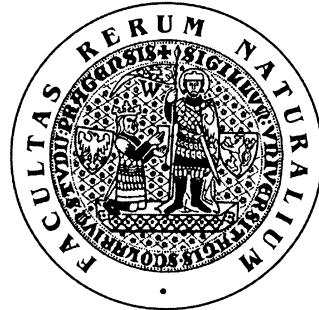


Univerzita Karlova v Praze – Přírodovědecká fakulta
Katedra biochémie



Klonování, exprese a biochemická charakterizace
rekombinantních fragmentů proteinu Ahnak (marker
enlargeosomů)

Diplomová práce

Barbora Pavlů

Vedoucí diplomové práce:
Doc. Mgr. Jan Černý, Ph.D. a RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.
Praha 2006

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelů Doc. Mgr. Jana Černého, Ph.D. a RNDr. Miroslava Šulce, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 1.9.2006



Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK	6
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	8
2.1	EXOCYTOSA	8
2.2	TYPY EXOCYTOSY	8
2.3	HOJENÍ PORUŠENÉ CYTOPLASMATICKÉ MEMBRÁNY	11
2.3.1	<i>Aktivní vs. pasivní proces</i>	11
2.3.2	<i>Exocytosa jako podmínka úspěšného hojení.....</i>	11
2.3.3	<i>Funkce exocytosis v procesu hojení.....</i>	12
2.3.4	<i>Facilitace a potenciace hojení jako adaptace na poškození cytoplasmatické membrány...</i>	13
2.3.5	<i>Identifikace populace váčků účastnících se exocytosy.....</i>	13
2.4	AHNAK	17
3	CÍL PRÁCE.....	22
4	MATERIÁL A METODY.....	23
4.1	MATERIÁL.....	23
4.1.1	<i>Přístroje.....</i>	23
4.1.2	<i>Materiál</i>	23
4.1.2.1	Standardy molekulových hmotností	26
4.1.2.2	Vektory.....	28
4.1.2.3	Seznam primerů.....	31
4.1.3	<i>Roztoky</i>	32
4.1.3.1	Mowiol	32
4.1.3.2	Lyzační pufr pro izolaci RNA	32
4.1.3.3	Agarosová elektroforéza.....	32
4.1.3.4	Kultivace <i>E. coli</i>	32
4.1.3.5	SDS-PAGE.....	32
4.1.3.6	10x PBS.....	33
4.1.3.7	HIS-Select Spin Columns.....	33
4.1.3.8	Ekvilibrační pufr na ionex	33
4.1.3.9	Hmotnostní spektrometrie	33
4.1.3.10	Detekce proteinů v PAA gelu	34
4.1.3.11	Histrap FF crude	34
4.1.3.12	Tkáňové kultury	34
4.1.3.13	Western blotting	34
4.1.3.14	Tris/ EDTA/ NaCl/ NaN ₃ pufr (TENN).....	35
4.1.4	<i>Použité organismy</i>	36
4.1.4.1	Kmeny <i>E. coli</i> :.....	36
4.1.4.2	Buněčné linie.....	36
4.2	METODY	37

4.2.1	<i>Izolace RNA</i>	37
4.2.2	<i>Reverzní transkripce RNA</i>	37
4.2.3	<i>Amplifikace fragmentů genu AHNAK pomocí PCR</i>	38
4.2.4	<i>PCR z kolonií</i>	40
4.2.5	<i>Extrakce DNA z agarosového gelu</i>	40
4.2.6	<i>TOPO TA klonování PCR produktů</i>	41
4.2.7	<i>Transformace E. coli</i>	42
4.2.7.1	Chemická transformace chemokompetentních <i>E. coli</i>	42
4.2.7.2	Transformace elektrokompetentních <i>E. coli</i> elektroporací	42
4.2.7.3	Příprava elektrokompetentních <i>E. coli</i>	42
4.2.8	<i>Izolace plazmidů z E. coli (miniprep)</i>	43
4.2.9	<i>Elektroforéza v 1% agarosovém gelu</i>	44
4.2.10	<i>Určení koncentrace DNA</i>	44
4.2.11	<i>Restrikce</i>	44
4.2.11.1	Preparativní dvojnásobná restrikce restriktašami BamHI a XhoI	44
4.2.11.2	Preparativní restrikce restriktašou NdeI.....	45
4.2.11.3	Analytická restrikce.....	45
4.2.12	<i>Ligace</i>	45
4.2.13	<i>Sekvenace DNA</i>	46
4.2.14	<i>Exprese rekombinantního proteinu</i>	46
4.2.15	<i>Lyze E. coli BL21 (DE3) pLysS</i>	46
4.2.16	<i>SDS-PAGE</i>	46
4.2.17	<i>Western blotting</i>	46
4.2.18	<i>Detekce proteinů v PAA gelu CBB</i>	47
4.2.19	<i>Detekce proteinů v PAA gelu stříbrem</i>	47
4.2.20	<i>Afinitní chromatografie na Histrap FF crude (Amersham Biosciences)</i>	47
4.2.21	<i>Afinitní chromatografie na HIS-Select Spin Columns (Sigma)</i>	48
4.2.22	<i>Chromatografie na iontoměniči</i>	49
4.2.22.1	Eluce ionexové kolony s navázaným rekombinantním Ahnak-N	50
4.2.22.2	Eluce ionexové kolony s navázaným rekombinantním Ahnak-C	50
4.2.23	<i>Afinitní chromatografie na středotlaké koloně</i>	51
4.2.24	<i>Příprava vzorku rekombinantního proteinu pro hmotnostní spektrometrii</i>	52
4.2.25	<i>Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF</i>	53
4.2.26	<i>Tkáňové kultury</i>	53
4.2.27	<i>Transfekce HeLa buněk konstrukty pEGFP</i>	53
4.2.28	<i>Klonování transfektantů metodou mezního ředění</i>	54
4.2.29	<i>Zamrazování buněčných kultur</i>	54
4.2.30	<i>Fixace preparátů pro imunofluorescenční mikroskopii</i>	54
4.2.31	<i>Barvení pro imunofluorescenční mikroskopii</i>	55
5	VÝSLEDKY	56

5.1	NAVRŽENÍ PRIMERŮ PRO KLONOVÁNÍ FRAGMENTŮ GENU AHNAK	56
5.2	VÝBĚR ZDROJE POUŽÍVANÝCH cDNA.....	57
5.3	KLONOVÁNÍ FRAGMENTŮ GENU AHNAK VEKTOREM PCR-XL-TOPO	58
5.4	VKLÁDÁNÍ FRAGMENTŮ GENU AHNAK (Z PCR-XL-TOPO) DO EXPRESNÍCH VEKTORŮ.....	58
5.4.1	<i>pET-15b</i>	58
5.4.2	<i>pEGFP-C</i>	62
5.5	EXPRESE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ	64
5.6	ROZPUSTNOST REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ	65
5.7	OPTIMALIZACE PURIFIKACE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ.....	65
5.8	VNITROBUNĚČNÁ LOKALIZACE FRAGMENTŮ PROTEINU AHNAK FÚZOVANÝCH S EGFP	72
5.9	KOLOKALIZACE AHNAK_EGFP S ENLARGEOSOMY	73
5.10	VYTVOŘENÍ STABILNĚ TRANSFEKOVANÉ LINIE HE LA	74
5.11	OVĚŘENÍ EXPRESE FRAGMENTŮ FÚZOVANÝCH S EGFP WESTERN BLOTTINGEM	75
6	DISKUSE	77
7	ZÁVĚR	82
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	83

1 Seznam zkratek

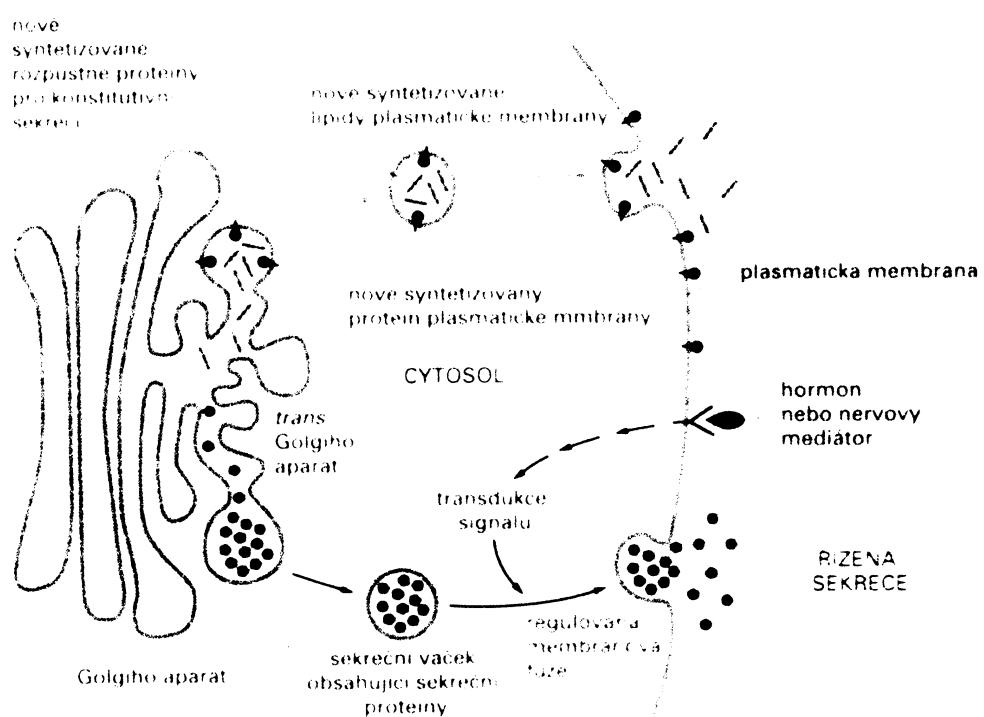
AA	arachidonic acid
AMPA	α -amino-5-hydroxy-3-methyl-4-isoxazole propionic acid
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	bovine serum albumin
CaMKII	Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II
cAMP	cyclic AMP (3'-5'-cyklický adenosin monofosfát)
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CM-Sephadex	Carboxymethyl Sephadex
cPLA	cytosolic phospholipase A
CREB	cAMP response element-binding
DAG	diacylglycerol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	dimethyl sulfoxid
DTT	1,4-dithio-DL-threitol
ECL	enzymatic chemiluminescence
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FBS	Fetal Bovine Serum
GAM	goat anti-mouse
GLUT	glucose transporter
GST	glutathion-S-transferasa
GTP	guanosine triphosphate
HRP	Horseradish peroxidase
IGF1	insulin-like growth factor 1
IP ₃	inositol trisphosphate (inositol-1,4,5-trisfosfát)
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
LC	liquid chromatography
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight
MAPK	mitogen-activated protein kinase
ORF	open reading frame

PAA	polyakrylamid
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PIP ₂	phosphatidylinositol bisphosphate
PKA	protein kinase A
PKB	protein kinase B
PKC	protein kinase C
PLC	phospholipase C
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide Gel electrophoresis
SEM	scanning electron microscope
SLE	systémový lupus erythematoses
SNAP	synaptosome-associated protein
SNARE	soluble (N-ethylmaleimide sensitive factor) attachment receptor
SOC	Super Optimal Broth, catabolite repression
SytVII	synaptotagmin VII
TBE	Tris/Borate/EDTA
TCA	trichloroacetic acid
TENN	Tris/ EDTA/ NaCl/NaN₃ pufr
TGN	<i>trans</i>-Golgi network
TMHMM	Transmembrane region prediction, Hidden Markov model
TPB	Tryptose Phosphate Broth
TRPC	transient receptor potential ion channel, canonical
VAMP	vesicle associated membrane protein
XRCC4	X-ray repair cross complementing 4
ŽA	živný agar

2 Literární přehled

2.1 Exocytosa

Aby mohl být nějaký objekt prohlášen za živý organismus, musí mimo jiné splňovat podmínu schopnosti interakce se svým okolím. Buňky k vnímání svého okolí používají různých povrchových i intracelulárních receptorů, z nichž je informace přenesena, zesílena a zpracována pomocí signálních kaskád. K vysílání informací o sobě využívají jak povrchových molekul, tak molekul volně difundujících do okolního prostředí. Pokud tyto molekuly nemají schopnost volně procházet cytoplasmatickou membránou nebo nejsou syntetizovány na povrchu buňky, musí existovat nějaký mechanismus, jenž zajistí jejich dopravu na povrch, případně do okolí buňky. Děje se tak exocytosou, tedy splýváním vnitřních membránových váčků s cytoplasmatickou membránou. Membrána váčku se stane součástí cytoplasmatické membrány a obsah váčku se uvolní do vnějšího prostředí. Přehled sekreční dráhy v Obr. 2.1.



Obr. 2.1 Sekreční dráha eukaryotické buňky. Podle [5]

2.2 Typy exocytosy

Exocytosa je buď konstitutivní, nebo regulovaná. Konstitutivní exocytosa probíhá neustále a jejím zdrojem je proud váčků odškrcovaných z TGN (*trans*-Golgi network).

Slouží k obnově cytoplasmatické membrány a v některých případech k produkci extracelulární matrix. Regulovaná exocytosa naopak probíhá jen po určitém stimulu po omezenou dobu a váčky určené k regulované exocytose se hromadí pod cytoplasmatickou membránou. Většině se vybaví regulovaná exocytosa v souvislosti se sekrecí hormonů, neurotransmitterů nebo trávících enzymů, tedy ve spojení se specializovaným typem buněk. Regulovaná exocytosa však má své místo ve všech typech buněk. Je jí například přesun některých povrchových receptorů z intracelulárních membránových váčků do cytoplasmatické membrány, ale také exocytosa doprovázející hojení narušené cytoplasmatické membrány. Oba tyto příklady regulované exocytosy mají společné to, že při nich není primárně potřeba vylít obsah exocytovaných váčků do prostředí, ale je třeba vložit do cytoplasmatické membrány bud' proteiny anebo zvětšit její plochu. Proto Chieregatti a Meldolesi [1] navrhují pro rozlišení těchto dvou typů regulované exocytosy označit tuto jako nesekreční regulovaná exocytosa, protože jejím účelem je transfer membrán na povrch buňky, a jako sekreční regulovanou exocytosou nazývat exocytosu sloužící k sekreci specifických produktů, které jsou uloženy v lumen exocytovaného váčku, do extracelulárního prostoru. Další příklady nesekreční regulované exocytosy jsou v Tabulka 2-1.

Tabulka 2-1 Nesekreční exocytosa (podle [1])

Typ nesekreční exocytosy	Proteiny dopravované na povrch/ funkce expanzivní exocytosy	Studovaný buněčný typ	Hlavní stimul/ druhý posel	Nástup exocytosy	SNARE
Translokace transmembránových proteinů	AMPA receptor	neurony	Ca ²⁺ / CaMKII	několik minut	VAMP2 SNAP25
	TRPC3	HEK293 neurony	karbachol/ Ca ²⁺	1 min	VAMP2 SNAP23 syntaxin-3
	aquaporin-2	buňky ledvinových kanálků	vasopresin/ cAMP	desítky minut	VAMP2 SNAP23 syntaxin-4
	GLUT4	adipocyty	inzulin/ PI3K/ PKB/ PKC ζ	5-10 min	VAMP2 SNAP23 syntaxin-4 syntaxin-6
	H+/ K+ pumpa	žaludeční parietální buňky	histamin/ cAMP	desítky minut	VAMP2 SNAP25 syntaxin-3
	H+ pumpa	buňky ledvinových kanálků	vasopresin/ cAMP/ Ca ²⁺	desítky minut	cellubrevin/ VAMP3 SNAP23 syntaxin-1
Translokace membrán / expanzivní	cytokinese	embrya <i>Xenopus laevis</i>	Ca ²⁺	několik sekund	VAMP8 syntaxin-2
	fagocytosa	makrofágy	GTP/ PI3K	několik minut	cellubrevin/ VAMP3
	prodlužování neuritů	neurony, PC12	IGF1/ Ca ²⁺	6 min	VAMP7
	rychlé zvětšování membrány	klon PC12 neschopný sekrece	Ca ²⁺	méně než 1 s	nestudováno

zkratky v tabulce: AMPA α-amino-5-hydroxy-3-methyl-4-isoxazole propionic acid; CaMKII Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II; GLUT Glucose transporter; IGF1 Insulin-like growth factor 1; PI3K Phosphoinositide 3-kinase; PKB protein kinase B; PKC protein kinase C; SNAP; Synaptosome-associated protein; TRPC Transient receptor potential ion channel, canonical; VAMP Vesicle associated membrane protein

2.3 Hojení porušené cytoplasmatické membrány

2.3.1 Aktivní vs. pasivní proces

V dřívějších dobách panovalo přesvědčení, že obnova celistvosti biomembrán je pasivní termodynamický proces, při kterém se membrána sama zacelí [2]. Vycházelo se z pozorování, že erythrocyty, což jsou atypické buňky, protože jsou bez jádra a všech dalších organel, v prostředí bez přítomnosti divalentních kationtů byly schopné během několika minut uzavřít malé otvory v cytoplasmatické membráně o průměru do 120 nm [3]. Ostatní buňky, které mají stavbu běžné eukaryotické buňky, jsou schopné zacelovat mnohem větší otvory (i odstranění 50 % povrchu) v časové škále sekund, pokud je v médiu dostatečná koncentrace vápenatých kationtů [4]. U takto velkých poškození cytoplasmatické membrány v tak krátkém čase je obtížné představovat si zacelování jen na základě fyzikálně-chemických vlastností biomembrán. Proto byla pro tento typ zacelování navržena účast exocytosy, která by zvětšila plochu cytoplasmatické membrány.

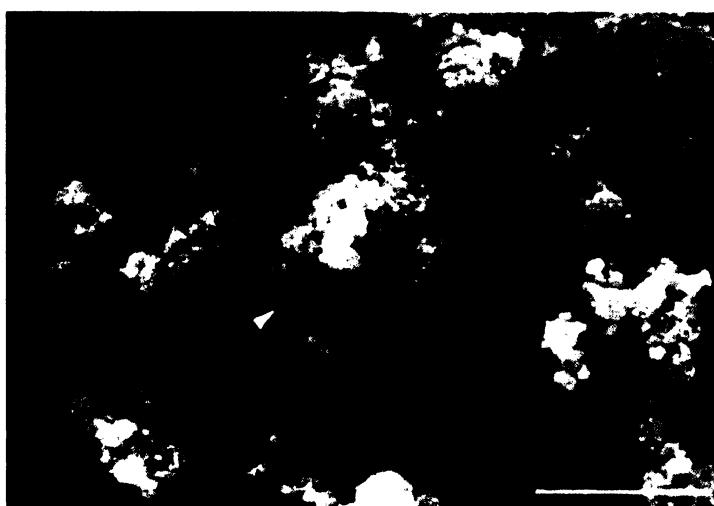
2.3.2 Exocytosa jako podmínka úspěšného hojení

Exocytosa regulovaná koncentrací vápenatých kationtů v cytoplasmě byla opravdu po narušení integrity cytoplasmatické membrány potvrzena a její výskyt koreloval s úspěšným zacelením otvorů v cytoplasmatické membráně [6, 7]. K odlišení, zda exocytosa po narušení cytoplasmatické membrány je pouze doprovodný jev, nebo slouží přímo k obnově integrity cytoplasmatické membrány, přispěla studie, při níž byla srovnávána permeabilita cytoplasmatické membrány u erythrocytů a fibroblastů NIH 3T3 po definovaném poranění laserem. Erythrocyty v pufru s fyziologickou koncentrací Ca^{2+} po rozsáhlém narušení cytoplasmatické membrány lyzují, zatímco fibroblasty jsou schopné se s tímto poškozením vypořádat. Vysvětlením rozdílného chování je odlišná vnitřní struktura těchto buněk. Tento experiment ukazuje na význam vnitřních membrán pro znovuobnovení integrity cytoplasmatické membrány [8]. Vysvětlení rozdílných výsledků hojení erythrocytů zaznamenaných [3] a [8] je v toxicitě Ca^{2+} pro buňku a v rychlosti pasivního uzavírání otvorů v biomembránách. V prostředí bez Ca^{2+} , jako tomu bylo ve studii [3], má erythrocyt dostatek času, aby mohl uzavřít otvory v cytoplasmatické membráně pouhou difusí fosfolipidů. V prostředí s obsahem Ca^{2+} v rádu μM , jak bylo použito v [8], je však erythrocyt zabit déle trvajícím působením

vysoké intracelulární koncentrace Ca^{2+} dříve, než dojde k zacelení cytoplasmatické membrány.

2.3.3 Funkce exocytosy v procesu hojení

Exocytosa je tedy pro úspěšné zacelování otvorů v cytoplasmatické membráně nezbytná, ale nabízí se otázka, jakou má při tom funkci. Zde je nutné zdůraznit, že je třeba rozlišovat rozsah poškození cytoplasmatické membrány. Pokud je opravdu velké, jako například při odtržení lamelopodia během pohybu fibroblastu v extracelulární matrix, slouží endomembrány k vytvoření „záplaty“. Při tvorbě „záplat“ dochází k velmi rychlému a masivnímu splývání váčků u místa průniku Ca^{2+} do cytoplasmy [9]. Tento jev byl u vajíček ježovky zobrazen rastrovací elektronovou mikroskopí [10] (Obr. 2.2).



Obr. 2.2 Povrch vajíčka ježovky v místě porušení cytoplasmatické membrány. Na snímku ze SEM je otvor v cytoplasmatické membráně vyplněný váčky. Měřítko 10 μm . [10].

V případě méně rozsáhlých poškození snižuje exocytosa napnutí cytoplasmatické membrány. Význam napnutí biomembrán pro zacelování otvorů se ukázal ve studii provedené na velkých liposomech (průměr 25-56 μm) tvořených arteficiální fosfolipidovou dvojvrstvou. Ty byly schopné uzavírat otvory o průměru asi 1 μm , jen dokud nebyla překročena určitá hodnota povrchového napětí [11]. V buňkách je cytoplasmatická membrána napínána cytoskeletem [12, 13]. Ten je navíc fyzickou bariérou pro kontakt váčků s cytoplasmatickou membránou, proto je narušení kortikálního cytoskeletu, řízené hladinou Ca^{2+} , jedním z kroků vedoucích k úspěšnému zacelení trhlin v cytoplasmatické membráně [14, 15].

2.3.4 Facilitace a potenciace hojení jako adaptace na poškození cytoplasmatické membrány

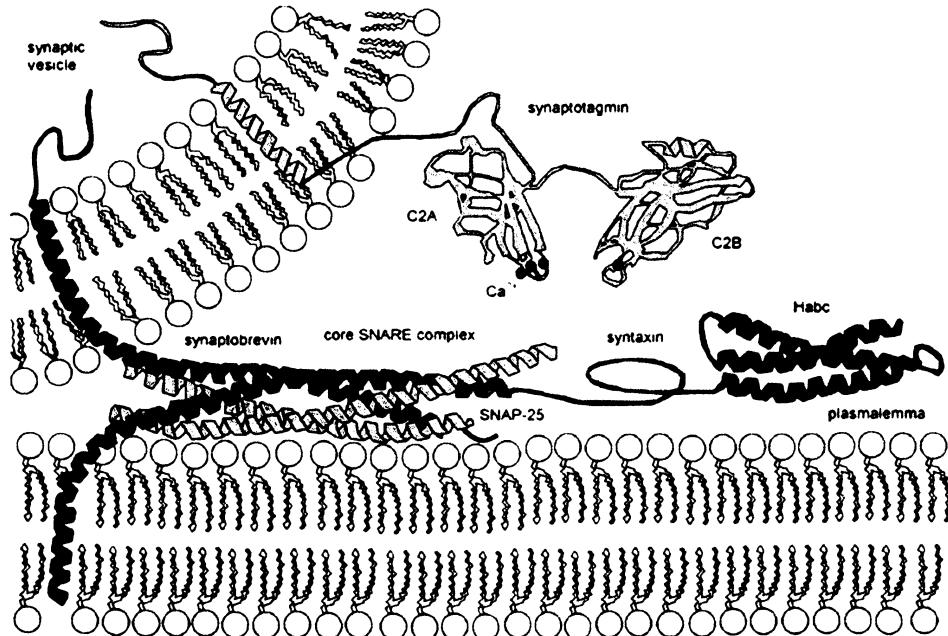
Zajímavým jevem je tzv. facilitace a potenciace hojení po prvním průniku Ca^{2+} do buňky. Facilitace neboli usnadnění hojení trvá několik minut po prvním poranění a projevuje se rychlejším zacelením trhliny. Usnadnění hojení poranění na stejném místě, jako bylo první, je závislé na aktivitě PKC (protein kinase C) [13], která je aktivována Ca^{2+} a DAG (diacylglycerol) a mimo jiné se podílí na přestavbě aktinového cytoskeletu – viz přehledný článek [16]. Když je poranění na jiném místě než primární, je usnadnění hojení závislé na aktivitě PKA (protein kinase A) [17], aktivované cAMP, která se kromě jiného účastní regulace aktinového cytoskeletu – viz přehledný článek [18]. Potenciace hojení se stejně jako facilitace projevuje rychlejším zacelováním trhlin, ale tento stav nastává až po období facilitace a trvá několik hodin až den. Spuštění těchto pochodů je závislé na PKC a účastní se při ní signální kaskáda p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase), která aktivuje transkripční faktor CREB (cAMP response element-binding protein) [19]. Přehledný článek o signalizační kaskádě p38 MAPK je například [20].

2.3.5 Identifikace populace váčků účastnících se exocytosy

Poměrně nepřehlednou oblastí problematiky hojení buněk je charakterizace populace váčků, které se exocytují. V neoplozených vajíčkách se exocytují kortikální granula [6, 21]. V oplozených vajíčkách ježovky už kortikální granula nejsou a přesto k hojení dochází. Po odstranění žloutkových granul bylo hojení inhibováno, proto se dá předpokládat, že jsou to právě ony, které se exocytují, i když k jejich exocytose je zapotřebí vyšší koncentrace Ca^{2+} [9, 21].

Exocytosa endocytického kompartmentu při hojení byla studována na 3T3 fibroblastech pomocí barviva FM1-43 (*N*-(3-(triethyl ammonium) propyl)-4-(4-dibutylaminostyryl pyridinium dibromid). Toto barvivo je rozpustné v hydrofilním i hydrofobním prostředí, silně fluorescenční je však pouze v hydrofobním prostředí. Při inkubaci buněk v tomto barvivu dochází k jeho inkorporaci do vnějšího listu cytoplasmatické membrány a během endocytosis je označen endocytický systém. Po odstranění barviva z média se v důsledku difuse odbarví cytoplasmatická membrána a exocytosa endocytického kompartmentu se projeví poklesem celkové fluorescence buněk. Ve studiích [7, 12, 13, 17] byl zaznamenán po poranění pokles fluorescence endosomů v místě trhliny jako

důsledek exocytosy a z toho byla vyvozena účast endocytického kompartmentu na procesu hojení. Stejně jako v případě kortikálních a žloutkových granul je i toto zacelování trhlin v cytoplasmatické membráně inhibováno klostridiálními toxiny [13, 21]. Klostridiální toxiny (například tetanový toxin a botulotoxiny) jsou specifické endoproteasy štěpící komponenty některých SNARE komplexů. SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) jsou už poměrně dlouho považovány za vlastní motor fúze membrán - viz Obr. 2.3. SNARE byly objeveny v neuronech jako nezbytná součást exocytosy synaptických váčků, kde jádro tohoto komplexu tvoří čtyři helixy, které během své asociace do coiled-coil konformace vytváří sílu, která slouží k překonání odpudivých sil mezi dvěma membránami, a tím jim umožňuje splynout. V savčích buňkách existuje kolem 30 členů, ne všechny jsou štěpeny klostridiálními toxiny a každý člen má specifickou lokalizaci na membránové organele. Viz přehledné články [23-27]. Inhibice exocytosy klostridiálními toxiny však není dokonalá [13, 21], a proto se dá usuzovat na přítomnost dalšího kompartmentu, který pro exocytosu používá SNARE neštěpitelné klostridiální toxiny. To by potvrzoval i poznatek, že pokles fluorescence FM1-43 barviva je pouze v první rychlé fázi exocytosy [12].



Obr. 2.3 Molekulární mechanismus fúzování membrán [22].

Fúze membrán je zajištěna složením komplexu SNARE (zde synaptobrevin, SNAP-25 a syntaxin). Synaptotagmin slouží jako senzor vápenatých iontů.

Další důkazy účasti několika různých kompartmentů přinesla elektrofysiologická měření exocytosy regulované Ca^{2+} v CHO buňkách a 3T3 fibroblastech. Tato měření byla provedena metodou tercíkového zámku (patch-clamp), při které se měří kapacitance buňky. Při zvětšení povrchu buňky dojde ke zvětšení kapacitance, lze tak měřit míru exocytosy. Zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} nad 20 μM mělo za následek dvoufázový průběh exocytosy, přičemž pomalejší fáze byla tvořena velkými váčky a vyskytovala se už při nižších koncentracích Ca^{2+} v cytoplasmě, rychlejší fáze byla tvořena velkým množstvím malých váčků [28, 29]. Zjištěná velikost exocytovaných váčků okolo 1 μm v pomalejší fázi odpovídá velikosti lysosomů.

Lysosomy jsou většinou vnímány jako odpadkový koš buňky. Ačkoliv bylo známo, že existují tzv. sekreční lysosomy, což jsou modifikované lysosomy například v hematopoetické linii nebo v melanocytech (viz přehledný článek[30]), schopnost tzv. konvenčních lysosomů exocytovat začala být zkoumána po objevu, že lysosomy migrovaly k cytoplasmatické membráně a fúzovaly s ní v místech průniku parazita *Trypanosoma cruzi* [31]. K exocytose lysosomů dochází po zvýšení intracelulárního Ca^{2+} a tato závislost na Ca^{2+} je řízena synaptotagminem VII (dále SytVII) [32-34]. Synaptotagminy se nacházejí na různých membránových organelách. Skládají se z variabilní glykosylované N-koncové domény, která je v lumen váčku, jedné transmembránové domény, spojovací domény, která má vysoký obsah cysteinu a je vhodná pro palmitoylaci, dvou C2 domén a konzervované C-koncové domény. C2 doména váže Ca^{2+} a v tomto stavu má vysokou afinitu k fosfolipidům. Předpokládaná role při fúzování membrán je regulační, protože se vážou ke SNARE komplexu a protože mohou sloužit jako senzor hladiny Ca^{2+} . Viz přehledné články [35-37]. Lysosomální exocytosa není citlivá ke klostridiálním toxinům [38] a hojení je inhibováno zablokováním SytVII [33, 39], který, jak už bylo zmíněno výše, řídí závislost exocytosy lysosomů na koncentraci Ca^{2+} v cytoplasmě. Myši s deletovanými C2 domény SytVII, tedy teoreticky bez možnosti spřáhnout exocytosu lysosomů s koncentrací Ca^{2+} , měly zvýšený výskyt zánětů a fibróz v kůži a kosterních svalech, což se dá považovat za důsledek málo efektivního hojení [40]. Tyto studie společně s pozorováním, že jediným ze známých membránových kompartmentů v NRK buňkách, který se exocytoval po poškození cytoplasmatické membrány, byly lysosomy nacházející se v blízkosti povrchu buněk [39], by měly učinit roli lysosomů v procesu hojení cytoplasmatické membrány nepopiratelnou. Skupina Kirchhausena ji

zpochybnila prací, ve které byla za použití vakuolinu, chemikálie způsobující vakuolizaci pozdních endosomů a lysosomů, zablokována regulovaná exocytosa lysosomů, ale hojení po poranění bylo zachováno. Na základě tohoto pozorování navrhují účast jiné populace váčků [41]. Proti tomuto tvrzení protestuje skupina Andrewsové, která zpochybňuje schopnost vakuolinu zablokovat exocytosu lysosomů [42].

Populaci váčků, která byla identifikována při elektrofyziológických měřeních jako rychlá fáze exocytosy po zvýšení intracelulárního Ca^{2+} nad $20 \mu\text{M}$ [28, 29], nebylo možné studovat do doby identifikace buněčné linie, ve které jsou tyto váčky převažujícím typem exocytovaným po zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} . Při elektrofyziológických měřeních na PC12-27, což je klon PC12 s nefunkční neurosekreční dráhou, byla zaznamenána exocytosa malých váčků po zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} [43]. Stejný průběh jako u klonu PC12-27 mělo měření na kontrolních normálních PC12, pokud byl přítomen tetanový toxin, který štěpí některé SNARE a inhibuje tak sekreci z neurosekrečních granul [43]. Z toho vyplývá, že váčky nejsou v PC12-27 artefaktem vzniklým celkovou aberací regulované exocytosy, protože se vyskytují i v normálních PC12. Dalším průlomem ve studiu těchto váčků se stala příprava a charakterizace monoklonální protilátky specificky interagující s antigenem lokalizovaným v jejich lumen. Tato protilátka umožnila provést s buněčnou linií PC12-27 kolokalizační studie, pomocí nichž bylo možné vyloučit jejich endosomální původ. Navíc je nebylo možné ztotožnit ani s dalšími popsanými membránovými organelami [44]. Jako antigen rozeznávaný touto unikátní protilátkou byl identifikován protein Ahnak [44]. Ačkoliv ani v úvodní studii [45], která popisovala objev genu AHNAK, ani za použití novějšího algoritmu pro vyhledávání transmembránových regionů TMHMM 2.0 [46] nebyla v sekvenci Ahnaku nalezena transmembránová doména, je na cytoplasmatické membráně po exocytose enlargeosomů tečkovitá distribuce protilátky, která vypovídá o jeho asociaci s vnitřním listem membrány těchto váčků [44]. Protože se tyto váčky účastnily expanze cytoplasmatické membrány, byl pro ně navržen název enlargeosomy [44].

Rozsáhlejší charakterizace exocytosy enlargeosomů je ve studii [47]. Tato studie podává další důkazy, které ztotožňují váčky objevené elektrofyziológickými měřeními [43] a váčky vizualizovanými za použití specifické protilátky [44]. Důraz je v ní kladen hlavně na srovnatelné koncentrace intracelulárního vápníku při elektrofyziológických

měřených a při sledování exocytosy imunofluorescencí. Zajímavým zjištěním je rezistence membrán enlargeosomů vůči solubilizaci neiontovými detergenty za nízké teploty, protože tomuto rysu membrán se připisuje velký význam pro regulaci exocytosy i endocytosy [48, 49]. Na základě negativních kolokalizací s markery již známých membrán rezistentních k neiontovým detergentům jsou membrány enlargeosomů novým typem tohoto druhu membrán. Extrakce cholesterolu z membrán buňky nemá za následek blok exocytosy enlargeosomů. Přesto má odstranění cholesterolu na lokalizaci a morfologii enlargeosomů i samotných PC12-27 značný účinek. Buňky se scvrkly a zploštěly a enlargeosomy, které jsou jinak jen na periferii buňky, se rozptýlily do celého objemu cytoplasmy a byla pozorována jejich vakuolizace. Endocytosa exocytovaných membrán enlargeosomů je také závislá na koncentraci Ca^{2+} v cytoplasmě. Aby nastala, musí se hladina intracelulárního Ca^{2+} zvýšit na minimálně 4 μM . Endocytované membrány mají stejně jako enlargeosomy neutrální pH lumen a jsou tedy nezávislé na endosomálním systému, který se vyznačuje nízkým pH v lumen.

Další zmínky o enlargeosomech a jejich účasti na zacelování cytoplasmatické membrány po poškození lze najít v přehledných článcích [1, 50-52].

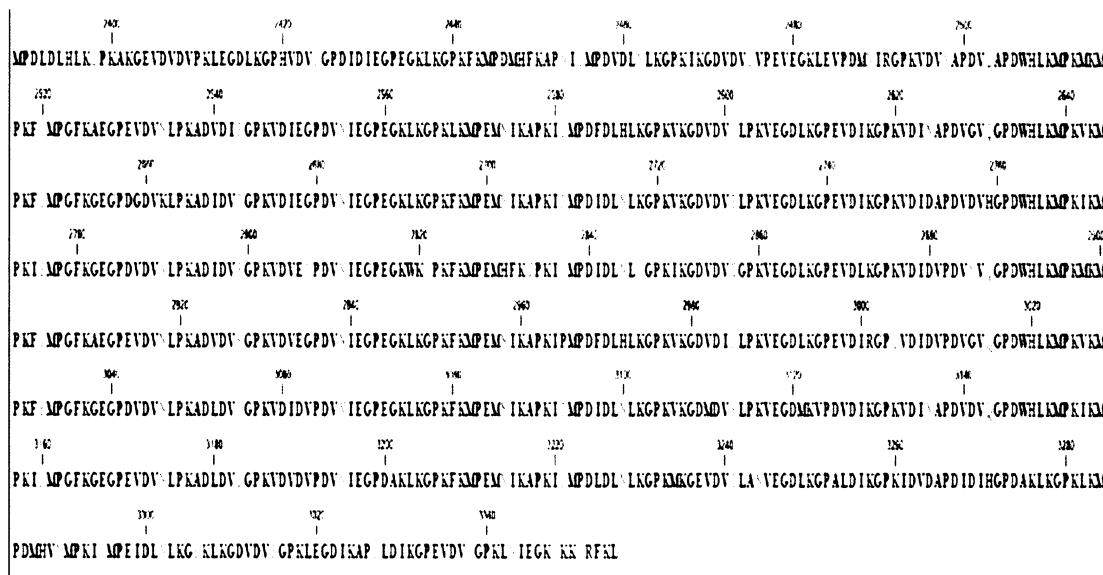
2.4 Ahnak

Nejdříve byl objeven proteinový produkt genu AHNAK, který byl pojmenován desmoyokin [53]. Gen AHNAK byl objeven nezávisle [45] a následně byly ztotožněny [54]. Gen je v lidském genomu lokalizován v oblasti 11q12 [55].

Desmoyokin byl nalezen mezi proteiny s vysokou molekulovou hmotností tvořícími desmosomy ve stratifikovaném epithelu. Desmosomy se nacházejí ve velkém počtu v laterální části cytoplasmatické membrány epitheliálních buněk a slouží k upevnění buňky k jiným buňkám pomocí adhezivních molekul a zároveň k jejich propojení intermediárními filamenty. Proti desmoyokinu byla připravena monoklonální protilátka, která potvrzovala asociaci s desmosomy [53]. Reálná asociace s desmosomy však byla následně vyvrácena [56, 57]. Pomocí elektronové mikroskopie byl desmoyokin vizualizován. Tvar desmoyokinu je tyčinkovitý s globulárními doménami na okrajích, jeho velikost byla odhadnuta na asi 170 nm [53].

AHNAK byl identifikován jako jeden ze suprimovaných genů v neuroblastomu ve srovnání s normální neuronální tkání. Porovnání 17,5 kb dlouhé mRNA s genomem přineslo překvapivé zjištění, že se jedná s největší pravděpodobností o gen bez intronů,

což je u takto velkých transkriptů neobvyklé. AHNAK je poměrně vysoce fylogeneticky konzervován od *Dictyostelium discoideum* přes drosophilu až k savcům. Na základě nukleotidové sekvence bylo předpovězeno Shtivelman et al. , že by protein měl mít tři domény a délku asi 1,2 μm. Prostřední doména vykazuje periodicitu s repeticemi dlouhými 128 aminokyselin. V repeticích byl odhalen interní motiv dlouhý sedm aminokyselin, ve kterém je na každé sedmé pozici prolin [45] (Obr. 2.4). Podle téže práce se toto neslučuje s tvorbou α-helixu [45].



Obr. 2.4 Aminokyselinová sekvence části repetitivní domény proteinu Ahnak.

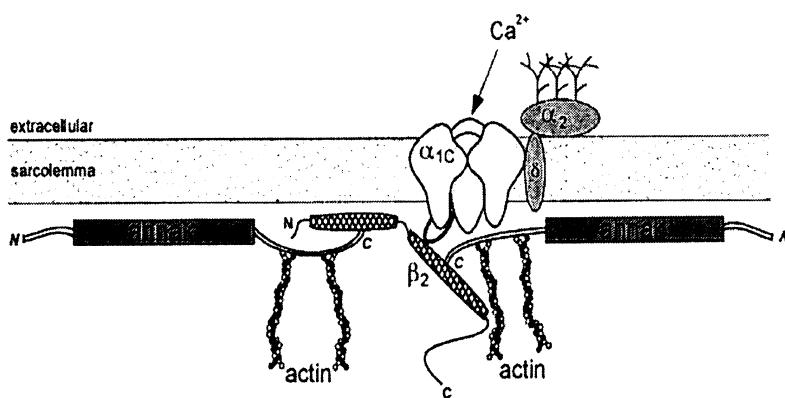
V sekvenci jsou barevně vyznačeny nabité a polární aminokyseliny. Ty se pravidelně střídají s nepolárními. Délka jednoho řádku je 128 aminokyselin, což odpovídá délce jedné repetice.

Ztotožnění Ahnaku a desmoyokinu provedl Hashimoto, který také poukázal na špatnou reprodukovatelnost intracelulární imunofluorescenční detekce proteinu Ahnak a na rozdíly mezi různými použitými protilátkami [54]. Jak se později ukázalo při použití protilátek proti titinu, repetitivní střední část Ahnaku je zdrojem různých zkřížených reaktivit [58].

Exprese Ahnaku hodnocená podle přítomnosti jeho mRNA v buňce je závislá na fázi buněčného cyklu a nejvyšší je v G1 a G0 fázi [59]. Další studium na úrovni proteinu vedlo k lokalizaci Ahnaku pomocí králičích polyklonálních protilátek označovaných KIS a FEN do jádra [59]. Fosforylace Ahnaku prostřednictvím PKC by měla sloužit jako signál k exkluzi z jádra [56]. Za translokaci z jádra do cytoplasmy, případně na cytoplasmatickou membránou (závisí na použité buněčné linii) je zodpovědná C-koncová doména [60]. Fosforylace jako prostředek k vyloučení Ahnaku z jádra byla

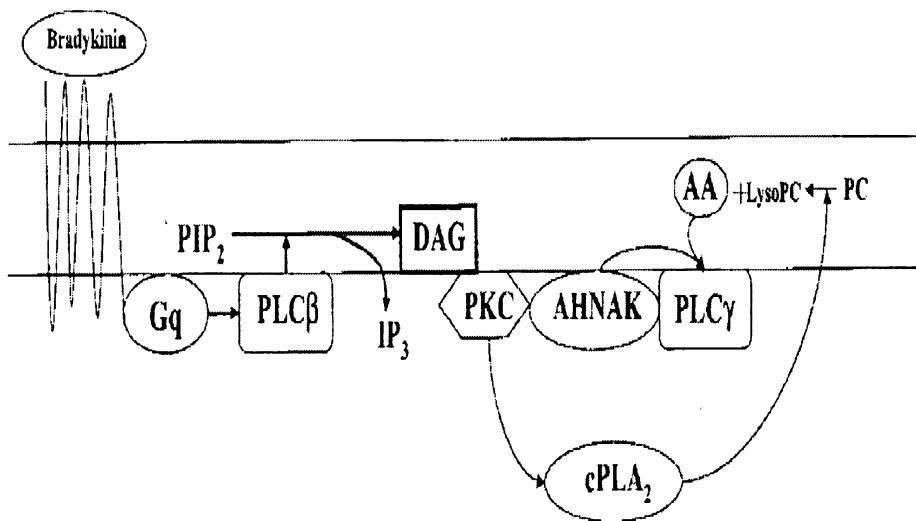
potvrzena ještě další studií, kde je ale za fosforylací odpovědná PKB [61]. Nukleární lokalizační signál, který umožňuje import do jádra přes jaderný pór, je v C-koncové doméně a k jeho inaktivaci by měla sloužit fosforylace na serinu 5535 a nukleární exportní signál v oblasti aminokyselin 4826-5071 [61].

Jediná v literatuře dobře doložitelná ucelená linie výzkumu Ahnaku se soustředila na jeho úlohu v srdečním svalu. V srdci je asociován s vápníkovým kanálem typu L. Vápníkový kanál L-typu v srdeční svalovině iniciuje a moduluje srdeční kontrakce. Jeho aktivace se děje depolarizací membrány a k inaktivaci dochází spontánně. Skládá se z α_1 -podjednotky, což je samotný kanál a současně senzor napětí, a β -podjednotky modulující vlastnosti kanálu. Zvýšení průtoku Ca^{2+} a prodloužení času inaktivace kanálu způsobí zvýšení kontraktility svalu. Asociace Ahnaku s β - podjednotkou kanálu je závislá na fosforylací Ahnaku prostřednictvím PKA [62]. K interakci dochází mezi C-koncovou doménou Ahnaku a C-koncovou částí β_2 -podjednotky kanálu [63]. Současně se na Ahnak váže aktin [63]. Tato vazba způsobuje spojení aktinových vláken do svazků [64]. Obr. 2.5 ilustruje předpokládanou interakci ve svalu [63]. Vzhledem k tomu, že všechny hypotézy o působení Ahnaku v srdeční svalovině se týkají regulace kontraktility [64, 65], byla provedena klinická studie, jestli polymorfismus Ahnaku Ile5236Thr nemá souvislost se srdečními onemocněními. Výsledkem bylo zjištění, že u jedinců s touto mutací není zvýšená prevalence k hypertrofické kardiomyopatii [66]. Přesto má tento polymorfismus dalekosáhlé důsledky na buněčné úrovni, protože brání funkci Ahnaku jako brzdy, snižující proud Ca^{2+} tekoucích do kardiomyocytů [66].



Obr. 2.5 Uspořádání komplexu vápníkového kanálu L-typu v cytoplasmatické membráně srdečního svalu. [63]

Další poměrně ucelená studie se týká vlivu Ahnaku na aktivitu PLC- γ 1 (fosfolipasa C- γ 1). Byla provedená skupinou Rhee et. al [67, 68]. PLC- γ je aktivována povrchovými receptory a druhými posly odvozenými od lipidů (kyselina fosfatidová, fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát, kyselina arachidonová - AA). Nový způsob aktivace je založen na společném působení repetitivní části Ahnaku a AA. Celá jimi navržená dráha je na Obr. 2.6 [67].

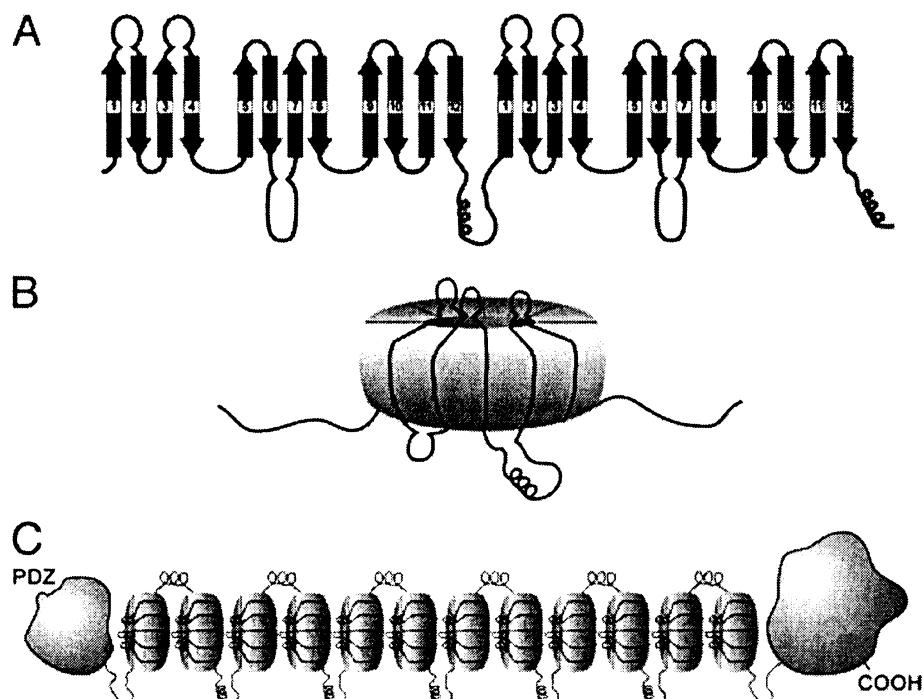


Obr. 2.6 Aktivace PLC γ [67]

Po navázání ligantu na receptor sdružený s G-proteinem se aktivuje PLC β , která štěpí fosfatidylinositolbisfosfát na diacylglycerol a inositol-1,4,5-trisfosfát. Diacylglycerol je aktivátorem PKC, která fosforyluje cPLA $_2$. cPLA $_2$ štěpí fosfatidylcholin na kyselinu lysofosfatidovou a kyselinu arachidonovou (AA). AA spolu s repeticemi Ahnaku aktivuje PLC γ . [67].

Ostatní poznatky o interakcích Ahnaku s dalšími proteiny byly zjištěny při hledání interakčních partnerů různých proteinů a nebyly dále rozvíjeny. Jedná se o nalezení specifické interakce s proteinem S100B v závislosti na koncentraci Zn $^{2+}$ a Ca $^{2+}$ [69], studii o vlivu interakce Ahnaku s annexinem 2 a S100A10 na diferenciaci a polarizaci epiteliaálních buněčných linií MDCK a MCF-7 [70] a nakonec o vlivu asociace Ahnaku do komplexu DNA ligasy IV s XRCC4 na opravy dvouřetězcových zlomů v DNA [71]. Studie [71] byla provedena na jaderných extraktech a ve studii [69] byly použity purifikované proteiny, proto se může jednat o artefakty neodrážející skutečnou situaci v buňce. K objasnění funkce Ahnaku v buňce měl napomoci myší knock-out, ale ten neměl žádný z očekávaných problémů s kůží, srdcem nebo nervovým systémem [72],

73]. Vysvětluje se to tím, že existuje homolog, který ztrátu Ahnaku kompenzuje. Tímto „zachráncem“ má být otevřený čtecí rámec (ORF) lokalizovaný v lidském genomu na 14q32, který je Ahnaku podobný velikostí i obsahem repetic, a proto je pracovně pojmenován Ahnak2. Skládá se z N- a C-koncové globulární domény spojené repeticemi, které vytvářejí disky složené z β -listů. Povrch disků je nabity a slouží k interakcím s jinými proteiny [73] a předpokládá se, že by velmi podobnou strukturu měl mít i Ahnak. Model struktury Ahnak2 viz (Obr. 2.7)



Obr. 2.7 Model proteinu Ahnak2 navržený na základě sekvence. [73]

A. Sekundární struktura jednoho modulu z repetitivní části.

B. Tvar jednoho modulu z repetitivní části.

C. Tvar celé molekuly Ahnak2.

Kromě markeru pro enlargeosomy se Ahnak ukázal být markerem endothelu udržujícího hemato-encefalickou bariéru [74]. Zdá se, že může být využit k diagnostickým účelům jako marker rakoviny vaječníků [75] nebo pro předvídaní relapsů při léčbě akutní T-buněčné lymfoblastické leukémie u dospělých [76]. Byl prokázán jako jeden z autoantigenů přítomných v krvi pacientů se systémovým lupus erythematoses, ale nebyla prokázána žádná souvislost mezi rozvojem tohoto onemocnění a hladinou autoprotilátek proti Ahnaku [77].

3 Cíl práce

- Klonování fragmentů genu AHNAK kódujících C- a N-koncové domény a repetitivní střední část.
- Produkce a purifikace rekombinantních fragmentů proteinu Ahnak pro imunizace myší a testování sér pacientů s autoimunitními onemocněními.
- Konstrukce fragmentů proteinu Ahnak fúzovaných s EGFP využitelných pro studium enlargeosomů v živých buňkách fluorescenční mikroskopíí.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Přístroje

autokláv PS20A (Chirana)
CCD kamera Exwave HAD (Sony)
centrifuga 5804R (Eppendorf)
centrifuga Universal 32R (Hettich Zentrifugen)
cykler PTC-100 (MJ Research)
cykler TouchGene gradient (Techne)
elektrodový pH metr InoLab pH720 (WTW)
elektroforetický systém Mighty small SE250 a SE260 (Hoeffer Scientific)
elektroporátor Gene Pulser Xcell (Bio-Rad Laboratories)
invertovaný mikroskop IX-71 (Olympus)
invertovaný mikroskop IX-81 CellR s filtry pro fluorescenci U-M3DAFTR (Olympus)
orbitální inkubátor NB-205 (N-Biotek)
regulovatelný zdroj stejnosměrného proudu Power pac Basic (Bio-Rad Laboratories)
rotační vakuový koncentrátor SpeedVac (Savant)
sada mechanických pipet EpResearch pipett (Eppendorf)
semi-dry blotter TE77XP (Hoeffer Scientific)
spektrofotometr UV-1601 (Shimadzu)
stolní centrifuga Minispin Plus (Eppendorf)
termoblok Thermomixer comfort (Eppendorf)
trans-iluminátor TCP-20-MC (Vilber Lourmat)
ultrazvukový generátor UP50H (Dr. Hielscher)
váhy ABC plus 600H (ADAM Equipment)
vortex MS1 minishaker (IKA)
vyhřívací deska VD2 (VEZAS)
vyvolávač RTG filmů Optimax (Protec)

4.1.2 Materiál

Použité zkratky viz Kapitola 1.
1,4-dithio-DL-threitol (dále DTT) (Fluka)

10x Long PCR Buffer with MgCl₂ (Fermentas MBI)
2-merkaptoothanol (Sigma)
4-ethylmorpholinium acetát (Sigma)
aceton (Lachema)
acetonitril (Sigma)
agarosa (Sigma)
AgNO₃ (Lachema)
ampicilin (Sigma)
blotovací papír 17CHR (Whatman)
bromfenolová modř (Sigma)
BSA (Sigma)
CaCl₂ (Sigma)
CM-Sephadex C-50 (Pharmacia)
Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad Laboratories)
DAPI (Sigma)
D-MEM (Gibco)
dNTP (Fermentas MBI)
dodecylsulfát sodný (dále SDS) (Sigma)
ECL substrát (Pierce)
EDTA (Sigma)
enzym CIAP (Fermentas MBI)
enzym Long PCR Enzyme mix (Fermentas MBI)
enzym T4 DNA ligase (Fermentas MBI)
ethanol (Lachema)
ethidium bromid (Sigma)
FBS (Gibco)
fenol (Lachema)
formaldehyd (Sigma)
geneticin (Gibco)
gentamycin (Lek Pharmaceutical and Chemical Company)
glukosa (Lachema)
glutamin (SEVAPHARMA)
glycerol (Sigma)

glycin (Sigma)
guanidin hydrochlorid (Sigma)
 H_3BO_3 (Lachema)
HIS-Select Spin Columns (Sigma)
HIS-Select™ Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich)
Histrap FF crude (Amersham Biosciences)
chloramfenikol (Fluka)
chloroform (Lachema)
imidazol (Loba)
inhibitor proteas AEBSF (Calbiochem)
inhibitor proteas E-64 (Calbiochem)
inhibitor proteas leupeptin (Calbiochem)
isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (dále IPTG) (Sigma)
KAc (Lachema)
kanamycin (Sigma)
KCl (Lachema)
 KH_2PO_4 (Lachema)
kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel)
kit pCR®-XL-TOPO® (Invitrogen)
kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
kit RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas MBI)
krycí skla kulatá 8 mm (Hirschmann)
kyselina octová (Lachema)
kyselina trichloroctová (dále TCA) (Sigma)
Lipofectamine 2000 (Invitrogen)
média SOC (Invitrogen)
methanol (Lachema)
močovina (Lachema)
Mowiol 4-88 (Calbiochem)
 N,N,N',N' -tetramethylethylenediamin (Sigma)
 Na_2CO_3 (Lachema)
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Lachema)
 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Lachema)

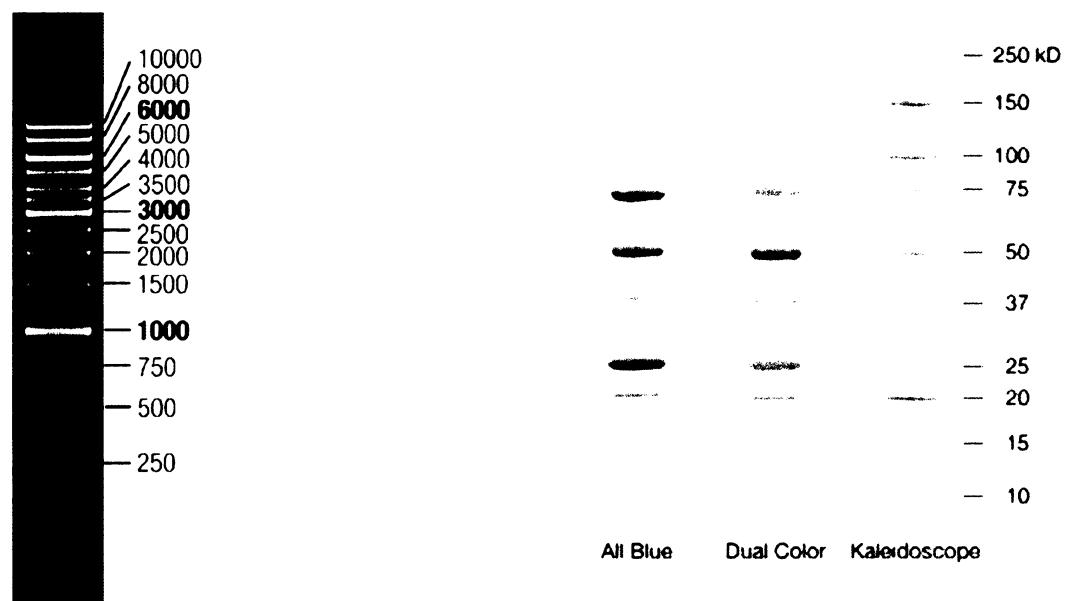
NaCl (Lachema)
NaN₃ (Sigma)
NH₄Cl (Lachema)
nitrocelulosové membrány Protran (Whatman)
N-lauroylsarcosin (Serva)
Nuclease free H₂O (Fermentas MBI)
Nutrient agar (OXOID)
peroxosíran amonný (Bio-Rad Laboratories)
plastik (Nunc, Eppendorf)
plastik pro tkáňové kultury (Nunc)
podložní skla 76x26 mm (Hirschmann)
primární protilátka Anti-GFP (Roche applied science)
primární protilátka His•Tag® Monoclonal Antibody (Novagen)
Protease Inhibitor Cocktail for use in purification of Histidine-tagged proteins, DMSO solution (Sigma)
pufry pro restrikční endonukleasy (Fermentas MBI)
restrikční endonukleasy (Fermentas MBI)
RPMI 1640 (Gibco)
RTG filmy Medical X-ray film 13x18 (Foma)
sekundární protilátka Alexa Fluor® 594 goat anti-mouse IgG (H+L) (Molecular Probes)
sekundární protilátka Goat Anti-Mouse IgG (H + L)-HRP Conjugate (Bio-Rad Laboratories)
sestava pro LC Bio-Rad Biologic Duoflow (Bio-Rad Laboratories)
sterilní roztok Trypsin-EDTA, 10x (Sigma)
sušené mléko (Laktino)
tris(hydroxymethyl)aminomethan (dále Tris) (Sigma)
trypsin (Promega)
Tryptose Phosphate Broth (OXOID)
TWEEN 20 (Sigma)

4.1.2.1 Standardy molekulových hmotností

elektroforézy nukleových kyselin

GeneRuler™ Express DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas MBI) viz Obr. 4.1
proteinové elektroforézy

Precision Plus Protein prestained standards (Bio-Rad Laboratories) viz Obr. 4.2

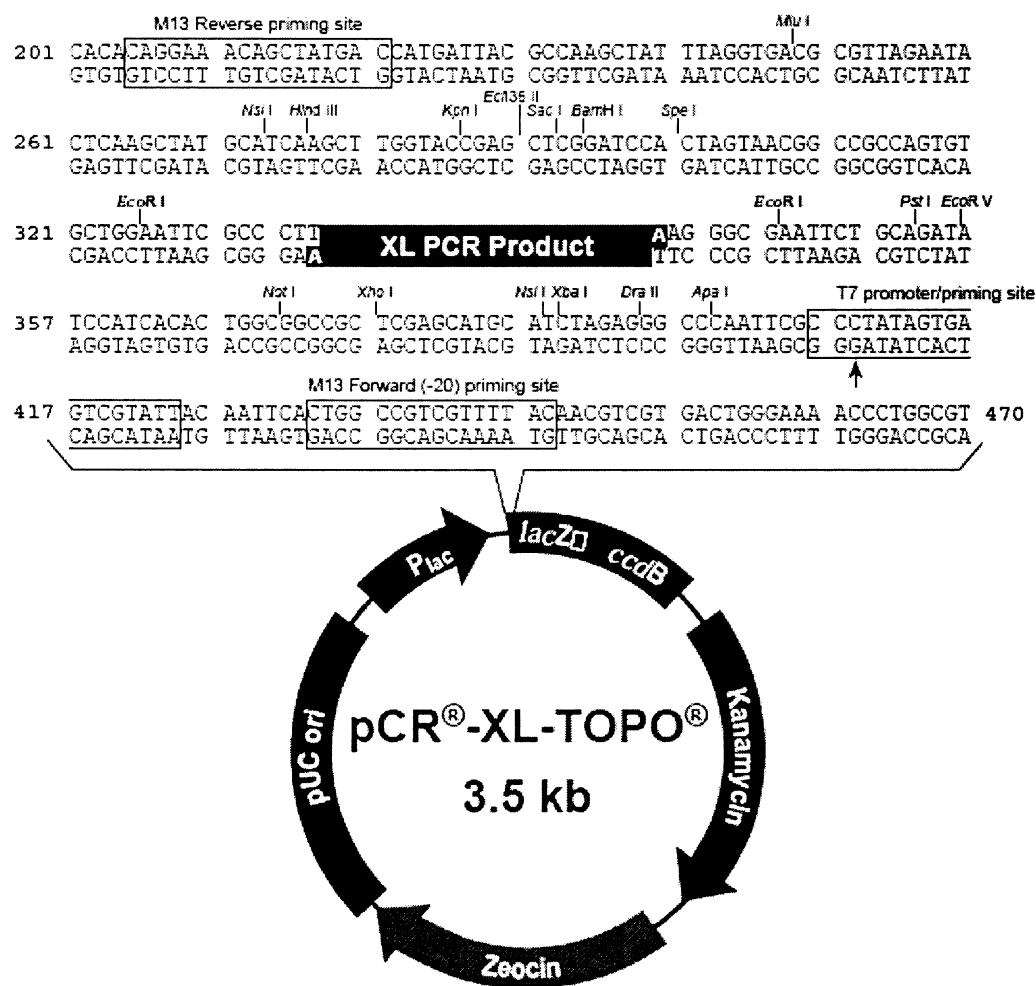


Obr. 4.1 Standardy DNA. (stupnice v párech bazí)

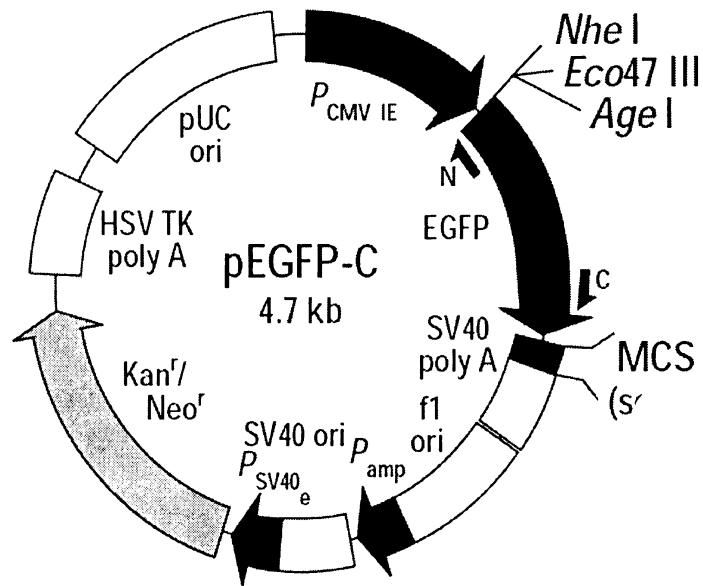
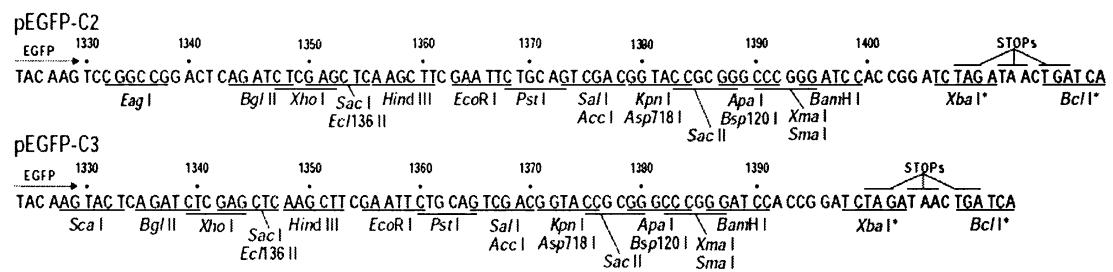
4.1.2.2 Vektor

Plazmid pCR-XL-TOPO konjugovaný s topoisomerasou byl skladován v -20°C v originálním roztoku. Všechny ostatní plazmidy a odvozené konstrukty byly skladovány ve vodném roztoku v -20°C. Zároveň byly vytvořeny bakteriální konzervy skladované v 10% (v/v) glycerolu v -80°C.

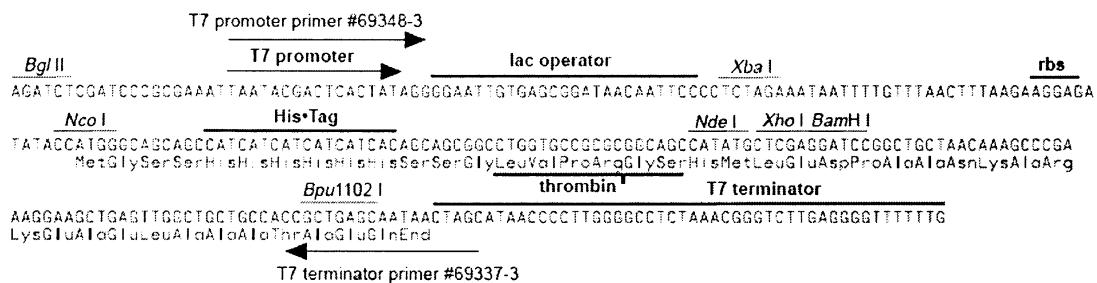
pCR-XL-TOPO (Invitrogen)



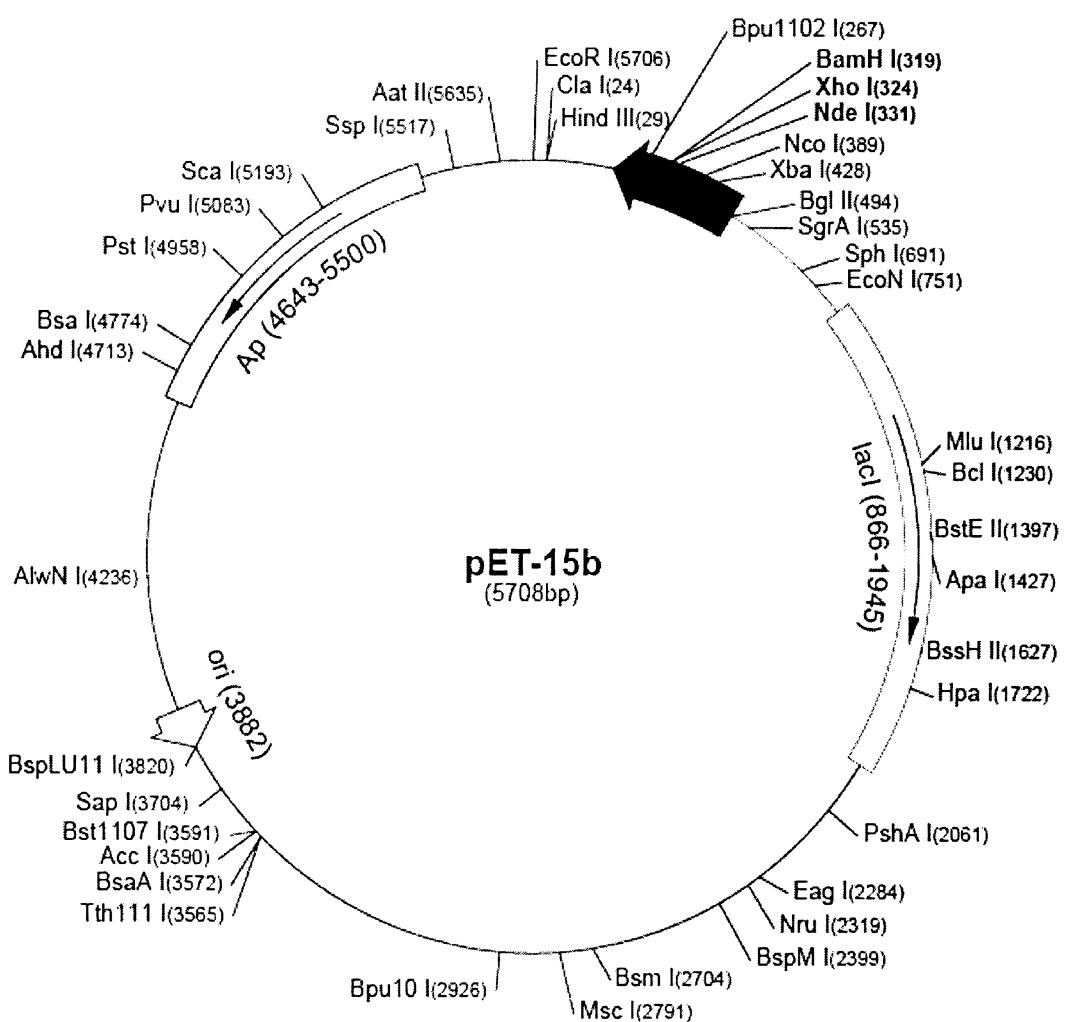
pEGFP-C2 / 3 (Clontech), dar RNDr. K. Drbala, PhD. (ÚMG, AV ČR)



pET-15b (Novagen), dar Doc.RNDr. J. Forstové, CSc. (Katedra genetiky a mikrobiologie PřF UK)



pET-15b cloning/expression region



4.1.2.3 Seznam primerů

Primery byly vyrobeny firmou Invitrogen a skladovány jako vodný roztok v -20°C.

Tabulka 4-1 Klonovací primery

označení primeru	sekvence (restrikční místo podtrženo)	teplota tání primeru	
		*	**
AhnakN_F_XhoI	ACTCGAGATAAAGGTGGGAGGCTCA	58°C	69°C
AhnakN_R_BamHI	GGGATC C TTCTACTCTGGGGAGTGTG	59°C	68°C
AhnakC_F_XhoI	ACTCGAG C TTAGATGTACACATGGACA	56°C	68°C
AhnakC_R_BamHI	CGGATCC C CTCTTGTGGAAACTG	57°C	68°C
AhnakREP_F_XhoI	ATCTCGAGGAC C TCGATCTACACTT	54°C	67°C
AhnakREP_R_BamHI	CTGGATCCACGAGATTCTTGACTTT	53°C	66°C

Vysvětlivky: * primer bez restrikčního místa, ** primer s restrikčním místem.

Tabulka 4-2 Sekvenační primery

označení primeru	sekvence	teplota tání primeru
pEGFP_R2	TTATTTTCAGGTTCAGGG	56°C
pEGFP_F	GATCACATGGC C TGCTG	59°C
T7_promotor	TAATACGACTCACTATAAGGG	56°C
T7_terminator	GCTAGTTATTG C TCAGCGG	63°C
M13_F	GT T TC C CCAGTCACGA	53°C
M13_R	CAGGAAACAG C TATGAC	54°C

4.1.3 Roztoky

Pokud není uvedeno jinak, byly roztoky skladovány při laboratorní teplotě na světle.

4.1.3.1 Mowiol

20% (w/v) glycerol; 10% (w/v) Mowiol 4-88; 0,1 M Tris.HCl; pH 8,5; skladováno ve 4°C

4.1.3.2 Lyzační pufr pro izolaci RNA

7,2 M guanidin HCl; 0,3 M KAc (pH 4,8); 5 mM DTT; 14,2 µl/ml *N*-lauroylsarcosin; DTT a *N*-laurylsarcosin byly přidány před použitím pufru

4.1.3.3 Agarsová elektroforéza

4.1.3.3.1 TBE pufr

89 mM Tris.HCl; 89 mM kyselina boritá; 2 mM EDTA; pH 8,0

4.1.3.3.2 Vzorkový pufr

50% glycerol; 0,13 M EDTA; 0,12% bromfenolová modř; pH 8,0

4.1.3.4 Kultivace *E. coli*

4.1.3.4.1 TPB

29,5 g/l Tryptose Phosphate Broth, sterilizováno 15 min při 121°C v autoklávu; skladováno při 4°C

4.1.3.4.2 Živný agar (ŽA)

28 g/l Nutrient Agar, sterilizováno 15 min při 121°C v autoklávu, přídavek antibiotik po zchlazení na asi 40°C

4.1.3.5 SDS-PAGE

4.1.3.5.1 Elektrodový pufr

25 mM Tris.HCl; 192 mM glycin; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3

4.1.3.5.2 Pufr pro dělící gel

0,75 M Tris.HCl; 1% (w/v) SDS; pH 8,8

4.1.3.5.3 Pufr pro řadící gel

0,25 M Tris.HCl; 1% (w/v) SDS; pH 6,8

4.1.3.5.4 2x vzorkový pufr

30 mM Tris.HCl; 12,5% (v/v) glycerol; 1% (w/v) SDS; 0,005% (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8

4.1.3.6 10x PBS

79 g NaCl; 1,1 g KCl; 29 g Na₂HPO₄.12H₂O; 3,1 g KH₂PO₄; doplněno do 1 l destilovanou vodou

4.1.3.7 HIS-Select Spin Columns

4.1.3.7.1 Ekvilibrační pufr I

0,05M NaH₂PO₄; 0,3M NaCl; pH 8

4.1.3.7.2 Ekvilibrační pufr II

0,1 M NaH₂PO₄; 8 M močovina; pH 8; příprava před použitím

4.1.3.8 Ekvilibrační pufr na ionex

0,1x PBS

4.1.3.9 Hmotnostní spektrometrie

4.1.3.9.1 Štěpící pufr s trypsinem

0,01% (v/v) 2-merkaptethanol; 50 mM 4-ethylmorpholinium acetát; 1 mM CaCl₂; 10% (v/v) acetonitril; 0,02 g/l trypsin; pH 8,0; skladováno v -20°C

4.1.3.9.2 Odbarvováci roztok

10 mM DTT; 50 mM 4-ethylmorpholinium acetát; 50% (v/v) acetonitril; pH 8,1

4.1.3.10 Detekce proteinů v PAA gelu

4.1.3.10.1 Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB)

0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 40% (v/v) ethanol; 10% (v/v) octová kyselina

4.1.3.10.2 Odbarvovací roztok

40% (v/v) ethanol; 10% (v/v) octová kyselina

4.1.3.11 Histrap FF crude

4.1.3.11.1 Ekvilibrační pufr

0,5 M NaCl; 2 mM DTT; 1 mM imidazol; doplněno PBS; pH 8

4.1.3.11.2 Lyzační pufr

1M NaCl; 4 mM DTT; 2 mM imidazol; doplněno PBS; pH 8

4.1.3.11.3 Promývací pufr

0,5 M NaCl; 2 mM DTT; 60 mM imidazol; doplněno PBS; pH 8

4.1.3.11.4 Eluční pufr

0,5 M NaCl; 2 mM DTT; 600 mM-imidazol; doplněno PBS; pH 8

4.1.3.12 Tkáňové kultury

4.1.3.12.1 D-MEM

90% (v/v) D-MEM; 10% (v/v) FBS; 40 µg/ml gentamycin; 0,25 mg/ml glutamin; sterilní příprava, skladováno ve 4°C

4.1.3.12.2 RPMI 1640

90% (v/v) RPMI 1640; 10% (v/v) FBS; 40 µg/ml gentamycin; 0,25 mg/ml glutamin; sterilní příprava; skladováno ve 4°C

4.1.3.13 Western blotting

4.1.3.13.1 Transferový pufr

25 mM Tris.HCl; 192 mM glycin; 20% (v/v) methanol

4.1.3.13.2 Blokovací roztok na nitrocelulosové membrány

PBS; 10% (w/v) sušené mléko (1,3 % tuku); 0,05% (v/v) TWEEN 20; 0,01% NaN₃; skladováno ve 4°C

4.1.3.13.3 Ředící pufr na protilátky

PBS; 1% (w/v) sušené mléko (1,3 % tuku); 0,05% (v/v) TWEEN 20; mléko přidáno před použitím pufru

4.1.3.14 Tris/ EDTA/ NaCl/ NaN₃ pufr (TENN)

20 mM Tris.HCl; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM NaN₃; pH 7,4

4.1.4 Použité organismy

4.1.4.1 Kmeny *E. coli*:

BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen; dar Doc. RNDr. J. Tachezyho, Katedra parazitologie, Přf UK)

F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3) pLysS(cm^R)

(určený pro expresi proteinů z T7 promotoru, pro vysokou účinnost produkce má deletované některé proteasy)

TOP10 (Invitrogen)

F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1 λ⁻

(určený pro klonování, eliminace restriktas a některých endonukleas, vhodný pro příjem velkých plazmidů, pro modro-bílou selekci má deletovaný celý lac operon a pro α-komplementaci vnesený na φ80 částečně deletovaný lacZ)

4.1.4.2 Buněčné linie

(všechny ATCC; dar Prof.RNDr. V. Hořejšího, CSc., ÚMG AV ČR):

HeLa

lidská linie původem z adenokarcinomu děložního krčku, adherentní, epitheloidní morfologie

Ramos

lidská linie původem z Burkittova lymfomu, suspenzní, lymphoblastoidní morfologie

Jurkat

lidská linie původem z akutní T-lymfocytární leukemie, suspenzní, lymphoblastoidní morfologie

4.2 Metody

4.2.1 Izolace RNA

RNA byla izolována z buněčných linií Ramos, Jurkat a HeLa. Sklizené tkáňové kultury byly skladovány jako suché pelety v mikrozkumavkách v -80°C, dokud nebyly použity.

1. resuspendace pelet v lyzačním pufru v množství 1-2 ml na 1 peletu (aby viskozita lyzátu umožnila pipetování)
2. přidání směsi fenol/ chloroform (1:1) v množství stejném jako byl objem lyzačního pufru
3. protřepání lyzátu obracením mikrozkumavky
4. centrifugace 15 min, 21 500x g, 4°C (centrifuga Universal 32R)
5. opakování kroků 2-4 ještě 2x (případně až do vyčeření vodné fáze)
6. spojení vodných fází do jedné centrifugační zkumavky
7. přidání čistého ethanolu v množství 2,5 násobku objemu vodné fáze
8. pokud nedošlo k okamžitému vysrážení nukleových kyselin a solí, byla zkumavka inkubována 10 min v -20°C
9. centrifugace 15 min, 2 600x g, laboratorní teplota (centrifuga Universal 32R)
10. odstranění supernatantu
11. promytí pelety v 1 ml 70% (v/v) ethanolu
12. převedení roztoku do mikrozkumavky
13. centrifugace 10 min, 14 000x g, laboratorní teplota (stolní centrifuga Minispin Plus)
14. opakování kroků 11. a 13. ještě 2x
15. rozpuštění pelety ve 100 µl H₂O
16. okamžité přenesení do kapalného dusíku

4.2.2 Reverzní transkripce RNA

Reverzní transkripce mRNA byla provedena kitem RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas MBI) podle pokynů výrobce.

1. přidání 1 µl oligo dT18 primeru (koncentrace 0,5 µg/ µl) k 3,5 µg RNA v H₂O
2. doplnění reakční směsi H₂O do 12 µl
3. krátká centrifugace (stolní centrifuga Minispin Plus)
4. inkubace v termobloku 5 min, 70°C

5. přenesení směsi na led
6. přidání 4 µl 5x reakčního pufru, 1 µl inhibitoru ribonukleas (20 U/µl) a 2 µl dNTP (10 mM)
7. inkubace 5 min, 37°C
8. přidání 1 µl RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl)
9. reverzní transkripce 1 h, 42°C
10. zastavení reakce inkubací 10 min, 70°C
11. uchovávání produktu v -20°C

4.2.3 Amplifikace fragmentů genu AHNAK pomocí PCR

Fragmenty byly amplifikovány z cDNA z buněčných kultur specifickými primery. Teplota nasedání primerů byla o stupeň nižší než teplota tání primerů určená jako Nearest Neighbor ve webové aplikaci Oligonucleotide Properties Calculator [78]. Tabulka s názvy primerů a teplotami tání viz Tabulka 2-1.

Pro amplifikaci N-koncové domény (dále Ahnak-N) byla připravena tato reakční směs:

10x Long PCR Buffer with MgCl ₂ (15 mM)	5 µl
primer AhnakN_F_XhoI (25 µM)	2 µl
primer AhnakN_R_BamHI (25 µM)	2 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
cDNA Jurkat	1 µl
Long PCR Enzyme mix (5 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O bez nukleas	38,5 µl

a použit program na cykleru viz Tabulka 4-3.

Tabulka 4-3 Nastavení cykleru pro PCR Ahnak-N

Počet cyklů	program	
	teplota	trvání
1	94°C	1 min
3	94°C	20 s
	57°C	30 s
	70°C	3,5 min
7	94°C	20 s
	68°C	30 s
	70°C	3,5 min
20	94°C	20 s
	68°C	30 s
	70°C	4 min
1	70°C	10 min

Pro amplifikaci C-koncové domény (dále Ahnak-C) byla připravena tato reakční směs:

10x Long PCR Buffer with MgCl ₂ (15 mM)	5 µl
primer AhnakC_F_XhoI (25 µM)	2 µl
primer AhnakC_R_BamHI (25 µM)	2 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
cDNA Jurkat	1 µl
Long PCR Enzyme mix (5 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O bez nukleas	38,5 µl

a použít program na cykleru viz Tabulka 4-4.

Tabulka 4-4 Nastavení cykleru pro PCR Ahnak-C

počet cyklů	program	
	Teplota	trvání
1	94°C	1 min
3	94°C	20 s
	56°C	30 s
	70°C	4 min
7	94°C	20 s
	68°C	30 s
	70°C	4 min
20	94°C	20 s
	68°C	30 s
	70°C	5 min
1	70°C	10 min

Pro amplifikaci repetitivní domény (dále Ahnak-rep) byla připravena tato reakční směs:

10x Long PCR Buffer with MgCl ₂ (15 mM)	5 µl
primer AhnakREP_F_XhoI (25 µM)	2 µl
primer AhnakREP_R_BamHI (25 µM)	2 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
cDNA Jurkat	1 µl
Long PCR Enzyme mix (5 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O bez nukleas	38,5 µl

a použít program na cykleru Tabulka 4-5

Tabulka 4-5 Nastavení cykleru pro PCR Ahnak-rep

počet cyklů	program	
	teplota	trvání
1	94°C	1 min
3	94°C	20 s
	53°C	30 s
	70°C	4 min
7	94°C	20 s
	66°C	30 s
	70°C	4 min
20	94°C	20 s
	66°C	30 s
	70°C	5 min
1	70°C	10 min

Produkt PCR reakce byl uložen až do použití v -20°C.

4.2.4 PCR z kolonií

Narostlé kolonie byly kličkou sklizeny z plotny ŽA. Po vyčárkování na záložní plotnu ŽA byly zbylé bakterie na kličce resuspendovány v 38,5 µl H₂O v mikrozkumavce na PCR. Lyze byla provedena v cykleru programem viz Tabulka 4-6.

Tabulka 4-6 Nastavení cykleru pro lyzi *E. coli*

počet cyklů	program	
	teplota	trvání
1	96°C	5 min
1	55°C	5 min
1	96°C	4 min
1	50°C	4min
1	96°C	3 min
1	45°C	3 min
1	96°C	3 min
1	40°C	3 min

Směs byla krátce centrifugována a PCR reakce byla připravena a dále provedena podle postupu pro PCR konkrétního fragmentu uvedeného výše, v programu cykleru byla pozměněna teplota nasedání primerů bez přidaného restrikčního místa na teplotu nasedání primeru s restrikčním místem.

4.2.5 Extrakce DNA z agarosového gelu

Extrakce DNA z gelu byla provedena pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

1. vyříznutí DNA z gelu skalpelem a přenesení do předem zvážené mikrozkumavky
2. zjištění hmotnosti vyřízlého proužku gelu
3. přidání pufru QG v objemu 3 µl pufru na 1 mg hmotnosti proužku gelu
4. inkubace 10 min (případně do úplného rozpuštění gelu), 50°C s občasným krátkým protřepáním na vortexu
5. v případě velikosti DNA větší než 4 kbp přidání isopropanolu v objemu 1 µl na 1 mg hmotnosti proužku gelu
6. nanesení maximálně 800 µl roztoku na kolonku
7. centrifugace 1 min, 14 000x g, laboratorní teplota (stolní centrifuga Minispin Plus)
8. odstranění proteklého roztoku
9. pokud byl objem roztoku větší než 800 µl, opakování kroků 6-8 až do nanesení celého objemu
10. nanesení 750 µl pufru PE na kolonku
11. centrifugace 1 min, 14 000x g, laboratorní teplota (stolní centrifuga Minispin Plus)
12. odstranění proteklého roztoku
13. vysušení kolonky centrifugací 1 min, 14 000x g, laboratorní teplota (stolní centrifuga Minispin Plus)
14. výměna mikrozkumavky
15. nanesení 20-50 µl H₂O na kolonku
16. eluce DNA centrifugací 1 min, 11 000x g, laboratorní teplota (stolní centrifuga Minispin Plus)

4.2.6 TOPO TA klonování PCR produktů

Pro TOPO TA klonování se využívá terminální transferasové aktivity Taq polymerasy, která na konce PCR produktů přidává adenin, a transesterifikační aktivity topoisomerasy, kovalentně navázané na koncích linearizovaného vektoru, ke kovalentnímu vložení PCR produktu do pCR-XL-TOPO. 5 µl PCR produktu bylo zkontozováno analytickou elektroforézou v 1% (w/v) agarosovém gelu. Na preparativní elektroforézu byl nanesen zbytek PCR reakce. Byla provedena za stejných podmínek jako analytická a DNA o správné velikosti byla extrahována z gelu. Pro TOPO TA

klonování byl použit kit pCR[®]-XL-TOPO[®] (Invitrogen). 2 µl přečištěného amplifikátu byly smíchány s 0,5 µl vektoru pCR-XL-TOPO a inkubovány 5 min při 25°C v termobloku. Po přidání 0,5 µl 6x TOPO STOP a jemném zamíchání byla směs krátce centrifugována a uložena na led. Následovala chemická transformace chemokompetentních *E. coli* TOP10.

4.2.7 Transformace *E. coli*

4.2.7.1 Chemická transformace chemokompetentních *E. coli*

1. přidání 0,5 µg plazmidové DNA k 25 µl chemokompetentních *E. coli* na ledu
2. 30 min inkubace na ledu
3. 30 s teplotní šok 42°C
4. okamžité vložení do ledu na 2 min
5. přidání 200 µl SOC média o teplotě 37°C
6. 1 h třepání (1 400 rpm) mikrozkumavky s transformovanýma *E. coli* při 37°C v termobloku
7. vysetí suspenze v množství 50 a 150 µl na plotny s ŽA s příslušným antibiotikem
8. inkubace přes noc při 37°C

4.2.7.2 Transformace elektrokompetentních *E. coli* elektroporací

Na ledu bylo k 50 µl elektrokompetentních *E. coli* v elektroporační kyvetě přidáno maximálně 5 µl roztoku plazmidové DNA obsahujícího 0,5 pg – 0,5 µg DNA. Elektroporace byla provedená na elektroporátoru v režimu Time constant protocol. Použité parametry: šířka kyvety 2 mm, napětí 2,5 kV, časová konstanta 5 ms.

Ihned po skončení pulzu byl obsah kyvety resuspendován v 1,5 ml TPB s 0,5 % (w/v) glukosy a třepán (1 400 rpm, 1 h, 37°C) v termobloku. Suspenze byla vyseta v množství 50 a 300 µl na plotny s ŽA s příslušným antibiotikem a inkubována při 37°C přes noc.

4.2.7.3 Příprava elektrokompetentních *E. coli*

Kultura *E. coli* BL21 (DE3) pLysS byla zaočkována do 3 ml TPB média a inkubována při 30°C přes noc za třepání (230 rpm). Takto připravené inokulum bylo převedeno do 100 ml TPB média s 25 µg/ml chloramfenikolu a bylo inkubováno za třepání (230 rpm)

při 37°C do dosažení OD = 0,4-0,6 při vlnové délce 600 nm. Všechno dále používané nádobí a roztoky byly předchlazeny na ledu.

1. 30 min inkubace kultury na ledu
2. centrifugace 10 min, 3 000x g, 0°C (centrifuga 5804R)
3. resuspendace pelety v 10 ml sterilní deionizované H₂O
4. centrifugace 10 min, 3 000x g, 0°C (centrifuga 5804R)
5. resuspendace pelety v 10 ml sterilní deionizované H₂O
6. centrifugace 10 min, 3 000x g, 0°C (centrifuga 5804R)
7. resuspendace pelety v 10 ml sterilního 10% (v/v) glycerolu
8. centrifugace 10 min, 3 000x g, 0°C (centrifuga 5804R)
9. resuspendace pelety v 10 ml sterilního 10% (v/v) glycerolu
10. rozplnění vzniklé suspenze po 200 µl do sterilních mikrozkumavek
11. okamžité zmrazení v kapalném dusíku
12. přenesení aliquot do -80°C

4.2.8 Izolace plazmidů z *E. coli* (miniprep)

Plazmidy byly izolovány buď z tekuté kultury v TPB nebo z kultury narostlé na plotně ŽA. K izolaci byly využity kity NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nalgene).

1. resuspendace buněk v mikrozkumavce ve 250 µl pufu A1 za pomoci vortexu
2. lyze přídavkem 250 µl pufu A2
3. promíchání převracením mikrozkumavky
4. inkubace 5 min, laboratorní teplota
5. neutralizace lyzátu 300 µl pufu A3
6. promíchání převracením mikrozkumavky
7. centrifugace 10 min, 11 000x g, laboratorní teplota (stolní centrifuga Minispin Plus)
8. nanesení supernatantu na kolonku
9. centrifugace 1 min, 11 000x g, laboratorní teplota (stolní centrifuga Minispin Plus)
10. odstranění proteklého roztoku
11. nanesení 500 µl pufu AW ohřátého na 50°C na kolonku
12. centrifugace 1 min, 11 000x g, laboratorní teplota (stolní centrifuga Minispin Plus)

13. odstranění proteklého roztoku
14. nanesení 600 µl pufru A4 s ethanolem
15. centrifugace 1 min, 11 000x g, laboratorní teplota (stolní centrifuga Minispin Plus)
16. odstranění proteklého roztoku
17. vysušení kolonky centrifugací 2 min, 11 000x g, laboratorní teplota (stolní centrifuga Minispin Plus)
18. výměna mikrozkumavky
19. nanesení 50 µl H₂O
20. inkubace 1 min, laboratorní teplota
21. eluce DNA centrifugací 1 min, 11 000x g, laboratorní teplota (stolní centrifuga Minispin Plus)

4.2.9 Elektroforéza v 1% agarosovém gelu

Elektroforéza byla provedena v 1% (v/v) agarosovém gelu s 1 mg/ml ethidium bromidu v TBE při stálém napětí 18 V/cm délky gelu. Byl použit standard molekulových hmotností Gene Ruler DNA Ladder Mix. Gely byly prohlíženy na UV transluminátoru a snímány CCD kamerou Exwave HAD, úprava jasu a kontrastu byla v aplikaci DIPS (Digital Image Processing System for Windows 5.0, Druckmüller, Heriban).

4.2.10 Určení koncentrace DNA

Cirkulární DNA byla linearizována restrikcí a nanesena na 1% agarosový gel ve 3 ředěních spolu s 4 µl standardu Gene Ruler DNA Ladder Mix. Po rozdělení elektroforézou byla koncentrace odhadnuta na transluminátoru srovnáním intenzit fluorescence vzorku s intenzitou fluorescence markeru.

4.2.11 Restriktce

4.2.11.1 Preparativní dvojnásobná restrikce restriktašami BamHI a XhoI

Byla připravena restrikční směs o složení:

plazmidová DNA	2-7 µg
10x Y pufr	4 µl
XhoI (10 U/µl)	1 µl

BamHI (10 U/ μ l) 1 μ l
H₂O do celkového objemu 20 μ l
a inkubováno 1h při 37°C.

4.2.11.2 Preparativní restrikce restriktasou NdeI

Byla připravena restrikční směs o složení:

plazmidová DNA 2-7 μ g
10x O pufr 2 μ l
NdeI (10 U/ μ l) 1 μ l
H₂O do celkového objemu 20 μ l
a inkubováno 1h při 37°C.

4.2.11.3 Analytická restrikce

Byla připravena restrikční směs o složení:

plazmidová DNA asi 200 – 400 ng
10x pufr dle enzymu 1 μ l
Enzym 1 (10 U/ μ l) 0,2 μ l
Ev. enzym 2 (10 U/ μ l) 0,2 μ l
H₂O do celkového objemu 10 μ l
a inkubováno 1h při 37°C.

Směs byla analyzována elektroforézou v agarosovém gelu.

4.2.12 Ligace

Byla připravena ligační směs o složení:

10x pufr pro T4 ligasu 2 μ l
linearizovaný vektor asi 100 ng DNA
inzert asi 200 ng DNA
T4 DNA ligasa (5 Weiss U/ μ l) 1 μ l
H₂O do celkového objemu 20 μ l
a inkubována 2h při 22°C.

4.2.13 Sekvenace DNA

Sekvenace byla provedena pracovníky Sekvenační laboratoře Přf UK nebo Sekvenační laboratoře MBÚ AV ČR. Používané sekvenační primery pro jednotlivé vektory viz Tabulka 4-2.

4.2.14 Exprese rekombinantního proteinu

Vybraná kolonie byla zaočkována do 3 ml TPB média s ampicilinem (100 µg/ml) a inkubována při 30°C přes noc za třepání (230 rpm). Takto připravené inokulum bylo převedeno do 100 ml TPB média s příslušným antibiotikem a bylo inkubováno za třepání (230 rpm) při 37°C do dosažení OD = 0,6-0,8 při vlnové délce 600 nm. Poté byla teplota snížena na 30°C a exprese indukována přidáním IPTG (konečná koncentrace 1 mM). Po indukci byla kultura inkubována asi 5 h při 30°C a potom přes noc uložena ve 4°C. Suchá peleta po centrifugaci (15 min, 1 124x g, laboratorní teplota) byla buď okamžitě resuspendována v pufru požadovaném pro další aplikace nebo skladována v -80°C.

4.2.15 Lyze *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

E. coli BL21 (DE3) pLysS nesou plazmid pLysS, díky kterému je produkováno malé množství T7 lysozymu. To usnadňuje lyzi bakterií. Peleta po centrifugaci bakteriální kultury (15 min, 1124xg, laboratorní teplota) byla resuspendována v pufru podle dalšího použití lyzátu s inhibitory proteas. Cyklus zmrazení suspenze v kapalném dusíku a tání ve vodní lázni o teplotě asi 15°C byl proveden 3x. Suspenze byla na ledu 5-20 min sonikována na plný výkon.

4.2.16 SDS-PAGE

Exprese, rozpustnost a postup purifikace byly sledovány pomocí SDS-PAGE [79]. Elektroforéza byla provedena při stálém napětí 200 V za chlazení. Byly použity markery molekulových hmotností Precision Plus Protein prestained standards.

4.2.17 Western blotting

1. transfer proteinů z PAA gelu na nitrocelulosovou membránu semi-dry systémem s transferovým pufrém při proudové hustotě $0,8 \text{ mA/cm}^2$ po dobu 1,5 h
2. 1 h blokování membrány v blokovacím roztoku na nitrocelulosové membrány
3. opláchnutí membrány PBS s 0,05% (v/v) Tween20

4. 1 h inkubace při pokojové teplotě (nebo ve 4°C přes noc) s primární protilátkou 1000x naředěnou do ředícího pufru na protilátky
5. 3x 5minutové promytí v PBS s 0,05% (v/v) Tween20
6. inkubace v 10 000x naředěné sekundární protilátce GAM konjugované s HRP v ředícím pufru za stejných podmínek jako u primární protilátky
7. 5x 5minutové promytí v PBS s 0,05% (v/v) Tween20
8. nanesení substrátu pro ECL na membránu
9. detekce chemiluminiscence v místech aktivity HRP za použití modrého RTG filmu a přístroje na vyvolávání filmů

4.2.18 Detekce proteinů v PAA gelu CBB

Gely byly za mírného míchání 1 h barveny v CBB a potom odbarvovány v odbarvovacím roztoku až do dostatečné redukce pozadí.

4.2.19 Detekce proteinů v PAA gelu stříbrem

1. 30 minut fixování v roztoku 40% (v/v) ethanolu a 10% (v/v) kyseliny octové
2. 1 h promytí ve vodě MiliQ
3. 2 min senzitizace v 0,02% (w/v) roztoku thiosíranu sodného
4. 2x 1 min promytí MiliQ vodou
5. 30 min inkubace v 0,1 % (w/v) roztoku dusičnanu stříbrného
6. 2x 1 min promytí MiliQ vodou
7. vyvolání 2% (w/v) roztokem uhličitanu sodného s přídavkem 0,04% (w/v) formaldehydu
8. zastavení vyvolání po dosažení optimálního kontrastu přídavkem 5% (v/v) kyseliny octové

4.2.20 Afinitní chromatografie na Histrap FF crude (Amersham Biosciences)

Ve všech pufrech, ve kterých byl rekombinantní protein, byly inhibitory proteas E-64 (konečná koncentrace 10 µM), AEBSF (konečná koncentrace 1 mM) a pepstatin (konečná koncentrace 1 µM). Zmrazená suchá peleta ze 100 ml bakteriální kultury byla resuspendována ve 3 ml lyzačního pufru a lyzována. Lyzát byl centrifugován (15 min,

4500x g, 4°C). Supernatant byl až do nanesení na kolonku uchováván na ledu. Průtok kolonkou byl 1 ml/min, nanášení bylo prováděno injekční stříkačkou.

1. promytí kolonky 2,5 ml H₂O
2. ekvilibrace 2,5 ml ekvilibračního pufru
3. nanesení supernatantu z lyzátu
4. jímání 0,5 ml frakcí až do závěrečného vymytí
5. promytí kolonky 6 ml promývacího pufru
6. eluce rekombinantního proteinu 6 ml elučního pufru
7. čištění kolonky 5 ml 20% (v/v) ethanolu
8. uložení ve 4°C

Z každé frakce bylo odebráno 50 µl na SDS-PAGE, k nim bylo přidáno 50 µl 2x vzorkového pufru pro SDS-PAGE a poté 10 min vařeno. Frakce byly uloženy v -80°C.

4.2.21 Afinitní chromatografie na HIS-Select Spin Columns (Sigma)

Ve všech pufrech, ve kterých byl rekombinantní protein, byla směs inhibitorů proteas Protease Inhibitor Cocktail for use in purification of Histidine-tagged proteins. Pro purifikaci byla polovina pelety ze 100 ml kultury resuspendována v 3 ml ekvilibračního pufru s 20 µl směsi inhibitorů a lyzována. Lyzát byl centrifugován (15 min, 4 500x g, 4°C, centrifuga 5804R).

1. umístění kolonky do 2 ml mikrozkumavky
2. nanesení 600 µl ekvilibračního pufru s 1 µl směsi inhibitorů na kolonku
3. centrifugace 2 min, 600x g, laboratorní teplota (stolní centrifuga Minispin Plus)
4. odstranění proteklého roztoku
5. nanesení 300 µl supernatantu z lyzátu na kolonku
6. centrifugace 2 min, 600x g, 4°C (stolní centrifuga Minispin Plus)
7. uschování proteklého roztoku na ledu
8. přemístění kolonky do nové mikrozkumavky
9. první promytí 600 µl ekvilibračního pufru s 1 µl směsi inhibitorů
10. centrifugace 2 min, 600x g, 4°C (stolní centrifuga Minispin Plus)
11. uschování proteklého roztoku na ledu
12. přemístění kolonky do nové mikrozkumavky

13. druhé až čtvrté promytí opakováním kroků 9-12 s modifikovanými ekvilibračními pufry (viz Tabulka 4-7, Tabulka 4-8)

Tabulka 4-7 Použité pufry pro purifikaci za nativních podmínek

typ eluce pořadí	klesající pH	rostoucí iontová síla	rostoucí koncentrace imidazolu
1. promytí	ekvilibrační pufr I, pH 8,0		
2. promytí	pH 6,0	0,5 M NaCl	2 mM imidazol
3. promytí	pH 5,0	1,5 M NaCl	20 mM imidazol
4. promytí	pH 4,0	pH 4,0	250 mM imidazol

Tabulka 4-8 Použité pufry pro purifikaci za denaturujících podmínek:

typ eluce pořadí	klesající pH	rostoucí iontová síla	rostoucí koncentrace imidazolu
1. promytí	ekvilibrační pufr II, pH 8,0		
2. promytí	pH 6,0	0,5 M NaCl	2 mM imidazol
3. promytí	pH 5,0	1,5 M NaCl	20 mM imidazol
4. promytí	pH 4,0	pH 4,0	250 mM imidazol

Jednotlivé získané frakce byly vysráženy TCA (výsledná koncentrace 10% (v/v)), vysušeny na rotačním vakuovém koncentrátoru a resuspendovány ve 100 µl 2x vzorkového pufru pro SDS-PAGE + 100 µl 1,5 M Tris.HCl, pH 8,8; vařeny 10 min za třepání (850rpm) v termobloku a pak až do analýzy na SDS-PAGE uchovávány v -20°C.

4.2.22 Chromatografie na iontoměniči

Ve všech pufrech, ve kterých byl rekombinantní protein, byla směs inhibitorů proteas Protease Inhibitor Cocktail for use in purification of Histidine-tagged proteins. Vzhledem k bazickému pI obou rekombinantních proteinů (pI vypočítáno na základě aminokyselinové sekvence) byl pro provedení chromatografie zvolen CM-Sephadex C-50. Bohužel klasické kolonové uspořádání se vzhledem k nanášenému materiálu ukázalo jako nepraktické, proto byla zvolena vsádková metoda. 0,5 g CM-Sephadexu C-50 bylo resuspendováno v 50 ml ekvilibračního pufru a 2 h za stálého míchání vařeno. Objem byl ekvilibračním pufrem znova doplněn na 50 ml a přes noc míchán při laboratorní teplotě. Peleta ze 100 ml kultury byla resuspendována v 3 ml ekvilibračního pufru s 20 µl směsi inhibitorů proteas a lyzována. Lyzát byl centrifugován (30 min, 4 500x g, 4°C, centrifuga 5804R). Další manipulace se uskutečnily v chladové místnosti s předchlazenými roztoky.

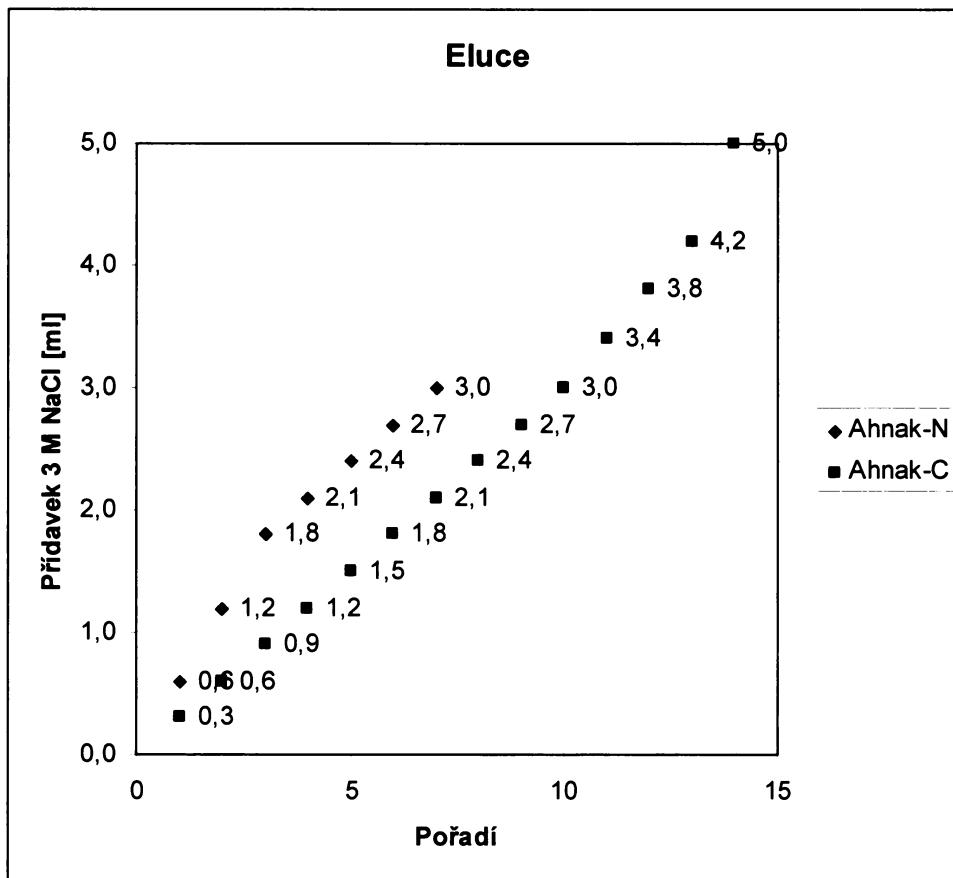
1. přidání supernatantu k připravené CM-Sepharose v kádince
2. 1,5 h míchání suspenze na magnetické míchačce
3. centrifugace 15 min, 16x g, 4°C (centrifuga Universal 32R)
4. uschování supernatantu v -20°C
5. resuspendování pelety v 15 ml ekvilibračního pufru s 20 µl inhibitorů
6. 1 h míchání suspenze na magnetické míchačce
7. centrifugace 15 min, 16x g, 4°C (centrifuga Universal 32R)
8. resuspendace v 15 ml ekvilibračního pufru s 20 µl inhibitorů
9. míchání přes noc
10. počet promývání elučním pufrem se zvyšující se iontovou silou se lišil pro oba rekombinantní proteiny; během eluce byly opakovány kroky 3-6

4.2.22.1 Eluce ionexové kolony s navázaným rekombinantním Ahnak-N

Jednotlivé eluční pufry byly připraveny tak, že k 3 ml 0,2x PBS s 6 µl směsi inhibitorů byl přidán 3 M NaCl v množství podle Obr. 4.3 a roztok byl doplněn do 6 ml vodou. Z každé frakce purifikace Ahnak-N byl do centrifugační zkumavky odebrán 1 ml, který byl přesrážen 8 ml acetonu vychlazeného na -20°C. Po centrifugaci (5 min, 670x g, laboratorní teplota, centrifuga Universal 32R) byly pelety nechány volně 3 h vyschnout při laboratorní teplotě. Pelety byly resuspendovány v 300 µl 1x vzorkového pufru pro SDS-PAGE, převedeny do mikrozkumavky a 10 min vařeny, následovala analýza na SDS-PAGE.

4.2.22.2 Eluce ionexové kolony s navázaným rekombinantním Ahnak-C

Jednotlivé eluční pufry byly připraveny tak, že k 5 ml 0,2x PBS s 10 µl směsi inhibitorů byl přidán 3 M NaCl v množství podle Obr. 4.3 a roztok byl doplněn vodou do 10 ml. Z každé frakce purifikace Ahnak-C bylo odebráno do mikrozkumavky 600 µl, které byly přesráženy 66 µl 100% TCA. Po centrifugaci (5 min, 20 000x g, laboratorní teplota, stolní centrifuga Minispin Plus) byly pelety vysušeny na rotačním vakuovém koncentrátoru a resuspendovány ve 100 µl 2x vzorkového pufru + 100 µl 1,5 M Tris.HCl, pH 8,8; 10 min za třepání (850 rpm) vařeny v termobloku a pak analyzovány na SDS-PAGE.



Obr. 4.3 Složení elučních roztoků pro ionex

4.2.23 Afinitní chromatografie na středotlaké koloně

Afinitní chromatografii na středotlaké koloně provedl Mgr. Petr Jedelský. Pro afinitní chromatografii byla použita sestava Bio-Rad Biologic Duoflow osazená vodivostním detektorem, čtyřkanálovým UV-Vis detektorem, pH elektrodou a sběračem frakcí. Pro separaci byla připravena kolona o vnitřním průměru 1 cm s náplní HIS-Select™ Nickel Affinity Gel o objemu náplně 2 ml. Pro chromatografii byly použity pufry doporučené výrobcem. Pro nativní podmínky byl použit 50 mM fosfátový pufr pH 8,0 s 0,3 M NaCl, pro eluci tentýž pufr doplněný na 250 mM imidazolu. Pro denaturující podmínky byl využit 100 mM fosfátový pufr pH 8,0 s 8 M močovinou, pro eluci 100 mM fosfátový pufr pH 4 s 8 M močovinou. Průtok kolonou byl nastaven na 1 ml/min. Při separaci byla kolona nejprve ekvilibrována průtokem 10 ml ekvilibračního pufra, následně byl na kolonu prostřednictvím automatického mnohocestného ventilu aplikován vzorek. Příprava vzorku probíhala tak, že peleta z 10 ml kultury byla resuspendována v ekvilibračním pufre s inhibitory a lyzována. Lyzát byl centrifugován (30 min, 4 500x g, 4°C). Po promytí kolony počátečním pufrem (5 ml) bylo zahájeno

směšování gradientu tak, aby bylo během 30-40 ml dosaženo 100% elučního pufru. Po dalších 5 ml 100% elučního pufru bylo přepnuto promytí základním pufrem a kolona byla připravena pro další použití. Mezi použitími byla kolona nejprve promyta vodou a následně uchovávána ve 30% ethanolu. Detekce byla zajištěna snímáním absorbance při 280 nm, v případě eluce za denaturujících podmínek byla používána i pH elektroda. Pro účely analýzy složení eluátu byl po počáteční optimalizaci strmosti a rozsahu gradientu používán automatický sběrač frakcí s nastavením objemu sbírané frakce 0,5 ml. Jednotlivé získané frakce byly vysráženy TCA (výsledná koncentrace 10% (v/v)), vysušeny na rotačním vakuovém koncentrátoru a resuspendovány ve 100 µl 2x vzorkového pufru pro SDS-PAGE + 100 µl 1,5M Tris.HCl, pH 8,8; 10 min za třepání (850rpm) vařeny v termobloku a pak až do analýzy na SDS-PAGE uchovávány v -20°C.

4.2.24 Příprava vzorku rekombinantního proteinu pro hmotnostní spektrometrii

Na SDS-PAGE bylo naneseno 50 µl vzorku z předchozích SDS-PAGE analýz z poslední frakce z purifikace na Histrap FF crude (Amersham Biosciences) na 12% PAA gel v případě Ahnak-N, na 10% PAA gel v případě Ahnak-C. Po ukončení elektroforézy byly proteiny v gelu obarveny CBB a proužek odpovídající rekombinantnímu proteinu byl skalpelem vyříznut a nakrájen na 1 mm kousky.

Postup odbarvování a štěpení v gelu

1. přidání 200 µl odbarvovacího roztoku k nakrájenému gelu
2. 5 min sonikace
3. odsání supernatantu
4. opakování kroků 1-3 až do úplného odbarvení gelu
5. přidání 100 µl H₂O
6. 5 min sonikace
7. odsání supernatantu
8. přidání 100 µl acetonitrilu
9. 5 min sonikace
10. odsání supernatantu
11. opakování kroků 5-10 ještě 2x
12. přidání 200 µl 50% (v/v) acetonitrilu

13. 5 min sonikace
14. odsání supernatantu
15. 10 min sušení gelu v rotačním vakuovém koncentrátoru
16. rehydratace gelu štěpícím pufrem s trypsinem
17. inkubace přes noc při 37 °C
18. přídavek acetonitrilu do výsledné koncentrace 30 % (v/v)
19. 20 min sonikace
20. supernatant byl použit k dalším analýzám

4.2.25 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Měření na přístroji BIFLEX II (Bruker-Franzen, SRN) provedl RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D. (MBÚ, AV ČR).

4.2.26 Tkáňové kultury

HeLa buňky byly pěstovány v D-MEM v CO₂ inkubátoru při 37°C s 5% CO₂ a pasážovány 2x týdně trypsinem s EDTA. Ramos a Jurkat byly pěstovány v RPMI 1640 v CO₂ inkubátoru při 37°C s 5% CO₂ a pasážovány odstraněním ¾ média 3-4x týdně.

4.2.27 Transfekce HeLa buněk konstrukty pEGFP

Fragment Ahnak-N v pEGFP-C3 a fragment Ahnak-C v pEGFP-C2 byly transfekovány do HeLa buněk. HeLa buňky byly nasazeny na šestijamkovou destičku do 2 ml D-MEM a nechány 2 dny růst do 80% konfluence. Transfekce byla provedena kationickým lipofekčním činidlem Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Postup přípravy lipofekčního činidla pro jednu jamku v šestijamkové destičce:

1. naředění 1-6 µg plazmidové DNA do objemu 250 µl bezsérového D-MEM
2. jemné promíchání
3. naředění 10 µl Lipofectamine 2000 ve 240 µl bezsérového D-MEM
4. jemné promíchání
5. inkubace 5 min, laboratorní teplota
6. smíchání naředěné DNA a naředěného Lipofectamine 2000
7. jemné promíchání
8. inkubace 20 min, laboratorní teplota
9. přidání roztoku k buňkám do média

Postup přípravy lipofekčního činidla pro jednu jamku ve dvacetíčtyřjamkové destičce: jednotlivé kroky jsou stejné, zmenšen je objem pro ředění na 50 µl bezsérového D-MEM, množství DNA na 0,1 -1 µg a množství Lipofectamine 2000 na 2 µl. Výměna média byla v obou případech provedena 8-12 h po transfekci.

4.2.28 Klonování transfektantů metodou mezního ředění

HeLa buňky byly převedeny do suspenze trypsinem s EDTA a spočítány pomocí Buerknerovy komůrky. Postupně byly naředěny v médiu na 50 buněk v 10 ml. Ty byly rozděleny po 100 µl do devadesátišestijamkové destičky s plochým dnem. Po 1 týdnu kultivace bylo vyměněno médium a byla přidána selekce 0,25 mg/ml geneticinu. Po dalších dvou týdnech kultivace byly destičky prohlédnuty inverzním fluorescenčním mikroskopem a od každého konstraktu byly vybrány 3 pozitivní kolonie, které byly pasážovány trypsinem s EDTA a přeneseny na šestijamkovou destičku do 1 ml média s 0,25 mg/ml geneticinu. Po dosažení dostatečného nárůstu kultury byl klon zamražen.

4.2.29 Zamrazování buněčných kultur

Buňky byly sklizeny do centrifugačních zkumavek a centrifugovány (8min, 170x g, 4°C). Pelety byly resuspendovány v médiu s 10% (v/v) DMSO a rychle rozpipetovány do zamrazovacích ampulí. Ampule byly ihned přeneseny do -20°C a po 20 minutách přemístěny do -80°C, po dalších 3 hodinách bylo možné vložit ampule do kontejneru s kapalným dusíkem.

4.2.30 Fixace preparátů pro imunofluorescenční mikroskopii

První dva kroky postupu byly provedeny na vyhřívací desce nastavené na 37°C s roztoky předehřátými na 37°C.

1. opláchnutí krycích skel s narostlou buněčnou kulturou PBS
2. 20 min inkubace v PBS s 4% (w/v) paraformaldehydu
3. 2x5 min promytí v PBS
4. 5 min neutralizace zbytků formaldehydu v 15 mM NH₄Cl
5. 2x5 min promytí v PBS
6. použití skel pro fluorescenční barvení nebo krátkodobé uchovávání ve 4°C v PBS s 0,01% (w/v) NaN₃

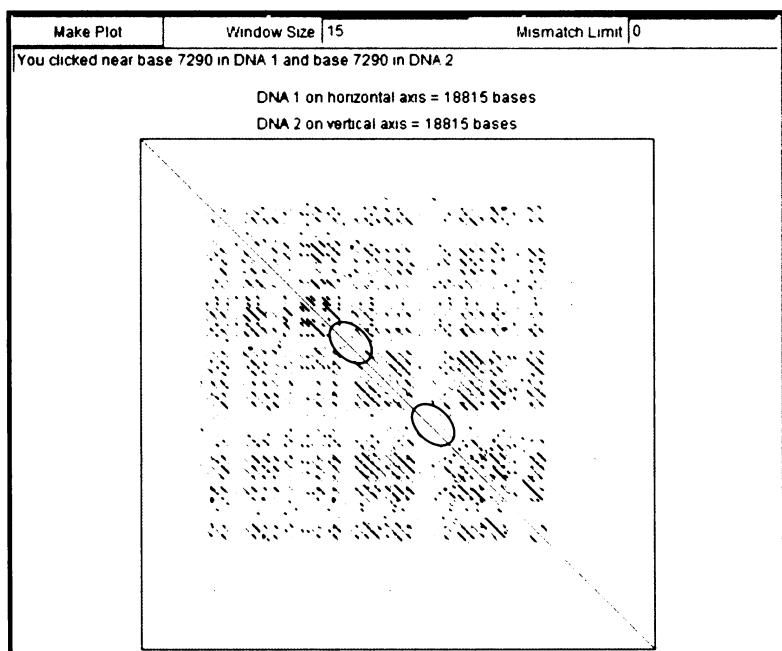
4.2.31 Barvení pro imunofluorescenční mikroskopii

1. 5 min permeabilizace v PBS s 0,05% (v/v) Tritonem X-100
2. opláchnutí PBS
3. 30 min blokování v PBS s 5% (w/v) BSA
4. 1h inkubování s primární protilátkou naředěnou do PBS s 1% (w/v) BSA
5. 3x promytí v PBS
6. 1 h inkubování v PBS s 1% (w/v) BSA a s 500x ředěnou sekundární protilátkou konjugovanou s AlexaFluor
7. 3x promytí v PBS
8. zamontování krycích skel do Mowiolu s DAPI na podložní sklo

5 Výsledky

5.1 Navržení primerů pro klonování fragmentů genu AHNAK

Aby byly pokryty všechny možnosti umístění lokalizačních signálů a interakčních motivů, byly vybrány sekvence ze dvou unikátních domén Ahnaku, tedy z C- a N-koncové domény, a část z repetitivního úseku ve střední části. Aby mohly být vybrané sekvence Ahnaku klonovány, byly navrženy primery pro jejich amplifikaci z cDNA. Primery pro N- a C-koncovou doménu (dále Ahnak-N a Ahnak-C) byly navrženy tak, aby byly tyto domény získány téměř celé. Pomocí webové aplikace Nucleic Acid Dot Plots¹ [80] byly nalezeny uvnitř repetitivní domény oblasti s relativně unikátní sekvencí, kam byly položeny specifické primery – viz Obr. 5.1. Pro navržení primerů byla použita sekvence mRNA zveřejněná v databázi GenBank [81] pod přístupovým číslem NM_001620 v květnu 2005. Primery doplněné o restrikční místa pro vkládání fragmentů do expresních vektorů byly navrženy pomocí programu PerlPrimer [82].



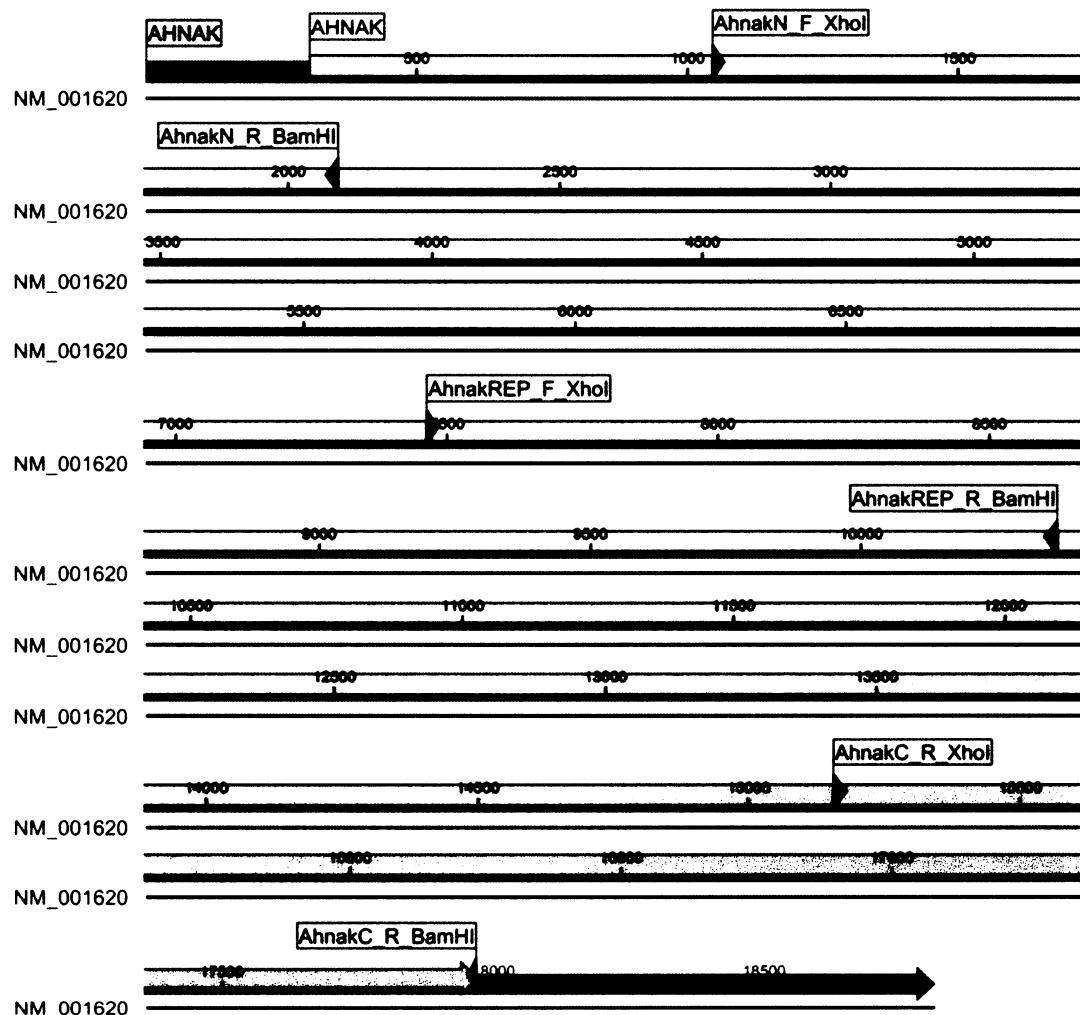
Obr. 5.1 Vnitřní podobnost mRNA AHNAKu (NM_001620).

Místa s vysokou hustotou bodů představují repetitivní sekvence.

Zakroužkované oblasti s unikátní sekvencí byly výchozí pro navržení primerů pro klonování repetitivní části.

¹ Dot plot se používá pro jednoduché porovnávání dvou sekvencí. Je to dvoudimenzionální matice, kde osy představují porovnávané sekvence. Okno pevné velikosti z jedné sekvence na jedné ose klouže po sekvenci na druhé ose a při identitě obou sekvencí je matice na tomto místě označena bodem. Proto se při porovnávání dvou stejných sekvencí objeví na diagonále nepřerušovaná linie bodů. Tento způsob porovnávání sekvencí je výhodný pro hledání přímých nebo invertovaných repetic apod.

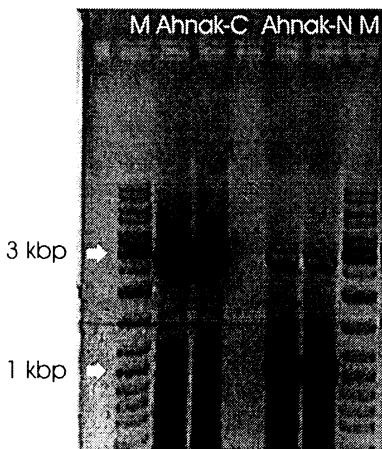
Sekvence vybrané pro klonování byly zkontrolovány pomocí webové aplikace NEBcutter V2.0 [83], aby neobsahovaly stejná restrikční místa, jako byla v primerech. Umístění primerů v sekvenci AHNAK je na Obr. 5.2, jejich sekvence viz Tabulka 2-1. Primery byly skladovány jako 25 µM vodný roztok v -20°C.



Obr. 5.2 Umístění vybraných fragmentů v sekvenci AHNAK. Modře sekvence mRNA, žlutě překládaná oblast, zelené trojúhelníky a popisky označují polohu a název primeru.

5.2 Výběr zdroje používaných cDNA

Pro přípravu cDNA byly z dostupných tkáňových kultur vybrány takové, které měly vysoký obsah mRNA AHNAKu. Výběr buněčných kultur pro přípravu cDNA se řídil v případě HeLa buněk prací [84], v případě Jurkat a Ramos databází Garvan U133AB, obsahující údaje o expresi 44 936 variant proteinů v lidských leukocytech, poskytnutou RNDr. Karlem Drbalem, Ph.D (ÚMG, AV ČR).



Obr. 5.3 Elektroforetogram produktů PCR.
Amplifikace cDNA Jurkat.

5.3 Klonování fragmentů genu AHNAK vektorem pCR-XL-TOPO

Při klonování byly nejdříve fragmenty amplifikovány specifickými primery z cDNA pomocí PCR. V případě Ahnak-rep se nepodařilo najít podmínky PCR, při kterých by vznikal specifický produkt. Ahnak-N a Ahnak-C se podařilo specificky amplifikovat ze všech typů cDNA (Obr. 5.3) a pro další amplifikaci byly tyto fragmenty klonovány pomocí pCR-XL-TOPO vektoru (mapa viz 4.1.2.2), kterým byly transformovány *E. coli* TOP 10. Aby byly nalezeny klony s vloženými fragmenty, byly připraveny miniprepы plazmidů z jednotlivých kolonií po transformaci. Ty byly kontrolovány analytickou restrikcí bud' BamHI a XhoI nebo EcoRI, které vyštěpují vložený fragment z plazmidu. Klony s vloženými fragmenty o správné velikosti byly částečně sekvenovány z primerů M13 (obklopují polylinker plazmidu a slouží k sekvenaci vložených fragmentů) (viz Tabulka 4-2). Pokud i sekvenace ukázala, že jsou v pořádku, byly fragmenty použity pro konstrukci expresních vektorů.

5.4 Vkládání fragmentů genu AHNAK (z pCR-XL-TOPO) do expresních vektorů

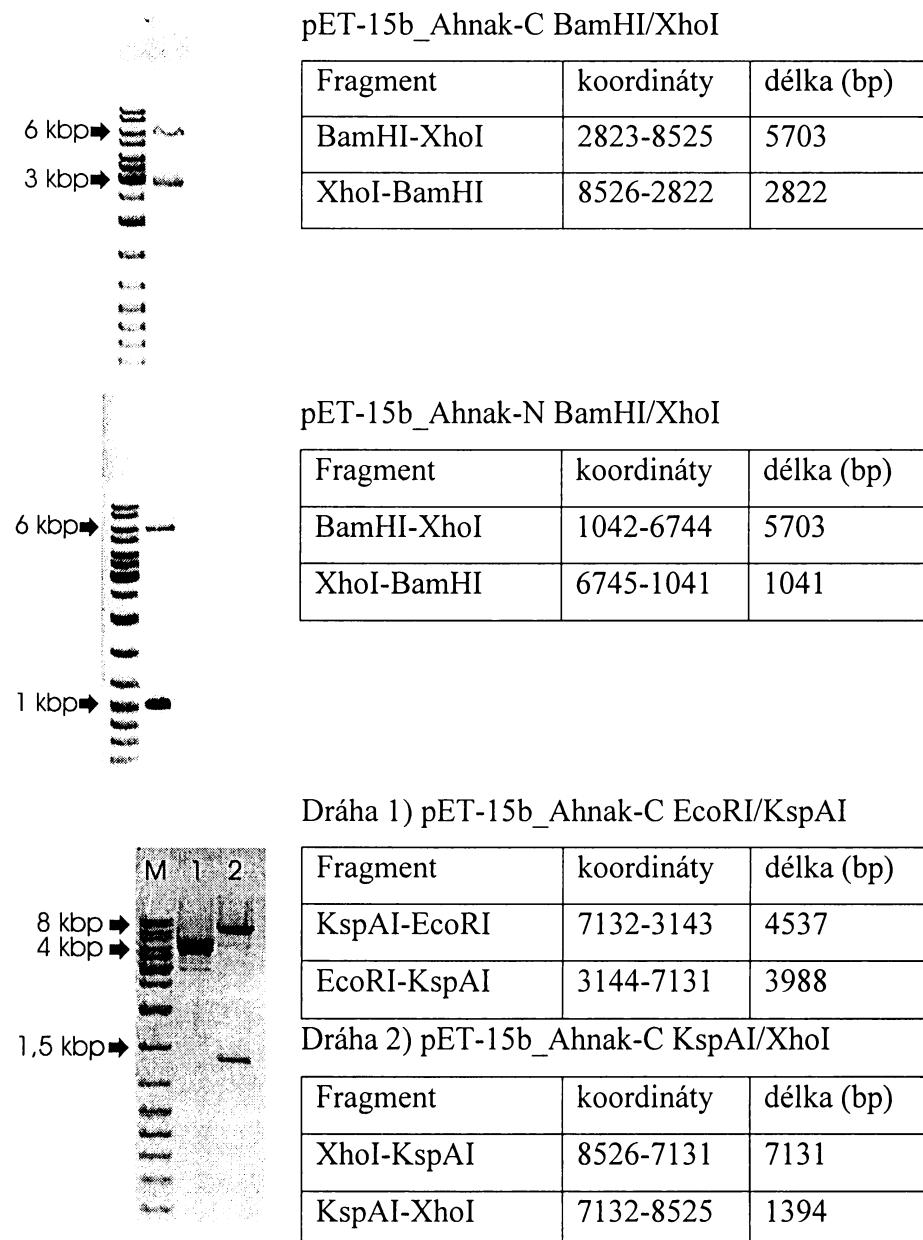
5.4.1 pET-15b

Pro získání dostatečného množství rekombinanrního proteinu pro imunizace, následný screening hybridomů a testování sér pacientů s autoimunitními chorobami bylo rozhodnuto využít expresního systému v *E. coli*. Pro usnadnění následné purifikaci byl vybrán expresní vektor pET-15b (mapa vektoru viz 4.1.2.2), který obsahuje v těsném

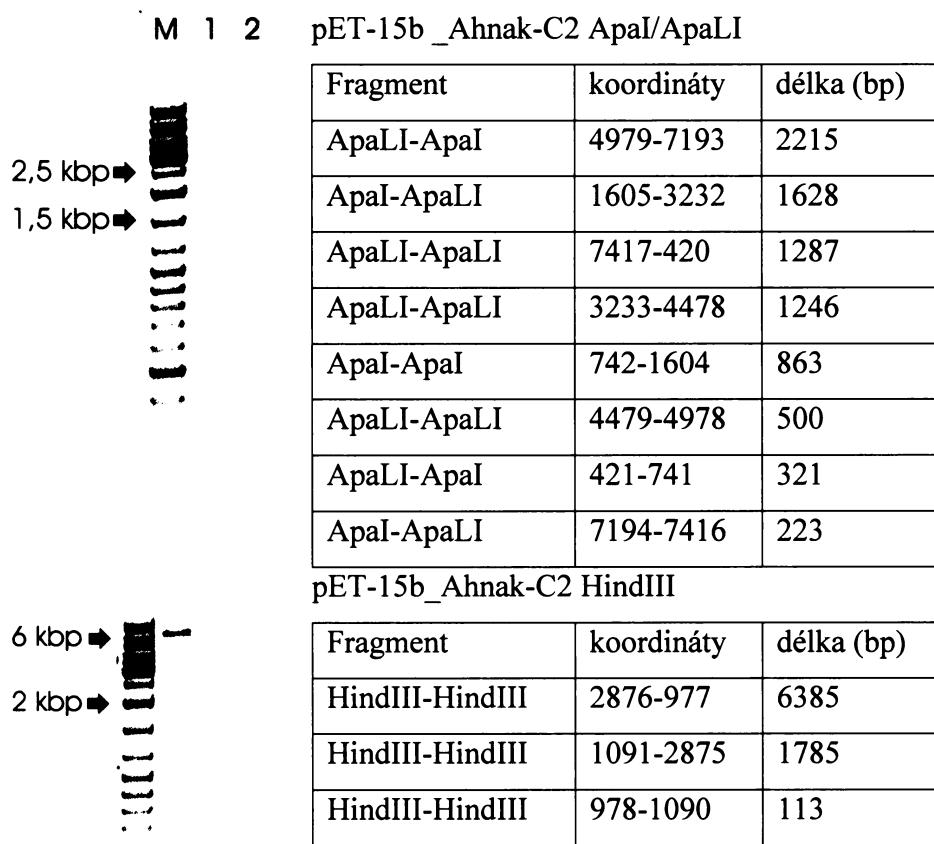
sousedství místa pro vkládání exprimovaného fragmentu krátkou sekvencí kódující šest histidinů a místo rozpoznávané proteasou thrombinem. Tato sekvence se exprimuje spolu s vloženým fragmentem v jednom polypeptidu, který tak na svém N-konci nese tzv. his-tag, odštěpitelný thrombinem. Pomocí his-tagu se protein zachytí při afinitní chromatografii na koloně s immobilizovanými nikelnatými ionty a může být eluován gradientem imidazolu. Další výhodou his-tagu je možnost detekce rekombinantního proteinu Western blottingem komerčními monoklonálními protilátkami proti his-tagu. Do pET-15b byly fragmenty vkládány přes restrikční místa rozeznávaná restriktašami BamHI a XhoI, která jsou v polylinkeru vektoru a která byla do vkládaných fragmentů vnesena PCR (specifickými primery s těmito místy). Preparativní restrikce byla provedena oběma restriktašemi najednou, pET-15b byl současně s restrikcí defosforylován CIAP (přidány 2 U do restrikční směsi), aby se během ligace zamezilo recirkularizaci bez vloženého fragmentu. Restrikční směsi byly rozděleny na preparativní agarosové elektroforéze a linearizovaný vektor pET-15b a fragment vyštěpený z pCR-XL-TOPO byly extrahovány z gelu. Fragment byl do linearizovaného expresního vektoru zaligován pomocí T4 DNA ligasy. Ligační směsi byly chemicky transformovány *E. coli* TOP10, aby se docílilo amplifikace konstruktu. Pro ověření vložení fragmentů byly z narostlých kolonií vybrány tři od každého konstruktu pro miniprep. Konstrukty pET-15b_Ahnak-N a pET-15b_Ahnak-C byly ověřeny analytickou restrikcí různými restriktašami (Obr. 5.4) a částečně sekvenovány pomocí T7-promotor primeru a T7-terminator primeru (viz Tabulka 4-2), které leží na okrajích exprimované sekvence.

Protože z konstruktu pET-15b_Ahnak-C se nezdařila exprese z transformovaných *E. coli* (DE3) BL21 pLysS, byl z klonů použitých pro expresi proveden miniprep plazmidů. Z nich byla pro ověření fragmentů provedena analytická restrikce. Protože plazmid měl vložený fragment, který byl podle restrikcí v pořádku, byl revidován celý postup konstrukce plazmidu od navržení primerů až po transformaci *E. coli* (DE3) BL21 pLysS. Chyba se ukázala v navržení primeru AhnakC_F_XhoI, díky kterému nebyl vkládaný fragment ve čtecím rámcu s his-tagem. Ve fragmentu však bylo ve čtecím rámcu restrikční místo NdeI, které se nacházelo i v polylinkeru pET-15b, čehož bylo využito pro opravu. Konstrukt pET-15b_Ahnak-C byl štěpen NdeI, restrikční směs byla rozdělena na preparativní agarosové elektroforéze a vektor byl extrahován z gelu. Linearizovaný vektor bez vyštěpené části byl recirkularizován T4 DNA ligasou.

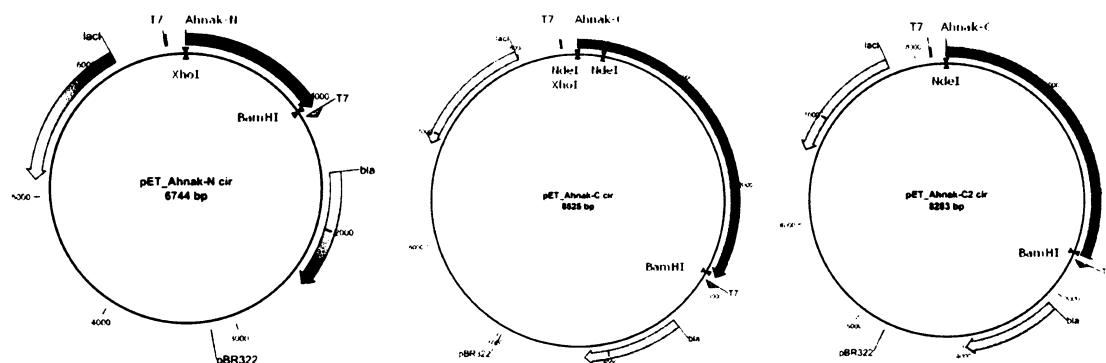
Restrikční ověřování konstruktu pET-15b_Ahnak-C2 je na Obr. 5.6, sekvenování bylo obdobné jako u původního konstruktu. Výsledné konstrukty pET-15b_Ahnak-C, pET-15b_Ahnak-C2 a pET-15b_Ahnak-N jsou znázorněny na Obr. 5.5.



Obr. 5.4 Restrikční ověření sekvence konstruktů s pET.



Obr. 5.6 Restrikční ověření sekvence konstruktu pET-15b_Ahnak-C2



Obr. 5.5 Schémata konstruktů.

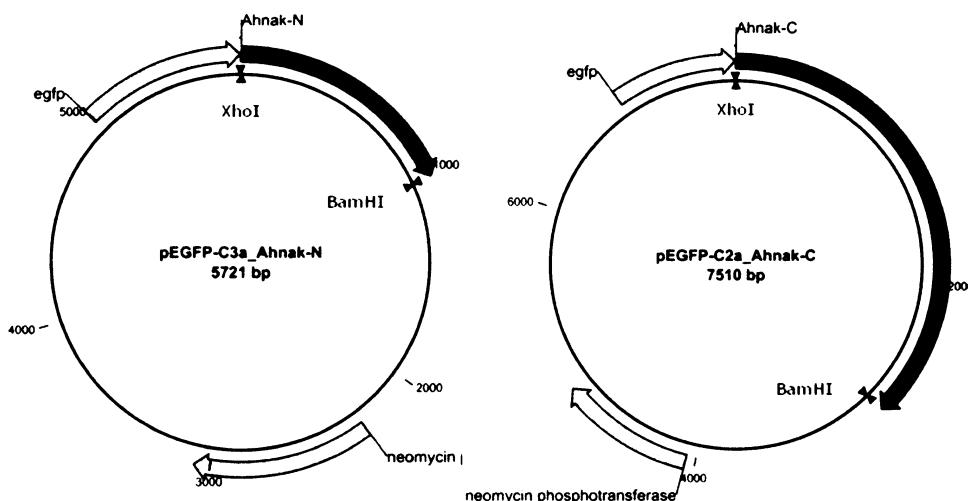
Zleva: pET-15b_Ahnak-N, pET-15b_Ahnak-C, pET-15b_Ahnak-C2

5.4.2 pEGFP-C

Vektor pEGFP-C (mapa viz 4.1.2.2) se používá pro expresi proteinů fúzovaných na N-konci s EGFP v eukaryotech. Fúzování s EGFP umožňuje sledování vnitrobuněčné lokalizace pomocí fluorescenčního mikroskopu přímo na živých buňkách, čímž jsou odstraněny artefakty vznikající fixací a použitím protilátek, ale na druhou stranu mohou vzniknout chybné lokalizace kvůli změně konformace fúzního proteinu.

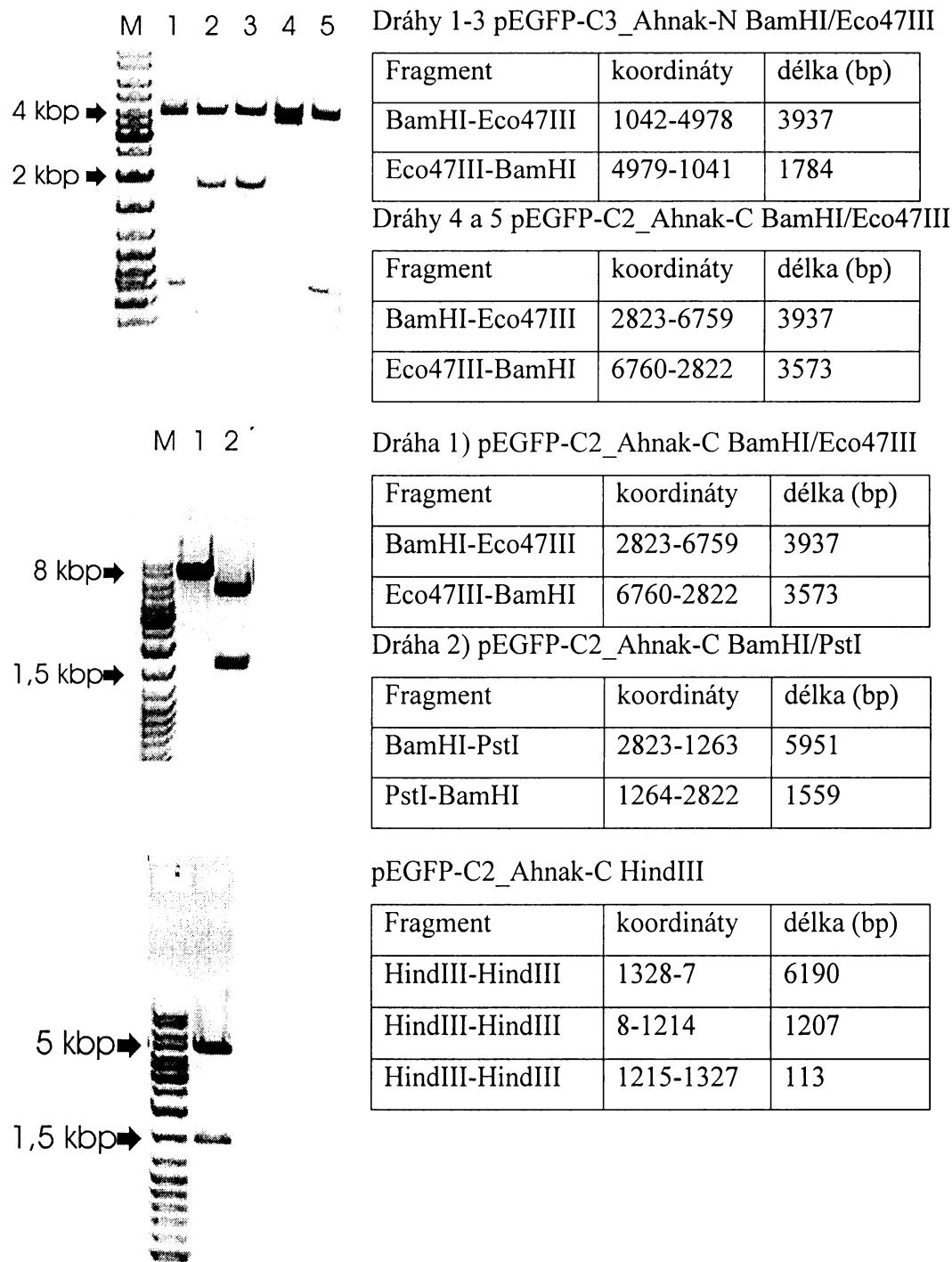
Pro dodržení čtecího rámce byl Ahnak-N vkládán do pEGFP-C3 a Ahnak-C do pEGFP-C2 přes restrikční místa XhoI a BamHI. Preparativní restrikce byla provedena oběma restriktašami najednou, pEGFP-C byl současně s restrikcí defosforylován CIAP (přidány 2 U do restrikční směsi), aby při ligaci nedocházelo k recirkularizaci bez vložení fragmentu. Restrikční směsi byly rozděleny na preparativní agarosové elektroforéze a linearizované vektory pEGFP-C a fragmenty vyštěpené z pCR-XL-TOPO byly extrahovány z gelu. Fragment byl do linearizovaného vektoru vkládán pomocí T4 DNA ligasy. Ligační směsi byly chemicky transformovány *E. coli* TOP10. Z narostlých kolonií byly vybrány tři od každého konstraktu pro miniprep. Amplifikovaný konstrukt byl ověřen restrikčně a částečně sekvenován pomocí námi navržených EGFP_F a EGFP_R2 sekvenačních primerů (viz Tabulka 4-2).

Výsledné konstrukty pEGFP-C3_Ahnak-N a pEGFP-C2_Ahnak-C jsou znázorněny na Obr. 5.7, postup restrikčních ověření je na Obr. 5.8.



Obr. 5.7 Schémata konstrukcí.

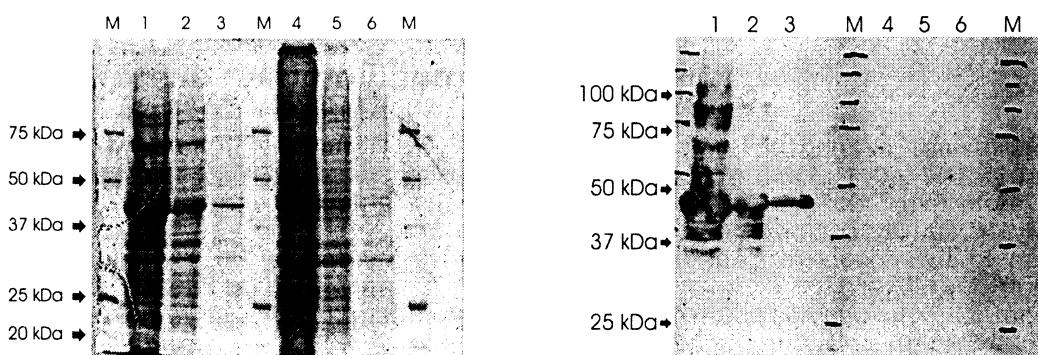
Zleva: pEGFP-C3_Ahnak-N, pEGFP-C2_Ahnak-C.



Obr. 5.8 Restrikční ověření sekvence konstruktů s pEGFP-C.

5.5 Expresce rekombinantních proteinů

Elektrokompetentní *E. coli* (DE3) BL21 pLysS byly elektroporací transformovány konstrukty pET-15b_Ahnak-C a pET-15b_Ahnak-N a vysety na plotny ŽA s ampicilinem (100 µg/ml). Z vybraných kolonií bylo provedeno PCR (současně s vyčárováním na ŽA s ampicilinem), protože bylo potřeba screenovat velké množství kolonií, což by bylo postupem přes miniprep plazmidu příliš náročné jak časově tak materiálně. U pozitivních klonů se z vyčárováných záloh provedl miniprep a restrikční ověření. Z kolonií, které byly takto testovány, byla vybrána jedna od každého konstruktu pro expresi. Suchá peleta z kultury po ukončení produkce byla



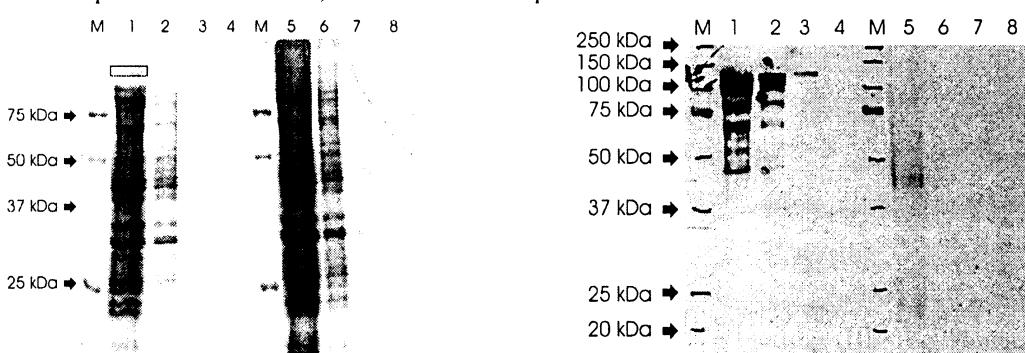
Obr. 5.10a Elektroforetogram z SDS-PAGE (CBB) a Western blotting (His•Tag Monoclonal Antibody).

Analýza produkce rekombinantních proteinů

Dráhy 1-3 desítkové ředění lyzátu z *E. coli* transformovaných pET-15b_Ahnak-N

Dráhy 4-6 desítkové ředění lyzátu z *E. coli* transformovaných pET-15b_Ahnak-C

Jasná exprese Ahnak-N v 1-3, nedetectovatelná exprese Ahnak-C v 4-6.



Obr. 5.10b Elektroforetogram z SDS-PAGE (CBB) a Western blotting (His•Tag Monoclonal Antibody).

Analýza produkce rekombinantních proteinů

Dráhy 1-4 desítkové ředění lyzátu z *E. coli* transformovaných pET-15b_Ahnak-C2

Dráhy 5-8 desítkové ředění lyzátu z *E. coli* transformovaných pET-15b_Ahnak-C

Expresce Ahnak-C v 1-4, lyzát v dráhách 5-8 použit jako negativní kontrola.

resuspendována v 3 ml TENN pufru. Po odebrání 1 ml na SDS-PAGE byla suspenze uložena v -80°C.

Vzorky byly analyzovány na SDS-PAGE a Western blottingem pomocí His•Tag Monoclonal Antibody. Ahnak-N byl produkován, Ahnak-C produkován nebyl (Obr. 5.10a). Exprese Ahnak-C byla ještě několikrát opakována za různých podmínek kultivace bakterií, ale ani jednou se nezdařila. Pro ověření, že bakterie byly transformovány, byl z použitých klonů připraven miniprep a po restrikci BamHI a XhoI bylo potvrzeno, že obsahují konstrukt pET-15b_Ahnak-C. Po důkladné revizi postupu konstruování pET-15b_Ahnak-C bylo zjištěno, že vložený fragment není ve čtecím rámci s his-tagem, a proto byl konstrukt upraven (viz 5.4.1). Exprese z konstruktu pET-15b_Ahnak-C2 proběhla bez problémů (Obr. 5.10b).

5.6 Rozpustnost rekombinantních proteinů

Vzhledem k tomu, že byla požadována produkce protilátek proti konformačním epitopům, aby byly použitelné v průtokové cytometrii a imunofluorescenci, byl kladen důraz na získání rekombinantních proteinů pro imunizaci v co nejnativnějším stavu. Proto bylo nutné zjistit, zda se rekombinantní proteiny produkují do inkluzních tělisek nebo zůstávají solubilní. Ze suspenze bakterií v TENN pufru byl odebrán 1 ml do mikrozkumavky a lyzován bez závěrečné sonikace. Lyzát byl centrifugován (20 000x g, 20 min, laboratorní teplota). Peleta byla resuspendována ve 200 µl 1x vzorkovém pufru pro SDS-PAGE. Supernatant byl srážen 8 ml acetonu (-20°C). Sraženina byla centrifugována (3 000x g, 10 min, laboratorní teplota) a po odpaření zbytků acetonu resuspendována ve 200 µl 1x SB pro SDS-PAGE. Peleta i supernatant byly 5 min vařeny při 99°C a potom krátce sonikovány na plný výkon pro snížení viskozity vzorku. Analýza na SDS-PAGE a Western blotting ukázaly, že Ahnak-N je solubilní, zatímco Ahnak-C je přibližně ekvimolárním dílem přítomný v inkluzních těliskách i v rozpustné formě.

5.7 Optimalizace purifikace rekombinantních proteinů

První purifikace byly provedeny za nativních podmínek, i když to znamenalo ztrátu části vyprodukovaného Ahnak-C, na niklové kolonce Histrap FF crude (Amersham Biosciences) s elucí vysokou koncentrací imidazolu. Z SDS-PAGE analýzy a Western blottingu vyplývá, že his-tag je patrně u obou rekombinantních proteinů částečně zanořen do nitra, protože oba se z kolonky uvolňovaly už při nízké koncentraci

imidazolu (Obr. 5.16; Obr. 5.13). Z frakcí eluce nejvíce obohacené rekombinantním proteinem byl připraven vzorek na MALDI-TOF analýzu provedenou RNDr. Miroslavem Šulcem, Ph.D. Výsledky:

AHNAK-N, pokrytí 51 %

MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MLEIKVGGSG	VNVNAKGLDL	GGRGGVQVPA	VDISSSLGGR
AVEVQGPSLE	SGDHGKIKFP	TMKVPKFGVS	TGREGQTPKA	GLRVSAPEVS	VGHKGKPGGL
TIQAPQLEVS	VPSANIEGLE	GKLKGPQITG	PSLEGDLGLK	GAKPQGHIGV	DASAPQIGGS
ITGPSVEVQA	PIDIVQGPGS	KLNVPKMKVP	KFSVSGAKGE	ETGIDVTLPT	GEVTVPGVSG
DVSLPEIATG	GLEGKMKGTK	VKTPEMIIQK	PKISMQDVLD	SLGSPKLKGD	IKVSAPGVQG
DVKGPQVALK	GSRVDIETPN	LEGTLTGPRL	GSPSGKTGTC	RISMSEVDLN	VAAPKVKGKV
DVTLPRTVEGS	GC				

AHNAK-C, pokrytí 48 %

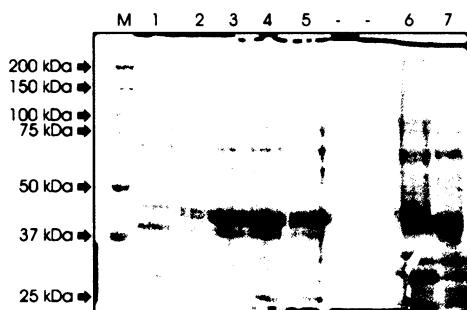
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MSGPKIKAKK	QGFDLNVPGG	EIDASLKAPD	VDVNIAGPDA
ALKVDVKSPK	TKKTMFGKMY	FPDVEFDIKS	PKFKAEAPLP	SPKLEGELQA	PDLELSLPAI
HVEGLDIKAK	APKVKMPDVD	ISVPKIEGDL	KGPKAQANLG	APDINIEGLD	AK████TPSFGI
SAPQVSIPDV	NVNLKGPKIK	GDVPSMGLEG	PDVDLQGPEA	KIKFPKFSMP	KIGIPGVKME
GGGAEVHAQL	PSLEGDLRGP	DVKLEGPDVS	LKGPGVDLPS	VNL SMPKVSG	PDLDLNLKGP
SLKGDLDA SV	PSMKVHAPGL	NLSGVGGKMQ	VGGDGVKVPG	IDATTKLNVG	APDVTLRGPS
LQGDLAVSGD	IKCPKVSVGA	PDLSLEASEG	SIKLPKMKLP	QFGISTPGSD	LHVNAKGPQV
SGELKGPGVD	VNLKGPRISA	PNVDFNLEGP	KVKGSLGATG	EIKGPTVGGG	LPGIGVQGLE
GNLQMPGIKS	SGCDVNLPGV	NVKLPTGQIS	GPEIKGGLKG	SEVGFHGAAP	DISVK████
████████████	IKGG	ADVSGGV SAP	DISLGEGLS	VKGSGGEWKG	PQVSSALNLD
TSKFAGGLHF	SGPKVEGGVK	GGQIGLQAPG	LSVSGPQGHL	ESGSGKVTFP	KMKIPKFTFS
GRELVGREMG	VDVHFPKAEA	SIQAGAGDGE	WEESEVKLKK	SKIKMPKFNF	SKPKGKGGVT
GSPEASISGS	KGDLKSSKAS	LGSLEGEAEA	EASSPKGKFS	LFKSKKPRHR	SNSFSDERE F
SGPSTPTGT L	EFE GGEGEV SLE	GGKVKGKHGK	LKF GTFGGLG	SKSKGH YEV T	GSDDET GKLQ
GSGVSLASKK	SRLSSSSS ND	SGNKVGIQLP	EVELSVSTKK	EDPAANKARK	EAELAAATAE Q

Žlutě jsou označeny peptidy identifikované ve hmotnostním spektru, tyrkysově jsou označeny isobarické peptidy. Díky tomuto ověření identity produkovaných rekombinantních proteinů bylo nadále pro jejich detekci nutné využívat Western blotting.

Další pokusy o hrubé stanovení podmínek purifikace byly provedeny na niklových kolonkách HIS-Select Spin Columns (Sigma), které umožňují provést najednou v krátké době několik purifikací v malém měřítku. Purifikace byly provedeny za nativních i

denaturujících podmínek. Pro oba fragmenty byly použity za nativních i denaturujících podmínek tři typy elucí: eluce zvyšující se koncentrací imidazolu, eluce klesajícím pH a eluce rostoucí iontovou silou (Tabulka 4-7 a Tabulka 4-8). Frakce byly analyzovány na SDS-PAGE a gely byly pro nízké množství proteinů, které je možné na kolonku nanést, barveny stříbrem. Výsledky všech zvolených typů purifikace nebyly dobré, část rekombinantního proteinu se začala uvolňovat už během promývání a všechny frakce obsahovaly silnou kontaminaci několika bakteriálními proteiny a mnoha minoritních kontaminantů. Z tohoto důvodu a z prostorových důvodů není ukázáno všech 12 gelů. Lepších výsledků bylo v případě obou rekombinantních proteinů dosaženo za denaturujících podmínek. Nejslibnějším typem eluce za denaturujících podmínek se ukázala eluce klesajícím pH, ale ani při ní nebyla získána frakce, ve které by byl rekombinantní protein v elektroforeticky homogenní čistotě (Obr. 5.18). Další úsilí směřovalo ke stanovení podmínek purifikace na středotlaké niklové koloně, na které byl zatím testován jen Ahnak-C. Ani na tomto systému se nepodařilo nalézt podmínky k oddělení rekombinantního proteinu ze směsi (Obr. 5.22a a Obr. 5.22b).

Pro další optimalizace bylo rozhodnuto použít tandemovou chromatografii, při které by

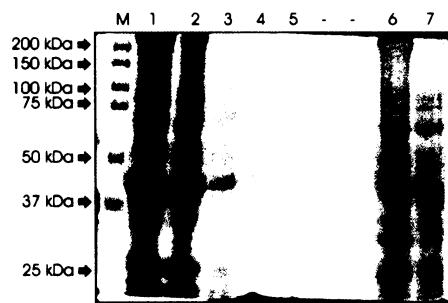


Obr. 5.13a Elektroforetogram průběhu nanášecího vrcholu Ahnak-N na koloně Histrap FF crude (CBB)

Dráhy 1-5 frakce z nanášky

Dráha 6 negativní kontrola

Dráha 7 pozitivní kontrola

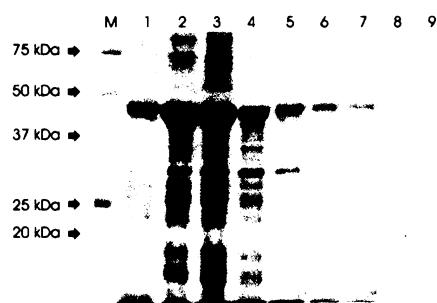


Obr. 5.13b Elektroforetogram průběhu promývání Ahnak-N na koloně Histrap FF crude (CBB)

Dráhy 1-5 frakce promývání

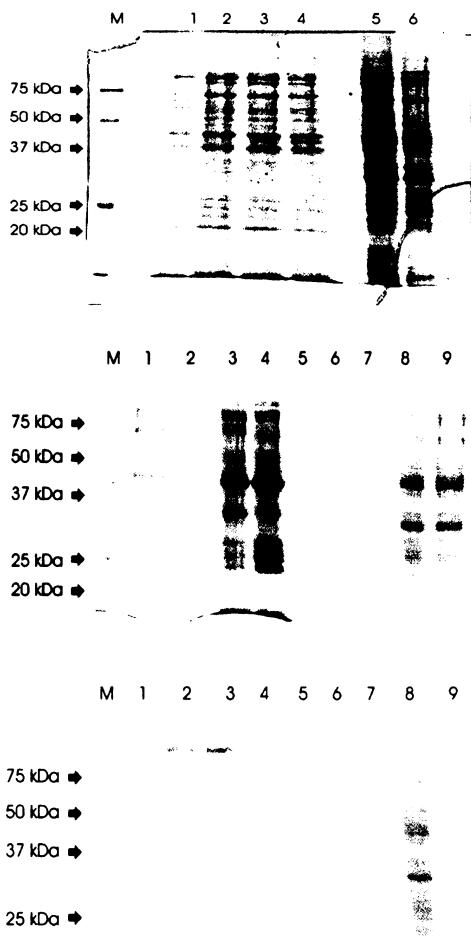
Dráha 6 negativní kontrola

Dráha 7 pozitivní kontrola



Obr. 5.13c Elektroforetogram průběhu eluce Ahnak-N na koloně Histrap FF crude (CBB)

Dráhy 1-9 frakce promývání



Obr. 5.16a Elektroforetogram průběhu nanášecího vrcholu Ahnak-C na koloně Histrap FF crude (CBB)

Dráhy 1-4 frakce z nanášky

Dráha 5 negativní kontrola

Dráha 6 pozitivní kontrola

Obr. 5.16b Elektroforetogram průběhu promívání Ahnak-C na koloně Histrap FF crude (CBB)

Dráhy 1-7 frakce promývání

Dráha 8 negativní kontrola

Dráha 9 pozitivní kontrola

Obr. 5.16c Elektroforetogram průběhu eluce Ahnak-C na koloně Histrap FF crude (CBB)

Dráhy 1-7 frakce promývání

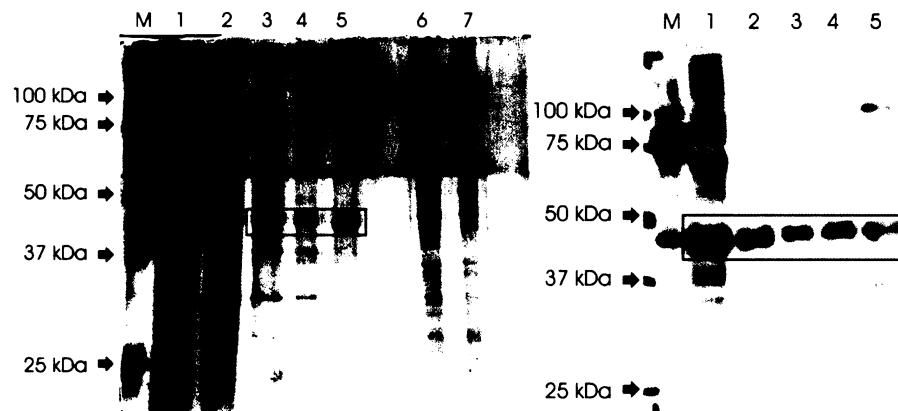
Dráha 8 negativní kontrola

Dráha 9 pozitivní kontrola

byl lyzát před nanesením na niklovou kolonu zjednodušen jinou chromatografií, čímž by mohlo dojít k odstranění některé z majoritních kontaminantů, a současně by došlo k nabohacení rekombinantního proteinu. Proto byla provedena chromatografie na ionexu CM-Sephadex C-50. Jednotlivé frakce byly analyzovány na SDS-PAGE a Western blottingem pomocí His-Tag Monoclonal Antibody. Tato samotná chromatografie nepostačuje k získání čistého rekombinantního proteinu (Obr. 5.20a a Obr. 5.20b). Frakce nejvíce obohacené o exprimovaný rekombinantní protein (Obr. 5.20a a Obr. 5.20b) budou použity pro purifikaci na niklové koloně.

Výsledkem všech těchto optimalizačních kroků je, že ačkoliv zatím nebyly nalezeny podmínky purifikace, nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití denaturačních podmínek a eluce snižujícím se pH. Ionexová chromatografie sama o sobě nestačí pro získání čistého rekombinantního proteinu, ale došlo k zakoncentrování rekombinantního proteinu do jedné frakce, což se dá využít při dalších optimalizacích. Určitě je dobré zvážit i možnost přechodu od his-tagovaného proteinu k proteinu fúzovanému s GST,

protože zde je afinita k substrátu navázanému na kolonu vyšší a specifičejší, než afinita his-tagu k immobilizovaným nikelnatým iontům.



Obr. 5.18a Elektroforetogram (stříbro) a Western blotting (His-Tag Monoclonal Antibody) analýzy afinitní chromatografie Ahnak-N na HIS-Select Spin Columns.

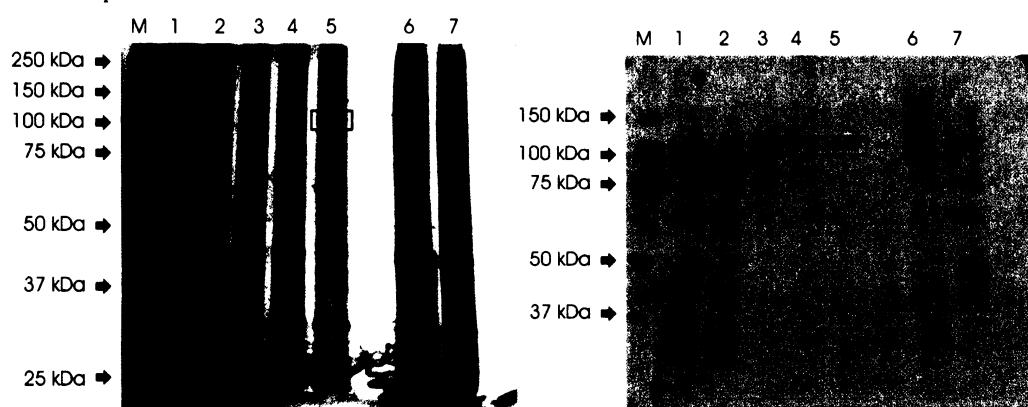
Dráha 1 lyzát s rekombinantním proteinem

Dráha 2-4 promytí pufry s klesajícím pH

Dráha 5 eluce pufrem o pH 4,0

Dráha 6 negativní kontrola

Dráha 7 pozitivní kontrola



Obr. 5.18b Elektroforetogram (stříbro) a Western blotting (His-Tag Monoclonal Antibody) analýzy afinitní chromatografie Ahnak-C na HIS-Select Spin Columns.

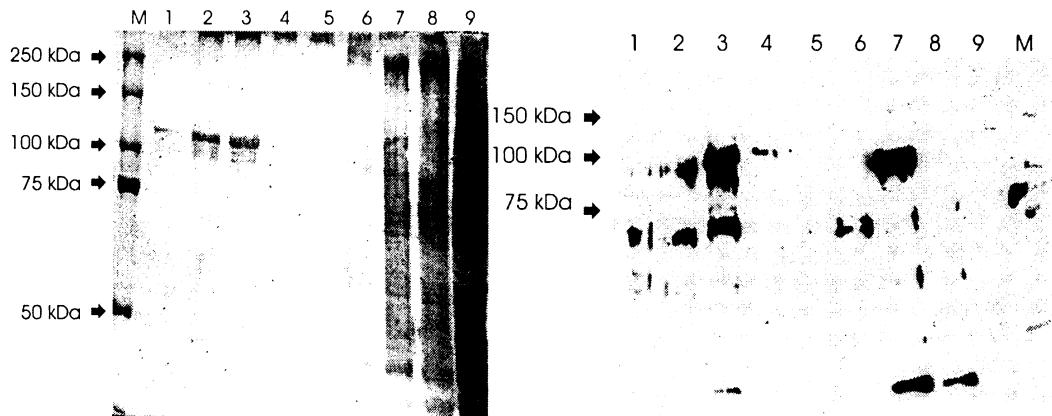
Dráha 1 lyzát s rekombinantním proteinem

Dráha 2-4 promytí pufry s klesajícím pH

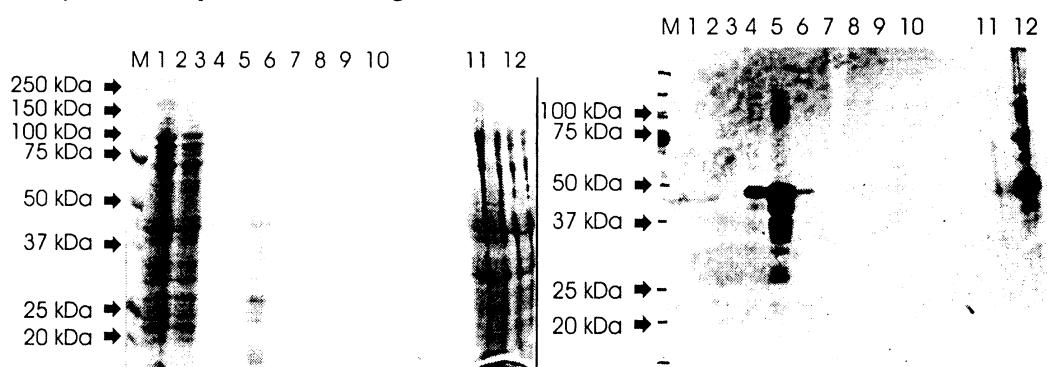
Dráha 5 eluce pufrem o pH 4,0

Dráha 6 negativní kontrola

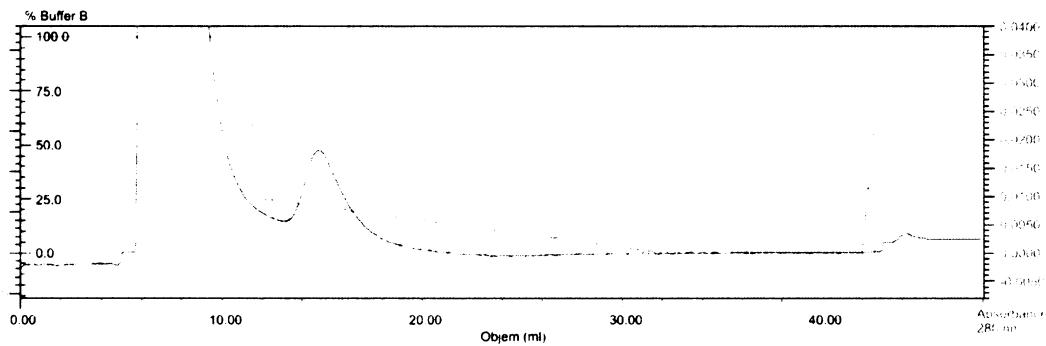
Dráha 7 pozitivní kontrola



Obr. 5.20a Elektroforetogram (stříbro) a Western blotting (His-Tag Monoclonal Antibody) analýzy ionexové chromatografie rekombinantního Ahnak-C
Dráhy 1-9 frakce průběhu chromatografie

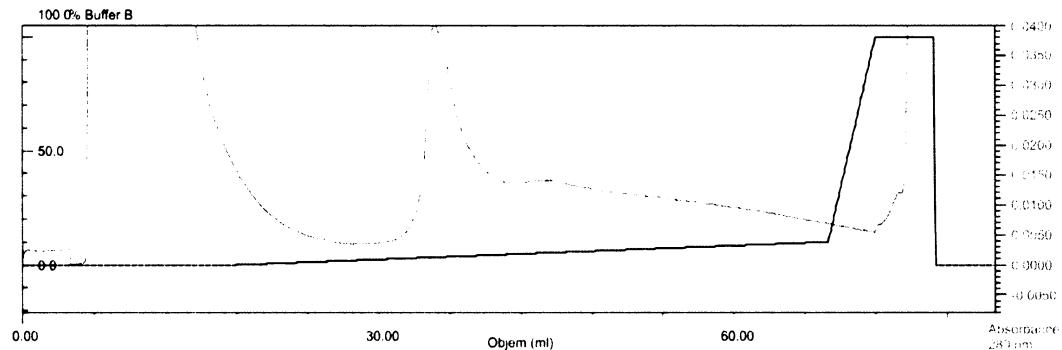


Obr. 5.20b Elektroforetogram (stříbro) a Western blotting (His-Tag Monoclonal Antibody) analýzy ionexové chromatografie rekombinantního Ahnak-N
Dráhy 1-10 frakce průběhu chromatografie
Dráha 11 negativní kontrola
Dráha 12 pozitivní kontrola



Obr. 5.22a Graf průběhu afinitní chromatografie Ahnak-C na středotlaké koloně za denaturujících podmínek.

šedě procenta ekvilibračního pufru ve směsi s elučním pufrem (stupnice vlevo uvnitř)
zeleně průběh absorbance při vlnové délce 280 nm (stupnice vpravo)
fialově průběh pH (stupnice vlevo vně)



Obr. 5.22b Graf průběhu afinitní chromatografie Ahnak-C na středotlaké koloně za nativních podmínek.

černě procenta elučního pufru ve směsi s ekvilibračním pufrem (stupnice vlevo uvnitř)
zeleně průběh absorbance při vlnové délce 280 nm (stupnice vpravo)

5.8 Vnitrobuněčná lokalizace fragmentů proteinu Ahnak fúzovaných s EGFP



Obr. 5.23 Živé HeLa buňky 2 dny po transfekci – vlevo pEGFP-C2_Ahnak-C, vpravo pEGFP-C3_Ahnak-N. Kombinace světlého pole a fluorescence EGFP, zvětšeno 200x.

Pro studium lokalizace fragmentů byly transfekovány HeLa buňky rostoucí v dvacetíčtyřjamkové destičce. Druhý den po transfekci byly buňky na destičce při stonásobném zvětšení vyfoceny na invertovaném mikroskopu Olympus IX-71. Viz Obr. 5.23. Třetí den po transfekci byly buňky pasážovány trypsinem a přeneseny do 60 mm Petriho misky s kulatými 8 mm krycími sklíčky a byla nasazena selekce 0,8 mg/ml geneticinu. Šestý den po transfekci byly buňky na sklech zafixovány 4% paraformaldehydem a vyfotografovány na invertovaném mikroskopu Olympus IX-81



Obr. 5.24 HeLa buňky fixované 6 dnů po transfekci. Zvětšeno 1000x.

CellR při tisícinásobném zvětšení (Obr. 5.24). Pokud je možné posoudit z menšího zvětšení, při kterém byly prohlíženy živé buňky na destičce, nedochází během fixace paraformaldehydem ke změně lokalizace signálu EFGP. Lokalizace Ahnak-C_EGFP je převážně jaderná, se slabým signálem v cytoplasmě. Protože jsou zřetelně vyznačeny hranice mezi pozitivními buňkami, je velmi pravděpodobné, že je asociován s cytoplasmatickou membránou. Je možné, že co se jeví při epifluorescenci jako slabý signál v cytoplasmě, je ve skutečnosti signál z cytoplasmatické membrány. Proto budou preparáty ještě analyzovány na konfokálním mikroskopu, který je schopen zobrazovat řezy bez rušivé fluorescence pod a nad ohniskovou rovinou. Lokalizace Ahnak-N_EGFP naopak v jádře chybí a je pouze cytoplasmatická, což dokazují negativní velké váčky na periferii (tentotéž je velmi dobře zachycen na fotografiích z kolokalizačního pokusu v kapitole 5.9) a chybějící vyznačení hranice mezi buňkami.

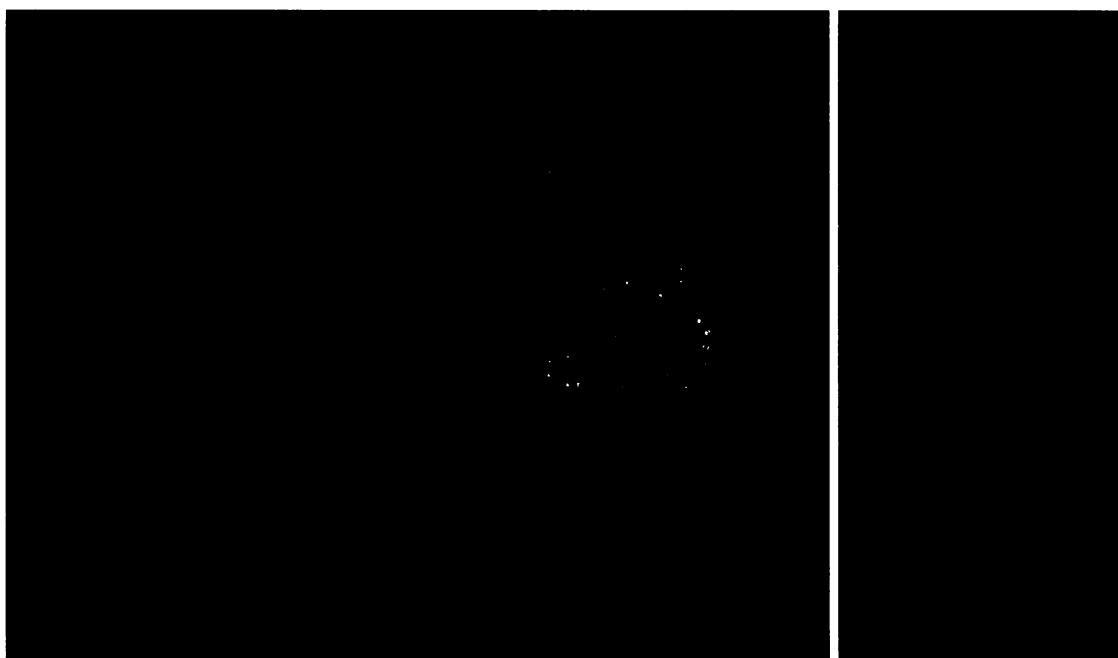
5.9 Kolokalizace Ahnak_EGFP s enlargeosomy

Pro srovnání buněčné lokalizace enlargeosomů a fragmentů proteinu Ahnak byl proveden kolokalizační pokus. Byly transfekovány HeLa buňky rostoucí na 8 mm kulatých krycích sklech. Dva dny po transfepci byly buňky zafixovány a barveny 200x ředěnou primární protilátkou popsanou v [44]. Použitá sekundární protilátku byla GAM konjugována s AlexaFluor 594. Byla provedena kontrola nespecifické reaktivnosti



Obr. 5.25 Kolokalizace Ahnak-N_EGFP a enlargeosomů. Vpravo složené RGB kanály. Vlevo shora: DAPI (jádra), EGFP (Ahnak-N), AlexaFluor 594 (enlargeosomy)

sekundární protilátky vynecháním kroku s primární protilátkou. Nespecifická reaktivita byla velmi slabá. Při tisícinásobném zvětšení na invertovaném mikroskopu Olympus IX-81 CellR lze vyloučit kolokalizaci obou fragmentů proteinu Ahnak s protilátkou [44] (Obr. 5.26, Obr. 5.25). Protože se lokalizace enlargeosomů mírně liší mezi jednotlivými buňkami, je objektivní posouzení vlivu exprese fragmentů proteinu Ahnak fúzovaných s EGFP na jejich lokalizaci těžší, ale zdá se, že nedochází ke změnám, které by se nedaly vysvětlit právě individuálními odlišnostmi mezi buňkami. Lokalizace Ahnak-C_EGFP a Ahnak-N_EGFP byla stejná jako v kapitole 5.8.



Obr. 5.26 Kolokalizace Ahnak-C_EGFP a enlargeosomů. Vpravo složené RGB kanály. Vlevo shora: DAPI (jádra), EGFP (Ahnak-N), AlexaFluor 594 (enlargeosomy)

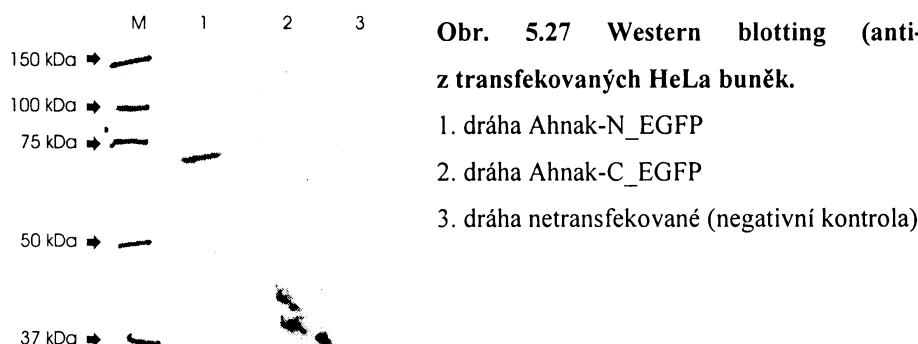
5.10 Vytvoření stabilně transfekované linie HeLa

Aby nedocházelo k problémům s interpretací výsledků z různých transfekcí (mění se míra exprese v závislosti na účinnosti transfekce), bylo rozhodnuto pro další pokusy vytvořit linii stabilně transfekovaných HeLa buněk. Transfektantům byla nasazena selekce 0,8 mg/ml geneticinu do doby, než byla zřetelná 100% mortalita netransfekované kontroly (což trvalo 10 dnů) a potom byla ponechána udržovací selekce 0,5 mg/ml geneticinu až do doby rozklonování metodou mezního ředění. Touto metodou se podařilo získat jeden viabilní klon produkovající Ahnak-N_EGFP detekovatelný na fluorescenčním mikroskopu v 90 % buněk a jeden viabilní klon

produkující Ahnak-C_EGFP detekovatelný na fluorescenčním mikroskopu v 50 % buněk (odhad byl proveden spočítáním buněk ve světlém poli a na fluorescenci při dvousetnásobném zvětšení na invertovaném mikroskopu Olympus IX-71). V průběhu dlouhodobější kultivace během klonování byl zaznamenán trend k postupnému snižování exprese obou fragmentů, u Ahnak-C_EGFP byl mnohem výraznější a nebyla nalezena kolonie, kde by se nevyskytovaly buňky s natolik nízkou expresí Ahnak-C_EGFP, že nebyla pozorovatelná fluorescenčním mikroskopem při dvousetnásobném zvětšení. Klony byly zmrazeny a do dalšího používání budou uchovávány v kapalném dusíku.

5.11 Ověření exprese fragmentů fúzovaných s EGFP Western blottingem

Protože se stává, že fúzní proteiny se rozpadají, bylo ověřeno Western blottingem, zda to není případ některého z fragmentů proteinu Ahnak. Byly transfekovány HeLa buňky rostoucí v šestijamkové destičce. V případě Ahnak-C_EGFP-C2 byla účinnost této transfekce velmi nízká, účinnost transfekce Ahnak-N_EGFP-C3 byla odhadem 20 %. Dva dny po transfekci bylo z buněk odebráno médium a po opláchnutí PBS byly buňky lyzovány přímo na destičce 1x vzorkovým pufrem na SDS-PAGE, aby se zabránilo možnosti proteolýzy během pasážování. Vzorky byly analyzovány Western blottingem za použití monoklonální primární protilátky Anti-GFP (Obr. 5.27). Lyzát z buněk transfekovaných pEGFP-C3_Ahnak-N má reaktivní jeden proužek, který svou velikostí odpovídá 62 kDa fúzního proteinu, a nebyly detekovány žádné degradační produkty ani po prodloužení doby expozice na desetinásobek. Na základě tohoto výsledku je možné usuzovat, že se fúzní protein v buňkách nerozpadá. Lyzát z buněk transfekovaných pEGFP-C2_Ahnak-C nevykazoval žádnou reaktivitu. Protože transfekce měla velmi nízkou účinnost, je pravděpodobně množství fúzního proteinu pod mezí detekce



Western blottingem a proto nelze na stav fúzniho proteinu v buňce podle tohoto výsledku usuzovat. Lyzát netransfekovaných buněk je uveden v Obr. 5.27 jako negativní kontrola.

6 Diskuse

Problematika enlargeosomů je potenciálně velmi zajímavá, zejména s ohledem na možnou funkci při buněčném dělení [87]. Detailní poznání mechanismů zvětšování cytoplasmatické membrány a možností inhibice těchto procesů je slibným směrem vývoje nových terapeutických postupů u proliferativních poruch. Poznání funkce enlargeosomů je však zatím v počátcích, přičemž jejich studium je komplikováno faktorem, že je dosud znám pouze jeden, a to ještě diskutabilní (viz dále) marker protein Ahnak. Pro další studium navíc nejsou dostupné kvalitní monoklonální protilátky, umožňující jednoznačnou korelací mikroskopických a biochemických dat [54, 58].

Cílem této práce byla příprava modelu pro studium enlargeosomů *in vitro* prostřednictvím buněčných linií produkujících fragmenty markerové molekuly enlargeosomů Ahnak kovalentně spojené se zeleným fluorescenčním proteinem. Dále bylo cílem připravit expresí v bakteriálním systému rekombinantní fragmenty proteinu Ahnak pro následnou imunizaci a produkci monoklonálních protilátek a také pro screening sér pacientů s autoimunitními onemocněními na přítomnost autoprotilátek proti Ahnaku.

Vzhledem ke značné velikosti Ahnaku (cca 700kDa) byly pro expresi fúzního proteinu s EGFP i pro expresi v bakteriálním systému vybrány pouze fragmenty.

Důvodem pro klonování části repetitivní oblasti je potenciální funkce repetitive jako kostry pro interakci Ahnaku s jinými proteiny, případně pro jeho lokalizaci na cytoplasmatickou membránu [66, 67]. S touto oblastí navíc s největší pravděpodobností interaguje jediná monoklonální protilátka použitelná pro vizualizaci enlargeosomů [44]. Rekombinantní protein z repetitivní oblasti zřejmě nebude vhodný pro produkci monoklonálních protilátek jednoznačně zaměřených proti Ahnaku z důvodu velké pravděpodobnosti zkřížené reaktivity s jinými proteiny s podobnou skladbou repetitive [58]. Vhodné je naopak použití tohoto fragmentu pro testování sér pacientů s autoimunitními onemocněními, vzhledem k jeho potenciální antigenicitě dané značnou repetitivností (více než 30x) obecně se vyskytujících u autoantigenů [85]. Autoprotilátky proti Ahnaku byly identifikovány u pacientů se systémovým lupus erythematoses (SLE) [77]. Ačkoliv u pacientů se SLE není výskyt autoprotilátek proti Ahnaku využitelný pro diagnostiku [77], není vyloučeno, že u jiného autoimunitního onemocnění by mohl sloužit pro předpověď vývoje onemocnění. Byly již připraveny sady reprezentativních sér kontrolních i od pacientů s různými autoimunitními

onemocněními, která budou testována na přítomnost autoprotilátek proti repetitivní části Ahnaku. Lokalizace čtyř repetic fúzovaných s EGFP není váčková [67], proto neplánujeme konstrukci fragmentu obsahujícího repetitive fúzované s EGFP.

N-koncová doména nemá žádný dokumentovaný vliv na lokalizaci Ahnaku v buňce, proto naděje vkládané do fúzního proteinu s EGFP jako markeru enlargeosomů nebyly příliš velké. Rekombinantní protein bude použit k imunizacím myší za účelem přípravy specifické monoklonální protilátky. Rovněž bude využit pro testování sér pacientů s autoimunitními onemocněními, primárně se SLE. Pokud se u nich vyskytnou kromě autoprotilátek proti repetitive také autoprotilátky proti unikátním doménám Ahnaku, budou testována séra pacientů i s dalšími autoimunitními onemocněními.

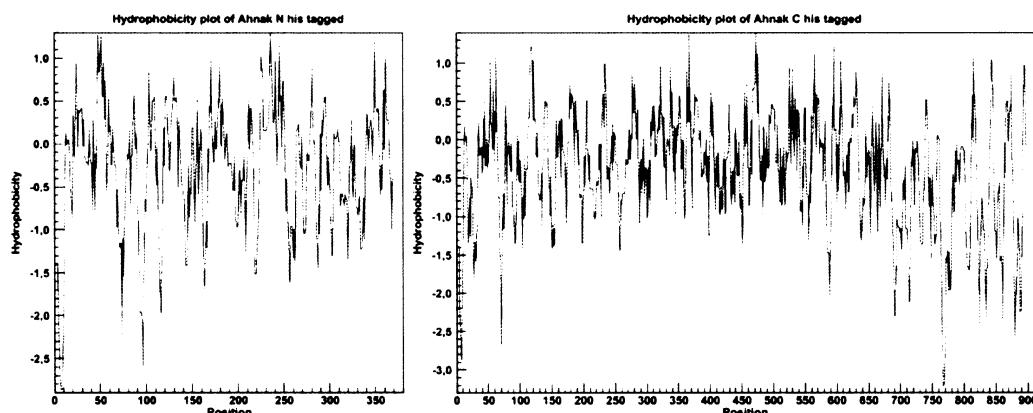
Do C-koncové domény byly vkládány největší naděje pro přípravu modelu pro studium enlargeosomů v živých buňkách, protože jsou v ní obsaženy lokalizační signály a tato doména se účastní většiny popsaných interakcí s jinými proteiny [56, 60, 61, 63-65, 68-70]. Rekombinantní protein by byl stejně jako u N-koncové domény použit pro imunizaci a testování autoprotilátek.

Při vlastním klonování vybraných oblastí byla úspěšná jen snaha u N-koncové a C-koncové domény. V případě repetitivní střední části se PCR nezdařila. Primery byly pečlivě vybrány tak, aby byly specifické, unikátní a nezasahovaly do repetitive (Obr. 5.1), nelze však vyloučit komplikace při transkripci repetitivní oblasti bakteriální polymerasou, která na repetitivním templátu může předčasně terminovat polymeraci. Pro budoucí práci probíhají jednání k získání klonu z80, který byl využíván v původní práci Shtivelmanové [45] a byl použit i pro studium reakcí autoprotilátek [77] a pro identifikaci protilátky specificky značící enlargeosomy [44].

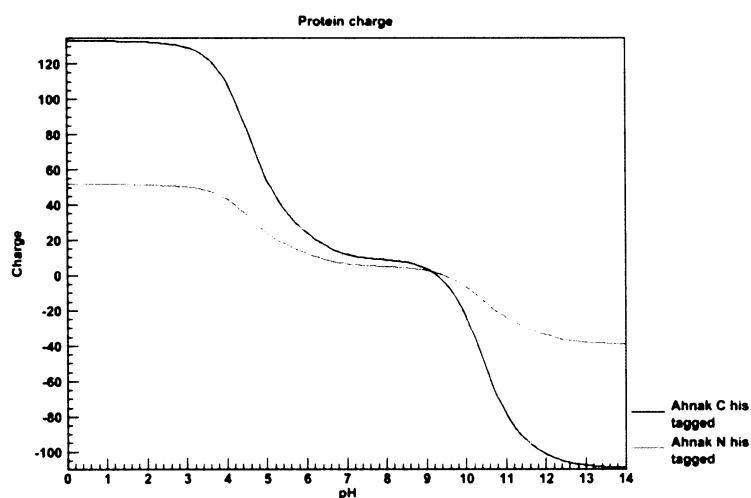
Pro expresi rekombinantních proteinů byl zvolen bakteriální systém a fúze požadovaného proteinu s úsekem šesti histidinů umožňujícím afinitní purifikaci a následně specificky odštěpitelný proteasou. Vektor pET-15b byl zvolen proto, že stejným postupem byl získán v jiné laboratoři dobře purifikovatelný produkt, který byl následně použit pro úspěšnou imunizaci [86]. Po nalezení optimálních podmínek pro produkci byla prováděna purifikace rekombinantních proteinů. I přes uplatnění veškerých doporučovaných postupů pro afinitní purifikaci se nepodařilo získat rekombinantní protein v dostatečném množství a čistotě pro další aplikace. Z výsledků purifikací se dá soudit na problém s přístupností či konformací afinitní značky, protože protein se uvolňoval už při použití mírných podmínek, které se běžně používají pro

odmytí nečistot z kolony. Poněkud zarážející je nepřítomnost peptidu s his-tagem na MS analýze, zejména proto, že histidin je dobře ionizovatelný za podmínek MALDI-TOF, a měl by zajišťovat přítomnost peptidu s his-tagem ve spektru. Možnost chybné primární sekvence oblasti his-tagu je však vyloučena na základě sekvenace DNA, kde je his-tag přítomen ve správné podobě. Možnost proteolytického odštěpení his-tagu v bakteriích vyloučí data z Western blottingu s His•Tag® Monoclonal Antibody a velikost rekombinantních proteinů odpovídající předpokládané velikosti.

Při afinitní purifikaci může mít negativní vliv nevhodná konformace proteinu znemožňující dostatečný kontakt his-tagu s afinitním nosičem. Příčinou může být okolní sekvence bezprostředně navazující na his-tag, jež má hydrofobní charakter a proto se dá předpokládat, že bude sbalená uvnitř proteinu (Obr. 6.1). K navázání rekombinantního proteinu však docházelo téměř kvantitativně, protože nebyl přítomen v roztoku prošlem kolonou po nanesení lyzátu.



Obr. 6.1 Grafy hydrofobicity rekombinantních proteinů. Výnos Kyte-Doolittle má hydrofobní oblasti nad osou x.



Obr. 6.2 Graf závislosti náboje rekombinantních proteinů na pH roztoku.

Další postup pro přípravu rekombinatních fragmentů proteinu Ahnak bude využívat jiný vektor umožňující afinitní purifikaci. Jako vhodný se jeví expresní systém založený na glutathion-S-transferase (GST). Tento postup slibuje snížení rizika chybné konformace afinitní značky, která by se proto špatně vázala na imobilizovaný ligand.

V návaznosti na neúspěšnou afinitní purifikaci byla testována ionexová chromatografie. Vzhledem k isoelektrickému bodu obou konstruktů okolo pH 9 nebylo možno použít anex. Pro purifikaci na kátxu CM-Sephadex bylo zvoleno neutrální pH, aby byly zajištěny podmínky pro izolaci nativních proteinů optimálních pro imunizaci. Při neutrálním pH je náboj obou rekombinantních proteinů zřejmě nedostatečný pro účinnou purifikaci, proto v případě rezignace na nativní konformaci proteinu by pomohlo snížení pH na 5 (Obr. 6.2). Nejschůdnější cestou se však jeví přechod na jiný expresní systém.

V případě N-koncové domény spojené s EGFP nebyla pozorována selektivní lokalizace v buňce, což je v souladu s očekáváním, neboť u N-koncové domény nebyla v literatuře popsána role v regulaci lokalizace. Pozorovaný signál vykazoval typickou cytosolickou lokalizaci nezasahující do expandovaných endosomálních struktur (Obr. 5.24, Obr. 5.25). Jeho lokalizace odpovídá stavu, který byl pozorován u C-koncového fragmentu zbaveného signálu pro jadernou lokalizaci [61]. Naproti tomu u C-koncové domény byla pozorována předpokládaná jaderná lokalizace, popsaná u C-koncové domény fúzované s GFP ve studii [61]. Lokalizace na cytoplasmatické membráně, která byla také pozorovaná, by mohla být potenciálně zajímavá, neboť cytoplasmatická membrána je cílem pro enlargeosomy během regulované exocytosis vyvolané Ca^{2+} [44]. Z tohoto důvodu by byla zajímavá informace, zda je Ahnak-C_EGFP na vnitřním nebo vnějším listu cytoplasmatické membrány. Žádný z fúzních proteinů neposkytuje při fluorescenční mikroskopii kolokalizaci s protilátkou proti Ahnaku, jež byla použita ve studii prof. Meldolesiho vedoucí k popisu distribuce enlargeosomů v buňce [44]. Možností, jak si vysvětlit rozdíl mezi značením protilátkou proti enlargeosomům a intracelulární lokalizací fragmentů Ahnaku, je hned několik. Je možné, že ve fragmentech není přítomná dostatečná informace pro lokalizaci. Bud' proto, že je v jiném místě, než které bylo klonováno, nebo musí být současně přítomno synergicky několik signálů z různých částí Ahnaku pro lokalizaci v enlargeosomech anebo fúze fragmentů s EGFP narušila jejich strukturu natolik, že už neobsahuje informace přítomné v nativním proteinu. Příkladem pro synergismus signálů pro lokalizaci je

nutnost současné přítomnosti nukleárního exportního signálu a fosforylace [61]. Zcela jistě není pro funkčnost Ahnaku náhodná jeho obří velikost, která je evolučně konzervována [45]. Je možné, že pouze kompletní molekula je v buňce správně zacílena a plní dokonale svou funkci. Také lze spekulovat o tom, že exprese fragmentů Ahnaku, která není regulovaná potřebami buňky, vede k ukládání Ahnaku mimo obvyklou lokalizaci. V takovém případě by mohlo nadprodukci vazebného motivu pro proteiny interagující s proteinem Ahnak dojít v transfekovaných buňkách ke změně distribuce enlargeosomů, detekovatelné příslušnou protilátkou. To však nebylo pozorováno, zdá se tedy, že produkované N- a C- koncové fragmenty nepůsobí jako kompetitor ovlivňující distribuci endogenního epitopu protilátky používané pro detekci enlargeosomů.

Dalším vysvětlením je velmi nepříjemná možnost, že Ahnak není markerem enlargeosomů a byl s nimi asociován pouze náhodně, což není úplně vyloučeno vzhledem k tomu, že za 15 let studia Ahnaku nebyla publikovaná práce, ve které by byla pozorována lokalizace ve váčcích, kromě studií provedených s využitím protilátky připravené skupinou prof. J. Meldolesiho [41, 44, 51].

Řešením problémů se zajištěním „správné“ buněčné lokalizace rekombinatního fragmentu by mohla být konstrukce proteinu obsahujícího kromě C-koncové domény i úsek repetic a N-koncovou doménu. V takovém případě se však už velikost konstruktu dostává za hranice transfekovatelnosti. Racionálním postupem by bylo detailní ověření specificity protilátky používané ke značení enlargeosomů, zda nedošlo k chybné identifikaci rozeznávaného antigenu anebo zda není za podmínek fixace využívané pro imunofluorescenci rozeznáván antigen odlišný od antigenu rozeznávaného při Western blottingu. Tento postup je zatím limitován nedostatečným množstvím darované protilátky.

Další snaha o vytvoření modelu pro studium enlargeosomů i v jiných buňkách než používaném defektním klonu PC12 by měla směřovat k získání jiného markeru než je protein Ahnak. Jeho velikost je překážkou v klonování celého proteinu a navíc existuje oprávněná pochybnost, zda je vůbec lokalizován v enlargeosomech. Prakticky by toho mohlo být dosaženo podobnou metodikou, jako byla použita při identifikaci Ahnaku jako markeru enlargeosomů [44]. Jde o biotinyaci povrchu buněk po exocytose vyvolané vzestupem hladiny Ca^{2+} a následné identifikování biotinylovaných proteinů prostřednictvím hmotnostní spektrometrie.

7 Závěr

- Byly klonovány fragmenty genu AHNAK kódující C-koncovou doménu. Klonování repetic ze střední domény se nezdařilo, proto probíhají jednání o jejich získání v expresním vektoru od prof. J. Meldolesiho.
- Podařila se produkce rekombinantních proteinů v *E. coli*. Jejich sekvence byla ověřena MALDI-TOF hmotnostní spektroskopii.
- Podmínky purifikace rekombinantních proteinů nebyly nalezeny, během snahy o optimalizaci se ukázala nutnost konstrukce rekombinantního proteinu s jinou afinitní značkou než použitý his-tag (např. GST).
- Byly zkonztruovány proteiny složené z fragmentů Ahnaku a EGFP, které se podařilo exprimovat v HeLa buňkách. Problém jejich negativní kolokalizace s enlargeosomy vyvolává otazníky kolem proklamované funkce proteinu Ahnak jako markeru enlargeosomů, proto považuji za nutné vydat se tímto směrem v dalším studiu enlargeosomů.

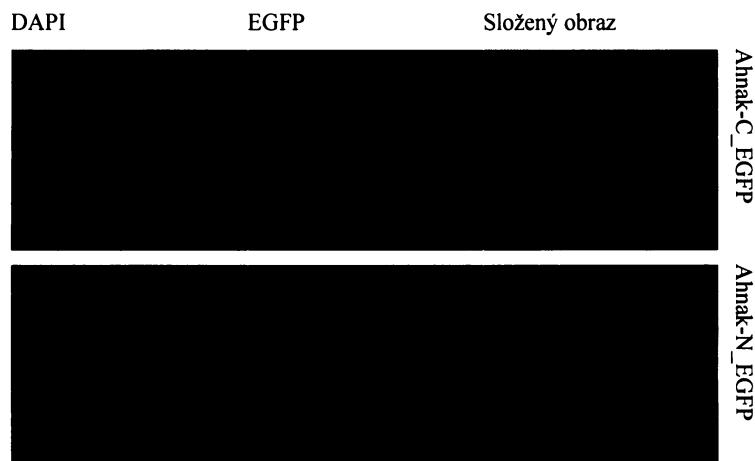
8 Použitá literatura

1. Chieregatti, E., Meldolesi, J.: *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 181-7 (2005)
2. Benz, R., Zimmermann, U.: *Biochim Biophys Acta* 640, 169-78 (1981)
3. Chang, D.C., Reese, T.S.: *Biophys J* 58, 1-12 (1990)
4. Deleze, J.: *J Physiol* 208, 547-62 (1970)
5. Alberts, B., et al., Základy buněčné biologie. Espero Publishing, s.r.o., Praha (1998)
6. Bi, G.Q., Alderton, J.M., Steinhardt, R.A.: *J Cell Biol* 131, 1747-58 (1995)
7. Miyake, K., McNeil, P.L.: *J Cell Biol* 131, 1737-45 (1995)
8. McNeil, P.L., Miyake, K., Vogel, S.S.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4592-7 (2003)
9. Terasaki, M., Miyake, K., McNeil, P.L.: *J Cell Biol* 139, 63-74 (1997)
10. McNeil, P.L., Baker, M.M.: *Cell Tissue Res* 304, 141-6 (2001)
11. Zhelev, D.V., Needham, D.: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1147, 89-104 (1993)
12. Togo, T., Krasieva, T.B., Steinhardt, R.A.: *Mol Biol Cell* 11, 4339-46 (2000)
13. Togo, T., et al.: *J Cell Sci* 112, 719-731 (1999)
14. Miyake, K., et al.: *J Cell Sci* 114, 3487-94 (2001)
15. Togo, T.: *J Cell Sci* 119, 2780-6 (2006)
16. Parker, P.J., Murray-Rust, J.: *J Cell Sci* 117, 131-2 (2004)
17. Togo, T., Alderton, J.M., Steinhardt, R.A.: *Mol Biol Cell* 14, 93-106 (2003)
18. Howe, A.K.: *Biochim Biophys Acta* 1692, 159-74 (2004)
19. Togo, T.: *J Biol Chem* 279, 44996-5003 (2004)
20. Zarubin, T., Han, J.: *Cell Res* 15, 11-8 (2005)
21. Steinhardt, R.A., Bi, G., Alderton, J.M.: *Science* 263, 390-3 (1994)
22. <http://en.wikipedia.org/wiki/SNARE>:
23. Goda, Y.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 769-72 (1997)
24. Gerst, J.E.: *Biochim Biophys Acta* 1641, 99-110 (2003)
25. Jahn, R., Grubmuller, H.: *Curr Opin Cell Biol* 14, 488-95 (2002)
26. Gerber, S.H., Sudhof, T.C.: *Diabetes* 51 Suppl 1, S3-11 (2002)
27. Chen, Y.A., Scheller, R.H.: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 98-106 (2001)
28. Ninomiya, Y., et al.: *J Biol Chem* 271, 17751-4 (1996)
29. Coorsen, J.R., Schmitt, H., Almers, W.: *Embo J* 15, 3787-91 (1996)
30. Blott, E.J., Griffiths, G.M.: *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 122-31 (2002)
31. Andrews, N.W.: *Trends Cell Biol* 5, 133-7 (1995)
32. Rodriguez, A., et al.: *J Cell Biol* 137, 93-104 (1997)
33. Martinez, I., et al.: *J Cell Biol* 148, 1141-49 (2000)
34. Jaiswal, J.K., Andrews, N.W., Simon, S.M.: *J Cell Biol* 159, 625-35 (2002)
35. Chapman, E.R.: *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 498-508 (2002)
36. Meldolesi, J., Chieregatti, E.: *Nat Cell Biol* 6, 476-8 (2004)
37. Tucker, W.C., Chapman, E.R.: *Biochem J* 366, 1-13 (2002)
38. Rao, S.K., et al.: *J Biol Chem* 279, 20471-9 (2004)
39. Reddy, A., Caler, E.V., Andrews, N.W.: *Cell* 106, 157-69 (2001)
40. Chakrabarti, S., et al.: *J Cell Biol* 162, 543-9 (2003)
41. Černý, J., et al.: *EMBO Rep* 5, 883-8 (2004)
42. Huynh, C., Andrews, N.W.: *EMBO Rep* 6, 843-7 (2005)
43. Kasai, H., et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 945-9 (1999)
44. Borgonovo, B., et al.: *Nat Cell Biol* 4, 955-62 (2002)

45. Shtivelman, E., Cohen, F.E., Bishop, J.M.: Proc Natl Acad Sci U S A 89, 5472-6 (1992)
46. Krogh, A., et al.: J Mol Biol 305, 567-80 (2001)
47. Cocucci, E., et al.: Mol Biol Cell 15, 5356-68 (2004)
48. Simons, K. and E. Ikonen: Nature 387, 569-72 (1997)
49. Salaun, C., James, D.J., Chamberlain, L.H.: Traffic 5, 255-64 (2004)
50. McNeil, P.L., Kirchhausen, T.: Nat Rev Mol Cell Biol 6, 499-505 (2005)
51. Cocucci, E., et al.: J Physiol Paris 99, 140-5 (2006)
52. Meldolesi, J.: J Cell Mol Med 7, 197-203 (2003)
53. Hieda, Y., Tsukita, S.: J Cell Biol 109, 1511-8 (1989)
54. Hashimoto, T., et al.: J Cell Sci 105 (Pt 2), 275-86 (1993)
55. Kudoh, J., et al.: Cytogenet Cell Genet 70, 218-20 (1995)
56. Hashimoto, T., et al.: Exp Cell Res 217, 258-66 (1995)
57. Masunaga, T., et al.: J Invest Dermatol 104, 941-5 (1995)
58. Wernyj, R.P., Ewing, C.M., Isaacs, W.B.: Cell Motil Cytoskeleton 50, 101-13 (2001)
59. Shtivelman, E., Bishop, J.M.: J Cell Biol 120, 625-30 (1993)
60. Nie, Z., et al.: J Invest Dermatol 114, 1044-9 (2000)
61. Sussman, J., et al.: J Cell Biol 154, 1019-30 (2001)
62. Haase, H., et al.: Faseb J 13, 2161-72 (1999)
63. Hohaus, A., et al.: Faseb J 16, 1205-16 (2002)
64. Haase, H., et al.: Faseb J 18, 839-41 (2004)
65. Alvarez, J., et al.: J Biol Chem 279, 12456-61 (2004)
66. Haase, H., et al.: Faseb J 19, 1969-77 (2005)
67. Lee, I.H., et al.: J Biol Chem 279, 26645-53 (2004)
68. Sekiya, F., et al.: J Biol Chem 274, 13900-7 (1999)
69. Gentil, B.J., et al.: J Biol Chem 276, 23253-61 (2001)
70. Benaud, C., et al.: J Cell Biol 164, 133-44 (2004)
71. Stiff, T., et al.: DNA Repair (Amst) 3, 245-56 (2004)
72. Kouno, M., et al.: J Invest Dermatol 123, 700-7 (2004)
73. Komuro, A., et al.: Proc Natl Acad Sci U S A 101, 4053-8 (2004)
74. Gentil, B.J., et al.: J Cell Physiol 203, 362-71 (2005)
75. Chatterjee, M., et al.: Cancer Res 66, 1181-90 (2006)
76. Chiaretti, S., et al.: Blood 103, 2771-8 (2004)
77. Skoldberg, F., et al.: Biochem Biophys Res Commun 291, 951-8 (2002)
78. <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>:
79. Laemmli, U.K.: Nature 227, 680-5 (1970)
80. <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/dnadot/index.html>:
81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
82. Marshall, O.J.: Bioinformatics 20, 2471-2 (2004)
83. <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>.
84. Gentil, B.J., et al.: J Histochem Cytochem 51, 339-48 (2003)
85. Routsias, J.G., Vlachoyiannopoulos, P.G., Tzioufas, A.G.: Crit Rev Clin Lab Sci 43, 203-48 (2006)
86. Doc. RNDr. J. Forstová, CSc.: osobní sdělení
87. Doc. Mgr. J. Černý, Ph.D.: nepublikovaná data

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

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka

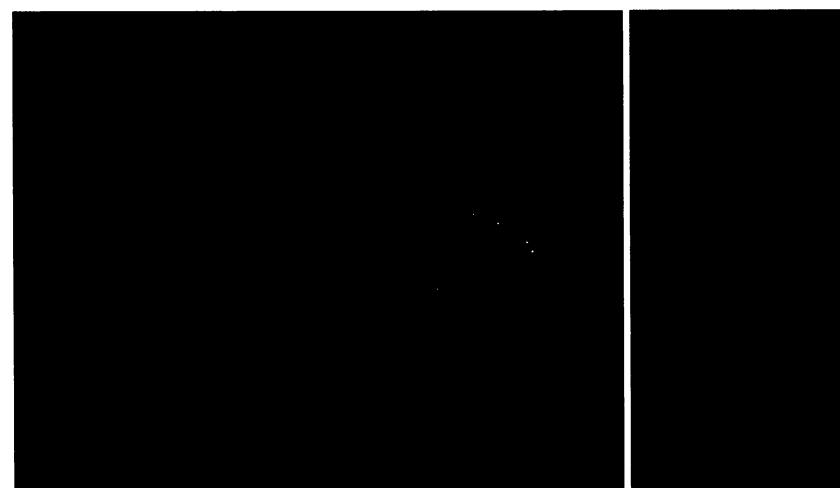


Obr. 1 HeLa buňky fixované 6 dnů po transfekci. Zvětšeno 1000x.

Podrobný postup uveden v kapitole Metody.



Obr. 2 Kolokalizace Ahnak-N_EGFP a enlargeosomů. Vlevo složené RGB kanály. Vpravo shora: DAPI (jádra), EGFP (Ahnak-N), AlexaFluor 594 (enlargeosomy). Podrobný postup uveden v kapitole Metody.



Obr. 3 Kolokalizace Ahnak-C_EGFP a enlargeosomů. Vlevo složené RGB kanály. Vpravo shora: DAPI (jádra), EGFP (Ahnak-N), AlexaFluor 594 (enlargeosomy). Podrobný postup uveden v kapitole Metody.