

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Biochemie



**Studium interakce PI4 kinasy II α s VAMP3
proteinem**

Interaction PI4 kinase II α with VAMP3 protein

Anna Dubánková

Bakalářská práce

Školitel:

Mgr. et Mgr. Evžen Bouřa, Ph.D.

Vedoucí bakalářské práce:

Doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Mgr. et Mgr. Evžena Bouři, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 23. května 2014

podpis:

Úvodem své bakalářské práce bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. et Mgr. Evženu Bouřovi, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a ochotu s kterou se mi věnoval v průběhu celé práce. Dále děkuji všem členům laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí a ochotu vždy poradit a pomoci. V neposlední řadě děkuji Mgr. Janě Horákové za provedení hmotnostní analýzy.

Děkuji také Doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph. D. za přínosné informace a svědomitost, s kterou se mi věnoval během vypracování této práce.

Abstrakt

Fosfoinositidy jsou nesmírně důležité pro regulaci aktivity mnoha signálních proteinů nejen buněčné membrány. Fosfatidylinositol - 4 - kinasy (PI4K) katalyzují tvorbu fosfatidylinositolu - 4 - fosfátu, molekuly s významnou regulační funkcí a prekuroru řady fosfoinositidů. PI4K jsou svou patogenicitou spojovány s některými RNA viry, jako jsou *Picornaviridae* (poliovirus, coxsackie virus, aichi virus, enterovirus 71) a *Flaviviridae* (virus hepatitidy C). PI4K také hrají významnou roli při rozvoji rakoviny. Tato práce se snaží přispět k objasnění mechanismu regulace PI4 kinasy typu II α skrze její interakci s proteinem vesikulární membrány 3 (VAMP 3) z rodiny proteinů SNARE (z angl. „Soluble N-ethylmaleimide Sensitive Fusion Attachment Protein Receptor“).

Abstract

Phosphoinositides are very important in regulation activity of many signaling proteins not just in cellular membranes. Phosphatidylinositol - 4 - kinases (PI4K) generate phosphatidylinositol - 4 - phosphate, an emerging regulatory molecule and precursor of important regulatory phosphoinositides. PI4Ks are associated with pathogenicity of several RNA viruses including *Picornaviridae* (poliovirus, coxsackie virus, aichi virus, enterovirus 71) and *Flaviviridae* (hepatitis C virus). PI4Ks also play important role in cancer. This study strives to clarify the mechanism of regulation of PI4K type II α by its potential interaction with Vesicle - associated membrane protein 3 (VAMP 3) of the SNARE protein family (Soluble N - ethylmaleimide Sensitive Fusion Attachment Protein Receptor).

(In Czech)

Obsah

1.	Seznam použitých zkratek	7
2.	Teoretický úvod	9
2.1.	Vesikulární transport	9
2.1.1.	Rozdělení SNARE proteinů na membráně	11
2.1.2.	Regulace	12
2.2.	VAMP3	13
2.3.	Fosfatidylinositol - 4 - kinasy (PI4K)	13
2.3.1.	Fosfatidylinositol - 4 - kinasa typu II α (54 kDa)	15
2.3.2.	Fosfatidyl inositol - 4 - kinasa typu II β (55 kDa)	15
2.3.3.	Fosfatidylinositol - 4 - kinasa typu III α (230 kDa)	15
2.3.4.	Fosfatidyl inositol - 4 - kinasa typu III β (92 kDa)	16
2.4.	Vliv fosfatidylinositol kinas na lidské zdraví	16
2.4.1.	Gaucherova choroba	16
2.4.2.	Plus RNA-viry	16
2.4.3.	Rakovina	17
2.4.4.	Neurologické poruchy	17
3.	Cíl bakalářské práce	18
4.	Materiál a metody	19
4.1.	Příprava rekombinantního proteinu	19
4.1.1.	Příprava konstruktů DNA – VAMP 3	20
4.1.1.1.	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	20
4.1.1.2.	Zmnožení rekombinantní DNA	20
4.1.1.3.	PCR bakteriálních kolonií	21
4.1.1.4.	Purifikace PCR produktu	22
4.1.1.5.	Štěpení DNA	22
4.1.1.6.	Ligace DNA	23
4.1.1.7.	Transformace bakterií <i>Escherichie coli</i> (<i>E. coli</i>) DH5 α	23
4.1.1.8.	Horizontální agarosová elektroforesa	24
4.1.1.9.	Amplifikace plasmidové DNA	24
4.1.1.10.	Minipreparace plasmidové DNA	24

4.1.1.11. Sekvenování plasmidové DNA.....	25
4.1.2. Bakteriální exprese	25
4.1.2.1. Zaočkování bakteriální kultury do LB média.....	25
4.1.2.2. Exprese v ZY médiu	26
4.1.3. Purifikace proteinu	26
4.1.3.1. Centrifugace.....	26
4.1.3.2. Lyse buněk.....	26
4.1.3.3. Afinitní purifikace (Ni - sefarosa)	26
4.1.3.4. Dialýza	27
4.1.3.5. Chromatografie na iontoměničích	27
4.1.3.6. Gelová permeační chromatografie	27
4.1.4. Diskontinuální elektroforesa v denaturačním prostředí dodecylsírnanu sodného (SDS)	28
4.1.4.1. Barvení Coomassie Brilliant Blue	29
4.1.4.2. Barvení stříbrem.....	29
4.2. „Pull-Down Assay“	30
4.3. Hmotnostní spektrometrie	31
4.4. Přístroje:.....	32
4.5. Materiál	33
4.6. Sekvence použitých templátů DNA (VAMP3 a PI4KII α):.....	39
5. Výsledky	41
5.1. Exprese a purifikace proteinu PI4KII α T4.....	41
5.2. Příprava konstruktů DNA proteinu VAMP 3.....	45
5.3. Exprese a purifikace proteinu VAMP 3.....	47
5.4. Optimalizace promývacího pufru	50
5.5. Koexprese PI4KII α T4 a VAMP 3.....	53
6. Diskuse	55
7. Závěr	57
Bibliografie	58

1. Seznam použitých zkratek

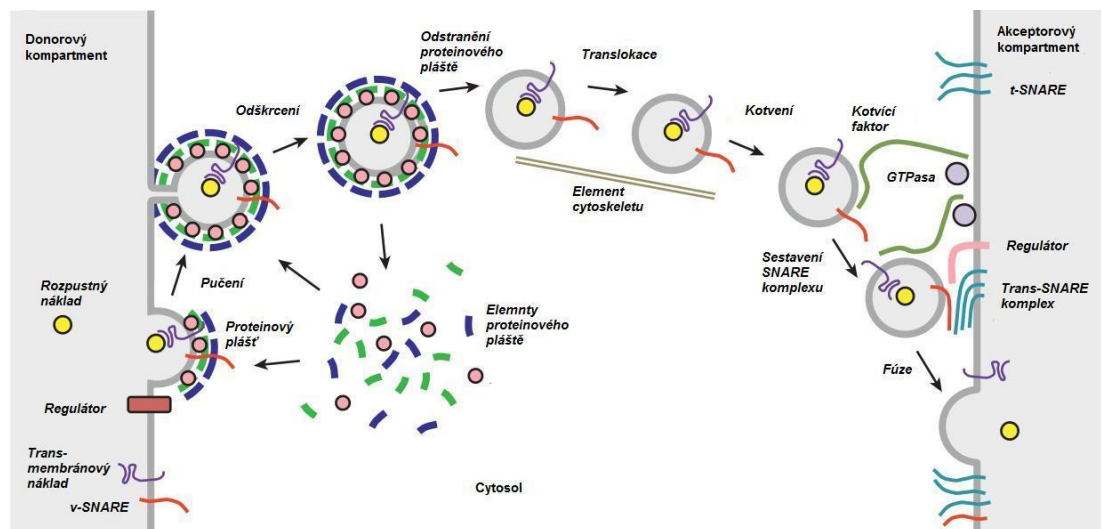
AA	aminokyselina z angl. „amino acid“
angl.	angličtina
AP	adaptorový protein
ATP	adenosintrifosfát
CALM	clathrinový endocytický adaptor z angl. „clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein“
CBB	z angl. „Coomassie Brilliant Blue“
CIAP	Telecí intestinální alkalická fosfatasa z angl. „Calf Intestinal Alkaline Phosphatase“
MWCO	nejvyšší molekulová hmotnost pronikajících látek z angl. „molecular weight cut off“
CNS	centrální nervová soustava
COP I (II)	proteinový komplex I (II) z angl. „coat protein complex I“ (II)
DAG	diacylglycerol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FPLC	Rychlá proteinová kapalinová chromatografie z angl. „Fast protein liquid chromatography“
HPLC H ₂ O	deionizovaná voda v čistotě pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii
I(1;4;5)P ₃	inositol - (1;4;5) - trisfosfát
LIMP2	lysosomální membránový protein 2
MW	molekulová hmotnost z angl. „molecular weight“
PCR	polymerasová řetězová reakce z angl. „polymerase chain reaction“
PH	pleckstrin homologní doména
PI	fosfatidylinositol

PI(3;4;5)P ₃	fosfatidylinositol - (3;4;5) - trisfosfát
PI(4;5)P ₂	fosfatidylinositol - (4;5) - bisfosfát
PI4K	fosfatidylinositol - 4 - kinasa
PI4KII α	fosfatidylinositol - 4 - kinasa typu II α
PI4KII α T4	fosfatidylinositol - 4 - kinasa typu II α s T4 lysozymem
PI4P	fosfatidyl inositol - 4 - fosfát
SDS	dodecylsíran sodný z angl. „sodium dodecyl sulphate“
SNAP-25	synaptosomálně vázaný protein 25 z angl. „Synaptosomal - associated protein 25“
SNARE	rozpustný na 1 - Ethylpyrrol-2,5-dion senzitivní fúzní upevňující proteinový receptor z angl. „soluble N - ethylmaleimide sensitive fusion attachment protein receptor“ (v - váčkové; t - cílové; R - arginin; Q - glutamin)
TAE	Tris – acetát – EDTA
TM	terminální doména
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
VAMP 3	protein vesikulární membrány 3 z angl. „Vesicle - associated membrane protein 3“

2. Teoretický úvod

2.1. Vesikulární transport

Doprava z endoplazmatického retikula přes Golgiho aparát a z Golgiho aparátu do dalších oddílů endomembránové soustavy se nazývá vesikulární transport. Je zprostředkována nepřetržitým pučením a fúzí transportních váček (vesikulů). Grafické znázornění následujícího popisu vesikulárního transportu pomocí klathrinových váček je veden jako OBR 1.



OBR 1 Cyklus vesikulárního transportu - klathrinové váčky, převzato a upraveno z [1].

Receptory nákladu se svými navázanými molekulami nákladu jsou zachycovány adaptiny, které také váží klathrinové molekuly k cytosolovému povrchu pučícího váčku skrze klathrinové adaptorové proteiny (platí pro klathrinové váčky). Molekuly dynaminu se skládají do většího celku kolem ústí pučícího váčku. Když je skládání ukončeno, dyneiny hydrolyzují na sebe navázaný GTP a odškrtí váček. Po ukončení pučení jsou proteinové pláště odstraněny a obnažený váček může fúzovat se svou cílovou membránou.

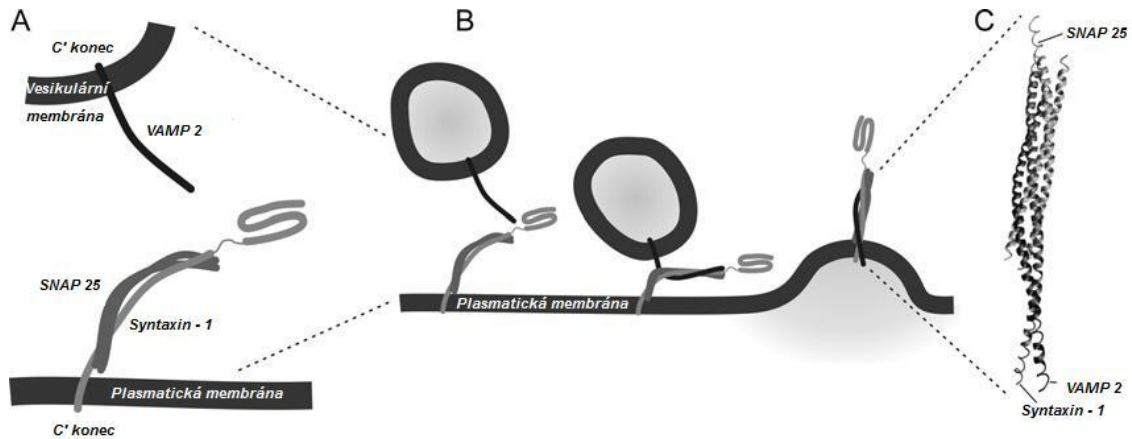
Vesikulární transport probíhá i skrze jiné váčky než jsou klathrinové (které rovněž nesou označení dle svého proteinového pláště: COP I a II - proteinový komplex I a II). Tyto váčky se však účastní transportu v rámci Golgiho aparátu či Golgiho aparátu a endoplasmatického retikula. Vzhledem k tomu, že fosfatidylinositol - 4 - fosfát kinasa typu II α se účastní transportu klathrinových váček, byl v této práci upřednostněn tento typ transportu.

Když transportní váček dorazí ke své cílové organelle (prostou difusí ale především pomocí motorových proteinů), musí ji rozpoznat a navázat se na ni pomocí SNARE proteinů (rozpuštěných na 1-Ethylpyrrol - 2,5 - dion senzitivních fúzních upevňujících proteinových receptorů) [2]. SNARE - proteiny jsou poměrně malé proteiny (10 - 30 kDa) s evolučně konzervovanou SNARE doménou, která umožňuje protein - proteinovou interakci [3]. Většina těchto proteinů má hydrofobní C - konec, který slouží jako membránová kotva. SNARE proteiny, které nemají hydrofobní C - konec, se upevňují k membráně skrze prenyl, nebo palmitoylací cysteinů [4].

SNARE proteiny na povrchu váček (v - SNARE, z angl. „vesicle“) jsou specificky rozpoznávány komplementárními SNARE proteiny na povrchu cílových membrán (t-SNARE, z angl. „target“) [2]. Následně se složí komplex proteinů katalyzující fúzi váček. Obvykle mezi jedním v - SNARE a třemi t - SNARE motivy se vytvoří pevnou interakci alfa helixů, a proteiny přitáhnou membrány do těsné blízkosti a umožní tak fúzi váčku s membránou, jak je znázorněno na OBR 2, str 11, [5] [6]. Energie uvolněná při tvorbě tohoto komplexu překoná energetický odpor membrány tvořený především záporným nábojem hydrofilní části membránové dvojvrstvy. Po fúzi membrán přejde trans - SNARE komplex do cis - SNARE komplexu. Následně je za spotřeby ATP obnoven na t-SNARE a volný v - SNARE protein [4].

Bylo zjištěno, že během vazby v - SNARE s t - SNARE dochází k interakci argininu na jednom proteinu s glutaminem na druhém proteinu. Proto se SNARE proteiny se rozdělují kromě na v/t - SNARE na R/Q - SNARE. R - SNARE mají

ve SNARE doméně arginin, zatímco Q - SNARE glutamin. Obvykle R - SNARE fungují jako v - SNARE a Q - SNARE zase jako t - SNARE [7].



OBR 2 Tvorba komplexu SNARE proteinů – membránová fúze. Převzato a upraveno z [8].

(A – Membránová topologie proteinů VAMP 2, Syntaxin – 1, SNAP 25 z angl. „synaptosomal-associated protein 25“; B – schéma ukotvení vesikulu k membráně a membránové fúze; C - struktura SNARE komplexu získaná rentgeno – strukturní analýzou [8])

K fúzi membrán je obvykle zapotřebí kromě SNARE komplexů i dalších proteinů, které pomáhají SNARE proteinům a určují čas a místo kde proběhne splynutí membrán.

2.1.1. Rozdělení SNARE proteinů na membráně

SNARE proteiny se na membráně shlukují v klastry, mechanismus tohoto shlukování není dosud zcela objasněn. Je zajímavé, že rozdělení SNARE proteinů na membráně může ovlivňovat další membránové proteiny tím, že spolu vytvoří

SNARE komplex. Je možné, že tento komplex omezuje mobilitu proteinu PI4KII α v membráně.

Shlukování SNARE proteinů bývá přičítáno více faktorům. Jedním z nich je interakce mezi SNARE proteiny a membránovými lipidy [8]. Vystává tedy otázka, zda by se protein VAMP 3 nemohl vázat spíše na substrát nebo produkt PI4KII α – fosfatidylinositol nebo fosfatidylinositol - 4 - fosfát (PI4P), než na samotnou kinasu.

2.1.2. Regulace

Golgiho aparát se účastní maturace membránových proteinů, biosyntesy lipidů a rovněž seskupování proteinů ve vesikuly pro exocytosu či transport v rámci endosomálního systému. Přesný mechanismus těchto funkcí Golgiho aparátu není zcela znám. Avšak na membráně váčků pučících z trans - sítí Golgiho aparátu se nachází PI4P, což nám napovídá o centrální regulační funkci této signální molekuly.

Fosfatidylinositoly slouží v eukaryotických buňkách jako důležité regulační molekuly (druží poslové), které zprostředkovávají prostorové informace. Na cytosolové straně membrány je produkováno sedm různých fosfoinositidů, jejich množství a přesná lokalizace je určena aktivitou fosfatidylových kinas a fosfatas [9].

Je tedy zřejmé, že fosfatidylinositol - 4 - kinasy (PI4K) i SNARE proteiny se účastní vesikulárního transportu. Pomocí proteomické analýzy byla objevena interakce proteinů PI4KII α a VAMP 3 [10]. Tato práce se snaží zodpovědět otázku, zda tyto dva proteiny spolu interagují přímo.

2.2. VAMP3

Do SNARE proteinů spadají proteiny vesikulární membrány (VAMP, z angl. „Vesicle-associated membrane protein“).

VAMP3 neboli cellubrevin je protein patřící do skupiny v-SNARE (R-SNARE) proteinů. Je dlouhý 98 aminokyselin (AA), jeho SNARE doména se nachází mezi 16-67 AA a jeho terminální doména mezi 78 -98 AA, jak je zobrazeno na OBR 3 [4]. VAMP3 je přítomen v migrující endosomech a v endosomálních vesikulách, kde zprostředkovává jejich fúzi s plasmatickou membránou. Prozatím bylo zjištěno, že na plasmatické membráně se VAMP3 váže na tyto t-SNARE proteiny: homologní dvojice proteinů syntaxin1 a syntaxin4, SNAP-23 a SNAP-25 [11] a také clathrinový endocytický adaptor (CALM z angl. „clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein“) [6]. Účelem této práce je zjistit zda protein fosfatidylinositol - 4 - fosfát kinasa typu II α (PI4KII α) lze zařadit do těchto výše zmíněných proteinů.



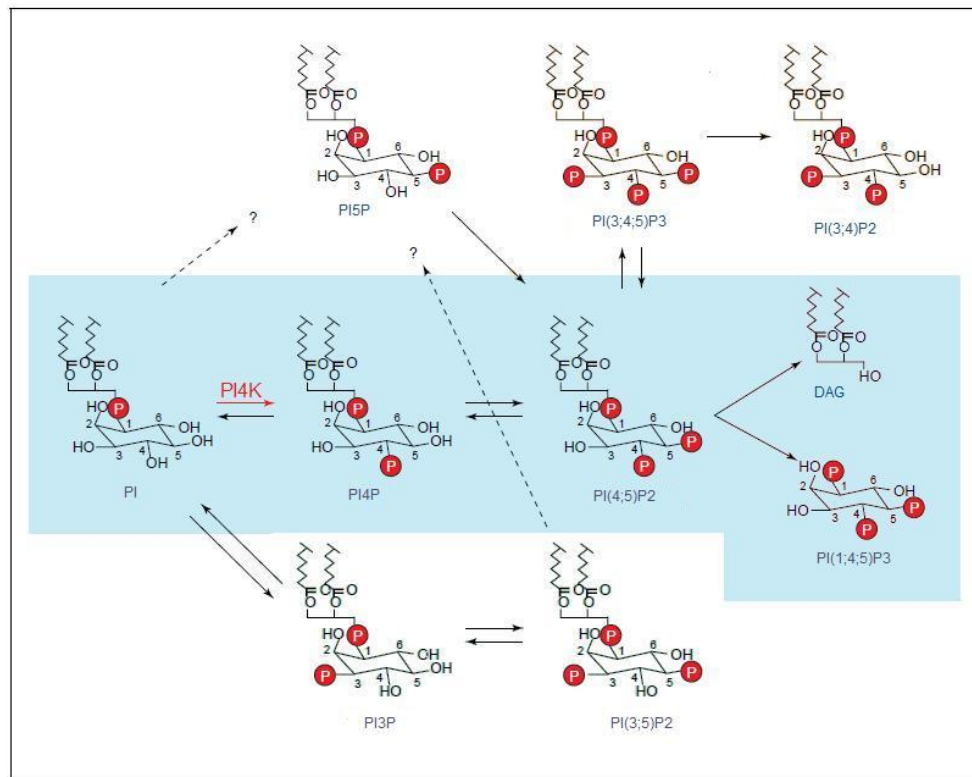
OBR 3 Doménová organizace VAMP 3 (SNARE a terminální doména TM), převzato a upraveno z [6].

2.3. Fosfatidylinositol - 4 - kinasy (PI4K)

Fosfoinositidy jsou deriváty fosfatidylinositolu (PI), které mají navázanou fosfátovou skupinu na jedné nebo více hydroxylových skupin inositolového kruhu.

Fosforylace PI katalyzována PI4K kinasou vede ke vzniku fosfatidylinositolu - 4 - fosfátu (PI4P). Jak je znázorněno na OBR 4, str 14, fosfoinositidy mohou být fosforylovány na různých pozicích (D3, D4 a D5) inositolového kruhu. Jedna z možných reakcí fosfatidylinositol - 4 - fosfátu (PI4K), která je na OBR 4 str 14

zvýrazněna modrým polem, vede k diacylglycerolu (DAG) a inositolu - (1;4;5) - trisfosfátu (I(1;4;5)P₃). Oba tyto produkty I(1;4;5)P₃ a DAG jsou důležitými druhými posly signální dráhy Ca²⁺ iontů [12].



OBR 4 Metabolické dráhy fosfatidylinositidů, převzato a upraveno z [12]

PI4KII tak mohou tvorbou prekurzoru PI(4;5)P₂ a PI(3;4;5)P₃ regulovat mezibuněčný transport. Nepřítomností nebo poškozením PI4KII dojde k úplnému zamezení navázání heterotetramerického komplexu clathrinového adaptorového proteinu (AP-1), zodpovědného za transport mezi trans sítí Golgiho aparátu a endosomy, na membránu Golgiho aparátu a narušení navázání AP-3 na endosom. To může ovlivnit výběr a koncentraci přepravovaných proteinů [13] [14].

V buňkách savců byly identifikovány čtyři základní typy enzymů vyrábějících PI4P, které mohou být rozděleny do dvou skupin dle jejich primární struktury a biochemických vlastností: typ II (PI4KII α ; PI4KII β) a typ III (PI4KIII α ; PI4KIII β).

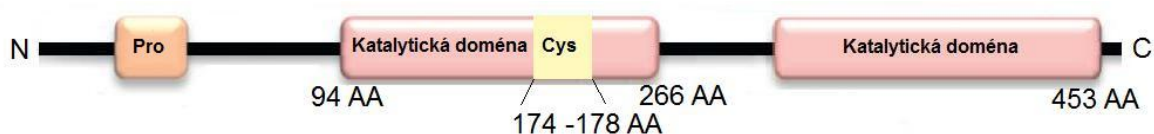
Všechny jsou lokalizovány v různých membránových kompartmentech, kde mají svou specifickou funkci.

2.3.1. Fosfatidylinositol - 4 - kinasa typu II α (54 kDa)

PI4KII α je převážně asociována s trans-sítí Golgiho aparátu, kde se zprostředkovaně účastní regulace aktivity klathrinových adaptinů [13]. Dále se také PI4KII α nachází v endosomech a v menší míře v endoplasmatickém retikulu, na jehož membráně katalyzuje tvorbu PI4P, který je nezbytným elementem při výběru a transportu látek do pozdních endosomů / lysosomů [15].

V katalytické doméně PI4KII α je přítomen motiv bohatý na cystein (motiv CCPC), který je posttranslačně modifikován palmitoylací [16]. To umožňuje ukotvení enzymu k membráně, kde se nachází jeho substrát, PI [17].

Na N konci proteinu PI4KII α se nachází doména bohatá na prolin. Schématické znázornění výše popsané struktury je vyobrazeno na OBR 5.



OBR 5 Strukturní vlastnosti proteinu PI4KII α

Převzato a upraveno z [17] a [18].

2.3.2. Fosfatidyl inositol - 4 - kinasa typu II β (55 kDa)

PI4II β je strukturně velmi podobná PI4II α , liší se od ní rozdílnou lokalizací v buňce (je přítomna v endosomu [19]) a asociací s transportními vesikuly [17].

2.3.3. Fosfatidylinositol - 4 - kinasa typu III α (230 kDa)

PI4KIII α je lokalizována především v endoplasmatickém retikulu, ale také v časných cis-Golgi kompartmentech a v jádře [15]. V buňkách savců má hlavní funkci v udržování proteinového a lipidového složení plasmatické membrány. Dále pak bylo zjištěno, že hraje klíčovou roli v replikaci RNA viru hepatitidy C [20].

2.3.4. Fosfatidyl inositol - 4 - kinasa typu III β (92 kDa)

PI4KIII β je fyziologickým substrátem protein kinasy D, patřící do rodiny serin / threonin proteinových kinas. Hlavní funkce PI4KIII β nespočívá ve tvorbě PI4P v plasmatické membráně na rozdíl od PI4KIII α , ale ve struktuře a funkci Golgiho aparátu [15].

PI4KIII β je užívána pro replikaci viry z čeledi *Piconaviridae* [20]

2.4. Vliv fosfatidylinositol kinas na lidské zdraví

V následujících kapitolách jsou zmíněny lidské nemoci, v jejichž průběhu hrají proteiny PI4K určitou roli.

2.4.1. Gaucherova choroba

Gaucherova choroba je genetická porucha způsobená mutací lysosomálního enzymu β - glukocerebrosidasy. Nedostatek tohoto enzymu vede k akumulaci glukocerebrosidů v lysosomech makrofágů zejména ve slezině a játrech [21].

β - glukocerebrosidasa dosáhne lysosomální membrány skrze její receptor, lysosomální integrální membránový protein 2 (LIMP2). Bylo zjištěno, že protein PI4KIII α prostřednictvím vesikulárního transportu ovlivňuje akumulaci proteinu LIMP2 a tím reguluje dodávku β - glukocerebrosidasy. Protein PI4KIII α je potenciální terapeutický cíl Gaucherovy choroby [22].

2.4.2. Plus RNA-viry

Většina virových patogenů uvnitř hostitelské buňky potřebuje co nejrychleji iniciovat svoji replikaci. Několik prvních syntetizovaných virových proteinů se musí vzájemně vyhledat, aby mohly vytvořit replikační komplex, který umožní replikaci virového genomu. Mnoho typů plus RNA-virů řeší tento problém umístěním svých replikačních mechanismů na cytosolovou stranu hostitelské intracelulární organelové membrány. Navázáním replikačních enzymů na membránu vzroste

pravděpodobnost, že se replikační komponenty setkají a zároveň dojde k zvýšení jejich citlivosti a rychlosti odpovědi na změnu koncentrace enzymu nebo substrátu.

Membrána, kterou takto využívají plus RNA-viry, je obvykle z endoplazmatického retikula, trans - sítích Golgiho aparátu, endosomu nebo mitochondrie. PI4P na cytosolové straně membrány je potřebný pro replikaci mnohých plus RNA-virů jako jsou *Picornaviridae* (poliovirus, coxsackie virus, aichi virus, enterovirus 71) a *Flaviviridae* (virus hepatitidy C) [20].

2.4.3. Rakovina

Výsledky získané výzkumem lidských nádorových tkání ukázaly, že exprese PI4KII α u několika typů rakoviny (fibrosarkom, rakovina prsu, rakovina močového měchýře a papilární karcinom štítné žlázy [19]) významně stoupá ve srovnání s normálními tkáněmi. Potlačení exprese PI4KII α dochází ke zpomalení růstu nádorů u myši, omezením tubulogenese v nádorových endoteliálních buňkách a má za následek sníženou angiogenesi [23]. PI4KII α je potenciální cíl pro terapii nádorového onemocnění.

PI4KIII α je zodpovědná za chemorezistenci nádorů, které odolávají indukované apoptose. Také exprese PI4KIII β má anti-apoptotické účinky na buňky rakoviny prsu.

Na rozdíl od ostatních PI4K má PI4KII β anti-metastatickou funkci a to zejména u hepatocelulárních karcinomů, u nichž byla objevena. Zvýšení exprese tohoto enzymu bylo zaznamenáno i na dalších karcinomech, ale jeho účinky už byly méně prokazatelné [19].

2.4.4. Neurologické poruchy

Snížení exprese PI4K je spojeno s neuronální disfunkcí, zejména narušením délky života specifických buněk v centrální nervové soustavě (CNS).

U geneticky modifikovaných myši, které neexprimují PI4KII α , dochází ke glióze mozečku a ztrátě Purkyňových buněk. Může dojít i k axonální degradaci

vzestupných i sestupných drah v míše [24]. Tento fakt poukazuje na význam PI4KII α jako na neurologicky důležitý enzym.

Dále bylo zjištěno, že při chronické závislosti na spotřebě ethanolu, dochází u hlodavců k redukci exprese PI4KIII β [25].

3. Cíl bakalářské práce

Intracelulární transport je velmi aktuální téma, v roce 2013 byla udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu Jamesi Rothmanovi, Randy Schekmanovi a Tomasi Sudhofovi za objevy týkající se vezikulárního transportu. Navzdory tomu dosud není mechanismus intracelulárního transportu zcela objasněn.

Zjištění možnosti vazby VAMP 3 proteinu na PI4PKII α může napomoci pochopení vezikulárního transportu na molekulární úrovni. Mimo to je PI4PKII α enzym s důležitou signální funkcí, která významně ovlivňuje metabolismus. Zjištění mechanismu její regulace může vést k pochopení nejrůznějších patologických jevů jako je rakovina či některá virová onemocnění.

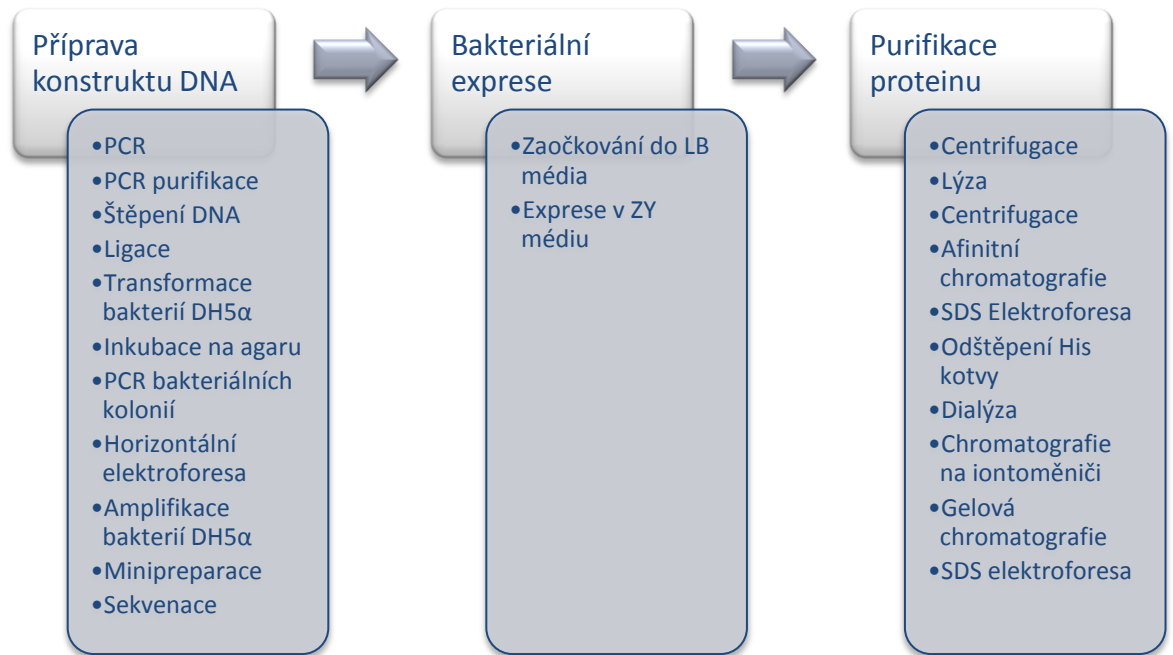
Dílčí cíle této práce:

- Příprava a purifikace proteinu PI4KII α s T4 lysozymem a cytosolové části proteinu VAMP 3
- Odhalení možné interakce proteinů PI4KII α a VAMP 3

4. Materiál a metody

4.1. Příprava rekombinantního proteinu

Pro přehlednost jednotlivých kroků je pracovní postup heslovitě znázorněn na OBR 6.



OBR 6 Schéma přípravy rekombinantního proteinu v *E. coli*

V šedých polích jsou jednotlivé úkony seřazeny chronologicky (sestupně).

4.1.1. Příprava konstruktů DNA – VAMP 3

Expresní konstrukt PI4PKII α byl již připraven v naší laboratoři.

4.1.1.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda PCR je založena na využití DNA - polymerasy pro opakované kopírování DNA, přičemž syntéza DNA je řízena primery, které se párují s rekombinantní DNA na počátku a konci amplifikovaného fragmentu [2].

4.1.1.2. Zmnožení rekombinantní DNA

Reakční směs byla připravena dle TAB 1. Následně proběhla reakce PCR znázorněná na TAB 2 str 20.

TAB 1 Složení reakční směsi PCR:

Komponenty:	Množství:
zdroj templátové DNA (viz	1 ng
10 μ M forwardní primer	1 μ l
10 μ M reversní primer	1 μ l
High-Fidelity master mix	10 μ l
HPLC H ₂ O	8 μ l

TAB 2 Podmínky průběhu PCR:

Počet cyklů	Teplota / °C	Čas
1	98	1 min
30	98	10s
	62	20s
	72	15 s
1	72	5 min

Koncentrace templátové DNA byla měřena pomocí NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 při $\lambda = 260$ nm proti destilované vodě.

Nukleotidové sekvence použitých primerů jsou uvedeny v TAB 18, str 40.

4.1.1.3. PCR bakteriálních kolonií

Reakční směs byla připravená dle TAB 3 str 21. Bakteriální DNA byla do směsi vnesena v podobě buněk bakterií dané kolonie narostlé na agarosové plotně (bakteriální kolonie byly vysety na plotnu obdobně jako 4.1.1.7., str 23). Samotný průběh PCR je znázorněn v

TAB 4, str 21.

TAB 3 Složení reakční směsi PCR bakteriálních kolonií:

Komponenty:	Množství:
HPLC H ₂ O	6 μ l
Dream Taq Master Mix	8 μ l
10 μ M forwardní primer	0,5 μ l
10 μ M reversní primer	0,5 μ l
bakteriální DNA - 1 kolonie	

Nukleotidové sekvence použitých primerů jsou uvedeny v TAB 18, str 40.

TAB 4 Podmínky průběhu PCR bakteriálních kolonií:

Počet cyklů	Teplota / °C	Čas
1	94	1 min
30	94	0,5 min
	52	0,5 min
	72	15 s
1	72	5 min

4.1.1.4. Purifikace PCR produktu

Při purifikaci produktu PCR byla DNA adsorbována na silikagelovou mikrokolonku za přítomnosti vysoké koncentrace chaotropních solí. Následně byly odplaveny nečistoty a DNA byla eluována puforem obsahujícím Tris - basi.

Při purifikaci PCR produktu bylo postupováno dle pokynů výrobce „QIAquick PCR Purification Kit“ [26].

4.1.1.5. Štěpení DNA

DNA i plasmid se specifickými restrikčními místy byly rozštěpeny stejným restrikčním enzymem. Reakční směs byla připravena dle TAB 5 str 22. Následně byla směs inkubována při 37°C po dobu 1 h. Pak byla takto připravená DNA počištěna dle purifikace PCR produktu (viz 4.1.1.4; str 22).

TAB 5 Složení reakční směsi štěpení DNA:

Štěpení templátové DNA		Štěpení plasmidu	
DNA	120 ng	plasmid	8 µg
HPLC H ₂ O	59 µl	HPLC H ₂ O	58,5 µl
FD pufr	10 µl	FD pufr	10 µl
Restrikční enzymy	po 0,5 µl	Restrikční enzymy	po 0,5 µl
celkový objem 100 µl		CIAP	0,5 µl
		celkový objem 100 µl	
DNA proteinu:		Plasmid:	Restrikční enzym:
VAMP3		pRSFD	NcoI
			AvrII (viz TAB 13, str 32)

Koncentrace templátové DNA byla zjišťována pomocí mikrospektrofotometru NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 při $\lambda = 260$ nm proti destilované vodě.

4.1.1.6. Ligace DNA

Ligací DNA myslíme vložení insertu (DNA) do vektoru (např. plasmidu). Insert i vektor naštěpený stejnými restrikčními enzymy (viz 4.1.1.5, str 22) byly vneseny do ligační směsi (viz TAB 6, str 23). Ligační směs byla nejprve 10 s promíchávána na Vortexu – Gene 2, pak centrifugována (30 s; 14000 RPM; pokojová teplota - eppendorf Centrifuge 5418 (rotor FA-45-18-11)). Následně byla směs inkubována při pokojové teplotě 30 min.

TAB 6 Složení ligační směsi:

Komponenty:	Množství:
Lineární vektor	0,7 µl
Insert (DNA) viz 4.1.1.5, str 22	5,5 µl
5X ligační pufr	3 µl
T4 DNA ligasa	0,3 µl
HPLC H ₂ O	5,5 µl

Při přípravě ligační směsi bylo postupováno dle protokolu k T4 DNA ligasy [27]. Koncentrace templátové DNA byla zjišťována pomocí mikrospektrofotometru NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 při $\lambda = 260$ nm proti destilované vodě.

4.1.1.7. Transformace bakterií *Escherichie coli* (*E. coli*) DH5 α

Pro vložení rekombinantní DNA do DNA kompetentní bakterie *E. Coli* DH5 α bylo postupováno následovně: Byly smíšeny 3 µl ligační směsi s 60 µl bakteriální suspenze *E. coli* DH5 α a inkubovány 20 min na ledě. S takto připraveným bakteriálním roztokem byl proveden tepelný šok (42 s; 42 °C).

Výše uvedený bakteriální roztok byl inkubován s 400 µl LB média (viz TAB 13, str 33) po dobu 1 h při 37 °C v inkubátor Memmert IPP 400. Po inkubaci bylo

180 μl tohoto roztoku přeneseno na Petriho misku s LB – agarem obsahující 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kanamycinu a inkubováno přibližně 12 h při 37 °C.

4.1.1.8. Horizontální agarosová elektroforesa

Horizontální agarosová elektroforesa se využívá k analýze velikosti fragmentů DNA. Byl zde použit nosič z agarosového gelu (viz TAB 16, str 37) a elektroforetický pufr odpovídající složení TAE pufru (viz TAB 16, str 37).

Vzorky DNA byly nanášeny na gel po 2 μl smíšených s dalšími 2 μl vzorkového pufru (DNA LD; viz TAB 13, str 33). Pro odhad velikostí fragmentů byl na gel aplikován spolu se vzorky DNA rovněž marker Gene Ruler (viz TAB 13, str 33). Separace DNA pak probíhala po dobu 18 min při napětí $U = 300 \text{ V}$. Vzniklé proužky byly vizualizované pomocí Quantum ST4 kamery.

4.1.1.9. Amplifikace plasmidové DNA

Plasmidová DNA z bakteriální kolonie *E. coli* (připravených například dle 4.1.1.7, str 23) byla přenesena skrze několik bakteriálních buněk do 5 ml LB média (viz TAB 13, str 33) s 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kanamycinu a inkubována přibližně 12 h ve třepačce (37 °C; 220 RPM). Takto připravená bakteriální kultura byla zpracována pomocí minipreparace plasmidové DNA (viz 4.1.1.10)

4.1.1.10. Minipreparace plasmidové DNA

Minipreparace amplifikované plasmidové DNA spočívá v alkalické lysi bakteriálních buněk (připravených dle 4.1.1.9) a následné adsorpci DNA na silikonovou membránu.

Postup se skládá z několika elementárních kroků:

- Preparace a čištění bakteriálního lyzátu
- Adsorpce DNA na silikagelovou mikrokolonku
- Promývání a eluce DNA

Při minipreparaci plasmidové DNA bylo postupováno dle pokynů výrobců „QIAprep Spin Miniprep Kit“ [28].

4.1.1.11. Sekvenování plasmidové DNA

Do 1,5ml mikrozkušavky byla připravena sekvenační směs dle TAB 7 str 25. Samotná sekvenace DNA byla provedena firmou GATC Biotech.

TAB 7 Složení sekvenační směsi:

Komponenty:	Množství:
Plasmidová DNA	260 ng
10 μ M primer	2,5 μ l
HPLC H ₂ O	6,5 μ l

Koncentrace DNA VAMP 3 = 260,8 ng. μ l⁻¹ (změřeno pomocí mikrospekrofotometru NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 při λ = 260nm proti destilované vodě)

Příprava sekvenační směsi byla provedena na základě doporučení GATC Biotech.

4.1.2. Bakteriální exprese

4.1.2.1. Zaočkování bakteriální kultury do LB média

K 60 μ l roztoku kompetentních bakterií E. coli BL21 STAR byl přidán 1 μ l konstruktů DNA připraveného dle 4.1.1., str 20. Následně byl roztok vystaven tepelnému šoku (42 s; 42 °C), pak byl chlazen 1 min na ledu. Poté byl k tomuto roztoku přidán 1 ml LB média (viz TAB 13, str 33) a bakteriální roztok byl inkubován bez přídavku antibiotik (30 min; 37°C). Po uplynutí 30 min byl inkubovaný roztok přenesen do 100 ml LB média obsahující 40 μ g.ml⁻¹ kanamycinu a inkubován ve třepačce (asi 12 h, 37°C; 220 RPM).

4.1.2.2. Exprese v ZY médiu

Ke každému litru ZY média (viz TAB 14, str 34) byly přidány 2 ml roztoku kanamycinu (40 mg.ml^{-1}) a 2 ml bakteriálního roztoku připraveného dle 4.1.2.1. Bakterie byly inkubovány ve třepačce (první 4 h 37°C ; 220 RPM, pak přibližně 12 h: 22°C ; 220 RPM).

4.1.3. Purifikace proteinu

4.1.3.1. Centrifugace

Bakteriální roztok, jehož příprava je popsána v odstavci 4.1.2.2., byl odstředěn v litrových kyvetách na centrifuze Sorval Evolution RC (15 min; 4°C ; 4000 RPM rotor – SLC 6000). Supernatant byl slit a peleta zamražena na teplotu -18°C .

4.1.3.2. Lyse buněk

Peleta byla po rozmražení a resuspendována v promývacím pufru (viz TAB 15, str 35, dle purifikovaného proteinu), aby mohla být homogenizována pomocí homogenizátoru podle Dounceho.

Bakteriální buňky byly lysovány pomocí EmulsiFlexu C3 pod tlakem 110 MPa. Dále byl lysát centrifugován ve 250-ti ml kyvetách na centrifuze Beckman Coulter – Avanticentrifuge J30I (15 min; 4°C ; 15 000 RPM; rotor – JLA-16.250).

4.1.3.3. Afinitní purifikace (Ni - sefaroza)

K supernatantu připravenému dle 4.1.3.2 bylo přidáno 5 ml nepravého roztoku Ni - sefarozy a 10 min byl inkubován v 15°C na rotátoru (Multi RS-60 BIOSAN) při 8 RPM.

Suspenze byla odstředěna na centrifuze Beckman Coulter Allgera X-15R (1 min; 4°C ; 1200 g), supernatant byl dekantován a peleta resuspendována

v promývacím pufru (viz TAB 15, str 35, dle purifikovaného proteinu). Tento postup se opakuje pětkrát, než byla resuspendovaná peleta nanesená na 15-ti ml kolonu a postupně (9 x 1,5 ml) eluována elučním puftrem (viz TAB 15, str 35, dle purifikovaného proteinu).

4.1.3.4. Dialyza

Do dialyzačního střeua MWCO 14000 (viz TAB 13, str 33) byl nanesen protein připravený v 4.1.3.3, str 26 a 150 µl TEV proteasy (1 mg.ml⁻¹), to pak bylo vloženo do 1 l dialyzačního pufru (viz

TAB 17, str 38) po dobu asi 12 h při laboratorní teplotě.

4.1.3.5. Chromatografie na iontoměničích

Vzorek proteinu byl centrifugován na centrifuze Allegra X – 15 R Centrifuge; Beckmann Coulter (5 min, 4°C, 2000 g). Supernatant byl nanesen na ekvilibrovanou kolonu (viz TAB 8) na purifikačním systému ÄKTA purifier 10. Následně byl nastaven gradient pufru o vyšší koncentraci NaCl (pufru B) tak, aby z počátečního 100% přítoku pufru o nižší koncentraci NaCl (pufru A) na kolonu dosáhl 100% pufru B během průtoku 96 ml (viz TAB 15, str 35). Kolona byla propojena se sběračem frakcí, který rozdělil eluční objem do jamek po 1 ml eluátu. Průběh chromatografie byl sledován skrze absorbanci při 280 a 254 nm.

TAB 8 Podmínky chromatografie na iontoměničích:

Protein	pI	Kolona
PI4KIIα	4,89	MONO S 5/50 GL (silný katex)

4.1.3.6. Gelová permeační chromatografie

Vzorek proteinu byl filtrován pomocí přetížení na cílový objem 500 µl na centrifuze Beckman Coulter Allegra X-15R (4°C; 1200 g) za použití molekulového

síta o vhodné velikosti (viz TAB 9) za centrifugace na Allegra X – 15 R Centrifuge; Beckmann Coulter (2000 g).

Vzorek byl nanesen na ekvilibrovanou kolonu (viz

TAB 10), na purifikačním systému ÄKTA purifier 10. Následně byl vzorek eluován 90 ml pufru pro gelovou chromatografii (viz TAB 15, str 35), během kterých došlo k rozdělení molekul na základě jejich velikosti.

TAB 9 Podmínky filtrace proteinů pomocí přetížení

Protein	Velikost molekulového síta
PI4KII α T4	MWCO = 30 000
VAMP 3	MWCO = 3000

TAB 10 Podmínky gelové permeační chromatografie:

Protein	Molekulová hmotnost (teoretická)	Kolona
PI4KII α T4	81,216 kDa	SUPERdex 200 10/300 GL
VAMP 3	9820,9 Da	Hi LOAD 16/60 SUPERdex 75 prep grade

4.1.4. Diskontinuální elektroforesa v denaturačním prostředí dodecylsírany sodného (SDS)

Proteiny byly rozděleny dle své elektroforetické pohyblivosti pomocí diskontinuální elektroforesy v denaturačním prostředí SDS, protein VAMP 3 pomocí „Tris-Tricine SDS-PAGE“ a PI4KII α T4 klasické „SDS – PAGE“ (viz TAB 16, str 37) Akrylamidový gel byl umístěn do přístroje na vertikální elektroforesu (Mini-PROTEAN Tetra System), horní komora byla naplněna katodovým elektroforetickým pufrům a dolní anodovým elektroforetickým pufrům.

Před nanesením na gel byly vzorky proteinu smíšeny s šestkrát koncentrovaným vzorkovým puřrem (6X) (viz TAB 16, str 37).

Elektroforesa probíhala při konstantním napětí dle typu gelu (viz TAB 16, str 37) do rozdělení proteinů na gelu. Vzniklé proteinové proužky pak byly detekovány barvením Coomassie Brilliant Blue (viz 4.1.4.1) nebo stříbrem (viz 4.1.4.2).

4.1.4.1. Barvení Coomassie Brilliant Blue

Pro zviditelnění elektroforeticky rozdělených proteinů (viz 4.1.4, str 28) bylo použito barvení pomocí „Coomassie Brilliant Blue“ (CBB) G 250. Gel byl barven asi 1 h v přibližně 20 ml barvicího roztoku CBB. Následně byl barvicí roztok slit a gel odbarven promýváním v destilované vodě.

4.1.4.2. Barvení stříbrem

Pro zviditelnění elektroforeticky rozdělených proteinů (viz 4.1.4, str 28) o nižší koncentraci bylo použito barvení stříbrem. Bylo postupováno dle TAB 11.

TAB 11 Průběh barvení akrylamidových gelů stříbrem

	<i>Funkce roztoku</i>	<i>Složení roztoku</i>	<i>Doba inkubace</i>
1	fixace	12 % (v/v) CH ₃ COOH 50 % (v/v) CH ₃ OH 0,02 % (v/v) HCHO	30 min
2	promývání	50 % (v/v) CH ₃ OH	3 x 15 min
3	exponace	0,02 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	1 min
4	promývání	destilovaná voda	3 x 20 s
5	impregnace	0,2 % (w/v) AgNO ₃ 0,02 % (v/v) HCHO	20 min
6	promývání	destilovaná voda	3 x 20 s

7	vyvolání	566 mM Na ₂ CO ₃ 16 μM Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O 0,02 % (v/v) HCHO	do objevení efogramu (10 s až 5 min)
8	promývání	destilovaná voda	3 x 20 s
9	zastavení	12 % (v/v) CH ₃ COOH; 50 % (v/v) CH ₃ OH	10 min
10	uchování	50 % (v/v) CH ₃ OH	∞

4.2. „Pull-Down Assay“

Do mikrozkušavky bylo nanášeno asi 20 μl nepravého roztoku Ni-sefarysy. Následně bylo přidáno asi 50 μg VAMP 3 (s His – kotvou) a inkubováno 10 min na ledu. Pak byl přidán 1 ml promývacího pufru „Pull-Down“ (viz TAB 15, str 35), pak byl vzorek 10 s vortexován a následně centrifugován (1 min; při pokojové teplotě; 14000 RPM) pomocí eppendorf Centrifuge 5418 (rotor FA-45-18-11)). Supernatant byl odstraněn pomocí pipety. K Ni-sefaryse s navázaným VAMP 3 bylo přidáno asi 25 μg PI4KIIαT4 (bez His-kotvy). Po další 10 min inkubaci na ledu byl vzorek 5 x promyt promývacím pufrem viz výše.

K proteinovému komplexu bylo následně přidáno 30 μl elučního pufru „Pull-Down“ (viz TAB 15, str 35), následně byla směs 10 s vortexována a 1 min centrifugována při 14000 RPM jako výše. Supernatant byl analyzován pomocí „Tris-Tricine SDS-PAGE“ (viz 4.1.4, str 28).

Jako negativní kontrola byl u tohoto pokusu proveden stejný „Pull-Down“, ale již bez přítomnosti VAMP 3.

4.3. Hmotnostní spektrometrie

Akrylamidový gel obsahující proužek daného proteinu byl odeslán na hmotnostní analýzu Mgr. Janě Horákové. Samotný proces zahrnoval:

- Redukce dithiothreitem
- Alkylace jodacetaminem
- Štěpení trypsinem
- Analýza pomocí kapalinové chromatografie – hmotnostním spektrometrie

Analýza byla provedena na systému RSLCnano Ultimate 3000, Dionex spojeným s hmotnostní spektrometrem Triple TOF 5600 se zdrojem NanoSpray III (AB Sciex).

4.4. Přístroje:

TAB 12 Seznam použitých přístrojů:

Centrifugy	Allegra X – 15 R Centrifuge; Beckmann Coulter Sorval Evolution RC Beckman Coulter – Avanti Centrifuge J30I Eppendorf Centrifuge 5418
Emulsiflex	EmulsiFlex C3; Avestin
Fotoaparát	Quantum ST4 camera, Vilbert Lourmat
Horizontální elektroforesa	Consort EV 231 P-LAB
Inkubátor	Memmert IPP 400
FPLC	ÄKTA purifier 10
Mikrospektrofotometr	NanoDrop Spectrophotometer ND-1000
PCR cyklér	Professional TRIO Thermocycler, Biometra Product Line
pH metr	HI 3220 pH / ORP Meter; HANNA instrument
Předvážky	KERN EMB 500-I
Rotátor	Multi RS-60 BIOSAN
Třepačka	Innova 44, Inkubator Shaker Series; New Brunswick Scientific
Vertikální elektroforesa	Mini-PROTEIN Tetra System; BIO RAD
Vortex	Gene 2, Scientific Industries

4.5. Materiál

TAB 13 Komerční materiál:

Coomassie brilliant blue G 250	Sigma-Aldrich
Dialyzační střevo	Dialysing tubing visking, cellulosa, typ 27/32 šířka 34 mm, průměr 21,5 mm, MWCO 14000
DNA LD	Thermo Scientific 6X DNA Loading Dye
Dream Taq Master Mix	Thermo scientific Dream Taq Green PCR Master Mix 2X
FD pufr	Thermo scientific 10X fast digest Green Buffer
Gene Ruler	Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Fermentas
Gradientový gel	MINI-PROTEAN TGX – Precast Gels 4 – 20 % Bio-Rad Laboratories, Inc.
High-Fidelity master mix	Q5™ Hot Start High-Fidelity 2X mastermix, NewEngland BioLabs Inc.
Kit na purifikaci DNA	QIAquick PCR Purification Kit QIAprep Spin Miniprep Kit
Kolona pro gelovou chromatografii	SUPERdex 200 10/300 GL (rozměry kolony 10 x 300 mm; mrtvý objem 24 ml) Hi LOAD 16/60 SUPERdex 75 prep grade (rozměry kolony 1,6 x 60 cm; mrtvý objem 121 ml)
Kolona pro chromatografii na kationtovém iontoměnič	MONO S 5/50 GL (<i>silný katex</i>) (rozměry kolony – 5 x 50 mm; mrtvý objem 1 ml)
LB – agar	(Lennox); P-Lab
LB médium	LB Broth (Lennox); P-Lab

Ni - sefarosa	Ni Sepharose™ 6 Fast Flow, GE Healthcare
Page Ruler	PageRuler Plus Prestained Protein Ladder
Restrikční enzymy	Thermo scientific FastDigest (NcoI; AvrII)
TEV - proteasa	připravena školitelem (1mg.ml ⁻¹)

TAB 14 Roztok pro bakteriální expresi:

ZY médium	1 % trypton; 0,5% kvasniční extrakt 2,8 mM glukosa 6 mM laktosa 0,5 % (V/V) glycerol 1 mM MgCl ₂ 25 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 50 mM KH ₂ PO ₄ 50 mM Na ₂ HPO ₄
-----------	---

TAB 15 Roztoky pro chromatografické metody:

Promývací pufr (PI4KII α T4)	50 mM Tris-Cl (pH 8,0) 300 mM NaCl 3 mM β - merkaptoethanol 40 mM imidazol 10 % (V/V) glycerol
Promývací pufr (VAMP3)	50 mM Tris-Cl (pH 8,0) 150 mM NaCl 3 mM β - merkaptoethanol 40 mM imidazol 10 % (V/V) glycerol 2 % (W/V) cholát sodný
Eluční pufr (PI4KII α T4)	50 mM Tris-Cl (pH 8,0) 300 mM NaCl 3 mM β - merkaptoethanol 300 mM imidazol 10 % (V/V) glycerol
Eluční pufr (VAMP3)	50 mM Tris-Cl (pH 8,0) 150 mM NaCl 3 mM β - merkaptoethanol 300 mM imidazol 2 % (W/V) cholát sodný
Pufr pro chromatografii na iontoměničích (PI4KII α T4)	30 mM Citrát (pH 5,5) 30 mM NaCl (A) 1 M NaCl (B) 3 mM β – merkaptoethanol (filtrovaný 0,22 μ m)

Pufr pro gelovou chromatografii (PI4KII α T4)	20 mM Tris (pH 8,0) 200 mM NaCl 3 mM β – merkaptoethanol (filtrovaný 0,22 μ m)
Pufr pro gelovou chromatografii (VAMP3)	20 mM Tris (pH 8,0) 150 mM NaCl 1 mM β – merkaptoethanol 1 % (W/V) CHAPS (filtrovaný 0,22 μ m)
Promývací pufr „Pull-Down“	0,25 % (W/V) CHAPS 80 mM Imidazol 50 mM Tris (pH 8,0) 100 mM NaCl 1 mM β - merkaptoethanol
Eluční pufr „Pull-Down“	0,25 % (W/V) CHAPS 300 mM Imidazol 50 mM Tris (pH 8,0) 100 mM NaCl 1 mM β - merkaptoethanol

TAB 16 Roztoky pro elektron migrační metody:

	Klasická „SDS - PAGE“.	„Tris-Tricine SDS-PAGE“
Zaostřovací gel	125 mM Tris-Cl (pH 6,8) 4 % (V/V) akrylamid / bisakrylamid (37,5 : 1) 0,1 % (W/V) SDS 0,005 % (V/V) TEMED 0,05 % (W/V) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	250 mM Tris-Cl (pH 8,45) 2,9 % (V/V) akrylamid / bisakrylamid (37,5 : 1) 0,1 % (W/V) SDS 0,12 % (V/V) TEMED 0,02 % (W/V) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈
Separáční gel	375 mM Tris-Cl (pH 8,8) 10 % (W/V) akrylamid / bisakrylamid (37,5 : 1) 0,1 % (W/V) SDS 0,001 % (V/V) TEMED 0,05 % (W/V) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	1,2 M Tris-Cl (pH 8,45) 13,2 % (W/V) akrylamid / bisakrylamid (37,5 : 1) 0,1 % (W/V) SDS 10 % (V/V) glycerol 0,05 % (V/V) TEMED 0,02 % (W/V) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈
Katodov� elektroforetick� pufr	25 mM Tris NaCl 0,25 M glycin 0,1 % (W/W) SDS	0,1 M Tris-Cl 0,1 M tricin 0,1 % (W/V) SDS
Anodov� elektroforetick� pufr	(pH 8,8)	0,04 Tris-Cl (pH 8,9)
Vložené napětí	220 V	150 V

Vzorkový pufr – „SDS PAGE“ (6x)	350 mM Tris-Cl (pH 6,8) 10 % (W/V) SDS 6 % (V/V) β - merkaptoethanol 30 % (V/V) glycerol 0,012 % (W/V) bromfenolová modř
Barvicí roztok CBB	3 mM Coomassie Brilliant Blue 1,5 M CH ₃ COOH 50 % (V/V) methanol
Agarosový gel	1 % (W/V) agarosa 0,01 % (V/V) ethidium bromid rozpuštěný v TAE pufru
TAE pufr	40 mM Tris-HCl, 20 mM CH ₃ COOH, 1 mM EDTA (pH 8,0)

TAB 17 Složení dialyzačního pufru

Dialyzační pufr	100 mM NaCl 3 mM β – merkaptoethenol 2 mM citrát (pH = 5,5)
-----------------	---

4.6. Sekvence použitých templátů DNA (VAMP3 a PI4KII α):

Konstrukt DNA PI4KII α T4 (PI4KII α s T4 lysozymem)

ATGAACAGCAGCCATCACCATCATCACCCACATGCGAGTACAAGCTTATCCTGAACGGTAAAAACCCTGAAAGGTGAAACCAC
CACCGAAGCTGTGCGACGCTGCTACCGCGGAAAAAGTTTTCAAACAGTACGCTAACGACAACGGTGTGACGGTGAATG
GACCTACGACGACGCTACCAAAAACCTTCACGGTAACCGAAATAATAACAACAATAACAACAACAACAATGAAAACCTGT
ATTTTCAGGGCGCCATGGATGAAACAAGTCTCTGTCTCTCCAGAACGTGCTCAGCCTCCAGATTATACATTTCCATCTG
GTTCTGGAGCACATTTCTCAAGTACCAGGAGGTGAGTTCGTGTAGCTGCAGCAGCAGGATCTGGTCTTTCTCCACCT
GGATCACCAGGTCACGATCGTGAACGTCAACCTCTCTTAGATCGTGCACGTGGAGCTGCTGCACAAGGTCAAACCTAAA
CCGTGGCGGCGCAGGCCAGGCTCTGGCCGCTCAGGCCGCGGGCAGCCACGCCGCTCAGGCCACCAGCGAGCGG
AACGAGTTCCCGGAGGATCCTGAGTTCGAGGCGGTGGTGCAGGCGGAGCTGGCCATCGAGCGCTGCATCTTTCC
GAGCGCATCTACCAGGGCTCCAGCGGAAGCTACTTCGTCAAGGACCCTCAGGGGAGGATCATTGCTGTCTTCAAACCCA
AGAATGAAGAGCCCTATGGGCATCTTAATCCTAAGTGGACCAAGTGGCTGCAGAAGAATATATTTGAAATGTTACGTATAG
ATGAAGGTCTTAGACTTAAAATCTATAAAGACACAGAAGGCTATTACACTATTGGCATCGGTCAATTTGCTTACAAAAGTC
CATCACTTAATGCTGCTAAATCTGAATTAGATAAAGCTATTGGCGTAATACTAATGGTGAATTAACAAAAGATGAGGCTGA
AAAATCTTTAATCAGGATGTTGATGCTGCTGTTCCGCGGAATTCTGAGAAATGCTAAATTAACCCGGTTTATGATTCTCTT
GATGCGGTTTCGTCGCGCTGCATTGATTAATATGTTTTCCAAATGGGAGAAACCCGGTGTGGCAGGATTTACTAACTCTTTA
CGTATGCTTCAACAAAACGCTGGGATGAAGCAGCAGTTAACTTAGCTAAAAGTAGATGGTATAATCAAACACCTAATCG
CGAAAACGAGTCATTACAACGTTTAGAACTGGCACTTGGGACGCGTATAAAAATCTAGGCCGTGACTGCCTTGCCTTA
ACCAGGGCTATCTCAGAAGCAGGGGCCAGCCTGGTGGACCAAAAACCTGGAACCTCAACATTGTCCCCGTACAAAAGGT
AGTATACCTGGCCAGTGAGACCTCAACTATAGTGCCATTGACCGAGTGAAGTCCAGGGGCAAGCGGCTGCACTAGAG
AAAGTGCCAAAAGTTGGACAGCGGTTAACCGCATCGGGCTACCACCAAAGGTTGGTTTATTCCAGCTCTTTGTTGAAG
GCTACAAAGATGCAGACTATTGGCTGCGGCGTTTTGAAGCAGAACCTCTTCTGAGAACACTAACCGCAACTACTGCTC
CAGTTTGAGCGGTTGGTGGTGGTGGATTACATCATCCGCAACACTGATCGAGGCAATGACAACCTGGCTGATTAAATATGA
CTGTCCAATGGATAGTTCTAGCTCTCGGGACACAGACTGGGTGGTGGTGAAGGAGCCTGTTATCAAGGTGGCTGCCATA
GACAATGGGCTGGCCTTCCCACTGAAGCATCTGACTCTGGAGGGCATATCCTTTTTACTGGGCTGGTTGCCCCAGGC
GAAAGTCCCATTTTCTCAGGAGATCAAAGATCTGATCCTTCAAAGATATCGGACCCTAACCTTCGTCAAGGACTTGGAAAG
AGGACCTATATGAACTCTCAAGAAAAGATCCTGGTTTTGACAGGGGCCAGTTCCATAAGCAGATTGCTGTATGCGGGGC
CAGATCTTAAATCTGACCCAGGCTTGAAGACAACAAGAGTCCCCTGCACCTCGTCCAGATGCCACCTGTGATTGTGCGA
GACGGCCCGTTCCACCAGCGGTCTTCTAGCGAGTCTACACAGAGCTTTCAGAGCCGGAAGCCCTTCTTTTCATGGT
GGTAG

Sekvence DNA His GB1 - kotvy je označena žlutě, zeleně sekvence DNA T4 lysozymu.

Konstrukt DNA VAMP 3

ATGTCTACAGGTCCAACCTGCTGCCACTGGCAGTAATCGAAGACTTCAGCAGACACAAAATCAAGTAGATGAGGTGGTGG
ACATAATGCGAGTTAACGTGGACAAGGTTCTGGAAAGAGACCAGAAGCTCTCTGAGTTAGACGACCGTGCAGACGCAC
TGCAGGCAAGCGCTTCTCAATTTGAAACGAGCGCAGCCAAGTTGAAGAGGAAATATTGGTGGGAAGAATTGCAAGCATC
ATCATCATCATCATAGCCTAGGGGTAC

Žlutě je označena His - kotva.

TAB 18 Sekvence použitých primerů:

<i>Dle směru replikace:</i>	<i>Sekvence primerů</i>
Forwardní primer VAMP 3 NcoI/1	5'TATAAGCCATGGATGTCTACAGGTCCAAGTGG3'
Reversní primer VAMP 3 AvrII/2	5'GTACCCCTAGGCTAATGATGATGATGATGATGCTTGCAA TTC TTCCACCAATAT3'
Forwardní primer VAMP 3 NdeI/1	5'TATAAGCATATGATGTCTACAGGTCCAAGTGG3'
Reversní primer STO 720 (T7 terminátor)	5'TATGCTAGTTATTGCTCAG3'

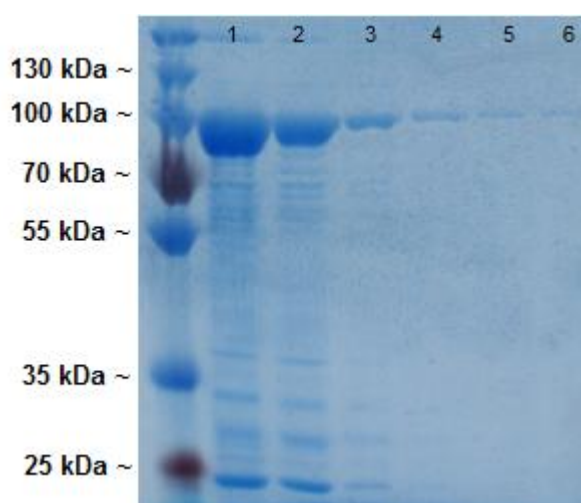
(Primery byly připraveny firmou Integrated DNA Technologies)

5. Výsledky

5.1. Expres a purifikace proteinu PI4KII α T4

Expresní konstrukt pro PI4KII α T4, jehož součástí je sekvence His GB1 - kotvy pro afinitní chromatografii a T4 lysozym pro vyšší rozpustnost, byl v naší laboratoři již připraven. Plasmid byl transformován do kompetentních buněk *E. coli* BL 21 STAR a bakterie zaočkovány do LB - média dle 4.1.2.1, str 25. Takto připravená bakteriální kultura byla přenesena do 12 l ZY média, kde probíhala exprese proteinu PI4KII α T4 (viz 4.1.2.2, str 26).

Vzniklý bakteriální nepravý roztok byl nejprve odstředěn a tím oddělen od expresního média (viz 4.1.3.1, str 26). Bakteriální buňky byly následně lysovány (viz 4.1.3.2, str 26), aby z jejich buněčného obsahu bylo možné izolovat daný protein pomocí Ni - sefarysy (viz 4.1.3.3, str 26). Jednotlivé frakce proteinu PI4KII α T4 byly analyzovány pomocí „SDS-PAGE“ (viz 4.1.4, str 28). Jak je vidět na OBR 7, vzniklé proužky proteinu se nachází mezi 100 a 70 kDa, odpovídají tedy molekulové hmotnosti proteinu PI4KII α s T4 lysozymem (81,216 kDa).

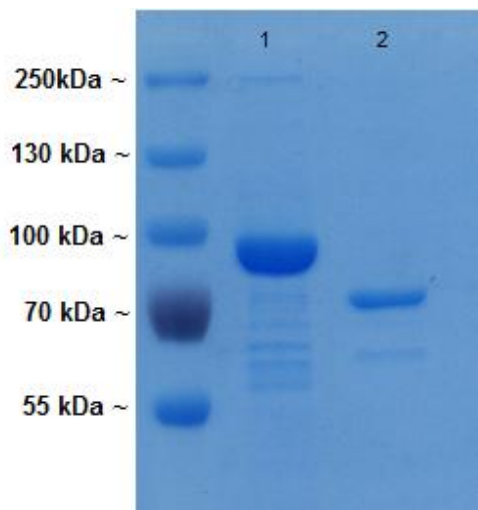


OBR 7 „SDS-PAGE“ eluce proteinu PI4KII α T4 po afinitní chromatografii (Ni - sefarysa)

10 % akrylamidový gel; barveno CBB G 250

V jednotlivých drahách je postupně zobrazeno: standard MW; 1 – 6 chronologicky seřazené frakce eluovaného proteinu PI4KII α T4

His GB1 – kotva prvních třech frakcí (viz OBR 7, str 41) získaného proteinu byla odštěpena pomocí TEV – proteasy během výměny pufru při dialýze (viz 4.1.3.4, str 27). Získaný protein byl analyzován pomocí „SDS-PAGE“ (viz 4.1.4, str 28) na OBR 8, kde je vidět pokles molekulové hmotnosti asi o 15 kDa, který odpovídá odštěpení His GB1- kotvy. Také je vidět zředění proteinu v důsledku dialýsy.

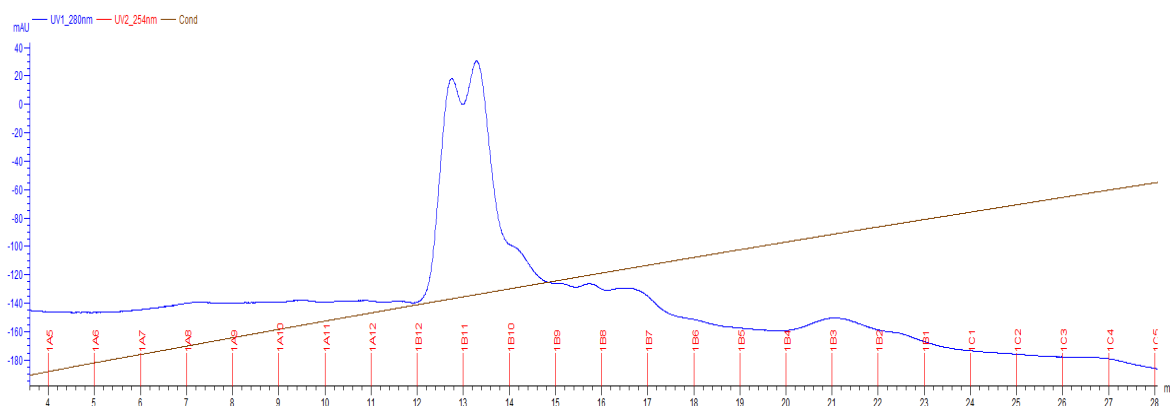


OBR 8 „SDS-PAGE“ štěpení His GB1 - kotvy proteinu PI4KIIαT4 pomocí TEV - proteasy

10 % akrylamidový gel; barveno CBB G 250

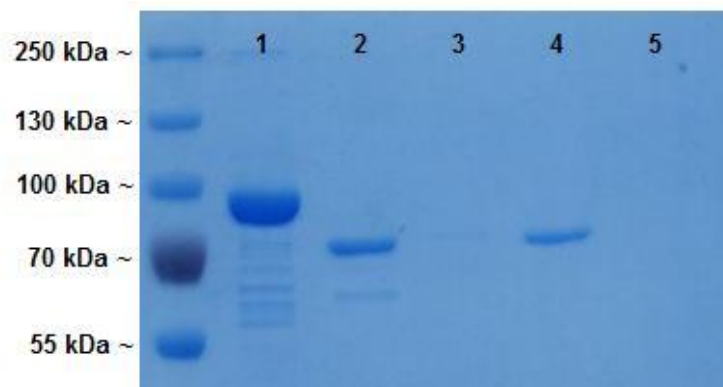
V jednotlivých drahách je postupně zobrazeno: standard MW; PI4KIIαT4 - His GB1 (1); PI4KIIαT4 (2)

Protein PI4KII α T4 byl dále purifikován pomocí chromatografie na kationtovém iontoměniči (viz 4.1.3.5, str 27) jejíž chromatogram je znázorněn na OBR 9.



OBR 9 Závislost absorpance na elučním objemu (protein PI4KII α T4) v podmínkách gradientové eluce 30 mM až 1 M NaCl na koloně MONO S 5/50 GL (rozměry kolony – 5 x 50 mm; mrtvý objem 1 ml) ekvilibrované pufrém pro chromatografii na iontoměničích (viz TAB 15, str 35).

Modře je znázorněna absorpance při $\lambda = 280 \text{ nm}$, hnědě konduktivita.



OBR 10 „SDS-PAGE“ frakcí chromatografie na kationtovém iontoměniči PI4KII α T4

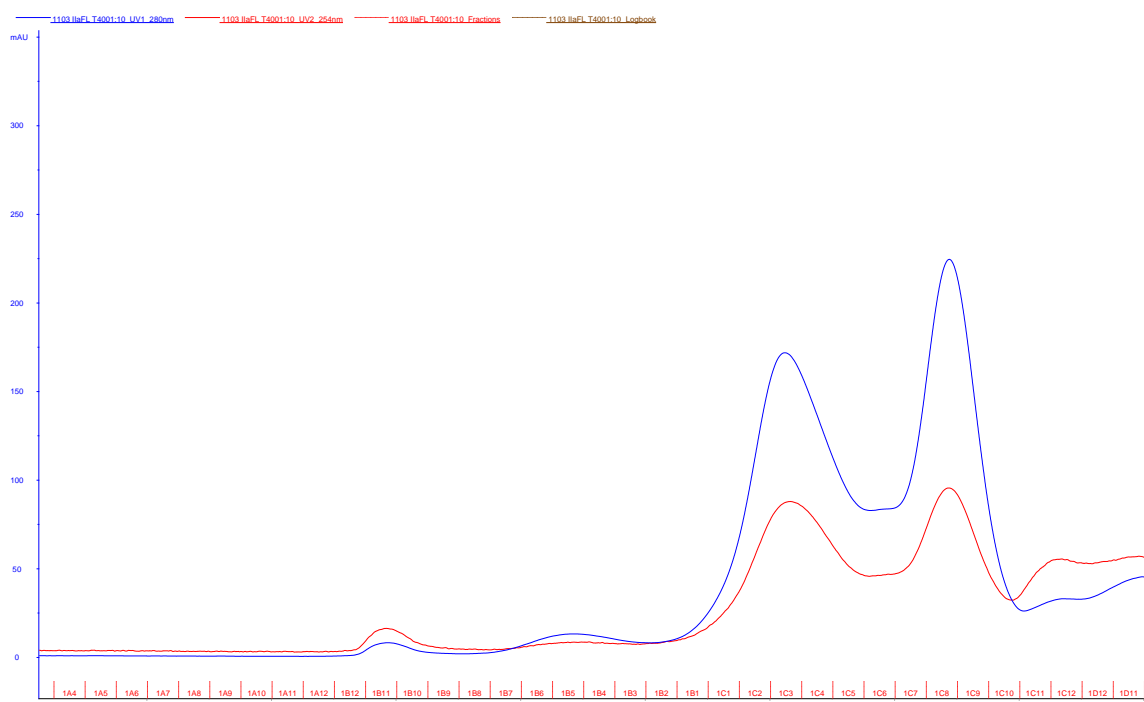
10 % akrylamidový gel; barveno CBB G 250

V jednotlivých drahách je postupně zobrazeno: standard MW; PI4KII α T4 - His GB1 po afinitní purifikaci (Ni - sefarosa)(1); PI4KII α T4 po dialyse (2); objemové frakce eluované při chromatografii na kationtovém iontoměniči. (PI4KII α T4) 1B12 (3); 1B11 (4); 1B10 (5)

Na OBR 10 str 43 je pomocí „SDS-PAGE“ (viz 4.1.4) znázorněna elektroforetická mobilita proteinů frakcí chromatografie na kationtovém iontoměničích s absorbcí při 280 nm. Prostřednictvím těchto elektroforetických mobilit lze uvažovat, že protein odpovídá teoretické velikosti 81 kDa.

Na gel byly nanášeny poloviční objemy jednotlivých frakcí eluovaných při chromatografii na kationtovém iontoměničích oproti objemům vzorků z předcházejících purifikací. Proto jsou na gelu vidět tenčí proužky ve drahách 3 a 4 (5) na OBR 10, str 43.

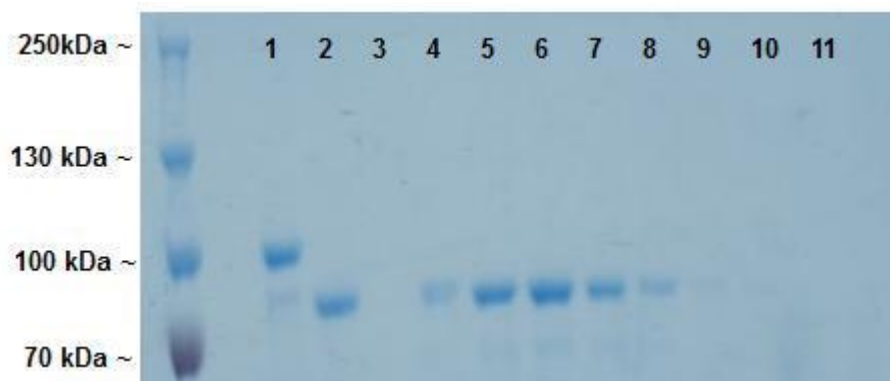
Proteinové frakce 1B12 až 1B10 byly zakoncentrovány s použitím molekulového síta (MWCO = 30 000, 2000 g Allegra X – 15 R Centrifuge; Beckmann Coulter) na cílový objem 500 μ l, aby následně byly purifikovány pomocí gelové permeační chromatografie (viz 4.1.3.6, str 27) jejíž záznam je na OBR 11, str 44.



OBR 11 Závislost absorpce na elučním objemu PI4KIIaT4 za použití kolony SUPERdex 200 10/300 GL (rozměry kolony 10 x 300 mm; mrtvý objem 24 ml)

ekvilibrované puřrem pro gelovou chromatografii (PI4KIIaT4) (viz TAB 15, str 35). Modře je znázorněna absorpce při $\lambda = 280$ nm, červeně při $\lambda = 254$ nm.

Frakce z gelové permeační chromatografie, které absorbovaly při 280 i 254 nm byly analyzovány pomocí „SDS-PAGE“ (viz 4.1.4, str 28) na OBR 12.



OBR 12 „SDS-PAGE“ frakcí gelové permeační chromatografie proteinu PI4KIIαT4
10 % akrylamidový gel; barveno CBB G 250

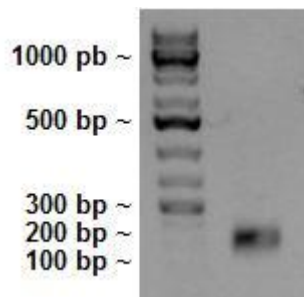
V jednotlivých drahách je postupně zobrazeno: standard MW; PI4KIIαT4 - His GB1 po afinitní purifikaci (Ni - sefarosa)(1); PI4KIIαT4 po dialyze (2); objemové frakce eluované při gelové permeační chromatografii. (PI4KIIαT4) 1B1 (3); 1C1 (4); 1C2 (5); 1C3 (6); 1C4 (7); 1C7 (8); 1C8 (9); 1C9 (10); 1C10 (11)

Takto připravený protein PI4KIIαT4 měl koncentraci $0,19 \text{ mg.ml}^{-1}$, měřeno pomocí mikrospektrofotometru NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 při $\lambda = 280 \text{ nm}$ proti pufru pro gelovou chromatografii (PI4KIIαT4) (viz TAB 15, str 35). Protein byl skladován při teplotě $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2. Příprava konstruktů DNA proteinu VAMP 3

Nejprve byla do nukleotidové sekvence DNA pro protein VAMP 3 přidána sekvence kódující His-kotvu a restrikční místa pro enzymy NcoI a AvrII pomocí PCR (viz 4.1.1.1, str 20; použité primery viz TAB 18, str 40).

Produkt PCR byl vizualizován pomocí horizontální agarosové elektroforesy (viz 4.1.1.8, str 24) a je znázorněn na OBR 13. Vzniklý proužek DNA měl elektroforetickou mobilitu o něco nižší než fragment DNA standardu odpovídající 300 bp. Očekávaná velikost fragmentu DNA byla 240 bp.

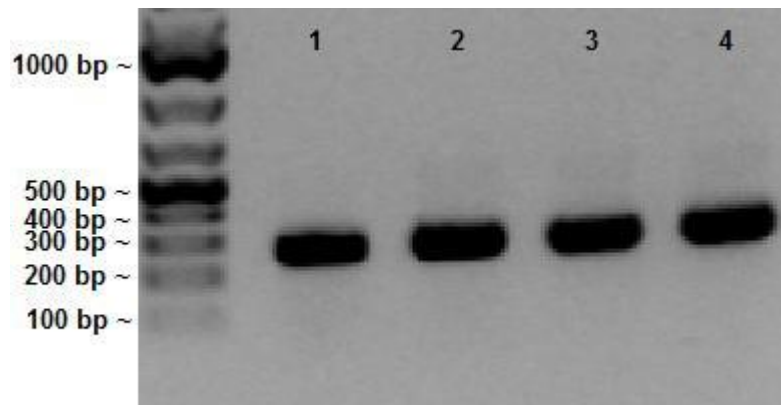


OBR 13 Horizontální agarosová elektroforesa produkt PCR - VAMP 3 s vloženými restrikčními místy (NcoI a AvrII) a His - kotvou

1% agarosový gel s 0,01 % (V/V) ethidium bromidu

Po pročištění DNA (viz 4.1.1.4, str 22) byla skrze restrikční místa (NcoI a AvrII) vložena do plasmidu pRSFD nukleotidová sekvence proteinu VAMP 3 (viz 4.1.1.5, str 22 a 4.1.1.6, str 23).

Sekvence DNA proteinu VAMP 3 byla zaklonovaná do plasmidu pRSFD skrze restrikční místa pro enzymy NcoI a AvrII (viz 4.1.1.5, str 22 a 4.1.1.6, str 23) za použití primerů VAMP 3 NcoI/1 a VAMP 3 AvrII/2 (viz TAB 18, str 40). Takto připravený plasmid byl následně transformován do DNA bakterií *E. coli* a úspěšnost transformace byla kontrolována plotnách s LB – agarem v přítomnosti kanamycinu ($40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (viz 4.1.1.7, str 23). Z vyrostlých bakteriálních kolonií byly vybrány 4, u kterých bylo analyzováno DNA pomocí PCR bakteriálních kolonií dle 4.1.1.3, str 21 (byly použity primery STO 720 a VAMP 3 NdeI/1 viz TAB 18, str 40). Produkt PCR byl vizualizován pomocí horizontální agarosové elektroforesy (viz 4.1.1.8, str 24). Na OBR 14 jsou vizualizovány PCR produkty všech čtyř kolonií, které mají přibližně stejnou elektroforetickou mobilitu odpovídající rozmezí proužků standardu o velikosti 200 a 300 bp. Očekávaná velikost tohoto PCR produktu byla 211 bp a tedy zhruba odpovídá získaným proužkům.



OBR 14 Horizontální agarosová elektroforesa produktu PCR bakteriálních kolonií (VAMP 3 + pRSFD).

*1% agarosový gel s 0,01 % (V/V) ethidium bromidu, horizontální elektroforesa
V jednotlivých drahách je postupně zobrazeno: standard MW; 1 - 4 odpovídají DNA jednotlivých transformovaných bakteriálních kolonií.*

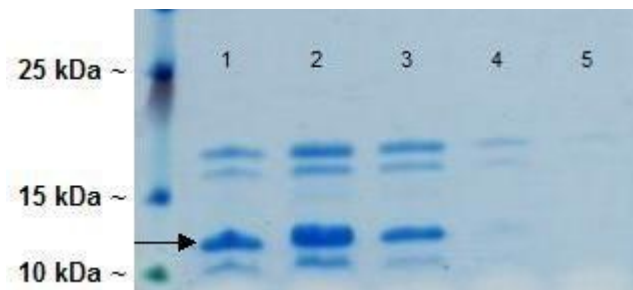
Protože intenzita proužků se příliš nelišila, byly vybrány bakterie z kolonie označené „2“ pro následnou amplifikaci (viz 4.1.1.9, str 24). DNA těchto bakterií mohla být izolována a pročištěna minipreparací plasmidové DNA (4.1.1.10, str 24).

Následně bylo dokázáno, že DNA obsahuje správnou nukleotidovou sekvenci proteinu VAMP 3 použitím metody sekvenace DNA (viz 4.1.1.11, str 25).

5.3. Exprese a purifikace proteinu VAMP 3

Konstrukt DNA připravený v kapitole 5.2, str 45 byl transformován do kompetentních buněk *E. coli BL 21 STAR* a zaočkován do LB - média (viz 4.1.2.1, str 25). Takto připravená bakteriální kultura byla exprimována ve 3 I ZY média (4.1.2.2, str 26). Centrifugací byly narostlé bakterie izolovány z média (viz 4.1.3.1, str 26), aby následně mohly být lysovány dle 4.1.3.2, str 26. Protein VAMP 3 byl izolován pomocí afinitní chromatografie (viz 4.1.3.3, str 26), jejíž eluce byla vizualizována pomocí „Tris-Tricine SDS-PAGE“ (viz 4.1.4, str 28). Na OBR 15 str 48 je vidět izolovaný protein VAMP 3 (označen šipkou), který putoval v gelu

elektroforetickou mobilitou jen o trochu menší než proužek standardu odpovídající 10 kDa,.



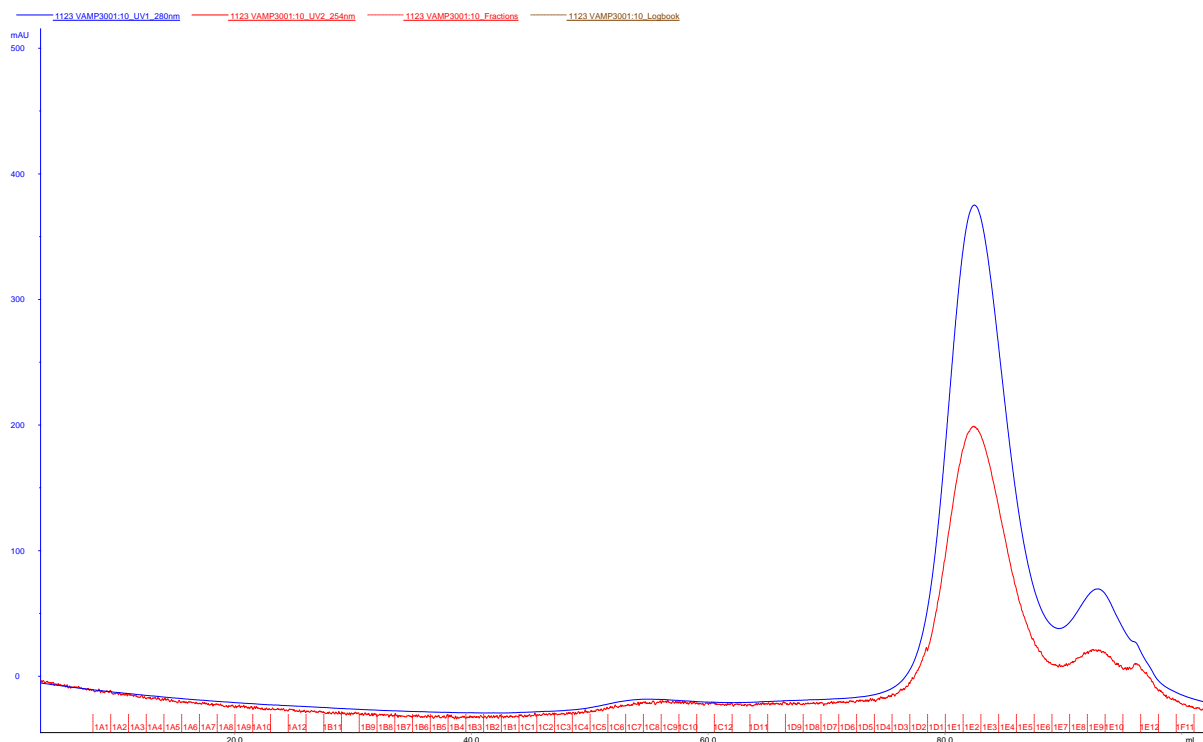
OBR 15 „Tris-Tricine SDS-PAGE“ eluce proteinu VAMP 3 po afinitní chromatografii (Ni - sefarsa)

13 % akrylamidová gel; barveno CBB G 250

V jednotlivých drahách je postupně zobrazeno: standard MW; 1 – 5 chronologicky seřazené frakce eluovaného proteinu VAMP 3.

Získaný protein byl kontaminován bakteriálními proteiny, které se nespecificky navázaly na Ni – sefarusu. Frakce 1 až 3 (viz OBR 15) tohoto proteinu byly smíšeny a zakoncentrovány na cílový objem 500 μ l pomocí polekulového síta (MWCO = 3000, 2000 g Allegra X – 15 R Centrifuge; Beckmann Coulter).

Takto připravený vzorek byl purifikován pomocí gelové permeační chromatografie (viz 4.1.3.6, str 27) jejíž záznam je uveden na OBR 16, str 49.



OBR 16 Závislost absorbance na elučním objemu VAMP 3 za použití kolony Hi LOAD 16/60 SUPERdex 75 prep grade (rozměry kolony 1,6 x 60 cm; mrtvý objem 121 ml) ekvilibrované puftrem pro gelovou chromatografii (VAMP 3) (viz TAB 15, str 35). Modře je znázorněna absorbance při $\lambda = 280 \text{ nm}$, červeně při $\lambda = 254 \text{ nm}$.

Na OBR 17, str 50 se nachází fotografie gelu „Tris-Tricine SDS-PAGE“ (viz 4.1.4, str 28) jednotlivých frakcí z gelové permeační chromatografie které absorbovaly při 280 i 254 nm. Protein se nachází ve frakcích 1D2 až 1E5.

Protein byl skladován při teplotě $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.



OBR 17 „Tris - Tricine SDS-PAGE“ frakcí gelové permeační chromatografie proteinu VAMP 3

13 % akrylamidová gel; barveno CBB G 250

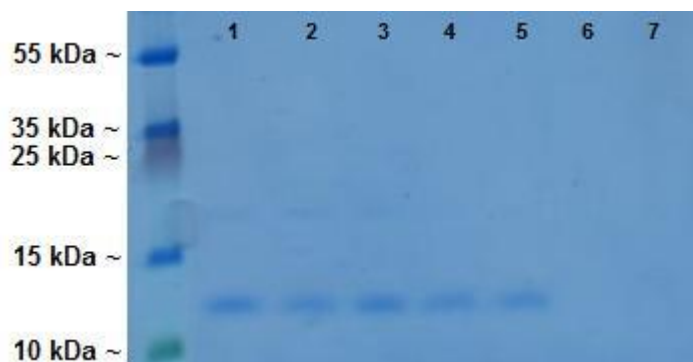
V jednotlivých drahách je postupně zobrazeno: standard MW; protein VAMP 3 po afinitní chromatografii (1); frakce z gelové permeační chromatografie (OBR 16, str 49): 1D3 (2); 1D2 (3); 1D1 (4); 1E1 (5); 1E2 (6); 1E3 (7); 1E4 (8); 1E5 (9); 1E8 (10); 1E9 (11); 1E10 (12)

Takto připravený protein měl koncentraci $0,84 \text{ mg.ml}^{-1}$, změřenou pomocí mikrospektrofotometru NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 při $\lambda = 280 \text{ nm}$ proti pufru pro gelovou chromatografii (VAMP 3) (viz TAB 15, str 35) a byl uchováván při teplotě $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.4. Optimalizace promývacího pufru

Nejprve bylo zjištěno při jaké koncentraci imidazolu v promývacím pufru se protein VAMP 3 obsahující His – kotvu ještě váže na Ni – sefarosu. Byl proveden „Pull-Down“ (viz 4.2, str 30) pouze s proteinem VAMP 3. Na Ni – sefarosu bylo navázáno $40 \mu\text{l}$ ($0,84 \text{ mg.ml}^{-1}$) proteinu VAMP 3. Následně byl nepravý roztok promýván promývacím pufrům „Pull – Down“ (viz TAB 15, str 35) o změněné

koncentraci imidazolu (20; 40; 60; 80; 100; 120; 140 mM) a pak eluován elučním pufrem „Pull – Down“ (viz TAB 15, str 35). Eluát byl analyzován pomocí „Tris-tricine SDS – PAGE“ (viz 4.1.4, str 28). Na OBR 18 je vidět, že vazba His – kotvy proteinu VAMP 3 na Ni-sefarosu přestane při promytí pufrem o 100 mM koncentraci imidazolu. Tato koncentrace je však poněkud limitní, proto byl pro další pokusy používán promývací pufr“Pull-Down“ o 80 mM koncentraci imidazolu.



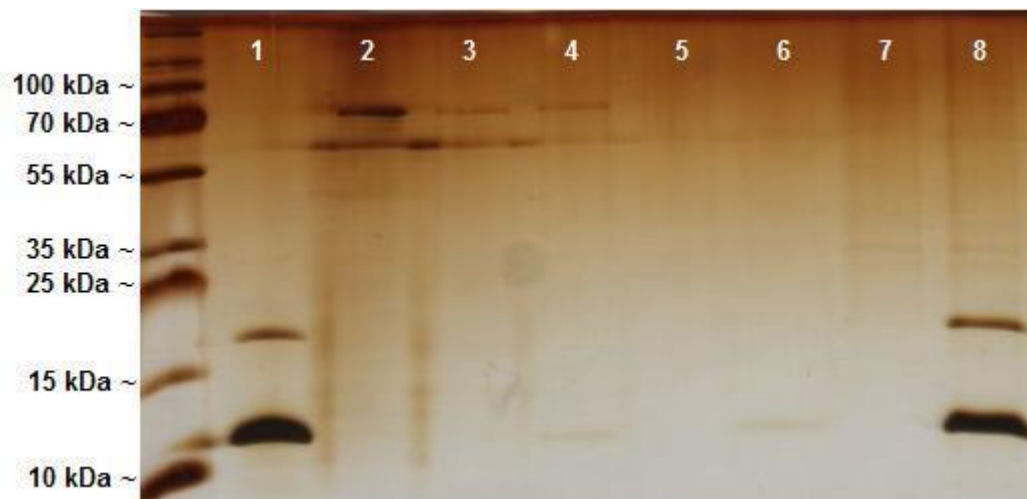
OBR 18 "Pull - Down" proteinu VAMP 3, maximální koncentrace imidazolu v promývacím pufru

13 % akrylamidová gel; barveno CBB G 250

(„Tris - Tricine SDS-PAGE“)

V jednotlivých drahách je postupně zobrazeno: standard MW; protein VAMP 3 eluován po použití různé koncentrace imidazolu v promývacím pufru „Pull – Down“ (viz TAB 15, str 35) - 20 mM (1); 40 mM (2); 60 mM (3); 80 mM (4); 100 mM (5); 120 mM (6); 140 mM (7)

Následně by proveden „Pull – Down“ dle 4.2, str 30 s oběma proteiny VAMP 3 (obsahující His - kotvu) i PI4KII α T4 (bez His GB1 - kotvy) za 80 mM koncentrace imidazolu v promývacím pufru „Pull – Down“ (viz TAB 15, str 35). Jako kontrola byl použit stejný pokus „Pull – Down“ ovšem pouze s proteinem PI4KII α T4. Jeho průběh byl vizualizován pomocí „Tris – Tricine SDS – PAGE“ (viz 4.1.4, str 28) a barven pomocí stříbra (viz 4.1.4.2, str 29). Jak je patrné z OBR 19, při 80 mM koncentraci imidazolu v promývacím pufru „Pull – Down“ (viz TAB 15, str 35) se protein PI4KII α T4 již nespecificky neváže na Ni – sefarosu.



OBR 19 Vizualizace průběhu „Pull – Down“ proteinů VAMP 3(His - kotva) a PI4KIIαT4 (bez His GB1 - kotvy) při 80 mM koncentraci imidazolu v promývacím pufru „Pull – Down“ (viz TAB 15, str 35).

13 % akrylamidová gel; barveno pomocí stříbra (viz 4.1.4.2, str 29)
(„Tris - Tricine SDS-PAGE“)

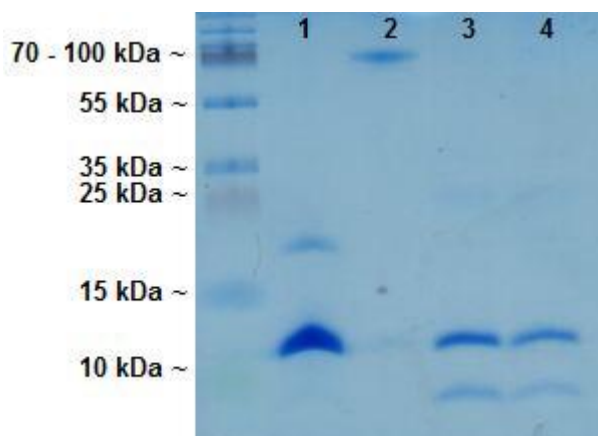
V jednotlivých drahách je postupně zobrazeno: standard MW; protein VAMP 3 (1); PI4KIIαT4 (2); promývací pufr po prvním promytí - kontroly obsahující pouze protein PI4KIIαT4 (3) - proteinů VAMP 3 a PI4KIIαT4 (4); promývací pufr po pátém (posledním) promytí - kontroly obsahující pouze protein PI4KIIαT4 (5) - proteinů VAMP 3 a PI4KIIαT4 (6); eluce kontroly obsahující jen protein PI4KIIαT4 (7); eluce proteinů VAMP 3 a PI4KIIαT4

Z OBR 19 je patrné, že pětinasobné promytí promývacím pufrům „Pull – Down“ (viz TAB 15, str 35) obsahujícím 80 mM imidazol je dostatečné pro odmytí proteinu PI4KIIαT4. Dále tento obrázek ukazuje, že při těchto podmínkách se protein PI4KIIαT4 na protein VAMP 3 neváže.

5.5. Koexprese PI4KII α T4 a VAMP 3

V naší laboratoři byl připraven expresní plasmid obsahující nukleotidovou sekvenci proteinu VAMP 3 (jejíž součástí je His – kotva) a zároveň proteinu PI4KII α T4 (bez His – kotvy).

Tento plasmid byl transformován a zaočkován (viz 4.1.2.1, str 25). Následně byl exprimován ve 3 I ZY média (viz 4.1.2.2, str 26). Centrifugací byly narostlé bakterie byly izolovány z média (viz 4.1.3.1, str 26), aby následně mohly být lysovány dle 4.1.3.2, str 26. Proteiny VAMP 3 a PI4KII α T4 byly izolovány pomocí afinitní chromatografie (viz 4.1.3.3, str 26) za použití promývacího pufrem „Pull – Down“ (viz TAB 15, str 35). Protein byl eluován do dvou frakcí o objemu 2 ml elučním pufrem (VAMP 3) viz TAB 15 ,str 35 jejíž eluce byla vizualizována „Tris-Tricine SDS-PAGE“ (viz 4.1.4, str 28) na OBR 20.



OBR 20, „Tris-Tricine SDS-PAGE“ eluce koexprese proteinů VAMP 3 a PI4KII α T4 po afinitní chromatografii (Ni - sefarosa)

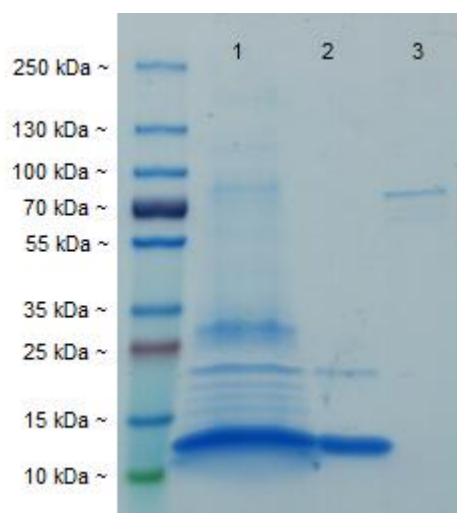
13 % akrylamidová gel; barveno CBB G 250

V jednotlivých drahách je postupně zobrazeno: standard MW; protein VAMP 3 (1); protein PI4KII α T4 (2); eluát komplexu proteinů PI4KII α T4 a VAMP 3 (3 - 4)

Protein PI4KII α T4 byl oproti proteinu VAMP 3 exprimován významně méně, nebylo jej tedy možno zachytit na fotografii gelu, ale na samotném gelu byl okem patrný proužek o stejné elektroforetické mobilitě jako protein PI4KII α T4 ve druhé dráze. Obě frakce obsahující protein byly smíšeny a zakoncentrovány

(MWCO = 3000; 2000 g Allegra X – 15 R Centrifuge; Beckmann Coulter) na 0,18 mg.ml⁻¹, změřenou pomocí mikrospektrofotometru NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 při $\lambda = 280$ nm proti destilované vodě.

Následně byly vizualizovány pomocí gradientového (4 - 20%) akrylamidového gelu (viz TAB 13, str 33) v podmínkách „SDS - PAGE“ (viz 4.1.4, str 28). Na OBR 21, str 54 je již zřetelně vidět přítomnost proteinu VAMP 3 a PI4KII α T4.



OBR 21 Vizualizace koexprese proteinů VAMP 3 a PI4KII α T4

4 - 20 % gradientový akrylamidový gel; barveno CBB G 250

V jednotlivých drahách je postupně zobrazeno: standard MW; eluce koexprese proteinů VAMP 3 a PI4KII α T4; protein VAMP 3 (2); protein PI4KII α T4 (3)

Proužek proteinu odpovídající svou elektroforetickou mobilitou proteinu PI4KII α T4 (viz OBR 21) byl vyříznut z gelu a po štěpení trypsinem a následné extrakci peptidů byl analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie, která potvrdila přítomnost sekvence AA tohoto proteinu. Měření a analýza hmotnostního spektra byla provedena Mgr. Janou Horákovou.

Níže je uvedená sekvence AA proteinu PI4KII α T4, zeleně jsou zvýrazněny části sekvence jejichž hladina spolehlivosti se pohybuje nad 95 %, žlutě mezi 50 až 95 % a červeně pod 50 %.

MDETSPLVSPERAQPPDYTFPSGSGAHFPQVPGGAVRVAAAAGSGSPPGSPGHDRERQPLLD RARGA
AAQGQTQTVAAQAQALAAQAAAAHAAQHRERNEFPEDPEFEAVVRQAELAIERICIFPERIYQGSSGSYFVK
DPQGR I IAVFKPKNEEPYGHLPKWKWLQKN I FEMLR IDEGLRLKIYKDTEGYTIGIGHLLTKSPSLNAAK
SELDKAIGRNTNGVITKDEAEK LFNQDVDAAVR GILRNAK LKPVYDSLDAVRRAALINMVFQMGETGVAGFTN
SLRMLQQKRWDEAAVNLA KSRWYNQTPNRAKRVITTFRTGTWDAYKNLGRDCLVLNQGYLSEAGASLVDQKLE
LNIVPRTKVVYLASETFNYS AIDRVKSRGKRLALEKVPKVGQRFNRIGLPPKVGSFQLFVEGYKDADYWLRRF
EAEPLPENTNRQLLLQFERLVLDYIIRNTDRGNDNWLIKYDCPMDSSSSRD TDWVVVKEPVIKVA AIDNGLA
FPLKHPDSWRAYPFYWAWLPQAKVPFSQEIKDLILPKISDPNFVKDLEEDLYELFKKDPGFDRGQFHKQIAVM
RGQILNLTQALKDNK SPLHLVQMPVIVETARSHQRSSSESYTQSFQSRKPFSSWW

6. Diskuse

Cílem této práce bylo připravit a purifikovat proteiny VAMP 3 a PI4KII α T4, dále zjistit zda tento SNARE protein VAMP 3 může přímo interagovat s proteinem PI4KII α T4. Prokázání těchto interakcí mělo přispět k objasnění mechanismu regulace kiny PI4KII α .

Již v teoretickém úvodu bylo poukázáno na stejnou kompartmentaci těchto proteinů (PI4KII α a VAMP 3) [6], [11], [13], [15]. Žádná literatura však neobsahovala informaci o přímé interakci těchto proteinů. V odstavci 2.1.1, str 11 je dokonce zmíněna hypotéza, zda se protein VAMP 3 neváže spíše na substrát nebo produkt kiny PI4KII α (fosfatidylinositol), místo na samotnou kinasu [8]. Na první pohled se tedy zdálo, že tyto dva proteiny jsou si blízké pouze svou lokalizací na membráně endosomů. Vycházeli jsme však z osobního sdělení Tamas Balla, M.D., Ph.D.(Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, Maryland, USA) kde v proteomické analýze interakčních partnerů proteinu PI4KII α byl identifikován i protein VAMP 3 [10].

Nejdříve byly připraveny proteiny VAMP 3 a PI4KII α T4 skrze bakteriální expresi v *E. coli*, které byly následně purifikovány pomocí afinitní, iontové a gelové permeační chromatografie (a protein PI4KII α T4 - chromatografie na kationtovém iontoměniči).

Zjistili jsem, že v podmínkách 80 mM imidazolu se protein PI4KII α T4 na protein VAMP 3 neváže (viz OBR 19, str 52). Tato skutečnost může být zapříčiněna příliš vysokou koncentrací imidazolu, který by mohl narušit možné slabé vazebné interakce mezi těmito proteiny. Použití nižší koncentrace imidazolu mělo za následek nespecifickou vazbu proteinu PI4KII α T4 na nosič, Ni - sefarosu (experiment neuveden).

Z těchto důvodů jsme se snažili dokázat tuto interakci prostřednictvím koexprese proteinů PI4KII α T4 a VAMP 3 (sekvence DNA obou proteinů byly vloženy do jednoho plasmidu, ale pouze protein VAMP 3 obsahoval His - kotvu). V těchto podmínkách se protein PI4KII α T4 pravděpodobně vytvořil komplex s některým z proteinů navázaný na nosič Ni - sefarosu (viz OBR 21, str 54).

Proteiny VAMP 3 i PI4KII α T4 bylo možné identifikovat pomocí diskontinuální elektroforesy v denaturačním prostředí SDS. Přítomnost PI4KII α T4 byla pak potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie.

Kinasa PI4KII α T4 spolu s proteinem VAMP 3 nebyly jedinými proteiny, které byly eluovány z nosiče, Ni - sefarosy.

Je otázkou, zda tyto další detekované proteiny vytváří vazbu s jedním z proteinů (PI4KII α T4, VAMP 3), nebo se jedná pouze o jejich nespecifickou interakci s nosičem. Další experimenty studující protein - proteinovou interakci (VAMP 3 a PKII α) a kontrolní vzorky budou součástí navazující diplomové práce.

7. Závěr

- Metodou molekulárního klonování byl připraven plasmid kódující protein VAMP 3.
- Protein PI4KII α T4 a cytosolová část proteinu VAMP 3 byly exprimovány v buňkách *E. coli*.
- Koexprese proteinů PI4KII α T4 a VAMP 3 naznačuje možnou interakci těchto proteinů.

Bibliografie

- [1] J. S. Bonifacio, Vesicular transport earns a Nobel, Trends in Cell Biology 24, 3-5, 2014.
- [2] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.:Základy buněčné biologie, Espero Publishing, s.r.o., Ústí nad Labem (1998).
- [3] Chaineau, M., Danglot, L., Galli T.:FEBS Lett.583, 3817-3826 (2009).
- [4] Hong, W.:Biochim. Biophys. Acta1744, 120–144 (2005).
- [5] Goodsell, D.: doi: 10.2210/rcsb_pdb/mom (2013).
- [6] Miller, S. E., Sahlender, D. A., Graham, S. C., Honing, S., Robinson, M. S., Peden, A. A., Owen, D. J.:Biochem. Cell Biol.147, 1118-1131 (2011).
- [7] Hong, W., Lev, S.:Trends Cell Biol.24, 35-43 (2014).
- [8] Bogaart, G., Lang, T., Jahn, R.:Curr. Top. Membr.72, 193-230 (2013).
- [9] Graham, T. R., Burd, C. G.:Trends Cell Biol.21, 113-121 (2010).
- [10] Balla, T.: osobní sdělení.
- [11] Chuan, H., Hardee, D., Minnear, F.:Exp. Cell Res.313, 3198-3209 (2007).
- [12] Berridge, M.J., Irvine, R.F.:Nat. Cell Biol.312, 315-321 (1984).
- [13] Wang, Y. J., Wang, J., Sun, Y. X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J. P., Roth, M. G., Yin, H. L.:Cell Press114, C (2003).
- [14] Salazar, G.:J. Mol. Biol.16, 3692–3704 (2005).

- [15] Clayton, E. L., Minogue S., Waugh, M. G.: *Prog. Lipid Res.* 52, 294-304 (2013).
- [16] Barylko, B.: *Biol. Chem.* 276, 7705–7708 (2001).
- [17] Balla, A., Balla, T.: *Trends Cell Biol.* 16, 351-361 (2006).
- [18] Zhou, Q., Li, J., Yu, H., Zhai, Y. Gao, Z., Liu, Y., Pang, X., Zhang, L., Schulten, K., Sun, F., Chen, C.: DOI: 10.1038/ncomms4552 (2014).
- [19] Waugh, M. G.: *Cancer Lett.* 325, 125-131 (2012).
- [20] Altan-Bonnet, N., Balla, T.: *Trends Biochem. Sci.* 37, 293-302 (2010).
- [21] Nagral, A.: doi: 10.1016/j.jceh.2014.02.005 (2014).
- [22] Jovović, M., Kean, M., Szentpetery, Z., Polevoy, G., Gingras, A., Brill, J., Balla, T.: *Mol. Biol. Cell* 23, 1533-1545 (2012).
- [23] Li, J., Lu, Y., Zhang, J., Kang, H., Qin, Z., Chen, C.: *Oncogene* 29, 2550-2559 (2010).
- [24] Simons, P. J., Al-Sawi, R., Minogue, S., Waugh, M. G., Wiedemann, C., Evangelou, S., Leosch, A., Sihra, T. S., King, R., Warner, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 160, 11535-11539 (2009).
- [25] Saito, M., Smiley, J., Toth, R., Vadasz, C.: *Neurochem. Res.* 27, 1221-1229 (2002).
- [26] QIAGEN, QIAquick® Spin Handbook,
<http://sevierlab.vet.cornell.edu/resources/EN-QIAquick-Spin-Handbook.pdf>, 30.3. 2014.
- [27] Thermo Scientific, PRODUCT INFORMATION T4 DNA Ligase,
<http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/el001-product-information.pdf>, 22. 2. 2014.

- [28] QIAGEN, QIAprep® Miniprep Handbook,
[http://public.wsu.edu/~kahn_sci/Flow/E2-
QIAprep_Miniprep_Handbook.pdf](http://public.wsu.edu/~kahn_sci/Flow/E2-QIAprep_Miniprep_Handbook.pdf), 30.3.2014.
- [29] Wymann, M .P., Marone, R.:Cell Biol.17, 141-149 (2005).
- [30] Stein, A., Weber, G., Wahl, M. C., Jahn R.:Nature460, 525-528 (2009).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatелů TAB 19.

TAB 19 Evidence vypůjčovatелů:

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka