

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**



**Optimalizace purifikačního protokolu pro PhLP  
(„Phosducin - like protein“)**

**Bakalářská práce**

Biochemie

Školitel: RNDr. Tomáš Obšil, PhD.

Garant: Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.

Praha 2007

Lucie Magrlová

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomohli vypracovat tuto bakalářskou práci.

Děkuji svému školiteli RNDr. Tomáši Obšilovi, PhD. a doktorandovi Mgr. Evženu Bouřovi za odborné vedení, trpělivost, cenné rady, věnovaný čas a energii, které mi během mé práce poskytli.

Děkuji Prof.RNDr. Karlu Bezouškovi,DSc. za to, že se mě ujal jako garant a za pomoc při psaní mé práce.

Děkuji ostatním studentům a pracovníkům naší laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji svým rodičům za jejich podporu a všestrannou pomoc, kterou mi poskytují po celou dobu mého studia.

## Prohlášení

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

V Praze dne.....*30.8.2007*.....

*Magrlová Lucie*  
.....

Lucie Magrlová

# Obsah

Seznam použitých zkratk.....	5
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>6</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>8</b>
2.1 G proteinová signální dráha.....	8
2.2 G proteiny.....	11
<b>3. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>14</b>
<b>4. MATERIÁLY A METODY.....</b>	<b>15</b>
4.1 Použitý materiál.....	15
4.1.1 Chemikálie.....	15
4.1.2 Přístroje.....	16
4.1.3 Ostatní materiál.....	16
4.2 Pracovní postup.....	17
4.2.1 Kultivace bakterií.....	17
4.2.2 Sonikace.....	17
4.2.3 Niklová afinitní chromatografie.....	18
4.2.4 SDS - elektroforéza.....	19
4.2.5 Dialýza .....	20
4.2.6 Gelová filtrace.....	21
4.2.7 Aniontová výměna.....	21
<b>5. VÝSLEDKY.....</b>	<b>23</b>
5.1 Niklová afinitní chromatografie.....	23
5.2 Gelová filtrace.....	24
5.3 Aniontová výměna.....	25
<b>6. DISKUSE.....</b>	<b>28</b>
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>29</b>
Seznam citované literatury.....	30

## Seznam zkratek

Amp	Ampicilinu
APS	amonium persulfát
$\beta$ ME	$\beta$ – merkaptoethanol
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
cGMP	cyklický GMP
DTT	dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
$G\alpha$	$\alpha$ podjednotka G proteinu
$G\beta$	$\beta$ podjednotka G proteinu
$G\beta\chi$	$\beta\chi$ komplex podjednotek G proteinu
$G\chi$	$\chi$ podjednotka G proteinu
GDP	guanosin difosfát
GEF	G protein exchange factor
GMP	guanosin monofosfát
GPCR	tzv. s G proteinem spřažený receptor (z angl. "G protein - coupled receptor")
Gt	G protein transducin
GTP	guanosin trifosfát
His	histidin
His - tag	motiv šesti histidinů za sebou
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D- thio-galaktopyranosid
kDa	kilodaltony
$\lambda$	vlnová délka
LB	medium podle Luria-Bertaniho
MCO	molecular cut off
mRNA	mediátorová ribonuklová kyselina
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PBS	fosfátový pufr
Pd	phosducin
pET-15b	komerčně dostupný plasmid
PhLP	phosducin - like protein
PKA	cAMP dependentní protein kinasa
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS - polyakrylamidová gelová elektroforéza
Ser	serin
T	teplota
TEMED	N,N,N',N' - tetrametyletylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymetyl)-aminometan

# 1. Úvod

Žádná buňka nežije v izolaci. Potřebuje vnímat okolí, přijímat potravu, bránit se před nepříznivými vlivy a také musí komunikovat s ostatními buňkami. Např. eukaryotické mikroorganismy, jako kvasinky či prvoci, využívají sekreci speciálních molekul zvaných feromony, které koordinují seskupení volně žijících buněk při páření. Kvasinka, připravená ke kopulaci, vylučuje tzv. pářící faktor (z angl. „mating – type factor“), na který ostatní buňky reagují. Tyto faktory jsou příkladem feromony zprostředkované buněčné signalizace. U rostlin a živočichů jsou důležitější signální molekuly, které mají za úkol řídit metabolismus uvnitř buňky, růst a diferenciaci tkání, syntézu a sekreci proteinů a složení intracelulárních a extracelulárních tekutin. Mnoho buněk spolu komunikuje přímým kontaktem, např. tzv. mezerový spoj (z angl. „gap junction“) v plasmatické membráně umožňuje mnoha buňkám výměnu malých molekul, jiné mají receptory pro signalizační molekuly, které se nacházejí v extracelulární tekutině.

Komunikace prostřednictvím extracelulárních signálů zahrnuje obvykle několik kroků:

- syntézu a uvolnění signální molekuly signalizující buňkou
- transport signálu k cílové buňce
- navázání signálu specifickým receptorovým proteinem, což vede k jeho aktivaci
- iniciaci jedné nebo více intracelulárních signál přenášejících drah aktivovaným receptorem
- specifické změny v buněčné funkci, metabolismu nebo vývoji
- odstranění signálu, které často ukončí specifickou odpověď

Signální molekula se chová jako ligand, který se váže ke strukturálně komplementárnímu místu na receptoru. Tato vazba ligandu na receptor způsobí konformační změnu, která nakonec vyvolá specifickou buněčnou odpověď.

Existuje několik cest, jak vyslat signál:

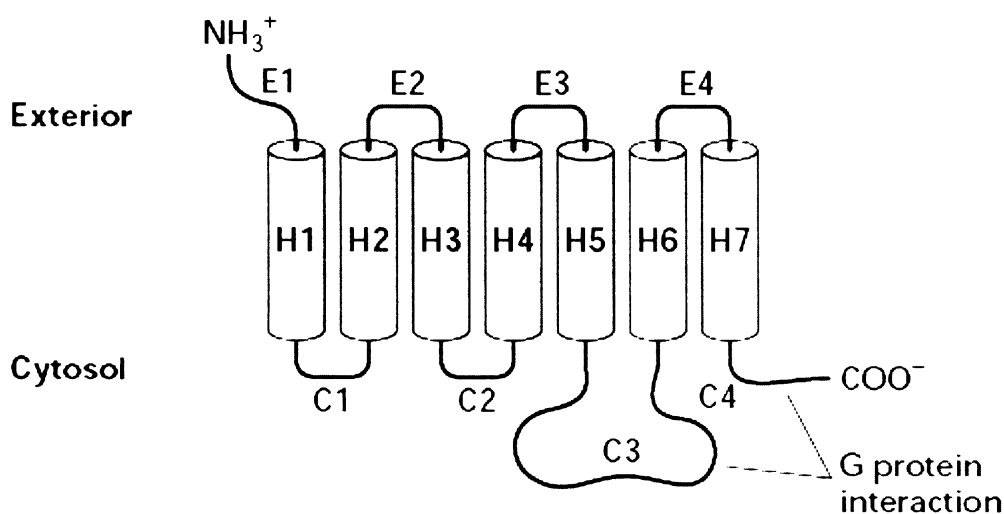
- endokrinní signalizace - signální molekula = hormon je uvolňována do krevního (u rostlin mízního) řečiště
- parakrinní signalizace – signální molekula = lokální mediátor difunduje extracelulárním prostorem, zůstává však v blízkosti signalizující molekuly
- autokrinní signalizace – buňka reaguje na signál, který sama uvolnila
- neuronová signalizace – neurony vysílají svými axony elektrické impulsy, které se na koncích mění na signály chemické = nervové mediátory (neurotransmitery)
- dotyková signalizace – signál je předáván při navázání signální molekuly v plasmatické membráně signalizující buňky k receptoru cílové buňky

a také existují různé typy signálních drah [1,2]. Mezi ty významné patří tzv. G proteinová signální dráha, s níž souvisí moje práce zaměřená na jeden z regulátorů G proteinové signalizace, konkrétně na phosducin – like protein (PhLP).

## 2. Literární přehled

### 2.1 G proteinová signální dráha

Velký počet hormonů, neurotransmiterů, chemokinů, smyslových podnětů atd. působí na buňky a organismy prostřednictvím vazby na GPCRs (G protein-coupled receptors) [3]. Tyto receptory tvoří největší rodinu buněčných povrchových receptorů. Jsou složeny z jednoho sedmkrát membránou procházejícího  $\alpha$ -helikálního proteinu, jehož N-terminální část se nachází na exoplasmatické straně a C – terminální část na cytosolické straně plasmatické membrány (viz obr.1) [1, 2].



Obr.1: **Schéma struktury GPCR.** H1 – H7 jsou  $\alpha$ -helikální struktury, E1 – E4 extracelulární segmenty, C1 – C4 cytosolické segmenty; C3, C4 a v některých případech i C2 se podílí na interakcích s G proteinem. [Lodish, H. et al.: Signaling at the cell surface, v knize Molecular cell biology (W.H. Freeman and Company), New York, str.545 (2004)]

Funkcí GPCRs je detekce a přenos různých chemických a fyzikálních stimulů v eukaryotických buňkách. Jde o signály, které využívají právě G protein – dependentních drah. Tyto dráhy jsou uzpůsobeny tak, aby dokázaly zvětšovat a spojit velký počet jak stimulačních, tak inhibičních buněčných odpovědí [4].

G proteiny (guanine nucleotide binding proteins) přenášejí signál z heptahelikálního receptoru, např. rhodopsinu na efektor jako adenylát cyklastu nebo iontové kanály[5]. Skládají se ze tří podjednotek -  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Během intracelulární signalizace jsou podjednotky  $\beta$ ,  $\gamma$  spojeny v jeden komplex ( $G\beta\gamma$ ). Podjednotka  $\alpha$  ( $G\alpha$ ) je GTPasovým proteinovým vypínačem (z angl. „GTPase switch protein“). Je - li na  $G\alpha$  navázáno GTP, je podjednotka

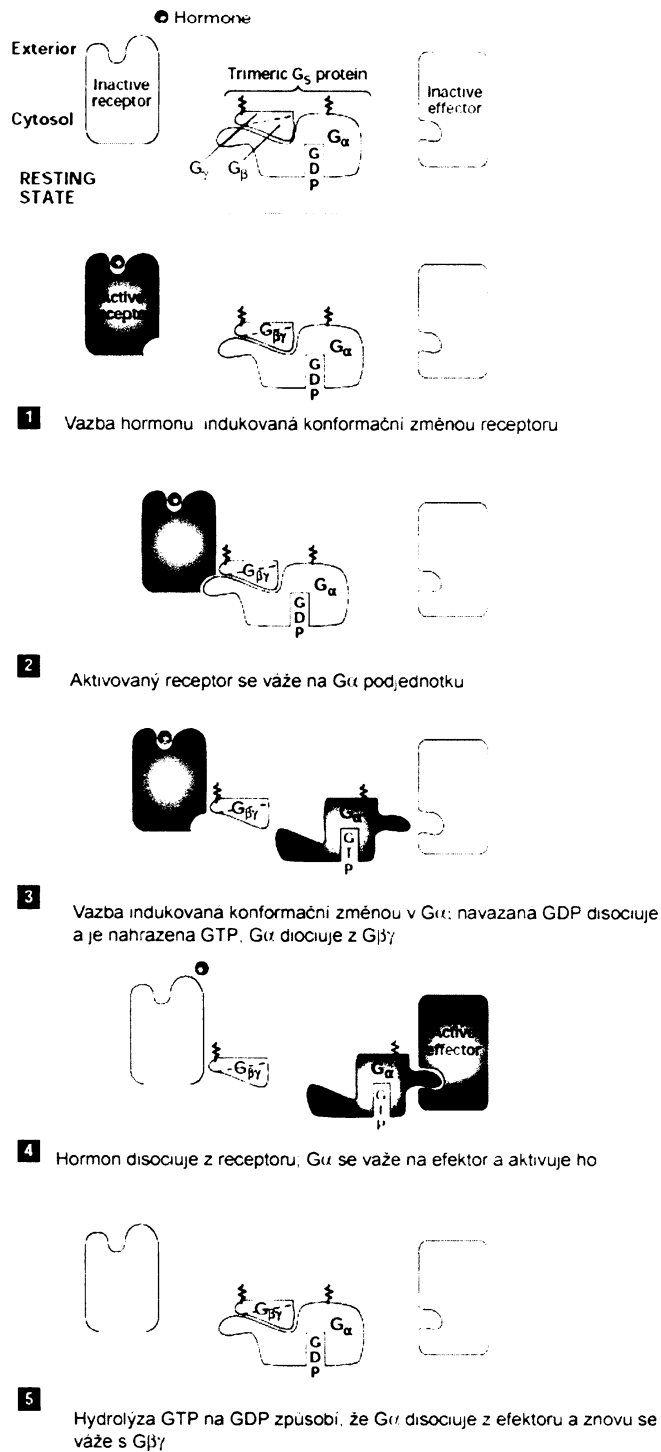


v aktivním stavu („zapnuto“), je – li navázáno GDP, je v neaktivním stavu („vypnuto“) [2].  $G\alpha$  se skládá ze dvou domén. Jedna se podílí na vazbě a hydrolyze GTP, druhá je unikátní helikální doménou, která ukrývá GTP v jádře proteinu [3]. O komplexu  $G\beta\gamma$  se nejdříve uvažovalo jen jako o kotvě a negativním regulátoru  $G\alpha$ . Nyní je však jasné, že hraje důležitou roli v přenosu signálu [6]. Aby byla schopna tyto efekторы regulovat, musí být navázána na aktivní  $G\alpha$ , tedy s navázanou GTP.  $G\beta\gamma$  regulované efekторы zahrnují např. adenylát cyklázu,  $K^+$  a  $Ca^{2+}$  kanály, fosfolipázu C a některé proteinové kinázy [7].

G proteinová signální dráha se skládá z:

- ligandu vázajícího se na receptor– aktivace receptoru
- záměny GDP na GTP  $G\alpha$  podjednotce heterotrimerického G proteinu
- separace  $G\beta\gamma$  dimeru a  $G\alpha$  podjednotky
- komplexů  $G\alpha.GTP$  a  $G\beta\gamma$ , řídících aktivitu efektorových enzymů a iontových kanálů, jež regulují intracelulární koncentraci druhých posílů a elektrický potenciál plasmatické membrány [8, 9]

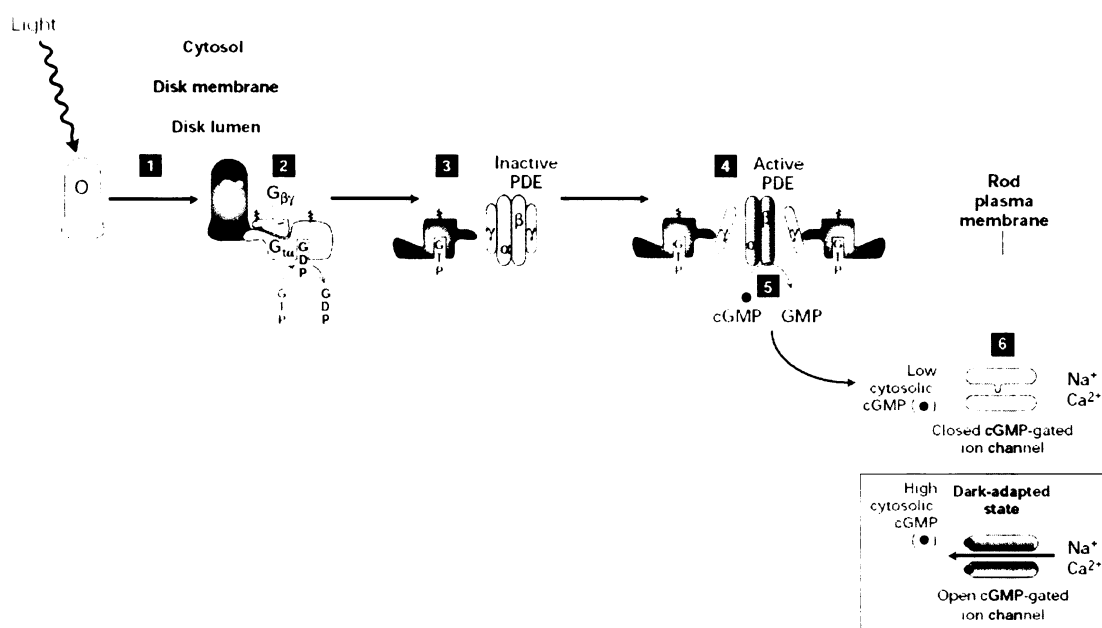
Jak podjednotka  $G\alpha$  tak  $G\gamma$  jsou spojeny s plasmatickou membránou prostřednictvím lipidu. V klidovém stavu, kdy se na receptor neváže žádný ligand, je na  $G\alpha$  navázáno GDP a komplex  $G\beta\gamma$ . Vazba např. hormonu na receptor změní jeho konformaci, což způsobí, že se na  $G\alpha$  podjednotce naváže GTP místo GDP. Takže aktivovaný receptor s navázaným ligandem funguje jako GEF (guanine nucleotide–exchange factor) pro  $G\alpha$  podjednotku. Změna nukleotidu způsobí, že komplex  $G\alpha.GTP$  disociuje od  $G\beta\gamma$ , ale oba zůstávají zakotveny v membráně. Ve většině případů potom  $G\alpha.GTP$  interaguje s efektorovým proteinem, který tím zároveň aktivuje. Tato aktivace je však krátkodobá, protože GTP vázaná na  $G\alpha$  je hydrolyzována na GDP, což je katalyzováno samotnou  $G\alpha$ . Výsledná  $G\alpha.GDP$  se spojuje s  $G\beta\gamma$ , čímž je ukončena efektorová aktivace (viz obr.2, str.10) [2].



Obr.2: Schéma pro ligandem indukovanou aktivaci efektorového proteinu spojenou s GPCRs;  $G_\alpha$  a  $G\beta\gamma$  jsou kovalentně vázány k membráně prostřednictvím lipidové molekuly (černá vlnovka); následuje změna GDP na GTP (1-3), poté vazba  $G_\alpha$  na efektor (4) a hydrolyza GTP (5) a návrat do původního stavu. Navázání další molekuly ligandu způsobí opakování cyklu. V některých případech může být efektor aktivován volnou  $G\beta\gamma$  podjednotkou. [Lodish, H. et al.: Signaling at the cell surface, v knize Molecular cell biology (W.H. Freeman and Company), New York, str.545 (2004)]

## 2.2 G proteiny

Přeměna světla v neurální odpověď prostřednictvím fotoreceptorových buněk sítnice obratlovců je iniciována G proteinovou signální dráhou zahrnující receptor rhodopsin, fotoreceptorový G protein – transducin Gt, cGMP fosfodiesterasu (hydrolyzuje cGMP na 5'-GMP) a tzv. cGMP uzavíratelné kationtové kanály (z angl. „cGMP – gated cation channels“). Uzavření kanálů v odpovědi na světlo způsobí hyperpolarizaci membrány fotoreceptorových buněk, která spíná neurální odpověď (viz obr.3) Kromě toho, uzavření kanálů je také důsledkem snížení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů ve fotoreceptorových buňkách, což vede k poklesu citlivosti fotoreceptorů na světlo = adaptace [10].



**Obr.3: Schéma pro rhodopsinem indukované uzavření kationtových kanálů v tyčinkách;** tyčinky adaptované na tmu; vysoká hladina cGMP udržuje neselektivní kationtové kanály otevřené. Absorpce světla aktivuje opsin (součást rhodopsinu) /1/, který se naváže na inaktivní Gt protein a zprostředkuje tak výměnu GDP za GTP /2/. Volná  $G\alpha$ .GTP pak aktivuje cGMP fosfodiesterasu navázáním jejího inhibitoru -  $\chi$  podjednotky /3/ a odtržením z katalytických podjednotek  $\alpha, \beta$  /4/. Zbaveny inhibitoru, podjednotky  $\alpha, \beta$  přeměňují cGMP na GMP /5/. Důsledkem je snížení koncentrace cytosolického cGMP, které vede k disociaci cGMP z nukleotidem uzavíratelného kanálu v plasmatické membráně a uzavření kanálu /6/. Membrána se tak stává dočasně hyperpolarizovanou. [Lodish, H. et al.: Signaling at the cell surface, v knize Molecular cell biology (W.H. Freeman and Company), New York, str.558 (2004)]

Jak již bylo řečeno  $G\beta\gamma$  podjednotka hraje významnou roli v efektorové aktivaci. Nejinak je tomu u fotoreceptorů, kdy  $G\beta\gamma$  zprostředkovává interakci  $G\alpha$  s rhodopsinem.

Kromě  $G_{t\alpha}$ , je jediným známým vazným partnerem pro  $G_{\beta\gamma}$  ve fotoreceptorových buňkách G protein zvaný phosducin (Pd).

Phosducin je kyselý cytosolický fosfoprotein exprimovaný ve velmi vysokých koncentracích ve fotoreceptorových buňkách sítnice a šišinky. Jeho funkcí je regulace přenosu signálu spojeného s G proteiny. Pd se váže ke  $G_{\beta\gamma}$  podjednotce heterotrimerického G proteinu a blokuje tak asociaci jak s  $G_{\alpha}$  tak s lamelou membrán vnějšího segmentu tyčinkových receptorů. Je-li Pd fosforylován na Ser73 cAMP dependentní protein kinasou (PKA), nemůže již déle blokovat asociaci s  $G_{\alpha}$ . Fosforylační stav Pd je daný světlem. Za světla je defosforylován, za tmy fosforylován. Tato fakta vedla k hypotéze, že se Pd podílí na adaptaci na světlo a to tímto způsobem: Za světla je Pd defosforylován a váže  $G_{t\beta\gamma}$ . To blokuje opětovné spojení tohoto komplexu s  $G_{\alpha}$ . GTP, čímž inhibuje další aktivaci heterotrimerického G prostřednictvím světlem aktivovaného rhodopsinu. Existují také teorie o dalších funkcích Pd jako např. regulaci hladiny proteinů, lokalizaci heterotrimerických G proteinů v jednotlivých buňkách, regulaci transkripce [4, 11, 12, 13].

Druhým zástupcem rodiny phosducinů je phosducin-like protein (PhLP), který existuje ve 2 formách – krátké (PhLP<sub>S</sub>) a dlouhé (PhLP<sub>L</sub>), která obsahuje na C konci o 83 aminokyselin víc než PhLP<sub>L</sub> [15].

PhLP je exprimovaný v jiných tkáních než v sítnici a šišince a s mnohem větší koncentrací než Pd. PhLP také váže  $G_{\beta\gamma}$  podjednotku s vysokou afinitou, ale na rozdíl od Pd není dobrým substrátem pro PKA, tudíž jeho schopnost vázat  $G_{t\beta\gamma}$  není ovlivněna fosforylací prostřednictvím PKA [4]. Myslelo se, že jak Pd tak PhLP negativně regulují aktivitu  $G_{\beta\gamma}$  tím, že se navážou a izolují  $G_{\beta\gamma}$  heterodimer od  $G_{\alpha}$ . Avšak nedávné studie ukázaly, že PhLP je pozitivním regulátorem  $G_{\beta\gamma}$  signalizace. PhLP je také nezbytný pro vznik  $G_{\beta\gamma}$  dimeru a pro normální (proteinové) hladiny  $G_{\beta}$  a  $G_{\gamma}$ . PhLP váže vznikající  $G_{\beta}$  podjednotku bez  $G_{\gamma}$ , kterou stabilizuje až do doby, kdy je  $G_{\gamma}$  připojena ke komplexu PhLP -  $G_{\beta}$ . Vytvoření PhLP -  $G_{\beta\gamma}$  komplexu je přechodný stav a PhLP je z něj nejspíš velmi rychle disociován [14].

Jiné práce uvádí, že fyziologická kontrola G proteinové funkce prostřednictvím PhLP zahrnuje fosforylaci kasein kinasou II a kalcium/kalmodulin kinasou II. Defosforylovaná forma PhLP váže  $G_{\beta\gamma}$ , jež pak zabraňuje receptorem zprostředkované  $G_{\alpha}$  reaktivaci a blokuje interakce mezi  $G_{\beta\gamma}$  a jejími efekty. PhLP také reguluje tzv. sbalení proteinů (z angl. „protein folding“) skrze interakci s cytosolickým chaperoninem CCT, který zprostředkovává sbalení aktinu, tubulinu a jiných proteinů do jejich nativních struktur [11, 16].

Dalším proteinem, který také interaguje s PhLP je protein 14-3-3. Izoformy 14-3-3 proteinu hrají důležitou roli v mnoha buněčných procesech včetně přenosu signálu. 14-3-3 proteiny interagují se svými vazebnými partnery, pokud jsou tyto fosforylovány. Předchozí studie ukázaly, že 14-3-3 může regulovat intracelulární lokalizaci, zabraňovat proteolýze a defosforylaci svých vazebných partnerů [11]. Proto vyvstala hypotéza, že Pd a PhLP, jež jsou samy regulátory intracelulární signalizace, jsou dále regulovány interakcí se 14-3-3 proteiny.

### **3. Cíl:**

- vyvinout purifikační protokol umožňující získávat miligramová množství čistého rekombinantního PhLP, který bude dále použit v naší laboratoři pro krystalizaci komplexu 14–3-3:PhLP a jeho další zkoumání

## 4. Metody a materiál

### 4.1 Použitý materiál

#### 4.1.1 Chemikálie

akrylamid - Carl Roth GmbH, Německo  
ampicilin - Sigma, USA  
bacto trypton (pepton) - Carl Roth GmbH, Německo  
bacto yeast extract (kvasniční extrakt) - Carl Roth GmbH, Německo  
bis-akrylamid - Carl Roth GmbH, Německo  
bromfenolová modř - Sigma, USA  
Coomassie Brilliant Blue R-250 - Lachema a.s, ČR  
dihydrogenfosforečnan draselný - Lachema a.s, ČR  
DTT (dithiotreitol) - Carl Roth GmbH, Německo  
EDTA - Sigma, USA  
glycerol - Lachema a.s., Neratovice  
glycin - Carl Roth GmbH, Německo  
hydrogenfosforečnan sodný - Lachema, ČR  
chlorid draselný - Lachema a.s, ČR  
chlorid sodný - Carl Roth GmbH, Německo  
imidazol - Carl Roth GmbH, Německo  
IPTG - Sigma, USA  
isopropylalkohol - Sigma, USA  
kyselina boritá - Lachema a.s, ČR  
kyselina chlorovodíková - Lachema a.s., Neratovice  
kyselina octová - Lachema a.s., Neratovice  
kyselina octová - Lachema a.s, ČR  
methanol - Lachema a.s., Neratovice  
persulfát amonný - Sigma, USA  
SDS - Sigma, USA  
síran nikelnatý - Penta, ČR  
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin) - Carl Roth GmbH, Německo  
Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan) - Carl Roth GmbH, Německo  
trypton - Carl Roth GmbH, Německo  
β-merkptoethanol - Carl Roth GmbH, Německo  
lysozym - New England BioLabs, USA

standard molekulových vah - Precision Plus Protein Dual Color Standard, BioRad,  
USA

*Veškeré použité chemikálie byly čistoty p.a. nebo vyšší.*

#### **4.1.2 Přístroje**

centrifuga - pro koncentrování proteinů – Eppendorf 5804R, rotor A-4-44

centrifuga - rotor GSA a SS34 – Sorval RC-5B, DuPont Instruments

přístroj pro elektroforézu - BioRad, Itálie

chromatografie - HPLC-AKTA, Amersham Biosciences, USA

laboratorní váhy - HF-200g, AND, USA

magnetická míchačka MM 2A - Lab.přístroje Praha, ČR

peristaltická pumpa - Stavebnicové čerpadlo SC4, Vývojové dílny ČSAV

pH metr - JenWay 3505, Felsted Velká Británie

přístroj pro PCR - Hybaid – PCR Express, USA

sonikátor - Ultrasonic Processor, Cole Farmer, USA

termostat BT 120M - Lab.přístroje Praha, ČR

třepačka - Orbital Incubator, Gallenkap

UV-Vis absorpční spektrofotometr - Agilent 8453

vodní lázeň – Memmert, Velká Británie

vortex - Zx3, Velp Scientifica, Itálie

zdroj pro elektroforesu - Consort E143, Belgie

#### **4.1.3 Ostatní materiál**

dialyzační membrána - MCO (Molecular weight cut off) 14000 - Roth, Německo

filtry 0,45 $\mu$ m - Whatmann Internation Ltd, Velká Británie

injekční stříkačky pro nános a filtraci roztoků proteinu - Chirana T. Injecta a.s., SR

laboratorní sklo – Simax, ČR

mikrozkumavky - Axygen Scientific Inc., USA

náplně do kolon a kolony - Amersham Biosciences, USA

vektor - pET-15b - Invitrogen, USA

pipeta 25  $\mu$ l pro nanášení vzorků na elektroforézu - Hamilton Co, USA

pipety – Eppendorf, Německo

rukavice - Beromed GmbH Hospital Products, Německo

špičky pro pipety - INSET, Praha

zdroj deionizované vody Milli Q - Millipore, USA



## 4.2 Pracovní postup

### 4.2.1 Kultivace bakterií

Kolonie bakterie *E.coli* BL21(DE3) byly naočkovány do 6 zkumavek s kapalným LB médiem (10 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu, 10 g NaCl doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH upraveno na 7,4 a následně sterilizováno v autoklávu), jež obsahovalo 100 µg/ml roztoku ampicilinu. Tyto zkumavky byly umístěny na ~16h (T = 37°C) do třepačky.

Bakterie *E.coli* (ze zkumavek) byly naočkovány do 6 jednolitrových Erlenmayerových baněk s kapalným LB médiem a 100 µg/ml Amp a opět byly umístěny na třepačku (T=37°C). Přibližně po 2 h byla pomocí spektrofotometru změřena optická densita ve všech lahvích ( $\lambda=600$  nm) proti slepému vzorku (pouze LB medium), který byl měřen při  $\lambda=600$  nm. Erlenmayerovy baňky byly umístěny na třepačce při 37°C a optická densita byla kontrolována asi po 30 minutách. Po dosažení hodnoty optické density přibližně 0,7 -0,8, byl přidán roztok IPTG na finální koncentraci 0,5 mM. Elenmayerovy baňky byly znovu umístěny na třepačku, teplota byla snížena na 30°C a bakterie byly inkubovány přes noc.

Obsah Erlenmayerových baněk byl přelit do kyvet a kyvety byly umístěny do centrifugy (4°C, 35 min, 3600 rpm). Poté byl supernatant odstraněn a sediment resuspendován lyzačním pufrém.

#### Lyzační pufr:

1x koncentrovaný PBS

1 M NaCl

4 mM  $\beta$ ME

2 mM imidazol

### 4.2.2 Sonikace

Sonikace je mechanická metoda, která využívá ultrazvuku k rozrušení buněk [17]. Rozsuspendovaný roztok byl inkubován za konstantního míchání s lysozymem (enzymem štěpícím peptidoglykany v buněčné stěně bakterií [17]) finální koncentrace 100 µg/ml při 4°C přibližně 1 h. Poté byl přelit do kádinky a na ledové lázni byl sonikován. Provedeno 10 cyklů. Jeden cyklus se skládá z 2 min sonikování a 3 min přestávky, která je nutná, aby nedošlo k přehřátí. Sonikovaný roztok byl poté nalit do kyvet a 50 min centrifugován (při

13500 rpm). Získaný supernatant obsahující požadovaný protein byl přelit do plastových zkumavek k dalšímu použití.

#### 4.2.3 Niklová afinitní chromatografie

Chromatografie patří mezi separační metody. Zkoumané látky jsou rozpuštěny v kapalině nebo plynu = mobilní fázi. Tento roztok pak prochází kolonou, která je naplněna pórovitou pevnou matricí = stacionární fázi.

Afinitní chromatografie je technika, která využívá schopnosti mnoha proteinů vázat se nekovalentně k specifickým molekulám. Tyto molekuly, zvané ligandy, jsou ukotveny v inertní a porózní matrici a požadované proteiny se k nim specificky vážou [17].

Niklová afinitní chromatografie využívá k separaci proteinů nikelnaté ionty, ke kterým mají proteiny obsahující motiv šesti po sobě jdoucích His (His – tag) velkou afinitu.

Při této metodě byla použita kolona, jež obsahovala Sepharosovou matrici (Amersham Biosciences, Švédsko). Tato kolona byla postupně promyta:

10 ml H<sub>2</sub>O

10 ml Stripp solution (50mM EDTA, 0,5M NaCl)

15 ml H<sub>2</sub>O

50 ml Ni<sup>2+</sup> (0,1M NiSO<sub>4</sub>)

10 ml H<sub>2</sub>O

10 ml E pufru

Poté byl na kolonu nanesen sonikát (kolona byly chlazená, aby protein nenedenaturoval). Ni<sup>2+</sup> se navázal koordinační vazbou na imidazolové zbytky His. Po protečení veškerého sonikátu byla kolona promyta 10% pufrům F v E (~ 400 ml) – vymytí nespecificky vázaných proteinů - a následně 200 ml F pufru, díky kterému byl eluován protein s His - tag. Eluát byl sbírán do 9 mikrozkuvek, z nichž pro další práci byla použita 3. – 9. zkumavka.

Pozn.: Průtok látek nanášených na kolonu byl zprostředkován peristaltickou pumpou o průtoku 3 ml/min.

##### E pufr:

1x koncentrovaný PBS

0,5 M NaCl

1 mM imidazol

2 mM βME

##### F pufr:

1x koncentrovaný PBS

0,5 M NaCl

2 mM βME

0,6 M imidazol

10% glycerol

10x koncentrovaný PBS:

27 mM KCl  
1,36 M NaCl  
50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10%pufr F v E :

1x koncentrovaný PBS  
0,5 M NaCl  
2 mM βME  
0,06 M imidazol  
10% glycerol

#### 4.2.4 SDS elektroforéza

Elektroforéza patří mezi separační elektromigrační metody. Jedná se o migraci iontů v elektrickém poli, přičemž dochází k separaci biomolekul. Mezi hojně využívané patří gelová elektroforéza. Často se využívá gel agarový nebo polyakrylamidový. Při migraci se velké molekuly relativně opožďují, protože hůře procházejí gelem.

Při SDS–PAGE obsahuje polyakrylamidový gel denaturující činidlo zvané dodecylsulfát sodný (SDS). SDS má silný záporný náboj, který je schopen překrýt vlastní náboj proteinu, takže proteiny mají identický poměr náboj:hmotě a mají podobný tvar. Z toho plyne, že se proteiny dělí podle jejich relativní molekulové hmotnosti [17].

Pro elektroforézu byly připraveny gely:

12% separační gel (pozn. množství na 4 gely)

10,2 ml H<sub>2</sub>O  
7,5 ml 1,5 M Tris – HCl (pH 8,8) obsahující SDS  
12 ml akrylamid/bisakrylamid (30% / 0,8% w/v)  
150 μl 10% (w/v) APS  
20 μl TEMED

zaváděcí gel

5 ml H<sub>2</sub>O  
2 ml 0,5 M Tris – HCl (pH 6,8) obsahující SDS  
1,07 ml akrylamid/bisakrylamid (30% / 0,8%)  
80 μl 10% (w/v) APS  
16 μl TEMED

Po ztuhnutí gelu byly do jamek nanášeny vzorky 3 – 9 obarvené vzorkovým pufrům a také roztok standardu ( *Precision Plus Protein Dual Color Standard*, BioRad; obsahuje směs fragmentů 100, 75, 50, 37, 25, 20 kDa). Elektroforéza byla provedena při 200 V asi 40 min. Gel byl následně obarven pomocí barvicího roztoku Commasie Brilliant Blue R 250 a odbarven v odbarvovacím roztoku.

Vzorkový pufr (5x koncentrovaný):

0,6 ml 1M Tris - HCl (pH 6,8)  
5 ml 50% glycerol  
2 ml 10% SDS  
0,5 ml βME  
1 ml 10% bromfenolová modř  
0,9 ml voda

Barvicí roztok Commasie Brilliant Blue R 250:

1 g Coomassie Brilliant Blue R 250  
450 ml methanolu  
100 ml ledové kyseliny octové  
450 ml H<sub>2</sub>O

Odbarvovací roztok:

100 ml methanolu  
100 ml ledové kyseliny octové  
800 ml H<sub>2</sub>O

Pufr pro elektroforézu:

50 mM Tris – HCl (pH 8,3)  
385 mM glycin  
0,1% SDS

#### 4.2.5 Dialýza

Dialýza je forma molekulové filtrace. Dochází při ní k separaci molekul podle velikosti za použití polopropustné membrány obsahující póry menší než jsou rozměry dané makromolekuly. Může být např. používána k výměně rozpouštědla, ve kterém jsou makromolekuly rozpuštěny.

Vzorky 4 – 9 byly odpipetovány do dialyzačního střívka, ponořeny do dialyzačního pufru (T = 4°C) a za stálého míchání nechány přes noc dialyzovat.

Dialyzační pufr (1 l):

20 mM Tris (pH 7,5)  
50 mM NaCl  
1 mM EDTA  
2 mM DTT  
10 % glycerol

Roztok byl pomocí pipety přenesen do zkumavky. Poté byl připraven roztok pro spektrofotometrii: 30  $\mu$ l roztoku proteinu + 970  $\mu$ l dialyzačního pufru a napipetován do kyvety.

Byla změřena absorbance roztoku a poté vypočítána koncentrace.

#### 4.2.6 Gelová filtrace

Při gelové filtraci jsou molekuly děleny podle jejich velikosti a tvaru. Molekuly procházejí pórovitým gelem; ty menší se zachytávají v kuličkách gelu, protože díky své velikosti projdou pórem v kuličce, a proto tečou pomaleji, kdežto velké molekuly, které do kuliček neprojdou protečou rychleji [17].

Kolona na gelovou filtraci (Superdex 75, 10/300 GL; Amersham Biosciences, Švédsko) byla ekvilibrována vodou a poté puftrem pro gelovou filtraci:

20 mM Tris (pH 7,5)

100 mM NaCl

1 mM EDTA

2 mM DTT

10 % glycerol

Poté byl proveden nástřik předem přes mikrofiltr přefiltrovaného roztoku proteinu (~ 1,5 ml) a eluované frakce byly jímány do mikrozkuvek.

Pro SDS elektroforézu byla odebrána frakce A6 – A12. Ke 20  $\mu$ l vzorku 6 – 12 bylo přidáno 5  $\mu$ l vzorkového pufru (0,6 ml 1 M Tris - HCl (pH 6,8), 5 ml 50% glycerol, 2 ml 10% SDS, 0,5 ml  $\beta$ ME, 1 ml 10% bromfenolová modř; 0,9 ml voda) a tyto frakce byly krátce (3 min) povařeny. Frakce 9 byla použita i v nepovařené formě (20  $\mu$ l 9.frakce + 5  $\mu$ l vzorkového pufru). Poté byly vzorky nanесeny na gel a provedena SDS elektroforéza po dobu 45 min při 200 V. Další postup viz výše (2.2.4 elektroforéza, str.19).

Vzorky, obsahující čistý protein, byly smíchány a poté změřena jejich absorbance při  $\lambda=280$  nm. Vzorek obsahoval 50  $\mu$ l roztoku proteinu a 950  $\mu$ l pufru pro gelovou filtraci.

#### 4.2.7 Aniontová výměna

Při iontové výměně jsou ionty, které jsou elektrostaticky vázány na nerozpustnou a chemicky inertní matici, reverzibilně vyměňovány za ionty v rozpouštědle. Existují 2 druhy iontoměníčů – kationtové (výměna kationtů) a aniontové (výměna anionů). U polyiontů, které nesou oba náboje se mohou vázat jak kationty tak anionty. Afinita, s jakou se

polyionty vážou k danému iontoměníči, závisí na identitě a koncentraci ostatních iontů v roztoku, protože s těmito ionty soutěží o vazebné místo na iontoměníči. Vazebná afinita polyiontů nesoucích acidobazické skupiny je vysoce závislá na pH, protože ovlivňuje výsledný náboj molekuly [17].

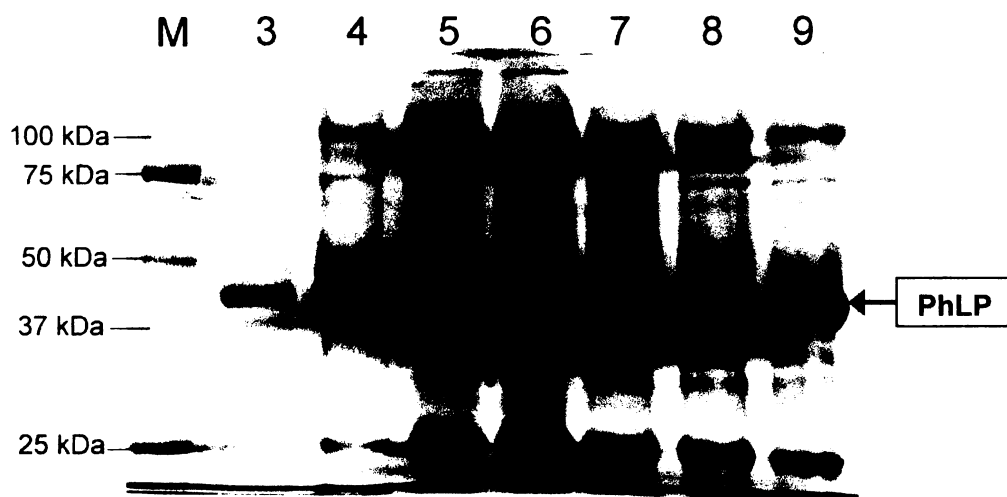
Protein byl přes noc dialyzován (dialyzační pufr: 50 mM Tris – HCl (pH 8), 1 mM DTT) a poté byla provedena aniontová výměna na Q–Sephárosové koloně (Amersham Biosciences, Švédsko). Eluované frakce byly jímány do mikrozkušavek, z kterých poté byly vybrány vzorky pro další zkoumání.

Frakce, které obsahovaly čistý protein byly smíchány, čímž vznikl roztok o objemu asi 3 ml. Ten roztok byl pomocí centrikonu MCO 10 000 (velikost pórů ve filtru 10 kDa) zakoncentrován přibližně na 1 ml. Po zakoncentrování byla změřena absorbance roztoku, který byl připraven z 20  $\mu$ l zakoncentrovaného roztoku a 980  $\mu$ l filtrátu, který byl použit i jako slepý vzorek při měření absorbance. Hodnota absorbance posloužila k výpočtu koncentrace.

## 5. Výsledky

### 5.1 Niklová afinitní chromatografie

Pro pokusy byl použit vektor pET–15b, v němž byl zaklonován gen pro PhLP a který obsahuje motiv šesti po sobě jdoucích His. Proto mohla být pro purifikaci použita niklová afinitní chromatografie, při níž vzniká koordinační vazba mezi imidazolovými zbytky His a  $\text{Ni}^{2+}$  ionty a tudíž je protein zachycován na koloně. Použitím pufru F (viz 4.2.3, str.18) byl protein eluován a frakce jímány do mikrozkuvek. Dále byla provedena elektroforéza (viz 4.2.4, str.19), jejíž výsledek můžeme vidět na obr. 4. Jamka M obsahovala standard molekulových vah, podle kterého byly určeny velikosti proteinů. PhLP je relativně velké množství, ale není dostatečně čistý, jak naznačují pásy po separaci směsi proteinů.



Obr. 4 : **Gel po His- tagu**; jamka M obsahovala roztok standardu, jamky 3 – 9 obsahovaly frakce 3 – 9 eluované ze Sepharosové kolony při His-tagu

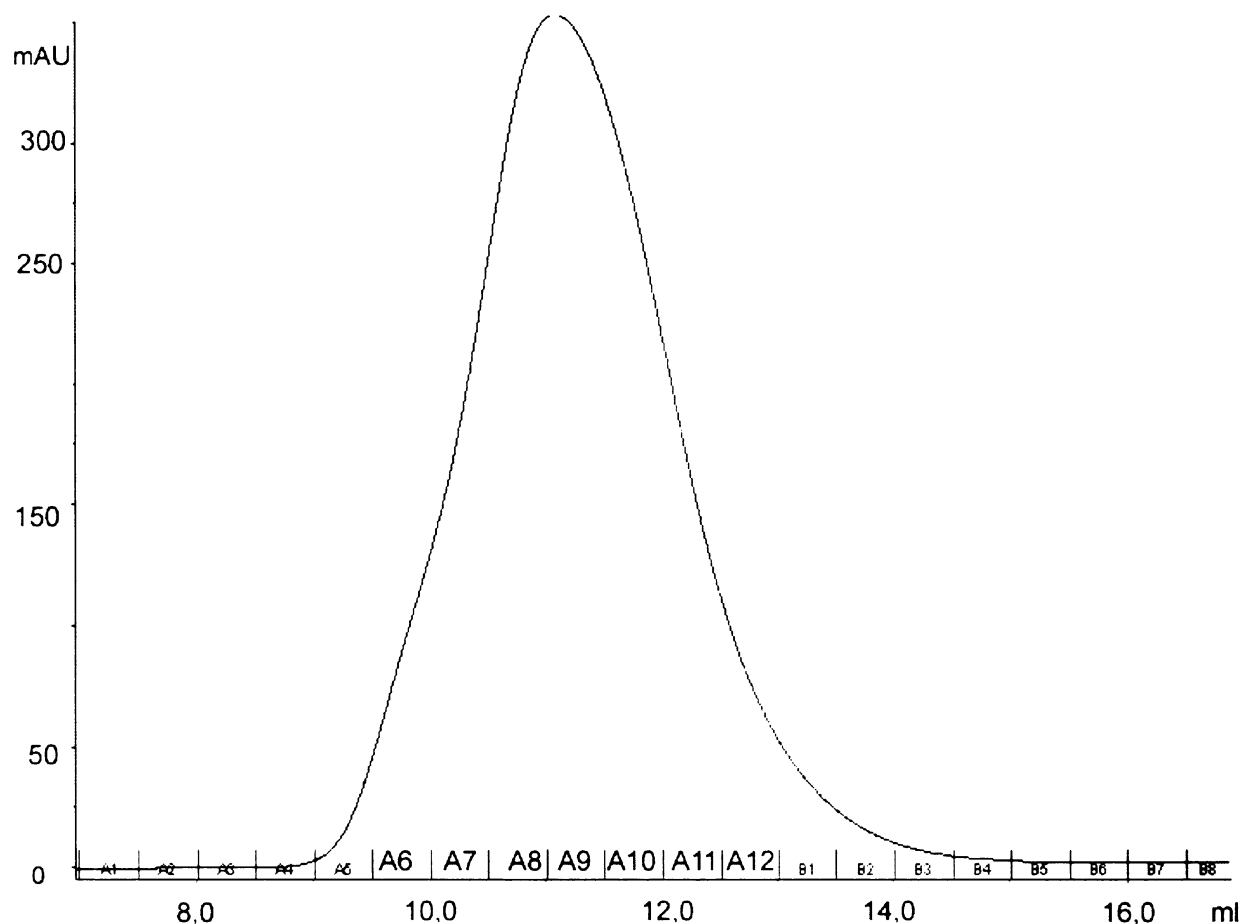
Po elektroforéze byla provedena dialýza pro výměnu pufrů a poté byla změřena absorbance, z níž byla vypočítána koncentrace proteinu ( extinkční koeficient  $\epsilon = 15930 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  ; relativní molekulová hmotnost  $M_r = 37610$  ). Pozn. extinkční koeficienty a také relativní molekulová hmotnost byly zjištěny pomocí „ProtParam tool“ na internetových stránkách [www.expasy.org/tools/protparam.html](http://www.expasy.org/tools/protparam.html)

Vypočtená koncentrace proteinu byla 6,28 mg/ml.

## 5.2 Gelová filtrace

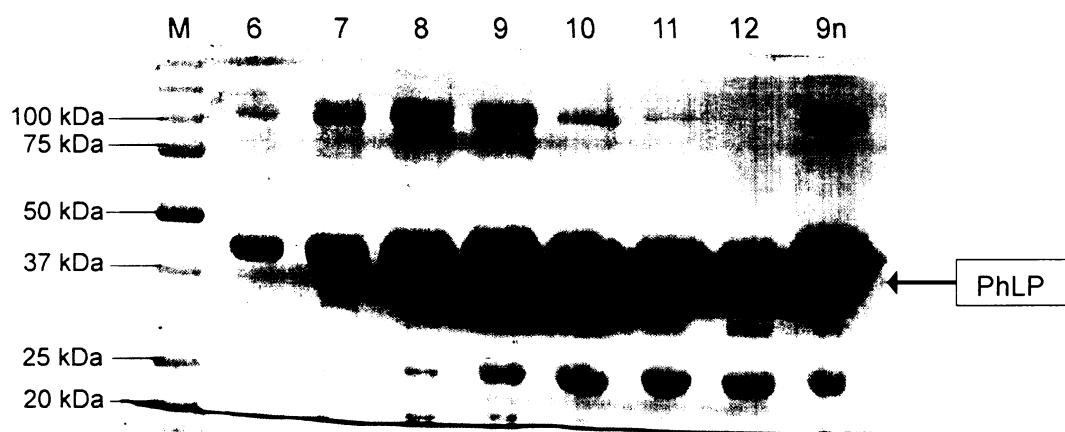
Jako další metoda pro purifikaci PhLP byla použita gelová filtrace ( viz 4.2.6, str.21), jež byla prováděna na přístroji AKTAprime<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences, Švédsko) pro HPLC a data byla analyzována pomocí programu Unicorn 4.11 dodaným spolu s přístrojem.

Podle chromatogramu (obr.5) byly vybrány frakce A6 – A12 a přítomnost a čistota PhLP byla ověřena pomocí SDS–PAGE (obr.6, str.25).



Obr. 5 : **Chromatogram eluce PhLP při gelové filtraci na koloně Superdex 75;** na ose x je vynesen eluční objem, na ose y absorbance



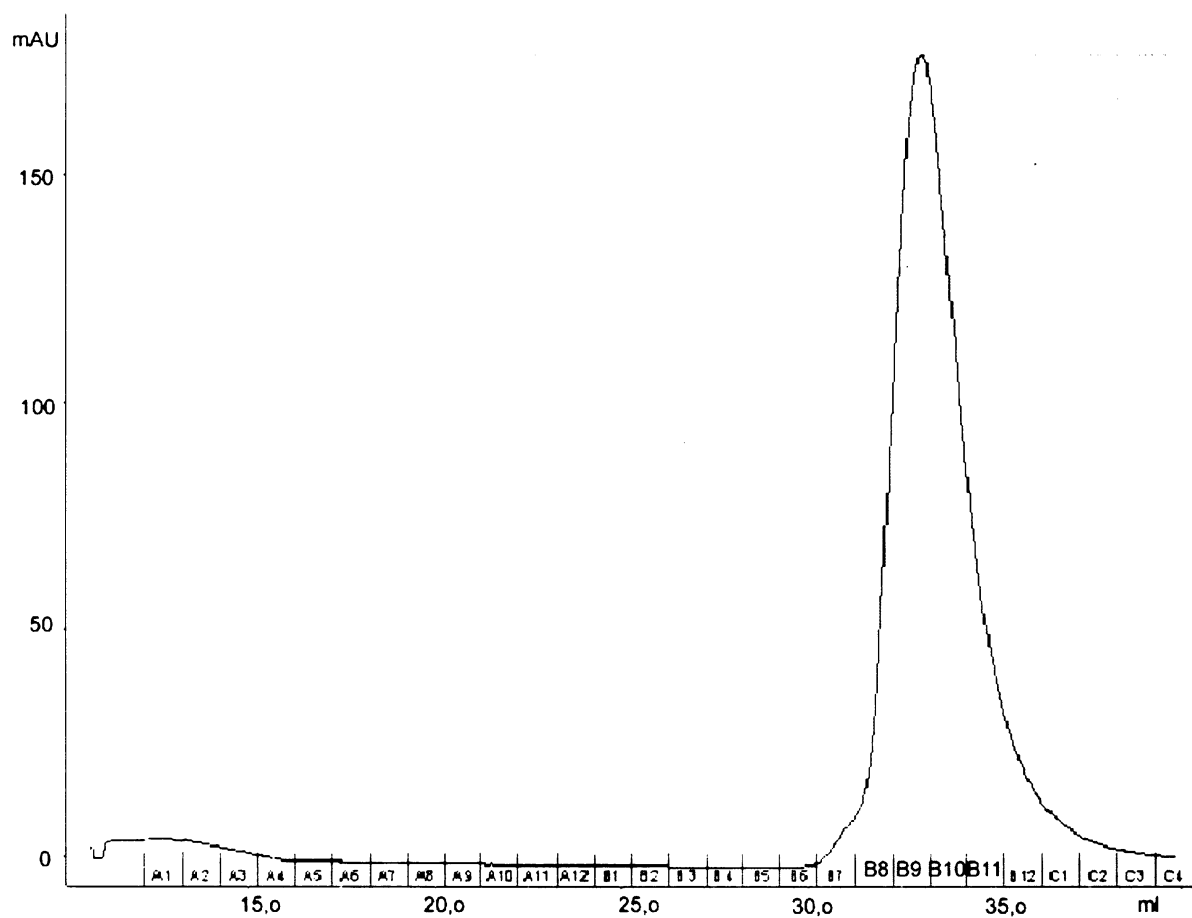


Obr. 6: **Gel po gelové filtraci**; jamka M označuje roztok standardu, jamky 6 – 12 obsahovaly povážené frakce A6 – A12 (viz obr.5, str.24 ) jímané při gelové filtraci, jamka 9n obsahovala nepováženou frakci A9

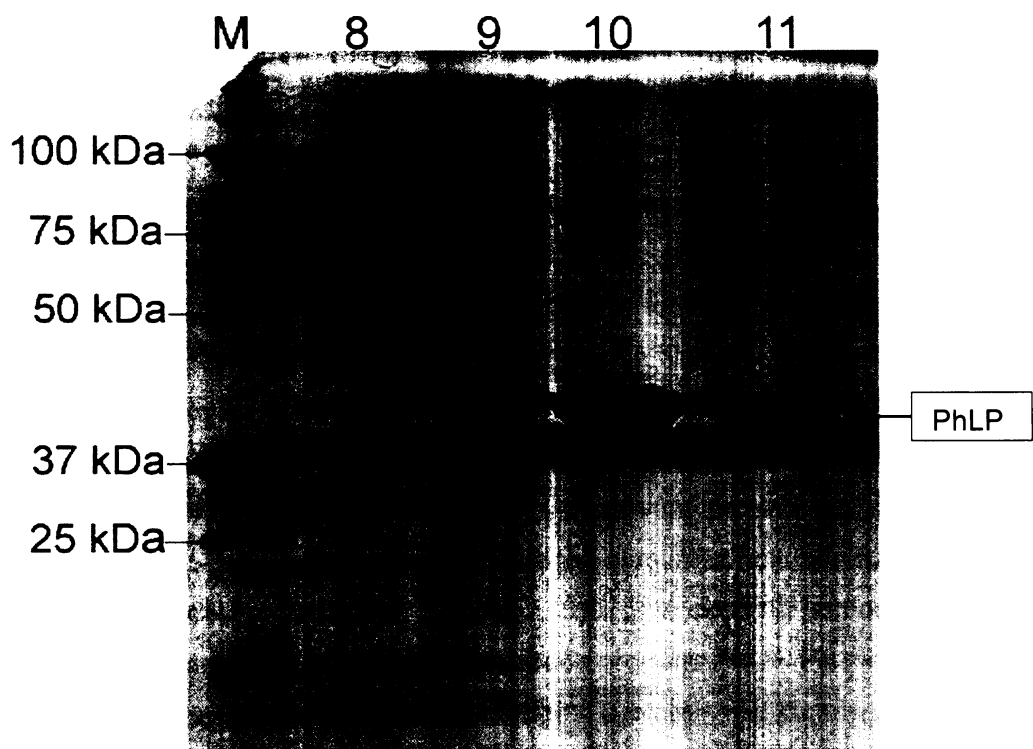
Frakce A8 – A11 obsahovaly nejvíce proteinu, proto byly vybrány k dalšímu zkoumání. Byly smíchány dohromady a byla změřena jejich absorbance při 280 nm. Poté byla vypočtena koncentrace PhLP v roztoku, která činila 3,35 mg/ml.

### 5.3 Aniontová výměna

Před touto metodou byl roztok proteinu znovu dialyzován kvůli změně pufru a poté byla provedena aniontová výměna. Opět bylo použito přístroje AKTAprime<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences, Švédsko) pro HPLC a data byla opět analyzována pomocí programu Unicorn 4.11 dodaným spolu s přístrojem jako v případě gelové filtrace, jen byl použit jiný pufr (viz 4.2.7, str.21). Dle chromatogramu (obr.7, str. 26) byla vybrána frakce B8 – B11, které by měly obsahovat nejvíce proteinu. Přítomnost a čistota PhLP byla znovu ověřena pomocí SDS–PAGE (obr.8, str.27). Poté, co byla změřena absorbance roztoku proteinu, byla vypočtena koncentrace PhLP v roztoku, která činila 3,19 mg/ml.



Obr.7: **Chromatogram eluce PhLP při aniontové výměně;** na ose x jsou vyneseny hodnoty elučního objemu, na ose y hodnoty absorbance; průběh gradientu iontové síly je naznačen zelenou křivkou



Obr. 8: **Gel po aniontové výměně**; jamka M obsahovala roztok standardu, jamky 8 -11 obsahovaly frakce B8-B11 (viz obr. 7, str. 26) jímané při aniontové výměně

## 6. Diskuse

Tato práce byla vypracována za účelem najít co nejefektivnější způsob purifikace pro rekombinantní PhLP protein. PhLP je jedním ze zástupců superrodiny fosducinů, je využíván při G – proteinové signalizaci a má v organismu mnoho různých funkcí.

Jako první krok byla provedena kultivace bakterií, které ve své genetické informaci nesly gen pro rekombinantní PhLP. Následně byl protein z buněk izolován a dále purifikován. Díky tomu, že byl použit vektor pET-15b, ve kterém byl právě gen pro PhLP zakódován a který obsahuje motiv šesti po sobě jdoucích histidinů, mohla být použita k purifikaci PhLP niklová afinitní chromatografie. Tato metoda spočívá v tom, že se na kolonu obsahující chelatující Sepharosu navážou nikelnaté ionty, které vytváří koordinační vazby s imidazolovými zbytky His, a tak zadržují požadovaný protein, jež obsahuje motiv šesti po sobě jdoucích His. Tento protein je následně eluován z kolony a frakce se jímají do zkumavek. Přítomnost a čistota PhLP proteinu byla poté ověřena pomocí SDS-PAGE, byla změřena absorbance a vypočítána koncentrace proteinu PhLP. Po niklové afinitní chromatografii byla koncentrace proteinu 6,28 mg/ml a protein měl čistotu přibližně 90%.

V dalším kroku byla provedena gelová filtrace. PhLP protein byl nastříknut na kolonu Superdex 75 a eluované frakce byly jímány do mikrozkušavek. Následně byla provedena SDS-PAGE pro ověření přítomnosti a čistoty požadovaného rekombinantního proteinu. Znovu byla změřena absorbance a vypočítána koncentrace proteinu v roztoku. Po gelové filtraci se její hodnota rovnala 3,35 mg/ml. Čistota proteinu se výrazně nezvýšila.

Proto byla vyzkoušena metoda aniontové výměny. Na Q-Sepharosovou kolonu byl opět nastříknut protein a eluované frakce byly jímány do mikrozkušavek. Jako u předchozích metod byla k ověření čistoty použita SDS-PAGE, změřena absorbance a vypočítána koncentrace PhLP, která činila 3,19 mg/ml. Byl získán téměř čistý protein (čistota zhruba 99%).

Tento protokol byl vyvinut pro produkci rekombinantního proteinu PhLP, který chce naše laboratoř studovat. Naším hlavním cílem je zkoumání jeho interakcí s 14-3-3 proteinem, a proto budou poznatky této práce velmi užitečné.

## 7. Závěr

Bylo zjištěno:

- pomocí niklové afinitní chromatografie jsme schopni získat velké množství rekombinantního PhLP proteinu, který má zhruba 90% čistotu
- při gelové filtraci na Superdexu 75 se nepodařilo výrazně zvýšit čistotu rekombinantního PhLP proteinu
- při aniontové výměně jsme byli schopni získat na 99% čistý rekombinantní PhLP protein (určeno pomocí SDS–PAGE)

## Seznam citované literatury

1. Alberts, Bruce a kol.: Komunikace mezi buňkami, v knize Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky [Orig.: Essential cell biology] / přeložili Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák, (Espero Publishing), Ústí nad Labem, str.481 – 512 (2001)
2. Lodish, H. et al.: Signaling at the cell surface, v knize Molecular cell biology (W.H. Freeman and Company), New York, str. 533-570 (2004)
3. Hamm, H.E.: The Many Face sof G Protein Signaling, J. Biol. Chem., 273, 669 – 672 (1998)
4. Savage, J.R., McLaughlin, J.N., Skiba, P., Hamm, H.E., Willardson, B.M.: Functional Roles of the Two Domains of Phosducin and Phosducin-like Protein, J. Biol. Chem., 275, 30399 – 30407 (2000)
5. Schröder, S., Lohse, M.J.: Inhibition of G – protein  $\beta\gamma$  - subunit functions by phosducin – like protein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 2100 – 2104 (1996)
6. Chen, S., Dell, E.J., Lin, F., Sai, J., Hamm, H.E.: RACK1 Regulates Specific Functions of  $G\beta\gamma$ , J. Biol. Chem., 279, 17861 – 17868 (2004)
7. Tang, N., Tu, Y., Nayak, K., Woodson, J., Jehl, M., Ross, E.M.:  $G\beta\gamma$  Inhibits  $G\alpha$  GTPase – activating Proteins by Inhibition of  $G\alpha$  - GTP Binding during Stimulation by Receptor, J. Biol. Chem., 281, 4746 – 4753 (2006)
8. Partridge, J.G., Puhl, H.L., Ikeda, S.R.: Phosducin and Phosducin – like Protein Attenuate G – Protein – Coupled Receptor – Mediated Inhibition of Voltage – Gated Kalcium Channels in Rat Sympathetic Neurons, Mol. Pharmacol., 70, 90 – 100 (2006)
9. Lukov, G.L., Baker, C.M., Ludtke, P.J., Hu, T., Carter, M.D., Hackett, R.A., Thulin, C.D.: Mechanism of Ansambly of G protein  $\beta\gamma$  Subunits by Protein Dinase CK2 – phosphorylated Phosducin – like Protein and the Cytosolic Chaperonin Complex, J. Biol. Chem., 281, 22261 – 22274 (2006)
10. Lee, B.Y., Thulin, C.D., Willardson, B.M.: Site – specific Phosporylation of Phosducin in Intact Retina, J. Biol. Chem., 279, 54008 – 54017 (2004)
11. Lacoste, C., Barthaux, V., Iborra, C., Seagar, M., Erard – Garcia, M.: MAU – 8 is a Phosducin – like Protein required for G protein signaling in *C. elegans*, Dev Biol, 294, 181 – 191 (2006)
12. Klenk, C., Humrich, J., Quitterer, U., Lohse, M.J.: SUMO – 1 Controls the Protein Stability and the Biological Function of Phosducin, J. Biol. Chem., 281, 8358 – 8364 (2006)
13. Song, H., Belcastro, M., Young, E.J., Sokolov, M.: COMPARTMENT-SPECIFIC PHOSPHORYLATION OF PHOSDUCIN IN RODS UNDERLIES ADAPTATION TO VARIOUS LEVELS OF ILLUMINATION, J. Biol. Chem., 10.1074/jbc.M701974200 (2007)
14. Seo, J.A., Yu, J.H.: The Phosducin – Like Protein PhnA Is Required for  $G\beta\gamma$  - Mediated Signaling for Vegetative Growth, Development Control, and Toxin Biosynthesis in *Aspergillus nidulans*, Eukaryot Cell, 5, 400 – 410 (2006)
15. Humrich, J., Bermel, C., Bünemann, M., Märmark, L., Frost, R., Quitterer, U., Lohse, M.J.: Phosducin – like Protein Regulates G – Protein  $\beta\gamma$  Folding by Interaction with Tailless Complex Polypeptide 1 $\alpha$ , J. Biol. Chem., 280, 20042 – 20050 (2005)
16. Lukov, G.L., Hu, T., McLaughlin, N., Hamm, H.E., Willardson, B.M.: Phosducin – like protein acts as a molecular chaperone for G protein  $\beta\gamma$  dimer assembly, The EMBO Journal, 24, 1965 – 1975 (2005)
17. Voet, D., Voet, J.G.: Techniques of Protein and Nucleic Acid Purification, v knize Biochemistry (J.Wiley & sons, Inc.), str. 127 – 160 (2004)

