

IV. PUBLIKACE

IRESITE: THE DATABASE OF EXPERIMENTALLY VERIFIED IRES STRUCTURES **(WWW.IRESITE.ORG)**

Mokrejš M., Vopálenský V., Kolenatý O., Mašek T., Feketová Z., Sekyrová P., Škaloudová B.,
Kříž V., Pospíšek M.

Nucleic Acids Research 2006 Jan 1;34(Database issue): D125-30

A BIOINFORMATICAL APPROACH TO THE ANALYSIS OF VIRAL AND CELLULAR INTERNAL RIBOSOME ENTRY

Mokrejš M., Vopálenský V., Mašek T., Pospíšek M.

*In: Lee B. Kwang editor. New Messenger RNA Research Communications. Hauppauge, NY: Nova
Science Publishers 2007; p.133 - 166*

Obě publikace představují námi vytvořenou databázi experimentálně ověřených IRES struktur. Jak bylo naznačeno v literárním úvodu, naprostá většina eukaryotických a virovým mRNA je zakončena na svém 5' konci čepičkou a iniciace jejich translace probíhá způsobem závislým na čepičce. Existuje však skupina virových i eukaryotických mRNA nesoucích na svém 5' konci IRES strukturu, která umožní nasednutí ribozómu do blízkosti iniciačního kodónu AUG bez nutnosti vazby proteinu eIF4E na N⁷-methylguanozinovou čepičku. První IRES struktura byla popsána přibližně před 20 lety. Od té doby se skupina mRNA obsahujících IRES sekvence v 5' nepřekládaných oblastech (UTR, *Untranslated Region*) rozrostla na 90 buněčných a 62 virových mRNA. Práci s IRES strukturami značně ztěžuje skutečnost, že se jedná pouze o funkčně definované oblasti. Zatím nebyly nalezeny strukturní či sekvenční znaky charakteristické pro všechny IRES sekvence. Určité podobnosti se dají vysledovat (a aplikovat) pouze v případě velmi příbuzných virů. Například IRES sekvence u čeledi *Flaviviridae* (virus žloutenky typu C, BVDV - *Bovine Viral Diarrhea Virus*) je vysoce strukturována a obsahuje charakteristické, zejména u HCV velmi dobře prozkoumané smyčky. Tyto smyčky jsou charakteristické pro všechny zástupce této čeledi, kteří využívají iniciaci translace nezávislou na čepičce. Právě neschopností jasně definovat a predikovat struktury IRES sekvencí byla vedena naše snaha vytvořit databázi experimenty prověřených IRES struktur, ty následně analyzovat a pokusit se nalézt podobnosti mezi nimi.

V publikaci „IRESITE: THE DATABASE OF EXPERIMENTALLY VERIFIED IRES STRUCTURES (WWW.IRESITE.ORG)“ představujeme zejména technické řešení databáze v kontextu jiných databází a vyzdvihujeme skutečnost, že IRESite analyzuje pouze experimentální výsledky a navíc přináší dosud nepublikované kompletní či částečné sekvence

studovaných RNA molekul. IRESite je relační databáze typu MySQL-4.1 využívající InnoDB tabulky. Výhodou databáze jsou dynamicky generované webové stránky umožňující uživatelsky příjemnou práci s daty. Bezpečnost dat je zajištěna právě použitím InnoDB tabulek, které umožňují bezpečně vrátit neúplně provedené změny do obsahu databáze v případě, kdy program narazí na nečekanou chybu. Data vložená do databáze jsou rozdělena do tabulek a každá z nich dále do sloupců. Toto rozmístění umožňuje logické pospojování dat a jejich následnou komprimaci vedoucí k velké úspoře místa na pevném disku počítače. Práce také detailně diskutuje problematiku IRES segmentů a prezentuje databázi jako nástroj, s jehož pomocí hodláme porovnávat těžko srovnatelné experimentální výsledky mezi sebou. To je umožněno tím, že lze z relativně velkého množství již provedených experimentů vybrat takové, které používaly například stejnou experimentální metodiku, stejné nebo podobné kontroly atd. Cílem IRESite je tedy shromažďovat a následně hodnotit relevantní informace o vnitřním vazebném místě pro ribozóm. Je to databáze kurátorovaná s hierarchickým rozvrstvením kurátorů, což zaručuje, že je každá položka vložená do databáze před zveřejněním minimálně 2x prověřena a zkontrolována.

Do databáze je možné vložit položky dvojího typu. *Natural* položky obsahují veškerá experimentální data týkající se určité IRES struktury, včetně kompletní sekvence mRNA s vymezením pozic IRES sekvence a kódovaného proteinu (nebo proteinů), veškeré s IRES interagující proteiny včetně reakčních podmínek nutných k interakci. V případě, že byla u konkrétního IRES zmapována sekundární struktura, je tato také vložena včetně popisu reakčních pufřů. Jedná se vlastně o kompilaci z položek *engineered*. *Engineered* položky jsou uměle vytvořené, většinou se jedná o bicistronní plazmidy sloužící k testování funkčnosti sekvence, o níž se předpokládá, že obsahuje IRES element, a případné mutantní deriváty této sekvence. Do databáze se v případě *engineered* položek vkládají manuálně anotované údaje o sekvenci mRNA s vymezením IRES oblasti, základní informace o reportérových proteinech, informace o translačních experimentech včetně použitého promotoru a informace o pozitivních a negativních kontrolách. Manuální kontrola dat je velmi důležitá, je třeba vyloučit všechny možné experimentální chyby, jako je přítomnost kryptického promotoru či alternativní sestřih ve studované sekvenci.

V době zprovoznění obsahovala IRESite 70 položek, 30 *natural* a 40 *engineered*. V současnosti je v databázi uloženo 288 položek; 67 *natural* (20 virových a 47 buněčných) a 221 *engineered*. *Engineered* položky v současné době podrobně popisují 23 IRES sekvencí (BCL2, BVDV1, c-IAP1, c-myc, CSFV, CVB3, ELH, EMCV, ERAV, GBV-B, Hairless, HCV, HRV-2, Kv1.4, LEF1, MYT2, n-myc, NDST, NRF, Pim-1, PV, UtrA, XIAP). Počet

přístupů z nezávislých IP adres do IRESite je v průměru 900 měsíčně. Od prosince 2005 hledalo v databázi pomocí námi vytvořeného prohlédáče 763 lidí, kteří provedli 1677 dotazů. To vše svědčí o poměrně velkém zájmu skupiny vědců zabývajících se způsobem translace nezávislým na čepičce o databázi IRESite.

Databáze stále prochází vývojem, v nedávné době jsme zavedli možnost vkládání celých sekvencí kontrolních plazmidů. Také jsme zavedli sekci *promotor test*, která umožňuje lépe charakterizovat experimenty ověřující nepřítomnost kryptického promotoru ve studované sekvenci.

Podle našeho názoru může IRESite v budoucnosti sloužit jako základní zdroj informací o IRES sekvencích využívaný vědeckou komunitou zabývajících se studiem na čepičce nezávislé iniciace translace. Databáze může také sloužit k omezení zbytečné práce případných experimentátorů na poli IRES struktur; z *engineered* položek vložených v databázi a ze slovních komentářů kurátorů, týkajících se těchto položek, je patrné, jaké pozitivní či negativní kontroly je vhodné použít pro správné ověření funkce IRES sekvence. Doufáme, že přítomnost experimentálně ověřených dat pomůže vysvětlit protichůdná či neúplná data vyskytující se v publikacích týkajících se IRES struktur, a stejně tak, že se podaří vysledovat určité podobnosti mezi IRES sekvencemi, které by umožňovaly jejich přesnější predikci.

V přehledovém článku „A BIOINFORMATICAL APPROACH TO THE ANALYSIS OF VIRAL AND CELLULAR INTERNAL RIBOSOME ENTRY“ diskutujeme současný stav studia IRES struktur a navrhuje možná využití databáze IRESite k řešení určitých problémů. Součástí publikace jsou rozsáhlé tabulky obsahující všechny dosud známé IRES elementy virové, buněčné i uměle vytvořené. Také zde podrobněji popisujeme kurátorskou činnost. Obecně se dá říci, že je to práce náročná. Originální data (zejména sekvence) se snažíme získávat přímo od autorů, nicméně i přesto je nezbytná manuální kontrola dat. V některých případech nám autoři dokonce zašlou pouze požadované plazmidy s tím, že sekvenci nemají k dispozici. Poté je nutná sekvenační analýza v naší laboratoři. V případě starších publikací je nutné data rekonstruovat *in silico*, přičemž ne vždy je tato „molekulární archeologie“, s ohledem na neúplnost, nepřesnost či nejednoznačnost dat uvedených v konkrétních publikacích, možná. Již teď se dá říct, že některé *natural* IRES sekvence, pokud si je sami nezrekonstruujeme podle původních publikací, nebudou do databáze vloženy. Například o (údajných) IRES elementech lidských genů ARC, α CaM kináza II, MAP2, RC3 a dendrin nejsou k dispozici žádná data, stejně tak nejsou k dispozici (fyzicky) ani plazmidy použité při experimentech.

Další částí publikace je srovnání IRESite se dvěma databázemi obsahujícími IRES sekvence. První z nich je IRESdb (<http://www.rangueil.inserm.fr/IRESDatabase/>). Zatímco se v případě IRESite snažíme vkládat celou sekvenci transkriptu obsahujícího IRES, IRESdb obsahuje automaticky extrahované 5'-UTR sekvence z veřejně přístupných databází. Kvalita sekvencí uložených v těchto veřejných databázích je ovšem podle naší zkušenosti problematická, jedním z důvodů je i to, že autoři nejsou nuceni editory časopisů deponovat sekvence studovaných molekul do veřejných sekvenčních databází před odesláním článku do tisku. Navíc IRESdb není od prosince 2002 aktualizována. Druhá databáze obsahující IRES sekvence je UTRdb (<http://www.ba.itb.cnr.it/UTR/>). Tato databáze využívá k automatickému vyhledávání IRES sekvencí ve veřejných databázích sekvenční vzorec odvozený z nereprezentativního vzorku pouhých tří IRES sekvencí (HCV, BiP a FGF2). IRES sekvence uložené v této databázi také nejsou nijak anotovány ve smyslu jejich účinnosti, metod studia apod.; podle našeho mínění není hodnota takto predikovaných položek příliš vysoká.

V poslední části práce ukazujeme možnou analýzu IRES sekvencí vložených v IRESite. Statisticky jsme hodnotili délku IRES sekvencí, obsah G+C párů a počet AUG iniciačních kodónů v těchto IRES sekvencích. Navzdory tomu, že se jedná o analýzu velmi předběžnou, neboť databáze zdaleka neobsahuje všechny popsané IRES sekvence, lze vysledovat zajímavé trendy lišící se od hypotéz uvedených v literatuře. Zejména se ukázala zřejmá rozdílnost IRES sekvencí virových a buněčných. Virové IRES tvoří vcelku kompaktní skupinu, zatímco IRES buněčné jsou ve všech analyzovaných případech velmi různorodé. Tato různorodost je podle našeho názoru vysvětlitelná dvojím způsobem. Buď jde o ovlivnění lidským faktorem, neboť se autoři zabývající se hledáním nových IRES sekvencí zaměřili přednostně na krátké G+C bohaté či naopak na dlouhé 5' nepřekládané oblasti studovaných genů. Druhá možnost, vysvětlující rozložení buněčných IRES sekvencí na krátké G+C bohaté a na dlouhé A+T bohaté, je ta, že u buněčných IRES sekvencí existuje více způsobů iniciace translace. Možnosti více mechanismů iniciace translace by nasvědčoval i fakt, že se u buněčných IRES sekvencí vyskytuje daleko méně AUG iniciačních kodónů ve srovnání s IRES virovými.

Již z těchto prvotních výsledků je zřejmé, že pro podrobnou analýzu bude třeba do databáze vložit co nejvíce možných *natural* sekvencí, což je práce velmi zdlouhavá a ani poté není zaručena jednoznačnost výsledků. Obecně lze říci, že zejména studium buněčných IRES sekvencí by si zasloužilo více pozornosti, hlavně s ohledem na čistotu experimentů. Sama existence buněčných IRES je totiž často, právě díky závažným nedostatkům při experimentální práci, zpochybňována. IRESite, jak již bylo uvedeno, by do budoucna mohla

sloužit jako jakási platforma obsahující „vzorové“ experimenty týkající se analýzy IRES sekvencí, případně jako komunikační centrum vědců zabývajících se studiem IRES struktur.

HEPATITIS C VIRUS INTERNAL RIBOSOME ENTRY SITE INITIATES PROTEIN SYNTHESIS AT THE AUTHENTIC INITIATION CODON IN YEAST

Mašek T., Vopálenský V., Horváth O., Vortelová L., Feketová Z., Pospíšek M.

Journal of General Virology 2007 Jul; 88(Pt 7):1992-2002

FIREFLY LUCIFERASE GENE CONTAINS A CRYPTIC PROMOTER – RE-EVALUATION OF THE HEPATITIS C VIRUS IRES PROMOTER

Vopálenský V., Mašek T., Horváth O., Vicenová B., Mokrejš M., Pospíšek M.

zasláno k posouzení oponentům

Vnitřní vazebné místo pro ribozóm viru žloutenky typu C dnes do jisté míry představuje paradigma struktury a funkce virových IRES sekvencí, o čemž svědčí i počet odborných publikací přesahujících v současnosti počet 250. Důvodem zájmu vědců je nejen velká účinnost translace u viru HCV, ale také skutečnost, že tento typ žloutenky představuje nejtěžší a nejzákladnější formu lidských hepatitid. Proto se intenzivně studují proteinové produkty a sekvence viru žloutenky typu C, které by mohly sloužit pro zavedení účinné terapie této dosud nevyléčitelné nemoci. Jedním z potenciálních míst účinku virové terapie je i sekvence samotného IRES elementu, který kontroluje translaci celého virového polyproteinu.

Kvasinka *S. cerevisiae* je uznávaným a hojně využívaným modelovým eukaryotickým organismem. Řada údajů experimentálně zjištěných u kvasinky *S. cerevisiae* se dá vztáhnout i na vyšší eukaryota. Bohužel translace je proces kde to neplatí stoprocentně. Kvasinky se od vyšších eukaryot liší velikostí ribozómů i složením iniciačních faktorů. Stejně tak není zcela jasné, jestli vůbec a případně jakým způsobem, je v kvasince realizována iniciace translace nezávislá na čepičce. V kvasinkách sice byly identifikovány geny (Yap1, Hap4, Tif4631) obsahující na svém 5' konci potenciální IRES strukturu, následné publikace ovšem odhalily kryptické promotory v cDNA sekvencích těchto „IRES“. Také se zatím nepodařilo detekovat aktivitu *in vivo* u žádného virového IRES elementu (s výjimkou IGR IRES z *Cricket Paralysis Virus*) testovaného v kvasince *S. cerevisiae*. U některých IRES elementů (HCV, crTMV, poliovirus) bylo prokázáno, že jsou funkční v kvasinkových lyzátech, nikoliv však *in vivo* v kvasinkových buňkách.

V článku „HEPATITIS C VIRUS INTERNAL RIBOSOME ENTRY SITE INITIATES PROTEIN SYNTHESIS AT THE AUTHENTIC INITIATION CODON IN YEAST“ popisujeme analýzu funkčnosti HCV IRES v kvasince *S. cerevisiae*. Pro toto testování jsme připravili vektor pFGAL4, který produkuje bicistronní mRNA nesoucí geny pro luciferázu (první cistron) a pro protein GAL4 (druhý cistron). Kvasinkový Gal4 protein představuje transkripční faktor, který indukuje

syntézu mRNA z genů pro metabolismus galaktózy. Transkripce celé bicistronní mRNA probíhá ze silného konstitutivního promotoru pro triosofosfát izomerázu (TPI; *Triosephosphate Isomerase*). Díky tomuto uspořádání se pFGAL4 reportérový systém vyznačuje vysokou citlivostí a velkým dynamickým rozsahem měření. Je vhodný jak pro měření enzymových aktivit, tak pro *in vivo* selekci sekvencí obsahujících IRES elementy nebo kryptické promotory.

Po vnesení HCV IRES sekvence do plazmidu pFGAL4 byla aktivita HCV IRES v kvasince přibližně 40 % ve srovnání s prázdným vektorem. Nicméně správnější srovnání vektorů o stejné délce intercistronické oblasti (tj. srovnání s kontrolními plazmidy) ukazuje, že HCV IRES zvyšuje aktivitu β -galaktosidázy zhruba 26x. Následnými mutačními analýzami jsme prokázali, že translace u kvasinek začíná stejně jako u savců na AUG iniciačním kodónu 342. Toto zjištění společně s ověřením, že disrupce vlásenky IV eliminuje funkci HCV IRES v kvasinkách, naznačuje, že je HCV IRES v kvasinkách plně funkční, a že mechanismus iniciace translace je velmi podobný mechanismu iniciace translace v savčích buňkách. Všechny uvedené experimenty byly doprovázeny množstvím kontrol vylučujících vliv kryptických promotorů, alternativního sestřihu či rozlomení RNA na námi studovaný efekt funkčnosti HCV IRES v kvasinkách. Tyto kontroly zahrnovaly použití tricistronních plazmidů, kontrolu integrity mRNA pomocí RT-PCR a kvantifikaci pomocí RQ-PCR (*real-time PCR*).

Díky zjištění funkčnosti HCV IRES v kvasinkových buňkách bude možné využít tuto IRES sekvenci jako případnou pozitivní kontrolu v projektu vyhledávání kvasinkových IRES sekvencí, běžícím v současnosti v naší laboratoři. Dále plánujeme využití funkčního HCV IRES k selekci nízkomolekulárních látek ovlivňujících aktivitu HCV IRES sekvence v kvasinkových buňkách a k hledání lidských proteinů schopných interakce s HCV IRES sekvencí v kvasinkové buňce.

Při řešení projektu iniciace translace HCV IRES v kvasinkách jsme navíc pojali podezření, že gen kódující luciferázu z *Photinus pyralis* (FLuc, *firefly luciferase*) pravděpodobně obsahuje kryptický promotor funkční minimálně v kvasinkách. Jelikož je tento typ luciferázy používán jako jeden z nejběžnějších signálních genů v mnoha experimentech z různých oblastí molekulárně biologického výzkumu, bylo by nalezení takového promotoru velmi zajímavé a mohlo by vést k přehodnocení řady výsledků publikovaných v odborné literatuře. Pro ověření této hypotézy jsme vytvořili sérii bezpromotorových plazmidů, které jsme následně transfekovali do tkáňových kultur a měřili

aktivity reportérových genů pomocí průtokové cytometrie. Výsledky potvrdily, že ve *firefly* luciferáze je přítomen promotor funkční v lidských tkáňových liniích a v kvasinkách. Dále jsme potvrdili známý fakt, že v IRES sekvenci viru žloutenky typu C je přítomen promotor funkční v lidských tkáňových kulturách.

Tento výsledek nám umožnil také korigovat v literatuře udávanou účinnost kryptického promotoru HCV IRES sekvence. Podle literárních údajů je účinnost promotoru vyskytujícího se v HCV IRES sekvenci srovnatelná s účinností časného cytomegalovirového promotoru. Dle našeho měření je ovšem účinnost HCV IRES promotoru 16x nižší. Tento rozdíl je způsobený mimo jiné tím, že autoři popisující promotor v HCV IRES sekvenci měřili jeho účinnost v bicistronním konstruktu, kde byla prvním cistronem právě *firefly* luciferáza. Je to tedy jeden z mnoha případů, kde je experimentální výsledek sice rámcově v pořádku, je však výrazně ovlivněn přítomností kryptického promotoru ve výše uvedené luciferáze. Dle našich nepublikovaných zjištění je kryptický promotor lokalizován zhruba v poslední třetině genu kódujícího FLuc. Obdobné ovlivnění se dá očekávat i v experimentech zacílených na testování IRES sekvencí (pokud je *firefly* luciferáza použita jako první cistron bicistronního konstrukt), případně experimentů zaměřených na siRNA/miRNA (pokud jsou interferující RNA zacíleny na 3' konec mRNA kódující luciferázu).

Výsledky testování přítomnosti kryptického promotoru ve *firefly* luciferáze jsou shrnuty v článku s předběžným názvem „FIREFLY LUCIFERASE GENE CONTAINS A CRYPTIC PROMOTER – RE-EVALUATION OF THE HEPATITIS C VIRUS IRES PROMOTER“.

FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE PUTATIVE CAPPING ENZYME ENCODED BY LINEAR CYTOPLASMIC PLASMIDS OF THE YEAST *KLUYVEROMYCES LACTIS*

Vopálenský V., Mašek T., Sekyrová P., Pospíšek M.

připravovaný článek

Lineární dsDNA plazmidy byly objeveny u kvasinky *Kluyveromyces lactis* v roce 1981. Tyto plazmidy, nazvané pGKL1 a pGKL2, jsou pozoruhodné cytoplazmatickou lokalizací a uspořádáním genomu, čímž připomínají DNA genomy cytoplazmatických virů čeledi *Poxviridae* či *Asfarviridae*. Do současné doby byl obdobný typ plazmidů popsán u 28 kvasinkových kmenů, patřících do 18 druhů z 9 rodů kvasinek.

Přítomnost pGKL plazmidů je v buňce spojena s produkcí *killer* toxinu inhibujícího růst citlivých kvasinkových kmenů. Mechanismus účinku toxinu *K. lactis* na kvasinku *S. cerevisiae* je v současné době velmi dobře popsán. Naopak není mnoho známo o transkripci a translaci plazmidy kódovaných genů. Pomocí počítačových analýz a pilotních experimentů bylo zjištěno, že si tyto plazmidy samy kódují součásti svého transkripčního aparátu, čímž připomínají již zmíněné cytoplazmatické viry. Přesný mechanismus transkripce ovšem není znám.

V této publikaci se zabýváme charakterizací proteinového produktu otevřeného čtecího rámce 3 kódovaného plazmidem pGKL2. V sekvenci tohoto genu byly nalezeny motivy charakteristické pro virové enzymy syntetizující čepičku na 5' konci mRNA; o tomto proteinu se tedy předpokládá, že je to tzv. *capping* enzym.

Při plánování experimentů týkajících se charakterizace ORF3p jsme předpokládali, že díky vysokému obsahu A+T bází v pGKL plazmidech bude produkce proteinů kódovaných pGKL plazmidy pomocí bakteriálních expresních systémů obtížná. Přesto se nám podařilo produkovat *capping* enzym pomocí T7 expresního systému v *E. coli* jako N-koncový fúzní protein s histidinovou kotvou či jako N-koncový fúzní protein s glutationtransferázovou kotvou. Podařilo se nám také připravit rekombinantní bakulovirus nesoucí *capping* enzym, opět jako N-koncový fúzní protein s histidinovou kotvou, pod kontrolou silného polyhedrinového promotoru. Všechny výše popsané varianty produkovaného *capping* enzymu jsme izolovali pomocí příslušných afinitních chromatografií a úspěšně u všech otestovali guanylyltransferázovou aktivitu. U takto připravených proteinů jsme dále testovali metyltransferázovou aktivitu, ve všech případech bohužel neúspěšně. Získané výsledky nicméně prokazují, že je možné produkovat A+T bohaté sekvence v produkčních systémech odvozených od *E. coli* (což jsem prokázal i u neuváděných produkcí proteinů kódovaných

ORF7 a ORF9 plazmidu pGKL2). Dalším důležitým zjištěním je, že funkčnost (v tomto případě spíše nefunkčnost) případné metyltransferázové domény ORF3p není ovlivněna umístěním kotvy na C- či na N-konec produkovaného proteinu, jak je naznačeno v publikaci Tiggemanna a spolupracovníků [79].

Jelikož naše přesvědčení o přítomnosti čepičky na 5' konci pGKL plazmidů nebylo stoprocentní, věnovali jsem se dále charakterizaci konců pGKL-specifických mRNA. Nejprve jsme testovali schopnost pGKL-specifických mRNA vázat se na produkovaný protein eIF4E (cdc33) kvasinky *S. cerevisiae*. Ze získaných výsledků je dobře patrné, že zatímco kontrolní mRNA (aktin či vysokoafinitní transportér glukózy - HGT) se na eIF4E *in vitro* váží, u pGKL-specifických mRNA tomu tak není. Obdobné výsledky jsme získali také *in vivo*; testováním produkce *killer* toxinu v kmenech *S. cerevisiae* obsahujících termosenzitivní mutace v eIF4E proteinu.

Všechny naše dosavadní výsledky naznačují, že otázka přítomnosti či nepřítomnosti čepičky na 5' koncích pGKL-specifických mRNA je stále nejasná. Dle našeho názoru buď čepička na 5' koncích plazmidových mRNA není přítomna vůbec, anebo se vyskytuje v nestandardní, například v nemetylované formě.

DENATURING RNA ELECTROPHORESIS IN TAE AGAROSE GELS

Mašek T., Vopálenský V., Suchomelová P., Pospíšek M.

Analytical Biochemistry 2005 Jan 1; 336(1):46-50

MULTIPLE CATHEPSIN B ISOFORMS IN SCHISTOSOMULA OF TRICHOBLIHARZIA REGENTI: IDENTIFICATION, CHARACTERISATION AND PUTATIVE ROLE IN MIGRATION AND NUTRITION

Dvořák J., Delcroix M., Rossi A., Vopálenský V., Pospíšek M., Šedinová M., Mikeš L., Sajid M., Sali A., McKerrow J.H., Horák P., Caffrey C.R.

International Journal for Parasitology 2005 Jul; 35(8):895-910

Můj podíl na těchto dvou článcích byl pouze metodický. Uvádím je zde proto, že tyto publikace charakterizují metodické zaměření naší laboratoře.

V článku „DENATURING RNA ELECTROPHORESIS IN TAE AGAROSE GELS“ ukazujeme možné zjednodušení elektroforetické analýzy molekul RNA. Z výsledků obsažených v této publikaci je zřejmé, že je možné nahradit běžně používaný pufrací systém využívaný při elektroforéze RNA (MOPS) pufrém TAE (Tris/acetát/EDTA) v kombinaci s minimálně 60 % v/v obsahem formamidu v analyzovaném vzorku. Při porovnání obou systémů byly prokázány obdobné separační schopnosti (například odhad délky analyzovaných molekul RNA), podobná byla i účinnost metody *Northern blot*. Námi navržená metoda elektroforetické separace RNA je levnější a jednodušší než v současnosti rozšířené metody založené na přítomnosti formaldehydu v agarózových gelech a pufrách. Zároveň výrazně minimalizuje expozici pracovníků karcinogenními látkami v průběhu přípravy a manipulace s agarózovými gely.

Článek „MULTIPLE CATHEPSIN B ISOFORMS IN SCHISTOSOMULA OF TRICHOBLIHARZIA REGENTI: IDENTIFICATION, CHARACTERISATION AND PUTATIVE ROLE IN MIGRATION AND NUTRITION“ byl hlavní součástí dizertační práce dr. Jana Dvořáka. V tomto článku je popsána identifikace a charakterizace šesti (TrCB1.1 - TrCB1.6) nových endopeptidáz motolice *T. regenti*. Dvě (TrCB1.1 a TrCB1.4) z těchto cysteinových endopeptidáz, vykazující podobnost s endopeptidázami příbuznými katepsinu B, byly produkovány a dále charakterizovány biochemickými a molekulárně biologickými metodami. Můj příspěvek k této práci se týkal provedení některých molekulárně biologických metod. Konkrétně se jednalo o pomoc s návrhem degenerovaných primerů (sekvence genu kódujícího tuto peptidázu nebyla předtím známa), izolaci mRNA, přípravu cDNA a mapování 5' konců mRNA kódujících izofomy katepsinu B pomocí RACE PCR (*Rapid Amplification of cDNA Ends*).