

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Lukáš Fojtík

Charakterizace vybraných vlastností modelových zástupců hemových
senzorových proteinů

Characterization of selected properties of model heme-containing sensor
proteins

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 20. května 2018

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce doc. RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D. za zadání zajímavého tématu, poskytnutou podporu, trpělivost a čas, který se mnou strávila při zpracování této bakalářské práce.

Dále bych rád poděkoval Mgr. Martinu Stráňavovi, Ph.D. a Mgr. Veronice Fojtíkové za pomoc při zpracování experimentální části mé práce a celému týmu laboratoře 217, za přátelskou atmosféru.

Také bych rád poděkoval své rodině a přítelkyni za podporu během celého studia.

Abstrakt

Hemové sensorové proteiny představují čtvrtou skupinu hemoproteinů. V této skupině hemoproteinů slouží hem jako signální molekula. Disociace a asociace hemu u proteinů detekujících hem má vliv na regulaci fyziologických procesů např. regulace enzymové aktivity nebo genové exprese.

V předkládané bakalářské práci jsou shrnuty dosavadní poznatky o vybraných zástupcích hlavně ze skupiny eukaryotických hemových sensorových proteinů publikované v odborných časopisech. V experimentální části této bakalářské práce jsme se zaměřili na přípravu rekombinantního proteinu, inhibitoru regulovaného hemem (HRI) a jeho proteinového substrátu, alfa podjednotky eukaryotického translačního iniciačního faktoru 2 (eIF2 α). Nejprve byly připraveny, posléze amplifikovány a následně izolovány plasmidy nesoucí buď gen pro HRI nebo pro eIF2 α . Následně byly dané proteiny připraveny heterologní expresí v bakteriálních buňkách *E. coli* BL-21(DE3) a celý proces zakončila jejich purifikace. Získali jsme finální preparát HRI o koncentraci 7,7 μ M a celkovém objemu 400 μ l a 60% homogenitě a finální preparát eIF2 α o koncentraci 51,3 μ M a celkovém objemu 400 μ l a 80% homogenitě. Pilotní charakterizace obou získaných preparátů s ohledem na jejich teplotní stabilitu, přinesla důležité informace nezbytné pro správné uchovávání proteinů před dalšími experimenty.

Klíčová slova:

sensorové proteiny detekující hem, hem, kinasa, transdukce signálu, izolace plasmidu, heterologní exprese, purifikace proteinů

Abstract

Heme sensor proteins are the fourth group of hemoproteins. In this group of hemoproteins heme plays an important role in signalization. Dissociation and/or association of heme detecting proteins serves as an important physiological function in regulation of enzyme activity or gene expression. In this bachelor thesis all the actual knowledge about selected forms of eukaryotic heme sensor proteins previously published in scientific articles are summarized. The experimental part of this bachelor thesis is focused on preparation of recombinant protein heme regulated inhibitor (HRI) and its substrate eukaryotic translation initiation factor 2 alpha (eIF2 α). Firstly the preparation of the plasmids with genes HRI and eIF2 α was conducted. In the next step these proteins were prepared in prokaryotic system formed by *E. coli* BL-21(DE3). The final sample of HRI (7,7 μ M in total volume 400 μ l and 60 % of homogeneity) and the final sample of eIF2 α (51,3 μ M in total volume 400 μ l and 80 % of homogeneity) were obtained by the purification process. The study of thermal stability of these samples provided important informations on appropriate storage and manipulation with them in further experiments.

Key words:

heme-base sensors, heme, kinase, transduction of signal, isolation of plasmids, prokaryotic expresion, protein purification.

(In Czech)

Obsah

1. Teoretický úvod	11
1.1 Hemoproteiny.....	11
1.2 Eukaryotický iniciační translační faktor 2.....	19
1.2.1 Kinasy eukaryotického iniciačního faktoru 2 α	21
2 Cíle bakalářské práce	28
3 Materiál a metody	29
3.1. Použité přístroje	29
3.2 Použitý materiál a chemikálie	30
3.3 Metody	35
3.3.1 Řetězová polymerázová reakce genu pro HRI	35
3.3.2 Řetězová polymerázová reakce genu pro eIF2 α	37
3.3.3 Purifikace DNA z agarosového gelu po elektroforese	37
3.3.4 Restrikční štěpení příslušného genu (pro HRI, resp. eIF2 α)	38
3.3.5 Ligace příslušného genu (pro HRI, resp. eIF2 α) s plasmidem.....	39
3.3.6 Transformace buněk <i>E. coli</i> BL-21 (DE3) a <i>E. coli</i> DH5 α	39
3.3.7 Izolace plasmidové DNA genu pro HRI, resp. eIF2 α	40
3.3.8 Exprese proteinu HRI, resp eIF2 α	42
3.3.9 Izolace proteinu HRI, resp. eIF2 α z buněk <i>E. coli</i> BL-21(DE).....	43
3.3.10 Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-elektroforesa)	44
3.3.11 Western blot	46
3.3.12 Horizontální agarosová elektroforesa.....	47
3.3.13 Sekvenace genu HRI/eIF2 α	48
3.3.14 Spektrofotometrické stanovení koncentrace plasmidové DNA	48
3.3.15 Stanovení koncentrace proteinu pomocí standardu BSA	48
3.3.16 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu	49
3.3.17 Pilotní charakterizace proteinů HRI a eIF2 α se zaměřením na jejich teplotní stabilitu	49
4 Výsledky	50
4.1 Přenesení genu kódujícího protein HRI z plasmidu pDNR-dual do plasmidu pET-21c(+) a pMAL-c5E	50
4.2 Přenesení genu kódujícího protein eIF2 α z plasmidu pDNR-dual do plasmidu pET-21c(+)	55
4.3 Exprese proteinu HRI.....	59
4.4. Izolace proteinu HRI z buněk <i>E. coli</i> BL-21(DE3).....	60

4.5 Imunodetekce histidinové kotvy proteinu HRI	65
4.6 Expres proteinu eIF2 α	68
4.7 Izolace proteinu eIF2 α z buněk <i>E. coli</i> BL-21(DE3)	69
4.6 Imunodetekce histidinové kotvy proteinu eIF2 α	73
4.7. Pilotní charakterizace proteinů HRI a eIF2 α se zaměřením na jejich teplotní stabilitu	76
5 Diskuze.....	79
6 Závěr	86
7 Seznam použitých zdrojů	87

Seznam zkratek a symbolů

A280	absorbance při vlnové délce 280 nm
AfGcHK	histidinkinasa s globinovou strukturou senzorové domény bakterie <i>Anaeromyxobacter sp</i> , Fw 109-5
ALA	5(δ)-aminolevulová kyselina
AP	alkalická fosfatasa
APS	persíran amonný
AU	z angl. „arbitrary units“, relativní jednotka absorbance
BCA	bicinchoninová kyselina
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
bp	párů bazí, z angl. base pare
CK-II	kaseinová kinasa 2 z angl. casein kinase 2
CP motiv	krátká sekvence dvou aminokyselin cysteinu a prolinu za sebou se vyskytujících v primární sekvenci proteinu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	směs nukletid trifosfátů
dsRBM	motivy vázající dvojvláknové RNA z angl. double strand RNA binding motifs
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ec DOS	fosfodiesterasa, která detekuje kyslík z <i>Escheriechia coli</i> , z angl. Direct oxygen sensor located in <i>Escheriechia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
eIF2	eukaryotický translační iniciační faktor 2, z angl. eukaryotic translation initiation factor 2
eIF2B	sekundární eukaryotický translační iniciační faktor
eIF2α	alfa podjednotka eukaryotického translačního iniciačního faktoru 2, z angl. eukaryotic translation initiation factor 2 alpha
eIF4	eukaryotický translační iniciační faktor 4, z angl. eukaryotic translation initiation factor 4

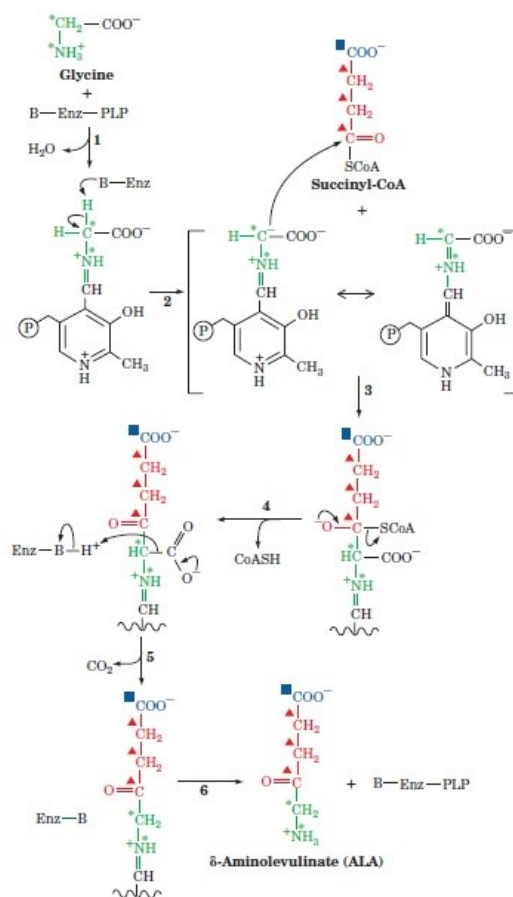
eIF5	eukaryotický translační iniciační faktor 5, z angl. Eukaryotic translation initiation factor 5
GCN1	z angl. general control of amino acid synthesis 1-like protein
GCN2 kinasa	z angl. general control non-depressive 2 kinase
GDP	guanosin difosfát
GTP	guanosin trifosfát
HisTag	histidinová kotva, polyhistidinová sekvence
HisRS	histidin related domain
HRI	inhibitor regulovaný hemem, z angl. heme regulated inhibitor
HRM	hem regulující motiv, z angl. heme regulated motif
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
LB medium	Luria Broth medium
MBP	protein vázající maltosu z angl, maltosa binding protein
metHB	methemoglobin
Met-tRNA ⁱ	transferová RNA, která přenáší methionin
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NBT	nitrotetrazoliová modř
OD ₆₀₀	optická denzita při vlnové délce 600 nm
PABPC	poly adeninový vázající protein, z angl. polyadenylate binding protein
PACT	protein aktivátor, z angl. protein activator
PBG	porfobilinogen
PCR	polymerázová řetězová reakce, z angl. polymeric chain reaction
PEK	pankreatická eIF2 α kinasa z angl. pancreatic eIF2 α kinase
PERK	PKR podobná kinasa endoplasmatického retikula, z angl. PKR-like endoplasmic reticulum kinase
pI	izoelektrický bod
PKA	proteinkinasa A, z angl. protein kinase A
PKC	proteinkinasa C, z angl. protein kinase C
PKR	proteinkinasa R, z angl. protein kinase R
PLP	pyridoxalfosfát
PMSF	fenylmethylsulfonil florid
RPM	počet otáček za minutu

SDS	dodecylsírán sodný
SS	singální sekvence, z angl. signal sequence
Sukcinyl – CoA	sukcinyl koenzym A
TAE	pufr Tris-acetát-EDTA
TB medium	terrific Broth medium
TBS	tris pufr s obsahem NaCl
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin
TM	transmembránový segment z angl. transmembran segment
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	polyoxyethylen (20) sorbitan monolaurát
WT	wild type

1. Teoretický úvod

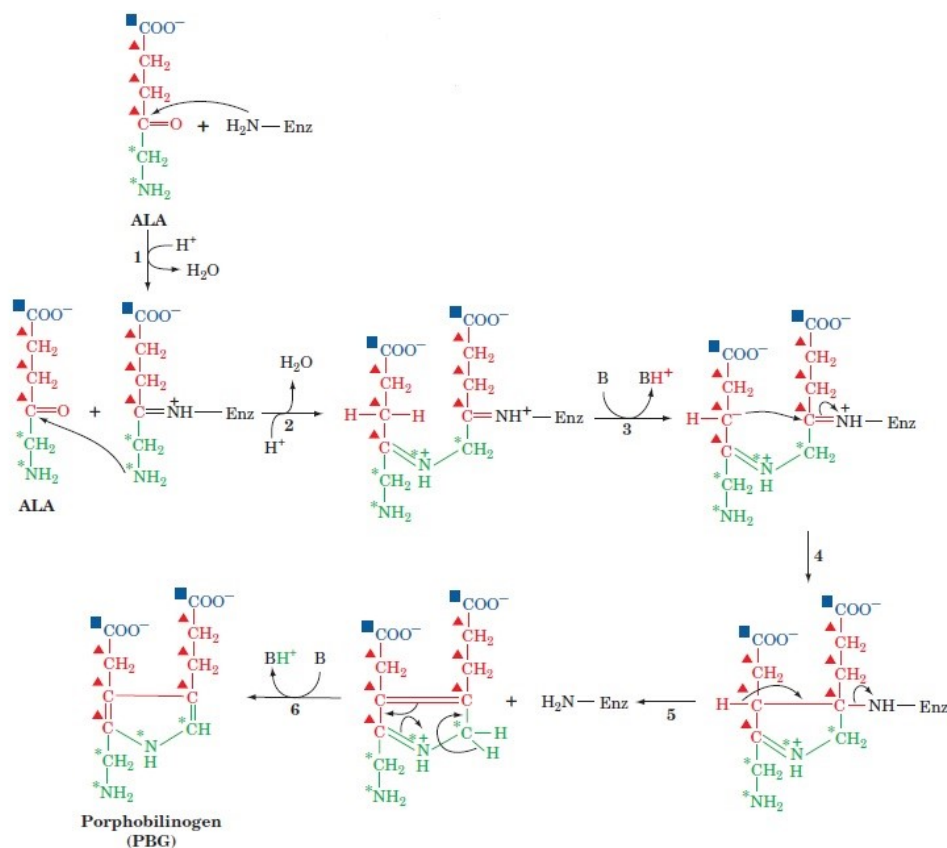
1.1 Hemoproteiny

Hemoproteiny jsou skupina proteinů, které obsahují hem jako nebilkovinnou část struktury [1]. Hem je syntetizován částečně v cytosolu a částečně v mitochondriích. Biosyntéza hemu byla objasněna v roce 1945 kdy David Shemin a David Rittenberg pomocí radioaktivně značených atomů uhlíku a dusíku prokázali, že hlavními prekurzory biosyntézy hemu jsou glycin a acetát [2]. Acetát musí být metabolicky přeměněn v citrátovém cyklu na sukcinyl-CoA. Sukcinyl-CoA reaguje v prvním kroku biosyntézy s glycinem, následuje dekarboxylace za katalýzy PLP-dependenční 5-aminolevulátsynthasou a vzniká 5(δ)-aminolevulová kyselina (ALA) [1]. Biosyntéza ALA je znázorněna na obrázku 1, strana 11.



Obrázek 1 Syntéza kyseliny δ -aminolevulové v mitochondriích, převzato z Voet, D., Voet, J.G.: Biochemistry, John Wiley & Sons, 2011 [1]. 1 – Transaminace, 2 – vznik karbaniontu, 3 – konjugace C-C vazby, 4 – odštěpení koenzymu A, 5 – dekarboxylace, 6 – druhá transaminace, které vede k uvolnění δ -aminolevulové kyseliny a regeneraci PLP komplexu (enzymu)

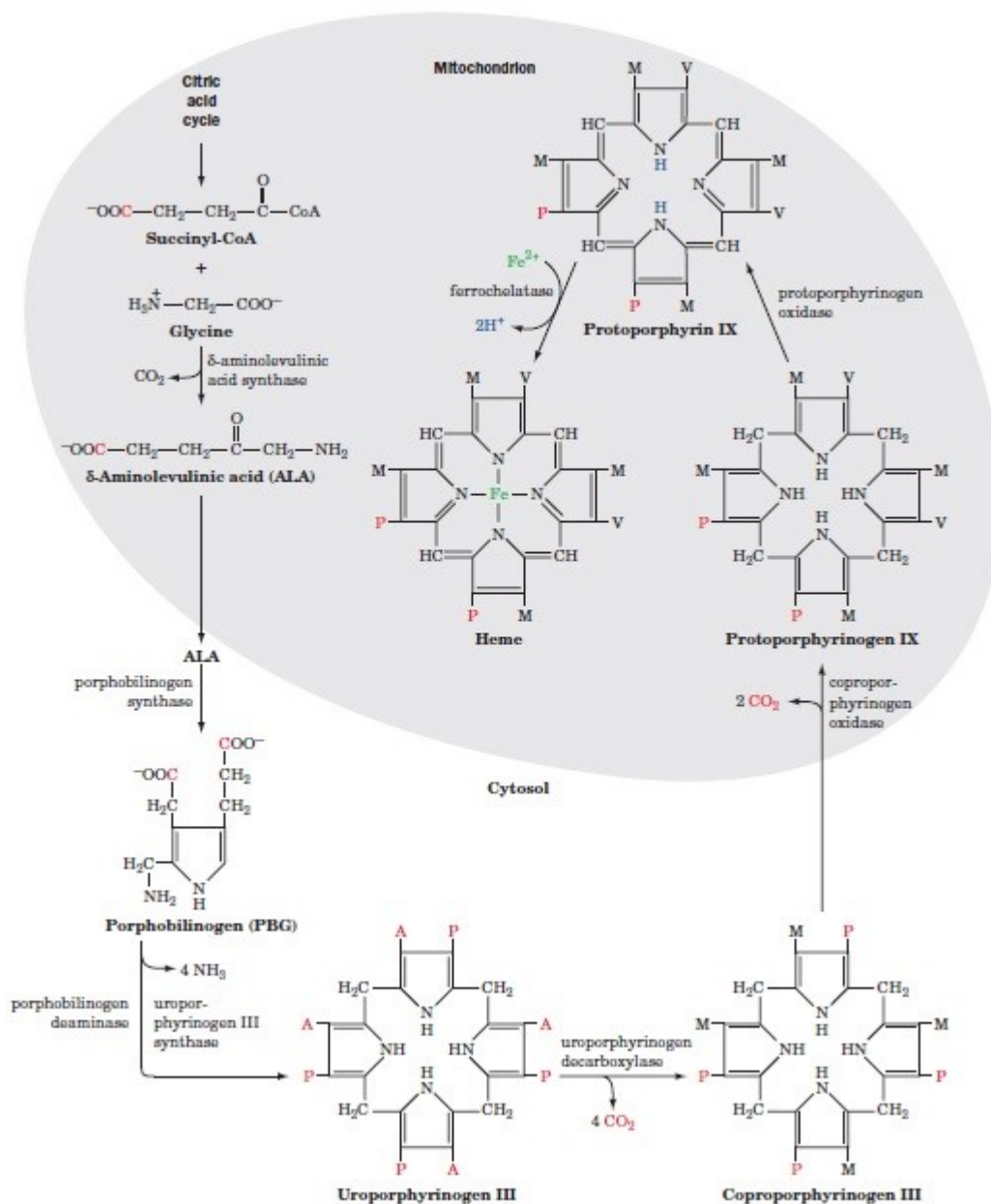
Biosyntéza ALA probíhá v mitochondriích odkud je transportována do cytosolu. V cytosolu pak probíhá syntéza porfobilinogenu (PBG) ze dvou molekul ALA za katalýzy enzymu porfobilinogensynthasy [1]. Biosyntéza PBG je znázorněna na obrázku 2, strana 12.



Obrázek 2 Syntéza porfobilinogenu v cytosolu, převzato z Voet, D., Voet, J.G.: *Biochemistry*, John Wiley & Sons, 2011 [1]. 1 – Vznik Shiffovy báze, 2 – dehydratace + vznik druhé Shiffovy báze, 3 – vznik karbaniontu, 4 – aldolová kondenzace a zacyklení kruhu, 5 – eliminace NH_2 skupiny a následná tautomerace – 6.

Protoporfyrin IX vzniká ze 4 molekul PBG. Po spojení 4 molekul PBG, které jsou vzájemně spojeny α -methinovými můstky, vzniká uroporfyrinogen III. Uroporfyrinogen je produktem více reakcí, které jsou katalyzovány enzymy uroporfyrinogensynthasou a uroporfyrinogen III-kosynthasou. Kosynthasa hraje velmi důležitou roli při cyklizaci, pokud by nebyla přítomna, proběhla by cyklizace neenzymaticky za vzniku symetrické molekuly uroporfyrinogenu I. Hem je však asymetrická molekula, což dokazuje poloha methylové skupiny na 4 molekulě PBG, která je orientovaná opačně vůči ostatním třem molekulám PBG. Uroporfyrinogen III je následně dekarboxylován enzymem uroporfyrinogendekarboxylasou za vzniku koporfyrinogenu III. V dalším kroku je syntetizován protoporfyrinogen IX pomocí

enzymu koproporfyrinogensynthasy a transportován do mitochondrií, kde je podroben oxidaci pomocí protoporfyrinogenoxidasy na protoporfyrin IX. Finálním krokem je fixace železa pomocí ferrochelatasy a vznik hemu [1,3]. Kompletní přehled biosyntézy hemu a kompartmentace jednotlivých částí syntézy je znázorněna na obrázku 3, strana 13.



Obrázek 3 Kompletní přehled biosyntézy hemu a jeho buněčná kompartmentace, převzato z Voet, D., Voet, J.G.: *Biochemistry*, John Wiley & Sons, 2011 [1]. Substituenty v β -polohách uhlíkového skeletu: A – acetyl, M – methyl, P – propionyl, V – vinyl.

Protoporfyrin IX se chová jako slabá dvojsytná kyselina, která je v alkalickém prostředí schopna navázat iont kovu namísto dvou pyrolových atomů vodíku. V případě hemu se jedná o iont železa, který tvoří s protoporfyrinem IX nejstabilnější komplexy. Hem je proto také označován jako ferroprotoporfyrin IX. Z hlediska stability jsou oktaedrické komplexy nejstabilnější, hem je ovšem charakterizován jako tetrakomplex a má dvě nenasycené koordinační vazby. Využitím volných elektronových párů těchto nenasycených koordinačních vazeb je hem schopen vázat různé ligandy. Toho je využíváno právě při vzniku hemoproteinů, kdy je hem vázán nejčastěji přes dusík imidazolového kruhu histidinu nebo přes thiolátovou skupinu cysteinu [1,3,4].

Hemoproteiny se rozdělují do čtyř skupin, každá skupina má charakteristickou vlastnost a funkci v organismu:

- I. Transporty a rezervoáry kyslíku
- II. Přenašeče kyslíku
- III. Hemové enzymy
- IV. Hemové senzorové/signalizační hemoproteiny

I. Přenašeče plynů

Do této skupiny hemoproteinů patří hemoglobin a myoglobin [1]. Myoglobin slouží k ukládání kyslíku ve svalech, hemoglobin je využíván jako přenašeč kyslíku, v některých případech dojde k přenašení i oxidu uhelnatého, oxidu dusného a sulfanu při otravách [1,3]. Hemoglobin je obsažen v organismu většiny živočichů, kteří ho potřebují k transportu kyslíku. Jen velmi malé organismy hemoglobin nevyužívají, ty získávají kyslík ze vzduchu prostou difuzí. Jediný příklad obratlovce, který nevyužívá hemoglobin k transportu kyslíku je čeleď antarktických ryb *Chaenichthyidae* [5]. Hemoglobin je složen ze 4 podjednotek (ze dvou α a ze dvou β), každá podjednotka obsahuje jednu molekulu hemu jako prostetickou (nebílkovinnou) část [6]. Hem je navázán na globinovou část proteinu pomocí histidinu F8, pokud není navázána molekula plynu je hem pentakoordinovaný a tvoří „pyramidu“, v případě že je přítomna i molekula plynu je hem hexakoordinovaný a tvoří „osmistěn“ [1]. V případě hemoglobinu je iont železa ve formě Fe^{2+} , tato forma může být oxidována na iont železa Fe^{3+} a vznikat tak methemoglobin (metHB). Tato forma již není schopna vázat kyslík a dochází ke změně barvy krve z červené na hnědou. V červených krvinkách je obsažen enzym methemoglobinreduktasa,

kteřá je schopna redukovat malé množství spontánně vzniklého methemoglobinu na hemoglobin [3].

Funkce myoglobinu není omezena pouze na zásobárnu kyslíku, ale jeho hlavní fyziologická funkce je usnadnění transportu kyslíku ve svalech [3]. V myoglobinu připadá na jednu jednotku globinu jedna molekula hemu [3]. V roce 1958 byla objasněna 3D struktura myoglobinu Johnem Kendrewem a stala se tak první 3D vyřešenou strukturou proteinu [7]. Koordinace hemu v myoglobinu a oxidační stavy železa jsou totožné s hemoglobinem. Myoglobin, kde je iont železa ve formě Fe^{3+} se nazývá metmyoglobin.

S mutacemi hemoglobinu souvisí mnoho onemocnění, mezi nejznámější patří srpkovitá anémie, při které dochází ke změně aminokyselin v postranních řetězcích hemoglobinu. Přesněji dochází ke změně aminokyseliny valinu na pozici 6 v β -řetězci hemoglobinu za glutamovou kyselinu. Po této mutaci se hemoglobin začíná chovat jako jeho deoxyforma a dochází ke shlukování hemoglobinů a deformaci krvinek [8].

II. Hemoproteiny spojené s přenosem elektronů

Do této skupiny spadají cytochromy obsažené v dýchacím řetězci. Jejich rolí je přenos elektronů z dehydrogenasových komplexů na kyslík pomocí změny oxidačního stupně železa. Cytochromy dále rozdělujeme podle typu hemu (nebílkovinná složka), který je navázán na jejich bílkovinnou složku. Cytochrom c obsahuje hem c, cytochrom a obsahuje hem a, kde se různé formy hemu liší podle substituentů v β -polohách porfyrinového skeletu [3].

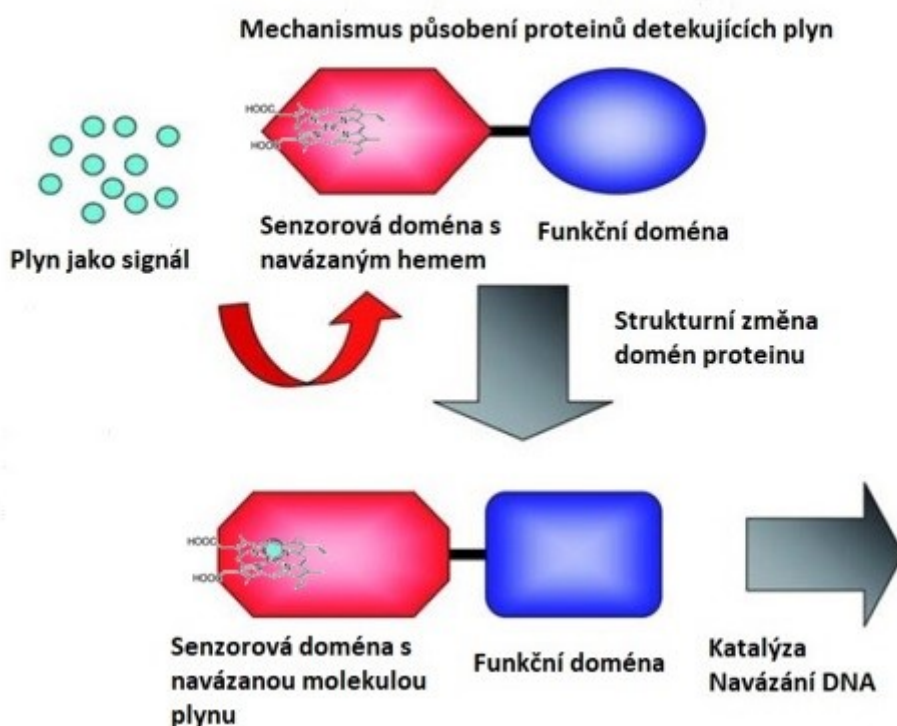
III. Hemoproteiny s enzymovou funkcí

Do této kategorie patří enzymy, které mají jako nebílkovinnou složku hem. Mezi hlavního zástupce lze zařadit cytochrom P450. Cytochrom P450 má název odvozen od absorpčního pásu jeho redukované formy v komplexech s oxidem uhelnatým v oblasti UV-VIS při vlnové délce 450 nm – Soretův pás. Jeho funkcí je katalyzovat reakce molekulárního kyslíku, účastní se metabolismu endogenních látek a je přítomen při biotransformaci xenobiotik [1,3].

IV. Senzorové/signalizační hemoproteiny

Tyto proteiny dále rozdělujeme na proteiny detekující plyn a proteiny detekující hem[9]. Proteiny detekující plyn obsahují ve své N-terminální doméně hem jako nebílkovinnou složku,

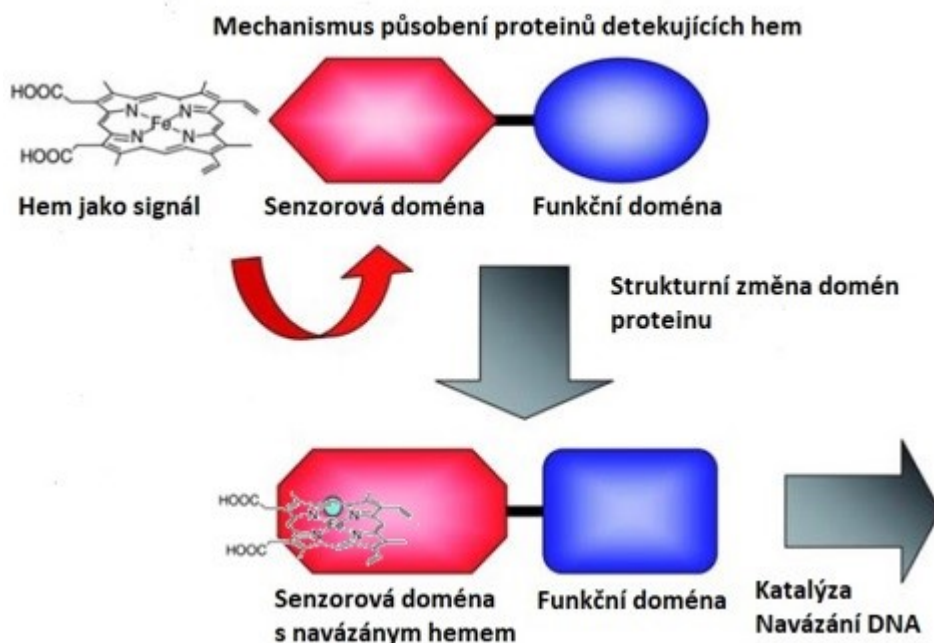
kteřá slouží pro detekci plynu. Na C-konci se nachází funkční doména, která zprostředkovává odpověď po navázání plynu na N-terminální doménu [9,10]. Iont železa je v molekule hemu pentakoordinovaný, šestá vazba je volná pro vhodný ligand. Vhodným ligandem jsou molekuly plynu např. O₂, NO, CO a H₂S [10]. V momentě, kdy je v prostředí proteinu detekujícího plyn dostatečná koncentrace plynu, naváže se na molekulu hemu a dojde ke strukturní změně N-terminální (senzorové) domény. Po strukturní změně sensorové domény dochází i ke strukturní změně funkční domény, což vede k vyvolání odpovědi v podobě navázání DNA, enzymové katalýze nebo k aktivaci transkripčního faktoru [9]. Mechanismus účinku proteinů detekujících plyn je naznačen na obrázku 4, strana 16.



Obrázek 4 *Mechanismus působení proteinů detekujících plyn*, převzato a upraveno podle *The Roles of Thiolate-Heme Proteins, Other Than the P450 Cytochromes, in the Regulation of Heme-Sensor Proteins* [9]. Po vazbě molekuly plynu k hemu v sensorové doméně dojde ke změně konformace této domény. To vyvolá strukturní změnu funkční domény, což aktivuje její funkci (enzymová katalýza, vazba DNA).

Druhou skupinou hemových sensorových proteinů jsou proteiny detekující hem. Tyto proteiny detekují signál v závislosti na koncentraci hemu v okolí. Proteiny, které detekují hem, mají dvě domény, sensorovou a funkční. Mechanismus detekce a následné odpovědi proteinů detekujících hem je popsán na obrázku 5, strana 17. Když je v okolí proteinu zvýšená koncentrace hemu, naváže se na sensorovou doménu, která tak změní konformaci. Po změně

konformace sensorové domény dochází ke strukturní změně funkční domény, která dává signál, např. ke katalytické činnosti enzymu, navázání DNA nebo aktivaci transkripčního faktoru [9,10].



Obrázek 5 Mechanismus působení proteinů, které detekují hem, převzato a upraveno podle *The Roles of Thiolate-Heme Proteins, Other Than the P450 Cytochromes, in the Regulation of Heme-Sensor proteins* [9]. Po vazbě molekuly hemu k sensorové doméně dochází ke změně její konformace. To vyvolá strukturní změnu funkční domény, což způsobí její aktivaci (enzymová katalýza, vazba DNA).

Proteiny detekující hem mají většinou hem vázaný přes thiolátovou skupinu cysteinu. Tato vazba není tak silná jako vazba zprostředkovaná pomocí imidazolové skupiny histidinu, protože cystein je vedle aminokyseliny prolinu, což vede ke vzniku CP-motivu, který bude popsán níže v textu a hem tak může snadno disociovat. Disociace hemu v případě sensorových proteinů, kde je hem vázaný na proteinovou část přes thiolátovou skupinu cysteinu, je mnohem větší než disociace hemu v případě hemoglobinu, myoglobinu, kdy je hem vázán na globin přes dusík imidazolové skupiny histidinu [10,11]. Podíváme-li se na hodnoty konstant disociace vybraných zástupců, inhibitor regulovaný hemem (HRI, z angl. heme regulated inhibitor) jako protein detekující hem s hemem vázaným přes thiolátovou skupinu a hemoglobin jako zástupce globinového proteinu s hemem vázaným přes dusík v imidazolovém kruhu, hodnoty konstant rychlosti disociace jsou $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ pro HRI [11] a $7,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ pro hemoglobin [12]. Rozdíl disociačních konstant těchto zástupců se liší o tři řády. Afinita hemu k hemoglobinu je závislá na rychlosti disociace, s rostoucí disociací hemu klesá jeho afinita k bílkovinové části [10]. Tato

vlastnost je velmi důležitá pro správnou funkci proteinů detekujících hem, jednak kdyby afinita k hemu byla příliš vysoká, docházelo by k irreverzibilnímu navázání hemu k sensorové doméně proteinů a ke kompletní deaktivaci daného senzoru a fatálnímu ovlivnění fyziologických funkcí. Také by docházelo k navázání a detekování hemu již při nízkých koncentracích hemu v okolí proteinu a nedocházelo by tak k fyziologickým regulacím potřebných pro organismus. Rychlost disociace je ovlivněna pevností vazby, thiolátová skupina a její schopnost vázat hem je ovlivněna pozicí aminokyselin vedle cysteinů, který zprostředkovává thiolovou skupinu a také je ovlivněna oxidačně redukční formou železa ve které je přítomné [10,11].

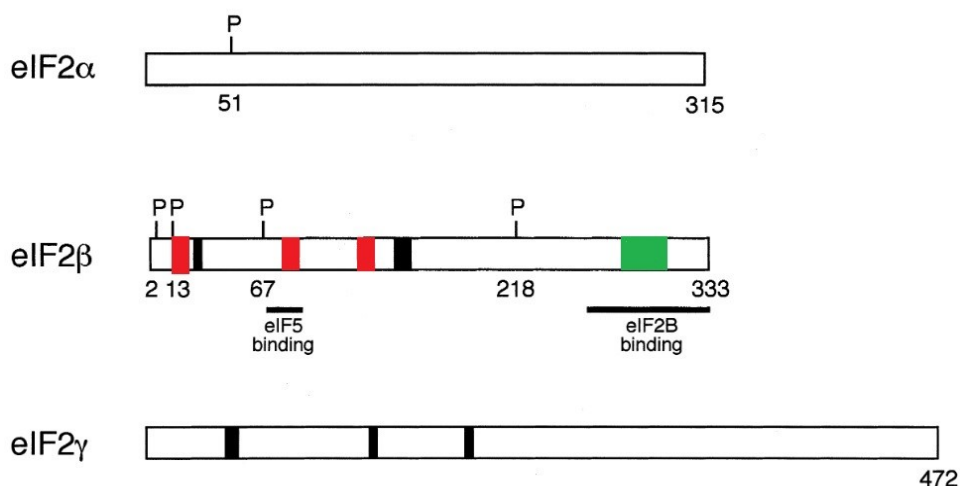
Při pozici aminokyselin je využíváno hemového regulujícího motivu (HRM z angl. heme regulatory motif) někdy označovaného jako CP motiv (z angl. cystein-prolin motif) [10,13]. CP motiv je důležitý pro funkci sensorových proteinů, prolin moduluje vlastnosti thiolátové skupiny cysteinu, což vede ke snadnější a rychlejší disociaci hemu [10,13]. Sensorové proteiny mohou mít více CP motivů, například HRI má dva CP motivy na pozici Cys409 a Cys550. Pokud byl Pro410 vedle Cys409 mutován, HRI ztratil schopnost vázat hem [14]. Tento příklad potvrzuje významnost CP motivů. Ne všechny CP motivy jsou však plně využity k detekci hemu.

Další možností regulace signalizace je reakce na redoxní stav v organismu. U některých sensorových proteinů dochází v důsledku redoxního stresu ke změně iontu železa z formy Fe^{3+} , tedy formy, ve které je iont železa v sensorových proteinech obvykle přítomen, na formu iontu Fe^{2+} . Dvojmocné železo (redukováná forma) lépe váže ligandy obsahující dusík. Typickým příkladem je imidazolový kruh histidinu, který z důvodu redoxního stresu může nahradit thiolovou skupinu cysteinu, tedy cystein bude nahrazen histidinem a dochází tak ke změně struktury sensorové domény, tedy i následné změně funkční domény. Tento mechanismus je tedy vedle hlavního signálního mechanismu, který je popsán na obrázku 5, strana 17, dalším možným typem mechanismu signalizace sensorových proteinů [10].

Další charakteristická vlastnost proteinů, které detekují hem, je jejich flexibilní struktura, která je odlišuje od ostatních hemoproteinů. Flexibilita proteinů detekujících hem je popsána na vybraném zástupci této skupiny hemoproteinů v samostatné kapitole věnované HRI (kapitola 1.2.1.4).

1.2 Eukaryotický iniciační translační faktor 2

Eukaryotický translační iniciační faktor 2 (eIF2) byl objeven přibližně před 40 lety, kdy byl popsán jako protein, který váže GTP a zprostředkovává propojení 40s podjednotky ribosomu s Met-tRNA_i [15]. eIF2 je protein, který je složený z 3 odlišných podjednotek α , β , γ [16]. Jednotlivé podjednotky eIF2 jsou popsány na obrázku 6, strana 19.

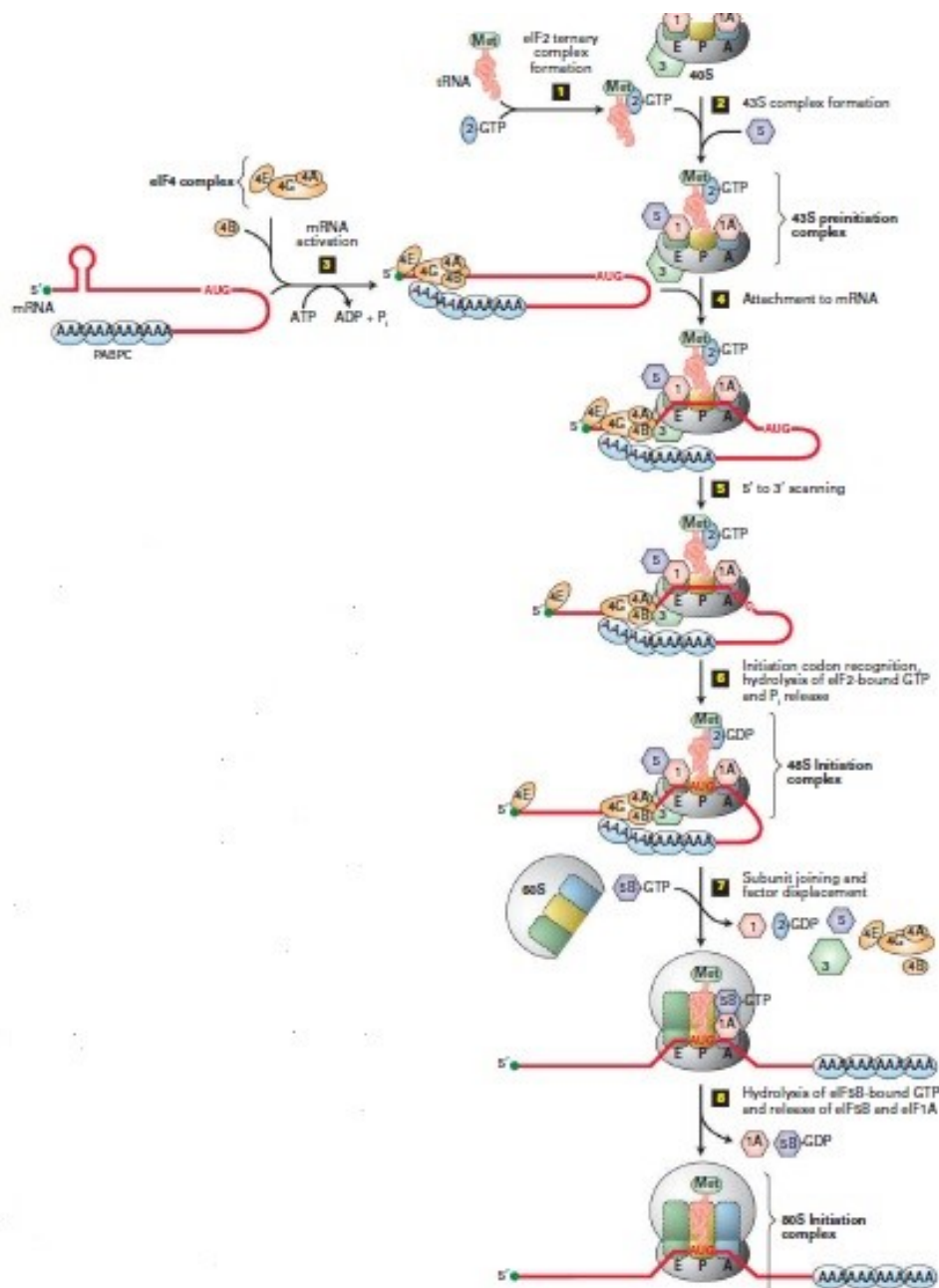


Obrázek 6 Zobrazení jednotlivých podjednotek eIF2, převzato a upraveno podle S.R. Kimball. "Eukaryotic initiation factor eIF2". *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999. 31(1): 25–29 [16]. Čísla vpravo pod každým schématem podjednotky znázorňují počet aminokyselin v jednotlivých podjednotkách. P nad jednotlivými částmi řetězců značí fosforylační místa s pořadím aminokyseliny na jaké k fosforylaci dochází. Červené pruhy znázorňují polylysinové domény, černé pruhy znázorňují vazebná místa pro guaninové nukleotidy, zelená místa znázorňují vazebné místo pro výměnný faktor eIF2B.

U eIF2 α dochází k fosforylaci na Ser51 pomocí eIF2 α kinas, kterým bude věnována samostatná kapitola 1.2.1 Kinasy eukaryotického iniciačního faktoru 2 α . U eIF2 β dochází k fosforylaci na Ser2 a Ser67 pomocí kaseinové kinasy 2 (CK-2), další fosforylační místo je na Ser13, který je fosforylován pomocí proteinové kinasy C a fosforylační místo na Ser218 je fosforylováno pomocí proteinové kinasy A [16,17]. Červená místa na obrázku 6, strana 19, znázorňují polylysinové domény, které jsou složeny z 6-8 lysinů. Tyto domény poskytují vazebné místo pro eukaryotický translační iniciační faktor 5 (eIF5), které je znázorněno na obrázku 6, strana 19 vodorovnou černou čarou pod eIF2 β podjednotkou [16,18]. Na C-konci eIF2 β podjednotky se nachází vazné místo pro sekundární translační iniciační faktor 2 (eIF2B), které je znázorněno na obrázku 6, strana 19 zeleně. Toto místo obsahuje motiv zinkového prstu [16,19]. Tento motiv obsahuje tetraedrální ligand Zn^{2+} který je koordinčně navázaný přes

histidinový a cysteinový zbytek. Tento motiv se využívá k interakci proteinů s DNA nebo RNA [1].

eIF2 má důležitou funkci při procesu iniciace translace, kde je zodpovědný za interakci Met-tRNA_i s malou 40s podjednotku ribosomu [20]. Proces iniciace translace je vyznačen na obrázku 7, strana 20.



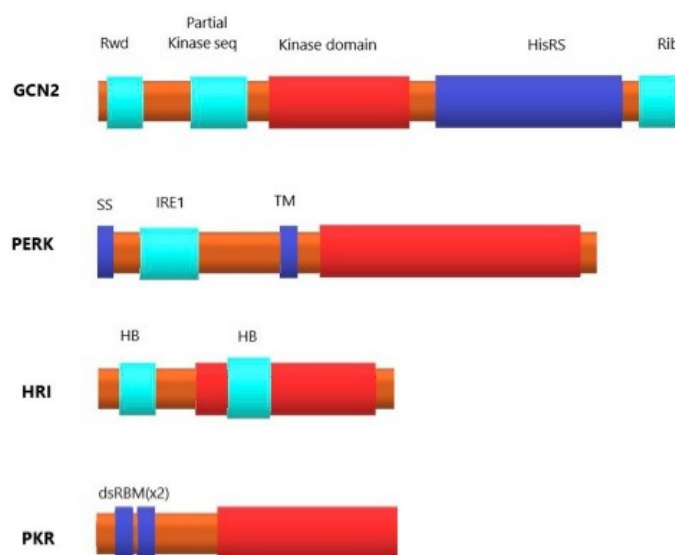
Obrázek 7 Schéma iniciace translace, převzato z H. Lodish, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. W. H. Freeman, 2000 [20].

V první fázi iniciace translace dochází k navázání GTP na eIF2 (GTP se může vázat na β i γ podjednotku eIF2), po navázání tRNAⁱ-Met na eIF2-GTP dochází k zformování trojného komplexu eIF2-Met-tRNAⁱ^{Met}-GTP. Po disociaci ribosomu na malou a velkou podjednotku je na malou podjednotku 40s dopraven trojný komplex eIF2-Met-tRNAⁱ^{Met}-GTP a pomocí eIF5 dochází ke zformování 43s preiniciačního komplexu. Současně dochází k aktivaci mRNA na kterou se naváže multikomplex eIF4, eIF4E se naváže na čepičku na 5-konci mRNA a eIF4G naváže několik jednotek polyadenin-vázacího protein (PABPC), který naváže mRNA k polyadeninovému konci. K tomuto cirkulárnímu komplexu se připojí eIF4B, který stimuluje eIF4A helikasovou aktivitu. Cirkulární komplex eIF4-mRNA interaguje s preiniciačním komplexem 43s. Po navázání dojde k aktivaci eIF4A helikasy, která rozvine všechny RNA na 5 konci a začne skenovat mRNA ve směru 5'→3' dokud nenarazí na startovní kodon AUG. Po rozpoznání startovního kodonu eIF5 stimuluje hydrolýzu vazby eIF2-GTP a 43s podjednotka změní konformaci na 48s iniciační komplex s antikodonem tRNAⁱ-Met, který je připraven se navázat na kodon AUG na P straně 40s podjednotky ribosomu. Následně dojde k navázání 60s podjednotky na 40s podjednotku, hydrolyzují se všechny eukaryotické translační iniciační faktory (eIFs) a dochází k navázání eIF5B-GTP k eIF1A na A straně 40s ribosomu. eIFs a PABPC jsou regenerovány a připraveny na reakci s dalším 43s preiniciačním komplexem. Po správné interakci 40s a 60s podjednotky vzniká 80s jednotka ribosomu. Dochází k hydrolýze eIF5-GTP, vypuštění eIF5-GDP a eIF1A za vzniku iniciačního komplexu 80s s tRNAⁱ methioninu na P straně ribosomu [15,20].

1.2.1 Kinasy eukaryotického iniciačního faktoru 2 α

Kinasy eukaryotického iniciačního faktoru 2 α (eIF2 α kinasy z angl. eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase) jsou zodpovědné za regulační procesy tvorby proteinů v důsledku negativních vlivů jako např. nedostatek aminokyselin v organismu, nahromadění proteinů s chybnou terciální strukturou v buňce, virové infekce nebo pokles koncentrace hemu [21]. U savců jsou známy 4 typy eIF2 α kinas. GCN2 (z angl. general control non-depressive 2 eIF2 α kinase), pankreatická eIF2 α kinasa (PEK, z angl. pancreatic eIF2 alpha kinase) někdy také označována jako PKR podobná kinasa endoplasmatického retikula, (PERK z angl. PKR-like endoplasmic reticulum kinase), třetí v pořadí je označovaná jako proteinkinasa R (PKR, z angl. protein kinase R) a čtvrtá kinasa je HRI [21,22]. eIF2 α kinasy

jsou součástí preiniciačního komplexu 43s. Vznik komplexu probíhá v počáteční fázi iniciace translace, kdy eIF2 naváže GTP za vzniku komplexu eIF2-GTP ten pak interaguje s tRNAⁱ methioninu za vzniku komplexu eIF2-Met-tRNAⁱMet-GTP, eIF2 komplex se váže pomocí eIF1, eIF1A a eIF3 na 40s podjednotku ribosomu a spolu s eIF5 formuje 43s komplex (obrázek 7, strana 20) [20,23]. eIF2 α kinyasy jsou více doménové proteiny, které vedle svých specifických domén vždy obsahují kinasovou doménu, která je využívána při fosforylaci α -podjednotky eIF2 v mechanismu účinku eIF2 kinas [24]. Přehled a popis jednotlivých domén je uveden na obrázku 8, strana 22.

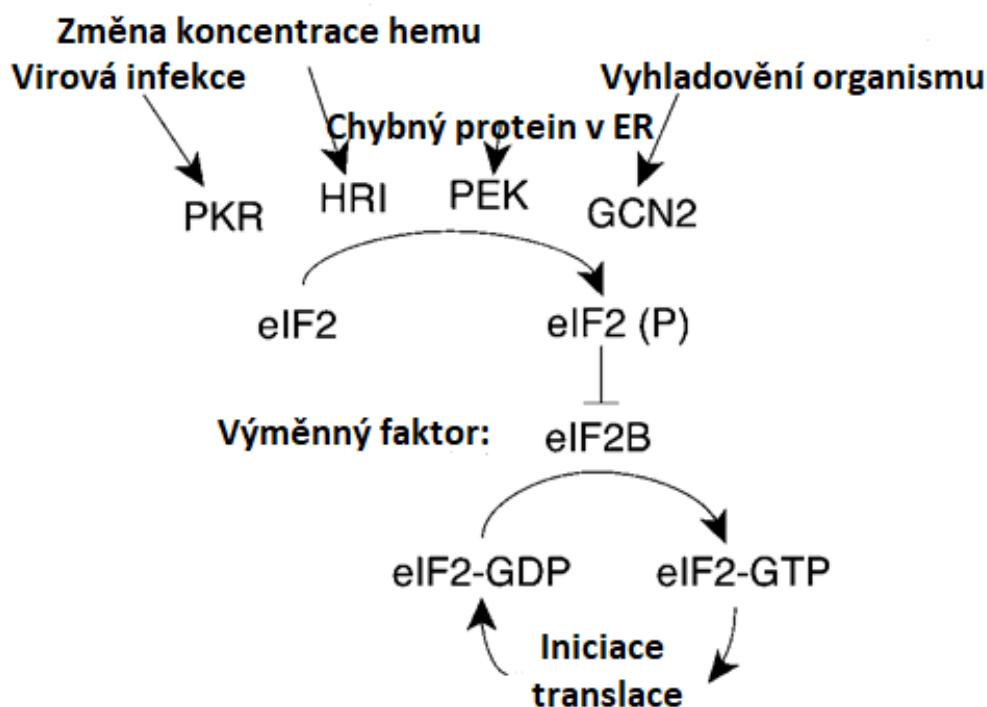


Obrázek 8 Přehled domén u jednotlivých eIF2 α kinas, převzato z E. Chesnokova, N. Bal, P. Kolosov. “Kinases of eIF2 α Switch Translation of mRNA Subset during Neuronal Plasticity”. *Int. J. Mol. Sci.* 2017. 18(10) [22]. Je zde zobrazeno rozdílné doménové uspořádání čtyř eIF2 α kinas (GCN2, PERK, HRI, PKR). Tyto eIF2 α kinyasy obsahují vždy kinasovou doménu (označeno červeně) a další segmenty (označeno různě barevnými pruhy, jejich význam je popsán v následujícím textu).

Každá eIF2 α kinasa obsahuje kinasovou doménu (na obrázku 8, strana 22 vyznačeno červeným pruhem). GCN2 je z hlediska domén nejsložitější z eIF2 α kinas, obsahuje vedle kinasové domény ještě RWD sekvenci, která je propojena s GCN1 (z angl. general control of amino-acid synthesis 1-like protein 1), která zodpovídá za správnou regulaci syntézy aminokyselin v organismu, dále obsahuje pseudo-kinasovou doménu, která slouží jako cis-regulátor (regulátor transkripce na stejné molekule [20]), HisRS-related doména slouží k navázání tRNA, které se hromadí v cytoplasmě [22,24,25]. PERK obsahuje vedle kinasové domény transmembránovou doménu (TM, z angl. transmembran segment), kterými rozděluje PERK na dvě části, doménu signální sekvence (SS z angl. signal sequence), která usnadňuje

lokalizaci části PERK v lumenu endoplasmatického retikula a IRE1 domény, která je zodpovědná za detekci proteinů s chybnou terciální strukturou v endoplasmatickém retikulu [24]. PKR obsahuje kromě kinasové domény také dva motivy vázající dvouvláknovou RNA (dsRBM, z angl. double strand RNA binding motifs), které slouží k detekci a interakci dvouvláknové RNA [22,24]. HRI obsahuje navíc kromě kinasové domény dvě vazebná místa pro molekulu hemu (na obrázku 8, strana 22 znázorněné jako HB) [22,24].

Mechanismus účinku eIF2 α kinas je shodný pro všechny výše uvedené čtyři typy, tento mechanismus je znázorněn na obrázku 9, strana 23 [11,25].



Obrázek 9 Mechanismus působení eIF2 α kinas, převzato a upraveno podle R.C. Wek, H.-Y. Jiang, T. Anthony. Wek RC, Jiang HY, Anthony TG. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* 34:7-11. 2006 [25]. Po fosforylaci eIF2 prostřednictvím některé z eIF2 α kinas dochází k jeho interakci s eIF2B. Tímto nedochází k přeměně eIF2-GDP na eIF2-GTP a tím je inhibován iniciační krok translace.

Pokud je organismus vystaven nějaké ze stresových podmínek (nedostatek aminokyselin, virová infekce, nedostatečná koncentrace hemu atd.) dojde k aktivování eIF2 α kinas, které následně pomocí kinasové domény fosforylují eIF2 α podjednotky na Ser51. V dalším kroku dochází k navázání eIF2B, který působí jako inhibitor substrátu eIF2 α a po interakci dochází k ukončení translace proteinů v buňce [22,25,26].

1.2.1.1 GCN2

Jak bylo uvedeno výše při popisování domén jednotlivých eIF2 α kinas, GCN2 je strukturně nejsložitější z eIF2 α kinas a je zodpovědná za regulaci proteosyntézy s ohledem na množství aminokyselin v organismu [22]. První zmínky o funkci GCN2 pojednávaly pouze o regulaci koncentrace histidinu v organismu, čemuž odpovídá i prvotní název jedné z jeho domén (HisRS z angl. his related domain). GCN2 zodpovídá za navázání nahromaděných volných tRNA v cytoplasmě, které by vznikly v důsledku nepřítomnosti aminokyselin (např. při hladovění) [21,22,27]. Po dalším zkoumání GCN2 bylo ověřeno, že GCN2 detekuje volné tRNA v nepřítomnosti všech typů aminokyselin v cytoplasmě a její aktivace může být navíc způsobena také virovou infekcí, inhibicí proteasomu nebo UV ozářením [22,25,28].

1.2.1.2 Protein kinasa R

PKR je nejlépe charakterizovanou eIF2 α kinasou. PKR je aktivována v důsledku virové infekce, za což odpovídají dsRBM motivy na N-konci (obrázek 8, strana 22). V případě, kdy nedochází k virové infekci, interaguje tento dsRBM motiv s C-koncem, čímž je inhibována kinasová aktivita. V případě, kdy není v dosahu dvouvláknová RNA jako důsledek virové infekce, dojde k rozvolnění této interakce a je aktivována kinasová doména, čímž dojde k inhibici proteosyntézy [22,25]. K detekci virové infekce ještě napomáhá proteinový aktivátor (PACT, z angl. protein activator), který je fosforylován v důsledku různých stresových situací v organismu [22]. PKR se vyskytuje pouze v obratlovcích, kde je lokalizována v cytosolu a v jádře buňky [29]. PKR vedle detekce virové infekce, zabraňuje translaci virové mRNA a také podporuje apoptosu (řízenou smrt buňky) v důsledku virové infekce. Z toho vyplývá, že aktivace PKR většinou vede k iniciaci (spuštění) apoptosy [20,22,28,29].

1.2.1.3 PKR-podobná kinasa endoplasmatického retikula

PERK je transmembránový protein, který je zakotven v lumenu endoplasmatického retikula ze kterého vyčnívá jeho kinasová doména do cytoplasmy [21,22]. PERK dohlíží na správné prostorové uspořádání proteinů a jejich následné ukládání do endoplasmatického retikula. Pokud dochází k nahromadění proteinů v endoplasmatickém retikulu v důsledku

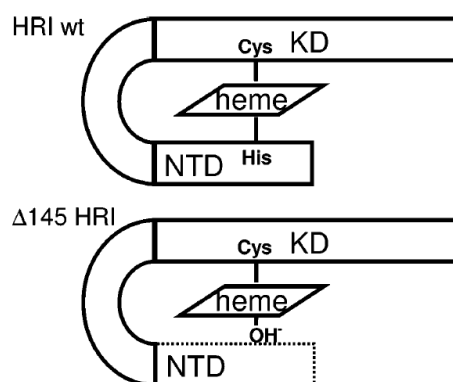
nahromadění proteinů s chybnou komformací, dochází k aktivaci PERK a následné fosforylaci eIF2 α podjednotky (mechanismus je popsán na obrázku 9, strana 23). Tento mechanismus vede ke snížení transportu nativních proteinů do endoplasmatického retikula a tím dojde k zabránění hromadění proteinů s chybou v jejich terciální struktuře v endoplasmatickém retikulu [22,24,25,30]. Tento mechanismus slouží jako obrana vůči mnoha chorobám, které jsou způsobeny v důsledku kumulace proteinů s chybnou strukturou v buňce. PERK tak může být velmi důležitým prvkem v procesu léčby mnohých závažných onemocnění, jako je například Alzheimerova choroba nebo Parkinsonova choroba [31].

1.2.1.4 Inhibitor regulovaný hemem

HRI je protein o molekulové hmotnosti 71,106 Da, skládá se z 630 aminokyselin a hodnota izoelektrického bodu (pI) tohoto proteinu je 5,68 [32]. HRI reguluje syntézu proteinu v závislosti na koncentraci hemu v buňce. Pokud je koncentrace hemu v buňce dostatečná, podjednotka eIF2 α není fosforylovaná a syntéza proteinů probíhá. V případě, kdy je z nějaké příčiny, nedostatek hemu, dochází k aktivaci HRI a katalytická doména HRI fosforyluje eIF2 α podjednotku, čímž dochází k zastavení syntézy proteinů v buňce [26,33,34]. Tento proces zajišťuje, aby poměr globinu k hemu byl 1:1 a v případě hemového deficitu tak nedocházelo k hromadění volných molekul globinu, což by jinak vedlo až k usmrcení buňky [26,33]. HRI není obsažen pouze v retikulocytech, kde plní výše zmíněnou funkci, ale byl nalezen v mnohých dalších buňkách, jako například v plicích a mozkových [35].

První studie o HRI ukázaly, že HRI může vázat jednu nebo dvě molekuly hemu, protože molekula HRI má dvě vazebná místa pro tuto molekulu [36]. Jedna je obsažená na C-konci v katalytické doméně a druhá na N-konci [26,36]. Dříve se předpokládalo, že jedna molekula hemu se váže na jedno vazebné místo a druhá molekula hemu se váže na druhé místo, toto uspořádání je přiblíženo na obrázku 8, strana 22. Modernější studie toto tvrzení vyvrátily a bylo tedy zjištěno, že na jednu molekulu HRI připadá pouze jedna molekula hemu, která je vázaná mezi dvě vazebná místa na N-konci a C-konci katalytické domény [26]. Toto uspořádání je znázorněno na obrázku 10, strana 26, kde je vyznačena interakce hemu s cysteinem v katalytické doméně a histidinem v N-terminální doméně v případě wild type (WT) HRI [26,37]. V důsledku signálu a navázání hemu k sensorové doméně dochází ke změně z volně

pohyblivé flexibilní struktury bílkovinné části sensorové domény na strukturu, která je fixována navázaným hemem, který je vázán axiálními ligandy His 119/120 a Cys409 [10].



Obrázek 10 Znárodnění jednotlivých domén HRI pro navázání jedné molekuly hemu, převzato z M. Miksanova, J. Igarashi, M. Minami, I. Sagami, S. Yamauchi, H. Kurokawa, et al. “Characterization of heme-regulated eIF2 α kinase: roles of the N-terminal domain in the oligomeric state, heme binding, catalysis, and inhibition”. *Biochemistry (Mosc.)*. 2006. 45(32) [26]. V horní části obrázku je HRI ve své přirozené formě (WT z anglického wild type) a v dolní části je znázorněna mutantní forma proteinu HRI, která neobsahuje N-terminální doménu (NTD). Z obou znázornění je zřejmé, že poměr molekul hemu k molekule HRI je 1:1 bez ohledu na to, kolik vazebných míst se v molekule HRI nachází.

Afinita molekuly hemu k HRI je nižší než afinita k myoglobinu či hemoglobinu [26], což potvrzuje i obecné pozorování, že sensorové hemoproteiny mají nižší afinitu než ostatní hemoproteiny [10] (kapitola 1.1).

Přenos fosfátu na eIF2 α podjednotku HRI je zprostředkován pomocí katalytické domény, která ke své funkci překvapivě nepotřebuje N-terminální doménu. Katalytická aktivita HRI v jeho přirozené formě a HRI který neobsahoval N-terminální doménu, byla stejná [26]. Tuto vlastnost vykazují i ostatní hemové sensorové proteiny například fosfodiesterasa, která detekuje kyslík z *Escherichia coli* (EcDOS) [38]. Hlavní význam N-terminální domény HRI je oligomerizace proteinu (domény) a detekce hemu spolu s organizací substrátu pro působení katalytické domény [26]. Katalytická efektivita HRI je závislá na koncentraci hemu - při nízkých koncentracích je HRI aktivní, při vysokých koncentracích hemu dochází k částečné inhibici a aktivita HRI klesá [26]. Tím je zaručena produkce optimálního množství hemoglobinu v buňce v závislosti na koncentraci hemu. Dalšími inhibitory HRI jsou degradační

produkty hemu např. biliverdin a bilirubin. Mnohé studie ukázaly, že metabolické produkty degradace hemu ve vysokých koncentracích jsou neurotoxické a jejich hromadění v organismu je zdrojem patologických stavů [39]. Z těchto důvodů je regulace syntézy hemoglobinu prostřednictvím HRI velmi důležitá, aby poměr hemu a globinu byl 1:1 a nedocházelo tak ani k hromadění hemu a jeho metabolických produktů z důvodů jejich toxicity ani k hromadění globinů. Výzkum týkající se HRI je tak úzce propojen s možností vývoje léčiv vůči chorobám spojenými s poruchou proteosyntézy [26].

2 Cíle bakalářské práce

- Jedním z cílů této bakalářské práce bylo shrnutí dosavadních poznatků o hemových senzorních proteinech publikovaných v odborných časopisech.
- Dalším cílem byla příprava, amplifikace a izolace plasmidu pET-21c(+)/HRI a pET-21c(+)/eIF2 α v buňkách *Escherichia coli* DH5 α s následnou charakterizací izolovaného plasmidu.
- V neposlední řadě bylo úkolem bakalářské práce transformovat buňky *E. coli* BL-21(DE3) plasmidem pET-21c(+)/HRI respektive pET-21c(+)/eIF2 α a exprimovat dané rekombinantní eukaryotické proteiny v uvedených bakteriálních buňkách.
- Nejdůležitější úkol předkládané bakalářské práce pak spočíval v izolaci exprimovaných proteinů HRI a eIF2 α z buněk *E. coli* BL-21(DE3), jejich purifikaci pomocí afinitní chromatografie a následné pilotní charakterizaci s ohledem na jejich teplotní stabilitu.

3 Materiál a metody

3.1. Použité přístroje

Analytické váhy	HM-200, A&D Instruments LTD
Autokláv	Varioklav 400E, H+P Labortechnik
Bezdotykový kahan	Gasprof2 SCS, VLD-TEC
Centrifugy	5415 R, Eppendorf Allegro X-22R, Beckman Coulter Janetzki K 70 D, MLW Stolní minicentrifuga Gilson, GmC Lab Ultracentrifuga Optima™ LE-80K, Beckman Coulter
Čtečka mikrotitračních destiček	Sunrise Absorbance Reader, TECAN
Elektroforetická aparatura	Mini-PROTEAN Tetra Cell, Biorad MSMINI 10-Multi Sub Mini, Uvitec
HPLC systém	ÄKTAbasic systém, GE Healthcare
Inkubátory	IR 1500 Automatic CO2 Incubator, Flow Laboratories Mini Rocker MR-1, BioSan
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare
Laboratorní váhy	440-35N, KERN
Laminární box	BIO 126, Labox
Magnetická míchačka	KMO2 basic, IKA
Orbitální míchač	G 24, New Brunswick Scientific Multitron Pro, Infors HT
pH metr	Orion Star A111, Thermo Fisher
Přístroj pro elektropřenos	Trans-Blot®Turbo, Biorad
Spektrofotometry	Cary 60 UV-Vis, Agilent DS-11 Spectrophotometer, DeNovix
Termostat	LS1, VLM Labortechnik
Termocycler	Tech Gene FTGENE2D, Techne
Ultrazvukový homogenizátor	Sonopuls HD 3100, sonda KE 76, Bandelin
Zdroj pro elektroforesu	EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech

3.2 Použitý materiál a chemikálie

BD Life Sciences, USA:

Bacto Tryptone, Bacto Yeast Extract

Biorad, USA:

persíran amonný (APS), Precision Plus Protein Dual Color Standards, nitrocelulosová membrána

Clontech, USA:

TALON Metal Affinity Resin

Fluka, Švýcarsko:

dodecylsíran sodný (SDS), akrylamid, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS),merkptoethanol, lysozym

INVITROGEN, USA:

SYBR SAFE DNA gel stain

Lach-Ner, ČR:

glycerol, kyselina octová, bromfenolová modř, chlorid sodný, dihydrogenfosforečnan draselný, kyselina etylendiamin tetraoctová (EDTA), hydrogenfosforečnan draselný

New England BioLabs, USA:

Q5 High - Fidelity DNA polymerasa, 5x koncentrovaný Q5 reakční pufr, 5x Q5 CG enhancer, pufr CutSmart (50 mM octan draselný, 20 mM Tris-acetát, 10 mM octan horečnatý, 100 µg/ml BSA, pH 7,9), restriční endonukleasy NdeI a XhoI, 2-Log DNA Ladder, Loading Dye Purple 6x (2,5% Ficoll-400, 10 mM EDTA, 3,3 mM Tris-HCl, 0,08% SDS, 0,02% Dye 1, 0,0008% Dye 2, pH 8,0)

Monarch DNA Gel Extraction Kit: rozpouštěcí pufr - Monarch Gel Dissolving Buffer, promývací pufr Monarch DNA Wash Buffer (před použitím přidán ethanol dle návodu), extrakční kolony Monarch Cleanup Columns, eluční pufr Monarch DNA Elution Buffer

P-lab, ČR:

Luria-Bertani Agar, Luria-Bertani Broth, aprotinin, pepstatin A, leupeptin, ampicilin, agarosa

Promega, USA:

5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát (BCIP), nitrotetrazoliová modř (NBT)

QIAGEN, USA:

QIAprep Spin Miniprep Kit: Pufr P1 (resuspendační pufr s obsahem nespecifikované RNasy), Pufr P2 (lyzační pufr), Pufr N3 (neutralizační pufr), Pufr PE (promývací pufr – před použitím přidán ethanol dle návodu), Pufr EB (eluční pufr), QIAprep Spin Columns (kolony)

SERVA Electrophoresis, Německo:

N,N,N',N'-tetramethylethylendiimin (TEMED), Coomassie Brilliant Blue R-250, fenylmethylsulfonyl florid (PMSF)

SIGMA Aldrich, USA:

isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), InstantBlue™ Protein Stain

Stratagen, USA:

Bakteriální kmeny *E. coli* BL-21 (DE3) a *E. coli* DH5 α

Thermo Scientific, USA:

Pierce BCA Protein Assay Kit: BCA Reagent A (uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, kyselina bichinoninová, vlnan sodný v 0,1 M hydroxidu sodném); BCA Reagent B (4% síran měďnatý), Albumin Standard Ampules, 2 mg/ml: 10 x 1 ml ampule obsahující hovězí sérový albumin (BSA) o koncentraci 2 mg/ml v 0,9% fyziologickém roztoku s přídatkem 0,05% azidu sodného)

Top-Bio, ČR:

směs nukleotidtrifosfátů pro PCR (PCR dNTP mix)

Složení TB media

1,2% Bacto Tryptone, 2,4% Bacto Yeast extract, 0,2% KH_2PO_4 a 1,3% g K_2HPO_4 , 0,4% glycerol

Složení LB media

2,5% Luria Broth

Složení LB agaru

4% Luria-Bertani Agar

Všechna připravená media byla sterilizována horkou parou při teplotě 121 °C (Varioklav 400E, H+P Labortechnik) po dobu 20 minut.

Oligonukleotidy použité při PCR

- (1) HRI Forward: 5'AGATACATATGCAGGGGGGCAACTC 3'
- (2) HRI Reverse: 5'AGATACTCGAGTCCCACGCCCCCATC 3'
- (3) eIF2 α Forward:5'AGATACATATGCCGGGTCTAAGTTGTAG 3'
- (4) eIF2 α Reverse: 5'AGATACTCGAGCAAATCTTCAGCTTTGGCTTC 3'

Plasmid pET-21c(+)

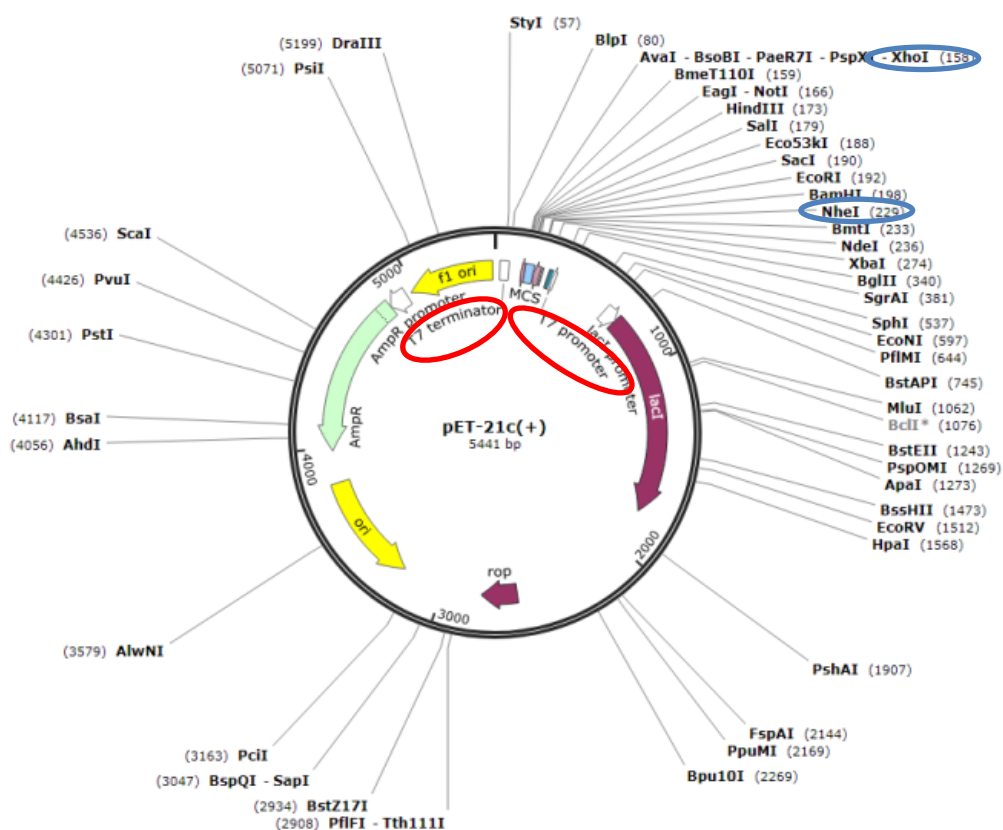
Pro expresi proteinů HRI a eIF2 α v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) byl použit expresní vektor pET-21c(+), obsahující 5441 párů bazí. Tento plasmid obsahuje T7 promotor, který je specifický pouze pro T7 RNA polymerasu [40]. T7 RNA polymerasa je výkonnější než RNA polymerasa bakterií *E. coli* vlastní. Gen pro T7 polymerasu byl do bakterií *E. coli* BL-21(DE3) integrován pomocí genomu bakteriofága T7. Gen (v rámci experimentů této bakalářské práce gen kódující protein HRI, popř. gen kódující eIF2 α), který je umístěný za T7 promotorem je exprimován s vysokou efektivitou. Plasmid pET-21c(+) obsahuje gen, který zajišťuje bakterii rezistenci k ampicilinu, čímž umožňuje selekci buněk transformovaných tímto plasmidem. Tento plasmid byl laskavě poskytnut spolupracující laboratoří prof. Toru Shimizu, Sendai, Japonsko. Mapa plasmidu je na obrázku 11, strana 33.

Plasmid pDNR-Dual

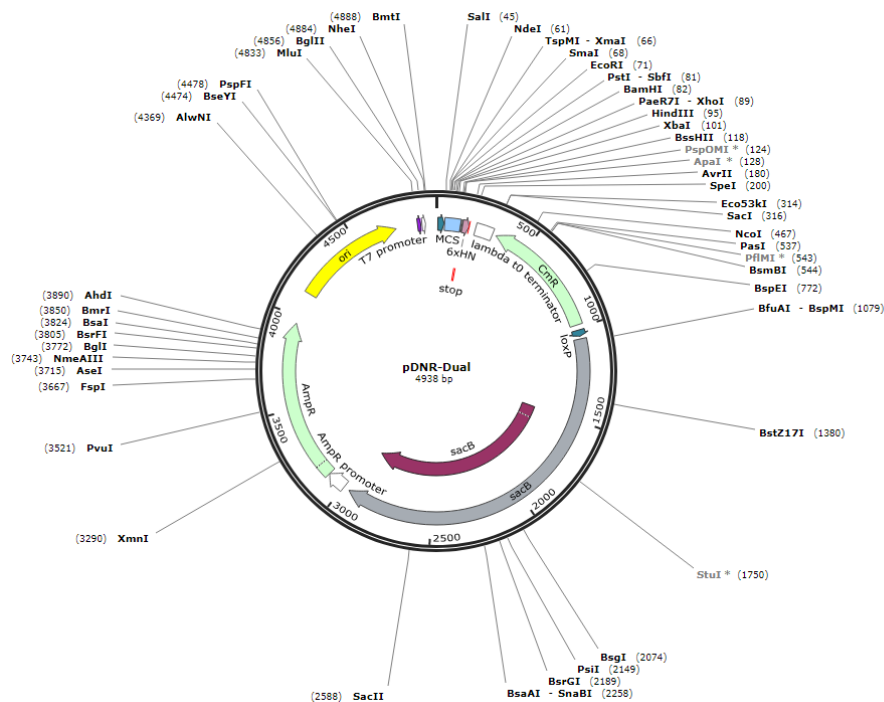
Geny, které kódují proteiny HRI a eIF2 α byly do naší laboratoře dodány jako inserty vložené do vektoru pDNR-Dual. Tento plasmid je složen z 4938 párů bazí a obsahuje gen, zajišťující bakterii rezistenci vůči ampicilinu. Tento plasmid byl zakoupen z laboratoří lékařské fakulty University v Harvardu, USA. Mapa plasmidu je na obrázku 12, strana 34.

Plasmid pMAL-c5E

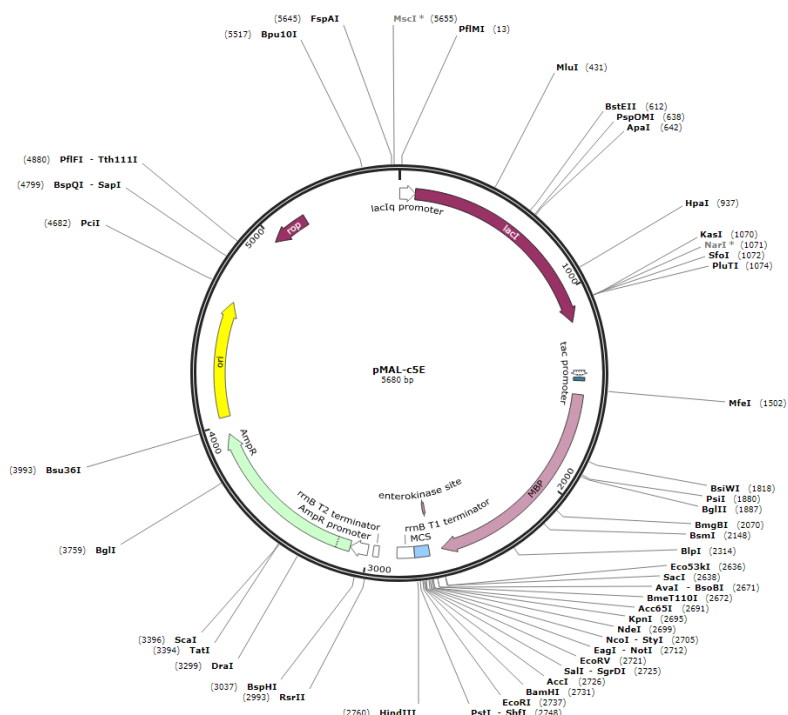
Plasmid pMAL-c5E je používán jako expresní vektor pro produkci rekombinantních proteinů s fúzním proteinem vázajícím maltosu (MBP). Obsahuje 5680 párů bazí a ve své sekvenci má gen zajišťující bakteriím rezistenci vůči ampicilinu. Tento plasmid byl laskavě poskytnut laboratoří RNDr. Ondřeje Vaňka, Ph.D, Katedra biochemie, PřF UK, ČR. Mapa plasmidu je na obrázku 13, strana 34.



Obrázek 11 Mapa plasmidu *pET-21c(+)* ; převzato z [<https://www.snapgene.com/>, viděno 5.5.2018][41]. Schéma plasmidu *pET-21c(+)*, zelená šipka s označením *AmpR* znázorňuje gen zajišťující rezistenci k ampicilinu, modře jsou vyznačena místa pro restriční štěpení endonukleasami *XhoI* a *NdeI*, červeně je vyznačen *T7* promotor a *T7* terminator



Obrázek 12 Mapa plasmidu pDNR-Dual ; převzato z [https://www.snapgene.com, viděno 5.5.2018][41]. Schéma plasmidu pDNR-Dual, zelená šipka s označením AmpR znázorňuje gen zajišťující rezistenci k ampicilinu



Obrázek 13 Mapa plasmidu pMAL-c5E ; převzato z [http://www.snapgene.com, viděno 5.5.2018][41]. Schéma plasmidu pMAL-c5E, zelená šipka s označením AmpR znázorňuje gen zajišťující rezistenci k ampicilinu, fialová šipka MBP znázorňuje fúzní protein vázající maltosu

3.3 Metody

3.3.1 Řetězová polymerázová reakce genu pro HRI

Řetězová polymerasová reakce (PCR z angl. polymeric chain reaction) je metoda objevená v roce 1983 Karyem Mullisem a je využívána k rychlému „namnožení“ nukleových kyselin [42].

Gen pro protein HRI byl zakoupen z repozitáře plasmidových DNA Harvardské Univerzity [43]. Byl dodán jako insert ve vektoru pDNR-Dual, který měl také vložený gen pro rezistenci na ampicilin (obrázek 12, strana 34). Pro následnou purifikaci proteinu HRI z bakterií *E. coli* bylo nutné vytvořit gen HRI, který bude mít ve své aminokyselinové sekvenci polyhistidinovou sekvenci označovanou v literatuře pod pojmem histidinová kotva (HisTag). Z toho důvodu byl insert genu HRI vložen do plasmidu pET-21c(+). Nejprve byl gen pro HRI pomocí vhodných oligonukleotidů (1) a (2) (kapitola 3.2) metodou PCR namnožen a byly přidány nukleotidy pro následné restrikční štěpení.

Pro PCR byly zvoleny dva typy roztoků, které byly napipetovány do tenkostěnných zkumavek eppendorf. První roztok obsahoval tzv. „GC enhacer“, což je látka, která usnadňuje průběh PCR v případě, že je v sekvenci primerů obsažen vysoký poměr GC bazí. Druhá směs neobsahovala „GC enhancer“, jeho objem byl nahrazen sterilní vodou bez endonukleas. Každý typ roztoku byl napipetován 2x, přičemž jednou byl použit templát DNA (HRI v plasmidu pDNR – Dual) koncentrovaný a jednou 10x zředěný sterilní vodou bez endonukleas. Celkový objem směsí byl vždy 50 μ l. Kompletní přehled a množství jednotlivých složek směsí je obsažen v tabulce 1, strana 36.

Tabulka 1 Kompletní přehled složení roztoků pro PCR

Složky reakční směsi pro PCR	Směs č.1 s enhancerem objem [μl]	Směs č.2 s enhancerem objem [μl]	Směs č. 3 bez enhanceru objem [μl]	Směs č. 4 bez enhanceru objem [μl]
5x koncentrovaný Q5 reakční pufr	10,0	10,0	10,0	10,0
10 mM dNTPs – směs nukleotidů	1,0	1,0	1,0	1,0
10 μM „Forward primer“	2,5	2,5	2,5	2,5
10 μM „Reverse primer“	2,5	2,5	2,5	2,5
„Templátová“ DNA v plasmidu pDNR-Dual	1,0	0	1,0	0
10x „zředěná templátová“ DNA v plasmidu pDNR-Dual	0	1,0	0	1,0
Q5 High Fidelity DNA polymerasa	0,5	0,5	0,5	0,5
Sterilní voda bez endonukleas	22,5	22,5	32,5	32,5
5x Q5 High CG „enhancer“	10,0	10,0	0	0

Po přípravě výše uvedených roztoků (tabulka 1, strana 36) byly mikrozkušavky vloženy do PCR thermocykleru (Tech Gene FTGENE2D, Techne) a byly zadány optimální teploty a doba trvání jednotlivých kroků reakce (tabulka 2, strana 36). Teploty pro průběh PCR byly určeny z teplot tání použitých oligonukleotidů a z pokynů pro ideální působení Q5 high – fidelity DNA polymerasy. Zvolené teploty a doba trvání jednotlivých kroků PCR jsou zaznamenány v tabulce 2, strana 36.

Tabulka 2 Podmínky PCR genu pro HRI

Jednotlivé kroky PCR	Teplota [°C]	Čas [s]
Počáteční denaturace	98	60
Nasedání oligonukleotidů 35 cyklů	98	10
	66	30
	72	180
Finální teplota pro dokončení reakce	72	120
Udržovací teplota po dokončení reakce	4	

Po ukončení PCR byla amplifikace jednotlivých vzorků ověřena pomocí horizontální agarosové elektroforesy (kapitola 3.3.12).

3.3.2 Řetězová polymerázová reakce genu pro eIF2 α

Jako při předchozí PCR s genem pro HRI, byl gen pro eIF2 α zakoupen z repozitáře plasmidových DNA Harvardské Univerzity [43] Byl dodán jako insert ve vektoru pDNR-Dual, který měl také vložený gen pro rezistenci na ampicilin. Ze stejného důvodu, jako v případě genu pro HRI, bylo nutné gen eIF2 α vložit do plasmidu pET-21c(+), aby bylo možné tento protein purifikovat pomocí histidinové kotvy pro afinitní chromatografii. Nejprve byl gen pro eIF2 α pomocí vhodných oligonukleotidů ((3) a (4) (kapitola 3.2)) metodou PCR namnožen a byly přidány nukleotidy pro následné restrikční štěpení.

Typy roztoků byly stejné jako v případě PCR s genem pro HRI. Množství a složení roztoků je popsáno v tabulce 1, strana 36, až na rozdíl, že jako gen byl použit eIF2 α . Teplota nasedání byla odlišná, protože byly zvoleny odlišné oligonukleotidy, které měly odlišnou teplotu tání. Teploty PCR pro gen pro eIF2 α jsou uvedeny v tabulce 3, strana 37. V případě genu eIF2 α nebylo nutné do směsi přidávat „GC enhancer“, protože poměr GC bazí u oligonukleotidů pro PCR nebyl větší než 70 %.

Tabulka 3 Podmínky PCR genu pro eIF2 α

Jednotlivé kroky PCR	Teplota [°C]	Čas [s]
Počáteční denaturace	98	60
Nasedání primerů 35 cyklů	98	10
	61	30
	72	180
Finální teplota pro dokončení reakce	72	120
Udržovací teplota po dokončení reakce	4	

Po ukončení PCR byla amplifikace jednotlivých vzorků ověřena pomocí horizontální agarosové elektroforezy (kapitola 3.3.12).

3.3.3 Purifikace DNA z agarosového gelu po elektroforese

Byla připravena sterilní mikrozkuřavka eppendorf, které byla zvážena. Poté byl z agarosové gelu sterilně vyříznut požadovaný pruh, který obsahoval izolovanou DNA. Poté byla agarosa s požadovanou DNA vložena do sterilní mikrozkuřavky a opět byla mikrozkuřavka zvážena. Výsledný rozdíl v hmotnostech představoval hmotnost agarosy s

DNA. Podle této hmotnosti bylo do mikrozkušavky s gelem s DNA přidáno potřebné množství rozpouštěcího pufru (Monarch Gel Dissolving Buffer) ze soupravy Monarch DNA Gel Extraction Kit. Po přidání požadovaného množství byla mikrozkušavka s agarosou s DNA umístěna do termostatu (EVA-LS1-MT-S, VLM) ekvilibrovaným na teplotu 50 °C. Zkušavky byly během rozpouštění agarosy promíchávány převracováním. Po rozpouštění byl obsah mikrozkušavek převeden na membránu extrakčních kolon Monarch DNA Cleanup Columns ze soupravy Monarch DNA Gel Extraction Kit. Následně byly tyto mikrozkušavky s extrakčními kolonami centrifugovány 1 minutu při 13 000 RPM (5451 R, Eppendorf). Po centrifugaci byla DNA zachycená na membráně 2x promyta 200 µl 5x koncentrovaného promývacího pufru (Monarch DNA Wash Buffer) ze soupravy Monarch DNA Gel Extraction Kit pomocí centrifugace – 1 minutu při 13 000 RPM. Následně byla extrakční kolonka vložena do nové sterilní zkušavky a na membránu bylo aplikováno 6 µl elučního pufru (Monarch DNA Elution Buffer) ze soupravy Monarch DNA Gel Extraction Kit, který byl na membráně nechán působit 1 minutu a poté byla DNA eluována 1 centrifugací 1 minutu při 13 000 RPM.

3.3.4 Restrikční štěpení příslušného genu (pro HRI, resp. eIF2 α)

Po přečištění DNA od oligonukleotidů pomocí horizontální agarosové elektroforesy a následné izolaci byl produkt PCR podroben restrikčnímu štěpení pomocí endonukleas. Produkt PCR obsahoval kromě genu pro HRI, resp. eIF2 α i nukleotidové sekvence pro štěpení restrikčními endonukleasami a pre-sekvenci AGATA pro lepší funkci endonukleasy. Pre-sekvence musely být před ligací s novým plasmidem odštěpeny. Do tenkostěnné mikrozkušavky eppendorf bylo napipetováno 0,5 µl endonukleasy NdeI, 0,5 µl endonukleasy XhoI, 2 µl 10x koncentrovaného restrikčního pufru (Cutsmart, New England BioLabs, USA) a 17 µl DNA templátu. Restrikční reakce byly provedeny tři, pokaždé s jiným DNA templátem. V první reakci byl jako DNA templát použit produkt po PCR (gen pro HRI, resp. eIF2 α s příslušnými restrikčními místy a přesahy). V druhé reakci byl použit DNA templát plasmidu pET-21c(+), který obsahoval gen o velikosti přibližně 1,2 kb, vložený pomocí restrikčních endonukleas, který bylo nutné odstranit a získat tak plasmid vhodný pro ligaci s genem HRI, resp. eIF2 α a v třetí reakci byl použit jako DNA templát plasmidu pMAL-c5E. Oba plasmidy (pET-21c(+) a pMAL-c5E) měly restrikční místa pro endonukleasy NdeI a XhoI. Po „napipetování“ byly vzorky vloženy do inkubátoru (IR 1500 Automatic CO2 Incubator, Flow

Laboratories) na 120 min při teplotě 37°C. Poté byly vzorky přečištěny od nežádoucích nukleotidů pomocí horizontální agarosové elektroforesy (kapitola 3.3.12).

3.3.5 Ligace příslušného genu (pro HRI, resp. eIF2 α) s plasmidem

Po restričním štěpení (kapitola 3.3.4) a následné analýze pomocí horizontální agarosové elektroforesy byly produkty purifikovány z agarosového gelu (kapitola 3.3.3). Poté byl gen pro HRI, resp. eIF2 α , z kterého byly odštěpeny nukleotidové přesahy, vložen pomocí restričních míst pro endonukleasy do plasmidů (gen pro HRI i gen pro eIF2 α byly vkládány do plasmidu pET-21c(+) a gen pro HRI byl vkládán také do plasmidu pMAL-c5E). Ligační směs obsahovala 16 μ l „insertu“ (gen HRI, resp. eIF2 α po restričním štěpení), 2 μ l plasmidu (pET-21c(+) – první reakce, pMAL-c5E – druhá reakce), 2 μ l T4 pufru a 0,5 μ l T4 DNA ligasy. Po „napipetování“ do tenkostěnných mikrozkušavek eppendorf, byly směsi („insert“ HRI, resp. eIF2 α s pET-21c(+), „insert“ HRI s pMal-c5E) umístěny do PCR thermocykleru na 4 hodiny při teplotě 16°C. Po ligaci byla provedena transformace tohoto produktu ligace do buněk *E.coli* DH5 α .

3.3.6 Transformace buněk *E. coli* BL-21 (DE3) a *E. coli* DH5 α

Transformace je proces, při kterém je vkládána plasmidová DNA do kompetentní buňky. V tomto projektu byly použity dva typy buněk *E.coli* BL-21 (DE3) a *E. coli* DH5 α . *E.coli* BL-21 (DE3) jsou kompetentní buňky, které byly využívány pro expresi genu kódujícího protein HRI, resp. eIF2 α a kompetentní buňky *E.coli* DH5 α byly využívány pro namnožení plasmidu pET-21c(+) obsahující požadovaný gen. V prvním kroku bylo potřeba připravit „plotny“ s agarem. Předem připravený agar (kapitola 3.2) byl nejprve pomocí zvýšené teploty rozpuštěn do kapalného stavu. Následně byl vychlazen cca na 40 °C a 10 ml bylo převedeno do sterilní zkumavky Falcon (50 ml) a následně přidáno 10 μ l ampicilinu (100 mg/ml). Směs byla promíchána a následně aplikována na sterilní Petriho misku a krouživým pohybem byla směs agaru a ampicilinu rozprostřena po celé ploše Petriho misky. Veškerá manipulace byla prováděna asepticky v laminární boxu (BIO 126, Labo). Poté byly Petriho misky se směsí agaru a ampicilinu ponechány v laminárním boxu až do „ztuhnutí“ agaru. Podle tohoto postupu byly připraveny 3 Petriho misky s agarem. Po „ztuhnutí“ byly do tří mikrozkušavek Eppendorf

připraveny různé tři směsi. Do první mikrozkušavky byla připravena kontrola, která obsahovala 25 μ l buněk *E.coli* DH5 α . Do druhé mikrozkušavky byla připravena směs 10 μ l genu pro HRI, resp. eIF2 α v plasmidu pET-21c(+) s 25 μ l buněk *E.coli* DH5 α a do třetí mikrozkušavky byla připravena směs 10 μ l genu pro HRI v plasmidu pMAL-c5E s 25 μ l buněk *E. coli* DH5 α . Po „napipetování“ byly vzorky dány 10 minut na led a poté byly vysety na plotny s agarem a rozprostřeny pomocí mikrobiologické hokejky. Po důkladném rozprostření byly plotny dány do inkubátoru (IR 1500 Automatic CO₂ Incubator, Flow Laboratories) dnem vzhůru a byly inkubovány při teplotě 37 °C cca 12 hodin. Před vložením do inkubátoru byly plotny utěsněny parafilmem. Po inkubaci byly vloženy do lednice, kde byly připraveny k dalšímu použití.

Při transformaci plasmidové DNA s buňkami *E. coli* BL-21(DE3), které byly využívány pro expresi genu kódujícího protein HRI, resp. eIF2 α , bylo k 1 μ l genu pro HRI, resp. eIF2 α v plasmidu pET-21c(+) přidáno 25 μ l buněk *E. coli* BL-21(DE3) a směs byla důkladně rozprostřena na agarové plotny obsahující ampicilin. Následující a předchozí postup se shoduje s výše popsaným postupem transformace s buňkami *E. coli* DH5 α . Celý postup transformace byl proveden asepticky v laminárním boxu (BIO 126, Labo).

3.3.7 Izolace plasmidové DNA genu pro HRI, resp. eIF2 α

Izolace DNA je rozdělena na dvě části, první část zahrnuje single cell („přeočkování“) a následné namnožení přeočkované kultury a druhá část zahrnuje izolaci plasmidové DNA pomocí izolačního kitu.

Single cell / „přeočkování“

Z agarové plotny po transformaci byla vhodně zvolena kolonie buněk *E. coli* DH5 α nebo *E. coli* BL-21(DE). Kolonie byla osamocena a nebyla přerostlá. Po vybrání kolonie byla selektována pomocí sterilního párátko a vložena do sterilní zkumavky Falcon (50 ml), ve které bylo 5 ml LB media (kapitola 3.2) a 5 μ l ampicilinu (100 mg/ml). Selektce proběhla pomocí sterilní pinzety a veškerá manipulace byla provedena v laminárním boxu (BIO 126, Labo). Po vložení párátko do zkumavky Falcon, byla zkumavka Falcon vložena do orbitálního shakeru (G 24 New Brunswick Scientific) a inkubována při 37 °C a 220 RPM po dobu 12 hodin. Po

ukončení kultivace buněk *E. Coli* DH5 α byla DNA vyizolována pomocí komerčního kitu podle návodu výrobce.

Izolace plasmidové DNA

Izolace plasmidové DNA byla provedena pomocí komerčního kitu QIAprep SPIN Miniprep Kit. Po ukončení kultivace buněk *E. coli* DH5 α , byla zkumavka Falcon (50 ml) s buňkami centrifugována a byl odstraněn vzniklý supernatant. Poté byla bakteriální peleta resuspendována v 250 μ l resuspendačního pufru P1 (součást kitu QIAprep Spin Miniprep). Vzniklá suspenze byla převedena do mikrozkuvkavy Eppendorf. Do této směsi bylo přidáno 250 μ l promývacího pufru P2 (součást kitu QIAprep Spin Miniprep) a mikrozkuvka byla 6x převrácena. Následně byla tato zkumavka nechána tři minuty stát při laboratorní teplotě. Po uplynutí tří minut bylo do zkumavky přidáno 350 μ l neutralizačního pufru N3 (součást kitu QIAprep Spin Miniprep) a mikrozkuvka byla 10x převrácena. Následně byla mikrozkuvka centrifugována 10 minut při 13 200 RPM (5415 R, Eppendorf) při laboratorní teplotě. Po centrifugaci byl supernatant převeden na kolonu mikrozkuvkavy (součást kitu QIAprep Spin Miniprep) pro izolaci DNA. Poté byla tato mikrozkuvka s kolonou centrifugována 1 minutu při laboratorní teplotě při 13 200 RPM (5415 R, Eppendorf). Filtrát byl odstraněn a na kolonu mikrozkuvkavy bylo aplikováno 750 μ l promývacího pufru PE (součást kitu QIAprep Spin Miniprep). Po aplikaci byla provedena centrifugace 1 minutu při 13 200 RPM (5415 R, Eppendorf) při laboratorní teplotě. Postup promývání byl proveden 2x. Po promytí byla kolona převedena do nové mikrozkuvkavy a na kolonu bylo aplikováno 50 μ l elučního pufru PE (součást kitu QIAprep Spin Miniprep) a byla provedena centrifugace 1 minutu při 13 200 (5415 R, Eppendorf) při laboratorní teplotě. Po centrifugaci byla kolona odstraněna a ze získaného vzorku byla stanovena spektrofotometricky koncentrace. Výsledný vzorek byl uchován v -20 °C pro další použití.

V případě buněk *E. coli* BL-21(DE3) byla po inkubaci v 5 ml LB media s 5 μ l ampicilinu provedena inokulace do TB média, postup je popsán v následující kapitole.

3.3.8 Exprese proteinu HRI, resp eIF2 α

Kultivace buněk *E. coli* BL-21(DE3)

Do 2 l Erlenmayerovy baňky bylo postupně přidáno 450 ml TB média (kapitola 3.2) 50 ml roztoku KH₂PO₄ a K₂HPO₄, 0,5 ml ampicilinu (100 mg/ml) a 0,5 ml suspenze buněk *E. coli* BL-21(DE3) s plasmidem pro gen HRI, resp. eIF2 α (5 ml LB media s 5 μ l ampicilinu) (kapitola 3.3.6). Takto byly připraveny 4 litry TB media (8 lahví), které byly vloženy do orbitálního shakeru (Multron pro, Infors HT) a Erlenmayerovy baňky byly třepány při teplotě 37 °C a rychlosti 180 RPM do doby než optická denzita OD₆₀₀ buněk *E. coli* nebyla v rozmezí 0,6 – 1,2. Optická denzita byla měřena na spektrofotometru Cary 60 UV-Vis, Agilent, kde bylo vždy vhodné množství suspenze z Erlenmayerovy baňky převedeno do kyvety a změřeno. Po dosažení potřebné hodnoty OD₆₀₀, byla provedena indukce exprese.

Indukce exprese genu kodujícího protein HRI, resp eIF2 α

Indukce exprese byla provedena pomocí látky IPTG, která je schopna aktivovat *lac* operon, který aktivuje T7 RNA polymerasu[44]. T7 RNA polymerasa hraje klíčovou roli při správném fungování exprese genu HRI, resp eIF2 α , protože gen pro HRI, resp. eIF2 α je vložen v plasmidu pET-21c(+), který obsahuje T7 promotor. T7 promotor využívá ke své funkci T7 RNA polymerasu, která má svůj gen zapsaný v genomu buněk *E. coli* BL-21(DE3) pomocí bakteriofága DE3 [40]. Gen pro T7 RNA polymerasu je regulován pomocí *lac* operon, který je blokován v nepřítomnosti IPTG *lac* represorem, který je produkován *lacI*, jehož gen je uložen v plasmidu pET-21c(+). Po přidání IPTG je aktivován *lac* operon, který spouští expresi T7 RNA polymerasy. T7 RNA polymerasa interaguje s T7 promotorem, který aktivuje expresi vloženého genu pro HRI, resp. eIF2 α [1,44].

Po dosažení optimální optické denzity OD₆₀₀, bylo přidáno do každé Erlenmayerovy baňky 0,1 ml 0,1 mM IPTG jako indukčního činidla. Po 30 minutách od přidání IPTG, byla snížena teplota na 18 °C a otáčky na 140 RPM. Při těchto podmínkách byly Erlenmayerovy baňky s bakteriální suspenzí inkubovány po dobu 16 hodin. Po ukončení exprese genu pro HRI, resp. eIF2 α byl obsah Erlenmayerových baňek převeden do kyvet a centrifugován (Janetzki K70 D, MLW) při 4°C a 3000 RPM po dobu 45 minut. Po ukončení centrifugace byly sklizené buňky zváženy a uchovány v -80°C pro další pracovní postup.

Během exprese byly odebrány vzorky pro kontrolu pomocí SDS elektroforesy) (kapitola 3.3.10) před a po indukci IPTG.

3.3.9 Izolace proteinu HRI, resp. eIF2 α z buněk *E. coli* BL-21(DE)

V prvním kroku izolace rekombinantního proteinu HRI, resp. eIF2 α z buněk *E. coli* BL-21(DE3) byly buňky (20,3 g, resp. 23,5 g) resuspendovány v cca 100 ml resuspendačního pufru (50 mM TRIS-HCL, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,2 mg/ml lysozym, v případě izolace proteinu HRI resuspendační pufr obsahoval navíc 1 mg/100 ml aprotinin, 1 mg/100 ml pepstatin A, 1 mg/100 ml leupeptin). Resuspendované buňky byly podrobeny ultrazvukové sonikaci šestkrát pod dobu jedné minuty při amplitudě 55 % (Sonopuls HD 3100, sonda KE 76). Mezi jednotlivými sonikacemi byla prováděna pauza jednu minutu, aby nedocházelo k přehřívání vzorku a možné denaturaci izolovaného proteinu. Celý tento postup byl prováděn za stálého míchání na ledu. Po sonikaci byly fragmenty buněk převedeny do ultracentrifugačních kyvet (26 ml) a byly centrifugovány po dobu jedné hodiny při 55 000 RPM (Lab Ultracentrifuga Optima™ LE-80K, Beckman Coulter). Po ultracentrifugaci byl odebrán supernatant a k němu byly přidány cca 3 ml afinitního nosiče (TALON® Metal Affinity Resin). Afinitní nosič byl nejprve převeden do pufru A (50 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl) pomocí opětovné centrifugace (4x) kdy bylo k 3 ml afinitního nosiče přidáno 10 ml pufru A a centrifugováno při 750 RPM a 4°C (Allegro X-22R, Beckman Coulter). Takto převedený afinitní nosič byl přidán k supernatantu vzniklém po ultracentrifugaci a inkubován po dobu jedné hodiny za stálého šetrného míchání v 4 °C na kývačce Mini Rocker Mr-1, BioSan. Gen pro protein HRI, resp. eIF2 α obsahoval sekvenci, která zajišťovala, že purifikovaný protein obsahoval polyhistidinovou sekvenci, tzv. histidinovou kotvu na C-konci. Histidinová kotva je schopna navázat se na afinitní nosič, který obsahuje se své struktuře iont přechodného kovu (konkrétně Co²⁺). Po navázání afinitního nosiče je nutné izolovaný protein eluovat pomocí nadbytku vhodné látky (imidazol), která se váže na afinitní nosič a dojde tak k uvolnění označeného proteinu.

Před afinitní chromatografií byly skleněné kolony s fritou promyty destilovanou vodou a následně byl supernatant s afinitním nosičem převeden na kolonu s fritou. Po převedení byla směs třikrát promyta cca 50 ml pufru A a následně byl rekombinací proteinu eluován elučním

pufrem (50 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 200 mM Imidazol). K eluci bylo použito přibližně 10 ml elučního pufru.

Po afinitní chromatografii byl vzorek převeden do zkumavky Milipore obsahující polopropustnou membránu, která propustí látky s relativní molekulovou hmotností menší než 30 kDa. Před převedením vzorku po afinitní chromatografii do zkumavky Milipore, byla zkumavka, respektive membrána, promyta 10 ml pufru A (50 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl) prostřednictvím centrifugace 10 minut při 4 °C a 3 000 RPM (Allegro X-22R, Beckman Coulter). Po promytí byl do zkumavky Milipore vložen vzorek po afinitní chromatografii a následovala centrifugace při 4 °C a 3 000 RPM po dobu 2 minut. Po ukončení byl vzorek ve zkumavce promíchán pomocí pipety a následně podroben další centrifugaci při stejných podmínkách. Tento proces se několikrát opakoval, dokud objem zakoncentrovaného produktu ve zkumavce Milipore dosáhl přibližně 500 μ l.

Pro odstranění nežádoucích látek (imidazol) a vysokomolekulárních proteinových agregátů byla provedena gelová filtrační chromatografie s využitím ÄKTAbasic systému pro kapalinovou chromatografii (GE healthcare). Byla použita kolona Superdex 200 10/30 GL (GE healthcare). Pro kalibraci kolony byly využity proteiny thyroglobulin (669 kDa, eluční objem 8.6 ml), apoferritin (481 kDa, eluční objem 9.5 ml), aldolasa (158 kDa, eluční objem 12.1 ml), BSA (66 kDa, eluční objem 13.2 ml) a ovalbumin (43 kDa, eluční objem 14.4 ml). Kolona byla ekvilibrována 20 ml pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl, 150 mM chlorid sodný pH 8,0. Poté byl na kolonu aplikován vzorek (500 μ l) rychlostí 0,5 ml/min⁻¹. Detekce eluovaného roztoku byla provedena při vlnové délce 280 nm.

3.3.10 Diskontinuální elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-elektroforesa)

Nejprve byla postavena aparatura pro elektroforesu (Mini-Protean tetra cell, BioRad), poté byla do aparatury vložena dvě skla, které byla odmaštěna ethanolem. Po upevnění a utěsnění aparatury byl mezi skla nanesen roztok, ze kterého se vytvoří 12% akrylamidový gel. Roztok obsahoval 3,0 ml pufru A (0,375 M TRIS-HCl, 0,1 % SDS, pH 8,8), 2,0 ml polymeračního roztoku A (30% akrylamid, 0,8% BIS v pufru A), 5,0 μ l TEMEDu a 50 μ l roztoku persíranu amonného (100 mg/ml). Po smíchání v kádince byl roztok nanesen mezi dvě očištěná skla a převrstven vodou. Po ukončení polymerizace gelu byla opatrně odstraněna voda a na 12% separační gel byl nanesen roztok, který vytvořil 4% zaostřovací gel. Druhý roztok byl

nejprve připraven do kádinky z 1,7 ml pufru B (0,125 M Tris-HCl; 0,1% SDS; pH 6,8), 267 μ l polymeračního roztoku B (30% akrylamid; 0,8% BIS v pufru B), 2 μ l TEMEDu a 40 μ l persíranu amonného (100 mg/ml). Po nanesení roztoku pro zaostřovací gel byl mezi skla vložen hřeben pro vytvoření jamek pro nanesení vzorku. Po zatuhnutí zaostřovacího gelu byla skla vložena do elektroforetické vany a elektrodový prostor byl naplněn elektrodovým pufrům (0,025 M Tris; 0,192 M glycin; 0,1% SDS; pH 8,3). Vzorky byly připraveny podle tabulky 4, strana 45.

Tabulka 4 Složení vzorků, odebíraných v průběhu exprese a izolace proteinů HRI a eIF2 α
Tyto vzorky byly analyzovány pomocí SDS elektroforesy

Frakce expresního/izolačního postupu	4x konc. reduk. pufr objem [μ l]	Vzorek objem [μ l]	Destilovaná voda objem [μ l]
Vzorek z exprese před přidáním IPTG	5	5	10
Vzorek z exprese po přidání IPTG	5	5	10
Supernatant po ultracentrifugaci	5	5	10
Vzorek před afinitní chromatografií	5	5	10
Vzorek po afinitní chromatografií	5	15	0
Vzorek frakce nezachycené na afinitní nosič	5	15	0
Zakoncentrovaný vzorek	5	15	0
Vzorky frakcí z gelové chromatografie	5	15	0
Finální produkt	5	15	0

4 x koncentrovaný redukující pufr byl složen z 0,25 M Tris-HCl, pH 6,8; 8% SDS; 40% glycerol; 20% 2-merkptoethanol; 0,008% bromfenolová modř. Vzorky byly vloženy do termostatu vytemperovaného na 100 °C po dobu 3 minut. Poté byly vzorky krátce centrifugovány a nanесeny do jamek zaostřovacího gelu (viz výše). Do každé jamky bylo

naneseno 10 µl vzorků uvedených v tabulce 4, strana 45 a do první jamky bylo naneseno 7 µl markeru Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BioRad). Po nanesení vzorků byla aparatura připojena ke zdroji (EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech) a separace probíhala při napětí 200 V po dobu 70 minut.

Po skončení elektroforesy byly gely obarveny v komerční lázni InstantBlue™ Protein Stain (Sigma Aldrich) nebo byly podrobeny další analýze pomocí metody western blot.

3.3.11 Western blot

Pro elektropřenos bylo nejprve připraveno 20 ks filtračních papírů o rozměru 10,5 x 7 cm a nitrocelulosaová membrána (BioRad) o rozměrech 8,5 x 5 cm. Na spodní elektrodu přenosové kazety bylo umístěno 10 ks filtračních papírů, následně nitrocelulosaová membrána, akrylamidový gel z SDS elektroforesy a 10 ks filtračních papírů. Před umístěním na spodní elektrodu byly filtrační papíry, membrána a gel převedeny do přenosového pufru (25 mM TRIS, 150 mM glycin, 10% methanol, pH 8,3). Následně byla kazeta uzavřena a vložena do přístroje pro elektropřenos (Trans-Blot®Turbo, Biorad) a elektropřenos probíhal 15 minut při napětí 25 V a proudu až 2,5 A.

Imunodetekce proteinů s histidinovou kotvou

Membrána po elektropřenosu byla omyta vodou, vložena do Petriho misky a následně byla inkubována ve 20 ml 1% BSA v TBS pufru (10 mM TRIS, 500 mM NaCl, 10 mM NaN₃, pH 7,5) přes noc při 4 °C. Druhý den byla membrána 2x omyta pufrem TBS-Tweem/Triton (20 mM TRIS, 500 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 0,2% Triton X-100, pH 7,5) a 1x v TBS pufru. „Oplach“ probíhal v Petriho misce cca 5 minut za stálého míchání na třepačce při laboratorní teplotě. Po sérii omytí byly 4 µl myší monoklonální protilátky proti histidinové kotvě (sigma Aldrich) napipetovány do 10 ml roztoku 1% BSA v TBS pufru a následně byl tento roztok aplikován na membránu a 1 hodinu inkubován za stálého míchání při laboratorní teplotě. Membrána byla po inkubaci omyta totožným postupem jako po blokaci a následně byly 4 µl koží polyklonální protilátky proti myšimu IgG konjugovaného s alkalickou fosfatase (Sigma Aldrich) napipetovány do 10 ml roztoku 10% sušeného mléka v TBS. Tento roztok byl inkubován s membránou 1 hodinu za stálého míchání při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla membrána 3x omyta TBS pufrem a podrobena kolorimetrické detekci.

Kolorimetrická detekce

Do 10 ml AP pufru (100 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaN₃, pH 9,0) bylo přidáno 66 µl roztoku NBT (50 mg/ml NBT v 70% dimethylformamidu) a promícháno. Následně bylo přidáno 33 µl roztoku BCIP (50 mg/ml BCIP v dimethylformamidu), promícháno a následně proběhla vizualizace a vyhodnocení.

3.3.12 Horizontální agarosová elektroforesa

Horizontální agarosová elektroforesa je metoda využívaná k dělení látek s velkou molekulovou hmotností (větší než přibližně 200 kDa). Příkladem takových látek jsou molekuly DNA, které díky svým fosfátovým skupinám mají záporný náboj, jehož velikost je závislá na délce řetězce. Tato vlastnost molekul DNA je využívána při dělení jednotlivých molekul v elektrickém poli podle jejich velikosti. Nejvíce využívané agarosové gely pro separaci DNA jsou 1% [1].

V první kroku byl připraven roztok 1% agarosy (w/v) v 40 ml TAE pufru (0,04 M TRIS-acetát, pH 8,2, 1 mM EDTA). Agarosa byla rozpuštěna za zvýšené teploty v mikrovlnné troubě a po vychladnutí bylo přidáno 4 µl barviva SYBR SAFETM DNA gel stain (10 000x koncentrované). Po promíchání byl roztok převeden do elektroforetické vaničky a po vložení hřebenu, k vytvoření jamek pro nanášení vzorků, byl roztok 1% agarosy nechán ztuhnout při laboratorní teplotě. Po „zatuhnutí“ gelu byla vložena do elektroforetické aparatury (MSMINI 10-Multi Sub Mini, Uvitec) do které byl převeden TAE pufr. Po vytažení hřebenu byly do vzniklých jamek nanášeny vzorky podle Tabulka 5, strana 47. Marker byl připraven z 4 µl sterilní vody, 1 µl 2 – log DNA ladder a 1 µl 5x loading dye. Po nanášení vzorků byla aparatura zapojena do zdroje (EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech) a elektroforesa probíhla při napětí 110V po dobu 30 minut.

Tabulka 5 Složení vzorků po PCR a restričním štěpení

Tyto vzorky byly analyzovány pomocí agarosové elektroforesy

Typ vzorku	Objem vzorku [µl]	Objem 5x loading dye [µl]
Produkt po PCR	25	5
Produkt po restričním štěpení	20	

3.3.13 Sekvenace genu HRI/eIF2 α

Správnost vložení genů pro HRI, resp eIF2 α do vektoru pET-21c(+) byla ověřena pomocí sekvenační metody. Ta byla zajištěna sekvenační laboratoří PřF UK.

3.3.14 Spektrofotometrické stanovení koncentrace plasmidové DNA

Stanovení koncentrace plasmidové DNA bylo provedeno pomocí spektrofotometrického měření s použitím přístroje DS-11 Spectrophotometer, DeNovix. Na tomto spektrofotometru byla spuštěna aplikace „dsDNA“. Jako slepý vzorek byly použity 2 μ l elučního pufru PE (součást kitu QIAprep Spin Miniprep), které byly nanесeny na detekční plochu spektrofotometru. Po proměření slepého vzorku byly nanесeny 2 μ l měřeného vzorku. Absorbance byla měřena při 260 nm. Přístroj určuje koncentraci ve vzorku podle vztahu:

$$c = \frac{A \cdot (CF)}{l}$$

kde, c je koncentrace plasmidové DNA v roztoku v jednotkách $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, A je absorbance při 260 nm, CF je přepočítávací faktor, jehož hodnota udaná výrobcem je $CF = 50 \cdot \text{ng} \cdot \text{cm} \cdot \mu\text{l}^{-1}$
 l je šířka absorpčního prostředí v jednotkách cm.

3.3.15 Stanovení koncentrace proteinu pomocí standardu BSA

Pro stanovení koncentrace proteinu v roztoku byla použita souprava Pierce™ Microplate BCA Protein Assay Kit. Standardem této metody byl BSA o různých koncentracích. Jako slepý vzorek byla použita deionizovaná voda. Stanovení bylo provedeno pomocí 96 jamkové mikrodestičky. Pracovní roztok byl připraven z roztoku A (hydrogenuhličitan sodný, uhličitan sodný, bicinchoninová kyselina (BCA), vínan sodný v 0,1 mol/l hydroxidu sodném, stanovené koncentrace nebyly uvedeny výrobcem) a z roztoku B (4% síran měďnatý) smícháním 50:1. Na destičku byl nanесen slepý vzorek 9 μ l, poté byly nanесeny jednotlivé roztoky standardu BSA o koncentracích 4 mg/ml, 8 mg/ml, 16 mg/ml, 24 mg/ml, 32 mg/ml, 48 mg/ml a 64 mg/ml. Následně byl nanесen roztok měřeného proteinu (10 μ l). Všechny vzorky byly nanášeny v tripletech. Poté bylo do každé jamky přidáno 260 μ l pracovního roztoku. Následně byla mikrotitrační destička inkubována 30 minut při 37 °C. Po inkubaci byla

mikrotitrační destička vložena do čtečky mikrotitračních destiček (Infinite M200 PRO, Tecan) a byly změřeny absorbance roztoků při 562 nm. Poté byla sestrojena kalibrační křivka na základě absorbance roztoků o známé koncentraci a z kalibrační křivky byla následně stanovena koncentrace měřeného proteinu.

3.3.16 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinu

Stanovení koncentrace proteinu v roztoku bylo provedeno pomocí spektrofotometrického měření s použitím přístroje DS-11 Spectrophotometer, DeNovix. Na tomto spektrofotometru byla spuštěna aplikace „Protein A280“. Jako slepý vzorek byly použity 2 μ l elučního pufru použitého pro gelovou chromatografii (20 mM Tris-HCl, 150 mM chlorid sodný pH 8,0), které byly nanесeny na detekční plochu spektrofotometru. Po proměření slepého vzorku byly nanесeny 2 μ l měřeného vzorku. Absorbance byla měřena při 280 nm. Přístroj určuje koncentraci proteinu ve vzorku podle vztahu: $A = \epsilon \cdot c \cdot l$, kde c je koncentrace proteinu, l je šířka absorpčního prostředí a ϵ je hodnota extinčního koeficientu. Hodnota extinčního koeficientu byla zjištěna na základě aminokyselinové sekvence proteinů pomocí programu na webových stránkách <https://web.expasy.org/protparam/> [32]. Zjištěné hodnoty byly $\epsilon = 46\,465 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro protein HRI a $\epsilon = 23\,380 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro protein eIF2 α .

3.3.17 Pilotní charakterizace proteinů HRI a eIF2 α se zaměřením na jejich teplotní stabilitu

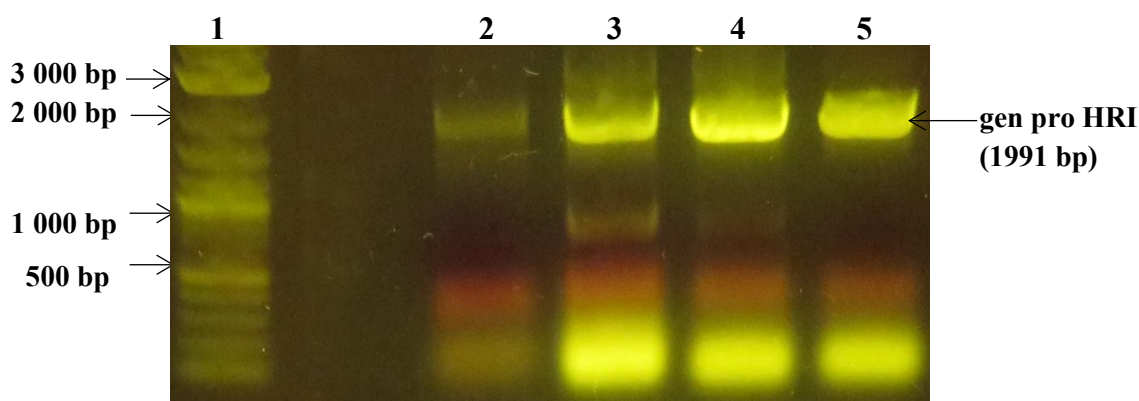
Při první sérii experimentů s proteiny HRI resp. eIF2 α byly tyto ponechány 3 dny v lednici (při přibližně 7 °C), 3 dny při laboratorní teplotě (při přibližně 20 °C) a zamražené při -80 °C, když předtím byly rychle chlazeny kapalným dusíkem. Při druhé sérii experimentů, byly vzorky proteinů HRI resp. eIF2 α vystaveny stejným teplotním podmínkám ale pouze po dobu 24 hodin. Po ukončení reakčních podmínek bylo ze všech vzorků odebráno 15 μ l proteinu a k proteinu bylo přidáno 5 μ l 4x koncentrovaného vzorkového pufru. Poté byly vzorky povařeny, krátce centrifugovány a nanесeny na akrylamidový gel a analyzovány pomocí SDS elektroforesy (kapitola 3.3.10).

4 Výsledky

4.1 Přenesení genu kódujícího protein HRI z plasmidu pDNR-dual do plasmidu pET-21c(+) a pMAL-c5E

Řetězová polymerasová reakce genu pro HRI

V prvním kroku přípravy proteinu HRI, bylo nutné gen pro vybraný protein vložit do vhodného expresního plasmidu. Po navrhnutí oligonukleotidů, které jsou uvedeny v kapitole 3.2 pod čísly (1) a (2) byl podle postupu (kapitola 3.3.1) amplifikován gen pro HRI prostřednictvím PCR. Produkty PCR byly analyzovány pomocí horizontální agarosové elektroforesy (kapitola 3.3.12). Výsledky popisuje obrázek 14, strana 50.



Obrázek 14 Výsledný agarosový gel po amplifikaci genu pro HRI pomocí PCR

1. Standard – 2- log DNA ladder
2. 10x zředěná „templátová“ DNA (gen pro HRI v plasmidu pDNR-dual dodán Universitou v Harvardu) s přidavkem „enhanceru“ pro zvýšení výtěžku PCR
3. Koncentrovaná „templátová“ DNA (gen pro HRI v plasmidu pDNR-dual dodán Universitou v Harvardu) s přidavkem „enhanceru“ pro zvýšení výtěžku PCR
4. Koncentrovaná „templátová“ DNA (gen pro HRI v plasmidu pDNR-dual dodán Universitou v Harvardu)
5. 10x zředěná „templátová“ DNA (gen pro HRI v plasmidu pDNR-dual dodán Universitou v Harvardu)

Gen pro HRI obsahuje 1911 párů bazí (započteny přesahy i restrikční místa pro endonukleasy). Tomuto faktu odpovídá i výsledek horizontální agarosové elektroforesy

(obrázek 14, strana 50), kde nejsilnější pruh v jamkách 2, 3, 4, 5 (šipka v popisku obrázku 14, strana 50) má přibližně stejnou mobilitu jako pruh standardu pro 2000 párů bazí. Ve druhé dráze je nanesen produkt PCR, kdy byla použita 10x naředěná „templátová“ DNA genu pro HRI v plasmidu pDNR-dual, do této směsi byl přidán také „GC enhancer“, který se přidává pro zvýšení výtěžku reakce v případě, kdy je vysoké procentuální zastoupení GC bazí v oligonukleotidu (kapitola 3.2). V tomto případě je výsledné množství DNA poměrně nízké. V dráze číslo tři je produkt PCR, kdy byl opět v reakční směsi použit „GC enhancer“, ale „templátová“ DNA nebyla ředěna. V tomto případě je množství naprodukované DNA mnohem vyšší, ale došlo také ke vzniku nespecifického produktu o přibližné velikosti 1000 párů bazí. V drahách 4 a 5 jsou produkty PCR, kdy „GC enhancer“ nebyl použit. Reakční směsi ve drahách 4 a 5 se lišily pouze množstvím použité „templátové“ DNA, nicméně rozdíl v množství získaného produktu je minimální. Po vizualizaci byly pruhy obsahující DNA, které se nacházely v pozici předpokládaného výskytu genu pro HRI (tedy přibližně 1911 párů bazí), separovány z agarosového gelu a následně byla izolována DNA pro gen HRI (kapitola 3.3.3), pomocí komerčního kitu. Finálně byla určena koncentrace DNA (kapitola 3.3.14). Výsledné koncentrace DNA jsou uvedeny v tabulce 6, strana 51.

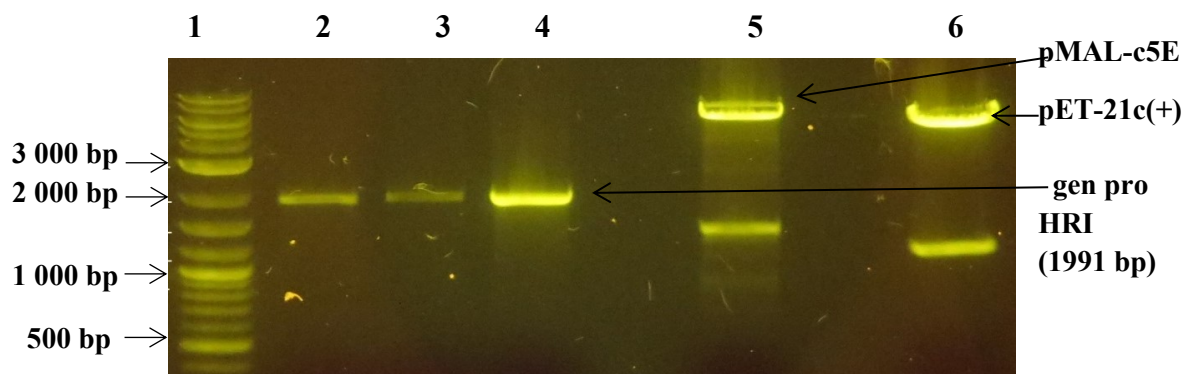
Vzorek, jehož analýza byla ukázaná na obrázku 14, strana 50 v dráze 2 nebyl dále zpracován z důvodu nízkého výtěžku.

Tabulka 6 Výsledné koncentrace DNA produktů genu pro HRI po PCR

Vzorek	Koncentrace [ng/μl]
Koncentrovaná „templátová“ DNA (gen pro HRI) s přídavkem GC „enhanceru“ pro zvýšení výtěžku PCR	7,5
Koncentrovaná „templátová“ DNA (gen pro HRI)	4,7
10x zředěná „templátová“ DNA (gen pro HRI)	27,4

Restrikční štěpení genu pro HRI, plasmidu pET-21c(+) a plasmidu pMAL-c5E

Po provedení restrikčního štěpení podle kapitoly 3.3.4 byly výsledné produkty analyzovány pomocí horizontální agarosové elektroforesy a příslušné úseky DNA byly separovány (kapitola 3.3.12). Výsledný agarosový gel s produkty restrikčního štěpení je znázorněn na obrázku 15, strana 52.



Obrázek 15 Výsledný agarosový gel po restričním štěpení PCR produktu genu HRI, plasmidu pET-21c(+) a pMAL-c5E endonukleasami NdeI a XhoI

1. Standard – 2- log DNA ladder
2. Koncentrovaná „templátová“ DNA (gen pro HRI s přidavkem „GC enhanceru“) po restričním štěpení endonukleasami NdeI a XhoI
3. Koncentrovaná „templátová“ DNA (gen pro HRI) po restričním štěpení endonukleasami NdeI a XhoI
4. 10x zředěná „templátová“ DNA (gen pro HRI) po restričním štěpení endonukleasami NdeI a XhoI
5. Plasmid pMAL-c5E s vloženým genem o velikosti přibližně 1500 páru bazí po restričním štěpení endonukleasami NdeI a XhoI
6. Plasmid pET-21c(+) s vloženým genem o velikosti přibližně 1 500 páru bazí po restričním štěpení endonukleasami NdeI a XhoI

Na obrázku 15, strana 52 jsou znázorněny produkty jednotlivého restričního štěpení genu pro HRI, plasmidu pET-21c(+) a plasmidu pMAL-c5E. V drahách 2 – 4 jsou zobrazeny produkty restričního štěpení genu HRI po amplifikaci DNA pomocí PCR. Pruhy obsahující DNA genu HRI měly stejnou mobilitu jako složka standardu o velikosti 2000 párů bazí. Gen pro HRI obsahuje teoreticky 1911 párů bazí. U těchto tří produktů není možné pouze na základě analýzy horizontální agarosovou elektroforesou říci, zda proběhlo restriční štěpení nebo ne. Rozdíl v počtu bazí „poštěpeného“ a „nepoštěpeného“ produktu genu HRI po PCR je minimální a je nemožné ho pomocí daného provedení horizontální agarosové elektroforesy rozeznat. V případě drah 5 a 6 je tomu naopak, zde jsou jasně vidět produkty po restričním štěpení. V případě dráhy 6, kde byl štěpen plasmid pET-21c(+), je v horní části dráhy vidět pruh znázorňující „štěpený“ plasmid pET-21c(+) (5443bp) a druhý pruh (ve spodnější části) charakterizuje gen pro protein, který se v plasmidu pET-21c(+) nacházel před štěpením. V dráze 5, kde je produkt štěpení plasmidu pMAL-c5E, jsou dva výrazné pruhy. Ten v horní

polovině gelu odpovídá štěpenému plasmidu a ten v dolní části gelu odpovídá genu, který se v plasmidu nacházel před štěpením. S geny pro proteiny (velikost cca 1500 párů bází), které byly původně v plasmidech nebylo dále pracováno. Produkty restričního štěpení potřebné pro další pracovní postup byly separovány z gelu pomocí komerčního kitu (kapitola 3.3.3) a následně byla určena jejich koncentrace (kapitola 3.3.14). Výsledné koncentrace „rozštěpených“ produktů DNA jsou uvedeny v tabulce 7, strana 53.

Tabulka 7 Výsledné koncentrace produktů DNA po restričním štěpení

Vzorek	Koncentrace [ng/μl]
Koncentrovaný „templát“ DNA (gen pro HRI s přidavkem „GC enhanceru“) po restričním štěpení endonukleasami NdeI a XhoI (viz. dráha č. 2, Obrázek 15, strana 52)	7,3
10x zředěný „templát“ DNA (gen pro HRI) po restričním štěpení endonukleasami NdeI a XhoI (viz. dráha č. 4, Obrázek 15, strana 52)	21,3
Plasmid pMAL-c5E po restričním štěpení endonukleasami NdeI a XhoI (viz. dráha č. 5, Obrázek 15, strana 52)	17,2
Plasmid pET-21c(+) po restričním štěpení endonukleasami NdeI a XhoI (viz. dráha č. 6, Obrázek 15, strana 52)	28,8

Ligace plasmidu pET-21c(+) a pMAL-c5E s genem HRI po restriční reakci

Po restriční reakci byly vytvořeny dvě směsi vzorků. První směs obsahovala insert HRI (10x zředěná „templátová“ DNA po restričním štěpení endonukleasami NdeI a XhoI o koncentraci 21,3 ng/μl) s plasmidem pET-21c(+) po restričním štěpení o koncentraci 28,8 ng/μl. Druhá směs obsahovala insert HRI (koncentrovaná „templátová“ DNA s přidavkem „GC enhancer“ po restričním štěpení endonukleasami NdeI a XhoI o koncentraci 7,3 ng/μl) s plasmidem pMAL-c5E po restričním štěpení endonukleasami NdeI a XhoI o koncentraci 17,2 ng/μl. K oběma směsím byl následně přidán T4 pufr a T4 DNA ligasa. Po ukončení ligace (detailní postup kapitola 3.3.5) byla DNA dané směsi transformována do kompetentních buněk *E. coli* DH5α (kapitola 3.3.6). V případě první reakce, kde v reakční směsi byl insert genu HRI s plasmidem pET-21c(+), proběhla ligace i transformace úspěšně, o čemž svědčí přítomnost kolonií bakterií *E. coli* na substrátu obsahující antibiotikum (rezistence na antibiotikum je zprostředkována plasmidem pET-21c(+)). V případě druhé reakční směsi, která obsahovala insert genu HRI s plasmidem pMAL-c5E se ligace nebo transformace buněk *E. coli* DH5α nezdařila.

Po výše popsané selekci buněk *E. coli* u kterých došlo k pozitivní transformaci plasmidem pET-21c(+)/HRI (kapitola 3.3.6), proběhlo „namnožení“ buněk v LB mediu a z nich byl izolován plasmid pET-21c(+)/HRI komerčním kitem (kapitola 3.3.7) a byla určena jeho koncentrace (kapitola 3.3.14). Výsledné koncentrace DNA jsou uvedeny v tabulce 8, strana 54.

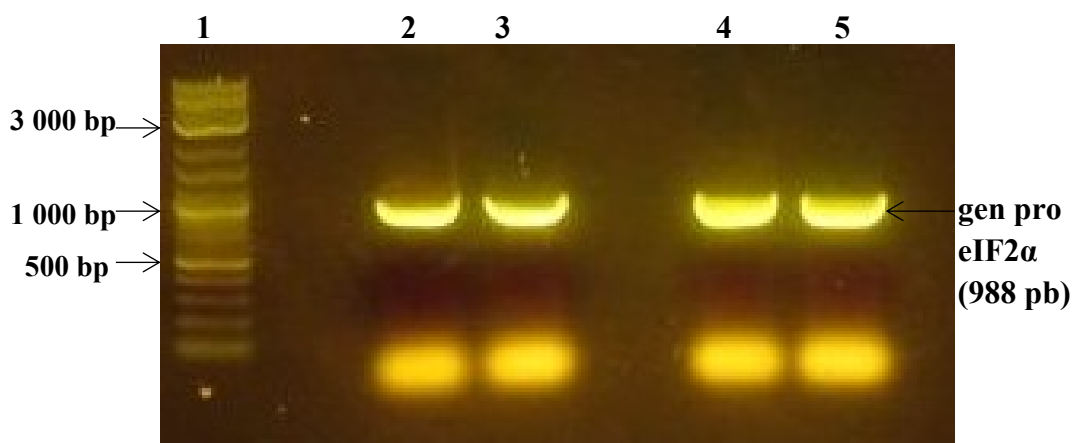
Tabulka 8 Výsledné koncentrace DNA pET-21c(+)/HRI

Vzorek	Koncentrace [ng/μl]
pET-21c(+)/HRI 1	109,7
pET-21c(+)/HRI 2	142,7

4.2 Přenesení genu kódujícího protein eIF2 α z plasmidu pDNR-dual do plasmidu pET-21c(+)

Polymerázová řetězová reakce pro gen eIF2 α

V prvním kroku bylo třeba „namnožit“ DNA pomocí PCR. Nejprve byly navrženy oligonukleotidy (3), (4) (kapitola 3.2) poté byla provedena PCR podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2. Po ukončení PCR byly vzniklé produkty analyzovány pomocí horizontální agarosové elektroforesy (kapitola 3.3.12). Výsledek je znázorněn na obrázku 16, strana 55.



Obrázek 16 Výsledný agarosový gel po amplifikaci genu pro eIF2 α pomocí PCR

1. Standard 2-log DNA ladder
2. Koncentrovaná „templátová“ DNA (gen pro eIF2 α v plasmidu pDNR-dual dodán Universitou v Harvardu)
3. Koncentrovaná „templátová“ DNA (gen pro eIF2 α v plasmidu pDNR-dual dodán Universitou v Harvardu)
4. 10x zředěná „templátová“ DNA (gen pro eIF2 α v plasmidu pDNR-dual dodán Universitou v Harvardu)
5. 10x zředěná „templátová“ DNA (gen pro eIF2 α v plasmidu pDNR-dual dodán Universitou v Harvardu)

Gen pro eIF2 α obsahuje 988 párů bazí. Nejvýraznější signál (šipka s popiskem eIF2 α na obrázku 16, strana 55) má přibližně stejnou mobilitu jako signál standardu o velikosti 1 000 párů bazí. Lze se proto domnívat, že výrazné pruhy v drahách 2 – 5 jsou produkty PCR odpovídající genu pro eIF2 α . Rozdíl mezi drahami 2, 3 a drahami 4, 5 je pouze v množství použité „templátové“ DNA. Výsledný rozdíl v množství produkované DNA metodou PCR je minimální. Po vizualizaci byly pruhy obsahující DNA, které se nacházely v pozici předpokládaného výskytu genu pro eIF2 α (tedy přibližně 988 párů bazí), separovány a následně

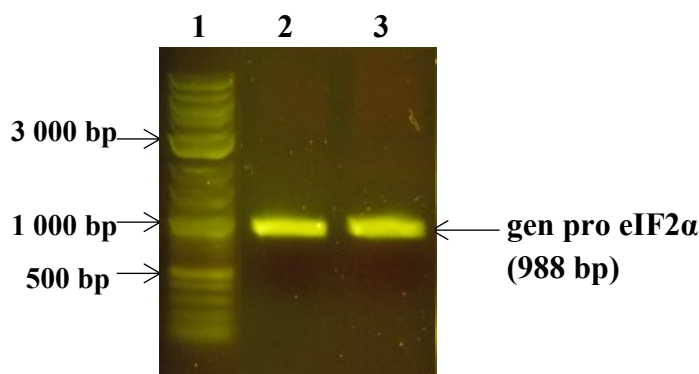
z nich byla izolována DNA pro gen eIF2 α (kapitola 3.3.3) pomocí komerčního kitu. Následně byla určena koncentrace DNA (kapitola 3.3.14). Výsledné koncentrace DNA jsou znázorněny v tabulce 9, strana 56.

Tabulka 9 Přehled výsledných koncentrací produktů PCR reakce pro gen eIF2 α

Vzorek	Koncentrace [ng/ μ l]
Koncentrovaná „templátová“ DNA	56,4
10x zředěná „templátová“ DNA	45,7

Restrikční štěpení genu pro eIF2 α

Po provedení restrikčního štěpení podle kapitoly 3.3.4 byly výsledné produkty analyzovány pomocí horizontální agarosové elektroforesy a příslušné úseky DNA byly separovány (kapitola 3.3.12). Výsledný agarosový gel s produkty restrikčního štěpení genu pro eIF2 α je znázorněn na obrázku 17, strana 56, výsledný agarosový gel s produkty restrikčního štěpení plasmidu pET-21c(+) je zobrazen na obrázku 15, strana 52 v jamce 6.



Obrázek 17 Výsledný agarosový gel po restrikčním štěpení PCR produktu genu pro eIF2 α , endonukleasami *NdeI* a *XhoI*

1. Standard 2 – log DNA ladder
2. Koncentrovaná „templátová“ DNA (gen pro eIF2 α) po restrikčním štěpení endonukleasami *NdeI* a *XhoI*
3. 10x zředěná „templátová“ DNA (gen pro eIF2 α) po restrikčním štěpení endonukleasami *NdeI* a *XhoI*

V drahách 2 a 3 na obrázku 17, strana 56 jsou znázorněny produkty restričního štěpení genu pro eIF2 α , po amplifikaci DNA pomocí PCR. Pruhly obsahující DNA genu pro eIF2 α (na obrázku 17, strana 56 k těmto pruhům směřuje černá šipka) měly stejnou mobilitu jako složka standardu o velikosti 1000 párů bazí. Gen pro eIF2 α obsahuje teoreticky 988 párů bazí. U těchto dvou produktů není možné pouze na základě analýzy horizontální agarosovou elektroforezou říci, zda proběhlo restriční štěpení nebo ne. Rozdíl v počtu bazí „poštěpeného“ a „nepoštěpeného“ produktu genu pro eIF2 α po PCR je minimální a je nemožné ho pomocí daného provedení horizontální agarosové elektroforezy rozeznat. Produkty restričního štěpení potřebné pro další pracovní postup byly separovány z gelu pomocí komerčního kitu (kapitola 3.3.3) a následně byla určena jejich koncentrace (kapitola 3.3.14). Výsledné koncentrace „rozštěpených“ produktů DNA jsou uvedeny v tabulce 10, strana 57.

Tabulka 10 Výsledné koncentrace DNA genu eIF2 α po restričním štěpení

Vzorek	Koncentrace [ng/ μ l]
Koncentrovanová „templátová“ DNA (gen pro eIF2) po štěpení restričními endonukleasami NdeI a XhoI	18,1
10x zředěná „templátová“ DNA (gen pro eIF2) po štěpení restričními endonukleasami NdeI a XhoI	11,8

Ligace genu pro eIF2 α s plasmidem pET-21c(+)

Po určení koncentrací jednotlivých roztoků obsahujících DNA byla provedena ligace insertu genu eIF2 α po působení endonukleas NdeI a XhoI s plasmidem pET-21c(+). Byl využit plasmid pET-21c(+) z předchozích experimentů naší laboratoře, který obsahoval insert genu pro jiný protein (tento již dále v dané studii nebyl zpracováván). Tento plasmid byl „štěpen“ endonukleasami NdeI a XhoI a následně byl separován na horizontální agarosové elektroforese (obrázek 15, strana 52). Po separaci byla určena koncentrace „štěpeného“ plasmidu pET-21c(+) (kapitola 3.3.14), a to 14,3 ng/ μ l. Ke směsi obsahující „naštěpený“ gen pro eIF2 α a „naštěpený“ plasmid pET-21c(+) byl následně přidán T4 pufr a T4 DNA ligasa. Po ukončení ligace (detailní postup (kapitola 3.3.5), byla DNA dané směsi transformována do kompetentních buněk *E. coli* DH5 α (kapitola 3.3.6). Ligace i transformace proběhla úspěšně, o čemž svědčí přítomnost kolonií bakterií *E. coli* na substrátu obsahující antibiotikum (rezistence na antibiotikum je zprostředkována plasmidem pET-21c(+)). Po výše popsané selekci buněk *E. coli*, proběhlo „namnožení“ buněk v LB mediu a z nich byl izolován plasmid pET-21c(+)/eIF2 α komerčním

kitem (kapitola 3.3.7) a byla určena jeho koncentrace (kapitola 3.3.14). Výsledky jsou zaznamenány v tabulce 11, strana 58.

Tabulka 11 Výsledné koncentrace DNA plasmidu *pET-21c(+)/eIF2 α*

Vzorek	Koncentrace [ng/ μ l]
pET-21c(+)/eIF2 α 1	120,5
pET-21c(+)/eIF2 α 2	82,9

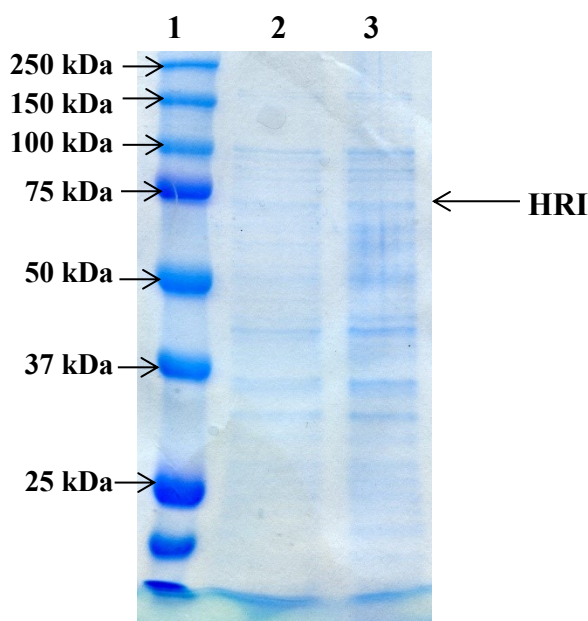
4.3 Exprese proteinu HRI

Pro expresi proteinu HRI byly použity buňky *E. coli* BL-21(DE3). Na připravené agarové plotny s ampicilinem byly nanесeny buňky *E. coli* BL-21(DE3) transformované vektorem pET-21c(+)/HRI. Společně s touto agarovou plotnou byla inkubována také kontrolní agarová plotna, na kterou byly nanесeny pouze buňky *E. coli* BL-21(DE3), které nebyly transformovány plasmidem rezistentním na ampicilin. Na kontrolní agarové plotně se neobjevily žádné kolonie a na agarové plotně s buňkami transformovanými plasmidem pET-21c(+)/HRI, který poskytuje rezistenci na ampicilin, narostlo cca 30 bakteriálních kolonií. Podařilo se tedy úspěšně transformovat buňky *E. coli* BL-21(DE3) vektorem pET-21c(+)/HRI. Inokulace TB media proběhla transformovanými buňkami *E. coli* BL-21(DE3) s vektorem pET-21c(+)/HRI a buňky byly kultivovány (kapitola 3.3.8).

Obecně platí, že pro dosažení co nejvyšších výtěžků exprese proteinu je nutné, aby byly bakterie namnoženy do určitého množství před indukcí jejich exprese v heterologních expresních systémech [45]. Optimální hodnota optické denzity buněk v příslušném médiu při 600 nm se pohybuje v rozmezí 0,6 – 1,2. Po pěti hodinách kultivace byla zjištěna hodnota optické denzity $OD_{600} = 1,0$. V této fázi bylo tedy dosaženo optimálního množství bakterií v kultivačním médiu a byla zahájena exprese proteinu přidávkem IPTG. Exprese byla ukončena centrifugací buněk. Výsledná hmotnost získaných buněk obsahujících protein HRI byla 20,3 g ze 4 l kultivačního media.

Aby bylo možné zkontrolovat, že získané buňky *E. coli* BL21-(DE3) obsahují protein HRI, byly odebrány vzorky pro analýzu pomocí SDS elektroforesy, a to před a po indukcii exprese HRI pomocí IPTG. Teoretická molekulová hmotnost proteinu HRI je 71 kDa, jak bylo odvozeno z aminokyselinové sekvence tohoto proteinu, proto byl pro tuto analýzu zvolen 12% akrylamidový gel, aby došlo k efektivnímu rozdělení proteinů o požadované molekulové hmotnosti. Výsledek kontrolní SDS elektroforesy, kdy vzorky byly po vhodném naředění nanесeny na akrylamidový gel je znázorněn na obrázku 18, strana 60. Do jamky 1 tohoto gelu byl nanесen komerčně dodávaný standard obsahující standardní proteiny o známé molekulové hmotnosti. Do jamky 2 byl nanесen vzorek suspenze buněk *E. coli* BL-21(DE3) před indukcí IPTG. V daném vzorku se nevyskytuje žádný protein o velikosti přibližně 71 kDa. Ve vzorku buněk po přidání IPTG (vzorek po ukončení exprese byl nanесen do jamky v dráze 3) je patrný signál v oblasti mobility odpovídající proteinu o velikosti přibližně 75 kDa (viz šipka směřující

do této oblasti (obrázek 18, strana 60). Na základě podobnosti molekulové hmotnosti tohoto proteinu a pruhu odpovídajícímu standardu 75 kDa, lze předpokládat, že se jedná o protein HRI.



Obrázek 18 Analýza exprese proteinu HRI v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) pomocí SDS elektroforesy v 12% akrylamidovém gelu

- (1) 1 Standard – Precision Plus Protein™, Dual color, Biorad
- (2) Buňky *E. coli* BL-21(DE3) před indukcí IPTG
- (3) Buňky *E. coli* BL-21(DE3) po indukcí IPTG

4.4. Izolace proteinu HRI z buněk *E. coli* BL-21(DE3)

Izolace proteinu byla provedena podle postupu v kapitole izolace (kapitola 3.3.9). Během purifikace byly odebírány vzorky, které byly analyzovány pomocí SDS elektroforesy (obrázek 19, strana 63). Nejprve byly buňky *E. coli* BL-21(DE3) obsahující exprimovaný protein HRI resuspendovány a buněčná stěna byla narušena pomocí ultrazvuku a lysozymu, aby došlo k uvolnění cytosolárního obsahu do roztoku. Následně byla provedena centrifugace této směsi. Do jamky 1 (obrázek 19, strana 63) byl nanesen vzorek frakce obsahující buněčné komponenty jako jsou membrány, inkluzní tělíska apod. odebrané po centrifugaci. Zde je vidět, že buňky obsahují velké množství bakteriálních proteinů a pravděpodobně také protein HRI (v oblasti přibližně 75 kDa). Můžeme tedy předpokládat, že v tomto purifikačním kroku dochází ke ztrátám proteinu HRI, ale v minoritním množství. Do jamky 2 byl nanesen vzorek

supernatantu cytosolární frakce po centrifugaci. V oblasti přibližně 75 kDa je již možné detekovat intenzivnější pruh, který pravděpodobně odpovídá proteinu HRI. Ve vzorku 2 je však stále spousta bakteriálních proteinů, které bylo nutné od proteinu HRI oddělit. K přečištění od bakteriálních proteinů byla vybrána afinitní chromatografie. Protein HRI na svém C-konci obsahuje sekvenci šesti za sebou následujících histidinů, tzv. histidinovou kotvu. Použitý afinitní nosič prostřednictvím kobaltnatých iontů inkorporovaných v jeho struktuře histidinovou kotvu váže. Vzorek frakce proteinů, které nebyly na afinitní nosič vázány, byl nanesen do jamky 3 (obrázek 19, strana 63). Kromě bakteriálních proteinů je zde vidět také pruh v oblasti 75 kDa, zřejmě tak nedošlo k dostatečné vazbě proteinu HRI k afinitnímu nosiči ať už z důvodu překročení kapacity daného nosiče nebo nedostatečně silné interakci. Protein HRI byl z afinitního nosiče eluován 200 mM roztokem imidazolu. Následně byl tento vzorek centrifugován s použitím „zahušťovací“ kyvety (Milipore), díky které došlo ke zvýšení koncentrace všech proteinů ve vzorku s molekulovou hmotností větší než 30 kDa. Výsledný vzorek byl nanesen do jamky 4 (obrázek 19, strana 63). V oblasti odpovídající molekulové hmotnosti proteinu přibližně 75 kDa jsou patrné tři pruhy. Nebylo tedy jednoznačně prokázáno, že se izolace HRI podařila.

Za účelem odstranění imidazolu a vysokomolekulárních proteinových agregátů byla provedena gelová filtrační chromatografie (kapitola 3.3.9). Výsledný chromatogram je na obrázku 20, strana 64, křivka znázorňující absorbanci při 280 nm je modrá. K prvnímu výraznějšímu nárůstu absorbance (A_{280}) došlo při elučním objemu 8 ml. Na základě údajů získaných při kalibraci chromatografické kolony bylo zjištěno, že proteiny eluované v této oblasti mají vysokou molekulovou hmotnost a putují s mrtvým objemem kolony. Pravděpodobně se tak jedná o proteinové agregáty. Výraznější nárůst absorbance A_{280} byl zaznamenán při elučním objemu mezi 12 a 17 ml. V této oblasti dochází k eluci proteinů s molekulovou hmotností, která odpovídá také proteinu HRI.

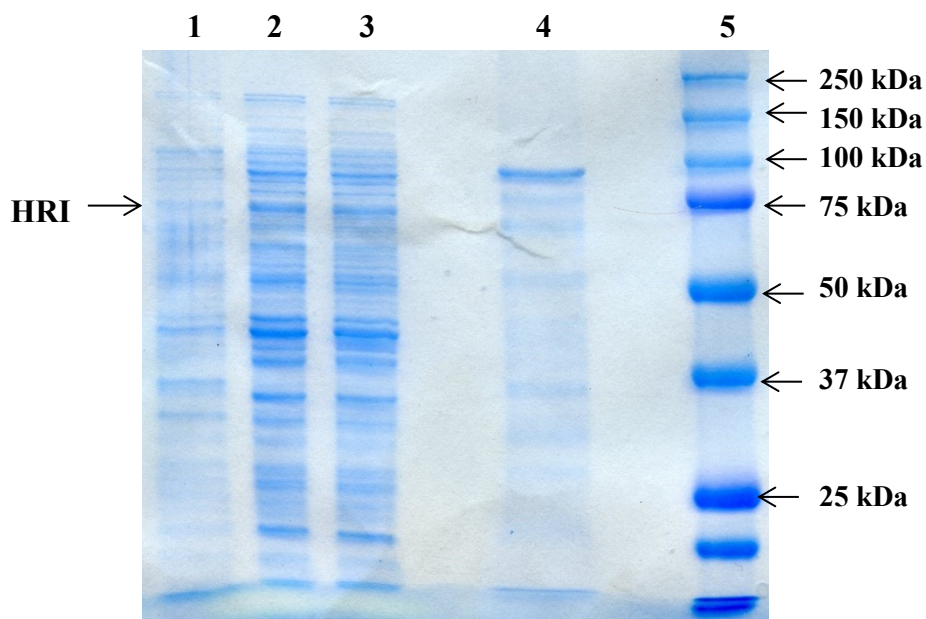
V průběhu gelové filtrační chromatografie byly jímány jednotlivé frakce, (na obrázku 20, strana 64 vyznačeny černými čísly). Z těchto frakcí byly odebrány vzorky, které byly analyzovány v 12% akrylamidovém gelu pomocí SDS elektroforesy (obrázek 21, strana 65). Do první jamky akrylamidového gelu byl nanesen komerční proteinový standard. Do jamek 2 – 11 byly naneseny jednotlivé vzorky frakcí filtrační gelové chromatografie. Pruh, jehož mobilita odpovídá mobilitě standardu proteinu o molekulové hmotnosti přibližně 75 kDa je možné pozorovat v drahách 6 – 11. Do jamek těchto drah byly naneseny vzorky odebrané

z elučnicích frakcí 5 – 10 (černá čísla obrázků 20, strana 64). Elučnicím objemům těchto frakcí odpovídá nejvyšší naměřená intenzita absorpance A_{280} . Tyto frakce byly spojeny a výsledný roztok obsahující protein HRI byl zahuštěn. Tento finální vzorek byl analyzován pomocí SDS elektroforesy (obrázek 21, strana 65, dráha 12). Zde je vidět velmi intenzivní pruh v oblasti odpovídající molekulové hmotnosti přibližně 75 kDa. Pod tímto pruhem se nachází další méně intenzivní pruhy. Z výsledku této analýzy bohužel nelze s jistotou určit, zda se jedná o bakteriální proteiny nebo dochází k degradaci proteinu HRI, např. působením bakteriálních enzymů. Z tohoto důvodu byla provedena další analýza zaměřená na imunodetekci histidinové kotvy, kterou rekombinantní protein HRI obsahuje (kapitola 4.5).

Ve finálním vzorku byla spektrofotometricky stanovena koncentrace proteinu, a to s použitím dvou metod, pomocí absorpance při 280 nm (na základě teoretického extinkčního koeficientu podle kapitoly 3.3.16) a metodou využívající bicinchoninovou kyselinu v reakčním činidle (na základě porovnání se standardem, kterým byl BSA) (kapitola 3.3.15). Koncentrace HRI určené oběma metodami byly velmi podobné a jsou uvedeny tabulce 12, strana 62.

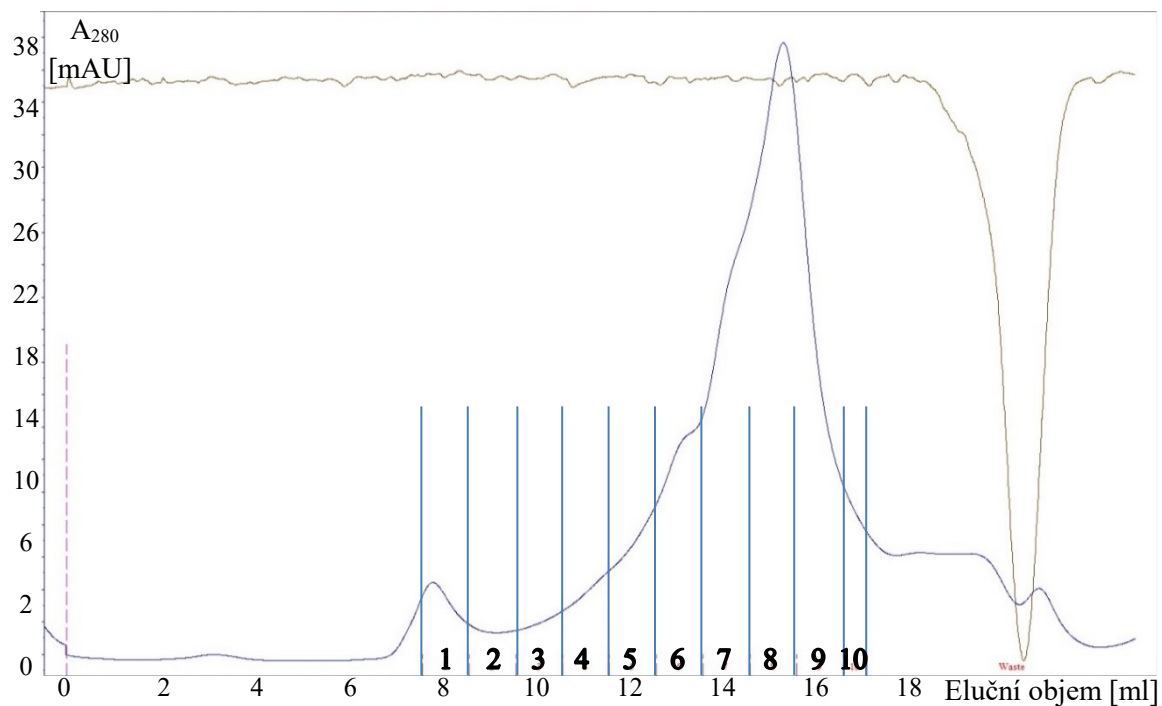
Tabulka 12 Výsledné koncentrace proteinu HRI purifikovaného z buněk *E.coli* BL21-(DE3)

Použitá metoda pro stanovení koncentrace proteinu HRI	Koncentrace [mg/ml]
Koncentrace finálního preparátu, obsahující protein HRI stanovená přímo při A_{280}	0,5
Koncentrace finálního preparátu, využívající bicinchoninovou kyselinu v reakčním činidle (na základě porovnání se standardem, kterým byl BSA)	0,6
Koncentrace – průměrná hodnota z obou měření	0,55



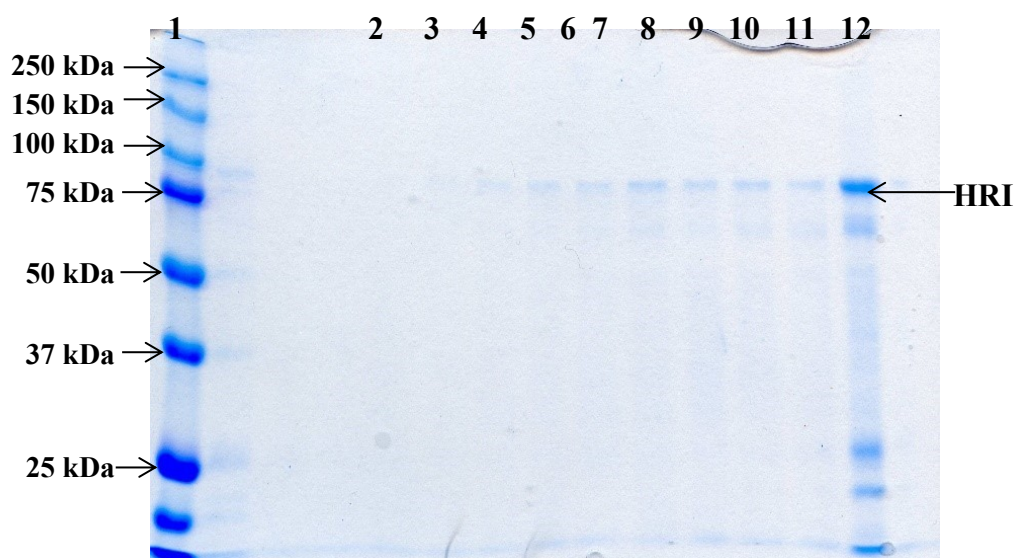
Obrázek 19 Analýza jednotlivých kroků izolace proteinu HRI z buněk *E. coli* BL-21(DE3) pomocí SDS elektroforezy v 12% akrylamidovém gelu

- (1) Vzorek partikulární frakce
- (2) Vzorek supernatantu cytosolární frakce
- (3) Vzorek cytosolární frakce, nevázané na afinitní nosič
- (4) Vzorek eluovaný 200 mM roztokem imidazolu z afinitního nosiče
- (5) Standard – Precision Plus ProteinTM, Dual color, Biorad



Obrázek 20 Výsledný chromatogram preparátu obsahujícího protein HRI získaný metodou gelové filtrační chromatografie

Modrá křivka znázorňuje signál, který byl získán z hodnot absorbance eluovaného vzorku. Černými čísly a modrými čarami jsou znázorněny jednotlivé frakce, které byly odebrány. Hnědá křivka znázorňuje konduktivitu [mS/cm].



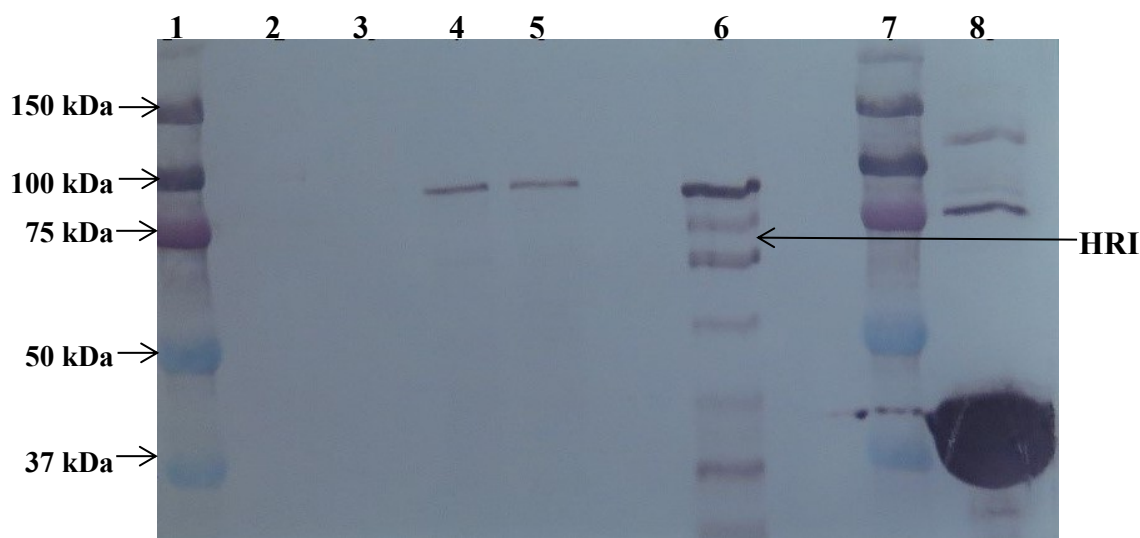
Obrázek 21 Analýza jednotlivých frakcí mobilní fáze gelové chromatografie během purifikace HRI pomocí SDS elektroforesy v 12% akrylamidovém gelu

- (1) Standard - Precision Plus ProteinTM, Dual color, Biorad
- (2) Eluční frakce 1 z gelové chromatografie
- (3) Eluční frakce 2 z gelové chromatografie
- (4) Eluční frakce 3 z gelové chromatografie
- (5) Eluční frakce 4 z gelové chromatografie
- (6) Eluční frakce 5 z gelové chromatografie
- (7) Eluční frakce 6 z gelové chromatografie
- (8) Eluční frakce 7 z gelové chromatografie
- (9) Eluční frakce 8 z gelové chromatografie
- (10) Eluční frakce 9 z gelové chromatografie
- (11) Eluční frakce 10 z gelové chromatografie
- (12) Finální preparát proteinu HRI

4.5 Imunodetekce histidinové kotvy proteinu HRI

Detekce proteinu HRI metodou „western blot“ využila přítomnosti histidinové kotvy na C-konci rekombinantního proteinu HRI. Princip imunodetekce histidinové kotvy je popsán v kapitole 3.3.11. Přenos pomocí elektrického proudu byl proveden z akrylamidového gelu, do jehož jamek byly naneseny vzorky odebrané v průběhu exprese a purifikace proteinu HRI (obrázek 18, strana 60 a obrázek 19, strana 63) a z akrylamidového gelu, na kterém jsou naneseny vzorky eluovaných frakcí během gelové chromatografie (obrázek 21, strana 65).

Nitrocelulosová membrána na obrázku 22, strana 66 zobrazuje výsledek imunodetekce proteinu HRI ze vzorků odebraných během purifikace a exprese.



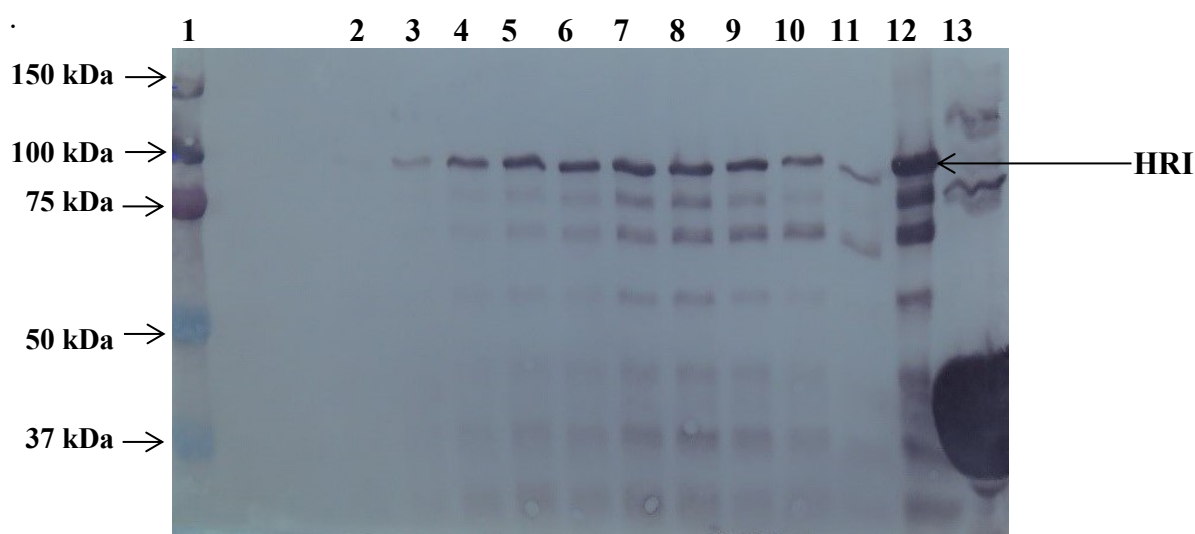
Obrázek 22 Nitrocelulosová membrána po imunodetekci vzorků z jednotlivých kroků exprese a izolace proteinu HRI z buněk *E. coli* BL21(DE3)

- (1) Standard – Precision Plus ProteinTM, Dual color, Biorad
- (2) Buňky BL-21(DE3) *E. coli* před indukcí IPTG
- (3) Buňky BL-21(DE3) *E. coli* po indukcí IPTG
- (4) Vzorek supernatantu cytosolární frakce
- (5) Vzorek cytosolární frakce, nevázané na afinitní nosič
- (6) Vzorek eluovaný 200 mM roztokem imidazolu z afinitního nosiče
- (7) Marker – Precision Plus ProteinTM, Dual color, Biorad
- (8) Protein AfGcHK s histidinovou kotvou použitý jako pozitivní kontrola

Na obrázku 22, strana 66 je zobrazena nitrocelulosová membrána s vizualizací všech interakcí primární protilátky proti histidinové kotvě s proteinem obsahujícím histidinovou kotvu. Jednotlivé pruhy na membráně tedy ukazují výskyt proteinů, které obsahují histidinovou kotvu, případně jinou sekvenci bohatou na přítomnost polyhistidinové skupiny. V případě vzorku pozitivní kontroly došlo k vizualizaci pruhu kolem 40 kDa. Koncentrace proteinu je však příliš vysoká. V jamkách 2 a 3 byly naneseny vzorky odebrané z bakteriálních pelet před a po indukcí exprese. V drahách 4 - 6 jsou naneseny vzorky z průběhu purifikace. V oblasti s mobilitou přibližně 75 kDa došlo k pozitivní vizualizaci pruhu. Je tak pravděpodobné, že se jedná o protein HRI značený histidinovou kotvou. V dráze 6 je pruhů několik, což by mohlo znamenat, že protein je nestabilní a je štěpen od N-konce na několik produktů. Tvrzení, že je

protein štěpen právě od N-konce a není štěpený od C-konce je založeno na faktu, že histidinová kotva je na C-konci proteinu a tím by díky jejímu odštěpení dále nedocházelo k imunodetekci pomocí protilátky proti histidinové kotvě.

Nitrocelulosová membrána obsahující vzorky vzniklé přenosem z akrylamidového gelu, který obsahoval vzorky frakcí gelové chromatografie (obrázek 21, strana 65), je znázorněna na obrázku 23, strana 67. V tomto případě vidíme pruhy s mobilitou cca 75 kDa v drahách 4, 5, 6, které jsou na akrylamidovém gelu nedetekovatelné. Pomocí imunodetekční metody je tak dosaženo vyššího rozlišení. V drahách 5 – 12 je vizualizováno větší množství pruhů v každé dráze. To by mohlo opět znamenat, že protein HRI je štěpen od N-konce. V jamce dráhy 13 byl nanesen vzorek, který představoval pozitivní kontrolu.



Obrázek 23 Nitrocelulosová membrána po imunodetekci vzorků jednotlivých frakcí gelové chromatografie

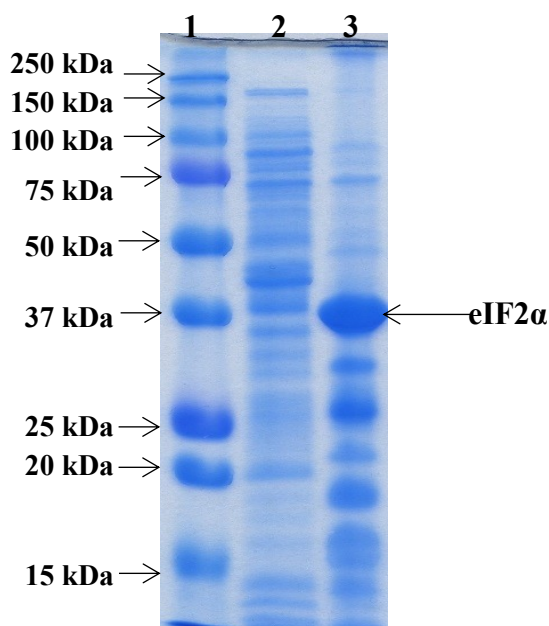
- (1) Standard - Precision Plus Protein™, Dual color, Biorad
- (2) Eluční frakce 1 z gelové chromatografie
- (3) Eluční frakce 2 z gelové chromatografie
- (4) Eluční frakce 3 z gelové chromatografie
- (5) Eluční frakce 4 z gelové chromatografie
- (6) Eluční frakce 5 z gelové chromatografie
- (7) Eluční frakce 6 z gelové chromatografie
- (8) Eluční frakce 7 z gelové chromatografie
- (9) Eluční frakce 8 z gelové chromatografie
- (10) Eluční frakce 9 z gelové chromatografie
- (11) Eluční frakce 10 z gelové chromatografie
- (12) Finální preparát proteinu HRI
- (13) Protein AfGcHK s histidinovou kotvou jako pozitivní kontrola

4.6 Exprese proteinu eIF2 α

Pro expresi proteinu eIF2 α byly použity buňky *E. coli* BL-21(DE3). Na připravené agarové plotny s ampicilinem byly nanесeny buňky *E. coli* BL-21(DE3) transformované vektorem pET-21c(+)/eIF2 α . Společně s touto agarovou plotnou byla inkubována také kontrolní agarová plotna, na kterou byly nanесeny pouze buňky *E. coli* BL-21(DE3), které nebyly transformovány plasmidem rezistentním na ampicilin. Na kontrolní agarové plotně se neobjevily žádné kolonie a na agarové plotně s buňkami transformovanými plasmidem pET-21c(+)/eIF2 α , který poskytuje rezistenci na ampicilin, se vyskytlo cca 40 bakteriálních kolonií. Podařilo se tedy úspěšně transformovat buňky *E. coli* BL-21(DE3) vektorem pET-21c(+)/eIF2 α . Inokulace TB media proběhla transformovanými buňkami *E. coli* BL-21(DE3) s vektorem pET-21c(+)/eIF2 α a buňky byly kultivovány (kapitola 3.3.8).

Po pěti hodinách kultivace byla zjištěna hodnota optické denzity OD₆₀₀ = 0,9. V této fázi bylo tedy dosaženo optimálního množství bakterií v kultivačním médiu a byla zahájena exprese proteinu přidavkem IPTG. Exprese byla ukončena centrifugací buněk. Výsledná hmotnost získaných buněk obsahujících protein eIF2 α byla 23,5 g ze 4 l kultivačního media.

Aby bylo možné zkontrolovat, že získané buňky *E. coli* BL21-(DE3) obsahují protein eIF2 α , byly odebrány vzorky pro analýzu pomocí SDS elektroforesy, a to před a po indukci exprese eIF2 α . Teoretická molekulová hmotnost proteinu eIF2 α je 36 kDa, jak bylo odvozeno z aminokyselinové sekvence tohoto proteinu. Výsledky kontrolní SDS elektroforesy, kdy vzorky byly po vhodném naředění nanесeny na akrylamidový gel, jsou znázorněny na obrázku 24, strana 69. Do jamky 1 tohoto gelu byl nanесen komerčně dodaný standard obsahující proteiny o známé molekulové hmotnosti. Do jamky 2 byl nanесen vzorek suspenze buněk *E. coli* BL-21(DE3) před indukcí IPTG. V daném vzorku se nevyskytuje žádný protein o molekulové hmotnosti 36 kDa. Do jamky 3 byl nanесen vzorek buněčné suspenze po ukončení kultivace buněk (tedy po přidání IPTG). V této dráze je patrný signál v oblasti mobility odpovídající proteinu o velikosti přibližně 37 kDa (viz šipka směřující do této oblasti na obrázku 24, strana 69). Na základě podobnosti molekulové hmotnosti tohoto proteinu a pruhu odpovídajícímu standardu 37 kDa, lze předpokládat, že se jedná o protein eIF2 α .



Obrázek 24 Analýza exprese proteinu *eIF2 α* v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) pomocí SDS elektroforesy v 12% akrylamidovém gelu

(1) Standard – Precision Plus ProteinTM, Dual color, Biorad

(2) Buňky *E. coli* BL-21(DE3) před indukcí IPTG

(3) Buňky *E. coli* BL-21(DE3) po indukcí IPTG

4.7 Izolace proteinu *eIF2 α* z buněk *E. coli* BL-21(DE3)

Izolace proteinu byla provedena podle postupu v kapitole izolace (kapitola 3.3.9). Posledním krokem tohoto purifikačního postupu bylo odstranění imidazolu a vysokomolekulárních agregátů z preparátu pomocí gelové filtrační chromatografie. Výsledný chromatogram je na obrázku 25, strana 71, křivka znázorňující absorbanci při 280 nm je modrá. K prvnímu výraznějšímu nárůstu absorbance (A_{280}) došlo v elučním objemu přibližně 7 ml. Na základě údajů získaných při kalibraci chromatografické kolony bylo zjištěno, že proteiny eluované v této oblasti mají vysokou molekulovou hmotnost a putují s mrtvým objemem kolony. Pravděpodobně se tak jedná o proteinové agregáty. V průběhu gelové filtrační chromatografie byly jímány jednotlivé frakce (na obrázku 25, strana 71 vyznačeny černými čísly). Z těchto frakcí byly odebrány vzorky, které byly analyzovány v 12% akrylamidovém gelu pomocí SDS elektroforesy (obrázek 26, strana 72).

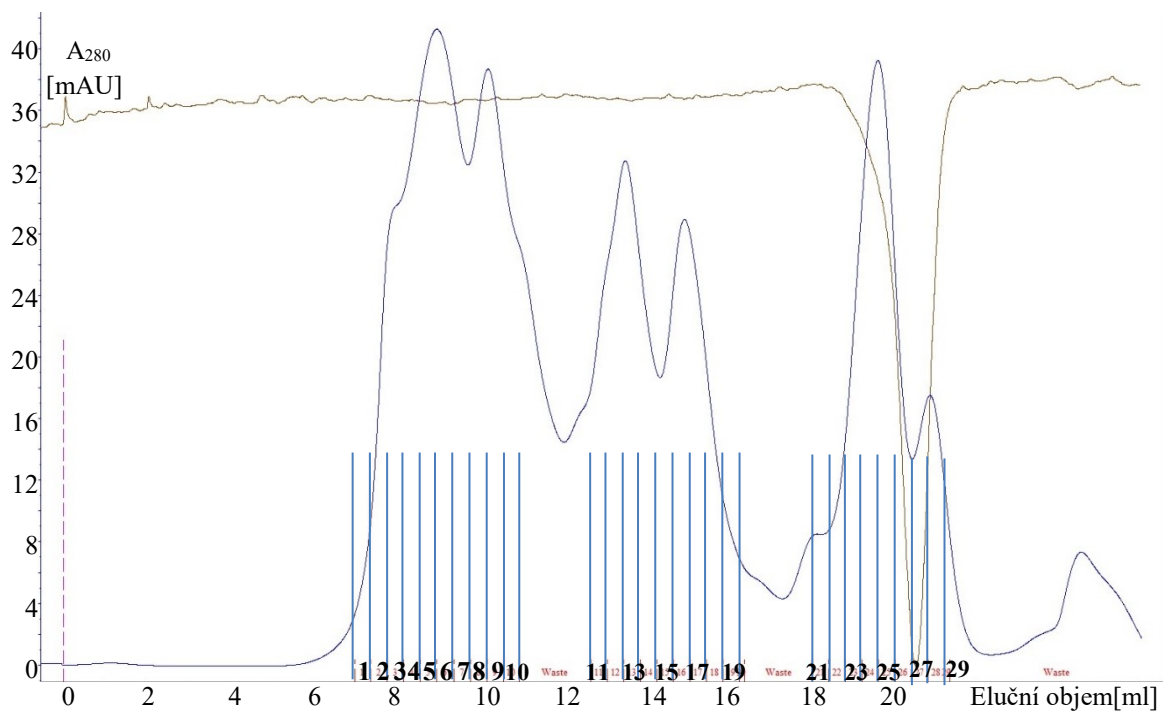
Na gelu jsou zobrazeny signály odpovídající mobilitě standardu 37 kDa, z čeho lze předpokládat, že se jedná o protein *eIF2 α* , který má molekulovou hmotnost přibližně 36 kDa.

Tyto signály na akrylamidovém gelu (obrázek 26, strana 72) v drahách 2 – 12 odpovídají elučním frakcím 4 – 14. Nejvýraznější signály jsou v drahách 5 – 9, které odpovídají elučním frakcím 7 – 11. Další nárůst absorbance A_{280} v chromatogramu na obrázek 25, strana 71 lze pozorovat při hodnotě elučního objemu přibližně 13 ml. Také tyto frakce (15-20) byly analyzovány pomocí SDS elektroforesy (obrázek 27, strana 73 v drahách 3 – 8), která odhalila přítomnost proteinu s mobilitou standardu odpovídající velikosti 37 kDa v těchto frakcích. Protein eIF2 α byl tedy eluován ve frakcích 4 – 20 (obrázek 25, strana 71). Další nárůst signálu absorbance A_{280} byl detekován při hodnotě elučního objemu přibližně 18 ml. Eluční frakce (23, 24, 25 a 28) z tohoto nárůstu signálu absorbance A_{280} neposkytovaly žádný signál na akrylamidovém gelu (obrázek 27, strana 73, dráhy 10 – 13). Eluční frakce 4 – 20 (obrázek 25, strana 71) byly „zahuštěny“ a finální vzorek byl opět podroben elektroforetické analýze (dráha 2, obrázek 27, strana 73). Je patrné, že finální preparát obsahuje kromě výrazného signálu v oblasti odpovídající molekulové hmotnosti přibližně 37 kDa další proteiny o velikosti 25 kDa a méně. Tyto pruhy (25 kDa) jsou i v ostatních drahách (dráhy 2 – 12 obrázek 26, strana 72 a dráhy 3 – 8 obrázek 27, strana 73). Oba akrylamidové gely, (obrázek 26, strana 72 a obrázek 27, strana 73) byly podrobeny elektropřenosu a následné imunodetekci histidinové kotvy, kterou protein eIF2 α obsahuje.

Ve finálním vzorku proteinu eIF2 α byla stanovena koncentrace proteinu, a to s použitím dvou metod, pomocí absorbance při 280 nm (na základě teoretického extinkčního koeficientu (podle kapitoly 3.3.16) a metodou využívající bicinchoninovou kyselinu v reakčním činidle (na základě porovnání se standardem, kterým byl BSA) (kapitola 3.3.15). Koncentrace eIF2 α určené oběma metodami jsou uvedeny v tabulce 13, strana 70.

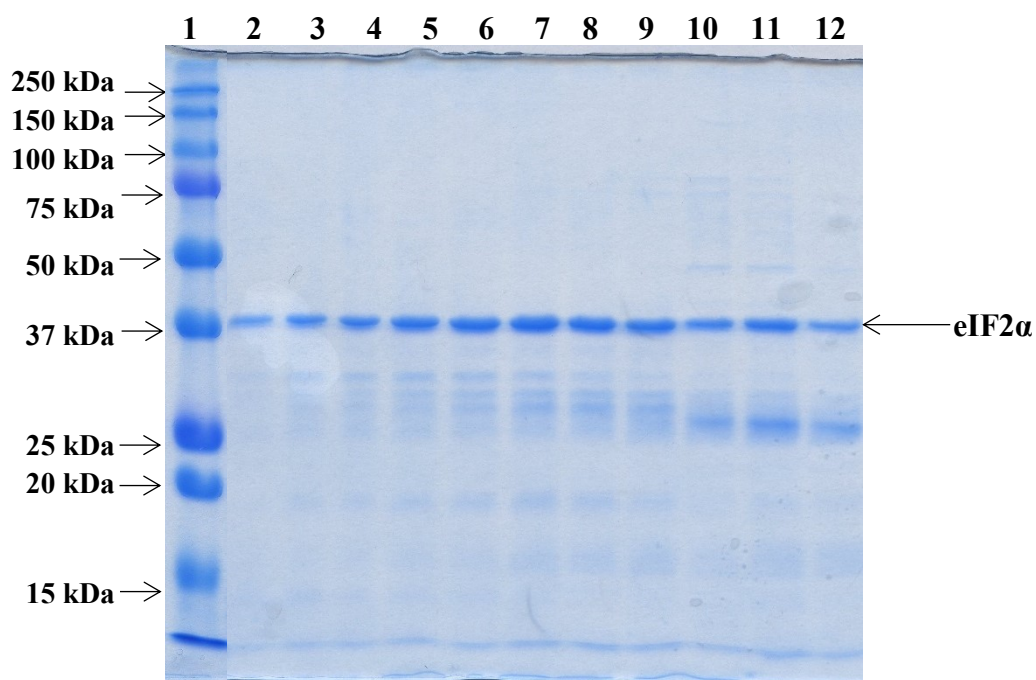
Tabulka 13 Výsledné koncentrace proteinu eIF2 α po izolaci z buněk *E. Coli* BL-21(DE3)

Použitá metoda pro stanovení koncentrace proteinu eIF2 α	Koncentrace [mg/ml]
Koncentrace finálního preparátu, obsahující protein eIF2 α stanovená přímo při A_{280}	1,9
Koncentrace finálního preparátu, obsahující protein eIF2 α stanovená metodou využívající bicinchoninovou kyselinu v reakčním činidle (na základě porovnání se standardem, kterým byl BSA)	1,8
Koncentrace – průměrná hodnota z obou měření	1,85



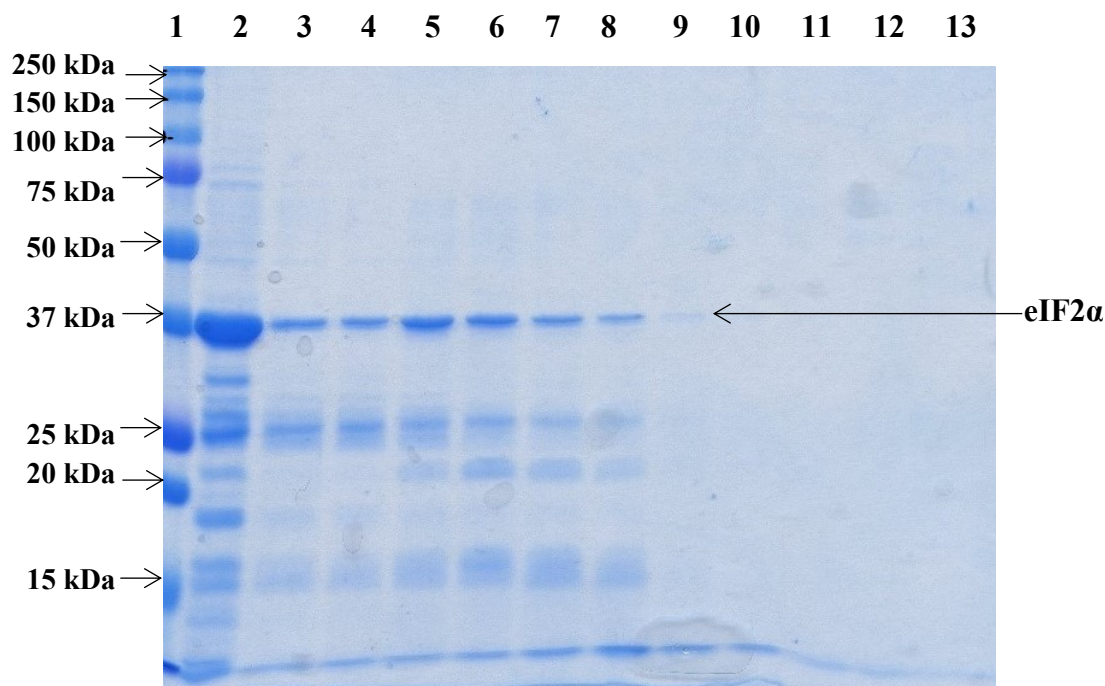
Obrázek 25 Výsledný chromatogram preparátu obsahujícího protein eIF2 α získaný metodou gelové filtrační chromatografie

Modrá křivka znázorňuje signál, který byl získán z hodnot absorbance eluovaného vzorku. Černými čísly a modrými čarami jsou znázorněny jednotlivé frakce, které byly odebrány. Hnědá křivka představuje konduktivitu [mS/cm].



Obrázek 26 Analýza jednotlivých frakcí mobilní fáze gelové chromatografie během purifikace eIF2 α pomocí SDS elektroforesy v 12% akrylamidovém gelu

- (1) Standard – Precision Plus ProteinTM, Dual color, Biorad
- (2) Eluční frakce 4 z gelové chromatografie eIF2 α
- (3) Eluční frakce 5 z gelové chromatografie eIF2 α
- (4) Eluční frakce 6 z gelové chromatografie eIF2 α
- (5) Eluční frakce 7 z gelové chromatografie eIF2 α
- (6) Eluční frakce 8 z gelové chromatografie eIF2 α
- (7) Eluční frakce 9 z gelové chromatografie eIF2 α
- (8) Eluční frakce 10 z gelové chromatografie eIF2 α
- (9) Eluční frakce 11 z gelové chromatografie eIF2 α
- (10) Eluční frakce 12 z gelové chromatografie eIF2 α
- (11) Eluční frakce 13 z gelové chromatografie eIF2 α
- (12) Eluční frakce 14 z gelové chromatografie eIF2 α



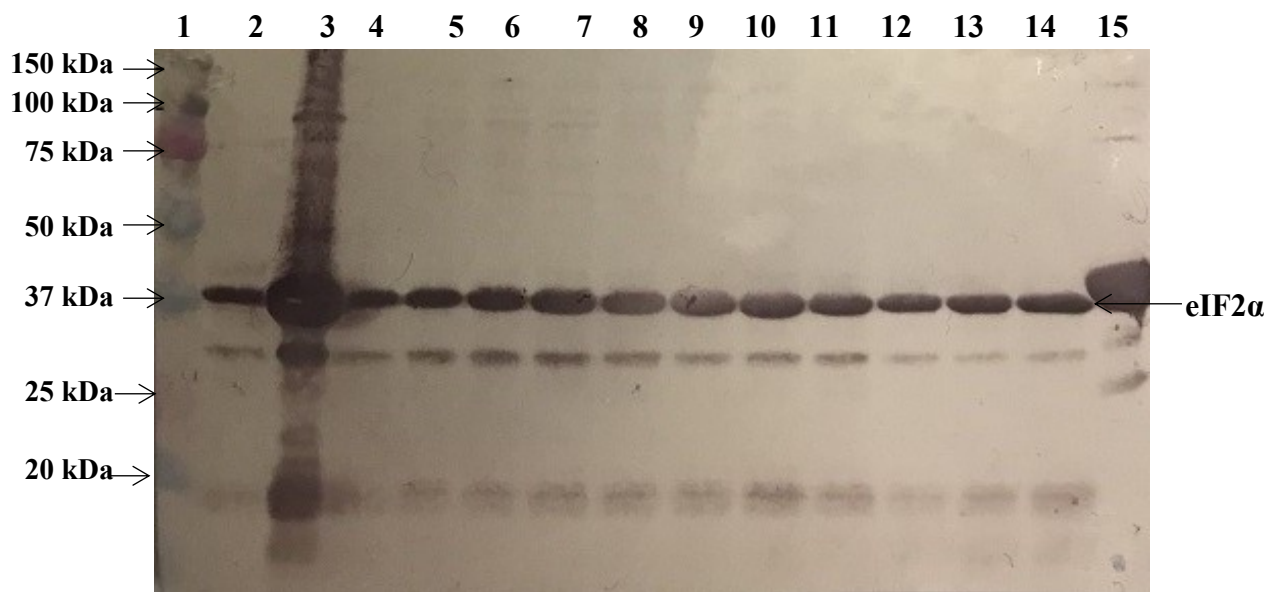
Obrázek 27 Analýza jednotlivých frakcí eluovaných během gelové chromatografie pomocí SDS elektroforesy v 12% akrylamidovém gelu

- (1) Standard – Precision Plus Protein™, Dual color, Biorad
- (2) Finální preparát eIF2α po gelové chromatografii
- (3) Eluční frakce 15 z gelové chromatografie eIF2α
- (4) Eluční frakce 16 z gelové chromatografie eIF2α
- (5) Eluční frakce 17 z gelové chromatografie eIF2α
- (6) Eluční frakce 18 z gelové chromatografie eIF2α
- (7) Eluční frakce 19 z gelové chromatografie eIF2α
- (8) Eluční frakce 20 z gelové chromatografie eIF2α
- (9) Eluční frakce 22 z gelové chromatografie eIF2α
- (10) Eluční frakce 23 z gelové chromatografie eIF2α
- (11) Eluční frakce 24 z gelové chromatografie eIF2α
- (12) Eluční frakce 25 z gelové chromatografie eIF2α
- (13) Eluční frakce 28 z gelové chromatografie eIF2α

4.6 Imunodetekce histidinové kotvy proteinu eIF2α

Detekce proteinu eIF2α metodou „western blot“ využila přítomnosti histidinové kotvy na C-konci rekombinantního proteinu eIF2α. Princip imunodetekce histidinové kotvy je popsán v kapitole (kapitola 3.3.11). Přenos pomocí elektrického proudu byl proveden

z akrylamidového gelu, do jehož jamek byly naneseny vzorky odebrané v průběhu exprese proteinu eIF2 α (obrázek 24, strana 69) a během průběhu gelové chromatografie, (obrázek 26, strana 72 a obrázek 27, strana 73).

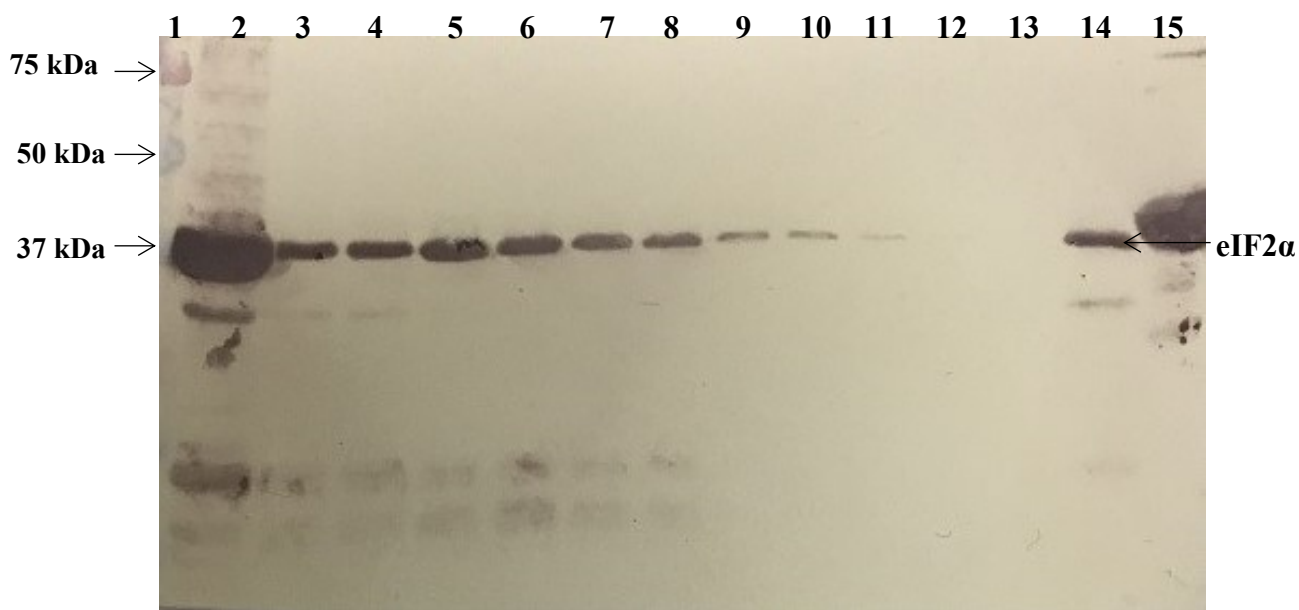


Obrázek 28 Nitrocelulosová membrána po imunodetekci vzorků z exprese proteinu eIF2 α v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) a vzorky z gelové chromatografie prováděné v rámci purifikace proteinu

- (1) Standard – Precision Plus ProteinTM, Dual color, Biorad
- (2) Buňky *E. coli* BL-21(DE3) před indukcí IPTG
- (3) Buňky *E. coli* BL-21(DE3) po indukcí IPTG
- (4) Eluční frakce 4 z gelové chromatografie eIF2 α
- (5) Eluční frakce 5 z gelové chromatografie eIF2 α
- (6) Eluční frakce 6 z gelové chromatografie eIF2 α
- (7) Eluční frakce 7 z gelové chromatografie eIF2 α
- (8) Eluční frakce 8 z gelové chromatografie eIF2 α
- (9) Eluční frakce 9 z gelové chromatografie eIF2 α
- (10) Eluční frakce 10 z gelové chromatografie eIF2 α
- (11) Eluční frakce 11 z gelové chromatografie eIF2 α
- (12) Eluční frakce 12 z gelové chromatografie eIF2 α
- (13) Eluční frakce 13 z gelové chromatografie eIF2 α
- (14) Eluční frakce 14 z gelové chromatografie eIF2 α
- (15) Protein AfgCHK obsahující histidinovou kotvu jako pozitivní kontrola

Dráhy 2 a 3 (obrázek 28, strana 74) znázorňují analýzu vzorků suspenze buněk před a po indukcí IPTG. V obou případech byly vizualizovány pruhy v oblasti přibližně 37 kDa. Stejně tak tomu bylo u vzorků frakcí eluovaných během gelové chromatografie dráhy 4 – 14 (obrázek 28, strana 74) a dráhy 3 – 11 a 14 (obrázek 29, strana 75). Zároveň na nitrocelulosové membráně na obrázku 28, strana 74 jsou vizualizovány pruhy, které indikují přítomnost proteinů

s molekulovou hmotností menší než 37 kDa ve vzorku. V případě vzorku pozitivní kontroly došlo k vizualizaci pruhu kolem 40 kDa (dráha 15 obrázek 28, strana 74 a dráha 15 obrázek 29, strana 75). Na obrázku 29, strana 75 v drahách 3 – 11 jsou vizualizovány pruhy v oblasti přibližně 37 kDa, kde se vyskytuje protein eIF2 α . Finální vzorek v dráze 2 byl nanesen na jamku ve vysoké koncentraci a tak tento signál přesahuje i do okolních drah. Pomocí imunodetekce histidinové kotvy byla potvrzena přítomnost proteinu eIF2 α ve vzorku.



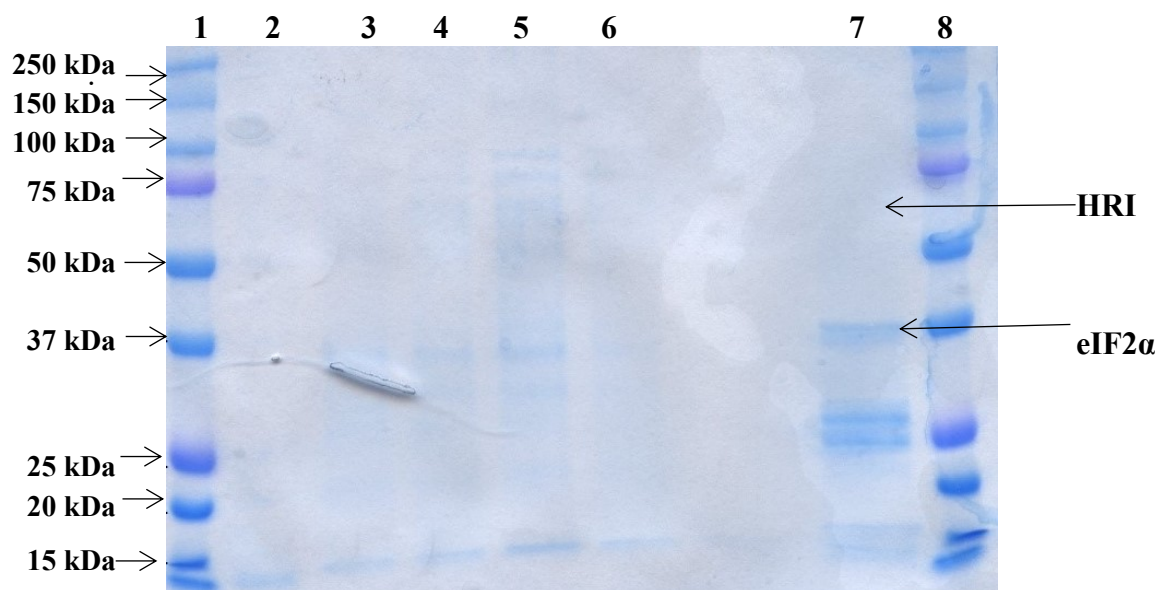
Obrázek 29 Nitrocelulosové membrána po imunodetekci vzorků z gelové chromatografie izolace proteinu eIF2 α z buněk *E. coli* BL-21(DE3)

- (1) Standard – Precision Plus ProteinTM, Dual color, Biorad
- (2) Koncentrát z elučních frakcí po gelové chromatografii
- (3) Eluční frakce 15 z gelové chromatografie eIF2 α
- (4) Eluční frakce 16 z gelové chromatografie eIF2 α
- (5) Eluční frakce 17 z gelové chromatografie eIF2 α
- (6) Eluční frakce 18 z gelové chromatografie eIF2 α
- (7) Eluční frakce 19 z gelové chromatografie eIF2 α
- (8) Eluční frakce 20 z gelové chromatografie eIF2 α
- (9) Eluční frakce 22 z gelové chromatografie eIF2 α
- (10) Eluční frakce 23 z gelové chromatografie eIF2 α
- (11) Eluční frakce 24 z gelové chromatografie eIF2 α
- (12) Eluční frakce 25 z gelové chromatografie eIF2 α
- (13) Eluční frakce 28 z gelové chromatografie eIF2 α
- (14) Eluční frakce 3 z gelové chromatografie eIF2 α
- (15) Protein AfGcHK jako kontrola pro histidinovou kotvu

4.7. Pilotní charakterizace proteinů HRI a eIF2 α se zaměřením na jejich teplotní stabilitu

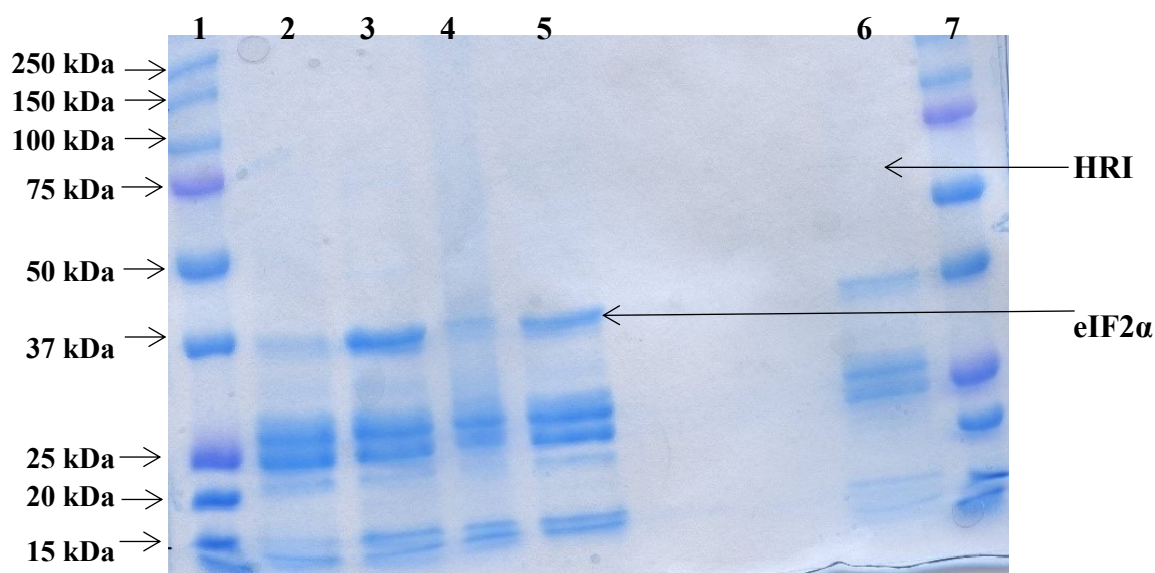
Při testování vlivu teploty na stabilitu proteinů (kapitola 3.3.17) bylo zkoumáno, zda má skladování proteinů při různé teplotě vliv na jejich degradaci případně agregaci. Po ukončení experimentů byly vzorky analyzovány pomocí SDS elektroforesy. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 30, strana 77 v případě charakterizace proteinu HRI a obrázku 31, strana 78 v případě charakterizace proteinu eIF2 α . Z výsledků na obrázku 30, strana 77 se prakticky nedá určit, který druh ukládání proteinu HRI je nejvýhodnější.

V případě proteinu eIF2 α teplotní analýza přinesla důležité výsledky ohledně uchovávání tohoto proteinu. Nejsilnější pruh kolem 37 kDa, kde je nejpravděpodobnější výskyt proteinu eIF2 α , je vidět v dráze 3 (obrázek 31, strana 78), kdy byl protein uchováván při -20 °C a nechán samovolně zmrznout v průběhu 3 dnů. Ve čtvrté dráze vidíme mnohem slabší pruh v oblasti 37 kDa, vzorek byl uchován v -80°C. Tento vzorek byl však chlazen pomocí teplotního šoku kapalným dusíkem a následně byl uložen do -80 °C. Druhý nejsilnější pruh odpovídající proteinu eIF2 α je v dráze 5, kdy byl vzorek ponechán v lednici při teplotě cca 7 °C. Nejslabší pruh proteinu eIF2 α je vidět v dráze 2, kdy byl protein eIF2 α ponechán při laboratorní teplotě a tím došlo k jeho degradaci. Tento výsledek byl předpokládán, proto i všechny purifikační kroky byly prováděny při teplotě cca 7 °C.



Obrázek 30 Pilotní charakterizace proteinu *HRI* se zaměřením na jeho teplotní stabilitu pomocí SDS elektroforesy

- 1) Standard – Precision Plus Protein™, Dual color, Biorad
- 2) *HRI* 3 dny při laboratorní teplotě cca 20 °C
- 3) *HRI* 3 dny v lednici při teplotě cca 7 °C
- 4) *HRI* 1 den při laboratorní teplotě cca 20 °C
- 5) *HRI* 1 den v lednici při teplotě cca 7 °C
- 6) *HRI* chlazené teplotním šokem pomocí kapalného dusíku
- 7) Směs *HRI* + *eIF2α*
- 8) Marker – Precision Plus Protein™, Dual color, Biorad



Obrázek 31 Pilotní charakterizace proteinu *eIF2α* se zaměřením na jeho teplotní stabilitu pomocí SDS elektroforezy

- 1) Standard – Precision Plus Protein™, Dual color, Biorad
- 2) *eIF2α* 3 dny při laboratorní teplotě cca 20 °C
- 3) *eIF2α* 3 dny v mrazícím boxu při teplotě cca -20 °C
- 4) *eIF2α* chlazený teplotním šokem pomocí kapalného dusíku
- 5) *eIF2α* uchovávaný v lednici při teplotě cca 7 °C
- 6) Směs HRI + *eIF2α*
- 7) Standard – Precision Plus Protein™, Dual color, Biorad

5 Diskuze

Prvním cílem předkládané bakalářské práce bylo zpracování dosavadních vědeckých poznatků ohledně proteinu HRI. Funkce a využití HRI v organismu je kromě jiného spojena s regulací poměru hemu ke globinovým řetězcům, který musí být 1:1, aby nedocházelo k nahromadění jednotlivých samostatných komponentů molekul hemoglobinu (tj. samotného hemu nebo apoglobinu) [26,33]. Nedodržením tohoto poměru by mohlo docházet k precipitaci proteinu v retikulocytech nebo reakcím iontů železa samotného hemu, což oboje je pro buňku toxické [46]. Působení HRI v tomto procesu je popsáno v kapitole 1.2.1.4. Funkce HRI je úzce spjata i s onemocněními spojenými s anémií. Mezi tato onemocnění patří například sideropenická anémie a β -thalasemie [47,48]. Pro tato onemocnění je typická porucha syntézy globinů a hemu, proto je možné předpokládat, že tato onemocnění budou úzce souviset s působením HRI. Sideropenická anémie je způsobena nedostatkem iontů železa v organismu [47]. Při β -thalesemii naopak dochází ke „špatné“ syntéze globinu, přesněji β -řetězcům, zatímco α -řetězce jsou syntetizovány správně, čím vzniká nadbytek α -řetězců nad β -řetězce [48]. β -thalesemie vzniká poruchou mechanismu proteosyntézy, například mutací genu globinu nebo jeho promotoru. Při nadbytku β -řetězců dochází k jejich precipitaci, což vede k aktivaci HRI, které mechanismem popsaným v kapitole 1.2.1 zastaví proteosyntézu α -řetězce a tím zamezí jeho precipitaci v erythrocytech [48]. Teprve nedávno bylo zjištěno, že HRI hraje významnou roli také při nádorových onemocněních, a to konkrétně v případě nádoru plic. Bylo zjištěno, že v buňkách nádoru plic je vysoká incidence přítomnosti mutovaného genu pro HRI (Gly202 je nahrazen Ser) [49]. To je dalším důvodem pro studium mechanismu působení HRI, neboť by takové poznatky mimo jiné pomohly vysvětlit spojitost mezi mutací HRI a rozvojem rakoviny plic.

Hlavním cílem experimentální části této bakalářské práce bylo získat dostatečné množství proteinu HRI a proteinu eIF2 α pro další experimenty. Pro tento účel byla vybrána metoda rekombinantní exprese v prokaryotním systému. Gen kódující protein HRI byl k dispozici v plasmidu pDNR-dual, který pro dané účely nebyl vhodný. Gen bylo nutné převést do jiného plasmidu, který by svými vlastnostmi vyhovoval pro další práci vedoucí k získání proteinu HRI (např. fúzní značka pro purifikaci, rezistence k antibiotiku). Prvním testovaným

plasmidem byl pET-21c(+). V genomu tohoto plasmidu se nachází nukleotidová sekvence, kódující polyhistidinovou skupinu, díky které je umožněna purifikace proteinu z bakterií pomocí afinitního nosiče [50]. Tento plasmid byl s výhodou použit pro expresi i dalších podobných proteinů v naší laboratoři [51] a dokonce i pro přípravu HRI [26,52]. Druhým zvažovaným plasmidem byl pMAL-c5E, který je využíván také pro expresi v prokaryotních systémech a obsahuje sekvenci pro fúzní protein vázající maltosu (MBP). MBP zvyšuje solubilitu proteinu v roztoku a tím i výtěžky při expresi a následné purifikaci [53]. Po přenesení genu HRI z plasmidu pDNR-dual do plasmidů pET-21c(+) a pMAL-c5E, byly oba plasmidy s geny HRI transformované do buněk *E. coli* DH5 α a tyto buňky převedeny na substrát obsahující antibiotikum (rezistence na antibiotikum byla zprostředkována plasmidem pET-21c(+) i plasmidem pMAL-c5E). Byl připraven i kontrolní substrát s antibiotikem na který byly nanесeny pouze buňky *E. coli* DH5 α . V případě, že by se na kontrolní plotně objevily kolonie, znamenalo by to, že buňky *E. coli* DH5 α byly kontaminovány a nemohou být dále používány. V našem případě byla tato negativní kontrola v pořádku a v experimentu bylo možno pokračovat. Příprava plasmidu pET-21c(+)/HRI proběhla úspěšně a celkem bylo získáno 0,012 mg daného materiálu. Naopak příprava plasmidu pMAL-c5E/HRI se nezdařila. Konkrétně, v případě substrátu s antibiotikem, na který byly nanесeny buňky *E. coli* DH5 α transformované plasmidem pMAL-c5E/HRI, „nevyrostly“ žádné kolonie buněk *E. coli*. V tomto případě se nezdařila buď transformace buněk *E. coli* DH5 α plasmidem pMAL-c5E/HRI nebo nebyla úspěšná ligace plasmidu pMAL-c5E s genem HRI. Jedna z možností, proč se nezdařila ligace, je nízká koncentrace genu HRI po restrikčním štěpením (7,3 ng/ μ l), který byl použit pro ligaci s plasmidem pMAL-c5E. Toto tvrzení je založeno na faktu, že v případě ligace genu HRI po restrikčním štěpením s plasmidem pET-21c(+), tedy v případě, kdy se ligace podařila, byla koncentrace genu 21,3 ng/ μ l, což je přibližně 3x víc než v případě ligace genu HRI s plasmidem pMAL-c5E. Další možností, proč jsme nepozorovali žádné kolonie buněk *E. coli* na substrátu s antibiotikem je, že neproběhla již restrikční reakce genu HRI po PCR reakci. Analýza produktů restrikčního štěpení genu HRI (obrázek 15, strana 52) pomocí horizontální agarosové elektroforesy, není v daném uspořádání schopna odhalit, zda bylo restrikční štěpení genu HRI po jeho amplifikaci pomocí PCR úspěšné, či nikoliv. „Štěpený“ úsek genu HRI se od „neštěpeného“ liší pouze v několika bázích. V případě, že by neproběhlo restrikční štěpení genu HRI, zůstaly by na obou koncích řetězce přesahy nukleotidů,

kteřé byly přidány při amplifikaci DNA během PCR. V tomto případě by nemohla proběhnout ligace, protože by insert genu nebyl komplementární s přesahy v plasmidu pMAL-c5E.

Gen pro eIF2 α byl, stejně jako gen kódující protein HRI, dodán v plasmidu pDNR-dual. Na základě předchozích zkušeností s expresí proteinu eIF2 α jsme usoudili, že není třeba k proteinu přidávat fúzní protein MBP, pro zvýšení výtěžku proteinu. Vybraným plasmidem pro další práci s eIF2 α byl tedy pouze pET-21c(+). Ten je určen pro prokaryotní expresi, kde výsledný protein je purifikován pomocí histidinové kotvy. Transformace *E. coli* DH5 α plasmidem pET-21c(+)/eIF2 α proběhla úspěšně. Na agarovém substrátu obsahující ampicilin jsme pozorovali vznik několika desítek kolonií. Negativní kontrola potvrdila, že během manipulace s buňkami *E. coli* DH5 α nedošlo k jejich kontaminaci. Celkem bylo získáno 0,01 mg plasmidu pET-21c(+)/eIF2 α .

Úspěšnost přípravy, amplifikace a izolace plasmidu pET-21c(+)/HRI i plasmidu pET-21c(+)/eIF2 α naznačila také finální sekvenace (data nejsou součástí předkládané bakalářské práce), která potvrdila přítomnost obou genů v nemutované podobě v daných plasmidech.

Exprese proteinu HRI byla prováděna v prokaryotním systému v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) [26,52]. Ve vzorku buněčné suspenze po indukci exprese byl detekován protein, který by svou mobilitou mohl odpovídat HRI a tento nebyl přítomný ve vzorku buněčné suspenze před indukcí (obrázek 18, strana 60 dráhy 2 a 3). Zároveň však vzorek buněčné suspenze po indukci exprese obsahoval i další bakteriální proteiny, takže tento výsledek nebyl jednoznačnou identifikací proteinu HRI po expresi a proto byly tyto vzorky dále analyzovány imunodetekcí zaměřenou na histidinovou kotvu, která je v rekombinantní molekule proteinu HRI přítomna. Avšak ani ve vzorku buněčné suspenze před indukcí exprese ani ve vzorku po indukci exprese nebyl identifikován protein obsahující histidinovou kotvu (obrázek 22, strana 66, dráhy 2 a 3). Toto mohlo být způsobeno mnoha faktory. Protein HRI byl v buňkách exprimován, ale neobsahoval histidinovou kotvu. Těto možnosti by odpovídala i pozitivní detekce proteinu na akrylamidovém gelu (obrázek 18, strana 60, dráhy 2 a 3). Nicméně tato situace se zdála velmi nepravděpodobná, jelikož pomocí kontrolního sekvenování plasmidu pET-21c(+)/HRI bylo prokázáno, že gen HRI na svém C-konci obsahoval sekvenci několika po sobě následujících histidinů. Druhou možností je, že protein HRI nebyl v buňkách vůbec

exprimován. Jelikož se podařilo protein HRI posléze z daných analyzovaných buněk BL-21(DE3) izolovat (výsledek byl potvrzen imunodetekcí histidinové kotvy ve finálním preparátu – viz dále), nepřítomnost signálu pro histidinovou kotvu v analyzovaném vzorku na nitrocelulosové membráně neznamená, že by v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) nedocházelo k expresi proteinu HRI, nicméně produkce proteinu HRI je pravděpodobně velmi nízká a použitá metoda imunodekce již nemá rozlišení takové nízké množství zaznamenat. Větší míry exprese proteinu HRI by bylo možné dostáhnout pomocí jiného expresního systému, například jeho produkcí v eukaryotních buňkách [54]. Další možností by bylo použití expresního vektoru s fúzním proteinem, zvyšující solubilitu proteinu [53] např. pMAL-c5E. Přenést gen do tohoto vektoru se však nepodařilo (viz. výše).

Veškeré kroky izolace proteinu HRI z buněk *E. coli* BL-21(DE3) byly prováděny za snížené teploty cca 7 °C za účelem snížení aktivity bakteriálních proteas. Navíc byly k resuspendačnímu pufru přidány inhibitory proteas aprotin (inhibitor serinových proteas) a pepstatin A (inhibitor aspartátových proteas) a leupeptin (inhibuje serinové, cysteinové a threoninové proteasy) [1]. Těmito opatřeními jsme se snažili minimalizovat aktivitu bakteriálních proteas a zabránit tak „štěpení“ proteinu HRI těmito enzymy a zvýšit tak výtěžek proteinu HRI [52]. Na výsledných akrylamidových gelech, (obrázek 19, strana 63 a obrázek 21, strana 65) a nitrocelulosových membránách (obrázek 22, strana 66 a obrázek 23, strana 67) je patrné, že ve vzorcích, kde je s největší pravděpodobností přítomen protein HRI, se vyskytují i další proteiny. Nejvíce intenzivní jsou signály těchto balastních proteinů ve finálním vzorku (obrázek 21, strana 65 dráha 12 a obrázek 23, strana 67 dráha 12). Velikost proteinu HRI je 71 kDa [32]. Jeden ze tří balastních proteinů má vyšší molekulovou hmotnost než HRI (má nižší mobilitu na SDS elektroforese než HRI). Může se jednat o protein HRI, na který jsou navázány další molekuly, jako např. chaperony [55]. V případě dalších dvou balastních proteinů s molekulovou hmotností menší než HRI, se může jednat o fragment proteinu HRI, který vznikl působením bakteriálních proteas od N-konce proteinu. Předpokládáme, že protein HRI je štěpen od N-konce proteinu, protože na C-konci proteinu je histidinová kotva, která je detekována pomocí protilátek a kdyby byla odštěpena, tak by se neprojevil signál pomocí imunodekce histidinové kotvy. Tomuto bakteriálnímu štěpení by mohlo být zabráněno umístěním histidinové kotvy na N-konec proteinu namísto C-konce. Je také velmi důležité zjistit, v jaké míře dochází ke působení proteas již během exprese. Bylo by vhodné vyzkoušet, zda snížení

teploty během exprese proteinu nepovede k výraznému snížení aktivity bakteriálních proteas, a tedy vyšším výtěžkům. Balastní proteiny ve vzorku finálního preparátu však nemusí mít svůj původ jen v působení proteas na HRI. Další možností je přítomnost bakteriálních proteinů, které mají ve své aminokyselinové sekvenci několik za sebou následujících histidinů, a tudíž interagovaly s afinitním nosičem během afinitní chromatografie a také byly detekovány pomocí protilátek proti histidinové kotvě.

Koncentrace proteinů finálního vzorku HRI určena metodou využívající bicinchoninovou kyselinu v reakčním činidle (na základě porovnání se standardem, kterým byl BSA) byla 0,6 mg/ml a pomocí přímého spektrofotometrického stanovení se znalostí teoretického extinkčního koeficientu pro HRI při A_{280} byla 0,5 mg/ml. Rozdíl v koncentracích určených dvěma různými metodami je poměrně malý, ale i přesto není možné jednoznačně posoudit, která z obou metod je správnější a výsledek tudíž relevantnější. V případě metody, kdy stanovujeme koncentraci proteinu s využitím standardu BSA je nutné sestavit kalibrační křivku a jak manuální pipetování, tak riziko odlišných vlastností použitého standardu vnáší riziko chyby a nepřesností určení koncentrace. V případě použití spektrofotometrického stanovení pro přímé učení A_{280} je velká pravděpodobnost chybování při určení teoretického extinkčního koeficientu [56]. Z těchto důvodů byl vypočítán průměr z hodnot koncentrací proteinů ve výsledném preparátu určených oběma metodami. Finální koncentrace preparátu HRI je 0,55 mg/ml. Výtěžek je tedy 0,2 mg HRI z 20,3 g buněk a 4 l media. I přes přítomnost balastních proteinů ve finálním preparátu HRI lze konstatovat, že purifikace proběhla úspěšně a preparát obsahuje více než 60 % cílového proteinu HRI. Při dalších izolacích HRI lze homogenitu purifikovaného preparátu HRI zvýšit přidáním některých dalších izolačních kroků, například vysolováním cílového proteinu síranem amonným, jak bylo využito v jiných izolačních postupech [26]. Tímto krokem pravděpodobně došlo odstranění bakteriálních proteas již v počátku purifikace. Tento proces by ale mohl zapříčinit další ztráty proteinu HRI, jehož exprese je velmi malá a z těchto důvodů nebylo vysolování cílového proteinu v této bakalářské práci použito.

Také protein eIF2 α byl exprimován v prokaryotním systému v buňkách *E. coli* BL-21(DE3). Na výsledném akrylamidovém gelu, který obsahuje vzorky bakteriálních suspenzí před a po indukci (obrázek 24, strana 69 dráhy 2 a 3) je vidět, že po přidání indukčního činidla IPTG, dochází k masivnímu nárůstu exprese proteinu eIF2 α (pruh odpovídající mobilitě přibližně 36 kDa). Zdá se, že před přidáním indukčního činidla (obrázek 24, strana 69, dráha 2)

není v buňkách přítomný žádný protein o velikosti 36 kDa, který by odpovídal expresi proteinu eIF2 α . Z výsledků imunodetekce histidinové kotvy (obrázek 28, strana 74) vyplývá, že k expresi proteinu eIF2 α docházelo již před přidáním IPTG (obrázek 28, strana 74, dráha 2). Jednalo se tak pravděpodobně o bazální expresi proteinu eIF2 α bakteriemi *E. coli*. Na rozdíl od proteinu HRI, byl tento protein exprimován v prokaryotním systému velmi dobře.

Izolace proteinu eIF2 α z buněk *E. coli* BL-21(DE3) byla prováděna za snížené teploty cca 7 °C. S ohledem na výtěžky exprese publikovaných v [26] zde nebylo nutné přidávat inhibitory proteas pro zvýšení výtěžku. Z výsledků imunodetekce histidinové kotvy, (obrázek 28, strana 74 a obrázek 29, strana 75) můžeme indikovat, že výsledný protein není purifikován ve 100% čistotě. Ve finálním preparátu je přítomno několik balastních proteinů (obrázek 27, strana 73, dráha 2). Mimo signálu v oblasti kolem 36 kDa, který odpovídá pravděpodobně proteinu eIF2 α , jsou zde i dva signály odpovídající proteinům o nižší molekulové hmotnosti, než má eIF2 α . Tyto signály by mohly odpovídat buď bakteriálním proteinům, které mají polyhistidinovou sekvenci, nebo tyto signály mohou souviset s působením bakteriálních proteas na N-konci eIF2 α . Nicméně i přes to byl výtěžek izolace eIF2 α vysoký. Čistota, respektive homogenita finálního preparátu eIF2 α byla více než 80 %. Stejně jako v případě HRI také pro stanovení koncentrace eIF2 byly použity dvě nezávislé metody a za relevantní považujeme průměr daných hodnot. Koncentrace finálního preparátu eIF2 α byla 1,85 mg/ml. Výtěžek je tedy 0,8 mg eIF2 α z 23,5 g buněk a 4 l media. Výtěžek proteinu eIF2 α je cca 4x vyšší než u proteinu HRI.

Pilotní charakterizace obou získaných preparátů s ohledem na jejich teplotní stabilitu přinesla důležité informace nezbytné pro správné uchovávání proteinů před dalšími experimenty. Jako nejvhodnější způsob uskladnění proteinu eIF2 α (obrázek 31, strana 78) se jeví pomalé a plynulé vystavení proteinu teplotě -20 °C. Naopak, při rychlém podchlazení preparátu např. kapalným dusíkem a následném uložení v -80 °C docházelo ke ztrátám a znehodnocení proteinu. Lze se domnívat, že v případě rychlého vystavení kapalnému dusíku dochází k degradaci proteinu eIF2 α . Při uchovávání v lednici, tedy při teplotě cca 7 °C docházelo k degradaci, ale mnohem pomaleji než v případě uchovávání při laboratorní teplotě. Při laboratorní teplotě došlo během 3 dní k téměř úplné degradaci proteinu eIF2 α . V případě uchovávání v lednici byla degradace mnohem pomalejší, ale přesto k ní docházelo a je

pravděpodobné, že za určitou dobu dojde k úplné degradaci jako v případě uchovávání při laboratorní teplotě. Je možné, že k degradaci dochází i v případě uchovávání v -20 °C, ale za dobu tři dní nebyla tak výrazná abychom jí byli schopni použitou metodou detekovat.

Protein HRI se nepodařilo detekovat (obrázek 30, strana 77) v žádném vzorku připraveném za účelem zkoumání tepelné stability. Jeden z důvodů je, že protein HRI byl uchován po purifikaci v „nezakoncentrovaném“ stavu při 7 °C z důvodů dalších analýz a došlo tak k jeho předčasné degradaci. V tomto případě by bylo vhodnější skladování při -80 °C poté, co byl preparát vystaven krátkému působení kapalného dusíku, tak jak uchováváme většinu dalších rekombinantních proteinů s kterými v naší laboratoři pracujeme [51]. Druhým z důvodů je, že množství proteinu HRI získané izolací z buněk *E. coli* bylo velmi malé a pravděpodobně pro tento experiment je potřeba použít větší množství proteinu.

6 Závěr

Předkládaná bakalářská práce se zabývá studiem hemových sensorových proteinů, konkrétně modelovým eukaryotickým senzorem HRI. Stanovené cíle této bakalářské práce byly naplněny. Konkrétně bylo dosaženo následujících výsledků:

1. Na stranách 11 – 27 je provedena rešerše dosavadních výsledků vědeckých studií, týkajících se daného tématu.
2. Byl úspěšně připraven, amplifikován a izolován plasmid pET-21c(+)/HRI. V celkovém objemu 100 μ l bylo získáno 12,6 μ g dané plasmidové DNA ve 2 paralelních vzorcích.
3. Byl úspěšně připraven, amplifikován a izolován plasmid pET-21c(+)/eIF2 α . V celkovém objemu 100 μ l bylo získáno 10,1 μ g dané plasmidové DNA ve 2 paralelních vzorcích.
4. Navzdory tomu, že ani SDS elektroforesa ani imunodetekce histidinové kotvy obsažené v rekombinantním proteinu HRI neprokázaly úspěšnost exprese proteinu HRI v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) po indukci IPTG, přistoupili přesto jsme k izolaci tohoto proteinu z daných buněk. Ukázalo, že i přes výše uvedené problémy s detekcí proteinu HRI, byla exprese úspěšná. Z celkového objemu 4 l TB media bylo získáno 20,3 g buněk *E. coli* BL-21(DE3), pravděpodobně obsahující exprimovaný protein HRI.
5. Pomocí SDS elektroforesy a imunodetekce polyhistidinové sekvence obsažené v rekombinantním proteinu eIF2 α byla potvrzena úspěšnost exprese proteinu eIF2 α v buňkách *E. coli* BL-21(DE3) po indukci IPTG. Z celkového objemu 4 l TB media bylo získáno 23,5 g buněk *E. coli* BL-21(DE3), které obsahovaly exprimovaný protein eIF2 α .
6. Ze 20,3 g buněk *E. coli* BL-21(DE3) s exprimovaným proteinem HRI byl tento protein úspěšně izolován a jeho čistota byla více než 60 %, což bylo potvrzeno pomocí SDS elektroforesy. Koncentrace finálního preparátu byla 7,7 μ M (celkový výtěžek 0,2 mg HRI).
7. Ze 23,5 g buněk *E. coli* BL-21(DE3) s exprimovaným proteinem eIF2 α byl tento protein úspěšně izolován a jeho čistota byla více než 80 %, což bylo potvrzeno pomocí SDS elektroforesy. Koncentrace finálního preparátu byla 51,3 μ M (celkový výtěžek 0,8 mg eIF2 α).
8. V rámci pilotní charakterizace izolovaných proteinů byla sledována jejich teplotní stabilita s ohledem na optimalizaci metody skladování.

7 Seznam použitých zdrojů

1. Voet, D., Voet, J.G.: Biochemistry, John Wiley & Sons, 2011
2. Shemin, D., Russell, C.S., Abramsky, T. (1955) The succinate-glycine cycle. I. The mechanism of pyrrole synthesis. *J. Biol. Chem.* **215**, 613–26.
3. Kolektiv autorů: Biochemie - základní kurz, Nakladatelství Karolinum, Praha, 2009
4. Mička, Z.: Teoretické základy anorganické chemie, Nakladatelství Karolinum, Praha, 2009
5. Greer, J. (1985) Hemoglobin by R. E. Dickerson and I. Geis. *Acta Crystallogr. B* **41**, 375–375.
6. Rossmann, M.G. (1982) Atlas of molecular structures in biology. Vol. 2. Haemoglobin and myoglobin by G. Fermi and M. F. Perutz. *Acta Crystallogr. B* **38**, 2096–97.
7. Kendrew, J.C., Bodo, G., Dintzis, H.M., Parrish, R.G., Wyckoff, H., Phillips, D.C. (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* **181**, 662–66.
8. Peake, I. (1988) The Molecular Basis of Blood Diseases. *J. Med. Genet.* **25**, 789–90.
9. Igarashi, J., Kitanishi, K., Martinkova, M., Murase, M., Iizuka, A., Shimizu, T. (2007) The Roles of Thiolate-Heme Proteins, Other Than the P450 Cytochromes, in the Regulation of Heme-Sensor Proteins. *Acta Chim Slov* **55**.
10. Igarashi, J., Kitanishi, K., Shimizu, T. (2011) in *Handbook of Porphyrin Science (Volume 15) With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine* (World Scientific), s 399–460.
11. Miksanova, M., Igarashi, J., Minami, M., Sagami, I., Yamauchi, S., Kurokawa, H., Shimizu, T. (2006) Characterization of heme-regulated eIF2alpha kinase: roles of the N-terminal domain in the oligomeric state, heme binding, catalysis, and inhibition. *Biochemistry (Mosc.)* **45**, 9894–9905.
12. Hargrove, M.S., Singleton, E.W., Quillin, M.L., Ortiz, L.A., Phillips, G.N., Olson, J.S., Mathews, A.J. (1994) His64(E7)-->Tyr apomyoglobin as a reagent for measuring rates of heme dissociation. *J. Biol. Chem.* **269**, 4207–14.
13. Zhang, L., Guarente, L. (1995) Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. *EMBO J.* **14**, 313–20.
14. Igarashi, J., Murase, M., Iizuka, A., Pichierri, F., Martinkova, M., Shimizu, T. (2008) Elucidation of the heme binding site of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase and the role of the regulatory motif in heme sensing by spectroscopic and catalytic studies of mutant proteins. *J. Biol. Chem.* **283**, 18782–91.
15. Pain, V.M. (1996) Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* **236**, 747–71.
16. Kimball, S.R. (1999) Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 25–29.

17. Welsh, G.I., Price, N.T., Bladergroen, B.A., Bloomberg, G., Proud, C.G. (1994) Identification of Novel Phosphorylation Sites in the β -Subunit of Translation Initiation Factor eIF-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 1279–88.
18. Das, S., Maiti, T., Das, K., Maitra, U. (1997) Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) with the beta-subunit of eIF2. *J. Biol. Chem.* **272**, 31712–18.
19. Kimball, S.R., Heinzinger, N.K., Horetsky, R.L., Jefferson, L.S. (1998) Identification of Interprotein Interactions between the Subunits of Eukaryotic Initiation Factors eIF2 and eIF2B. *J. Biol. Chem.* **273**, 3039–44.
20. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000) *Molecular Cell Biology* (W. H. Freeman). 4th Vyd.
21. Wek, R.C., Jiang, H.-Y., Anthony, T. (2006) *Wek RC, Jiang HY, Anthony TG. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. Biochem Soc Trans* 34:7-11.
22. Chesnokova, E., Bal, N., Kolosov, P. (2017) Kinases of eIF2a Switch Translation of mRNA Subset during Neuronal Plasticity. *Int. J. Mol. Sci.* **18**.
23. Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V. (2010) The mechanisms of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 113–27.
24. Baird, T.D., Wek, R.C. (2012) Eukaryotic Initiation Factor 2 Phosphorylation and Translational Control in Metabolism. *Adv. Nutr.* **3**, 307–21.
25. Wek, R.C., Jiang, H.-Y., Anthony, T. (2006) *Wek RC, Jiang HY, Anthony TG. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. Biochem Soc Trans* 34:7-11.
26. Miksanova, M., Igarashi, J., Minami, M., Sagami, I., Yamauchi, S., Kurokawa, H., Shimizu, T. (2006) Characterization of heme-regulated eIF2 α kinase: roles of the N-terminal domain in the oligomeric state, heme binding, catalysis, and inhibition. *Biochemistry (Mosc.)* **45**, 9894–9905.
27. Wek, S.A., Zhu, S., Wek, R.C. (1995) The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 α protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4497–4506.
28. Donnelly, N., Gorman, A.M., Gupta, S., Samali, A. (2013) The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **70**, 3493–3511.
29. Taniuchi, S., Miyake, M., Tsugawa, K., Oyadomari, M., Oyadomari, S. (2016) Integrated stress response of vertebrates is regulated by four eIF2 α kinases. *Sci. Rep.* **6**.
30. Jiang, H.-Y., Wek, R.C. (2005) Phosphorylation of the α -subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2 α) reduces protein synthesis and enhances apoptosis in response to proteasome inhibition. *J. Biol. Chem.* **280**, 14189–14202.
31. Ohno, M. (2017) PERK as a hub of multiple pathogenic pathways leading to memory deficits and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* .
32. ExPASy - ProtParam URL: <https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam?Q9BQI3-2> [Viděno březem 1, 2018].
33. Crosby, J.S., Lee, K., London, I.M., Chen, J.J. (1994) Erythroid expression of the heme-regulated eIF-2 α kinase. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3906–14.
34. Chen, J.J., London, I.M. (1995) Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2 α kinase. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 105–8.

35. Berlanga, J.J., Herrero, S., Haro, C. de (1998) Characterization of the Hemin-sensitive Eukaryotic Initiation Factor 2 α Kinase from Mouse Nonerythroid Cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 32340–46.
36. Rafie-Kolpin, M., Chefalo, P.J., Hussain, Z., Hahn, J., Uma, S., Matts, R.L., Chen, J.-J. (2000) Two Heme-binding Domains of Heme-regulated Eukaryotic Initiation Factor-2 α Kinase n terminus and kinase insertion. *J. Biol. Chem.* **275**, 5171–78.
37. Igarashi, J., Sato, A., Kitagawa, T., Yoshimura, T., Yamauchi, S., Sagami, I., Shimizu, T. (2004) Activation of Heme-regulated Eukaryotic Initiation Factor 2 α Kinase by Nitric Oxide Is Induced by the Formation of a Five-coordinate NO-Heme Complex optical absorption, electron spin resonance, and resonance raman spectral studies. *J. Biol. Chem.* **279**, 15752–62.
38. Yoshimura, T., Sagami, I., Sasakura, Y., Shimizu, T. (2003) Relationships between Heme Incorporation, Tetramer Formation, and Catalysis of a Heme-regulated Phosphodiesterase from *Escherichia coli* a study of deletion and site-directed mutants. *J. Biol. Chem.* **278**, 53105–11.
39. Molecular basis of bilirubin-induced neurotoxicity: Trends in Molecular Medicine <http://www.cell.com/trends/molecular-medicine/fulltext/> [Viděno březem 2, 2018].
40. Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–30.
41. pMAL-c5E Sequence and Map http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pMAL-c5E/ [Viděno květen 19, 2018].
42. Bartlett, J.M.S., Stirling, D. (2003) in *PCR Protocols*, Methods in Molecular Biology™. (Humana Press), s 3–6.
43. Harvard PlasmID Database <https://plasmid.med.harvard.edu/PLASMID/Home.xhtml> [Viděno duben 20, 2018].
44. Production of Membrane Proteins: Strategies for Expression and Isolation <https://www.wiley.com/en/us/Production+of+Membrane+Proteins%3A+Strategies+for+Expression+and+Isolation-p-9783527327294> [Viděno duben 15, 2018].
45. Sivashanmugam, A., Murray, V., Cui, C., Zhang, Y., Wang, J., Li, Q. (2009) Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **18**, 936–48.
46. Chen, J.-J. (2007) Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2 α kinase: relevance to anemias. *Blood* **109**, 2693–99.
47. Han, A.-P., Yu, C., Lu, L., Fujiwara, Y., Browne, C., Chin, G., Fleming, M., Leboulch, P., Orkin, S.H., Chen, J.-J. (2001) Heme-regulated eIF2 α kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. *EMBO J.* **20**, 6909–18.
48. Han, A.-P., Fleming, M.D., Chen, J.-J. (2005) Heme-regulated eIF2 α kinase modifies the phenotypic severity of murine models of erythropoietic protoporphyria and β -thalassemia. *J. Clin. Invest.* **115**, 1562–70.
49. Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., Edkins, S., O'Meara, S., Vastrik, I., Schmidt, E.E., Avis, T., Barthorpe, S., Bhamra, G., Buck, G., Choudhury, B., Clements, J., Cole, J., Dicks, E., Forbes, S., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Hinton, J.,

- Jenkinson, A., Jones, D., et al. (2007) Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* **446**, 153–58.
50. Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R., Stüber, D. (1988) Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. *Nat. Biotechnol.* **6**, 1321–25.
51. Fojtikova, V., Stranova, M., Vos, M.H., Liebl, U., Hranicek, J., Kitanishi, K., Shimizu, T., Martinkova, M. (2015) Kinetic Analysis of a Globin-Coupled Histidine Kinase, AfGcHK: Effects of the Heme Iron Complex, Response Regulator, and Metal Cations on Autophosphorylation Activity. *Biochemistry (Mosc.)* **54**, 5017–29.
52. Zhan, K., Vattem, K.M., Bauer, B.N., Dever, T.E., Chen, J.-J., Wek, R.C. (2002) Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 2 by Heme-Regulated Inhibitor Kinase-Related Protein Kinases in *Schizosaccharomyces pombe* Is Important for Resistance to Environmental Stresses. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7134–46.
53. di Guana, C., Lib, P., Riggsa, P.D., Inouyeb, H. (1988) Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**, 21–30.
54. Khan, K.H. (2013) Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications. *Adv. Pharm. Bull.* **3**, 257–63.
55. Mukai, K., Shimizu, T., Igarashi, J. (2011) Phosphorylation of a heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α kinase enhances the interaction with heat-shock protein 90 and substantially upregulates kinase activity. *Protein Pept. Lett.* **18**, 1251–57.
56. Gill, S.C., von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319–26.