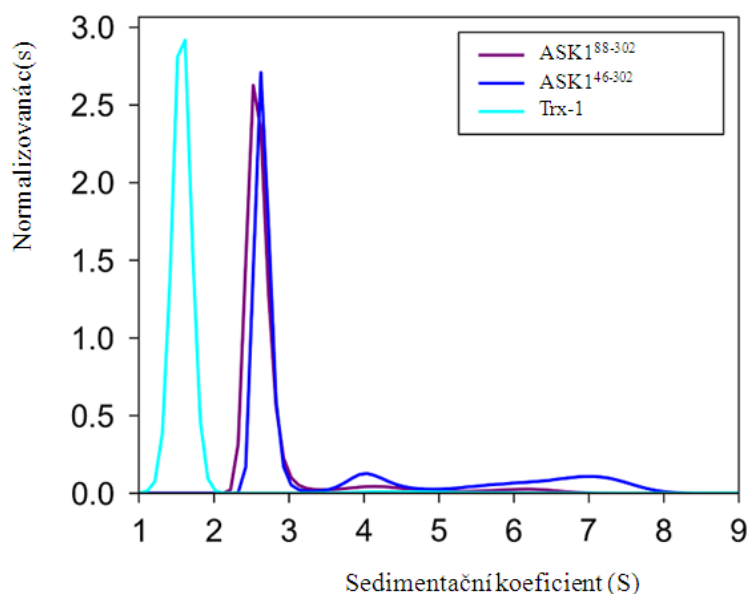
Obr. 4.16: 15% SDS-PAGE gel Trx-1 po gelové permeační chromatografii. V první dráze jsou vidět zóny migrace standardu molekulových vah, dráhy označené jako B1-B5 korespondují s jímány frakcemi označenými černým rámečkem na obr. 4.15.

4.4 Biofyzikální charakterizace ASK146-302 a ASK188-302

4.4.1 AUC c(s) distribuce

Prvním krokem při biofyzikální charakterizaci připravených proteinů byla AUC a její metoda sedimentačních rychlostí. Její princip byl popsán v kapitole 3.2.4.2, str. 45.

K práci byla použita analytická ultracentrifuga ProteomLab™ XL-I (Beckman Coulter, USA). Závislost normalizovaných distribucí sedimentačních koeficientů na sedimentačních koeficientech připravených proteinů je zobrazena na obr. 4.17. Výsledky z této analýzy ukázaly, že hodnota sedimentačního koeficientu (vážený průměr vztažený na teplotu 20 °C) pro samotný Trx-1 je 1,57 S (tomu odpovídá relativní M_w 13500), pro ASK1⁴⁶⁻³⁰² je 2,79 S (odpovídající relativní M_w je 33000) a pro ASK1⁸⁸⁻³⁰² je 2,73 S (odpovídající relativní M_w je 30600). Hodnoty získaných sedimentačních koeficientů dobře odpovídají relativním molekulovým hmotnostem studovaných proteinů vypočítaných ze sekvence, tedy: Trx-1 12989, ASK1⁴⁶⁻³⁰² 37989, ASK1⁸⁸⁻³⁰² 34110.

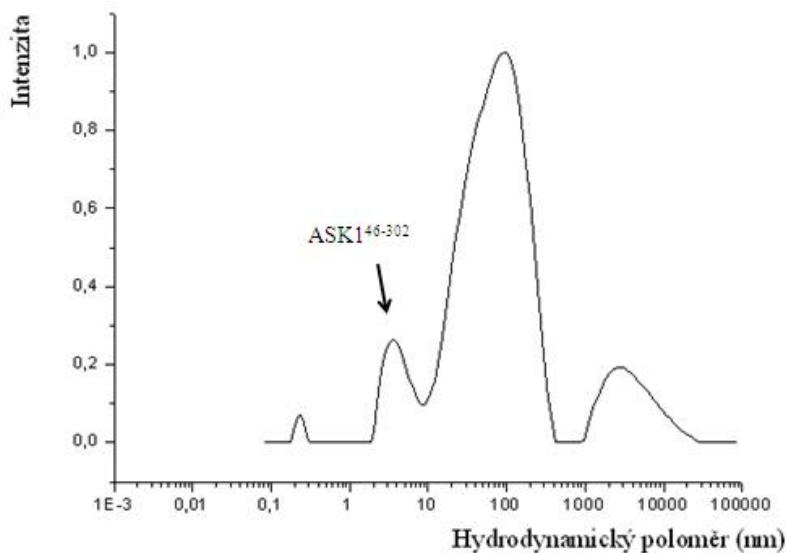


Obr. 4.17: Závislost normalizované distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ na sedimentačním koeficientu S pro samotné proteiny. Světle modrá křivka označuje Trx-1, fialová křivka označuje ASK1⁸⁸⁻³⁰² a tmavě modrá křivka patří ASK1⁴⁶⁻³⁰². Všechny proteiny měly 20 μ M koncentraci.

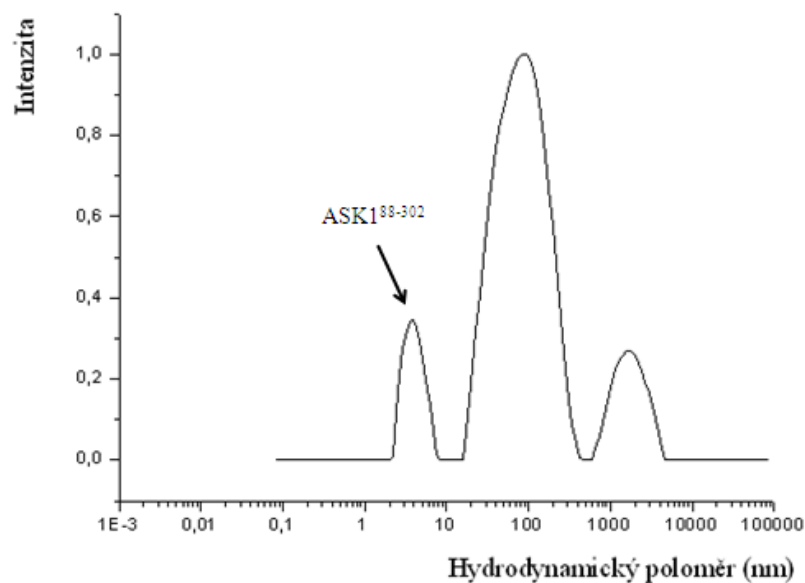
Z výsledků vyplývá, že v roztoku 20 μ M ASK1⁴⁶⁻³⁰² se tvoří agregáty, které jsou na obrázku 4. 17 zobrazeny jako další nezanedbatelná lokální maxima u křivky patřící ASK1⁴⁶⁻³⁰². V mnohem menší míře se ten samý jev projevil i u fragmentu ASK1⁸⁸⁻³⁰², zatímco u Trx-1 je výskyt agregátů téměř zanedbatelný.

4.4.2 Dynamický rozptyl světla

Další metodou zvolenou pro biofyzikální charakterizaci byl DLS, při kterém bylo cílem ověřit přítomnost vysokomolekulárních agregátů v roztoku N-terminálních fragmentů ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰². Princip metody a experimentální postup je popsán v kapitole 3.2.4.1 na str. 43. Z výsledků získaných touto technikou bylo zjištěno, že roztoky obou fragmentů ASK1 obsahují agregáty. Na obr. 4.18 a obr. 4.19 na str. 62 jsou zobrazeny závislosti intenzity rozptylu na hydrodynamickém poloměru částic v roztocích vzorků. Je nutné si uvědomit, že vysokomolekulární agregáty rozptylují mnohem silněji, než neagregovaný protein a proporce jednotlivých lokálních maxim neodpovídají relativnímu zastoupení jednotlivých forem v roztoku. Toto zastoupení je lépe patrné z výsledků analytické ultracentrifugace (viz obr. 4.17, str. 60).



Obr. 4.18: Distribuce hydrodynamických poloměrů N-terminálního fragmentu ASK1⁴⁶⁻³⁰². Oblast, ve které se vyskytuje monomerní fragment ASK1⁴⁶⁻³⁰² je označena šipkou. Výrazné lokální maximum odpovídá vysokomolekulárním agregátům, které se nacházely ve vzorku.

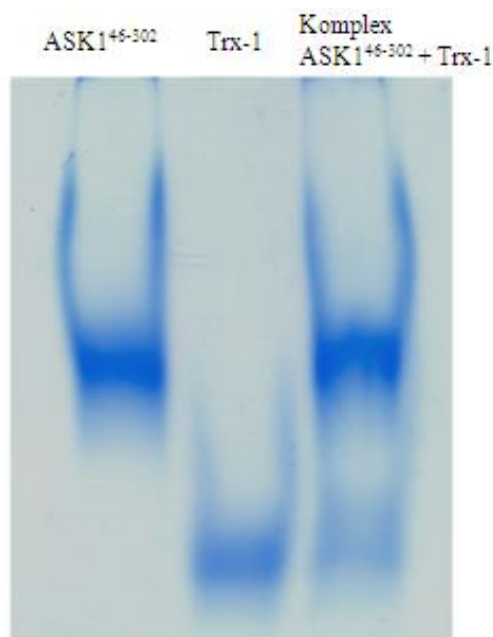


Obr. 4.19: Distribuce hydrodynamických poloměrů N-terminálního fragmentu ASK1⁸⁸⁻³⁰². Oblast, ve které se vyskytuje monomerní fragment ASK1⁸⁸⁻³⁰² je označena šipkou. Výrazné lokální maximum odpovídá vysokomolekulárním agregátům, které se nacházely ve vzorku.

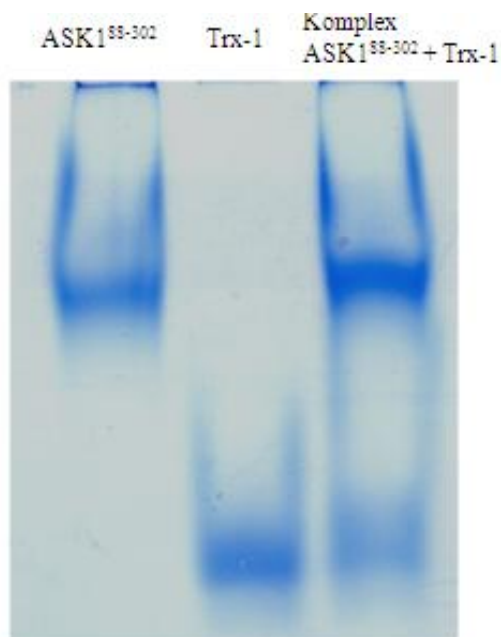
4.5 Ověření interakcí mezi fragmenty ASK⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰² a Trx-1

4.5.1 Nativní elektroforesa

Nativní elektroforesa je jednoduchá a relativně rychlá technika sloužící, kromě jiného, ke studiu interakcí mezi proteiny v nativním stavu. Pro tuto práci byla zvolena jako orientační metoda k přesnější metodě studia proteinových interakcí, analytické ultracentrifugaci (viz kapitola 3.2.4.2, str. 45). Výsledky z nativní elektroforesy ukázaly, že Trx-1 interaguje s N-terminální částí ASK1. Na obr. 4.20 resp. 4.21 na str. 63 jsou zobrazeny nativní 12% polyakrylamidové gely, na nichž je patrná tvorba komplexu mezi ASK1⁴⁶⁻³⁰² resp. ASK1⁸⁸⁻³⁰² a Trx-1. Tvorba komplexu plyne z poklesu intenzit zón odpovídajících Trx-1 v dráhách komplexů v porovnání s dráhami, kde byla nanášena stejná látková množství samotného Trx-1. Látková množství všech tří proteinů (ASK1, Trx-1 a komplex s molárním poměrem 1:1) byla vždy stejná, $320 \cdot 10^{-12}$ mol.



Obr. 4.20: 12% polyakrylamidový gel po nativní elektroforese. V první jamce je samotný N-terminální fragment ASK1⁴⁶⁻³⁰², v prostřední jamce samotný Trx-1 a do poslední jamky byl nanesen komplex ASK1⁴⁶⁻³⁰²/Trx-1. Proteiny byly na gel nanесeny ve stejném molárním množství.

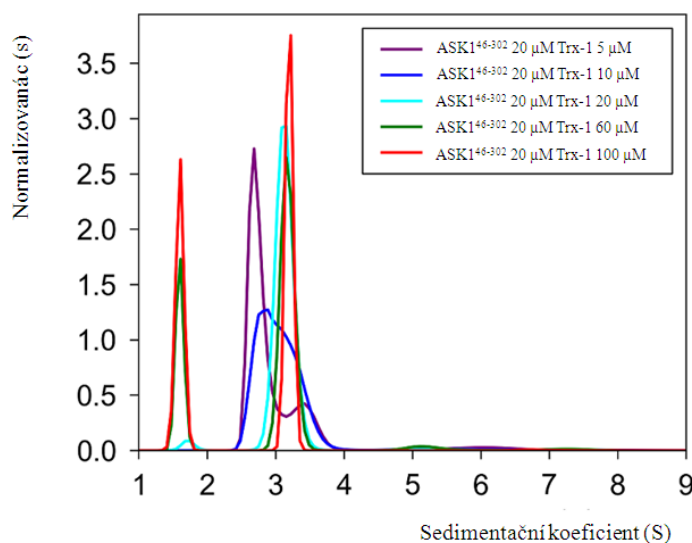


Obr. 4.21: 12% polyakrylamidový gel po nativní elektroforese. V první jamce je samotný N-terminální fragment ASK1⁸⁸⁻³⁰², v prostřední jamce samotný Trx-1 a do poslední jamky byl nanesen komplex ASK1⁸⁸⁻³⁰²/Trx-1. Proteiny byly na gel nanесeny ve stejném molárním množství.

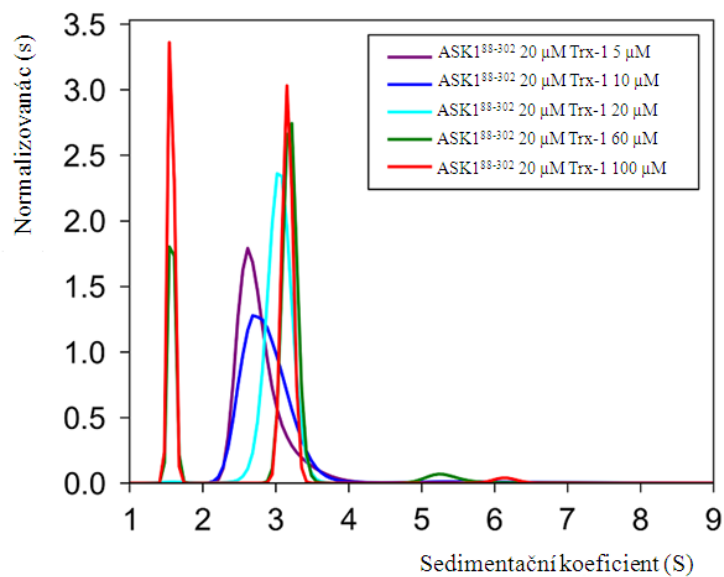
4.5.2 Analytická ultracentrifugace

Analytická centrifugace, konkrétně metoda sedimentačních rychlostí byla použita ke studiu interakcí mezi N-terminálními fragmenty ASK1⁴⁶⁻³⁰² resp. ASK1⁸⁸⁻³⁰² s Trx-1. Smyslem tohoto experimentu bylo ověřit výsledky získané při nativní elektroforese, tedy potvrdit vazbu Trx-1 na N-terminální část ASK1 a dále porovnat jejich vazebné afinity.

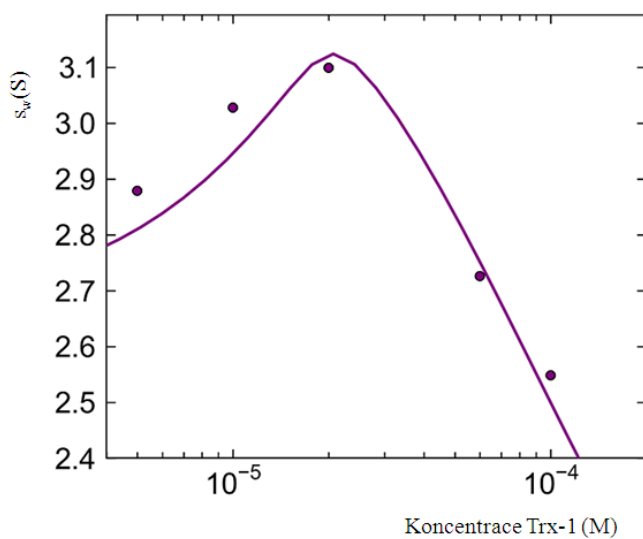
V rámci tohoto experimentu bylo připraveno pět vzorků pro každý komplex. Tyto vzorky obsahovaly vždy ASK1⁴⁶⁻³⁰² resp. ASK1⁸⁸⁻³⁰² o koncentraci 20 μM a různé koncentrace Trx-1 (5-100 μM). Poté byly změřeny $c(s)$ distribuce těchto směsí (obr. 4.22 a 4.23, str. 65) a ze získaných distribucí byly vypočteny vážené průměry sedimentačních koeficientů (s_w), které byly následně použity pro vytvoření tzv. vazebných isoterm (závislostí s_w na koncentraci Trx-1). Tyto vazebné isotermy jsou znázorněny na obrázcích 4.24, str. 65 a 4.25, str. 66. Analýzou získaných vazebných isoterm s použitím vazebného modelu reversibilní interakce $A + B \rightleftharpoons AB$ byla získána pro oba komplexy stejná hodnota zdánlivé disociační konstanty $K_D = (0,5 \pm 0,4) \times 10^{-6}$.



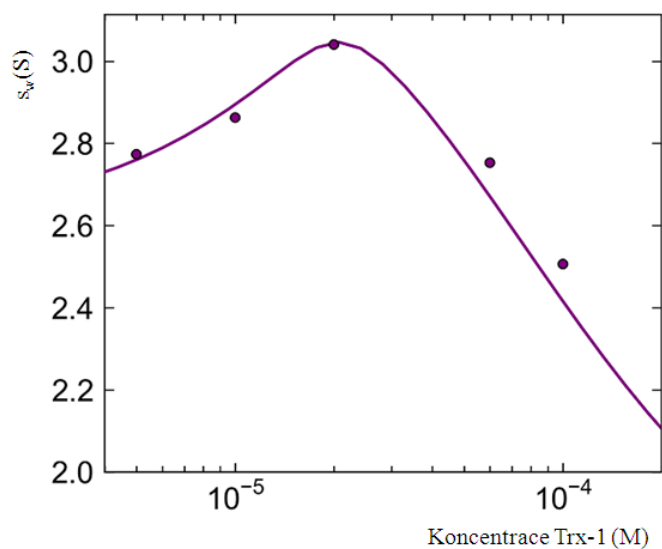
Obr. 4.22: Normalizované distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ pro různé směsi proteinů ASK1⁴⁶⁻³⁰² a Trx-1. Při experimentu byla použita konstantní koncentrace ASK1⁴⁶⁻³⁰² (20 μM) a různé koncentrace Trx-1 (5-100 μM).



Obr. 4.23: Normalizované distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ pro různé směsi proteinů $ASK1^{88-302}$ a $Trx-1$. Při experimentu byla použita konstantní koncentrace $ASK1^{88-302}$ ($20 \mu M$) a různé koncentrace $Trx-1$ ($5-100 \mu M$).



Obr. 4.24: Závislost vážených průměrů sedimentačních koeficientů s_w získaných ze sedimentačních experimentů se směsmi $ASK1^{46-302}$ ($20 \mu M$) a $Trx-1$ ($5-100 \mu M$) na koncentraci $Trx-1$.



Obr. 4.25: Závislost vážených průměrů sedimentačních koeficientů s_w získaných ze sedimentačních experimentů se směsí ASK1⁸⁸⁻³⁰² (20 μ M) a Trx-1 (5-100 μ M) na koncentraci Trx-1.

5. Diskuze

Tato diplomová práce byla vypracována za účelem studia interakcí mezi různě dlouhými fragmenty N-terminální části ASK1 s vazebným partnerem Trx-1 pro upřesnění polohy vazebného místa pro Trx-1 v molekule ASK1. Interakce mezi těmito proteiny je zásadní při regulaci MAP kinasové signalizační kaskády, která ovlivňuje buněčné odpovědi na stresové podněty přicházející z okolního prostředí buňky. Délky N-terminálních fragmentů ASK1 byly navrženy dle predikce vazebného místa pro Trx-1, která byla publikována v roce 2007 [18].

Prvním krokem této práce byla příprava rekombinantních DNA N-terminálních fragmentů ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰². DNA kódující tyto fragmenty lidské ASK1 byly vneseny do plasmidu pRSFDuet-1, který umožňuje následnou expresi rekombinantních proteinů jako fusionských proteinů, které na N-konci obsahují motiv šesti histidinů v řadě tzv. histidinovou kotvu a GB-1 protein. Histidinová kotva zjednodušuje purifikaci proteinu díky možnosti použití niklové chelatační chromatografie jako prvního purifikačního kroku. Protein GB-1 zvyšuje rozpustnost fusionského proteinu, čímž v podstatě pomáhá stabilizovat protein v roztoku. K vnesení sekvencí kódujících N-terminální fragmenty lidské ASK1, ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰², do plasmidu pRSFDuet-1 byly použity základní techniky molekulární biologie (transformace bakterií, PCR, štěpení restrikčními endonukleasami a ligace). Následné ověření nukleotidové sekvence připravených rekombinantních DNA posloužilo ke kontrole získaných sekvencí s publikovanými, čímž se předešlo chybám, kterými mohly být např. nežádoucí mutace nebo vnesení jiných než požadovaných sekvencí do plasmidu. Tato kontrola však prokázala, že do plasmidu pRSFDuet-1 byly vneseny správné sekvence N-terminálních fragmentů ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰². Tyto dvě připravené rekombinantní DNA však nebyly jedinými, které byly následně použity pro další experimenty. Do plasmidu pRSFDuet-1 byly ještě vneseny další dva N-terminální fragmenty ASK1, ASK1⁴⁶⁻³²² a ASK1⁸⁸⁻³²², ty však byly připraveny Mgr. Daliborem Koškem a expresní konstrukt Trx-1 (mutant Cys⁷³Ser) v plasmidu pQ-30 byl získán od RNDr. Veroniky Obšilové, Ph.D.

Dalším krokem byla exprese a purifikace všech výše zmíněných N-terminálních fragmentů ASK1 a proteinu Trx-1. Proteiny byly izolovány ze 3 l LB média a prvním purifikačním krokem byla vždy niklová chelatační chromatografie. Míra exprese a čistoty všech proteinů byla po tomto prvním purifikačním kroku zkontrolována pomocí SDS-PAGE a získané výsledky bylo možné interpretovat tak, že N-terminální fragmenty

ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰² a protein Trx-1 byly exprimovány velmi dobře a jejich rozpustnost a čistota byly relativně vysoké. Bohužel, N-terminální fragmenty ASK1⁴⁶⁻³²² a ASK1⁸⁸⁻³²² vykazovaly malou rozpustnost a jejich koncentrace v rozpustné frakci tak byla velmi nízká. Jako druhý a poslední purifikační krok byla zvolena gelová permeační chromatografie. Touto metodou se podařilo získat velmi čisté fragmenty ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰² a také protein Trx-1. Bohužel, fragmenty ASK1⁴⁶⁻³²² a ASK1⁸⁸⁻³²² se při této metodě ukázaly být velice nestabilní, protože množství agregátů získaných při eluci z kolony bylo neúměrně vysoké k množství požadovaných fragmentů ASK1⁴⁶⁻³²² a ASK1⁸⁸⁻³²² a můžeme tedy konstatovat, že tyto fragmenty vlastně nebylo možné od vzniklých agregátů separovat, protože eluční profily vykazovaly dvě spojitá lokální maxima. Z těchto výsledků vyplynulo, že k dalšímu studiu byly použity pouze fragmenty ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰² a protein Trx-1.

Fragmenty ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰² byly studovány základními biofyzikálními metodami, kterými byly analytická ultracentrifugace a dynamický rozptyl světla. Při analytické centrifugaci bylo pozorováno, že při vyšších koncentracích část N-terminálních fragmentů ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰² v roztoku tvořila agregáty. Díky tomu byl proveden ještě další experiment, dynamický rozptyl světla, jehož výsledky potvrdily tuto agregaci zkoumaných fragmentů ASK1 již při koncentracích 1 mg/ml. Tato skutečnost může být způsobena C-terminální částí připravených fragmentů ASK1, která obsahuje část N-terminální coiled-coil domény ASK1, a proto se v ní nachází relativně mnoho hydrofobních aminokyselin. Coiled-coil doména je zajímavý strukturní motiv, ve kterém jsou dva či více α -helixů stočené okolo sebe. Tato doména má charakteristické opakující se schéma *a-b-c-d-e-f-g*, kde *a* a *d* označují hydrofobní aminokyseliny. Tím, že se α -helixy stáčí okolo sebe, dochází k pohřbení hydrofobního povrchu a tedy ke vzniku termodynamické hnací síly pro oligomerizaci jednotlivých molekul proteinu [41]. Tato teorie by tedy mohla naznačovat důvod agregace N-terminálních fragmentů ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰² při vyšších koncentracích těchto proteinů v roztoku a zároveň vysokou agregaci neúspěšně purifikovaných fragmentů ASK1⁴⁶⁻³²² a ASK1⁸⁸⁻³²², které na svém C-konci obsahují ještě delší část N-terminální coiled coil domény molekuly ASK1 než fragmenty ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰². Existuje domněnka, že C-terminální část těchto fragmentů ASK1 kinasy je zásadní při jejich agregaci, neboť v přítomnosti C-terminální histidinové kotvy je minimálně fragment ASK1⁸⁸⁻³⁰² více rozpustný a stabilní [K. Pšenáková, nepublikovaná data]. Do budoucna by tedy bylo zajímavé porovnat stabilitu a rozpustnost N-terminálních

fragmentů ASK1 s histidinovou kotvou na N- a C-konci a také ověřit interakce s lidským Trx-1.

K ověření interakcí mezi Trx-1 a N-terminálními fragmenty ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰² byly použity dvě vhodné techniky. První z nich byla analytická ultracentrifugace, kterou bylo zjištěno, že oba fragmenty, tedy ASK1⁴⁶⁻³⁰² i ASK1⁸⁸⁻³⁰², váží Trx-1 se stejnou vazebnou afinitou. Pro oba fragmenty byla získána hodnota zdánlivé disociační konstanty, $K_D = (0,5 \pm 0,4) \times 10^{-6}$. Tento výsledek ukázal, že vazebné místo pro lidský Trx-1 se v molekule lidské ASK1 nachází na jejím N-konci, konkrétně v oblasti aminokyselin 88-302. Interakce byly následně ověřeny ještě pomocí nativní elektroforesy, což je ovšem metoda mnohem méně sofistikovaná než analytická ultracentrifugace, nicméně i z jejích výsledků lze vyvodit závěr, že se lidská forma Trx-1 opravdu váže na N-terminální část lidské ASK1, konkrétně na fragmenty ASK1⁴⁶⁻³⁰² i ASK1⁸⁸⁻³⁰². Hodnotu vazebné afinity však z výsledků z nativní elektroforesy zjistit nelze.

Závěrem lze říci, že vazebné místo pro Trx-1 v molekule ASK1 se nachází v oblasti 88-302 a že tato oblast vytváří doménu, kterou lze samostatně připravit a použít jako model pro studium interakcí mezi ASK1 a Trx-1.

6. Závěr

- Byly připraveny expresní konstrukty ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰² v plasmidu pRSFDuet-1.
- Byly exprimovány a purifikovány fragmenty ASK1⁴⁶⁻³⁰² a ASK1⁸⁸⁻³⁰² jako fusní proteiny s N-terminální histidinovou kotvou a GB-1 proteinem.
- Byl exprimován a purifikován Trx-1 jako fusní protein s N-terminální histidinovou kotvou.
- Byla provedena biofyzikální charakterizace připravených proteinů pomocí analytické ultracentrifugace (metodou sedimentačních rychlostí) a dynamických rozptylem světla. Obě metody ukázaly, že připravené vzorky fragmentů ASK1 obsahují určité množství agregátů.
- Interakce mezi připravenými fragmenty N-terminální části ASK1 a Trx-1 v redukčních podmínkách byly ověřeny pomocí analytické ultracentrifugace a nativní elektroforesy.

Seznam citované literatury

- [1] Lodish, H. et al.: Protein Structure and Function, v knize Molecular and Cell Biology (W. H. Freeman and Company), 6th edition New York, p. 91-92 (2008)
- [2] <http://www.scq.ubc.ca/protein-phosphorylation-a-global-regulator-of-cellular-activity/>, převzato dne 17. 7. 2014
- [3] Kawarazaki, Y., Ichijo, H., Naguro, I.: Expert Opinion on Therapeutic Targets, 18 (6), p. 1-14 (2014)
- [4] Widmann, C., Gibson, S., Jarpe M. B., Johnson G.L.: Physiological Reviews, 79, p. 143-180 (1999)
- [5] Ichijo, H.: Oncogene, 18, p.6087-6093 (1999)
- [6] Matsukawa, J., Matsuzawa, A., Takeda, K., Ichijo, H.: The Journal of Biochemistry, 136, p. 261-265 (2004)
- [7] Kyriakis, J. M., Avruch, J.: Physiological Reviews, 81, p. 807-869, (2001)
- [8] Cuevas, B. D., Abell, A.N., Johnson, G. L.: Oncogene, 26, p. 3159-3171 (2007)
- [9] Nagai, H., Noguchi, T., Takeda, K., Ichijo, H.: Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 40, p. 1-6 (2007)
- [10] Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., Gotoh, Y.: Science, 275, p. 90-94 (1997)
- [11] Takeda, K., Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Ichijo, H.: Cell Structure and Function, 28, p.23-29 (2003)
- [12] <http://www.biosignaling.com/content/7/1/9/figure/F1>, převzato dne 17. 7. 2014
- [13] Fujino, G., Noguchi, T., Takeda, K., Ichijo, H.: Seminars in Cancer Biology, 16, p. 427-435 (2006)
- [14] Liu, Y., Min, W.: Circulation Research, 90, p. 1259-1266 (2002)
- [15] Shiizaki, S., Naguro, I., Ichijo, H.: Advances in Biological Regulation, 53, p. 135-144 (2013)
- [16] Bunkonczy, G., Salah, E., Filippakopoulos, P., Fedorov, O., Müller, S., Sobott, F., Parker, S. A., Zhang, H., Min, W., Turk, B. E., Knapp, S.: Structure, 15, p.1215-1226 (2007)
- [17] Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., Ichijo, H.: EMBO reports, 2, p. 222-228 (2001)
- [18] Fujino, G., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Yamauchi, S., Saitoh, M., Takeda, K., Ichijo, H.: Molecular and Cellular Biology, 27, p. 8152-8163 (2007)

- [19] Taylor, S. S., Ilouz, R., Zhang, P., Kornev, P. A.: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, p. 646-658 (2012)
- [20] Noguchi, T., Takeda, K., Matsuzawa, A., Saegusa, K., Nakano, H., Gohda, J., Inoue, J., Ichijo, H.: *The Journal of Biological Chemistry*, 280, p. 37033-37040 (2005)
- [21] Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K., Ichijo, H.: *Molecular Cell*, 2, p. 389-395 (1998)
- [22] Maruyama, T., Araki, T., Kawarazaki, Y., Naguro, I., Heynen, S., Aza-Blanc, P., Ronai, Z., Matsuzawa, A., Ichijo, H.: *Science Signaling*, 7, p. ra8 (2014)
- [23] Nagai, H., Noguchi, T., Homma, K., Katagiri, K., Takeda, K., Matsuyawa, A., Ichijo, H.: *Molecular Cell*, 36, p. 805-818 (2009)
- [24] Obsil, T., Obsilova, V.: *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22, p. 663-672 (2011)
- [25] Zhang, L., Chen, J., Fu, H.: *Cell Biology*, 96, p. 8511-8515 (1999)
- [26] Goldmann, E. H., Chen, L., Fu, H.: *The Journal of Biological Chemistry*, 279, p. 10442-10449 (2004)
- [27] Powis, G., Montfort, W. R.: *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41, p. 261-295 (2001)
- [28] Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., Ichijo, H.: *The EMBO Journal*, 17, p. 2596-2606 (1998)
- [29] Holmgren, A.: *Antioxidants and Redox Signaling*, 2, p.811-820 (2000)
- [30] Holmgren, A.: *Structure*, 3, p.239-243 (1995)
- [31] Eklund, H., Gleason, F. K., Holmgren, A.: *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 11, p. 13-28
- [32] Arner, E. S. J., Holmgren, A.: *European Journal of Biochemistry*, 267, p. 6102-6109 (2000)
- [33] www.pymol.org
- [34] <http://biochem.web.utah.edu/hill/links/pRSFDuet-1.pdf> , převzato dne 12. 7. 2014
- [35] Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., Bairoch, A.: *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*, v knize *The Proteomics Protocols Handbook* (Humana Press), p. 571-607 (2005)
- [36] Veisova, D., Rezabkova, L., Stepanek, M., Novotna, P., Herman, P., Vecer, J., Obsil, T., Obsilova, V.: *Biochemistry*, 49, p. 3853-3861 (2010)
- [37] <http://sednterp.unh.edu/>

- [38] Schuck, P.: *Biophysical Journal*, 78, p. 1606-1619 (2000)
- [39] Dam, J., Velikovsky, C. A., Mariuzza, R. A., Urbanke, C., Schuck, P.: *Biophysical Journal*, 89, p. 619-634 (2005)
- [40] McGuffin, L. J., Bryson, K., Jones, D. T.: *Bioinformatics Application Note*, 16, p.404-405 (2000)
- [41] Mason, J. M., Arndt, K. M.: *ChemBioChem*, 5, p.170-176 (2004)

Příloha 1

- **Sekvence aminokyselin lidské ASK1 (převzato z databáze PubMed a upraveno)**

MSTEADDEGIT FSVPPFAPSG FCTIPEGGIC RRGGAHAVGE GEEHQLPPPP
PGSFWNVESA AAPGIGCPAA TSSSSATRGR GSSVGGGSRR TTVAYVINEA
SQGQLVVAES EALQSLREAC ETVGATLETL HFGKLDGET TVLDRFYHAD
IAVVEMSDAF RQPSLFYHLG VRESFSMANN IILYCDTNSD SLQSLKEIIC
QKNTMCTGNY TFVPYMITPH NKVYCCDSSF MKGLTELMQP NFELLLGPIC
LPLVDRFIQL LKVAQASSSQ YFRESILNDI RKARNLYTGK ELAAELARIR
QRVDNIEVLT ADIVINLLLS YRDIQDYDSI VKLVETLEKL PTFDLASHHH
VKFHYAFALN RRNLPGDRAK ALDIMIPMVQ SEGQVASDMY CLVGRIYKDM
FLDSNFTDTE SRDHGASWFK KAFESEPTLQ SGINYAVLLL AAGHQFESSF
ELRKVGVKLS SLLGKKGNLE KLQSYWEVGF FLGASVLAND HMRVIQASEK
LFKLTTPAWY LKSIVETILI YKHFVKLTTE QPVAKQELVD FWMDFLVEAT
KTDVTVVRFV VLILEPTKIY QPSYLSINNE VEEKTISIWH VLPDDKKGIIH
EWNFSASSVR GVSISKFEER CCFLYVLHNS DDFQIYFCTE LHCKKFFEMV
NTITEEKGRS TEEGDCESDL LEYDYEYDEN GDRVVLGKGT YGIVYAGRDL
SNQVRIAIKE IPERDSRYSQ PLHEEIALHK HLKHKNIYQY LGSFSENGFI
KIFMEQVPGG SLSALLRSKW GPLKDNEQTI GFYTKQILEG LKYLHDNQIV
HRDIKGDNVL INTYSGVLKI SDFGTSKRLA GINPCTETFT GTLQYMAPEI
IDKGPRGYGK AADIWSLGCT IIEMATGKPP FYELGEPQAA MFKVGMFKVH
PEIPESMSAE AKAFILKCFE PDPDKRACAN DLLVDEFLKV SSKKKKTQPK
LSALSAGSNE YLRS/RIPSL PVPVLVEDTS SSSEYGSVSP DTELKVD PFS
FKTRAKSCGE RDVKGIRTLF LGIPDENFED HSAPPSPEEK DSGFFMLRDK
SERRATLHRI LTEDQDKIVR NLMESLAQGA EEPKWKWEHI TTLIASLREF
VRSTDRKIIA TTLSKLLKLEL DFDSHGISQV QVVLFGFQDA VNKVLRNHNI
KPHWMFALDS IIRKAVQTAI TILVPELRPH FSLASESDTA DQEDLDVEDD
HEEQPSNQTV RRPQAVIEDA VATSGVSTLS STVSHDSQSA HRSLNVQLGR
MKIETNRLLE ELVRKEKELQ ALLHRAIEEK DQEIHKHLKLLK SQPIEIPELP
VFHLNSSGTN TEDSELTDWL RVNGAEDTI SRFLAEDYTL LDVLYYVTRD
DLKCLRLRGG MLCTLWKAI I DFRNKQT-LL LNL

- **Sekvence aminokyselin N-terminálního fragmentu ASK1, ASK1⁴⁶⁻³⁰² s histidinovou kotvou a GB-1 proteinem na N-konci (převzato z databáze ProtParam a upraveno)**

MNSSHHHHHH MQYKLILNGK TLKGETTTEA VDAATAEKVF KQYANDNGVD
 GEWTYDDATK TFTVTEENLY FQGAMGSLPP PPPGSFWNVE SAAAPGIGCP
 AATSSSSATR GRGSSVGGGS RRTTVAYVIN EASQGQLVVA ESEALQSLRE
 ACETVGATLE TLHFGKLDLF ETTVLDRFYN ADIAVVEMSD AFRQPSLFYH
 LGVRESFSMA NNIILYCDTN SDLQSLKEI ICQKNTMCTG NYTFVPYMIT
 PHNKVYCCDS SFMKGLTELM QPNFELLGIP ICLPLVDRFI QLLKVAQASS
 SQYFRESILN DIRKARNLYT GKELAAELAR IRQR

V sekvenci je modře označena histidinová kotva, za níž následuje GB-1 protein. Samotný N-terminální fragment ASK1⁴⁶⁻³⁰² je označen červeně.

- **Sekvence aminokyselin N-terminálního fragmentu ASK1, ASK1⁸⁸⁻³⁰² s histidinovou kotvou a GB-1 proteinem na N-konci (převzato z databáze ProtParam a upraveno)**

MNSSHHHHHH MQYKLILNGK TLKGETTTEA VDAATAEKVF KQYANDNGVD
 GEWTYDDATK TFTVTEENLY FQGAMGSSRR TTVAYVINEA SQGQLVVAES
 EALQSLREAC ETVGATLETL HFGKLDLFGET TVLDRFYNAD IAVVEMSDAF
 RQPSLFYHLG VRESFSMANN IILYCDTNSD SLQSLKEIIC QKNTMCTGNY
 TFVPYMITPH NKVYCCDSSF MKGLTELMQP NFELLGPIIC LPLVDRFIQL
 LKVAQASSSQ YFRESILNDI RKARNLYTGK ELAAELARIR QR

V sekvenci je modře označena histidinová kotva, za níž následuje GB-1 protein. Samotný N-terminální fragment ASK1⁸⁸⁻³⁰² je označen červeně.

- **Sekvence aminokyselin N-terminálního fragmentu ASK1, ASK1⁴⁶⁻³²² s histidinovou kotvou a GB-1 proteinem na N-konci (převzato z databáze ProtParam a upraveno)**

MNSSHHHHHH MQYKLILNGK TLKGETTTEA VDAATAEKVF KQYANDNGVD
 GEWTYDDATK TFTVTEENLY FQGAMGSLPP PPPGSFWNVE SAAAPGIGCP
 AATSSSSATR GRGSSVGGGS RRTTVAYVIN EASQGQLVVA ESEALQSLRE
 ACETVGATLE TLHFGKLDLF ETTVLDRFYN ADIAVVEMSD AFRQPSLFYH
 LGVRESFSMA NNIILYCDTN SDLSLQSLKEI ICQKNTMCTG NYTFVPYMIT
 PHNKVYCCDS SFMKGLTELM QPNFELLGIP ICLPLVDRFI QLLKVAQASS
 SQYFRESILN DIRKARNLYT GKELAAELAR IRQRVDNIEV LTADIVINLL
 LSYR

V sekvenci je modře označena histidinová kotva, za níž následuje GB-1 protein. Samotný N-terminální fragment ASK1⁴⁶⁻³²² je označen červeně.

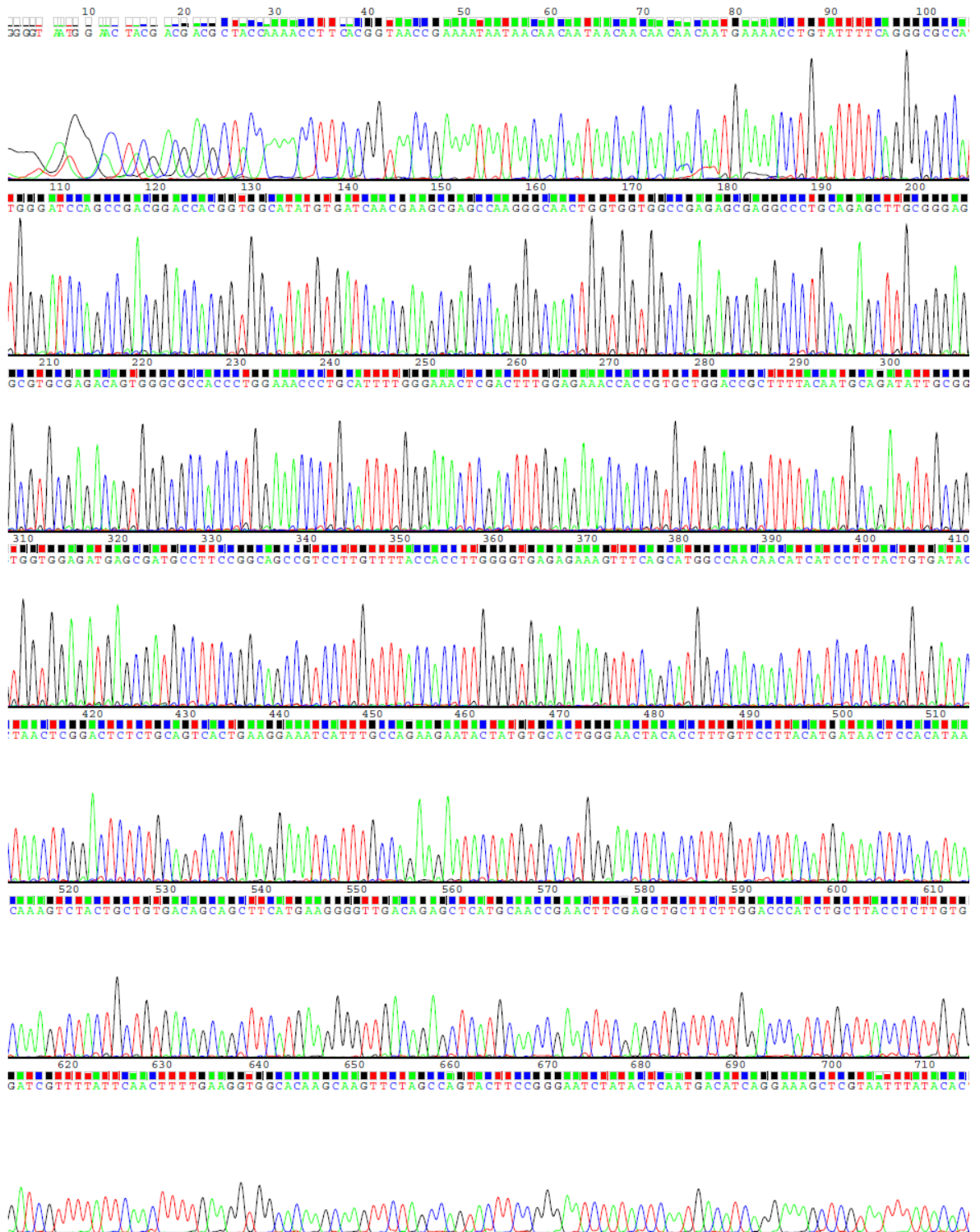
- **Sekvence aminokyselin N-terminálního fragmentu ASK1, ASK1⁸⁸⁻³²² s histidinovou kotvou a GB-1 proteinem na N-konci (převzato z databáze ProtParam a upraveno)**

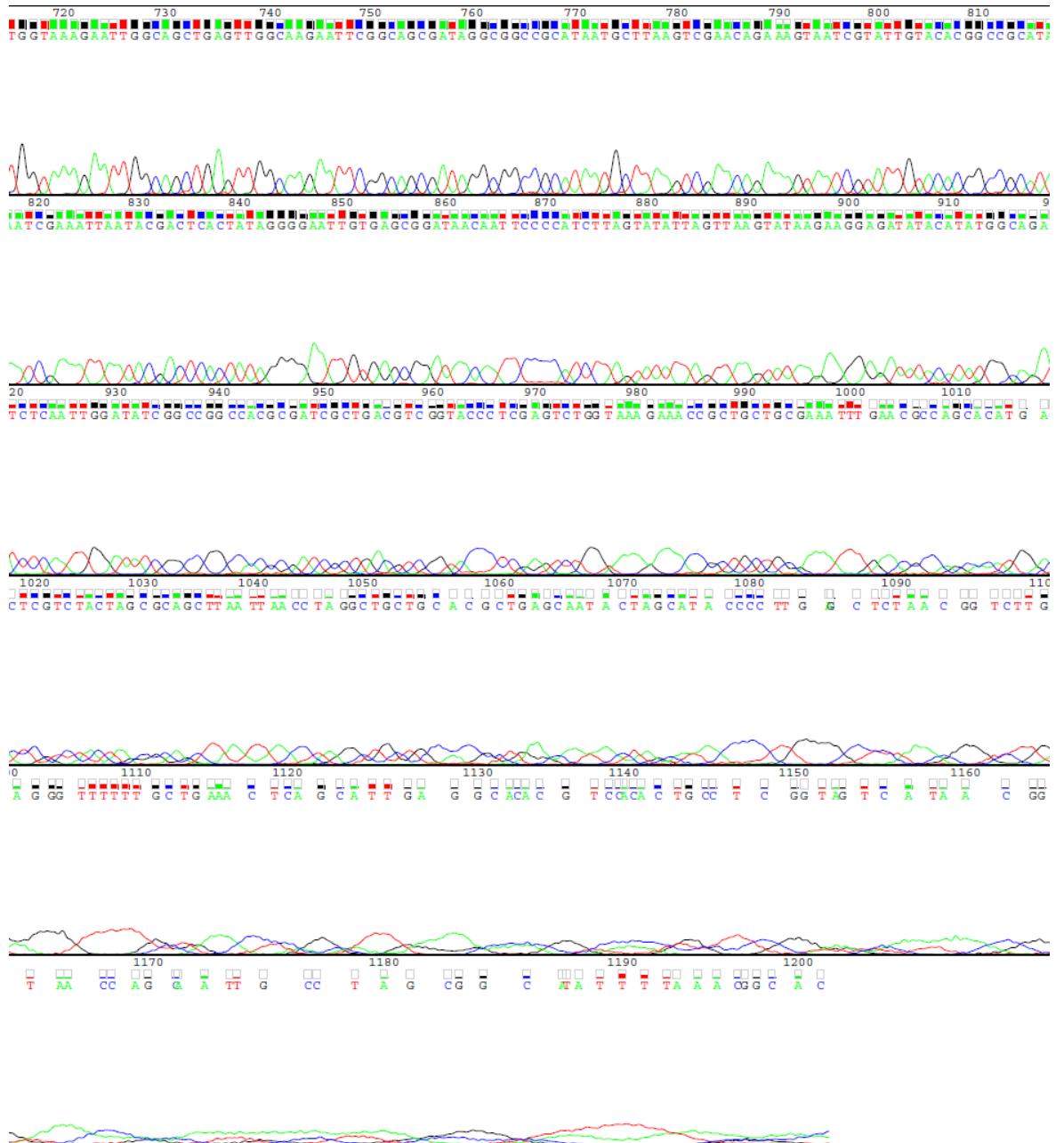
MNSSHHHHHH MQYKLILNGK TLKGETTTEA VDAATAEKVF KQYANDNGVD
 GEWTYDDATK TFTVTEENLY FQGAMGSSRR TTVAYVINEA SQGQLVVAES
 EALQSLREAC ETVGATLETL HFGKLDLFGET TVLDRFYNAD IAVVEMSDAF
 RQPSLFYHLG VRESFSMANN IILYCDTNSD SLQSLKEIIC QKNTMCTGNY
 TFVPYMITPH NKVYCCDSSF MKGLTELMQP NFELLGPIIC LPLVDRFIQL
 LKVAQASSSQ YFRESILNDI RKARNLYTGK ELAAELARIR QRVDNIEVLT
 ADIVINLLLS YR

V sekvenci je modře označena histidinová kotva, za níž následuje GB-1 protein. Samotný N-terminální fragment ASK1⁸⁸⁻³²² je označen červeně.

Příloha 2

- Data získaná ze sekvenační analýzy pro N-terminální fragment ASK1⁸⁸⁻³⁰²



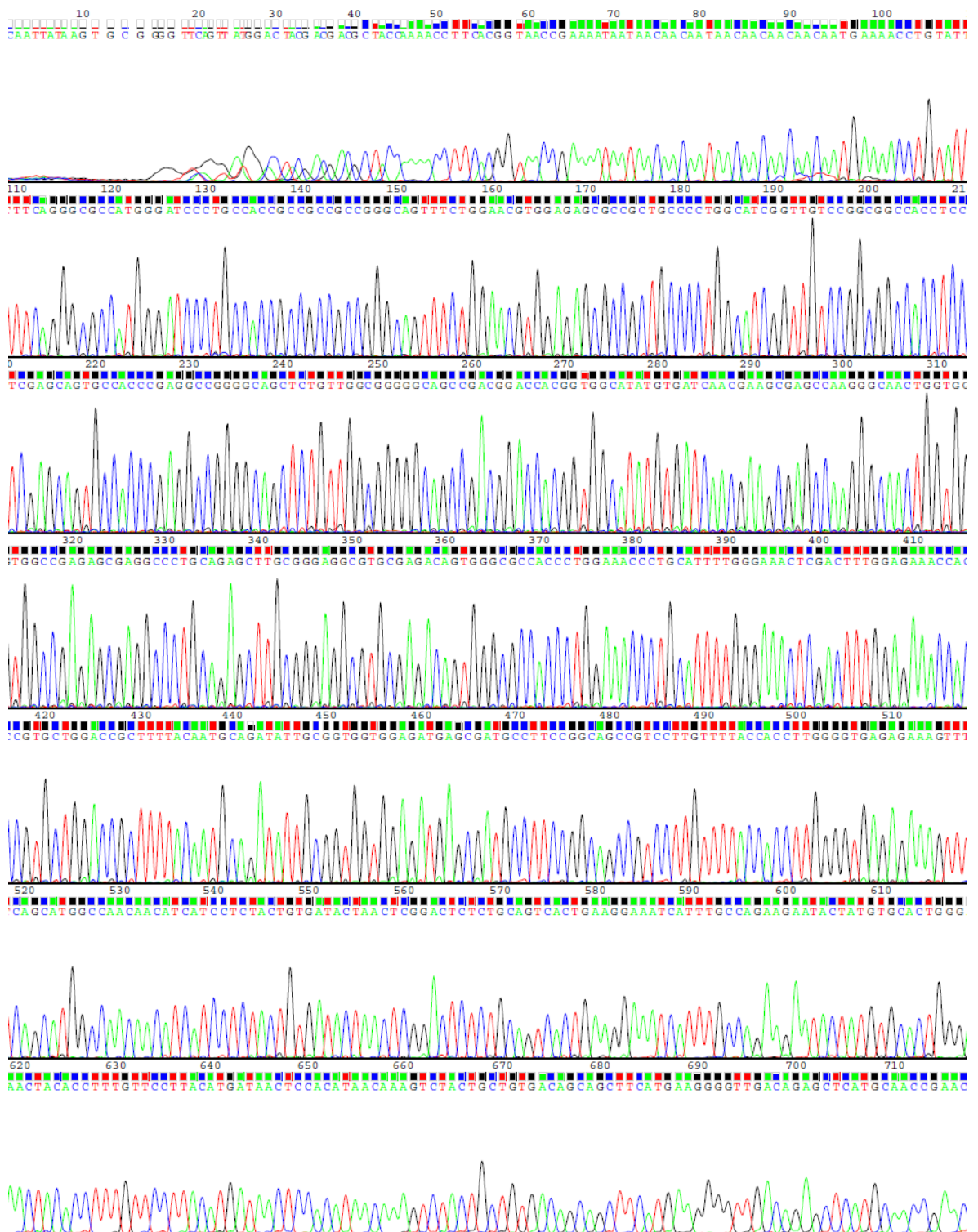


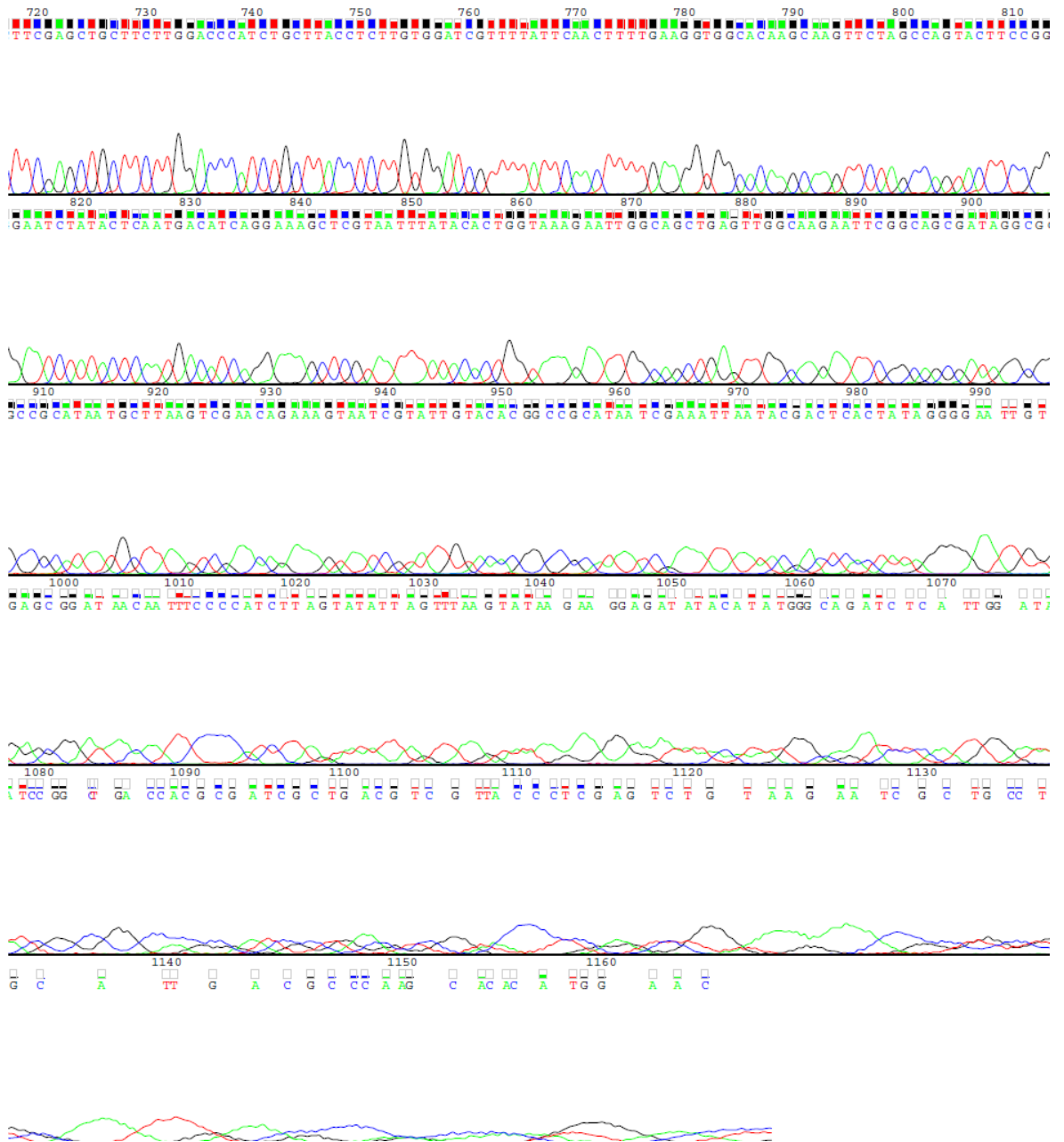
- **Výsledná sekvence konstruktů ASK1⁴⁶⁻³⁰² v pRSFDuet-1 (data ze sekvenční analýzy)**

CAATTATAAGTGCGGGGTTTCAGTTATGGACTACGACGACGCTACCAAAACCTTCACGGTAA
 CCGAAAATAATAACAACAATAACAACAACAATGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCAT
 GGGATCCCTGCCACCGCCGCCGGGCAGTTTCTGGAACGTGGAGAGCGCCGCTGCCCT
 GGCATCGGTTGTCCGGCGGCCACCTCCTCGAGCAGTGCCACCCGAGGCCGGGGCAGCTCTG
 TTGGCGGGGGCAGCCGACGGACCACGGTGGCATATGTGATCAACGAAGCGAGCCAAGGGCA
 ACTGGTGGTGGCCGAGAGCGAGGCCCTGCAGAGCTTGCGGGAGGCGTGCGAGACAGTGGGC
 GCCACCCTGGAAACCCTGCATTTTGGGAAACTCGACTTTGGAGAAACCACCGTGCTGGACC
 GCTTTTACAATGCAGATATTGCGGTGGTGGAGATGAGCGATGCCTTCCGGCAGCCGTCCTT
 GTTTTACCACCTTGGGGTGAGAGAAAGTTTTCAGCATGGCCAACAACATCATCCTCTACTGT
 GATACTAACTCGGACTCTCTGCAGTCACTGAAGGAAATCATTTGCCAGAAGAATACTATGT
 GCACTGGGAACTACACCTTTGTTTCCTTACATGATAACTCCACATAACAAAGTCTACTGCTG
 TGACAGCAGCTTCATGAAGGGGTTGACAGAGCTCATGCAACCGAACTTCGAGCTGCTTCTT
 GGACCCATCTGCTTACCTCTTGTGGATCGTTTTATTCAACTTTTGAAGGTGGCACAAGCAA
 GTTCTAGCCAGTACTTCCGGGAATCTATACTCAATGACATCAGGAAAGCTCGTAATTTATA
 CACTGGTAAAGAATTGGCAGCTGAGTTGGCAAGAATTCGGCAGCGATAGGCGGCCGCATAA
 TGCTTAAGTCGAACAGAAAGTAATCGTATTGTACACGGCCGCATAATCGAAATTAATACGA
 CTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCCCATCTTAGTATATTAGTTTAAGT
 ATAAGAAGGAGATATACATATGGGCAGATCTCATTGGATATCCGGCTGACCACGCGATCGC
 TGACGTCGTTACCCTCGAGTCTGTAAGAATCGCTGCCTGCATTGACGCCCAAGCACACATG
 GAAC

V sekvenci je červeně označen počátek nukleotidové sekvence N-terminálního fragmentu ASK1⁴⁶⁻³⁰².

• Data získaná ze sekvenační analýzy pro N-terminální fragment ASK1⁴⁶⁻³⁰²





- **Výsledná sekvence konstruktů ASK1⁸⁸⁻³⁰² v pRSFDuet-1 (data ze sekvenční analýzy)**

GGGGTAATGGAACACTACGACGACGCTACCAAAACCTTCACGGTAACCGAAAATAATAACAAC
AATAACAACAACAACAATGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATGGGATCCAGCCGACGGA
CCACGGTGGCATAATGTGATCAACGAAGCGAGCCAAGGGCAACTGGTGGTGGCCGAGAGCGA
GGCCCTGCAGAGCTTGCGGGAGGCGTGCGAGACAGTGGGCGCCACCCTGGAAACCCTGCAT
TTTGGGAAACTCGACTTTGGAGAAACCACCGTGCTGGACCGCTTTTACAATGCAGATATTG
CGGTGGTGGAGATGAGCGATGCCTTCCGGCAGCCGTCTTGTTTTACCACCTTGGGGTGAG
AGAAAGTTTCAGCATGGCCAACAACATCATCCTCTACTGTGATACTAACTCGGACTCTCTG
CAGTCACTGAAGGAAATCATTTGCCAGAAGAATACTATGTGCACTGGGAACTACACCTTTG
TTCCTTACATGATAACTCCACATAACAAAGTCTACTGCTGTGACAGCAGCTTCATGAAGGG
GTTGACAGAGCTCATGCAACCGAACTTCGAGCTGCTTCTTGGACCCATCTGCTTACCTCTT
GTGGATCGTTTTTATTTCAACTTTTGAAGGTGGCACAAGCAAGTTCTAGCCAGTACTTCCGGG
AATCTATACTCAATGACATCAGGAAAGCTCGTAATTTATACACTGGTAAAGAATTGGCAGC
TGAGTTGGCAAGAATTCGGCAGCGATAGGCGGCCGCATAATGCTTAAGTCGAACAGAAAGT
AATCGTATTGTACACGGCCGCATAATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGA
GCGGATAACAATTTCCCATCTTAGTATATTAGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACATATGG
CAGATCTCAATTGGATATCGGCCGGCCACGCGATCGCTGACGTGGTACCCTCGAGTCTGG
TAAAGAAACCGCTGCTGCGAAATTTGAACGCCAGCACATGACTCGTCTACTAGCGCAGCTT
AATTAACCTAGGCTGCTGCACGCTGAGCAATACTAGCATAACCCTTGAGCTCTAACGGTCT
TGAGGGTTTTTTTGCTGAAACTCAGCATTGAGGCACACGTCCACACTGCCTCGGTAGTCATA
ACGGTAACCAGCAATTGCCTAGCGGCATATTTTAAACGGCAC

V sekvenci je červeně označen počátek nukleotidové sekvence N-terminálního fragmentu ASK1⁸⁸⁻³⁰².

